

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.09.003

## 氢气对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤内质网应激及神经细胞凋亡的影响\*

夏裕宁<sup>1</sup>, 李雪梅<sup>2</sup>, 袁楠楠<sup>1</sup>, 张鑫磊<sup>1</sup>, 谭永星<sup>3△</sup>

(桂林医学院:1. 研究生院;2. 附属医院护理部;3. 附属医院重症医学科, 广西桂林 541001)

**[摘要]** **目的** 探讨吸入高浓度氢气(H<sub>2</sub>)对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤(IRI)内质网应激(ERS)相关蛋白葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、半胱氨酸蛋白酶 12(Caspase-12)及脑皮质神经细胞凋亡和凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响。**方法** 选取 72 只健康成年 SPF 级雄性 SD 大鼠,将其分为对照组(I组:不作任何处理)、假手术组(II组)、脑 IRI 组(III组)、氢气治疗组(IV组),每组 18 只。采用线栓法建立大鼠局灶性脑 IRI 模型。于再灌注 24 h 后行神经功能缺损评分(NDS),采用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色观察大鼠脑缺血梗死程度并计算脑梗死面积,原位末端标记法(TUNEL)技术检测各组大鼠脑皮质神经细胞凋亡并计算凋亡指数(AI),Western blot 法和免疫组织化学法检测大鼠脑皮质 GRP78、Caspase-12、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达。**结果** 与 I、II 组比较,III、IV 组大鼠脑 IRI 后 NDS、脑梗死面积、AI 均明显增加,GRP78、Caspase-12、Bax 蛋白表达明显升高,Bcl-2 蛋白表达明显下降( $P < 0.05$ );与 III 组比较,IV 组大鼠 NDS、脑梗死面积、AI 及 Caspase-12、Bax 蛋白表达明显减少,GRP78、Bcl-2 表达明显增加( $P < 0.05$ )。**结论** 再灌注同时吸入高浓度 H<sub>2</sub> 可通过增加脑 IRI 后内质网 GRP78 蛋白表达,并抑制 Caspase-12 的激活进而抑制 ERS 并促进内质网功能修复,对大鼠脑 IRI 起到一定的保护作用。

**[关键词]** 氢;脑缺血;再灌注损伤;细胞凋亡;内质网;应激**[中图分类号]** R743.31**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)09-1159-04

## Effect of hydrogen gas on endoplasmic reticulum stress and neural cell apoptosis in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury\*

Xia Yuning<sup>1</sup>, Li Xuemei<sup>2</sup>, Yuan Nannan<sup>1</sup>, Zhang Xinlei<sup>1</sup>, Tan Yongxing<sup>3△</sup>

(1. Postgraduate School; 2. Department of Nursing, Affiliated Hospital; 3. Department of Intensive Care Medicine, Affiliated Hospital, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of inhaling high concentration of hydrogen gas on the expressions of endoplasmic reticulum stress(ERS) related protein glucose regulated protein 78 (GRP78), Caspase-12 and the neural cell apoptosis and related proteins Bcl-2 and Bax in the rats with focal cerebral ischemia reperfusion(I/R) injury. **Methods** Seventy-two healthy SPF male Sprague-Dawley rats were selected and then randomly divided into the control group (I: without any treatment), sham operation group (II), cerebral IRI group (III) and hydrogen gas treatment group (IV), 18 cases in each group. Focal cerebral ischemia reperfusion injury (IRI) model was induced by using the suture-occluded method. The neurological deficits score (NDS) was assessed at 24 h after cerebral reperfusion in four groups. The cerebral infarction severity and size were detected by TTC staining and neuronal apoptosis of brain cortex were tested by TUNEL technique. The apoptosis index (AI) was calculated. Then the expressions of GRP78, Caspase-12, Bcl-2 and Bax were assessed by Western blot and immunohistochemistry. **Results** As compared with the group I and II, NDS score, cerebral infarction size, AI and the expressions of GRP78, Caspase-12 and Bax in cerebral cortex in the group III and IV were significantly increased, while the expression of Bcl-2 in cerebral cortex was markedly decreased ( $P < 0.05$ ); compared with the group III, NDS score, brain infarction size, AI and the expression of Caspase-12 and Bax in cerebral cortex in the group IV were markedly decreased, while the expressions of GRP78 and Bcl-2 were dramatically increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Inhaling high concentration of hydrogen gas has a certain protective effect on cerebral IRI in rats through increasing endoplasmic reticulum GRP78 protein expression after IRI and inhibiting Caspase-12 activation, thus inhibiting ERS and promoting the repair function of endoplasmic reticulum.

