

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.01.007

β-谷甾醇对创伤性脑损伤大鼠的保护作用 及对铁死亡-脂质代谢途径的影响*

杜俊凯[#] 关红[#] 李治廷 徐之超 白立曦 谢万科[△]

(西安交通大学第一附属医院急诊中心 陕西 西安 710061)

摘要 目的:揭示β-谷甾醇(Sito)对创伤性脑损伤(TBI)大鼠的保护作用及对铁死亡-脂质代谢途径的影响。**方法:**将大鼠分为 Sham 组(n=10)、TBI 组(n=11)、TBI+10Sito 组(n=10)、TBI+20Sito 组(n=10)、TBI+40Sito 组(n=10)和 TBI+40Sito+GPX4-IN-3 组(n=10)。Sham 组大鼠不进行造模,其他组大鼠为 TBI 模型大鼠。Sham 组和 TBI 组大鼠每天灌胃 1 mL 0.5%羧甲基纤维素钠。TBI+10Sito 组、TBI+20Sito 组、TBI+40Sito 组大鼠分别灌胃 1 mL 10、20、40 mg/kg/d 的 β-谷甾醇。TBI+40Sito+GPX4-IN-3 组大鼠同时灌胃 0.5 mL 40 mg/kg/d 的 β-谷甾醇和 0.5 mL 15 mg/kg/d 的 GPX4-IN-3(铁死亡选择性诱导剂)。各组大鼠均给药 14 d。给药结束后,检测了各组大鼠的神经功能评分。通过 Morris 水迷宫实验评价认知功能。通过蔗糖偏好实验和旷场实验评价行为学。检测血清脂质代谢指标[总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)]水平、脑组织含水量、脑组织氧化应激指标[超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)]水平、脑组织 Fe²⁺含量。通过苏木素伊红(HE)染色和尼氏染色评价脑组织损伤。通过 Western blot 和免疫荧光染色检测谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)蛋白表达。**结果:**与 Sham 组比较,TBI 组大鼠的神经功能评分和逃避潜伏期升高,穿越平台次数、蔗糖偏好率、水平活动分数和垂直活动分数降低,TC、TG 和 LDL-c 升高,HDL-c 降低,脑组织含水量升高,神经元出现明显损伤,SOD 水平降低,MDA 水平升高,Fe²⁺含量升高,GPX4 蛋白表达水平和 GPX4 相对荧光强度降低($P<0.05$)。与 TBI 组比较,TBI+10Sito 组、TBI+20Sito 组和 TBI+40Sito 组大鼠的神经功能评分和逃避潜伏期降低,穿越平台次数、蔗糖偏好率、水平活动分数和垂直活动分数升高,TC、TG 和 LDL-c 降低,HDL-c 升高,脑组织含水量降低,神经元损伤明显减轻,SOD 水平升高,MDA 水平降低,Fe²⁺含量降低,GPX4 蛋白表达水平和 GPX4 相对荧光强度升高($P<0.05$)。与 TBI+40Sito 组比较,TBI+40Sito+GPX4-IN-3 组大鼠的神经功能评分和逃避潜伏期升高,穿越平台次数、蔗糖偏好率、水平活动分数和垂直活动分数降低,TC、TG 和 LDL-c 升高,HDL-c 降低,脑组织含水量升高,神经元损伤加重,SOD 水平降低,MDA 水平升高,Fe²⁺含量升高,GPX4 蛋白表达水平和 GPX4 相对荧光强度降低($P<0.05$)。**结论:**β-谷甾醇可有效减轻 TBI 后的继发性损伤,其机制可能与抑制铁死亡途径介导的氧化应激和脂质代谢紊乱有关。

关键词:创伤性脑损伤;β-谷甾醇;铁死亡;脂质代谢;氧化应激

中图分类号:R-33;R651.15 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)01-38-08

Protective Effects of β-sitosterol on Traumatic University and its Effect on Ferroptosis-lipid Metabolism Pathway in Rats*

DU Jun-ka[#], GUAN Hong[#], LI Zhi-yan, XU Zhi-chao, BAI Li-xi, XIE Wan-ke[△]

(Emergency center, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To reveal the protective effect of β-sitosterol (Sito) on traumatic brain injury (TBI) rats and its effect on ferroptosis-lipid metabolism pathway. **Methods:** Rats were divided into Sham group (n=10), TBI group (n=11), TBI+10Sito group (n=10), TBI+20Sito group (n=10), TBI+40Sito group (n=10) and TBI+40Sito+GPX4-IN-3 group (n=10). The rats in Sham group were not modeled, while the rats in other groups were TBI model rats. Rats in Sham group and TBI group were given 1 mL 0.5% carboxymethyl cellulose sodium by gastric gavage every day. Rats in TBI+10Sito group, TBI+20Sito group and TBI+40Sito group were given intragastric administration of β-sitosterol of 1 mL 10, 20 and 40 mg/kg/d respectively. Rats in TBI+40Sito+GPX4-IN-3 group were given intragastric administration of β-sitosterol of 0.5 mL 40 mg/kg/d and GPX4-IN-3 of 0.5 mL 15 mg/kg/d (selective inducer of ferroptosis). Rats in each group were given drugs for 14 days. At the end of administration, the neurological function scores of rats in each group were measured. Cognitive function was evaluated by Morris water maze test. Behavior was evaluated by sucrose preference test and open field experiment. The levels of serum lipid metabolism indexes [total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol

* 基金项目:陕西省自然科学基金项目(2018JM7152)

[#] 为共同第一作者

作者简介:杜俊凯(1976-),男,博士研究生,硕士生导师,主任医师,主要研究方向:急诊医学,E-mail: 68631784@qq.com;

关红(1983-),女,本科,副主任医师,主要研究方向:急诊医学,E-mail: 312668041@qq.com

[△] 通讯作者:谢万科,男,硕士研究生,住院医师,主要研究方向:急诊医学,E-mail: Xienogu20K@163.com

(收稿日期:2023-05-28 接受日期:2023-06-25)

