

# 选择性脑亚低温对脑缺血再灌注损伤大鼠 p300 及乳酸化修饰的影响

牛瑞皎<sup>1</sup> 刘锦荟<sup>1</sup> 董怡<sup>2</sup> 刘锦浩<sup>3</sup> 董瑞<sup>1</sup> 王明山<sup>1</sup> 袁阳<sup>1</sup> 张高峰<sup>1</sup>

<sup>1</sup>青岛大学附属青岛市市立医院麻醉科, 青岛 266071; <sup>2</sup>山东第二医科大学麻醉学院, 潍坊 261053; <sup>3</sup>滨州医学院第二临床医学院, 烟台 264000

牛瑞皎现在首都医科大学附属北京胸科医院麻醉科, 北京 101100

通信作者: 张高峰, Email: exgalaxy@163.com

**【摘要】 目的** 探讨选择性脑亚低温对脑缺血再灌注损伤(CIRI)大鼠 p300 及乳酸化修饰的影响。**方法** 选取 60 只 6~8 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠, 采用随机数字表法分为假手术组(Sham 组)、CIRI 组、选择性脑亚低温干预组(CIRI+HT 组)和常温处理组(CIRI+NT 组), 每组 15 只。采用线栓法构建大脑中动脉闭塞, 缺血 2 h 后撤栓实现再灌注; Sham 组仅实施颈部血管暴露手术。于再灌注即刻, 通过左侧颈内动脉插管, 以 0.6 mL/min 的速度分别灌注 20 °C (CIRI+HT 组)或 37 °C (CIRI+NT 组)生理盐水, 持续 10 min。在整个过程中监测大鼠的脑温及直肠温度, 于再灌注后 24 h, 采用改良神经功能缺损评分(mNSS)对大鼠神经功能进行评估。随后处死大鼠, 迅速取脑组织, 经 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色观察脑梗死情况, 并计算脑梗死体积百分比; 取缺血半暗带区脑皮质, 用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测神经细胞凋亡情况; 经苏木素-伊红(HE)染色观察神经细胞形态学改变; 免疫荧光染色法观察 p300 表达情况; 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测乳酸化修饰和 p300 蛋白表达; 同时检测缺血半暗带区脑皮质乳酸水平。**结果** 与 Sham 组比较, CIRI 组、CIRI+HT 组、CIRI+NT 组 mNSS、脑梗死体积、神经细胞凋亡率、乳酸含量、乳酸化修饰和 p300 表达均升高(均  $P < 0.05$ )。与 CIRI 组比较, CIRI+HT 组 mNSS、脑梗死体积、神经细胞凋亡率, 以及缺血脑组织乳酸含量、乳酸化修饰和 p300 表达降低[mNSS(分):  $4.20 \pm 1.30$  比  $9.40 \pm 1.34$ , 脑梗死体积百分比:  $(31.21 \pm 1.20)\%$  比  $(41.18 \pm 2.33)\%$ , 神经细胞凋亡率:  $(27.69 \pm 2.87)\%$  比  $(48.90 \pm 2.08)\%$ , 乳酸含量(mmol/g):  $0.44 \pm 0.04$  比  $0.63 \pm 0.04$ , 乳酸化修饰(乳酸化修饰/ $\beta$ -actin):  $0.29 \pm 0.03$  比  $0.36 \pm 0.03$ , p300 表达(p300/ $\beta$ -actin):  $0.60 \pm 0.02$  比  $0.82 \pm 0.02$ , p300 阳性细胞比例:  $(46.70 \pm 2.97)\%$  比  $(63.80 \pm 3.41)\%$ , 均  $P < 0.05$ ]; 而 CIRI+NT 组上述指标与 CIRI 组差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。HE 染色显示, Sham 组神经细胞形态完整且轮廓清晰; CIRI 组和 CIRI+NT 组可见大量细胞水肿, 细胞核不规则固缩; CIRI+HT 组细胞核固缩情况减轻, 神经细胞形态改变减轻。**结论** 选择性脑亚低温可减轻大鼠 CIRI, 其机制可能与减少乳酸生成, 抑制 p300 表达, 进而抑制乳酸化修饰有关。

**【关键词】** 亚低温; 脑缺血再灌注损伤; 乳酸化修饰; p300

**基金项目:** 山东省青岛市医疗卫生优秀学科带头人培养项目(2024-3)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240824-00414

## Effect of selective cerebral mild hypothermia on p300 and lactylation modification in rats following cerebral ischemic reperfusion injury

Niu Ruijiao<sup>1</sup>, Liu Jinhui<sup>1</sup>, Dong Yi<sup>2</sup>, Liu Jinhao<sup>3</sup>, Dong Rui<sup>1</sup>, Wang Mingshan<sup>1</sup>, Yuan Yang<sup>1</sup>, Zhang Gaofeng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Anesthesiology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266071, China;

<sup>2</sup>College of Anesthesia, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China; <sup>3</sup>The Second School of Clinical Medicine of Binzhou Medical University, Yantai 264000, China

Niu Ruijiao is working on the Department of Anesthesiology, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101100, China

