

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.01.003
文章编号: 1005-8982 (2018) 01-0011-05

硫化氢对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护效果研究*

陈昆, 邱华峰, 从静, 张卉
(黄淮学院护理学系, 河南 驻马店 463000)

摘要: 目的 探讨硫化氢 (H_2S) 干预处理对大脑中动脉栓塞局灶性脑缺血性再灌注损伤 (CIRI) 模型大鼠脑及神经功能的保护作用及其机制。**方法** 选取 48 只成年雄性 SD 大鼠, 采用随机数字表法分为假手术组、模型组和实验组, 每组 16 只 (复制模型过程中如死亡则补足), 假手术组和实验组采用线栓法结扎大鼠左侧大脑中动脉复制模型, 实验组于栓线后 10 min 腹腔注射 $25 \mu\text{mol/kg}$ 硫化氢钠 NaHS 生理盐水, 假手术组和模型组仅给予等体积生理盐水。**结果** 实验组大鼠的死亡率为 23.81%, 低于模型组的 44.83%, 两组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 3 组大鼠的脑梗死体积百分比比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组和实验组大鼠的脑梗死体积百分比高于假手术组; 实验组的脑梗死体积百分比低于模型组; 3 组大鼠的海马 CA1 区的 PI3K、p-Akt、Caspase 蛋白水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 模型组大鼠海马 CA1 区的 p-Akt、Caspase 蛋白高于假手术组, 实验组大鼠海马 CA1 区的 Caspase 蛋白低于模型组, 实验组大鼠海马 CA1 区的 PI3K、p-Akt 蛋白高于假手术组和模型组。**结论** H_2S 干预处理对大脑中动脉栓塞局灶性脑缺血再灌注损伤模型大鼠有脑脊神经缺损功能保护作用, 其作用机制可能与激活 PI3K、p-Akt 通路, 抑制凋亡相关蛋白 Caspase 有关。

关键词: 硫化氢; 栓塞; 局灶性脑缺血; 再灌注损伤; 神经功能

中图分类号: R-332; R743.3

文献标识码: A

Experimental study on protective effect of H_2S on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats*

Kun Chen, Hua-feng Qiu, Jing Cong, Hui Zhang
(Nursing Department of Huanghuai College, Zhumadian, Henan 463000, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of hydrogen sulfide (H_2S) on the brain and nerve function in rats after focal cerebral ischemia-reperfusion injury and its mechanism. **Methods** Forty-eight adult male SD rats were randomly divided into sham group, model group and experimental group with 16 in each group (the number was complemented in case of death during modeling process). In the model group and the experimental group, suture method was used to ligate the left middle cerebral artery of the rats for modeling; 10 min after suture, the experimental group had intraperitoneal injection of $25 \mu\text{mol/kg}$ NaHS saline solution, but the sham group and the model group only received equal volume of saline. **Results** The mortality rate of 23.81% in the experimental group was significantly lower than 44.83% in model group ($P < 0.05$). The percentage of cerebral infarct volume in the model group and the experimental group was significantly higher than that in the sham group ($P < 0.05$); the infarct volume percentage of the experimental group was significantly lower than that of the model group ($P < 0.05$). p-Akt and caspase in the hippocampal CA1 region of the model group were significantly higher than those of the sham group ($P < 0.05$). Caspase protein in the hippocampal CA1 region of the rats in the experimental group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). PI3K and p-Akt in the hippocampal CA1 region

收稿日期: 2016-12-16

* 基金项目: 黄淮学院青年骨干教师资助计划 (No: 院字 [2013]101 号); 2014 年河南省教育厅项目 (No: 14B180006)

[通信作者] 从静, E-mail: 1132548483@qq.com

of the rats in the experimental group were significantly higher than those in the sham group and the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** H₂S intervention has protective effect on brain spinal nerve function in the treatment of focal cerebral ischemia-reperfusion injury rat model due to cerebral artery occlusion, its mechanism may be related to the activation of PI3K/p-Akt pathway and inhibition of apoptosis-related protein caspase.

