·实验研究·

鸢尾素预处理激活 Notch 信号通路减轻大鼠全脑缺血-再灌注损伤

金朝　郭培培　杨新　王焱林　吴会生

【摘要】 **目的**　探讨鸢尾素预处理对全脑缺血-再灌注大鼠 Notch 信号通路的影响。**方法**　成年雄性 SD 大鼠 60 只，体重 300~350 g，按随机数字表法分为五组：假手术组（A 组）、缺血-再灌注组（B 组）、鸢尾素预处理组（C 组）、DAPT（Notch 信号通路选择性抑制剂）预处理组（D 组）和鸢尾素复合 DAPT 预处理组（E 组），每组 12 只。采用改良夹闭双侧颈总动脉合并低血压法建立大鼠全脑缺血-再灌注模型。假手术组仅分离双侧颈总动脉，不结扎。在大鼠全脑缺血-再灌注模型制备前 30 min，C 组静脉注射鸢尾素 10 μg/kg，D 组腹腔注射 DAPT 100 mg/kg，E 组静脉注射鸢尾素 10 μg/kg 后腹腔注射 DAPT 100 mg/kg。A 组和 B 组分别于相应时点静脉注射等体积生理盐水。再灌注 24 h 后采用神经功能缺失评分（NDS）法观察大鼠行为学变化，大脑干湿比重法观察大鼠脑含水量（BWC）变化，HE 染色及原位末端标记（TUNEL）法观察大鼠脑组织海马 CA1 区坏死及凋亡情况，Western blot 法检测 Casepase-3、Notch1、NICD 和 Hes1 蛋白相对含量。**结果**　与 A 组比较，B 组、C 组、D 组和 E 组 NDS 均明显升高，BWC 均明显增加，脑组织海马 CA1 区形态学损伤和神经元凋亡程度明显加重，Caspase-3、NICD、Notch1 和 Hes1 蛋白相对含量明显升高（$P<0.05$）。与 B 组比较，C 组大鼠 NDS 明显降低，BWC 明显减少，脑组织海马 CA1 区形态学损伤和神经元凋亡程度明显减轻，Caspase-3 蛋白相对含量明显降低，NICD、Notch1 和 Hes1 蛋白相对含量明显升高（$P<0.05$）。与 C 组比较，D 组和 E 组大鼠 NDS 明显升高，海马 CA1 区形态学损伤和神经元凋亡程度明显加重，Caspase-3 蛋白相对含量明显升高，NICD、Notch1 和 Hes1 蛋白相对含量明显降低（$P<0.05$）。D 组和 E 组各项指标差异无统计学意义。**结论**　鸢尾素预处理可减轻大鼠全脑缺血-再灌注后海马神经元凋亡，降低脑水肿程度，其机制可能与激活 Notch 信号通路有关。

【关键词】 鸢尾素；脑缺血-再灌注损伤；海马；Notch 信号通路；凋亡

Irisin on reduce global cerebral ischemia-reperfusion injury by activating Notch signaling pathway

JIN Zhao, GUO Peipei, YANG Xin, WANG Yanlin, WU Huisheng. Department of Anesthesiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: WU Huisheng, Email: wb002405@whu.edu.cn

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the effect of irisin on Notch signaling pathway in rats with global cerebral ischemia-reperfusion. **Methods**　A total of 60 healthy adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham group (group A), global cerebral ischemia reperfusion group (group B), irisin-treated group (group C), DAPT (seletive inhibitor of Notch signaling pathway)-treated group (group D) and irisin combined with DAPT-treated group (group E), each group enrolled 12 rats. A rat model of global cerebral ischemia-reperfusion for group B was established by improved clipping of bilateral common carotid artery occlusion for 20 minutes and reperfusion for 24 hours combined with hypotension. In group A, only bilateral common carotid arteries separated without ligation. Thirty minutes before cerebral ischemia, rats in group C were injected with 10 μg/kg irisin intravenously, rats in group D were intraperitoneally injected with DAPT 100 mg/kg, and rats in group E were injected with both irisin intravenously and DAPT intraperitoneally. Normal saline was intravenously injected at the corresponding time points in group A and group B. Twenty-four hours after reperfusion, neurological function was evaluated by neurological deficit score (NDS). The brain water content (BWC) was used to assess brain edema. HE staining and TdT-nediated dUTP nick end labeling (TUNEL) were used to observe the neuronal necrosis and apoptosis of hippocampal CA1 region in rats respectively. The protein expression of Caspase-3, Notch1, NICD, and Hes1 were detec-

