

Research on the Effect of Resveratrol on Endoplasmic Reticulum Pathway after Cerebral Ischemia-Reperfusion in Rats

Huihui Wang Deju Ma

Teaching Department of Basic Medicine, Qilu Medical University, Zibo, Shandong 253000, China

Abstract

Objective: To study the effect of resveratrol on endoplasmic reticulum pathway in rats with cerebral ischemia reperfusion. **Methods:** Healthy SD rats were randomly divided into sham group, I/R group, 40mg Kg⁻¹ D-1 RES group (RES-H group), 20mg Kg⁻¹ D-1 RES group (RES-L group), with 8 rats in each group. The model of ventricular fibrillation cerebral ischemia-reperfusion induced by esophageal alternating current stimulation was established 10 days before the model was established. CPR was performed 5 minutes later. The expression of caspase-12 Western blotting was detected in the brain tissues of rats in each group after the recovery of autonomous circulation (ROSC). **Results:** The expression of caspase-12 protein in I/R group, RES-H group and RES-L group was higher than that in SH group ($p < 0.05$), but the expression of caspase-12 protein in RES-L and RES-H group was lower than that in I/R group ($p < 0.05$). **Conclusion:** Resveratrol attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by down-regulating caspase-12 expression in endoplasmic reticulum pathway.

Keywords

ischemia-reperfusion; resveratrol; endoplasmic reticulum

研究白藜芦醇对大鼠脑缺血再灌注内质网途径的影响

王慧慧 马德菊

齐鲁医药学院 基础医学教学部, 中国·山东 淄博 253000

摘要

目的: 研究白藜芦醇对大鼠脑缺血再灌注内质网途径的影响。**方法:** 将健康SD大鼠随机分为假手术组(Sham组)、I/R组和40mg·Kg⁻¹·d⁻¹ RES组(RES-H组)、20mg·Kg⁻¹·d⁻¹ RES组(RES-L组), 8只/组。造模前连续10d给予药物干预建立食道交流电刺激诱发心室颤动脑缺血再灌注模型, 5min后行CPR, 待自主循环恢复(ROSC)后取各组大鼠脑组织检测caspase-12的Western blotting表达。**结果:** I/R组、RES-H和RES-L组caspase-12蛋白表达量比SH组相对增多, 相比差异有统计学意义($p < 0.05$), 而RES-L和RES-H组caspase-12蛋白表达量与I/R组相比相对下降, 有统计学意义($p < 0.05$)。**结论:** 白藜芦醇通过下调内质网途径中caspase-12的表达来减轻大鼠脑缺血再灌注的损伤。

关键词

缺血再灌注; 白藜芦醇; 内质网

1 引言

脑缺血后再灌注可加重缺血脑组织的病理损害, 使病情恶化, 这种现象被称为脑缺血再灌注损伤(Cerebral Ischemia-reperfusion Injury, CIRI)^[1]。心脏骤停(cardiac arrest, CA)心肺复苏(cardio-pulmonary resuscitation, CPR)大鼠脑缺血再灌注后引起脑组织损害的病理机制复杂, 主要与自由基的生成、细胞内钙超载、兴奋性氨基酸毒性、凋亡通路的激活等多种致病因素有关, 目前尚未完全阐明。在缺血再灌注损伤的凋亡途径研究中发现内质网途径发挥重要作用^[2-3], 由于细胞凋亡启动阶段不同, 其可分为线粒体途径、内质

网途径、死亡受体途径, 三条途径中除了线粒体途径中的凋亡诱导因子(ATF)途径, 其他途径都可以经过caspase家族的激活而实现。缺血缺氧等引起内质网功能失调从而触发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-12(cysteiny aspartate specific proteinase-12, caspase-12)存在于内质网上, 在全身多种器官内均有表达, 是ERS诱导细胞凋亡的重要因子。近年来, 白藜芦醇(resveratrol, RES)的神经药理作用研究成为热点。既往研究发现, RES在慢性脑缺血的神经保护、抗神经细胞凋亡方面具有一定的积极作用^[4-6]。RES具有丰富生物活性, 而且是一种天然多酚^[7], 在缺血再灌注(I/R)损伤中可能起到