Corresponding author: Zhang Gaofeng, Email: exgalaxy@163.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the effect of selective cerebral mild hypothermia on p300 and lactylation modification in rats following cerebral ischemic reperfusion injury (CIRI). **Methods** Sixty healthy male SD rats aged 6 to 8 weeks of age at SPF grade were selected and divided into sham operation group (Sham group), CIRI group, selective cerebral mild hypothermic intervention group (CIRI+HT group), and normal temperature intervention group (CIRI+NT group) using randomized numerical tables, 15 in each group. A middle cerebral artery occlusion was established using thrombosis, revocation of thrombus after 2 hours of ischemia to achieve reperfusion. Sham group underwent only cervical vascular exposure surgery. Immediately after reperfusion, 20 °C (CIRI+HT group) or 37 °C (CIRI+NT group) saline was perfused at a constant flow rate of 0.6 mL/min through the left internal carotid artery for 10 minutes, respectively. Brain temperature and rectal temperature of rats were monitored throughout the process. At 24 hours after reperfusion, Modified Neurological Severity Score (mNSS) was used to evaluate the

neurological function of rats. Then the rats were sacrificed and brain tissues were obtained. Cerebral infarction was observed by staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), and the percentage of cerebral infarction volume was calculated. The ischemic penumbra tissue of cerebral cortex was taken. TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was used to measure neuronal apoptosis rate. Hematoxylin-eosin (HE) staining was employed to observe the morphological changes of nerve cells. Immunofluorescence analysis was used to assess the expression of p300. Western blotting analysis was conducted to assess the level of lactylation modification and p300. In addition, lactate level in the cerebral cortex of the ischemic penumbra area were detected. **Results** Compared with Sham group, mNSS, cerebral infarction volume, neuronal apoptosis rate, lactic acid content, lactic acid modification level and p300 enzyme expression were increased in the CIRI group, CIRI+HT group and CIRI+NT group (all  $P < 0.05$ ). Compared with CIRI group, the CIRI+HT group had decreased mNSS, cerebral infarction volume, and neuronal apoptosis rate, as well as decreased lactate content, lactate modification level, and p300 expression [mNSS:  $4.20 \pm 1.30$  vs.  $9.40 \pm 1.34$ , cerebral infarction volume percentage:  $(31.21 \pm 1.20)$  vs.  $(41.18 \pm 2.33)\%$ , neuronal apoptosis rate:  $(27.69 \pm 2.87)\%$  vs.  $(48.90 \pm 2.08)\%$ , lactate content (mmol/g):  $0.44 \pm 0.04$  vs.  $0.63 \pm 0.04$ , lactate modification (lactate modification/ $\beta$ -actin):  $0.29 \pm 0.03$  vs.  $0.36 \pm 0.03$ , p300 (p300/ $\beta$ -actin):  $0.60 \pm 0.02$  vs.  $0.82 \pm 0.02$ , proportion of p300 positive cells:  $(46.70 \pm 2.97)\%$  vs.  $(63.80 \pm 3.41)\%$ , all  $P < 0.05$ ]. However, there were no significant differences in the above indicators between the CIRI+NT group and the CIRI group (all  $P > 0.05$ ). HE staining showed neurocytes had integrated morphology and clear contours in Sham group, a large amount of cellular edema and irregular nucleus enrichment were observed in CIRI group and CIRI+NT group, and the degree of cell edema and nucleus shrinkage were reduced in CIRI+HT group. **Conclusion** Selective mild hypothermia can alleviate CIRI in rats, and the mechanism may be related to the reduction of lactic acid production, inhibition of p300 expression, and then suppressing lactylation modification level.

**【Key words】** Mild hypothermia; Cerebral ischemic reperfusion injury; Lactylation modification; p300

**Fund program:** Qingdao Outstanding Health Professional Development Fund (2024-3)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240824-00414

恢复血流灌注是治疗缺血性脑卒中的必要手段,但有可能引发更严重的损伤,即脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)<sup>[1]</sup>。CIRI 时脑组织乳酸生成持续增加<sup>[2]</sup>。近年来研究显示,乳酸不仅是细胞代谢的终产物,同时也可作为一种动态的底物修饰分子,通过特定的酶促反应共价修饰靶蛋白,从而调控其活性、亚细胞定位及基因表达谱,这一过程被定义为蛋白质乳酸化修饰<sup>[3]</sup>。p300 具有乙酰转移酶活性,是促进乳酸化修饰的重要酶类,在调节乳酸化修饰水平中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。乳酸化修饰对脑组织的能量代谢和细胞信号转导过程发挥重要的调控作用,进而影响 CIRI 的进展<sup>[5-6]</sup>。

亚低温治疗通过抑制缺血缺氧状态下脑组织的能量代谢速率,可以显著降低乳酸堆积水平<sup>[7]</sup>。有研究显示,经颈动脉灌注低温生理盐水诱导的选择性脑亚低温可有效减轻大鼠 CIRI<sup>[8]</sup>。然而目前关于选择性脑亚低温能否调控 CIRI 过程中的蛋白质乳酸化修饰尚无明确结论。本研究中拟通过 CIRI 大鼠模型,观察选择性脑亚低温对 p300 及乳酸化修饰水平的影响,探讨选择性脑亚低温的脑保护机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组:** 60 只 SPF 级健康雄性 SD 大鼠, 6~8 周龄, 体质量 240~260 g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 动物许可证号: SCXK

