

呋塞米对脑出血模型大鼠 PERK/eIF2 α /CHOP 通路及继发性脑损伤的影响

张瑜, 高建洲, 韩韶*

(邯郸市第一医院 东院区 神经外科, 河北 邯郸 056000)

摘要:目的 探讨呋塞米(FUR)对脑出血(ICH)大鼠 RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶(PERK)/真核起始因子2 α (eIF2 α)/转录因子 CCAAT 增强子结合蛋白的同源蛋白(CHOP)通路及继发性脑损伤的影响。方法 将大鼠分为假手术组、模型组(脑定位注射IV型胶原酶,建立 ICH 模型)、FUR 低剂量组(FUR-L)、FUR 中剂量组(FUR-M)、FUR 高剂量组(FUR-H)、神经节苷脂组,每组 18 只。药物处理后,检测神经功能,对其进行 Longa 评分;测量大脑含水量;用 Evans 蓝外渗实验检测血脑屏障损伤;用 HE 染色检测海马神经元损伤;用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-6(IL-6)水平;用免疫印迹法检测大鼠脑组织 PERK/eIF2 α /CHOP 通路相关蛋白 p-PERK/PERK、p-eIF2 α /eIF2 α 、CHOP 表达。结果 相比假手术组,模型组大鼠海马神经元变性坏死,皱缩变小,数目明显减少,呈现严重病理损伤,Longa 评分、Evans 蓝渗出量、大脑含水量、血清 IFN- γ 及 IL-6 水平、p-PERK/PERK、p-eIF2 α /eIF2 α 、CHOP 表达水平明显升高($P < 0.05$)。相比模型组,FUR-L、FUR-M、FUR-H 组及神经节苷脂组大鼠海马神经元形态有不同程度恢复,病理损伤减轻,Longa 评分、大脑含水量、Evans 蓝渗出量、血清 IFN- γ 及 IL-6 水平、p-PERK/PERK、p-eIF2 α /eIF2 α 、CHOP 表达水平均降低($P < 0.05$)。结论 FUR 可下调 PERK/eIF2 α /CHOP 通路蛋白表达,缓解脑水肿及海马神经元损伤,修复 ICH 模型大鼠神经功能。

关键词: 呋塞米;脑出血;PERK/eIF2 α /CHOP 通路;脑损伤

中图分类号:R743.34 文献标志码:A

Effects of furosemide on PERK/eIF2 α /CHOP pathway and secondary brain injury in rat models with intracerebral hemorrhage

ZHANG Yu, GAO Jian-zhou, HAN Shao*

(Department of Neurosurgery, East Campus, Handan First Hospital, Handan 056000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of furosemide(FUR) on PERK/eIF2 α /CHOP pathway and secondary brain injury in rats with intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** The rats were divided into sham operation group, model group(intracerebral injection of collagenase type IV in ICH), furosemide low dose (FUR-L) groups, medium dose (FUR-M) groups, high dose (FUR-H) groups and ganglioside group, with eighteen rats in each. After treatment, the neurological function was evaluated and scored by Longa and the water content of brain tissue was measured; Evans blue extravasation test was used to detect the blood-brain barrier injury; HE staining microscopy was used to detect the damage of hippocampus neurons; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

收稿日期:2020-12-07 修回日期:2021-04-30

基金项目:河北省 2020 年度医学科学研究计划(20200185)

* 通信作者 (corresponding author): ne3761@163.com

was used to detect the serum level of interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-6 (IL-6); Western blot was used to detect the expression of p-PERK/PERK, p-eIF2 α /eIF2 α and CHOP. **Results** Compared with those in the sham operation group, the hippocampal neurons in the model group were degenerated and necrotic, the shrinkage was smaller, the number was significantly decreased, severe pathological damage was found, Longa score, Evans blue exudation, brain water content, level of serum IFN- γ and IL-6, the expression of p-PERK/PERK, p-eIF2 α /eIF2 α and CHOP were all significantly increased ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, The morphological changes of hippocampal neurons in the FUR-L, FUR-M and FUR-H groups and ganglioside group were restored to different degrees and the pathological damage was alleviated, Longa score, brain water content, Evans blue exudation, level of serum IFN- γ and IL-6, expression of p-PERK/PERK, p-eIF2 α /eIF2 α and CHOP were decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Furosemide can down-regulate the expression of PERK/eIF2 α /CHOP pathway protein, relieve brain edema and hippocampal neuron damage and repair the neural function in ICH animal.model.

