

饱和氢盐水对短暂性脑缺血再灌注损伤小鼠海马 PERK/eIF2 α /ATF4 信号通路的影响

张晨^a, 吉飞跃^a, 郑良凤^a, 成守亮^a, 王祥^b, 郭宗锋^{b*} (南通大学附属海安医院, a.中心实验室, b.麻醉科, 江苏 南通 226600)

摘要: 目的 探讨饱和氢盐水对短暂性脑缺血再灌注损伤小鼠海马 PERK/eIF2 α /ATF4 信号通路的影响。方法 选择 SPF 级健康♂ C57BL/6 小鼠 150 只, 采用随机数字表法将其分为 5 组($n=30$): 对照组、假手术组、脑缺血再灌注组、饱和氢盐水治疗组和生理盐水治疗组。于再灌注 12, 24 h 行神经行为学评分, 然后处死小鼠取海马组织, 采用 TUNEL 法测定海马 CA1 区细胞凋亡指数, 分别采用 Western blotting 和 Real-time PCR 法测定海马 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 及其 mRNA 的表达水平。结果 与对照组、假手术组相比, 脑缺血再灌注组、饱和氢盐水治疗组和生理盐水治疗组小鼠神经行为学评分升高, 海马 CA1 区神经细胞凋亡指数升高, 海马 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 及其 mRNA 的表达上调(P 均 <0.05); 与脑缺血再灌注组、生理盐水治疗组相比, 饱和氢盐水治疗组小鼠神经行为学评分降低, 海马 CA1 区神经细胞凋亡指数降低, PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 及其 mRNA 的表达下调(P 均 <0.05)。结论 饱和氢盐水可改善小鼠短暂性脑缺血再灌注损伤, 其机制可能与抑制海马 PERK/eIF2 α /ATF4 信号通路有关。

关键词: 饱和氢盐水; 脑缺血; 再灌注损伤; 海马; 磷酸化的细胞外信号调节激酶; 真核翻译起始因子 2 α ; 活化转录因子 4

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)07-0807-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.07.006

引用本文: 张晨, 吉飞跃, 郑良凤, 等. 饱和氢盐水对短暂性脑缺血再灌注损伤小鼠海马 PERK/eIF2 α /ATF4 信号通路的影响[J]. 中国现代应用药理学, 2021, 38(7): 807-813.

Effects of Hydrogen-rich Saline on Hippocampus PERK/eIF2 α /ATF4 Signaling Pathway in Mice After Transient Cerebral Ischemia Reperfusion Injury

ZHANG Chen^a, JI Feiyue^a, ZHENG Liangfeng^a, CHENG Shouliang^a, WANG Xiang^b, GUO Zongfeng^{b*} (Nantong University Hai'an Hospital, a.Department of Central Laboratory, b.Department of Anesthesiology, Nantong 226600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the effect of hydrogen-rich saline on hippocampus PERK/eIF2 α /ATF4 protein signaling pathways in mice after transient cerebral ischemia reperfusion injury. **METHODS** One hundred and fifty healthy male C57BL/6 mice were divided into 5 groups($n=30$) using a random number table: control group, sham operation group, cerebral ischemia-reperfusion group, hydrogen-rich saline treatment group and normal saline treatment group. Neurobehavioral score was assessed at 12, 24 h of reperfusion. Then mice in each group were sacrificed, and the hippocampal tissues were obtained and the apoptosis index of CA1 in hippocampus were determined by TUNEL. The expression of PERK, eIF2 α , ATF4, CHOP, caspase-3 protein and mRNA were determined by Western blotting and real-time polymerase chain reaction, respectively. **RESULTS** Compared with the control group and the sham operation group, the neurobehavioral score and apoptosis index of hippocampal CA1 region were increased, and the expression of PERK, eIF2 α , ATF4, CHOP, caspase-3 and their mRNA were up-regulated in the cerebral ischemia-reperfusion group, hydrogen-rich saline treatment group and normal saline treatment group(all $P<0.05$). Compared with cerebral ischemia-reperfusion group and normal saline treatment group, the neurobehavioral score and apoptosis index in hippocampus CA1 region were decreased and the expression of PERK, eIF2 α , ATF4, CHOP, caspase-3 and their mRNA were down-regulated in the hydrogen-rich saline treatment group(all $P<0.05$). **CONCLUSION** Hydrogen-rich saline can improve transient cerebral ischemia reperfusion injury in mice, and its mechanism may be associated with inhibited activation of PERK/eIF2 α /ATF4 signaling pathway.

