

# Maresin 2对小鼠蛛网膜下腔出血早期的神经保护作用研究

李晨溪<sup>1,2a</sup>, 刘一涓<sup>2a</sup>, 王华飞<sup>2a</sup>, 王莉<sup>2a</sup>, 余列<sup>2b</sup>, 臧卫东<sup>1</sup>

**摘要** 目的:探讨Maresin 2(Mar2)注射对蛛网膜下腔出血(SAH)小鼠早期的神经保护作用及机制。方法:将134只雄性C57BL/6小鼠按照随机数字表法分为Sham组(12只)、Vehicle组(22只)、Mar2组(57只)、牛磺熊去氧胆酸钠(Tau)组(29只)和Tau+Mar2组(14只),其中Mar2组又分为低(Low; 2 μg/kg/d; 14只)、中(Middle; 10 μg/kg/d; 29只)、高(High; 50 μg/kg/d; 14只)剂量3个亚组。采用改良血管内穿刺法制备SAH模型,在SAH造模后6 h腹腔注射Mar2; Tau组,按照0.5 g/kg/d的剂量腹腔注射Tau,连续注射3 d; Tau+Mar2组,腹腔注射Tau后2 h,再腹腔注射中剂量的Mar2。完成注射后对各组小鼠进行神经功能评分、脑出血评分和脑组织含水量测定, FJB染色评估神经元变性数量,免疫荧光染色观察星形胶质细胞和小胶质细胞的数量变化, Western blotting检测神经元中内质网应激蛋白C/EBP同源蛋白(CHOP)和caspase-3的表达,荧光实时定量PCR(qPCR)检测脑组织白细胞介素-1β(IL-1β)、IL-6炎症因子的变化。体外培养Neuro2a神经元,根据实验采用血红素(Hem)或Tau(CHOP特异性抑制剂)进行干预,并分为对照组、Hem组、Hem+Tau组、Hem+Tau+Mar2组。Western blotting检测各组神经元表达CHOP和caspase-3水平;酶联免疫法检测活性氧(ROS)的水平。结果:Mar2注射显著改善神经功能缺损、减轻脑水肿,抑制神经元凋亡,中剂量(10 μg/kg/d)即可达到最佳治疗效果。Western blotting结果显示Mar2可以抑制皮质CHOP和caspase-3的表达;免疫荧光染色结果显示,Mar2可以抑制星形胶质细胞和小胶质细胞的活化增多;qPCR检测结果显示,Mar2注射可显著减少炎症因子IL-1β、IL-6的表达。体外实验显示,血红素可诱导神经元中CHOP和caspase-3的显著上调和ROS的合成增多;Mar2处理可以显著抑制神经元CHOP和caspase-3的表达。高剂量Tau处理可以显著抑制神经元中CHOP和caspase-3的表达,Tau+Mar2处理不能进一步降低CHOP和caspase-3的表达。结论:Mar2注射能抑制SAH小鼠神经元的凋亡、减轻脑水肿并改善神经功能缺损,具体机制可能与Mar2抑制神经元CHOP的活化,下调caspase-3的表达并减轻神经炎症有关。

**关键词** 蛛网膜下腔出血;神经保护;Maresin2;C/EBP同源蛋白

中图分类号 R741;R741.02;R743.34 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssngcj.20240137

本文引用格式:李晨溪,刘一涓,王华飞,王莉,余列,臧卫东. Maresin 2对小鼠蛛网膜下腔出血早期的神经保护作用研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2024, 19(6): 311-316.

## Research on the Neuroprotective Effects of Maresin 2 in the Early Stage of Subarachnoid Hemorrhage in Mice

LI Chenxi<sup>1,2a</sup>, LIU Yijuan<sup>2a</sup>, WANG Huafei<sup>2a</sup>, WANG Li<sup>2a</sup>, YU Lie<sup>2b</sup>, ZANG Weidong<sup>1</sup>. 1. Department of Human Anatomy, School of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2a. Biobank, b. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

