

· 实验研究 ·

盐酸戊乙奎醚预处理对小鼠反复缺血-再灌注脑损伤时细胞外信号调节激酶 1/2 的影响

杨良民 谢小娟 马立刚 张永杰

【摘要】 目的 探讨盐酸戊乙奎醚预处理对小鼠反复缺血-再灌注 (ischemia reperfusion, IR) 脑损伤时细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 的影响。方法 SPF 级成年 C57BL/6J 小鼠 96 只, 6~8 周龄, 体重 16~25 g, 按照随机数字表法分为三组: 盐酸戊乙奎醚组 (PHC 组)、IR 组和假手术组 (Sham 组), 每组 32 只。Sham 组腹腔注射等容量生理盐水, 30 min 后分离双侧颈总动脉但不夹闭; IR 组腹腔注射等容量生理盐水, 30 min 后分离并夹闭双侧颈总动脉, 建立反复 IR 脑损伤模型; PHC 组腹腔注射盐酸戊乙奎醚 1.0 mg/kg, 30 min 后采用双侧颈总动脉夹闭术建立反复 IR 脑损伤模型。采用 Morris 水迷宫实验评估术前及术后学习记忆能力, 随后处死小鼠, 留取海马组织并测定其湿/干重比 (W/D)。采用伊文斯蓝 (EB) 法检测血脑屏障的通透性。采用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 测定海马组织 ERK1/2 mRNA 表达量, Western blot 法测定海马组织磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 蛋白含量。结果 与 Sham 组比较, 术后 3、7 d IR 组逃避潜伏期和游泳距离明显延长 ($P < 0.05$)。与 IR 组比较, 术后 3、7 d PHC 组逃避潜伏期和游泳距离明显缩短 ($P < 0.05$)。与 Sham 组比较, IR 组海马组织 W/D 和脑组织 EB 含量明显升高 ($P < 0.05$)。与 IR 组比较, PHC 组海马组织 W/D 和脑组织 EB 含量明显降低 ($P < 0.05$)。与 Sham 组比较, IR 组海马组织 ERK1/2 mRNA 表达量和 p-ERK1/2 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$)。与 IR 组比较, PHC 组海马组织 ERK1/2 mRNA 表达量和 p-ERK1/2 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$)。结论 盐酸戊乙奎醚预处理可通过抑制海马组织 ERK 1/2 激活而减轻小鼠反复缺血-再灌注脑损伤并改善其学习记忆能力。

【关键词】 盐酸戊乙奎醚; 细胞外信号调节激酶 1/2; 脑损伤; 缺血-再灌注; 学习记忆

Effect of penheclidine hydrochloride preconditioning on extracellular signal-regulated kinase 1/2 during repeated cerebral ischemia-reperfusion injury in mice YANG Liangmin, XIE Xiaojuan, MA Ligang, ZHANG Yongjie. *Clinical Medicine College of Henan University of Science and Technology & Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China*

Corresponding author: XIE Xiaojuan, Email: lhq_19770812@sina.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of penheclidine hydrochloride preconditioning on extracellular signal-regulated kinase 1/2 during repeated cerebral ischemia-reperfusion (IR) injury in mice. **Methods** Ninety-six C57BL/6J mice, graded into specific pathogen free (SPF), aged 6 - 8 weeks, weighing 16 - 25 g, were randomly allocated into three groups as follows: penheclidine hydrochloride group (group PHC), group IR and sham operation group (group Sham), 32 mice in each group. Mice were intraperitoneally injected with normal saline, and the bilateral common carotid arteries were separated but not clamped after 30 min in group Sham. Mice were intraperitoneally injected with normal saline, and after 30 min, the bilateral common carotid arteries were isolated and clamped to establish a model of repeated IR brain injury in group IR. Mice were injected intraperitoneally with penheclidine hydrochloride at a dose of 1.0 mg/kg, and after 30 min bilateral common carotid arteries were clipped for establishing the model of repeated IR cerebral injury in group PHC. Learning and memory function of mice were tested by Morris water maze test before and after surgery. After Morris water maze test, mice were euthanized, and hippocampus was excised. The ratio of wet weight to dry weight (W/D) of hippocampus was tested. The permeability of blood-brain barrier was determined by Evans blue (EB) method. The expression levels of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) mRNAs in hippocampus were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression levels of phosphorylated (p-ERK1/2) proteins in hippocampus were detected by Western blot. **Results** Compared with group Sham, the escape latency and swim-