减少神经细胞凋亡的作用^[8-9]。本研究旨在探讨 RES 对大鼠短暂性脑缺血后内质网通路的影响。

2 材料与方法

2.1 材料

动物: 健康 SD 大鼠。雌雄不限, 体重为 (300 ± 50) g, 由济南金丰动物有限公司提供, 实验前提供正常饮食, 室温 25℃。试剂: 兔抗大鼠 caspase-12 多克隆抗体 (ab8117, Abcam 公司, 英国), 兔抗大鼠 Tubulin 单克隆抗体 (EPR1330ab108342, Abcam 公司, 英国)。仪器: Bio-Rad 电泳仪 (英文名称: Powersupplies, PowerPac 系列, 产地: 美国), 脱色摇床 (TS-1 型, 中国)。

2.2 实验准备

实验动物及动物分组大鼠腹腔注射巴比妥钠 (45μg/g, ip.) 麻醉, 经气管内插入 14G 套管以备连接动物呼吸机 (ALC-V9, 上海奥尔科特生物科技有限公司)。在左侧腹股沟处备皮、消毒, 切开皮肤, 用钝性分离法分离股动脉和静脉并切开, 各置一根预先充满 5IU/ml 肝素钠生理盐水留置管, 动脉导管经压力换能器与 BL-420F 生物机能实验系统 (四川成都泰盟科技有限公司) 相连接, 监测有创动脉血压。股静脉导管以备注入药物, 四肢经皮下针头全程记录标准 II 导联心电图。手术后观察 10-15min, 待各组大鼠血流动力学稳定后, 采用经食管交流电诱导心脏骤停的方法建立 CA 模^[10]: CA 的标准: ①动脉搏动消失且平均动脉压 (MAP) < 10 mm Hg; ②心电图为直线, 心室颤动或无脉性电活动, CA 5 min 后行 CPR 至自主循环恢复 (restoration of spontaneous circulation ROSC)。ROSC 的标准: 室性节律 (包括窦性、房性或交界性心律) 并伴 MAP > 20 mm Hg, 持续 5min 以上^[11]。ROSC 后大鼠脑供血恢复后取脑组织

2.3 RES 给药方法

采用无水乙醇溶解 RES (美国 Sigma 公司), 并用 0.5% 临界胶束浓度 (CMC) 溶液稀释。RES 组给药剂量为 20mg · Kg⁻¹ · d⁻¹ RES 组 (RES-L 组)、40mg · Kg⁻¹ · d⁻¹ RES 组 (RES-H 组) 1 次腹腔注射, 造模前 10d 给药。Sham 组和 I/R 组给予腹腔注射 0.5% CMC, 剂量和时间同给药组

2.4 指标测定及方法

Western Blotting 测定: 在 ROSC 后快速断头取脑用 EP

管包裹做好标记直接投入液氮中迅速冷冻放入 -80℃ 超低温冰箱保存备用。玻璃匀浆管用自来水洗净后用双蒸水冲洗后高压 20 分钟, 取出放进 60℃ 恒温箱中蒸干后冰浴中冷却备用。冰上称取 0.1g 脑组织加入 10000μl RIPA (蛋白酶裂解液) (上海碧云天生物技术有限公司, 中国) 和 100μl RSMF (蛋白酶抑制剂) (上海碧云天生物技术有限公司, 中国), 在冰上静置半小时。将组织匀浆液转移到已高压 1.5ml 预冷的 EP 管中, 4℃ 下 12000rpm 离心 10min; 吸取上清液并以 0.1ml 分装在已高压的 0.2ml 预冷的 EP 管中。将所提全蛋白保存在 -80℃, 避免反复冻融。蛋白变性: 按照蛋白样品: 上样缓冲液 = 4: 1 的比例加入蛋白上样缓冲液混匀。混匀后放入沸水中煮 5min 使蛋白充分变性。变形后蛋白样品室温下冷却, 放入 -20℃ 冰箱内冻存备用。取含总蛋白质 8μg 的样品进行聚丙烯酰胺凝胶 (10% SDS-PAGE) 电泳分离后, 根据 Marker 标记分子量的位置, 切取相应分子量的凝胶条带。PVDF 膜 (聚偏二氟乙烯 PVDF 膜, Bedford, 美国), 在甲醇中激活 PVDF 膜 1min, 再将其和滤纸 (长度和泳道数匹配) 一起放在电转液中平衡 10min。按自下而上三层滤纸、PVDF 膜、凝胶条带、三层滤纸顺序叠放, 用玻璃棒碾压除去其间气泡, 接正负极和电源, 0.09mA 恒流半干转。转完膜后用含有 0.05% Tween-20 的 PBS (PBST) 漂洗 PVDF 膜, 3 × 5min。然后放入溶有一抗 caspase-12 (1:1000) 的新配制的封闭液中, 4℃ 过夜用 PBST 漂洗 PVDF 膜 3 × 5 min, 放入荧光素标记二抗 (LI-COR Biosciences) (1:10000) 中 2h。然后用 PBST 漂洗 PVDF 膜 3 × 5min。用奥德赛成像分析系统 (LI-COR Biosciences) 扫描显影目标蛋白条带并计算 caspase-12 蛋白 / 内参蛋白 (Tubulin) 比值。

