

大麻二酚抑制创伤性脑损伤大鼠睾丸凋亡相关蛋白的表达

李佳丽^{1*}, 凌腾晗^{1*}, 曹艳¹, 尹爱平¹, 李恒希¹, 杨莉², 吴海鹰², 李坪¹

摘要 目的 研究创伤性脑损伤(TBI)后大鼠睾丸的损伤情况,并分析大麻二酚(CBD)对TBI引起的睾丸损伤的干预作用。方法 将18只SD大鼠随机分为3组:假手术组(Sham组)、模型组(TBI组)和治疗组(TBI+CBD组)。采用HE染色法观察大鼠睾丸组织病理学变化,采用ELISA法检测大鼠血清中的睾酮水平。采用TUNEL染色法观察细胞

凋亡,同时采用免疫荧光染色、Western blot和RT-qPCR法检测Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)蛋白及mRNA表达。结果 HE结果显示,与Sham组比较,TBI组大鼠睾丸出现病理改变。ELISA检测表明,与Sham组比较,TBI组的睾酮水平下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。免疫荧光结果显示,与Sham组比较,TBI组大鼠睾丸Bax荧光表达强度升高($P < 0.01$);而CBD干预后Bax荧光强度下降且Bcl-2荧光强度升高($P < 0.01$)。Western blot结果表明,大鼠经CBD治疗后降低了睾丸凋亡相关蛋白(Bax和Cleaved Caspase-3,均 $P < 0.05$)和炎症相关蛋白(TNF- α , $P < 0.01$)的蛋白水平,升高了抗凋亡蛋白Bcl-2的蛋白水平($P < 0.05$)。RT-qPCR结果趋势近似,与TBI组比较,CBD干预后Bax($P < 0.05$)和TNF- α ($P < 0.01$)的mRNA表达下降,而Bcl-2的mRNA表达升高($P < 0.05$)。结论 TBI导致睾丸损伤,CBD能够减轻TBI大鼠睾丸组织的凋亡和炎症反应。

关键词 大麻二酚;创伤性脑损伤;凋亡;炎症;大鼠;睾丸
中图分类号 R 742

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1128-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.004

2024-02-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82060241,82260387);云南省科技厅计划项目(编号:202101AY070001-002);云南省医疗机构科研项目(编号:202403AC100010);昆明医科大学研究生创新基金(编号:2023S133)

作者单位:¹昆明医科大学人体解剖学与组织胚胎学系,昆明 650500

²昆明医科大学第一附属医院急诊科,昆明 650032

作者简介:李佳丽,女,硕士研究生;

吴海鹰,女,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: why02092022@163.com;

李坪,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: kyzp@163.com

* 对本文具有同等贡献

Role of the renin-angiotensin system in myocardial injury in rats with vascular dementia

Li Jian, Zhu Bohan, Gao Peng, Chen Ji, Chen Hemu, Gao Xiaoping

(Dept of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To observe the role of the renin-angiotensin system in myocardial injury induced by experimental vascular dementia. **Methods** Eighteen adult male rats were categorized into a normal group, sham group, and modified 2-vessel occlusion group (model). To assess the myocardial injury caused by experimental vascular dementia, immunostaining was conducted to evaluate the interstitial collagen fraction and myocyte cross-sectional area. The concentrations of angiotensin II (Ang II) and angiotensin 1-7 (Ang1-7) in the serum, as well as the expression levels of angiotensin converting enzyme (ACE), angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), Ang II, Ang1-7, angiotensin type 1 (AT1) receptor, and Mas receptor in the myocardium, were assessed. **Results** Modified 2-vessel occlusion led to pronounced cognitive dysfunction ($P < 0.01$) and myocardial injury ($P < 0.0001$) when compared to the sham and normal groups. Additionally, modified 2-vessel occlusion induced significant upregulation of the ACE/Ang II/AT1 receptor axis ($P < 0.01$) and downregulation of the ACE2/Ang1-7/Mas axis ($P < 0.05$) of the renin-angiotensin system in the myocardium. **Conclusion** Myocardial injury in rats with experimental vascular dementia may be related to dysregulation of the renin-angiotensin system.

