doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2020.01.012

论著・实验研究

鸢尾素对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的作用及机制

徐瑄培¹ 黄凌依² 赵凤艳¹ 应俊杰¹ 李世平¹ 岳艳¹ 李文星¹ 屈艺¹ 母得志¹

(1.四川大学华西第二医院儿科/出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室,四川成都 610041; 2.四川大学口腔医学院,四川成都 610041)

[摘要]目的 探索鸢尾素对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的作用和机制。方法 将 248 只 7 日龄 Sprague-Dawley 大鼠随机分为假手术组、模型组、鸢尾素干预低剂量组及高剂量组(n=62)。模型组和鸢尾素 干预组大鼠行右侧颈总动脉结扎后再行缺氧处理,建立缺氧缺血脑损伤模型。假手术组只分离右侧颈总动脉而 不做结扎和缺氧处理。高、低剂量组大鼠分别于侧脑室注射 0.15 µg、0.30 µg 重组鸢尾素多肽,模型组及假手术 组注射等量 PBS。采用水迷宫实验检测各组大鼠神经行为学差异;采用 TTC 染色、苏木精 – 伊红染色和 TUNEL 染色检测各组大鼠脑组织病理改变;采用 Western blot 检测凋亡相关分子 cleaved-caspase-3 (CC3)及 BCL-2/ BAX 的表达差异。结果 与假手术组相比,模型组大鼠潜伏期延长,穿越平台次数减少 (P<0.05);高剂量组 大鼠潜伏期较模型组缩短,穿越平台次数较模型组增加 (P<0.05)。与假手术组比较,模型组大鼠右侧大脑半 球出现大面积梗死,细胞核固缩及核裂解明显增多;高剂量组大鼠与模型组大鼠相比,右侧大脑半球梗死面积 减少,细胞核固缩及核裂解减少。模型组大鼠右侧大脑皮层及海马区细胞凋亡率明显高于假手术组,高剂量组 细胞凋亡率明显低于模型组 (P<0.05)。造模后 24 h 及 48 h,假手术组 CC3 水平明显低于模型组 (P<0.05); 高剂量组 CC3 水平明显低于模型组, BCL-2/BAX 值明显高于模型组 (P<0.05)。低剂量组上述实验指标及脑组 织病理变化情况与模型组类似。结论 鸢尾素可以有效减轻新生大鼠缺氧缺血性脑损伤,且疗效与鸢尾素使用 剂量有关,其作用机制可能与减少大脑皮层及海马区域细胞凋亡相关。

[中国当代儿科杂志, 2020, 22(1):58-64]

[关键词] 缺氧缺血性脑损伤; 鸢尾素; 细胞凋亡; 新生大鼠

Effect of irisin on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats

XU Xuan-Pei, HUANG Ling-Yi, ZHAO Feng-Yan, YING Jun-Jie, LI Shi-Ping, YUE Yan, LI Wen-Xing, QU Yi, MU De-Zhi. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital/Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China (Qu Y, Email: quyi712002@163.com)

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of action of irisin on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. **Methods** A total of 248 7-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into a sham-operation group, a model group, and low- and high-dose irisin intervention groups (n=62 each). The rats in the model and irisin intervention groups were given hypoxic treatment after right common carotid artery ligation to establish a model of hypoxic-ischemic brain damage. Those in the sham-operation group were given the separation of the right common carotid artery without ligation or hypoxic treatment. The rats in the high- and low-dose irisin intervention groups were given intracerebroventricular injection of recombinant irisin polypeptide at a dose of 0.30 µg and 0.15 µg respectively. Those in the model and sham-operation groups were given the injection of an equal volume of PBS. The water maze test was used to compare neurological behaviors between groups. TTC staining, hematoxylin-eosin staining and TUNEL staining were used to observe histopathological changes of the brain. Western blot was used to measure the expression

[[]收稿日期] 2019-07-15; [接受日期] 2019-12-16

[[]基金项目]国家自然科学基金(81630038; 81771634; 81842011; 81971433; 81971428);国家临床重点专科基金(1311200003303)。 [作者简介]徐瑄培,女,硕士研究生。

