

基于磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/核因子 κ B 通路探讨高原缺氧对大鼠蛛网膜下腔出血后血脑屏障的作用

魏艳娜 王锋存 马香莲 索田莎 陈胜 王兰桂 孙娟* 赵秀丽*
(青海大学附属医院神经内科, 西宁 810001)

[摘要] **目的** 探讨高原缺氧对大鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后血脑屏障的作用及其机制。**方法** SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠($n=78$), 随机分为 4 组: 假手术组(sham)、蛛网膜下腔出血模型组(SAH)、高原缺氧假手术组(Hp sham)和高原缺氧蛛网膜下腔出血模型组(Hp SAH)。通过低压模拟舱(海拔 5000 m)饲养 4 d 建立高原缺氧大鼠动物模型, 采用颈内动脉刺破法建立 SAH 大鼠动物模型。SAH 后 24 h, 各组大鼠进行神经功能学评分和出血严重程度评估, Nissl 染色和 TUNEL 染色分别观察大鼠海马组织 CA1 区神经元形态变化和神经细胞凋亡, Western blotting 检测大鼠海马组织磷酸化 PI3K(p-PI3K)、PI3K、磷酸化 Akt(p-Akt)、Akt、磷酸化核因子 κ B(p-NF- κ B)、NF- κ B 及基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、闭锁蛋白(occludin)、紧密连接蛋白-5(claudin-5)的表达, 免疫荧光染色观察大鼠海马组织 CA1 区 occludin、claudin-5 蛋白表达。**结果** SAH 后 24 h, SAH 组与 Sham 组、Hp SAH 组与 Hp Sham 组比较, 大鼠神经功能评分明显下降, 颅底出血量明显增加($P<0.05$), Hp SAH 组与 SAH 组比较, 神经功能评分明显下降($P<0.05$); SAH 组与 sham 组比较, 大鼠海马组织 CA1 区神经元形态萎缩变形, 神经元细胞排列紊乱, 神经元数量明显下降, 神经细胞凋亡明显增加($P<0.05$), 高原缺氧后上述神经元形态损伤和神经细胞凋亡进一步加重; SAH 组与 sham 组、Hp SAH 组与 Hp sham 组比较, p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、occludin 及 claudin-5 蛋白的表达明显下降, p-NF- κ B/NF- κ B 和 MMP-9 蛋白表达明显升高($P<0.05$), Hp SAH 组与 SAH 组比较, p-PI3K/PI3K 和 MMP-9 蛋白表达明显升高, Hp sham 组与 sham 组比较, claudin-5 蛋白表达明显升高, 差异均具有统计学意义($P<0.05$); 免疫荧光染色发现, SAH 组大鼠海马组织 CA1 区 occludin、claudin-5 蛋白的表达下降, 高原缺氧后 occludin、claudin-5 蛋白的表达进一步降低。**结论** 高原缺氧通过抑制 PI3K/Akt/NF- κ B 通路加重蛛网膜下腔出血大鼠模型后血脑屏障破坏。

[关键词] 高原缺氧; 蛛网膜下腔出血; 血脑屏障; 磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/核因子 κ B 通路; 免疫印迹法; 免疫荧光; 大鼠

[中图分类号] R743.3 [文献标志码] A [DOI] 10.16098/j.issn.0529-1356.2023.02.005

Effect of altitude hypoxia on blood-brain barrier after subarachnoid hemorrhage based on phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/nuclear factor κ B pathway in rats

WEI Yan-na, WANG Feng-cun, MA Xiang-lian, SUO Tian-sha, CHEN Sheng,
WANG Lan-gui, SUN Juan*, ZHAO Xiu-li*
(Department of Neurology, Qinghai University Affiliated Hospital, Xining 810001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of plateau hypoxia on the blood-brain barrier after subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats. **Methods** Adult male SD rats ($n=78$) were randomly divided into 4 groups: sham group (sham), SAH model group (SAH), plateau hypoxia sham group (Hp sham) and plateau hypoxia SAH model group (Hp SAH). The rat model of plateau hypoxia was established through low-pressure simulation chamber (altitude 5000 m), and

[收稿日期] 2022-10-17 [修回日期] 2022-11-25
[基金项目] 青海省自然科学基金(2020-ZJ-948Q)
[作者简介] 魏艳娜(1995—), 女(汉族), 陕西省大荔县人, 在读硕士研究生。
* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)
E-mail: sunjuan_128@163.com Tel: 0971(3921581)
E-mail: zhaoxl6@aliyun.com Tel: 0971(3921581)

the SAH model was established by endovascular perforation method. At 24 hours after SAH, neurobehavior score and SAH grade were assessed. The morphological changes of neurons and apoptosis of nerve cells in the CA1 region of hippocampal were observed by the staining of Nissl and TUNEL. The expression of phosphorylated PI3K (p-PI3K), PI3K, phosphorylated Akt (p-Akt), Akt, phosphorylated nuclear factor κ B (p-NF- κ B), NF- κ B, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), occludin and claudin-5 in hippocampal were detected by the method of Western blotting. The expression of occludin and claudin-5 proteins in the CA1 region of hippocampal were observed by immunofluorescent staining. **Results** At 24 hours after SAH, the neurobehavior score decreased significantly and SAH grade increased significantly in the SAH and Hp SAH group ($P < 0.05$). Neurobehavior score decreased significantly in the Hp SAH group compared with the SAH group ($P < 0.05$). In the SAH group, neurons in the CA1 region of hippocampus were atrophied and deformed, the arrangement were disordered, the number of neurons decreased significantly, and the apoptosis of nerve cells increased significantly ($P < 0.05$). Plateau hypoxia could aggravate the morphological damage of neurons and apoptosis of nerve cells. The expression of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, occludin and claudin-5 proteins decreased significantly, while the expression of p-NF- κ B/NF- κ B and MMP-9 proteins increased significantly in the SAH and Hp SAH group ($P < 0.05$). The expression of p-PI3K/PI3K and MMP-9 proteins increased significantly in Hp SAH group compared with the SAH group. The expression of claudin-5 protein increased significantly in Hp sham group compared with the sham group ($P < 0.05$). Immunofluorescent staining showed that the expression of occludin and claudin-5 proteins in the CA1 region of hippocampus decreased in the SAH group. Plateau hypoxia could further decreased the expression of occludin and claudin-5 proteins. **Conclusion** Plateau hypoxia aggravates blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in rats through inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B pathway.

