基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003608

PERK信号通路介导的线粒体未折叠蛋白反应在低氧缺血性脑损伤中的作用

王映云，于利国，曹海燕，李艳芳
（武汉市第一医院/武汉市中西医结合医院康复医学科，武汉 430022）

【摘 要】目的：探讨蛋白激酶RNA样ER激酶（protein kinase RNA-like ER kinase，PERK）信号通路介导的线粒体未折叠蛋白反应（mitochondrial unfolded protein response，mtUPR）在缺氧缺血性脑损伤（hypoxic-ischemic brain injury，HIBI）中的作用。**方法：**将大鼠随机分为假手术（Sham）组和5个HIBI亚组（HIBI后3、6、12、24、48 h）。用于蛋白质印迹检测PERK、转录激活因子4（activating transcription factor 4，ATF4）、热休克蛋白60（heat shock protein 60，HSP60）蛋白的时程表达。将大鼠随机分为Sham组、HIBI组、HIBI + PERK组和HIBI+载体（Vector）组，每组15只。HIBI+PERK组和HIBI+Vector组大鼠在HIBI手术前1 h，将基于腺病毒相关病毒（adeno-associated virus，AAV）的PERK过表达质粒或AAV载体注射到脑室内，用于特异性表达PERK。在HIBI后24 h进行FJC染色分析神经元变性和DHE染色、酶联免疫吸附试验分析氧化应激。将大鼠随机分为Sham组、HIBI组、HIBI+PERK激动剂（CCT020312）组，每组12只。在HIBI手术前1 h，向HIBI+CCT020312组大鼠脑室内注射CCT020312。在HIBI后3周进行开阔场地测试和莫里斯水迷宫测试。**结果：**与Sham组相比，PERK、ATF4、HSP60在HIBI后3 h开始明显升高，在12 h达到高峰，然后逐渐下降，直到48 h（F=60.23、56.72、74.31，均P<0.001）。与HIBI组相比，HIBI+PERK组神经元变性的数量（100.2 ± 3.1 vs. 582.4 ± 15.7，P<0.001）、活性氧（reactive oxygen species，ROS）（42.4 ± 2.9 vs. 17.7 ± 2.1，P<0.01）、丙二醛（Malondialdehyde，MDA）（0.81 ± 0.06 vs. 0.54 ± 0.04，P<0.001）水平显著降低，和谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSHPx）（112.4 ± 3.6 vs. 177.5 ± 6.6，P<0.05）、超氧化物歧化酶（superoxide Dismutase，SOD）活性（46.3 ± 1.9 vs. 64.2 ± 2.3，P<0.05）活性明显增加。与Sham组相比，HIBI组大鼠海马组织中PERK（1.00 ± 0.03 vs. 1.66 ± 0.08，P<0.01）、ATF4（1.00 ± 0.04 vs. 1.53 ± 0.06，P<0.05）、动力蛋白相关蛋白1（dynamin-related protein 1，Drp1）（1.00 ± 0.02 vs. 1.98 ± 0.07，P<0.01）、HSP60（1.00 ± 0.03 vs. 1.37 ± 0.04，P<0.05）蛋白表达均明显增加（P<0.05）。与HIBI组相比，HIBI+PERK组大鼠海马组织中PERK（1.66 ± 0.08 vs. 2.95 ± 0.17，P<0.01）、ATF4（1.53 ± 0.06 vs. 3.42 ± 0.22，P<0.01）、HSP60（1.37 ± 0.04 vs. 2.03 ± 0.09，P<0.05）蛋白表达均明显增加（F=46.72、30.63、20.64，P<0.001），和Drp1（1.98 ± 0.07 vs. 1.04 ± 0.05，P<0.05）蛋白表达明显降低（F=35.72，P<0.001）。HIBI+CCT020312组的平均逃避潜伏期和平台穿越次数均较HIBI组明显增加（F=246.84、113.62，P<0.001）。**结论：**PERK减轻HIBI模型诱导的氧化应激和神经元凋亡，其机制可能涉及PERK/ATF4信号通路对mtUPR的调节。通过CCT020312给药具有神经保护作用。

【关键词】蛋白激酶RNA样ER激酶；线粒体未折叠蛋白反应；缺氧缺血性脑损伤；神经元
【中图分类号】R743.31 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2023-09-25

Role of PERK signaling pathway-mediated mitochondrial unfolded protein response in hypoxic-ischemic brain injury

Wang Yingyun，Yu Liguo，Cao Haiyan，Li Yanfang
（*Department of Rehabilitation Medicine，The First Hospital of Wuhan / Wuhan Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital*）

【Abstract】*Objective*：To examine the role of mitochondrial unfolded protein response（mtUPR）mediated by the protein kinase RNA-like ER kinase（PERK）signaling pathway in hypoxic-ischemic brain injury（HIBI）. ***Methods*：**Rats were randomly divided into the sham group and five HIBI groups（3，6，12，24 and 48 h after HIBI）for Western blot analysis of PERK，activating transcription factor 4（ATF4），and heat shock protein 60（HSP60）protein expression over time. In another experiment，rats were randomly divided into the sham group，HIBI group，HIBI+PERK group，and HIBI+Vector group，with 15 rats in each group. Rats in the HIBI+PERK group