Key words vascular dementia; renin-angiotensin system; myocardial injury; brain-heart interaction

创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)可导致严重的神经损伤,给家庭和社会带来沉重负担,并且中青年男性患者较多^[1-2]。研究^[3]发现,TBI会影响其他器官系统的功能,如心脏、肝和性腺。小鼠的睾酮水平与TBI后的脑水肿以及神经功能缺损呈负相关,此外,成人TBI后也会导致睾酮水平下降,并且重度TBI急性期患者的总睾酮水平相比轻、中度TBI患者下降更为明显^[4]。然而大部分实验中,TBI后性腺功能检测都只涉及相关激素水平的检测,有必要了解TBI是否对性腺造成其他负面作用。大麻二酚(cannabidiol, CBD)是大麻中含量较高的一种成分,在各种中枢神经系统疾病中显示出强大的抗炎和抗氧化特性^[5]。然而CBD是否在TBI诱导的睾丸损伤中发挥干预作用还是未知的。该研究旨在探索TBI是否造成睾丸损伤以及CBD能否对其进行干预,并且为CBD的用药安全提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级SD雄性大鼠,体质量260~280 g,共18只,由昆明医科大学实验动物中心提供(动物伦理批号:KMMU2020054)。在温度20~25℃、湿度55%~65%给予自由饮食、饮水的环境中饲养。

1.1.2 主要试剂与仪器 CBD粉末(云南汉素生物科技有限公司,货号:20200601,纯度 $\geq 99.5\%$),兔抗大鼠Bax多克隆抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,货号:AF0120),兔抗大鼠Bcl-2多克隆抗体(美国Abcam公司,货号:ab196495),兔抗大鼠Cleaved Caspase-3多克隆抗体(武汉赛尔维生物科技有限公司,货号:GB11532),兔抗大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)多克隆抗体(美国Millipore公司,货号:AB1837p),兔抗大鼠 β -actin多克隆抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:20536-1-AP、SA00001-2),Cy3标记的山羊抗兔IgG抗体、含DAPI的抗荧光衰减封片剂(美国Sigma公司,货号:C2306、F6057),大鼠睾酮ELISA试剂盒(南京建成科技有限公司,货号:H090-1-2),HE染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号:G1120),TUNEL染色试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,货号:KGA702C200),RNAiso Plus试剂盒、逆转录试剂盒(北京宝日医生物技术有限公司,货号:9108、

RR047A),BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:P00010),高灵敏化学发光检测试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司,货号:BL520A),凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司,型号:Chemi Doc™ XRS+),荧光倒置显微镜(德国Zeiss公司,型号:Axio Observer)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型制备 将18只SD大鼠随机分为3组:假手术组(Sham组)、模型组(TBI组)和治疗组(TBI+ CBD组)。TBI模型制备:2%戊巴比妥钠(2 ml/kg)腹腔麻醉,固定大鼠头部,以矢状缝右侧2.5 mm和冠状缝下侧2 mm为中心,开一个直径约6 mm的骨窗,打击开骨窗部位后止血、封闭骨窗并缝合伤口。Sham组开骨窗后不进行打击,余同TBI组。TBI+ CBD组大鼠造模前30 min和造模后6 h进行CBD(10 mg/kg)腹腔注射给药。TBI组注射等体积2%吐温-80溶液。造模1 d后取材进行后续实验。

1.2.2 HE染色检测睾丸组织病理变化 各组大鼠在造模1 d后处死,固定睾丸组织后进行石蜡包埋,制备厚度5 μ m的石蜡切片。切片脱蜡至水后,常规染色,梯度乙醇脱水、二甲苯透明后使用中性树脂胶封固切片。

1.2.3 ELISA法检测睾酮表达情况 按照ELISA试剂盒的说明书检测大鼠血清中的睾酮含量。

1.2.4 免疫荧光染色检测睾丸组织Bax、Bcl-2蛋白阳性表达情况 石蜡切片抗原修复后,使用10%山羊血清室温封闭1 h,滴加兔抗大鼠Bax多克隆抗体或兔抗大鼠Bcl-2多克隆抗体(1:200)于4℃冰箱过夜,次日滴加Cy3标记的山羊抗兔IgG抗体(1:200)室温孵育1 h,使用含有DAPI的抗荧光衰减封片剂封片。使用ImageJ软件分析阳性细胞的平均荧光强度。