[Key words] Plateau hypoxia; Subarachnoid hemorrhage; Blood-brain barrier; Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/nuclear factor κ B pathway; Western blotting; Immunofluorescence; Rat

蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 是指颅底或脑表面病变的血管破裂, 血液流入蛛网膜下腔引起的一种综合征^[1], SAH 的发病率仅占卒中的 5%~7%, 但其死亡率和致残率极高, 预后极差^[2], 严重威胁着人类的健康和生命。早期脑损伤 (early brain injury, EBI) 是影响 SAH 预后的主要因素, EBI 的病理生理机制包括脑缺血、血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 破坏、脑水肿、氧化应激、炎症反应和细胞凋亡等, 导致内皮细胞收缩、紧密连接解体 and 血管通透性增加, 进而破坏 BBB 的完整性和功能^[3]。

BBB 是神经血管单位的一个重要组成部分, 调节外周血和中枢神经系统之间的物质交流, BBB 的组成主要包括微血管内皮细胞、内皮细胞间的连接、星形胶质细胞和周细胞^[4]。内皮细胞间的连接是 BBB 最关键的结构, 而内皮细胞间的连接包括紧密连接 (tight junctions, TJs)、黏附连接和缝隙链接, 其中 TJs 是 BBB 的结构和基础。紧密连接蛋白包括: 闭锁蛋白 (occludin)、闭合小环蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1) 和紧密连接蛋白-5 (claudin-5)。有研究报道^[5], 脑卒中后激活 PI3K/Akt/核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 通路, 增加紧密连接蛋白的表达进而稳定 BBB 的完整性。基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinases-9, MMP-9) 是一种由活性氧及促炎症细胞因子诱导产生的蛋白酶^[6], 通过与 NF- κ B 的启动子结合发生转录, 降解内皮细胞间的紧密连接蛋白和基底膜蛋白。有文献报道^[7], SAH

后 NF- κ B 被激活并转移到细胞核内上调 MMP-9 的表达, 进而降解紧密连接蛋白-5 (claudin-5) 的表达, 导致 BBB 的破坏。

青藏高原环境具有低气压、低氧、强紫外线、干燥和寒冷的特点, 机体在这种高海拔的环境中会产生一系列生理或病理反应, 其中低氧是最重要的影响因素之一。研究显示, 高原世居人群与平原人相比, 人体组织结构及生理功能都发生了不同程度的变化, 尤其中枢神经系统改变最为明显^[8]。SAH 后颅内压增高, 脑组织处于严重的缺血、缺氧状态, 且蛛网膜下腔内血液的代谢产物作为致痉挛物质作用于血管, 引起内皮细胞功能紊乱, 激活细胞凋亡和炎症反应, 最终形成脑水肿及 BBB 破坏^[9]。高原缺氧导致脑血管病的发生率增加, 然而, 低氧环境对 SAH 后 BBB 的影响鲜见报道。PI3K/Akt/NF- κ B 通路在调节脑水肿、炎症、神经元凋亡和血脑屏障破坏等过程中发挥着重要作用, 有文献报道, SAH 后 PI3K/Akt/NF- κ B 通路的激活通过增加紧密连接蛋白的表达来稳定 BBB 的完整性^[10]。综上, 本工作研究高原缺氧对大鼠蛛网膜下腔出血后 BBB 的影响, 并探讨其机制是否通过 PI3K/Akt/NF- κ B 通路。

材料和方法

1. 实验动物及分组

78 只 SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠, 体重 280~300 g, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, SPF 级, 动物许可证号: SCXK (京) 2019-0008。

SD 大鼠随机分为 4 组: 假手术组 (sham, $n = 16$)、蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 模型组 (SAH, $n = 23$, 死亡 7 只)、高原缺氧假手术组 (Hp sham, $n = 16$) 和高原缺氧蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 模型组 (Hp SAH, $n = 23$, 死亡 7 只)。对照组于西宁 (海拔 2261 m) 饲养 4 d, 高原缺氧组大鼠利用低压氧舱模拟高原低压低氧环境, 持续暴露 4 d 建立高原缺氧大鼠动物模型^[11], 低压氧舱海拔设置: 舱内海拔 5000 m、氧分压 78 mmHg、氧浓度 19.6%、温度 23.3 °C、湿度 31.8%、二氧化碳 300 ppm。

2. 实验方法

2.1 SAH 动物模型的建立: 根据 Bederson 等^[12]的方法, 应用颈内动脉刺破法建立大鼠 SAH 模型。SD 大鼠经气体麻醉机 (瑞沃德-R520IE 小动物麻醉机-移动式, 麻醉剂成分: 2% 异氟烷) 吸入麻醉后, 将大鼠仰卧位固定于操作台上, 颈部正中切口, 钝性分离并暴露右侧颈总动脉, 分离颈外动脉和颈内动脉, 颈外动脉近头侧端结扎并离断, 使颈外动脉近心端成一个残端, 用外科缝合线在其起始部松散打个活结, 动脉夹夹闭颈总动脉和颈内动脉, 眼科剪在颈外动脉近心端剪一个“V”型切口, 将线栓从“V”型切口导入, 并将颈外动脉残端上的外科缝合线拉紧, 去掉颈内动脉上的动脉夹, 线栓顺着颈内动脉插入直至感觉到有阻力 (18~20 mm), 继续插入刺破大脑前动脉和大脑中动脉的分叉处, 将线栓抽出并结扎颈外动脉, 松开颈总动脉上的动脉夹, 缝合伤口后, 转移到笼中饲养。假手术组大鼠的线栓插入颈内动脉但不刺破血管, 其余步骤与模型组相同。

2.2 神经功能学评分: SAH 后 24 h 分别取 5 只大鼠, 参照 Garcia 等^[13]大鼠神经功能评分标准进行评分。包括 6 项观测指标: (1) 自主运动 (将大鼠放入鼠笼中观察 5 min): 0 分: 无自主运动; 1 分: 很少运动; 2 分: 运动并触及至少 1 侧笼壁; 3 分: 运动并触及至少 3 侧笼壁; (2) 四肢运动的对称性 (提起鼠尾使之悬空观察四肢状态): 0 分: 患侧无运动; 1 分: 患侧轻微运动; 2 分: 患侧运动较迟缓; 3 分: 双侧体态对称; (3) 前爪伸展运动 (悬尾使后肢悬空, 前肢移向桌子, 使之仅靠前肢行走, 观察前肢伸展运动): 0 分: 左前肢无伸展动作; 1 分: 左前肢轻微伸展; 2 分: 左前肢有伸展运动但不及右侧; 3 分: 双侧伸展对称; (4) 网屏实验: 1 分: 不能爬上; 2 分: 左侧劣势; 3 分: 正常攀爬; (5) 两侧身体触觉反射实验: 1 分: 左侧无反应; 2 分: 左侧反应弱于右侧; 3 分: 反应相同; (6) 两侧胡须触觉反射实验: 1 分: 左侧无反应; 2 分: 左侧反应弱于右侧; 3 分: 反应相同。总分 3~18 分, 分数越低表示脑损伤程度越严重。