作者介绍：王映云，Email：noo7097@163.com，研究方向：心脑血管康复。
通信作者：李艳芳，Email：2424588058qq.com。
基金项目：湖北省卫生健康科研基金资助项目（编号：2021B548K）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.r.20241023.0949.032（2024-10-23）

and HIBI+Vector group were given intracerebroventricular injection of adeno-associated virus (AAV)-based PERK overexpression plasmid or empty AAV vector 1 h before HIBI to induce specific PERK expression. FJC staining was performed 24 h after HIBI to analyze neuronal degeneration, and oxidative stress was examined by DHE staining and enzyme-linked immunosorbent assay. In a third experiment, rats were randomly divided into the sham group, HIBI group and HIBI+CCT020312 (PERK agonist) group, with 12 rats in each group. Rats in the HIBI+CCT020312 group were given intracerebroventricular injection of CCT020312 one hour before HIBI. Open field test and Morris water maze test were performed 3 weeks after HIBI. ***Results***: Compared with the sham group, the HIBI groups showed significantly increased PERK, ATF4, and HSP60 expression at 3 h post-HIBI, which peaked at 12 h and then gradually decreased until 48 h (F=60.23, 56.72, 74.31, all P<0.001). The HIBI+PERK group had significantly lower number of degenerated neurons (100.2 ± 3.1 vs. 582.4 ± 15.7, P<0.001), reactive oxygen species (ROS) level (42.4 ± 2.9 vs. 17.7 ± 2.1, P<0.01), and malondialdehyde (MDA) level (0.81 ± 0.06 vs. 0.54 ± 0.04, P<0.001), but significantly higher glutathione peroxidase (GSH-Px) activity (112.4 ± 3.6 vs. 177.5 ± 6.6, P<0.05) and superoxide dismutase (SOD) activity (46.3 ± 1.9 vs. 64.2 ± 2.3, P<0.05), as compared with the HIBI group. PERK (1.00 ± 0.03 vs. 1.66 ± 0.08, P<0.01), ATF4 (1.00 ± 0.04 vs. 1.53 ± 0.06, P<0.05), dynamin-related protein 1 (Drp1; 1.00 ± 0.02 vs. 1.98 ± 0.07, P<0.01), and HSP60 (1.00 ± 0.03 vs. 1.37 ± 0.04, P<0.05) protein expression in the hippocampal tissue were significantly higher in the HIBI group than in the sham group. Furthermore, the HIBI+PERK group demonstrated significantly higher PERK (1.66 ± 0.08 vs. 2.95 ± 0.17, P<0.01), ATF4 (1.53 ± 0.06 vs. 3.42 ± 0.22, P<0.01), and HSP60 (1.37 ± 0.04 vs. 2.03 ± 0.09, P<0.05) protein expression (F=46.72, 30.63, 20.64, P<0.001) but significantly lower Drp1 (1.98 ± 0.07 vs. 1.04 ± 0.05, P<0.05) protein expression in the hippocampal tissue than the HIBI group (F=35.72, P<0.001). Mean escape latency and the number of platform crossings were significantly higher in the HIBI+CCT020312 group than in the HIBI group (F=246.84, 113.62, P<0.001). ***Conclusion***: PERK attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis induced by HIBI, possibly through the regulation of mtUPR via the PERK/ATF4 signaling pathway. CCT020312 has neuroprotective effects in HIBI.

【Key words】protein kinase RNA-like ER kinase; mitochondrial unfolded protein response; hypoxic ischemic brain injury; neuron

缺氧缺血性脑损伤（hypoxic-ischemic brain injury，HIBI）主要由围产期窒息引起，发生率为2.5/千，通常会导致长期的神经损伤和障碍（如学习和记忆障碍）[1]。尽管低温治疗已在临床上批准用于HIBI，但治疗效果并不令人满意，并且在最佳治疗窗口内（HIBI后6 h内）进行低温干预可能很困难[2-3]。此外，由于对HIBI相关的确切潜在机制和病理生理学了解不足，个性化治疗的发展受到限制；因此，进一步的研究是必要的，以适应HIBI治疗方案。神经元损伤是导致HIBI后认知功能障碍的直接原因[4]。氧化应激被认为是导致神经元损伤的重要机制[5]。在实验性模型中，抗氧化治疗具有神经保护和抗血管痉挛作用[6]。线粒体是活性氧（reactive oxygen species，ROS）的重要产生者，也是氧化应激的主要场所，氧化应激可以破坏线粒体的完整性，并在许多病理状态下引发线粒体功能障碍[7]。已证实线粒体功能障碍可引起多种神经系统异常[8]。线粒体生物发生在维持中枢神经系统中线粒体的完整性方面起着重要的作用；其中线粒体未折叠蛋白反应（mitochondrial unfolded protein response，mtUPR）通过调节分子伴侣和线粒体相关蛋白酶的转录而被激活，以恢复线粒体功能[9-10]。最近研究表明，mtUPR参与了受损线粒体的修复，以减轻帕金森氏病毒介导的神经元损伤[11]。此外，mtUPR是细胞适应低氧微环境的一种自我保护过程[12]。然而，HIBI期间mtUPR在海马神经元损伤中的作用仍不清楚。蛋白激酶RNA样ER激酶（protein kinase RNA-like ER kinase，PERK）是一种氧化应激诱导的转录因子，参与氨基酸的代谢和转运以及蛋白质稳态的维持[13]。研究表明，PERK与线粒体功能密切相关[14]。最近1项研究报道，PERK可以通过诱导mtUPR来减轻肺泡上皮细胞的损伤[15]。因此，这项研究重点分析了HIBI期间PERK通路在新生大鼠海马组织中的时程表达，并分析PERK通路表达上调对mtUPR和海马神经元损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

