

分类号:

密 级: 公开

学 号: 20212014084

单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



Neuritin 抑制内质网应激相关炎症通路对 SAH 后神经细胞凋亡影响的研究

学 位 申 请 人	任坤豪
指 导 教 师	赵冬教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	外科学
研 究 方 向	神经外科
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2024 年 5 月

分类号:

密 级: 公开

学 号: 20212014084

单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



Neuritin 抑制内质网应激相关炎症通路对 SAH 后神经细胞凋亡影响的研究

学 位 申 请 人	任坤豪
指 导 教 师	赵冬教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	外科学
研 究 方 向	神经外科
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2024 年 5 月

**Mechanism of Neuritin inhibiting endoplasmic reticulum stress-related
inflammatory pathways on neuronal apoptosis after subarachnoid
hemorrhage**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Ren KunHao

(Surgery)

Dissertation Supervisor:

Prof

Zhao Dong

May,2024

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：任仲豪

时间：2024年5月12日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：任仲豪

时间：2024年5月12日

导师签名：张立

时间：2024年5月12日

摘要

目的：探讨蛛网膜下腔出血大鼠内质网应激相关炎症通路与神经细胞凋亡之间的关系及 Neuritin 是否能够通过抑制内质网应激相关炎症通路包括 IRE1 α -TRAF2-NF- κ B、PERK-eIF2 α -NF- κ B、ATF6-NF- κ B 通路减少蛛网膜下腔出血后神经炎症和细胞凋亡。为临床上治疗蛛网膜下腔出血提供新的理论依据。

方法：(1)利用血管内穿孔法诱导大鼠 SAH 模型。(2)大鼠 SAH 模型的鉴定。(3)把大鼠随机分为 Sham 组、SAH 组、SAH + Vehicle 组、SAH + TUDCA 组、SAH + BAY11-7082 组、SAH + AAV-NC 组、SAH + AAV-Neuritin 组、SAH + AAV-Neuritin + TUDCA 组。(4)Western blot 及免疫荧光染色检测腺病毒转染后 Neuritin 蛋白表达情况。(5)用改良加西亚评分评估 SAH 模型神经功能并进行 SAH 出血程度评分；用脑干湿重评估脑水肿程度、Evans 蓝染色评估血脑屏障损伤程度。(6)WB 检测 NF- κ B、p-NF- κ B、NLRP3、Cleaved-caspase3、GRP78、p-PERK、TRAF2、ATF6、p-IRE1 α 、p-eIF2 α 、p-AKT 的表达水平变化；免疫荧光染色分析 NLRP3、GRP78 的表达变化。(7)TUNEL 试剂盒检测神经细胞的凋亡。(8)ELISA 技术检测炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 的表达变化。

结果：(1)大鼠 SAH 模型构建成功：肉眼观与 Sham 组相比，SAH 实验组在基底池周围和 Willis 环部位有明显的血凝块形成，尤其是在两侧的颞底区更为显著。对脑组织进行 HE 染色后的切片观察表明，Sham 组大鼠的蛛网膜下腔没有看到异常细胞出现，而在 SAH 组中，大量红细胞充斥在蛛网膜下腔中。(2)Western blot 及免疫荧光结果显示，SAH + AAV-Neuritin 组 Neuritin 蛋白的表达较 SAH 组和 SAH + AAV-NC 组明显升高 ($P < 0.001$)，SAH 组和 SAH + AAV-NC 组 Neuritin 蛋白的表达差异无统计学意义。(3)改良加西亚评分结果显示 SAH 组及 SAH+AAV-NC 组较 Sham 组降低，表明模型组神经功能受损 ($P < 0.001$)，而 SAH + AAV-Neuritin 组和 SAH + AAV-Neuritin + TUDCA 组较 SAH 组改良加西亚评分有所升高 ($P < 0.001$)；各组 (除 Sham 组) SAH 出血程度评分差异无统计学意义；脑干湿重结果显示 SAH 组及 SAH+AAV-NC 组较 Sham 组升高 ($P < 0.001$)，表明模型组发生脑水肿，而 SAH + AAV-Neuritin 组和 SAH + AAV-Neuritin + TUDCA 组较 SAH 组脑水肿程度有所降低 ($P < 0.05$)；伊文氏蓝染色结果显示 SAH 组伊文氏蓝渗出量较 Sham 组升高 ($P < 0.001$)，表明模型组发生血脑屏障受损，而 SAH + AAV-Neuritin 组和 SAH + AAV-Neuritin + TUDCA 组较 SAH 组伊文氏蓝渗出量有所降低 ($P < 0.001$)。(4)Western 印迹结果显示 SAH 组 p-NF- κ B/NF- κ B 比值、NLRP3、Cleaved-caspase3、GRP78、p-PERK、TRAF2、p-IRE1 α 、p-eIF2 α 、ATF6 的表达较 Sham 组明显升高 ($P < 0.001$)，SAH 组 p-AKT 的表达较 Sham 组明显降低 ($P < 0.05$)，SAH 组与 SAH + Vehicle 组两者