(LDL-c), high density lipoprotein cholesterol (HDL-c)], brain water content, brain oxidative stress indexes [superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA)] and brain tissue Fe^{2+} content were measured. Brain injury was evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining and Nissl staining. The protein expression of glutathione peroxidase 4 (GPX4) was detected by Western blot and immunofluorescence staining. **Results:** Compared with Sham group, the neurological function score and escape latency increased, the number of crossing platform, sucrose preference rate, horizontal activity score and vertical activity score decreased, TC, TG and LDL-c increased, HDL-c decreased, brain water content increased, neurons showed obvious damage, SOD level decreased, MDA level increased, Fe^{2+} content increased, GPX4 protein expression and GPX4 relative fluorescence intensity decreased in TBI group ($P<0.05$). Compared with TBI group, neurological function score and escape latency decreased, the number of crossing platform, sucrose preference rate, horizontal activity score and vertical activity score increased, TC, TG and LDL-c decreased, HDL-c increased, brain water content decreased, neuronal injury was significantly alleviated, SOD level increased, MDA level decreased, Fe^{2+} content decreased, GPX4 protein expression and GPX4 relative fluorescence intensity increased in TBI+10Sito group, TBI+20Sito group and TBI+40Sito group ($P<0.05$). Compared with TBI+40Sito group, the neurological function score and escape latency increased, the number of crossing platform, sucrose preference rate, horizontal activity score and vertical activity score decreased, TC, TG and LDL-c increased, HDL-c decreased, brain water content increased, neuron injury aggravated, SOD level decreased, MDA level increased, Fe^{2+} content increased, GPX4 protein expression and GPX4 relative fluorescence intensity decreased in TBI+40Sito+GPX4-IN-3 group ($P<0.05$). **Conclusion:** β -sitosterol can effectively reduce the secondary injury after TBI, and its mechanism may be related to the inhibition of oxidative stress and lipid metabolism disorder mediated by ferroptosis pathway.

Key words: Traumatic brain injury; β -sitosterol; Ferroptosis; Lipid metabolism; Oxidative stress

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R651.15 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)01-38-08

前言

创伤性脑损伤(Traumatic brain injury, TBI)病理生理学机制复杂^[1,2],涉及氧化应激、内质网应激、线粒体功能障碍和神经炎症^[3]。目前,TBI后的致残率较高,但是还没有针对继发性损伤的有效治疗方法^[4]。 β -谷甾醇(β -Sitosterol, Sito)是一种普遍存在于多种植物中的植物甾醇,具有降低胆固醇的作用^[5]。此外, β -谷甾醇在治疗神经退行性疾病方面具有明显药理活性^[6]。例如, β -谷甾醇能够抑制高胆固醇诱导的 β 淀粉样蛋白释放,可能有助于预防和治疗阿尔兹海默症^[7,8]。尤其TBI后患者的脑脊液中的胆固醇会升高^[9],而高胆固醇会诱发引起神经炎症^[10]。本研究推测 β -谷甾醇可能在治疗TBI方面具有潜在价值。另外,铁死亡(Ferroptosis)是由脂质氧化产物的积累引起的细胞死亡途径^[11]。TBI后铁死亡信号被激活^[12],抑制铁死亡可减轻TBI后的继发性损伤^[13],并且铁死亡也参与调节脂质代谢,抑制铁死亡可纠正脂质代谢紊乱^[14]。基于上述研究背景,本研究旨在探讨 β -谷甾醇对创伤性脑损伤大鼠的保护作用及对铁死亡-脂质代谢途径的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 β -谷甾醇(货号:S1270)购自Sigma-Aldrich公司。羧甲基纤维素钠(货号:IS9000)购自北京索莱宝科技有限公司。苏木素伊红(Hematoxylin-eosin staining, HE)染液(货号:C0105M)、尼氏(Nissl)染色液(货号:C0117)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)试剂盒(货号:S0101M)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒(货号:S0131S)、RIPA裂解液(货号:P0013B)、BCA试剂盒(货号:P0010S)、BeyoECL Plus(货号:P0018S)购自碧云天生物技术研究所。Iron Assay试剂盒

(货号:ab83366)购自Abcam公司。谷胱甘肽过氧化物酶4(Glutathione peroxidase 4, GPX4)兔单克隆抗体一抗(货号:ab125066)、 β -actin兔多克隆抗体一抗(货号:ab8227)、驴抗兔IgG H&L(Alexa Fluor® 647)二抗(货号:ab150075)、山羊抗兔IgG H&L(HRP)二抗(货号:ab205718)购自英国Abcam公司。

1.1.2 实验仪器 PT-3502C酶标仪,北京普天新桥技术有限公司。TBI-0310颅脑损伤仪,美国PSI公司。ZS-Morris Morris水迷宫视频跟踪分析系统,北京众实迪科技发展有限公司。AU2700全自动生化分析仪,日本奥林巴斯公司。7500实时荧光定量PCR仪,美国ABI公司。

1.1.3 实验动物 7~8周龄SPF级SD大鼠(体重250~320g)购自西安交通大学实验动物中心[SCXK(陕)2020-001]。大鼠在屏障环境中[室温 $23\pm 2^{\circ}C$,湿度 $55\pm 5\%$,12h/12h光暗循环照明]使用标准饲料和自来水饲养。本研究由西安交通大学医学部第一附属医院医学生物科研伦理委员会审核通过(编号(No):XJTU1AF2020DK-136)。

1.2 方法

1.2.1 TBI大鼠模型的制备 参考文献^[15]建立TBI大鼠模型,异氟醚吸入麻醉大鼠后,仰卧固定于脑立体定向仪上,于左顶骨切开皮肤,微型磨钻制作半径2mm的骨窗,通过颅脑损伤仪打击造模,速度5m/s,深度4.5mm,停留时间400ms。造模12h后,剔除死亡或濒临死亡的大鼠,剩余大鼠用于后续实验。本研究共有60只大鼠造模,51只大鼠造模成功,造模成功率为85%。Sham组大鼠仰卧固定于脑立体定向仪上,于左顶骨切开皮肤,然后缝合皮肤,不进行打击造模。

1.2.2 动物分组及治疗 将51只TBI模型大鼠随机分为TBI组(n=11)、TBI+10Sito组(n=10)、TBI+20Sito组(n=10)、TBI+40Sito组(n=10)、TBI+40Sito+GPX4-IN-3组(n=10)。Sham组(n=10)大鼠仅切开皮肤,不进行打击造模。Sham组和TBI组

大鼠每天灌胃 1 mL 0.5% 羧甲基纤维素钠。TBI+10Sito 组、TBI+20Sito 组、TBI+40Sito 组大鼠分别灌胃 1 mL 10、20、40 mg/kg/d 的 β - 谷甾醇 (溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠)。TBI+40Sito+GPX4-IN-3 组大鼠同时灌胃 0.5 mL 40 mg/kg/d 的 β - 谷甾醇和 0.5 mL 15 mg/kg/d 的 GPX4-IN-3 (铁死亡选择性诱导剂)^[16]。各组大鼠均给药 14 d 后进行后续实验。

