

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.13.002

文章编号: 1005-8982 (2018) 13-0009-08

## BQ-123 对蛛网膜下腔出血大鼠 神经功能的保护作用研究 \*

赵雅宁<sup>1</sup>, 李建民<sup>2</sup>, 孙竹梅<sup>1</sup>, 赵旭<sup>2</sup>, 郭向飞<sup>1</sup>, 薛承景<sup>2</sup>

(1. 华北理工大学 护理与康复学院, 河北 唐山 063210;

2. 华北理工大学附属医院, 河北 唐山 063000)

**摘要:** **目的** 探讨 BQ-123 对蛛网膜下腔出血 (SAH) 的治疗作用及其机制。**方法** 160 只雄性 SD 大鼠, 随机分为假手术 (Sham) 组、SAH 组、雷帕霉素组、低剂量 BQ-123 组、高剂量 BQ-123 组。2 次注血法复制 SAH 大鼠模型; 光镜观察海马区形态结构变化; 免疫组织化学法检测海马区雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、自噬相关基因 Beclin-1 和微管相关蛋白 1 轻链 (LC3) - II 的表达; 实时逆转录聚合酶链反应 (real-time RT-PCR) 检测 mTOR、Beclin-1 和 LC3 的 mRNA 表达; 抓力测定实验评价各时间点大鼠前肢拉力情况; 穿梭箱实验测试动物的学习功能。**结果** 与 Sham 组比较, SAH 组海马区 mTOR、Beclin-1 和 LC3 mRNA 表达增加, 存活神经元细胞数量减少, 大鼠的学习功能和拉力值下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 SAH 组比较, 雷帕霉素组海马区 mTOR mRNA 表达降低、Beclin-1 和 LC3 mRNA 表达增高, 存活神经元细胞数量增多, 大鼠的学习功能和拉力值改善, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 SAH 组比较, BQ-123 组海马区 mTOR mRNA 降低、Beclin-1 和 LC3 mRNA 表达增高, 存活神经元细胞数量增多, 动物学习功能指标和拉力值改善, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且上述变化在高剂量 BQ-123 更为明显。**结论** BQ-123 可改善 SAH 大鼠神经功能缺陷, 抑制 mTOR 激活, 从而提高海马区神经细胞自噬程度。

**关键词:** 蛛网膜下腔出血; 神经细胞; 雷帕霉素靶蛋白; 自噬

**中图分类号:** R743.34

**文献标识码:** A

## Protective effect of BQ-123 on neural function of rats with subarachnoid hemorrhage\*

Ya-ning Zhao<sup>1</sup>, Jian-min Li<sup>2</sup>, Zhu-mei Sun<sup>1</sup>, Xu Zhao<sup>2</sup>, Xiang-fei Guo<sup>1</sup>, Cheng-jing Xue<sup>2</sup>

(1. College of Nursing and Rehabilitation, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China; 2. Affiliated Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the therapeutical effect of BQ-123 on subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats, and explore the mechanisms. **Methods** Totally 160 male SD rats were divided into 5 groups: sham operation (sham) group, SAH group, Rapamycin group, low-dosage and high-dosage BQ-123 groups. The animal models were established by injecting the autologous blood into cisterna magna twice. Optical microscopy was used to observe the morphological changes of neurons in the hippocampi at each time point. The expressions of mTOR, Beclin-1 and LC3-II proteins in the hippocampi of the rats were detected with immunohistochemistry. RT-PCR was used to detect the mRNA expressions of mammalian target of Rapamycin (mTOR), Beclin-1 and LC3. The grip experiment was used to evaluate the forelimb grip of the rats at each time point and the shuttle-box experiment was used to

收稿日期: 2017-04-25

\* 基金项目: 河北省卫生厅重点医学项目 (No: zd2013087); 唐山市科技局课题 (No: 14130220B)

[通信作者] 李建民, E-mail: 15133916661@163.com

evaluate the ability of learning. **Results** Compared with the sham group, the expressions of mTOR, Beclin-1 and LC3 mRNAs increased and the number of alive nerve cells decreased in the hippocampi, the measured grip scores and the ability of learning significantly declined in the SAH group ( $P < 0.05$ ). Compared with the SAH group, the expression of mTOR mRNA in the hippocampi decreased, the expressions of Beclin-1 mRNA and LC3 mRNA in the hippocampi increased, and the number of alive neurons increased, and the measured grip scores and the ability of learning increased in the Rapamycin group ( $P < 0.05$ ). The expression of mTOR mRNA in the hippocampi decreased, the expressions of Beclin-1 mRNA and LC3 mRNA in the hippocampi and the number of alive nerve cells increased, the measured grip scores and the ability of learning also increased in the BQ-123 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** BQ-123 can improve neurological function after subarachnoid hemorrhage in rats, which is related to inhibition of mTOR activation and increase of neuron autophagy in the hippocampi.

