

## 依达拉奉对 SAH 大鼠 JNK 信号通路及海马区神经细胞自噬的影响

卞育婕<sup>1</sup>, 刘俊杰<sup>1</sup>, 付程凯<sup>1</sup>, 赵雅宁<sup>2</sup>, 刘仁杰<sup>1</sup>, 刘胜冬<sup>1</sup>, 徐继伟<sup>3</sup>, 李建民<sup>3\*</sup>, 田景瑞<sup>4</sup>

1. 华北理工大学, 河北 唐山 063000
2. 华北理工大学护理与康复学院, 河北 唐山 063000
3. 华北理工大学, 附属医院神经外科, 河北 唐山 063000
4. 华北理工大学基础医学院, 河北省慢性疾病重点实验室, 唐山市慢性病临床基础研究重点实验室, 河北 唐山 063000

**摘要:**目的 探讨依达拉奉对蛛网膜下腔出血大鼠 JNK 信号通路及海马区神经细胞自噬的影响。方法 雄性 SD 大鼠 40 只, 随机等分为假手术组 (Sham 组)、SAH 模型组、依达拉奉治疗组 (Edaravone 组)、JNK 抑制剂组 (SP600125 组)。改良血管内穿刺法制成大鼠 SAH 模型; SP600125 组于建模前 30 min, 侧脑室注射 SP600125 (3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$ ); Edaravone 组于建模后 5 mg/kg Edaravone 腹腔注射, 12 h 后重复给药。24 h 处死, 检测各组海马区神经元形态、数量及 Beclin-1、LC3-II、p-JNK 蛋白的变化。结果 与 Sham 组相比, SAH 组海马区神经元排列紊乱、细胞多呈三角锥形、存活数量明显减少, ( $P < 0.05$ ); Beclin-1、LC3-II、p-JNK 表达升高, ( $P < 0.05$ )。与 SAH 组相比, Edaravone 组、SP600125 组神经元坏死率明显下降、形态正常细胞数增多, ( $P < 0.05$ ); Beclin-1、LC3-II、p-JNK 表达明显降低, ( $P < 0.05$ )。结论 依达拉奉可降低 SAH 大鼠海马区神经元 Beclin-1 和 LC3-II 表达, 减轻 SAH 后早期脑损伤, 其可能是 JNK 通路依赖性的。

**关键词:** 依达拉奉; 蛛网膜下腔出血; 自噬; JNK 信号通路

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2016.06.009

## Effects of Edaravone on JNK signaling pathway and neuronal autophagy in the hippocampus in SAH rats

BIAN Yu-Jie<sup>1</sup>, LIU Jun-Jie<sup>1</sup>, FU Cheng-Kai<sup>1</sup>, ZHAO Ya-Ning<sup>2</sup>, LIU Ren-Jie<sup>1</sup>, LIU Sheng-Dong<sup>1</sup>, XU Ji-Wei<sup>3</sup>, LI Jian-Min<sup>3\*</sup>, TIAN Jing-Rui<sup>4</sup>. 1 North China University of Science and Technology. 2 Nursing and Rehabilitation Institute of North China University of Science and Technology. 3 Department of Neurosurgery, the Affiliated Hospital. 4 Basic Medicine Institute of North China University of Science and Technology, Key laboratory of chronic disease in HeBei province, TangShan chronic disease clinical basic research key laboratory; HeBei TangShan 063000