2.3 出血严重程度评分: SAH 后 24 h, SD 大鼠经上述方法麻醉后固定, 打开大鼠胸腔, 经主动脉快速灌注生理盐水后再灌注 4% 多聚甲醛 PBS, 取出整脑, 参照 Sugawara 等^[14]方法评估 SAH 模型后的严重程度。基底池分为 6 段, 每段根据血管上的血块覆盖情况评分 0~3 分, 血管包括: 基底动脉、大脑前动脉、颈内动脉、后交通动脉及大脑后动脉; 评分标准: 0 分: 无蛛网膜下腔出血; 1 分: 少量蛛网膜下腔出血; 2 分: 动脉周围有中等出血量; 3 分: 血凝块覆盖所有动脉。

2.4 Nissl 染色: SAH 后 24 h, 每组分别取 5 只大鼠, 各组大鼠经上述方法麻醉后, 经主动脉灌注 4% 多聚甲醛 PBS (0.1 mol/L, pH 7.2), 取出大鼠脑组织固定 12 h, 30% 蔗糖溶液 (溶于 0.1 mol/L PBS) 脱水, 将大鼠脑组织以视交叉和乳头体中部为切面行冠状切片, OCT 包埋后, 冷冻切片 (Leica CM 1950) 制作含海马组织断面的脑切片 (厚 20 μm), 将冷冻切片置于蒸馏水中洗 5 min; Nissl 染色液 (北京索莱宝科技有限公司, G1430) 37 °C 温箱孵育 30 min; 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, Olympus X71 显微照相系统观察并摄片。

2.5 TUNEL 染色: 含海马组织冷冻切片行 TUNEL 染色, 冷冻切片置于蒸馏水中 5 min, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.01 mol/L PBS 室温 5 min \times 2 次; 蛋白酶 K 37 °C 反应 20 min, 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min \times 3 次, 平衡液室温平衡 20 min; TdT 酶反应液 37 °C 温箱避光 60 min, 0.01 mol/L PBS 洗 5 min \times 5 次, 用含抗荧光淬灭剂的封片剂封片, Olympus X71 荧光显微镜下观察并摄片。

2.6 Western blotting 检测: SAH 后 24 h, 每组分别取 6 只大鼠, 经上述方法麻醉后, 动物断头后快速于冰上取出海马组织, 置于低温冰箱 (-80 °C) 保存。BCA 法测定蛋白浓度并根据分子量选择合适的分离胶浓度, 制胶后 4 °C 冰箱过夜; 各组蛋白上样, 连接电泳仪电泳: 恒压 80 V、30 min 后, 待蛋白条带跑至分离胶和浓缩胶的交界处, 重新设置电压: 恒压 120V、1 h, 电泳完成后, 转移到 PVDF 膜上, 转膜条件设置: 200 mA、120 min; 用 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 50 min; 孵育一抗: 兔抗大鼠磷酸化 PI3K (phosphor PI3K, p-PI3K) 单克隆抗体 (1:2000, Cell Signaling Technology 公司, #4228), 兔抗大鼠 PI3K 单克隆抗体 (1:2000, Cell Signaling Technology 公司, #4257), 兔抗大鼠磷酸化 Akt (phosphor Akt, p-Akt) 单克隆抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology 公司, #4060), 兔抗大鼠 Akt 单克隆抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology 公司, #4691), 兔抗大鼠磷酸化 NF- κ B (phosphor NF- κ B, p-NF- κ B) 单克隆抗体

(1:2000, Cell Signaling Technology 公司, #3033), 兔抗大鼠 NF- κ B 单克隆抗体 (1:2000, Cell Signaling Technology 公司, #8242), 兔抗大鼠 MMP-9 单克隆抗体 (1:1000, Abcam 公司, ab228402), 兔抗大鼠 occludin 单克隆抗体 (1:1000, Abcam 公司, ab216327), 兔抗大鼠 claudin-5 单克隆抗体 (1:1000, Abcam 公司, ab131259), 兔抗大鼠 β -actin 多克隆抗体 (1:5000, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, E-AB-40338), 4 $^{\circ}$ C 过夜; 次日复温 1 h 后, 加入相应二抗, 山羊抗兔 IgG-HRP (1:5000, 北京索莱宝科技有限公司, SE134), 室温下 50 min, 1 \times TBST 洗膜, 10 min \times 3 次; 按照 1:1 的比例配置 ECL 发光液; 自动曝光, 以 TIF 格式保存图像, 并计算目的蛋白灰度值。

2.7 免疫荧光染色: 对含海马组织冷冻切片进行免疫荧光染色。冷冻切片置于 0.01 mol/L PBS 溶液 5 min, 0.1% Triton X-100 37 $^{\circ}$ C 温箱 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗 5 min \times 3 次, 5% 正常羊血清室温封闭 1 h 后, 滴加一抗, 兔抗大鼠 occludin 单克隆抗体 (1:100, Abcam 公司, ab216327), 兔抗大鼠 claudin-5 单克隆抗体 (1:100, Abcam 公司, ab131259), 将切片放入湿盒 4 $^{\circ}$ C 过夜, 次日复温 1 h 后, 滴加山羊抗兔荧光二抗 (1:200, SA00003-2, Proteintech 公司) 室温避光孵育 1 h, 0.01 mol/L PBS 洗 5 min \times 3 次, 用含抗荧光淬灭剂的封片剂封片, Olympus X71 荧光显微镜下摄片。

3. 数据分析

采用 Sigma Plot 10.0 统计学软件进行分析, 出血严重程度评分采用中位数与四分位数间距表示, 并采用秩和检验, 其余实验数据用均值 \pm 标准差

($\bar{x}\pm s$) 表示, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行组间比较, P 值 < 0.05 表示差异具有统计学意义。

结 果

1. 神经功能学评分

SAH 后 24 h, 各组大鼠 Garcia 神经功能学评分结果见图 1A。结果显示, SAH 组与 sham 组比较, Hp SAH 组与 Hp sham 组比较, 神经功能学评分均明显下降, 差异具有统计学意义 ($P< 0.05$); Hp SAH 与 SAH 组比较, 神经功能学评分明显下降, 差异具有统计学意义 ($P< 0.05$)。结果表明, SAH 后大鼠神经功能评分明显下降, 高原缺氧可以进一步降低大鼠 SAH 模型后神经功能评分。

2. 出血严重程度评分

SAH 后 24 h, 各组大鼠出血严重程度结果见图 1B、2A。结果显示, 蛛网膜下腔血凝块分布在 Willis 环和腹侧脑干周围; SAH 组与 sham 组比较, Hp SAH 组与 Hp sham 组比较, 出血量明显升高, 差异具有统计学意义 ($P< 0.05$); 而 Hp SAH 与 SAH 组比较, 出血严重程度差异无显著性 ($P> 0.05$), 提示 SAH 组及 Hp SAH 组模型制作成功。