**Abstract Objective:** To investigate the neuroprotective effects and mechanisms of Maresin 2 (Mar2) in the early stage of subarachnoid hemorrhage (SAH) in mice. **Methods:** A total of 134 male C57BL/6 mice were randomly divided into Sham group (12 mice), Vehicle group (22 mice), Mar2 group (57 mice), Tau group (29 mice), and Tau+Mar2 group (14 mice), with the Mar2 group further divided into low (2 μg/kg/d; 14 mice), middle (10 μg/kg/d; 29 mice), and high (50 μg/kg/d; 14 mice) dose subgroups. The SAH model was prepared using a modified intravascular perforation method, and Mar2 was injected intraperitoneally 6 hours after SAH modeling; the Tau group received an intraperitoneal injection of Tau at a dose of 0.5 g/kg/d for 3 consecutive days; the Tau+Mar2 group received an intraperitoneal injection of Tau followed by a middle dose of Mar2 2 hours later. After the injections, neurological function scores, cerebral hemorrhage scores, and brain tissue water content were measured for each group of mice. FJB staining was used to assess the number of degenerating neurons, immunofluorescence staining was used to observe changes in the number of astrocytes and microglia, Western blotting was used to detect the expression of endoplasmic reticulum stress protein C/EBP homologous protein (CHOP) and caspase-3 in neurons, and quantitative PCR (qPCR) was used to detect changes in the inflammatory cytokines interleukin-1β (IL-1β) and IL-6 in brain tissue. In vitro cultured Neuro2a neurons were treated with heme or taurine sodium cholate (Tau, CHOP-specific inhibitor), and divided into control group, Hem group, Hem+Tau group, and Hem+Tau+Mar2 group. Western blotting was used to detect the levels of CHOP and caspase-3 expression in neurons; enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure ROS levels. **Results:**

### 作者单位

1. 郑州大学基础医学院人体解剖学系  
郑州 450001

2. 郑州大学第一附属医院 a. 生物样本库, b. 神经内科  
郑州 450001

### 基金项目

河南省科技攻关项目(Prdx1的新功能—调控脑梗死后SVZ区神经发生效率及其YTHDC1依赖机制, No. 202102310076; CES2C介导p53烷基化抑制脑梗死小鼠少突胶质前体细胞衰老促进髓鞘再生的分子机制研究, No. 242102311133)

### 收稿日期

2024-02-29

### 通讯作者

臧卫东

zwd@zzu.edu.cn

Mar2 injection significantly improved neurological deficits, reduced brain edema, inhibited neuronal apoptosis, and a middle dose (10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ) achieved the best therapeutic effect. Western blotting results showed that Mar2 could inhibit the expression of CHOP and caspase-3 in the cortex; immunofluorescence staining results showed that Mar2 could inhibit the activation and increase of astrocytes and microglia; qPCR detection results showed that Mar2 injection could significantly reduce the expression of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6. In vitro experiments showed that heme could induce significant upregulation of CHOP and caspase-3 in neurons and increase the synthesis of ROS; Mar2 treatment could significantly inhibit the expression of CHOP and caspase-3 in neurons. High-dose Tau treatment could significantly inhibit the expression of CHOP and caspase-3 in neurons, and Tau+Mar2 treatment could not further reduce the expression of CHOP and caspase-3. **Conclusion:** Mar2 injection can inhibit neuronal apoptosis in SAH mice, reduce brain edema, and improve neurological deficits. The specific mechanism may be related to Mar2 inhibiting the activation of neuronal CHOP, downregulating the expression of caspase-3, and reducing neuroinflammation.

**Keywords** subarachnoid hemorrhage; neuroprotection; Maresin 2; C/EBP-homologous protein

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)起病急,死亡率和致残率高<sup>[1]</sup>。动脉瘤破裂是导致SAH的主要原因之一,动脉瘤破裂触发的内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)和神经炎症是导致神经元变性死亡的关键因素<sup>[1,2]</sup>。当ERS失代偿时,细胞会上调ERS的重要标记物-C/EBP同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP)的表达及活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成,进而激活半胱天冬氨酸酶-3(caspase-3)导致细胞凋亡。同时,血液中某些化学物质也可激活星形胶质细胞和小胶质细胞,引起炎症因子的释放,加重神经元的死亡<sup>[1,2]</sup>。因此,抑制内质网应激和神经炎症有助于减轻SAH所致的神经损伤。

Maresins是一类促炎症消退因子,在维持内环境稳定与促进组织修复等方面至关重要<sup>[3,4]</sup>。Mar 2是新近发现的一个Maresins亚型,研究显示Mar 2可以拮抗炎症因子介导的肠道黏膜损伤<sup>[5]</sup>。但Mar 2在中枢神经系统中的作用尚不明确。本研究旨在观察Mar2注射对SAH小鼠行为学、神经元变性死亡及CHOP、caspase-3表达的影响,探究Mar2在SAH中的潜在作用与机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与材料

1.1.1 实验动物 SPF级成年雄性C57BL/6小鼠,2~3月龄,体质量20~25 g,购自河南省实验动物中心,合格证号:4110062411000013718;许可证号:SCXK(豫)2022-0001。本研究获郑州大学第一附属医院伦理委员会批准(2023AE01011)。