**Abstract: Objective** To investigate the effects of edaravone on the JNK signaling pathway and neuronal autophagy in the hippocampus in rats with subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** A total of 40 adult male Sprague-Dawley rats were equally and randomly divided into four groups: sham-operation group, SAH model group, edaravone group, and SP600125 (JNK inhibitor) group. The SAH model rats were prepared using the modified intracranial arterial puncture method; the sham-operation group was treated as well, but the artery was not catheterized. The rats in the SP600125 group received an injection of SP600125 solution (3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$ ) at the lateral ventricle through a stereotaxic apparatus at 30 minutes before SAH modeling. The rats in the edaravone group received an intraperitoneal injection of edaravone (5 mg/kg) after SAH modeling and once again after 12 hours. All rats were sacrificed after 24 hours. HE staining was used to observe the changes in the morphology and number of hippocampal neurons, and immunohistochemical staining and Western blot were used to evaluate the changes in the expression of Beclin-1, LC3-II protein, and p-JNK protein. **Results** In the

**基金项目:** 河北省卫生厅重点医学项目 (zd2013087); 唐山市科技局课题 (14130220B); 河北省 2016 年大学生创新创业训练计划项目 (201610081029)。

**收稿日期:** 2016-09-25; **修回日期:** 2016-11-23

**作者简介:** 卞育婕 (1994-), 女, 本科在读。研究方向: 神经损伤与神经保护。

**通讯作者:** 李建民 (1962-), 男, 医学博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师。研究方向: 神经损伤与神经保护。

sham-operation group, the brain tissues remained integral in structure and the number and morphology of hippocampal neurons remained normal. In the SAH model group, hippocampal neurons mostly appeared disordered and triangular-pyramidal; the number of surviving cells was significantly lower than that in the sham-operation group ( $P < 0.05$ ); the expression of Beclin-1, LC3-II protein, and p-JNK protein was significantly higher than that in the sham-operation group ( $P < 0.05$ ). Compared with the SAH model group, the edaravone group and the SP600125 group had a significantly lower death rate of hippocampal neurons ( $P < 0.05$ ), a significantly higher number of neurons with normal morphology ( $P < 0.05$ ), and significantly lower expression of Beclin-1, LC3-II protein, and p-JNK protein ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Edaravone can reduce the expression of Beclin-1 and LC3-II protein in the hippocampal neurons of SAH rats and alleviate the early brain injury after SAH, which may be dependent on the JNK signaling pathway.

**Key words:** Edaravone; Subarachnoid hemorrhage; Autophagy; JNK signaling pathway

蛛网膜下腔出血 (Subarachnoid hemorrhage, SAH) 具有极高的病死率、致残率<sup>[1]</sup>。最新文献报道, SAH 后早期存在自噬的异常激活<sup>[2]</sup>。自噬在调控 SAH 神经元生与死的平衡中发挥重要作用, 适度的自噬可以保护神经元, 而过度的自噬导致神经元发生 II 型程序性死亡<sup>[3-4]</sup>。因此, 目前针对 SAH 后自噬的早期药物干预逐渐受到重视。依达拉奉 (Edaravone) 是一种强效的自由基清除剂, 2004 年在日本上市, 目前已应用于 SAH 的临床治疗。前期研究发现, 依达拉奉治疗后可弱化 SAH 后神经元自噬的激活, 但其具体作用机制尚未阐明。自噬的激活涉及多种复杂的分子机制, 例如, MAPK、ERK、P38、JNK 等均与自噬的激活存在一定关系<sup>[5]</sup>, 其中 JNK 通路与自噬联系最为密切, 现正逐渐成为研究热点<sup>[6]</sup>。本实验拟选定 JNK 信号通路, 观察 Edaravone 是否可以通过调节 JNK 信号通路影响 SAH 大鼠海马区神经元自噬的活性, 从而进一步明确依达拉奉的药理学机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

雄性清洁级健康 SD 大鼠 (体重范围 350 ~ 450 g) 40 只, 购于北京维通利华公司, 许可证号 SCXK (京) 2012 - 0001。随机等分为假手术组 (Sham 组)、蛛网膜下腔出血模型组 (SAH 组)、依达拉奉治疗组 (Edaravone 组)、JNK 抑制剂组 (SP600125 组), 术前禁食水 12 h。