1.2.3 神经功能评分 通过改良神经功能缺损评分方法^[17]对各组大鼠进行神经功能评分,分值为 0~18 分,分数越高表示神经功能缺损程度越严重。

1.2.4 Morris 水迷宫实验评价认知功能 参考文献^[18]法进行 Morris 水迷宫实验。实验设备为直径 150 cm、高 60 cm 的圆形水池,水深 35 cm,水池第一象限中心放置直径 12 cm 的站台,距水面 2 cm,实验过程中水温保持 30℃。定位航行实验中,视频分析系统记录大鼠登陆站台的时间,作为逃避潜伏期。空间探索实验中,撤去平台,记录大鼠 1 min 内的穿越平台次数。

1.2.5 蔗糖偏好实验和旷场实验评价行为学 参考文献^[19]进行蔗糖偏好实验。大鼠单笼饲养,禁水禁食 12 h。然后将装有 200 mL 自来水和 200 mL 1% 蔗糖溶液的瓶子放入笼中,6 h 后互换瓶子位置。12 h 后测量自来水和蔗糖溶液的消耗量,计算蔗糖偏好率。

参考文献^[20]进行旷场实验,实验设备为长 100 cm、宽 100 cm、高 40 cm 的不透明盒子,底部被分成 25 个相等方格。将大鼠置于盒子底部中心 5 min,记录水平活动分数(大鼠穿越方格的次数)和垂直活动分数(两前肢离地次数)。

1.2.6 血清脂质代谢指标检测 大鼠腹主动脉采血 1 mL,3000 r/min 离心 10 min,取血清。全自动生化分析仪检测总胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol, LDL-c)、高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol, HDL-c)。

1.2.7 脑组织含水量的测定 行为学测试后,处死大鼠并分离损伤侧脑半球,蒸馏水冲洗,滤纸吸干,称取湿重,然后 95℃ 烘烤 24 h。称取干重,按照下式计算含水量:(湿重 - 干重)/湿重 \times 100%。

1.2.8 HE 染色和尼氏染色评价脑组织损伤 常规制作 5 μ m 厚损伤侧脑组织石蜡切片。按照制造商说明进行 HE 染色和尼氏染色。

1.2.9 脑组织氧化应激指标检测 使用玻璃匀浆器制备脑组织匀浆。4℃、8000 r/min 离心 5 min,取上清。WST-8 法检测 SOD,硫代巴比妥酸法检测 MDA。

1.2.10 脑组织 Fe²⁺ 含量测量 使用 Iron Assay 试剂盒测定脑组织 Fe²⁺ 含量。脑组织在铁分析缓冲液中匀浆,16000 r/min 4℃ 离心 10 min,取上清。取 100 μ L 样品加入 96 孔板中,依次加入 5 μ L 铁还原剂、5 μ L 的 Fe²⁺ 测定缓冲液、5 μ L 的铁还原剂,37℃ 避光孵育 30 min。加入 100 μ L 铁探针,37℃ 避光孵育 60 min。使用酶标仪检测 593 nm OD 值并计算 Fe²⁺ 含量。

1.2.11 Western blot 检测 GPX4 蛋白 RIPA 裂解液提取脑组织总蛋白,BCA 法定量,蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离后转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶封闭 2 h。将膜与 1:1000 稀释的

GPX4 和 β -actin 一抗 4℃ 孵育过夜。然后将膜与 1:1000 稀释的 IgG H&L(HRP)二抗室温孵育 1 h。ECL 显影 3 min,ImageJ 软件分析条带灰度值, β -actin 作为内参蛋白。

1.2.12 免疫荧光染色检测 GPX4 蛋白 脑组织切片经烤片、脱蜡、水化后,用 0.01M 枸橼酸钠缓冲溶液(pH6.0)煮沸 10 min 进行抗原修复。在 3% H₂O₂ 中孵育 10 min,10% 正常驴血清 37℃ 封闭 30 min。将切片与 1:500 稀释的 GPX4 一抗 4℃ 孵育过夜,然后与 1:500 稀释的荧光二抗室温孵育 2 h,DAPI 孵育 5 min,抗荧光淬灭封片液封片,荧光显微镜下观察。

1.3 统计学分析

使用 SPSS21.0 软件分析数据。采用单因素方差分析和 LSD 检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 β - 谷甾醇改善 TBI 大鼠认知功能和行为学

与 Sham 组比较,TBI 组大鼠的神经功能评分和逃避潜伏期升高,穿越平台次数、蔗糖偏好率、水平活动分数和垂直活动分数降低($P < 0.05$)。与 TBI 组比较,TBI+10Sito 组、TBI+20Sito 组和 TBI+40Sito 组大鼠的神经功能评分和逃避潜伏期均降低,穿越平台次数、蔗糖偏好率、水平活动分数和垂直活动分数均升高($P < 0.05$)。与 TBI+40Sito 组比较,TBI+40Sito+GPX4-IN-3 组大鼠的神经功能评分和逃避潜伏期均升高,穿越平台次数、蔗糖偏好率、水平活动分数和垂直活动分数均降低($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 β - 谷甾醇改善 TBI 大鼠脂质代谢紊乱

与 Sham 组比较,TBI 组大鼠的血清 TC、TG 和 LDL-c 升高,HDL-c 降低($P < 0.05$)。与 TBI 组比较,TBI+10Sito 组、TBI+20Sito 组和 TBI+40Sito 组大鼠的血清 TC、TG 和 LDL-c 降低,HDL-c 升高($P < 0.05$)。与 TBI+40Sito 组比较,TBI+40Sito+GPX4-IN-3 组大鼠的血清 TC、TG 和 LDL-c 升高,HDL-c 降低($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 β - 谷甾醇减轻 TBI 大鼠脑组织损伤

与 Sham 组比较,TBI 组大鼠的脑组织含水量升高($P < 0.05$)。与 TBI 组比较,TBI+10Sito 组、TBI+20Sito 组和 TBI+40Sito 组大鼠的脑组织含水量降低($P < 0.05$)。与 TBI+40Sito 组比较,TBI+40Sito+GPX4-IN-3 组大鼠的脑组织含水量升高($P < 0.05$)。见图 3。

HE 染色和尼氏染色显示,Sham 组大鼠皮层和海马形态正常。TBI 组皮层和海马神经元发生变形、核固缩、肿胀、空泡化等病变。与 TBI 组比较,TBI+10Sito 组、TBI+20Sito 组和 TBI+40Sito 组大鼠的神经元损伤明显减轻。与 TBI+40Sito 组比较,TBI+40Sito+GPX4-IN-3 组大鼠的神经元损伤加重。见图 4。

