

新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后内质网应激相关因子的表达及意义

于海侠^{1,2},刘文强¹,吴 铭¹,王 军¹

摘要 **目的** 观察新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后脑组织的病理损伤改变、脑组织内质网应激相关因子激活转录因子6(ATF6)、肌醇需求因子1(IRE1)、双链RNA依赖的蛋白激酶样内质网激酶(PERK)的分布及表达变化。**方法** 7 d龄新生大鼠分为假手术组(Sham组)和缺氧缺血性脑损伤组(HIBD组)。采用改良Rice法建立HIBD模型。对造模72 h时间点的脑组织进行苏木精-伊红(HE)染色观察大脑病理变化,尼氏染色观察皮质及海马区神经元损伤情况,采用免疫组化法检测各组大鼠大脑皮质及海马区ATF6、IRE1、PERK的表达情况。造模后6、24、72 h分别处死大鼠,采用Western blot法检测各时间点ATF6、IRE1、PERK蛋白表达情况。**结果** HIBD后72 h,HE染色显示Sham组未见神经细胞损伤,HIBD组可见脑组织神经细胞损伤,且主要损伤部位为脑皮层及海马区域。尼氏染色显示HIBD组皮质及海马区受损神经元比例均高于Sham组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。免疫组织化学染色显示,与Sham组比较,HIBD组脑组织大脑皮质及海马区中ATF6、IRE1、PERK阳性细胞数(棕黄色)增加($P < 0.001$)。HIBD组神经细胞胞质及核内ATF6表达均增加,胞核内IRE1及胞质内PERK表达增加。HIBD组ATF6、IRE1、PERK各时间点的蛋白相对表达水平均高于Sham组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后,脑损伤的部位主要在大脑皮质及海马区,且大脑皮质及海马区组织内质网应激因子表达升高,提示内质网应激相关因子参与其病理性损伤。

关键词 缺氧缺血性脑损伤;内质网应激;双链RNA依赖的蛋白激酶样内质网激酶;激活转录因子6;肌醇需求因子1

中图分类号 R 722.19

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1475-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.025

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic

brain damage, HIBD)主要是因为围产期发生的缺氧窒息引起的脑缺氧缺血性损害,是临床上引起新生儿急性死亡和慢性神经系统损伤的主要原因之一^[1]。儿童HIBD的病死率高达60%^[2],虽然目前较为有效的治疗方法为亚低温治疗,但在损伤早期有效果^[3],所以深入研究HIBD的损伤机制,这对于HIBD的治疗具有重要意义。

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是指由于缺氧、缺血等损伤导致细胞内质网稳态失衡、生理功能发生紊乱及障碍的一种亚细胞器的病理过程^[4]。ERS可以诱导未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),以恢复细胞内环境的稳定,但是剧烈或者持久的ERS可导致细胞凋亡,而细胞凋亡是引起缺氧缺血性脑损伤的主要机制之一^[5]。该研究通过观察新生大鼠HIBD后ERS相关因子激活转录因子6(activated transcription factor 6, ATF6)、肌醇需求因子1(inositol demand factor 1, IRE1)、双链RNA依赖的蛋白激酶样内质网激酶(PKR-like ER kinase, PERK)的表达、分布及神经元损伤情况,进一步探讨ERS在HIBD发病机制中的相关作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 15只健康成年SD大鼠由徐州医科大学实验动物中心提供,饲养条件为室温(20~26℃),光照为12 h/12 h明暗交替。动物合格证号:SYXK(苏)2020-0048。按照1:2雄雌比例进行交配繁殖,孕鼠单独喂养,待产子后选用7 d龄SD大鼠作为实验对象。

1.2 试剂与仪器 ATF6一抗(兔)、IRE1一抗(兔)、PERK一抗(兔)、 β -actin一抗及 β -actin二抗购自美国Affinity公司,羊抗兔二抗购自上海碧云天生物技术有限公司,HE染色试剂盒购自大连美伦生物技术有限公司等。荧光显微镜(BX-43)、数字切片扫描系统(VS120)购自日本Olympus公司。