### 1.2 试剂与仪器

兔抗 Beclin-1、LC3-II、p-JNK 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); PBS 缓冲液、枸橼酸盐缓冲液、DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 二甲亚砜溶剂 (DMSO) (美国 Sigma 公司); GADPH (武汉博士德生物工程有限公司); OLYMPUS 摄像显微镜 (日本奥林巴斯公司); 图像采集及分析系统 (北京航空航天大学); Gel-Doc 凝胶成

像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.3 SAH 大鼠模型制作及给药方法

动物模型的制备: 采用 Bederson 等<sup>[7]</sup>报道的血管内穿刺法并加以改良制作 SAH 模型<sup>[8]</sup>, 大鼠 10% 水合氯醛麻醉 (350 mg/kg 体重), 取颈部正中切口, 显微镜下暴露右侧颈总动脉主干及其分叉处, 分离颈外动脉后切断结扎。动脉夹分别夹闭颈总动脉和颈内动脉, 将 4-0 穿刺线经颈外动脉残端插入颈内动脉, 松开颈总动脉上的动脉夹, 将尼龙线向颅内插入造成 SAH 大鼠模型。Sham 组在当穿刺线刺入感到阻力时退出, 不刺破大脑前动脉与大脑中动脉分叉, 其余步骤同实验组。麻醉清醒后, 单笼饲养。Edaravone 组腹腔给药干预, SAH 造模后 5 mg/kg 腹腔注射, 12 h 后重复给药一次直至 24 h 处死。SP600125 组使用大鼠脑立体定位仪, 在造模前 30 min 给予脑室 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  SP600125 溶液 10  $\mu\text{l}$ 。

### 1.4 HE 染色

每组取 5 只大鼠, 于造模成功后 24 小时处死, 4% 多聚甲醛灌注取脑, 常规石蜡包埋, 切片; 梯度酒精水化, 行 HE 染色, 脱水、封片。每只大鼠海马 CA1 区取 6 个不完全重叠的视野, 在光学显微镜 (40  $\times$  10 倍) 下观察细胞形态。应用 Motic-6.0 图像采集及图像分析系统观察计数高位视野下的存活与坏死神经细胞数。

### 1.5 免疫组化

切片常规脱蜡至水, 高压热修复 90 S, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  封闭内源性过氧化氢酶, 分别滴加 p-JNK、LC3-II、Beclin-1 (均 1:200 稀释), 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 滴加二抗 (1:400), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染细胞核, 梯度酒精脱水、透明、中性树胶封片。PBS 代替一抗做阴性对照。每只大鼠每个因子取出 5 张切片待测, 其中每张切片定位海马 CA1 区在该区域用 400 倍光镜下随机抽取 5 个不完全重叠视野,

在 Olymapus 显微镜 (400 × 10) 中观察海马 CA1 区阳性细胞的变化,以胞核、胞浆或胞膜呈浅褐色为入选标准。并计数 (40 × 10) 倍视野下的阳性细胞数量。

1.6 Western-blot 实验

24 小时后断头,冰上取脑,液氮研磨总提取蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度,计算待测品蛋白浓度的上样量。制备分离胶 (12%) 浓缩胶 (5%),电泳:浓缩胶 80 MV 30 min,分离胶 100 mV 60 min。电泳之后再 100 mA 45 min 冰浴转膜。10% 脱脂牛奶抗原封闭,一抗 (1:1000) 4 度冰箱过夜。次日 1×TBST 室温摇床 5 min 3 次,二抗 (1:3000) 室内摇床孵育 2 h。TBST 洗膜,采用增强化学发光法 (ECL) 法显影目标条带。测定每个因子各时间点对应条带的灰度值,GAPDH 做内参照,用 Image Lab 5.0 测对条带进行分析,将目标蛋白与 GAPDH 的灰度值的比值作为对各因子各时间点相对的表达量做分析数据。

