

曹娟,王士杰,毕见龙. 白皮杉醇通过 MAPK/ERK 信号通路对急性重症一氧化碳中毒大鼠脑损伤的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 85-92.

Cao J, Wang SJ, Bi JL. Role of the MAPK/ERK signaling pathway in the protective effect of piceatannol on rat brain damage by acute CO poisoning [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 85-92.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.013

白皮杉醇通过 MAPK/ERK 信号通路对急性重症 一氧化碳中毒大鼠脑损伤的保护作用

曹娟*, 王士杰, 毕见龙

(北京大学国际医院急诊科, 北京 102206)

【摘要】 目的 探究白皮杉醇通过调控 MAPK/ERK 信号通路对急性重症一氧化碳中毒大鼠脑损伤的作用机制。**方法** 取 100 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为四组, 其中三组于灌入 CO 气体处理箱中活动 1 h 制备急性 CO 中毒模型, 出箱后立即检测四组大鼠的 HbCO%, PIC 组采取 2 mL 200 mg/kg PIC 灌胃处理, PIC + ERK 组采取 2 mL 200 mg/kg PIC 和 0.2 mg/kg ERK 抑制剂 P-4313 共同处理, CO 组与 NC 组给予等体积生理盐水灌胃处理。分别于 1、7、14、21、28 d 后进行水迷宫实验, 实验结束后取四组大鼠脑组织进行 HE 染色观察、TUNEL 染色检测细胞凋亡情况、脑组织神经细胞超微结构观察、神经细胞线粒体膜电位检测、脑组织细胞氧化应激损伤指标检测、Western blot 检测 Nrf-2 和 Bcl-2 蛋白的表达。**结果** 与 NC 组比较, CO 组和 PIC + ERK 组大鼠在水迷宫实验中学习记忆表现下降, 脑组织细胞形态发生变化, 神经细胞超微结构受损, 凋亡细胞数目较多 ($P < 0.001$), MFI 值明显下降 ($P < 0.001$), ROS 含量增加 ($P < 0.001$); 与 CO 组比较, PIC 组大鼠在行为实验中表现正常, 脑组织细胞形态未发生改变, 神经细胞超微结构完整, 凋亡细胞数目较少 ($P < 0.001$), MFI 值与 ROS 含量较低 ($P < 0.001$), Nrf-2 和 Bcl-2 蛋白表达略增高。**结论** 白皮杉醇可能通过调控 MAPK/ERK 信号通路, 使 Nrf-2、Bcl-2 蛋白的表达量升高, 对急性 CO 中毒造成的脑损伤起到保护作用。

【关键词】 白皮杉醇; MAPK/ERK 信号通路; 急性一氧化碳中毒; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0085-08

Role of the MAPK/ERK signaling pathway in the protective effect of piceatannol on rat brain damage by acute CO poisoning

CAO Juan*, WANG Shijie, BI Jianlong

(Department of Emergency Medicine, Peking University International Hospital, Beijing 102206, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of piceatannol (PIC) on rat brain damage caused by acute carbon monoxide (CO) poisoning through the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) pathway. **Methods** SPF male SD rats were randomly assigned to four groups (25 rats each group). Three groups were infused with CO gas for 1 hour to establish an acute CO poisoning model. The negative control (NC) group did not receive any CO. Following removal from the CO, the percent of carboxyhemoglobin (HbCO%) of the rats in all four groups was determined immediately. Subsequently, the PIC group received 2 mL 200 mg/kg PIC by intragastric administration, the PIC + ERK group was similarly treated with both 2 mL 200 mg/kg PIC and 0.2 mg/kg ERK inhibitor P-4313, and the CO and NC groups were treated with an equal volume of normal saline. A water maze experiment was performed after 1, 7, 14,

21 and 28 d. After completing this experiment, the brain tissues of all the animals were obtained for hematoxylin-eosin (HE) staining observation, Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End labeling (TUNEL) staining to detect cell apoptosis, ultrastructure observation of neurons in brain tissue, detection of mitochondrial membrane potential, detection of the oxidative stress damage index of brain tissue cells, and Western blot detection of the nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf-2) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) proteins. **Results** In comparison with the NC group, rats in the CO and PIC + ERK groups displayed poorer learning and memory performance in the water maze experiment, the brain tissue cell morphology was changed, the ultrastructure of nerve cells was disrupted, the number of apoptotic cells was greater ($P < 0.001$), the mean fluorescence intensity (MFI) value was significantly decreased ($P < 0.001$) and the reactive oxygen species (ROS) content was elevated ($P < 0.001$). In contrast with the CO group, rats in the PIC group were normal in the behavioral experiments and the brain tissue cell morphology did not change; furthermore, fewer apoptotic cells were found ($P < 0.001$), the ultrastructure of nerve cells was intact, the MFI value and ROS content were lower ($P < 0.001$), and the Nrf-2 and Bcl-2 protein expression were slightly increased. **Conclusions** PIC may increase Nrf-2 and Bcl-2 expression through the MAPK/ERK signaling pathway to protect against brain damage caused by acute carbon monoxide poisoning.