KEYWORDS: hydrogen-rich saline; brain ischemia; reperfusion injury; hippocampus; PERK; eIF2 α ; ATF4

缺血性脑卒中是指由于脑部血液供应障碍, 缺血缺氧引起的局限性脑组织的缺血性坏死。它是目前严重危害中老年人身体健康和生命的主要疾病之一, 具有发病率高、死亡率高、致残率高、复发率高、合并症多、治愈率低等特点^[1]。目前研

究发现脑缺血再灌注损伤机制包括: 能量代谢、炎症反应、细胞凋亡等^[2]。因此如何防治脑缺血再灌注损伤是国内外研究的热点。未折叠蛋白反应是内质网损害时的一种细胞应答反应。在应激条件下, 内质网内大量未折叠、错误折叠蛋白质的

作者简介: 张晨, 女, 主管技师 Tel: (0513)88821001 E-mail: 382415368@qq.com *通信作者: 郭宗锋, 男, 硕士, 主治医师 Tel: 15006276006 E-mail: 296227324@qq.com

中国现代应用药理学 2021 年 4 月第 38 卷第 7 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2021 April, Vol.38 No.7

· 807 ·

积累, 导致神经细胞凋亡。有研究发现 PERK/eIF2 α /ATF4 信号通路是未折叠蛋白反应重要的信号通路, 其参与脑缺血再灌注损伤的神经细胞凋亡^[3]。氢是自然界最简单的元素, 氢气广泛存在于自然界中, 是无色、无嗅、无味且具有一定还原性的双原子气体。将纯氢在生理盐水中溶解, 制造出含氢的生理盐水饱和溶液即饱和氢盐水在炎症反应、神经退行性变、代谢疾病等动物实验和临床研究中有保护作用, 主要机制可能与抗氧化损伤、抗炎性反应损伤和减少细胞凋亡有关^[4]。有研究发现, 饱和氢盐水可以有效减少脑缺血再灌注损伤, 其机制与内质网应激有关^[5]。但饱和氢盐水是否通过抑制 PERK/eIF2 α /ATF4 信号通路减轻短暂性脑缺血再灌注损伤, 国内外尚未见相关报道。因此, 本实验通过建立小鼠脑缺血再灌注损伤模型, 旨在探讨饱和氢盐水对短暂性脑缺血再灌注损伤小鼠海马 PERK/eIF2 α /ATF4 信号通路的影响, 针对这一问题进行评价, 为饱和氢盐水应用于临床提供一定的依据。

1 材料

1.1 动物

实验动物的应用及实验程序得到中心实验动物应用管理委员会同意。选择 SPF 级健康 C57BL/6 小鼠 150 只, ♂, 10~12 周龄, 体质量 20~22 g, 实验动物购于青岛大任富成畜牧有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(鲁)20140007, 饲养于 12 h 黑白昼夜交替的恒定室温及湿度的环境中, 在实验开始前小鼠适应饲养环境 1 周, 自由进食饮水。

1.2 仪器

CX31 型高倍显微镜(日本 Olympus 公司); Thermo Forma 905-ULTS 型-80 °C 冰箱、MaxQ 5000 型摇床、ABI7300 荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司); Image-pro plus 6.0 软件(美国 Media Cybernetics 公司); Quantity one 图像分析软件(美国 Bio Rad 公司); BG-caTANK 型电泳仪(北京百晶生物公司)。

1.3 试剂

PERK(批号: ab192591)、eIF2 α (批号: ab169528)、ATF4(批号: ab184909)、CHOP(批号: ab11419)、caspase-3(批号: ab32351)均购自英国 Abcam 公司; RIPA 裂解液(北京 Beyotime 公司, 批号: P0013B); 苯甲基磺酰氟(PMSF, 中国碧云天生物试剂研究所, 批号: ST506); PVDF 膜(批

号: IPFL00005)、TUNEL 凋亡试剂盒(批号: E607172)均购自美国 Millipore 公司; Western blotting 二抗(北京中杉金桥科技公司, 批号: ZB2306); RNA 提取试剂盒(批号: 83913)、Real-time PCR 试剂盒(批号: B532461)均购自北京天根公司; β -actin 抗体(北京中杉金桥科技公司, 批号: IPSC1030)。

2 方法

2.1 分组与给药

采用随机数字表法将 C57BL/6 小鼠分为 5 组($n=30$): 对照组、假手术组、脑缺血再灌注组、饱和氢盐水治疗组、生理盐水治疗组。对照组不做任何处理; 假手术组小鼠仅穿线不结扎双侧颈总动脉; 脑缺血再灌注组制备小鼠脑缺血再灌注损伤模型; 饱和氢盐水治疗组于再灌注前 5 min 给予 1 mL $\cdot$ (100 g)⁻¹腹腔注射饱和氢生理盐水; 生理盐水治疗组于再灌注前 5 min 给予 1 mL $\cdot$ (100 g)⁻¹腹腔注射等量生理盐水。