1.2.5 TUNEL染色检测睾丸组织的细胞凋亡情况 使用上述睾丸组织切片,脱蜡至水后,严格按照试剂盒说明书进行检测。

1.2.6 Western blot法检测睾丸组织Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3、TNF- α 蛋白表达量 提取各组大鼠睾丸组织蛋白,通过BCA法测定蛋白浓度。每孔加入20 μ g样品蛋白,通过电泳将蛋白分离,电转移至PVDF膜,5%脱脂牛奶常温封闭2 h后,用1:1 000的兔抗大鼠Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3或TNF- α 多克隆抗体和1:5 000的兔抗大鼠 β -actin多克隆抗体4℃摇床孵育过夜,次日用1:

10 000的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 1 h 然后进行显影。使用 ImageJ 软件分析每组蛋白表达灰度值。

1.2.7 RT-qPCR 实验检测睾丸组织 Bax、Bcl-2、TNF-α 的 mRNA 表达量 使用 RNAiso Plus 试剂盒提取总 RNA ,然后逆转录为 cDNA 进行 PCR 实验 ,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对 mRNA 表达量。相关引物由上海生工生物有限公司合成 ,GAPDH 上游引物为: 5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3' ,下游引物为: 5'-TGATTTCCCGTAGGACCCGA-3' ; Bax 上游引物为: 5'-CTTCAGGGATGGGCTGAACT-3' ,下游引物为: 5'-ATCTCCCTGTTGACGCTCTC-3' ; Bcl-2 上游引物为: 5'-GAGACACCTGAGCTGACCTT-3' ,下游引物为: 5'-GTTGTCCAGTTCATCGCCAA-3' ; TNF-α 上游引物为: 5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTA-3' ,下游引物为: 5'-CGAGGGAGAGTAGTCAAGGT-3' 。

1.3 统计学处理 使用 Graph Pad Prism 9.0 软件进行统计分析 ,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 Student's *t* 检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TBI 大鼠睾丸组织病理变化和血清睾酮水平变化 Sham 组大鼠的睾丸组织结构清晰完整 ,生精细胞排列有序。与 Sham 组比较 ,TBI 组大鼠曲细精管管腔变大 ,生精细胞数量和层次减少 ,排列紊乱 ,见图 1A。ELISA 法检测大鼠的血清睾酮水平 ,结果表明 ,与 Sham 组比较 ,TBI 组有所下降 ,但差异无统计学意义($t = 0.832 P > 0.05$) ,见图 1B。

2.2 三组大鼠睾丸组织 Bax、Bcl-2 平均荧光强度比较 三组大鼠免疫荧光实验结果显示: 与 Sham 组比较 ,TBI 组 Bax 平均荧光强度值升高 ($t = 4.666 P < 0.01$) ,Bcl-2 平均荧光强度值有下降 ,但差异无统计学意义($t = 1.271 P > 0.05$) ; 与 TBI 组比较 ,TBI + CBD 组 Bax 平均荧光强度值下降 ,而 Bcl-2 平均荧光强度值升高($t = 6.332、5.213$,均 $P < 0.01$) ,见图 2。