DOI：10.12089/jca.2021.01.014
基金项目：武汉大学中南医院科技创新培育基金资助项目（znpy2018020）
作者单位：430071　武汉大学中南医院麻醉科
通信作者：吴会生，Email：wb002405@whu.edu.cn

ted by Western blot. **Results** Compared with group A, the NDS were higher, BWC were increased, the morphological damage were worse, the TUNEL positive cells increased, and the protein expression of Caspase-3, NICD, Notch1 and Hes1 up-regulated in other four groups ($P < 0.05$). Compared with group B, the NDS were lower, the BWC were decreased, the morphological damage alleviated, the TUNEL positive cells reduced, the expression of Caspase-3 down-regulated, the protein expression of NICD, Notch1 and Hes1 up-regulated in group C ($P < 0.05$). Compared with group C, the NDS were higher, the BWC were increased, the morphological damage were worse, the TUNEL positive cells increased, the expression of Caspase-3 up-regulated, and the protein expression of NICD, Notch1 and Hes1 down-regulated in groups D and E ($P < 0.05$). **Conclusion** Irisin pretreatment can alleviate the morphological damage and cerebral edema after global cerebral ischemia-reperfusion. The mechanism may be related to the early activation of Notch signaling pathway.

【Key words】 Irisin; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Hippocampus; Notch signaling pathway; Apoptosis

全脑缺血-再灌注损伤是临床上休克、心肺复苏以及心脏大血管手术中均会出现的复杂病理生理过程,常引起继发性脑水肿、神经功能障碍等相关并发症[1],目前临床治疗效果均不理想[2-3]。本课题组前期研究发现缺血性卒中患者血清中鸢尾素浓度与神经功能成正相关[4],且外源性鸢尾素可一定程度减轻脑缺血-再灌注损伤[5],但相关机制尚不甚清楚。Yang 等[6]研究表明,Notch 信号通路可通过减轻神经元凋亡,降低脑缺血-再灌注损伤的程度,鉴于此,本实验拟观察外源性鸢尾素预处理对大鼠全脑缺血-再灌注损伤的影响,并探讨其机制是否与调节 Notch 信号通路有关。

材料与方法

实验分组与方法　成年雄性 SD 大鼠 60 只,体重 300~350 g,由武汉大学医学部动物中心提供[动物使用许可证号:SYXK(鄂)2015-0025]。按随机数字表法分为五组:假手术组(A 组)、缺血-再灌注组(B 组)、鸢尾素治疗组(C 组)、DAPT(γ-分泌酶抑制剂,间接抑制 γ-分泌酶底物 Notch 的活性,从而影响细胞信号传导和分化)治疗组(D 组)和鸢尾素复合 DAPT 治疗组(E 组),每组 12 只。

制备全脑缺血-再灌注模型　采用改良夹闭双侧颈总动脉合并低血压法建立模型[3]。大鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉后,仰卧位固定,分离双侧颈总动脉、右侧颈总静脉和一侧股动脉。于颈总静脉沿心脏方向穿刺置管用于抽血,股动脉沿心脏方向穿刺置管用于监测血压。使用肝素化的注射器经颈总静脉缓慢抽取大鼠全身 30%~35%血量的静脉血并置于 37.5 ℃水浴中,同时使其平均动脉压维持在 35~45 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),使用无创微动脉夹夹闭双侧颈总动脉。夹闭颈总动脉 20 min 后松开动脉夹恢复灌注并经右侧颈总静脉缓慢回输血液(回输速度约 1.2 ml/min),结扎右颈总静脉和一侧股动脉,缝合伤口。假手术组仅分离双侧颈总动脉,不结扎血管。整个手术过程中采用白炽灯照射,维持大鼠直肠温 37.3~37.7 ℃,待大鼠翻正反射恢复且完全清醒后放回笼中饲养。

药物干预　大鼠全脑缺血-再灌注模型制备前 30 min,C 组静脉注射鸢尾素 10 μg/kg,D 组腹腔注射 DAPT 100 mg/kg,E 组静脉注射鸢尾素 10 μg/kg 后腹腔注射 DAPT 100 mg/kg。A 组和 B 组分别于相应时间点静脉注射等体积生理盐水。

