

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.06.009

钙敏感受体在大鼠脑缺血再灌注损伤时细胞凋亡中的作用*

李凤晓¹ 史雪莹¹ 初向华¹ 卢晓东¹ 董加花¹ 于良健¹ 张 宁^{2△}

(1 青岛大学附属医院药学部 山东 青岛 266003; 2 青岛市市立医院麻醉科 山东 青岛 266011)

摘要 目的: 评价钙敏感受体在大鼠脑缺血再灌注损伤时细胞凋亡中的作用。**方法:** 健康成年雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重 250~300 g, 采用随机数字表法分为 3 组(n=20): 假手术组(S 组)、脑缺血再灌注组(I/R 组)和钙敏感受体拮抗剂组(N 组)。I/R 组和 N 组采用线栓法经左侧颈外-颈内动脉插线制备大鼠脑缺血再灌注损伤模型, 于脑缺血前 10 min 尾静脉注射等容量二甲基亚砜和钙敏感受体拮抗剂 NPS-89636 1 mg/kg。于再灌注 24 h 时行神经功能评分, 随后处死大鼠取脑组织, 测定 MDA 含量和 SOD 活性, 采用 TUNEL 法观察神经细胞凋亡情况, 计算神经细胞凋亡指数, 免疫组化法检测 Caspase-3 阳性细胞的表达, Western blot 法检测 Caspase-3 蛋白的表达。**结果:** I/R 组和 N 组 MDA 含量、神经细胞凋亡指数、Caspase-3 阳性细胞和 Caspase-3 蛋白表达水平高于 S 组, 神经功能评分和 SOD 活性低于 S 组, 差异有统计学意义($P<0.05$); N 组 MDA 含量、神经细胞凋亡指数、Caspase-3 阳性细胞和 Caspase-3 蛋白表达水平低于 I/R 组, 神经功能评分和 SOD 活性高于 I/R 组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:** 钙敏感受体参与大鼠脑缺血再灌注损伤和细胞凋亡的发生。

关键词: 受体; 钙敏感; 再灌注损伤; 脑; 细胞凋亡

中图分类号: R-33; R743 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2020)06-1043-04

Role of Calcium Sensing Receptor on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats*

LI Feng-xiao¹, SHI Xue-ying¹, CHU Xiang-hua¹, LU Xiao-dong¹, DONG Jia-hua¹, YU Liang-jian¹, ZHANG Ning^{2△}

(1 Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266003, China;

2 Department of Anesthesiology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao, Shandong, 266011, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of calcium sensing receptor on cerebral ischemia-reperfusion (I/R) in rats. **Methods:** Sixty male Wistar rats, weighing 250-300 g, were randomly divided into three groups (n=20 each) using a random number table: sham operation group (group S), group I/R and calcium-sensing receptor antagonists group (group N). Animal models of middle cerebral artery occlusion/reperfusion in the later 2 groups were established by a filament method in the left external-internal carotid artery. Rats were injected with 1 mg/kg NPS-89636 in the calcium-sensing receptor antagonists group and the equal volume of dimethyl sulfoxide 10 minutes before the cerebral ischemia. Neurological function was assessed and scored at 24 h of reperfusion. The rats were sacrificed and then the brains were removed for determination of MDA content, SOD activity, apoptotic cell death was assessed by TUNEL staining, and the expression of Caspase-3 by immunohistochemical and Western blot. **Results:** The content of MDA, neuronal apoptosis index, expression levels of Caspase-3 positive cells and Caspase-3 protein in group I/R and N were higher than those in group S, and neurological function score and SOD activity were lower than those in group S ($P<0.05$); The content of MDA, neuronal apoptosis index, expression levels of Caspase-3 positive cells and Caspase-3 protein in group N were lower than those in group I/R, and neurological function score and SOD activity were higher than those in group I/R ($P<0.05$). **Conclusion:** Calcium-sensing receptor is involved in cerebral ischemia-reperfusion injury and cell apoptosis.

