

. 实验研究 .

抑制 ERK1/2 对大鼠弥漫性脑损伤后细胞凋亡的影响

李金星 赵海梅 姜晓兵

【摘要】目的 探讨抑制细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)对大鼠弥漫性脑损伤(DBI)后脑组织细胞凋亡的影响。方法 按随机数字表法将 228 只成年 SD 大鼠随机分为假手术组(n=12)、DBI 组(n=72)、阻滞剂组(n=72)、对照组(n=72),后三组按动物处死时间分为 30 min、3 h、24 h、48 h、72 h 和 7 d 六个亚组,每亚组 12 只。参照 Mamarou 自由落体方法制作重型 DBI 模型。阻滞剂组损伤后尾静脉注射 ERK1/2 特异性阻滞剂 U0126(0.05 mg/kg),对照组注射等量溶剂二甲基亚砜。免疫印迹法检测脑组织磷酸化 ERK1/2(pERK1/2)的表达水平,免疫组化法检测 Caspase-3 表达,流式细胞术检测细胞凋亡率。结果 伤后 30 min,脑组织 pERK1/2 表达水平显著增高($P<0.05$),并持续高水平表达至 72 h,伤后 7 d 与假手术组无统计学差异($P>0.05$)。伤后 3 h,脑组织 Caspase-3 表达水平和细胞凋亡率均明显增高,72 h 达到高峰,伤后 7 d 仍明显高于假手术组($P<0.05$)。伤后 30 min、3 h、24 h、48 h、72 h 和 7 d,阻滞剂组脑组织 Caspase-3 表达水平和细胞凋亡率均明显低于 DBI 组和对照组($P<0.05$),而 DBI 组和对照组均无统计学差异($P>0.05$)。结论 阻滞 ERK1/2 通路,可显著抑制 DBI 大鼠脑组织 Caspase-3 的表达,降低细胞凋亡率。

【关键词】弥漫性脑损伤;ERK1/2;Caspase-3;细胞凋亡;大鼠

【文章编号】1009-153X(2019)01-0039-03 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 651.1+5

Effects of inhibition of ERK1/2 on cell apoptosis in rats with diffuse brain injury

LI Jin-xing¹, ZHAO Hai-mei², JIANG Xiao-bing³. 1. Department of Neurosurgery, Chinese Traditional Medicine Hospital Of Shenzhen City, Shenzhen 518033, China; 2. Department of Gerontology, The Third Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330008, China; 3. Department of Neurosurgery, Union Hospital, Tongji Medical School, Huazhong University of Sciences and Technology, Wuhan 43002, China

【Abstract】Objective To study the effect of inhibition of extracellular signal regulated kinase1/2 (ERK1/2) on cell apoptosis in the cerebral tissues of the rats with diffuse brain injury (DBI). Methods Two hundred and twenty-eight SD rats were randomly divided into sham operation (n=12), DBI (n=72), experimental (n=72) and control (n=72) groups. Severe rats DBI models were established by Mamarou’s free falling-body method in DBI, experimental and control groups. U0126, a special inhibitor of ERK1/2, was injected respectively into the tail veins of rats immediately after DBI in the experimental and control groups. Phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) and caspase-3 expression in the cerebral tissues were determined respectively by Western blotting and immunohistochemical staining. The cell apoptosis rate in the cerebral tissues was detected by flow cytometry method. Results The levels of pERK1/2 expression were significantly higher in DBI and control groups than those in the experimental group ($P<0.01$), which were significantly higher than that in the sham operation group ($P<0.01$) 0.5, 3, 24, 48 and 72 hours after DBI. The levels of Caspase-3 expression in the cerebral tissues were significantly higher in DBI and control groups than those in the experimental group ($P<0.05$), which were significantly higher than those in the sham operation group ($P<0.05$) 3, 24, 48, 72 and 168 hours after DBI. The rats of cell apoptosis in the cerebral tissues were significantly higher in the DBI and control groups than those in the experimental group ($P<0.05$), which were significantly higher than that in the sham operation group ($P<0.05$) 3, 24, 48 72 and 168 hours after DBI group. Conclusion The inhibition the activation of ERK1/2 can decrease expression of Caspase-3 and cell apoptosis in the brain tissue of the rats with DBI.