之间蛋白表达差异无统计学意义；与 SAH 组相比 SAH + TUDCA 组 p-NF- κ B/NF- κ B 比值、NLRP3、GRP78、p-PERK、TRAF2、p-IRE1 α 、p-eIF2 α 、ATF6 蛋白水平显著降低 ($P<0.01$)，p-AKT 蛋白水平显著升高 ($P<0.001$)；与 SAH 组相比，SAH + BAY11-7082 组的 p-NF- κ B/NF- κ B 比值、NLRP3、Cleaved-caspase3 蛋白水平显著降低 ($P<0.05$)；与 SAH 组相比 SAH + AAV-Neuritin 组和 SAH + AAV-Neuritin + TUDCA 组的 p-NF- κ B/NF- κ B 比值、NLRP3、Cleaved-caspase3、GRP78、p-PERK、TRAF2、p-IRE1 α 、p-eIF2 α 、ATF6 蛋白水平显著降低 ($P<0.01$)，p-AKT 的表达较 SAH 组升高 ($P<0.01$)，SAH+AAV-Neuritin 组和 SAH + AAV-Neuritin + TUDCA 组两组蛋白表达差异无统计学意义；免疫荧光结果显示 SAH 组 GRP78、NLRP3 蛋白的荧光强度较 Sham 组明显升高 ($P<0.001$)。与 SAH 组相比 SAH + AAV-Neuritin 组和 SAH + AAV-Neuritin + TUDCA 组 GRP78、NLRP3 蛋白荧光强度显著降低 ($P<0.001$)，SAH+AAV-Neuritin 组和 SAH+ AAV-Neuritin + TUDCA 组两组蛋白荧光强度差异无统计学意义。(4) TUNEL 染色结果显示 SAH 组细胞凋亡率较 Sham 组明显升高 ($P<0.001$)。与 SAH 组相比，BAY11-7082 组的细胞凋亡率显著降低 ($P<0.001$)；且 SAH 组与 SAH + Vehicle 组两者细胞凋亡率差异无统计学意义；与 SAH 组相比，SAH + AAV-Neuritin 组和 SAH + AAV-Neuritin + TUDCA 组细胞凋亡率较 SAH 组下降 ($P<0.001$)，且两者细胞的凋亡率差异无统计学意义。(5)ELISA 结果显示 SAH 组较 Sham 组炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 的表达明显升高 ($P<0.001$)，SAH + AAV-Neuritin 组和 SAH + AAV-Neuritin + TUDCA 组炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 的表达较 SAH 组下降 ($P<0.01$)，且两者差异无统计学意义。

结论：Neuritin 可通过抑制 SAH 后内质网应激相关炎症通路包括 IRE1 α -TRAF2-NF- κ B、PERK-eIF2 α -NF- κ B、ATF6-NF- κ B 通路抑制神经炎症进而减少神经细胞的凋亡。

关键词：蛛网膜下腔出血；Neuritin；内质网应激；炎症；凋亡

Abstract

Objective: To investigate the relationship between endoplasmic reticulum stress-associated inflammatory pathways and neuronal apoptosis in rats with subarachnoid hemorrhage and to assess whether Neuritin can attenuate ER stress-mediated inflammation and cell apoptosis following SAH by inhibiting pathways including IRE1 α -TRAF2-NF- κ B, PERK-eIF2 α -NF- κ B, and ATF6-NF- κ B, thereby providing novel theoretical insights for clinical treatment of SAH.