**[Key words]** hydrogen; brain ischemia; reperfusion injury; apoptosis; endoplasmic reticulum; stress

脑缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)是临床常见的具有严重危害的病生过程,是包括多种作用机制在内的一种复杂的综合征<sup>[1]</sup>。缺血及再灌注所引起的缺氧、能量耗竭、酸中毒、钙稳态的破坏及大量自由基的生成等均可诱发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS),细胞可通过 ERS 自身产生应激性保护作用;但是过强或持久的 ERS 会激活凋亡信号通路,引起细胞凋亡,加重脑 IRI。Ishige 等<sup>[2]</sup>研究

表明,ERS 在脑 IRI 过程中处于中心环节,可启动神经细胞凋亡途径。Tian 等<sup>[3]</sup>研究证实,氢气(H<sub>2</sub>)可有效降低脑 IRI,但 H<sub>2</sub> 与脑 IRI 后 ERS 的关系尚不清楚。本研究通过建立大鼠局灶性脑 IRI 模型,通过观察 IRI 后脑皮质神经细胞凋亡及 ERS 相关蛋白葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、半胱氨酸蛋白酶 12(Caspase-12)和凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达变化,探讨吸入高浓度 H<sub>2</sub> 对脑 IRI 内质网应激及神经细胞凋亡的影响

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81320020)广西自然科学基金资助项目(2015GXNSFAA019155,2015GXNSFAA139130);广西壮族自治区卫生厅课题(Z2009038,Z2013497,Z2012402);广西医学科学实验中心开放课题(KFJJ2011-07)。作者简介:夏裕宁(1987-),在读硕士研究生,主要从事围术期脏器功能保护的基础与临床研究。△ 通信作者 E-mail:tan\_yongxing\_2012@163.com。

及可能机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** (1)动物:健康雄性 SD 大鼠 72 只,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号:SCXK(沪 2012-0002),体质量为(210±10)g。(2)试剂及仪器:原位末端标记法(TUNEL)凋亡检测试剂盒(罗氏公司,瑞士);兔单克隆抗 GRP78、Bcl-2(Abcam 公司,英国);兔多克隆抗 Caspase-12、Bax(Abcam 公司,英国);单克隆抗体  $\beta$ -actin(Santa Cruz 公司,美国);即用型快捷免疫组化 MaxVision 试剂盒(鼠/兔)(福州迈新生物技术开发有限公司,中国);辣根酶标记山羊抗兔、小鼠(中山金桥有限生物公司,中国);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,中国);DAB 显色试剂盒(Sigma 公司,美国);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色液(国药集团化学试剂有限公司,中国);H<sub>2</sub> 浓度检测仪检测(日本新宇宙,型号 XP-3140,日本)。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物分组** 将 72 只大鼠按随机数字表法分为 4 组:对照组(I 组,不做任何处理),假手术组(II 组,只分离颈动脉即予缝合,同时吸入 67%N<sub>2</sub>+33%O<sub>2</sub> 混合气体),脑 IRI 组(III 组,脑缺血 1 h 再灌注 24 h,同时吸入 67%N<sub>2</sub>+33%O<sub>2</sub> 混合气体),氢气治疗组(IV 组,于脑缺血 1 h 再灌注同时吸入 67%H<sub>2</sub>+33%O<sub>2</sub> 混合气体 2 h,并每间隔 6 h 予以吸入 H<sub>2</sub> 2 h),每组 18 只。II 组与 III 组每次吸气时间及间隔时间与 IV 组相同。

**1.2.2 高浓度 H<sub>2</sub> 制备及检测** 使用氢气雾化机(上海德美医疗科技有限公司,型号 AMS-H-01)产氢,电解纯水后 H<sub>2</sub> 与 O<sub>2</sub> 比例为 2:1。将大鼠放入密封的带有进气口和出气口的树脂玻璃箱子内,通过气体流量计将 H<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub> 混合后从进气口输入箱内,残余气体从出气口排出。混合气中 H<sub>2</sub> 浓度使用 H<sub>2</sub> 浓度检测仪监测(日本新宇宙,型号 XP-3140)。

