

紫铆因通过激活SIRT1介导FOXO1/NF- κ B信号通路改善坐骨神经损伤

车敏, 张辉

(沈阳医学院附属中心医院手外一科, 沈阳 110024)

摘要 **目的** 探讨紫铆因诱导SIRT1激活对大鼠坐骨神经损伤的影响及其可能的机制。**方法** 将30只大鼠随机分为假手术组、坐骨神经损伤组和紫铆因组, 每组10只。分别于建立大鼠坐骨神经损伤模型手术当天、术后第7天和第14天检测各组大鼠BBB运动评分和坐骨神经功能指数; 术后第14天取材, 通过HE染色观察各组大鼠坐骨神经病理学改变, 通过TUNEL实验检测各组大鼠坐骨神经细胞凋亡水平, 通过Western blotting检测各组大鼠坐骨神经BDNF、MBP、GAP-43、SIRT1、FOXO1、Keap1和NF- κ B蛋白表达水平。**结果** 与坐骨神经损伤组大鼠相比, 紫铆因组坐骨神经损伤大鼠BBB运动评分和坐骨神经功能指数增加, 坐骨神经病理损伤改善, 坐骨神经细胞凋亡水平降低, 坐骨神经BDNF、MBP、GAP-43和SIRT1蛋白表达水平增高, FOXO1、Keap1和NF- κ B蛋白表达水平降低。**结论** 紫铆因可通过上调坐骨神经损伤大鼠SIRT1表达抑制FOXO1/NF- κ B信号通路激活, 继而改善大鼠坐骨神经病理损伤。

关键词 紫铆因; 坐骨神经损伤; 沉默信息调节因子2相关酶1; FOXO1/NF- κ B信号通路

中图分类号 R745.4 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)02-0102-06

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240109.1248.002>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2024.02.002

Butein ameliorates sciatic nerve injury by activating SIRT1 and mediating the FOXO1/NF- κ B signaling pathway

CHE Min, ZHANG Hui

(The First Department of Hand Surgery, Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China)

Abstract **Objective** This study aimed to explore the effect and possible mechanism of SIRT1 activation induced by butein on sciatic nerve injury in rats. **Methods** A total of 30 rats were randomly divided into a sham operation group, a sciatic nerve injury group, and a butein group, with 10 rats in each group. BBB motor scores and sciatic nerve function index were detected on the modeling surgery day, the 7th day after surgery, and the 14th day after surgery. The pathological changes of the sciatic nerve in each group were observed by HE staining. The apoptosis of sciatic nerve cells in each group was detected by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The expression of BDNF, MBP, GAP-43, SIRT1, FOXO1, Keap1, and NF- κ B in the sciatic nerve was detected by Western blotting. **Results** Butein improved the pathological injury of the sciatic nerve, reduced the apoptosis of sciatic nerve cells, increased BDNF, MBP, GAP-43, and SIRT1 expression, and decreased FOXO1, Keap1, and NF- κ B expression in the sciatic nerve. **Conclusion** Butein can inhibit FOXO1/NF- κ B signaling pathway activation by up-regulating SIRT1 expression in rats with sciatic nerve injury and then improve the sciatic nerve pathological injury in rats.

Keywords butein; sciatic nerve injury; SIRT1; FOXO1/NF- κ B signaling pathway

周围神经损伤(peripheral nerve injury, PNI)后神经的再生与功能恢复是一个涉及多机制的复杂过程^[1]。随着细胞生物学与分子生物学研究的不断

深入, 临床已采用药物治疗、自体或异体神经移植、神经导管或支架及基因治疗等多种方法和手段治疗PNI, 然而, 即使患者经过较为科学的治疗, 仍会留下程度不一的后遗症^[2-3]。因此, 深入研究神经损伤后的病理机制、寻求新的治疗靶点, 以及开发有效的治疗新药物仍是亟待解决的问题。紫铆因是沉默信息调节因子2相关酶1(silence information regulator factor 2 related enzyme 1, SIRT1)的激活剂, 具有抗氧化、抗炎、抗癌、抗糖尿病、降压和神经保护等广