Keywords: hydrogen sulfide; embolism; focal cerebral ischemia; reperfusion injury; neurological function

脑缺血性疾病的发病率逐年攀升,造成脑血管堵塞或脑血供不足^[1],诱发脑缺血性再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)。CIRI能够直接造成脑神经元细胞坏死或凋亡,形成一系列的严重继发病,具有较高的病死率和致残率^[2]。因此,通过研究 CIRI 的产生机制,寻找到一种优秀神经保护剂,从而有效预防其发生及恶化。

硫化氢 H₂S 作为医学界中常见的气体信号分子,具有优秀的抗氧化、缓解机体损伤和消除大脑毒性的作用^[3]。H₂S 能够保护脑缺血性损伤,其机制可能与血管平滑肌及促血管细胞炎症因子相关^[4],但具体过程仍需进一步研究。笔者选择局灶性 CIRI 模型大鼠作为研究对象,旨在探讨 H₂S 对模型大鼠脑及神经功能的保护作用,并较深入分析其作用机制,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

选取 48 只成年雄性 SD 大鼠 (SPF 级), 体重 220 ~ 250 g, 平均 (240 ± 15) g, 购自安徽医科大学动物实验研究中心, 动物合格证号: 皖医实动准字第 01 号。动物喂养条件: 自由进食进水、光照 12 h、室温 23 ~ 25℃、相对湿度 40% ~ 60%, 实验前禁食 8 ~ 12 h^[5]。

1.2 实验药品与仪器

兔抗鼠 Caspase-3、PI3K、p-Akt 多克隆抗体购自上海索莱宝生物科技有限公司, 抗热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 多克隆抗体购自武汉云克隆科技股份有限公司, 抗 β-actin 单克隆抗体购自北京康为世纪生物科技有限公司, 硫氢化钠 NaHS 水合物购自上海容创生物技术有限公司, CM1800Leica 冷冻切片机和 RM2135Leica 石蜡切片机构购自德国 Leica 公司。

1.3 模型的复制

大鼠腹腔注射 350 mg/kg 10% 水合氯醛全身麻醉后, 平放于手术台上, 取颈正中切口, 逐渐分离双侧

颈总动脉, 结扎左侧颈外动脉主干, 再结扎颈总动脉近心端, 微动脉夹夹闭颈内动脉。近颈外动脉起始处剪开颈总动脉, 于颈内动脉端插入尼龙线栓头, 后缓慢上推撤出微动脉夹, 逐层缝合。将处于麻醉状态大鼠固定放入鼠笼, 至其自然苏醒后提起颈部双侧总动脉, 用无创动脉夹夹闭形成全脑缺血。待大鼠无翻正反射, 呼吸频率加快、毛竖立、眼发白和瞳孔放大, 则代表模型复制成功。在模型复制过程中需仔细操作, 避免造成模型鼠的死亡。

1.4 实验方法

将 57 只大鼠随机分为 3 组: ①假手术组, 全部大鼠行假手术, 将其双侧颈总动脉及翼小孔分别暴露, 无缺血处理; ②模型组, 大鼠腹腔注射 350 mg/kg 10% 水合氯醛全身麻醉后, 手术分离其双侧颈总动脉, 结扎左侧颈外动脉主干, 再结扎颈总动脉近心端, 微动脉夹夹闭颈内动脉。近颈外动脉起始处剪开颈总动脉, 于颈内动脉端插入尼龙线栓头, 缓慢上推撤出微动脉夹, 逐层缝合。将处于麻醉状态大鼠固定放入鼠笼, 自然苏醒后提起颈部双侧总动脉后用无创动脉夹夹闭形成全脑缺血; ③实验组: 大鼠模型复制方式与模型组一致, 模型复制成功后腹腔注射 NaHS 水合物 48 μmol/kg, 双侧颈总动脉闭塞 30 min。假手术组和模型组仅给予等体积生理盐水。模型复制过程中, 每组 16 只成功, 3 只死亡。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 死亡率 采用 Longa 5 分制对大鼠的神经缺陷程度进行评价, 0 分表示无神经功能缺陷; 1 分表示轻度局灶性神经功能缺陷, 不能完全伸展对侧前肢; 2 分为中度局灶性神经功能缺陷, 大鼠存在向对侧转圈的情况; 3 分表示重度局灶性神经功能缺陷, 大鼠向对侧倾倒; 4 分表示大鼠不能独立行走、意识减低。比较 3 组大鼠脑梗死体积的差异和脑梗死体积百分率。