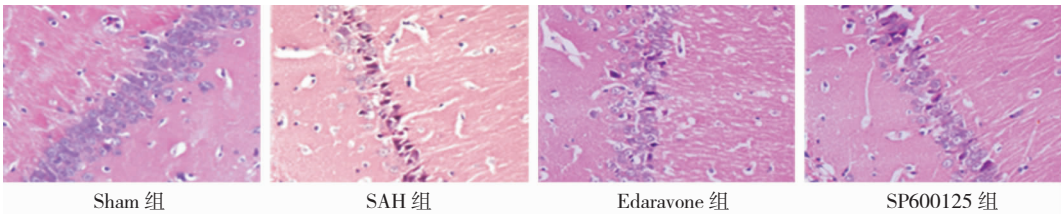


图 1 各组大鼠海马区神经元形态 (HE × 400)

表 1 各组大鼠海马区神经细胞数量比较 (n=5,  $\bar{x} \pm s$ ) (个/高倍视野)

分组	n	存活细胞数量
Sham 组	5	132.74 ± 2.18
SAH 组	5	70.52 ± 2.78 *
Edaravone 组	5	76.87 ± 2.56 #
SP600125 组	5	79.55 ± 2.48 #
F 值		790.239
P		0.000

注: \* P < 0.05, 与 Sham 组相比; # P < 0.05, 与 SAH 相比;

2.2 Beclin-1 和 LC3-II 免疫组化与 Western-blot 结果

免疫组化分析: Beclin-1、LC3-II 蛋白主要表达于细胞胞质,阳性细胞胞质中可见大量棕褐色颗粒。与 Sham 组比较,SAH 组阳性细胞数量明显增多 (P < 0.05); 与 SAH 组比较,Edaravone 组和 SP600125 组阳性细胞数量显著降低 (P < 0.05),但仍高于 Sham 组。见图 2、图 3、表 2。Western-Blot 定量分析:与 Sham 组比较,SAH 组 Beclin-1 表达量明显增高 (P < 0.05); 与 SAH 组相比,Edaravone 组、

1.7 统计学分析

采用 Excel 建立数据库,SPSS 统计软件进行数据分析,各项数据均以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用单因素方差分析 (one way, ANOVA),SNK 法 (student newman kenults, SNK) 进行两两比较, P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果

Sham 组大鼠脑组织结构规整,海马区神经细胞形态正常,数目多、排列有序、细胞核无固缩碎裂溶解,核仁明显。与 Sham 组相比,SAH 组海马区神经细胞数量明显减少,形态不规则 (P < 0.05); 核固缩、碎裂、溶解;神经元细胞肿胀坏死形成空泡状结构,最终导致神经细胞大量损伤;与 SAH 组相比,Edaravone 组神经细胞数量均较 SAH 明显增多、形态接近正常 (P < 0.05),SP600125 组神经元细胞损伤有所改善,细胞形态较规整、数量增多, (P < 0.05)。见图 1。细胞计数分析见表 1。

SP600125 组其表达量显著下降,但表达量仍高于 Sham 组 (P < 0.05)。与 Sham 组比较,SAH 组 LC3-II 表达量明显增高 (P < 0.05); 与 SAH 组相比,Edaravone 组、SP600125 组表达量显著下降,表达量高于 Sham 组 (P < 0.05)。见图 4、图 5、表 3。

2.3 p-JNK 蛋白免疫组化和 Western-blot 结果

阳性磷酸化 JNK 主要定位于细胞核,少数表达在细胞浆。阳性细胞可见浅褐色颗粒。Sham 组大鼠阳性细胞数目较少,与 Sham 组比较,SAH 组 p-JNK 蛋白阳性细胞数量较多, (P < 0.05)。与 SAH 组比较,Edaravone 组、SP600125 组 p-JNK 蛋白阳性细胞表达量均减少, (P < 0.05)。见图 6、表 2。Western-blot 定量分析:Sham 组 p-JNK 蛋白微弱表达, (P < 0.05); 与 Sham 组相比,SAH 组 p-JNK 蛋白表达量明显增加,差异有统计学意义 (P < 0.05); 与 SAH 组相比,Edaravone 组、SP600125 组 p-JNK 蛋白表达量均降低,但仍维持较高水平表达,高于 Sham 组, (P < 0.05)。图 7、表 3。