[[]通信作者] 屈艺, 女, 教授。Email: quyi712002@163.com。

of the apoptosis-related molecules cleaved-caspase-3 (CC3), BCL-2 and BAX. Results Compared with the shamoperation group, the model group had a significant increase in latency time and a significant reduction in the number of platform crossings (P<0.05). Compared with the model group, the high-dose irisin intervention group had a significant reduction in latency time and a significant increase in the number of platform crossings (P<0.05). Compared with the sham-operation group, the model group had massive infarction in the right hemisphere, with significant increases in karyopyknosis and karyorrhexis. Compared with the model group, the high-dose irisin intervention group had a smaller infarct area of the right hemisphere, with reductions in karyopyknosis and karyorrhexis. The model group had a significantly higher apoptosis rate of cells in the right cerebral cortex and the hippocampus than the sham-operation group. The high-dose irisin intervention group had a significantly lower apoptosis rate than the model group (P<0.05). At 24 and 48 hours after modeling, the sham-operation group had a significantly lower level of CC3 than the model group (P<0.05). Compared with the model group, the high-dose irisin intervention group had a significantly lower level of CC3 and a significantly higher BCL-2/BAX ratio (P<0.05). The low-dose irisin intervention group had similar laboratory markers and histopathological changes of the brain to the model group. Conclusions Irisin can alleviate hypoxicischemic brain damage in neonatal rats in a dose-dependent manner, possibly by reducing cell apoptosis in the cerebral [Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(1): 58-64] cortex and the hippocampus.

Key words: Hypoxic-ischemic brain damage; Irisin; Apoptosis; Neonatal rats

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是在缺氧和缺血状态同时存 在的情况下,发生的一种新生儿脑损伤。其致死 率可高达20%以上,且存活患儿可发生多种后遗 症,包括癫痫、脑瘫、视觉和听觉障碍、发育迟 缓和孤独症等^[1]。目前全身亚低温治疗为临床上 常规应用的治疗手段,在足月儿缺氧缺血脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)后的6h内, 进行48~72h的亚低温治疗,可提升患儿的存活率, 减少严重后遗症的发生率并改善预后^[2]。但在接受 亚低温治疗后,患儿易发生高血糖及白细胞减少 症等相关并发症,且依旧有半数以上患儿伴有脑 损伤^[3]。因而,探索对 HIE 有效且安全的治疗手 段十分必要。

鸢尾素(irisin)是新近发现的一种多肽,由 Ⅲ型纤连蛋白结构域包含蛋白5被未确认的酶剪 切其C末端后形成^[4]。广泛分布于包括血液、脑 脊液、唾液及乳汁等多种体液中^[5-7]。目前鸢尾素 已被报道具有抗炎症、抗凋亡、抗氧化应激等多 种效应^[8]。在肺缺氧缺血损伤模型中,检测到缺 氧缺血损伤可以引起大鼠血液中鸢尾素的水平升 高^[9],提示鸢尾素可能具有对缺氧缺血损伤的保护 作用。

细胞凋亡是导致缺氧缺血脑损伤的重要病 理机制。细胞凋亡可由多条通路触发,线粒体介 导的通路和死亡受体介导的通路是其中两条主要 通路,两者最终都会通过激活半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3)执行细胞凋亡。线粒体介导的细胞凋 亡主要通过激活 B 细胞淋巴瘤 -2(B cell lymphoma 2, BCL-2)家族蛋白,导致促凋亡蛋白如 BCL-2 相关蛋白 X(BCL-2 associated X protein, BAX)、 BCL-2 拮抗 / 杀伤因子 -1(BCL-2 antagonist/killer 1, BAK)等孔蛋白,与抗凋亡蛋白如 BCL-2、BCL-2 样 2 蛋白(BCL-2 like 2 protein, BCL-W)等蛋白水 平失衡,在线粒体膜上形成孔道,使线粒体中的 其他促凋亡蛋白如凋亡诱导因子、细胞色素 C 等 释放,激活半胱氨酸蛋白酶 -9(caspase-9)并进 一步激活 caspase-3,介导凋亡^[10]。

本研究建立新生大鼠 HIBD 模型,探究鸢尾 素对 HIBD 的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 动物