**1.2.3 动物模型制备及处理** 参照 Zea-Longa 的线栓法并加以改良制备大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型。栓线采用直径 0.24~0.26 mm,长 4.00 cm 的尼龙线(北京西浓科技有限公司,中国)。用 4%水合氯醛 400 mg/kg 腹腔注射麻醉后仰卧位固定,颈旁正中切口,分离并暴露左侧颈总动脉及颈内外动脉。结扎左侧颈外动脉根部,暂时结扎左侧颈总动脉,由颈外动脉近分叉处剪一小口插入栓线,进线长度 18.00~20.00 mm 感到有轻微阻力时停止,扎紧并固定插线,阻断 60 min 后,拔出栓线至颈外动脉残端内进行再灌注 24 h。IV 组再灌注同时给予吸入 67%H<sub>2</sub>+33%O<sub>2</sub> 混合气体 2 h,以后每间隔 6 h 给予以吸入 H<sub>2</sub> 2 h;II、III 组于再灌注同时吸入 67%N<sub>2</sub>+33%O<sub>2</sub> 混合气体,每次吸气时间及间隔时间与 IV 组相同。II 组只分离颈动脉但不予结扎。围术期间采取严格消毒措施,恒温毯维持大鼠体温在 37℃左右。

**1.2.4 神经功能缺损(NDS)评分** 各组大鼠于再灌注 24 h 后及相应时间点参考 Longa 的 5 级 4 分法行 NDS 评分。0 分:行走正常,无神经损伤症状;1 分:垂直提尾时大鼠右前肢不能完全伸展;2 分:大鼠行走时向右侧转圈;3 分:大鼠行走时向右侧跌倒;4 分:不能自发行走,意识水平明显下降。1~3 分即为制模成功。

**1.2.5 TTC 染色测定脑梗死面积** 于再灌注 24 h 后,每组各取 6 只大鼠,用 4%水合氯醛麻醉后断头取脑。迅速将脑组织置于-20℃中速冻 20 min 后取出,除去两端 1.00 mm 左右,由前向后每隔 2.00 mm 作冠状切片,均切成 5 片,置于 2% TTC 液中,放入 37℃恒温箱中避光孵育 30 min,每隔 15 min 翻面使脑组织均匀染色。染色后可见正常脑组织呈红色,梗死

灶染成白色。将染色后的脑组织用 4%多聚甲醛溶液再次固定 48 h,数码相机拍照并利用 ImageJ 软件分析计算梗死面积,计算得梗死面积百分比=(梗死面积/整个脑组织面积)×100%。

**1.2.6 TUNEL 法检测脑皮质区凋亡神经细胞** 于再灌注 24 h 后,每组取 6 只大鼠,麻醉后用冰生理盐水心脏灌注,断头取脑,取部分缺血侧皮质区组织于 4%多聚甲醛溶液中固定,剩余部分置于-80℃超低温冰箱保存备用。采用漂片法 25  $\mu$ m 冰冻切片行细胞凋亡检测。应用 TUNEL 试剂盒检测各组大鼠脑皮质区神经元的凋亡情况,严格按照试剂盒操作说明进行检测。TUNEL 染色结束后,滴加 DAPI(1:1 000)孵育 5 min,抗荧光猝灭剂封片,采用 Olympus 荧光显微镜(Olympus 公司)观察并拍照。镜下观察红色荧光为 TUNEL 阳性细胞,蓝色荧光为 DAPI 对所有细胞核进行染色。取 5 个不重复视野( $\times$ 200),计数细胞总数和 TUNEL 染色阳性细胞数,计算细胞凋亡指数(AI)。AI=(凋亡细胞数/总细胞数)×100%,采用 IPP6.0 分析 TUNEL 阳性细胞和 DAPI 墨迹,观察凋亡细胞与神经元的位置关系。

**1.2.7 免疫组织化学染色** 冰冻切片用 PBS 漂洗后以 PBS:甲醇:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(5:4:1)溶液阻断组织内源性过氧化物酶活性,1%BSA 封闭 1 h,按 1:200 稀释一抗 Bcl-2、Bax 及 Caspase-12,4℃孵育过夜;次日滴加即用型快捷免疫组化 Max Vision 试剂盒(鼠/兔)试剂,室温孵育 20 min,DAB 染色 3~5 min。操作过程按各试剂盒说明进行。光镜下观察并拍照,每张切片取 5 个高倍视野( $\times$ 200),对脑皮质区染色阳性细胞计数。

