

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.02.008

茴拉西坦对局灶性脑缺血再灌注损伤模型大鼠的神经保护作用*

柴娟,张潇潇[△],李丹,徐沙丽

(华中科技大学同济医学院附属梨园医院神经内科,湖北 武汉 430077)

摘要:目的 探讨茴拉西坦对局灶性脑缺血再灌注损伤(I/R)模型大鼠的神经保护作用。方法 将100只SD大鼠分为对照组(等体积0.9%氯化钠溶液)、模型组(等体积0.9%氯化钠溶液)、尼莫地平组(50 mg/kg)和茴拉西坦低、高剂量组(50, 100 mg/kg),各20只。复制局灶性脑I/R大鼠模型,建模成功后灌胃相应药物或等体积0.9%氯化钠溶液(每100 g体重1 mL),每日1次,连续4周。进行贴纸去除及平衡木行走实验,以Longa评分标准评估大鼠的脑神经功能,测定大鼠脑梗死体积;采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法及Western blot法分别测定大鼠脑组织的转录激活子4(ATF4)及NLRP3 mRNA和蛋白的表达水平。结果 与模型组比较,尼莫地平组和茴拉西坦低、高剂量组大鼠双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间均显著缩短,脑梗死体积显著缩小,NLRP3 mRNA和蛋白的表达水平和Longa评分均显著降低,ATF4 mRNA和蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结论 茴拉西坦对局灶性脑I/R模型大鼠具有一定神经保护作用,其机制与促进大鼠脑组织ATF4表达、抑制NLRP3表达有关。

关键词:茴拉西坦;脑缺血再灌注损伤;ATF4/NLRP3通路;神经保护;大鼠

中图分类号:R965;R971

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)02-0028-04

Neuroprotective Effect of Aniracetam on Focal Cerebral Ischemia - Reperfusion Injury in Rats

CHAI Juan, ZHANG Xiaoxiao, LI Dan, XU Shali

(Department of Neurology, Liyuan Hospital of Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China 430077)

Abstract: Objective To investigate the neuroprotective effect of aniracetam on focal cerebral ischemia - reperfusion injury (I/R) in rats. **Methods** A total of 100 SD rats were divided into the control group (equal volume of 0.9% Sodium Chloride Solution), model group (equal volume of 0.9% Sodium Chloride Solution), nimodipine group (50 mg/kg), and aniracetam low - and high - dose groups (50, 100 mg/kg), with 20 rats in each group. The focal cerebral I/R rat models were established. After successful modeling, the rats were given the corresponding drugs or the equal volume of 0.9% Sodium Chloride Solution (1 mL per 100 g of body weight), once a day for four weeks. The sticker removal test and balance beam walking test were carried out. The cerebral nerve function of rats was evaluated by the Longa score standard, and the cerebral infarction volume was measured. The expression levels of transcription activator 4 (ATF4) mRNA and protein and NLRP3 mRNA and protein in brain tissue of rats were measured by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR) and Western blot respectively. **Results** Compared with those in the model group, the bilateral stickers removal time and the balance beam passing time were significantly shortened, the cerebral infarction volume was significantly reduced, the expression levels of NLRP3 mRNA and protein and Longa score were significantly reduced, while the expression levels of ATF4 mRNA and protein were significantly increased in the nimodipine group and aniracetam low - and high - dose groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Aniracetam has a neuroprotective effect on focal cerebral I/R model rats, and its mechanism is related to promoting the expression of ATF4 and inhibiting the expression of NLRP3.