1.3 动物模型制备 参照相关文献^[6]制作新生大鼠缺氧缺血性脑损伤模型(HIBD组):7 d龄SD大

2022-04-10 接收

基金项目:江苏省卫生健康委科研项目(编号:H2019004);徐州市科技项目(编号:KC18216)

作者单位:¹徐州医科大学附属医院儿科,徐州 221002

²徐州市中心医院放射科,徐州 221009

作者简介:于海侠,女,硕士研究生;

王 军,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail:664586331@qq.com

鼠无水乙醚吸入麻醉,仰卧位固定,沿颈正中线切开皮肤,游离出右侧颈总动脉,碘伏浸泡丝线进行结扎,缝合切口后回窝休息 2 h,再置入缺氧箱中,设置 37 °C 恒温水浴箱,以 1 ~ 2 L/min 的速度输入含 8% 氧气、92% 氮气的混合气体,持续 2 h,造成缺氧缺血性脑损伤。假手术组 (Sham 组) 切开颈部皮肤,游离右颈总动脉后缝合切口,不结扎,也不缺氧,缝合切口后呼吸正常空气。

1.4 动物分组 清洁级 7 d 龄新生 SD 大鼠,12 ~ 18 g,随机分为 Sham 组、HIBD 组,每组按照术后时间点不同进一步分为 6、24、72 h 三个亚组,6 h、24 h 每个亚组 8 只,72 h 每个亚组 16 只,6、24、72 h 各 8 只大鼠用于蛋白检测,72 h 的余 8 只大鼠用于 HE 染色、免疫组化及尼氏染色。

1.5 方法

1.5.1 标本制备新生大鼠脑组织的获取 各组新生大鼠在各时间点断头取脑,称取右侧新鲜脑组织约 100 mg,置于匀浆管中并加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解蛋白,匀浆结束后,将液体转移至新的 EP 管中,4 °C、15 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,使用 BCA 法测定蛋白浓度后于 - 80 °C 保存。

新生 SD 大鼠于 72 h 取材,开胸后充分暴露心脏,从心尖部插入灌注针头至左心室,剪开右心耳,快速灌注 50 ml 0.9% NaCl,同时观察肝、肺组织颜色变白、右心耳流出处液体为无色透明后,灌注 4 °C 预冷的 4% 多聚甲醛 50 ml,待其四肢抽动及全身组织变硬后取材,打开乳鼠颅腔,仔细摘取其脑组织,固定于 4% 多聚甲醛中,置于 4 °C 冰箱过夜。

1.5.2 HE 染色 取缺氧缺血 72 h 后大脑常规固定、脱水、石蜡包埋,统一取海马区行冠状位脑组织切

片,切片常规脱蜡、复水,进行 HE 染色,于光学显微镜下观察各组神经细胞的形态改变并拍摄组织图片。

1.5.3 尼氏染色 取石蜡切片行尼氏染色液染色,光学显微镜下观察存活神经元数量和胞质出现的尼氏小体并拍摄组织图片。

1.5.4 免疫组化 取石蜡切片脱蜡至水,放入预热的柠檬酸缓冲液进行抗原修复。取适量 3% 过氧化氢覆盖组织,室温孵育 10 min,3% BSA 室温封闭 30 min,孵育一抗 (1 : 400) 切片平放于湿盒内 4 °C 孵育过夜。次日孵育二抗 (1 : 400),室温孵育 1 h, DAB 显色,苏木精染色细胞核,脱水、封片,显微镜镜检,采集图像分析。