3. Nissl 染色

SAH 后 24 h, 各组大鼠 Nissl 染色结果见图 2B1~2C4, 神经元统计结果见图 3A。结果显示, sham 组大鼠海马组织 CA1 区神经元排列整齐, 细胞大而圆, 胞质内尼氏体染色清晰, SAH 组大鼠海马组织 CA1 区神经元萎缩变形, 排列紊乱, 并出现大量神经元缺失 ($P< 0.05$); Hp sham 组与 sham 组比较, 大鼠海马组织 CA1 区神经元形态萎缩变形, 神经元数量明显下降, 差异具有统计学意义 ($P< 0.05$); 而 Hp

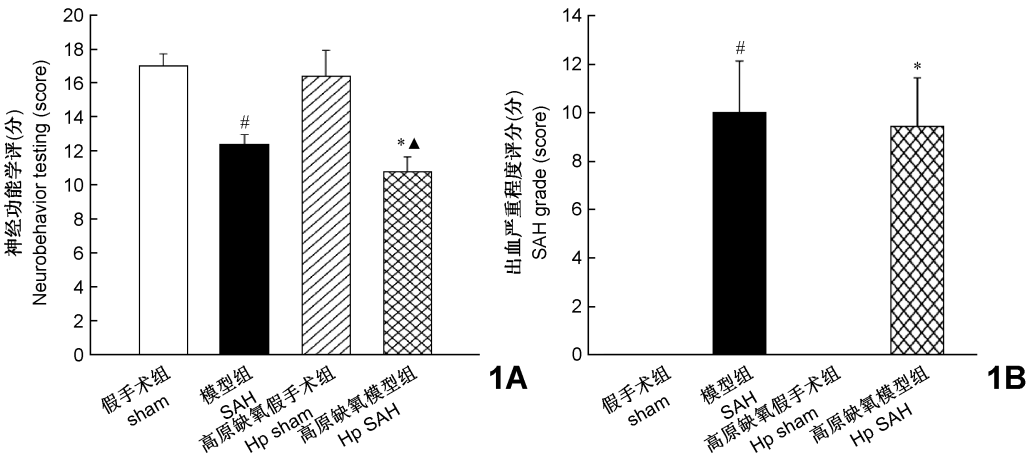


图1 神经功能学评分和出血严重程度评分
A. 神经功能学评分; B. 出血严重程度评分; SAH 组与 sham 组比较, $\#P< 0.05$; Hp SAH 组与 Hp sham 组比较, $*P< 0.05$; Hp sham 组与 sham 组比较及 Hp SAH 组与 SAH 组比较, $\blacktriangle P< 0.05$
Fig.1 The score of neurobehavior and SAH grade
A, Neurobehavior score; B, SAH grade; SAH group vs sham group, $\#P< 0.05$; Hp SAH group vs Hp sham group, $*P< 0.05$; Hp sham group vs sham group, Hp SAH group vs SAH group, $\blacktriangle P< 0.05$