(鲁)20220006。采用随机数字表法将大鼠分为假手术组(Sham 组)、CIRI 组、选择性脑亚低温干预组(CIRI+HT 组)和常温处理组(CIRI+NT 组), 每组 15 只。本实验方法符合动物伦理学标准, 获得青岛大学附属青岛市市立医院动物伦理委员会批准(审批号: KTL202306190)。

**1.2 大鼠局灶性 CIRI 模型制备:** 采用线栓法造成大脑中动脉闭塞, 维持缺血 2 h 后缓慢撤栓实现再灌注<sup>[9]</sup>。实验全程中采用超声多普勒系统实时监测脑血流动力学变化。在缺血状态下, 脑血流量显著降低至基线水平的 15%~20%; 实施再灌注处理后 10 min 内, 脑血流灌注可恢复至基础值的 70% 以上。

**1.3 亚低温模型的建立及温度监测:** 麻醉大鼠后, 用 BAmNSST-12 微探针温度计持续监测脑温, 并同步使用电子温度计测量直肠温度。CIRI+HT 组和 CIRI+NT 组在拔除线栓即刻于大鼠左侧颈内动脉以 0.6 mL/min 的速度分别灌注 20 °C、37 °C 的生理盐水 10 min<sup>[8]</sup>。

## 1.4 检测指标及方法

**1.4.1 行为学测试:** 于再灌注 24 h 时进行改良神经功能缺损评分(Modified Neurologic Severity Score, mNSS)<sup>[10]</sup>, 评分越高表明神经功能障碍越显著。

**1.4.2 脑梗死测定:** 再灌注后 24 h 每组选取 5 只大鼠, 断头处死取脑组织, 置于 -20 °C 冰箱冷冻 20~30 min; 冠状位连续切片(片厚 2 mm), 浸入 1%

的 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色液中, 37 °C 避光孵育 15 ~ 20 min; 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h。使用 Image J 图像分析系统对脑组织切片进行定量分析。脑梗死体积百分比=(对侧半球总体积-同侧半球正常染色区域体积)/对侧半球总体积 × 100%。

**1.4.3 脑组织石蜡切片制备:** 于再灌注后 24 h 每组取 5 只大鼠, 深度麻醉, 经左心室穿刺依次灌注预冷生理盐水及 4% 多聚甲醛固定液, 直至肢体末端呈现苍白色且肌肉强直; 随后断头取完整脑组织, 经梯度乙醇脱水(70% ~ 100%)、二甲苯透明及石蜡包埋, 冠状位连续切片(片厚 5 μm), 将切片贴附于多聚赖氨酸包被的载玻片上, 于 37 °C 水浴中展平后完成捞片; 晾干后保存于 4 °C 冰箱用于后续 HE、TUNEL、免疫荧光染色。

**1.4.4 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色** 观察缺血半暗带区神经细胞形态: 每组取 5 张石蜡切片, 经常规烤片、脱蜡及水化处理, 进行 HE 染色, 用蒸馏水洗净后依次经梯度乙醇脱水、二甲苯透明化处理, 最后以中性树胶封固。于光镜下观察缺血半暗带区神经细胞的形态学改变。

**1.4.5 原位末端缺刻标记试验(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)** 检测缺血半暗带区神经细胞凋亡情况: 每组取 5 张石蜡切片, 经常规烤片、脱蜡及水化处理, 按照 TUNEL 试剂盒说明书步骤操作, 滴加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染细胞核后进行封片。显微镜下观察细胞凋亡情况, 并计算神经细胞凋亡率。神经细胞凋亡率(%)=TUNEL 阳性细胞数/总细胞数 × 100%。

**1.4.6 免疫荧光染色:** 每组取 5 张石蜡切片, 经常规烤片、脱蜡、水化、抗原热修复后, 用 10% 山羊血清室温封闭 30 min; 加入一抗 p300(1:100) 4 °C 孵育过夜, 室温复温、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)浸洗后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1:200) 37 °C 孵育 1 h; 滴加多重荧光免疫组化染料 TSA-520 于 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗涤后用 DAPI 复染细胞核, 再用 PBS 洗涤, 将液体甩干后封片。荧光倒置显微镜下观察并计算 p300 阳性细胞率。p300 阳性细胞率(%)=p300 阳性细胞数/总细胞数 × 100%。

**1.4.7 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting):** 于再灌注后 24 h 每组取 5 只大鼠, 断头处死, 于缺血半暗带区取 20 mg 大脑皮质置于预冷的匀浆管中, 加入 RIPA 细胞裂解液、PMSF 和去乙酰化酶抑制剂冰浴条件下进行超声破碎处理, 随后 4 °C 下离心 20 min, 收集上清液。取 30 μg 蛋白上样, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白条带转移至聚偏二氟乙烯膜, 用含吐温 20 的 Tris 缓冲液(Tris-buffered saline with Tween 20, TBST)洗涤, 5% 脱脂牛奶室温封闭 90 min; 加入一抗乳酸化抗体(1:1000)、p300 抗体(1:1000)和 β-肌动蛋白(β-actin)抗体(1:1000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜; 加入山羊抗兔二抗(1:10000)室温孵育 1 h, TBST 洗膜。用超敏 ECL 化学发光成像仪曝光, Image J 图像分析系统对蛋白条带进行定量分析。计算目标蛋白与内参蛋白 β-actin 的灰度值比值, 以评估目标蛋白的表达水平。