1.1.2 主要材料、试剂与仪器 Maresin 2(HY-119684)、Tauroursodeoxycholate(HY-19696)购自美国MCE公司;荧光染料FJB(TR-150-FJB)购自艾美捷公司;活性

氧检测试剂盒(S0033S)、兔抗Caspase-3(DF6879)抗体购自affinity公司;兔抗Iba-1(ab178846)、鸡抗GFAP(ab4674)、山羊抗兔IgG H&L-FITC(ab6717)、山羊抗鸡IgY H&L-Alexa Fluor<sup>®</sup>594(ab150176)均购自美国Abcam公司;小鼠抗 $\beta$ -Tubulin(sc-80011)购自美国Santacruz公司,绵羊抗 $\beta$ -actin(AF4000)购自美国Novus Biologicals公司;兔源性抗CHOP(15204-1-AP)购买自武汉三鹰生物技术有限公司;Neuro2a细胞系(CL-0168)购自武汉普诺赛有限公司;青霉素/链霉素(P1400)购买自索莱宝公司;全自动石蜡包埋机Leica EG1150型、切片机Leica CM1950型购自LEICA公司;Olympus BX53型光学显微镜购自Olympus公司。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组、模型制备及用药 134只小鼠按照随机数字表法分为Sham组(12只)、Vehicle组(22只)、Mar2组(57只)、牛磺熊去氧胆酸钠(Tau)组(29只)和Tau+Mar2组(14只),其中Mar2组又分为低(Low; 2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ; 14只)、中(Middle; 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ; 29只)、高(High; 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ; 14只)剂量3个亚组;均连续注射3 d<sup>[6]</sup>。3%异氟烷诱导小鼠麻醉,并使用1%的浓度维持。备皮后行纵形切口,分离右侧颈总、颈外和颈内动脉,剪开颈外动脉,插入线栓,并由颈总、颈内动脉缓慢前行。当感觉到有阻力时,再前进3 mm左右,将大脑前和大脑中动脉分叉处刺破,随即抽出线栓,快速结扎颈外动脉,并行皮肤缝合。假手术操作时,当线栓进入10 mm左右并遭遇阻力时立刻退出。整个手术期间,利用电热毯维持体温37 $^{\circ}\text{C}$ 。Mar2各亚组,在SAH造模后6 h腹腔注射Mar2; Tau组,按照0.5 g/kg/d的剂量腹腔注射Tau,连续注射3 d<sup>[11]</sup>; Tau+Mar2组,腹腔注射Tau后2 h,再腹腔注射中剂量的Mar2。

1.2.2 出血严重性评分 根据Sugawara等<sup>[7]</sup>报道的方法进行评估。将脑底Willis环分成6个区域,每个区域

最高得分为3分(0分,无血凝块;1分,微量血凝块;2分,中等量血凝块;3分,大量血凝块),总分18分。

1.2.3 脑水肿评估 各组取4只小鼠断头取脑,称取左右大脑半球和小脑的重量。然后将脑标本置于110℃的烤箱中烘干72 h再次称重。脑含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 $\times$ 100%<sup>[8]</sup>。

1.2.4 行为学评分 根据改良版本加西亚(Garcia)评分量表进行评估<sup>[9]</sup>。该量表由自发运动、前肢运动对称性、前肢伸展、攀岩、躯干本体感觉和胡须触觉实验构成;每项3分,总分为18分;分值越高,神经功能损害越轻。

1.2.5 免疫荧光染色 在造模后3 d,麻醉各组小鼠,开胸暴露心脏,依次用生理盐、4%多聚甲醛冲洗、灌注,取脑后多聚甲醛固定过夜,石蜡包埋后上机,-20℃切片备用,厚度为3  $\mu$ m。常规脱蜡、抗原修复、3%去除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>内源性酶、10%驴血清封闭、0.2% Triton 打孔,孵育Iba-1抗体(1:500)、GFAP(1:500) 4℃孵育过夜。清洗完毕后,在Iba-1和GFAP孵育的脑片中分别加入FITC(绿色)和Alexa Fluor 594(红色)标记的二抗,孵育2 h,洗片后滴加DAPI封片,风干后观察拍照。

1.2.6 FJB染色 FJB可以特异性的结合神经细胞中的DNA碎片,产生强烈的荧光信号,标记变性死亡的神经元。取出冻存的各组脑片进行脱蜡,0.1%冰醋酸并按1:100配制FJB工作液,将其滴加到脱蜡的脑片上室温孵育20 min,纯水冲洗后DAPI染核、封片、晾干。

