

本文引用: 张 静, 钱 倩, 白艳梅. 依达拉奉右莰醇通过 PKC/ERK 通路对脑缺血再灌注大鼠发挥脑保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(5): 391-398. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.05.004.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-05-0391-08

• 实验研究 •

依达拉奉右莰醇通过 PKC/ERK 通路对脑缺血再灌注大鼠发挥脑保护作用

张 静, 钱 倩, 白艳梅

(保定市第一中心医院神经内五科, 河北省保定市 071000)

[摘 要] **[目的]** 观察依达拉奉右莰醇(EDDE)对脑缺血再灌注大鼠神经元凋亡的影响,并探讨其作用机制。**[方法]** 将SD大鼠随机分为假手术组、大脑中动脉闭塞(MCAO)组、低剂量EDDE组(EDDE-L组,3 mg/kg)、高剂量EDDE组(EDDE-H组,6 mg/kg)、白屈菜红碱(CHE,PKC抑制剂)组(5 mg/kg CHE)、EDDE+CHE组(6 mg/kg EDDE+5 mg/kg CHE),每组15只。除假手术组外,其余各组大鼠采用线栓法构建MCAO模型。对各组大鼠进行神经功能缺损评分;再灌注24 h后,TTC染色检测大鼠脑梗死体积;HE染色观察皮质神经细胞病理损伤;TUNEL染色检测皮质神经细胞凋亡;免疫组织化学法检测皮质区神经细胞Bcl-2、Bax的表达;Western blot检测脑组织Caspase-3、cleaved Caspase-3和蛋白激酶C(PKC)/细胞外信号调节激酶(ERK)通路相关蛋白(PKC、p-PKC、ERK1/2、p-ERK1/2)的表达。**[结果]** 与假手术组相比,MCAO组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积百分比和神经细胞凋亡率升高,Bax阳性表达增加,cleaved Caspase-3/Caspase-3比值升高(均 $P<0.05$),Bcl-2阳性表达和Bcl-2/Bax比值降低,脑组织p-PKC/PKC、p-ERK1/2/ERK1/2比值降低(均 $P<0.05$),脑皮质细胞排列稀疏,神经细胞肿胀、空泡样变性明显、核固缩,组织坏死;与MCAO组相比,EDDE-L组和EDDE-H组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积百分比和神经细胞凋亡率降低,Bax阳性表达减少,cleaved Caspase-3/Caspase-3比值降低(均 $P<0.05$),Bcl-2阳性表达升高,Bcl-2/Bax、p-PKC/PKC和p-ERK1/2/ERK1/2比值升高(均 $P<0.05$),脑皮质病理损伤有不同程度的改善,神经细胞数量增多,空泡样变性减轻,胞核较清晰,且EDDE-H组的改善优于EDDE-L组;CHE可以消除EDDE的神经保护作用。**[结论]** EDDE可抑制神经细胞凋亡,减轻脑缺血再灌注损伤,其机制可能与激活PKC/ERK通路有关。

[关键词] 依达拉奉右莰醇; 脑缺血再灌注损伤; 神经细胞; 蛋白激酶C; 细胞外信号调节激酶

[中图分类号] R741;R5

[文献标识码] A

Edaravone dexborneol exerts cerebral protective effect on cerebral ischemia-reperfusion rats through PKC/ERK pathway

ZHANG Jing, QIAN Qian, BAI Yanmei

(Fifth Department of Neurology, Baoding First Central Hospital, Baoding, Hebei 071000, China)

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of edaravone dexborneol (EDDE) on neuronal apoptosis in rats with cerebral ischemia-reperfusion, and to explore its mechanism. **Methods** SD rats were randomly divided into sham group, middle cerebral artery occlusion (MCAO) group, low-dose EDDE group (EDDE-L group, 3 mg/kg), and high-dose EDDE group (EDDE-H group, 6 mg/kg), chelerythrine (CHE, PKC inhibitor) group (5 mg/kg CHE), EDDE+CHE group (6 mg/kg EDDE+5 mg/kg CHE), with 15 rats in each group. Except for the sham group, the rats in the other groups were given the suture method to construct the MCAO model. The rats in each group were scored for neurological deficits; after 24 hours of reperfusion, TTC staining was used to detect the cerebral infarct volume of rats; HE staining was used to observe the pathological damage of cortical nerve cells; TUNEL staining was used to detect cortical nerve cells apoptosis; immunohistochemical method was used to detect the expression of Bcl-2 and Bax in the cortex nerve cells; Western blot was used to detect the expression of Caspase-3, cleaved Caspase-3 and protein kinase C (PKC)/extracellular signal-

[收稿日期] 2022-05-19

[修回日期] 2022-10-31

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题计划项目(20180003);河北省卫生健康委医学科学研究课题(20220291)