**Keywords:** subarachnoid hemorrhage; nerve cell; mammalian target of Rapamycin; autophagy

近年的统计发现我国蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 的发病率为 1‰, 死亡率高达 30%。除此之外, 约有 60% 以上的患者疑有认知功能缺失及精神障碍等后遗症, 严重影响患者生存质量及再就业<sup>[1]</sup>。目前, 临床治疗中高度重视早期神经保护剂的应用, 以防治 SAH 造成的神经缺陷。BQ-123 是由 5 个氨基酸组成的五环肽, 是内皮素受体 (endothelin receptor A, ETA) 拮抗剂, 可降低血管痉挛、抑制交感神经系统及肾素-血管紧张素系统活性, 目前已初步证实对 SAH 有一定的保护作用<sup>[2]</sup>, 但具体机制尚不明确。研究显示, SAH 导致神经功能缺陷的关键是脑损伤后细胞正常的稳态环境受到破坏, 某些信号转导系统发生紊乱, 导致神经细胞死亡<sup>[1-3]</sup>。自噬是溶酶体对自身结构进行吞噬降解的过程。研究发现自噬广泛存在于正常的生理病理过程中, 该过程包括细胞废物清除、结构重建、生长分化、营养缺乏和肿瘤发生等<sup>[4]</sup>。雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其激活后通过磷酸化其下游的靶蛋白, 进而影响细胞自噬进程, 在中枢神经系统疾病中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。但 BQ-123 对 SAH 神经功能损伤的保护作用是否与 mTOR-自噬通路的活化有关, 目前报道甚少。本研究复制大鼠 SAH 模型, 应用 mTOR 特异抑制剂雷帕霉素和不同剂量 BQ-123 进行干预, 观察其对海马区磷酸化 mTOR、自噬关键因子 Beclin-1 和微管相关蛋白 1 (轻链 LC3)-II (两者是自噬过程中特异因子, 可折射出自噬发生、发展的程度) 以及大鼠神经功能的影响, 以探讨 BQ-123 对 SAH 的治疗机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 160 只, 体重

350 ~ 450 g 购置于北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)2009-003。随机分为假手术组 (Sham 组)、蛛网膜下腔出血组 (SAH 组)、雷帕霉素组、BQ-123 低剂量组和 BQ-123 高剂量组, 每组 32 只。每组分为 6、24、72 及 144 h 4 个时间亚组。

1.1.2 主要试剂 Anti-mTOR、Anti-Beclin1、Anti-LC3-II (兔抗大鼠) (北京博奥森公司), mTOR、Beclin-1、LC3 引物 (生工生物工程上海股份有限公司), 实时逆转录聚合酶链反应 (real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, real-time RT-PCR) 试剂盒 (大连宝生物公司), 免疫组织化学二抗试剂盒 pv6001 (北京中杉金桥公司)。

### 1.2 仪器与设备

Nikon 摄影生物光学显微镜 (日本 Nikon 公司), 5417R 冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司), ZH-CSC 型穿梭箱及抓力测试仪 (安徽正华生物仪器设备有限公司), 眼科镊、眼科剪、无菌线及缝合针等 (上海手术器械厂)。

### 1.3 方法

1.3.1 动物模型复制 参考文献 [6], 采用经典的自体血 2 次枕大池注血法 (间隔 48 h 分别向枕大池注射自体动脉血 0.3 ml) 复制大鼠 SAH 模型。Sham 组向枕大池 2 次注入 0.3 ml 生理盐水, 余操作均与 SAH 组一致。雷帕霉素组: 复制模型前 30 min 侧脑室注射, 剂量为 5  $\mu$ l (10 nmol) / 只。BQ-123 高、低剂量组: 在复制模型前 30 min 尾静脉注射 BQ-123 (将 BQ-123 用生理盐水按 10  $\mu$ g/ml 稀释, 低剂量组每次给予 50  $\mu$ g/kg、高剂量组每次给予 75  $\mu$ g/kg), 然后再复制 SAH 模型。48 h 后重复给药 1 次。

1.3.2 模型复制成功判定标准 当行 2 次枕大池注血时, 可见少量血性脑脊液在穿刺部位渗出, 该现象

充分说明穿刺针位置准确;剥离脑部时肉眼可见极其显眼的血性液体散在分布脑底基底池部位。模型复制过程中,SAH 组死亡 7 只,1 只模型不符合标准被剔除;雷帕霉素组死亡 8 只,BQ-123 低剂量组死亡 4 只,BQ-123 高剂量组死亡 2 只。上述被剔除动物依次补齐,最终纳入统计学分析:Sham 组、SAH 组、雷帕霉素组、BQ-123 低剂量组和 BQ-123 高剂量组,每组 32 只大鼠。

**1.3.3 神经功能评测** 学习能力评测:每组各时间取 4 只大鼠,参考文献[7],采用 ZH-CSC 型穿梭实验视频分析系统(shuttle box system, SBS)分别测定动物行为学能力。每只大鼠被电击 30 次,记录被动回避潜伏期(passive avoidance latency, PAL)和主动回避反应次数,主动回避反应次数占总训练次数的百分比即为主动回避反应率(active avoidance reaction rate, AARR)。AARR 越高, PAL 越短,表明动物学习能力越强。抓力实验:每组各时间点取 4 只大鼠,将大鼠放置于抓力测试仪上恰当位置,用脚踩下踏板将显示器读数归零,用手拉住鼠尾向后下方施加轻微力量,待大鼠握紧抓力杆时,继续增加力道,直至大鼠肢体无法抵抗外力且听到“滴”的响声时,记录数值为本次拉力值。每只大鼠行 3 次测试,大鼠中间需休息 5 min,取平均值作为最终结果。上述各组各时间完成动物神经功能评测后,分别处死,进行病理学及 RT-PCR 检测。

**1.3.4 脑组织皮质区形态结构观察** 每组各时间取 4 只大鼠,4% 多聚甲醛灌注固定后,取脑,截取视交叉平面至大脑横裂脑组织。石蜡包埋、冠状切片,片厚 5  $\mu\text{m}$ , HE 染色。光学显微镜下观察。在有测微尺的光学显微镜( $\times 400$ )下观察海马 CA1 区神经元形态变化并计数该视野下的存活神经元数量(有明显细胞膜、细胞核和核仁为存活神经细胞)。具体方法:每只动物取 5 张海马区切片,每张切片选取 5 个不重复的视野,所以每组都是 100 个视野,选用 Motic 6.0 图像采集以及分析系统计算每个视野存活神经元数,以 CA1 区每个视野下平均存活细胞数量表示。