**1.4.8 乳酸水平检测:** 每组取 0.1 g 缺血半暗带区脑皮质组织, 加入生理盐水, 冰水浴条件下匀浆、离心, 取上清液, 按试剂盒说明书步骤测定乳酸含量。

**1.5 统计学分析:** 采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析。正态分布的计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准  $\alpha$  值取双侧 0.05。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠 mNSS 比较:** 表 1 结果显示, Sham 组大鼠无神经功能损伤, mNSS 为 0 分。CIRI 组、CIRI+HT 组和 CIRI+NT 组 mNSS 均较 Sham 组升高(均  $P < 0.05$ )。但 CIRI+HT 组 mNSS 较 CIRI 组和 CIRI+NT 组降低(均  $P < 0.05$ ), 而 CIRI+NT 组与 CIRI 组 mNSS 比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 各组大鼠 mNSS、脑梗死体积百分比、神经细胞凋亡率和缺血脑组织乳酸含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	mNSS(分)	脑梗死体积百分比(%)	神经细胞凋亡率(%)	缺血脑组织乳酸含量(mmol/g)
Sham 组	5	0	0	0	0.23 ± 0.02
CIRI 组	5	9.40 ± 1.34 <sup>a</sup>	41.18 ± 2.33 <sup>a</sup>	48.90 ± 2.08 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.04 <sup>a</sup>
CIRI+HT 组	5	4.20 ± 1.30 <sup>ab</sup>	31.21 ± 1.20 <sup>ab</sup>	27.69 ± 2.87 <sup>ab</sup>	0.44 ± 0.04 <sup>ab</sup>
CIRI+NT 组	5	9.20 ± 0.84 <sup>ac</sup>	40.01 ± 1.41 <sup>ac</sup>	48.28 ± 3.44 <sup>ac</sup>	0.62 ± 0.02 <sup>ac</sup>
<i>F</i> 值		96.317	836.307	434.428	170.140
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: Sham 组为假手术组, CIRI 组为脑缺血/再灌注损伤组, CIRI+HT 组为选择性脑亚低温干预组, CIRI+NT 组为常温处理组; mNSS 为改良神经功能缺损评分; 与 Sham 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 CIRI 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 CIRI+HT 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

**2.2 各组大鼠脑梗死体积、神经细胞凋亡率及缺血脑组织乳酸含量比较:**表 1 和图 1 结果显示,与 Sham 组比较, CIRI 组、 CIRI+HT 组和 CIRI+NT 组脑梗死体积百分比、神经细胞凋亡率和缺血脑组织乳酸含量均升高(均  $P < 0.05$ )。但 CIRI+HT 组脑梗死体积百分比、神经细胞凋亡率和缺血脑组织乳酸含量均较 CIRI 组和 CIRI+NT 组降低(均  $P < 0.05$ ) , 而 CIRI+NT 组与 CIRI 组上述指标比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。

**2.3 各组大鼠神经细胞形态学改变:**HE 染色显示(图 2), Sham 组神经元结构保持完整,细胞轮廓清晰,细胞核膜边界明确,核仁结构显著; CIRI 组和 CIRI+NT 组则呈现出细胞毒性水肿及广泛的细胞核不规则固缩; CIRI+HT 组神经细胞形态学改变较 CIRI 组减轻。

**2.4 各组大鼠乳酸化修饰水平比较:**Western blotting

结果显示(表 2; 图 3), 与 Sham 组比较, CIRI 组、 CIRI+HT 组和 CIRI+NT 组乳酸化修饰水平均升高(均  $P < 0.05$ ) ; 但 CIRI+HT 组乳酸化修饰水平较 CIRI 组和 CIRI+NT 组降低(均  $P < 0.05$ ) ; 而 CIRI+NT 组与 CIRI 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

组别	动物数 (只)	乳酸化修饰 / $\beta$ -actin	p300/ $\beta$ -actin	p300 阳性细胞比例 (%)
Sham 组	5	0.23 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.02	28.62 $\pm$ 2.29
CIRI 组	5	0.36 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.82 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	63.80 $\pm$ 3.41 <sup>a</sup>
CIRI+HT 组	5	0.29 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.60 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	46.70 $\pm$ 2.90 <sup>ab</sup>
CIRI+NT 组	5	0.34 $\pm$ 0.05 <sup>ac</sup>	0.80 $\pm$ 0.30 <sup>ac</sup>	65.22 $\pm$ 2.60 <sup>ac</sup>
F 值		10.840	343.307	181.967
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: Sham 组为假手术组, CIRI 组为脑缺血再灌注损伤组, CIRI+HT 组为选择性脑亚低温干预组, CIRI+NT 组为常温处理组;  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白; 与 Sham 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 CIRI 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 CIRI+HT 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