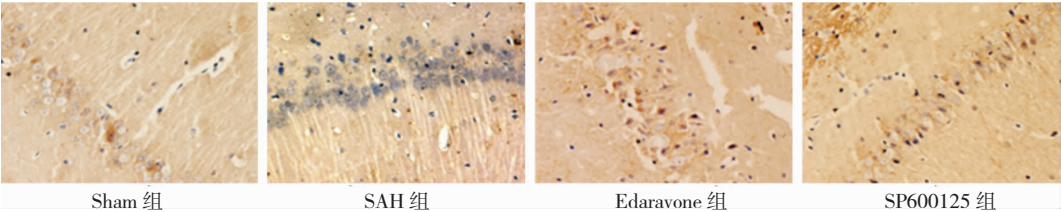


图2 各组SD大鼠海马区神经元 Beclin-1 的表达(免疫组化×400)

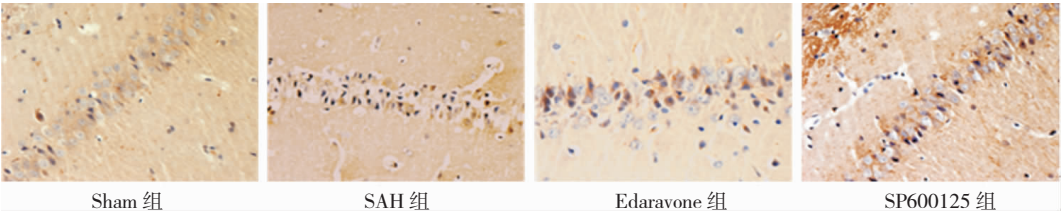


图3 各组SD大鼠海马区神经元 LC3II 的表达(免疫组化×400)

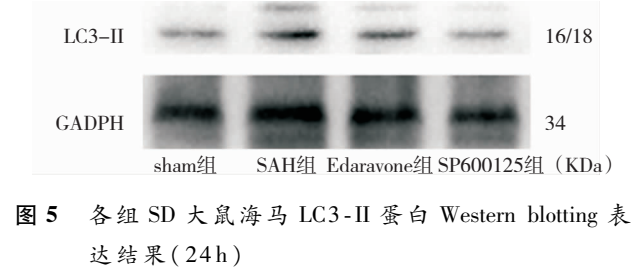
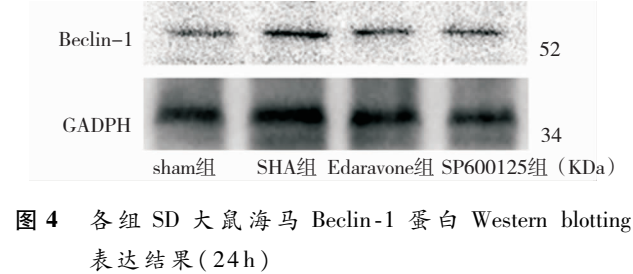


表2 各组大鼠海马区 Beclin-1、LC3II、p-JNK 蛋白表达结果( $n = 5, \bar{x} \pm s$ ) (个/高倍视野)

分组	Beclin-1	LC3II	p-JNK
Sham 组	23.86 ± 1.51	13.15 ± 0.76	0.71 ± 0.35
SAH 组	47.73 ± 2.48 *	42.13 ± 3.26 *	28.55 ± 3.05 *
Edaravone 组	40.05 ± 2.58 #	35.23 ± 3.59 #	24.80 ± 3.17 #
SP600125 组	42.33 ± 2.42 #	34.55 ± 2.75 #	20.12 ± 2.55 #
F 值	120.934	119.463	155.104
P 值	0.000	0.000	0.000

