

往病区过程中,难免有外力对输液成品的振荡,从而可能加速了药物析出。故本实验还考察了振荡作用对配伍液的影响,即使用振荡器考察轻度、强度两个挡位的振荡对伏立康唑稳定性的影响。实验发现轻度、强度振摇下的配伍液分别在 1.5 h 和 1 h 开始出现浑浊,药物析出结晶,轻度振摇下其百分含量在 3 h 下降至 89.41%,强度振摇下其百分含量在 1.5 h 下降至 88.84%,均已不符合规范。所以在实际工作中,调配好的伏立康唑成品输液应避免振荡,尽快使用,以保证药物的有效性。

### 参考文献

- [1] 石洁君,钱国清,杨乃彬,等.伏立康唑治疗隐球菌感染的研究进展[J].国际呼吸杂志,2020,40(2):156-160.
- [2] 郑晓丽,陈官芝,刘维达.抗真菌药物的免疫调节作用[J].中国真菌学杂志,2020,15(3):179-182.
- [3] 陈江飞,苗彩云,徐萍.抗真菌药伏立康唑的临床药代动力学研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2015,20(9):1072-1080.

- [4] 陈丽娟,李进东,吴晓丽,等.两性霉素B脂质体联合伏立康唑治疗急性髓系白血病合并曲霉菌感染 21 例疗效观察[J].安徽医药,2021,25(1):169-172.
- [5] 陈秀强,韦曦,欧阳小琳,等.两种国产注射用伏立康唑与输液配伍稳定性研究[J].中国抗生素杂志,2015,40(2):120-123.
- [6] 国家药典委员会.中国药典(四部)[S].北京:中国医药科技出版社,2020:通则 125-126.
- [7] 赵欣,刘梦,周静,等.品管圈在提高某院 PIVAS 药品调配残留达标率的应用研究[J].中国医院药学杂志,2020,40(5):559-564.
- [8] 冯彩霞,修宪,田伟,等.伏立康唑磺丁基醚- $\beta$ -环糊精包合物制备工艺优化[J].中国医院药学杂志,2017,37(15):1431-1434.
- [9] 王晓宇,邓晓娟,吴妍,等.注射用灯盏花素调配方法优化及其在不同溶媒中稳定性的研究[J].安徽医药,2019,23(6):1078-1081.
- [10] 李国春,黄新武,唐勇,等.不同调配方法对注射用奥美拉唑钠残留量的影响[J].中国药业,2015,24(7):8-9.
- [11] 刘荣,路霞林,董平.注射用两性霉素B与不同厂家5%葡萄糖注射液的配伍稳定性考察[J].中国药房,2015,26(20):2771-2773.
- [12] 许红,李国春,伍伦玲,等.注射用盐酸丙帕他莫合理调配方案研究[J].中国药业,2017,26(22):8-11.

(收稿日期:2020-11-09,修回日期:2021-02-25)

引用本文:苗志凯,夏清岫,王艳.乌司他丁对脑出血大鼠局部黏着斑激酶/细胞外信号调节激酶信号通路及神经元凋亡的影响[J].安徽医药,2022,26(11):2217-2222.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.11.022.