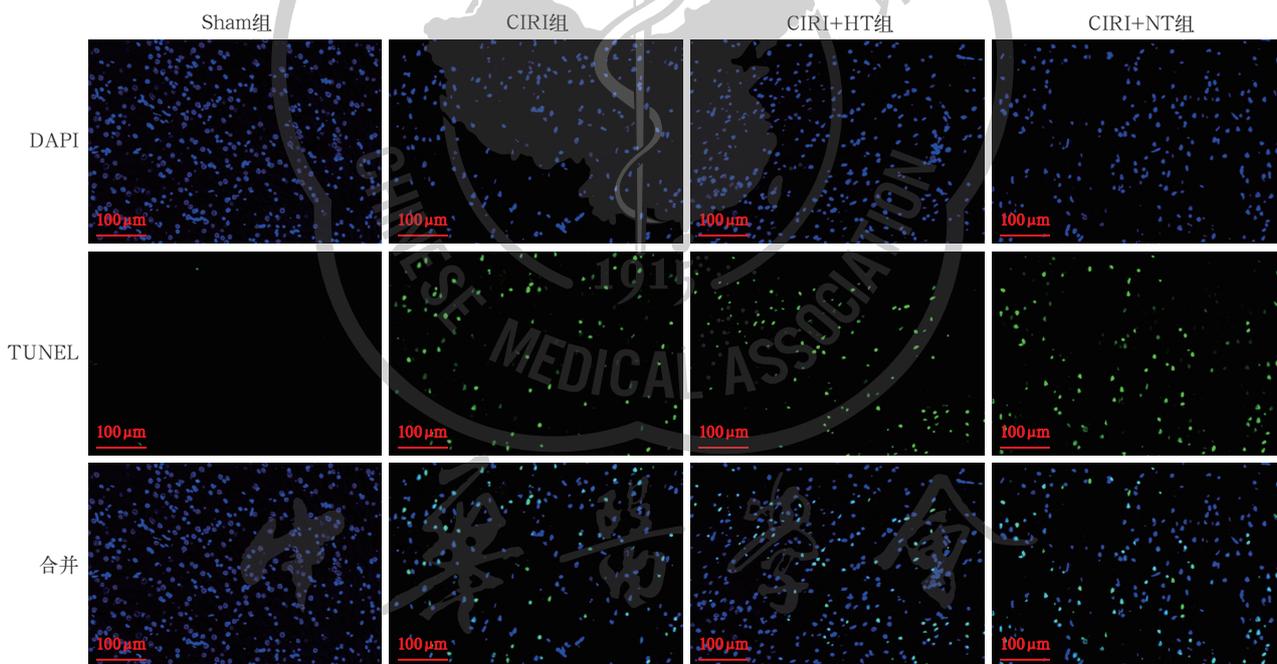


图 1 荧光显微镜下观察各组大鼠脑缺血半暗带区细胞凋亡情况 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染细胞核呈蓝色,原位末端缺刻标记法 (TUNEL) 染色凋亡细胞呈绿色。假手术组 (Sham 组) 未见凋亡细胞; 脑缺血再灌注损伤组 (CIRI 组) 和常温处理组 (CIRI+NT 组) 可见较多凋亡细胞; 选择性脑亚低温干预组 (CIRI+HT 组) 凋亡细胞较 CIRI 组和 CIRI+NT 组明显减少 TUNEL 染色 高倍放大

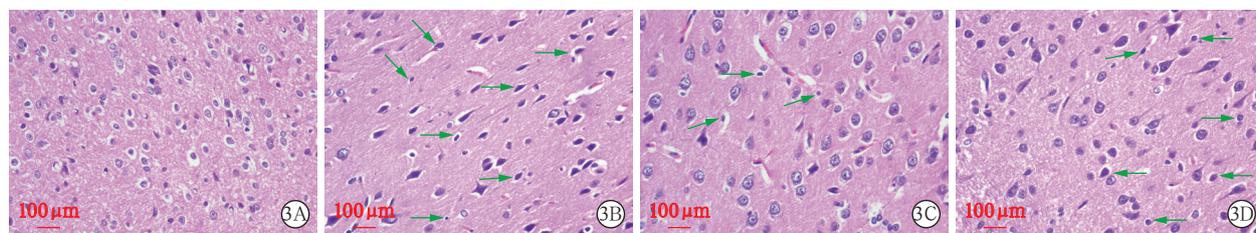
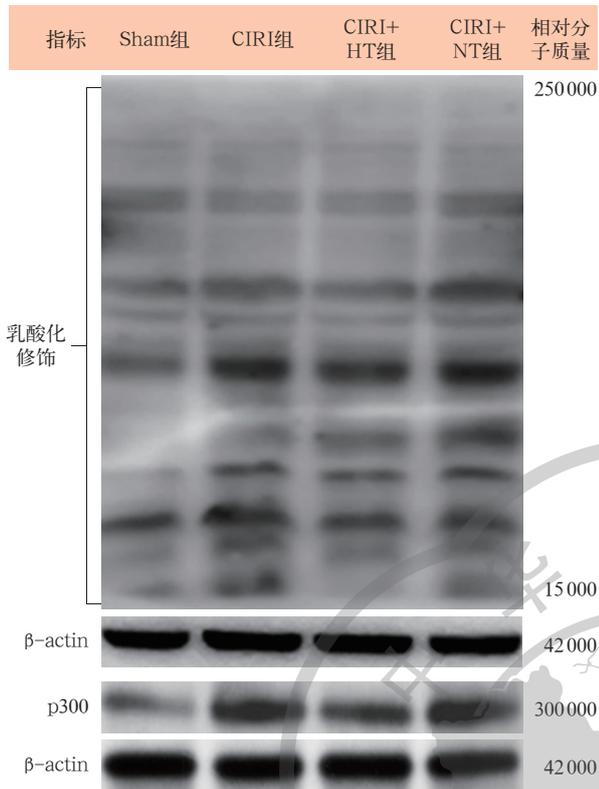