1.5.5 Western blot 实验 实验前取出部分蛋白样品,通过 10% SDS-PAGE 电泳分离,并转移至 PVDF 膜,封闭,一抗 ATF6、IRE1、PERK (1 : 1 000) 于 4 °C 孵育过夜,洗膜 3 次,每次 5 min,二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 2 h,洗膜 3 次,每次 5 min,使用凝胶成像系统拍照并保存图片,ImageJ 软件分析相对灰度值,以 β -actin 为内参标化相关蛋白表达量。

1.6 统计学处理 使用 SPSS 24.0 统计软件对数据进行分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑组织病理改变 Sham 组脑组织的神经细胞排列正常、整齐,层次清晰、形态及数量正常,包膜完整,核居中且圆,核仁深,异染色质少。HIBD 组可见皮质及海马区脑组织的神经细胞数量减少,排列紊乱,细胞间隙增大,结构不清,细胞质疏松,淡染,细胞胞质空泡化,表现为核固缩,并伴有细胞坏死,部分细胞膜破裂等。见图 1。

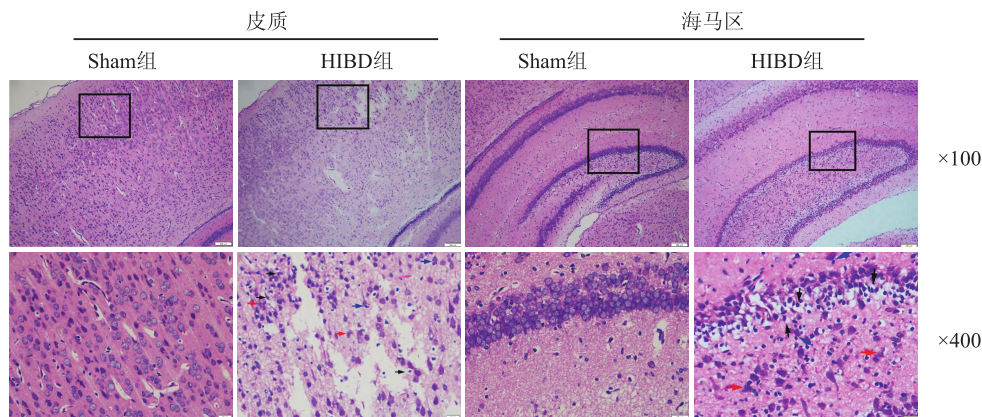


图 1 各组脑组织病理学改变

黑色箭头:神经元细胞胞质空泡化、细胞核固缩;红色箭头:细胞膜破裂;蓝色箭头:神经元坏死

2.2 各组大鼠皮质及海马区凋亡情况比较 尼氏染色结果显示 Sham 组神经元胞体呈圆形,核仁清晰,胞质深染,存在染色较深的尼氏小体。与 Sham 组比较,HIBD 组大脑皮质及海马区细胞皱缩、细胞核固缩,部分胞核偏位或溶解,空泡样表现,尼氏小体染色稀释且色浅,尼氏体数量减少,神经元变性严重,差异有统计学意义($P < 0.001$)。提示缺氧缺血性脑损伤新生大鼠神经元受损增加,神经元凋亡率增加。见图 2、表 1。

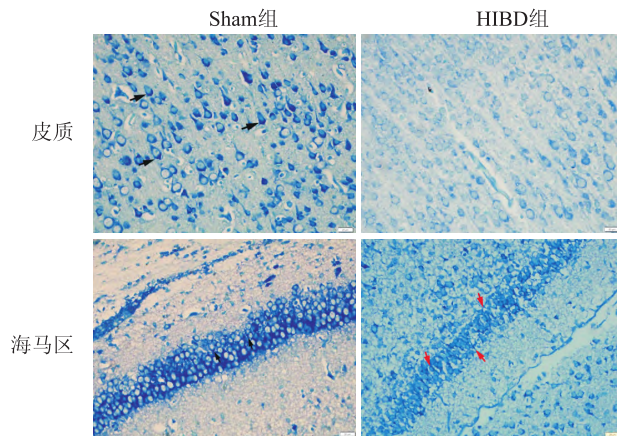


图 2 各组脑组织尼氏染色结果 $\times 400$

黑色箭头:尼氏小体;红色箭头:空泡样变、细胞核固缩

表 1 两组大鼠皮质及海马区尼氏体染色阳性神经元数占神经元总数比值($n=8$,个/高倍视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	大脑皮质	海马区
Sham	0.425 \pm 0.053	0.529 \pm 0.154
HIBD	0.236 \pm 0.037	0.198 \pm 0.090
<i>t</i> 值	8.817	5.790
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