◇ 药学研究 ◇



## 乌司他丁对脑出血大鼠局部黏着斑激酶/细胞外信号调节激酶信号通路及神经元凋亡的影响

苗志凯,夏清岫,王艳

作者单位:河北省沧州中西医结合医院神经外科,河北 沧州 061000

**摘要:** **目的** 探讨乌司他丁(UTI)对脑出血(ICH)大鼠局部黏着斑激酶(FAK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路及神经元凋亡的影响。**方法** 建立 ICH 大鼠模型,使用随机数字表法将造模成功的大鼠随机分为模型组(尾静脉注射 0.9% 氯化钠溶液)、抑制剂组(FAK 抑制剂 PF562271, 50 mg/kg 灌胃)、UTI 组(尾静脉注射 10 万 U/kg UTI)、UTI+抑制剂组(FAK 抑制剂 PF562271, 50 mg/kg 灌胃同时尾静脉注射 10 万 U/kg UTI),每组 20 只,另设 20 只为假手术组(尾静脉注射 0.9% 氯化钠溶液)作为对照,所有处理均每天 1 次,连续 7 d。干湿比重法测定各组大鼠脑组织含水率;酶联免疫吸附(ELISA)法各组大鼠血清中炎症因子含量;原位末端标记(TUNEL)法检测各组大鼠海马组织神经元凋亡;免疫组织化学分析法检测大鼠海马组织抗凋亡因子 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和促凋亡因子 Bcl 相关 X(Bax)、胱天蛋白酶 3(caspase-3)表达;尼氏染色法检测各组大鼠海马组织中神经元存活情况;蛋白质印迹法(Western blotting)法检测大鼠海马组织中 FAK 蛋白表达和 ERK1/2 磷酸化水平。**结果** 与假手术组相比,模型组大鼠脑组织含水率(84.51±7.42)%、炎症因子含量、神经元凋亡指数(44.51±3.77)%以及促凋亡因子 Bax(3.05±0.41)、caspase-3(3.27±0.46)表达和 ERK1/2 磷酸化水平升高,神经元存活数目、抑凋亡因子 Bcl-2(1.23±0.21)表达以及 FAK(0.29±0.07)蛋白表达水平降低( $P<0.05$ )。与模型组相比,UTI 组大鼠脑组织含水率(71.43±6.11)%、炎症因子含量、神经元凋亡指数(15.34±0.76)%以及促凋亡因子 Bax(2.03±0.15)、caspase-3(2.27±0.61)表达和 ERK1/2 磷酸化水平降低,神经元存活数目、抑凋亡因子 Bcl-2(2.67±0.27)表达以及 FAK(0.58±0.09)蛋白表达升高( $P<0.05$ );抑制剂组大鼠脑组织含水率(92.83±7.56)%、炎症因子含量、神经元凋亡指数(51.99±5.65)%以及促凋亡因子 Bax(3.73±0.37)、caspase-3(3.99±0.26)表达和 ERK1/2 磷酸化水平升高,神经元存活数目、抑凋亡因子 Bcl-2(0.73±0.06)表达以及 FAK(0.12±0.02)蛋白表达水平降低( $P<0.05$ )。与 UTI 组相比,UTI+抑制剂组大鼠脑组织含水率(84.16±6.76)%、炎症因子含量、神经元凋亡指数(43.22±4.07)%以及促凋亡因子 Bax(2.98±0.35)、caspase-3(3.26±0.31)表达和 ERK1/2 磷酸化水平升高,神经元存活数目、抑凋亡因子 Bcl-2(1.27±0.12)表达以

及FAK(0.28±0.03)蛋白表达水平降低( $P<0.05$ )。结论 UTI可通过促进FAK蛋白表达,抑制ERK磷酸化,进而抑制ICH大鼠神经元凋亡。

关键词: 乌司他丁; 脑出血; 局部黏着斑激酶/细胞外信号调节激酶; 神经元凋亡

## Effects of ulinastatin on FAK/ERK signaling pathway and neuronal apoptosis in rats with intracerebral hemorrhage

MIAO Zhikai, XIA Qingxiu, WANG Yan

Author Affiliation: Department of Neurosurgery, Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Cangzhou, Hebei 061000, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of ulinastatin (UTI) on focal adhesion kinase (FAK)/extracellular signal regulated kinase (ERK) signal pathway and neuronal apoptosis in rats with intracerebral hemorrhage. **Methods** ICH rat models were established and randomly divided into model group (tail vein injection of 0.9% sodium chloride solution), inhibitor group (FAK inhibitor PF562271, 50 mg/kg by gavage), UTI group (tail vein injection of 100 000 U/kg UTI), UTI+inhibitor group (gavage of FAK inhibitor pf562271 and 50 mg/kg, meanwhile, tail vein injection of 100 000 U/kg UTI), with 20 rats in each group, another 20 rats were divided into sham operation group (tail vein injection of 0.9% sodium chloride solution) as control, all treatments were once a day for 7 consecutive days. The water content of brain tissue was measured by dry wet specific gravity method; the content of inflammatory factors in serum of rats in each group was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); TUNEL method was used to detect neuronal apoptosis in hippocampus; the expressions of anti apoptotic factor Bcl-2 and pro apoptotic factor Bax, caspase-3 were detected by immunohistochemistry; the survival of neurons in hippocampal tissues of rats were detected by Nysch staining; and Western blotting was used to detect FAK protein expression and ERK1/2 phosphorylation level in hippocampus. **Results** Compared with those in the sham operation group, the water content of brain tissue(84.51±7.42)%, inflammatory factor content, neuronal apoptosis index(44.51±3.77)%, Bax(3.05±0.41) and caspase-3(3.27±0.46) expressions, ERK1/2 phosphorylation level in model group were higher, while the expressions of Bcl-2(1.23±0.21) and FAK(0.29±0.07) protein was lower ( $P<0.05$ ). Compared with those in the model group, the water content of brain tissue (71.43±6.11)%, inflammatory factor content, neuronal apoptosis index(15.34±0.76)%, Bax(2.03±0.15) and caspase-3(2.27±0.61) expressions, ERK1/2 phosphorylation level in UTI group were lower, while the number of neurons alive, the expressions of Bcl-2(2.67±0.27) and FAK(0.58±0.09) protein was higher ( $P<0.05$ ); the water content of brain tissue(92.83±7.56)%, inflammatory factor content, neuronal apoptosis index(51.99±5.65)%, Bax(3.73±0.37) and caspase-3(3.99±0.26) expressions, ERK1/2 phosphorylation level in inhibitor group were higher, while the number of neurons alive, the expressions of Bcl-2(0.73±0.06) and FAK(0.12±0.02) protein was lower ( $P<0.05$ ). Compared with those in UTI group, the water content of brain tissue(84.16±6.76)%, inflammatory factor content(43.22±4.07)%, neuronal apoptosis index, Bax(2.98±0.35) and caspase-3(3.26±0.31) expressions, ERK1/2 phosphorylation level in UTI+inhibitor group were higher, while the number of neurons alive, the expressions of Bcl-2(1.27±0.12) and FAK(0.28±0.03) protein was lower ( $P<0.05$ ). **Conclusion** UTI can inhibit ERK phosphorylation by promoting FAK protein expression, then inhibit neuronal apoptosis in ICH rats. **Key words:** Ulinastatin; Intracerebral hemorrhage; Focal adhesion kinase/extracellular signal-regulated kinase; Neuronal apoptosis