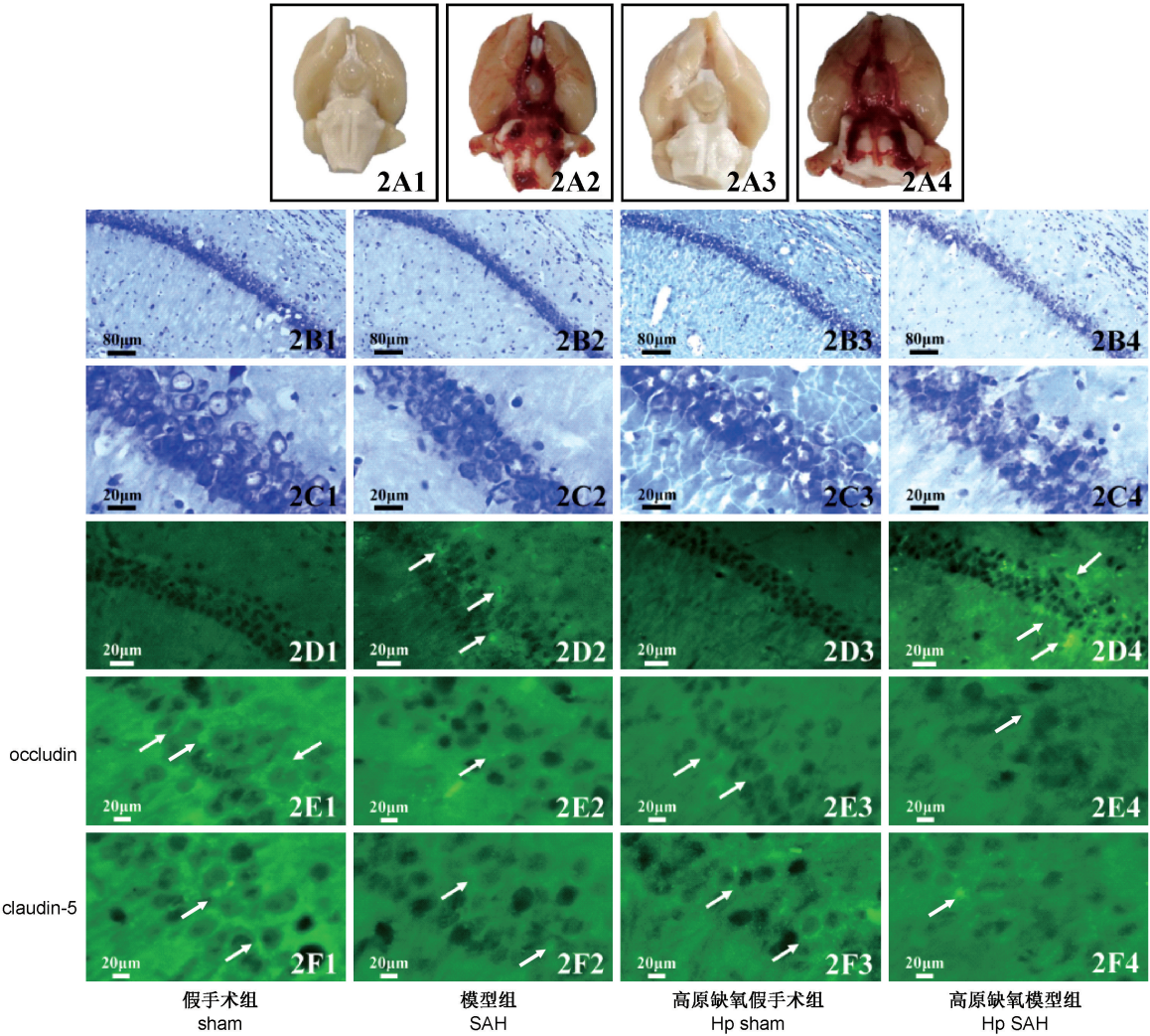


图2 颅底标本观察 Nissl 染色、TUNEL 染色和免疫荧光染色

A. 大体观察, sham 组 (A1) 和 Hp sham 组 (A3) 中未观察到血凝块, SAH 组 (A2) 和 Hp SAH 组 (A4) 观察到血凝块; B1~B4. Nissl 染色; B1~B4. 标尺示 80 μm; C1~C4. 标尺示 20 μm; D1~D4. TUNEL 染色, 标尺示 20 μm, 箭头所指为凋亡细胞; Sham 组海马组织 CA1 区神经元排列整齐, 细胞大而圆, 偶见神经细胞凋亡, SAH 组神经元萎缩变形, 排列紊乱, 出现大量神经元缺失及神经细胞凋亡, Hp sham 及 Hp SAH 组神经元形态萎缩变形, 神经元细胞排列紊乱, 神经元数量明显下降, 神经细胞凋亡明显增加; E1~F4. 免疫荧光染色, 标尺示 20 μm, 箭头所指为阳性细胞; E1~E4. Occludin 蛋白的表达; F1~F4. Claudin-5 蛋白的表达; Sham 组大鼠海马组织 CA1 区有大量 occludin、claudin-5 蛋白表达, SAH、Hp sham 及 Hp SAH 组与 sham 组比较, 海马组织 CA1 区 occludin、claudin-5 蛋白表达明显下降

Fig.2 Skull base observation, Nissl staining, TUNEL staining and immunofluorescent staining

A, General observation; There were no blood clots in the Sham group (A1) and Hp sham group (A3), meanwhile the blood clots were observed in the SAH group (A2) and Hp SAH group (A4); B1-C4, Nissl staining; B1-B4, Bar=80 μm; C1-C4, Bar=20 μm; D1-D4, TUNEL staining, Bar=20 μm, the arrows indicate apoptotic cells; In the sham group, neurons in the CA1 region of the hippocampus were neatly arranged, with large and round cells and occasional neuronal apoptosis; While in the SAH group, neurons were atrophied and deformed, with disorganized arrangement and numbers of neuronal deletions and nerve cells apoptosis; In the Hp sham and Hp SAH groups, neuronal morphology was atrophied and deformed, the arrangement was disordered, the number of neurons were significantly decreased and the apoptosis of nerve cells was significantly increased; E1-F4, Immunofluorescent staining, Bar = 20 μm, the arrow indicates positive cell; E1-E4, Expression of occludin protein; F1-F4, Expression of claudin protein; In the sham group, a large number of occludin and claudin-5 proteins expressed in the CA1 region of hippocampal tissue; While the expression of occludin and claudin-5 proteins in the CA1 region of hippocampal tissue decreased significantly in the SAH group, Hp sham group and Hp SAH group compared with the sham group

SAH 组与 SAH 组比较, 神经元细胞排列更紊乱, 神经元数量进一步下降。

4. TUNEL 染色

SAH 后 24 h, 各组大鼠 TUNEL 染色结果见图

2D1~2D4, 神经细胞凋亡数统计结果见 3B。结果显示, sham 组大鼠海马组织 CA1 区偶见神经细胞凋亡, 而 SAH 组神经细胞凋亡明显升高 ($P < 0.05$), Hp sham 组大鼠海马组织 CA1 区神经细胞凋亡较

sham 组升高,但差异无统计学意义,而 Hp SAH 组与 Hp sham 及 SAH 组比较,海马组织 CA1 区神经细胞凋亡明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果说明,SAH 后 24 h,大鼠海马组织 CA1 区出现神经细胞凋亡,而高原缺氧能够加重大鼠海马组织 CA1 区神经细胞凋亡。

5. Western blotting

SAH 后 24 h,Western blotting 检测各组大鼠海马组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-NF- κ B/NF- κ B、MMP-9、occludin、claudin-5 蛋白的表达,结果见图 4。结果显示,SAH 组与 sham 组比较及 Hp SAH 组与 Hp sham 组比较,p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、occludin 及 claudin-5 蛋白的表达明显下降,p-NF- κ B/NF- κ B 和 MMP-9 蛋白的表达明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);Hp sham 组与 sham 组比较,p-Akt/Akt 的表达明显降低,claudin-5 蛋白的表达明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);Hp SAH 组与 SAH 组比较,p-PI3K/PI3K、MMP-9 蛋白的表达明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

6. 免疫荧光染色

SAH 后 24 h, 各组大鼠海马组织 CA1 区 occludin 和 claudin-5 蛋白免疫荧光染色结果见图 2E1~2F4, 阳性细胞数结果见图 5A、5B。结果显示,sham 组大鼠海马组织 CA1 区有大量 occludin、claudin-5 蛋白表达,Hp sham 组与 sham 组比较,大鼠海马组织 CA1 区 occludin、claudin-5 蛋白表达明显下降($P < 0.05$),SAH 组与 sham 组比较及 Hp SAH 组与 Hp sham 组比较,海马组织 CA1 区 occludin、claudin-5 蛋白表达明显下降($P < 0.05$),Hp SAH 组与 SAH 组比较,海马组织 CA1 区 occludin 蛋

白表达降低,但差异无统计学意义,claudin-5 蛋白表达明显降低($P < 0.05$),差异具有统计学意义。结果表明,SAH 后 24 h,大鼠海马组织 CA1 区 occludin、claudin-5 蛋白的表达降低,高原缺氧可进一步降低海马组织 CA1 区 occludin 和 claudin-5 蛋白的表达。

讨 论

蛛网膜下腔出血(SAH)是一种严重威胁生命的急性脑血管疾病,具有较高的死亡率和致残率,已成为全世界脑血管疾病相关死亡的主要原因之一。早期脑损伤(EBI)是指 SAH 后 72 h 内对脑的直接损伤^[15],被认为是蛛网膜下腔出血后高发病率和死亡率的主要原因。SAH 后颅内压升高,脑血流量减少,全脑缺血,脑水肿,血液成分外渗和分解产物积聚等,共同导致 EBI 的发生,这些病理变化可以导致内皮细胞收缩,紧密连接解体和血管通透性增加,进而破坏 BBB 的完整性和功能。