1.5.2 大脑海马 CA1 区相关蛋白 比较 3 组大鼠 PI3K、p-Akt、Caspase 的表达差异。

1.6 脑梗死体积测量

3 组大鼠腹腔注射 0.50 ml/100 mg 10% 水合氯醛

全身麻醉, 离断鼠头开颅取脑, 将脑置入冰水冲洗干净, -20°C 下静置 20 min 后取出, 从前往后取冠状切片, 厚 2.0 mm, 切 5 片。置于 1% TTC 磷酸缓冲液内, 37°C 避光孵育 30 min, 脑正常组织染成红色, 梗死组织则为白色。对脑切片拍照后, 将图片数据传输至计算机, 使用 Image-pro plus 软件进行图像分析, 计算脑梗死容积, 脑梗死容积 = 脑切片坏死区面积 \times 切片厚度, 将全部大鼠脑切片梗死容积相加得到全脑总梗死容积, 梗死体积百分比 = 梗死体积 / 鼠大脑体积 $\times 100\%$ 。

1.7 免疫组织化学法

SABC 免疫组织化学法染色测定 3 组大鼠大脑海马 CA1 区的 PI3K、p-Akt、Caspase 的表达, 取测定梗死面积的切片 37°C 下复温 1 h, 切片置于 PBS 液, 洗 3 次, 5 min/次。于 3% 过氧化氢与甲醇体积比 1 : 10 混合液内, 37°C 水浴 40 min。置于 PBS 液, 洗 3 次, 5 min/次。切片于高压煮沸的柠檬酸缓冲液瓷缸内煮 5 min, 取出瓷缸自然冷却至室温。取冷却后的切片置于 PBS 液, 洗 3 次, 5 min/次。取出切片脱水、指甲油包裹、10% 山羊血清封闭, 室温下静置 2 h, 滴入一抗(PI3K、p-Akt、Caspase 抗体和 PBS 按 1 : 100 稀释), 室温孵育 1 h, 4°C 冰箱过夜孵育。取出切片室温复温 1 h, 置于 PBS 液, 洗 3 次, 5 min/次, 清除切片水分。DAB 显色, 各蛋白呈现红褐色阳性染色结果, 用水冲洗 30 min。切片梯度酒精脱水、中性树胶封片后, 通风处晾干, 显微镜下观察并拍照。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件数据进行分析, 所有计量资料满足正态分布、方差齐性, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 3 组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠的死亡率及神经功能缺陷评分比较

模型组共用 29 只大鼠、死亡 13 只, 实验组共用大鼠 19 只、死亡 3 只, 假手术组无大鼠死亡, 实验组大鼠的死亡率为 23.81%, 低于模型组的 44.83%, 两组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.356$, $P=0.037$)。假手术组、模型组及实验组大鼠神经功能缺陷评分分别为 (0.00 ± 0.00)、(3.31 ± 0.57) 和 (2.26 ± 0.66) 分, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=49.084$, $P=0.000$); 进一步两两比较, 模型组和实验组大鼠神

经功能缺陷评分较假手术组高 ($P < 0.05$), 实验组大鼠神经功能缺陷评分较模型组高 ($P < 0.05$)。

2.2 3 组大鼠的脑梗死体积百分比比较

假手术组、模型组及实验组大鼠的脑梗死体积百分比分别为 (0.00 ± 0.00)%、(36.35 ± 3.89)% 和 (21.74 ± 3.72)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=28.627$, $P=0.000$); 进一步两两比较, 模型组和实验组大鼠的脑梗死体积百分比高于假手术组 ($P < 0.05$), 实验组大鼠的脑梗死体积百分比低于模型组 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 3 组大鼠海马 CA1 区的 PI3K、p-Akt、Caspase 蛋白表达比较

3 组大鼠海马 CA1 区的 PI3K、p-Akt、Caspase 蛋白表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较, 模型组大鼠海马 CA1 区的 p-Akt、Caspase 蛋白高于假手术组 ($P < 0.05$), 实验组大鼠海马 CA1 区的 Caspase 蛋白低于模型组 ($P < 0.05$), 实验组大鼠海马 CA1 区的 PI3K、p-Akt 蛋白高于假手术组和模型组 ($P < 0.05$)。见附表和图 2。