**1.3.5 免疫组织化学法检测 mTOR、Beclin-1 和 LC3- II 的表达** 标本采集同 HE 染色,切片常规脱蜡至去离子水,滴加复合消化液后入 37℃ 温箱孵育 20 min,经 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,入 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶 15 min,经 PBS 洗涤后滴加兔抗鼠 mTOR、Beclin-1 和 LC3- II 多克隆抗体(1 : 300, 1 : 250, 1 : 250),4℃ 过夜;37℃ 复温 45 min, PBS

洗涤后滴加生物素化二抗,37℃ 40 min, PBS 洗涤;DAB 显色,苏木精轻度复染,脱水透明,封片。镜下观察并摄片。

**1.3.6 real time RT-PCR 检测 mTOR、Beclin-1 及 LC3 mRNA 表达** 各组各时间点取 4 只大鼠,致死后迅速取双侧海马区组织,称量 0.6 g,加入 1 ml RNAiso Plus 溶液后匀浆,室温静置 5 min 后 12 000 r/min 4℃ 离心 5 min,取上清液移至新的 1.5 ml 离心管内,加入 1/5 RNAiso Plus 溶液体积的氯仿,震荡混匀后室温静置 5 min,12 000 r/min 4℃ 离心 15 min,将上清液转移至新离心管中,加入 0.5 ~ 1.0 倍 RNAiso Plus 溶液体积的异丙醇,室温静置 10 min,12 000 r/min 4℃ 离心 10 min,弃掉上清液,用与 RNAiso Plus 溶液等量的 75% 乙醇清洗沉淀,7 500 r/min 4℃ 离心 5 min,弃上清保留沉淀,干燥(不可加热),溶解于 30  $\mu\text{l}$  DEPC 处理水中,测量 OD260/280 值,根据 OD260 计算 RNA 浓度,置入 -80℃ 冰箱冷冻保存。

**1.3.7 检测步骤** m-TOR 引物:正向 5'-GGTGGACG AGCTCTTTGTCA-3',反向 5'-AGGAGCCCTAACACT CGGAT-3';Beclin-1 引物:正向 5'-CTCTCGTCAAGGC GTCACCTC-3',反向 5'-CCTTAGACCCCTCCATTCCTC A-3;LC3 引物:正向 5'-ACCCCTCTACGATGCTGGTG A-3',反向 5'-GCTGTCTCAATGTCCTTCTG-3'。进行 real time One Step RT-PCR 反应:反应条件为 95℃ 预变性 10 min 后,95℃ 5 s,60℃ 31 s 进行 30 个循环,72℃ 延伸 10 min。将所扩增的 PCR 产物进行熔解曲线分析。用 Gen Amp 5700 SDS Software 分析结果及 PCR 扩增产物生成曲线。以内参 GAPDH mRNA CT 值标化 mTOR、Beclin-1 和 LC3 mRNA 的 Ct 值,得到相对 Ct 值,具体采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法( $\Delta C_t$ = 目的基因平均 Ct 值 - 管家基因平均 Ct 值,  $\Delta\Delta C_t$ = 实验组  $\Delta C_t$  - 对照组  $\Delta C_t$ , 相对表达量  $= 2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) 进行计算。

## 1.4 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,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- $q$  检验,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 组织病理学检测结果

采用单因素方差分析,结果显示,各组大鼠海马区存活神经细胞数量比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );

与 Sham 组比较, SAH 组术后各时间存活神经细胞数降低 ( $P < 0.05$ ); 与 SAH 组比较, 雷帕霉素组、低和高剂量 BQ-123 组术后各时间点存活神经细胞数增加 ( $P < 0.05$ ); 高剂量 BQ-123 组术后各时间点存活神经细胞数量高于低剂量 BQ-123 组 ( $P < 0.05$ ) (见表 1)。Sham 组, 海马区神经细胞排列整齐、细胞形态结构正常, 神经元胞体较大, 胞核大而圆, 核仁清晰; SAH 组, 海马区可见神经细胞变性水肿, 细胞轮廓模糊, 亦可见死亡神经细胞, 表现为细胞出现核溶解、核碎裂或核消失结构不清; 雷帕霉素组神经元结构损伤减轻, 大部分细胞排列整齐、细胞结构完整; 低和高剂量 BQ-123 组各时间点神经细胞形态结构减轻, 视野中

结构完整神经细胞增多, 在高剂量 BQ-123 组变化尤为明显 (见图 1)。

## 2.2 神经功能检测结果

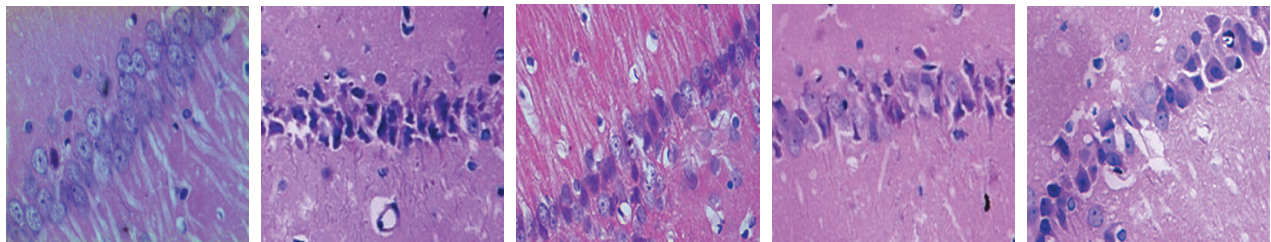
**2.2.1 穿梭实验结果** 采用单因素方差分析, 结果显示各组大鼠不同时间 AARR 和 PAL 比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 Sham 组比较, SAH 组大鼠对刺激反应迟钝, 动物的 AARR 减少、PAL 延长 ( $P < 0.05$ ); 与 SAH 组比较, 雷帕霉素组、低和高剂量 BQ-123 组大鼠对刺激反应灵敏, 动物的 AARR 增多、PAL 缩短 ( $P < 0.05$ ), 上述变化在高剂量 BQ-123 组最为明显。见表 2、3。