**1.2.8 Western blot 法检测** Western blot 法检测脑皮质区凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及内质网应激相关蛋白 GRP78、Caspase-12 的表达。取备用皮质区脑组织 100 mg 剪碎、研磨后,加入组织裂解液提取总蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白浓度后,蛋白变性,10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,湿转法转至 PVDF 膜行免疫反应后于 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,按 1:1 000 稀释 Bcl-2、Bax 及 GRP78、Caspase-12 抗体,4℃孵育过夜,次日取出用 TBST 洗膜,孵育二抗 1 h,再用 TBST 洗二抗,加 ECL 发光液,放入 Bio-Rad 凝胶成像仪中自动显影读出条带,测得各目的条带灰度值,以  $\beta$ -actin 为内参照算得各组相对表达量。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS18.0 统计软件对各组数据进行统计分析。计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析及最小显著性差异法检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 各组大鼠 NDS 症状评分及 TTC 染色比较** I、II 组的大鼠无行为学异常,行动自如,饮食正常,反应敏捷;III 组大鼠精神萎靡,食欲欠佳,行走时向右侧转圈或跌倒,反应迟钝;IV 组大鼠行动较灵敏,饮食正常,行走速度较快且不转圈,反应较快,NDS 评分明显低于 III 组( $P<0.01$ )。I、II 组无梗死灶,III、IV 组脑缺血 1 h 再灌注 24 h 脑组织 TTC 染色可见明显梗死灶,但 IV 组梗死面积较 III 组明显减少( $P<0.01$ ),见表 1、图 1。

**2.2 各组大鼠皮质区 TUNEL 染色检测细胞凋亡比较** 脑皮质区荧光双标 DAPI 染色结果显示,I、II 组神经元细胞核圆且大,排列紧密,几乎未见核碎片;III 组神经元细胞核浓缩深染,核间隙增宽,可见较多细胞核碎片;与 III 组相比,IV 组细胞核较饱满,细胞核碎片较少。TUNEL 染色显示,I、II 组偶见凋亡细胞,两组凋亡细胞数比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );与



I、II 组比较, III、IV 组脑 IRI 后凋亡细胞数目明显增多, AI 明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 III 组相比, IV 组脑 IRI 后凋亡细胞减少, AI 下降 ( $P < 0.01$ )。各组切片 Merged 结果显示, TUNEL 染色阳性细胞与 DAPI 染色细胞核大致重叠, 见图 2、表 2。

表 1 各组大鼠 NDS 评分及皮质区梗死面积比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	NDS 评分(分)	梗死面积比(%)
I 组	6	0	0
II 组	6	0	0
III 组	6	2.22 ± 0.65 <sup>a</sup>	26.85 ± 8.59 <sup>a</sup>
IV 组	6	0.89 ± 0.58 <sup>ab</sup>	11.43 ± 4.03 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 I、II 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 III 组比较。

2.3 各组大鼠脑皮质神经元 GRP78、Caspase-12、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达比较 与 I、II 组比较, III、IV 组大鼠 IRI 24 h 后神经元 GRP78 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), III 组 IRI 24 h 后神经元 Caspase-12 和 Bax 蛋白表达水平明显升高, 而 Bcl-2 表

达量明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与 III 组比较, IV 组 IRI 24 h 后神经元 Caspase-12 和 Bax 蛋白表达水平明显降低, GRP78 蛋白表达量进一步升高, Bcl-2 表达明显增加 ( $P < 0.05$ ); I、II 组与 IV 组 IRI 24 h 后神经元 Caspase-12、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2、图 3。