DOI:10.12089/jca.2019.06.015

作者单位: 471003 洛阳市, 河南科技大学临床医学院 河南科技大学第一附属医院麻醉科
通信作者: 谢小娟, Email: lhq_19770812@sina.com

ming distance of mice were prolonged 3 and 7 d after surgery in group IR ($P < 0.05$). Compared with group IR, the escape latency and swimming distance of mice were shortened 3 and 7 d after surgery in group PHC ($P < 0.05$). Compared with group Sham, hippocampal W/D and the content of EB of brain tissue were higher in group IR ($P < 0.05$). Compared with group IR, hippocampal W/D and the content of EB of brain tissue were lower in group PHC ($P < 0.05$). Compared with group Sham, the expression levels of ERK1/2 mRNA and protein in hippocampus were higher in group IR ($P < 0.05$). Compared with group IR, the expression levels of ERK1/2 mRNA and protein in hippocampus were lower in group PHC ($P < 0.05$). **Conclusion** Penethylidene hydrochloride can alleviate cerebral injury and improve learning and memory function of mice with repeated cerebral IR injury via inhibiting the activation of ERK1/2 in hippocampus.

【Key words】 Penethylidene hydrochloride; Extracellular signal-regulated kinase 1/2; Cerebral injury; Ischemia-reperfusion; Learning and memory

脑缺血性疾病在临床麻醉中较为多见,如心肺转流、心脏骤停及复苏和术中血流动力学紊乱等,严重者可致患者预后不良。脑缺血-再灌注(ischemia reperfusion, IR)可促使脑局部及全身发生炎症反应及氧化应激,从而导致脑损伤^[1]。研究表明,再灌注脑损伤的发生与细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)激活有着密切关系,且干预 ERK1/2 的激活可减轻脑 IR 损伤^[2-3]。生理情况下,ERK 位于胞浆内,脑 IR 时,ERK 被激活并迅速穿过核膜,再激活转录因子或/和 P70 核蛋白体 S6 激酶。磷酸化的 ERK1/2 具有活性,可调节某些转录因子的活性,引起特定蛋白的表达或活性改变,调节神经细胞代谢和功能改变,最终导致脑组织损伤。盐酸戊乙奎醚是一种新型的长效抗胆碱药,已有研究证实其可抑制神经元凋亡和氧化应激性损伤而减轻大鼠局灶性脑 IR 损伤^[4]。但盐酸戊乙奎醚对 IR 脑损伤时海马组织中 ERK1/2 激活是否有抑制作用尚无结论。本实验拟评价盐酸戊乙奎醚预先给药对小鼠反复 IR 脑损伤时 ERK1/2 的影响。

材料与方 法

实验仪器与试剂 AL204 电子称,电热恒温鼓风干燥箱, Morris 水迷宫测试系统, 721 紫外可见分光光度计,电转仪和电泳仪,聚合酶链式反应(PCR)仪。盐酸戊乙奎醚(批号:15051332),伊文斯蓝(EB),ERK、ERK 引物,逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒,磷酸化 ERK(p-ERK)及 GAPDH 一抗,二抗工作液,其余均为市售分析纯。

实验动物与分组 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 96 只,6~8 周龄,体重 16~25 g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,按照随机数字表法将小鼠分为三组:盐酸戊乙奎醚组(PHC 组)、IR 组和假手术组(Sham 组),每组 32 只。Sham 组腹腔注射等容量生理盐水,30 min 后分离双侧颈总动脉但不夹闭;IR

组腹腔注射等容量生理盐水,30 min 后分离并夹闭双侧颈总动脉,建立反复 IR 脑损伤模型;PHC 组腹腔注射盐酸戊乙奎醚 1.0 mg/kg,30 min 后采用双侧颈总动脉夹闭术建立反复 IR 脑损伤模型。