[作者简介] 张静,硕士研究生,主治医师,研究方向为脑血管病,E-mail:zehhqt@163.com。

regulated kinase (ERK) pathway related proteins (PKC, p-PKC, ERK1/2 and p-ERK1/2) in brain tissue. **Results** Compared with sham group, the neurological deficit score, the percentage of cerebral infarction volume and the apoptosis rate of nerve cells increased, the positive expression of Bax increased and the ratio of cleaved Caspase-3/Caspase-3 increased (all $P < 0.05$), the positive expression of Bcl-2 decreased, the ratio of Bcl-2/Bax, p-PKC/PKC and p-ERK1/2/ERK1/2 decreased in brain tissue (all $P < 0.05$), the cerebral cortex cells were sparsely arranged, swelling and vacuolar degeneration of nerve cells were obvious, the nucleus shrank and the tissue becomes necrotic in MCAO group. Compared with MCAO group, the neurological deficit score, cerebral infarction volume percentage and apoptosis rate of nerve cells decreased, the positive expression of Bax decreased, the ratio of cleaved Caspase-3/Caspase-3 decreased (all $P < 0.05$), the positive expression of Bcl-2 increased, the ratio of Bcl-2/Bax, p-PKC/PKC and the ratio of p-ERK1/2/ERK1/2 increased in brain tissue ($P < 0.05$) in the EDDE-L group and EDDE-H group, the pathological damage of the cerebral cortex was improved to varying degrees, the number of nerve cells increased, the vacuolar degeneration was reduced, the nucleus was clearer, and the EDDE-H group was better than the EDDE-L group. CHE could eliminate the neuroprotective effect of EDDE. **Conclusion** EDDE could inhibit neuronal apoptosis and reduce cerebral ischemia/reperfusion injury, and its mechanism may be related to the activation of PKC/ERK pathway.

[**KEY WORDS**] edaravone dextrorotatory; cerebral ischemia-reperfusion injury; nerve cells; protein kinase C; extracellular signal-regulated kinase

急性脑梗死是由脑动脉血管阻塞引起的脑组织局部缺血缺氧,进而引起一系列神经功能障碍的疾病,具有很高的致残、死亡和复发风险,且呈年轻化趋势,给社会和家庭带来了严重的负担^[1-2]。静脉内重组组织型纤溶酶原激活剂溶栓和机械性动脉血栓切除术是目前开放闭塞血管和恢复脑血液灌注最有效的治疗方法。然而,脑缺血后的快速再灌注可引起继发性损伤,称为脑缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤,比单纯脑缺血损伤更为严重。脑 I/R 损伤常导致大量的神经元死亡,导致广泛的脑梗死和严重的认知功能障碍。因此,迫切需要明确脑 I/R 损伤的发病机制并寻找有效的治疗方法^[3]。依达拉奉右莰醇(edaravone dextrorotatory, EDDE)是由依达拉奉和右莰醇两种活性成分组成的复合制剂,是一种新型多靶点神经保护剂,用于治疗急性缺血性脑卒中,能有效改善患者的神经功能^[4-5],然而,其作用机制仍未阐明。

研究表明,蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路对大脑神经系统调节起着重要的作用,与神经发育有关^[6]。ERK 包括 ERK1 和 ERK2,据报道,ERK1/2 的激活在脑梗死后发挥神经保护作用^[7-8]。PKC 是 ERK 激活的调节因子,参与突触重塑、蛋白质合成的诱导以及许多其他对学习和记忆很重要的过程^[9]。PKC/ERK 通路的激活可增强 Bcl-2 活性,抑制细胞色素 C 的释放,增加神经元对缺氧/缺血应激的耐受性^[10]。依达拉奉可通过激活 ERK1/2 减轻缺氧/复氧诱导的神经细胞损

伤^[11],但 EDDE 对急性脑梗死的保护机制是否与 PKC/ERK 通路有关还未见相关报道。因此,本研究旨在探究 EDDE 的神经保护机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

90 只 SD 大鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[合格证号为 SCXK(湘)2019-0004],SPF 级,雄性,体质量(300 ± 20) g,饲养在温度为(24 ± 2) °C,湿度为 50% ~ 60% 的动物房中,保持 12 h 的光暗循环,并按照 3R 原则给予人道关怀。本研究经医院动物伦理与使用委员会批准并遵循中国《实验动物管理条例》(2017 年 3 月 1 日修正版)。

1.2 药品、试剂及主要仪器

EDDE 注射液,商品名先必新,购自先声药业有限公司,批准文号为国药准字 H20200007,规格为 5 mL : 10 mg : 2.5 mg; PKC 抑制剂白屈菜红碱(chelerythrine, CHE)购自美国 MedChemExpress 公司,纯度为 98.56%,货号为 HY-12048; TTC 购自美国 Sigma 公司,货号为 T8877; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德公司,批号为 20200517A; 兔源一抗 Caspase-3 (#9662)、cleaved Caspase-3 (#9661) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 兔源一抗 PKC (ab181558)、p-PKC (ab109539)、ERK1/2 (ab184699)、p-ERK1/2 (ab201015)、Bcl-2 (ab194583)、Bax (ab32503)、GAPDH (ab181602) 购自英国 Abcam 公司。电动显微镜(BX61, 日本 Olympus 公司)。

1.3 模型制备与分组

采用随机数字表法将 SD 大鼠分为 6 组:假手术组、大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)组、低剂量 EDDE 组(EDDE-L 组, 3 mg/kg)、高剂量 EDDE 组(EDDE-H 组, 6 mg/kg)、CHE 组(5 mg/kg CHE)和 EDDE+CHE 组(6 mg/kg EDDE+5 mg/kg CHE)^[12], 每组 15 只。于再灌注前 15 min, EDDE-L 组、EDDE-H 组分别经尾静脉注射相应剂量的 EDDE, CHE 组经腹腔注射 5 mg/kg CHE, EDDE+CHE 组在尾静脉注射 6 mg/kg EDDE 的同时腹腔注射 5 mg/kg CHE, 假手术组和 MCAO 组给予等量的生理盐水经尾静脉和腹腔注射。除假手术组外, 其余各组大鼠采用线栓法构建 MCAO 模型^[7]:用 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 分离右颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA);夹闭颈内动脉, 结扎颈总动脉和颈外动脉, 用血管剪在颈总动脉上剪一小口, 将线栓插入右颈内动脉, 感觉有轻微阻力时停止;2 h 后, 拔出线栓, 实现再灌注, 缝合伤口。假手术组大鼠除不将线栓插入颈内动脉阻塞血管外, 其余操作同上。