2.2 小鼠脑缺血再灌注模型的建立

参照文献[6]介绍的方法, 采用双侧颈总动脉阻断的方法制备小鼠全脑缺血再灌注损伤模型。腹腔注射 4%水合氯醛[0.2 mL $\cdot$ (20 g)⁻¹]麻醉后, 动物取平卧位, 刮去颈部皮毛, 碘伏消毒。取颈正中切口, 常规分离肌肉、筋膜, 暴露双侧颈总动脉, 挂线, 用小动脉夹夹闭双侧颈总动脉, 夹闭 15 min 后恢复再灌注。全脑缺血模型成功标准为术中脑血流值降至基础血流量的 10%以下, 持续至再灌注前, 术中记录小鼠心率、呼吸频率、耳温、皮肤颜色、夹闭 15 min 后恢复再灌注。用 4-0 慕丝线缝合伤口处, 消毒, 移入 25 °C 恒温箱, 待小鼠嘴唇红润, 呼吸频率和心率规律, 翻正反射恢复, 放回笼中自由饮食。

2.3 指标测定

2.3.1 神经行为学评分 参照文献[7]介绍的方法行神经功能学评分, 包括以下 6 个方面: 眼睑下垂情况(正常, 0 分; 一侧眼睑部分下垂, 1 分; 一侧眼睑完全下垂, 2 分; 两侧眼睑部分下垂, 3 分; 两侧眼睑完全下垂, 4 分); 毛发竖立情况(正常, 0 分; 出现毛发竖立, 1 分); 肢体肌张力(正常, 0 分; 肌力下降, 1 分); 屈肌反射(正常, 0 分; 后肢屈肌反射下降, 1 分; 后肢完全不能屈曲, 2 分); 姿势(正常, 0 分; 伏首前倾, 1 分); 行走方式(正常, 0 分; 速度减慢, 1 分; 不能行走, 2 分)。评估全过程采用双盲法进行。

2.3.2 TUNEL 法检测细胞凋亡 于再灌注 12, 24 h 神经行为学评分后随机从各组选取 5 只小鼠, 腹腔注射 10%水合氯醛 0.3 mL·(100 g)⁻¹ 麻醉后, 迅速置于冰上断头取脑, 应用原位末端标记(TUNEL)法, 按 TUNEL 试剂盒说明书进行标记染色。显微镜下采集图像, 凋亡细胞的细胞核显色为棕黄色。未凋亡的细胞核为深蓝色, 每张切片随机取 5 个高倍镜(400×)视野计数, 计算凋亡指数=(凋亡细胞数/神经细胞总数)×100%。

2.3.3 Western blotting 检测 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 的表达 于再灌注 12, 24 h 神经行为学评分后随机从各组取 5 只小鼠腹腔注射 10%水合氯醛 0.3 mL·(100 g)⁻¹ 麻醉后, 迅速置于冰上断头取脑, 分离海马组织, -80 °C 冰箱保存。海马组织加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂 PMSF 进行冰上裂解 2 h 后, 超声裂解、低温离心取上清液 95 °C 变性 5 min, 放入 -20 °C 冻存。选用 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 转至 PVDF 膜, 加一抗, 置于摇床上室温孵育 2 h, PBST 充分漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:6 000)室温摇床孵育 1 h, 膜与化学发光底物孵育后显影照相。用 Quantity one 图像分析软件测定海马 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 的表达。

2.3.4 Real-time PCR 法测 PERK mRNA、eIF2 α mRNA、ATF4 mRNA、CHOP mRNA 和 caspase-3 mRNA 的表达 于再灌注 12, 24 h 神经行为学评分后从各组取 5 只小鼠腹腔注射 10%水合氯醛 0.3 mL·(100 g)⁻¹ 麻醉后, 迅速置于冰上断头取脑, 分离海马组织, -80 °C 冰箱保存。海马组织 RNA 的提取采用 RNA 提取试剂盒法。取 RNA 产物 1.0 mg, 用逆转录试剂盒反转录合成 cDNA; Real-time-PCR 采用对应试剂盒, 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 20 s, 56 °C 退火 20 s, 75 °C 延伸 30 s, 40 个循环, 75 °C 延伸 7 min。结束反应。取 10 μ L PCR 产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 通过 Image-pro plus 6.0 软件分析积分光度密度值(integral optical density, IOD)表达各 mRNA 的相对表达水平。引物设计见表 1。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 随机区组设计的计量资料采用单因素方差分析, 重复测量设计的计量资料采用重复测量设计的方差分析, 计数资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物设计

Tab. 1 Primer design

引物名称	引物序列
PERK mRNA	上游引物 5'-CTTGTGCGCAATGGGAATAC-3' 下游引物 5'-CAGTCAGCAACCGAAACC-3'
eIF2 α mRNA	上游引物 5'-GGTGCCTATGATGCCTTTAAGC-3' 下游引物 5'-GCTTTGGCTTCCATTTCTTCTG-3'
ATF4 mRNA	上游引物 5'-CAAAACAAGACAGCAGCCAC-3' 下游引物 5'-CTTCTTCCCCCTTGCCCTTAC-3'
CHOP mRNA	上游引物 5'-CTTCACTACTCTTGACCCTG-3' 下游引物 5'-CATTCTCCTGCTCCTTCTC-3'
Caspase-3 mRNA	上游引物 5'-AGTCTGACTGGAAAGCCGAA-3' 下游引物 5'-CGGGATCTGTTTCTTTGCAT-3'
内参选用 β -actin	上游引物 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' 下游引物 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'