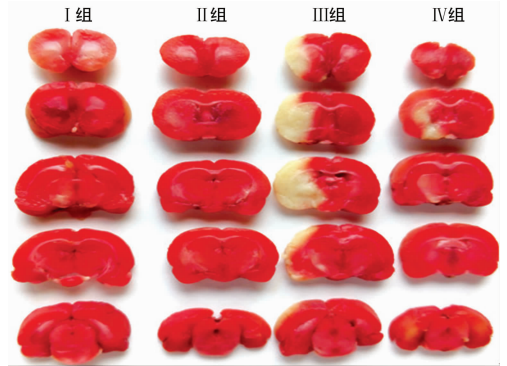


图 1 各组大鼠脑组织 TTC 染色结果

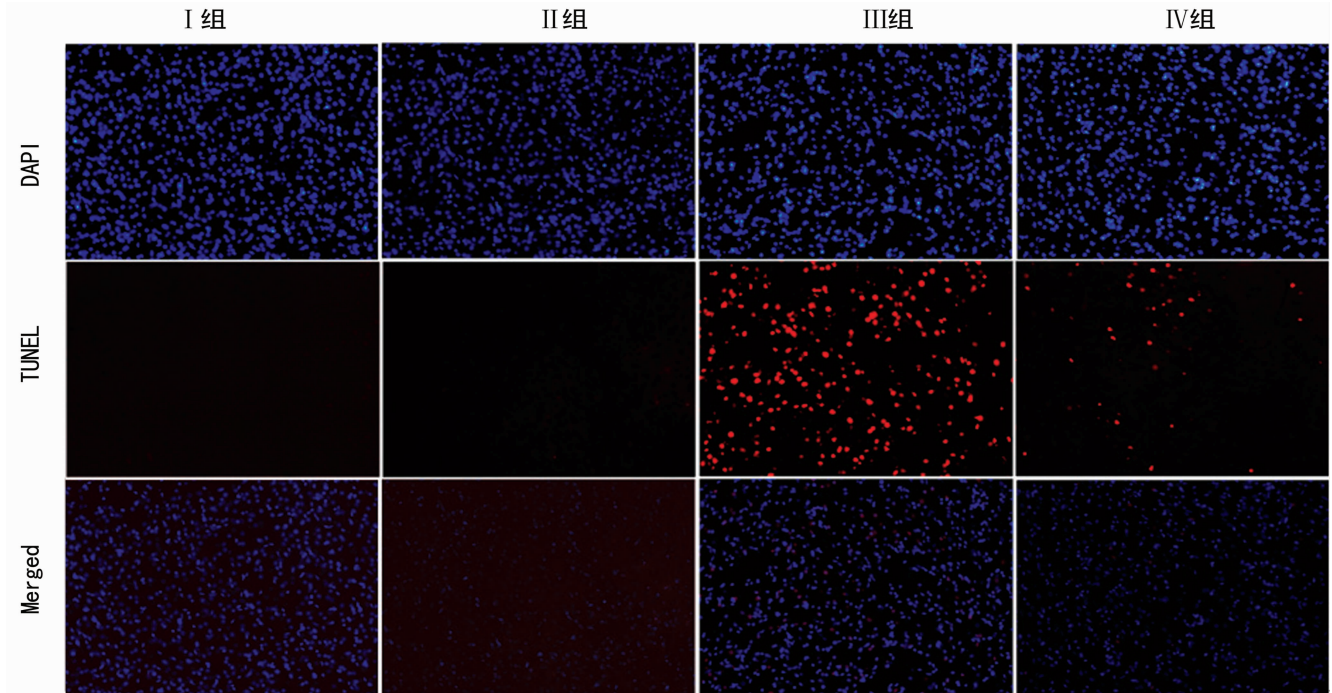


图 2 各组大鼠皮质区 TUNEL 原位神经细胞凋亡检测结果 ( $\times 200$ )

表 2 各组大鼠 AI 及脑皮质 GRP78、Caspase-12 等的蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	AI (%)	Bcl-2	Bax	Caspase-12	GRP78
I 组	0.59 ± 0.49	0.79 ± 0.20	0.38 ± 0.05	0.64 ± 0.17	0.30 ± 0.10
II 组	0.57 ± 0.45	0.79 ± 0.16	0.37 ± 0.04	0.67 ± 0.26	0.32 ± 0.10
III 组	41.28 ± 8.05 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.26 <sup>a</sup>
IV 组	16.92 ± 2.18 <sup>ab</sup>	0.69 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.74 ± 0.21 <sup>b</sup>	0.94 ± 0.28 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 I、II 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 III 组比较。

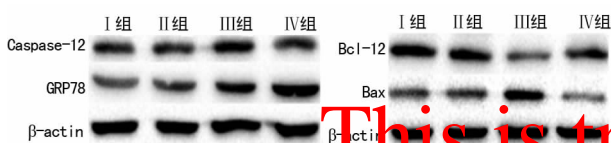


图 3 各组大鼠皮质区 GRP78、Caspase-12 等蛋白表达

2.4 各组大鼠免疫组化染色检测脑皮质 Bcl-2、Bax、Caspase-12 的表达比较 I、II 组未见 Bax、Caspase-12 阳性细胞, 而 Bcl-2 阳性细胞表达较多。与 I、II 组比较, III、IV 组脑 IRI 24 h 后 Bax、Caspase-12 表达明显增多, Bcl-2 表达明显减少 ( $P < 0.01$ ); 与 III 组比较, IV 组脑 IRI 24 h 后 Bcl-2 表达明显增多, 而 Bax、Caspase-12 表达明显减少 ( $P < 0.01$ ); 且 I、II 组神

经元 Bcl-2、Bax、Caspase-12 表达量比较,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),见表 3。