小鼠脑 IR 损伤模型 参照文献[5]报道的方法复制动物模型。腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉,仰卧固定。颈部正中切开,分离出双侧颈总动脉并夹闭 20 min,10 min 后恢复血流,如此重复 3 次。术后将小鼠置于 18~22 °C 下饲养,接受适当的治疗以促进康复,12 h 白天/12 h 夜间的光照周期,SPF 级动物实验室,环境安静。小鼠自由活动和进食进水。

Morris 水迷宫实验 每天相同的时间内进行 Morris 水迷宫实验。记录逃避潜伏期(≤ 60 s,从小鼠入水即刻至寻找到圆形平台的时间)和游泳距离(mm,小鼠从入水到找到圆形平台时游过的距离)。正式实验开始前每天训练小鼠自由游泳。术前 1 d 正式进行测试;术后 3、7 d 分别再次进行测试。Morris 水迷宫实验结束后,使小鼠安乐死,分离海马组织,留取脑组织,置于液氮中保存,用于后续实验。

小鼠海马组织湿/干重比(W/D)的测定 每组随机选取 8 只小鼠。取小鼠海马组织,放到锡纸上,一并称取湿重,做好标记后放到 80 °C 烘箱中烘干,重量不变后一起称干重。最后湿重和干重均减去锡纸的重量即为海马湿重(W)和干重(D),计算二者之比即为 W/D。

小鼠血脑屏障通透性检测 每组随机选取 8 只小鼠。处死前 1 h 经尾静脉注入 2% EB 溶液 4 ml/kg。腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 进行麻醉,打开胸腔。心内灌注肝素生理盐水(生理盐水+肝素钠 20 U/ml)200~300 ml,断头取脑作矢状切取脑组织,剪碎置于二甲基甲酰胺(1 ml/100 mg 脑组织),60 °C 下孵育 24 h。4 °C 下 3 000 r/min 离心 20 min(离心半径 10 cm),取上清液。采用 721 紫外可

见分光光度计检测波长为 632 nm 的吸光度。采用 Oringen 7.0 软件进行数据分析,根据绘制的 EB 标准曲线计算 EB 含量。

小鼠海马组织 ERK1 和 ERK2 mRNA 表达量的检测 每组随机选取 8 只小鼠。Trizol 法提取总 RNA 并测定浓度。逆转录合成并扩增 cDNA。PCR 反应条件如下:首先在 94 °C 下预变性,共耗时 10 min;然后在 94 °C 下变性,共耗时 30 s。接着 GAPDH 在 55 °C 下退火,共耗时 30 s,ERK1、ERK2 均在 57 °C 退火,共耗时 30 s。随后在 72 °C 下延伸,共耗时 60 s。最后在 72 °C 下终止延伸,共耗时 10 min。GAPDH、ERK1、ERK2 均需 35 个循环次数。蛞正完毕后制备 1% 琼脂糖凝胶,取扩增产物进行电泳。采用 Gel-Pro Analyzer 4.0 图像分析软件分析条带灰度值。ERK 1 引物序列:正义链:5'-TCCTTTGGATCTGGTCCTG-3';反义链:5'-CCCCAGCAAAGTGAGAGAAG-3',扩增片段长度:136 bp。ERK 2 引物序列:正义链:5'-AACAGGTTGTCCAAATGC-3';反义链:5'-GCCAGAGCCTGTCAACTTC-3',扩增片段长度:101 bp。GAPDH 引物序列:正义链:5'-ACGGATTTGGTCGTATTGGG-3';反义链:5'-CGCTCCTGGAAGATGCTGAT-3',扩增片段长度:214 bp。

小鼠海马组织 p-ERK1/2 蛋白含量的检测 每组随机选取 8 只小鼠。称取小鼠海马组织并加入 400 μl 单去污剂裂解液裂,反复研磨,组织匀浆,4 °C 下以 3 000 r/min 离心,离心半径 10 cm,取上清液,二辛可酸(BCA)法测定蛋白浓度。取 30 μg 总蛋白上样。进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离目的蛋白,电转至硝酸纤维素膜(NC 膜),用 5% 脱脂奶粉封闭 90 min。洗脱后加入兔抗小鼠 p-ERK1/2 单克隆抗体、兔抗小鼠 ERK1/2 单克隆