3 结果

3.1 饱和氢盐水对脑缺血再灌注小鼠神经行为学评分的影响

与对照组、假手术组相比, 脑缺血再灌注组、饱和氢盐水治疗组和生理盐水治疗组神经行为学评分升高($P < 0.05$); 与脑缺血再灌注组、生理盐水治疗组相比, 饱和氢盐水治疗组神经行为学评分降低($P < 0.05$)。对照组与假手术组、脑缺血再灌注组与生理盐水治疗组相比神经行为学评分差异无统计学意义。结果见表 2。

表 2 5 组小鼠再灌注各时点神经行为学评分的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Tab. 2 Comparison of neurobehavioral score at different points of reperfusion among five groups ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

组别	再灌注 12 h	再灌注 24 h
对照组	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
假手术组	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
脑缺血再灌注组	7.45 $\pm$ 1.17 ¹⁾²⁾	7.42 $\pm$ 1.15 ¹⁾²⁾
生理盐水治疗组	7.48 $\pm$ 1.19 ¹⁾²⁾	7.46 $\pm$ 1.17 ¹⁾²⁾
饱和氢盐水治疗组	2.15 $\pm$ 0.57 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	2.67 $\pm$ 0.55 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与假手术组相比, ²⁾ $P < 0.05$; 与脑缺血再灌注组相比, ³⁾ $P < 0.05$; 与生理盐水治疗组相比, ⁴⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with the sham operation group, ²⁾ $P < 0.05$; compared with the cerebral ischemia-reperfusion group, ³⁾ $P < 0.05$; compared with the normal saline group, ⁴⁾ $P < 0.05$.

3.2 饱和氢盐水对脑缺血再灌注小鼠海马 CA1 区神经细胞凋亡指数的影响

与对照组、假手术组相比, 脑缺血再灌注组、饱和氢盐水治疗组和生理盐水治疗组小鼠脑缺血再灌注后 12, 24 h 海马 CA1 区神经细胞凋亡指数增加($P < 0.05$); 与脑缺血再灌注组、生理盐水治疗组相比, 饱和氢盐水治疗组小鼠脑缺血再灌注后 12, 24 h 海马 CA1 区神经细胞凋亡指数降低($P < 0.05$)。对照组与假手术组、脑缺血再灌注组与生理盐水治疗组相比海马小鼠脑缺血再灌注后

12, 24 h 海马 CA1 区神经细胞凋亡指数差异无统计学意义。对照组、假手术组老龄小鼠海马 CA1 区大多数神经元细胞外形正常, 胞核清楚。脑缺血再灌注组、生理盐水治疗组可见神经元细胞形态不规整, 皱缩深染呈棕黄色, 细胞核小而深。饱和氢盐水治疗组胞核较清楚, 细胞外形较正常。结果见表 3 和图 1。

3.3 饱和氢盐水对脑缺血再灌注小鼠海马 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 蛋白表达的影响

与对照组、假手术组相比, 脑缺血再灌注组、饱和氢盐水治疗组和生理盐水治疗组小鼠脑缺血再灌注后 12, 24 h 海马 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 的表达升高($P<0.05$); 与脑缺血再灌注组、生理盐水治疗组相比, 饱和氢盐水治疗组小鼠脑缺血再灌注后 12, 24 h 海马 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 的表达降低($P<0.05$)。对照组与假手术组、脑缺血再灌注组与

生理盐水治疗组相比小鼠脑缺血再灌注后 12, 24 h 海马 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 的表达差异无统计学意义。结果见图 2 和表 4。

表 3 5 组小鼠再灌注各时点海马 CA1 区神经细胞凋亡指数的比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab. 3 Comparison of apoptosis index of neurons in hippocampal CA1 region at different points of reperfusion among five groups($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	凋亡指数/%	
	12 h	24 h
对照组	1.05 $\pm$ 0.12	1.03 $\pm$ 0.11
假手术组	1.02 $\pm$ 0.16	1.04 $\pm$ 0.13
脑缺血再灌注组	28.73 $\pm$ 3.47 ¹⁾²⁾	28.69 $\pm$ 3.43 ¹⁾²⁾
生理盐水治疗组	28.65 $\pm$ 3.44 ¹⁾²⁾	28.63 $\pm$ 3.46 ¹⁾²⁾
饱和氢盐水治疗组	11.75 $\pm$ 1.38 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	11.77 $\pm$ 1.36 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与假手术组相比, ²⁾ $P<0.05$; 与脑缺血再灌注组相比, ³⁾ $P<0.05$; 与生理盐水治疗组相比, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the sham operation group, ²⁾ $P<0.05$; compared with the cerebral ischemia-reperfusion group, ³⁾ $P<0.05$; compared with the normal saline group, ⁴⁾ $P<0.05$.

