

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.21.001

文章编号: 1005-8982(2017)21-0001-06

基础研究·论著

细胞外信号蛋白调节激酶 5 在异氟醚后处理减轻大鼠海马脑片缺氧无糖损伤中的作用*

崔迪¹, 王胜¹, 葛明月¹, 王芹¹, 殷姜文¹, 代志刚¹, 司军强²

(1. 石河子大学医学院第一附属医院 麻醉科, 新疆 石河子 832008;

2. 石河子大学医学院 生理教研室, 新疆 石河子 832000)

摘要:目的 探讨异氟醚后处理大鼠海马脑片缺氧无糖(OGD)损伤神经保护机制中细胞外信号蛋白调节激酶 5(ERK5)的作用。**方法** 使用雄性 SD 大鼠,将其麻醉后取出海马组织,制成离体脑片,然后随机进行正常对照组(Con 组)、损伤组(OGD 组)和药物处理组的处理。采用花粉活力染色(TTC)法评价各组脑片损伤程度,采用碘化丙啶(PI)染色法检测海马 CA1 区神经细胞凋亡程度,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)测定细胞外信号蛋白调节激酶信使核糖核酸(ERK5 mRNA)的表达,采用 Western blot 法检测 ERK5 蛋白的表达与磷酸化水平。**结果** 与 Con 组比较,OGD 组脑片损伤程度升高、海马 CA1 区凋亡细胞增多,海马组织内 ERK5 mRNA 和 p-ERK5 表达升高($P < 0.05$);XMD 组阻断 ERK5 mRNA 和 p-ERK5 表达,脑片损伤程度升高、海马 CA1 区凋亡细胞增多($P < 0.05$)。与 OGD、1.5% ISPOC 和 4.5% ISPOC 组比较,3.0% ISPOC 组脑片损伤程度减轻、海马 CA1 区凋亡细胞减少,海马组织内 ERK5 mRNA 和 p-ERK5 表达升高($P < 0.05$)。与 3.0% ISPOC 组比较,XMD 阻断 ISPOC 海马组织内 ERK5 mRNA 和 p-ERK5 表达,脑片损伤程度升高、海马 CA1 区凋亡细胞增多($P < 0.05$)。**结论** 一定浓度的异氟醚后处理大鼠海马脑片对抗 OGD 损伤的保护性机制可能与上调 ERK5 mRNA 和 ERK5 磷酸化水平有关。

关键词: 麻醉药;异氟醚后处理;细胞外信号调节 MAP 激酶类;脑缺血;海马

中图分类号: R332

文献标识码: A

Involvement of ERK5 in Isoflurane posttreatment-mediated protective effect on hippocampal oxygen-glucose deprivation injury in rats*

Di Cui¹, Sheng Wang¹, Ming-yue Ge¹, Qin Wang¹, Jiang-wen Yin¹,
Zhi-gang Dai¹, Jun-qiang Si²

(1. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832008, China; 2. Department of Physiology, Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: Objective To investigate the role of extracellular signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) on Isoflurane posttreatment-mediated decrease of hippocampal injury in rat models of oxygen-glucose deprivation (OGD). **Methods** Male SD rats were randomly divided into four groups: the normal control (Con) group, the OGD group, the XMD group, and the ISPOC group. Rats were anesthetized followed by harvest of the hippocampus for further preparation of tissue slices. Histological analysis of hippocampus was achieved by 2% 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. Neuronal apoptosis in hippocampus CA1 region was

收稿日期:2017-02-04

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81360203)

[通信作者] 王胜, E-mail: iamsheng2006@163.com; Tel: 18935701573

analyzed by propidium iodide (PI) fluorescence staining. The expression level of ERK5 mRNA was determined by real-time fluorescent PCR. The ERK5 protein expression and phosphorylation were detected by Western blot. **Results** Compared with the Con group, the degree of hippocampal injury, apoptosis rate in hippocampal CA1 region and the expression levels of ERK5 mRNA and p-ERK5 in the OGD group were increased significantly ($P < 0.05$). In the XMD group, the expression levels of ERK5 mRNA and p-ERK5 were decreased, and the degree of tissue injury and the apoptosis rate in hippocampal CA1 region increased ($P < 0.05$). Compared with the group 3.0% ISPOC, XMD8-92 independently diminished the expression of ERK5 mRNA and phosphorylation of ERK5 in the hippocampus, and enhanced tissue injury as well as apoptosis rate in the XMD+ISPOC group ($P < 0.05$). **Conclusions** The protective effect of Isoflurane posttreatment on hippocampal OGD injury in rats may be related to the upregulation of ERK5 mRNA and phosphorylation of ERK5.