神经功能缺失评分(neurological deficit score, NDS)　再灌注 24 h 后,由同一名观察者在不知具体分组的情况下参照 Li 等[5]研究方法,对各组大鼠的神志、听力、嗅觉、视觉、呼吸、神经及角膜反射、运动及定向力、对新环境的适应力、饮食及有无癫痫发作等各方面进行评分,神经功能完全正常为 0 分,脑死亡为 100 分。

脑含水量(brain water content, BWC)*测定*　再灌注 24 h 后,每组取 6 只大鼠深麻醉后断头处死,在冰皿上迅速取出脑组织,沿矢状缝将大脑左右半球分开。取出大脑左半球,用滤纸吸干表面水分,称湿重后置于 110 ℃烤箱中烘烤 24 h 至恒重,取出后立即称干重,计算 BWC(%)=(湿重-干重)÷湿重×100%。

病理学观察　再灌注 24 h 后,每组取 6 只大鼠深麻醉后断头处死,在冰皿上迅速取出脑组织,4%多聚甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,冠状切片。行常规 HE 染色,400 倍光镜下观察海马 CA1 区神经元病理学结果。

原位末端标记(TdT-nediated dUTP nick end labeling, TUNEL)*法染色检测神经元凋亡*　取石蜡包埋的脑组织切片,采用 TUNEL 法检测海马神经元凋亡情况,具体操作按试剂盒说明书进行。在海马

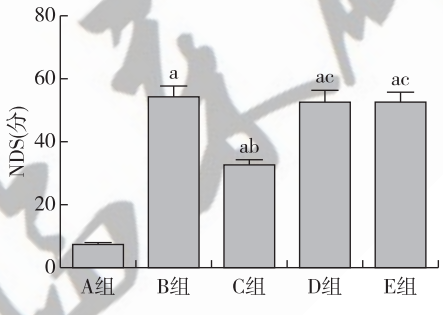
CA1 区于 400 倍光镜下随机取 5 个不重叠的视野进行观察，用全自动医学彩色图像分析系统对染色结果进行分析，正常细胞核呈蓝色，凋亡阳性细胞核呈棕黄色。计算神经元凋亡率(%) = 凋亡细胞数÷细胞总数×100%。

Caspase-3 蛋白及 Notch 信号通路相关蛋白检测　将剩下的大脑右半球取海马组织匀浆后提取总蛋白，进行蛋白浓度测定后行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、加入兔抗鼠一抗孵育过夜、加二抗室温孵育 2 h、化学发光后压片曝光、将 X 光胶片进行扫描、采用 quantity one 图象分析软件分析目的条带的灰度值，以 β-actin 条带灰度值为参照，定量检测 Caspase-3（BM4620）、Notch1（A00033-2）、NICD（A00033-1）和 Hes1（BM4488）的蛋白相对含量。

统计分析　采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析。正态分布计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差（ANOVA）分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

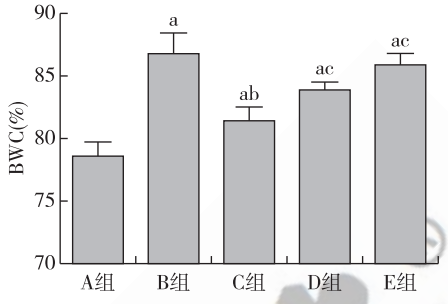
NDS　与 A 组比较，B 组、C 组、D 组和 E 组均于再灌注 24 h 后出现明显神经功能障碍，NDS 明显升高（$P<0.05$）。与 B 组比较，C 组于再灌注 24 h 后神经功能障碍程度明显减轻，NDS 明显降低（$P<0.05$）；D 组和 E 组 NDS 差异无统计学意义。与 C 组比较，D 组和 E 组于再灌注 24 h 后神经功能障碍程度明显加重，NDS 明显升高（$P<0.05$）。D 组和 E 组间 NDS 差异无统计学意义（图 1）。



注：与 A 组比较，[a]$P<0.05$；与 B 组比较，[b]$P<0.05$；与 C 组比较，[c]$P<0.05$

图 1　五组大鼠 NDS 的比较

BWC　与 A 组比较，B 组、C 组、D 组和 E 组 BWC 明显增加（$P<0.05$）。与 B 组比较，C 组 BWC 明显减少（$P<0.05$），D 组和 E 组 BWC 差异无统计学意义。与 C 组比较，D 组和 E 组 BWC 明显增加（$P<0.05$）。D 组和 E 组间 BWC 差异无统计学意义（图 2）。