2.3 各组新生大鼠脑组织 ATF6、IRE1、PERK 表达情况 ATF6、IRE1、PERK 阳性染色均呈棕黄色,阳性表达主要在损伤侧皮质及海马区,Sham 组新生大鼠损伤侧大脑皮质及海马区胞质有少量 ATF6 表达,胞核中有少量 IRE1 表达,胞质中有少量 PERK 表达,而 HIBD 组损伤侧皮质及海马区胞质及核内 ATF6 表达均增加,且核内表达增加明显,胞核内 IRE1 表达增加,胞质内 PERK 表达增加,表明缺氧缺血后,3 个 ERS 感受因子功能均活化并启动 UPR,并激活 3 个因子介导的凋亡通路造成脑损伤。与 Sham 组比较,HIBD 组新生 SD 大鼠大脑皮质及海马中 ATF6、IRE1、PERK 阳性细胞数(棕黄色)增加($P < 0.05$)。见图 3 和表 2、3。

表 2 各组皮质 ATF6、IRE1、PERK 的表达
免疫组化阳性细胞数比值($n=8$)

组别	ATF6	IRE1	PERK
Sham	0.22 \pm 0.12	0.16 \pm 0.06	0.17 \pm 0.09
HIBD	0.83 \pm 0.07	0.82 \pm 0.08	0.69 \pm 0.06
<i>t</i> 值	13.39	19.93	17.57
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 各组海马区 ATF6、IRE1、PERK 的表达
免疫组化阳性细胞数比值($n=8$)

组别	ATF6	IRE1	PERK
Sham	0.15 \pm 0.84	0.13 \pm 0.12	0.06 \pm 0.03
HIBD	0.75 \pm 0.09	0.75 \pm 0.97	0.67 \pm 0.09
<i>t</i> 值	10.49	9.95	21.11
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 各组大鼠脑组织不同时间点 ATF6、IRE1、PERK 蛋白表达比较 与 Sham 组比较,HIBD 组各时间点损伤侧脑组织中 ATF6、IRE1、PERK 蛋白表达随造模时间延长呈显著增高趋势,以 72 h 时间点表达量最高,见图 4A。Western blot 结果显示,ATF6、IRE1、PERK 蛋白在 6、24、72 h 时间点,HIBD 组较 Sham 组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4B~D。

3 讨论

新生儿 HIBD 是围产期发生的严重疾病^[7],可导致患儿出现智力低下、学习障碍、癫痫、脑瘫等神经功能受损症状,甚至死亡,给家庭及社会带来巨大的经济负担。在我国 HIBD 是导致新生儿死亡及儿童致残的主要原因,相关研究^[8]显示,新生儿缺氧缺血性脑损伤在发达国家中大约每 1 000 例存活的新生儿中有 1~8 例患病,而在发展中国家每 1 000 例存活的新生儿中患病者高达 26 例。目前唯一公认有效的治疗方法为亚低温治疗^[9],且仅在 6 h 之内使用对于中度的 HIBD 有效,重度 HIBD 无明显疗效。因此研究缺氧缺血性脑损伤的发病机制,降低 HIBD 引起的死亡及致残率是儿科领域急需解决的重要问题。