由于不同性别大鼠对于同等程度缺氧缺血 损伤的反映程度不同^[11],本实验使用雄性7日龄 Sprague-Dawley 大鼠建立新生儿 HIBD 模型。由成 都达硕实验动物有限公司直接购入新生大鼠及其 母鼠,饲养于无病原体的实验动物中心,母鼠使 用常规食物喂养,并实行12h昼夜交替周期给予 光照。生后7d时,选取体重在15~19g之间的大 鼠 248 只随机分为假手术组、模型组、鸢尾素干 预低剂量组及高剂量组,每组 62 只。

1.2 建立新生大鼠 HIBD 模型

参考既往文献建立模型^[12],使用异氟烷对新 生大鼠进行吸入麻醉后置于电热垫上固定,保持 手术过程中37℃的环境。消毒大鼠颈部皮肤,做 颈部正中切口,游离颈总动脉后,对假手术组大 鼠直接进行血管复位并缝合伤口,对其他3组大 鼠进行右侧颈总动脉双结扎后切断。术后将各组 大鼠置于电热垫上休息0.5h,假手术组大鼠不进 行缺氧处理,其他3组大鼠放入缺氧仓,暴露于8% O₂、92% N₂的环境下2h,缺氧仓中放入37℃电 热垫。

1.3 侧脑室注射鸢尾素重组多肽

各组大鼠进行吸入式麻醉,俯卧固定于电热 垫上。标记自前囟向右外侧移动 2 mm,再向人字 缝尖方向纵向移动 2 mm 后的点。使用 Hamilton 的 5 μL 进样针,于标记点处垂直进针 2 mm 深度, 进行侧脑室注射。注射速度为 1 μL/min,注射量 为 5 μL,注射完毕后,保持进样针在原处 1 min 后 拔出。参考既往文献报道^[13],侧脑室注射时,以 小鼠体重 20 g 进行统一计算,低剂量组中,5 μL PBS 中加入 0.15 μg(7.5 μg/kg)鸢尾素重组多肽 (orb180476,英国 Biorbyt 公司);高剂量组中, 5 μL PBS 中加入 0.30 μg(15 μg/kg)鸢尾素重组多 肽;模型组及假手术组注射 5 μL PBS。

1.4 水迷宫实验

造模后3周(生后28d)的各组大鼠(n=18), 进行水迷宫实验。前5日训练大鼠,第6日测试大 鼠从实验开始至寻找到平台的时间。实验使用直 径1.6m、深0.4m的圆形水池,平台直径10 cm, 并低于水面1 cm,水温保持在25±1℃。训练期间, 将大鼠由4个象限放入水池,找到平台后,于平 台上休息15 s,移出水池。若大鼠未能在120 s内 找到平台,则引导大鼠游向平台。第6日记录各 组大鼠由4个象限出发,至找到平台为止的潜伏 期时长,若未能在120 s内找到平台,则主动结束 实验,并记录时间为120 s。训练开始后第7日, 撤去平台,记录大鼠从同一象限出发,60 s内穿越 平台区的次数。

1.5 2,3,5- 三苯基氯化四氮唑染色

造模后 48 h, 异氟烷麻醉各组大鼠 (*n*=18), 断头取脑, 2 mm 厚度切片。将切片置于 2% 的 2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)溶液中, 避光孵育 15 min。PBS 清洗 3 次后, 加入 4% 多聚甲醛保存。

1.6 苏木精 – 伊红染色

造模后48h,异氟烷麻醉各组大鼠(n=8),断头取脑,4%多聚甲醛固定脑组织48h,石蜡包

埋,5µm厚度切片,于热水中展开后置于载玻片上, 于4℃保存。切片经脱蜡、水化后,使用苏木精染 色5min,并使用1%盐酸酒精分化10s,清水冲 洗切片1h;再使用伊红染色5min,冲洗掉染液; 经酒精脱水后,使用二甲苯进行透化,最后进行 封固。

1.7 TUNEL 染色

使用二甲苯、酒精处理保存的造模后48h各 组大鼠(*n*=8)脑组织标本的石蜡切片。在37℃ 使用蛋白酶K孵育25min后,使用破膜液在 常温下孵育20min。按照原位细胞死亡试剂盒 (11684817910,瑞士Roche公司)说明书进行 染色。并使用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(1:500, D9542,美国Sigma-Aldrich公司)避光孵育10min 进行细胞核染色。加荧光淬灭剂,使用Olympus FV1000激光共聚焦显微镜获取图像。

