

H₂S对急性脑梗死大鼠神经功能的保护作用及机制

辜锦川 张静

【摘要】 目的 探讨H₂S对急性脑梗死大鼠神经功能的保护作用以及相关机制。方法 将48只健康雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、生理盐水组和H₂S干预组。采用改良Longa法制备大鼠急性脑梗死模型,建模前25 min, H₂S干预组给予腹腔注射NaHS 28 μmol/kg,生理盐水组给予等量生理盐水,分别于苏醒后和术后72 h,评估各组大鼠的神经功能缺损。采用TTC染色法检测各组大鼠脑梗死面积, TUNEL法检测各组大鼠脑组织中细胞凋亡情况, Western blot法检测各组大鼠脑组织中PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax蛋白的表达。**结果** 与模型组和生理盐水组相比, H₂S干预组大鼠神经功能缺损程度评分、脑梗死面积和细胞凋亡指数均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组和生理盐水组相比, H₂S干预组大鼠脑组织中PI3K、Akt、Bcl-2蛋白相对表达量均升高,而p-PI3K、p-Akt、Bax蛋白相对表达量均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** H₂S可能通过抑制PI3K/Akt信号通路而改变Bcl-2/Bax比例,减小急性脑梗死大鼠脑梗死面积及细胞凋亡指数,保护神经功能。

【关键词】 硫化氢; 大鼠; 急性脑梗死; 神经功能; 机制

doi: 10.3969/j.issn.1009-6574.2017.09.010

Protective effect and mechanism of H₂S on neurological function in rats with acute cerebral infarction GU Jin-chuan, ZHANG Jing. Department of Critical Care Medicine, Huangshi City Aikang Hospital, Huangshi 435000, China

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of H₂S on neurological function in rats with acute cerebral infarction and the possible mechanism. **Methods** Totals of 48 healthy male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, saline group and H₂S intervention group. The model of rat acute cerebral infarction was established by modified Longa method. 25 min before modeling, rats in the H₂S intervention group were given intraperitoneal injection of NaHS 28 μmol/kg, while in the saline group were given the same amount of saline. After awakening and 72 h after operation, the neurological defects in rats of each group were evaluated. TTC staining was used to detect the cerebral infarct size in each group. TUNEL method was used to detect the cell apoptosis in brain tissue in each group. Western blot was used to detect the expressions of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, Bcl-2 and Bax proteins in the brain tissue. **Results** Compared with the model group and the saline group, the neurological defect score, the area of cerebral infarction and the apoptotic index in brain tissue in H₂S intervention group were decreased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the model group and the saline group, the relative expression levels of PI3K, Akt and Bcl-2 proteins in brain tissue in H₂S intervention group were increased, while the relative expression levels of p-PI3K, p-Akt and Bax proteins were decreased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** H₂S might change the ratio of Bcl-2/Bax by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway to reduce cerebral infarct size and apoptosis index and protect neurological function in rats with acute cerebral infarction.

【Key words】 Hydrogen sulfide; Rats; Acute cerebral infarction; Neurological function; Mechanism

急性脑梗死作为常见的危重症,具有起病快、进展迅速、病死率高、致残率高等特点,且近年来发病率呈不断升高趋势^[1],对人类健康构成严重威胁。目前,该病的具体发病机制尚不明确,研究表明,缺血、缺氧诱发的炎症反应、氧化应激、细胞调

亡在急性脑梗死病程进展中发挥重要作用^[2]。硫化氢(Hydrogen Sulfide, H₂S)作为机体内重要的气体信号分子,参与调控生物体的生理、病理过程,具有神经保护作用,在多种神经系统疾病中发挥重要作用^[3]。有研究指出,脑血管病变患者血浆H₂S水平发生改变,且与患者损伤严重程度有关^[4]。本研究通过构建大鼠急性脑梗死模型,观察H₂S干预对神经功能的保护作用,并探讨可能的机制。

作者单位: 435000 黄石市爱康医院重症医学科(辜锦川), 心血管内科(张静)