2.3 三组大鼠睾丸组织凋亡相关因子表达比较 Western blot 实验结果显示: 与 Sham 组比较 ,TBI 组 Bax 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达升高 ,Bcl-2 蛋白表达下降($t = 3.302、4.317、3.037$,均 $P < 0.05$) 。与 TBI 组比较 ,TBI + CBD 组 Bax 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达下降 ,Bcl-2 蛋白表达升高($t = 4.075、3.934、4.318$,均 $P < 0.05$) 。RT-qPCR 结果显示: 与 Sham 组比较 ,TBI 组 Bax 的 mRNA 表达升高 ,Bcl-2 的 mRNA 表达下降($t = 3.617、6.625$,均 $P < 0.05$) 。与 TBI 组比较 ,TBI + CBD 组 Bax 的 mRNA 表达下降 ,Bcl-2 的 mRNA 表达升高($t = 5.117、3.163$,均 $P < 0.05$) 。此外 ,TUNEL 染色结果显示 ,TBI 组大鼠睾丸组织发生凋亡 ,CBD 干预后大鼠睾丸凋亡改善 ,见图 3。

2.4 三组大鼠睾丸组织 TNF-α 蛋白和 mRNA 表达比较 Western blot 和 RT-qPCR 结果显示: 与 Sham 组比较 ,TBI 组 TNF-α 的蛋白和 mRNA 表达升高($t = 5.714、6.489$,均 $P < 0.01$) 。与 TBI 组比较 ,TBI + CBD 组 TNF-α 的蛋白和 mRNA 表达下降($t = 5.340、6.561$,均 $P < 0.01$) ,见图 4。

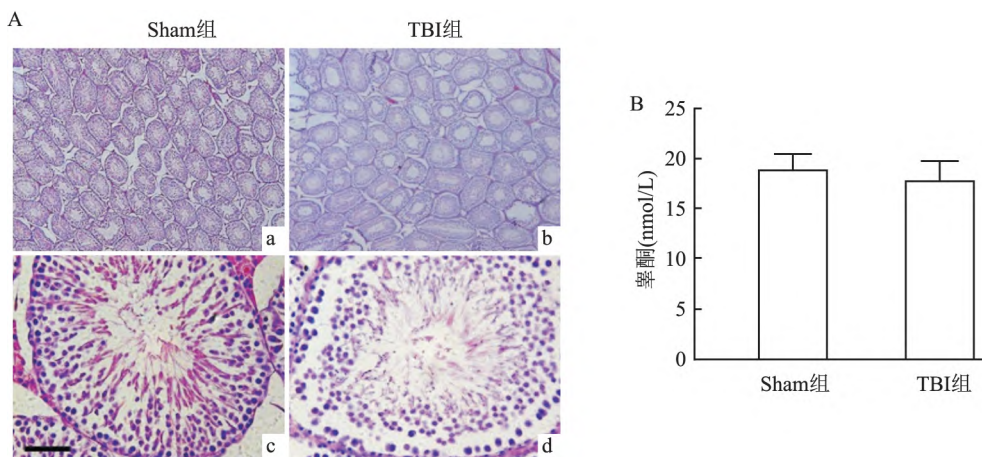


图 1 大鼠睾丸组织 HE 染色结果和血清睾酮水平变化

A: 大鼠睾丸 HE 染色图片 (a: Sham 组 $\times 40$ b: TBI 组 $\times 40$ c: Sham 组 $\times 400$ d: TBI 组 $\times 400$) ; B: 大鼠血清睾酮水平变化的比较

