

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.06.005
文章编号: 1005-8982 (2023) 06-0025-05

实验研究·论著

GLP-1/GIP双靶点受体激动剂DA5-CH对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织的作用及其机制研究*

董丽荣¹, 徐娜¹, 吕建东²

(河北北方学院附属第二医院 1.药剂科, 2.中医科, 河北 张家口 075100)

摘要: **目的** 研究胰高血糖素样肽-1/抑胃肽(GLP-1/GIP)双靶点受体激动剂DA5-CH对脑缺血再灌注损伤(I/R)大鼠脑组织的作用及其可能机制。**方法** 将30只脑I/R大鼠随机分为模型组、DA5-CH组、DA5-CH + SB431542组, 每组10只。另取10只大鼠仅做假手术(假手术组)。DA5-CH组腹腔注射10 nmol/kg DA5-CH; DA5-CH + SB431542组腹腔注射10 nmol/kg DA5-CH和5 mg/kg SB431542, 假手术组、模型组腹腔注射等体积生理盐水。检测各组大鼠脑组织含水量; 免疫组织化学染色检测海马CA1区神经核抗原(NeuN)阳性细胞数; Western blotting检测脑组织转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、Smad3、p-Smad3蛋白的表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组脑组织含水量增加, 海马CA1区每个视野NeuN阳性细胞数减少, 脑组织TGF- β_1 、p-Smad3/Smad3蛋白表达升高($P < 0.05$); 与模型组比较, DA5-CH组脑组织含水量降低, 海马CA1区NeuN阳性细胞数增加, 脑组织TGF- β_1 、p-Smad3/Smad3蛋白表达降低($P < 0.05$); 与DA5-CH组比较, DA5-CH + SB431542组脑组织含水量增加, 海马CA1区NeuN阳性细胞数减少, 脑组织TGF- β_1 、p-Smad3/Smad3蛋白表达升高($P < 0.05$)。**结论** GLP-1/GIP双靶点受体激动剂DA5-CH可保护脑I/R大鼠神经功能, 减少脑组织含水量及神经元坏死, 减轻海马区病理改变, 其作用机制可能与激活TGF- β_1 /Smads通路有关。

关键词: 脑缺血再灌注; 胰高血糖素样肽-1/抑胃肽双靶点受体激动剂; DA5-CH; 神经功能; 大鼠
中图分类号: R743.3 **文献标识码:** A

Effect and mechanism of dual GIP/GLP-1 receptor agonist DA5-CH on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats*

Dong Li-rong¹, Xu Na¹, Lü Jian-dong²

(1. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075100, China; 2. Department of TCM, The Second Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075100, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of dual GIP/GLP-1 receptor agonist DA5-CH on cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats and the potential underlying mechanisms. **Methods** Thirty cerebral I/R injury rat models were randomly divided into model group, DA5-CH group, and DA5-CH + SB431542 group, with 10 rats in each group. Another 10 rats only underwent sham operation and were set as sham group. Rats in the DA5-CH group were intraperitoneally injected with DA5-CH at a dose of 10 nmol/kg, those in the DA5-CH + SB431542 group were intraperitoneally injected with DA5-CH at a dose of 10 nmol/kg and SB431542 at a dose of 5 mg/kg, while those in the sham group and model group were intraperitoneally injected with an equal volume of normal saline. The water content of the brain tissues of rats was detected. The number of neuronal nuclear antigen (NeuN)-positive cells in hippocampal CA1 area was determined by immunohistochemical staining. The protein expressions of transforming

收稿日期: 2022-11-18

* 基金项目: 河北省自然科学基金面上项目(No: H2019423074); 张家口市重点研发计划项目(No: 1921017D)