通讯作者: 张静 Email: 3111850050@qq.com

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 48 只, 6 周龄, 体质量 (220 ± 20)g, 购自河南省实验动物中心 [合格证号: SCXK(豫)2010-0002], 饲养于标准环境下, 自由进食、饮水。适应性饲养 7 d 后, 利用随机数字表法随机分为假手术组、模型组、生理盐水组和 H₂S 干预组, 每组 12 只。

1.1.2 试剂和设备 NaHS 购自美国 Sigma 公司, 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 购自美国 AMRESCO 公司, OCT 冰冻切片包埋剂购自美国 SAKURA 公司, TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 兔抗大鼠磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 多克隆抗体购自美国 CST 公司, 兔抗大鼠磷酸化 p-PI3K、苏氨酸蛋白激酶 (Akt)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 兔抗大鼠 p-Akt 多克隆抗体购自美国 SAB 公司, 兔抗大鼠 Bcl-2 单克隆抗体购自武汉博士德生物公司, 凝胶电泳分析系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方 法

1.2.1 大鼠急性脑梗死模型制备 按参考文献 [5] 中介绍的改良 Longa 法制备大鼠急性脑梗死模型: 术前禁饮禁食 10 h, 按 0.4 ml/100 g 剂量将 1% 戊巴比妥钠经腹腔注射麻醉, 仰面朝上固定, 取正中切口, 将颈部肌肉钝性分离, 随后将左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉分离, 分别将颈外动脉远心端、颈总动脉近心端结扎, 用动脉夹将颈内动脉夹闭, 于颈总动脉近分叉处剪一小口, 将 MCAO 栓线插入, 向颈内动脉推进, 直至大脑中动脉, 对手术切口缝合。大鼠清醒后, 以出现精神萎靡、同侧 Horner 征、提尾时对侧前肢下垂及内收内旋、活动时向对侧转圈等表现作为成功建模标准, 剔除建模不成功大鼠, 并对各组进行补充以保证各组样本量不变。假手术组大鼠除不插入 MCAO 栓线外, 其余步骤同模型组、生理盐水组和 H₂S 干预组, H₂S 干预组于建模前 25 min 按 28 μ mol/kg 腹腔注射 NaHS, 生理盐水组则以同样的方法给予等量生理盐水。

1.2.2 各组大鼠神经功能缺损程度评估 各组大鼠分别于苏醒后和术后 72 h, 按照 Zea-Longa 神经功能缺损评分标准进行评估^[6]: 0 分, 正常; 1 分, 提尾时对侧前肢不能完全伸展; 2 分, 活动时向瘫侧转圈; 3 分, 活动时向瘫侧倾倒; 4 分, 瘫痪不能活动, 意识丧失。将苏醒后 1~3 分大鼠纳入实验, 将 0 分和 4 分剔除, 并补充使各组大鼠数量稳定。

1.2.3 TTC 染色法检测各组大鼠脑梗死面积 于术后 72 h, 在神经功能缺损程度评估后, 各组随机取 6 只

大鼠, 腹腔麻醉后断头处死, 快速取脑组织, 快速置于 -20°C 冰箱冷冻 15 min, 取出后将小脑、低位脑干除去, 沿冠状面进行连续切 6 片, 厚度约 2 mm, 置于 1% TTC 液中, 避光情况下, 37°C 水浴 25 min。采用 Image pro Plus 6.0 图像分析软件对脑梗死面积进行分析, 获得脑梗死面积比 (%) = 脑片梗死总面积 / 脑片总面积 $\times 100\%$ 。

1.2.4 TUNEL 法检测各组大鼠脑组织中细胞凋亡情况 于术后 72 h, 在神经功能缺损程度评估后, 取各组剩余的 6 只大鼠, 麻醉处死后, 取脑组织, 利用 OCT 冰冻切片包埋剂包埋, 切片, 厚度约 6 μ m, 粘附在玻片上, 用多聚甲醛固定 10 min, 用蛋白酶 K 对玻片进行处理, 滴加平衡缓冲液, 孵育 30 min, 弃去缓冲液, 滴加 TdT 孵育缓冲液, 37°C 恒温孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次, 滤纸除去周围和背面多余的 PBS 液, 在荧光显微镜下进行观察, 凋亡细胞核被染成绿色, 于高倍镜下随机计数 10 个视野, 计算凋亡指数。