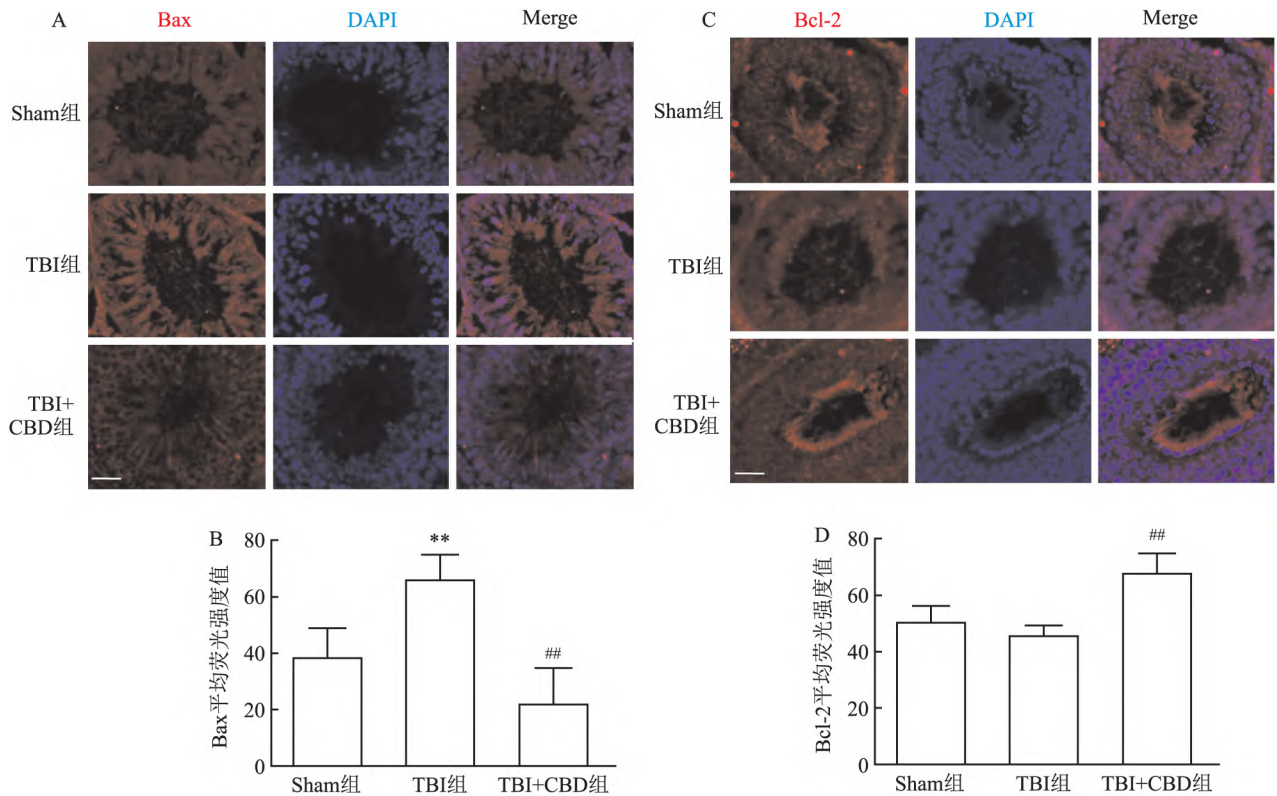


图2 CBD干预对TBI大鼠睾丸组织Bax、Bcl-2平均荧光强度表达的影响

A: Bax 免疫荧光图片 ×400; B: Bax 阳性表达平均荧光强度值的比较; C: Bcl-2 免疫荧光图片 ×400; D: Bcl-2 阳性表达平均荧光强度值的比较; 与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 TBI 组比较: ## $P < 0.01$