2.4 β - 谷甾醇对 TBI 大鼠脑组织氧化应激的影响

与 Sham 组比较,TBI 组大鼠的脑组织 SOD 水平降低,MDA 水平升高($P < 0.05$)。与 TBI 组比较,TBI+10Sito 组、TBI+20Sito 组和 TBI+40Sito 组大鼠的脑组织 SOD 水平升高,MDA 水平降低($P < 0.05$)。与 TBI+40Sito 组比较,TBI+40Sito+GPX4-IN-3 组大鼠的脑组织 SOD 水平降低,MDA 水平升高($P < 0.05$)。见图 5。

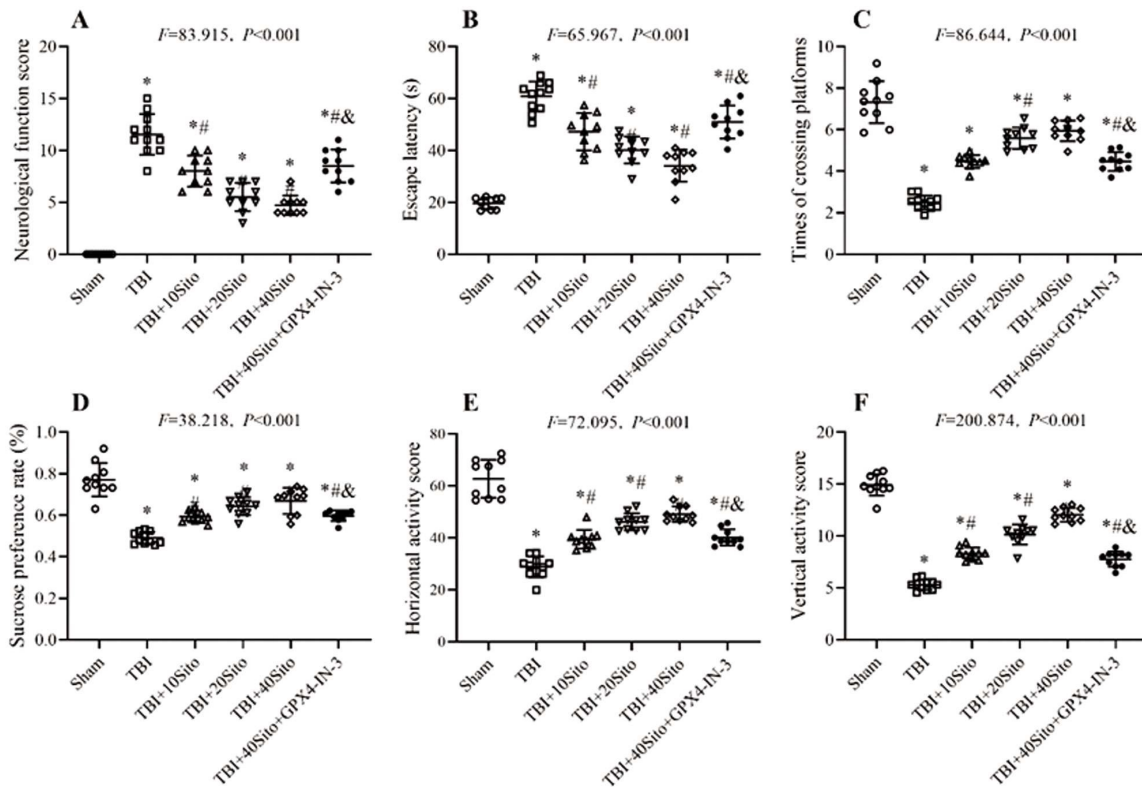


图 1 各组大鼠的认知功能和行为学测试结果

Fig. 1 Cognitive function and behavioral test results of rats in each group

Note: A-F: Neural function score, escape latency, number of crossing platform, sucrose preference rate, horizontal activity score and vertical activity score, respectively; Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with TBI group, # $P<0.05$; Compared with TBI+40Sito group, & $P<0.05$.

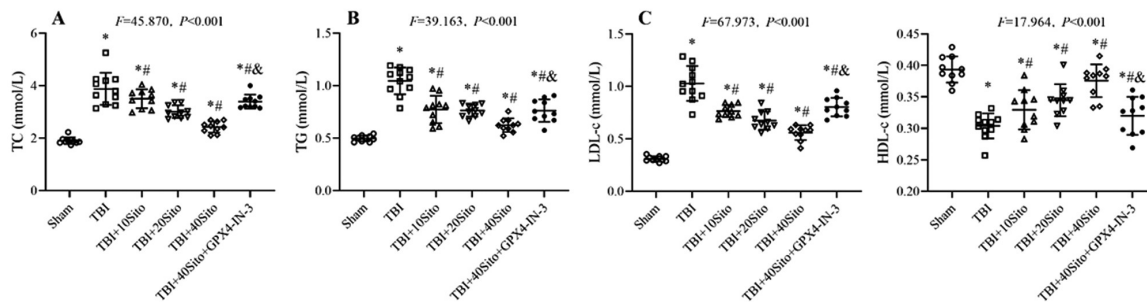


图 2 各组大鼠的血清脂质代谢指标检测结果

Fig.2 Serum lipid metabolism indexes of rats in each group

Note: A-D: Serum TC, TG, LDL-c and HDL-c levels, respectively; Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with TBI group, # $P<0.05$; Compared with TBI+40Sito group, & $P<0.05$.

2.5 β -谷甾醇对 TBI 大鼠脑组织铁死亡途径的影响

与 Sham 组比较, TBI 组大鼠的脑组织 Fe^{2+} 含量升高, GPX4 蛋白表达水平和 GPX4 相对荧光强度降低 ($P<0.05$)。与 TBI 组比较, TBI+10Sito 组、TBI+20Sito 组和 TBI+40Sito 组的大鼠脑组织 Fe^{2+} 含量降低, GPX4 蛋白表达水平和 GPX4 相对荧光强度升高 ($P<0.05$)。与 TBI+40Sito 组比较, TBI+40Sito+GPX4-IN-3 组大鼠的脑组织 Fe^{2+} 含量升高, GPX4 蛋白表达水平和 GPX4 相对荧光强度降低 ($P<0.05$)。见图 6。

3 讨论

TBI 包括原发性损伤和继发性损伤两个方面。原发性损伤由机械损伤引起, 会导致脑结构异常和血管功能障碍, 从而导致脑组织坏死和颅内出血。继发性损伤涉及细胞坏死、凋亡、铁