注：与 A 组比较，[a]$P<0.05$；与 B 组比较，[b]$P<0.05$；与 C 组比较，[c]$P<0.05$

图 2　五组大鼠 BWC 的比较

脑组织病理学形态　400 倍光镜下观察大鼠海马 CA1 区神经元病理学结果：A 组海马 CA1 区结构正常，未见明显坏死细胞；B 组海马 CA1 区结构破坏严重，可见大量坏死锥体细胞。与 A 组比较，B 组、C 组、D 组和 E 组海马 CA1 区损伤程度明显加重。与 B 组比较，C 组海马 CA1 区损伤程度明显减轻，D 组和 E 组海马 CA1 区损伤程度略有减轻。与 C 组比较，D 组和 E 组海马 CA1 区损伤程度明显加重。D 组和 E 组间海马 CA1 区损伤程度差异无统计学意义（图 3）。

TUNEL 法检测神经元凋亡　A 组海马 CA1 区未见明显凋亡细胞，B 组海马 CA1 区可见大量 TUNEL 阳性细胞。与 A 组比较，B 组、C 组、D 组和 E 组海马 CA1 区凋亡程度明显加重。与 B 组比较，C 组海马 CA1 区凋亡程度明显减轻；D 组和 E 组凋亡程度和凋亡率差异均无统计学意义。与 C 组比较，D 组和 E 组海马 CA1 区凋亡程度明显加重。D 组和 E 组间海马 CA1 区凋亡程度和凋亡率差异无统计学意义（图 4）。

Caspase-3 蛋白及 Notch 信号通路相关蛋白相对含量　与 A 组比较，B 组、C 组、D 组和 E 组中 Caspase-3、NICD、Notch1 和 Hes1 蛋白相对含量均明显升高（$P<0.05$）。与 B 组比较，C 组中 Caspase-3 蛋白相对含量明显降低，NICD、Notch1 和 Hes1 蛋白相对含量均明显升高（$P<0.05$）；D 组和 E 组 Caspase-3、NICD、Notch1 和 Hes1 蛋白相对含量差异均无统计学意义。与 C 组比较，D 组和 E 组中 Caspase-3 蛋白相对含量明显升高，NICD、Notch1 和 Hes1 蛋白相对含量均明显降低（$P<0.05$）。D 组和 E 组间 Caspase-3、NICD、Notch1 和 Hes1 蛋白相对含量差异均无统计学意义（图 5—8）。

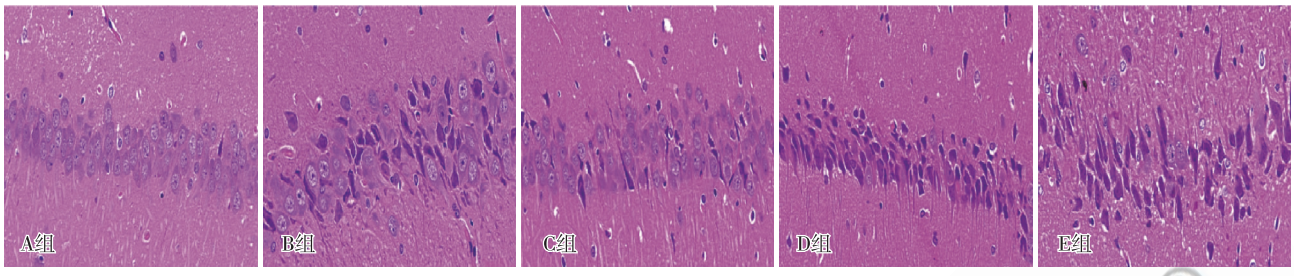


图 3　五组大鼠脑组织海马 CA1 区 HE 染色图(×400)