1.2.7 Neuro2a神经元细胞培养 使用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养,待神经元铺满大于90%时进行传代。对照组不加入任何药物;Hemin组加入1  $\mu$ mol Hemin(100  $\mu$ mol/L)<sup>[10]</sup>;Tau组加入1  $\mu$ mol Hemin后再加入用PBS溶解的6 mM Tau(高浓度)<sup>[11]</sup>;Mar 2组加入1  $\mu$ mol Hemin后再加入200 nM Mar 2;Tau+Mar2组,加入1  $\mu$ mol Hemin和6 mM Tau后2 h,再加入200 nM Mar 2。

1.2.8 蛋白质免疫印迹实验 取脑后采用强裂解液收集小鼠大脑皮质组织蛋白,BCA法测定蛋白浓度后分装冻存。凝胶电泳,上样(30  $\mu$ g/孔)后给予120 V电泳40 min,利用湿转仪将蛋白转移至PVDF膜上,孵育抗caspase-3(1:1000)、CHOP(1:1000)、 $\beta$ -actin抗体(1:4000)或 $\beta$ -Tubulin抗体(1:5000),4℃孵育过夜。次日TBST洗涤3 $\times$ 5 min,对应二抗室温孵育1 h,1 $\times$ TBST洗涤3 $\times$ 5 min后化学发光,曝光,采用Imag J计算靶蛋白与内参的灰度值比率进行统计。

1.2.9 荧光实时定量PCR(quantitative real-time PCR,

qPCR) 根据试剂盒说明进行。首先将cDNA稀释20倍后进行PCR扩增反应,反应体系为:5  $\mu$ L SYB酶,上、下游引物各0.4  $\mu$ L,灭菌水6.4 pL,cDNA 2  $\mu$ L;反应程序为:95℃预变性5 min;95℃变性15 s,60℃退火34 s,重复40个循环。引物序列为:IL-6上游5'-CCCCAATTTCCAATGCTCTCC-3',下游5'-CGCACTAGGT TTGCCGAGTA-3';IL-1 $\beta$ 上游5'-AAATGCCACCTTTT GACAGTGA-3',下游5'-AAAGAAGGTGCTCATGTC CTCATCC-3';GAPDH上游5'-CCTCGTCCCCTAGAC AAAATG-3',下游:5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTC GT-3'。目的基因(IL-6、IL-1 $\beta$ )和内参基因(GAPDH)的拷贝数分别根据反应产生的Ct值从各自的标准曲线中获得,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算IL-6、IL-1 $\beta$ 的相对表达量。

1.2.10 ROS水平检测 首先按照1:1000的稀释比例用无血清的DMEM稀释DCFH-DA探针,使终浓度为10  $\mu$ mol/L。吸弃96孔板细胞培养液,每孔加入总体积为100  $\mu$ L DCFH-DA稀释液;然后将培养板置于标准细胞培养箱中孵育20 min;完成后使用无血清的DMEM洗涤3次;置于荧光分光光度计检测,检测波段488 nm,重复3次。

### 1.3 统计学处理

使用SPSS 22.0进行统计学分析。符合正态分布以及方差齐性的计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间均数比较采用单因素方差分析,两两之间的比较采用Tukey检验;计数资料以率表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Mar2注射对SAH小鼠死亡率的影响

造模3 d后,各组小鼠死亡率如下:Sham组为0,Vehicle组为24.14%(7/29),Mar2-Low亚组为17.65%(3/17),Mar2-Middle亚组为12.12%(4/33),Mar2-High亚组为12.50%(2/16);Tau组为14.70%(5/34);Tau+Mar2组为12.50%(2/16)。Vehicle组与各药物干预组小鼠死亡率的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 2.2 Mar2注射减轻SAH小鼠神经功能缺损症状和脑组织水肿

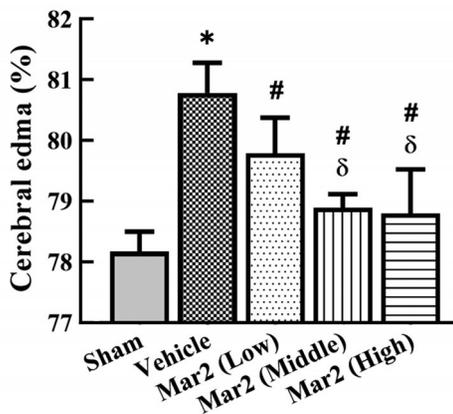
造模3 d后,Sham组小鼠脑底无出血。Vehicle组与Mar2-Low、Middle、High各亚组脑出血评分差异无统计学意义( $F=0.30, P>0.05$ )。加西亚评分结果显示,Vehicle组神经功能得分较Sham组明显降低( $P<0.05$ ),Mar2-Middle、High亚组的加西亚评分明显高于