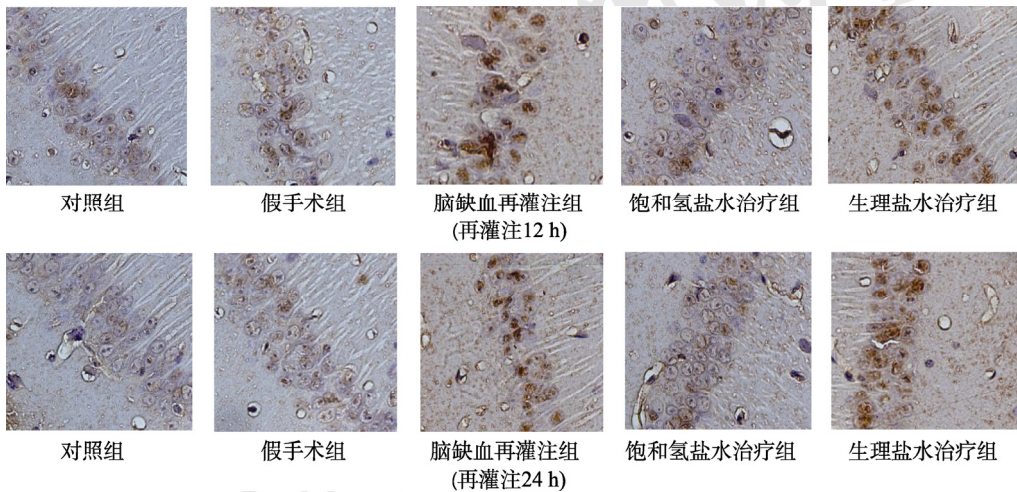


图 1 TUNEL 法显示各组海马 CA1 区神经元凋亡情况(400 $\times$)

Fig. 1 TUNEL method showed the apoptosis of neurons in the CA1 region of hippocampus in each group(400 $\times$)

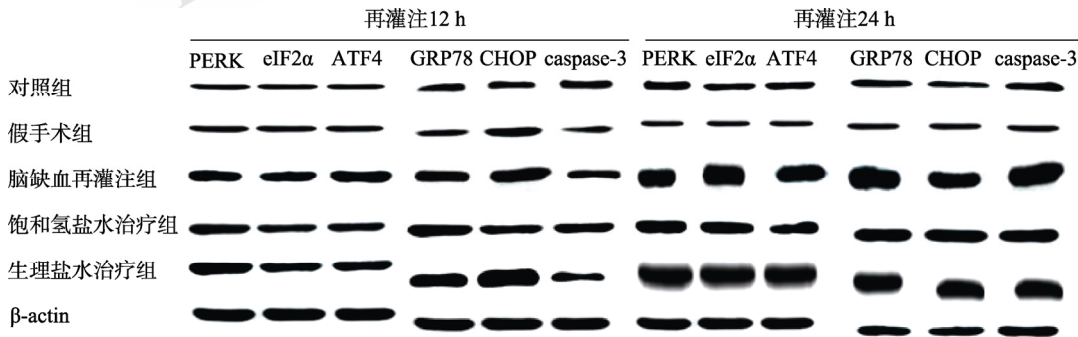


图 2 5 组小鼠再灌注各时点海马 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 蛋白表达水平

Fig. 2 Protein expression levels of hippocampal PERK, eIF2 α , ATF4, CHOP and caspase-3 at different points of reperfusion among five groups

表 4 5 组小鼠再灌注各时点海马 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 的表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab. 4 Comparison of expression levels of PERK, eIF2 α , ATF4, CHOP and caspase-3 at each time point of reperfusion among five groups($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	再灌注 12 h				
	PERK	eIF2 α	ATF4	CHOP	caspase-3
对照组	9.63 $\pm$ 0.53	6.38 $\pm$ 0.42	2.84 $\pm$ 0.72	1.75 $\pm$ 0.16	1.28 $\pm$ 0.11
假手术组	9.65 $\pm$ 0.55	6.39 $\pm$ 0.45	2.89 $\pm$ 0.75	1.77 $\pm$ 0.15	1.25 $\pm$ 0.12
脑缺血再灌注组	35.27 $\pm$ 3.71 ¹⁾²⁾	22.72 $\pm$ 2.86 ¹⁾²⁾	26.47 $\pm$ 3.94 ¹⁾²⁾	19.82 $\pm$ 3.68 ¹⁾²⁾	15.76 $\pm$ 2.21 ¹⁾²⁾
生理盐水治疗组	36.31 $\pm$ 3.72 ¹⁾²⁾	23.75 $\pm$ 2.88 ¹⁾²⁾	25.66 $\pm$ 3.95 ¹⁾²⁾	19.75 $\pm$ 3.67 ¹⁾²⁾	14.78 $\pm$ 2.22 ¹⁾²⁾
饱和氢盐水治疗组	19.61 $\pm$ 2.48 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	15.21 $\pm$ 1.61 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	15.52 $\pm$ 2.22 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	9.49 $\pm$ 2.47 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	7.89 $\pm$ 1.09 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