1.8 蛋白质免疫印迹法

造模后 24 h 及 48 h, 分别取各组大鼠 (n=9) 右脑半球皮层组织,使用 RIPA 裂解液裂解组织并 离心,取上清液,于-70℃冰箱保存。采用上样缓 冲液稀释样本,并加热蛋白使其变性后,以SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)将不同分子量 蛋白分离,并将目标蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜 条带上。封闭条带后,加入兔抗大鼠BAX(1:1000, 14796, 美国 Cell Signaling Technology 公司)、 兔抗大鼠 BCL-2 (1:1000, SAB4500003, 美国 Sigma-Aldrich)、兔抗大鼠 cleaved-caspase-3(CC3, 1:1000, 9661, 美国 Cell Signaling Technology)及 内参小鼠抗大鼠 β-actin (1:5000, 200068-8F10, 成都正能生物技术有限责任公司)等一抗,4℃孵 育过夜。清洗条带后,加入羊抗兔 IgG (1:5000, 511103)及羊抗小鼠 IgG(1:5000, 511203)(成 都正能生物技术有限责任公司) 孵育1h, 再次 清洗。滴加 ECL 化学发光试剂,曝光获取图像, 分析样本目标蛋白的灰度值。结果以目的蛋白与 内参蛋白条带灰度值比值表示。

1.9 统计学分析

使用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料使用均数 ± 标准差(x±s)表示, 多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较 采用 SNK-q 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水迷宫实验

在水迷宫实验中,模型组较假手术组潜伏期 明显延长(P<0.01);低剂量组与模型组比较潜伏 期差异无统计学意义(P>0.05);高剂量组潜伏期 随着训练次数增加有减少的趋势,经过训练的高 剂量组大鼠潜伏期与模型组和低剂量组相比均明 显缩短(P<0.01),且与假手术组相比差异无统计 学意义(P>0.05)。模型组大鼠撤去平台后穿越平 台次数较假手术组明显减少(P<0.01);低剂量组 较模型组穿越平台次数增加(P<0.01);高剂量组 大鼠穿越平台次数较模型组和低剂量组均明显增 加(P<0.01),且与假手术组相比差异无统计学意 义(P>0.05)。见图1,表1。

2.2 TTC 染色

造模后 48 h, TTC 实验结果显示,各组脑 梗死面积比较差异有统计学意义(F=28.98, P<0.0001)。假手术组脑梗死面积为0,模型组 大鼠脑梗死面积(21% ± 8%)明显大于假手术组 (P<0.05);低剂量组(13% ± 6%)及高剂量组 (6% ± 4%)脑梗死面积与模型组相比均有减少, 且存在浓度依赖趋势,其中高剂量组的脑梗死面 积与模型组相比差异有统计学意义(P<0.05),但仍大于假手术组(P<0.05)。见图 2。



图 1 水迷宫实验第 3~6 日各组大鼠潜伏期的变化曲 线 (*n*=18)

表1 行为学结果 $(\bar{x}\pm s)$

组别	п	潜伏期 (s)	穿越平台次数
假手术组	18	24 ± 13	5.8 ± 1.7
模型组	18	60 ± 27^{a}	1.2 ± 1.0^{a}
低剂量组	18	52 ± 24^{a}	$3.5 \pm 1.3^{\mathrm{a,b}}$
高剂量组	18	$27 \pm 17^{\mathrm{b,c}}$	$4.2 \pm 1.5^{\rm b,c}$
F 值		14.77	26.61
P 值		< 0.001	< 0.001

注: a示与假手术组比较, P<0.01; b示与模型组比较, P<0.01; c示与低剂量组比较, P<0.01。



图 2 造模后 48 h 各组大鼠脑组织 TTC 染色结果 假手术组大鼠脑组织未出现脑梗死区域,模型组大鼠出现大面积脑梗死区域,低剂量组及高剂量组大鼠脑梗死面积明显小于模型组,且呈剂量依赖性。