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是临床上常见的急危重病症,占急性脑血管病的10%~15%,具有较高致残率和致死率<sup>[1]</sup>。随着社会压力的剧增和个人生活习惯的改变,ICH的发病率持续升高。乌司他丁(ulinastatin, UTI)在临床上主要用于治疗急性胰腺炎和慢性复发性胰腺炎,亦可用于急性循环衰竭的抢救辅助药物。但是近年来,大量研究表明,UTI在调节脑出血引起的神经功能缺损中发挥重要作用。给予心脏骤停大鼠UTI,可减少脑出血后的细胞凋亡,从而减轻神经功能缺损,增加大鼠的生存率<sup>[2]</sup>。UTI联合血必净可通过减弱海马细胞凋亡信号通路,保护短暂性缺血引起的神经损伤<sup>[3]</sup>。UTI可通过抑制线粒体依赖的凋亡通路,对

异氟醚诱导的大鼠海马神经元凋亡起保护作用<sup>[4]</sup>。局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK),是一种酪氨酸激酶,增强FAK表达可抑制神经元凋亡,对神经起保护作用<sup>[5]</sup>。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)包括ERK1和ERK2,是将信号从表面受体转导至细胞核的关键,参与细胞增殖分化、维持细胞形态和调节细胞凋亡等多种化学反应。UTI可通过调节ERK信号通路缓解心肌缺血再灌注引起的损伤<sup>[6]</sup>。但是UTI通过FAK/ERK信号通路对ICH大鼠神经元凋亡的影响,目前尚未有报道。本研究自2020年1—8月采用Ⅶ型胶原酶注射法制备ICH大鼠模型,使用UTI和FAK抑制剂干预,旨在从FAK/ERK信号通路揭示

UTI对ICH大鼠神经元凋亡的影响,为UTI在临床上对ICH的治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 健康SD大鼠(120只,雄性,7~8周龄,体质量200~220 g)购自重庆医科大学动物实验中心,许可证号SCXK(渝)2018-0003,符合国家实验室动物伦理保护标准及相关法律规定。按照3R原则给予实验动物人道的关怀照顾。饲养条件为:温度22℃,湿度55%,12 h光暗循环。实验方案已通过河北省动物实验伦理委员会批准。

**1.1.2 实验药物** 乌司他丁(规格:10万IU,批号H19990134)购自广东天普生化医药股份有限公司;PF562271(FAK抑制剂,CAS号717907-75-0)购自上海联迈生物工程有限公司。

**1.1.3 主要试剂和仪器** 白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司;TUNEL凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司;尼氏染色试剂盒购自索莱宝生物科技有限公司;十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)鼠抗均购自美国Sigma公司;蛋白提取试剂盒、ECL显色试剂盒和DAB蛋白定量试剂盒购自北京中山金桥生物科技有限公司;B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl相关X(Bax)、胱天蛋白酶2(caspase-2)、FAK、ERK1/2和p-ERK1/2鼠抗、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠免疫球蛋白(IgG)二抗均购自美国Abcam公司;酶标仪Fax-20100购自美国INStat公司;尼康SMZ745光学显微镜购自于上海普赫生物科技有限公司;蛋白凝胶成像仪购自美国Bio-Rad公司;脱水机、包埋机、石蜡切片机和染色机均购自湖北惠达仪器有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 ICH大鼠模型的建立及分组** 采用VII型胶原酶注射法制备ICH大鼠模型<sup>[7]</sup>:使用10%水合氯醛(400 mg/kg)腹部注射麻醉,将大鼠俯卧固定于立体定位仪上,于头部正中进行切口,将大鼠骨膜剥离,使其冠状缝和前囟裸露,依照立体定位图谱进行定位,向右侧纹状体(前囟后0.2 mm、左旁开3.5 mm和硬脑膜下5 mm的坐标位置)缓慢均匀推注1  $\mu$ L VII型胶原酶(假手术组为1  $\mu$ L生理盐水),缓慢出针,骨蜡封住颅孔,缝合切口,为防止感染,用少量碘伏消毒缝合皮肤。以造模大鼠清醒后出现同侧Horner征(即大鼠会进行没有方向性的自主运动:提尾时