Methods: (1) SAH rat models were established using the endovascular perforation technique. (2) Verification of the SAH model. (3) Rats were randomly assigned to the following groups: Sham, SAH, SAH + Vehicle, SAH + TUDCA, SAH + BAY11-7082, SAH + AAV-NC, SAH + AAV-Neuritin, and SAH + AAV-Neuritin + TUDCA. (4) Neuritin expression following adenovirus transfection was examined using Western blot and Immunofluorescence staining. (5) Neurological deficits and SAH grading were assessed using the Modified Garcia scoring system, while brain edema and blood-brain barrier disruption was evaluated through measurement of Brain Water Content and Evans Blue staining. (6) Expression levels of NF- κ B, p-NF- κ B, NLRP3, Cleaved-caspase3, GRP78, p-PERK, TRAF2, ATF6, p-IRE1 α , p-eIF2 α , and p-AKT were measured using Western blot analysis; expression changes of NLRP3 and GRP78 were analyzed using immunofluorescence staining. (7) Neuronal apoptosis were analyzed using TUNEL staining. (8) Changes in expression of inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , IL-6) were analyzed using ELISA.

Results: (1) The SAH rat model was successfully constructed, evidenced by visible blood clots around the base pool and the Willis circle, and significant HE-stained red blood cells in the subarachnoid space of the SAH group compared to the Sham. (2) Western blot and immunofluorescence results showed that Neuritin expression was significantly higher in the SAH + AAV-Neuritin group compared to the SAH and SAH + AAV-NC groups ($P < 0.001$), with no significant differences between the SAH and SAH + AAV-NC groups. (3) Modified Garcia scores were lower in the SAH and SAH+AAV-NC groups compared to the Sham group ($P < 0.001$), indicating neurological impairment, while Modified Garcia scores were higher in the SAH + AAV-Neuritin and SAH + AAV-Neuritin + TUDCA groups compared to the SAH group ($P < 0.001$). The SAH grading scores did not differ significantly among groups (excluding Sham). Brain Water Content was higher in the SAH and SAH+AAV-NC groups compared to the Sham ($P < 0.001$), indicating brain edema. However, the SAH + AAV-Neuritin and SAH + AAV-Neuritin + TUDCA groups exhibited a reduced extent of brain edema ($P < 0.05$). Evans blue extravasation was higher in the SAH group compared to the Sham ($P < 0.001$), indicating blood-brain barrier damage, which was lessened in the SAH + AAV-Neuritin and SAH + AAV-Neuritin + TUDCA groups ($P < 0.001$). (4) Western blot revealed that in the SAH group, the expression levels of p-NF- κ B/NF- κ B ratio, NLRP3, Cleaved-caspase3, GRP78, p-PERK, TRAF2, p-IRE1 α , p-eIF2 α , and

ATF6 were significantly increased compared to the Sham group ($P < 0.001$), the expression of p-AKT was significantly decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in protein expression between SAH and SAH + Vehicle groups. Compared to the SAH group, the SAH + TUDCA group exhibited significantly lower levels of p-NF- κ B/NF- κ B ratio, NLRP3, GRP78, p-PERK, TRAF2, p-IRE1 α , p-eIF2 α , ATF6 ($P < 0.01$), but significantly higher levels of p-AKT ($P < 0.001$). The SAH + BAY11-7082 group showed significantly lower levels of p-NF- κ B/NF- κ B ratio, NLRP3, Cleaved-caspase3 compared to the SAH group ($P < 0.05$). The SAH + AAV-Neuritin and SAH + AAV-Neuritin + TUDCA groups had significantly lower levels of these proteins compared to the SAH group ($P < 0.01$), with no significant differences between the SAH + AAV-Neuritin and SAH + AAV-Neuritin + TUDCA groups. Immunofluorescence results demonstrated that GRP78 and NLRP3 fluorescence intensity were notably higher in the SAH group compared to the Sham ($P < 0.001$) and significantly reduced in the SAH + AAV-Neuritin and SAH + AAV-Neuritin + TUDCA groups ($P < 0.001$), the GRP78 and NLRP3 fluorescence intensity with no significant differences between the SAH + AAV-Neuritin and SAH + AAV-Neuritin + TUDCA groups. (5) TUNEL staining indicated apoptosis rates were significantly elevated in the SAH group compared to the Sham ($P < 0.001$), with a significant reduction in apoptosis observed in the BAY11-7082 group ($P < 0.001$). There were no significant differences in apoptosis rates between the SAH and SAH + Vehicle groups. Comparatively, the apoptosis rates were significantly decreased in the SAH + AAV-Neuritin and SAH + AAV-Neuritin + TUDCA groups ($P < 0.001$), and the apoptosis rates with no significant differences between the SAH + AAV-Neuritin and SAH + AAV-Neuritin + TUDCA groups. (6) ELISA results revealed a significant increase in inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , IL-6) in the SAH group compared to the Sham ($P < 0.001$). The expression of inflammatory factors was lowered in the SAH + AAV-Neuritin and SAH + AAV-Neuritin + TUDCA groups compared to the SAH group ($P < 0.01$), with no significant differences between the SAH + AAV-Neuritin and SAH + AAV-Neuritin + TUDCA groups.