Keywords: anesthetics; Isoflurane posttreatment; extracellular signal-regulated MAP kinases; brain ischemia; hippocampus

近年来急性缺血性脑损伤已成为全世界致残致死的主要原因之一,在临床诊疗过程中也存在中枢神经系统低灌注状态的高风险^[1-2],因此其在围术期中的管理一直受到麻醉医生的重视^[3]。麻醉药物具有神经保护作用,并且其后处理减少缺血性损伤更具有临床意义^[4]。由于异氟醚是一种具有适用范围广泛、刺激性小及苏醒快特点的常用麻醉药物,因此一直以来都是学者们在保护神经领域的重点研究对象,但是作用机制尚未完全明确^[5]。许多研究表明,影响缺血损伤后脑神经细胞的存活因素包括一系列信号通路,其中,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)家族就是具有代表性的一个信号蛋白超家族,而最新发现该家族成员细胞外信号蛋白调节激酶 5 (extracellular signal-regulated protein kinase 5,ERK5)有较大 C 末端结构,而且具有抑制和核穿梭功能,可干扰 MAPK 家族其他成员的功能,因此更适用于特定靶点的药物开发^[6-7]。目前,关于 ERK5 在异氟醚神经保护中的作用尚未见报道,因此,本研究拟利用经典的大鼠海马脑片缺氧无糖损伤(oxygen-glucose deprivation,OGD)模型,探讨 ERK5 在异氟醚神经保护中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雄性 SD 大鼠体重 50 ~ 100 g (新疆石河子大学生理教研室动物实验中心),异氟醚(批号:64140902,山东省临沂鲁南制药集团),ERK5 抑制剂 XMD8-92 (美国 Selleck Chemicals 公司),二甲基亚砜(DMSO) (批号:302A0324,美国 Sigma Aldrich 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠海马脑片的复制 使用 10%水合氯醛

(0.4 g/100 g)经腹腔注射将大鼠麻醉,达到一定麻醉深度后,迅速斩首将其安乐死,取脑组织,置于 0 ~ 4℃预充 95%氧气 O₂ ~ 5%二氧化碳 CO₂ 混合气的含糖人工脑脊液(ACSF,mmol/L:NaCl 124,KCl 3.3,NaHCO₃ 25.7;NaH₂PO₄ 1.24,MgSO₄ 2.4,CaCl₂ 2.4,Glu 10,pH 7.35 ~ 7.45)中,在冰台上快速剥离出完整的海马组织。使用 NVSL 振动切片机(美国 Campden Instruments 公司)在距海马长轴两端 10 mm 处矢状面切片,厚度为 400 μm,然后将海马脑片移至设定温度为 34℃装有含糖 ACSF 的灌流槽中,并向其内浸润式通入 95%O₂ ~ 5%CO₂ 混合气体孵育 90 min,以修复制备过程中的损伤。随后可将部分脑片移入 37℃含糖 ACSF 的灌流槽中,并向其内浸润式通入 95%O₂ ~ 5%CO₂ 混合气体孵育 30 min,作为正常对照组。

1.2.2 实验分组 将脑片随机进行不同的分组处理,包括:正常对照组(Con 组)、缺氧无糖损伤组(OGD 组)、异氟醚后处理组(ISPOC 组)、二甲基亚砜组(DMSO 组)、ERK5 抑制剂 XMD8-92(XMD 组)、ERK5 抑制剂 +3.0%异氟醚后处理组(XMD+ISPOC 组)。其中,异氟醚后处理组分为 3 个浓度亚组(1.5% ISPOC 组、3.0% ISPOC 组和 4.5% ISPOC 组)。