Key words: aniracetam; cerebral ischemia - reperfusion injury; ATF4/NLRP3 pathway; neuroprotective effect; rat

脑缺血再灌注(I/R)损伤是严重的健康问题^[1],其损伤机制复杂,其中炎性损害影响较大,可能成为潜在的治疗靶点^[2]。NLRP3是重要的组织损伤传感器,线粒体受损释放线粒体DNA(mtDNA)和线粒体活性氧(mtROS)激活了NLRP3炎性体^[3],NLRP3直接与衔接子分子ASC结合,后者随后募集并激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1前体(pro-caspase-1),促进NLRP3炎性小体的细胞质多蛋白复合物形成,该复合物能将前体白细胞介素1 β (IL-1 β)和前体白细胞介素18(IL-18)

裂解成活性形式,启动和放大炎性反应^[4]。NLRP3炎性体活性的功能障碍与多种疾病有关,如阿尔茨海默病、2型糖尿病、动脉粥样硬化和癌症^[5],同时NLRP3炎性体的激活可促进脑I/R损伤的病理发展。激活转录因子4(ATF4)是主要的内质网应激(ERS)反应效应物,参与多种疾病的进程,其在细胞存活和死亡中的作用尚不完全清楚。严重或长期的ERS后,PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP信号级联反应的激活是ERS诱导凋亡细胞死亡的原因^[6]。研究表明,在帕金森症细胞

*基金项目:华中科技大学自主创新研究基金[2017KFYXJJ088]。

第一作者:柴娟,女,硕士研究生,住院医师,研究方向为脑血管疾病的诊治,(电子信箱)juanchai2013@163.com。

[△]通信作者:张潇潇,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为脑血管疾病的诊治,(电子信箱)609299968@qq.com。

模型中,ATF4可抑制神经细胞的凋亡^[7-8]。茴拉西坦具有神经保护作用,可保护模型大鼠和小鼠的大脑免受缺血性中风的侵袭^[9]。茴拉西坦可缩小中风急性期缺血性脑梗死的面积,减少DNA片段化和线粒体细胞色素c释放并抑制脑组织中胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)的活性。本研究中探讨了茴拉西坦对局灶性脑I/R模型大鼠的神经保护作用及其作用机制,为脑I/R的治疗提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:5-0尼龙单丝(北京奇诺科技有限公司);IMT-2型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);StepOne Plus型荧光定量PCR仪(美国AB公司);DYY-6C型电泳仪(北京市六一仪器厂)。

试剂:茴拉西坦(批号为ED63652.36)、尼莫地平(批号为XS52963.36),均购自亚宝药业集团股份有限公司;聚L-赖氨酸(美国Sigma公司,批号为SX85954);苏木素-伊红(HE)染色试剂(大连宝生物科技有限公司,批号为DF4569.36);Trizol试剂(美国Invitrogen公司,批号为SE56969.36);PrimeScriptRT试剂盒(德国Merck公司,批号为514489);iCycler IQ多色检测系统(美国Bio-Rad公司);蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液(美国Sigma-Aldrich公司,批号为ER47636);BCA蛋白测定试剂盒(北京活力生物技术有限公司,批号为TY45858.36);SDS-PAGE凝胶(加拿大TakaraBioInc.,批号为6569748);硝酸纤维素膜(美国Millipore公司,批号为WS152545.63);小鼠单克隆抗人ATF4、NLRP3一级(1:1 000,1:2 000,批号分别为ED4526.98,ER8597.54),小鼠单克隆抗人类GAPDH(1:500,批号为XD41586.96),HRP偶联的山羊抗小鼠免疫球蛋白IgG(1:5 000,批号为EC52564.74),均购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;电发光ECL试剂盒(美国Cell Signaling Technology公司,批号为MN5254.67)。

动物:SD大鼠100只,SPF级,雌雄各半,8~10周龄,体质量280~300 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,动物生产许可证号SCXK(渝)2020-0003。大鼠饲养环境为温度22~26℃,相对湿度40%~70%,人工黑暗和光照交替12 h/12 h。

1.2 实验方法

模型复制与分组、给药:将100只SD大鼠分为对照组(A组,等体积0.9%氯化钠溶液)、模型组(B组,等体积0.9%氯化钠溶液)、尼莫地平组(C组,50 mg/kg),以及茴拉西坦低、高剂量组(D₁组、D₂组,50,100 mg/kg)^[10],各20只。腹腔注射戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉大鼠,然后在腹中线颈部切口,向左暴露并结扎左颈总动脉和外