Conclusion: Neuritin attenuates neuroinflammation and reduces neuronal apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress-associated pathways, including IRE1 α -TRAF2-NF- κ B, PERK-eIF2 α -NF- κ B, and ATF6-NF- κ B pathways.

Key words: Subarachnoid Hemorrhage; Neuritin; Endoplasmic Reticulum Stress; Inflammation; Apoptosis.

目录

摘要.....	I
Abstract	III
目录.....	V
英文缩略词简表.....	VII
第一章 前言.....	1
第二章 材料与方法.....	4
2.1 实验材料.....	4
2.1.1 实验动物.....	4
2.1.2 主要试剂与耗材.....	4
2.1.3 主要实验仪器.....	6
2.1.4 主要实验试剂配制.....	7
2.1.5 腺相关病毒基因序列.....	7
2.2 实验方法.....	8
2.2.1 实验设计及分组.....	8
2.2.2 SAH 模型的制备.....	8
2.2.3 侧脑室注射.....	9
2.2.4 神经行为学评分.....	9
2.2.5 SAH 出血程度评分.....	10
2.2.6 脑组织 HE 染色.....	10
2.2.7 脑含水量测定.....	11
2.2.8 Evans 蓝染色.....	11
2.2.9 Western blot 检测相关蛋白.....	11
2.2.10 ELISA 检测相关炎症因子.....	13
2.2.11 TUNEL 染色检测细胞凋亡.....	14
2.2.12 双重免疫荧光染色.....	15
2.2.13 数据处理统计学分析.....	16
第三章 实验结果.....	17
3.1 SAH 大鼠模型鉴定.....	17
3.2 SAH 后内质网应激相关炎症通路及炎症相关蛋白的表达情况.....	18
3.3 SAH 后神经炎症对神经细胞凋亡作用的情况.....	19
3.4 AAV-Neuritin 转染效果检测.....	20

3.5 过表达 Neuritin 后各组大鼠 SAH 后神经功能评分.....	21
3.6 各组大鼠 SAH 出血程度评分.....	21
3.7 过表达 Neuritin 后各组脑含水量测定.....	22
3.8 过表达 Neuritin 后各组 Evans 蓝染色测定.....	23
3.9 过表达 Neuritin 后各组 TUNEL 染色检测神经细胞凋亡情况.....	23
3.10 过表达 Neuritin 后各组 ELISA 检测炎症相关因子表达变化.....	24
3.11 过表达 Neuritin 后各组 Western blot 检测炎症相关指标表达变化.....	25
3.12 过表达 Neuritin 后内质网应激炎症通路相关蛋白表达情况.....	26
第四章 讨论.....	28
第五章 结论与展望.....	32
第六章 文献综述.....	33
参考文献.....	40
致谢.....	47
作者简介.....	48
导师评阅表.....	49

英文缩略词简表

(List of Abbreviations)