1.2.3 缺氧无糖损伤模型的复制 海马脑片在 90 min 修复后,改用 37℃的无糖人工脑脊液(glu-free ACSF, mmol/L:NaCl 124,KCl 3.3,NaHCO₃ 25.7,NaH₂PO₄ 1.24,MgSO₄ 2.4,CaCl₂ 2.4,蔗糖 10,pH 7.35 ~ 7.45)并通入 95%氮气 N₂ ~ 5%CO₂ 混合气体孵育 14 min,然后再使用 37℃含糖的 ACSF 并通入 95%O₂ ~ 5%CO₂ 混合气体孵育 30 min,即复糖复氧。

1.2.4 脑片的异氟醚后处理 在对脑片进行异氟醚后处理前,预先准备好等量的含有异氟醚的无氧无

糖的 ACSF 和含有异氟醚的有氧含糖 ACSF, 配制方法如下: 将预先加湿加热的 95%N₂ ~ 5%CO₂ 混合气连接异氟醚挥发罐(德国 Drager 公司)的进气端, 出气端通入无糖 ACSF 中平衡 20 min, 并将异氟醚挥发罐连接麻醉气体监测仪(德国 Drager 公司)测定通入 ACSF 中的异氟醚浓度, 参照本课题组前期科研成果^[8], 选取 1.5%、3.0% 和 4.5% 3 个异氟醚浓度梯度; 再采用同样的方法配制含有相应浓度异氟醚的有氧含糖 ACSF。然后用 95%N₂ ~ 5%CO₂ 平衡后的含异氟醚的无糖 ACSF, 于 OGD 结束前 5 min 灌注脑片。在 OGD 结束时, 改用 95%O₂ ~ 5%CO₂ 平衡后的含异氟醚的含糖 ACSF 继续灌注 5 min, 然后复氧复糖 25 min, 整个过程中异氟醚后处理 10 min, 复氧复糖 30 min。

1.2.5 脑片的抑制剂处理 将脑片用 ERK5 抑制剂 XMD8-92(10 μmol/L)在 OGD 前另外预孵育 10 min, 然后 OGD 处理 14 min, 复氧灌注 30 min; XMD8-92 是通过特异性抑制 BMK1/ERK5 信号通路, 从而化学阻断 ERK5 活化组。(XMD+ISPOC) 组将使用抑制剂 XMD8-92 与异氟醚后处理联合同时进行。DMSO 组将脑片在 34℃ 的 ACSF 中孵育 80 min 时, 将 XMD8-92 的溶剂 DMSO 加入到 ACSF 中孵育 10 min, 然后复氧复糖 30 min。

1.2.6 脑片损伤程度的测定 脑片复氧灌注后, 避光下进行操作, 用 2%2,3,5- 氯化三苯四唑(TTC) (批号: 204H032, 北京索莱宝科技公司)在 35℃ 下染色 30 min。随后用生理盐水冲洗, 脑片表面水分用滤纸吸收, 对脑片称重, 以 1 g : 20 ml 的量, 避光在 4℃ 下对脑片中红色物质甲瓩用 1 : 1 的乙醇和 DMSO 复合物抽提 24 h, 次日将抽提液加至 96 孔板(每孔 100 μl), 酶标仪测得在 490 nm 波长处各孔的吸光度(OD490 值)。各组脑片的 TTC 染色下降百分率即为组织损伤百分率, 按如下方法计算: (1-OD490 实验组 / OD490 对照组) × 100%, 将计算组织损伤百分率进行统计学分析(OD490 值越小, 说明 TTC 染色下降的越大, 脑片损伤越严重)。

1.2.7 凋亡细胞数的测定 复氧灌注后, 每组随机取 8 ~ 10 张脑片, 避光下进行操作, 用碘化丙啶(PI) (批号: MKBP1360V, 美国 Sigma Aldrich 公司)加入 ACSF 中(2 μl/ml), 37℃ 下, 避光灌注细胞核染色 60 min, 并通入 95%O₂ ~ 5%CO₂ 混合气体。然后用磷酸盐缓冲液冲洗, 浸入 4%多聚甲醛中固定 10 min, 甘油封片。用激光共聚焦显微镜(激发光波 530 nm, 发射光