表 3 各组大鼠脑皮质 Bcl-2、Bax 等表达比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	Bcl-2	Bax	Caspase-12
I 组	164.00±8.53	0	0
II 组	160.67±10.97	0	0
III 组	61.67±6.06 <sup>a</sup>	72.50±7.01 <sup>a</sup>	55.00±4.05 <sup>a</sup>
IV 组	128.17±9.70 <sup>ab</sup>	39.67±3.20 <sup>ab</sup>	28.17±3.87 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P<0.05$ ,与 I、II 组比较; <sup>b</sup>:  $P<0.05$ ,与 III 组比较。

### 3 讨 论

本研究通过采用阻塞左侧大脑中动脉的方法制备大鼠局灶性脑 IRI 模型,并于再灌注同时给予吸入高浓度  $H_2$ ,通过观察大鼠神经行为学变化、脑组织形态学及神经细胞凋亡等指标观察  $H_2$  对脑 IRI 的保护作用。实验结果表明,  $H_2$  可明显降低大鼠脑 IRI 后 NDS 评分,降低 IRI 引起的大鼠脑梗死面积并抑制神经细胞凋亡,揭示了  $H_2$  对大鼠局灶性脑 IRI 具有明确的保护作用,本研究结果与既往研究基本一致<sup>[3-4]</sup>。目前  $H_2$  发挥神经保护作用的具体机制尚不清楚。有文献报道  $H_2$  能通过调节核因子  $\kappa B$ (NF- $\kappa B$ )抑制 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)的活化,进而有效减轻大鼠  $A\beta 1-42$  诱发的神经炎症及氧化应激,降低 8-羟基脱氧鸟嘌呤(8-OHdG)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的水平,同时改善海马 CA1 细胞凋亡<sup>[5]</sup>。此外, Hong 等<sup>[6]</sup>的实验表明富氢水可抑制大鼠蛛网膜下腔出血(SAH)引起的神经细胞凋亡并改善其神经症状,其机制可能与通过调节磷脂酰肌醇 3-激酶/丝/苏氨酸蛋白激酶/糖原合成激酶(PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ )信号通路发挥作用有关。鉴于以上  $H_2$  抗细胞凋亡的生物学作用及脑 IRI 后 ERS 是启动细胞凋亡的一种新途径,本研究拟进一步探讨  $H_2$  对脑 IRI 的保护作用是否与抑制 ERS 有关。

脑 IRI 发病因素包括缺血/再灌注过程中出现的 ATP 耗竭、活性氧自由基(ROS)增多及钙稳态的破坏等,这些因素均可导致内质网内的蛋白折叠功能受损,使未折叠和错误折叠蛋白质在内质网腔内聚集,进而引发 ERS。ERS 早期是细胞应答刺激的适应性反应,过强或持久的 ERS 可诱导细胞凋亡<sup>[7]</sup>。有研究表明,抑制过度的 ERS 能显著减少细胞凋亡进而抑制细胞 IRI<sup>[8-9]</sup>。GRP78 是 ERS 诱导表达的关键分子伴侣蛋白,作为 ERS 的标志性保护蛋白,其在蛋白质折叠、调节 ERS 跨膜信号蛋白的活性等方面发挥着重要作用从而改善内质网损伤<sup>[10]</sup>。有研究表明,在缺血低氧、ROS 增多、热休克反应等多种应激状态下,内质网可激活细胞内的未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),通过激活转录因子 6(ATF-6)作用于 GRP78 基因的启动子,上调 GRP78 转录活性,使其表达量增高,改善内质网功能恢复<sup>[11-12]</sup>。此外,有研究结果显示,白藜芦醇可通过增加 GRP78 表达,减少 p-PERK 和转录因子 C/EBP 同源蛋白(CHOP)表达,抑制 ERS 反应,从而改善脑 IRI 大鼠 NDS 评分,减少梗死体积,对脑 IRI 起保护作用<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,脑 IRI 后神经细胞 GRP78 表达升高,而吸入  $H_2$  后 GRP78 表达量进一步升高,提示了 ERS 参与了脑 IRI 过程,且  $H_2$  能通过上调 GRP78 蛋白表达进而改善内质网功能。既往研究表明,在脑 IRI 过程中,ERS 可激活 UPR,UPR 是由 GRP78 和双链 RNA 激活蛋白激酶内质网激酶(PERK)、激活转录因子 6(ATF-6)和肌醇需要因子 1(IRE-1)所介导,PERK、ATF6 和 IRE1 信号不仅能够启动