Key words: Receptors; calcium-sensing; Reperfusion injury; Brain; Apoptosis

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)06-1043-04

前言

钙敏感受体 (Calcium-sensing receptor, CaSR) 属 G 蛋白偶联受体 C 家族成员, 它通过激活磷脂酶 C 系统引起肌浆网释

放钙, 从而引起细胞内钙超载。研究发现钙超载是缺血/再灌注损伤的主要发病机理^[1,2], 钙超载可引起线粒体内钙沉积, 氧化磷酸化反应下降至正常的 3%~4%, ATP 生成锐减, 同时还可诱发线粒体通透性转换孔(mPTP)开放, 释放促细胞凋亡的因

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81771415)

作者简介: 李凤晓(1986-), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 脑保护, 电话: 18661803765, E-mail: blws512@126.com

△ 通讯作者: 张宁, 男, 主治医师, 研究方向: 脑保护, E-mail: chinablws@126.com

(收稿日期: 2019-07-07 接受日期: 2019-07-30)

子,启动细胞凋亡的进程,引发细胞凋亡^[3-5]。研究证明 CaSR 参与小鼠脑缺血 / 再灌注损伤^[6,7],另有研究证明 CaSR 激活参与了缺氧复氧诱导的海马神经元细胞凋亡^[8,9]。然而目前关于 CaSR 在脑缺血再灌注损伤中的具体作用机制尚未完全明确。因此,本实验拟初步探讨 CaSR 在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

健康成年雄性 Wistar 大鼠 60 只,体重 250~300 g,由青岛市实验动物和动物实验中心提供。NPS-89636(批号:HY-10007)购自美国 MedChem Express 公司,丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L),购自碧云天生物技术有限公司;小鼠抗大鼠 Caspase-3 单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗、小鼠超敏二步法免疫组化检测试剂盒及 DAB 显色试剂盒均由北京中杉金桥生物技术有限公司购得,TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及给药 健康成年雄性 Wistar 大鼠,适应环境 1 周,饲养温度 23~25℃,自由饮水摄食。采用随机数字表法,将其分为 3 组(n=20):假手术组(S 组)、脑缺血再灌注组(I/R 组)和钙敏感受体拮抗剂组(N 组)。N 组于缺血前 10 min 尾静脉注射钙敏感受体拮抗剂 NPS-89636 1 mg/kg,I/R 组给予等容量二甲基亚砜。每组再分为 2 个亚组,一亚组应用 TUNEL 法检测神经细胞凋亡情况及采用免疫组化染色法测定 Caspase-3 阳性细胞表达水平;另一亚组应用酶联免疫法(ELISA)检测 MDA 含量,SOD 的活性,Western blot 法检测 Caspase-3 蛋白表达水平。

1.2.2 大鼠脑缺血再灌注损伤模型的制备 大鼠术前禁食 12 h,10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉,仰卧固定在手术台上,行颈部正中切口,结扎颈总动脉近端、颈外动脉及其分支,将线栓经颈总动脉分叉处通过颈内动脉入颅至大脑前动脉起始部来阻断大脑中动脉血流。线栓插入深度为 19.5~20.5 mm,脑缺血 2 h 后将线栓拔出再灌注 24 h,S 组大鼠只行麻醉和血管分离术,不行缺血再灌注及静脉注射。实验过程中大鼠用白炽灯照射,保持肛温 36~37℃。

1.2.3 神经功能评分 于再灌注 24 h 时行神经功能评分^[10]。评估内容包括自主活动、四肢活动的协调性、前爪伸展能力、攀爬、肢体反应和触须反应。每项评分为 0~3 分,总分 0~18 分;评分低,代表神经功能受损严重,正常大鼠评分为 18 分。

1.2.4 脑组织 MDA 含量及 SOD 活性的测定 于再灌注 24 h

时行神经功能评分后处死大鼠取缺血脑组织 100 mg,匀浆,4℃下 3000 转 /min(离心半径 6.4 cm)离心 10 min,取上清。按照试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性。

1.2.5 神经细胞凋亡及 Caspase-3 阳性细胞检测 脑缺血再灌注 24 h 后,应用 10%中性福尔马林(40%甲醛 100 mL、0.01 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液 900 mL 配制而成)经心脏灌注固定,快速断头取脑,4%多聚甲醛固定 2 h,于视交叉吻侧和尾侧横断,取中段标本,常规脱水、透明、石蜡包埋、冠状切片,切片厚度 6 mm,脱蜡至水。TUNEL 法检测神经细胞凋亡情况,免疫组化染色 SABC 法检测 Caspase-3 阳性细胞表达,按试剂盒说明书(北京中杉金桥生物技术有限公司)操作,DAB 呈色。每张切片在 400 倍视野下随机选取梗死周边区不重叠的 5~7 个视野。计数 TUNEL 阳性细胞数(胞核呈棕黄色颗粒)和细胞总数,计算神经细胞凋亡指数,取其平均值。计数各视野中 Caspase-3 阳性细胞数(胞质呈棕色,颗粒感,也有部分胞质、胞核均着色)和细胞总数,计算阳性细胞率,以反映 Caspase-3 的表达水平。