抗体和兔抗小鼠 GAPDH 多克隆抗体(稀释比例均为 1:1 000),4 °C 下过夜孵育,Tris-HCl 缓冲盐溶液+Tween 20(TBST)洗膜后用辣根过氧化物酶标记的二抗工作液(1:500),室温孵育 120 min。TBST 漂洗 3 次,加入 ECL 化学发光试剂,避光反应 15 min。采用 Gel-Pro Analyzer 4.0 图像分析软件分析条带灰度值。

统计分析 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量设计的方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

Morris 水迷宫实验 与 Sham 组比较,术后 3、7 d IR 组、PHC 组逃避潜伏期和游泳距离明显延长($P < 0.05$)。与 IR 组比较,术后 3、7 d PHC 组逃避潜伏期和游泳距离均明显缩短($P < 0.05$)。与术前 1 d 比较,术后 3、7 d Sham 组和 PHC 组逃避潜伏期和游泳距离明显缩短($P < 0.05$),IR 组逃避潜伏期和游泳距离明显延长($P < 0.05$)(表 1)。

海马组织 W/D 和脑组织 EB 含量 与 Sham 组比较,IR 组、PHC 组海马组织 W/D 和脑组织 EB 含量明显升高($P < 0.05$)。与 IR 组比较,PHC 组海马组织 W/D 和脑组织 EB 含量明显降低($P < 0.05$)(表 2)。

海马组织 ERK1/2 mRNA 表达量和 p-ERK1/2 蛋白含量 与 Sham 组比较,IR 组海马组织 ERK1/2 mRNA 表达量和 p-ERK1/2 蛋白含量明显升高($P < 0.05$)。与 IR 组比较,PHC 组海马组织 ERK1/2 mRNA 表达量和 p-ERK1/2 蛋白含量明显降低($P < 0.05$)(图 1—3)。

表 1 三组小鼠不同时点 Morris 水迷宫实验结果的比较($\bar{x} \pm s$)

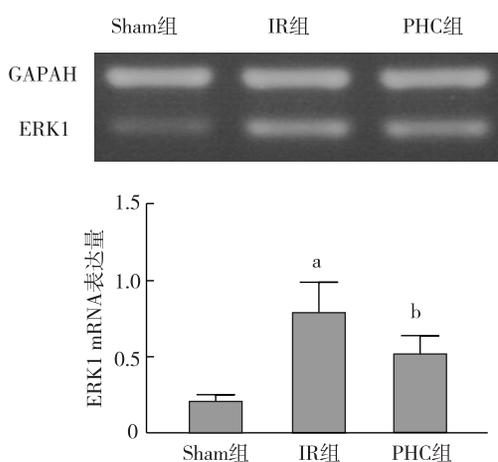
指标	组别	只数	术前 1 d	术后 3 d	术后 7 d
逃避潜伏期(s)	Sham 组	32	37.7±6.9	19.4±4.7 ^c	23.8±5.7 ^c
	IR 组	32	38.8±7.7	54.6±8.4 ^{ac}	46.5±8.8 ^{ac}
	PHC 组	32	37.8±7.5	28.9±7.7 ^{abc}	32.8±6.7 ^{abc}
游泳距离(mm)	Sham 组	32	3 454.2±712.9	2 122.8±543.7 ^c	1 123.7±369.9 ^c
	IR 组	32	3 423.3±894.3	4 789.8±677.6 ^{ac}	4 987.9±884.9 ^{ac}
	PHC 组	32	3 472.4±849.6	2 834.7±554.8 ^{abc}	1 952.9±528.6 ^{abc}

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$;与术前 1 d 比较,^c $P < 0.05$

表 2 三组小鼠海马组织 W/D 和脑组织 EB 含量的比较($\bar{x}\pm s$)

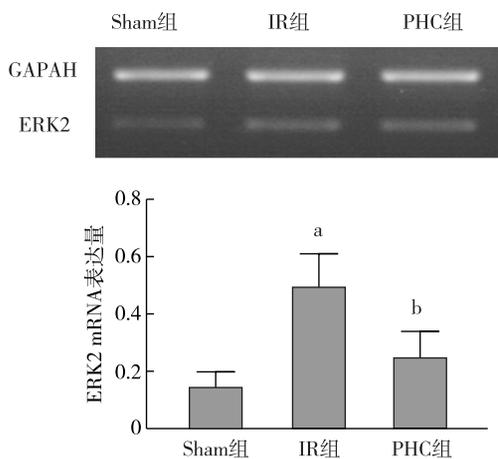
组别	只数	W/D	脑组织 EB 含量($\mu\text{g/g}$)
Sham 组	8	3.6 \pm 0.4	10.3 \pm 3.2
IR 组	8	4.9 \pm 0.6 ^a	19.4 \pm 4.6 ^a
PHC 组	8	4.1 \pm 0.5 ^{ab}	14.4 \pm 3.6 ^{ab}