英文缩写	英文全称	中文全称
SAH	Subarachnoid Hemorrhage	蛛网膜下腔出血
EBI	Early Brain Injury	早期脑损伤
ERS	Endoplasmic Reticulum Stress	内质网应激
UPR	Unfolded Protein Reaction	未折叠蛋白反应
GRP78	Glucose-Regulated Protein78	葡萄糖调节蛋白 78
IRE1 α	Inositol Requiring Enzyme1 α	肌醇激酶-1 α
TRAF2	TNF Receptor Associated Factor 2	TNF 受体相关因子 2
ATF6	Activating transcription factor6	激活转录因子 6
PERK	Protein kinase RNA-like ER kinase	蛋白激酶 RNA 样内质网激酶
eIF2 α	eukaryotic Initiation Factor 2	真核起始因子 2
NF- κ B	Nuclear factor - κ B	核因子- κ B
TNF- α	Tumour Necrosis Factor α	肿瘤坏死因子- α
IL-1 β	Interleukin-1 β	白介素-1 β
IL-6	Interleukin-6	白介素-6
Caspase3	Cysteine-requiring Aspartate Protease3	半胱氨酸天冬氨酸酶 3
HMGB1	High mobility group box1	高迁移率族蛋白 B1
PBS	Phosphate Buffer solution	磷酸盐缓冲液
H&E	Hematoxylin-eosin	苏木精-伊红
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
WB	Western Blot	蛋白质免疫印迹
TBS	Tris Buffered Saline	三乙醇胺缓冲盐水溶液
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺
ECL	Enhanced chemiluminescence	增强型化学发光试剂
PVDF	Polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
BBB	Blood Brain Barrier	血脑屏障

第一章 前言

蛛网膜下腔出血(Subarachnoid hemorrhage, SAH)是一种预后极差的脑血管疾病,约占所有卒中的 5%,但总的死亡率高达惊人的 27%^[1,2],迟发性脑缺血(Delayed cerebral ischemia, DCI)指 SAH 发病 3~14 天内脑的缺血性损伤。其导致了神经细胞的大规模死亡,对脑组织造成永久损伤,从而引起功能障碍,严重影响 SAH 患者的预后和生活质量。目前大量实验证据表明早期脑损伤(Early brain injury, EBI)在 DCI 及 SAH 预后不良中发挥重要作用。早期脑损伤的概念于 2004 年由 Kusaka 等学者提出,指的是血液进入蛛网膜下腔后的 72h 内对大脑造成的原始和直接的损伤^[3]。EBI 的病理生理变化和机制包括颅内压升高、氧化应激、神经炎症、微血栓形成、血脑屏障(Blood-brain barrier, BBB)破坏、脑水肿、微血管功能障碍、细胞凋亡、代谢紊乱和皮质弥漫性去极化(Cortical spreading depolarization and depression, CSD)^[4-6]。早期脑损伤所涉及的分子机制和信号传导路径极为复杂,而在这方面的研究中,神经炎症的发生发展成为研究的热点之一。

SAH 后的神经炎症被认为是导致脑组织损伤的关键机制之一。SAH 引起的强烈神经炎症反应通常涉及到细胞因子的释放、免疫细胞的激活和炎症介质的产生。这些炎症反应可以增加神经细胞的脆弱性,从而导致过度的氧化应激、能量代谢紊乱和凋亡信号通路的激活,进而引发神经细胞凋亡^[7, 8]。SAH 导致大量血液在蛛网膜下腔急速累积,造成局部组织压力升高和脑血流减少,进一步导致脑缺血和缺氧。这些因素激发氧化应激和炎症反应,生成过量的自由基和炎症介质。这些自由基损伤脑细胞中的脂蛋白质和 DNA,同时炎症介质增加细胞膜通透性,进一步破坏血脑屏障。受损的血脑屏障导致脑水肿,加剧神经细胞损伤。随着 SAH 后反应的进一步发展,细胞内钙离子超负荷、线粒体功能障碍和能量代谢紊乱是促进细胞凋亡的关键因素,引起 caspase 家族酶活化,最终导致细胞核 DNA 破坏及细胞结构损毁。这一连串病理过程导致了神经细胞的大规模死亡,对脑组织造成永久损伤。SAH 后的炎症反应可由多种因素引起。既往研究发现动脉瘤破裂后涌出的血液和脑损伤产生的各种分子,包括红细胞分解的变性产物(血红素、氯化血红素和高铁血红蛋白)和细胞内成分如高迁移率族蛋白 B1(High mobility group box1, HMGB1)^[9]、ATP 被认为是内源性危险信号(danger-associated molecular patterns, DAMPs), DAMPs 触发激活特定的受体,如 TLRs、P2X7 受体和晚期糖基化终末产物受体(the Receptor of Advanced Glycation Endproducts, RAGE),随后激活常见的下游炎症信号通路,释放炎症细胞因子^[10-12]。最近研究发现炎症反应和内质网应激