1.2.6 脑组织 Caspase-3 蛋白表达的检测 另取缺血脑组织 100 mg 加入 1 mL 蛋白提取剂研磨匀浆,冰上静置 2 h,4℃离心 10 min。取上清,BCA 法测定蛋白浓度,另取上清液 800 μ L,加入 5 $\times$ SDS 蛋白示踪缓冲液 200 μ L,煮沸 5 min 置于 -20℃保存。采用 Western blot 法检测 Caspase-3 蛋白的表达。冰箱中取出样本,离心 5 min,按照蛋白定量得到的浓度加样,使得每个加样孔的上样量为 30 μ g,电泳完毕,半干法转膜后,7%脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h,加入小鼠抗大鼠 Caspase-3 (1:300,Abcam 公司,英国)和 GAPDH (1:6 000,北京中杉金桥生物技术有限公司)单克隆抗体(作为内参),4℃孵育过夜,洗膜后加入山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:8 000,北京中杉金桥生物技术有限公司),室温摇床杂交 1 h,经化学发光法曝光后观察结果。以 β -actin 作为内参,采用吸光度值扫描分析软件 Quantiscan 1.0 测定每条带的吸光度值。以目的蛋白光密度值与 β -actin 光密度值的比值反应 Caspase-3 蛋白的表达。

1.2.7 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计学软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠神经功能评分、MDA 含量及 SOD 活性的影响

I/R 组和 N 组 MDA 含量高于 S 组,神经功能评分及 SOD 活性低于 S 组($P < 0.05$);N 组 MDA 含量低于 I/R 组,神经功能评分及 SOD 活性高于 I/R 组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能评分、MDA 含量及 SOD 活性的比较(n=10, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of neurological function score and the level of MDA, SOD indifferent groups (n=10, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Neurological function score	MDA(nmol/mg)	SOD(nU/mg)
S grou	18.0 $\pm$ 0.0	1.68 $\pm$ 0.23	31.9 $\pm$ 2.7
I/R group	10.2 $\pm$ 0.6 ^a	3.71 $\pm$ 1.25 ^a	18.7 $\pm$ 2.4 ^a
N group	15.8 $\pm$ 0.5 ^{ab}	2.31 $\pm$ 0.67 ^{ab}	27.4 $\pm$ 2.6 ^{ab}

Note: compared with group S, ^a $P < 0.05$; compared with group I/R, ^b $P < 0.05$.

2.2 对大鼠神经细胞凋亡指数、Caspase-3 阳性细胞和蛋白表达的影响

I/R 组和 N 组神经细胞凋亡指数、Caspase-3 阳性细胞和

Caspase-3 蛋白表达水平高于 S 组。N 组神经细胞凋亡指数、Caspase-3 阳性细胞和 Caspase-3 蛋白表达水平低于 I/R 组 ($P<0.05$)。见图 1、2、3 及表 2。