【Key words】Diffuse brain injury; ERK1/2; Caspase-3; Cell apoptosis; Rats

颅脑损伤、脑缺血及其他原因诱导的氧化应激反应可导致脑组织细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal regulated kinase1/2, ERK1/2) 信号转导通路被激活,磷酸化 ERK1/2(phosphorylated,

pERK1/2)表达水平增高,与神经细胞坏死和凋亡有关,但不同的文献中结论尚不统一^[1-5]。本文对弥漫性脑损伤(diffuse brain injury, DBI)大鼠给予 ERK1/2 通路阻滞剂 U0126 干预,观察损伤脑组织 pERK1/2、Caspase-3 表达及细胞凋亡的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康雄性 SD 大鼠 228 只,体重 325~375 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.01.011
作者单位:518033 广东,深圳市中医院神经外科(李金星);330008 南昌,南昌大学第三附属医院老年医学科(赵海梅);430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经外科(姜晓兵)
通讯作者:姜晓兵,E-mail:jxb917@sohu.com

心提供。按随机数字表法随机分为假手术组($n=12$)、DBI 组($n=72$)、阻滞剂组($n=72$)及对照组($n=72$),后三组按动物处死时间分为 30 min、3 h、24 h、48 h、72 h 和 7 d 六个亚组,每亚组 12 只。

1.2 模型制作及干预方法 参照 Mamarou 自由落体方法^[6]制作重型 DBI 模型。将大鼠乙醚面罩吸入麻醉,正中切开头顶皮肤,用磷酸锌水泥在顶骨上固定一圆形金属垫片(直径 10 mm,厚度 3 mm)。做颈前皮肤切口,显露气管以备气管切开。将 450 g 砝码由一相应口径的有机玻璃管导向自 2 m 高处自由垂直坠落至金属垫片上。打击后自主呼吸停止者即刻气管切开,呼吸机维持呼吸。按 0.05 mg/kg 计算用药量,将 U0126(美国 Alexis 公司)溶于二甲基亚砷中并以 0.1 mmol/L 的 PBS 稀释为总量 300 μ l,于打击后即刻自尾静脉注入。对照组注射等量二甲基亚砷。假手术组仅切开头皮固定垫片及行颈前切口显露气管。打击后缝合头皮及颈部切口,清醒后自由进食,饲养至不同时间点,自主呼吸未恢复及 7 d 内死亡者不纳入实验研究。

1.3 取材 假手术组以及损伤后 30 min、3 h、24 h、48 h、72 h 和 7 d 各亚组分别处死 12 只动物。处死时,腹腔注射 100 g/L 水合氯醛(300 mg/kg)麻醉后,各组 6 只动物断头取脑,冠状切取顶叶、皮质下层、纹状体、海马等结构 200 mg,平均分为二份。一份加入 1 ml 细胞裂解液,匀浆离心,提取上清液,用于免疫印迹法测定 pERK1/2 的表达;另一份剪碎、研磨、离心,取细胞悬液,用于测定细胞凋亡率。另 6 只动物经心脏灌注 4%多聚甲醛固定全脑,取出全脑,自前囟 4.8 mm 冠状切片,片厚 4 mm,包括顶叶皮质、皮质下层、纹状体及海马等,然后常规石蜡切片,用于 Caspase-3 免疫组化测定。

1.4 免疫印迹法检测 pERK1/2 表达 Bradford 法测定蛋白浓度,加入等体积 2 \times SDS,煮沸、离心,取样本 30 μ g 进行 10% SDS-PAGE 电泳,转移到 PVDF 膜,丽春红染色。按 0.5 μ g/ml 浓度加入兔抗大鼠 pERK1/2 多克隆抗体(美国 R & D 公司),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入羊抗兔 HRP 标记的 IgG(1:2 000),室温震荡孵育 1 h,以 TBS-T 液洗涤 5 min \times 3 次,用 ECL 试剂(美国 Pierce 公司)暗室内胶片曝光。用 FluorChem8900 图像分析系统测定目的条带的灰度值,以 β -tublin(47 ku)为内参照,根据目的条带与 β -tublin 条带灰度值比值表示待测蛋白含量。