**2.2.2 抓力实验结果** 采用单因素方差分析, 结果

表 1 各组大鼠不同时间海马区存活神经细胞数量比较 (个/高倍视野,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别           | 6 h                                 | 24 h                                | 72 h                                | 144 h                               |
|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Sham 组       | 188.65 $\pm$ 20.90                  | 189.8 $\pm$ 19.85                   | 190.10 $\pm$ 20.05                  | 189.80 $\pm$ 19.90                  |
| SAH 组        | 120.65 $\pm$ 16.50 <sup>1)</sup>    | 93.00 $\pm$ 12.65 <sup>1)</sup>     | 72.60 $\pm$ 10.80 <sup>1)</sup>     | 80.75 $\pm$ 9.80 <sup>1)</sup>      |
| 雷帕霉素组        | 140.56 $\pm$ 15.30 <sup>2)</sup>    | 122.8 $\pm$ 14.25 <sup>2)</sup>     | 98.36 $\pm$ 15.20 <sup>2)</sup>     | 110.72 $\pm$ 10.55 <sup>2)</sup>    |
| 低剂量 BQ-123 组 | 132.45 $\pm$ 18.45 <sup>2)</sup>    | 110.80 $\pm$ 16.45 <sup>2)</sup>    | 84.25 $\pm$ 12.60 <sup>2)</sup>     | 92.20 $\pm$ 10.25 <sup>2)</sup>     |
| 高剂量 BQ-123 组 | 152.80 $\pm$ 19.70 <sup>2) 3)</sup> | 130.75 $\pm$ 17.50 <sup>2) 3)</sup> | 136.90 $\pm$ 18.75 <sup>2) 3)</sup> | 134.80 $\pm$ 16.80 <sup>2) 3)</sup> |
| F 值          | 204.797                             | 225.012                             | 240.014                             | 133.630                             |
| P 值          | 0.000                               | 0.000                               | 0.000                               | 0.000                               |

注: 1) 与 Sham 组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 SAH 组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与低剂量 BQ-123 组比较,  $P < 0.05$



A Sham 组

B SAH 组

C 雷帕霉素组

D 低剂量 BQ-123 组

E 高剂量 BQ-123 组

图 1 各组大鼠 24 h 海马 CA1 区神经细胞形态 (HE 染色  $\times 400$ )

表 2 各组大鼠不同时间 AARR 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别           | 6 h                               | 24 h                              | 72 h                              | 144 h                             |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Sham 组       | 73.67 $\pm$ 1.63                  | 74.17 $\pm$ 2.14                  | 75.67 $\pm$ 1.86                  | 76.83 $\pm$ 1.72                  |
| SAH 组        | 40.33 $\pm$ 1.63 <sup>1)</sup>    | 48.17 $\pm$ 2.32 <sup>1)</sup>    | 53.00 $\pm$ 1.55 <sup>1)</sup>    | 59.17 $\pm$ 2.04 <sup>1)</sup>    |
| 雷帕霉素组        | 44.05 $\pm$ 1.34 <sup>2)</sup>    | 51.95 $\pm$ 1.96 <sup>2)</sup>    | 56.45 $\pm$ 1.68 <sup>2)</sup>    | 64.38 $\pm$ 2.04 <sup>2)</sup>    |
| 低剂量 BQ-123 组 | 43.78 $\pm$ 1.29 <sup>2)</sup>    | 52.53 $\pm$ 1.83 <sup>2)</sup>    | 55.13 $\pm$ 1.52 <sup>2)</sup>    | 64.27 $\pm$ 2.16 <sup>2)</sup>    |
| 高剂量 BQ-123 组 | 45.83 $\pm$ 1.72 <sup>2) 3)</sup> | 55.12 $\pm$ 1.47 <sup>2) 3)</sup> | 60.17 $\pm$ 2.14 <sup>2) 3)</sup> | 65.67 $\pm$ 2.25 <sup>2) 3)</sup> |
| F 值          | 122.422                           | 152.477                           | 92.428                            | 95.288                            |
| P 值          | 0.000                             | 0.000                             | 0.000                             | 0.000                             |

注: 1) 与 Sham 组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 SAH 组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与低剂量 BQ-123 组比较,  $P < 0.05$

表 3 各组大鼠不同时间 PAL 比较 (s,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别           | 6 h                           | 24 h                          | 72 h                          | 144 h                         |
|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Sham 组       | 16.33 ± 1.21                  | 16.67 ± 1.03                  | 16.67 ± 1.21                  | 17.33 ± 0.82                  |
| SAH 组        | 50.83 ± 1.47 <sup>1)</sup>    | 40.17 ± 1.60 <sup>1)</sup>    | 34.17 ± 1.72 <sup>1)</sup>    | 28.33 ± 1.50 <sup>1)</sup>    |
| 雷帕霉素组        | 47.56 ± 1.67 <sup>2)</sup>    | 36.85 ± 1.35 <sup>2)</sup>    | 30.23 ± 1.66 <sup>2)</sup>    | 23.96 ± 1.52 <sup>2)</sup>    |
| 低剂量 BQ-123 组 | 48.12 ± 1.55 <sup>2)</sup>    | 37.50 ± 1.52 <sup>2)</sup>    | 29.83 ± 1.60 <sup>2)</sup>    | 24.83 ± 1.38 <sup>2)</sup>    |
| 高剂量 BQ-123 组 | 46.00 ± 1.41 <sup>2) 3)</sup> | 35.83 ± 1.17 <sup>2) 3)</sup> | 27.67 ± 1.37 <sup>2) 3)</sup> | 20.83 ± 1.47 <sup>2) 3)</sup> |
| F 值          | 44.492                        | 83.102                        | 105.428                       | 97.955                        |
| P 值          | 0.000                         | 0.000                         | 0.000                         | 0.000                         |