7 d龄Sprague-Daw ley大鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司，饲养在无特定病原体的动物区，温度为（24 ± 1）℃，光照/黑暗周期为12 h，可随意进食和饮水。本研究中使用的方法和协议由本院动物伦理委员会批准。

1.2 新生儿HIBI模型

参照文献方法建立新生儿HIBI模型[16]。在七氟醚麻醉

后5 min内，通过颈部的小切口，使用7-0外科手术丝线永久结扎大鼠（性别比为1∶1）的左侧颈总动脉。唤醒后让大鼠恢复2 h。此后，将大鼠幼仔置于8%O_2、92%N_2和37 ℃下的低氧室中2 h。

1.3 实验分组设计

1.3.1 实验1 将24只大鼠分为假手术（Sham）组（n=6）和5个HIBI亚组[HIBI后3 h（n=3）、6 h（n=3）、12 h（n=3）、24 h（n=6）、48 h（n=3）]。各组取3只用于蛋白质印迹检测PERK、转录激活因子4（activating transcription factor 4，ATF4）、热休克蛋白60（heat shock protein 60，HSP60）蛋白的时程表达。此外，将假手术组和HIBI 24 h亚组其余3只通过双重荧光染色进行PERK的细胞定位。

1.3.2 实验2 将60只大鼠随机分为Sham组、HIBI组、HIBI+PERK组和HIBI+载体（Vector）组，每组15只。HIBI+PERK组和HIBI+Vector组大鼠在HIBI手术前1 h，将基于腺病毒相关病毒（adeno-associated virus，AAV）的PERK过表达质粒或AAV载体（1×10^{12} vg/mL，3 μL）注射到脑室内，用于特异性表达PERK。在HIBI后24 h进行DHE染色（n=4）、FJC染色（n=4）、酶联免疫吸附试验（n=6）、蛋白质印迹（n=6）和免疫荧光染色（n=4）。

1.3.3 实验3 将36只大鼠随机分为Sham组、HIBI组、HIBI+PERK激动剂（CCT020312）组，每组12只。在HIBI手术前1 h，向HIBI+CCT020312组大鼠脑室内注射3 pmol/3 μL CCT020312（溶解在含有1%二甲基亚砜中，美国MedChemExpress公司）。在HIBI后3周进行开阔场地测试（n=8）和莫里斯水迷宫测试（n=8）。

1.4 蛋白质印迹

收集实验大鼠的海马组织，并在放射免疫沉淀分析裂解缓冲液中制备匀浆（上海碧云天公司）。通过电泳分离等量的蛋白质到聚偏二氟乙烯膜，用初级抗体在4 ℃探测膜过夜，并在室温下用辣根过氧化物酶偶联的二级抗体（美国Affinity公司）孵育2 h。使用增强化学发光对免疫反应性进行可视化。使用的一抗如下：抗PERK抗体（1∶1 000）、抗ATF4抗体（1∶1 000）、抗动力蛋白相关蛋白1（dynamin-related protein 1，Drp1）抗体（1∶1 000）、抗HSP60抗体（1∶1 000）、抗甘油醛3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（1∶1 000，均购自美国Abcam公司）。

1.5 免疫荧光染色

制备石蜡包埋的脑切片（4 μm厚度），在室温下用5%山羊血清（北京Solarbio公司）封闭切片30 min，然后在4 ℃下与抗PERK抗体（1∶50）、抗HSP60抗体（1∶60）孵育过夜。用Alexa Fluor 594山羊抗小鼠IgG（1∶400，美国Abcam公司）或Alexa Fluor 488山羊抗兔IgG（1∶400，美国Abcam公司）在37 ℃下反应1 h。使用Hoechst 33342（美国Sigma公司）对细胞核染色15 min。由DMI8荧光显微镜（德国Leica公司）捕捉图像。

1.6 氟玉C（fluoro-Jade C，FJC）染色

使用商业检测试剂盒（德国Millipore公司）进行FJC染色以评估退化的神经元。脑切片与FJC反应混合物在室温下孵育1 h。切片用4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（4′，6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）染色以显示细胞核。在DM2500光学显微镜系统（德国Leica公司）下观察并获得图像。