ERS 的生存途径,而且严重或持续的 ERS 损伤内质网功能的同时,可启动由 ERS 所介导的凋亡信号通路,通过激活下游的凋亡信号分子,如 CHOP、JNK、Caspase 及 Bcl-2 家族等诱导细胞凋亡<sup>[10-13]</sup>。Caspase-12 是 ERS 诱导凋亡途径所固有的,正常情况下其位于内质网膜上,处于无活性状态。当 ERS 时, Caspase-12 被激活,活化后的 Caspase-12 从内质网转移至细胞液,进一步激活 Caspase-9,最终激活凋亡执行效应分子 Caspase-3,导致细胞凋亡<sup>[14]</sup>。细胞凋亡过程是由多种调节基因共同参与完成,尤其与一些原癌基因如 Bcl-2 和 Bax 等密切相关。研究表明促凋亡因子 Bax 与 ERS 诱导的细胞凋亡有关<sup>[15]</sup>。因此,本研究采用 Caspase-12、Bcl-2 和 Bax 反应大鼠脑 IRI 后神经细胞凋亡情况。

实验结果表明, TUNEL 染色墨迹显示凋亡细胞与皮质区神经元基本重合,吸入高浓度  $H_2$  可以明显减少大鼠脑皮质区神经细胞凋亡,同时可降低神经细胞 Caspase-12 及 Bax 蛋白表达,升高 GRP78、Bcl-2 蛋白表达,从而抑制 ERS,对大鼠脑 IRI 起到明确保护作用。其机制可能是在 IRI 过程中神经细胞能量代谢障碍、大量 ROS 自由基产生增多及内质网内  $Ca^{2+}$  稳态紊乱等综合作用下,导致内质网腔内未折叠及错误折叠蛋白大量聚集,分子伴侣蛋白 GRP78 即与 3 种内质网感应蛋白 PERK、IRE1、ATF6 解离,而与未折叠及错误折叠蛋白结合以协助蛋白的正确折叠,进而减轻 ERS,恢复内质网的正常功能,从而减少神经细胞凋亡。因此,推测  $H_2$  可能通过激活 GRP78 蛋白及抑制 Caspase-12 蛋白的表达,促进细胞未折叠及错误折叠蛋白的正确组装,抑制了 ERS;同时通过上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达及下调促凋亡蛋白 Bax 的表达减少神经细胞凋亡等有关。但高浓度  $H_2$  抑制脑 IRI 后 ERS 的具体调控通路及作用机制尚有待进一步深入研究。

综上所述,再灌注同时吸入高浓度  $H_2$  对大鼠局灶性脑 IRI 可产生明确保护作用,其机制可能与  $H_2$  可增加脑 IRI 后内质网 GRP78 蛋白表达并抑制 Caspase-12 的激活促进内质网功能修复及抑制 ERS,同时通过上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达及下调促凋亡蛋白 Bax 的表达减少神经细胞凋亡等有关。

### 参考文献

- [1] 李秀坤,黄英华. 基于 PI3K/Akt 信号转导通路探讨电针足三里、曲池对脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 重庆医学, 2016, 45(3): 303-306.
- [2] Ishige K, Osada N, Kosuge Y, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in neurodegeneration after transient global ischemia-reperfusion [J]. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2013, 142(1): 9-12.
- [3] Tian R, Hou Z, Hao S, et al. Hydrogen-rich water attenuates brain damage and inflammation after traumatic brain injury in rats [J]. Brain Res, 2016(1637): 1-13.
- [4] Han L, Tian R, Yan H, et al. Hydrogen-rich water protects against ischemic brain injury in rats by regulating Calcium buffering proteins [J]. Brain Res, 2015(1615): 129-138.
- [5] Wang C, Li J, Liu Q, et al. Hydrogen-rich saline reduces oxidative stress and inflammation by inhibit of JNK and NF- $\kappa B$  activation in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease [J]. Neurol Sci, 2011, 491(2): 127-132.
- [6] Hong X, Shao A, Wang J, et al. Neuroprotective effect of hydrogen-rich saline against neurologic (下转第 1167 页)

应的供血类型及反映组织内自由水水平的 ADC 值对肌瘤消融率影响权重较大,而反映肌瘤内部成分分布、排列的 T<sub>2</sub>WI 信号均匀度等对肌瘤消融率的影响权重较小。

综上所述,HIFU 治疗 UF 的消融率与代表 UF 特性的 MRI 参数如血供类型、T<sub>2</sub>WI SIR、T<sub>2</sub>WI SI、T<sub>2</sub>WI 信号均匀度和 ADC 值等有关,因此 HIFU 消融治疗前可通过分析靶肌瘤的 MRI 影像参数来初步预测该肌瘤的消融效果,辅助临床为患者制订个性化的治疗方案。