组别	再灌注 24 h				
	PERK	eIF2 α	ATF4	CHOP	caspase-3
对照组	9.67 $\pm$ 0.54	6.41 $\pm$ 0.39	2.79 $\pm$ 0.69	1.89 $\pm$ 0.17	1.31 $\pm$ 0.12
假手术组	9.63 $\pm$ 0.52	6.42 $\pm$ 0.38	2.81 $\pm$ 0.72	1.87 $\pm$ 0.15	1.29 $\pm$ 0.12
脑缺血再灌注组	35.62 $\pm$ 3.54 ¹⁾²⁾	23.55 $\pm$ 2.79 ¹⁾²⁾	25.73 $\pm$ 3.58 ¹⁾²⁾	19.46 $\pm$ 3.73 ¹⁾²⁾	16.58 $\pm$ 2.26 ¹⁾²⁾
生理盐水治疗组	35.55 $\pm$ 3.56 ¹⁾²⁾	24.56 $\pm$ 2.78 ¹⁾²⁾	26.72 $\pm$ 3.57 ¹⁾²⁾	19.61 $\pm$ 3.72 ¹⁾²⁾	15.86 $\pm$ 2.28 ¹⁾²⁾
饱和氢盐水治疗组	18.83 $\pm$ 2.36 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	14.32 $\pm$ 1.53 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	15.39 $\pm$ 1.32 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	9.51 $\pm$ 2.43 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	8.67 $\pm$ 1.24 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与假手术组相比, ²⁾ $P<0.05$; 与脑缺血再灌注组相比, ³⁾ $P<0.05$; 与生理盐水治疗组相比, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the sham operation group, ²⁾ $P<0.05$; compared with the cerebral ischemia-reperfusion group, ³⁾ $P<0.05$; compared with the normal saline group, ⁴⁾ $P<0.05$.

3.4 饱和氢盐水对脑缺血再灌注小鼠海马 PERK mRNA、eIF2 α mRNA、ATF4 mRNA、CHOP mRNA 和 caspase-3 mRNA 的表达

与对照组、假手术组相比, 脑缺血再灌注组、饱和氢盐水治疗组和生理盐水治疗组小鼠脑缺血再灌注后 12, 24 h 海马 PERK mRNA, eIF2 α mRNA、ATF4 mRNA、CHOP mRNA 和 caspase-3 mRNA 表达升高($P<0.05$); 与脑缺血再灌注组、生

理盐水治疗组相比, 饱和氢盐水治疗组小鼠脑缺血再灌注后 12, 24 h 海马 PERK mRNA、eIF2 α mRNA、ATF4 mRNA、CHOP mRNA 和 caspase-3 mRNA 表达降低($P<0.05$)。对照组与假手术组、脑缺血再灌注组与生理盐水治疗组相比小鼠脑缺血再灌注后 12, 24 h 海马 PERK mRNA、eIF2 α mRNA、ATF4 mRNA、CHOP mRNA 和 caspase-3 mRNA 表达差异无统计学意义, 结果见表 5。

表 5 5 组小鼠术后再灌注各时点海马 PERK mRNA、eIF2 α mRNA、ATF4 mRNA、CHOP mRNA 和 caspase-3 mRNA 的表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab. 5 Comparison of expression of PERK mRNA, eIF2 α mRNA, ATF4 mRNA, CHOP mRNA and caspase-3 mRNA at each time point of reperfusion among five groups($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	再灌注 12 h				
	PERK mRNA	eIF2 α mRNA	ATF4 mRNA	CHOP mRNA	caspase-3 mRNA
对照组	0.064 $\pm$ 0.008	0.024 $\pm$ 0.004	0.186 $\pm$ 0.015	0.245 $\pm$ 0.016	0.157 $\pm$ 0.022
假手术组	0.065 $\pm$ 0.007	0.025 $\pm$ 0.005	0.184 $\pm$ 0.013	0.252 $\pm$ 0.017	0.158 $\pm$ 0.023
脑缺血再灌注组	1.385 $\pm$ 0.096 ¹⁾²⁾	0.849 $\pm$ 0.066 ¹⁾²⁾	1.668 $\pm$ 0.127 ¹⁾²⁾	1.547 $\pm$ 0.247 ¹⁾²⁾	1.678 $\pm$ 0.067 ¹⁾²⁾
生理盐水治疗组	1.387 $\pm$ 0.097 ¹⁾²⁾	0.848 $\pm$ 0.067 ¹⁾²⁾	1.665 $\pm$ 0.126 ¹⁾²⁾	1.556 $\pm$ 0.248 ¹⁾²⁾	1.676 $\pm$ 0.068 ¹⁾²⁾
饱和氢盐水治疗组	0.587 $\pm$ 0.059 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.319 $\pm$ 0.031 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.825 $\pm$ 0.091 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.973 $\pm$ 0.164 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.466 $\pm$ 0.045 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