注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 IR 组比较,^b $P<0.05$



注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 IR 组比较,^b $P<0.05$

图 1 三组小鼠海马组织 ERK1 mRNA 表达量的比较

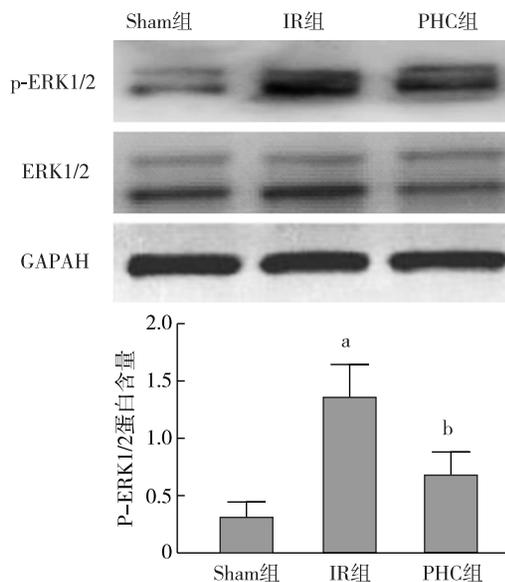


注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 IR 组比较,^b $P<0.05$

图 2 三组小鼠海马组织 ERK2 mRNA 表达量的比较

讨 论

脑 IR 损伤可致血脑屏障损伤,而后者又可加重脑损伤,从而形成脑缺血性损伤的恶性循环。鉴于此,同时结合相关文献报道^[5],本研究选取动物模



注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 IR 组比较,^b $P<0.05$

图 3 三组小鼠海马组织 p-ERK1/2 蛋白含量的比较

型的缺血时间为 20 min。IR 组小鼠海马组织 W/D 和脑组织 EB 含量均较 Sham 组升高,提示动物模型复制成功。

行为是机体最重要的功能之一,且由中枢神经系统掌控。实验动物的行为可随着环境的变化而改变,并由此准确地反映出动物的适应能力和神经功能的完整性。学习和记忆能力是人类和动物内在的神经心理学行为。这些行为发生在大脑内,并仅可通过机体对行为结果的确认或完成某一任务所需的时间来推测这些行为。本研究采用 Morris 水迷宫实验测定小鼠反复脑 IR 后的学习和记忆能力。急性脑卒中的临床治疗中,溶栓治疗等堵塞的脑血管再通技术对减少大脑神经元的死亡数目具有重要作用,而反复的溶栓治疗则易形成脑 IR 损伤,进而影响患者预后的学习记忆等能力。本研究结果显示,Sham 组术后 3、7 d 的逃避潜伏期和游泳距离均较术前 1 d 明显缩短,而 IR 组逃避潜伏期及游泳距离均延长。与 Sham 组比较,术后 3、7 d IR 组逃避潜伏期及游泳距离均延长。以上结果提示,小鼠脑 IR 后的学习记忆能力下降。

作为一种新型抗胆碱药,盐酸戊乙奎醚可选择性作用于 M1、M3 受体。目前,已有基础研究表明盐酸戊乙奎醚在脑 IR 损伤中具有保护作用,其作用机制主要与抑制神经元凋亡和氧化应激性损伤、脑线粒体 ATP 敏感性钾通道的激活等有关^[4,6]。由此推测,盐酸戊乙奎醚可能具有一定的脑保护作用,