growth factor β_1 (TGF- β_1), Smad3, and p-Smad3 in brain tissues were detected by Western blotting. **Results** Compared with the sham group, the water content of brain tissues was increased, the number of NeuN-positive cells in each field of hippocampal CA1 area was decreased, and the protein expressions of TGF- β_1 and p-Smad3/Smad3 in brain tissues were increased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the water content of brain tissues was decreased, the number of NeuN-positive cells in each field of hippocampal CA1 area was increased, and the protein expressions of TGF- β_1 and p-Smad3/Smad3 in brain tissues were decreased in the DA5-CH group ($P < 0.05$). Compared with DA5-CH group, the water content of brain tissues was increased, the number of NeuN-positive cells in each field of hippocampal CA1 region was decreased, and the protein expressions of TGF- β_1 and p-Smad3/Smad3 in brain tissues were increased in the DA5-CH + SB431542 group ($P < 0.05$). **Conclusions** The dual GIP/ GLP-1 receptor agonist DA5-CH can protect the neurological function of rats with cerebral I/R injury, reduce the brain water content, and ameliorate the neuronal necrosis and pathological changes in the hippocampus. The underlying mechanism may be related to the activation of TGF- β_1 / Smads pathway.

Keywords: cerebral ischemia-reperfusion; dual glucagon-like peptide-1/glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor agonist; DA5-CH; neurological function; rat

缺血性脑卒中是临床高发的脑血管疾病,早期再灌注可及时疏通堵塞血管,促进缺血脑组织血流再灌注的恢复,保护神经功能^[1]。然而,血流再灌注通常会激活缺血级联反应,加剧神经元凋亡,导致缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/R)。肠促胰岛素是具有胰岛素增敏作用的生长因子家族,其中肠促胰岛素胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1)、抑胃肽(gastric inhibitory peptide, GIP)是该家族主要成员,其类似物已被开发用于糖尿病的治疗。近年来有动物研究表明, GLP-1、GIP可通过抗炎、抗氧化应激、抑制神经胶质细胞激活等途径对帕金森、阿尔茨海默病等疾病发挥神经保护作用,开发其类似物为神经系统疾病的治疗带来了新希望^[2-3]。DA5-CH是新型的GLP-1/GIP双靶点受体激动剂,能减少酪氨酸神经元丢失,具有神经保护作用^[4]。目前关于DA5-CH对脑I/R大鼠神经功能作用的报道尚少,本研究通过复制脑I/R大鼠模型,观察DA5-CH对脑神经功能的作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 45只SPF级SD雄性大鼠,6周龄,体质量(210 ± 10)g,购自上海茂生衍生物科技有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0004,实验动物使用许可证号:SYXK(冀)2019-004。

1.1.2 主要药物、试剂 DA5-CH(上海强耀生物科技有限公司),转化生长因子 β_1 (transforming

growth factor β_1 , TGF- β_1)/Smads通路抑制剂SB431542(纯度>99%,美国Abcam公司),兔抗大鼠神经核抗原(neuronal nuclear antigen, NeuN)、TGF- β_1 、Smad3、p-Smad3一抗(美国Santa Cruz公司),免疫组织化学染色试剂盒(上海蕊试生物技术有限公司)。

1.1.3 主要仪器 RM2265病理切片机(德国徕卡显微系统贸易有限公司),Synergy-HD显微镜(日本Toshiba株式会社),Mini PROTEANTetra电泳槽(美国伯乐公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 线栓法复制脑I/R模型 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,固定于操作台。常规消毒后取颈部正中切口,逐层分离左侧肌肉,显露颈总、内、外动脉,将颈外动脉结扎、离断,以合适线栓从颈外动脉残端进入,经过颈部动脉至大脑中动脉,阻塞动脉血流,形成局灶性缺血。2h后抽出线栓至颈外动脉残端,使血流通畅,实现再灌注。术后24h后采用Zea Longa评分评价大鼠神经功能,1~3分为模型复制成功。Zea Longa评分标准:无神经功能缺损(0分);对侧前爪不能完全伸张(1分);向对侧转圈行走(2分);向对侧行走倾倒(3分);意识模糊,难以站立行走(4分)^[5]。

1.2.2 分组及干预方式 从45只大鼠随机抽取10只仅将线栓从颈外动脉残端进入颈内动脉,不阻塞大脑中动脉,作为假手术组;其余35只复制脑I/R模型,取模型复制成功的30只大鼠随机分为模型组、DA5-CH组、DA5-CH + SB431542组,每组10只。将