2.3 苏木精 – 伊红染色

与假手术组相比,模型组和低剂量组大鼠右脑神经元明显减少,右侧脑组织染色较对侧脑组织浅,结构疏松,组织结构紊乱,大量细胞死亡; 右侧大脑皮层区见大量细胞胞质空泡化、细胞核固缩、核破裂的神经元。高剂量组大鼠右侧脑组 织染色浅淡区面积较模型组减少,右侧大脑皮层 核固缩神经元较模型组和低剂量组减少,脑组织 接近正常生理结构。见图 3。

2.4 TUNEL 染色

造模后,模型组大鼠右侧大脑全脑、海马区 及皮层区出现广泛性细胞凋亡;低剂量组同样存 在广泛性的细胞凋亡;高剂量组可见细胞凋亡程 度较模型组减轻。TUNEL染色分析发现,模型组 大鼠右侧大脑皮层及海马区细胞凋亡率明显高于 假手术组(P<0.01),低剂量组细胞凋亡率与模型 组比较差异无统计学意义(P>0.05),高剂量组细 胞凋亡率较模型组及低剂量组均降低,但仍高于 假手术组(P<0.01)。见图4,见表2。



图 3 各组大鼠脑组织苏木精 - 伊红染色结果 上图为各组大鼠的脑组织切片染色后的全脑图像。与假手术组相比,模型组和低剂量组大鼠右侧脑组织染色较对侧脑组织浅,结构疏松,组织结构紊乱;高剂量组右侧脑组织染色浅淡区域面积较模型组减少,脑组织接近正常生理结构。下图为各组大鼠右侧大脑皮层扫描放大后的图像(×600)。A 为假手术组,模型组(B)和低剂量组(C)大鼠右侧大脑皮层区可见大量神经元细胞胞质空泡化、细胞核固缩(黑色箭头所示)、核破裂(红色箭头所示);高剂量组(D)可见中量细胞胞质空泡化,神经元细胞核固缩减少。



图 4 各组大鼠脑组织 TUNEL 染色结果 全脑(×20);右脑海马区(×200);右侧大脑皮层(×400)。蓝 色染色为细胞核;绿色染色为 TUNEL 染色阳性细胞,即凋亡细胞。造模后,模型组大鼠右侧大脑、海马区及皮层出现广泛性 细胞凋亡;上述区域在低剂量组同样存在广泛性的细胞凋亡;高剂量组可见细胞凋亡程度较模型组减轻。

)

组别	n	右侧大脑皮层	右脑海马区
假手术组	8	0.009 ± 0.003	0.006 ± 0.004
模型组	8	$85.676 \pm 6.542^{\circ}$	42.000 ± 13.523^{a}
低剂量组	8	$82.650 \pm 10.334^{\circ}$	$33.272 \pm 10.055^{\circ}$
高剂量组	8	$59.809 \pm 15.491^{\rm a,b,c}$	$10.713 \pm 4.708^{a,b,c}$
F 值		129.681	101.084
P 值		< 0.001	< 0.001

注: a示与假手术组比较, P<0.01; b示与模型组比较, P<0.01; c示与低剂量组比较, P<0.01。

2.5 Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白表达

造模后 24 h,模型组、低剂量组和高剂量组 CC3 水平较假手术组均明显升高(P<0.01);与模 型组相比,低剂量组、高剂量组存在 CC3 水平降 低(P<0.05);且高剂量组 CC3 水平低于低剂量 组(P<0.05)。高剂量组 BCL-2/BAX 值较假手术组、 模型组和低剂量组均明显升高(P<0.05),且低剂 量组高于模型组(P<0.05)。

造模后 48 h,模型组和低剂量组的 CC3 水平 较假手术组明显升高(P<0.05),高剂量组 CC3

水平与假手术组比较差异无统计学意义(*P*>0.05); 低剂量组、高剂量组 CC3 水平较模型组明显降低 (*P*<0.05),且高剂量组低于低剂量组(*P*<0.05)。 与假手术组相比,模型组 BCL-2/BAX 值降低,低 剂量组及高剂量组 BCL-2/BAX 值升高(*P*<0.05); 低剂量组、高剂量组 BCL-2/BAX 值均明显高于模 型组(*P*<0.05),且低剂量组明显高于高剂量组 (*P*<0.05)。见图 5,表 3。