研究^[10]表明凋亡是新生大鼠缺氧缺血性脑损伤主要机制之一。而 ERS 通路是介导细胞凋亡的重要途径。内质网作为细胞内最大的细胞器,在蛋白质合成、加工和转运等过程中发挥重要作用。内质网对细胞内外环境的改变非常敏感,缺氧缺血等损伤可导致 ERS。有研究^[11]证实在缺氧缺血环境下,

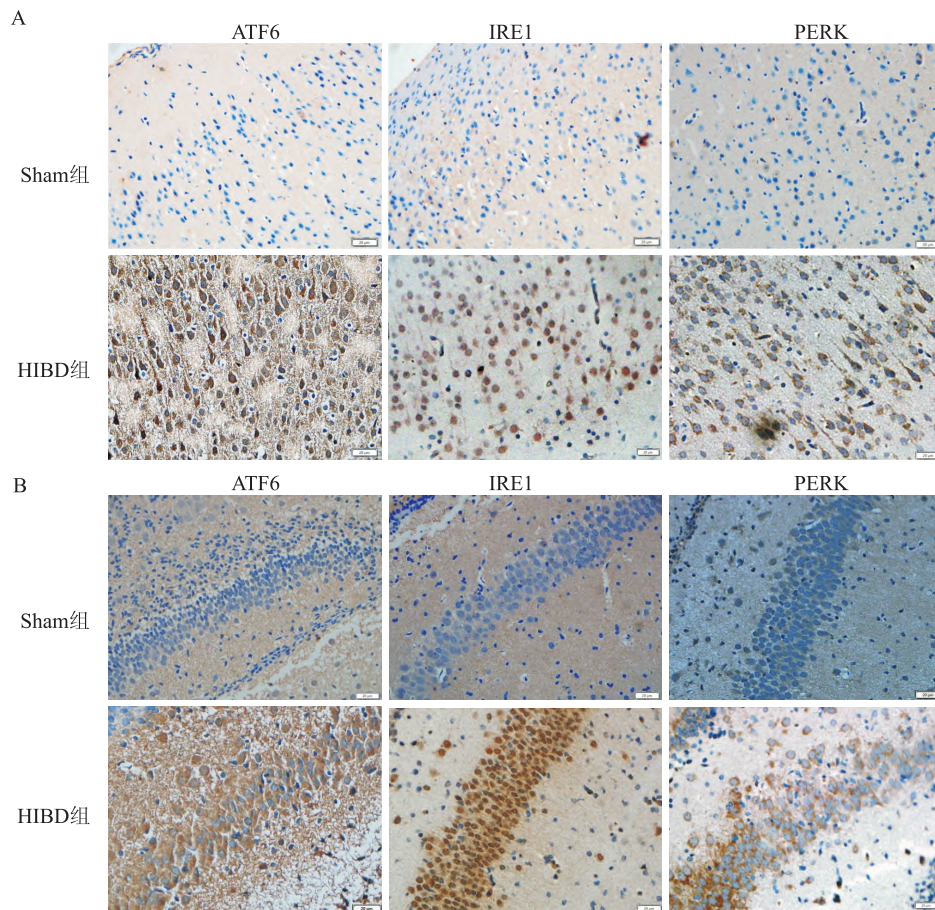


图3 各组脑组织免疫组化染色 ×400

A: 各组脑组织皮质 ATF6、IRE1、PERK 阳性表达细胞; B: 各组脑组织海马区 ATF6、IRE1、PERK 阳性表达细胞

ERS 会激活内质网的未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR), 以适应缺氧缺血损伤, 但长时间以及表达过强的 ERS 可启动细胞凋亡。正常情况下内质网分子伴侣葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 和 3 个 ERS 感受蛋白 PERK、ATF6、IRE1 结合, 处于无活性状态^[12], 一旦 ERS 发生, UPR 激活导致未折叠的蛋白在内质网内积聚, 使 GRP78 从 3 种跨膜蛋白上解离出来, 与未折叠的蛋白结合, 促进其折叠, 并激活这上述 3 种跨膜蛋白, 使上述三种蛋白功能活化, 启动细胞凋亡途径^[13]。研究^[14]表明, ERS 与许多急性慢性神经系统疾病如脑梗死、癫痫、神经退行性疾病等相关。但 ERS 在缺氧缺血性脑损伤中的确切作用机制尚未阐明。