注: 1) 与 Sham 组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 SAH 组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与低剂量 BQ-123 组比较,  $P < 0.05$

显示各组大鼠不同时间的抓力实验拉力值比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 Sham 组比较, SAH 组各时间抓力测定分值显著降低, 其中 6 h 拉力值最低 ( $P < 0.05$ ); 与 SAH 组比较, 雷帕霉素组、低和高剂量 BQ-123 组大鼠各时间点分值均有所升高 ( $P < 0.05$ ); 上述变化在高剂量 BQ-123 组最为明显。见表 4。

2.3 各组大鼠 mTOR、Beclin-1、LC3-II 阳性表达比较

mTOR、Beclin-1、LC3-II 阳性表达主要位于细胞核, 阳性细胞的胞核可见细小的棕黄色颗粒。Sham 组可见少量 mTOR、Beclin-1、LC3-II 阳性细胞, 染色棕黄。与 Sham 组比较, SAH 组各时间的磷酸化

mTOR、Beclin-1、LC3-II 免疫阳性反应增强; 与 SAH 组比较, 雷帕霉素组 mTOR 免疫阳性反应降低, Beclin-1、LC3-II 免疫阳性反应增高; 与 SAH 组比较, BQ-123 干预组 mTOR 免疫阳性反应降低, Beclin-1、LC3-II 免疫阳性反应进一步增强。见图 2。

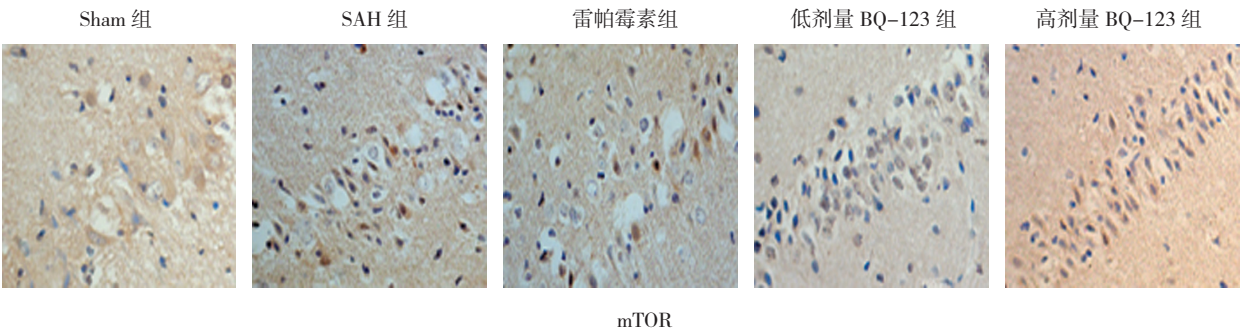
2.4 各组大鼠 mTOR、Beclin-1、LC3 mRNA 表达比较

由表 5~7 可见, 采用单因素方差分析, 结果显示各组大鼠海马区 mTOR、Beclin-1 及 LC3 mRNA 表达水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 Sham 组比较, SAH 组各时间 mTOR、Beclin-1 及 LC3 mRNA 表达水平增高, 其中 mTOR mRNA 24 h 达高峰, 持续

表 4 各组大鼠不同时间的抓力实验拉力值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别           | 6 h                               | 24 h                              | 72 h                              | 144 h                             |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Sham 组       | 2 000.53 ± 0.26                   | 2 000.40 ± 0.21                   | 2 000.43 ± 0.29                   | 2 000.47 ± 0.22                   |
| SAH 组        | 776.93 ± 18.31 <sup>1)</sup>      | 1 110.17 ± 16.30 <sup>1)</sup>    | 1 333.57 ± 11.20 <sup>1)</sup>    | 1 435.48 ± 15.53 <sup>1)</sup>    |
| 雷帕霉素组        | 905.30 ± 16.26 <sup>2)</sup>      | 1 253.36 ± 18.25 <sup>2)</sup>    | 1 495.62 ± 12.65 <sup>2)</sup>    | 1 598.20 ± 12.45 <sup>2)</sup>    |
| 低剂量 BQ-123 组 | 916.07 ± 15.19 <sup>2)</sup>      | 1 224.02 ± 20.18 <sup>2)</sup>    | 1 421.47 ± 11.50 <sup>2)</sup>    | 1 511.02 ± 36.10 <sup>2)</sup>    |
| 高剂量 BQ-123 组 | 1 077.08 ± 30.84 <sup>2) 3)</sup> | 1 439.02 ± 13.41 <sup>2) 3)</sup> | 1 612.43 ± 13.65 <sup>2) 3)</sup> | 1 717.95 ± 13.16 <sup>2) 3)</sup> |
| F 值          | 267.764                           | 588.619                           | 823.885                           | 224.161                           |
| P 值          | 0.000                             | 0.000                             | 0.000                             | 0.000                             |

注: 1) 与 Sham 组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 SAH 组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与低剂量 BQ-123 组比较,  $P < 0.05$