【Keywords】 piceatannol; MAPK/ERK signaling pathway; acute carbon monoxide poisoning; rat

一氧化碳(carbon monoxide, CO)中毒是临床上常见的吸入性中毒事件之一^[1]。CO中毒的致病机理是CO与血红蛋白结合,形成结构稳定的碳氧血红蛋白(carboxyhemoglobin, HbCO),使血红蛋白无法结合氧分子,造成组织缺氧^[2]。机体在短时间内吸入过量CO可致急性重症CO中毒(acute carbon monoxide poisoning, ACOP),引起组织细胞损伤,其中对脑组织细胞的损害最严重^[3]。它能引起多种严重并发症,尤其是急性脑损伤和迟发性脑病^[4]。

丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路是一个复杂的细胞内信号转导网络,参与调控细胞生长、分裂、分化、死亡等各个阶段的生理活动,对调节机体生理病理反应过程中起着重要作用^[5]。其中细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号通路涉及生长和分化中不同受体的激活,参与细胞的增殖、分化、形态维持、骨架构建、细胞凋亡和癌变等多种生化反应^[6-7]。然而,在已经不需要增殖和分化的成熟神经元细胞中仍有大量的ERK上游调控子和下游靶蛋白的存在,经研究发现,ERK与哺乳动物的学习和记忆过程有着紧密关系^[8]。

白皮杉醇(piceatannol, PIC)也称比杉特醇,是一种多酚类化合物,化学名为3,3',4,5'-四羟基反式二丙乙烯,分子式为 $C_{14}H_{12}O_4$ 。PIC主要存在于葡萄、甘蔗、大黄、蓝莓及百香果等植物中^[9]。PIC具有抗炎、抗氧化活性,清除自由基的作用^[10]。根据已有研究报道^[11],PIC可抑制脑细胞凋亡发挥对缺血缺氧性脑组织损伤大鼠大脑具有保护作用。本研究旨在通过MAPK信号通路揭示PIC对一氧化碳中毒大鼠脑损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠100只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0011],45周龄,体重为 (220 ± 20) g,饲养于本院动物实验中心[SYXK(京)2016-0044],饲养室保持良好通风,饲养环境温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,湿度 $(50 \pm 10)\%$,12 h昼夜周期。正常饲养1周以适应环境,第2周开始进行实验,使用大鼠时严格按照3R原则给予人道关怀。动物实验按照本院动物管理委员会(IACUC2018001)的规定执行,并已通过北京大学国际医院实验动物伦理与管理委员会审批(20190508001)。

1.2 主要试剂与仪器

PIC购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司(批号:10083-24-6);ERK1/2通路抑制剂 $(500 \mu\text{mol/L})$ 购自美国Sigma公司;HE染色试剂盒和TUNEL染色试剂盒购自南京凯基生物有限公司;ROS检测试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;Western blot试剂盒购自美国BD公司。

处理箱(订制90 L容积的亚克力材质密封箱体,箱侧壁存在可密封的进气口和出气口,箱内装有CO检测仪);99.99% CO气体购自西南化工研究所;血气分析仪购自德国拜耳公司;Morris水迷宫及分析跟踪系统由首都医科大学宣武医院实验动物室提供;线粒体提取试剂盒及膜电位检测试剂盒购自北京Solatbio Sciences & Technology有限公司;光学显微镜;透射电子显微镜(日产JEM-1230)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及急性 CO 中毒动物模型制备

饲养的第 8 天,将 100 只大鼠随机分为四组:空白对照组(NC 组)、ACOP 模型组(CO 组)、ACOP 模型采用 PIC 处理组(PIC 组)和 ACOP 模型采用 PIC 和 ERK 抑制剂同时处理组(PIC + ERK 组),每组各 25 只。除 NC 组外,其余各组大鼠根据文献^[3]描述制备 ACOP 大鼠模型。将大鼠置于 90 L 的处理箱中,持续吸入浓度为 1000 ppm 的 CO 气体 20 min,CO 浓度升高至 2000 ppm,持续吸入 20 min,随后 CO 气体浓度升高至 3000 ppm,大鼠在箱中持续吸入气体 20 min 后,转移至箱外呼吸空气。NC 组大鼠在处理箱中持续吸入空气 60 min。制模过程中观察大鼠的行为状态,出箱后立即从大鼠左侧股动脉抽取 0.3 mL 的全血,使用血气分析仪采用微量定量法检测血液中碳氧血红蛋白浓度(CO_{Hb}%)。

1.3.2 给药方法

制备模型后,NC 组与 CO 组大鼠正常饲养;PIC 组大鼠给予 200 mg/kg PIC 灌胃,灌胃剂量 2 mL,每天 1 次,共 33 d;PIC + ERK 组大鼠给予 200 mg/kg PIC 和 0.2 mg/kg ERK 抑制剂灌胃,灌胃剂量 2 mL,每天 1 次,共 33 d;NC 组与 CO 组灌胃等量生理盐水。

1.3.3 Morris 水迷宫实验

四组大鼠处理后于第 2 天进行 Morris 水迷宫实验,6 d 为一个实验周期,水迷宫实验包括定位航行和空间探索两个阶段^[12-14]。定位航行实验共进行 5 次,每次 5 d,每天训练 4 次;每次更换入水点,大鼠找到平台后或 120 s 内找不到平台,拿上平台,休息 15 s 后进行下一次训练,记录四组大鼠逃避潜伏期,计算每组大鼠每次实验得到逃避潜伏期的平均值。空间探索实验在定位航行实验结束后 1 d 进行,撤去原平台,所有大鼠从同一入水点放入水中,记录大鼠在 120 s 内穿越平台次数。逃避潜伏期和穿越平台次数取一个实验周期内得到的平均值。