本研究显示, HE 染色、尼氏染色显示 HIBD 后脑损伤的神经细胞数目增多, 神经元内尼氏体数量减少, 提示神经元损伤增加, 且主要的损伤部位在损伤侧的皮质和海马区。免疫组化结果显示 Sham 组新生大鼠损伤侧大脑皮质及海马区胞质中有少量

ATF6 表达, 胞核中有少量 IRE1 表达, 胞质中有少量 PERK 表达, 而 HIBD 组损伤侧皮质及海马区胞质及核内 ATF6 表达增加, 且核内表达增加明显, 胞核内 IRE1 表达增加, 胞质内 PERK 表达增加, 表明新生大鼠缺氧缺血时, 3 个 ERS 感受因子功能均活化并启动 UPR, 结合脑组织神经元损伤及凋亡增加的结果, 表明 3 个 ERS 感受因子最终启动凋亡通路造成脑损伤。Western blot 检测显示, 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后 6 h, ERS 相关因子 ATF6、IRE1、PERK 的表达量开始增加, 72 h 表达最高, 进一步提示新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后, 发生 ERS, 且 3 个 ERS 感受因子介导的凋亡通路被激活, 凋亡途径主要是 CHOP 通路、Caspases 通路及 JNK 通路^[15], CHOP 在生理条件下表达较低, 而 ATF6、IRE1、PERK 均能诱导 CHOP 的转录, 使 CHOP 表达增加, 从而诱导细胞凋亡。

综上所述, 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后导致内质网功能受损, 进一步启动 ERS 介导的神经元凋亡, ERS 介导的细胞凋亡是一种新的凋亡途径, 由此