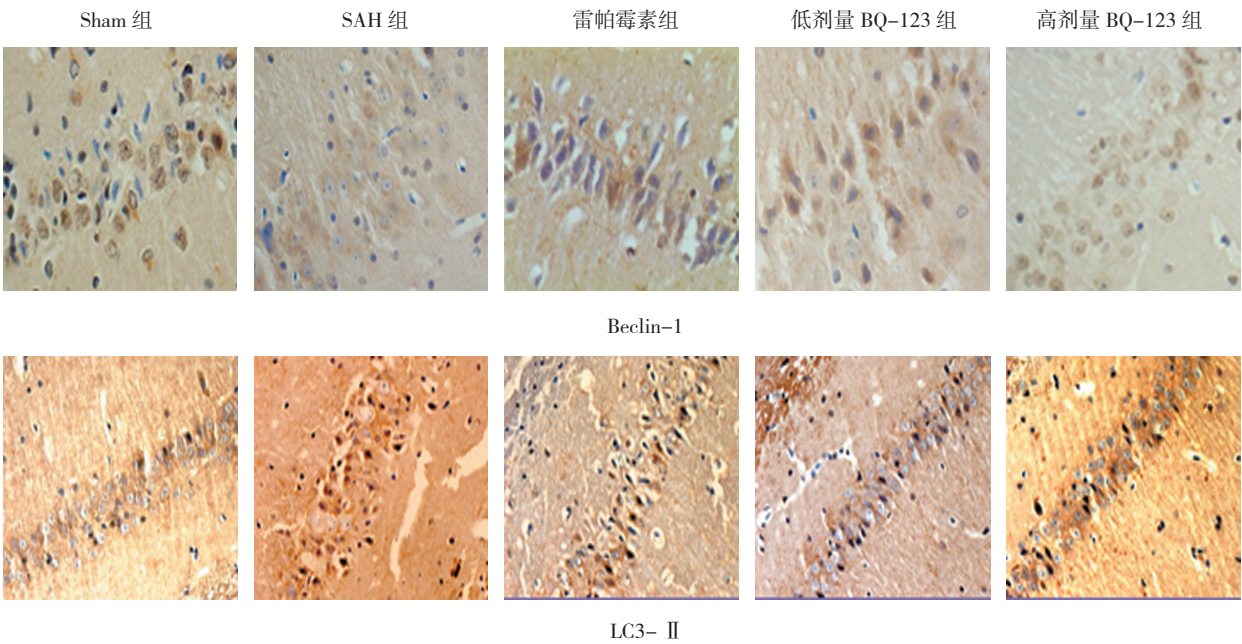


图 2 各组大鼠 24 h 海马 CA1 区 mTOR、Beclin-1 和 LC3- II 表达 （免疫组织化学法 × 400）

至 72 h 仍有较高水平表达，而 Beclin-1、LC3 mRNA 表达水平于 24 h 达高峰后，72 h 迅速下降，但仍高于 Sham 组（ $P<0.05$ ）；与 SAH 组比较，雷帕霉素组各时 间点 mTOR mRNA 表达降低，Beclin-1 和 LC3 mRNA 表达水平增高（ $P<0.05$ ）；与 SAH 组比较，BQ-123 干预组各时间 mTOR mRNA 表达水平降低、Beclin-1

表 5 各组大鼠海马区 mTOR 的 mRNA 相对表达量比较 （ $\bar{x} \pm s$ ）

| 组别          | 6 h                            | 24 h                           | 72 h                           | 144 h                          |
|-------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Sham 组      | 1.000 ± 0.000                  | 1.000 ± 0.000                  | 1.000 ± 0.000                  | 1.000 ± 0.000                  |
| SAH 组       | 1.847 ± 0.004 <sup>1)</sup>    | 2.375 ± 0.006 <sup>1)</sup>    | 2.156 ± 0.004 <sup>1)</sup>    | 1.536 ± 0.004 <sup>1)</sup>    |
| 雷帕霉素组       | 1.232 ± 0.002 <sup>2)</sup>    | 1.426 ± 0.003 <sup>2)</sup>    | 1.319 ± 0.002 <sup>2)</sup>    | 1.117 ± 0.002 <sup>2)</sup>    |
| BQ-123 低剂量组 | 1.698 ± 0.004 <sup>2)</sup>    | 1.924 ± 0.005 <sup>2)</sup>    | 1.628 ± 0.003 <sup>2)</sup>    | 1.310 ± 0.003 <sup>2)</sup>    |
| BQ-123 高剂量组 | 1.446 ± 0.003 <sup>2) 3)</sup> | 1.430 ± 0.004 <sup>2) 3)</sup> | 1.235 ± 0.002 <sup>2) 3)</sup> | 1.124 ± 0.002 <sup>2) 3)</sup> |
| F 值         | 41.840                         | 44.502                         | 38.551                         | 44.842                         |
| P 值         | 0.000                          | 0.000                          | 0.000                          | 0.000                          |