1.7 ROS水平的测量

将新鲜制备的冷冻脑切片（10 μm）与2 μmol/L荧光染料二氢乙锭（dihydroethidium，DHE，美国Thermo Fisher Scientific公司）在37 ℃下在潮湿的室温中避光孵育30 min。通过光学显微镜获得DHE染色的图像。

1.8 酶联免疫吸附测定

分别用蛋白质羰基（proteincarbonylation，PCO）和丙二醛（malondialdehyde，MDA）检测试剂盒分析脑氧化损伤指标的水平。分别用SOD测定试剂盒和GSHPx测定试剂盒测定抗氧化因子超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）和谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSHPx）活性水平。所有试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司。

1.9 开阔场地测试（open-field test，OFT）

在HIBI后第21天使用黑色正方形开放视野装置（100 cm×100 cm×45 cm）进行OFT。地板分为中心区和边缘区，并在2次测试之间用70%的乙醇清洗。使用EthoVision XT视频跟踪系统（荷兰Noldus公司）监测其活动10 min，记录运动、行进距离和平均速度。

1.10 莫里斯水迷宫（morris water maze，MWM）

在HIBI后第22~27天进行MWM测试。将温水（20±1）℃注入1个圆形水池（直径，160 cm；高度，60 cm）中，水深度为15 cm。连续5 d每天进行4次训练。将8只大鼠分别从不同象限放入水中，并允许它们搜寻平台长达90 s。未能找到平台的大鼠被引导至平台。诱导所有大鼠在平台上停留20 s。逃避潜伏期定义为到达平台所需的时间。对于无法在规定时间内找到平台的大鼠，逃跑潜伏期记录为90 s。在HIBI后第27天，将大鼠放入水中，并在没有平台的情况下自由游泳90 s。使用EthoVision XT视频跟踪系统（荷兰Noldus公司）监测和分析逃避潜伏期、游泳路径、游泳速度。

1.11 统计学方法

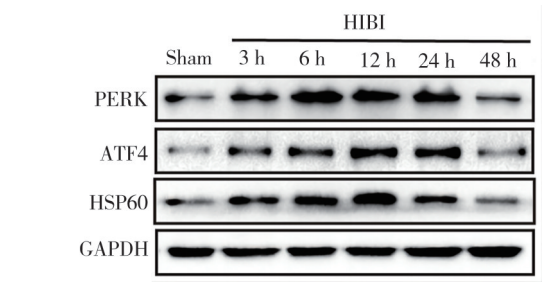
使用SPSS 19.0软件进行所有统计分析，数据以平均值±标准偏差（$\bar{x}\pm s$）表示。采用单因素方差分析进行多组间比较，随后进行LSD检验或Dunnett的T3检验组间两两比较。检验水准α=0.05。

2 结 果

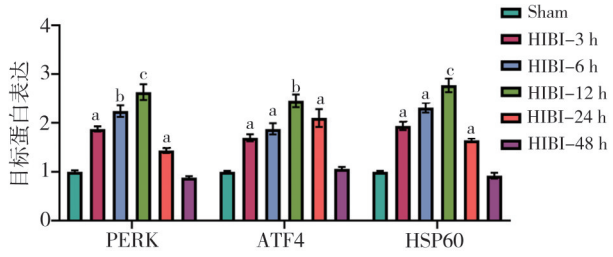
2.1 HIBI模型和HIBI后PERK、ATF4、HSP60的时程表达

与Sham组相比，PERK、ATF4、HSP60在HIBI后3 h开始明显升高，在12 h达到高峰，然后逐渐下降，直到48 h（F=60.23、56.72、74.31，均P<0.001）（图1A、B）。此外，双重免疫荧光染色显示PERK位于大脑皮质的神经元（NeuN）中，并

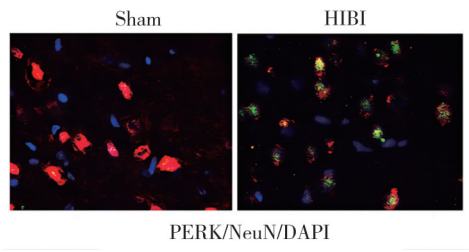
且在HIBI后24 h，PERK阳性神经元的数量明显高于Sham组（图1C）。



A. 蛋白质印迹检测蛋白表达



B. ERK、ATF4、HSP60蛋白表达的定量分析



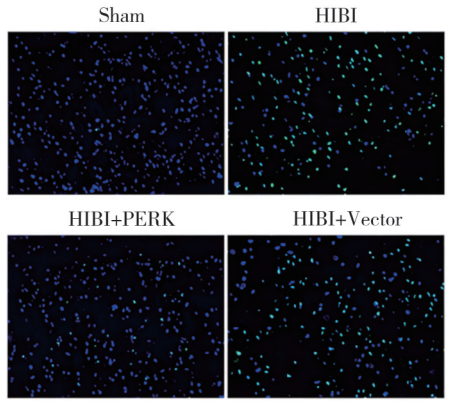
C. PERK-NeuN双重染色

注：绿色荧光：PERK，红色荧光：神经元，蓝色荧光：细胞核。a，与Sham组相比，$P<0.05$；b，与Sham组相比，$P<0.01$；c，与Sham组相比，$P<0.001$