高原环境以低氧、低压、干燥和寒冷为主要特征,其独特的环境使人类面临巨大的挑战,进入高原后,随着海拔升高,空气中氧含量逐步下降,当海拔升高到 5000 m 时,空气中氧含量只有海平面的 60%。当机体处于缺氧状态,脑组织通过血流量迅速增加进行自我调节以维持氧供^[16]。高原缺氧还会导致内皮细胞损伤和血小板功能障碍,这些功能障碍与微血管病变的形成有关^[17],在极端情况下,高原缺氧可能会导致高原肺水肿中的血管渗漏或 BBB 破坏,从而导致脑微出血。此外,机体通过激活 Toll 样受体、髓样细胞-1 信号通路中表达的 NF- κ B 触发受体等多种炎症途径,产生全身性炎症反应。全身性炎症反应可使毒素和炎症介质透过中

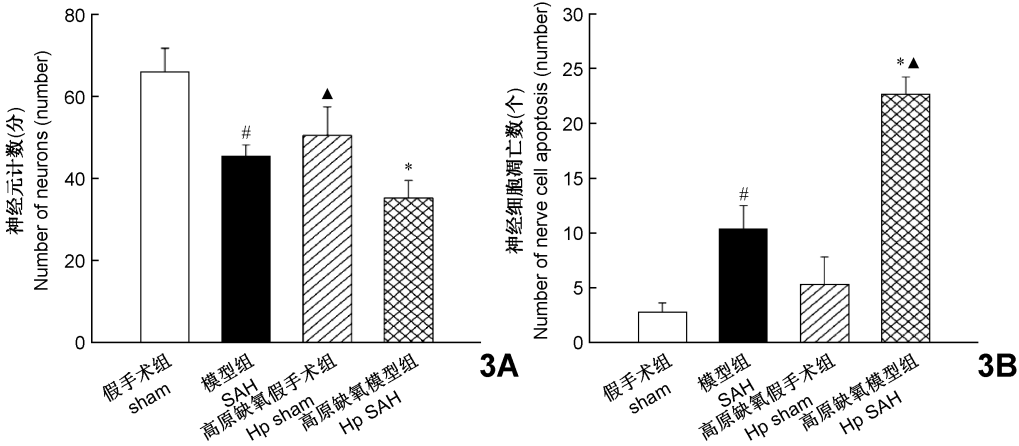


图3 神经元计数和神经细胞凋亡数
A. 神经元计数; B. 神经细胞凋亡数; SAH 组与 sham 组比较, # $P < 0.05$; Hp SAH 组与 Hp sham 组比较, * $P < 0.05$; Hp sham 组与 sham 组比较及 Hp SAH 组与 SAH 组比较, ▲ $P < 0.05$
Fig.3 Number of neurons and nerve apoptosis
A, Number of neurons; B, Number of nerve apoptosis; SAH group vs sham group, # $P < 0.05$; Hp SAH group vs Hp sham group, * $P < 0.05$; Hp sham group vs sham group, Hp SAH group vs SAH group, ▲ $P < 0.05$

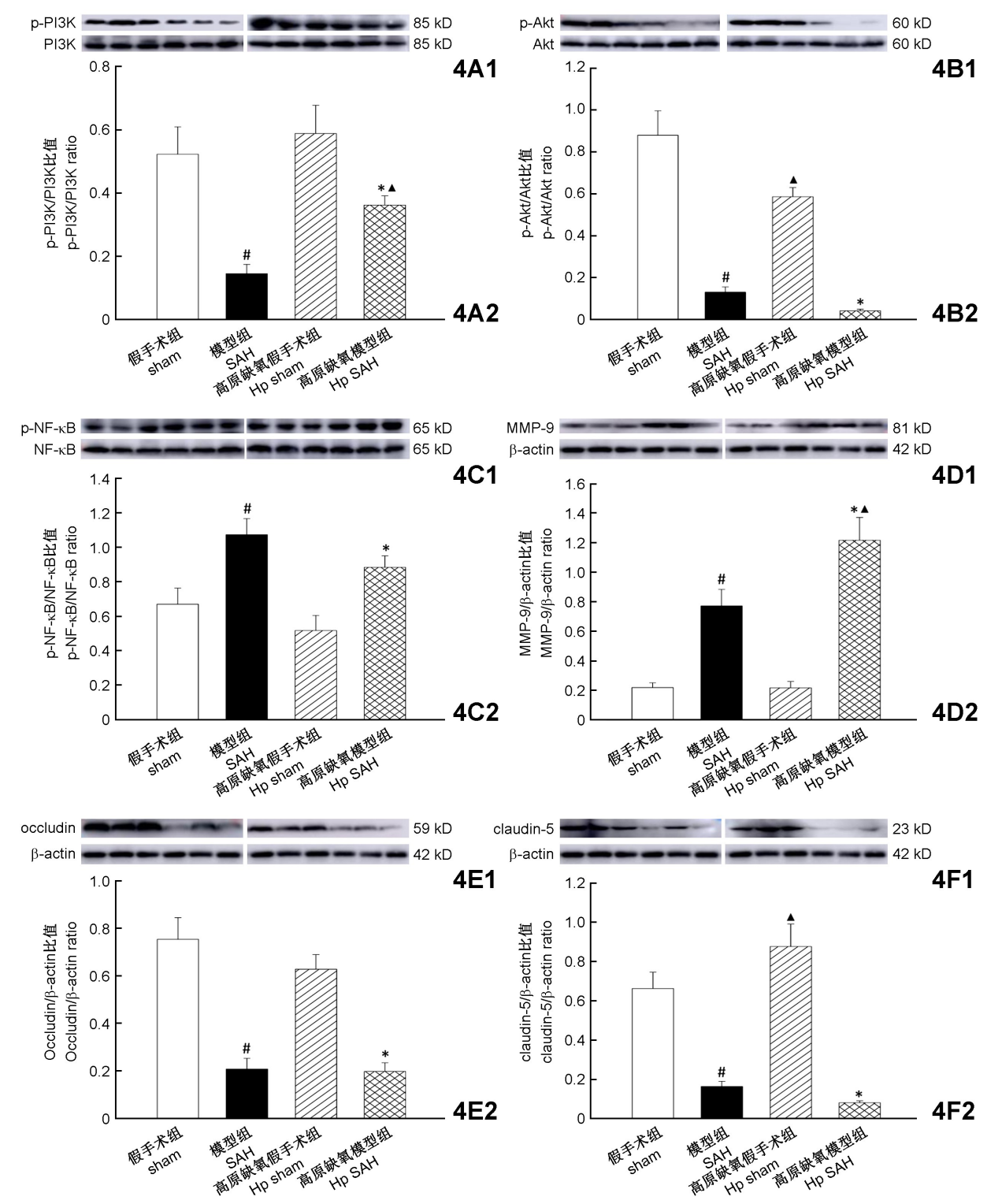


图4 Western blotting 结果

A. PI3K 蛋白的表达; B. Akt 蛋白的表达; C. NF-κB 蛋白的表达; D. MMP-9 蛋白的表达; E. Occludin 蛋白的表达; F. Claudin-5 蛋白的表达; 1.蛋白表达图; 2.统计图; SAH 组与 sham 组比较, $\#P<0.05$; Hp SAH 组与 Hp sham 组比较, $*P<0.05$; Hp sham 组与 sham 组比较及 Hp SAH 组与 SAH 组比较, $\blacktriangle P<0.05$