(Endoplasmic Reticulum stress, ER stress) 之间有着紧密联系, 在内质网应激期间, 细胞会激活一系列应激反应途径, 统称为未折叠蛋白质反应(Unfolded Protein Response, UPR)。UPR 旨在恢复内质网功能, 维护蛋白质折叠平衡, 并确保细胞内环境稳定。UPR 主要涉及三个受体: 激活的转录因子 6 (ATF6)、蛋白质激酶 RNA 样内质网激酶 (PERK) 和内质网应激诱导的激酶 1 (IRE1)。内质网应激通过 IRE1、PERK 和 ATF6 激活相关通路介导炎症反应。

在 UPR 过程中被激活的主要炎症信号蛋白是 NF- κ B。内质网应激三条通路 IRE1 α -TRAF2-NF- κ B 通路, PERK-eIF2 α -NF- κ B 通路, ATF6-NF- κ B 通路都可激活 NF- κ B。该三条通路通过激活 NF- κ B^[13]进而促进 NLRP3 炎症体的组装^[14]。研究发现 NLRP3 炎症体与 IL-1 β 和 IL-18 的释放有关, 加剧了 SAH 后的炎症反应促进了 EBI 的发生。干预 NLRP3 信号级联可减轻神经炎症反应, 恢复神经行为功能^[15, 16]。当内质网应激过度激活时, IRE1 α 经磷酸化与肿瘤坏死因子受体相关因子 2(TNF-receptor-associated factor 2, TRAF2)发生结合。招募 NF- κ B 激酶抑制剂(IKK)聚集在内质网附近。随后形成 IRE1 α -TRAF2-IKK 复合物使 I κ B 磷酸化导致 NF- κ B 游离并转位到细胞核。PERK 信号通路活化后, 使 eIF2 α 磷酸化, eIF2 α 磷酸化导致 mRNA 翻译的减弱提供了一种刺激 NF- κ B 的途径。ATF6 转移到高尔基体被 S1P 和 S2P 切割, 产生一个细胞质结构域作为活跃的转录因子发挥作用激活 NF- κ B。SAH 后神经炎症损害血脑屏障增加其通透性, 使得更多的免疫细胞和有害物质进入脑组织^[9, 17], 还激活免疫细胞导致进一步的神经元损伤和细胞死亡^[18, 19]。

细胞凋亡在 SAH 的病理生理过程中起着复杂且关键的作用, 它是神经细胞损伤和死亡的主要形式之一, 可导致神经细胞功能的丧失。神经炎症反应中产生的氧化应激、自由基、细胞因子和蛋白酶等不仅对血管组织造成直接伤害, 而且也对周围的神经细胞产生毒性效应激活细胞内的凋亡途径。最近研究发现抑制 PI3K/Akt/NF- κ B 通路可抑制蛛网膜下腔出血细胞模型的炎症和凋亡^[8, 20]。SAH 后脑组织缺血没有造成大面积脑梗死, 但缺血可导致颅内的组织细胞能量代谢出现障碍, 细胞凋亡与能量代谢密切相关。凋亡过程涉及诸如线粒体功能障碍、氧化应激、细胞内钙离子稳态失调、炎症反应以及各种细胞内信号传导途径的异常。随着神经细胞的丧失, 大脑的结构和功能遭受破坏, 导致脑组织水肿、脑血管痉挛乃至神经元死亡, 从而加剧了继发性脑损伤。这导致认知功能下降、运动障碍和其他神经递质失衡相关的功能障碍。因此, 细胞凋亡不仅直接涉及到 SAH 后的神经细胞损耗, 而且还可能通过上述间接途径促进了神经系统的各种病理变化, 从而显著影响 SAH 患者的恢复程度和最终预后。在研究神经细胞凋亡通路的过程中, 发现凋亡与亚细胞器官功能障碍有关, 如内质网应激、线粒体破坏和溶酶体激活。目前氧化应激、线粒体功能障碍、炎症等已被证实可以调控凋亡^[8]。神经细胞的凋亡与