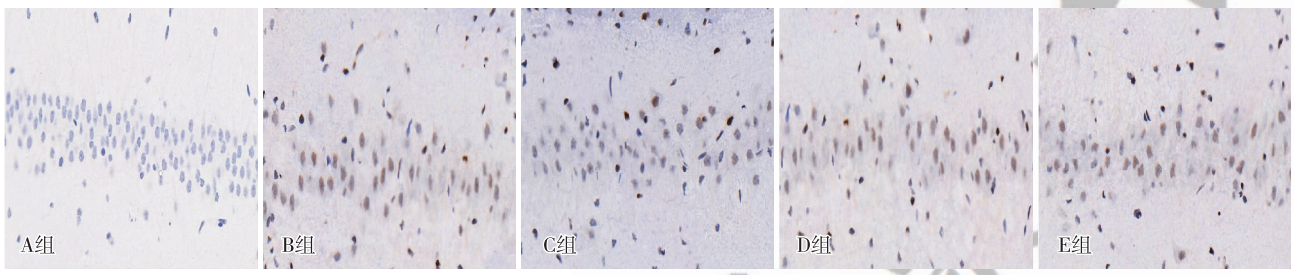
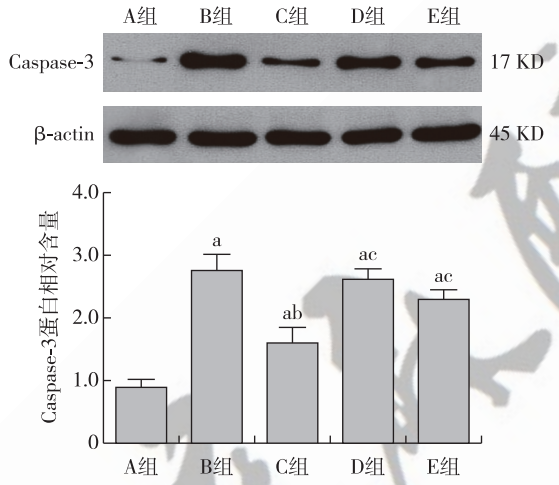
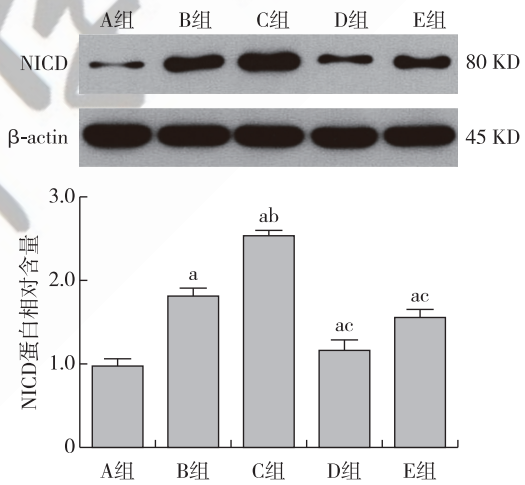


图 4　五组大鼠海马神经元凋亡的 TUNEL 染色图(×400)



注：与 A 组比较，$^{a}P<0.05$；与 B 组比较，$^{b}P<0.05$；与 C 组比较，$^{c}P<0.05$

图 5　五组大鼠 Caspase-3 蛋白相对含量的比较



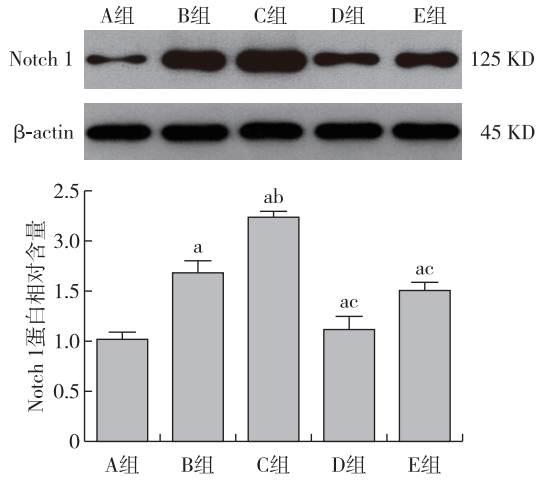
注：与 A 组比较，$^{a}P<0.05$；与 B 组比较，$^{b}P<0.05$；与 C 组比较，$^{c}P<0.05$