死亡、水肿、氧化应激、内质网应激、炎症和免疫反应等一系列复杂的级联反应^[13]。缓解继发性损伤是 TBI 治疗的关键, 但目前临床中缺少相关药物。植物甾醇是一类天然产物, 具有广泛的生物学和药理活性, 在食品、化妆品和草药中有着广泛的应用。 β -谷甾醇是一种存在于多种植物中的植物甾醇, 结构与胆固醇类似, 在降低胆固醇方面效果显著^[5]。近年来, β -谷甾醇的脑保护作用逐渐引起了学者的关注。例如, 10 mg/kg/d 的 β -谷甾醇预处理可以减少大鼠单侧颈总动脉闭塞后的缺血性脑损伤^[21]。本研究表明, β -谷甾醇剂量依赖性地降低了 TBI 大鼠的神经功能评分和逃避潜伏期, 升高了穿越平台次数、蔗糖偏好率、水平活动分数和垂直活动分数, 有效改善了认知功能和行为学。此外, β -谷甾醇降低了 TBI 大鼠脑组织含水量, 减轻了神经元损伤。其他学者报道, β -谷甾醇减轻了偏钒酸钠染毒引

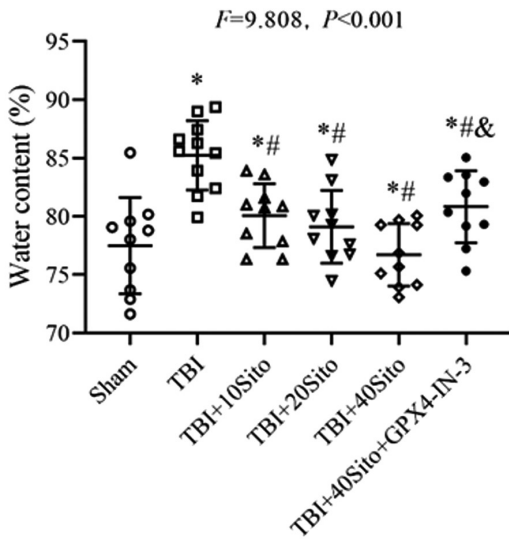


图3 各组大鼠的脑组织含水量

Fig.3 Water content of brain tissue of rats in each group

Note: Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with TBI group, # $P<0.05$; Compared with TBI+40Sito group, & $P<0.05$.

起的大鼠空间学习、运动效率和运动协调缺陷,升高了脑组织抗氧化酶活性降低了MDA和 H_2O_2 水平,减轻了髓鞘结构损伤^[22]。 β -谷甾醇可有效减轻氯化铝诱导的小鼠认知缺陷^[23];可降低小鼠焦虑,并与抗焦虑药物氟西汀具有协同作用^[24]。因此,本研究推测 β -谷甾醇在缓解TBI后的脑损伤、认知功能障碍、焦虑、抑郁等继发性损伤方面具有应用价值。

高胆固醇会增加患脑血管疾病的风险,诱发神经胶质细胞活化和促炎细胞因子表达,从而引起神经炎症^[19]。Kay等人证明,TBI后患者的脑脊液中的胆固醇会升高,因为大脑富含胆固醇^[9]。TBI患者脑脊液中的非酯化胆固醇显著增加了5倍^[9]。甘油水平与脑损伤的严重程度相关^[25]。预后不良的脑损伤患者甘油水平显著升高^[26]。本研究也显示,TBI大鼠血清TC、TG和LDL-c水平升高,HDL-c水平降低,出现脂质代谢紊乱。其他学者报道,降胆固醇药物辛伐他汀具有高度亲脂性,很容易穿过血脑屏障,并且可以促进中风后的神经恢复^[27]。辛伐他汀治疗显著减轻了高胆固醇血症大鼠TBI后的运动功能障碍,减弱神经元凋亡,抑制神经炎症^[28]。辛伐他汀减轻了大鼠创伤性脑损伤后的轴突损伤并促进原代皮层神经元的轴突生长^[29]。作为一