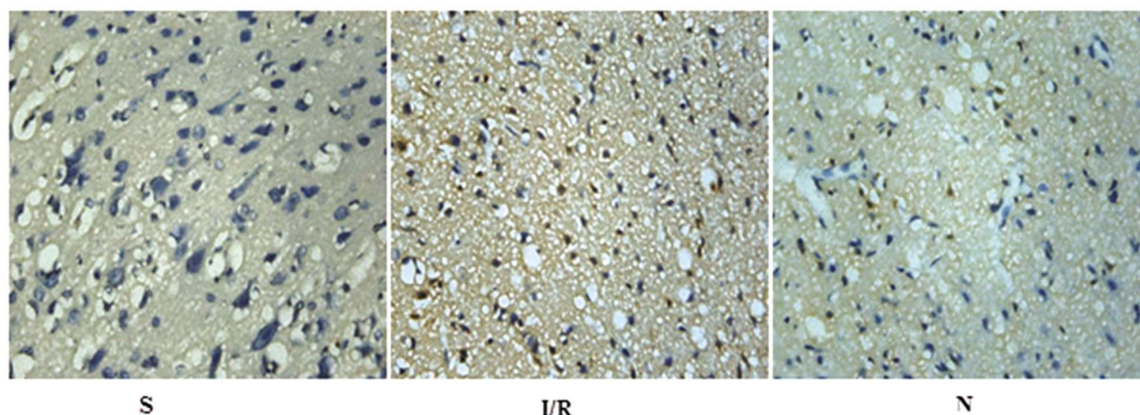


图 1 各组大鼠 TUNEL 凋亡阳性细胞表达

Fig.1 Expression of apoptotic positive cells in different groups

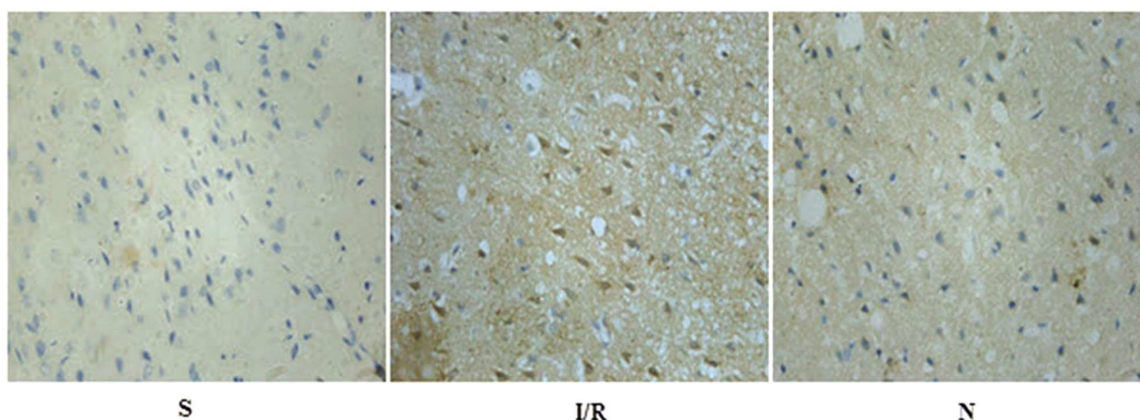


图 2 各组大鼠 Caspase-3 免疫组化染色阳性细胞表达

Fig.2 Immunohistochemical expression of Caspase-3 in different groups

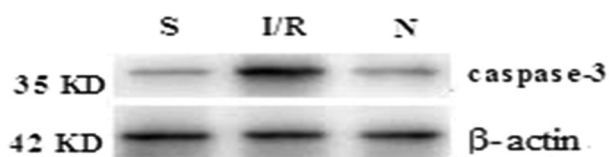


图 3 各组大鼠 Caspase-3 蛋白水平条带印迹图

Fig.3 Protein expression of Caspase-3 in different groups

3 讨论

钙敏感受体 (calcium sensing receptor, CaSR) 属于 G 蛋白

偶联受体家族中 C 家族的成员之一。Ruot 等^[11,12]首次证实脑组织中存在 CaSR mRNA 及蛋白表达, 随后发现正常生理状态下, CaSR 主要分布在嗅球、海马、小脑、大脑的室管膜下区等部位, 其广泛表达于神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞中。研究发现在脑缺血再灌注过程中, CaSR 表达增加, 可加重神经元的死亡^[13,14]; 另外, 在脑皮质损伤后给予钙敏感受体拮抗剂干预, 可使 CaSR 表达减少。这些实验初步提示 CaSR 在脑损伤中起到一定的作用, 但其在脑缺血再灌注损伤中的具体作用机制尚未完全阐明。

表 2 各组大鼠神经细胞凋亡指数、Caspase-3 阳性细胞和蛋白表达水平的比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of apoptosis index and Caspase-3 expression in different groups ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Groups	AI (%)	Caspase-3 positive cell rate (%)	Caspase-3 protein
S group	4.02± 0.25	3.86± 0.20	0.3951± 0.0017
I/R group	30.76± 0.51 ^a	48.32± 0.37 ^a	0.8732± 0.0016 ^a
N group	18.87± 0.62 ^{ab}	35.76± 0.51 ^{ab}	0.5128± 0.0014 ^{ab}

Note: compared with group S, ^a $P<0.05$; compared with group I/R, ^b $P<0.05$.

氧化应激是缺血再灌注损伤的重要机制之一。线粒体是机

体氧自由基产生的主要来源, 同时对氧自由基氧化损伤十分敏

感。MDA 是脂质过氧化的最终产物,其含量高低是组织细胞损伤的重要标志^[15,16]。SOD 是机体氧自由基清除酶,在脑组织内广泛存在,保护细胞免受损伤,其活性可反映机体对氧自由基清除能力的高低^[17,18]。本实验结果显示,与 I/R 组比较,N 组神经功能评分及 SOD 活性升高,而 MDA 含量降低。这提示抑制 CaSR 的表达,可使脑缺血/再灌注后氧自由基产生减少,从而减轻脑组织氧化损伤。