2.5 统计学处理

数据以 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。实验结果用均数 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示, 方差齐性资料, 多组间比较采用 ANOVA 进行单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。检验水准 α=0.05, p<0.05 表示差异有统计意义。

3 结果

RES 对 caspase-12 蛋白表达的影响 在自主循环恢复后 I/R 组 caspase-12 蛋白表达高于 RESH 组和 RESL 组, 有统计学差异 (n=8, p<0.05)。而 I/R 组和 RESH 组、RESL 组

caspase-12 蛋白表达量高于 SH 组 ($n=8, p<0.05$), RESH 组和 RESL 组 caspase-12 蛋白表达量无明显差异。

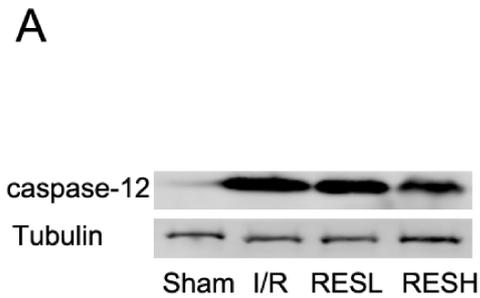


图 1A ROSC 后各组 caspase-12 蛋白表达和內参 (Tubulin) 条带

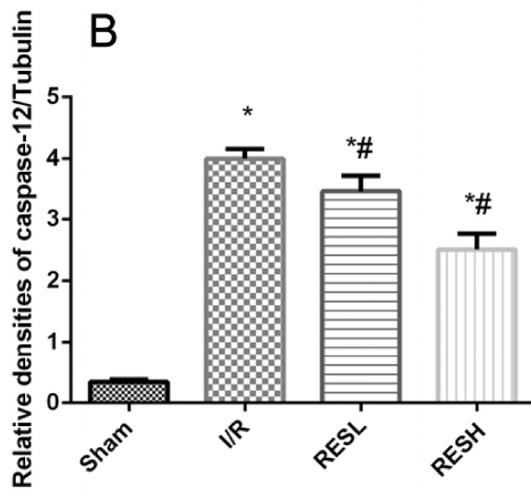


图 1B caspase-12 蛋白表达柱状图, * 与 SH 组比较, $P < 0.05$; # 与 I/R 组比较 $P < 0.05$ 。

4 讨论

在脑缺血再灌注损伤发生发展中,神经细胞凋亡是重要的损伤标志,干预细胞凋亡对脑缺血再灌注损伤发挥着较好的防治作用。本研究结果显示 SH 组脑组织中 caspase-12 蛋白表达量很少,而 I/R 组和 RESH 组、RESL 组 caspase-12 蛋白表达量明显高于 SH 组,给予 RES 干预后 caspase-12 蛋白表达量明显减少。内质网通路,即由内质网失常引起,而