基金项目: 国家自然科学基金(8197080581); 辽宁省自然科学基金(2020-MS-146); 辽宁省高校基本科研项目(LJKMZ20221781)

作者简介: 车敏(1982-), 男, 副教授, 博士。

通信作者: 张辉, E-mail: 59526543@qq.com

收稿日期: 2023-05-08

网络出版时间: 2024-01-10 16:01:47

泛的药理作用。研究^[4]发现,紫铆因能有效地防止谷氨酸诱导的氧化损伤和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的炎症激活,这可能与其通过磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号通路诱导血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)和核因子E2相关因子2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)激活有关。然而,关于紫铆因是否可作为改善PNI的潜在治疗药物目前尚无研究。本研究通过建立大鼠坐骨神经损伤模型,探究紫铆因对坐骨神经损伤大鼠神经损伤的改善作用及其潜在机制,为其作为PNI的潜在治疗药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

HE染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;TUNEL细胞凋亡检测试剂盒、RIPA裂解液、BCA试剂盒和ECL化学发光试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;BDNF、MBP、GAP-43、SIRT1、FOXO1、Keap1和核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司。光学显微镜购自日本奥林巴斯公司;荧光显微镜购自日本尼康公司;酶标仪购自美国Thermo公司;全自动化学发光分析系统购自上海天能科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组、处理及取材:雄性SD大鼠,6月龄,体质量(250 ± 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。将30只大鼠随机分为假手术组、坐骨神经损伤组和紫铆因组,每组10只。造模前24 h禁食水。腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉,将坐骨神经损伤组大鼠俯卧位固定,于右侧髌骨与股骨交界处碘伏消毒并备皮,沿坐骨神经走向切开约1 cm,钝性分离肌肉层,充分暴露梨状肌下缘,找到坐骨神经后,用止血钳在坐骨神经远端5 mm处夹持5 s,力度满扣(6 N),制造损伤点。生理盐水冲洗,消毒,缝合切口。假手术组按上述操作找到坐骨神经后,消毒并缝合伤口。紫铆因组除按上述方法^[5]造模外,每日灌胃给予紫铆因100 mg/kg。造模手术后14 d,腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,取出右侧坐骨神经,一部分置于4%多聚甲醛,其余部分置于-80 °C冻存。本研究获得中国医科大学动物伦理委员会批

准。

1.2.2 Basso、Beattie、Bresnahan(BBB)运动评分:分别于手术当天、手术后第7天和第14天,采用双盲法对各组大鼠行BBB运动评分。根据评分规则,观察4 min内各组大鼠的运动情况,无自发运动记为0分,正常运动记为21分,达到14分即表示肢体可支撑和四肢运动协调。

1.2.3 坐骨神经功能指数(sciatic nerve function index, SFI):分别于手术当天、手术后第7天和第14天,以SFI评价坐骨神经损伤后的功能恢复情况。将大鼠双侧后足沾墨水后,使其在通道内行走并留下足印。测量损伤(experimental, E)侧及正常(normal, N)侧足印,记录足印长度(print length, PL)、第1足趾到第5足趾的距离(toe spread, TS)、第2足趾到第4足趾的距离(intermediary toe spread, IT)。计算 $SFI = 109.5 \times (ETS - NTS) / NTS - 38.3 \times (EPL - NPL) / NPL + 13.3 \times (EIT - NIT) / NIT - 8.8$ 。SFI正常值为0,神经功能损伤后为负值,功能完全丧失为-100。

1.2.4 HE染色及TUNEL实验:坐骨神经组织经4%多聚甲醛固定、梯度乙醇脱水、二甲苯透明和石蜡包埋,制作厚约5 μ m切片。严格按照试剂盒说明书进行HE染色及TUNEL实验。

1.2.5 Western blotting:取冻存于-80 °C的各组大鼠坐骨神经组织,用RIPA裂解液提取组织总蛋白,BCA法定量蛋白。上样行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭,加入BDNF、MBP、GAP-43、SIRT1、FOXO1、Keap1和NF- κ B抗体(1:1 000稀释),4 °C孵育过夜。PBST洗膜3次,二抗室温孵育1 h, PBST洗膜3次, ECL化学发光,使用ImageJ软件进行灰度分析。