#### 参考文献

- [1] 曹泽,郎景和,王临虹,等.中华妇产科学[M].3版,北京:人民卫生出版社,2014:2224-2234
- [2] 陈文直,唐良菖,杨武威,等.超声消融治疗子宫肌瘤的安全性及有效性[J].中华妇产科杂志,2010,45(12):909-912.
- [3] 彭松,张炼,王智彪,等.高强度聚焦超声治疗子宫肌瘤的现状分析[J].中华医学教育探索杂志,2011,10(9):1148-1149.
- [4] Fennessy FM, Tempany CM, McDannold NJ, et al. Uterine leiomyomas: MR imaging-guided focused ultrasound surgery-results of different treatment protocols[J]. Radiology, 2007, 243(3):885-893.
- [5] 王婷,陈文直,陈锦云,等.聚焦超声消融不同 MRI 图像表现的子宫肌瘤的疗效[J].重庆医科大学学报,2011,36(5):539-541.
- [6] 祝宝让,杨武威,李静,等.高强度聚焦超声消融子宫肌瘤疗效相关因素分析[J/CD].中华临床医师杂志(电子版),2012,6(2):374-377.
- [7] 张嵘,梁碧玲,付加平,等.子宫肌瘤的 MRI 表现与临床病理相关性研究[J].中华放射学杂志,2003,37(10):954-959.
- [8] 杨新月,沈钧康,陆之安,等.子宫平滑肌瘤的磁共振研究[J].放射学实践,2003,18(4):246-248.
- [9] 陈加优,廖江,郑祥,等.富细胞性子宫平滑肌瘤 MRI 表现与病理对照分析[J].实用放射学杂志,2013,29(11):1803-1806.
- [10] 李亚军,白人驹,孙浩然,等. MRI 对子宫肌瘤病理类型的诊断价值[J].天津医药,2006,34(1):22-25.
- [11] DeSouza NM, Williams AD. Uterine arterial embolization for leiomyomas: perfusion and volume changes at MR imaging and relation to clinical outcome [J]. Radiology, 2002, 222(2):367-374.
- [12] Burn PR, McCall JM, Chinn RJ, et al. Uterine fibroleiomyoma: MR imaging appearances before and after embolization of uterine arteries [J]. Radiology, 2000, 214(3):729-734.
- [13] 张伟国,罗香国,严景恩,等.子宫肌瘤的 MR 成像研究——以 DSA 为参照[J].临床放射学杂志,2005,24(3):242-245.
- [14] Zhao WP, Chen JY, Zhang L, et al. Feasibility of ultrasound-guided high intensity focused ultrasound ablating uterine fibroids with hyperintense on T2-weighted MR imaging [J]. Eur J Radiol, 2013, 82(1):43-49.
- [15] 陈锦云,陈文直,朱丽,等.子宫肌瘤的血液供应特征对超声消融治疗剂量的影响[J].中华妇产科杂志,2011,46(6):403-406.
- [16] 牟玮,巫北海.肝肿瘤经皮局部高温固化治疗进展[J].国外医学临床放射学分册,2001,24(4):200-203.

(收稿日期:2016-08-13 修回日期:2016-11-11)

(上接第 1162 页)

- damage and apoptosis in early brain injury following subarachnoid hemorrhage: possible role of the Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway [J]. PLoS One, 2014, 9(4):e96212.
- [7] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(3):184-190.
  - [8] Grall S, Prunier-Mirebeau D, Tamareille S, et al. Endoplasmic reticulum stress pathway involvement in local and remote myocardial ischemic conditioning [J]. Shock, 2013, 39(5):433-439.
  - [9] Nakka VP, Gusain A, Raghubir R. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. Neurotox Res, 2010, 17(2):189-202.
  - [10] Zhu G, Lee AS. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis [J]. J Cell Physiol, 2015, 230(7):1413-1420.
  - [11] Neve EP, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450 proteins: retention and distribution from the endoplasmic reticulum [J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2010, 13(1):78-85.
  - [12] De La Cadena SG, Hernández-Fonseca K, Camacho-Arroyo I, et al. Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation [J]. Apoptosis, 2014, 19(3):414-427.
  - [13] 高轩,陈荔枝,刘振红,等.白藜芦醇通过抑制内质网应激减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤 [J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(1):92-96.
  - [14] 朱海英,孙红玉,冯光坤,等.姜黄素抑制大鼠脑缺血再灌注损伤内质网应激的研究 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(4):416-420.
  - [15] Yoshida H. ER stress and diseases [J]. FEBS J, 2007, 274(3):630-658.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-11-16)