向右侧旋转、自行向右转圈、右前肢发生瘫痪或者右前肢内收、曲头朝向右侧背部)作为ICH大鼠模型制备成功的标志。将造模成功的ICH大鼠使用随机数字表法随机分为模型组(尾静脉注射0.9%氯化钠溶液)、抑制剂组(FAK抑制剂PF562271, 50 mg/kg灌胃)、UTI组(尾静脉注射10万U/kg UTI<sup>[8]</sup>)、UTI+抑制剂组(FAK抑制剂PF562271, 50 mg/kg灌胃并尾静脉注射10万U/kg UTI),每组20只,每天1次,连续7 d。另取20只作为假手术组(尾静脉注射0.9%氯化钠溶液)。

**1.2.2 干湿比重法测定各组大鼠脑组织含水率** 各组大鼠在处理结束24 h后,注射3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)进行麻醉后实施安乐死。每组随机取10只大鼠,采用干湿比重法测定出血灶周围脑组织含水率:对大鼠断头取脑,收集大鼠血肿周围脑组织,切除脑膜、下脑干和小脑,剩余组织置于电子天平上称其湿重后,用锡纸包裹,放入电热烘箱内100℃烘干48 h至恒重后取出,测其干重。公式为:脑组织含水率(%)=(脑组织湿重-脑组织干重)/脑组织湿重 $\times$ 100%。用脑含水率评价脑水肿程度。

**1.2.3 ELISA法检测各组大鼠血清中炎症因子含量** 取上述1.2.2安乐死后各组所有大鼠尾静脉血液,13 000 r/min离心15 min后取上清,按照IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6 ELISA试剂盒说明书进行实验。

**1.2.4 原位末端标记(TUNEL)法检测各组大鼠海马组织神经元凋亡** 取上述1.2.2中每组余下10只大鼠,断头取脑后分离右海马,切取部分于4%多聚甲醛中固定24 h后,梯度乙醇脱水并包埋于石蜡中,海马组织石蜡包埋切片厚度为5 mm。使用凋亡试剂盒对石蜡包埋的切片进行常规脱水脱蜡,在显微镜下观察细胞核中有褐色或黄色颗粒特征的细胞为阳性细胞。以凋亡指数(apoptosis index, AI)评价细胞凋亡水平。AI=(阳性细胞数/总细胞数) $\times$ 100%。各组大鼠剩余海马组织存放于-80℃超低温冰箱中用于后续检测。

**1.2.5 免疫组织化学分析法检测抗凋亡因子Bcl-2和促凋亡因子Bax、caspase-3的表达** 取上述“1.2.4”石蜡包埋的组织样本玻片,干燥,在二甲苯中脱蜡,在乙醇中脱水。灭活时,加入含3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的甲醇溶液,静置20 min后,加入柠檬酸缓冲液(pH=6.0)加热提取抗原,5% BSA封闭20 min、1:5 000浓度稀释后的Bcl-2、Bax和caspase-3鼠抗4℃过夜孵育、PBS冲洗、含辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000)室温孵育40 min、DAB试剂盒染显色。然后干燥并固定样本,采用半定量分析方法,每个切片随机选取5个视野,显微镜观察计数阳性细胞,以染

色强度结合阳性细胞数百分比进行评分,以分数的均值反应 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 表达水平。

**1.2.6 尼氏染色法检测各组大鼠海马组织神经元存活情况** 取上述“1.2.4”中各取大鼠剩余右海马组织,同样置于4%多聚甲醛中固定24 h后,梯度乙醇脱水并包埋于石蜡中,海马组织石蜡包埋切片厚度为5 mm。然后脱蜡至水,蒸馏水冲洗后,尼氏染色液染色10 min,蒸馏水再次冲洗后,使用70%乙醇冲洗,接着使用95%乙醇使脑组织分化直到尼氏体着深蓝色,其中背景为浅蓝色或无色,室温晾干后,中性树脂胶封固,于光学显微镜下观察到神经元胞质中含有的蓝色颗粒即为阳性尼氏体,使用HPIAS-1000分析每单位视野中尼氏染色的阳性细胞光密度。光密度越大表明其神经元存活越多。