DA5-CH溶于生理盐水,大鼠苏醒后即刻给药。DA5-CH组腹腔注射10 nmol/kg DA5-CH; DA5-CH + SB431542组腹腔注射10 nmol/kg DA5-CH和5 mg/kg SB431542,假手术组、模型组腹腔注射等体积生理盐水^[6]。1次/d,连续干预28 d。

1.2.3 取材方式 末次干预后4 h,采用Zea Longa评分评价大鼠神经功能,评价完成后颈椎脱臼处死,剖开颅并清除颅骨,暴露脑组织,随机选取5只大鼠的脑组织检测脑组织含水量;其余5只大鼠患病侧脑组织分成两份,一份于4%多聚甲醛中固定24 h,切片切片厚约4 μm ,在《大鼠脑立体定位图谱》^[7]指导下进行海马CA1区免疫组织化学染色和苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色;另一份保存于液氮中用于检测脑组织蛋白的表达。

1.2.4 检测脑组织含水量 采用锡箔纸盛放脑组织,天平称重(湿重),100 $^{\circ}\text{C}$ 烤24 h,再次称重(干重),计算脑组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 $\times$ 100%^[8]。

1.2.5 免疫组织化学染色检测海马CA1区NeuN阳性细胞数 取脑组织切片烘烤10 min,在二甲苯I、II中浸泡后梯度乙醇脱水,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗。微波抗原修复后冷却至室温,PBS冲洗,3%过氧化氢溶液室温孵育15 min,PBS冲洗,山羊血清封闭,室温孵育35 min,吸干多余血清,滴加兔抗大鼠NeuN一抗(1:500),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS冲洗,滴加生物素标记的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,PBS冲洗,DAB显色,苏木精复染,盐酸酒精分化,梯度酒精脱水,中性树胶封片,晾干后显微镜下观察^[9]。以棕黄色或棕色细胞为阳性细胞,随机选取5个不相邻视野用Image-Pro Plus 6.0软件进行计数。

1.2.6 HE染色观察海马CA1区病理变化 取脑组织切片,脱蜡、水化后苏木精染色,冲洗5 min,1%盐酸酒精分化2 min,冲洗后伊红染色15 min,80%酒精浸泡1 min,90%酒精浸泡10 s,无水乙醇浸泡10 s,二甲苯处理后中性树胶封片^[10]。显微镜下观察病理变化。

1.2.7 Western blotting检测脑组织TGF- β_1 、Smad3、p-Smad3蛋白的表达 取液氮保存的脑组织,匀浆后加入放射免疫沉淀细胞裂解液裂解,全蛋白提取试剂盒提取总蛋白,离心取上清,二喹啉甲酸试剂盒定量。取40 μg 待测蛋白,混合5倍体积上样缓冲

液,混匀后,沸水浴10 min,离心,电泳后转至膜,5%脱脂奶粉室温摇床封闭2 h,洗涤后加入兔抗大鼠TGF- β_1 、Smad3、p-Smad3一抗(1:600),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入山羊抗兔IgG二抗(1:5 000),常温孵育2 h,洗涤后加入ELC发光液,暗室曝光,凝胶成像系统扫描、分析结果^[11]。

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 19.0统计软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较用单因素方差分析,两两比较用LSD- t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能评分、脑组织含水量比较

模型组、DA5-CH组、DA5-CH + SB431542组大鼠神经功能评分分别为(2.85 ± 0.37)、(1.90 ± 0.32)、(2.34 ± 0.40)分,经方差分析,差异有统计学意义($F=16.982, P=0.000$)。假手术组、模型组、DA5-CH组、DA5-CH + SB431542组脑组织含水量分别为(76.98 ± 0.91)%、(81.73 ± 0.96)%、(77.46 ± 0.89)%和(79.14 ± 0.87)%,经方差分析,差异有统计学意义($F=27.901, P=0.000$)。与假手术组比较,模型组脑组织含水量增加($P<0.05$);与模型组比较,DA5-CH组神经功能评分降低,脑组织含水量减少($P<0.05$);与DA5-CH组比较,DA5-CH + SB431542神经功能评分升高,脑组织含水量增加($P<0.05$)。