组别	再灌注 24 h				
	PERK mRNA	eIF2 α mRNA	ATF4 mRNA	CHOP mRNA	caspase-3 mRNA
对照组	0.061 $\pm$ 0.006	0.022 $\pm$ 0.005	0.177 $\pm$ 0.014	0.219 $\pm$ 0.014	0.136 $\pm$ 0.021
假手术组	0.062 $\pm$ 0.005	0.023 $\pm$ 0.006	0.175 $\pm$ 0.013	0.217 $\pm$ 0.015	0.133 $\pm$ 0.022
脑缺血再灌注组	1.374 $\pm$ 0.093 ¹⁾²⁾	0.829 $\pm$ 0.065 ¹⁾²⁾	1.652 $\pm$ 0.125 ¹⁾²⁾	1.376 $\pm$ 0.215 ¹⁾²⁾	1.488 $\pm$ 0.258 ¹⁾²⁾
生理盐水治疗组	1.372 $\pm$ 0.091 ¹⁾²⁾	0.825 $\pm$ 0.066 ¹⁾²⁾	1.649 $\pm$ 0.126 ¹⁾²⁾	1.374 $\pm$ 0.213 ¹⁾²⁾	1.476 $\pm$ 0.257 ¹⁾²⁾
饱和氢盐水治疗组	0.576 $\pm$ 0.057 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.325 $\pm$ 0.039 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.812 $\pm$ 0.092 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.647 $\pm$ 0.156 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.346 $\pm$ 0.031 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与假手术组相比, ²⁾ $P<0.05$; 与脑缺血再灌注组相比, ³⁾ $P<0.05$; 与生理盐水治疗组相比, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the sham operation group, ²⁾ $P<0.05$; compared with the cerebral ischemia-reperfusion group, ³⁾ $P<0.05$; compared with the normal saline group, ⁴⁾ $P<0.05$.

4 讨论

缺血性脑血管疾病严重威胁着人类健康和生存质量,是全球范围的常见病和多发病。脑组织对缺血极其敏感,大脑丰富的血流量及其特有的生理特征决定了其在发生缺血、缺氧时比身体其他器官组织更容易遭受损伤。及时恢复脑血流再灌注对挽救脑缺血患者的生命十分重要,但同时也会造成新的损害,称为脑缺血再灌注损伤。脑缺血再灌注的研究日益受到人们的重视,脑缺血再灌注损伤主要涉及细胞凋亡、氧化应激、氨基酸毒性及炎症反应等多个方面,是缺血性脑病对机体造成损害的主要原因之一^[8]。

本研究选取 C57BL/6 小鼠是由于其种属的特异性,Willis 环及后交通支发育不全,仅需要结扎双侧颈总动脉即可成功制备全脑缺血再灌注模型^[9]。小鼠脑缺血再灌注模型 12 h 脑组织中 PERK 水平表达及相关免疫复合物开始升高,24 h 达到峰值,所以本研究选取再灌注 12, 24 h 作为时间点^[10],发现小鼠脑缺血再灌注 12, 24 h 后小鼠海马神经细胞凋亡指数增加,神经行为学评分升高,从细胞形态学和行为学 2 个方面均提示小鼠短暂性全脑缺血再灌注模型建立成功。

内质网对细胞内环境的稳定起重要作用,当内质网受到外界因素干扰时产生内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)。未折叠蛋白反应是 ERS 的一种类型,其在转录和翻译水平上发挥效应诱发细胞凋亡。PERK 为内质网上的一种 I 型跨膜蛋白,其 c 端具有丝/苏氨酸蛋白激酶结构域,属于 eIF2 α 激酶家族成员。CHOP 是 ERS 的 1 个经典标志物,是 ERS 的标志性蛋白和保护性因子,可促进内质网中未折叠蛋白正确折叠、修饰,具有在应激状态下保护内质网功能的作用。Caspase 家族是细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶,其中 caspase-3 为凋亡效应酶。在内质网应激持续进行的过程中,转录因子 CHOP 是促进细胞凋亡的重要执行者。Tajiri 等^[11]在研究脑缺血再灌注损伤中发现,与野生型小鼠相比,敲除 CHOP 基因的小鼠神经细胞的凋亡数量显著减少。因此本研究观察海马组织 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 含量的变化。