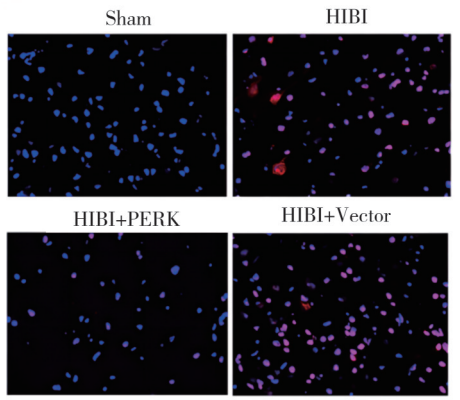
图1 HIBI后PERK、ATF4、HSP60的时程表达（$n=3$）

2.2 PERK参与调节保护HIBI后的神经元变性、氧化应激

FJC染色分析大鼠大脑海马组织中神经元变性情况显示：与Sham组相比，HIBI组神经元变性的数量明显增加（$P<0.001$）。与HIBI组相比，HIBI+PERK组神经元变性的数量明显降低（$P<0.01$）（图2A、表1）。DHE染色和ELISA分析大鼠大脑海马组织中氧化应激情况显示：与Sham组相比，HIBI组ROS、MDA、PCO水平明显增加（$P<0.001$），和GSH-Px、SOD活性明显降低（$P<0.001$）。与HIBI组相比，HIBI+PERK组ROS、MDA、PCO水平明显降低（$P<0.01$），和GSH-Px、SOD活性明显增加（$P<0.05$）（图2B、表1）。



A. FJC染色



B. DHE染色

图2 PERK参与调节保护HIBI后的神经元变性、氧化应激

2.3 PERK参与调节保护HIBI后的mtUPR调节

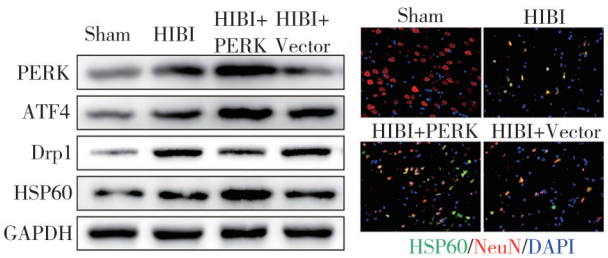
通过蛋白质印迹检测大鼠大脑海马组织中PERK、ATF4、Drp1、HSP60的蛋白表达水平情况显示：与Sham组相比，HIBI组大鼠海马组织中PERK、ATF4、Drp1、HSP60蛋白表达均明显增加（$P<0.05$）。与HIBI组相比，HIBI+PERK组大鼠海马组织中PERK、ATF4、HSP60蛋白表达均明显增加（$P<0.05$），和Drp1蛋白表达明显降低（$P<0.05$）（图3A、表2）。

表1 PERK参与调节保护HIBI后的神经元变性、氧化应激（$n=6, \bar{x}\pm s$）

组别	FJC阳性神经元数量/mm^2	ROS水平（%）	MDA（nmol/mg·protein）	PCO（ng/mg·protein）	GSH-Px（mU/mg·protein）	SOD（U/mg·protein）
Sham	100.24 ± 3.08	5.00 ± 1.08	0.42 ± 0.03	9.81 ± 0.78	241.00 ± 5.78	78.53 ± 2.9 *2*
HIBI	582.42 ± 15.67[a]	42.42 ± 2.89[a]	0.81 ± 0.06[a]	22.40 ± 2.56[a]	112.38 ± 3.56[a]	46.30 ± 1.88[a]
HIBI+PERK	325.56 ± 10.30[c]	17.67 ± 2.10[c]	0.54 ± 0.04[c]	15.33 ± 1.14[b]	177.49 ± 6.62[b]	64.19 ± 2.35[b]
HIBI+Vector	575.89 ± 12.04[a]	47.58 ± 3.77[a]	0.79 ± 0.03[a]	21.7 ± 2.2[a]	118.20 ± 4.78[a]	47.03 ± 1.78[a]
*F*值	207.6	91.4	46.8	40.7	62.5	32.9
*P*值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与Sham组相比，$P<0.001$；b，与HIBI组相比，$P<0.05$；c，与HIBI组相比，$P<0.01$

此外，与免疫印迹分析一致，来自不同组的神经元中 HSP60 也出现类似变化（图 3B）。



A. 蛋白质印迹分析　　B. HSP60-NeuN双重染色

注：绿色荧光：HSP60，红色荧光：神经元，蓝色荧光：细胞核

图 3　PERK 参与调节保护 HIBI 后的 mtUPR 调节

2.4　CCT020312 治疗可缓解 HIBI 相关的学习和记忆障碍

CCT020312 是一种 PERK 激动剂，本研究进行了行为测试，以确定 PERK/ATF4 信号在 HIBI 诱导的学习和记忆障碍中的作用。OFT 结果显示，3 组的平均速度和总距离差异无统计学意义（$P>0.05$）。与 Sham 组相比，HIBI 组的平台穿越次数明显降低（$P<0.001$）。与 HIBI 组相比，HIBI+CCT020312 组的平台穿越次数显著增加（$P<0.001$）（表 3）。此外，MWM 结果表明，与 Sham 组相比，HIBI 组的平均逃避潜伏期显著降低（$P<0.05$）。HIBI+CCT020312 组的平均逃避潜伏期较 HIBI 组显著增加（$P<0.01$）（表 4）。