Key words: furosemide; intracerebral hemorrhage; PERK/eIF2 α /CHOP pathway; brain injury

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是因脑血管破裂而引起的一种脑血管疾病,造成的脑实质内出血可对神经系统功能造成严重损害,ICH 发病急、进展快,致残率、病亡率极高,且预后不佳,给患者身心健康造成极大威胁^[1]。内质网应激在 ICH 后继发脑损伤的病理过程中起到重要作用,可造成脑水肿和神经元凋亡,引发神经功能障碍,另外,内质网应激导致的神经炎性反应会进一步加重脑损伤,因而抑制内质网应激可提高神经元存活率,减轻脑损伤^[2]。RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶 (protein kinase RNA-like ER kinase, PERK)/真核起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α)/转录因子 CCAAT 增强子结合蛋白的同源蛋白 (CCAAT enhancer binding protein-homologous protein, CHOP) 通路是调控内质网应激的主要信号通路,在缺血/再灌注损伤、炎性反应和神经系统疾病等病理机制中起着关键的调控作用,下调该通路蛋白表达可减弱内质网应激,抑制炎性反应,降低神经细胞凋亡率,减轻脑组织损伤^[3-4],因而抑制 PERK/eIF2 α /CHOP 信号通路激活可作为 ICH 的潜在治疗手段。呋塞米 (furosemide, FUR) 是临床常用的一种高效利尿药,可抑制肾小管对钠钾离子重吸收,促进水分排泄,起到强效利尿作用,还可阻止钠离子进入脑组织,减少脑脊液生成,降低颅内压,减轻脑水肿,对 ICH 疗效显著,广泛用于临床^[5],但其对 ICH 大鼠 PERK/eIF2 α /CHOP 通路及继发性脑损伤的影响,目前还未有明确阐述,本文通过构建 ICH 大鼠模

型,对此进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物: SD 大鼠,雄性,SPF 级,体质量 200~240 g,济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物合格证号 SCXK(鲁) 2019 0003,参照《中华人民共和国实验动物管理条例》饲养在本院动物房,温度为 22 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$,湿度为 45%~55%,噪音 \leq 50 dB,大鼠自由进食及饮水,光照昼夜循环(12 h/12 h),适应性喂养 1 周,用于后续实验。

1.1.2 主要试剂: IV 型胶原酶(上海一研生物科技有限公司);呋塞米 (furosemide, FUR) 注射液(遂成药业股份有限公司);单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液(齐鲁制药有限公司);Evans 蓝(上海钰博生物科技有限公司);HE 染色试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司);大鼠 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 及白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、兔源 PERK、CHOP 及 p-eIF2 α 一抗、羊抗兔二抗 (Abcam 公司);兔源 p-PERK 及 β -tubulin 一抗、鼠源 eIF2 α 一抗 (Santa Cruz 公司);羊抗鼠二抗 (Cell Signaling Technology 公司);RIPA 裂解液(上海吉至生化科技有限公司);BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 大鼠的分组及处理: 参照文献[6],将大鼠

分为假手术组、模型组(脑定位注射IV型胶原酶,建立ICH模型)、FUR-L、FUR-M、FUR-H组及神经节苷脂干预组,每组18只。分别配制为1、2、4 mg/mL的FUR^[8]溶液和5 mg/mL单唾液酸四己糖神经节苷脂^[9]溶液,药物处理组大鼠均经尾静脉注射给药,剂量为1 mL/kg,假手术组与模型组大鼠均尾静脉注射1 mL/kg的0.9%氯化钠溶液,每天1次,持续14 d。

1.2.2 大鼠神经功能缺损的检测:第14天给药后24 h,根据各组大鼠行为活动情况检测其神经功能,并参照Longa评分^[7]法进行评分,从行为活动正常到死亡共分为5级,得分从0到5分。