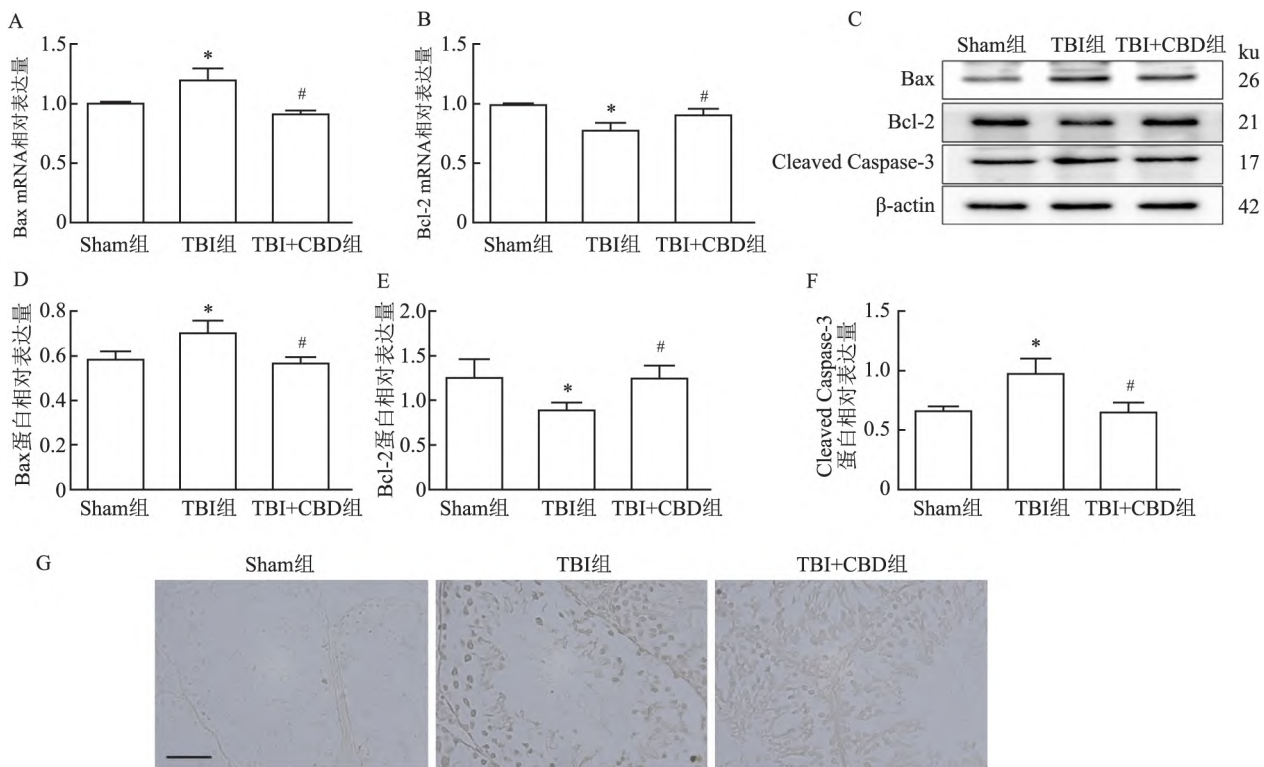


图3 CBD干预对TBI大鼠睾丸组织凋亡相关蛋白的影响

A: Bax 的 mRNA 表达的比较; B: Bcl-2 的 mRNA 表达的比较; C: Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 和 β -actin 蛋白条带图; D: Bax 蛋白表达的比较; E: Bcl-2 蛋白表达的比较; F: Cleaved Caspase-3 蛋白表达的比较; G: 大鼠睾丸组织 TUNEL 染色结果图 ×400; 与 Sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 TBI 组比较: # $P < 0.05$

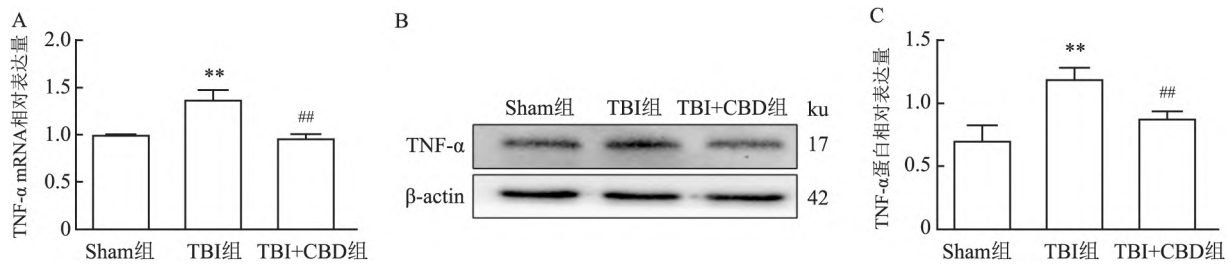


图4 CBD 干预对 TBI 大鼠睾丸组织 TNF- α 的蛋白与 mRNA 表达水平的影响

A: TNF- α 的 mRNA 表达的比较; B: TNF- α 和 β -actin 蛋白条带图; C: TNF- α 蛋白表达的比较; 与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 TBI 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