**1.2.7 蛋白质印迹法(Western blotting)检测大鼠海马组织 FAK 蛋白表达和 ERK1/2 磷酸化水平** 取上述1.2.4存放于-80℃超低温冰箱中的各组大鼠海马组织,使用蛋白提取试剂盒提取各组海马组织的总蛋白。使用BAC蛋白定量试剂盒对蛋白进行定量,然后进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、转膜、抗体封闭、1:2 000浓度稀释后的p-ERK1/2、FAK和ERK1/2鼠抗4℃过夜孵育、含辣根过氧化物酶缀合的二抗(1:5 000)中室温孵育2 h,用ECL显色试剂盒显色,凝胶成像仪拍照,分析灰度值,以GAPDH为参照,每组设置3个重复。

**1.3 统计学方法** 使用软件SPSS 24.0对实验数据进行统计分析,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两间比较行SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 UTI对各组大鼠脑水肿程度的影响** 假手术组、模型组、UTI组、抑制剂组、UTI+抑制剂组大鼠脑组织含水率分别为(72.65±6.11)%、(84.51±7.42)%、(71.43±6.11)%、(92.83±7.56)%、(84.16±6.76)% ,组间(每组10只大鼠)比较 $F=17.39$ 、 $P < 0.001$ 。其中,与假手术组相比,模型组大鼠脑组织含水率升高( $P$

$< 0.05$ )。与模型组相比,UTI组大鼠脑组织含水率降低( $P < 0.05$ );抑制剂组大鼠脑组织含水率升高( $P < 0.05$ )。与UTI组相比,UTI+抑制剂组大鼠脑组织含水率升高( $P < 0.05$ )。与抑制剂组相比,UTI+抑制剂组大鼠脑组织含水率降低( $P < 0.05$ )。

**2.2 UTI对各组大鼠血清中炎症因子含量的影响** 与假手术组相比,模型组大鼠血清中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6含量升高( $P < 0.05$ )。与模型组相比,UTI组大鼠血清中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6含量降低( $P < 0.05$ );抑制剂组大鼠血清中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6含量升高( $P < 0.05$ )。与UTI组相比,UTI+抑制剂组大鼠血清中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6含量升高( $P < 0.05$ )。与抑制剂组相比,UTI+抑制剂组大鼠血清中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6含量降低( $P < 0.05$ )。见表1。

**2.3 UTI对各组大鼠海马组织神经元凋亡的影响** 假手术组、模型组、UTI组、抑制剂组、UTI+抑制剂组大鼠海马组织神经元凋亡指数分别为(12.33±0.98)%、(44.51±3.77)%、(15.34±0.76)%、(51.99±5.65)%、(43.22±4.07)% ,组间(每组10只大鼠)比较 $F=259.88$ 、 $P < 0.001$ 。其中,与假手术组相比,模型组大鼠海马组织中神经元凋亡指数升高( $P < 0.05$ )。与模型组相比,UTI组大鼠海马组织中神经元凋亡指数降低( $P < 0.05$ );抑制剂组大鼠海马组织中神经元凋亡指数升高( $P < 0.05$ )。与UTI组相比,UTI+抑制剂组大鼠海马组织中神经元凋亡指数升高( $P < 0.05$ )。与抑制剂组相比,UTI+抑制剂组大鼠海马组织中神经元凋亡指数降低( $P < 0.05$ )。见图1。

**2.4 UTI对各组大鼠 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 表达的影响** 与假手术组相比,模型组大鼠海马组织中Bcl-2表达水平降低,Bax和caspase-3表达水平升高( $P < 0.05$ )。与模型组相比,UTI组大鼠海马组织中Bcl-2表达水平升高,Bax和caspase-3表达水平降低( $P < 0.05$ )。与UTI组相比,UTI+抑制剂组大鼠海马组织中Bcl-2表达水平降低,Bax和caspase-3表达水平升高( $P < 0.05$ )。与抑制剂组相比,UTI+抑制剂组大鼠海马组织中Bcl-2表达水平升高,Bax和cas-