1.4 神经功能缺损评分

在大鼠清醒后, 进行神经功能缺损评分^[8], 分数越高表示神经功能缺损越严重, 评分 1~3 分表示模型制备成功。评分标准:0 分为无神经功能缺损, 1 分为不能完全伸展对侧前肢, 2 分为向对侧转圈, 3 分为向对侧倾倒, 4 分为意识丧失。

1.5 TTC 染色检测大鼠脑梗死体积

再灌注 24 h 后, 每组随机选取 6 只大鼠, 经颈椎脱臼处死后迅速断头取脑, 在-20℃下迅速冷冻, 然后连续进行冠状切片(2 mm 厚), 将切片用 1% TTC 染色溶液在 37℃下避光孵育 15 min, 4% 多聚甲醛固定后拍照。正常的大脑区域被染成深红色, 梗死区域被染成白色。采用 Image Pro Plus 6.0 软件计算脑梗死体积百分比^[13]。脑梗死体积百分比(%) = $2 \text{ mm} \times (\text{对侧半球面积} - \text{同侧非梗死区域面积}) / (2 \text{ mm} \times \text{对侧半球面积}) \times 100\%$ 。

1.6 HE 染色观察皮质神经细胞病理损伤

各组剩余的大鼠, 经断头取脑后分为两部分, 一部分于-80℃冰箱保存, 另一部分用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 石蜡切片(4 μm 厚)进行 HE 染色, 光学显微镜下观察脑缺血半暗带皮质神经细胞病理损伤情况。

1.7 TUNEL 染色检测皮质神经细胞凋亡

取制备的脑组织切片, 二甲苯脱蜡并梯度乙醇水合, 按照 TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒说明书进行检测。使用光学显微镜观察呈棕色的 TUNEL 阳性细胞, 计算 TUNEL 阳性细胞百分比。每张切片随机选择 5 个视野, 取平均值。

1.8 免疫组织化学法检测皮质区神经细胞 Bcl-2、Bax 的表达

取脑组织石蜡切片, 用 5% BSA 封闭 15 min, 滴加兔抗大鼠 Bcl-2(1:100)或 Bax(1:100)一抗, 4℃孵育过夜, 洗去一抗, 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:200), 37℃孵育 1 h, DAB 显色。于光学显微镜下观察神经细胞中 Bcl-2、Bax 的阳性表达(目的蛋白染色为棕色, 细胞核为蓝紫色)。Image Pro Plus 6.0 软件计算阳性表达的积分光密度(integrated optical density, IOD)值。每张切片随机选择 5 个视野, 取平均值。

1.9 Western blot 检测脑组织 cleaved Caspase-3、Caspase-3 和 PKC、ERK 及其磷酸化蛋白表达

将脑组织在 RIPA 裂解液中匀浆, 并进一步以 12 000×g 在 4℃下离心 10 min, 收集上清液。随后用 BCA 蛋白测定法测定蛋白质浓度, 然后用 SDS-PAGE 分离等量蛋白质样品, 并转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶封闭蛋白条带 1 h, 与一抗(Caspase-3、cleaved Caspase-3、PKC、p-PKC、ERK1/2、p-ERK1/2 及 GAPDH, 1:1 000)在 4℃下孵育过夜。之后加二抗(1:2 000)孵育 1 h, ECL 试剂盒使印迹可视化, 使用 Image Pro Plus 6.0 软件分析目的蛋白的相对表达。

1.10 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 8.0 软件分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析进行多组间比较, 组间多重比较用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EDDE 对大鼠神经功能的影响

与假手术组相比, MCAO 组大鼠出现不同程度的神经功能缺损症状, 主要表现为提尾时不能完全伸展对侧前爪, 行走时不能走直线, 并向对侧转圈, 甚至向一侧倾倒, 神经功能缺损评分显著升高($P < 0.05$);与 MCAO 组相比, EDDE-L 组和 EDDE-H 组大鼠上述神经功能缺损症状明显改善, 神经功能缺损评分显著降低($P < 0.05$), 而 CHE 组大鼠神经功

能缺损评分显著升高 ($P<0.05$), 且 EDDE-H 组优于 EDDE-L 组, EDDE-H 组大鼠神经功能缺损评分较 EDDE-L 组降低 ($P<0.05$); 与 EDDE-H 组相比, EDDE+CHE 组大鼠神经功能缺损评分显著升高 ($P<0.05$; 表 1)。

2.2 EDDE 对大鼠脑梗死体积的影响

与假手术组相比, MCAO 组大鼠脑梗死体积百分比显著升高 ($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, EDDE-L 组和 EDDE-H 组大鼠脑梗死体积百分比显著降低 ($P<0.05$), 而 CHE 组大鼠脑梗死体积百分比显著升高 ($P<0.05$), 且 EDDE-H 组优于 EDDE-L 组, EDDE-H 组大鼠脑梗死体积百分比比较 EDDE-L 组降低 ($P<0.05$); 与 EDDE-H 组相比, EDDE+CHE 组大鼠脑梗死体积百分比显著升高 ($P<0.05$; 图 1