神经炎症反应是两个紧密相连的病理生理过程，减少炎症引发的细胞凋亡是提高 SAH 预后的潜在治疗策略之一。

神经营养因子 (neurotrophic factors) 是一组能够促进神经元生存、发育和功能的蛋白质，例如脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)和神经营养因子-3(NT-3)。这些因子被认为可以通过多种机制来保护细胞。神经营养因子可抑制 ER 应激相关的炎症通路来保护细胞^[21]。还可抑制一些促炎细胞因子的产生^[22]，增强内质网蛋白质折叠及处理相关能力，并减少细胞内 ROS 的生成，这些都可能帮助降低 ER 应激和减轻 UPR 的不利影响^[23, 24]。通过这种方式，它们可以恢复细胞内环境的稳定，防止细胞走向凋亡。Neuritin 属于神经营养因子家族，可通过神经活动和神经营养因子的激活来加强神经突触的增长与分支形成。Neuritin 在神经元的可塑性和再生中起着重要的作用。作为一种在大脑发育以及神经修复中发挥作用的蛋白质日渐受到研究者的关注。特别是在蛛网膜下腔出血这种神经损伤背景下，Neuritin 有望成为新的治疗靶点。研究表明，SAH 后，大脑神经细胞可遭受到急性损伤，伴随的神经炎症和神经细胞凋亡会导致神经功能缺失。Neuritin 在这个过程中可发挥多重保护性作用。首先，关于神经炎症，Neuritin 能够抵制炎症因子的生产，比如降低肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 与白介素 1 β (IL-1 β) 等的水平，同时减轻小胶质细胞和星形胶质细胞的活化，这些细胞类型在大脑损伤的炎症反应中起到了重要作用。因此，通过调节免疫细胞和减少炎症因子的释放，Neuritin 有助于减轻 SAH 后脑组织的炎症损伤^[25]。其次，在抑制神经细胞凋亡方面，Neuritin 能影响凋亡相关蛋白的表达，如通过下调凋亡蛋白 Bax 的水平 and 上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的水平，从而抑制细胞凋亡过程。我们前期的研究表明，Neuritin 能够抑制 NLRP3 炎症体的形成，从而缓解神经炎症^[25]。同时，Neuritin 能够抑制蛛网膜下腔出血之后与内质网应激相关的蛋白质的表达水平，并降低了神经细胞的死亡率^[26, 27]。因此我们做出如下假设：SAH 后内质网应激相关炎症通路包括 IRE1 α -TRAF2-NF- κ B 通路，PERK-eIF2 α -NF- κ B 通路，ATF6-NF- κ B 通路加重了神经损伤；Neuritin 抑制内质网应激相关的炎症通路缓解神经炎症并进一步减少蛛网膜下腔出血后的神经细胞的凋亡。

为了证实以上假设我们构建了大鼠 SAH 模型，通过使用内质网应激抑制剂 TUDCA 及 NF- κ B 抑制剂 BAY11-7082，观察 SAH 后内质网应激相关炎症通路对神经炎症的影响，以及神经炎症对凋亡相关指标表达变化的影响；揭示内质网应激相关炎症通路对神经细胞凋亡的作用。用腺病毒转染过表达 Neuritin 蛋白，检测各组 NF- κ B、p-NF- κ B、NLRP3、Cleaved-caspase3、GRP78、p-PERK、TRAF2、ATF6、p-IRE1 α 、p-eIF2 α 、p-AKT 的表达水平变化。并用 TUNEL 试剂盒检测神经细胞的凋亡情况。用 ELISA 检测炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 的表达变化。探讨 Neuritin 抑制内质网应激减少神经细胞凋亡的机制，以期逆转或减轻由 SAH 引起的神经系统损伤。