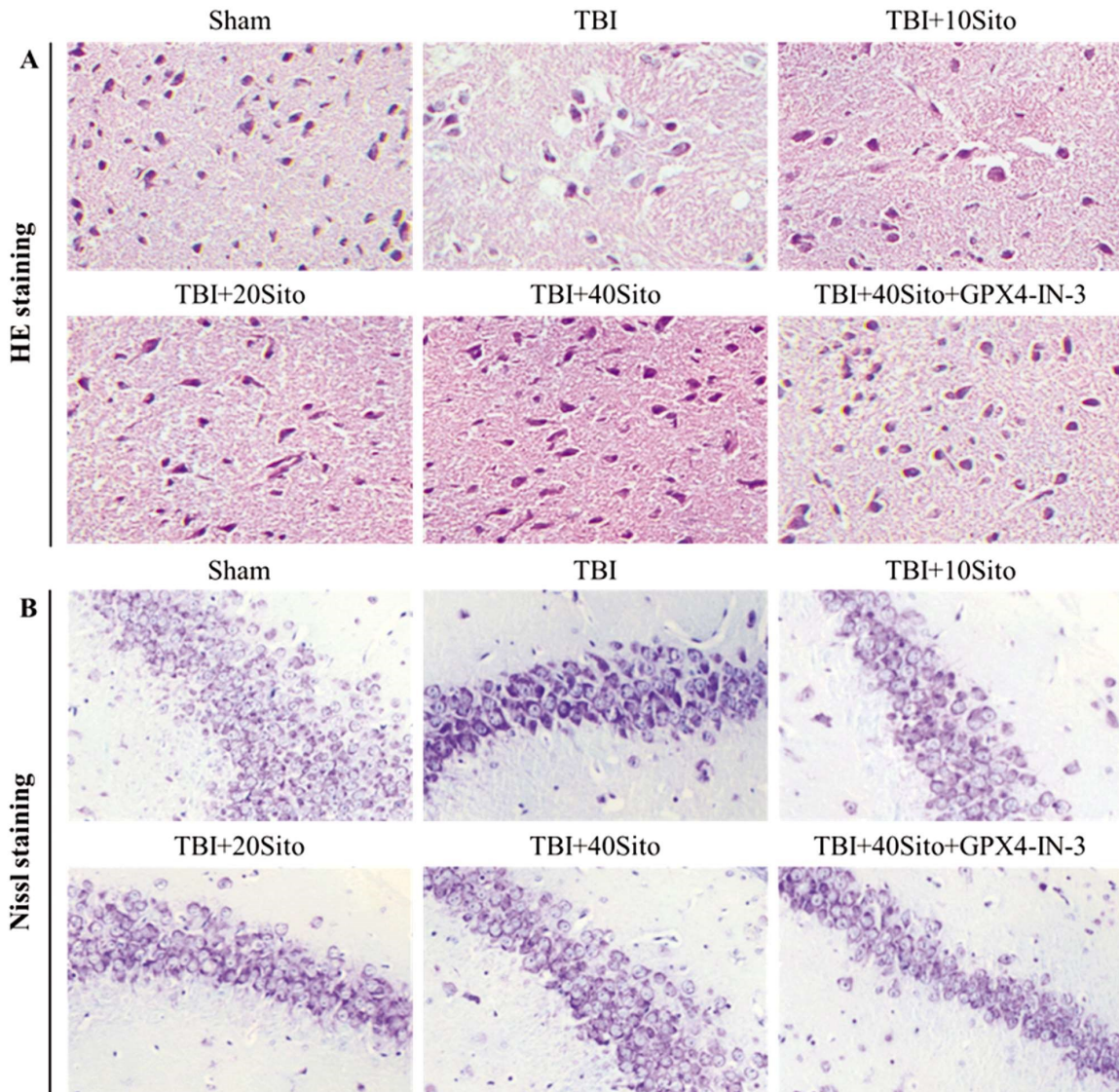


图4 各组大鼠的皮层 HE 染色和海马尼氏染色($\times 400$)

Fig.4 HE staining and hippocampal Nissl staining of the cortex of rats in each group ($\times 400$)

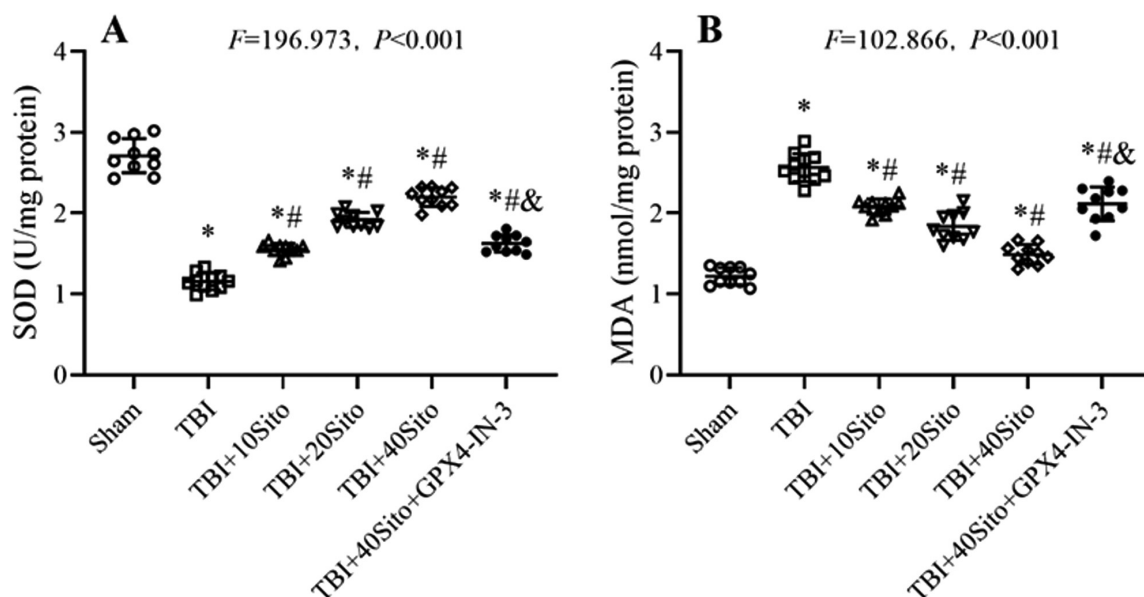


图 5 各组大鼠的脑组织氧化应激指标检测结果

Fig.5 Test results of oxidative stress indexes in brain tissue of rats in each group

Note: A and B: SOD and MDA levels in brain tissue respectively; Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with TBI group, # $P<0.05$; Compared with TBI+40Sito group, & $P<0.05$.

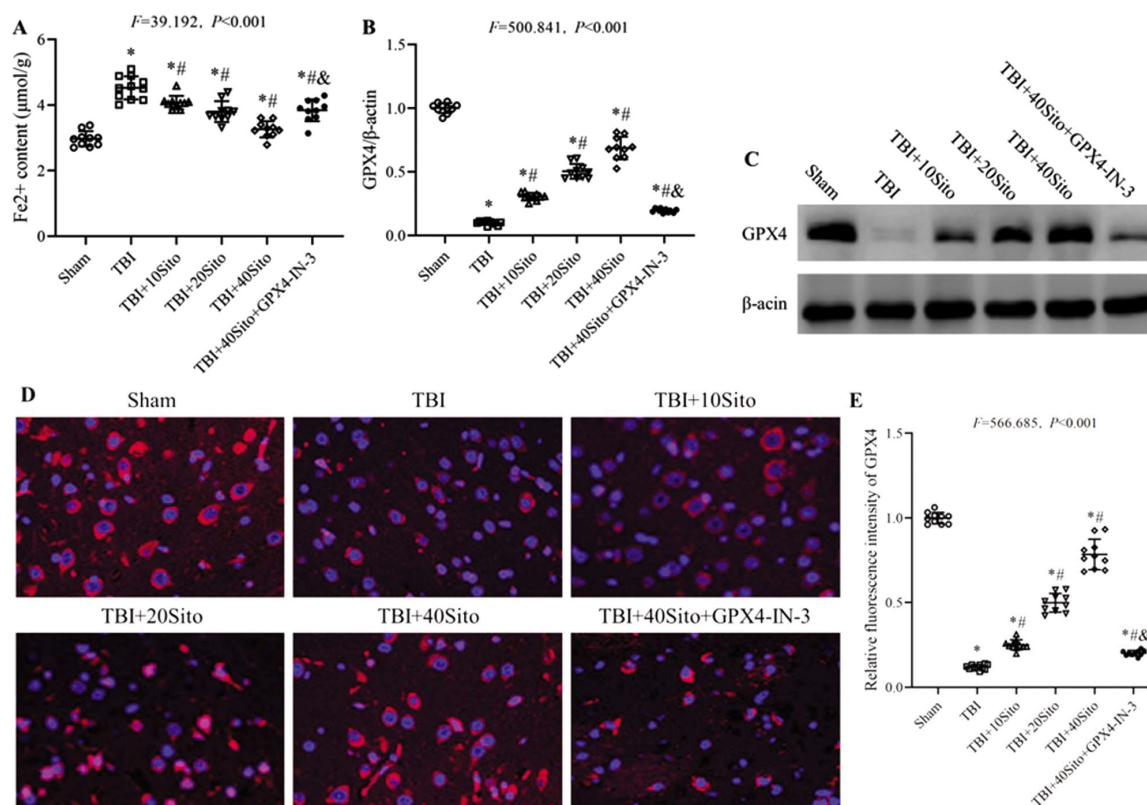


图 6 各组大鼠的脑组织铁死亡途径检测

Fig.6 Ferroptosis pathway in brain tissue of rats in each group

Note: A: Fe^{2+} content in brain tissue; B: Relative expression of GPX4 protein in brain tissue; C: The GPX4 protein was detected by Western blot; D: GPX4 immunofluorescence staining images of brain tissue ($\times 400$); E: GPX4 relative fluorescence intensity in brain tissue; Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with TBI group, # $P<0.05$; Compared with TBI+40Sito group, & $P<0.05$.