3　讨　论

HIBI 是新生儿脑损伤的一种常见形式，具有终身神经损伤的高风险[17]。本研究的主要发现如下：①PERK/ATF4 信号通路在 HIBI 后 12 h 达到高峰，并在之后逐渐降低；②施用外源性 PERK 促进了 mtUPR 相关蛋白 HSP60 的表达，并在一定程度上保护了大脑免受 HIBI 的影响；③PERK 激动剂 CCT020312 在一定程度上恢复了 HIBI 导致的学习和记忆损伤。这些数据突出了 PERK/ATF4 信号通路可作为 HIBI 治疗的潜在治疗靶点。

线粒体生物发生在维持中枢神经系统中线粒体的完整性方面起着重要的作用[18]。最近研究证

表 2　通过蛋白质印迹检测 PERK、ATF4、Drp1、HSP60 的蛋白表达水平（$n=6, \bar{x}\pm s$）

组别	PERK	ATF4	Drp1	HSP60
Sham	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.03
HIBI	1.66 ± 0.08[b]	1.53 ± 0.06[b]	1.98 ± 0.07[b]	1.37 ± 0.04[a]
HIBI+PERK	2.95 ± 0.17[d]	3.42 ± 0.22[d]	2.03 ± 0.09[d]	1.04 ± 0.05[c]
HIBI+Vector	1.60 ± 0.07[b]	1.48 ± 0.08[b]	1.92 ± 0.09[b]	1.33 ± 0.03[a]
F 值	246.72	30.63	35.72	20.64
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与 Sham 组相比，$P<0.05$；b，与 Sham 组相比，$P<0.01$；c，与 HIBI 组相比，$P<0.05$；d，与 HIBI 组相比，$P<0.01$

表 3　OFT 期间测量的总距离、平均速度和平台穿越次数的统计结果（$n=8, \bar{x}\pm s$）

组别	总距离（cm）	平均速度（cm/s）	平台穿越次数（次）
Sham	3982.00 ± 154.00	7.00 ± 0.38	9.00 ± 2.03
HIBI	4375.00 ± 207.00	7.48 ± 0.50	1.00 ± 0.51[a]
HIBI+CCT020312	4108.00 ± 226.00	7.31 ± 0.42	7.02 ± 1.45[b]
F 值	1.36	0.53	113.62
P 值	0.205	0.736	<0.001

注：a，与 Sham 组相比，$P<0.001$；b，与 HIBI 组相比，$P<0.001$

表 4　逃避潜伏期的测量结果（$n=8, \bar{x}\pm s$）

组别	时间（d）				
	1	2	3	4	5
Sham	70.02 ± 5.11	39.04 ± 4.38	21.04 ± 3.42	11.03 ± 1.24	10.45 ± 0.78
HIBI	85.00 ± 5.97[a]	84.00 ± 5.42[b]	83.21 ± 8.01[b]	72.96 ± 9.00[b]	58.00 ± 9.56[b]
HIBI+CCT020312	73.00 ± 4.98	44.01 ± 5.03[c]	30.54 ± 4.56[d]	18.22 ± 2.33[d]	15.13 ± 1.89[c]
F 值	4.92	19.37	26.75	33.92	21.24
P 值	0.039	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与 Sham 组相比，$PP<0.05$；b，与 Sham 组相比，$P<0.001$；c，与 HIBI 组相比，$P<0.01$；d，与 HIBI 组相比，$P<0.001$

实，低氧微环境可能影响线粒体生物发生的基因变化[19]。另一项研究表明，线粒体抗氧化剂保护缺氧缺血性神经元损伤[20-21]。当线粒体应激发生时，细胞通过激活 mtUPR 启动部分保护[22]。此外，mtUPR 是细胞适应低氧微环境的一种自我保护过程[12]。PERK/ATF4 通路被证明是调节 mtUPR 的关键因子[23-24]。因此，本研究试图确定 PERK/ATF4 通路调节的 mtUPR 对 HIBI 诱导的细胞凋亡的影响。在目前的研究中，本课题组发现 PERK、ATF4 的表达和 mtUPR 相关蛋白 HSP60 在 HIBI 后 12 h 内显著上调，之后逐渐下调。外源性 PERK 增加 PERK/ATF4 通路和 HSP60 表达。本研究结果表明，PERK/ATF4 通路可能参与调节 mtUPR 激活。