1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析。计量资料均符合正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,并采用事后检验Tukey法进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 紫铆因对坐骨神经损伤大鼠BBB运动评分和SFI的影响

手术当天和术后第7天,坐骨神经损伤组大鼠BBB运动评分较假手术组显著降低($P < 0.05$),紫铆

因组与坐骨神经损伤组大鼠BBB运动评分比较无统计学差异 ($P > 0.05$)；术后第14天,坐骨神经损伤组大鼠BBB运动评分较假手术组显著降低 ($P < 0.05$),紫柳因组大鼠BBB运动评分较坐骨神经损伤组显著升高 ($P < 0.05$)。

手术当天,坐骨神经损伤组大鼠SFI较假手术

组显著降低 ($P < 0.05$),紫柳因组SFI与坐骨神经损伤组比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。术后第7天和第14天,坐骨神经损伤组大鼠SFI较假手术组显著降低 ($P < 0.05$),紫柳因组大鼠SFI较坐骨神经损伤组显著升高 ($P < 0.05$)。见表1。

2.2 紫柳因对坐骨神经损伤大鼠坐骨神经病理学

表1 3大鼠BBB运动评分和坐骨神经功能指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of BBB motor score and sciatic nerve function index in rats ($\bar{x} \pm s$)

Item	Sham group	Model group	Butein group
Score of BBB scale			
0 d	21.0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
7 d	21.0 ± 0	7.1 ± 1.10 ¹⁾	10.6 ± 1.34 ¹⁾
14 d	21.0 ± 0	8.5 ± 0.70 ¹⁾	15.4 ± 1.17 ^{1),2)}
Sciatic nerve function index			
0 d	0 ± 0	-89.8 ± 6.87 ¹⁾	-90.7 ± 5.53 ¹⁾
7 d	-5.7 ± 1.85	-77.3 ± 5.75 ¹⁾	-66.2 ± 3.67 ¹⁾
14 d	-2.6 ± 1.17	-63.8 ± 4.87 ¹⁾	-40.1 ± 3.90 ^{1),2)}

1) $P < 0.05$ vs. sham group; 2) $P < 0.05$ vs. model group.