注: \*  $P < 0.05$ , 与 Sham 组相比; #  $P < 0.05$ , 与 SAH 相比;

表3 各蛋白在各组大鼠海马区 Western-blot 表达结果( $n = 5, \bar{x} \pm s$ )

Group	Beclin-1	LC3- II	p-JNK
Sham 组	0.0713 ± 0.0053	0.0716 ± 0.0062	0.0612 ± 0.0065
SAH 组	0.6426 ± 0.0410 *	0.5619 ± 0.0325 *	0.5618 ± 0.0425 *
Edaravone 组	0.5412 ± 0.0539 #	0.4326 ± 0.0621 #	0.4415 ± 0.0563 #
SP600125 组	0.5117 ± 0.0558 #	0.4516 ± 0.0528 #	0.4283 ± 0.0494 #
F 值	199.129	140.681	150.823
P 值	0.000	0.000	0.000

注: \*  $P < 0.05$ , 与 Sham 组相比; #  $P < 0.05$ , 与 SAH 相比

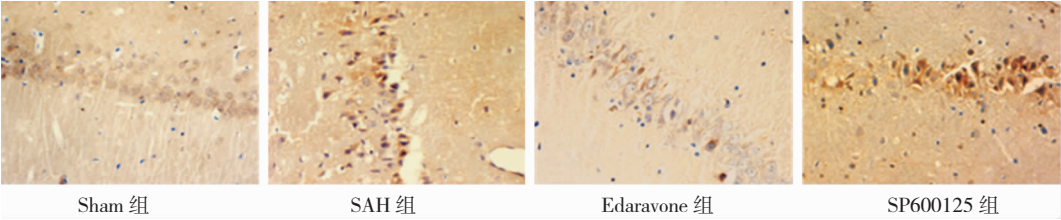


图6 各组SD大鼠海马区神经元 P-JNK 的表达(免疫组化×400)

3 讨论

本研究结果发现,Edaravone 治疗后可明显增加 SAH 大鼠海马区神经元存活数量,Edaravone 可能起到一定的神经保护作用。彭秉纲等<sup>[9,10]</sup>应用 Edaravone 对脑出血患者治疗后发现神经功能有较好的改善;蔡谋善等<sup>[11]</sup>应用 Edaravone 联合丹参川芎嗪治疗急性脑梗死患者发现,其神经功能缺损程度和日常生活能力均有明显改善。近年来 Edaravone 在



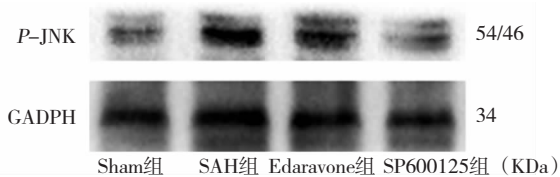


图 7 各组 SD 大鼠海马 P-JNK 蛋白 Western blotting 表达结果(24h)

SAH 的治疗中也有一定的应用,并取得良好疗效。我们的研究与此一致,依达拉奉可减少神经元的损伤,起到一定的神经保护与神经修复作用。

自噬(Autophagy),又叫做 II 型程序性细胞死亡,研究显示多种疾病的病理生理过程均有自噬的激活,但是自噬的作用尚未完全统一,目前学术界一致认为自噬是一把双刃剑,适度的自噬可以促进细胞的存活,而过度的自噬则加速细胞的死亡<sup>[3-4]</sup>。本实验前期发现,自噬途径在 SAH 早期即被激活,并在 24h 时最强。