1.5 免疫组化检测 Caspase-3 表达 采用 SP 法进行 Caspase-3 免疫组化染色,按照试剂盒说明进行操作。

兔抗 Caspase-3 抗体(Santa Cruz 公司)工作浓度为 1:100。以胞浆内或胞核呈棕黄色为阳性。用 HMIAS-2000 图像分析系统扫描和收集图像,Image-Pro plus 软件测平均光密度值。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡 将获取的脑组织制成单细胞悬液,采用 Annexin V-FITC 联合 PI 法检测。Annexin V/FITC 5 μ l/管,加 PI 10 μ l。另取 3 管,一管对照,一管 PI 10 μ l,一管 Annexin V 5 μ l,取上述细胞 100 μ l,分别加入含 Annexin V(美国 Becton Dickinson 公司)的试管中,4 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min。上机测定细胞凋亡率。

1.7 统计学分析 应用 SPSS 22.0 软件进行分析,定量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 pERK1/2 表达变化 假手术组仅少量表达,DBI 后 30 min 显著升高($P<0.01$),直到 72 h 都处于高水平($P<0.01$),到 7 d 下降至基础水平($P>0.05$)。伤后 30 min、3 h、12 h、24 h、72 h,阻滞剂组 pERK1/2 水平较 DBI 组和对照组均显著降低($P<0.01$);对照组与 DBI 组无显著性差异($P>0.05$)。见图 1。

2.2 Caspase-3 表达变化 假手术组可观察到少量 Caspase-3 阳性细胞;DBI 后 3 h, Caspase-3 阳性细胞开始增多,阳性染色主要位于胞浆,染色较淡,24 h 染色变深,72 h 达到高峰,Caspase-3 阳性细胞主要分布于脑皮质、皮质下层及海马。伤后 3 h、12 h、24 h、72 h、7 d,阻滞剂组 Caspase-3 水平明显低于 DBI 组和对照组($P<0.05$),对照组与 DBI 组无显著性差异($P>0.05$)。见图 2、3。

2.3 细胞凋亡率变化 伤后 30 min,细胞凋亡率较低,随后开始上升,72 h 达到高峰,随后有所下降,但是仍明显高于假手术组($P<0.05$)。伤后 3 h、12 h、24 h、72 h、7 d,阻滞剂组细胞凋亡率均明显低于 DBI 组和对照组($P<0.05$),对照组与 DBI 组无显著性差异($P>0.05$)。见图 4。

3 讨论

DBI 后细胞凋亡是导致继发性脑损伤的重要因素^[1,4,5,7]。Caspase-3 是导致细胞凋亡的关键酶^[8]。ERK1/2 是介导细胞产生反应的多条信息传递通路的中心环节,pERK1/2 是活化形式^[4,5]。许多研究探讨 ERK1/2 通路与细胞凋亡的关系,但结论不一致,甚至还出现了截然相反的情况^[1-5]。为什么出现这种