课题组前期^[6-7]在相同 TBI 模型上检测出 TBI 后 1 d 脑水肿最为严重,且 CBD(10 mg/kg) 干预效果最佳。因此在本研究中,采用 10 mg/kg CBD 对 TBI 干预 1 d,来探究 TBI 后是否发生睾丸损伤,以及 CBD 是否对其具有干预作用。本研究检测了 TBI 大鼠血清睾酮水平,结果表明,TBI 后睾酮有所下降,但差异无统计学意义。Kopczak et al^[8]对 340 例年龄在 18 ~ 65 岁之间的 TBI 患者进行检测,结果显示在所有接受筛查的男性中,40% 的人睾酮水平较低。同时 Lopez et al^[9]研究显示,与正常小鼠比较,TBI 小鼠的睾酮有所下降,但差异无统计学意义,这与本研究结果一致。这说明 TBI 后睾酮水平变化可能存在个体差异。然而,HE 染色结果却显示 TBI 大鼠睾丸组织发生了病理改变。本研究发现,TBI 大鼠睾丸中 Bax 的蛋白和 mRNA 水平升高,Cleaved Caspase-3 的蛋白水平升高,而 Bcl-2 的蛋白和 mRNA 水平下降。同时,TBI 后睾丸组织 TNF- α 蛋白和 mRNA 水平表达增加。这表明 TBI 确实会导致睾丸组织发生凋亡和炎症。研究^[3]显示,TBI 后,白细胞进入脑实质并释放炎症细胞因子,炎症介质被转移到血液中,并在外周器官中产生全身性炎症反应。这与本研究结果类似,即 TBI 会增加睾丸 TNF- α 蛋白和 mRNA 水平。但 TBI 引起的睾丸损伤是否是由炎症引起,还需进一步研究。

CBD 是大麻的主要非精神活性成分,具有广泛的潜在治疗特性,被证明在多种疾病中具有神经保护作用^[10]。本研究证明了 CBD 对 TBI 所致睾丸凋亡和炎症具有干预作用。然而,一些研究表明,CBD 会对睾丸造成损伤。Dochez et al^[11]研究显示,72 h 后,10⁻⁵ mol/L CBD 显著降低了发育 8 ~ 10 周的人

类胎儿睾丸有机培养基中的睾酮水平,但在更低浓度 CBD 的作用下,比如 10⁻⁶ mol/L 和 10⁻⁷ mol/L 的 CBD 对睾酮分泌就无影响。研究^[12]表明,在人类成年睾丸外植体中,10⁻⁵ mol/L 的 CBD 在 48 h 和 7 d 后同样不会导致细胞凋亡。据报道^[13],30 mg 的 CBD 不会引起人体肝肾功能指标的生理相关变化。可以推测 CBD 对睾丸的潜在负面影响取决于给药方法和浓度。结合本研究结果,腹腔注射 10 mg/kg 的 CBD 对睾丸组织具有保护作用。

综上所述,本研究揭示了 TBI 引起睾丸组织的损伤,包括凋亡和炎症,而 CBD 干预可以减轻 TBI 对睾丸组织的损伤。然而,本研究也有一定的局限性,未来将深入研究 TBI 后睾丸组织凋亡和炎症的机制以及采用更全面的指标检测 TBI 后睾丸损伤情况。

参考文献

- [1] Jiang J, Gao G, Feng J, et al. Traumatic brain injury in China[J]. Lancet Neurol 2019, 18(3): 286-95.
- [2] 蒋鸿雁, 杨凤, 曹艳, 等. 2004 ~ 2013 年昆明医科大学第一附属医院创伤性脑损伤流行病学特征调查[J]. 昆明医科大学学报 2022, 43(4): 12-8.
- [3] Sabet N, Soltani Z, Khaksari M. Multipotential and systemic effects of traumatic brain injury[J]. J Neuroimmunol 2021, 357: 577619.
- [4] Carteri R, Kopczynski A, Rodolphi M, et al. Testosterone administration after traumatic brain injury reduces mitochondrial dysfunction and neurodegeneration[J]. J Neurotrauma 2019, 36(14): 2246-59.
- [5] Cassano T, Villani R, Pace L, et al. From cannabis sativa to cannabidiol: Promising therapeutic candidate for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. Front Pharmacol 2020, 11: 124.
- [6] Jiang H, Li H, Cao Y, et al. Effects of cannabinoid (CBD) on blood brain barrier permeability after brain injury in rats[J]. Brain Res 2021, 1768: 147586.
- [7] 曹艳, 李恒希, 李佳丽, 等. 创伤性脑损伤大鼠不同脑区胶质