Vehicle组( $P<0.05$ )。脑组织含水量检测结果显示, Vehicle组脑组织含水量较Sham组显著增加,但Mar2-Low、Middle、High 3亚组脑组织含水量均较Vehicle组明显减少( $P<0.05$ )。Mar2-Middle和High亚组脑组织含水量的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表1、图1。

表1 各组小鼠造模3 d后脑出血评分、加西亚评分比较(分,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	只数	脑出血评分	加西亚评分
Sham	6	0	18
Vehicle	6	12.83±1.72	6.17±1.17 <sup>①</sup>
Mar2-Low	6	12.33±3.01	8.00±1.79 <sup>①</sup>
Mar2-Middle	6	11.83±2.32	11.50±3.56 <sup>①②③</sup>
Mar2-High	6	11.67±2.16	12.17±3.31 <sup>①②③</sup>
F值		0.30	16.12
P值		0.82	<0.0001

注:与假手术组比较,<sup>①</sup> $P<0.05$ ;与SAH+Vehicle组比较,<sup>②</sup> $P<0.05$ ;与SAH+Mar2-Low亚组比较,<sup>③</sup> $P<0.05$ 。



注:与Sham组比较,\* $P<0.05$ ;与Vehicle组比较,# $P<0.05$ ;与Mar2-Low组比较,<sup>④</sup> $P<0.05$ ;n=6。

图1 各组小鼠造模3 d后脑组织含水量比较

### 2.3 Mar2注射抑制SAH后皮质神经元的变性死亡

造模3 d后, Vehicle组FJB阳性细胞较Sham组明显增多( $P<0.05$ ); Mar2各亚组的FJB阳性细胞数量均较Vehicle组明显减少( $P<0.05$ ), Mar2-Middle和Mar2-High亚组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结合加西亚评分和脑水肿的研究结果, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Middle)可被认为是腹腔注射Mar2治疗SAH的最佳剂量, 见图2。

### 2.4 Mar2注射抑制SAH小鼠皮质CHOP信号通路

免疫印迹结果显示, Vehicle组CHOP和caspase-3表达水平较Sham组显著增加( $P<0.05$ ); 与Vehicle组比较, Mar2-Middle亚组这2种蛋白的表达明显降低( $P<0.05$ ), 见图3。

### 2.5 Mar2抑制神经元CHOP信号通路

体外实验结果显示, 与Control组相比, Hem组

CHOP和caspase-3的表达显著增加( $P<0.05$ ), 同时介导更多的ROS生成( $P<0.05$ ); 与Hem组相比, Hem+Mar2组CHOP和caspase-3的表达显著降低( $P<0.05$ ), ROS的含量也同时显著减少( $P<0.05$ ), 见图4。

### 2.6 高剂量的Tau能显著减少神经元CHOP和caspase-3的表达

体外实验显示, 与Vehicle组相比, Tau组和Tau+Mar2组CHOP和caspase-3的表达均显著降低( $P<0.05$ )。但与Tau组相比, Tau+Mar2组CHOP和caspase-3的表达无进一步减少( $P>0.05$ ), 见图5。

### 2.7 腹腔注射Tau显著减少皮质FJB阳性细胞数量并促进神经功能改善

FJB染色和加西亚评分结果显示, 在造模3 d后, 与Vehicle组比较, 腹腔注射Tau显著减少皮质FJB阳性细胞数量, 并明显增加了神经功能得分( $P<0.05$ )。Tau+Mar2联合注射不能进一步减少变性死亡神经元, 同时也不能提高神经功能得分( $P>0.05$ ), 见图6。