图 6　五组大鼠 NICD 蛋白相对含量的比较

讨　论

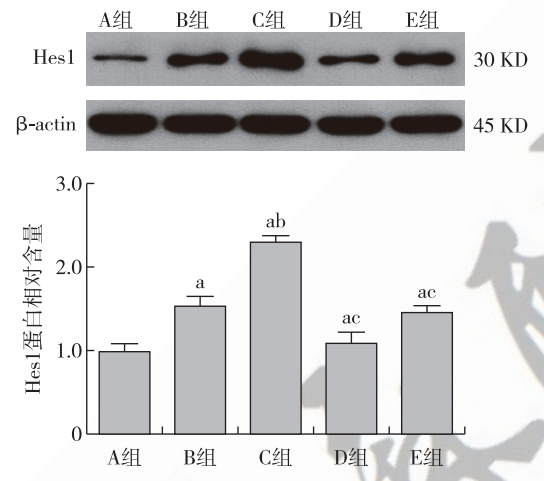
本实验参照 Catanese 等[3]研究中介绍的方法，夹闭双侧颈总动脉合并低血压 20 min，再灌注 24 h，建立大鼠全脑缺血-再灌注模型。NDS、BWC、HE 染色及 TUNEL 法等实验结果均提示全脑缺血-再灌注模型构建成功。

脑缺血-再灌注损伤是复杂的病理生理过程，而细胞凋亡是其中至关重要的机制之一。脑组织特定区域的神经元凋亡，不仅会引起神经功能受损，还可引起血脑屏障通透性增加，诱发脑水肿。因此，减轻神经元凋亡被认为是保护神经功能的重要措施之一。鸢尾素是一种通过脂肪组织、肝脏、脑和其他外周组织相联系而发挥生物学效应的新型肌肉因子，由纤维连结蛋白Ⅲ型域包含蛋白 5（fibronectin type Ⅲ domain-containing protein 5，FNDC5）经蛋白水解酶剪切后形成[7-8]，最早被发现与代谢性疾病相关[9-10]。新近研究[11]发现运动可以增加 FNDC5 的表达，促进海马神经元分泌鸢尾素，提示鸢尾素可能与脑组织中能量代谢有关。本



注：与 A 组比较，[a]$P<0.05$；与 B 组比较，[b]$P<0.05$；与 C 组比较，[c]$P<0.05$

图 7　五组大鼠 Notch1 蛋白相对含量的比较



注：与 A 组比较，[a]$P<0.05$；与 B 组比较，[b]$P<0.05$；与 C 组比较，[c]$P<0.05$

图 8　五组大鼠 Hes1 蛋白相对含量的比较

课题组前期研究发现缺血性卒中患者血液中鸢尾素的浓度与其短期预后呈正相关[5]。本实验结果显示，与单纯全脑缺血-再灌注组比较，鸢尾素预处理组 NDS 明显降低、BWC 明显减少、海马神经元凋亡程度明显减轻以及反应细胞凋亡的标志蛋白 Caspase-3 相对含量明显降低，以上结果均提示鸢尾素可减轻脑缺血-再灌注损伤。

Notch 信号通路表达于哺乳动物大脑皮层和海马神经元中[12]。在生理情况下，大脑发育时 Notch 信号通路决定了神经细胞的命运，调节神经干细胞的增殖、分化和凋亡[13]。Stump 等[14]表明，激活 Notch 信号通路可通过促进神经干细胞增殖，使缺血后神经功能缺损得以恢复；而阻断 Notch 信号通路后，随着 NICD、Hes1 蛋白表达量的降低，神经干细胞的增殖也明显减少。Zhao 等[15]研究发现，用电针活化 Notch 信号通路，可促进海马区神经干细胞的增殖、迁移和分化，从而对脑缺血所致神经的功能缺损起到防治作用。本研究结果显示，脑缺血-再灌注 24 h 后 Notch 信号通路被激活，其关键因子 Notch1、NICD 和 Hes1 蛋白相对含量明显升高，经外源性鸢尾素预处理后 Notch1、NICD 和 Hes1 蛋白相对含量进一步升高，提示 Notch 信号通路被进一步激活。为了进一步探讨鸢尾素的神经保护作用是否与其激活 Notch 信号通路相关，本研究中加入了 Notch 信号通路选择性抑制剂 DAPT。研究结果显示，与单纯使用鸢尾素预处理相比较，鸢尾素和 DAPT 同时预处理会使大鼠全脑缺血-再灌注后 BWC 明显增加，海马神经元凋亡率及 Caspase-3 蛋白相对含量明显升高，说明鸢尾素的神经保护作用被 Notch 信号通路选择性抑制剂 DAPT 所抵消。因此，以上研究结果提示鸢尾素可能是通过激活 Notch 信号通路发挥其神经保护作用。