颈动脉。将5-0尼龙单丝的末端涂有聚L-赖氨酸的钝头插入颈内动脉,并向前进入大脑中动脉起源,直至遇到轻微阻力,局部脑血流量(CBF)较基线水平降低20%;闭塞1 h后,缓慢抽出尼龙单丝实现再灌注,CBF为基线的75%表明局灶性脑I/R大鼠模型复制成功。建模成功后灌胃相应药物或等体积0.9%氯化钠溶液(每100 g体质量1 mL),每日1次,连续4周。

双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间、Longa评分、脑梗死体积测定:进行贴纸去除及平衡木行走实验^[8-9]。采用Longa评分评价脑神经功能。4分,不能自发行走,意识丧失;3分,身体向左侧倾倒;2分,自主运动时向左侧划圈;1分,不能伸展左侧前爪;0分,无神经功能损伤症状。测定脑梗死体积,并计算脑梗死体积百分比(右侧脑梗死面积×切片厚度/右侧脑组织总体积×100%)。

脑病理组织学改变观察:取出脑组织,固定,脱水,包埋,切片,HE染色,在显微镜下观察大鼠脑组织病理形态学。

ATF4和NLRP3 mRNA表达水平测定:取冻存的大鼠脑组织样本50 mg,采用Trizol法提取总RNA,鉴定完RNA纯度和完整性后,采用逆转录制备cDNA。PCR反应条件为,95℃预变性10 s;94℃变性15 s,40个循环;55℃退火30 s;70℃延伸30 s终止反应。读取循环阈值(C_t值),以2^{-ΔΔC_t}表示目的基因mRNA的表达量。各组设3个复孔,实验重复3次。由RiboBio(中国广州)设计的ATF4、NLRP3引物。引物序列为ATF4,5'-GAAGCTCCTACGCCTTTG-3',5'-TCCTCCCTTCAACATTCTG-3';NLRP3,5'-AGGGTTACAGTGGCTAAG-3',5'-GAGAGGAGAGGAAGAGGGAA-3';GAPDH,5'-TCCTCTGACTTCAACAGCGACAC-3',5'-CACCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC-3'。

ATF4和NLRP3蛋白表达水平测定:取冻存的大鼠脑组织样本50 mg,加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液,以BCA法测定蛋白含量。各组取20 μg,上样,10% SDS-PAGE电泳后电转。用含0.1%Tween-20 Tris缓冲液的5%脱脂奶粉封闭2 h;加入1抗,4℃孵育过夜;加入HRP偶联的山羊抗小鼠IgG,室温振摇1 h;加入ECL化学发光试剂,将PVDF膜放入暗盒中,压上X胶片,取出胶片后显影、定影、清洗;然后以Quantity One软件将条带灰度值数字化,以目的条带(ATF4、NLRP3)与内参条带(GAPDH)灰度比值为各目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间、Longa 评分、脑梗死体积

与A组比较,B组大鼠双侧贴纸去除时间和平衡木过杆时间均显著延长,脑梗死体积增大,Longa评分显著升高($P < 0.05$);与B组比较,C组、D₁组和D₂组大鼠双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间均显著缩短,脑梗死体积显著缩小,Longa评分显著降低($P < 0.05$)。详见表1。

表1 各组大鼠双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间、Longa评分、脑梗死体积比较($\bar{X} \pm s, n = 20$)