2.2 各组大鼠海马CA1区NeuN阳性细胞数比较

假手术组、模型组、DA5-CH组、DA5-CH + SB431542组海马CA1区NeuN阳性细胞数分别为(123.40 ± 24.78)、(32.80 ± 5.79)、(79.20 ± 11.47)个、(55.00 ± 8.16)个/HP,经方差分析,差异有统计学意义($F=35.615, P=0.000$)。与假手术组比较,模型组NeuN阳性细胞数减少($P<0.05$);与模型组比较,DA5-CH组NeuN阳性细胞数增加($P<0.05$);与DA5-CH组比较,DA5-CH + SB431542组NeuN阳性细胞数减少($P<0.05$)。见图1。

2.3 各组大鼠海马CA1区病理变化

HE染色显示,假手术组神经元排列完整,结构整齐,胞浆染色均匀,未观察到水肿、间质水肿,细胞核清晰,未观察到核固缩;模型组神经元排列紊乱、疏松,细胞塌陷,胞浆深染,细胞核固缩且周围

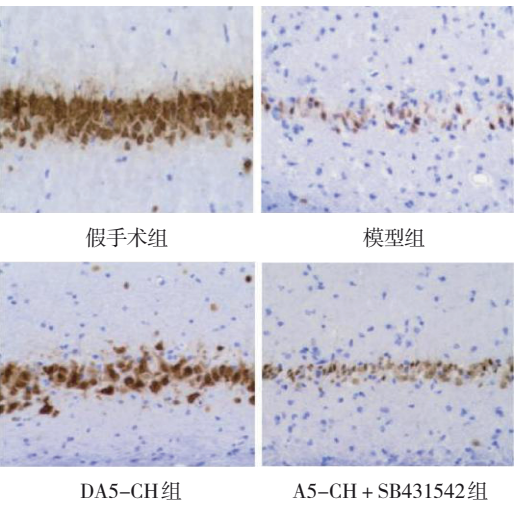


图1 各组大鼠海马CA1区NeuN阳性表达
(免疫组织化学染色×200)

出现空泡,与细胞浆之间界限模糊;DA5-CH组、DA5-CH + SB431542组干预后正常神经元数增加,神经元轮廓清晰、破坏程度降低,核周围空泡及核固缩有所改善,其中DA5-CH组病理改善更明显。见图2。

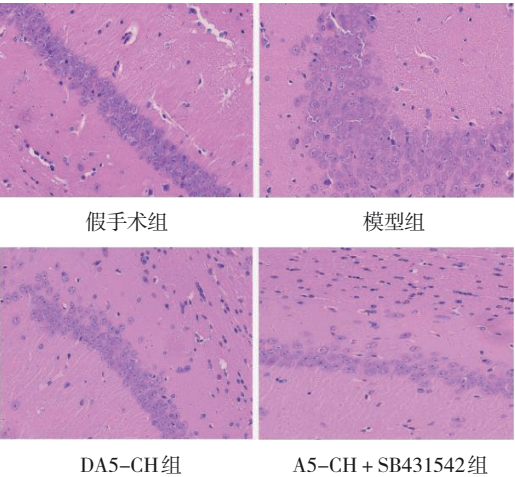


图2 各组大鼠海马CA1区病理变化 (HE染色×200)

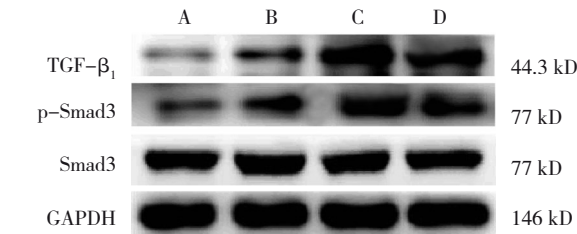
2.4 各组大鼠脑组织TGF-β₁、p-Smad3、Smad3蛋白表达比较

假手术组、模型组、DA5-CH组、DA5-CH + SB431542组TGF-β₁、p-Smad3/Smad3蛋白表达比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与假手术组比较,模型组脑组织TGF-β₁、p-Smad3/Smad3蛋白表达升高($P < 0.05$);与模型组比较,DA5-CH组TGF-β₁、p-Smad3/Smad3蛋白表达升高($P < 0.05$);与DA5-CH组比较,DA5-CH + SB431542组TGF-β₁、p-Smad3/Smad3蛋白表达降低($P < 0.05$)。见表1和图3。