1.3.4 脑组织标本制备

制备模型后 33 d,四组大鼠进行完空间探索实验后,每组大鼠随机取 10 只,其中每组 5 只用 4% 苯巴比妥钠深度麻醉后,从左心室灌注 200 mL 的生理盐水和 4% 多聚甲醛,取脑,放入 4% 多聚甲醛 4℃ 固定 48 h,脱水,石蜡包埋,冠状位连续切片,厚度 6 μ m,用于 HE 染色和 TUNEL 染色。剩余大鼠取

脑,冰面上分离海马区,-80℃ 保存,用于线粒体的提取、神经元超微结构观察、ROS 含量检测、Western blot 实验。

1.3.5 HE 染色检测大鼠脑组织形态

将四组大鼠脑组织石蜡切片依次脱蜡,水化,经苏木素-伊红染色,脱水,二甲苯透明,干燥,中性树胶封片,光学显微镜下观察大鼠脑组织海马区细胞形态并拍摄照片。

1.3.6 TUNEL 染色检测大鼠细胞凋亡

将四组大鼠脑组织石蜡切片脱蜡至水,加入蛋白酶 K 工作液,37℃ 孵育 20 min,加入 TUNEL 反应液湿盒 37℃ 避光孵育 1 h, PBS 洗涤, DAB 显色 10 min,苏木素复染,脱水,透明,中性树脂封片。每张切片随机选取互不重叠的 3 个视野,于 400 倍镜下通过 Lasersharp 2000 软件进行图像采集,颗粒状绿色深染的细胞为 TUNEL 阳性细胞,观察并记录图片中阳性细胞数。

1.3.7 离体神经元超微结构观察

取四组大鼠海马区齿状回平面切组织块样本,放入 4% 的戊二醛溶液中固定,环氧乙烷处理,环氧树脂包埋,包埋的组织样本进行超薄切片,枸橼酸铅染液染色,水洗,通过透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察切片并拍摄照片。

1.3.8 流式细胞仪检测线粒体膜电位

用线粒体提取液分离并纯化线粒体,然后添加 5 倍稀释的 JC-1 染料工作液,阴性对照切片以 PBS 代替荧光染料。线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的变化采用流式细胞仪的 cflowplus 软件分析系统。每个实验重复 10 次,取每组所有样本 MMP 相对值的平均值,用平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)表示。

1.3.9 活性氧试剂盒检测四组大鼠 ROS 水平

取 500 g 脑组织的细胞匀浆液,12000 r/min 离心 30 min,弃上清液,加入 10 μ mol/L 的 DCFH-DA,移液枪吹打混匀,使细胞悬浮于 DCFH-DA 中,在 37℃ 的细胞培养箱内孵育 20 min,每 3 min 颠倒混匀,使试剂与细胞完全接触,无血清培养基洗涤 3 次后悬浮于 PBS 溶液中,使用流式细胞仪在 488 nm 激发波长,525 nm 处检测样品的荧光强度。

1.3.10 Western blot 分析 Nrf-2 及 Bcl-2 蛋白表达

将海马区称重后加入 7 mL/g 脑组织的裂解液制备脑组织匀浆液,在 4℃ 下 1200 r/min 离心 30 min,

置于冰上裂解 30 min, 取上清液, 采用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法进行蛋白定量检测, 加入样品得到 1X 蛋白上样缓冲液, 混匀, 95℃ 下变性 10 min。按 Western blot 法^[9]检测 Nrf-2、Bcl-2 蛋白表达水平, 加入待测样品进行电泳, 转膜, 封闭 1 h, 按照抗体说明书进行一抗孵育过夜, 加入二抗显色, 成像。采用 Image J 软件进行灰度值分析, 每一条蛋白条带以自身 β -actin 作为内参进行灰度校正。

1.4 统计学方法

用 Graphpad 5.0 软件分析实验数据, 定量数据用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 实验数据进行正态性和方差性检验, 逃避潜伏期和穿越平台次数比较采用重复测量资料的方差分析, 海马区 Nrf-2、Bcl-2 的表达采用单因素方差分析进行组间比较, 两两比较采用 LSD 法, $P<0.05$ 表示差异显著, 结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠急性 CO 中毒模型制备后行为表现及血液 COHb% 检测结果

处理箱内 CO 浓度为 2000 ppm 条件下, CO 组、PIC 组和 PIC + ERK 组大鼠在 5~15 min 内表现为兴奋躁动, 15 min 后表现为呼吸急促。CO 浓度升高至 3000 ppm 后, 大鼠出现四肢抽搐, 大小便失禁, 口、鼻、耳、四肢及尾部皮肤呈现樱桃红色, 随后四肢无力甚至昏迷。昏迷大鼠出箱后吸入空气, 逐渐恢复活动, 制模过程无大鼠退出实验。处理后, CO 组、PIC 组和 PIC + ERK 组大鼠血液中 COHb% 均大于 40%, NC 组大鼠无上述表现, 血液中 COHb% 小于 5%, 表明 ACOP 大鼠模型制备成功, 四组大鼠 COHb% 的比较见图 1。