1.2.5 Western blot 法检测各组大鼠脑组织中 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax 蛋白表达 于术后 72 h, 在神经功能缺损程度评估后, 取各组剩余的 6 只大鼠, 麻醉处死后, 取 50 mg 大鼠梗死侧大脑皮层组织, 研磨后, 加入含蛋白酶抑制剂、广谱磷酸酶抑制剂的裂解液, 于 4°C 下 13 000 r/min 离心 15 min, 留取上清, 用 BCA 蛋白检测试剂盒对蛋白纯度和浓度进行检测。根据蛋白含量检测结果, 将蛋白和缓冲液加入, 99°C 煮 5 min 使蛋白变性, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电转移至 PVDF 膜上, 4°C 下用 5% 牛血清蛋白封闭 120 min, 将一抗兔抗大鼠 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bax 多克隆抗体及兔抗大鼠 Bcl-2 单克隆抗体加入 (稀释比例 1:500, 1:1 200, 1:1 000, 1:800, 1:1 500, 1:1 200), 4°C 下过夜孵育, PBST 洗涤 3 次, 将二抗加入, 室温下反应 60 min, PBST 洗涤 3 次, 加入 ECL 化学发光试剂避光反应 15 min, 拍照, 利用 Image J 图像分析软件以 GAPDH 蛋白为参考获得 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax 蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠神经功能缺损程度评分的比较 假手术组、模型组、生理盐水组和 H₂S 干预组大鼠神经功能缺损程度评分分别为 (0.13 ± 0.05) 分, (2.37 ± 0.77) 分, (2.15 ± 0.33) 分和 (1.32 ± 0.15) 分, 差异有统计学意义 ($F = 33.723, P < 0.01$); 两两比较, 与假手术组比较,

模型组、生理盐水组和H₂S干预组大鼠神经功能缺损程度评分均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),与模型组和生理盐水组比较,H₂S干预组大鼠神经功能缺损程度评分降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠脑梗死面积的比较 见图1(见本期封三)。假手术组、模型组、生理盐水组和H₂S干预组大鼠脑梗死面积分别为0, (29.5±3.7)%, (28.2±5.9)%和(17.1±3.5)%,差异有统计学意义($F=72.756, P < 0.01$);两两比较,与假手术组比较,模型组、生理盐水组和H₂S干预组大鼠脑梗死面积均变大,差异有统计学意义($P < 0.05$),与模型组和生理盐水组比较,H₂S干预组大鼠脑梗死面积变小,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠脑组织中细胞凋亡的比较 见图2(见本期封三)。假手术组、模型组、生理盐水组和H₂S干预组大鼠脑组织中细胞凋亡指数分别为(1.8±0.3)%, (26.5±1.6)%, (25.7±1.4)%和(12.0±0.6)%,差异有统计学意义($F=656.686, P < 0.01$);两两比较,与假手术组比较,模型组、生理盐水组和H₂S干预组大鼠脑组织中细胞凋亡指数均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),与模型组和生理盐水组比较,H₂S干预组大鼠脑组织中细胞凋亡指数降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠脑组织中PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax蛋白表达的比较 见表1。与假手术组相比,模型组、生理盐水组和H₂S干预组大鼠脑组织中PI3K、Akt、Bcl-2蛋白相对表达量均降低,而p-PI3K、p-Akt、Bax蛋白相对表达量均升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),与模型组和生理盐水组比较,H₂S干预组大鼠脑组织中PI3K、Akt、Bcl-2蛋白相对表达量均升高,而p-PI3K、p-Akt、Bax蛋白相对表达量均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

急性脑梗死作为由于缺血而导致的级联反应过程,可在较短时间内引起脑组织不可逆损伤,是临床上致死、致残率较高的急症^[7],近年来随着临床诊疗技术的进步,该病死亡率呈不断下降趋势,但致残率一直居高不下,约为80%,严重影响患者的生存质量^[8]。研