本实验选择于 SAH 后 24h 处死大鼠并发现,而应用 Edaravone 干预后,自噬蛋白的水平显著下降,结合病理学结果分析,SAH 早期病理生理学过程可能存在自噬的过度激活,Edaravone 治疗后可能把自噬抑制在适度的水平,从而起到神经保护作用。周波等<sup>[12]</sup>构建帕金森小鼠模型,应用 Edaravone 治疗发现小鼠海马区细胞内 Beclin-1、LC3-II 蛋白表达水平明显降低,神经细胞死亡数量减少,有效抑制自噬、发挥神经保护的作用,本实验结果与此一致,因此,我们认为 Edaravone 能够有效抑制自噬的活性,从而保护脑部神经元。自噬的激活涉及到细胞内外复杂的分子调控机制。有文献报道,JNK 通路与自噬关系密切<sup>[13]</sup>。本研究结果发现,Edaravone 干预后 p-JNK 的含量明显下降,而与 SP600125 干预后无显著差异,提示 Edaravone 可能对 JNK 信号通路起到一定的抑制作用。大量的氧自由基可能激活 JNK 通路,诱导细胞自噬、凋亡系统紊乱,最终导致神经细胞死亡。如前所述,Edaravone 可以抑制体内的脂质过氧化反应,清除氧自由基抑制炎症介质的形成,进而抑制了 JNK 信号通路的激活,下调自噬水平,减少 SAH 后自噬带来的神经元损伤。我们的结果认为,这可能是 Edaravone 的神经保护机制。

综上所述,Edaravone 可能通过抑制 JNK 信号通路,

降低神经细胞自噬的活性,从而起到一定的神经保护作用。但是 Edaravone 不仅仅依赖于此途径发挥保护作用,我们的研究只是冰山一角,Edaravone 更为广泛的药理学机制有待同仁更加深入的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Gao Y, Ding XS, Xu S, et al. Neuroprotective effects of edaravone on early brain injury in rats after subarachnoid hemorrhage. *Chin Med J (Engl)*. 2009,122(16):1935-1940.
- [2] 郝小可,史继新.蛛网膜下腔出血后早期脑损伤机制研究进展. *医学研究生学报*,2015,12(7):767-770.
- [3] Uekawa K, Hasegawa Y, Ma M, et al. Rosuvastatin ameliorates early brain injury after subarachnoid hemorrhage via suppression of superoxide formation and nuclear factor-kappa B activation in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014,23(6):1429-1439.
- [4] Wang Z, Shi XY, Yin J, et al. Role of autophagy in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Mol Neurosci*. 2012,46(1):192-202.
- [5] 覃芳,张智博. JNK 信号通路与自噬的研究进展. *中南大学学报(医学版)*,2015,40(9):1035-1038.
- [6] Lee S, Lee SJ, Coronata AA, et al. Carbon monoxide confers protection in sepsis by enhancing beclin-1 dependent autophagy and phagocytosis. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3):432-442.
- [7] Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke*, 1995, 26(6):1086-1091.
- [8] 尹风任,史学芳,扈玉华等.改良血管穿刺法大鼠蛛网膜下腔出血模型的制作及评价. *中华实验外科杂志*, 2008,25(8):975-977.
- [9] 彭秉纲,苏赤,肖彧,等.依达拉奉对急性脑出血患者自由及含量的影响及临床效果探讨. *临床医学工程*, 2016,2(35):633-634.
- [10] 滕秀涵.依达拉奉治疗脑出血患者的临床疗效. *中国药物经济学*,2016,11(4):62-63.
- [11] 蔡谋善,黄肖群,沈春林等.依达拉奉联合丹参川芎嗪注射液治疗急性脑梗死的疗效及对 C-反应蛋白的影响. *中国医药导报*,2012,9(7):95-96.
- [12] 周波,文敏,王赞等.依达拉奉对帕金森病小鼠模型中脑细胞自噬的影响. *山东大学学报(医学版)*,2012,50(8):1-4.
- [13] Luo S, Rubinshtein DC. BCL2L11/BIM: a novel molecular link between autophagy and apoptosis. *Autophagy*. 2013,9(1):104-105.