改变的影响

如图1所示,假手术组大鼠神经髓鞘完整,无炎症细胞浸润;坐骨神经损伤组大鼠神经髓鞘崩解变

性坏死,纤维几乎被炎症细胞占据;紫柳因组大鼠神经髓鞘变性改善,纤维炎性细胞减少。

2.3 紫柳因对坐骨神经损伤大鼠坐骨神经细胞凋

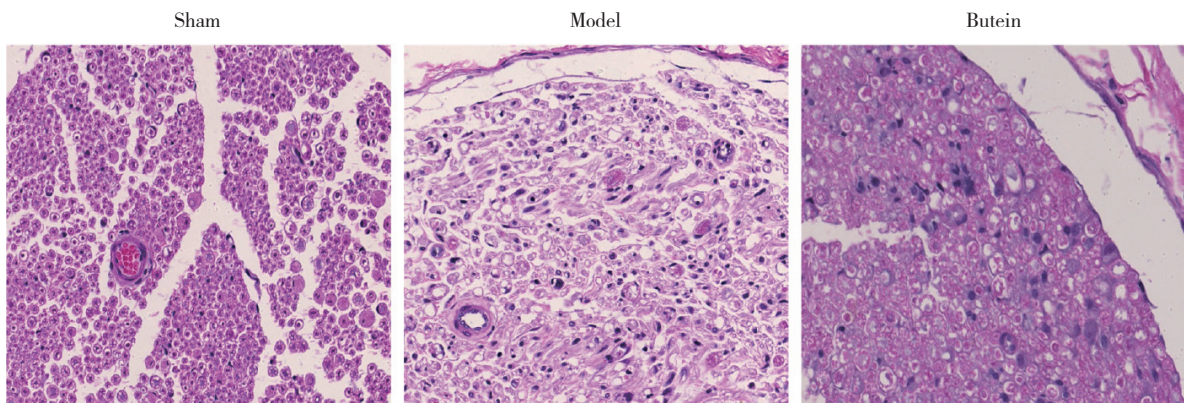


图1 各组大鼠坐骨神经病理损伤情况 HE × 400

Fig.1 Pathological damage of the sciatic nerve in each group of rats HE × 400

亡的影响

TUNEL结果如图2所示,坐骨神经损伤组大鼠坐骨神经近侧断端细胞凋亡率 [(42.5 ± 6.72)%] 较假手术组 [(3.8 ± 0.56)%] 显著升高 ($P < 0.05$),紫柳因组大鼠坐骨神经近侧断端细胞凋亡率 [(17.6 ± 2.25)%] 较坐骨神经损伤组显著降低 ($P < 0.05$)。

2.4 紫柳因对坐骨神经损伤大鼠坐骨神经细胞再生相关蛋白表达的影响

如图3所示,与假手术组比较,坐骨神经损伤组大鼠坐骨神经近侧断端BDNF、MBP和GAP-43蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$);与坐骨神经损伤组比较,紫柳因组大鼠坐骨神经近侧断端BDNF、MBP和

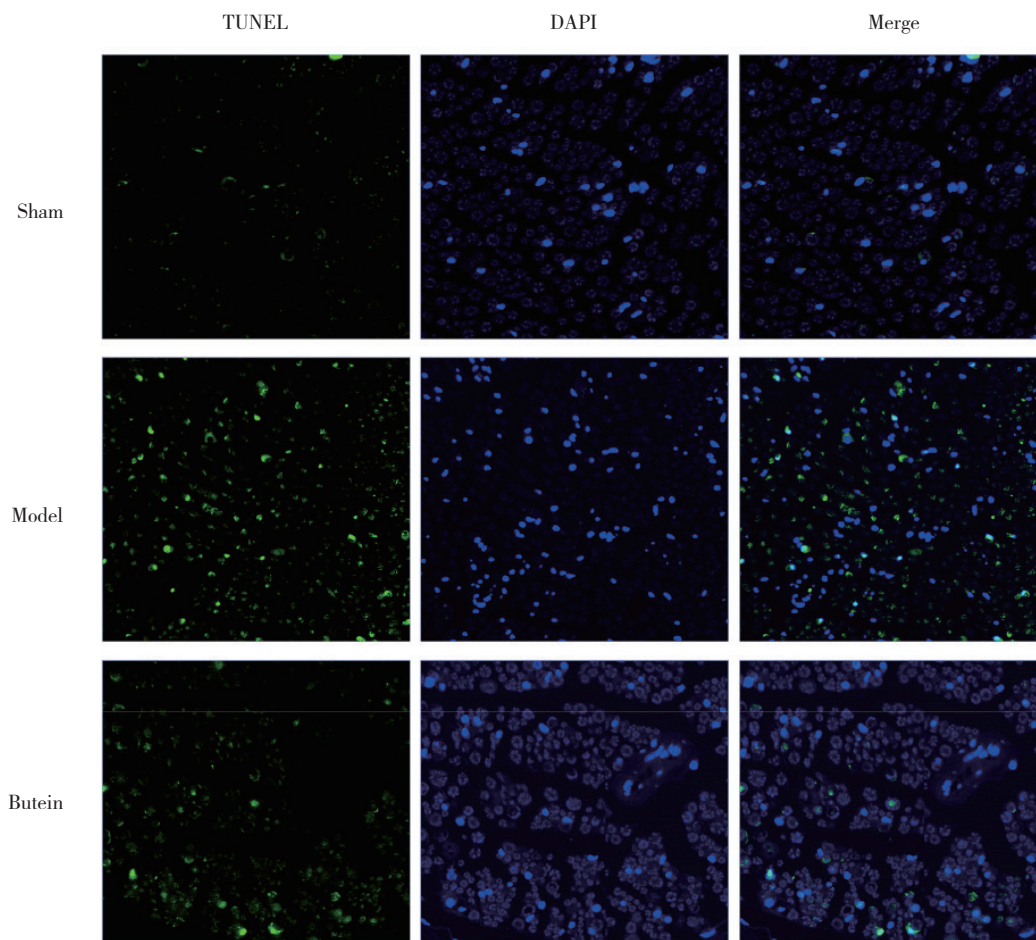
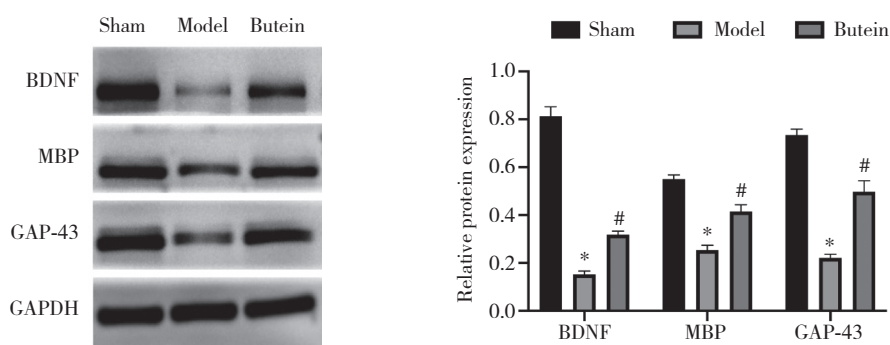