1.2.3 大鼠血脑屏障损伤的检测:神经功能缺损检测结束后,进行Evans蓝外渗实验检测大鼠血脑屏障损伤:各组大鼠均随机选取6只,以5 mL/kg的剂量股静脉注射2% Evans蓝染料,1 h后以乙醚麻醉,切下鼠头,解剖分离大脑,称量湿质量,以60℃甲酰胺对其浸泡,24 h后运用分光光度计测量浸出液中Evans蓝含量。

1.2.4 标本收集及大鼠海马神经元损伤情况的检测:各组大鼠再次随机选取6只,自尾静脉取血3 mL后麻醉处死,取出大脑,称量湿质量,将其置于烤箱中烤干,称量干质量,计算大脑含水量,公式:大脑含水量=(大脑湿质量-大脑干质量)/大脑湿质量×100%。将上述血液放入4℃,3 000 r/min离心15 min,吸取上清储存在-80℃备用。各组最后剩余的6只大鼠,经麻醉后处死,解剖获得大脑,取下相同部位脑组织约0.5 g储存在液氮中备用;剩余脑组织经0.9%氯化钠溶液漂洗后,置于特制小盒中,以OCT(optimal cutting temperature compound)包埋剂浸没组织,放入液氮中速冻成块,采用冰冻切片机做常规病理切片,置于室温30 min后,以4℃丙酮固定10 min,参照试剂盒说明书的操作步骤进行HE染色,经75%、90%、100%乙醇依次脱水、二甲苯透明后,转移至载玻片上封片,以显微镜采集任意5个视野图像。

1.2.5 ELISA检测大鼠血清IFN- γ 、IL-6水平:参照ELISA试剂盒说明书的操作步骤,检测血清其中各炎症因子IFN- γ 、IL-6水平。

1.2.6 免疫印迹法检测大鼠脑组织PERK/eIF2 α /CHOP通路相关蛋白表达:取出1.2.4中各组大鼠

脑组织,加入1.5 mL RIPA裂解液,匀浆后4℃,3 000 r/min离心20 min,以BCA法测量上清中总蛋白浓度,然后将各样本浓度根据结果调至相同,加入上样缓冲液,煮沸6 min变性,各取20 L样品液上样,电泳后湿转,均于恒压110 V下进行,将所得硝酸纤维素膜根据分子质量剪下目的蛋白条带,以5%脱脂奶粉溶液于室温下孵育2 h,封闭膜上蛋白非特异性位点,然后分别加入兔源PERK、CHOP、p-eIF2 α 、p-PERK、 β -tubulin一抗和鼠源eIF2 α 一抗,4℃孵育过夜,TBST缓冲液漂洗,加入对应的羊抗兔及羊抗鼠二抗,室温孵育2 h,TBST缓冲液漂洗,通过化学发光法对蛋白条带显影,然后放入凝胶成像仪中拍照,运用Image-J软件得到蛋白条带灰度值,并对各蛋白表达进行定量分析。

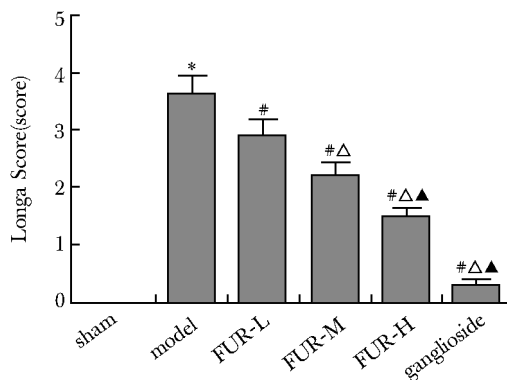
1.3 统计学分析

运用SPSS24.0软件进行统计分析,实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析做多组间比较,两组间进一步比较行LSD-*t*检验, $P<0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 呋塞米(FUR)对大鼠神经功能损伤的影响

模型组大鼠Longa评分相比假手术组明显升高($P<0.05$)。FUR-L、FUR-M、FUR-H组及神经节苷脂组大鼠Longa评分相比模型组均降低($P<0.05$) (图1)。