表1 各组大鼠脑组织TGF-β₁、p-Smad3/Smad3蛋白表达比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	TGF-β ₁	p-Smad3/Smad3
假手术组	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.02
模型组	0.22 ± 0.03 ^①	0.38 ± 0.04 ^①
DA5-CH组	0.69 ± 0.07 ^②	0.74 ± 0.08 ^②
DA5-CH + SB431542组	0.41 ± 0.05 ^③	0.57 ± 0.06 ^③
F值	161.647	125.486
P值	0.000	0.000

注:①与假手术组比较, $P < 0.05$;②与模型组比较, $P < 0.05$;③与DA5-CH组比较, $P < 0.05$ 。



A:假手术组;B:模型组;C:DA5-CH组;D:DA5-CH + SB431542组。

图3 各组大鼠脑组织TGF-β₁、p-Smad3、Smad3蛋白的表达

3 讨论

I/R发病机制复杂,目前多认为与血管内皮功能损伤、炎症反应、一氧化氮与自由基损伤、谷氨酸兴奋性毒作用及 $[Ca^{2+}]_i$ 超载有关^[12]。该病治疗关键在于及时恢复脑组织血供并抑制再灌注损伤,减轻脑组织内皮功能损伤,保护神经细胞,避免缺血梗死区域再扩大,促进缺血半暗带神经元结构及功能的恢复。利拉鲁肽作为GLP-1的类似物已被证实可通过激活过氧化物酶体增殖物,激活受体,改善合并糖尿病的局灶性脑缺血损伤,为GLP-1在神经系统疾病治疗作用的研究提供了理论基础^[13]。

NeuN特异性表达于神经系统大多数神经元细胞核及胞浆中,通常作为神经元特异性标志物^[14-15]。本研究结果显示,与模型组比较,DA5-CH组神经功能评分降低,脑组织含水量减少,海马CA1区NeuN阳性细胞数增加,提示DA5-CH可保护脑I/R大鼠神经功能,保护神经元。GLP-1是由胰腺α细胞及肠道分泌的对葡萄糖稳态具有控制作用的内分泌激素,其受体广泛表达于下丘脑、海马及椎体神经元中,表明GLP-1在调节神经元活动中具有重要作用。GLP-1与GIP类似物进入机体后可穿透血脑屏障至脑组织,作用于神经元表面,结合对应受体后激活下游

信号分子,发挥诱导神经元分化及突触生长等生理效应,减轻脑I/R所致损伤。DA5-CH可同时激活GLP-1、GIP受体,且其效果明显优于单受体激动剂。LI等^[6]在研究DA5-CH治疗阿尔茨海默病的效果时发现,其神经保护作用显著,且相较于其他GLP-1/GIP双靶点受体激动剂可更快地穿透血脑屏障。

TGF- β_1 在正常生理状态下几乎不在大脑中表达,当受缺血缺氧刺激后,其表达显著上调,通过与下游受体型Smad3结合,促进其C端丝氨酸残基发生磷酸化,参与神经细胞增殖、凋亡、分化等调控^[16]。国外有研究认为,通过上调局灶性脑I/R大鼠脑组织TGF- β_1 表达,可减少神经变性和脑组织病理改变,提示其可能参与脑I/R的发展进程^[17]。也有国内研究指出,通过调节TGF- β_1 /SMAD信号通路,可发挥对大鼠脑I/R后的神经保护作用^[18]。本研究结果显示,与假手术组比较,模型组脑组织TGF- β_1 、p-Smad3/Smad3蛋白表达上调,可能与脑I/R后该通路发挥抑制脑缺血后血管反应、促血管新生、抗神经元凋亡等神经保护作用有关。采用DA5-CH干预后TGF- β_1 /Smads通路被进一步激活,其抑制剂SB431542也可减弱DA5-CH对脑I/R的治疗作用,提示DA5-CH对脑I/R的保护作用可能通过激活该通路来实现。