非以细胞膜或线粒体为靶点的凋亡信号触发。这支队伍分为 PERK 通路和 caspase-7 通路^[12],caspase-7:内质网是细胞内蛋白质合成的主要场所,同时也是钙离子的主要储存库,内质网钙离子平衡的破坏或者内质网蛋白质的过量积累是关键步骤,他们会诱导内质网膜上的 caspase-12 的表达,同时诱导胞质的 caspase-7 转移到内质网表面。caspase-7 可以激活 caspase-12,而 caspase-12 的激活可以进一步剪切 caspase-3 从而引发细胞凋亡^[13]。既往研究显示,RES 在缺血再灌注(I/R)损伤中可能起到减少神经细胞凋亡的作用^[14]其机制可能与降低氧化应激反应和减轻炎症反应,增加抗氧化能力里有关,但具体的作用机制仍在探索。本实验观察到使用 RES 明显抑制 caspase-12 蛋白表达,提示 RES 可通过抑制 caspase-12 蛋白表达,从而减少神经细胞凋亡。本实验不足之处在于,未能揭示 RES 对 caspase-3 蛋白表达及凋亡小体的影响,尚需要进一步深入研究。

5 结语

综上所述,本研究结果表明,I/R 前预防性给予 RES,能改善内质网应激途径 caspase-12 蛋白的表达,其机制可能是由于 RES 在慢性脑缺血的神经保护、抗神经细胞凋亡方面的作用。

参考文献

- [1] SHETH K N,SMITH E E,GRAU-SEPULVEDA M V,et al. Drip and ship thrombolytic therapy for acute ischemic stroke: use,temporal trends,and outcomes[J].Stroke,2015,46(3):732-739.
- [2] Lhotak S,Sood S,Brimble E,et al.ER stress contributes to renalproximal tubule injury by increasing SREBP-2 -mediated lipid accumulation and apoptotic cell death[J].Am J Physiol Renal Physiol,2012,303(2):266-278.
- [3] Hu R,Chen ZF,Yan J,et al.Endoplasmic reticulum stress of neutrophils is required for ischemia /reperfusion-induced acute lung injury[J].J Immunol,2015,195(10):4802-4809.
- [4] ORSU P, MURTHY B V, AKULA A.Ccrebro protective potentialof resveratrol through anti-oxidant and anti-inflammatorymechanisms in rats[J].J Neural Transm,2013,120(8):1217-1223.
- [5] 李薇娜,陈莉芬.白藜芦醇在脑缺血再灌注损伤中的神经保护作用及其机制的研究进展 [J]. 中国中医急症,2014,23(6):1117-1120.

- [6] JI H,ZHANG X J,DU Y Y,et al.Polydatin modulates inflammation by decreasing NF- κ B activation and oxidative stress by increasing Gli1, Ptch1, SOD1 expression and ameliorates blood-brain barrier permeability for its neuroprotective effect in PMCAO rat brain[J]. *Brain Res Bull*,2012,87(1):50-59.
- [7] 苗玉连, 武传龙, 刘金波等. 白藜芦醇对高脂饮食去卵巢肥胖大鼠脑组织炎症反应及海马 A β -(1-42) 水平的影响 [J]. *山东大学学报 (医学版)*,2013, 51(8):17-21.
- [8] SONG J,CHEON S Y,JUNG W,et al.Resveratrol induces the expression of interleukin-10 and brain-derived neurotrophic factor in BV2 microglia under hypoxia[J]. *Int J Mol Sci*,2014,15(9):15512-15529.
- [9] VANCAU WENBERGHE C, VANDENDRIESSCHE C, LIBERT C, et al.Caloric restriction:beneficial effects on brain aging and Alzheimer' s disease[J]. *Mamm Genome*,2016,27(7/8):300-319.
- [10] Meng-Hua Chen., Tang-Wei Liu, Lu Xie,et al. A simpler cardiac arrest model in rats. *Am J Emerg Med*[J].2007,25(6):623-630.
- [11] 宋凤卿, 陈蒙华, 谢露等. 两种剂量肾上腺素在小鼠心肺复苏中的疗效比较. *中国急救医学* [J]. 2008(11):1002-1005.
- [12] 陈然, 邓鑫, 彭佩纯等. 内质网应激与乙型肝炎关系的研究进展. *广西医学* [J].2014(10):1432-1436.
- [13] Nakagawa T,Zhu H,Morishima N,et al.Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*[J].2000,403(6765): 98-103.
- [14] Abdel-Aleem GA,Khaleel EF,Mostafa DG,et al.Neuroprotective effect of resveratrol against brain ischemia reperfusion injury in rats entails reduction of DJ-1 protein expression and activation of PI3K/Akt/GSK3b survival pathway[J]. *Arch Physiol Biochem*,2016,122(4):200-213.