和表 2)。

表 1. EDDE 对大鼠神经功能缺损评分的影响
Table 1. Effect of EDDE on neurological deficit scores in rats
单位: 分

分组	<i>n</i>	神经功能缺损评分
假手术组	15	0.00±0.00
MCAO 组	15	2.33±0.28 ^a
EDDE-L 组	15	2.01±0.25 ^{bc}
EDDE-H 组	15	1.64±0.22 ^b
CHE 组	15	2.57±0.30 ^b
EDDE+CHE 组	15	2.08±0.26 ^c

注: a 为 $P<0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P<0.05$, 与 MCAO 组比较; c 为 $P<0.05$, 与 EDDE-H 组比较。

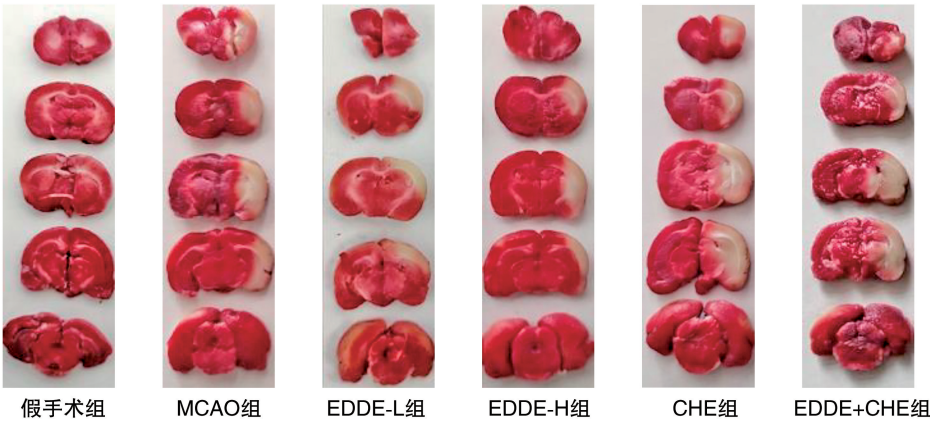


图 1. 各组大鼠脑组织 TTC 染色
Figure 1. TTC staining of rat brain tissue in each group

表 2. 各组大鼠脑梗死体积百分比
Table 2. Percentage of cerebral infarction volume
of rats in each group
单位: %

分组	<i>n</i>	脑梗死体积百分比
假手术组	6	0.00±0.00
MCAO 组	6	30.51±3.40 ^a
EDDE-L 组	6	24.92±2.97 ^{bc}
EDDE-H 组	6	16.37±2.38 ^b
CHE 组	6	37.15±4.06 ^b
EDDE+CHE 组	6	25.24±3.12 ^c

注: a 为 $P<0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P<0.05$, 与 MCAO 组比较; c 为 $P<0.05$, 与 EDDE-H 组比较。

2.3 EDDE 对大鼠脑皮质神经细胞病理学变化的影响

假手术组大鼠脑组织神经细胞轮廓清晰, 结构致密, 核仁清晰可见, 未出现明显的损伤; MCAO 组

大鼠脑组织神经细胞排列稀疏, 结构紊乱, 细胞肿胀、空泡样变性明显, 核固缩和组织坏死; 与 MCAO 组相比, EDDE-L 组和 EDDE-H 组大鼠脑组织病理损伤有不同程度的改善, 神经细胞数量增多, 空泡样变性减轻, 细胞核较清晰, 染色较为均匀, 而 CHE 组大鼠脑组织病理损伤进一步加重, 神经细胞肿胀、排列稀疏, 空泡变性增加, 且 EDDE-H 组优于 EDDE-L 组, 而 EDDE+CHE 组大鼠脑组织损伤程度较 EDDE-H 组加重 (图 2)。

2.4 EDDE 对大鼠皮质神经细胞凋亡的影响

与假手术组相比, MCAO 组大鼠神经细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, EDDE-L 组和 EDDE-H 组大鼠神经细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$), 而 CHE 组大鼠神经细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$), 且 EDDE-H 组优于 EDDE-L 组, EDDE-H 组大鼠神经凋亡率较 EDDE-L 组降低 ($P<0.05$); 与

EDDE-H 组比,EDDE+CHE 组大鼠神经细胞凋亡率 显著升高($P<0.05$;图 3 和表 3)。

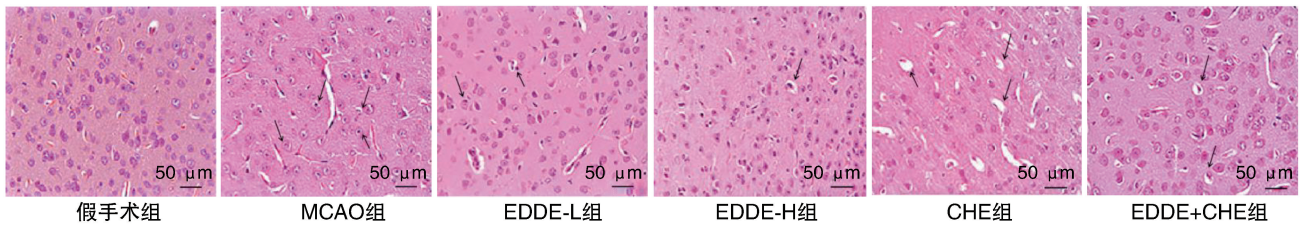


图 2. 各组大鼠脑组织皮质神经细胞病理学变化

Figure 2. Pathological changes of cortical neurons in the brain tissue of rats in each group