综上所述,GLP-1/GIP双靶点受体激动剂DA5-CH可保护脑I/R大鼠神经功能,减少脑组织含水量及神经元坏死,减轻海马区病理变化,其作用机制可能与激活TGF- β_1 /Smads通路有关。

参 考 文 献:

- [1] TESTA A, FRATI G, VERSACI F, et al. Ischemia-reperfusion injury: can we stop the curing-hurting paradox[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2021, 77(4): 427-429.
- [2] 张磊,唐春雷,刘振,等. 帕金森病中GLP-1蛋白对氧化应激损伤的保护作用及调节机制[J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 37(9): 162-163.
- [3] YU C J, MA D Y, SONG L L, et al. The role of GLP-1/GIP receptor agonists in Alzheimer's disease[J]. Adv Clin Exp Med, 2020, 29(6): 661-668.
- [4] 吕妙君,冯鹏,郭雅静,等. 新型肠促胰岛素双受体激动剂对亚急性帕金森病小鼠步态行为的影响及机制研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2021, 23(9): 908-912.
- [5] CHEN X Y, CHENG C, ZUO X Z, et al. Astragaloside alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by improving anti-oxidant and anti-inflammatory activities and inhibiting apoptosis pathway in rats[J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1): 120.
- [6] LI C, LIU W Z, LI X H, et al. The novel GLP-1/GIP analogue DA5-CH reduces tau phosphorylation and normalizes theta rhythm in the icv. STZ rat model of AD[J]. Brain Behav, 2020, 10(3): e01505.
- [7] PAXINOS G, WATSON C. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 诸葛启钊,译. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 75-77.
- [8] 田园,韩若东,赵江明. 氧化苦参碱对急性脑梗死大鼠的脑保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(22): 3709-3712.
- [9] 顾挺,胡宇华,夏荣辉,等. 免疫组织化学双染技术在唾液腺淋巴上皮性病变中的应用评价[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2019, 17(3): 216-220.
- [10] KE B X, ZHANG T M, AN T Y, et al. Soy isoflavones ameliorate the cognitive dysfunction of goto-kakizaki rats by activating the Nrf2-HO-1 signalling pathway[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(21): 21344-21354.
- [11] 张华章,黎婧,刘智慧. MicroRNA-31-3p靶向调控Sema4C表达对宫颈癌顺铂耐药性的作用及其机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(21): 8-12.
- [12] NEIMARK M I. Ischemia-reperfusion syndrome[J]. Khirurgiia (Mosk), 2021(9): 71-76.
- [13] 何婧,韩江全,施宁华,等. 利拉鲁肽通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体改善合并糖尿病的局灶性脑缺血损伤[J]. 重庆医科大学学报, 2020, 45(3): 350-355.
- [14] 宣伟军,黄力毅,宣毅,等. 复方健耳剂对抗老年性耳蜗神经细胞凋亡超微结构观察及上调NeuN和BDNF定位表达作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 338-344.
- [15] HU N Y, CHEN Y T, WANG Q, et al. Expression patterns of inducible Cre recombinase driven by differential astrocyte-specific promoters in transgenic mouse lines[J]. Neurosci Bull, 2020, 36(5): 530-544.
- [16] 全爱君,魏巍,蔡国锋,等. 电针预处理对脑缺血再灌注损伤大鼠TGF- β -Smads信号通路作用机制研究[J]. 针灸临床杂志, 2021, 37(8): 69-73.
- [17] ABDEL-RAHMAN R F, ALQASOUMI S I, OGALY H A, et al. Propolis ameliorates cerebral injury in focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) rat model via upregulation of TGF- β_1 [J]. Saudi Pharm J, 2020, 28(1): 116-126.
- [18] 殷姜文,葛明月,李燕,等. TGF- β /SMAD/JNK通路参与异氟醚后处理减轻大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤[J]. 临床麻醉学杂志, 2020, 36(6): 574-578.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 董丽荣,徐娜,吕建东. GLP-1/GIP双靶点受体激动剂DA5-CH对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织的作用及其机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(6): 25-29.

Cite this article as: DONG L R, XU N, LÜ J D. Effect and mechanism of dual GIP/GLP-1 receptor agonist on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. China Journal of Modern Medicine, 2023, 33(6): 25-29.