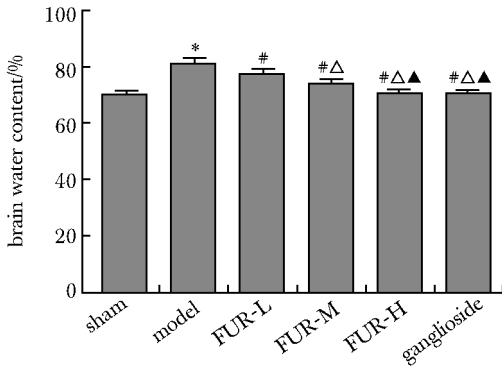
* $P<0.05$ compared with sham operation group;
$P<0.05$ compared with model group; $\Delta P<0.05$ compared with FUR-L group; $\blacktriangle P<0.05$ compared with FUR-M group

图1 大鼠Longa评分

Fig 1 Neurological function Longa Score of rats

2.2 呋塞米 (FUR) 对大鼠脑水肿的影响

模型组大鼠大脑含水量相比假手术组明显升高 ($P < 0.05$)。FUR-L、FUR-M、FUR-H 组及神经节苷脂组大鼠大脑含水量相比模型组均降低 ($P < 0.05$) (图 2)。



* $P < 0.05$ compared with sham operation group;
$P < 0.05$ compared with model group; $\Delta P < 0.05$ compared with FUR-L group; $\blacktriangle P < 0.05$ compared with FUR-M group

图 2 大鼠大脑含水量

Fig 2 Water content of rat brain

2.3 呋塞米 (FUR) 对大鼠血脑屏障损伤的影响

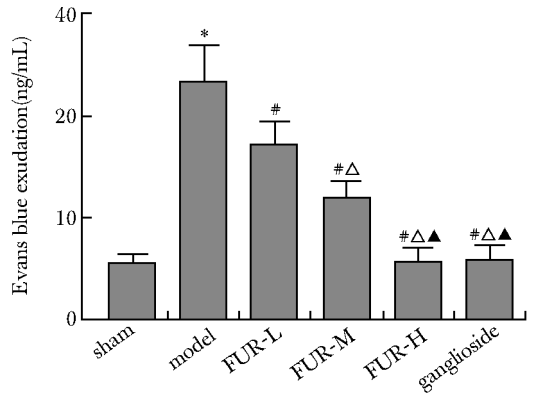
模型组大鼠 Evans 蓝渗出量相比假手术组明显升高 ($P < 0.05$)。FUR-L、FUR-M、FUR-H 组及神经节苷脂组大鼠 Evans 蓝渗出量相比模型组均呈剂量依赖性降低 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.4 呋塞米 (FUR) 对大鼠海马神经元损伤的影响

假手术组大鼠海马神经元无损伤;模型组大鼠海马神经元变性坏死,皱缩变小,数目明显减少,呈现严重病理损伤;相比模型组, FUR-L、FUR-M、FUR-H 组及神经节苷脂组大鼠脑海马神经元病理损伤均减轻,且 FUR 各组随剂量升高,海马神经元病理损伤减轻程度增强,相比神经节苷脂组, FUR-H 组大鼠海马神经元病理损伤减轻程度差异无统计学意义 (图 4)。

2.5 呋塞米 (FUR) 对大鼠血清 IL-6 及 IFN- γ 水平的影响

模型组大鼠血清 IL-6 及 IFN- γ 水平相比假手术组明显升高 ($P < 0.05$)。FUR-L、FUR-M、FUR-H 组及神经节苷脂组大鼠血清 IL-6 及 IFN- γ 水平相比模型组均降低 ($P < 0.05$) (图 5)。



* $P < 0.05$ compared with sham operation group;
$P < 0.05$ compared with model group; $\Delta P < 0.05$ compared with FUR-L group; $\blacktriangle P < 0.05$ compared with FUR-M group