2.2 各组大鼠 Morris 水迷宫实验观察比较

处理后 1~6 d Morris 水迷宫实验结果无显著性差异; 处理后 14~33 d, 随着病程延长, CO 组和 PIC

+ ERK 组平均逃避潜伏期逐渐延长, 穿越平台次数逐渐减少, 与 NC 组比较有显著差异 ($P<0.001$)。处理后 14~33 d, PIC 组与同期 CO 组和 PIC + ERK 组比较, 平均逃避潜伏期缩短, 穿越平台次数明显增多 ($P<0.001$), 与 NC 组比较, 21~28 d 定位航行实验差异显著 ($P<0.05$), 空间探索实验无显著差异 ($P>0.05$)。结果见表 1、表 2。

2.3 PIC 对大鼠脑组织形态的影响

四组大鼠海马区脑组织 HE 染色观察结果如下: NC 组细胞形态结构正常; CO 组细胞结构疏松; PIC 组结构较紧密; PIC + ERK 组细胞形态与 CO 组相近。PIC 处理后, PIC 组大鼠的脑组织细胞的形态结构没有明显的病理性变化 (见图 2)。

2.4 大鼠脑组织神经细胞超微结构观察比较

四组大鼠脑组织神经细胞超微结构观察结果 (见图 3): NC 组, 大鼠脑组织的海马区神经细胞轮廓清晰, 染色质均匀分布, 胞质清晰, 双层细胞核膜清晰完整, 胞浆内线粒体结构完整, 数量较多, 未出现空泡。CO 组和 PIC + ERK 组细胞核出现固缩, 线粒体肿胀, 嵴断裂或者变少, 甚至细胞水肿出现空泡化。PIC 组细胞轮廓较为清晰, 染色质均一, 线粒体形态规则。

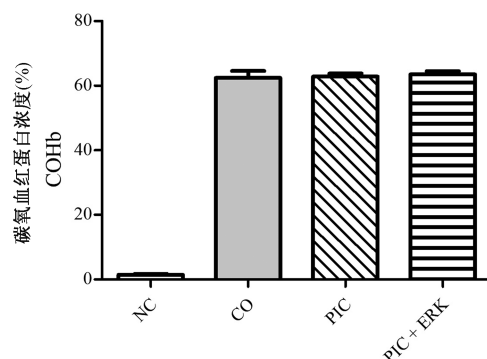


图 1 四组大鼠血液中 COHb% 比较 ($n=25$)

Figure 1 Comparison of COHb% in blood among four groups of rats

表 1 四组大鼠定位航行实验结果统计 ($n=25$)

Table 1 Statistics results of the place navigation experiments among four groups of rats

逃避潜伏期 (s) Escape latency	1~5 d	7~12 d	14~19 d	21~26 d	28~32 d
NC	12.37 $\pm$ 1.99	13.52 $\pm$ 3.31	12.21 $\pm$ 1.77	12.37 $\pm$ 1.92	12.17 $\pm$ 1.17
CO	15.44 $\pm$ 1.31	22.27 $\pm$ 2.80	59.01 $\pm$ 6.75 ***	68.08 $\pm$ 3.05 ***	79.24 $\pm$ 5.03 ***
PIC	14.77 $\pm$ 1.54	18.27 $\pm$ 4.37	19.79 $\pm$ 3.65 ###	23.08 $\pm$ 1.25 *###	26.91 $\pm$ 1.37 **###
PIC + ERK	15.09 $\pm$ 1.16	21.95 $\pm$ 2.57	56.48 $\pm$ 5.99 ***	68.85 $\pm$ 3.59 ***	78.92 $\pm$ 6.17 ***

注: 与 NC 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与 CO 组和 PIC + ERK 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

Note. Compared with NC group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with CO group and PIC + ERK group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

表 2 四组大鼠空间探索实验结果统计($n=25$)

Table 2 Statistics results of the spatial probe experiments among four groups of rats

穿越平台次数(次) Crossing platform times	6 d	13 d	20 d	27 d	33 d
NC	41.50 ± 3.54	41.00 ± 2.83	40.00 ± 2.83	39.50 ± 2.12	40.50 ± 2.12
CO	24.50 ± 4.95*	23.50 ± 4.95**	16.00 ± 1.41***	11.00 ± 4.24***	9.50 ± 3.54***
PIC	30.50 ± 9.19	26.00 ± 5.66*	35.00 ± 8.49###	29.00 ± 5.66###	29.00 ± 4.24###
PIC + ERK	27.00 ± 7.07*	24.50 ± 4.95*	17.00 ± 1.41***	11.00 ± 2.83***	10.00 ± 4.24***

2.5 四组大鼠脑组织细胞凋亡情况比较

TUNEL 染色结果见图 4, NC 组 TUNEL 阳性细胞数量少, 而 CO 组和 PIC + ERK 组有大量绿染 TUNEL 阳性细胞, PIC 组有少量 TUNEL 阳性细胞。四组阳性细胞计数结果见表, CO 组和 PIC + ERK 组显著高于 NC 组和 PIC 组($P<0.001$)。

2.6 四组大鼠脑组织海马区神经细胞线粒体膜电位改变

NC 组大鼠脑组织海马区中 MFI 值维持较高水平, 表明其神经细胞线粒体功能完整。CO 组和 PIC + ERK 组大鼠 MFI 值显著低于 NC 组, 差异具有统计学意义($P<0.001$), 说明 CO 组和 PIC + ERK 组大鼠对的神经细胞中线粒体损伤严重。PIC 组大鼠 MFI 值较 CO 组和 PIC + ERK 组高, 且差异显著($P<0.001$), 低于 NC 组, 表明经过 PIC 对 CO 中毒后大鼠的神经细胞有一定程度的保护作用。见图 5。