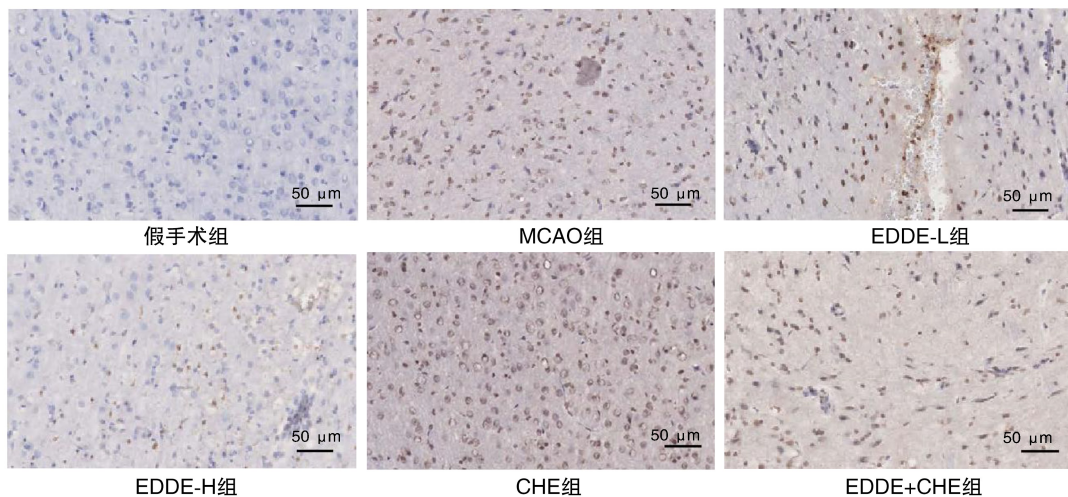


图 3. TUNEL 染色检测各组大鼠脑皮质神经细胞凋亡

Figure 3. TUNEL staining was used to detect apoptosis of rat cerebral cortical neurons in each group

表 3. 各组大鼠神经细胞凋亡率

Table 3. Apoptosis rate of neurons in each group of rats

单位: %

分组	<i>n</i>	细胞凋亡率
假手术组	9	5.31±1.02
MCAO 组	9	32.64±4.75 ^a
EDDE-L 组	9	21.38±3.26 ^{bc}
EDDE-H 组	9	16.79±2.85 ^b
CHE 组	9	40.24±4.32 ^b
EDDE+CHE 组	9	27.65±3.29 ^c

注: a 为 $P<0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P<0.05$, 与 MCAO 组比较; c 为 $P<0.05$, 与 EDDE-H 组比较。

2.5 EDDE 对大鼠脑皮质神经细胞 Bcl-2、Bax 表达的影响

与假手术组相比, MCAO 组大鼠脑皮质神经细胞中 Bax 的阳性表达显著升高, Bcl-2 的阳性表达和 Bcl-2/Bax 比值显著降低(均 $P<0.05$); 与 MCAO 组相比, EDDE-L 组和 EDDE-H 组大鼠脑皮质神经细

胞中 Bax 的阳性表达显著降低, Bcl-2 的阳性表达和 Bcl-2/Bax 比值显著升高(均 $P<0.05$), 而 CHE 组脑皮质神经细胞中 Bax 的阳性表达显著升高, Bcl-2 的阳性表达和 Bcl-2/Bax 比值显著降低(均 $P<0.05$), 且 EDDE-H 组优于 EDDE-L 组, EDDE-H 组脑皮质神经细胞中 Bax 的阳性表达较 EDDE-L 组降低, Bcl-2 的阳性表达和 Bcl-2/Bax 比值升高(均 $P<0.05$); 与 EDDE-H 组相比, EDDE+CHE 组脑皮质神经细胞中 Bax 的阳性表达显著升高, Bcl-2 的阳性表达和 Bcl-2/Bax 比值显著降低(均 $P<0.05$; 图 4 和表 4)。

2.6 EDDE 对大鼠脑组织 cleaved Caspase-3、Caspase-3 蛋白表达的影响

与假手术组相比, MCAO 组 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值显著升高($P<0.05$); 与 MCAO 组相比, EDDE-L 组和 EDDE-H 组 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值显著降低(均 $P<0.05$), 而 CHE 组 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值显著升高($P<0.05$), EDDE-H 组 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值较 EDDE-L 组降低($P<0.05$); 与 EDDE-H 组相

比,EDDE+CHE 组 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值 显著升高($P<0.05$;图 5 和表 4)。

表 4. 各组大鼠脑皮质神经细胞 Bcl-2、Bax 的表达和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值
Table 4. The expressions of Bcl-2 and Bax and the ratio of cleaved Caspase-3/Caspase-3 in cerebral cortex of rats in each group

分组	<i>n</i>	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax	cleaved Caspase-3/Caspase-3
假手术组	9	20.50±2.11	5.81±1.05	3.52±0.34	0.23±0.04
MCAO 组	9	8.04±1.28 ^a	15.75±1.62 ^a	0.51±0.08 ^a	0.64±0.08 ^a
EDDE-L 组	9	11.38±1.35 ^{bc}	10.63±1.14 ^{bc}	1.07±0.15 ^{bc}	0.47±0.06 ^{bc}
EDDE-H 组	9	15.49±1.76 ^b	8.54±1.20 ^b	1.81±0.22 ^b	0.35±0.05 ^b
CHE 组	9	3.75±0.51 ^b	20.28±2.13 ^b	0.18±0.03 ^b	0.79±0.08 ^b
EDDE+CHE 组	9	10.03±1.24 ^c	14.91±1.58 ^c	0.67±0.09 ^c	0.60±0.07 ^c