图 3 大鼠 Evans 蓝渗出量

Fig 3 Evans blue exudation in rats

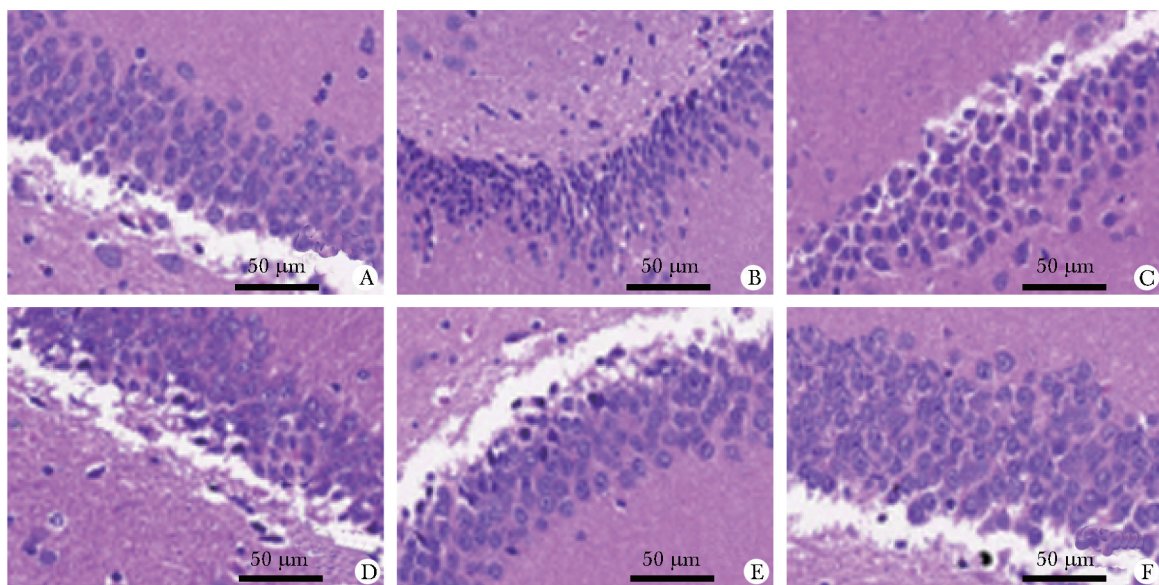
2.6 呋塞米 (FUR) 对大鼠脑组织 PERK/eIF2 α /CHOP 通路相关蛋白表达的影响

模型组大鼠脑组织 PERK/eIF2 α /CHOP 通路相关蛋白 p-PERK/PERK、p-eIF2 α /eIF2 α 、CHOP 表达水平相比假手术组明显升高 ($P < 0.05$)。FUR-L、FUR-M、FUR-H 组及神经节苷脂组大鼠脑组织 PERK/eIF2 α /CHOP 通路相关蛋白 p-PERK/PERK、p-eIF2 α /eIF2 α 、CHOP 表达水平相比模型组均降低 ($P < 0.05$) (图 6)。

3 讨论

ICH 易发于中老年群体,发病迅速,病情危重,易引发偏瘫、神经功能缺损等后遗症,如今仍是一个尚未解决的医学难题^[10]。内质网是一种膜性细胞器,脑实质出血后,形成的血肿可刺激神经细胞产生内质网应激反应,引发严重的神经炎症反应,造成神经功能缺损及脑水肿,最终引发继发性脑损伤^[11]。本文采用脑定位注射 IV 型胶原酶的方法建立 ICH 大鼠模型,结果表明 IV 型胶原酶可造成脑实质出血,诱发神经炎症反应,引起脑水肿,神经元凋亡,血脑屏障受损,最终导致神经功能障碍。

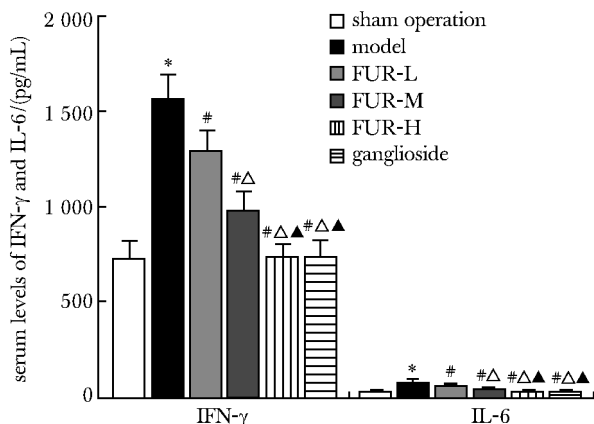
研究显示,减轻脑水肿,对减轻 ICH 脑损伤具有重要意义,因而利尿脱水是 ICH 的有效治疗方法, FUR 作为一种强效利尿剂,可对肾小管髓袢升支粗段发挥作用,在 ICH 的临床治疗中得到了广泛