Tab. 1 Comparison of bilateral sticker removal time, balance beam passing time, Longa score and cerebral infarction volume of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 (mg/kg)	双侧贴纸去除 时间(s)	平衡木过杆 时间(s)	Longa评分 (分)	脑梗死体积 (mm ³)
A组		23.69 ± 5.96	1.96 ± 0.52	1.62 ± 0.47 [*]	0.00 ± 0.00
B组		105.85 ± 6.85 [*]	18.93 ± 2.47 [*]	3.65 ± 0.45 [*]	43.69 ± 5.96 [*]
C组	50	48.96 ± 8.52 [#]	8.41 ± 1.95 [#]	1.92 ± 0.39 [#]	30.15 ± 2.52 [#]
D ₁ 组	50	68.85 ± 8.41 [#]	15.69 ± 2.06 [#]	2.58 ± 0.52 [#]	36.85 ± 1.99 [#]
D ₂ 组	100	50.41 ± 6.66 [#]	8.63 ± 2.41 [#]	2.62 ± 0.48 [#]	31.41 ± 2.49 [#]

注:与A组比较,^{*} $P < 0.05$;与B组比较,[#] $P < 0.05$ 。表2同。

Note: Compared with those in group A, ^{*} $P < 0.05$ (for Tab. 1 and Tab. 2); Compared with those in group B, [#] $P < 0.05$ (for Tab. 1 and Tab. 2).

2.2 脑组织病理形态学

A组大鼠脑组织结构正常,神经细胞均匀分布,无异常;B组大鼠脑组织出现空泡坏死灶,神经细胞体积变大(坏死),分布紊乱,可见显著炎性细胞浸润;C组、D₁组和D₂组大鼠的脑组织结构均趋于正常,神经细胞坏死显著减少。详见图1。

2.3 脑组织 ATF4 和 NLRP3 mRNA 表达水平

与A组比较,B组大鼠脑组织ATF4 mRNA表达水平显著降低,NLRP3 mRNA表达水平显著升高($P < 0.05$);与B组比较,C组、D₁组和D₂组大鼠脑组织ATF4 mRNA表达水平均显著升高,NLRP3 mRNA表达水平显著降低($P < 0.05$)。详见表2。

表2 各组大鼠脑组织ATF4和NLRP3 mRNA及蛋白表达水平比较($\bar{X} \pm s, n = 20$)

Tab. 2 Comparison of ATF4 and NLRP3 mRNA and protein expression levels in brain tissue of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 (mg/kg)	mRNA		蛋白	
		ATF4	NLRP3	ATF4	NLRP3
A组		5.36 ± 0.33	0.98 ± 0.42	1.52 ± 0.21	0.28 ± 0.15
B组		1.41 ± 0.32 [*]	3.29 ± 0.39 [*]	0.35 ± 0.14 [*]	1.28 ± 0.12 [*]
C组	50	4.01 ± 0.37 [#]	1.89 ± 0.41 [#]	0.85 ± 0.15 [#]	0.85 ± 0.11 [#]
D ₁ 组	50	2.86 ± 0.36 [#]	2.48 ± 0.42 [#]	0.62 ± 0.12 [#]	0.46 ± 0.16 [#]
D ₂ 组	100	4.03 ± 0.33 [#]	1.93 ± 0.38 [#]	0.83 ± 0.14 [#]	0.81 ± 0.13 [#]

2.4 脑组织 ATF4 和 NLRP3 蛋白表达水平

与A组比较,B组大鼠脑组织ATF4蛋白表达水平显著降低,NLRP3蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与B组比较,C组、D₁组和D₂组大鼠脑组织ATF4蛋白表达水平均显著升高,NLRP3蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。详见表3。

3 讨论

本研究结果显示,C组、D₁组和D₂组大鼠双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间均短于模型组,脑梗死体积小于B组,Longa评分低于B组($P < 0.05$)。表明茴拉西坦能缩小局灶性脑I/R模型大鼠脑梗死体积,其高剂量效果与尼莫地平相似。尼莫地平为钙拮抗剂,用于缺血性脑血管病、偏头痛、轻度蛛网膜下腔出血所致脑血管痉挛的治疗,是脑I/R损伤的经典治疗药物^[11]。茴拉西坦属拉西坦类脑细胞代谢药,能增强神经细胞突触内磷脂酶活性,并增加脑内三磷酸腺苷(ATP)的形成和转运,增加蛋白质和核糖核酸(RNA)的合成,促进大脑对氨基酸、磷脂、葡萄糖和氧的利用,增加机体反应性和兴奋性^[12]。口服茴拉西坦可显著抑制硫代巴比妥酸反应性物质的生成,并减缓前脑I/R后大鼠脑中谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的流失^[13]。本研究结果与上述研究结论一致。