图2 各组大鼠坐骨神经细胞凋亡情况 ×200

Fig.2 Apoptosis of sciatic nerve cells in each group of rats ×200



* $P < 0.05$ vs. sham group; # $P < 0.05$ vs. model group.

图3 各组大鼠坐骨神经细胞再生相关蛋白表达情况

Fig.3 Regeneration-related protein expression of sciatic nerve cells in each group of rats

GAP-43蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

2.5 紫柳因对坐骨神经损伤大鼠坐骨神经SIRT1表达的影响

如图4所示,与假手术组比较,坐骨神经损伤组大鼠坐骨神经近侧断端SIRT1蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$);与坐骨神经损伤组比较,紫柳因组大

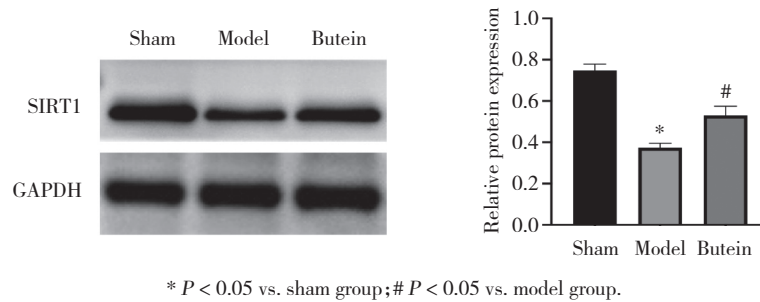
鼠坐骨神经近侧断端SIRT1蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

2.6 紫柳因对坐骨神经损伤大鼠坐骨神经FOXO1/NF-κB信号通路的影响

如图5所示,与假手术组比较,坐骨神经损伤组大鼠坐骨神经近侧断端FOXO1、Keap1和NF-κB蛋白

表达水平显著升高 ($P < 0.05$) ;与坐骨神经损伤组比较,紫柳因组大鼠坐骨神经近侧断端FOXO1、Keap1

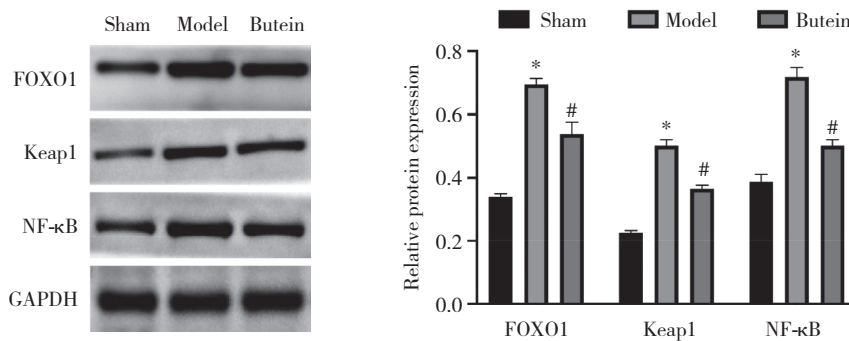
和NF- κ B蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$) 。



* $P < 0.05$ vs. sham group; # $P < 0.05$ vs. model group.