A. sham operation group; B. model group; C. FUR-L group; D. FUR-M group; E. FUR-H group; F. ganglioside group

图4 HE染色检测大鼠海马神经元损伤情况

Fig 4 HE staining was used to detect the damage of hippocampal neurons (scale bar=50 μm)



* $P < 0.05$ compared with sham operation group;

$P < 0.05$ compared with model group; $\Delta P < 0.05$ compared with FUR-L group;

▲ $P < 0.05$ compared with FUR-M group

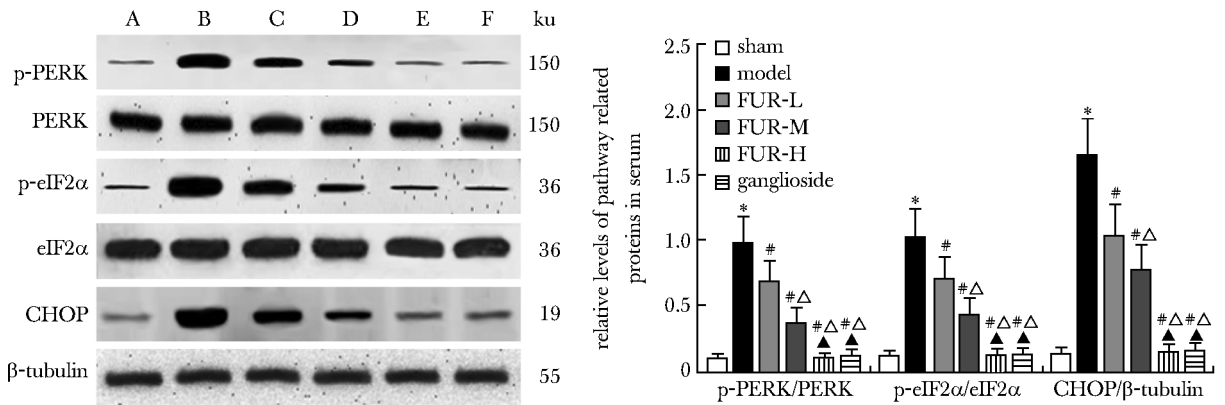
图5 ELISA检测大鼠血清IL-6及IFN- γ 水平

Fig 5 ELISA was used to detect the serum levels of IFN- γ and IL-6 in rats (pg/mL)

应用^[12],但其药理机制目前还未有详细的阐释。PERK/eIF2 α /CHOP通路是主要的内质网应激通路,当内质网受到氧化应激、缺血/再灌注、钙离子代谢紊乱及糖基化反应异常等病理因素刺激时,会发生应激反应,此时PERK/eIF2 α /CHOP信号通路激

活,引发细胞凋亡和组织损伤,下调PERK及eIF2 α 磷酸化水平,可抑制CHOP蛋白表达,降低内质网应激,减少细胞凋亡,改善脑血管及肾组织损伤^[13-14],因而推测,FUR可能下调PERK/eIF2 α /CHOP通路,抑制ICH后内质网应激,进而缓解其继发性脑损伤。本文结果显示,ICH大鼠经FUR处理后,其海马神经元病理损伤有不同程度减轻,另外大鼠Longa评分、Evans蓝渗出量、大脑含水量、血清IFN- γ 及IL-6水平、p-PERK/PERK、p-eIF2 α /eIF2 α 、CHOP表达水平均降低,且呈剂量依赖性,表明FUR可下调PERK/eIF2 α /CHOP通路蛋白表达,抑制内质网应激及炎症反应,减少海马神经元凋亡,缓解脑水肿,改善ICH大鼠神经功能障碍。