茴拉西坦可降低大脑中动脉闭塞后大鼠的脑内细胞炎症反应和氧化损伤,对脑I/R具有神经保护作用,其机制与减轻内质网应激介导的细胞凋亡有关^[14]。本

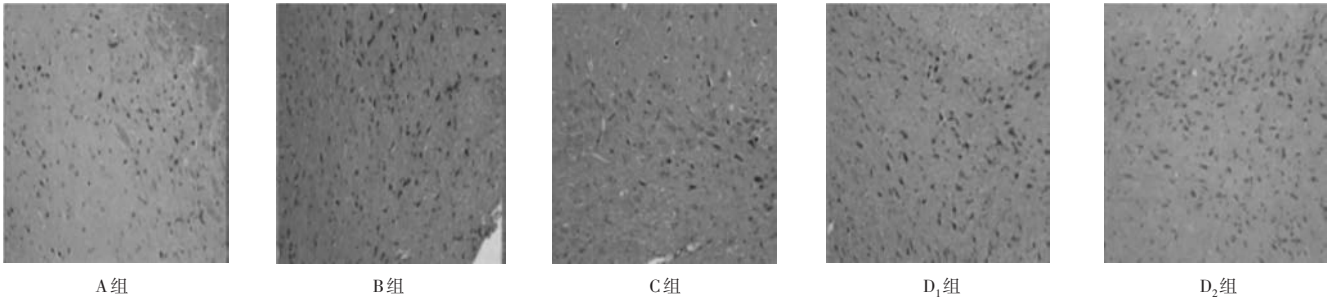


图1 各组大鼠脑组织病理形态学(HE, ×200)

Fig. 1 Pathomorphology of brain tissue of rats in each group (HE, ×200)

研究结果显示,对照组大鼠脑组织结构正常,神经细胞均匀分布,无异常;模型组大鼠脑组织出现空泡坏死灶,神经细胞体积变大(坏死),分布紊乱,可见明显炎症细胞浸润;尼莫地平组及茴拉西坦低、高剂量组大鼠脑组织结构趋于正常,神经细胞坏死明显减少。提示茴拉西坦能减轻灶性脑缺血再灌注大鼠脑神经炎症反应,与上述结论一致。

多项研究表明,活化的NLRP3炎性小体及其相关细胞因子对脑I/R损伤有显著影响^[15]。使用siRNA敲除NLRP3可减轻脑I/R损伤^[16]。ATF4属细胞保护因子,ATF4上调在鱼藤素介导的神经细胞死亡中具有保护作用;ATF4诱导的sestrin 2上调是保护一氧化碳诱导肝脂肪变性的原因。目前,ATF4对脑I/R损伤的作用及其潜在机制均未完全阐明。动物实验结果表明,ATF4的过表达降低了脑I/R损伤后IL-1 β ,IL-18,mtROS及活化的NLRP3炎性小体水平^[17]。可见,ATF4可能通过抑制NLRP3炎性体的活化而在脑I/R损伤中发挥神经保护作用。在短暂性脑缺血性损伤中,ATF4可能通过抑制核转录因子CHOP而减轻内质网应激所致神经细胞凋亡^[18]。本研究结果显示,尼莫地平组及茴拉西坦低、高剂量组大鼠脑组织ATF4 mRNA和蛋白的表达水平均高于模型组,NLRP3 mRNA和蛋白表达水平低于模型组($P < 0.05$),表明茴拉西坦通过促进局灶性脑I/R模型大鼠脑组织ATF4的表达而抑制NLRP3的表达,与上述结论一致。