表1 各组大鼠血清中炎症因子含量比较/(ng/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IL-6
假手术组	20	112.60±9.67	121.63±9.67	32.32±4.14
模型组	20	204.71±18.48 <sup>①</sup>	203.05±19.14 <sup>①</sup>	55.68±5.64 <sup>①</sup>
UTI组	20	119.76±10.72 <sup>②</sup>	119.38±10.29 <sup>②</sup>	30.33±3.99 <sup>②</sup>
抑制剂组	20	278.37±20.60 <sup>②</sup>	259.49±19.99 <sup>②</sup>	76.94±7.82 <sup>②</sup>
UTI+抑制剂组	20	201.31±19.87 <sup>②③④</sup>	198.74±18.78 <sup>②③④</sup>	53.25±5.87 <sup>②③④</sup>
<i>F</i> 值		172.16	135.45	114.32
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:①与假手术组相比, $P < 0.05$ 。②与模型组相比, $P < 0.05$ 。③与UTI组相比, $P < 0.05$ 。④与抑制剂组相比, $P < 0.05$ 。

pase-3 表达水平降低( $P<0.05$ )。见图 2 和表 2。

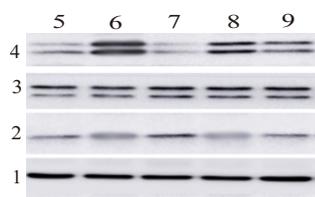
表 2 各组大鼠 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 免疫组化评分比较/ (分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	Bcl-2	Bax	caspase-3
假手术组	10	2.11±0.58	2.07±0.58	2.25±0.35
模型组	10	1.23±0.21 <sup>①</sup>	3.05±0.41 <sup>①</sup>	3.27±0.46 <sup>①</sup>
UTI 组	10	2.67±0.27 <sup>②</sup>	2.03±0.15 <sup>②</sup>	2.27±0.61 <sup>②</sup>
抑制剂组	10	0.73±0.06 <sup>②</sup>	3.73±0.37 <sup>②</sup>	3.99±0.26 <sup>②</sup>
UTI+抑制剂组	10	1.27±0.12 <sup>②③④</sup>	2.98±0.35 <sup>②③④</sup>	3.26±0.31 <sup>②③④</sup>
F 值		63.84	33.09	31.84
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:①与假手术组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。③与 UTI 组相比, $P<0.05$ 。④与抑制剂组相比, $P<0.05$ 。

**2.5 UTI 对各组大鼠海马组织神经元存活情况的影响** 假手术组、模型组、UTI 组、抑制剂组、UTI+抑制剂组大鼠海马组织尼氏染色阳性细胞光密度值分别为(24 543.15±2 658.39)、(13 897.16±1 392.76)、(21 546.89±2 239.58)、(10 540.65±1 124.06)、(12 876.55±1 295.29),组间(每组 10 只大鼠)比较  $F=107.15, P<0.001$ 。其中,与假手术组相比,模型组大鼠海马组织中神经元存活数目降低( $P<0.05$ )。与模型组相比,UTI 组大鼠海马组织中神经元存活数目升高( $P<0.05$ );抑制剂组大鼠海马组织中神经元存活数目降低( $P<0.05$ )。与 UTI 组相比,UTI+抑制剂组大鼠海马组织中神经元存活数目降低( $P<0.05$ )。与抑制剂组相比,UTI+抑制剂组大鼠海马组织中神经元存活数目升高( $P<0.05$ )。见图 3。

**2.6 UTI 对各组大鼠海马组织 FAK 蛋白表达和 ERK1/2 磷酸化水平的影响** 与假手术组相比,模型组大鼠海马组织中 FAK 蛋白表达水平降低,ERK1/2 磷酸化水平升高( $P<0.05$ )。与模型组相比,UTI 组大鼠海马组织中 FAK 蛋白表达水平升高,ERK1/2 磷酸化水平降低( $P<0.05$ )。与 UTI 组相比,UTI+抑制剂组大鼠海马组织中 FAK 蛋白表达水平降低,ERK1/2 磷酸化水平升高( $P<0.05$ )。与抑制剂组相比,UTI+抑制剂组大鼠海马组织中 FAK 蛋白表达水平升高,ERK1/2 磷酸化水平降低( $P<0.05$ )。见图 4 和表 3。



注:1—GAPDH;2—FAK;3—ERK1/2;4—p-ERK1/2;5—假手术组;6—模型组;7—UTI 组;8—抑制剂组;9—UTI+抑制剂组。

图 4 各组大鼠海马组织 FAK 和 ERK1/2 蛋白 Western blotting 图

表 3 各组大鼠海马组织 FAK 蛋白水平和 ERK1/2 磷酸化水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	FAK/GAPDH	p-ERK1/ERK1	p-ERK2/ERK2
假手术组	10	0.56±0.06	0.16±0.03	0.11±0.05
模型组	10	0.29±0.07 <sup>①</sup>	0.58±0.13 <sup>①</sup>	0.53±0.10 <sup>①</sup>
UTI 组	10	0.58±0.09 <sup>②</sup>	0.18±0.04 <sup>②</sup>	0.13±0.07 <sup>②</sup>
抑制剂组	10	0.12±0.02 <sup>②</sup>	0.96±0.22 <sup>②</sup>	0.93±0.08 <sup>②</sup>
UTI+抑制剂组	10	0.28±0.03 <sup>②③④</sup>	0.54±0.12 <sup>②③④</sup>	0.55±0.09 <sup>②③④</sup>
F 值		109.72	66.35	182.13
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:①与假手术组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。③与 UTI 组相比, $P<0.05$ 。④与抑制剂组相比, $P<0.05$ 。