波 620 nm, LSM510, 德国 Zeiss 公司)观察各组 CA1 区 PI 染色凋亡细胞核呈红色荧光的强度变化, 使用 Aim-Image Examiner 软件(德国 Zeiss 公司)测定荧光强度, 进行统计学分析(即 PI 荧光强度越大, 代表凋亡细胞越多)。

1.2.8 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time fluorescent polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 ERK5 mRNA 的表达 取冷冻保存于 -80℃ 冰箱中的各组脑片(70 ± 10)mg, 在冰盒上用液氮研磨方式打破细胞, 使用 Brizol(杭州博日科技有限公司)从脑组织匀浆中提取总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)。利用互补 DNA (complementary DNA, cDNA)第一链合成试剂盒(杭州博日科技有限公司)进行总 RNA 逆转录, 逆转录仪(美国 Bio-Rad 公司)设定逆转录条件为: 室温预变性 10 min, 45℃ 变性 45 min, 95℃ 退火 5 min, 冰浴 5 min。本实验中使用的特异性序列引物由上海生工生物工程股份有限公司设计并合成。ERK5, 正向引物: 5'-CTT CCAACCTCCTGCTGAAC-3'; 反向引物: 5'-GTCCAG CCAGAGGGTCAGTA-3'。MACTB, 正向引物: 5'-TT CCTTCTTGGGTATGGAAT-3'; 反向引物: 5'-GAGCA ATGATCTTGATCTTC-3'。逆转录后获取 cDNA, SYBR Green I real time PCR 试剂盒(杭州博日科技有限公司)配置反应液。ABI 7500 (美国 Applied Biosystems 公司)进行荧光定量 PCR 过程, 按如下条件进行: 94℃ 热启动 2 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 然后 40 个循环。通过每个循环增加的相对荧光测定扩增量, 获得每个实验组的循环阈值(Ct 值), 按照 $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{\beta-actin}$, $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{实验组} - \Delta Ct_{对照组}$, 将计算出来的 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 值进行统计学分析。

1.2.9 免疫印迹法 (Western blot) 测定 ERK5 和磷酸化 ERK5 的表达水平 在冰盒上, 取各组大鼠海马脑片, 使用含有 PMSF 和磷酸酶抑制剂的放射免疫沉淀 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司)将剪碎的组织裂解, 超声波充分裂解 2 s, 然后离心 15 min(4℃, 12 000 r/min), 取上清液。抽取各组等量总蛋白 50 μg 分别加入到 10%SDS- 聚乙烯酰胺凝胶的孔中进行电泳分离, 并用预染蛋白质 Marker(北京 Solarbio 公司)作为分子量标记。电泳结束后, 将目的蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜(美国 Roche 公司), 使用 5% 脱脂奶粉或牛血清蛋白 (BSA) 室温封闭 2 h 后, 4℃ 下孵育特异性一抗过夜,

ERK5 一抗(1:1 000,美国 Abcam 公司),p-ERK5 一抗(1:1 000,美国 Cell Signaling 公司)和 β -actin(1:1 000,北京中山金桥生物技术公司)。二抗孵育浓度为 1:20 000,室温孵育 2 h。暗室曝光:膜上均匀涂抹发光试剂,显影,定影,曝光胶片。采用凝胶成像系统拍照,Image J 软件(Gel-pro analyzer,美国 Media Cybernetics 公司)测定条带灰度值,将目的蛋白的灰度值与 β -actin 的灰度值的比值进行统计学分析。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠海马脑片的损伤程度

与 Con 组比较,OGD 组、XMD 组和(XMD+ISPOC)组吸光度(optical density, OD)值降低、脑片损伤程度升高($P < 0.05$),DMSO 组 OD 值、损伤程度差异无统计学意义($P > 0.05$);与 OGD 组比较,3.0% ISPOC 组 OD 值升高、损伤程度降低($P < 0.05$);而与 3.0% ISPOC 组比较,1.5% ISPOC 组、4.5% ISPOC 组、XMD 组及(XMD+ISPOC)组 OD 值降低、损伤程度升高($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠海马脑片 CA1 区神经细胞的凋亡程度