图4 各组大鼠坐骨神经SIRT1表达情况

Fig.4 Expression of SIRT1 in the sciatic nerve of rats in each group



* $P < 0.05$ vs. sham group; # $P < 0.05$ vs. model group.

图5 紫柳因抑制坐骨神经损伤大鼠坐骨神经FOXO1/NF- κ B信号通路

Fig.5 Butein inhibits sciatic nerve FOXO1/NF- κ B signaling pathway in rats with sciatic nerve injury

3 讨论

本研究发现,紫柳因可增加坐骨神经损伤大鼠BBB运动评分和SFI,改善大鼠坐骨神经病理损伤,降低大鼠坐骨神经细胞凋亡水平,增加神经再生相关蛋白BDNF、MBP和GAP-43表达,提示紫柳因对坐骨神经损伤具有改善作用。

紫柳因是一种SIRT1激活剂,可通过激活SIRT1抑制炎症和氧化应激,还可通过激活SIRT1/ADAM10信号通路改善神经退行性变^[6]。SIRT1是一种依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)且核心区域高度保守的组蛋白去乙酰化酶和二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)核糖基转移酶^[7]。SIRT1参与调节细胞存活、凋亡、氧化应激反应、衰老和炎症反应等多种生理过程^[8]。SIRT1在PNI中的作用已广泛报道,研究^[9]发

现,SIRT1在脊髓运动神经元中过表达,刺激mTOR非依赖性自噬,促进生长状态,改善运动轴突再生,表明SIRT1依赖性自噬促进PNI后运动神经元再生。TIAN等^[10]发现SIRT1在慢性缩窄性损伤(chronic constriction injury, CCI)手术后降低,植入SIRT1过表达的人间充质干细胞降低血清和脊髓背角的促炎性细胞因子水平,改善CCI大鼠的神经性疼痛。以上均表明激活SIRT1可改善PNI。本研究检测了紫柳因对坐骨神经损伤大鼠坐骨神经近侧断端SIRT1蛋白表达的影响,发现紫柳因逆转了坐骨神经损伤诱导的大鼠坐骨神经近侧断端SIRT1蛋白表达下调,提示紫柳因可能通过激活SIRT1改善坐骨神经损伤。

FOXO1是SIRT1激活后调节的转录因子之一。在一项脑缺血/再灌注损伤的相关研究^[11]中发现,抑制SIRT1/FOXO1信号通路能降低脑缺血/再灌注小鼠神经功能,加重脑损伤程度。此外,HUANG等^[12]

发现,SIRT1/FOXO1信号通路激活还具有内皮保护和促血管生成作用。NF- κ B在调节人体免疫系统方面具有关键作用,其失调与哮喘、癌症、糖尿病、类风湿性关节炎、炎症和神经系统疾病等慢性疾病有关^[13]。WANG等^[14]发现,NF- κ B信号受FOXO1调控。SONG等^[15]的研究显示,SIRT1通过增加Nrf2核转位抑制FOXO1,从而降低NF- κ B表达水平。因此,SIRT1介导的FOXO1/NF- κ B信号通路可能是其改善PNI的分子机制。本研究结果显示,紫铆因可降低大鼠坐骨神经近侧断端FOXO1、Keap1和NF- κ B蛋白表达水平,提示紫铆因可能通过激活SIRT1,抑制FOXO1/NF- κ B信号通路,从而减轻坐骨神经损伤。

综上所述,本研究发现,紫铆因可改善坐骨神经损伤模型大鼠坐骨神经损伤,其机制可能与其激活SIRT1抑制FOXO1/NF- κ B信号通路有关。本研究为紫铆因作为坐骨神经损伤及其他PNI的潜在治疗药物开发提供了理论依据。

参考文献:

- [1] FERNANDEZ L, KOMATSU DE, GUREVICH M, et al. Emerging strategies on adjuvant therapies for nerve recovery [J]. *J Hand Surg*, 2018, 43 (4) : 368-373. DOI: 10.1016/j.jhsa.2018.01.023.
- [2] ZHANG PX, NA H, KOU YH, et al. Peripheral nerve intersectional repair by bi-directional induction and systematic remodelling: biodegradable conduit tubulization from basic research to clinical application [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2017, 45 (8) : 1464-1466. DOI: 10.1080/21691401.2017.1373658.
- [3] HENRY BM, VIKSE J, SANNA B, et al. Cervical rib prevalence and its association with thoracic outlet syndrome: a meta-analysis of 141 studies with surgical considerations [J]. *World Neurosurg*, 2018, 110: e965-e978. DOI: 10.1016/j.wneu.2017.11.148.
- [4] ZHU Y, WANG K, MA Z, et al. SIRT1 activation by butein attenuates sepsis-induced brain injury in mice subjected to cecal ligation and puncture via alleviating inflammatory and oxidative stress [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 363: 34-46. DOI: 10.1016/j.taap.2018.10.013.
- [5] LIU P, PAN QL. Butein inhibits oxidative stress injury in rats with chronic heart failure via ERK/Nrf2 signaling [J]. *Cardiovasc Ther*, 2022, 2022: 8684014. DOI: 10.1155/2022/8684014.
- [6] GAY NH, SUWANJANG W, RUANKHAM W, et al. Butein, isoliquiritigenin, and scopoletin attenuate neurodegeneration via antioxidant enzymes and SIRT1/ADAM10 signaling pathway [J]. *RSC Adv*, 2020, 10 (28) : 16593-16606. DOI: 10.1039/c9ra06056a.
- [7] CHUANG YC, CHEN SD, JOU SB, et al. Sirtuin 1 regulates mitochondrial biogenesis and provides an endogenous neuroprotective mechanism against seizure-induced neuronal cell death in the hippocampus following status epilepticus [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (14) : 3588. DOI: 10.3390/ijms20143588.
- [8] HAN Y, SUN W, REN D, et al. SIRT1 agonism modulates cardiac NLRP3 inflammasome through pyruvate dehydrogenase during ischemia and reperfusion [J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101538. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101538.
- [9] ROMEO-GUITART D, LEIVA-RODRIGUEZ T, FORÉS J, et al. Improved motor nerve regeneration by SIRT1/Hif1 α -mediated autophagy [J]. *Cells*, 2019, 8 (11) : 1354. DOI: 10.3390/cells8111354.
- [10] TIAN J, SONG TY, WANG H, et al. Intrathecal injection of SIRT1-modified human mesenchymal stem cells alleviates neuropathic pain in rat [J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71 (5) : 972-980. DOI: 10.1007/s12031-020-01717-2.
- [11] MEI ZG, HUANG YG, FENG ZT, et al. Electroacupuncture ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the SIRT1-FOXO1 signaling pathway [J]. *Aging*, 2020, 12 (13) : 13187-13205. DOI: 10.18632/aging.103420.
- [12] HUANG Z, SHI JC, GAO YX, et al. HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (D1) : D1013-D1017. DOI: 10.1093/nar/gky1010.
- [13] KUNNUMAKKARA AB, SHABNAM B, GIRISA S, et al. Inflammation, NF- κ B, and chronic diseases: how are they linked? [J]. *Crit Rev Immunol*, 2020, 40 (1) : 1-39. DOI: 10.1615/critrevimmunol.2020033210.
- [14] WANG D, YANG L, YU W, et al. Correction: colorectal cancer cell-derived CCL20 recruits regulatory T cells to promote chemoresistance via FOXO1/CEBPB/NF- κ B signaling [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10 (6) : e0701-2corr1. DOI: 10.1186/s40425-019-0701-2.
- [15] SONG SS, CHU L, LIANG HF, et al. Protective effects of dioscin against doxorubicin-induced hepatotoxicity via regulation of Sirt1/FOXO1/NF- κ B signal [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1030. DOI: 10.3389/fphar.2019.01030.

(编辑 王又冬)