### 3 讨论

ICH 具有高发病率和死亡率,其发生伴随着脑周围血液循环中断以及神经细胞的氧供应受损,进而导致脑缺氧,对患者的生命安全造成严重威胁<sup>[9]</sup>。本研究以 VII 型胶原酶注射法制备 ICH 大鼠模型,结果发现模型大鼠出现同侧 Horner 征,表明模型建造成功。

UTI 是一种具有蛋白酶抑制剂作用的糖蛋白,不但能通过抑制炎症反应和淋巴细胞凋亡达到抗炎效果,而且还对组织器官和内皮细胞具有保护作用。Guo 等<sup>[10]</sup>研究发现 UTI 可通过减少炎症细胞因子表达来抑制大鼠神经元凋亡, Ji 等<sup>[11]</sup>研究发现 UTI 可保护下丘脑神经元免受热应激诱导的凋亡,而在中枢神经系统疾病中,持续的氧化应激可引起神经元细胞的炎症和凋亡<sup>[12]</sup>。UTI 还可通过激活自噬加强细胞增殖、减少形态学损伤,降低细胞凋亡率,以缓解肝脏缺血再灌注引起的肝损伤<sup>[13]</sup>。另外,UTI 可通过抑制大鼠短暂性脑缺血后的过度自噬和细胞凋亡,进而发挥神经保护作用<sup>[14]</sup>。本研究发现,UTI 可降低 ICH 大鼠模型脑组织含水率及血清中炎症因子含量,提高 Bcl-2 表达和神经元存活数目,降低 Bax 和 caspase-3 表达,抑制神经元凋亡。UTI 可通过抑制炎症反应、氧化应激、神经元凋亡、神经自噬和改善血脑屏障通透性来减轻脑缺血再灌注引起的损伤<sup>[15]</sup>,但其对于抑制 ICH 所致神经元凋亡作用机制目前还未完全阐明。

FAK 信号通路参与黏着斑形成,黏着斑形成可使细胞黏附性增强,阻止细胞凋亡。Sun 等<sup>[16]</sup>研究表明 FAK-ERK 信号可能参与蛛网膜下腔出血后早期脑损伤引起的骨桥蛋白自噬,骨桥蛋白增强自噬可减少细胞凋亡,减轻蛛网膜下腔出血后导致的早期脑损伤。脑损伤是人类脑血管病中最常见的颅内损伤,白藜芦醇可通过下调 ERK 信号通路降低缺血再灌注诱导的神经元凋亡<sup>[17]</sup>。抑制 ERK 信号通路可减少血流量增加,明显改善蛛网膜下腔出血诱

导的细胞凋亡<sup>[18-19]</sup>。另外,抑制ERK磷酸化,可使局部脑充血的增加减弱,局部脑充血减弱可进一步减轻脑损伤<sup>[20]</sup>,Topkuru等<sup>[21]</sup>研究发现重组骨桥蛋白可通过FAK抑制蛛网膜下出血大鼠神经细胞的死亡和脑水肿,改善神经系统状态。本研究结果显示,与假手术组比较,ICH大鼠海马组织中FAK蛋白表达水平降低,ERK1/2磷酸化水平升高。给予UTI处理后,模型大鼠脑组织含水率、神经元凋亡指数以及促凋亡因子Bax、caspase-3表达和ERK1/2磷酸化水平降低,神经元存活数目、抑凋亡因子Bcl-2表达和FAK蛋白表达升高,表明UTI可直接通过提高FAK蛋白表达,下调ERK信号通路,减少神经元凋亡。ICH大鼠经UTI和FAK抑制剂PF562271联合处理后,其脑组织含水率、神经元凋亡指数以及促凋亡因子Bax、caspase-3表达和ERK1/2磷酸化水平比UTI单独处理升高,比抑制剂单独处理降低;神经元存活数目、抑凋亡因子Bcl-2表达和FAK蛋白表达比UTI单独处理降低,比抑制剂单独处理升高;表明UTI对ICH模型大鼠神经元凋亡的抑制作用可被FAK抑制剂PF562271逆转,减弱UTI对神经元凋亡的保护效果,进一步揭示UTI可能通过提高FAK蛋白表达,抑制ERK磷酸化,减少ICH模型大鼠的神经元凋亡。

综上所述,UTI可能通过提高FAK蛋白表达,降低ERK1/2磷酸化水平,抑制ERK信号通路,从而减轻ICH大鼠炎症程度,减少神经元凋亡。但UTI对于治疗ICH的作用机制十分复杂,需后续深入研究。