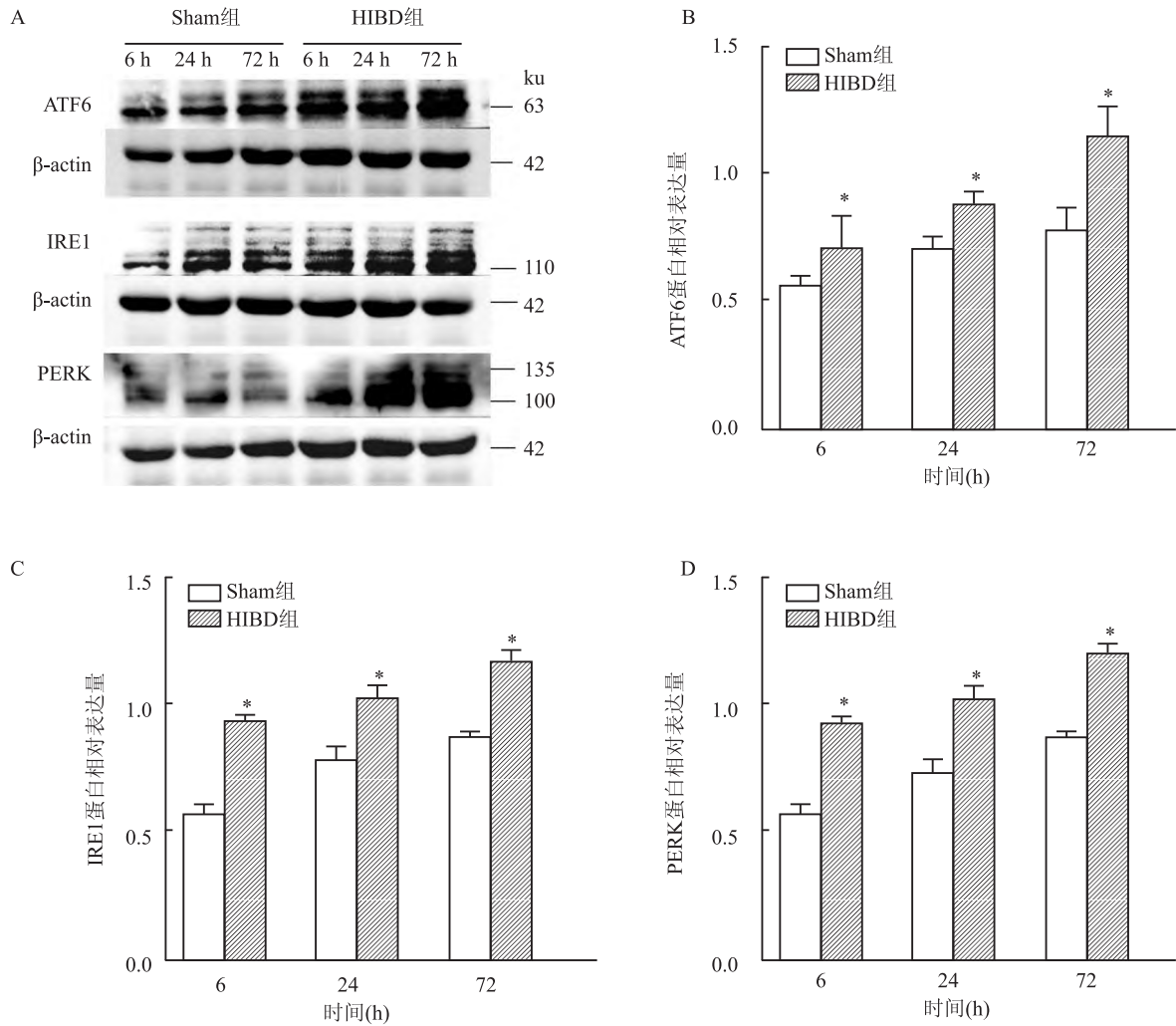


图4 各组新生大鼠大脑组织免疫印迹蛋白表达情况

A:各组新生大鼠损伤侧脑组织不同时间点 ATF6、IRE1、PERK 蛋白表达; B~D: A 图蛋白表达情况统计分析结果; 与 Sham 组比较: * $P < 0.05$

可见 ERS 在缺氧缺血性脑损伤中起重要作用,因此减少 ERS 可能是早期阻断新生儿缺氧缺血性脑损伤细胞凋亡的有效靶点。

参考文献

[1] Bonifacio S L, Hutson S. The term newborn: evaluation for hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Clin Perinatol, 2021,48(3): 681-95.
 [2] Papazian O. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Medicina (B Aires), 2018,78(Suppl 2):36-41.
 [3] 陈茂琼, 向敏, 宋海良, 等. hUC-MSCs 对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织的保护作用研究[J]. 安徽医科大学学报, 2021,56(8):1226-31.
 [4] Singh-Mallah G, Nair S, Sandberg M, et al. The role of mitochondrial and endoplasmic reticulum reactive oxygen species production in models of perinatal brain injury[J]. Antioxid Redox Signal, 2019,31(9):643-63.

[5] Liao Z, Luo R, Li G, et al. Exosomes from mesenchymal stem cells modulate endoplasmic reticulum stress to protect against nucleus pulposus cell death and ameliorate intervertebral disc degeneration *in vivo*[J]. Theranostics, 2019,9(14):4084-100.
 [6] Wu G, Chen Z, Wang P, et al. Hydrogen inhalation protects hypoxic-ischemic brain damage by attenuating inflammation and apoptosis in neonatal rats[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2019,244(12):1017-27.
 [7] Wu W, Wei W, Lu M, et al. Neuroprotective effect of chitosan oligosaccharide on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats[J]. Neurochem Res, 2017,42(11):3186-98.
 [8] Yang L, Zhao H, Cui H. Treatment and new progress of neonatal hypoxic-ischemic brain damage[J]. Histol Histopathol, 2020,35(9):929-36.
 [9] Silveira R C, Procianny R S. Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy[J]. J Pediatr (Rio J), 2015,91(6 Suppl 1):S78-83.