PI 染色后各组脑片显示,与 Con 组比较,OGD 组、XMD 组及(XMD+ISPOC)海马 CA1 区凋亡的细胞增多($P < 0.05$),DMSO 组细胞凋亡程度差异无统计学意义($P > 0.05$);与 OGD 组比较,1.5% ISPOC 组、3.0% ISPOC 组及 4.5% ISPOC 组海马 CA1 区凋亡的细胞减少($P < 0.05$);而与 3.0% ISPOC 组比较,1.5% ISPOC 组和 4.5% ISPOC 组海马 CA1 区凋亡的细胞增多,XMD 组和(XMD+ISPOC)组海马 CA1 区凋亡的细胞增多($P < 0.05$)。以上各组海马脑片 CA1 区神经细胞凋亡程度比较的检测结果与各组脑片损伤程度比较的检测结果基本相一致。见表 2。

2.3 各组大鼠海马脑片 ERK5 mRNA 的表达

ERK5 mRNA 在各组脑片中的表达水平为:Con 组(1.00 ± 0.00)、OGD 组(2.63 ± 0.25)、1.5%ISPOC 组(2.25 ± 0.06)、3.0% ISPOC 组(5.53 ± 0.22)、4.5% ISPOC 组(1.24 ± 0.25)、DMSO 组(1.18 ± 0.11)、XMD

表 1 各组大鼠海马脑片 OD490 值和损伤百分率的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	OD490 值	组织损伤百分率 /%
Con 组	0.59 ± 0.04	0.00
OGD 组	0.28 ± 0.03	$53.22 \pm 1.79^{1)}$
ISPOC 组		
1.5% ISPOC 组	0.32 ± 0.05	$44.85 \pm 5.57^{1)2)3)}$
3.0% ISPOC 组	0.45 ± 0.04	$23.93 \pm 2.46^{1)2)}$
4.5% ISPOC 组	0.31 ± 0.04	$47.81 \pm 3.85^{1)3)}$
DMSO 组	0.56 ± 0.04	$4.55 \pm 2.1^{2)3)}$
XMD 组	0.18 ± 0.03	$70.03 \pm 3.52^{1)2)3)}$
XMD+ISPOC 组	0.21 ± 0.03	$63.68 \pm 2.8^{1)2)3)}$
F 值	-	344.000
P 值	-	0.000

注:1)与 Con 组比较, $P < 0.05$;2)与 OGD 组比较, $P < 0.05$;3)与 3.0%ISPOC 组比较, $P < 0.05$

表 2 各组大鼠海马脑片 CA1 区神经细胞凋亡程度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡程度
Con 组	15.18 ± 6.53
OGD 组	$99.1 \pm 17.77^{1)}$
ISPOC 组	
1.5% ISPOC 组	$37.11 \pm 6.01^{1)2)3)}$
3.0% ISPOC 组	$23.87 \pm 8.97^{2)}$
4.5% ISPOC 组	$45.12 \pm 8.42^{1)2)3)}$
DMSO 组	$22.99 \pm 6.05^{2)3)}$
XMD 组	$102.84 \pm 9.95^{1)3)}$
XMD+ISPOC 组	$108.07 \pm 6.76^{1)3)}$
F 值	173.11
P 值	0.000