细胞启动一系列适应性修复保护机制，以抵抗线粒体功能障碍，如 mtUPR。HSP60 是调节细胞内代谢的 mtUPR 相关分子，其具有与线粒体 DNA 稳定性相关的特异性结合活性，并维持线粒体功能[25]。PERK 作为内质网中启动未折叠蛋白反应的传感器之一，其能与线粒体通讯，调节线粒体相关内质网膜（mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes，MAM）的氧化应激[12]。此外，PERK 是 MAM 的主要成分之一，能与多功能主链蛋白相互作用，并在接触部位调节整体代谢物如脂质、ROS 和 Ca^{2+} 的交换。MAM 也是启动自噬的关键位点，通过特定的调节蛋白清除有缺陷的细胞器和错误折叠的蛋白质[26]。因此，PERK 将信号从细胞核传递到这些膜结构的细胞器，这些细胞器形成一个相互连接的网络来调节 mtUPR。近年来，靶向异常的 mtUPR 信号是神经系统疾病新的治疗策略研究的焦点，并且研究证实 PERK 通路介导的 mtUPR 激活在神经疾病中在治疗作用，如神经退行性疾病[27]。在本研究中，PERK 过表达减轻了 HIBI 诱导的神经元变性、氧化应激，抑制 Drp1 触发的线粒体凋亡。基于这一发现，本课题组认为 PERK 可能调节 mtUPR 水平，并在 HIBI 模型中对神经元损伤发挥保护作用。

由于对临床医生管理 HIBI 患者的现有方法不满意，一些新的治疗概念，包括外源性和内源性修复策略，已被研究用于未来的临床治疗。外源性修复方法，如采用干细胞来取代丢失的神经元，并将其整合到现有的宿主受损区域中，促进生长因子的释放，以支持和刺激内源性修复过程等[28]。然而，在这些方法转化为临床治疗之前，需要克服许多障碍，如注射细胞（主要研究间充质基质细胞）的长期存活，以及患者未来将面临的经济负担[29]。相反，基于提高存活细胞的活力和功能的内源性修复策略抵消了与外源性修复疗法相关的缺点，这种策略在临床翻译中表现出更大的潜力，并吸引了当今研究者的更多目光[30]。本研究中，利用大鼠 HIBI 模型，本研究发现了 CCT020312（PERK 信号化学激动剂）治疗可缓解 HIBI 相关的学习和记忆障碍。因此，CCT020312 可能是内源性 mtUPR 靶向治疗的潜在候选物，以延缓甚至逆转 HIBI 的进程。

总之，本研究结果表明 PERK 减轻 HIBI 模型诱导的氧化应激和神经元凋亡，其机制可能涉及 PERK/ATF4 信号通路对 mtUPR 的调节。通过 CCT020312 给药具有神经保护作用。这些结果在一定程度上为 HIBI 的治疗提供了新的见解。需要强调的是，这项研究有以下局限性。首先，脑室注射 CCT020312 在临床实践中还没有广泛应用。第二，虽然本研究关注的是 PERK/ATF4 信号通路，但其他途径可能与 mtUPR 有关。因此，在未来的研究中应进一步考察 PERK/ATF4 信号通路的作用机制，并探讨其他可能与 mtUPR 相关的途径。

参 考 文 献

[1] You Q，Lan XB，Liu N，et al. Neuroprotective strategies for neonatal hypoxic-ischemic brain damage：current status and challenges[J]. Eur J Pharmacol，2023，957：176003.

[2] Greco P，Nencini G，Piva I，et al. Pathophysiology of hypoxic-ischemic encephalopathy：a review of the past and a view on the future [J]. Acta Neurol Belg，2020，120(2)：277-288.

[3] Lee BL，Glass HC. Cognitive outcomes in late childhood and adolescence of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Clin Exp Pediatr，2021，64(12)：608-618.

[4] Chevin M，Chabrier S，Allard MJ，et al. Necroptosis blockade potentiates the neuroprotective effect of hypothermia in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Biomedicines，2022，10(11)：2913.

[5] Cheng S，Chen C，Wang LL. Gelsemine exerts neuroprotective effects on neonatal mice with hypoxic-ischemic brain injury by suppressing inflammation and oxidative stress via Nrf2/HO-1 pathway[J]. Neurochem Res，2023，48(5)：1305-1319.

[6] Arteaga Cabeza O，Zhang Z，Smith Khoury E，et al. Neuroprotective effects of a dendrimer-based glutamate carboxypeptidase inhibitor on superoxide dismutase transgenic mice after neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. Neurobiol Dis，2021，148：105201.

[7] Lu HD, Wang XL, Li M, et al. Mitochondrial unfolded protein response and integrated stress response as promising therapeutic targets for mitochondrial diseases[J]. Cells, 2022, 12(1): 20.

[8] Lee Y, Heo JY, Ju XS, et al. General anesthesia activates the mitochondrial unfolded protein response and induces age-dependent, long-lasting changes in mitochondrial function in the developing brain[J]. Neurotoxicology, 2021, 82: 1-8.

[9] Zhao Y, Li HX, Luo Y, et al. Lycopene mitigates DEHP-induced hepatic mitochondrial quality control disorder via regulating SIRT1/PINK1/mitophagy axis and mitochondrial unfolded protein response[J]. Environ Pollut, 2022, 292(Pt B): 118390.