- 纤维酸性蛋白表达的变化[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(11): 1828–32, 1840.
- [8] Kopeczak A, Kilimann I, Von Rosen F, et al. Screening for hypopituitarism in 509 patients with traumatic brain injury or subarachnoid hemorrhage[J]. *J Neurotrauma* 2014, 31(1): 99–107.
- [9] Lopez R, Acaz F, Spezzano R, et al. Profiling neuroactive steroid levels after traumatic brain injury in male mice[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(10): 3983–93.
- [10] Calapai F, Cardia L, Sorbara E, et al. Cannabinoids, blood-brain barrier, and brain disposition[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(3): 265.
- [11] Dochez A, Desdoits L, Matias I, et al. Expression of the endocannabinoid system and response to cannabinoid components by the human fetal testis[J]. *BMC Medicine* 2023, 21(1): 219.
- [12] Da S, Dochez A, Desdoits C, et al. The acute exposure of human adult testis tissue to cannabinoids THC and CBD does not impact testosterone production nor germ cell lineage[J]. *World J Mens Health* 2023, 41(4): 928–39.
- [13] Abbotts K, Ewell T, Butterklee H, et al. Cannabidiol and cannabidiol metabolites: pharmacokinetics, interaction with food and influence on liver function[J]. *Nutrients* 2022, 14(10): 2152.

Cannabidiol inhibits the express of apoptosis-related proteins in the testis of rats with traumatic brain injury

Li Jiali¹, Ling Tenghan¹, Cao Yan¹, Yin Aiping¹, Li Hengxi¹, Yang Li², Wu Haiying², Li Ping¹

(¹Dept of Human Anatomy and Histology & Embryology, Kunming Medical University, Kunming 650500;

²Dept of Emergency, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032)

Abstract Objective To investigate testicular damage in traumatic brain injury (TBI) rats and to analyze the interventional effects of cannabidiol (CBD) on TBI-induced testicular damage. **Methods** 18 Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: the sham operation group (Sham group), model group (TBI group) and treatment group (TBI + CBD group). HE staining was used to observe the testicular histopathological changes in the rat testis. ELISA was used to detect testosterone level in rat serum. TUNEL staining was utilized to observe apoptosis, while immunofluorescence staining, Western blot and RT-qPCR were employed to evaluate Bax, Bcl-2, Cleaved Caspase-3 and TNF- α protein and mRNA expression. **Results** HE staining showed pathological changes in the testes of TBI rats compared with those in the Sham group. ELISA assay showed a decrease in testosterone levels in the TBI group compared to the Sham group, but there was no significant difference ($P > 0.05$). Immunofluorescence results showed that the intensity of Bax fluorescence expression increased in the TBI group compared with the Sham group ($P < 0.01$), whereas the intensity of Bax fluorescence decreased and the intensity of Bcl-2 fluorescence increased in the rats after the CBD intervention ($P < 0.01$). Western Blot results showed that CBD treatment in rats decreased the protein levels of testicular apoptosis-related proteins (Bax and Cleaved Caspase-3, all $P < 0.05$) and inflammation-related proteins (TNF- α , $P < 0.01$), and increased the protein level of the anti-apoptotic protein, Bcl-2 ($P < 0.05$). The trend of RT-qPCR results was similar, with mRNA expression of Bax ($P < 0.05$) and TNF- α ($P < 0.01$) decreased and mRNA expression of Bcl-2 increased after CBD intervention compared with the TBI group ($P < 0.05$). **Conclusion** TBI induces testis injury, and CBD treatment effectively repairs apoptosis and inflammation in testicular tissue of TBI rats.

Key words cannabidiol; traumatic brain injury; apoptosis; inflammatory; rats; testis