图 2 光镜下观察各组大鼠脑缺血半暗带区神经细胞形态学改变 绿色箭头所示为浓缩神经细胞及固缩细胞核。假手术组 (Sham 组, A) 细胞形态较规整,核仁清晰,细胞分布均匀,未见明显异常细胞结构; 脑缺血再灌注损伤组 (CIRI 组, B) 细胞呈梭形或不规则形,细胞体积小,细胞核深染; 选择性脑亚低温干预组 (CIRI+HT 组, C) 部分细胞呈空泡化改变,细胞核形态存在一定程度不规则,损伤程度减轻; 常温处理组 (CIRI+NT 组, D) 细胞体积小、核深染密集,呈炎症细胞浸润特征,损伤程度与 CIRI 组相似 苏木素-伊红 (HE) 染色 高倍放大



注：Sham 组为假手术组，CIRI 组为脑缺血再灌注损伤组，CIRI+HT 组为选择性脑亚低温干预组，CIRI+NT 组为常温处理组；β-actin 为 β-肌动蛋白

图 3 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组大鼠乳酸化修饰及 p300 的蛋白表达

2.5 各组大鼠 p300 蛋白表达和 p300 阳性细胞比例比较：Western blotting 和免疫荧光染色结果显示

(表 2；图 3~4)，与 Sham 组比较，CIRI 组、CIRI+HT 组和 CIRI+NT 组 p300 蛋白表达水平、p300 阳性细胞比例均升高 (均  $P < 0.05$ )；但 CIRI+HT 组 p300 蛋白表达水平、p300 阳性细胞比例均较 CIRI 组和 CIRI+NT 组下降 (均  $P < 0.05$ )；而 CIRI+NT 组与 CIRI 组上述指标比较差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。

3 讨论

本研究中采用线栓法阻断大脑中动脉血流 2 h 后再灌注，成功建立大鼠局灶性 CIRI 模型。实验结果显示，与 Sham 组比较，CIRI 组大鼠 mNSS、脑梗死体积及神经细胞凋亡率均升高，证实 CIRI 模型成功建立。对 CIRI 大鼠进行选择性脑亚低温处理<sup>[8]</sup>，结果表明，与 CIRI 组和 CIRI+NT 组比较，CIRI+HT 组 mNSS、脑梗死体积和神经细胞凋亡率均降低，提示选择性脑亚低温可减轻大鼠 CIRI。

脑缺血时细胞糖酵解占优势，乳酸生成增多，再灌注后细胞仍倾向于有氧糖酵解进行供能，称之为瓦博格 (Warburg) 效应，这一效应导致 CIRI 时乳酸持续增多<sup>[11]</sup>。乳酸穿梭及乳酸化修饰的发现，表明乳酸可参与调节各项生命活动。2019 年有研究显示组蛋白可发生乳酸化修饰<sup>[4]</sup>，随后有研究证明乳酸化修饰也存在于非组蛋白<sup>[12]</sup>。Zhang 等<sup>[4]</sup>发现，组蛋白乳酸化修饰过程是一种酶促反应，以乳酰辅酶 A 为底物，组蛋白乙酰转移酶作为结合酶将乳酰辅酶 A 转移至赖氨酸残基，完成乳酸化修饰。p300/