[10] Zhu MX, Ma XF, Niu X, et al. Mitochondrial unfolded protein response in ischemia-reperfusion injury[J]. Brain Res, 2022, 1797: 148116.

[11] Dastidar SG, Pham MT, Mitchell MB, et al. 4E-BP1 protects neurons from misfolded protein stress and Parkinson's disease toxicity by inducing the mitochondrial unfolded protein response[J]. J Neurosci, 2020, 40(45): 8734-8745.

[12] Feng Y, Nouri K, Schimmer AD. Mitochondrial ATP-dependent proteases-biological function and potential anti-cancer targets[J]. Cancers, 2021, 13(9): 2020.

[13] Lebeau J, Saunders JM, Moraes VWR, et al. The PERK arm of the unfolded protein response regulates mitochondrial morphology during acute endoplasmic reticulum stress[J]. Cell Rep, 2018, 22(11): 2827-2836.

[14] Almeida LM, Pinho BR, Duchen MR, et al. The PERKs of mitochondria protection during stress: insights for PERK modulation in neurodegenerative and metabolic diseases[J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2022, 97(5): 1737-1748.

[15] Leterme S, Michaud M. Mitochondrial membrane biogenesis: a new pathway for lipid transport mediated by PERK/E-Syt1 complex[J]. J Cell Biol, 2023, 222(3): e202301132.

[16] Xue H, Zhang YH, Gao QS, et al. Sevoflurane post-conditioning ameliorates neuronal deficits and axon demyelination after neonatal hypoxic ischemic brain injury: role of microglia/macrophage[J]. Cell Mol Neurobiol, 2021, 41(8): 1801-1816.

[17] Ji XL, Zhou YY, Gao QQ, et al. Functional reconstruction of the basal Ganglia neural circuit by human striatal neurons in hypoxic-ischaemic injured brain[J]. Brain, 2023, 146(2): 612-628.

[18] Jiang Y, Li D, Du ZQ, et al. Perampanel stimulates mitochondrial biogenesis in neuronal cells through activation of the SIRT1/PGC-1α signaling pathway[J]. ACS Chem Neurosci, 2021, 12(2): 323-329.

[19] Meng H, Sun LK, Su J, et al. Serine protease HtrA2/Omi regulates adaptive mitochondrial reprogramming in the brain cortex after ischemia/reperfusion injury via UCP2-SIRT3-PGC1 axis[J]. Hum Cell, 2022, 35(1): 63-82.

[20] Al Rahim M, Thatipamula S, Pasinetti GM, et al. Neuronal pentraxin 1 promotes hypoxic-ischemic neuronal injury by impairing mitochondrial biogenesis via interactions with active bax[6A7]and mitochondrial hexokinase II[J]. ASN Neuro, 2021, 13: 17590914211012888.

[21] Lee MJ, Jang Y, Zhu JB, et al. Auraptene enhances junction assembly in cerebrovascular endothelial cells by promoting resilience to mitochondrial stress through activation of antioxidant enzymes and mtUPR[J]. Antioxidants, 2021, 10(3): 475.

[22] Yuan Y, Tian Y, Jiang H, et al. Mechanism of PGC-1α-mediated mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Front Mol Neurosci, 2023, 16: 1224964.

[23] Sasaki K, Uchiumi T, Toshima T, et al. Mitochondrial translation inhibition triggers ATF4 activation, leading to integrated stress response but not to mitochondrial unfolded protein response[J]. Biosci Rep, 2020, 40(11): BSR20201289.

[24] Chen YB, Mi YJ, Zhang XF, et al. Dihydroartemisinin-induced unfolded protein response feedback attenuates ferroptosis via PERK/ATF4/HSPA5 pathway in glioma cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 402.

[25] Yang Z, Shi XY, Ren JL, et al. Mitochondrial homeostasis is involved in inhibiting hippocampus neuronal apoptosis during ZSWF ameliorate the cognitive dysfunction of SAMP8 mice[J]. J Funct Foods, 2022, 91: 105010.

[26] Fan P, Jordan VC. PERK, beyond an unfolded protein response sensor in estrogen-induced apoptosis in endocrine-resistant breast cancer[J]. Mol Cancer Res, 2022, 20(2): 193-201.

[27] Yu XM, Wang XY, Xie YY, et al. Activating transcription factor 4-mediated mitochondrial unfolded protein response alleviates hippocampal neuronal damage in an *in vitro* model of epileptiform discharges [J]. Neurochem Res, 2023, 48(7): 2253-2264.

[28] Luo BY, Zhou HS, Sun YF, et al. The fate and prospects of stem cell therapy in the treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Eur J Neurosci, 2023, 58(1): 2384-2405.

[29] Zhong L, Wang JJ, Wang P, et al. Neural stem cell-derived exosomes and regeneration: cell-free therapeutic strategies for traumatic brain injury[J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 198.

[30] Chen XD, Malaeb SN, Pan J, et al. Editorial: Perinatal hypoxic-ischemic brain injury: mechanisms, pathogenesis, and potential therapeutic strategies[J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 1086692.

（责任编辑：李青颖）