然而，Notch 信号通路在脑组织中的改变所产生的效应尚有争议。Arumugam 等[16]研究表明，阻断 Notch 信号通路后，仍可通过多种途径提高小鼠脑缺血后 NDS。Yang 等[6]研究表明，活化 Notch 信号通路可通过减轻神经元凋亡对一过性脑缺血的小鼠发挥脑保护作用。Oya 等[17]研究认为，缺血脑损伤后一段时间内，Notch 信号通路可能在海马新生神经元的整合里发挥重要作用。本研究结果显示，鸢尾素可通过激活 Notch 信号通路减轻大鼠全脑缺血-再灌注损伤。这些研究结果的差异可能由于实验动物的种系、损伤模型以及处理方式不同所致。

综上所述，鸢尾素预处理可一定程度上减轻大鼠全脑缺血-再灌注后脑水肿的程度，抑制海马神经元凋亡，其机制可能与激活 Notch 信号通路有关。

参　考　文　献

[1] Hankey GJ. The global and regional burden of stroke. Lancet Glob Health, 2013, 1(5): e239-e240.

[2] Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. Lancet Neurol, 2016, 15(8): 869-881.

[3] Catanese L, Tarsia J, Fisher M. Acute ischemic stroke therapy overview. Circ Res, 2017, 120(3): 541-558.

[4] Wu H, Guo P, Jin Z, et al. Serum levels of irisin predict short-

term outcomes in ischemic stroke. Cytokine, 2019, 122: 154303.
[5] Li DJ, Li YH, Yuan HB, et al. The novel exercise-induced hormoneirisin protects against neuronal injury via activation of the Akt and ERK1/2 signaling pathways and contributes to the neuroprotection of physical exercise in cerebral ischemia. Metabolism, 2017, 68: 31-42.
[6] Yang Q, Yan W, Li X, et al. Activation of canonical notch signaling pathway is involved in the ischemic tolerance induced bysevoflurane preconditioning in mice. Anesthesiology, 2012, 117(5): 996-1005.
[7] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1-α-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. Nature, 2012, 481(7382): 463-468.
[8] Kelly DP. Medicine. Irisin, light my fire. Science, 2012, 336(6077): 42-43.
[9] Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, et al. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. Metabolism, 2012, 61(12): 1725-1738.
[10] Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, et al. Cardiac, skeletal muscle and serum irisin responses to with or without water exercise in young and old male rats: cardiac muscle produces more irisin than skeletal muscle. Peptides, 2014, 52: 68-73.
[11] Wrann CD, White JP, Salogiannnis J, et al. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1α/FNDC5 pathway. Cell Metab, 2013, 18(5): 649-659.
[12] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science, 1999, 284(5415): 770-776.
[13] Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. Nature, 2006, 442(7104): 823-826.
[14] Stump G, Durrer A, Klein AL, et al. Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. Mech Dev, 2002, 114(1-2): 153-159.
[15] Zhao Y, Chen X, Ma L, et al. Electroacupuncture pretreatment induces tolerance against focal cerebral ischemia through activation of canonical Notch pathway. BMC Neurosci, 2012, 13: 111.
[16] Arumugam TV, Chan SL, Jo DG, et al. Gamma secretase-mediated Notch signaling worsens brain damage and functional outcome in ischemic stroke. Nat Med, 2006, 12(6): 621-623.
[17] Oya S, Yoshikawa G, Takai K, et al. Attenuation of Notch signaling promotes the differentiation of neural progenitors into neurons in the hippocampal CA1 region after ischemic injury. Neuroscience, 2009, 158(2): 683-692.

（收稿日期：2020－02－28）

·读者·作者·编者·

《临床麻醉学杂志》关于学术不端行为的声明

为维护学术期刊的严肃性和科学性，并向广大读者负责，本刊编辑部重申坚决反对抄袭、剽窃、一稿两投、一稿两用等学术不端行为，并采取以下预防和惩处措施：（1）稿件刊出前所有作者须在校样首页亲笔签名，并加盖公章；稿件文责自负。（2）投稿后 3 个月内未收到稿件处理意见，稿件可能仍在审阅中；作者欲投他刊，请先与编辑部联系撤稿，切勿一稿两投。（3）来稿如有学术不端行为嫌疑时，编辑部在认真收集有关资料和仔细核对后将通知第一作者，作者须对此作出解释。（4）如稿件被证实系一稿两用，本刊将在杂志和网站上刊登撤销该文的声明，并向作者所在单位通报；2 年内拒绝发表该作者的任何来稿。