种降胆固醇药物, β - 谷甾醇也很容易穿过血脑屏障^[30]。本研究显示, β - 谷甾醇剂量依赖性地降低了 TBI 大鼠的血清 TC、TG 和 LDL-c 水平, 升高了 HDL-c 水平, 纠正了 TBI 后的脂质代谢

紊乱。因此, 本研究推测, β - 谷甾醇减轻 TBI 后继发性损伤的机制可能与调节脂质代谢有关。

铁死亡是一种铁依赖性细胞死亡类型, 铁死亡过程通常伴

随 Fe²⁺ 大量积累和脂质过氧化^[31]。铁超载也是 TBI、阿尔茨海默病、帕金森病、脑缺血等中枢神经系统疾病中神经元铁死亡的关键起始因素^[32]。铁死亡也是认知缺陷的重要诱因之一^[33]。谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)家族的成员具有保护神经元线粒体功能和氧化还原平衡的作用。GPX4 参与调节 DNA 合成、免疫反应、金属离子储存和稳态、维持蛋白质氧化还原状态、抗氧化防御等多种生物学过程。GPX4 是氧化损伤通路的核心蛋白,也是铁死亡的特异性标志物,调控铁死亡氨基酸代谢^[34]。本研究观察到 TBI 大鼠脑组织出现明显氧化应激反应,SOD 水平降低,MDA 水平升高,并且脑组织 Fe²⁺ 含量升高,GPX4 蛋白表达水平降低,这些结果证实 TBI 后大鼠脑组织铁死亡途径被激活,引起了脑组织氧化应激损伤。然而,不同剂量的 β- 谷甾醇抑制了 TBI 大鼠脑组织氧化应激和铁死亡途径。

铁死亡途径的激活除了可引起脑组织氧化损伤、认知功能障碍之外^[11,12],也参与调节脂质代谢,抑制铁死亡可纠正脂质代谢紊乱^[14,35,36]。研究表明,GPX4 具有清除脂质过氧化物,降低磷脂酯化过氧化胆固醇和多不饱和脂肪酸的能力^[37]。GPX4 的抑制或耗竭可引起脂质过氧化物的过量累积,激活铁死亡途径^[38,39]。为了验证 β- 谷甾醇是否通过铁死亡 - 脂质代谢途径减轻 TBI 后的继发性损伤,本研究在 β- 谷甾醇给药的基础上对 TBI 大鼠加用铁死亡诱导剂 GPX4-IN-3,GPX4-IN-3 是 GPX4 特异性抑制剂,可选择性诱导铁死亡^[16]。研究表明,GPX4-IN-3 给药部分减弱了 β- 谷甾醇对 TBI 大鼠继发性损伤的缓解作用,证实了本研究推论,即 β- 谷甾醇部分通过铁死亡 - 脂质代谢途径减轻 TBI 后的继发性损伤。

本研究仍存在不足之处,作为一植物甾醇,β- 谷甾醇具有多种药理活性,铁死亡途径可能只是其发挥治疗作用的途径之一,后续研究中还需要深入揭示 β- 谷甾醇治疗 TBI 后继发性损伤的其他机制。此外,本研究为造模 12 h 后给药,疗程为 14 d,最佳给药时间点和疗程尚未确定,后续实验中还应该进一步考察不同 β- 谷甾醇给药时间点和疗程对 TBI 后继发性损伤的治疗效果。综上所述,本研究表明 β- 谷甾醇可有效减轻 TBI 后的继发性损伤,其机制可能与抑制铁死亡途径介导的氧化应激和脂质代谢紊乱有关。β- 谷甾醇在治疗 TBI 后的继发性损伤方面具有较高的开发前景,值得进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Fordington S, Manford M. A review of seizures and epilepsy following traumatic brain injury[J]. *J Neurol*, 2020, 267(10): 3105-3111.
- [2] Scarboro M, McQuillan KA. Traumatic brain injury update[J]. *AACN Adv Crit Care*, 2021, 32(1): 29-50.
- [3] Capizzi A, Woo J, Verdusco-Gutierrez M. Traumatic brain injury: an overview of epidemiology, pathophysiology, and medical management[J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2): 213-238.
- [4] Mas MF, Mathews A, Gilbert-baffoe. Rehabilitation needs of the elder with traumatic brain injury [J]. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 2017, 28(4): 829-842.
- [5] Nguyen LB, Shefer S, Salen G, et al. Mechanisms for cholesterol homeostasis in rat jejunal mucosa: effects of cholesterol, sitosterol, and lovastatin[J]. *J Lipid Res*, 2001, 42(2): 195-200.
- [6] Yang Q, Yu D, Zhang Y. β-Sitosterol attenuates the intracranial aneurysm growth by suppressing TNF-α-mediated mechanism [J]. *Pharmacology*, 2019, 104(5-6): 303-311.
- [7] Shi C, Liu J, Wu F, et al. β-sitosterol inhibits high cholesterol-induced platelet β-amyloid release [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2011, 43(6): 691-697.
- [8] Ayaz M, Junaid M, Ullah F, et al. Anti-alzheimer's studies on β-sitosterol isolated from polygonum hydropiper L [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 697.
- [9] Kay AD, Day SP, Kerr M, et al. Remodeling of cerebrospinal fluid lipoprotein particles after human traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2003, 20(8): 717-723.
- [10] Thirumangalakudi L, Prakasam A, Zhang R, et al. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice[J]. *J Neurochem*, 2008, 106(1): 475-485.
- [11] 姚鹏, 陈勇, 李依玲, 等. 海马神经细胞铁死亡通过 Nrf2/GPX4 信号通路导致脓毒症相关性脑病大鼠认知功能障碍[J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31(11): 1389-1394.
- [12] Kenny EM, Fidan E, Yang Q, et al. Ferroptosis contributes to neuronal death and functional outcome after traumatic brain injury [J]. *Crit Care Med*, 2019, 47(3): 410-418.
- [13] Xie BS, Wang YQ, Lin Y, et al. Inhibition of ferroptosis attenuates tissue damage and improves long-term outcomes after traumatic brain injury in mice[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(4): 465-475.
- [14] 马贵萍, 于忠杨, 卿立金, 等. 加味二至丸通过抑制铁死亡减轻高脂血症小鼠肝脏脂质沉积 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(2): 259-266.
- [15] 王瑞辉, 郭新荣, 吴涛, 等. 使用电子颅脑损伤仪器制备大鼠颅脑损伤动物模型[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(3): 675-676.
- [16] Xu C, Xiao Z, Wang J, et al. Discovery of a potent glutathione peroxidase 4 inhibitor as a selective ferroptosis inducer [J]. *J Med Chem*, 2021, 64(18): 13312-13326.
- [17] 张辉, 杨林, 陈培莉, 等. 过表达 B 细胞淋巴瘤 / 白血病 -2 对重度创伤性脑损伤大鼠的治疗作用及其机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(1): 92-95.
- [18] 刘恒, 孙凡, 徐倩倩, 等. 黄芩苷对脑小血管病模型大鼠认知功能及脑内血管内皮生长因子和内皮抑素表达水平的影响[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2019, 45(5): 1080-1085.
- [19] Hales CA, Stuart SA, Anderson MH, et al. Modelling cognitive affective biases in major depressive disorder using rodents [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(20): 4524-4538.
- [20] Ceretta LB, Réus GZ, Stringari RB, et al. Imipramine treatment reverses depressive-like behavior in alloxan-diabetic rats[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2012, 28(2): 139-144.
- [21] Parvatikar PP, Patil SM, Patil BS, et al. Effect of Mucuna pruriens on brain NMDA receptor and tau protein gene expression in cerebral ischemic rats [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1092032.
- [22] Adebisi OE, Olayemi FO, Olopade JO, et al. β-sitosterol enhances motor coordination, attenuates memory loss and demyelination in a vanadium-induced model of experimental neurotoxicity [J]. *Pathophysiology*, 2019, 26(1): 21-29.
- [23] Yadav S, Aggarwal P, Khan F, et al. β-sitosterol protects against Aluminium chloride-mediated neurotoxicity [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2023[Online ahead of print].