本研究结果表明,短暂性脑缺血再灌注损伤小鼠神经行为学评分升高,海马组织中 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 及 PERK mRNA,

eIF2 α mRNA、ATF4 mRNA、CHOP mRNA 和 caspase-3 mRNA 表达上调,海马 CA1 区神经细胞凋亡指数增加,提示短暂性脑缺血后可引起小鼠脑缺血再灌注损伤,而给予饱和氢盐水电后,小鼠神经行为学评分降低,海马组织中 PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 和 caspase-3 及 PERK mRNA, eIF2 α mRNA、ATF4 mRNA、CHOP mRNA 和 caspase-3 mRNA 表达下调,海马 CA1 区神经细胞凋亡指数降低,提示饱和氢盐水电改善小鼠短暂性脑缺血再灌注损伤可能与抑制海马组织 PERK/eIF2 α /ATF4 蛋白信号通路有关,其机制可能是小鼠发生短暂性脑缺血再灌注损伤后,导致脑缺血缺氧、ATP 耗竭、自由基蓄积及 Ca²⁺稳态破坏等都引起内质网功能障碍,触发内质网应激,过度内质网应激可通过诱导细胞凋亡而加重缺血灌注损伤^[12]。有研究发现,脑缺血再灌注损伤后 PERK 蛋白表达升高^[13],其可引起 eIF2 α 及诱导转录因子 ATF4 蛋白升高^[14],使行神经细胞蛋白合成抑制,从而引起下游 CHOP 蛋白表达持续上调,使得神经细胞 caspase-3 表达上调^[15],引起细胞凋亡。由此推断饱和氢生理盐水电可抑制小鼠海马 PERK/eIF2 α /ATF4 信号通路,从而减少 CHOP 蛋白表达,使得神经细胞 caspase-3 表达下调,减少细胞凋亡,改善小鼠脑缺血再灌注损伤。但饱和氢生理盐水电是否通过其他信号通路改善脑缺血再灌注损伤仍需进一步探索,为临床治疗提供依据。

综上所述,饱和氢盐水电可改善小鼠短暂性脑缺血再灌注损伤,其机制可能与抑制海马组织 PERK/eIF2 α /ATF4 蛋白信号通路有关。

REFERENCES

- [1] YE N H, LIN Y Y, LIU S T, et al. Protection of fusion protein PTD-SOD by oral on rats of focal cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(7): 602-606.
- [2] SHARMA T, AIRAO V, PANARA N, et al. Solasodine protects rat brain against ischemia/reperfusion injury through its antioxidant activity[J]. Eur J Pharmacol, 2014(725): 40-46.
- [3] LIN Y W, CHEN T Y, HUNG C Y, et al. Melatonin protects brain against ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(1): 182-192.
- [4] HONG Y, CHEN S, ZHANG J M. Hydrogen as a selective antioxidant: A review of clinical and experimental studies[J]. J Int Med Res, 2010, 38(6): 1893-1903.

- [5] LIU H W, DONG L, CHEN H G, et al. Effect of hydrogen on endoplasmic reticulum stress during hypoxia-reoxygenation in PC12 cells[J]. Chin J Anesthesiol(中华麻醉学杂志), 2012, 32(5): 597-599.
- [6] YE T. Effects of electroacupuncture preconditioning on cerebral infarct volume and contents of INF- α , IL-10 in serum of rats after cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. China Med Abstr: Intern Med(中国医学文摘: 内科学分册: 英文版), 2017, 34(4): 194-195.
- [7] CHEN H L, YU Y Y, ZHANG Q, et al. Effect of electro-acupuncture preconditioning on expression of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase in hippocampus of mice following cerebral ischemia-reperfusion[J]. Chin J Anesthesiol(中华麻醉学杂志), 2019, 39(1): 48-51.
- [8] FANG F, WANG W L, YU S Y, et al. Effect of ischemic preconditioning on focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2007, 23(4): 476-479.
- [9] CHEN Y P, LIU S H, CHEN G Y. Aggravation of cerebral ischemia/reperfusion injury by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma deficiency via endoplasmic reticulum stress[J]. Med Sci Monit, 2019(25): 7518-7526.
- [10] WANG R, SUN D Z, SONG C Q, et al. Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit α (eIF2 α) inhibitor salubrinal attenuates paraquat-induced human lung epithelial-like A549 cell apoptosis by regulating the PERK-eIF2 α signaling pathway[J]. Toxicol Vitro, 2018(46): 58-65.
- [11] TAJIRI S, OYADOMARI S, YANO S, et al. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP[J]. Cell Death Differ, 2004, 11(4): 403-415.
- [12] LEI X F, LEI L J, ZHANG Z Q, et al. Diazoxide inhibits of ER stress mediated apoptosis during oxygen glucose deprivation *in vitro* and cerebral ischemia reperfusion *in vivo* [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(6): 8039-8046.
- [13] HU Y Q, CHEN W, YAN M H, et al. Ischemic preconditioning protects brain from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through PERK pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(24): 5736-5744.
- [14] ARROJO E, DRIGO R, FONSECA T L, CASTILLO M, et al. Endoplasmic reticulum stress decreases intracellular thyroid hormone activation via an eIF2 α -mediated decrease in type 2 deiodinase synthesis[J]. Mol Endocrinol, 2011, 25(12): 2065-2075.
- [15] SYEDA K, MOHAMMED A M, ARORA D K, et al. Glucotoxic conditions induce endoplasmic reticulum stress to cause caspase 3 mediated lamin B degradation in pancreatic β -cells: Protection by nifedipine[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86(9): 1338-1346.

收稿日期: 2020-01-05

(本文责编: 李艳芳)