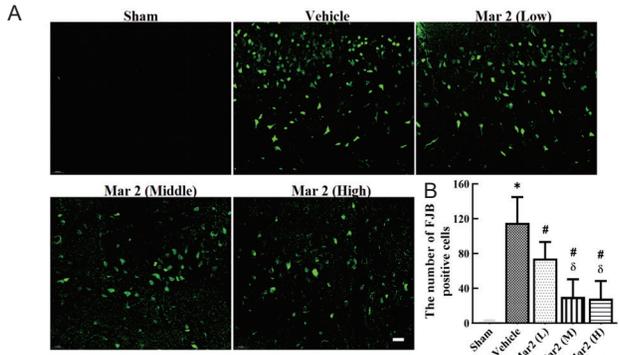
### 2.8 Mar2注射对SAH后神经炎症的影响

免疫荧光染色发现, 造模3 d后, Vehicle组星形胶质细胞以及小胶质细胞数目较Sham组明显增多( $P<0.05$ )。Mar2注射显著抑制了这2种细胞的活化增多( $P<0.05$ ); 同时, qPCR检测发现Mar2注射显著减少了IL-6、IL-1 $\beta$ 的表达( $P<0.05$ ), 见图7。

## 3 讨论

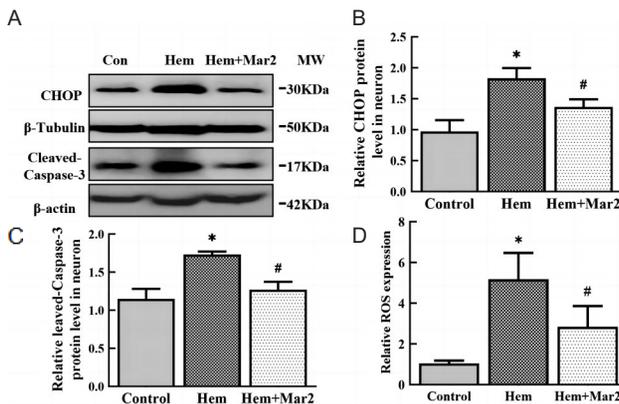
脑皮质大范围的神经元变性死亡是SAH致死、致残的重要因素, 减少神经元死亡是SAH治疗的重要措施<sup>[12]</sup>。本研究发现, 一种特殊的脂质中介物-Mar2, 通过调控CHOP-caspase-3通路显著抑制神经元的变性死亡并控制神经炎症, 为开发SAH新的治疗策略提供了理论基础。

SAH的多种病理因素会破坏内质网的稳态, 导致蛋白质错误折叠或未折叠, 进而触发内质网应激<sup>[2]</sup>。CHOP作为一种重要的转录因子, 是内质网应激事件的中心环节和特征蛋白<sup>[11,13,15]</sup>。CHOP被激活后可促进caspase-3等基因的表达, 最终导致神经元凋亡<sup>[2,13-15]</sup>。本研究体内实验发现, SAH小鼠皮质CHOP和caspase-3的表达显著增加, 提示SAH介导的神经元死亡可能通过CHOP/caspase-3通路。体外实验进一步发现, 血红素可以明显诱导神经元CHOP和caspase-3的表达增加, CHOP的特异性抑制Tau可显著抑制神经元中CHOP与caspase-3的表达, 说明CHOP可能是caspase-3的上游信号。结合既往的文献报道<sup>[2,15]</sup>和本研究的发现, 推



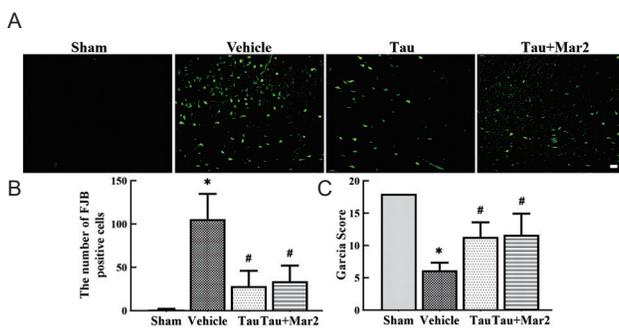
注：(A)FJB染色图，n=3，标尺=20 μm；(B)FJB染色定量结果，与Sham组比较，\*P<0.05；与Vehicle组比较，#P<0.05；与Mar2-Low亚组比较，<sup>§</sup>P<0.05。

图2 Mar2注射对SAH小鼠皮质神经元变性死亡的影响



注：(A)CHOP、caspase-3蛋白表达条带，n=3；(B-C)分别是CHOP和caspase-3的定量比较结果；(D)ROS的相对表达量，n=4；与Control组比较，\*P<0.05；与Hem组比较，#P<0.05。

图4 Mar2对神经元表达CHOP、caspase-3的影响

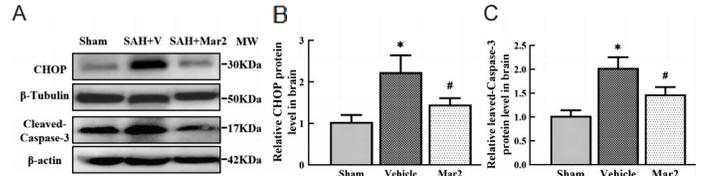


注：(A)FJB染色图，标尺=20 μm，n=3；(B)FJB染色定量结果；(C)加亚西评分定量结果，与Sham组比较，\*P<0.05；与Vehicle组比较，#P<0.05。