Fig.4 Results of Western Blotting

A, The expression of PI3K protein; B, The expression of Akt protein; C, The expression of NF-κB protein; D, The expression of MMP-9 protein; E, The expression of occludin protein; F, The expression of claudin-5 protein; 1, Protein expression map; 2, Statistical chart; SAH group va sham group, $\#P<0.05$; Hp SAH group vs Hp sham group, $*P<0.05$; Hp sham group vs sham group, Hp SAH group vs SAH group, $\blacktriangle P<0.05$

枢神经系统屏障,进而从体循环外渗到蛛网膜下腔,进一步激活神经炎症级联反应,从而增加 SAH 的发病^[18]。SAH 是高原出血性脑卒中的常见类型,因其具有极高的致死率和致残率,已经成为严重威胁高

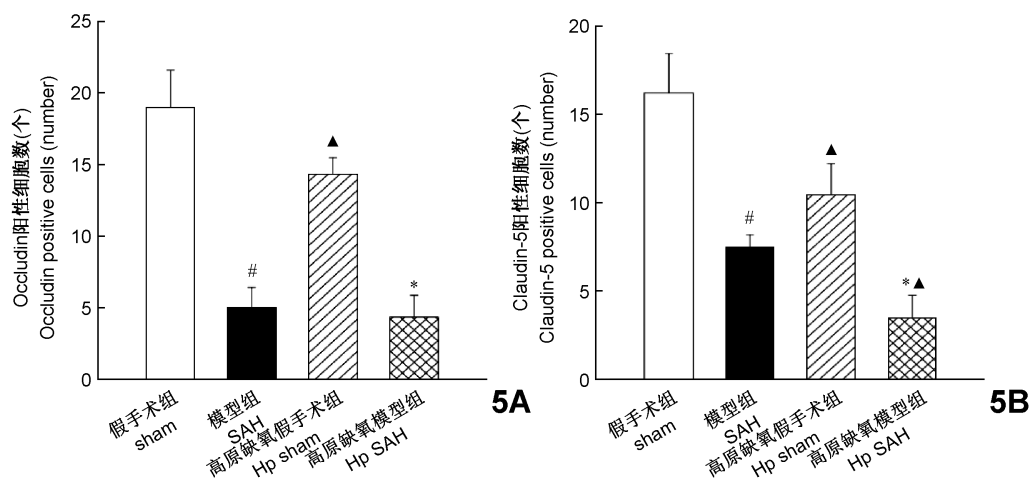


图5 Occludin 和 claudin-5 蛋白阳性细胞数
A. Occludin 蛋白阳性细胞数; B. Claudin-5 蛋白阳性细胞数; SAH 组与 sham 组比较, # $P < 0.05$; Hp SAH 组与 Hp sham 组比较, * $P < 0.05$; Hp sham 组与 sham 组比较, Hp SAH 组与 SAH 组比较, ▲ $P < 0.05$
Fig.5 Occludin and claudin-5 positive cells
A, Occludin positive cells; B, Claudin-5 positive cells; SAH group vs sham group, # $P < 0.05$; Hp SAH group vs sham group, * $P < 0.05$; Hp sham group vs sham group, Hp SAH group vs SAH group, ▲ $P < 0.05$

原人群生命健康的主要原因之一。有研究表明,外源性 G 补缀和叉头蛋白结构域血管生成因子 1 (angiogenic factor with G patch and forkhead associated domains 1, Aggf1) 治疗可以通过 PI3K/Akt/NF- κ B 通路减轻大鼠 SAH 后的神经炎症和 BBB 的破坏,进而改善了神经功能缺损^[10]。

本实验结果表明,SAH 后大鼠神经功能评分明显下降,而高原缺氧可以进一步降低大鼠 SAH 模型后的神经功能评分。海马组织 CA1 区是已知的大脑结构中对缺氧最敏感的区域,因此,我们采用 Nissl 染色和 TUNEL 染色观察大鼠海马组织 CA1 区神经元的形态变化和神经细胞凋亡。SAH 后 24 h,海马组织 CA1 区神经元萎缩变形,排列紊乱,并出现大量神经元缺失和神经细胞凋亡,而高原缺氧进一步加重了海马组织 CA1 区神经元上述形态学损伤和神经细胞凋亡。

NF- κ B 信号通路参与脑缺血疾病的炎症反应和 BBB 完整性的调节^[9]。大多数细胞静息状态下 NF- κ B 与细胞质抑制因子核因子 κ B 抑制蛋白- α (inhibitor of NF- κ B- α , I κ B α) 结合,I κ B α 被磷酸化后迅速降解并释放 NF- κ B,NF- κ B 被磷酸化并转运到细胞核,进而启动一系列炎症级联反应。PI3K/Akt 信号通路是 NF- κ B 信号通路的主要上游元件,通过诱导 I κ B 激酶 (I κ B kinase, IKK) 磷酸化参与 I κ B α 的调控,进而通过增强 p65 亚基的转录活性激活 NF- κ B^[19]。本实验通过 Western blotting 检测了大鼠海马组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-NF- κ B/NF- κ B 蛋白的表达,结果提示,SAH 组与 sham 组及 Hp SAH 组与 Hp sham 组比较,p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt

的表达显著下降,p-NF- κ B/NF- κ B 的表达明显升高,而 Hp sham 组与 sham 组比较,p-Akt/Akt 的表达显著下降,表明 SAH 可通过 PI3K/Akt/NF- κ B 通路导致 EBI 的发生,而高原低氧可能通过该通路进一步加重 EBI 的发生,与 Zhu 等^[10]的报道一致。

有文献报道,NF- κ B/MMP-9 通路参与了 SAH 后血脑屏障破坏的发生,BBB 的关键结构是紧密连接,主要包括紧密连接蛋白,如 occludin、claudin-5 和 ZO-1^[20]。有研究表明,基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 在 SAH 后血脑屏障的破坏中发挥着重要作用^[21],MMP-9 通过降解微血管基底的细胞外基质 (如胶原蛋白 IV、层黏连蛋白、纤连蛋白) 以及内皮细胞间紧密连接蛋白,使得紧密连接蛋白中断,进而导致 SAH 后 BBB 破坏和全脑水肿。亦有文献报道,SAH 后通过 MMP-9 的上调和紧密连接蛋白的下调,诱导了 BBB 的破坏^[22]。本研究通过 Western blotting 检测了 MMP-9、occludin、claudin-5 蛋白的表达,通过免疫荧光染色检测了 occludin、claudin-5 蛋白的表达,结果提示,SAH 组与 sham 组比较及 Hp SAH 组与 Hp sham 组比较,MMP-9 蛋白的表达明显升高,occludin 及 claudin-5 蛋白的表达明显下降;Hp SAH 组与 SAH 组比较,MMP-9 蛋白的表达明显升高,提示高原缺氧可以增加 MMP-9 蛋白的表达,降解紧密连接蛋白 occludin、claudin-5 的表达,导致 SAH 后 BBB 通透性破坏,参与 SAH 后 EBI 的发生。然而,我们亦发现,Hp sham 组与 sham 组比较,claudin-5 蛋白的表达明显升高,提示高原缺氧预处理可以提高紧密连接蛋白的表达进而发挥脑保护作用,其可能原因考虑是缺氧对脑组织的预保