注:1)与 Con 组比较, $P < 0.05$;2)与 OGD 组比较, $P < 0.05$;3)与 3.0% ISPOC 组比较, $P < 0.05$

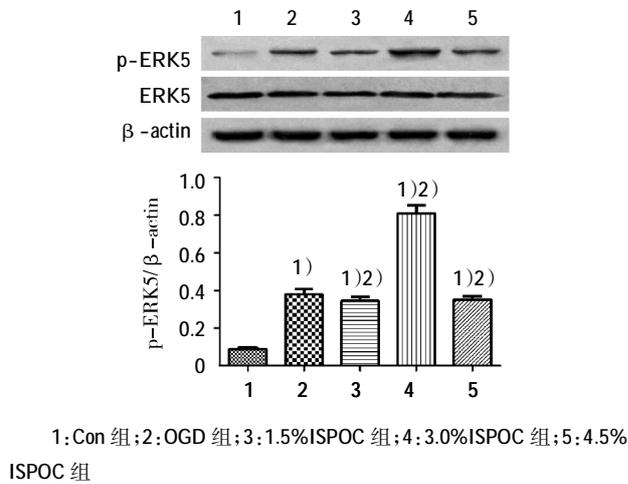
组(0.16 ± 0.04)及(XMD+ISPOC)组(0.27 ± 0.02),以上各组表达差异有统计学意义($F = 379.05, P = 0.000$)。与 Con 组比较,OGD 组、1.5% ISPOC 组及 3.0% ISPOC 组 ERK5 mRNA 表达上调($P < 0.05$),XMD 组和(XMD+ISPOC)组 ERK5 mRNA 表达下调($P < 0.05$),DMSO 组 ERK5 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$);与 OGD 组比较,3.0% ISPOC 组 ERK5 mRNA 表达上调($P < 0.05$),4.5% ISPOC 组、XMD 组和(XMD+ISPOC)组 ERK5 mRNA 表达下调($P < 0.05$);与 3.0% ISPOC 组比较,1.5% ISPOC 组、4.5% ISPOC 组、XMD 组及(XMD+ISPOC)组 ERK5 mRNA 表达

下调($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠海马脑片 ERK5 信号蛋白的表达

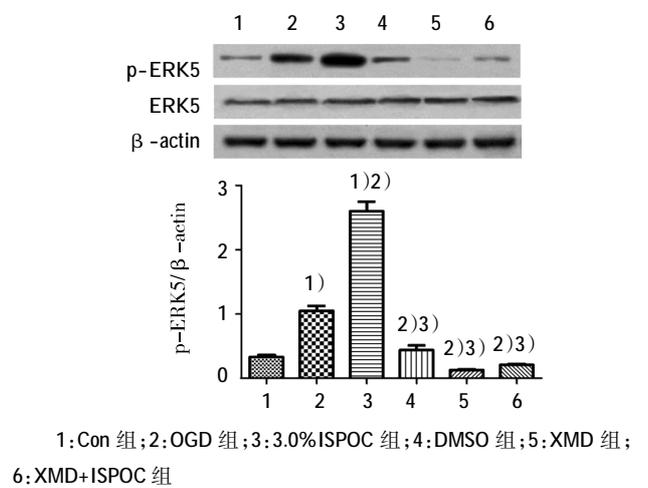
Con 组、OGD 组、1.5% ISPOC 组、3.0% ISPOC 组及 4.5% ISPOC 组海马脑片 p-ERK5 蛋白的表达差异有统计学意义($F = 94.07, P = 0.000$)。与 Con 组比较,OGD 组、1.5% ISPOC 组、3.0% ISPOC 组及 4.5% ISPOC 组 ERK5 磷酸化蛋白水平升高 ($P < 0.05$);与 OGD 组比较,3.0% ISPOC 组 ERK5 磷酸化蛋白水平升高($P < 0.05$);与 3.0% ISPOC 组比较,1.5% ISPOC 组和 4.5% ISPOC 组 ERK5 磷酸化蛋白水平降低($P <$

0.05)(见附图 A)。Con 组、OGD 组、3.0% ISPOC 组、DMSO 组、XMD 组及(XMD+ISPOC)组海马脑片 p-ERK5 蛋白的表达差异有统计学意义($F = 174.08, P = 0.000$)。与 Con 组比较,DMSO 组 ERK5 磷酸化蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),单纯使用 ERK5 抑制剂 XMD8-92 后,ERK5 磷酸化蛋白表达水平降低,XMD8-92 与 3.0%异氟醚联合处理后,ERK5 磷酸化蛋白表达水平也降低($P < 0.05$)(见附图 B)。以上各组中磷酸化的 ERK5 表达结果与 ERK5 mRNA 的表达结果相一致。