图6 Tau以及Tau+Mar2注射对SAH小鼠神经元死亡和神经功能的影响

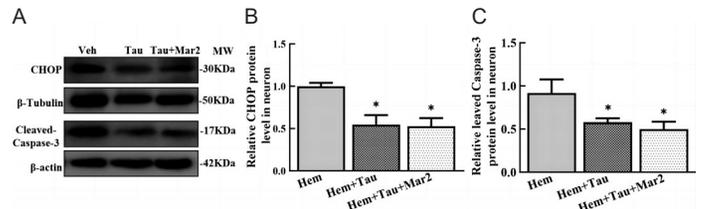
测SAH可能通过激活CHOP/caspase-3通路介导神经元的死亡。

Mar2是新近鉴定出的Maresins亚型，目前相关的研究较少，尤其是Mar2在SAH中的作用尚不十分明确。SAH发生后，高速流动的血液迅速充斥蛛网膜下腔，引发颅内压急剧升高，直接对血脑屏障造成损伤。



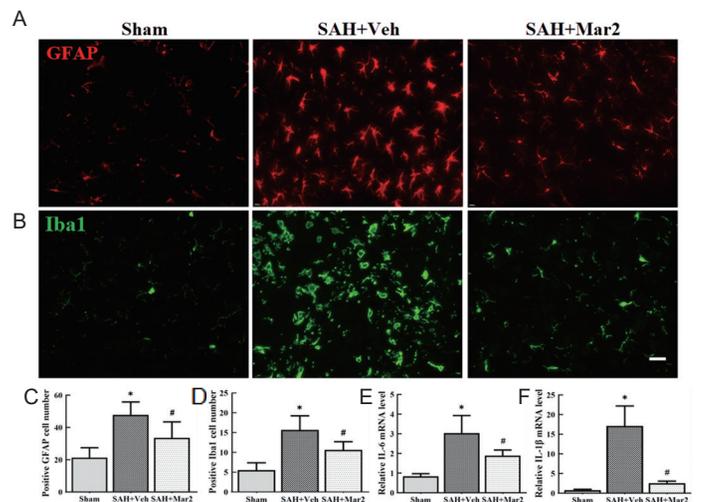
注：(A)CHOP、caspase-3蛋白表达条带，n=5；(B-C)分别为CHOP和caspase-3定量比较结果，与Sham组比较，\*P<0.05，与Vehicle组比较，#P<0.05。

图3 Mar2注射对SAH小鼠皮质CHOP、caspase-3蛋白表达的影响



注：(A)CHOP、caspase-3蛋白表达条带，n=3；(B-C)分别为CHOP和caspase-3定量比较结果，与Hem组比较，\*P<0.05。

图5 Tau和Tau+Mar2处理对神经元CHOP、caspase-3表达的影响



注：(A-B)分别是各组GFAP、Iba-1染色图，n=3，标尺=20 μm；(C-D)分别是GFAP和Iba-1染色的定量统计图；(E-F)分别是qPCR检测各组IL-6(n=4)和IL-1β(n=3)相对表达统计图；与Sham组比较，\*P<0.05；与SAH+Vehicle组比较，#P<0.05。

图7 Mar2对SAH后星形胶质质和小胶质细胞活化以及神经炎症的影响

继发的血管痉挛、神经炎症等反应进一步加剧了血脑屏障的破坏<sup>[1,2,14]</sup>，致使血浆和其他成分无阻碍地渗入脑实质<sup>[1,2,14]</sup>。因此，在探究Mar2对SAH的神经保护效应时，本研究采用了腹腔注射Mar2的干预方法。研究结果显示，经腹腔给予Mar2可以显著缓解SAH小鼠的脑水肿，并促进神经功能恢复。从细胞和分子水平分析，Mar2可通过下调神经元CHOP/caspase-3信号直接拮抗血红素的神经毒性效应。与单独使用Mar2相比，Mar2与Tau联合处理未能进一步减少caspase-3的表达，提示Mar2与Tau可能作用于相同的信号通路，或