究表明,神经元凋亡与急性脑梗死致残、致死密切相关,有效保护神经元已成为拯救急性脑梗死患者的重点^[9]。有研究指出,急性脑梗死过程中炎症反应、氧化应激、自噬等均可导致神经元凋亡^[10]。H₂S作为新近发现的第3种气体信号分子,在炎症反应相关疾病、器官损伤中发挥重要的保护作用^[11],同时,参与了多种神经系统疾病的发生,在神经保护及神经递质功能发挥中起重要作用^[12]。本研究按照改良Longa法制备了大鼠急性脑梗死模型,结果显示,模型组大鼠神经功能缺损程度评分显著升高,大鼠脑梗死面积显著增加,提示成功构建了大鼠急性脑梗死模型。

本研究中在给予大鼠NaHS干预后,NaHS是外源性H₂S供体硫化盐的一种,在溶液中可分离出Na⁺和HS⁻,随后HS⁻和H⁺结合生成H₂S。本研究结果显示,H₂S干预组大鼠神经功能缺损程度评分较模型组和生理盐水组降低、脑梗死面积减小,说明H₂S可有效减少急性脑梗死损伤,减小脑梗死面积。本研究结果显示,模型组、生理盐水组大鼠脑组织中细胞凋亡指数升高,而相比模型组、生理盐水组,H₂S干预组大鼠脑组织中细胞凋亡指数降低,说明急性脑梗死可加剧脑组织中细胞凋亡,而给予H₂S干预则可有效保护脑组织,减少细胞凋亡发生。

PI3K/Akt信号通路作为机体内广泛存在的信号通路,在细胞增殖、凋亡、肿瘤发生中发挥重要作用^[13]。各种因素在激活PI3K/Akt信号通路后,活化的PI3K发生磷酸化,从而激活Akt,发生磷酸化,促使其从胞质转移至细胞膜,可通过抑制促凋亡蛋白Bax表达而促进抗凋亡蛋白Bcl-2表达,改变Bcl-2/Bax平衡而抗细胞凋亡^[14]。本研究结果显示,模型组、生理盐水组大鼠脑组织中PI3K、Akt、Bcl-2蛋白相对表达量均降低,而p-PI3K、p-Akt、Bax蛋白相对表达量均升高,说明发生急性脑梗死时,可能通过激活PI3K/Akt信号通路,改变Bcl-2/Bax比例而参与神经细胞凋亡过程,而给予H₂S干预后,大鼠脑组织中PI3K、Akt、Bcl-2蛋白相对表达量均升高,而p-PI3K、p-Akt、Bax蛋白相对表达量均降低,提示H₂S可能通

表1 各组大鼠脑组织中PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	PI3K	p-PI3K	Akt	p-Akt	Bcl-2	Bax
假手术组	6	0.75 ± 0.13	0.26 ± 0.05	0.62 ± 0.08	0.40 ± 0.06	0.81 ± 0.12	0.33 ± 0.05
模型组	6	0.32 ± 0.14 ^a	0.67 ± 0.08 ^a	0.31 ± 0.05 ^a	0.72 ± 0.11 ^a	0.48 ± 0.09 ^a	0.76 ± 0.10 ^a
生理盐水组	6	0.30 ± 0.11 ^a	0.69 ± 0.11 ^a	0.29 ± 0.03 ^a	0.75 ± 0.13 ^a	0.50 ± 0.10 ^a	0.75 ± 0.09 ^a
H ₂ S干预组	6	0.57 ± 0.10 ^{abc}	0.49 ± 0.10 ^{abc}	0.50 ± 0.07 ^{abc}	0.57 ± 0.09 ^{abc}	0.65 ± 0.07 ^{abc}	0.54 ± 0.08 ^{abc}
F值		10.316	31.863	88.440	30.826	13.741	35.313
P值		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注:与假手术组比较^a $P < 0.05$;与模型组比较^b $P < 0.05$;与生理盐水组比较^c $P < 0.05$

过抑制 PI3K/Akt 信号通路激活,而使 Bcl-2/Bax 比例升高发挥抗细胞凋亡的功能。

综上所述,给予 H₂S 干预可减轻急性脑梗死大鼠神经功能损伤,减少脑梗死面积及细胞凋亡,其机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路而改变 Bcl-2/Bax 比例有关,有望为急性脑梗死临床防治提供新的方向。