2.7 四组大鼠海马区氧化应激损伤指标检测

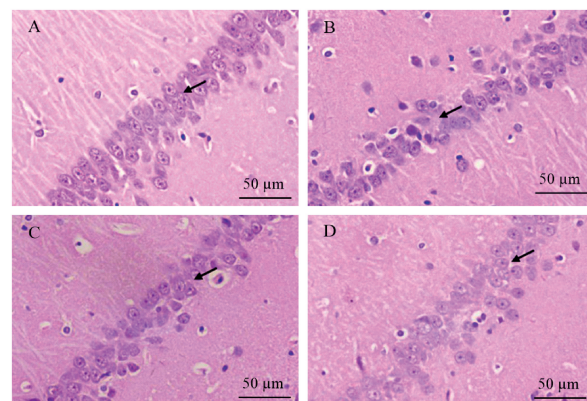
与 NC 组比较, CO 组和 PIC + ERK 组海马区 ROS 含量明显升高, 差异显著($P<0.01$)。PIC + ERK 组的 ROS 含量与 CO 组接近, 差异不显著($P>0.05$)。PIC 组与 CO 组和 PIC + ERK 组比较, ROS 含量下降, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。见图 6。

2.8 Nrf-2 及 Bcl-2 蛋白在大鼠脑组织海马区中的表达变化

Western blot 结果显示, Nrf-2、Bcl-2 蛋白的表达在四组大鼠间无显著差异($P>0.05$), PIC 组相对于 NC 组、CO 组、PIC + ERK 组, 大鼠脑组织海马区中 Nrf-2、Bcl-2 蛋白的表达水平上升。见图 7。

3 讨论

ACOP 主要是由组织持续缺氧引发的^[15]。在哺乳动物的各器官系统中, 以脑神经元细胞对缺氧最为敏感, 缺血缺氧都易造成脑损伤甚至细胞死亡, 从而引起机体出现学习、记忆机能减退等表现^[16]。ACOP 造成脑损伤, 致死率高, 治疗难度大^[17]。目前常用的治疗手段是高压氧治疗, 能有效改善急性期中毒患者组织缺氧的情况, 减轻中毒



注: A: NC 组; B: CO 组; C: PIC 组; D: PIC + ERK 组。下同。

图 2 四组大鼠脑组织 HE 染色形态观察结果($n=25$)

Note. A, NC group. B, CO group. C, PIC group. D, PIC + ERK group. The same as below.

Figure 2 Results of HE staining in brain tissues among four groups of rats

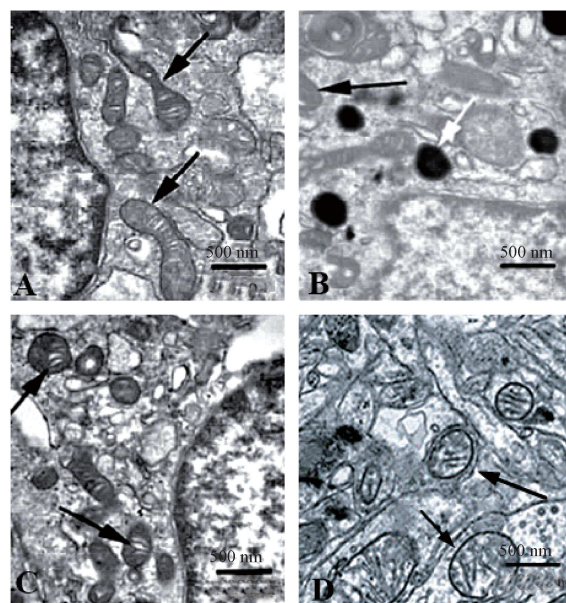
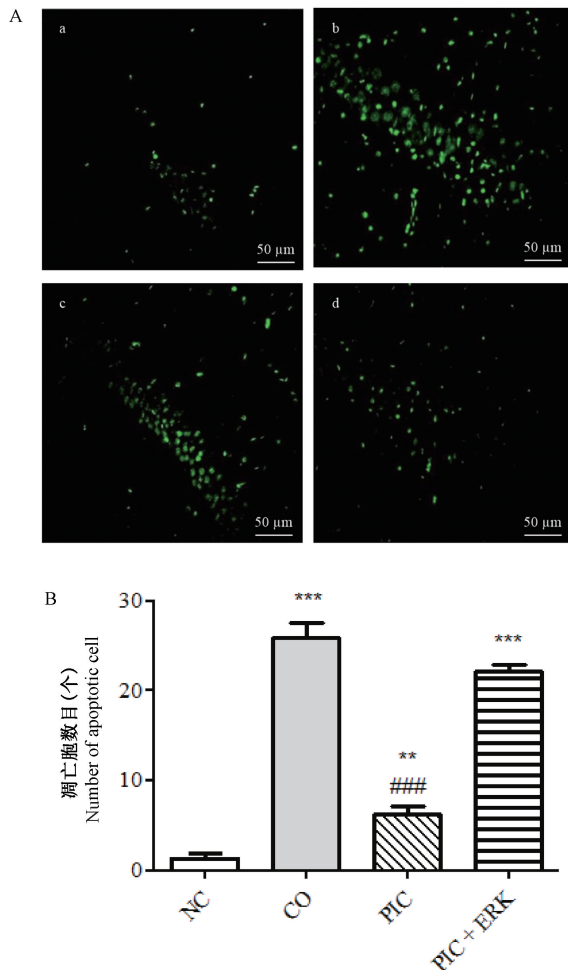