目前越来越多的学者认为,线粒体是参与细胞凋亡的重要通路。关于细胞凋亡的细胞外信号转导机制目前尚不完全清楚,而凋亡的细胞内信号转导机制的终点均是 Caspase-3 蛋白的激活,Caspase-3 蛋白的激活是启动细胞凋亡的关键步骤。因此,Caspase-3 蛋白被认为是细胞凋亡的执行蛋白,Caspase-3 蛋白激活后破坏 DNA 链、破坏细胞完整性,最终形成凋亡小体,导致细胞凋亡^[19-21]。本实验结果显示,与 I/R 组比较,N 组神经细胞凋亡指数、Caspase-3 阳性细胞率及 Caspase-3 蛋白表达降低,故推测 CaSR 参与了大鼠脑缺血再灌注损伤时细胞凋亡的过程。综上所述,钙敏感受体参与大鼠脑缺血再灌注损伤和细胞凋亡的发生,其可能通过改善缺血再灌注脑组织氧化应激反应,影响 Caspase-3 的释放,改善缺血再灌注脑组织的神经细胞凋亡。

参考文献(References)

- [1] Qin T, Li N, Tan XF, et al. Works on heart, how about brain? Effect of hyperkalemia on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(9): 2839-2846
- [2] Chen X, Lu M, He X, et al. TRPC3/6/7 Knockdown Protects the Brain from Cerebral Ischemia Injury via Astrocyte Apoptosis Inhibition and Effects on NF- κ B Translocation [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(10): 7555-7566
- [3] Xing J, Xu H, Liu C, et al. Melatonin ameliorates endoplasmic reticulum stress in N2a neuroblastoma cell hypoxia-reoxygenation injury by activating the AMPK-Pak2 pathway [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(3): 621-633
- [4] Yu B, Ruan M, Liang T, et al. Tetramethylpyrazine phosphate and borneol combination therapy synergistically attenuated ischemia-reperfusion injury of the hypothalamus and striatum via regulation of apoptosis and autophagy in a rat model [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(11): 4807-4820
- [5] Radak D, Katsiki N, Resanovic I, et al. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 15(2): 115-122
- [6] Paquot F, Huart J, Defraigne JO, et al. Implications of the calcium-sensing receptor in ischemia/reperfusion [J]. *Acta cardiologica*, 2017, 72(2): 125-131
- [7] Xue Z, Song Z, Wan Y, et al. Calcium-sensing receptor antagonist NPS2390 attenuates neuronal apoptosis through intrinsic pathway following traumatic brain injury in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(2): 589-594
- [8] Zhen Y, Ding C, Sun J, et al. Activation of the calcium-sensing receptor promotes apoptosis by modulating the JNK/p38 MAPK pathway in focal cerebral ischemia-reperfusion in mice [J]. *AM J Transl Res*, 2016, 8(2): 911-921
- [9] Wang P, Wang L, Wang S, et al. Effects of calcium-sensing receptors on apoptosis in rat hippocampus during hypoxia/reoxygenation through the ERK1/2 pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 10808-10815
- [10] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-634
- [11] Ruat M, Molliver ME, Snowman AM, et al. Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(8): 3161-3165
- [12] Pak HJ, Riew TR, Shin YJ, et al. Enhanced expression of the calcium-sensing receptor in reactive astrocytes following ischemic injury in vivo and in vitro[J]. *J Neurol Sci*, 2016, 366: 102-109
- [13] Kim JY, Ho H, Kim N, et al. Calcium-sensing receptor (CaSR) as a novel target for ischemic neuroprotection[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2014, (11): 851-866
- [14] Noh JS, Pak HJ, Shin YJ, et al. Differential expression of the calcium-sensing receptor in the ischemic and border zones after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *J Chem Neuroanat*, 2015, 66-67: 40-51
- [15] Wang RX, Li S, Sui X. Sodium butyrate relieves cerebral ischemia-reperfusion injury in mice by inhibiting JNK/STAT pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(4): 1762-1769
- [16] Lu W, Xu L, Wen J. Protective effect of extract of the *Camellia japonica* L. on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2019, 77(1): 39-46
- [17] Rasouli Vani J, Taghi Mohammadi M, Sarami Foroshani M, et al. Evaluation of the neuroprotective and antioxidant effects of *Dorema aucheri* extract on cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 255-262
- [18] Tan L, Liang C, Wang Y, et al. Pharmacodynamic Effect of Luteolin Micelles on Alleviating Cerebral Ischemia Reperfusion Injury [J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(4): E248
- [19] Zhang FB, Wang JP, Zhang HX, et al. Effect of β -patchoulene on cerebral ischemia-reperfusion injury and the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(5): 3335-3342
- [20] Xia D, Zhang Z, Zhao Y. Acteoside Attenuates Oxidative Stress and Neuronal Apoptosis in Rats with Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury[J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(11): 1645-1651
- [21] Zhao Y, Huang Y, Fang Y, et al. Chrysophanol attenuates nitrosative/oxidative stress injury in a mouse model of focal cerebral ischemia-reperfusion[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 138(1): 16-22