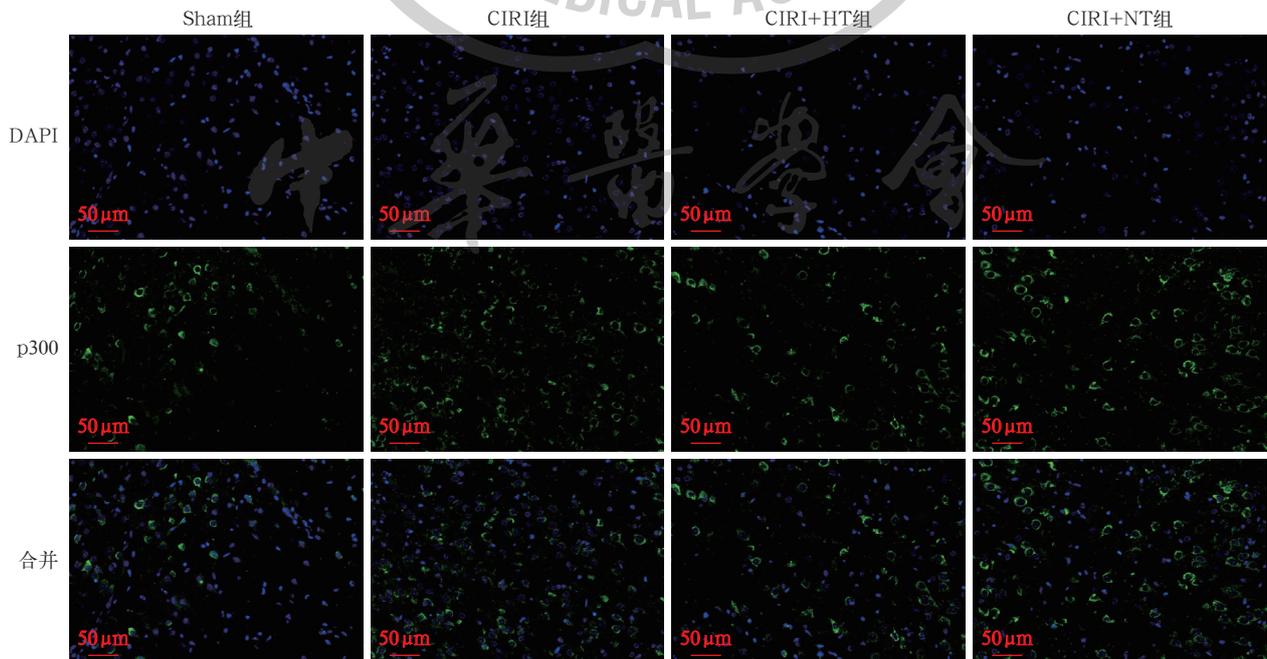


图 4 荧光显微镜下观察各组大鼠脑缺血半暗带区 p300 酶表达情况 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染细胞核呈蓝色，p300 阳性呈绿色；假手术组 (Sham 组) p300 表达较少；脑缺血再灌注损伤组 (CIRI 组) p300 表达增多；选择性脑亚低温干预组 (CIRI+HT 组) p300 表达较 CIRI 组减少；常温处理组 (CIRI+NT 组) p300 表达与 CIRI 组相似 免疫荧光染色 高倍放大

CREB 结合蛋白是多功能的转录辅激活子,已被确定为最多样化酰基转移酶活性的介质<sup>[13]</sup>。p300 可显著增强 Glis1 (Yamanaka 第五重编程因子)调控下组蛋白 H3K18 的乳酸化修饰水平<sup>[14]</sup>。组蛋白脱乙酰酶可去除乙酰辅酶 A 实现去乳酸化修饰<sup>[15]</sup>。本研究结果提示, CIRI 时乳酸生成增加,同时 p300 表达上调,进而增加乳酸化修饰水平。

蛋白乳酸化修饰在维持细胞稳态和神经元活动等过程中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。有研究显示,经过氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)处理的小鼠脑神经瘤细胞(N2a 细胞),乳酸生成增多,组蛋白乳酸化修饰增强,炎症因子增加,引起细胞焦亡<sup>[17]</sup>。Zhang 等<sup>[6]</sup>研究发现,大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12 细胞)经过 OGD/R 处理后乳酸化修饰水平增加,使用不可代谢的葡萄糖类似物 2-脱氧-D-葡萄糖抑制糖酵解,可降低乳酸化修饰水平,减少细胞凋亡。本研究结果显示, CIRI 大鼠缺血半暗区脑组织乳酸化修饰水平增加,脑损伤加重,与以上研究结果一致。

亚低温(32~34 °C)作为神经保护的重要干预措施<sup>[18]</sup>,可通过降低缺血缺氧期间脑代谢,优化再灌注期间能量参数,维持大脑能量稳态,发挥脑保护作用<sup>[7]</sup>。经颈动脉灌注低温生理盐水实现选择性脑亚低温具有降温速度快、全身不良反应少的优点<sup>[8]</sup>。研究显示,亚低温可抑制 CIRI 大鼠脑内乳酸脱氢酶的活性和催化效率,降低脑内糖酵解水平,从而维持低水平的乳酸<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,选择性脑亚低温可能通过减少脑组织缺血半暗带区乳酸生成,下调乳酸化修饰重要的结合酶 p300 的表达,降低乳酸化修饰水平,发挥脑保护作用。而灌注 37 °C 生理盐水对 CIRI 时乳酸生成、p300 表达及乳酸化修饰水平等均无显著影响,提示生理盐水的稀释或冲洗作用已被排除。

综上所述,选择性脑亚低温可能通过减少大鼠 CIRI 时乳酸生成,下调 p300 表达,进而抑制乳酸化修饰水平,发挥脑保护作用。后续将通过联合干预 p300 表达,并在细胞水平进一步验证亚低温影响乳酸化修饰的机制。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 牛瑞姣: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析;刘锦荟: 实施研究、起草文章;董怡、刘锦浩: 采集数据、分析/解释数据、统计分析;董瑞: 酝酿和设计实验、指导;王明山: 对文章的知识性内容作批评性审阅、指