注:a 为 $P<0.05$,与假手术组比较;b 为 $P<0.05$,与 MCAO 组比较;c 为 $P<0.05$,与 EDDE-H 组比较。

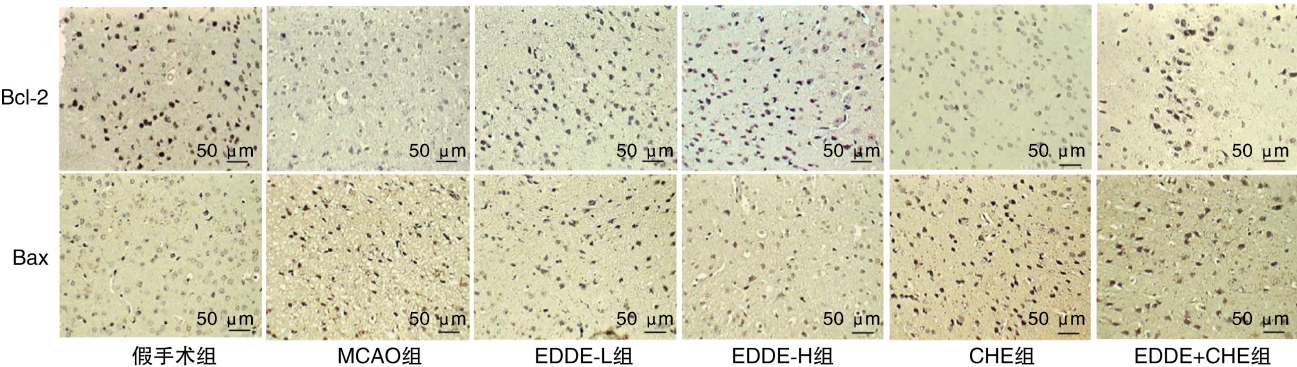


图 4. 各组大鼠脑皮质神经细胞 Bcl-2、Bax 的表达
Figure 4. Expression of Bcl-2 and Bax in cerebral cortex of rats in each group

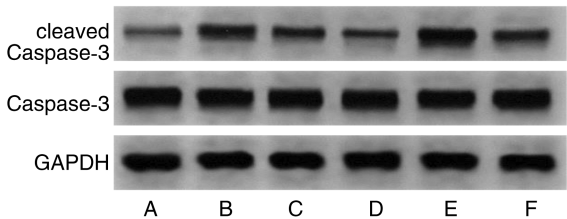


图 5. 各组大鼠脑组织 cleaved Caspase-3、Caspase-3 的蛋白表达
A 为假手术组,B 为 MCAO 组,C 为 EDDE-L 组,
D 为 EDDE-H 组,E 为 CHE 组,F 为 EDDE+CHE 组。
Figure 5. Expression of cleaved Caspase-3 and Caspase-3 protein in brain tissue of rats in each group

2.7 EDDE 对大鼠脑组织 PKC、ERK 及其磷酸化蛋白表达的影响

与假手术组相比,MCAO 组 p-PKC/PKC、p-ERK1/2/ERK1/2 比值显著降低(均 $P<0.05$);与 MCAO 组相比,EDDE-L 组和 EDDE-H 组 p-PKC/PKC、p-ERK1/2/ERK1/2 比值显著升高(均 $P<0.05$),而 CHE 组 p-PKC/PKC、p-ERK1/2/ERK1/2

比值显著降低(均 $P<0.05$),EDDE-H 组 p-PKC/PKC、p-ERK1/2/ERK1/2 比值较 EDDE-L 组升高(均 $P<0.05$);与 EDDE-H 组相比,EDDE+CHE 组 p-PKC/PKC、p-ERK1/2/ERK1/2 比值显著降低($P<0.05$;图 6 和表 5)。

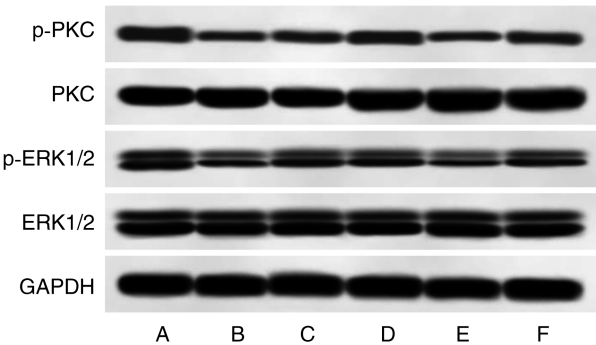


图 6. 各组大鼠脑组织 PKC/ERK 通路相关蛋白的表达
A 为假手术组,B 为 MCAO 组,C 为 EDDE-L 组,
D 为 EDDE-H 组,E 为 CHE 组,F 为 EDDE+CHE 组。
Figure 6. Expression of PKC/ERK pathway-related proteins in brain tissue of rats in each group

表 5. 各组 p-PKC/PKC 和 p-ERK1/2/ERK1/2 比值比较
Table 5. Comparison of p-PKC/PKC and p-ERK1/2/ERK1/2 ratio in each group