注：1) 与 Sham 组比较， $P<0.05$ ；2) 与 SAH 组比较， $P<0.05$ ；3) 与低剂量 BQ-123 组比较， $P<0.05$

表 6 各组大鼠海马区 Beclin-1 的 mRNA 相对表达量比较 （ $\bar{x} \pm s$ ）

| 组别          | 6 h                            | 24 h                           | 72 h                           | 144 h                          |
|-------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Sham 组      | 1.000 ± 0.000                  | 1.000 ± 0.000                  | 1.000 ± 0.000                  | 1.000 ± 0.000                  |
| SAH 组       | 1.063 ± 0.002 <sup>1)</sup>    | 1.160 ± 0.002 <sup>1)</sup>    | 1.024 ± 0.002 <sup>1)</sup>    | 1.024 ± 0.002 <sup>1)</sup>    |
| 雷帕霉素组       | 1.411 ± 0.002 <sup>2)</sup>    | 1.526 ± 0.002 <sup>2)</sup>    | 1.519 ± 0.001 <sup>2)</sup>    | 1.207 ± 0.002 <sup>2)</sup>    |
| BQ-123 低剂量组 | 1.124 ± 0.004 <sup>2)</sup>    | 1.362 ± 0.006 <sup>2)</sup>    | 1.356 ± 0.004 <sup>2)</sup>    | 1.124 ± 0.003 <sup>2)</sup>    |
| BQ-123 高剂量组 | 1.447 ± 0.002 <sup>2) 3)</sup> | 1.671 ± 0.005 <sup>2) 3)</sup> | 1.706 ± 0.006 <sup>2) 3)</sup> | 1.286 ± 0.004 <sup>2) 3)</sup> |
| F 值         | 121.642                        | 125.643                        | 107.433                        | 47.048                         |
| P 值         | 0.000                          | 0.000                          | 0.000                          | 0.000                          |

注：1) 与 Sham 组比较， $P<0.05$ ；2) 与 SAH 组比较， $P<0.05$ ；3) 与低剂量 BQ-123 组比较， $P<0.05$

表 7 各组大鼠海马区 LC3 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别          | 6 h                            | 24 h                           | 72 h                           | 144 h                          |
|-------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Sham 组      | 1.000 ± 0.000                  | 1.000 ± 0.000                  | 1.000 ± 0.000                  | 1.000 ± 0.000                  |
| SAH 组       | 1.329 ± 0.004 <sup>1)</sup>    | 1.692 ± 0.010 <sup>1)</sup>    | 1.146 ± 0.012 <sup>1)</sup>    | 1.018 ± 0.004 <sup>1)</sup>    |
| 雷帕霉素组       | 1.655 ± 0.008 <sup>2)</sup>    | 2.428 ± 0.009 <sup>2)</sup>    | 2.173 ± 0.038 <sup>2)</sup>    | 1.344 ± 0.003 <sup>2)</sup>    |
| BQ-123 低剂量组 | 1.444 ± 0.004 <sup>2)</sup>    | 1.892 ± 0.010 <sup>2)</sup>    | 1.728 ± 0.012 <sup>2)</sup>    | 1.186 ± 0.004 <sup>2)</sup>    |
| BQ-123 高剂量组 | 1.737 ± 0.010 <sup>2) 3)</sup> | 2.319 ± 0.012 <sup>2) 3)</sup> | 2.296 ± 0.015 <sup>2) 3)</sup> | 1.452 ± 0.013 <sup>2) 3)</sup> |
| F 值         | 67.342                         | 132.586                        | 72.740                         | 38.389                         |
| P 值         | 0.000                          | 0.000                          | 0.000                          | 0.000                          |

注: 1) 与 Sham 组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 SAH 组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与低剂量 BQ-123 组比较,  $P < 0.05$

和 LC3 mRNA 表达水平增高 ( $P < 0.05$ ), 且 Beclin-1 和 LC3 mRNA 高表达持续至 72 h。

3 讨论

本实验中组织病理学和动物行为学结果显示, BQ-123 对 SAH 大鼠有较好的神经保护作用, 与国外学者的研究结果基本一致<sup>[8-9]</sup>。BQ-123 是特异性内皮素受体 ETA 阻断剂, 可以直接阻断 ETA 活性而对 ETB 受体几乎无作用, 具有高特异性、高亲和力和水溶的特点。药理学研究显示 BQ-123 可抑制血管的痉挛, 改善脑组织灌注压, 保证脑组织的血供, 使细胞的缺血缺氧得到相应的改善, 缓解脑组织的缺血缺氧, 神经细胞得到保护<sup>[10]</sup>。

目前, 自噬已经成为医学研究领域的一个新热点。研究表明<sup>[4]</sup>, 在帕金森病中, 自噬功能的紊乱导致蛋白质出现变构或错误折叠与发病密切相关, 提示自噬在神经系统疾病中的调节作用。最近有研究结果提示<sup>[11-12]</sup>, 在缺血性脑卒中及脑出血动物模型中, 自噬被不同程度地激活。也有文献报道自噬的相关通路在 SAH 后被激活, 石晓勇等<sup>[13]</sup>通过复制蛛网膜下腔出血模型, 应用自噬激动剂 RAP 干预自噬后, 发现自噬相关蛋白 LC3 和 Beclin-1 的表达增高, 自噬增强, 同时大鼠神经功能评分好转, 脑水肿指数下降, 血脑屏障通透性好转。Beclin-1 和 LC3 被认为是自噬过程的特征调控基因和蛋白, 其表达水平是检测自噬高低水平的重要指标。本研究中 BQ-123 组 Beclin-1 mRNA、LC3 mRNA 不仅表达水平较 SAH 组增加, 且两者高表达状态持续至 72 h, 且上述指标呈 BQ-123 剂量依赖式变化, 说明 BQ-123 可以提高 SAH 后大鼠海马区 Beclin-1、LC3 的表达水平, 即增强神经细胞自噬激活的程度。结合上述形态学和行为学变化特征, 笔者

认为在 BQ-123 的干预下, 脑供血得到改善, 细胞低氧、氧自由基及 ATP 耗竭等各种因素缓解<sup>[14]</sup>, 使自噬过程或程度增加, 丢失的神经细胞明显减少, 神经功能恢复。