A 不同浓度异氟醚后处理对 p-ERK5 表达的影响

1)与 Con 组比较, $P < 0.05$; 2)与 OGD 组比较, $P < 0.05$; 3)与 3.0% ISPOC 组比较, $P < 0.05$



B XMD8-92 对 ISPOC 海马脑片的影响

附图 各组大鼠海马脑片 p-ERK5 蛋白的表达

3 讨论

研究表明,异氟醚诱导 Ras-Raf-MEK-ERK 通路磷酸化激活,减少神经元坏死,从而提供神经保护作用^[9]。MAPK 信号通路中上调磷酸化的 ERK1/2 和抑制磷酸化的 JNK、p38 能够对抗缺血诱导的细胞凋亡,起到神经保护作用^[10-11]。而 ERK5 是 MAPK 家族的新成员,在海马 CA1 区,缺血预处理通过增加活化的 p-Bad 和 14-3-3 蛋白结合,使 ERK5 上调逆转活化的 c-JNK 下调,以及 c-fos 上调^[2]。活化的 ERK5 能促进神经营养因子(BDNF)表达,从而修复缺血区域损伤的组织^[13]。异氟醚能够上调神经保护蛋白 Bcl-2 和脑源性神经营养因子(BDNF),从而增强神经元存活^[9]。有研究表明,ERK5 可通过与 KLF4 通路级联诱导略高水平的 H₂O₂ 活性氧预处理和神经生长因子(NGF),来减少原代海马神经元死亡^[14]。

本研究结果显示,与 Con 组比较,OGD 组海马脑

片损伤程度升高、海马脑片 CA1 区凋亡细胞明显增多,提示大鼠海马脑片缺氧无糖损伤模型复制成功。与 OGD 组比较,1.5% ISPOC 组和 3.0% ISPOC 组损伤程度降低,海马 CA1 区神经细胞凋亡减少,说明 1.5%和 3.0%浓度的异氟醚后处理对大鼠海马脑片 OGD 损伤起到保护作用;且 3.0% ISPOC 组 ERK5 mRNA 和 p-ERK5 的表达升高,而 XMD8-92 阻断 3.0% ISPOC 组海马组织内 ERK5 mRNA 和 p-ERK5 表达后,脑片损伤程度升高、海马 CA1 区凋亡细胞增多,说明异氟醚后处理对大鼠海马脑片 OGD 损伤的保护作用可能与 ERK5 mRNA 和 p-ERK5 的表达上调有关;4.5%浓度的异氟醚后处理并未起到保护作用,且 ERK5 mRNA 降低。与 3.0% ISPOC 组比较,1.5% ISPOC 组和 4.5% ISPOC 组损伤程度高,海马 CA1 区神经细胞凋亡多,ERK5 mRNA 和 p-ERK5 的表达低,说明一定浓度的异氟醚后处理可通过上调 ERK5 mRNA 和 p-ERK5 来减轻大鼠海马脑片 OGD

损伤,但其浓度范围的掌握还应由更多实验证实和精准化。在本研究中观察 3.0% ISPOC 组神经保护作用最强,所以选择 3.0%浓度异氟醚来进一步完成 ERK5 抑制剂联合异氟醚后处理组,即 XMD+ISPOC 组。使用 DMSO 作为 ERK5 抑制剂 XMD8-92 的溶剂,与 Con 组比较,DMSO 组损伤程度和凋亡程度无差异,可排除对实验结果的影响;XMD 组脑片损伤程度升高、海马 CA1 区神经细胞凋亡增多,ERK5 mRNA 表达低,可见 XMD8-92 为强效的选择性的 BMK1/ERK5 抑制剂阻断 ERK5 信号通路后,脑片表现出易受损的状态。然而 OGD 处理后,大鼠海马区 ERK5 mRNA 和 p-ERK5 表达升高,可能与刺激机体自身保护反应有关,且有研究证实海马区的 ERK5 在大鼠缺血后迅速被激活^[5]。