图 3 四组大鼠神经元细胞超微结构观察

Figure 3 Observation of ultra-structure of neuron among four groups of rats

症状。但是该疗法对重症患者和迟发性脑病患者的治疗效果有限^[3]。寻找新的治疗手段是目前相关学者研究的重点。已有研究认为急性 CO 中毒引起脑损伤的机制有: (1) 血液和组织的缺氧性损伤



注:A:TUNEL 染色荧光检测 B:四组大鼠凋亡细胞结果统计柱形图。与 NC 组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与 CO 组和 PIC + ERK 组比较, ### $P<0.001$ 。

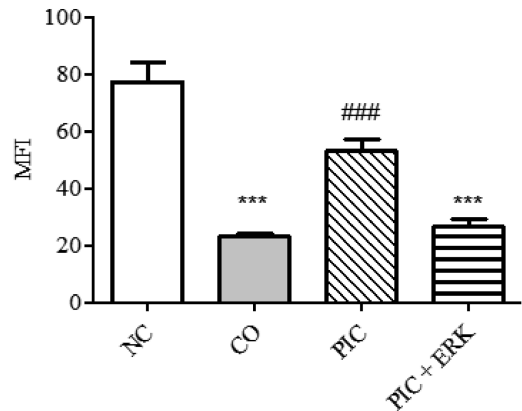
图 4 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况 ($n=25$)

Note. A, Representative images from four groups of rats. B, Comparison of apoptotic cell among four groups of rats. Compared with NC group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with CO group and PIC + ERK group, ### $P<0.001$.

Figure 4 TUNEL staining in brain of rats

及随之产生的氧化应激反应^[4,17-18]; (2) 神经炎症反应^[15]; (3) 线粒体介导神经细胞凋亡^[4]。而脑组织中海马区参与机体的学习和记忆过程,对空间定位起到了重要作用,并且对于组织缺氧造成的损伤十分敏感。已有研究表明, PIC 对于治疗神经细胞损伤有一定疗效^[11]。Morris 水迷宫实验是国内外常用的检测大鼠空间学习记忆能力的实验^[14]。

本研究对 CO 组、PIC 组和 PIC+ERK 组大鼠制备 ACOP 模型,结果显示三组大鼠血液中 COHb% 均 >40%, 明显高于 NC 组大鼠,说明大鼠 ACOP 模型制备成功。随后进行 5 次 Morris 水迷宫实验检测



注:与 NC 组比较, *** $P<0.001$;与 CO 组和 PIC + ERK 组比较, ### $P<0.001$ 。

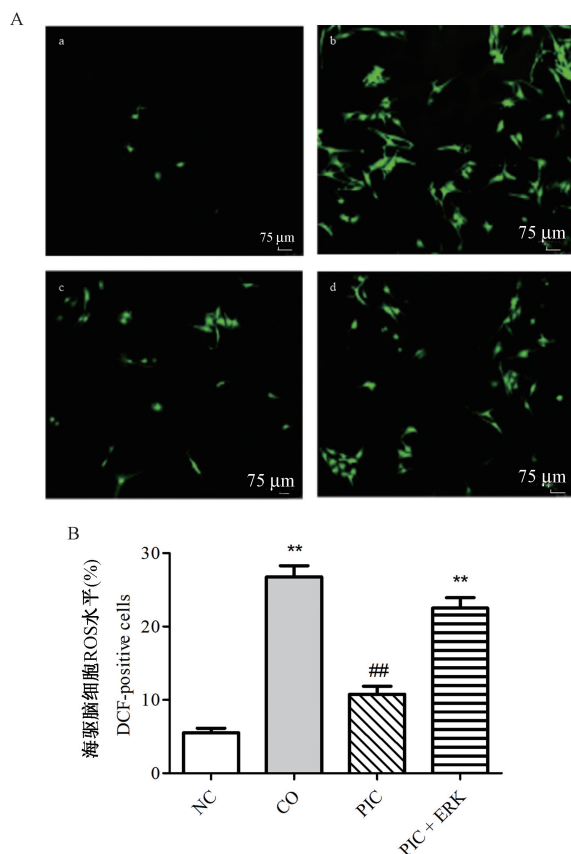
图 5 四组大鼠脑组织神经细胞 MFI 值比较 ($n=25$)

Note. Compared with NC group, *** $P<0.001$. Compared with CO group and PIC + ERK group, ### $P<0.001$.