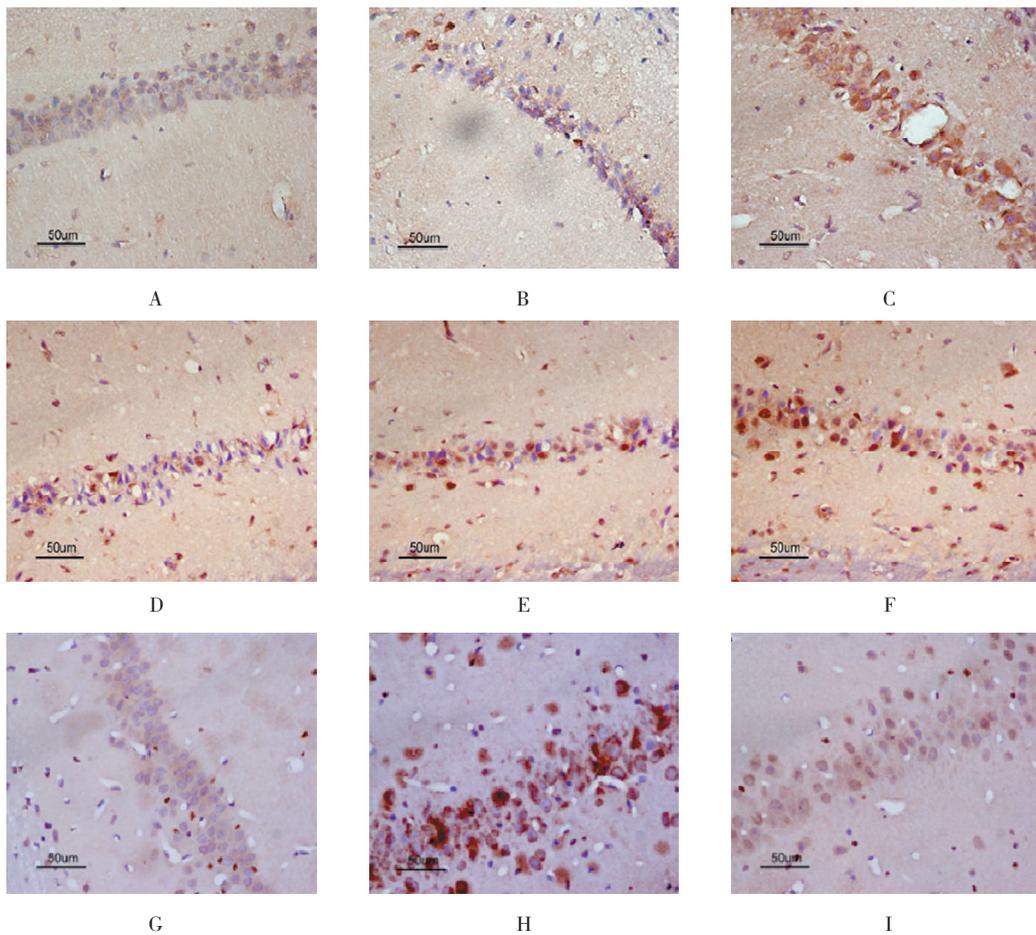
A: 假手术组; B: 模型组; C: 实验组

图 1 3 组大鼠的脑梗死组织

附表 大鼠海马 CA1 区的 PI3K、p-Akt、Caspase 蛋白表达比较 ($n=16$, $\bar{x} \pm s$)

组别	PI3K	p-Akt	Caspase
假手术组	0.167 ± 0.032	0.204 ± 0.051	0.249 ± 0.094
模型组	0.163 ± 0.029	$0.245 \pm 0.049^{(1)}$	$0.571 \pm 0.126^{(1)}$
实验组	$0.286 \pm 0.041^{(1)(2)}$	$0.357 \pm 0.056^{(1)(2)}$	$0.336 \pm 0.111^{(1)(2)}$
F 值	22.761	19.864	31.863
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与假手术组比较; $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$



A: 假手术组 PI3K 蛋白; B: 模型组 PI3K 蛋白; C: 实验组 PI3K 蛋白; D: 假手术组 p-Akt 蛋白; E: 模型组 p-Akt 蛋白; F: 实验组 p-Akt 蛋白; G: 假手术组 Caspase 蛋白; H: 模型组 Caspase 蛋白; I: 实验组 Caspase 蛋白

图 2 3 组大鼠海马 CA1 区的 PI3K、p-Akt、Caspase 蛋白表达 (免疫组织化学法 × 400)