图 5 Western blot 检测各组蛋白相对表达变化电泳图

表 3 各组蛋白相对表达水平比较 (x±s)

组别	74	造模后	造模后 24 h		造模后 48 h	
	n -	CC3	BCL-2/BAX	CC3	BCL-2/BAX	
假手术组	9	0.089 ± 0.009	1.12 ± 0.63	0.591 ± 0.129	1.36 ± 0.61	
模型组	9	1.000 ± 0.542^{a}	0.87 ± 0.36	$1.000 \pm 0.301^{\circ}$	1.01 ± 0.30^{a}	
低剂量组	9	$0.388 \pm 0.186^{\mathrm{a,b}}$	$1.20\pm0.47^{\rm b}$	$0.798 \pm 0.225^{a,b}$	$4.56 \pm 3.46^{a,b}$	
高剂量组	9	$0.372 \pm 0.258^{\rm a,b,c}$	$2.08 \pm 1.08^{\mathrm{a,b,c}}$	$0.521 \pm 0.128^{\mathrm{b,c}}$	$2.85 \pm 1.92^{\mathrm{a,b,c}}$	
F 值		26.47	15.92	19.35	31.56	
<i>P</i> 值		<0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	

注: a示与假手术组比较, P<0.05; b示与模型组比较, P<0.05; c示与低剂量组比较, P<0.05。

3 讨论

HIBD 目前考虑为两阶段的打击引起细胞死 亡。第一次打击为缺氧直接导致的能量耗竭,造 成细胞损伤。第二次打击可能与后续的炎症反应、 氧化应激反应及兴奋性毒性作用引起的能量耗竭 有关^{114]}。鸢尾素除拥有抗凋亡、抗炎症、抗氧化 应激等作用外,还可以保护血管内皮细胞,如: 保护血脑屏障、减轻脑组织水肿、促进心脏的血 管再生。目前已报道其在肝脏缺血再灌注、成年 人脑卒中、心肌缺血再灌注等多种疾病动物模型 的治疗中有效^[13,15-16]。本实验首次显示鸢尾素对新 生大鼠 HIBD 模型存在保护作用,并有效减少细胞 凋亡。

水迷宫实验中,模型组和低剂量组较假手 术组潜伏期更长,高剂量组第6日的潜伏期与假 手术组相近,但从第3~6日之间时间变化曲线的 趋势来看,假手术组第4日开始表现趋于稳定, 高剂量组训练期间表现较假手术组差,但潜伏期 逐渐缩短,变化趋势较其余两组明显。高剂量组 穿越平台次数较模型组多。提示鸢尾素可以改善 HIBD 导致的认知功能障碍。 本实验中,HIBD 引起新生大鼠广泛性的脑组 织损伤,大脑皮层受损更为严重。TTC 染色结果 可见各组大鼠右侧大脑皮层区存在梗死灶,模型 组及低剂量组梗死面积更大,高剂量组梗死面积 较小。且苏木精 – 伊红染色结果显示 HIBD 后大鼠 右侧脑组织可见广泛性损伤、大量细胞死亡及脑 组织结构紊乱,高剂量组与模型组相比损伤明显 较轻。同时,TUNEL结果显示,大鼠的海马区也 受到损伤,但高剂量组海马区细胞凋亡阳性率较 低。提示鸢尾素可有效减少 HIBD 早期的广泛性脑 损伤。

新生儿在大脑发生 HIBD 时,可出现细胞凋 亡、坏死及自噬等过程。线粒体外膜透化作用 发生后,凋亡复合体被释放,并最终激活下游的 caspase-3,执行 DNA 裂解及细胞凋亡。线粒体膜 通透性转换孔的开放则主要引起细胞坏死^[17-18]。 活化的孔蛋白 BAX 在其 BH3 区域被 BCL-2 包裹 时,无法发生寡聚化形成通道,从而阻止线粒体 外膜透化作用的发生^[19]。由于实验检测的是细胞 中 BAX 蛋白的总量,无法体现其发生寡聚化后形 成通道的水平,本实验使用 BCL-2 与 BAX 的比值 代表线粒体外膜透化作用程度。