参 考 文 献

- [1] Hsu CC, Kwan GNC, Hapugoda S, et al. Susceptibility weighted imaging in acute cerebral ischemia: review of emerging technical concepts and clinical applications[J]. *Neuroradiol J*, 2017,30(2): 109-119.
- [2] Lin R, Cai J, Kostuk EW, et al. Fumarate modulates the immune/inflammatory response and rescues nerve cells and neurological function after stroke in rats[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 269.
- [3] Chiappe C, Pomelli CS. Hydrogen Sulfide and Ionic Liquids: Absorption, Separation, and Oxidation[J]. *Top Curr Chem (Cham)*, 2017, 375(3): 52.
- [4] 方浩威,黄益洪,官少兵,等.脑血管病变严重程度与血浆硫化氢水平的相关研究[J/OL].*中华临床医师杂志(电子版)*, 2016, 10(22): 3 320-3 323.
- [5] 孙寒静,刘志和,吴艳华,等.川芎嗪对急性脑梗死大鼠 CD40/CD40L 信号通路的影响及机制探讨[J].*中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(10): 1 087-1 090.
- [6] 王一超. Akt 和 mTOR 在脑缺血再灌注大鼠皮质区的表达[J].

华北理工大学学报(医学版), 2017, 19(1): 9-14.

- [7] Lin MP, Sanossian N. Reperfusion therapy in the acute management of ischemic stroke[J]. *Cardiol Clin*, 2015, 33(1): 99-109.
- [8] Sheth SA, Jahan R, Gralla J, et al. Time to endovascular reperfusion and degree of disability in acute stroke[J]. *Ann Neurol*, 2015, 78(4): 584-593.
- [9] Song M, Yu SP. Ionic regulation of cell volume changes and cell death after ischemic stroke[J]. *Transl Stroke Res*, 2014, 5(1): 17-27.
- [10] Robinson AA, Ikuta K, Soverow J. Anticoagulation for the acute management of ischemic stroke[J]. *Yale J Biol Med*, 2014, 87(2): 199-206.
- [11] Nakagawa H. Photocontrol of NO, H₂S, and HNO Release in Biological Systems by Using Specific Caged Compounds[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2016, 64(9): 1 249-1 255.
- [12] Chen WL, Niu YY, Jiang WZ, et al. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide and the underlying signaling pathways[J]. *Rev Neurosci*, 2015, 26(2): 129-142.
- [13] Spangle JM, Roberts TM, Zhao JJ. The emerging role of PI3K/AKT-mediated epigenetic regulation in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1 868(1): 123-131.
- [14] Meng Y, Wang W, Kang J, et al. Role of the PI3K/AKT signalling pathway in apoptotic cell death in the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5): 2 417-2 422.

(收稿日期: 2017-07-12)

· 消息 ·

欢迎订阅 2018 年《神经疾病与精神卫生》杂志

《神经疾病与精神卫生》杂志是神经、精神科学及精神卫生领域的学术性期刊,国内外公开发行人,2006 年被中国科学技术信息研究所收录为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)。本刊坚持党的出版方针和卫生工作方针,遵循学科发展规律、适应市场需求规律,以提高杂志质量、扩大社会效益为使命,及时反映科学研究的重大进展,更好地促进国内外学术交流。主要读者对象为广大神经科学、精神科学及精神卫生领域中从事基础、临床医学、教学、科研的工作者及学生。报道内容包括相关各学科领先的教学、科研成果及临床诊疗经验。主要栏目有专家论坛(述评)、论著、英文原著、学术交流、短篇报道、综述、会议纪要、国内外学术动态等。

《神经疾病与精神卫生》杂志国内邮发代号为 82-353,由北京市邮政局发行;国外发行代号 BM1690,由中国国际图书贸易总公司发行。每期定价 10.00 元,全年 120.00 元。欢迎直接通过本社订阅。

银行汇款:开户行:中国建设银行建华支行 户名:《神经疾病与精神卫生》杂志社
账号:23001626251050500949
联系电话:(010)83191160 传真:(010)83191161