分组	n	p-PKC/PKC	p-ERK1/2/ERK1/2
假手术组	9	0.69±0.08	0.55±0.07
MCAO 组	9	0.31±0.05 ^a	0.26±0.04 ^a
EDDE-L 组	9	0.42±0.06 ^{bc}	0.35±0.05 ^{bc}
EDDE-H 组	9	0.55±0.06 ^b	0.43±0.06 ^b
CHE 组	9	0.20±0.04 ^b	0.12±0.02 ^b
EDDE+CHE 组	9	0.39±0.05 ^c	0.30±0.05 ^c

注:a 为 $P<0.05$,与假手术组比较;b 为 $P<0.05$,与 MCAO 组比较;c 为 $P<0.05$,与 EDDE-H 组比较。

3 讨论

依达拉奉是第一个对缺血性脑卒中患者具有神经保护作用的临床药物,是一种有效的自由基清除剂,可清除自由基,缓解脑水肿,抑制延迟性神经元死亡,被证明是缓解脑缺血损伤的有效药物^[14]。右莰醇是双环单萜类化合物,可抑制脑 I/R 引起的炎症相关蛋白的产生或表达,对炎症具有抑制作用,防止脑损伤^[15]。EDDE 是一种新型的神经保护剂,由依达拉奉和右莰醇按 4:1 的比例组成,这两种成分之间存在互补性,其组合具有协同的神经保护作用,对缺血性脑卒中中具有更好的治疗效果^[16]。细胞凋亡是与 I/R 相关的重要病理生理机制,再灌注可以加速缺血诱导的细胞凋亡过程,抑制细胞凋亡是预防脑 I/R 损伤的关键保护机制^[17]。本研究结果发现,经 EDDE 干预的 MCAO 大鼠,神经功能缺损症状和脑组织神经细胞病理损伤明显改善,脑梗死体积百分比、神经细胞凋亡率降低,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达升高,促凋亡蛋白 Bax 的表达降低。提示 EDDE 可抑制脑组织神经细胞凋亡,减轻 MCAO 大鼠的脑损伤,且 EDDE 对 MCAO 大鼠神经细胞凋亡的抑制作用可能与其对凋亡相关蛋白的调控有关。然而,其调控细胞凋亡的机制尚不明确。

ERK1/2 信号通路在脑 I/R 损伤中具有潜在的重要作用^[18],ERK1/2 磷酸化在脑梗死后发挥神经保护作用^[7-8,19]。本研究中,Western blot 检测结果也证实 MCAO 大鼠脑组织 ERK1/2 通路受到抑制,表现为 ERK1/2 磷酸化减少。PKC 是 ERK 信号通路的上游调节因子,据报道,PKC/ERK 信号通路在全身广泛表达,一旦 PKC 被激活就会磷酸化并激活 ERK,而 ERK1/2 的磷酸化可引起 Bad 蛋白磷酸化,使其失去与 Bcl-2 结合的能力,导致 Bcl-2 与 Bax 结

合形成二聚体,最终增加细胞对凋亡的抵抗力^[19-20]。在缺氧神经元中,PKC/ERK 通路的激活可增强 Bcl-2 的活性,抑制细胞色素 C 的释放,保护神经元^[10];在小鼠脑出血模型中,PKC 活性的降低减少了 p-ERK1/2、Bcl-2 的表达,升高了 Caspase-3 的表达,并导致氧化应激反应加重及神经元凋亡,而激活 PKC/ERK 通路则表现出相反的作用^[21],说明 PKC/ERK 通路在神经细胞凋亡中具有重要的影响。本研究结果发现,EDDE 干预可增加 PKC 和 ERK1/2 磷酸化,表明激活了 PKC/ERK 信号通路。为了进一步明确 EDDE 的神经保护机制,使用 PKC 特异性抑制剂 CHE 进行了实验,结果显示,CHE 可以消除 EDDE 对脑 I/R 损伤的保护作用。基于这些研究,推测 EDDE 在脑 I/R 损伤中的抗凋亡作用可能是通过激活 PKC/ERK 通路实现的。

综上所述,EDDE 可抑制神经细胞凋亡,减轻大鼠脑 I/R 损伤,其机制可能与激活 PKC/ERK 通路有关。本研究只关注了 EDDE 对 MCAO 后神经细胞凋亡的影响,EDDE 是否干扰了脑 I/R 期间炎症反应或氧化应激仍有待确定。此外,本研究主要针对缺血半暗带皮质神经细胞凋亡进行了初步探究,EDDE 能否影响其他脑组织区域,如海马区,有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] HERPICH F, RINCON F. Management of acute ischemic stroke[J]. Crit Care Med, 2020, 48(11): 1654-1663.
- [2] 周晓梅,任孝林,周芯羽. 颈动脉易损斑块风险模型的构建及与急性脑梗死患者认知障碍和预后的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(7): 606-610.
ZHOU X M, REN X L, ZHOU X Y. Construction of carotid vulnerable plaque risk model and its relationship with cognitive impairment and prognosis in patients with acute cerebral infarction[J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(7): 606-610.
- [3] LIU K, LI L L, LIU Z J, et al. Acute administration of metformin protects against neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia-reperfusion injury via regulation of the AMPK/CREB/BDNF pathway [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 832611.
- [4] 张颖楠,姜扬,任莉,等. 依达拉奉右莰醇静脉滴注对急性前循环脑梗死血管内治疗开通良好患者脑损伤的改善作用[J]. 山东医药, 2021, 61(18): 76-79.
ZHANG Y N, JIANG Y, REN L, et al. Effect of intravenous infusion of edaravone dexborneol on brain injury in patients with acute anterior circulation cerebral infarction who have been well treated with intravascular therapy [J].