已有实验报道鸢尾素可以改善缺氧缺血损伤 时心肌细胞、胰岛细胞、肺上皮细胞的细胞凋亡, 降低 caspase-3 及 BAX 的蛋白水平,提升 BCL-2 的蛋白水平^[1]。本实验中,TUNEL实验显示与模 型组相比,高剂量组细胞染色阳性率低。且高剂 量组在两个时间点上的 CC3 表达水平均下降,而 BCL-2/BAX 升高,提示一定量的鸢尾素可能通过 改善线粒体外膜透化作用,改善 HIBD 导致的新生 儿脑组织的细胞凋亡。

总之,本研究表明,鸢尾素可以有效减轻新 生大鼠 HIBD,其机制可能与减少细胞凋亡相关。

[参考文献]

- Yıldız EP, Ekici B, Tatlı B. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment[J]. Expert Rev Neurother, 2017, 17(5): 449-459.
- [2] Wassink G, Davidson JO, Dhillon SK, et al. Therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2019, 19(2): 2.
- [3] Rao R, Trivedi S, Vesoulis Z, et al. Safety and short-term outcomes of therapeutic hypothermia in preterm neonates 34-35

weeks gestational age with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. J Pediatr, 2017, 183: 37-42.

- [4] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1-α-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis[J]. Nature, 2012, 481(7382): 463-468.
- [5] Ruan Q, Zhang L, Ruan J, et al. Detection and quantitation of irisin in human cerebrospinal fluid by tandem mass spectrometry[J]. Peptides, 2018, 103: 60-64.
- [6] Aydin S, Kuloglu T, Aydin S. Copeptin, adropin and irisin concentrations in breast milk and plasma of healthy women and those with gestational diabetes mellitus[J]. Peptides, 2013, 47: 66-70.
- [7] Aydin S, Aydin S, Kuloglu T, et al. Alterations of irisin concentrations in saliva and serum of obese and normal-weight subjects, before and after 45 min of a Turkish bath or running[J]. Peptides, 2013, 50: 13-18.
- [8] Yıldız EP, Ekici B, Tatlı B. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment[J]. Expert Rev Neurother, 2017, 17(5): 449-459.
- [9] Chen K, Xu Z, Liu Y, et al. Irisin protects mitochondria function during pulmonary ischemia/reperfusion injury[J]. Sci Transl Med, 2017, 9(418). pii: eaao6298.
- Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update[J]. Arch Toxicol, 2015, 89(3): 289-317.
- [11] Charriaut-Marlangue C, Besson VC, Baud O. Sexually dimorphic outcomes after neonatal stroke and hypoxiaischemia[J]. Int J Mol Sci, 2017, 19(1). pii: E61.
- [12] Zheng Z, Zhang L, Qu Y, et al. Mesenchymal stem cells protect against hypoxia-ischemia brain damage by enhancing autophagy through brain derived neurotrophic factor/mammalin target of rapamycin signaling pathway[J]. Stem Cells, 2018, 36(7): 1109-1121.
- [13] Asadi Y, Gorjipour F, Behrouzifar S, et al. Irisin peptide protects brain against ischemic injury through reducing apoptosis and enhancing BDNF in a rodent model of stroke[J]. Neurochem Res, 2018, 43(8): 1549-1560.
- [14] Gopagondanahalli KR, Li J, Fahey MC, et al. Preterm hypoxicischemic encephalopathy[J]. Front Pediatr, 2016, 4: 114.
- [15] Bi J, Zhang J, Ren Y, et al. Irisin alleviates liver ischemiareperfusion injury by inhibiting excessive mitochondrial fission, promoting mitochondrial biogenesis and decreasing oxidative stress[J]. Redox Biol, 2019, 20: 296-306.
- [16] Liao Q, Qu S, Tang LX, et al. Irisin exerts a therapeutic effect against myocardial infarction via promoting angiogenesis[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(10): 1314-1321.
- [17] Thornton C, Leaw B, Mallard C, et al. Cell death in the developing brain after hypoxia-ischemia[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11: 248.
- [18] Thornton C, Hagberg H. Role of mitochondria in apoptotic and necroptotic cell death in the developing brain[J]. Clin Chim Acta, 2015, 451(Pt A): 35-38.
- [19] Walensky LD. Targeting BAX to drug death directly[J]. Nat Chem Biol, 2019, 15(7): 657-665.