Figure 5 Comparison of MFI value in neuron among four groups of rats

CO 的毒性对于大鼠学习记忆能力的影响,结果显示经过 PIC 治疗 14~33 d, PIC 组大鼠定位航行实验的平均逃避潜伏期明显低于 CO 组大鼠 ($P<0.05$),与 NC 组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);空间探索实验中 PIC 组大鼠跨越平台次数明显高于 CO 组大鼠 ($P<0.05$),与 NC 组无显著差异 ($P>0.05$),表明经过 PIC 处理的大鼠空间学习和记忆能力较未用药物处理的模型大鼠有明显恢复。王赜宇等^[17]研究结果显示进行 Morris 水迷宫实验 CO 中毒的模型组大鼠的逃避潜伏期较干预组和对照组明显延长,本研究结果与之相符。在行为实验观察结束后,对四组大鼠的脑组织细胞形态、凋亡情况等进行观察,比较不同处理的大鼠脑组织细胞的生理结构变化,结果显示 PIC 处理的大鼠,脑细胞形态与对照组相近,无明显的病理结构变化,凋亡细胞数目明显少于 CO 组大鼠 ($P<0.05$),说明 PIC 对急性 CO 中毒大鼠的脑损伤情况起到了保护作用。本研究将进一步探讨 PIC 对于由 CO 中毒引起的脑损伤的保护机制。

线粒体膜在细胞凋亡的起始过程中起到重要作用^[3,19]。线粒体膜电位的降低导致膜孔道的开放,使内膜及外膜的离子对流,造成呼吸链异常,进而使得线粒体功能受损^[16]。线粒体功能障碍使得细胞中氧自由基增多,ROS 含量增加,形成氧自由基连锁反应,破坏生物膜及其功能,造成细胞损伤及凋亡^[19]。线粒体介导的细胞凋亡在氧化应激的



注:A:ROS 荧光检测结果;B:四组大鼠海马区脑细胞 ROS 水平柱形图。与 NC 组比较, ** $P < 0.01$;与 CO 组和 PIC + ERK 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 6 四组大鼠海马区氧化应激损伤 ($n = 25$)

Note. A, Fluorescence detecting results of ROS. B, Comparison of DCF-positive cells to show ROS level in hippocampus among four groups of rats. Compared with NC group, ** $P < 0.01$. Compared with CO group and PIC + ERK group, ## $P < 0.01$.

Figure 6 Oxidative stress level detection in hippocampus among four groups of rats

生理过程中发挥着重要作用。本研究对四组大鼠神经元细胞超微结构的观察与线粒体膜电位的检测,可以看出未经药物处理的模型大鼠神经细胞中线粒体结构受到严重破坏,CO 组大鼠与 NC 组比较,线粒体膜电位明显下降,细胞中 ROS 含量显著增加($P < 0.05$),该结果与已有研究一致^[3]。而采用 PIC 灌胃处理的大鼠,线粒体结构较为完整,与 CO 组比较,MMP 下降程度低,对线粒体功能影响较小,细胞中 ROS 含量较低($P < 0.05$),说明 PIC 可能对于 CO 造成的线粒体结构损伤起到了保护作用。

Bcl-2 蛋白是目前最受关注的凋亡相关蛋白,分布于线粒体膜、内质网和核膜孔周围^[16,20]。已有研究报道,细胞受损情况与细胞中 ERK 通路的激活情

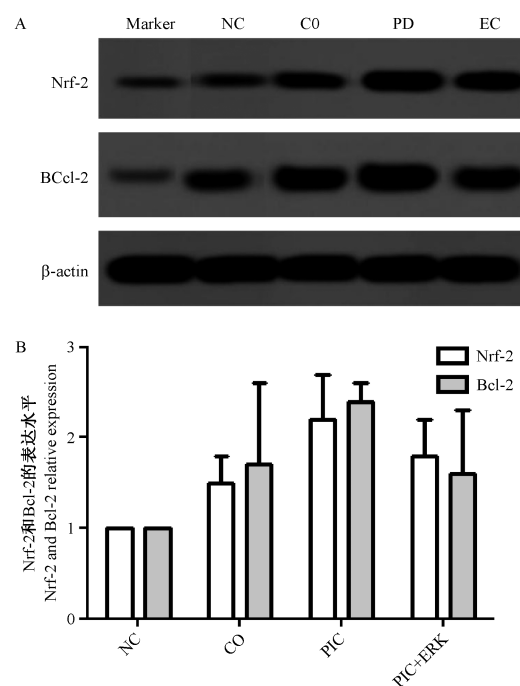


图 7 Western blot 检测 Nrf-2 和 Bcl-2 蛋白表达水平 ($n = 25$)

Figure 7 Relative expression of Nrf-2 and Bcl-2 protein detected by Western blot in brain tissue among four groups of rats

况相关,通过激活 ERK 信号通路,能诱发下游细胞信号分子 Bcl-2 的表达,从而抑制细胞凋亡^[5]。PIC 抑制细胞凋亡,减轻脑损伤与 MAPK/ERK 信号通路有关^[10]。通过实验证明,激活 ERK 信号通路可以上调 Nrf-2 蛋白的表达^[20-22]。根据研究报道,CO 中毒后,人为诱导 Nrf-2 过表达能发挥其抗氧化机制^[3]。Nrf-2 能被多种外源物质诱导,是常用抗氧化应激治疗的靶向位点。PIC 已被证明通过上调 Nrf-2 蛋白的表达水平有助于缓解细胞的炎症反应和氧化应激反应,对组织损伤起到保护作用^[9,23]。在本研究中,与 CO 组大鼠相比,PIC 处理的大鼠 Nrf-2 和 Bcl-2 的表达量增加($P < 0.05$),同时采用 PIC 和 ERK 抑制剂处理模型大鼠相较于 NC 组大鼠,其学习记忆能力下降明显,脑组织细胞形态异常,神经细胞凋亡数目较多,超微结构受到损害,MMP 值显著下降,ROS 含量上升,Nrf-2 和 Bcl-2 蛋白的表达下降($P < 0.05$),说明 PIC 可能通过激活 ERK 信号通路,使 Nrf-2、Bcl-2 蛋白过表达,来保护线粒体结构的完整,抑制氧化应激反应。