- Shandong Med J, 2021, 61(18): 76-79.
- [5] 张黎宾, 封志鹏, 陈日升, 等. 阿替普酶联合依达拉奉右莰醇治疗急性缺血性脑卒中疗效研究[J]. 智慧健康, 2021, 7(20): 133-135.
- ZHANG L B, FENG Z P, CHEN R S, et al. The efficacy of alteplase combined with edaravone dextrorotatory on acute ischemic stroke[J]. Smart Healthcare, 2021, 7(20): 133-135.
- [6] GLADBACH A, VAN EERSEL J, BI M, et al. ERK inhibition with PD184161 mitigates brain damage in a mouse model of stroke[J]. J Neural Transm (Vienna), 2014, 121(5): 543-547.
- [7] 葛海, 何良霞, 朱迎春, 等. 山茱萸环烯醚萜苷通过介导胞外信号调节激酶信号通路对急性脑梗死小鼠的神经保护作用[J]. 安徽医药, 2021, 25(9): 1727-1731.
- GE H, HE G X, ZHU Y C, et al. Neuroprotective effects of cornel iridoid glycoside on acute cerebral infarction in mice through extracellular regulated protein signaling pathway[J]. Anhui Med Pharmaceut J, 2021, 25(9): 1727-1731.
- [8] LIU J, WANG Q, YANG S L, et al. Electroacupuncture inhibits apoptosis of peri-ischemic regions via modulating p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), and c-Jun N terminal kinases (JNK) in cerebral ischemia-reperfusion-injured rats[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 4395-4404.
- [9] NELSON T J, SUN M K, HONGPAISAN J, et al. Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 585(1): 76-87.
- [10] ZHU M, LI M W, YANG F, et al. Mitochondrial ERK plays a key role in δ -opioid receptor neuroprotection against acute mitochondrial dysfunction[J]. Neurochem Int, 2011, 59(6): 739-748.
- [11] WANG G B, SU J J, LI L J, et al. Edaravone alleviates hypoxia-acidosis/reoxygenation-induced neuronal injury by activating ERK1/2[J]. Neurosci Lett, 2013, 543: 72-77.
- [12] HU B, XU G T, ZHENG Y X, et al. Chelerythrine attenuates renal ischemia/reperfusion-induced myocardial injury by activating CSE/H₂S via PKC/NF- κ B pathway in diabetic rats[J]. Kidney Blood Press Res, 2017, 42(2): 379-388.
- [13] 田健材, 姚斐, 谢芳芳, 等. 不同时间窗电针水沟穴对缺血性脑卒中大鼠脑梗死体积的影响[J]. 北京中医药, 2021, 40(7): 715-718.
- TIAN J C, YAO F, XIE F F, et al. Effect of electroacupuncture at Shuigou point at different time windows on cerebral infarction volume in rats with ischemic stroke[J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2021, 40(7): 715-718.
- [14] 张雄智, 丁彦博, 贾燕燕. 阿加曲班联合依达拉奉对后循环急性脑梗死患者神经功能恢复及血清 Hcy、CXCL16 和 TGF- β 1 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(8): 695-701.
- ZHANG X Z, DING Y B, JIA Y Y. Effect of argatroban combined with edaravone on neurological function recovery and serum Hcy, CXCL16 and TGF- β 1 in patients with posterior circulation acute cerebral infarction[J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(8): 695-701.
- [15] XU J, WANG Y L, WANG A X, et al. Safety and efficacy of edaravone dextrorotatory versus edaravone for patients with acute ischaemic stroke: a phase II, multicentre, randomised, double-blind, multiple-dose, active-controlled clinical trial[J]. Stroke Vasc Neurol, 2019, 4(3): 109-114.
- [16] XU J, WANG A X, MENG X, et al. Edaravone dextrorotatory versus edaravone alone for the treatment of acute ischemic stroke: a phase III, randomized, double-blind, comparative trial[J]. Stroke, 2021, 52(3): 772-780.
- [17] WEN L, LIU L, TONG L Y, et al. NDRG4 prevents cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting neuronal apoptosis[J]. Genes Dis, 2019, 6(4): 448-454.
- [18] SHI Z F, FANG Q, CHEN Y, et al. Methylene blue ameliorates brain edema in rats with experimental ischemic stroke via inhibiting aquaporin 4 expression[J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(3): 382-392.
- [19] HUANG S M, TAN Z G, CAI J R, et al. Myrtenol improves brain damage and promotes angiogenesis in rats with cerebral infarction by activating the ERK1/2 signalling pathway[J]. Pharm Biol, 2021, 59(1): 582-591.
- [20] MOHANRAJ M, SEKAR P, LIOU H H, et al. The mycobacterial adjuvant analogue TDB attenuates neuroinflammation via mircle-independent PLC- γ 1/PKC/ERK signaling and microglial polarization[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(2): 1167-1187.
- [21] 傅思铭, 吴旋, 谢宗义. NDP-MSH 激活黑皮素 3 受体通过 PKC/ERK 信号通路减轻小鼠脑出血后氧化应激和神经元凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(16): 1633-1640.
- FU S M, WU X, XIE Z Y. NDP-MSH activates melanocortin-3 receptor to attenuate oxidative stress and neuronal apoptosis in mice with intracerebral hemorrhage via PKC/ERK signaling pathway[J]. J Third Military Med Univ, 2020, 42(16): 1633-1640.

(此文编辑 文玉珊)