- [10] Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, et al. ER stress and disease: toward prevention and treatment[J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(9):1337-43.
- [11] Carloni S, Albertini M C, Galluzzi L, et al. Increased autophagy reduces endoplasmic reticulum stress after neonatal hypoxia-ischemia: role of protein synthesis and autophagic pathways[J]. *Exp Neurol*, 2014, 255:103-12.
- [12] Thornton C, Baburamani A A, Kichev A, et al. Oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress in the development of neonatal hypoxic-ischaemic brain injury[J]. *Biochem Soc Trans*, 2017, 45(5):1067-76.
- [13] Huang J, Lu W, Doycheva D M, et al. IRE1 α inhibition attenuates neuronal pyroptosis via miR-125/NLRP1 pathway in a neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy rat model[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):152.
- [14] Liu S, Xin D, Wang L, et al. Therapeutic effects of L-cysteine in newborn mice subjected to hypoxia-ischemia brain injury via the CBS/H(2)S system: role of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress[J]. *Redox Biol*, 2017, 13:528-40.
- [15] Liu Z, Lv Y, Zhao N, et al. Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(7):e1822.

Expression and significance of endoplasmic reticulum stress-related factors in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain injury

Yu Haixia^{1,2}, Liu Wenqiang¹, Wu Ming¹, Wang Jun¹

(¹*Dept of Pediatrics, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002;*

²*Dept of Radiology, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou 221009*)

Abstract Objective To observe the pathological changes of brain tissue in neonatal rats after hypoxic-ischemic brain damage (HIBD), the distribution and expression changes of endoplasmic reticulum stress (ERS) related factors including activated transcription factor 6 (ATF6), inositol demand factor 1 (IRE1) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in brain tissue. **Methods** Seven-day-old newborn rats were divided into sham operation group (Sham group) and hypoxic-ischemic brain damage group (HIBD group). The modified rice method was used to establish the HIBD model. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed on the brain tissue at the 72 h point of modeling to observe the pathological changes of the brain, Nissl staining was used to observe the neuron damage in the cortex and hippocampus, and immunohistochemistry was used to detect the expression of ATF6, IRE1 and PERK in the cerebral cortex and hippocampus of rats in each group. The models were sacrificed at 6 h, 24 h, and 72 h respectively, Western blot was used to detect the protein expression of ATF6, IRE1, and PERK at each time point at 6 h, 24 h, and 72 h. **Results** 72 hours after HIBD, HE staining showed that no nerve cell injury was observed in the Sham group, while nerve cell injury was observed in the brain tissue of the HIBD group, and the main injury sites were the cerebral cortex and hippocampus. Nissl staining showed that the proportion of damaged neurons in the cortex and hippocampus of the HIBD group was higher than that in the Sham group, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). Immunohistochemical staining showed that compared with the Sham group, the number of ATF6, IRE1, and PERK positive cells (brown-yellow) in the cerebral cortex and hippocampus of the HIBD group increased ($P < 0.001$). In the HIBD group, the expression of ATF6 in the cytoplasm and nucleus of nerve cells increased, and the expression of IRE1 in the nucleus and PERK in the cytoplasm increased. The relative protein expression levels of ATF6, IRE1, and PERK at each time point in the HIBD group were higher than those in the Sham group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** The brain damage of neonatal rats after hypoxic-ischemic brain injury is mainly in the cerebral cortex and hippocampus, and the expression of ER stress factors in cerebral cortex and hippocampus is increased, suggesting that ER stress related factors are involved in its pathological injury.

Key words hypoxic-ischemic brain injury; endoplasmic reticulum stress; PERK; ATF6; IRE1