综上所述,一定浓度的异氟醚后处理大鼠海马脑片对抗 OGD 损伤的保护性机制可能与上调 ERK5 mRNA 和 ERK5 磷酸化水平有关。在围术期管理中,异氟醚介导的 ERK5 信号蛋白作为一种可能干预和防治缺血性脑损伤的目标靶点,随着研究和认识的不断深入,期望探索出它与其他通路在信号交互对话关系中扮演的角色,以及明确其在脑保护过程中的独特作用。

参 考 文 献:

- [1] STOCCHETTI N, TACCONE F S, CITERIO G, et al. Neuroprotection in acute brain injury: an up-to-date review[J]. *Critical Care*, 2015, 199(1): 186.
- [2] DAHMANI S, ROUELLE D, GRESSENS P, et al. Characterization of the preconditioning effect of dexmedetomidine in mouse organotypic hippocampal slice cultures exposed to oxygen and glucose deprivation[J]. *Anesthesiology*, 2010, 112(2): 373-383.
- [3] KIRKMAN M A, LAMB DEN S, SMITH M. Challenges in the anesthetic and intensive care management of acute ischemic stroke[J]. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*, 2016, 28(3): 214-232.
- [4] KIM E J, KIM S Y, LEE J H, et al. Effect of isoflurane post-treatment on tPA-exaggerated brain injury in a rat ischemic stroke model[J]. *Korean Journal of Anesthesiology*, 2015, 68(3): 281-286.
- [5] MCMURTREY R J, ZUO Z Y. Isoflurane preconditioning and preconditioning in rat hippocampal neurons[J]. *Brain Research*, 2010, 1358(c): 184-190.
- [6] WOO C H, LE N T, SHISHIDO T, et al. Novel role of C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) ubiquitin ligase on inhibiting cardiac apoptosis and dysfunction via regulating ERK5-mediated degradation of inducible cAMP early repressor[J]. *FASEB Journal*, 2010, 24(12): 4917-4928.
- [7] DREW B A, BUROW M E, BECKMAN B S. MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 2012, 1825(1): 37-48.
- [8] WANG S, YIN J W, GE M Y, et al. Transforming growth-beta 1 contributes to isoflurane preconditioning against cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway[J]. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 2016, 78(2): 280-290.
- [9] WU L Z, ZHAO H L, WANG T L, et al. Cellular signaling pathways and molecular mechanisms involving inhalational anesthetics-induced organoprotection[J]. *Journal of Anesthesia*, 2014, 28(5): 740-758.
- [10] ZHU H L, ZHANG Y S, SHI Z S, et al. The neuroprotection of liraglutide against Ischaemia-induced apoptosis through the activation of the PI3K/AKT and MAPK pathways[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26859.
- [11] LIAO Z X, CAO D X, HAN X, et al. Both JNK and P38 MAPK pathways participate in the protection by dexmedetomidine against isoflurane-induced neuroapoptosis in the hippocampus of neonatal rats[J]. *Brain Research Bulletin*, 2014, 107: 69-78.
- [12] LI J, ZHANG M, ZHU Y. Ischemic preconditioning mediates NMDA receptors through down regulation of c-Jun activation and up-regulation of c-fos in hippocampus CA1[J]. *IEEE Workshop on Electronics, Computer and Applications*, 2014: 972-975.
- [13] YU S J, GRIDER J R, GULICK M A, et al. Up-regulation of brain-derived neurotrophic factor is regulated by extracellular signal-regulated protein kinase 5 and by nerve growth factor retrograde signaling in colonic afferent neurons in colitis[J]. *Experimental Neurology*, 2012, 238(2): 209-217.
- [14] SU C, SUN F, CUNNINGHAM R L, et al. ERK5/KLF4 signaling as a common mediator of the neuroprotective effects of both nerve growth factor and hydrogen peroxide preconditioning[J]. *Age*, 2014, 36(4): 9685.
- [15] 王瑞敏,张光毅,胡刚,等. 脑缺血及缺血再灌注诱导大鼠海马脑区 ERK5 的激活及其分子机制的研究[J]. *徐州医学院学报*, 2003, 23(4): 283-287.