基于以上结果推测,PIC 可能通过调控 MAPK/ERK 信号通路,上调 Nrf-2 和 Bcl-2 蛋白的表达,有效保护了大鼠脑组织,防止急性重症 CO 中毒引起的损害。

参考文献:

- [1] Li Q, Bi MJ, Bi WK, et al. Edaravone attenuates brain damage in rats after acute CO poisoning through inhibiting apoptosis and oxidative stress [J]. *Environ Toxicol*, 2016, 31(3): 372-379.
- [2] Wang L, Xu JH, Guo DD, et al. Fasudil alleviates brain damage in rats after carbon monoxide poisoning through regulating neurite outgrowth inhibitor/oligodendrocyte myelin glycoprotein signalling pathway [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2019, 125(2): 152-165.
- [3] 周谓栋, 丁晓瑜, 王利, 等. 靶向调节 Nrf2 基因对急性重症一氧化碳中毒大鼠脑损伤的神经保护作用 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2018, 27(10): 870-876.
- [4] 丁晓瑜, 王利, 毕伟康, 等. 莱菔硫烷对急性一氧化碳中毒大鼠脑组织神经细胞线粒体损伤的治疗作用 [J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2018, 25(4): 213-219.
- [5] 李峥, 高项羽, 刘喆, 等. 丙泊酚通过 MAPK/ERK 信号通路对谷氨酸诱导的神经 PC12 细胞损伤的抑制作用 [J]. *中国药房*, 2016, 27(1): 61-63.
- [6] 薛战尤, 王安海, 赵元, 等. 香芹酚通过 MAPK/ERK 信号通路对缺血再灌注后脑损伤大鼠的保护作用 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(23): 2473-2476.
- [7] 房祥杰, 张彬, 张德重, 等. 迷迭香酸通过 MAPK/ERK 信号通路对结肠癌细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国肿瘤*, 2018, 27(4): 306-310.
- [8] 郁迪, 莫绪明. PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路在缺血性脑损伤中的保护作用 [J]. *医学综述*, 2015, 21(2): 210-213.
- [9] 姚重阳. 白皮杉醇通过调控 Nrf2 抑制 NLRP3 炎症体激活减轻高糖诱导的足细胞损伤 [D]. 郑州: 郑州大学, 2018.
- [10] 杜倩, 侯旭, 李剑波, 等. 白皮杉醇对青光眼大鼠视网膜神经节细胞的保护作用 [J]. *眼科新进展*, 2017, 37(6): 527-530, 547.
- [11] 任应国, 张保朝, 贾东佩, 等. 白皮杉醇对急性脑出血大鼠的保护作用及其机制 [J]. *中华高血压杂志*, 2018, 26(3): 271-275.
- [12] 余群星. 基于 Morris 水迷宫学习记忆方法的研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2015.
- [13] 杨玉洁, 李玉姣, 李杉杉, 等. 用于评价大小鼠学习记忆能力的迷宫实验方法比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(12): 129-134.
- [14] 胡小东, 关浩, 杨立山. Morris 水迷宫在筛选急性 CO 中毒迟发性脑病模型中的应用 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2020, 42(1): 25-29.
- [15] 雷蕊琦, 蒋力, 辜刚凤, 等. 虾青素对急性一氧化碳中毒大鼠海马 NF- κ B 炎症信号通路相关蛋白表达的影响 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2019, 28(12): 1064-1069.
- [16] 胡尧. 红景天对缺氧脑损伤的保护作用及其神经元线粒体 MPTP 机制的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [17] 王鲲宇, 唐圣桃, 邱峰, 等. 正丁基苯酚对急性一氧化碳中毒大鼠脑组织氧化应激的调节及其机制的实验研究 [J]. *北京医学*, 2019, 41(5): 54-57.
- [18] 马竞, 何文龙, 高重阳, 等. 盐酸小檗碱对脂多糖诱导的大鼠急性脑损伤后脑组织形态学和 NF- κ B 活性的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(21): 2582-2586.
- [19] 李梦. 3-巯基丙酮酸硫转移酶产生的 H₂S 对大鼠脑血管张力和其内皮细胞缺氧性损伤的影响 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
- [20] Bai ZF, Wang ZJ. Genistein protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity through Nrf-2/HO-1 signaling in mice model [J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(5): 645-651.
- [21] 向绍通, 徐书雯, 肖豪, 等. 槲皮苷通过 ERK1/2-Nrf2 通路发挥对 A β 25-35 诱导的阿尔兹海默病大鼠模型的神经保护作用 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2018, 47(1): 27-32, 37.
- [22] Yu Y, Shen Q, Lai Y, et al. Anti-inflammatory effects of curcumin in microglial cells [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 386.
- [23] 赵伟, 李瑾, 朱向东, 等. 血红素氧合酶-1 在糖尿病大鼠视网膜中的表达及意义 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(20): 5035-5038.

[收稿日期] 2020-08-26