(本文图1~3见插图11-2)

### 参考文献

- [1] 韩山山. 脑出血后血脑屏障通透性增高相关机制的研究进展[J]. 癫痫与神经电生理学杂志, 2019, 28(3): 177-180, 192.
- [2] JIANG XM, HU JH, WANG LL, et al. Ulinastatin alleviates neurological deficiencies evoked by transient cerebral ischemia via improving autophagy, Nrf-2-ARE and apoptosis signals in hippocampus[J]. *Physiol Res*, 2018, 67(4): 637-646.
- [3] MA C, HAN DF, JIN H, et al. A combination of ulinastatin and xuebijing amplifies neuroprotection after transient cerebral ischemia via attenuating apoptosis signal pathways in hippocampus[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(44): 5342-5347.
- [4] 郭远波, 王研, 张登文, 等. 乌司他丁对异氟烷诱导的大鼠海马神经元凋亡的影响[J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(7): 850-854.
- [5] GAO YY, ZHANG ZH, ZHUANG Z, et al. Recombinant milk fat globule-EGF factor-8 reduces apoptosis via integrin  $\beta$ 3/FAK/PI3K/AKT signaling pathway in rats after traumatic brain injury[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 845-855.
- [6] CHE H, LV YF, LIU YG, et al. Effect of ulinastatin on myocardial ischemia reperfusion injury through ERK signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(10): 4458-4464.
- [7] 刘志明, 黄山, 常柄权, 等. 藏荆芥提取物对脑出血大鼠AQP-4及NGF表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 150-154.
- [8] 刘猛, 练学淦, 叶丹, 等. 乌司他丁对脑出血大鼠的治疗作用[J]. 江苏医药, 2017, 43(10): 677-680, 封2.
- [9] HUAN S, JIN J, SHI CX, et al. Overexpression of miR-146a inhibits the apoptosis of hippocampal neurons of rats with cerebral hemorrhage by regulating autophagy[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2020, 39(9): 1178-1189.
- [10] GUO M, ZHU X, XU H, et al. Ulinastatin attenuates isoflurane-induced cognitive dysfunction in aged rats by inhibiting neuroinflammation and  $\beta$ -amyloid peptide expression in the brain[J]. *Neurol Res*, 2019, 41(10): 923-929.
- [11] JI JJ, HONG XX, SU L, et al. Proteomic identification of hippocalcin and its protective role in heatstroke-induced hypothalamic injury in mice[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 3775-3789.
- [12] DUAN XC, WANG W, FENG DX, et al. Roles of autophagy and endoplasmic reticulum stress in intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury in rats[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2017, 23(7): 554-566.
- [13] ZHAO YM, CAI HB, ZHOU PM, et al. Protective effect of ulinastatin on hepatic ischemia reperfusion injury through autophagy activation in Chang liver cells[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14960-14970.
- [14] SUN DW, WANG WY, WANG XT, et al. bFGF plays a neuroprotective role by suppressing excessive autophagy and apoptosis after transient global cerebral ischemia in rats[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 172.
- [15] LV B, JIANG XM, WANG DW, et al. Protective effects and mechanisms of action of ulinastatin against cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(27): 3332-3340.
- [16] SUN C, ENKHJARGAL B, REIS C, et al. Osteopontin-enhanced autophagy attenuates early brain injury via FAK-ERK pathway and improves long-term outcome after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Cells*, 2019, 8(9): 980-990.
- [17] ZHAO R, ZHAO K, SU H, et al. Resveratrol ameliorates brain injury via the TGF- $\beta$ -mediated ERK signaling pathway in a rat model of cerebral hemorrhage[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(5): 3397-3404.
- [18] MÜLLER AH, EDWARDS AVG, LARSEN MR, et al. Proteomic expression changes in large cerebral arteries after experimental subarachnoid hemorrhage in rat are regulated by the MEK-ERK1/2 pathway[J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 62(3): 380-394.
- [19] MA L, JIANG Y, DONG Y, et al. Anti-TNF- $\alpha$  antibody attenuates subarachnoid hemorrhage-induced apoptosis in the hypothalamus by inhibiting the activation of ERK[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2018, 14(10): 525-536.
- [20] KURAUCHI Y, KINOSHITA R, MORI A, et al. MEK/ERK and calcineurin/NFAT-mediated mechanism of cerebral hyperemia and brain injury following NMDA receptor activation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 488(2): 329-334.
- [21] TOPKORU BC, ALTAY O, DURIS K, et al. Nasal administration of recombinant osteopontin attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. *Stroke*, 2013, 44(11): 3189-3194.

(收稿日期: 2020-10-20, 修回日期: 2020-12-09)