综上所述,茴拉西坦对I/R模型大鼠具有一定神经保护作用,其机制与促进大鼠脑组织ATF4表达、抑制NLRP3表达有关。

参考文献

- [1] SEMERANO A, LAREDO C, ZHAO Y, et al. Leukocytes, Collateral Circulation, and Reperfusion in Ischemic Stroke Patients Treated With Mechanical Thrombectomy [J]. *Stroke*, 2019, 50(12):3456-3464.
- [2] WU MY, YIANG GT, LIAO WT, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4):1650-1667.
- [3] ZHAO C, ZHAO W. NLRP3 inflammasome - a key player in antiviral responses[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:211.
- [4] DEORA V, LEE JD, ALBORNOZ EA, et al. The microglial NLRP3 inflammasome is activated by amyotrophic lateral sclerosis proteins[J]. *Glia*, 2020, 68(2):407-421.
- [5] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y, et al. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13):3328.
- [6] WANG N, ZENG GZ, YIN JL, et al. Artesunate activates the ATF4 - CHOP - CHAC1 pathway and affects ferroptosis in Burkitt's Lymphoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(3):533-539.
- [7] AIMÉ P, KARUPPAGOUNDER SS, RAO A, et al. The drug adaptaquin blocks ATF4/CHOP-dependent pro-death Trib3 induction and protects in cellular and mouse models of Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 136:104725.
- [8] ZHAO A, ZHANG Z, ZHOU Y, et al. β -Elemonic acid inhibits the growth of human Osteosarcoma through endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP activation and Wnt/ β -catenin signal suppression[J]. *Phyto-medicine*, 2020, 69:153183.
- [9] PHILLIPS H, MCDOWELL A, MIELBY BS, et al. Aniracetam does not improve working memory in neurologically healthy pigeons[J]. *PLoS One*, 2019, 14(4):e0215612.
- [10] LI D, CHEN Q X, ZOU W, et al. Acupuncture promotes functional recovery after cerebral hemorrhage by upregulating neurotrophic factor expression [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(8):1510-1517.
- [11] CARLSON AP, HÄNGGI D, MACDONALD RL, et al. Nimodipine Reappraised: An Old Drug With a Future[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2020, 18(1):65-82.
- [12] FAN Y, CHEN M, ZHANG J, et al. Updated progress of nanocarrier-based intranasal drug delivery systems for treatment of brain diseases[J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2018, 35(5):433-467.
- [13] PERNG CH, CHANG YC, TZANG RF. The treatment of cognitive dysfunction in dementia: a multiple treatments meta-analysis[J]. *Psychopharmacology*, 2018, 235(5):1571-1580.
- [14] LU S, LI J, CHENG F. The Effect of Electroacupuncture on the Pathology and Ultrastructure of Brain Tissue around Hematoma in Rats with Cerebral Hemorrhage[J]. *Acta Microscopica*, 2020, 29(5):474-476.
- [15] HE Q, LI Z, MENG C, et al. Parkin-dependent mitophagy is required for the inhibition of ATF4 on NLRP3 inflammasome activation in cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Cells*, 2019, 8(8):897.
- [16] YUAN X, ZHENG Y, CHEN C, et al. Anisodamine inhibits endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in rhabdomyolysis-induced acute kidney injury[J]. *Apoptosis*, 2017, 22(12):1524-1531.
- [17] KE R, WANG Y, HONG S, et al. Endoplasmic reticulum stress related factor IRE1 α regulates TXNIP/NLRP3-mediated pyroptosis in diabetic nephropathy [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 396(2):112293.
- [18] MEYERS AK, ZHU X. The NLRP3 inflammasome: metabolic regulation and contribution to inflammaging[J]. *Cells*, 2020, 9(8):1808.

(收稿日期:2021-02-01;修回日期:2021-08-23)