3 讨论

CIRI 可致脑组织损伤, 并累及脑中枢神经, 形成继发性神经细胞坏死或凋亡, 造成患者死亡或残疾^[6]。这是因为常规状态下, 人体内活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 生成和代谢清除保持动态平衡状态^[7]。当人体处于 CIRI 病理状态时, 其抗氧化功能出现障碍, 造成 ROS 无法被清除而蓄积, 从而攻击脑组织等机体组织, 即形成氧化应激反应, 其能直接促使脑组织或神经组织细胞坏死^[8], 并可经线粒体通路、DNA 修复酶及转录因子, 诱发连锁式的成批细胞凋亡, 故笔者认为通过探讨 CIRI 的最佳防治手段具有十分重要的医学研究价值。

CIRI 的产生机制较复杂, 其中脑缺血可引发自由基过表达, 从而严重氧化损害脑组织细胞, 属于诱发 CIRI 主要因素之一^[9]。而脑缺血诱发脑组织损伤, 造成炎症因子表达上升, 产生大量毒性物质, 侵蚀神经

组织, 造成神经细胞坏死及星形细胞水肿, 也可形成 CIRI^[10]。因此, 笔者认为预防 CIRI 产生及恶化的首要手段应是选择合适外源性保护因子, 降低脑缺血患者机体内氧自由基或炎症因子表达水平。在本实验中, 笔者选择 H₂S 作为抵抗 CIRI 的气体保护分子, 这是因为其能够调控海马磷酸化环腺苷酸反应元件结合蛋白和海马神经元源性神经营养因子 mRNA 表达上调^[11], 从而使得生物体脑缺血程度得到缓解, 间接减轻 CIRI 对脑组织的损伤程度。有研究显示, H₂S 能够增强 CIRI 模型大鼠脑组织内超氧化物酶活性, 并降低脂质过氧化产物的产生^[12], 有效降低自由基表达, 保证细胞膜免受氧化反应侵害。本实验选择线栓法复制 CIRI 大鼠模型, 并使用 H₂S 对实验组大鼠进行干预, 结果显示该组死亡率低于模型组, 这表明 H₂S 还可有效降低 CIRI 大鼠死亡率, 笔者推断 H₂S 可能通过抑制氧自由基表达, 缓解 CIRI 大鼠脑组织损伤, 从而降低

大鼠死亡率。

既往文献显示^[13], CIRI 可致大鼠大脑皮质缺血, 从而造成其侧前肢出现明显的运动功能障碍, 而缺血性低灌注脑梗死体积越大, CIRI 大鼠的运动功能障碍越严重。在本实验中, 笔者测得模型组和实验组大鼠的脑梗死体积百分比高于假手术组, 而实验组的脑梗死体积百分比低于模型组; 这表明 H₂S 能够缩小 CIRI 大鼠脑梗死体积, 缓解缺血性脑神经损伤, 从而侧面证明 H₂S 可能对预防 CIRI 所引起肢体功能障碍或甚至残疾具有积极意义。

在本实验中, 笔者对 CIRI 诱发脑组织细胞及神经组织细胞凋亡机制进行评估。细胞凋亡受到多种凋亡因子调控, 而这些因子也是在和相关信号通路结合后被激活, 造成中性粒细胞聚集、大量氧自由基合成及增加线粒体钙超载度等诱细胞凋亡因素。通过分析, 笔者选择 PI3K-Akt 信号通路作为实验中评估指标之一, 这是因为该信号通路参与调控细胞增殖、分化及凋亡, 并由多靶点组成, 并和磷酸化 Akt 基因相互作用, 对转录因子表达和促凋亡蛋白活性水平产生影响, 间接影响脑组织及神经细胞等多种细胞活性、发育、分化、增殖和凋亡。文献显示^[14], PI3K/P-Akt 越高, 细胞存活率越高, 细胞凋亡则反之, 而在脑缺血早期给患者提供外源性 PI3K 及 p-Akt, 能够减轻缺血性脑组织损伤, 同时促使 p-Akt 蛋白表达下调。在本实验中, 实验组 PI3K 和 p-Akt 蛋白高于假手术组和模型组, 这表明 H₂S 可使实验组大鼠机体 PI3K 和 p-Akt 蛋白表达增高, 从而缓解脑组织及神经组织细胞凋亡, 减轻 CIRI。