但机制不明。本研究参照文献[7],确定术前 30 min 经腹腔注射盐酸戊乙奎醚的给药剂量为 1.0 mg/kg。本案研究结果显示,盐酸戊乙奎醚预处理后海马组织 W/D 和脑组织 EB 含量均较 IR 组降低,提示盐酸戊乙奎醚可减轻反复 IR 小鼠脑损伤。且 PHC 组术后 3、7 d 逃避潜伏期及游泳距离均较 IR 组缩短,提示盐酸戊乙奎醚可改善小鼠反复 IR 脑损伤后学习记忆能力。本研究注重于小鼠反复 IR 脑损伤后学习记忆能力与 ERK1/2 激活的关系。ERK1/2 属于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族,ERK 信号途径主要参与细胞分裂、生长、增值及凋亡。多项研究已表明,ERK1/2 的激活在脑缺血-再灌注损伤中具有重要作用^[8-9]。本研究结果显示,IR 组海马组织 ERK1/2 mRNA 表达量和 p-ERK1/2 蛋白含量均升高。这与既往研究结果相一致^[8-9]。而给予盐酸戊乙奎醚干预后海马组织 ERK mRNA 表达量和 p-ERK 蛋白含量均降低,提示盐酸戊乙奎醚可通过抑制海马组织 ERK1/2 激活而小鼠反复 IR 脑损伤。

综上所述,盐酸戊乙奎醚可通过抑制海马组织 ERK 1/2 激活而减轻小鼠反复 IR 脑损伤并改善其学习记忆能力。

参 考 文 献

[1] Gong G, Xiang L, Yuan L, et al. Protective effect of glycyrrhizin, a direct HMGB1 inhibitor, on focal cerebral ischemia/reperfusion-induced inflammation, oxidative stress, and ap-

optosis in rats. PLoS One, 2014, 9(3): e89450.

- [2] Yang SI, Yuan Y, Jiao S, et al. Calcitonin gene-related peptide protects rats from cerebral ischemia/reperfusion injury via a mechanism of action in the MAPK pathway. Biomed Rep, 2016, 4(6): 699-703.
- [3] Zhang X, Chen L, Dang X, et al. Neuroprotective effects of total steroid saponins on cerebral ischemia injuries in an animal model of focal ischemia/reperfusion. Planta Med, 2014, 80(8-9): 637-644.
- [4] Yu C, Wang J. Neuroprotective effect of penehyclidine hydrochloride on focal cerebral ischemia-reperfusion injury. Neural Regen Res, 2013, 8(7): 622-632.
- [5] Fan M, Song C, Wang T, et al. Protective effects of lithium chloride treatment on repeated cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. Neurol Sci, 2015, 36(2): 315-321.
- [6] Shu Y, Li Z, Han B. Penehyclidine hydrochloride postconditioning ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury: critical role of mitochondrial ATP sensitive potassium channel. J Biol Regul Homeost Agents, 2016, 30(1): 41-53.
- [7] 姜丽华, 王玉霞, 马琪, 等. 盐酸戊乙奎醚对新生大鼠脑缺血再灌注损伤的影响. 中华麻醉学杂志, 2011, 31(4): 511-512.
- [8] Yang H, Yang H, Lu Y, et al. Targeted delivery of extracellular matrix protected against neurologic defects after focal ischemia reperfusion in rats. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2015, 24(1): 154-162.
- [9] Chuang DY, Cui J, Simonyi A, et al. Dietary sutherlandia and elderberry mitigate cerebral ischemia-induced neuronal damage and attenuate p47phox and phospho-ERK1/2 expression in microglial cells. ASN Neuro, 2014, 6(6). pii: 1759091414554946.

(收稿日期:2018-05-04)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》对来稿署名的要求

作者姓名在文题下方按序排列,一般不宜超过 6 位。排序应在投稿时确定,在编排过程中不应再作更换,如欲更换第一作者,需出具单位证明和由全体作者签名的申请。作者单位的邮编、所在城市、单位名称的全称和科室在首页脚注中说明。若其他作者不属同一单位,需写出各自单位,并在单位后用括号列出作者的姓名。作者应具备的条件:(1)参与选题和设计,或参与资料的分析和解释;(2)起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容;(3)能对编辑部的修改意见进行核修,在学术上进行答辩,并最终同意该文发表者。以上 3 条均需具备。“通信作者”系指研究生课题论文的导师或直接指导者、相关科研项目课题负责人及该文的主要责任者和联系者。“通信作者”对论文应具有与第一作者同等的权利和义务。