- [24] Panayotis N, Freund PA, Marvaldi L, et al. β -sitosterol reduces anxiety and synergizes with established anxiolytic drugs in mice[J]. *Cell Rep Med*, 2021, 2(5): 100281.
- [25] Peerdeman SM, Girbes AR, Polderman KH, et al. Changes in cerebral interstitial glycerol concentration in head-injured patients; correlation with secondary events [J]. *Intensive Care Med*, 2003, 29(10): 1825-1828.
- [26] Karathanou A, Paterakis K, Pakopoulou M, et al. Biochemical markers analyzed using microdialysis and traumatic brain injury outcomes[J]. *J Neurosurg Sci*, 2011, 55(3): 173-177.
- [27] Chen J, Zhang ZG, Li Y, et al. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke [J]. *Ann Neurol*, 2003, 53(6): 743-751.
- [28] Chong AJ, Lim SW, Lee YL, et al. The neuroprotective effects of simvastatin on high cholesterol following traumatic brain injury in rats[J]. *World Neurosurg*, 2019, 132: e99-e108.
- [29] Wu H, Mahmood A, Qu C, et al. Simvastatin attenuates axonal injury after experimental traumatic brain injury and promotes neurite outgrowth of primary cortical neurons [J]. *Brain Res*, 2012, 1486: 121-130.
- [30] Li J, Wang X, Liu H, et al. Impaired hepatic and intestinal ATP-binding cassette transporter G5/8 was associated with high exposure of β -sitosterol and the potential risks to blood-brain barrier integrity in diabetic rats[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2014, 66(3): 428-436.
- [31] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [32] Tang S, Gao P, Chen H, et al. The Role of Iron, Its metabolism and ferroptosis in traumatic brain injury[J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 590789.
- [33] Chen S, Chen Y, Zhang Y, et al. Iron metabolism and ferroptosis in epilepsy[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 601193.
- [34] Kagan VE, Mao G, Qu F, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 81-90.
- [35] Li D, Li Y. The interaction between ferroptosis and lipid metabolism in cancer[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 108.
- [36] Liang D, Minikes AM, Jiang X. Ferroptosis at the intersection of lipid metabolism and cellular signaling [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(12): 2215-2227.
- [37] Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(5): 3289-3303.
- [38] Liu T, Jiang L, Tavana O, et al. The deubiquitylase OTUB1 mediates ferroptosis via stabilization of SLC7A11[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(8): 1913-1924.
- [39] Ni J, Chen K, Zhang J, et al. Inhibition of GPX4 or mTOR overcomes resistance to lapatinib via promoting ferroptosis in NSCLC cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 567: 154-160.

(上接第 90 页)

- [21] Can B, Tutuncu Y, Can B, et al. Inflammatory markers are associated with the progression of gestational diabetes to metabolic syndrome[J]. *J Obstet Gynaecol*, 2022, 42(6): 1857-1861.
- [22] Amirani E, Aghadavod E, Shafabakhsh R, et al. Anti-inflammatory and antioxidative effects of thiamin supplements in patients with gestational diabetes mellitus [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2022, 35(11): 2085-2090.
- [23] Wen Q, Hu M, Lai M, et al. Effect of acupuncture and metformin on insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome and insulin resistance: a three-armed randomized controlled trial[J]. *Hum Reprod*, 2022, 37(3): 542-552.
- [24] Lovell H, Mitchell A, Ovadia C, et al. A multi-centered trial investigating gestational treatment with ursodeoxycholic acid compared to metformin to reduce effects of diabetes mellitus (GUARD): a randomized controlled trial protocol[J]. *Trials*, 2022, 23(1): 571.
- [25] Xie Y, Zhao H, Zhao M, et al. Effects of resistance exercise on blood glucose level and pregnancy outcome in patients with gestational diabetes mellitus: a randomized controlled trial [J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2022, 10(2): e002622.
- [26] Wu Y, Xu M, Zheng G. Application of diversified and quantitative management model of exercise intervention in patients with gestational diabetes mellitus [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2022, 35(25): 5001-5007.
- [27] Moon JH, Jang HC. Gestational Diabetes Mellitus: Diagnostic Approaches and Maternal-Offspring Complications [J]. *Diabetes Metab J*, 2022, 46(1): 3-14.
- [28] Xu H, Hutcheon JA, Liu X, Stephansson O, et al. Risk of gestational diabetes mellitus in relation to early pregnancy and gestational weight gain before diagnosis: A population-based cohort study [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2022, 101(11): 1253-1261.