导;袁阳: 统计分析、指导研究;张高峰: 对文章的知识性内容作批评性审阅、获取研究经费、指导

## 参考文献

- [1] Zeng X, Zhang YD, Ma RY, et al. Activated Drp1 regulates p62-mediated autophagic flux and aggravates inflammation in cerebral ischemia-reperfusion via the ROS-RIP1/RIP3-exosome axis[J]. *Mil Med Res*, 2022, 9(1): 25. DOI: 10.1186/s40779-022-00383-2.
- [2] Li ZF, Zhang B, Yao WL, et al. APC-Cdh1 regulates neuronal apoptosis through modulating glycolysis and pentose-phosphate pathway after oxygen-glucose deprivation and reperfusion[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 39(1): 123-135. DOI: 10.1007/s10571-018-0638-x.
- [3] Fan HQ, Yang F, Xiao ZH, et al. Lactylation: novel epigenetic regulatory and therapeutic opportunities[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2023, 324(4): E330-E338. DOI: 10.1152/ajpendo.00159.2022.
- [4] Zhang D, Tang ZY, Huang H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation[J]. *Nature*, 2019, 574(7779): 575-580. DOI: 10.1038/s41586-019-1678-1.
- [5] Li RB, Yang Y, Wang HY, et al. Lactate and lactylation in the brain: current progress and perspectives[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(6): 2541-2555. DOI: 10.1007/s10571-023-01335-7.
- [6] Zhang W, Xu L, Yu ZF, et al. Inhibition of the glycolysis prevents the cerebral infarction progression through decreasing the lactylation levels of LCP1[J]. *Mol Biotechnol*, 2023, 65(8): 1336-1345. DOI: 10.1007/s12033-022-00643-5.
- [7] Erecinska M, Thoresen M, Silver IA. Effects of hypothermia on energy metabolism in Mammalian central nervous system[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(5): 513-530. DOI: 10.1097/01.WCB.0000066287.21705.21.
- [8] Wang XY, Wehbe A, Kaura S, et al. Updates on selective brain hypothermia: studies from bench work to clinical trials[J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 899547. DOI: 10.3389/fneur.2022.899547.
- [9] Zhao N, Xu XM, Jiang YJ, et al. Lipocalin-2 may produce damaging effect after cerebral ischemia by inducing astrocytes classical activation[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 168. DOI: 10.1186/s12974-019-1556-7.
- [10] Li ZF, Yang MG, Lin YJ, et al. Electroacupuncture promotes motor function and functional connectivity in rats with ischemic stroke: an animal resting-state functional magnetic resonance imaging study[J]. *Acupunct Med*, 2021, 39(2): 146-155. DOI: 10.1177/0964528420920297.
- [11] Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases[J]. *Bioessays*, 2013, 35(11): 965-973. DOI: 10.1002/bies.201300084.
- [12] Zhao W, Yu HL, Liu XN, et al. Systematic identification of the lysine lactylation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*[J]. *Parasit Vectors*, 2022, 15(1): 180. DOI: 10.1186/s13071-022-05315-6.
- [13] Dancy BM, Cole PA. Protein lysine acetylation by p300/CBP[J]. *Chem Rev*, 2015, 115(6): 2419-2452. DOI: 10.1021/er500452k. Erratum in: *Chem Rev*, 2016, 116(14): 8314. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00351.
- [14] Li LP, Chen KS, Wang TY, et al. Glis1 facilitates induction of pluripotency via an epigenome-metabolome-epigenome signalling cascade[J]. *Nat Metab*, 2020, 2(9): 882-892. DOI: 10.1038/s42255-020-0267-9. Erratum in: *Nat Metab*, 2020, 2(10): 1179. DOI: 10.1038/s42255-020-00308-0.
- [15] Moreno-Yruela C, Zhang D, Wei W, et al. Class I histone deacetylases (HDAC1-3) are histone lysine delactylases[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(3): eabi6696. DOI: 10.1126/sciadv.abi6696.
- [16] Hagihara H, Shoji H, Otabi H, et al. Protein lactylation induced by neural excitation[J]. *Cell Rep*, 2021, 37(2): 109820. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109820.
- [17] Yao X, Li C. Lactate dehydrogenase A mediated histone lactylation induced the pyroptosis through targeting HMGB1[J]. *Metab Brain Dis*, 2023, 38(5): 1543-1553. DOI: 10.1007/s11011-023-01195-6.
- [18] Huber C, Huber M, Ding Y. Evidence and opportunities of hypothermia in acute ischemic stroke: clinical trials of systemic versus selective hypothermia[J]. *Brain Circ*, 2019, 5(4): 195-202. DOI: 10.4103/bc.bc\_25\_19.
- [19] Khalilov RA, Dzhaifarova AM, Khizrieva SI. Effect of hypothermia on kinetic characteristics of lactate dehydrogenase in rat brain under conditions of global ischemia and reperfusion[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2017, 163(3): 334-337. DOI: 10.1007/s10517-017-3797-8.

(收稿日期: 2024-08-24)

(本文编辑: 保健媛 张耘菲)