护作用。Halder^[23] 和 Boroujerdi^[24] 等报道,低氧预处理刺激广泛的血管重塑反应,从而增加脑血管供应,促进 BBB 紧密连接蛋白的表达,进而发挥脑保护作用。

综上所述,高原缺氧通过抑制 PI3K/Akt/NF-κB 通路,增加大鼠海马组织内 MMP-9 蛋白的表达,降低紧密连接蛋白 (occludin、claudin-5) 的表达,进而增加大鼠 SAH 模型后的 BBB 破坏。但高原缺氧可能通过增加 Sham 组大鼠海马组织中 claudin-5 蛋白的表达发挥脑保护作用。

参 考 文 献

[1] Xie JM, Yang XM. Recent progress of the neural injury mechanism after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Acta Anatomica Sinica, 2020, 51(4) : 618-652. (in Chinese)
谢江森, 杨晓梅. 动脉瘤性蛛网膜下腔出血后神经元损伤机制的研究进展[J]. 解剖学报, 2020, 51(4) : 618-625.

[2] Sun J, Zhao XL, Zeng GX, et al. Salvinorin A alleviating cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage through phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/endothelial nitric oxide synthase pathway [J]. Acta Anatomica Sinica, 2021, 52(6) : 855-862. (in Chinese)
孙娟, 赵秀丽, 曾国熙, 等. Salvinorin A 通过磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/内皮型一氧化氮合酶通路减轻蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛[J]. 解剖学报, 2021, 52(6) : 855-862.

[3] Li Y, Wu P, Bihl JC, et al. Underlying mechanisms and potential therapeutic molecular targets in blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage [J]. Curr Neuroparmacol, 2020, 18(12) : 1168-1179.

[4] Ueno M. Molecular anatomy of the brain endothelial barrier; an overview of the distributional features[J]. Curr Med Chem, 2007, 14(11) : 1199-1206.

[5] Yu L, Fan SJ, Liu L, et al. Effect of ischemic preconditioning on cerebral edema and the AQP4 expression following hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats [J]. World J Pediatr, 2015, 11(2) : 165-170.

[6] Peeyush Kumar T, McBride DW, Dash PK, et al. Endothelial cell dysfunction and injury in subarachnoid hemorrhage [J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(3) : 1992-2006.

[7] Xie Z, Enkhjargal B, Nathanael M, et al. Exendin-4 preserves blood-brain barrier integrity via glucagon-like peptide 1 receptor/activated protein kinase-dependent nuclear factor-κB/matrix metalloproteinase-9 inhibition after subarachnoid hemorrhage in rat [J]. Front Mol Neurosci, 2021, 14: 750726.

[8] Gu GJ. Research progress on the pathogenesis and prevention of highland cerebrovascular disease[J]. People's Military Surgeon, 2018, 61(1) : 78-80. (in Chinese)
顾高洁. 高原脑血管病发病机制及防治研究进展[J]. 人民军医, 2018, 61(1) : 78-80.

[9] Caner B, Hou J, Altay O, et al. Transition of research focus from vasospasm to early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. J Neurochem, 2012, 123(Suppl 2) : 12-21.

[10] Zhu Q, Enkhjargal B, Huang L, et al. Aggf1 attenuates

neuroinflammation and BBB disruption via PI3K/Akt/NF-κB pathway after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1) : 178.

[11] Hou Y, Wang X, Chen X, et al. Establishment and evaluation of a simulated high-altitude hypoxic brain injury model in SD rats[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(4) : 2758-2766.

[12] Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat[J]. Stroke, 1995, 26(6) : 1086-1092.

[13] 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) : 627-635.

[14] Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, et al. A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model[J]. J Neurosci Methods, 2008, 167(2) : 327-334.

[15] de Oliveira Manoel AL, Goffi A, Marotta TR, et al. The critical care management of poor-grade subarachnoid hemorrhage[J]. Crit Care, 2016, 20(1) : 21.

[16] Savioli G, Ceresa IF, Gori G, et al. Pathophysiology and therapy of high-altitude sickness: practical approach in emergency and critical care [J]. J Clin Med, 2022, 11(14) : 3937.

[17] Utermöhlen O, Jakobshagen K, Blissenbach B, et al. Emergence of annexin vpos CD31neg CD42blow/neg extracellular vesicles in plasma of humans at extreme altitude[J]. PLoS One, 2019, 14(8) : e0220133.

[18] Geraghty JR, Davis JL, Testai FD. Neuroinflammation and microvascular dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage: emerging components of early brain injury related to outcome[J]. Neurocrit Care, 2019, 31(2) : 373-389.

[19] Liu R, Chen Y, Liu G, et al. PI3K/Akt pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(9) : 797.

[20] Qu J, Zhao H, Li Q, et al. MST1 suppression reduces early brain injury by inhibiting the NF-κB/MMP-9 pathway after subarachnoid hemorrhage in mice[J]. Behav Neurol, 2018, 2018: 6470957.

[21] Zou Z, Dong YS, Liu DD, et al. MAP4K4 induces early blood-brain barrier damage in a murine subarachnoid hemorrhage model [J]. Neural Regen Res, 2021, 16(2) : 325-332.

[22] Liu X, Zhang X, Ma K, et al. Matrine alleviates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats; possible involvement of PI3K/Akt-mediated NF-κB inhibition and Keap1/Nrf2-dependent HO-1 induction[J]. Cell Mol Biol (Noisy-Le-grand), 2016, 62(11) : 38-44.

[23] Halder SK, Kant R, Milner R. Chronic mild hypoxia promotes profound vascular remodeling in spinal cord blood vessels, preferentially in white matter, via an α5β1 integrin-mediated mechanism[J]. Angiogenesis, 2018, 21(2) : 251-266.

[24] Boroujerdi A, Milner R. Defining the critical hypoxic threshold that promotes vascular remodeling in the brain[J]. Exp Neurol, 2015, 263: 132-140.