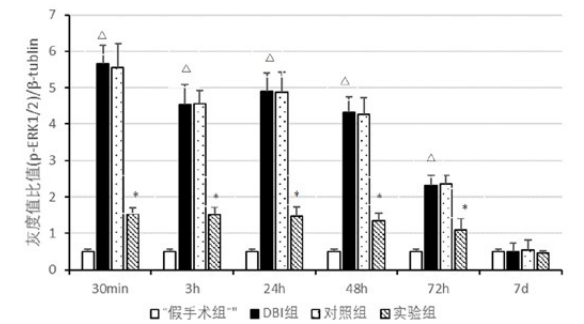


图1 大鼠颅脑损伤后脑组织pERK1/2表达变化与假手术组相应值比, Δ $P<0.01$; 与 DBI 组相应值比, * $P<0.01$

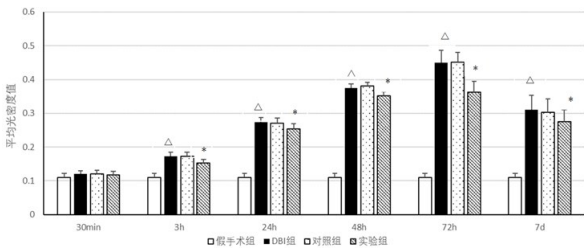


图2 大鼠颅脑损伤后脑组织Caspase-3表达变化与假手术组相应值比, Δ $P<0.01$; 与 DBI 组相应值比, * $P<0.01$

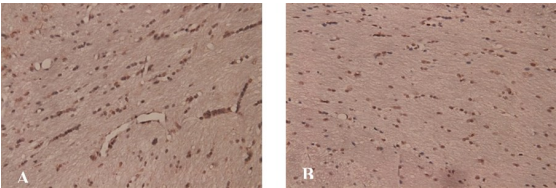


图3 大鼠颅脑损伤后 72 h 脑皮质 Caspase-3 免疫组化染色(×200, SP 法)
A. DBI 组; B. 阻滞剂组

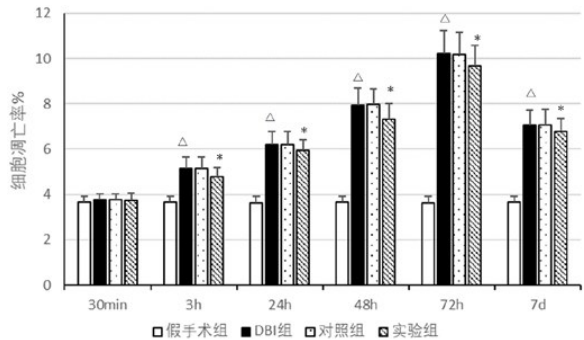


图4 大鼠颅脑损伤后脑组织细胞凋亡率变化与假手术组相应值比, Δ $P<0.01$; 与 DBI 组相应值比, * $P<0.01$

相互矛盾的现象呢? Whitehurst 等^[7]发现,不同模型、不同刺激条件诱导的 ERK1/2 激活特点和作用不同。据此,我们推测,相同因子或指标的变化在不同病理状态下所起的作用并不相同,应根据具体的病理状况进行合理的调控,DBI 后 ERK1/2 通路的激活所起的作用也有可能 与模型的病理特征、特定时段、具体的干预条件等因素有关。本研究采用重型 DBI

大鼠模型,结果显示,DBI 后 pERK1/2 表达显著升高,Caspase-3 表达也明显增高;在 DBI 后即刻应用 ERK1/2 通路特异性抑制剂 U0126,在明显抑制 pERK1/2 表达的同时下调 Caspase-3 的表达,降低细胞凋亡率。这表明在重型 DBI 急性期,ERK1/2 通路的激活导致 Caspase-3 基因表达增高,增加细胞凋亡率。通过下调 ERK1/2 信号通路可以起到减轻 DBI 后继发性细胞凋亡的作用,对该信号靶点的合理调控有望成为 DBI 治疗的新方法;但如何进行精准调控,干预时间点如何掌握,还需要进一步研究。

【参考文献】

[1] Jeong JE, Park JH, Kim CS, *et al.* Neuroprotective effects of erythropoietin against hypoxic injury via modulation of the mitogen- activated protein kinase pathway and apoptosis [J]. Korean J Pediatr, 2017, 60(6): 181-188.

[2] Abdul Rahman NZ, Greenwood SM, Brett RR. Mitogen- activated protein kinase phosphatase- 2 deletion impairs synaptic plasticity and hippocampal- dependent memory [J]. J Neurosci, 2016, 36(8): 2348-2354.

[3] Yang Y, Zhang X, Cui H, *et al.* Apelin -13 protects the brain against ischemia/reperfusion injury through activating PI3K/ Akt and ERK1/2 signaling pathways [J]. Neurosci Lett, 2014, 568: 44-49.

[4] 边 寰,徐浩翔,杨悦凡,等. MAPK 信号通路在创伤性脑损伤中的作用[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2013, 12 (3):210-212.

[5] Zhao B, Zheng Z. Insulin growth factor 1 protects neural stem cells against apoptosis induced by hypoxia through Akt/Mitogen- Activated protein kinase/extracellular signal- regulated kinase (Akt/MAPK/ERK) pathway in hypoxia- ischemic encephalopathy [J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 1872-1879.

[6] Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury [J]. Nat Rev Neurosci, 2013,14(2):128-142.

[7] Whitehurst A, Cobb MH, White MA. Stimulus-coupled spatial restriction of extracellular signal- regulated kinase 1/2 activity contributes to the specificity of signal- response pathways [J]. Mol Cell, 2004, 24(23): 10145-10150.

[8] 李金星,赵海梅,张方成. 大鼠弥漫性脑损伤 Caspase-3 表达及细胞凋亡的检测[J]. 中国继续医学教育, 2017, 9 (26):136-138.