研究显示<sup>[15]</sup>, mTOR 信号通路对于抑制细胞自噬的发生、调节细胞的生长代谢及增殖有重要作用。有学者<sup>[16]</sup>应用小鼠脑中动脉阻塞缺血性脑卒中模型, 发现通过调制神经元内 Akt-mTOR 信号通路可使其介导的自噬水平提高, 减轻小鼠缺血性卒中脑缺血损伤, 提高缺血神经元存活率。在神经元氧糖剥夺 (OGD) 模型中, 应用细胞自噬抑制剂 3-MA 抑制 mTOR 信号后, 能够诱导酵母基因 (SIR3) 表达增加, 减少 OGD 诱导的乳酸脱氢酶 (LDH) 的释放和神经元凋亡, 并且通过调节 AMPK-mTOR 通路减轻过度自噬造成的缺血后神经元损伤<sup>[17]</sup>。本研究发现应用 mTOR 抑制剂雷帕霉素后, 发现 Beclin-1 和 LC3 表达增多, 存活神经细胞数量增多, 说明 SAH 后海马区神经细胞自噬与 mTOR 信号活化有关。笔者发现与 SAH 组比较, BQ-123 组 mTOR mRNA 表达降低, 而 Beclin-1 mRNA、LC3 mRNA 表达增高, 3 者变化均与 BQ-123 剂量密切相关, 说明 BQ-123 通过抑制 mTOR 活性, 进而提高 SAH 后自噬程度, 发挥神经保护作用。目前关于 BQ-123 调节 mTOR 信号活性的原因尚未明确。但研究显示 BQ-123 可增加组织中内源性一氧化氮含量, 减轻钙离子超载、维持微环境稳定, 具有对抗氧化应激及抗炎等作用<sup>[18]</sup>, 该因素的变化可使 mTOR 上游的 PI3K/Akt 途径活化, 可能是 BQ-123 提高 mTOR 信号活性的原因之一。

综上所述, BQ-123 可减轻 SAH 后脑组织神经细胞的丢失, 促进神经功能的恢复; 同时 BQ-123 可部分抑制 SAH 后 mTOR 活性, 提高神经细胞自噬程度。

这为临床救治 SAH 提供了新思路, 亦为 BQ-123 在临床的应用提供理论基础, 具有重要的指导意义。

#### 参 考 文 献:

- [1] SEHBA F A, HOU J, PLUTA R M, et al. The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. *Prog Neurobiol*, 2012, 97(1): 14-37.
- [2] 许松, 周文泉, 张征宇, 等. 内皮素 A 受体拮抗剂 BQ123 对前列腺癌 PC-3M 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *中华男科学杂志*, 2009, 15(4): 341-345.
- [3] TOPKORU B C, ALTAY O, DURIS K, et al. Nasal administration of recombinant osteopontin attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. *Stroke*, 2013, 44(11): 3189-3194.
- [4] 陈敬寅. 褪黑素调节的自噬在蛛网膜下腔出血早期脑损伤中的作用及机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015: 4.
- [5] SENGUPTA S, PETERSON T R, SABATINI D M. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 310-322.
- [6] 马朝晖, 李贵福, 罗望池, 等. 改良“二次枕大池注血法”构建 Wistar 大鼠蛛网膜下腔出血模型 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2012, 38(3): 190-192.
- [7] 孙竹梅, 赵雅宁, 李建民, 等. 不同强度运动对脑缺血再灌注大鼠学习能力及氧自由基代谢的影响 [J]. *中国康复理论与实践*, 2015, 21(1): 26-30.
- [8] JOSKO J. Cerebral angiogenesis and expression of VEGF after subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats[J]. *Brain Res*, 2003, 981(1-2): 58-69.
- [9] JOŚKO J, GWÓŹDŹ B, HENDRYK S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat brain after subarachnoid haemorrhage and endothelin receptor blockage with BQ-123[J]. *Folia Neuropathol*, 2001, 39(4): 243-251.
- [10] 张邓新, 陈莺, 季永, 等. 七氟烷对小鼠短期记忆功能和海马突触短时程增强的影响 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2012, 21(10): 884-886.
- [11] LI L, CHEN J, SUN S, et al. Effects of estradiol on autophagy and Nrf-2/ARE signals after cerebral ischemia[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(5): 2027-2036.
- [12] LI H, WU J, SHEN H, et al. Autophagy in hemorrhagic stroke: mechanisms and clinical implications[J]. *Prog Neurobiol*, 2017, 13(16): 30156-30153.
- [13] 石晓勇, 王中, 陈罡, 等. 自噬在大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中作用的实验研究 [J]. *临床神经外科杂志*, 2015, 12(6): 449-452.
- [14] 赵明明, 赵永博, 罗鹏, 等. PI3K/Akt 信号通路对神经元机械性损伤诱导的自噬调节作用 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2012, 11(6): 491-494.
- [15] KAUR A, SHARMA S. Mammalian target of rapamycin (mTOR) as a potential therapeutic target in various diseases[J]. *Inflammopharmacology*, 2017, 25(3): 1-20.
- [16] 魏海萍. cPKC $\gamma$  通过 Akt-mTOR 通过调制神经元自噬减轻缺血性卒中鼠脑损伤 [D]. 北京: 首都医科大学, 2016: 4.
- [17] DAI S H, CHEN T, LI X, et al. Sirt3 confers protection against neuronal ischemia by inducing autophagy: Involvement of the AMPK-mTOR pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 7(108): 345-353.
- [18] KOWALCZYK A, JELEŃ A, ŻEBROWSKA M, et al. BQ123 stimulates skeletal muscle antioxidant defense via Nrf2 activation in LPS-treated Rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 9(28): 2356853.

(张蕾 编辑)