综上所述,FUR可降低PERK、eIF2 α 磷酸化水平,下调CHOP蛋白表达,减弱内质网应激及炎症反应,缓解脑水肿和神经元损伤,减轻ICH引发的继发性脑损伤,促使神经功能修复,抑制PERK/eIF2 α /CHOP信号通路激活可能是其药理机制之一,但本文只做了初步探究,还存在一定不足,后续还应使用该信号通路激活剂及抑制剂进行对照验证。



A. sham operation group; B. model group; C. FUR-L group; D. FUR-M group; E. FUR-H group; F. ganglioside group; * $P < 0.05$ compared with sham operation group; # $P < 0.05$ compared with model group; $\Delta P < 0.05$ compared with FUR-L group; $\blacktriangle P < 0.05$ compared with FUR-M group

图 6 免疫印迹检测各组大鼠脑组织 PERK/eIF2 α /CHOP 通路相关蛋白表达

Fig 6 Western blot was used to detect the expression of PERK/eIF2 α /CHOP pathway related proteins in brain tissue of rats in each group

参考文献:

- [1] Lai X, Xiong Y, Zhou J, *et al.* Verbascoide attenuates acute inflammatory injury in experimental cerebral hemorrhage by suppressing TLR4[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2019, 519:721-726.
- [2] Chen J, Zhang M, Zhu M, *et al.* Paeoniflorin prevents endoplasmic reticulum stress-associated inflammation in lipopolysaccharide-stimulated human umbilical vein endothelial cells via the IRE1 α /NF- κ B signaling pathway[J]. *Food Funct*, 2018, 9:2386-2397.
- [3] Fan CL, Yao ZH, Ye MN, *et al.* Fuziline alleviates isoproterenol-induced myocardial injury by inhibiting ROS-triggered endoplasmic reticulum stress via PERK/eIF2 α /ATF4/Chop pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24:1332-1344.
- [4] Li Y, Zhang Y, Fu H, *et al.* Hes1 knockdown exacerbates ischemic stroke following tMCAO by increasing ER stress-dependent apoptosis via the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway[J]. *Neurosci Bull*, 2019, 36:134-142.
- [5] 耿极光, 姚宝军. 呋塞米联合银杏达莫治疗外伤出血的临床效果[J]. *临床医学研究与实践*, 2019, 4:20-21.
- [6] 郭辉, 钟燕, 杨贤义, 等. 黄芪总皂苷对实验性脑出血大鼠脑水肿与神经功能的影响及作用机制[J]. *中国中医急症*, 2019, 28:83-86.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson SR, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- [8] 许翔. 甘油果糖联合呋塞米治疗急性脑出血后脑水肿效果研究[J]. *实用中西医结合临床*, 2020, 20:51-52.
- [9] 陈旭, 侯文, 张毅, 等. 补肾填精益髓方对大鼠脑出血后胶质纤维酸性蛋白, 尼氏小体表达水平的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2020, 29:1373-1378.
- [10] Keep RF, Andjelkovic AV, Xiang J, *et al.* Brain endothelial cell junctions after cerebral hemorrhage: changes, mechanisms and therapeutic targets[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2018, 38:1255-1275.
- [11] Wu H, Wang J, Cao M, *et al.* Effects of homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein on endoplasmic reticulum stress, autophagy, and neuronal apoptosis following intracerebral hemorrhage[J]. *IBRO Rep*, 2020, 9:207-217.
- [12] 李玉金. 呋塞米与托拉塞米对急性脑出血患者脑水肿的影响研究[J]. *中国处方药*, 2018, 16:80-81.
- [13] Wang MG, Fan R, Li WH, *et al.* Activation of PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP axis triggered by excessive ER stress contributes to lead-induced nephrotoxicity[J]. *BBA-Mol Cell Res*, 2019, 1866:713-726.
- [14] Chen Y, Zhang B, Cao S, *et al.* GanDouLing combined with penicillamine improves cerebrovascular injury via PERK/eIF2 α /CHOP endoplasmic reticulum stress pathway in the mouse model of Wilson's disease[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38:1-10.