有研究表明^[15], Caspase-3 能够影响脑缺血后神经元损伤, 并可直接促使神经元凋亡; 而高活性 Caspase-3 能够造成多种蛋白质底物失活, 造成其促修复、复制和转录 DNA 和 mRNA 的功能障碍; 同时磷酸化 Akt 能降低 Caspase-3 活性。本实验结果显示, CIRI 确实可致大鼠 Caspase-3 蛋白表达上升, 而 H₂S 预处理能够使得 CIRI 大鼠 Caspase-3 蛋白降低, 从而对 CIRI 大鼠脑损伤进行缓解和保护。

笔者在既往研究基础上, 证明通过 H₂S 干预可使 CIRI 对大鼠脑组织损伤程度降低, 可降低局灶性缺血性再灌注所诱发的死亡率及神经功能障碍程度, 而 H₂S 这种干预机制可能通过直接影响各类诱发脑组织及神经组织细胞凋亡的基因蛋白表达水平实现, 但更详细的作用过程仍需进一步研究完善。

综上所述, H₂S 干预处理能够保护大脑中动脉栓塞局灶性脑缺血再灌注损伤模型大鼠的脑组织, 其作用机制可能和激活 PI3K、p-Akt 通路抑制凋亡相关蛋白 Caspase 有关, 该研究结果可能为临床治疗 CIRI 患者提供新方向。

参 考 文 献:

- [1] 胡仲昊, 程小华. 缺血性脑血管病患者并发动脉硬化性狭窄部位及危险因素分析 [J]. 现代仪器与医疗, 2015, 4(5): 43-44.
- [2] 孙立新, 李国风, 骆海坤, 等. 硫化氢对大鼠局灶性脑缺血损伤的影响 [J]. 河北医药, 2015, 37(18): 2725-2728.
- [3] LI H B, DAI X J, JI S H, et al. Hydrogen sulphide and mild hypothermia activate the CREB signaling pathway and prevent ischemia-reperfusion injury[J]. BMC Anesthesiology, 2015, 1(15): 119-119.
- [4] 骆海坤, 张建新, 李国风. 局灶性脑缺血大鼠脑组织硫化氢水平的动态变化 [J]. 河北医药, 2015, 3(6): 833-835.
- [5] 李新娟, 魏林郁, 李超堃, 等. 硫化氢对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的保护作用及其机制 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(9): 1271-1275.
- [6] 张萌, 李国风, 骆海坤, 等. 外源性硫化氢对大鼠局灶性脑缺血时线粒体功能的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2014, 34(10): 1259-1262.
- [7] SONG X R, WEN D S, QI Y, et al. H₂S attenuates cognitive deficits through Akt1/JNK3 signaling pathway in ischemic stroke[J]. Behavioural Brain research, 2014, 2(269): 6-14.
- [8] 冯磊, 胡丽娟, 王海云, 等. 外源性硫化氢对大鼠局灶性脑缺血再灌注时神经元凋亡的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2016, 36(1): 116-119.
- [9] CHEN Y Y, HU R L, LI H, et al. Sirtuin 6 is essential for sodium sulfide-mediated cytoprotective effect in ischemia/reperfusion-stimulated brain endothelial cells[J]. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 2015, 24(3): 601-609.
- [10] 李国风, 张建新, 骆海坤, 等. 氨基氧酸对大鼠局灶性脑缺血损伤的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2011, 31(8): 984-986.
- [11] DING Q, YU Z H, LU L, et al. ROS-dependent neuroprotective effects of NaHS in ischemia brain injury involves the PARP/AIF pathway[J]. Cellular physiology and biochemistry, 2015, 36(4): 1539-1551.
- [12] 张国珍, 郑维红, 梁戎. 川芎嗪对急性脑梗死模型大鼠硫化氢、血浆胆红素和氧化低密度脂蛋白水平变化及意义 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 2(3): 28-31.
- [13] 焦传安, 宋标, 陈志武. 外源性血管内皮衍生超极化因子对脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(6): 648-653.
- [14] 王梅. 硫化氢在大鼠脑血管 EDHF 反应中的作用及其抗脑缺血再灌注损伤作用 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2014.
- [15] 骆海坤. 硫化氢对大鼠局灶性脑缺血脑组织线粒体损伤的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.

(张蕾 编辑)