Tau已接近最大限度地阻断了CHOP信号传导。此外,既往文献证实,SAH可促进星形胶质细胞与小胶质细胞中CHOP表达的显著上升<sup>[16]</sup>,导致这些细胞活化增多与炎症因子分泌。鉴于Mar2具有抑制CHOP信号的能力,注射CHOP特异性抑制Tau或Mar2均能抑制这2类细胞的过度激活并减轻神经炎症。这一抗炎作用也是Mar2的神经保护关键机制之一,既减轻了炎症介质对神经元的直接损伤,也减少了炎症对血脑屏障的破坏。

虽然本研究提示了有关Mar2潜在的神经保护机制,但仍有一些问题需要进一步探讨<sup>[17]</sup>。例如,Mar2是如何具体抑制CHOP信号的?哪些内质网应激转录因子是CHOP的上游信号?未来的研究可以在这些方面深入研究。

综上所述,本研究对Mar2在抗内质网应激和保护神经元免受损伤方面的相关机制进行了初步探讨。这些发现为进一步理解Mar2的神经保护作用机制奠定了基础,并为开发新型神经保护药物提供了有价值的参考和指导。

### 参考文献

- [1] Claassen J, Park S. Spontaneous subarachnoid haemorrhage[J]. *Lancet*, 2022, 400 (10355): 846-862.
- [2] Zhao J, Xiang X, Zhang H, et al. CHOP induces apoptosis by affecting brain iron metabolism in rats with subarachnoid hemorrhage[J]. *Exp Neurol*, 2018, 302(3): 22-33.
- [3] Fattori V, Zaninelli TH, Ferraz CR, et al. Maresin 2 is an analgesic specialized pro-resolution lipid mediator in mice by inhibiting neutrophil and monocyte recruitment, nociceptor neuron TRPV1 and TRPA1 activation, and CGRP release[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 216(15): 109189.
- [4] Lopes RV, Baggio DF, Ferraz CR, et al. Maresin-2 inhibits inflammatory and neuropathic trigeminal pain and reduces neuronal activation in the trigeminal ganglion[J]. *Curr Res Neurobiol*, 2023, 8(4): 100093.
- [5] Miranda J, Brazil JC, Morris AH, et al. Maresin-2 promotes mucosal repair and has therapeutic potential when encapsulated in thermostable nanoparticles[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(4): e2218162120.
- [6] Zhang J, Li C, Shuai W, et al. maresin2 fine-tunes ULK1 O-GlcNAcylation to improve post myocardial infarction remodeling[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 962(5): 176223.
- [7] 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.
- [8] Shi ZF, Fang Q, Chen Y, et al. Methylene blue ameliorates brain edema in rats with experimental ischemic stroke via inhibiting aquaporin 4 expression[J]. *Acta pharmacol Sin*, 2021, 42(3): 382-392.
- [9] Fu C, Wu Y, Liu S, et al. Rehmannioside A improves cognitive impairment and alleviates ferroptosis via activating PI3K/AKT/Nrf2 and SLC7A11/GPX4 signaling pathway after ischemia[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289(10): 115021.
- [10] Borok Z, Horie M, Flodby P, et al. Grp78 Loss in Epithelial Progenitors Reveals an Age-linked Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Pulmonary Fibrosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 201(2): 198-211.
- [11] Latif MU, Schmidt GE, Mercan S, et al. NFATc1 signaling drives chronic ER stress responses to promote NAFLD progression[J]. *Gut*, 2022, 71(12): 2561-2573.
- [12] 金磊, 旦增赤来, 魏博洋, 等. 中性粒细胞对小鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中细胞焦亡的作用及其机制研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2023, 22(1): 18-26.
- [13] He Z, Ostrowski RP, Sun X, et al. CHOP silencing reduces acute brain injury in the rat model of subarachnoid hemorrhage[J]. *Stroke*, 2012, 43(2): 484-490.
- [14] Feng D, Zhou J, Liu H, et al. Astrocytic NDRG2-PPM1A interaction exacerbates blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(39): e abq2423.
- [15] Heinz R, Brandenburg S, Nieminen-Kelhä M, et al. Microglia as target for anti-inflammatory approaches to prevent secondary brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH) [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 36.
- [16] Huang H, An Y, Jiao W, et al. CHOP/caspase-3 signal pathway involves in mitigative effect of selenium on lead-induced apoptosis via endoplasmic reticulum pathway in chicken testes[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 5(19): 18838-18845.
- [17] 张立, 王托弟, 黄旌, 等. 蛛网膜下腔出血大鼠脑组织载脂蛋白E的表达升高[J]. *神经损伤与功能重建*, 2022, 17(3): 152-154.

(本文编辑:唐颖馨)