

· 论著 ·

PPAR γ 受体激动剂通过 HIF-1 α /BNIP3 信号通路减轻脑出血模型大鼠继发性损伤的机制研究



扫描二维码
查看更多

姚林^{1,2}, 罗腾², 杨磊², 穆琼¹

作者单位: 1.550004贵州省贵阳市, 贵州医科大学附属医院全科医疗科 2.550004贵州省贵阳市, 贵州医科大学临床医学学院

通信作者: 穆琼, E-mail: mu0731@126.com

【摘要】 **目的** 探讨过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)受体激动剂通过低氧诱导因子1 α (HIF-1 α)/Bcl2/腺病毒E1B相互作用蛋白3 (BNIP3)信号通路减轻脑出血模型大鼠继发性损伤的机制。**方法** 本实验时间为2021年7月—2022年7月。选取健康SPF级雄性SD大鼠95只。选取10只大鼠进行模型筛选, 选取25只大鼠用于确定指标检测时间。选取30只大鼠, 随机分为A、B、C、D、E、F组, 每组5只。A组大鼠在改良脑出血模型制备过程中注入0.9%氯化钠注射液代替自体血, 建模前给予0.9%氯化钠溶液灌胃, 建模后给予0.9%氯化钠溶液灌胃、腹腔注射。B、C、D、E、F组大鼠制备改良脑出血模型, 其中B组大鼠建模前给予0.9%氯化钠溶液灌胃, 建模后给予0.9%氯化钠溶液灌胃、腹腔注射; C组大鼠建模前给予0.9%氯化钠溶液灌胃, 建模后给予罗格列酮 (RSG)灌胃、0.9%氯化钠溶液腹腔注射; D组大鼠建模前给予RSG灌胃, 建模后给予RSG灌胃、0.9%氯化钠溶液腹腔注射; E组大鼠建模前给予0.9%氯化钠溶液灌胃, 建模后给予0.9%氯化钠溶液灌胃、2-甲氧基雌二醇 (2ME2)腹腔注射; F组大鼠建模前给予RSG灌胃, 建模后给予RSG灌胃、2ME2腹腔注射。比较六组大鼠建模后24、48、72 h改良神经功能缺损评分 (mNSS), 建模后72 h脑血肿周围组织HIF-1 α 、微管相关蛋白1轻链3 (LC3)、BNIP3表达水平。选取30只大鼠, 随机分为A、B、C、D、E、F组, 每组5只。各组干预方法同前。比较六组大鼠建模后72 h脑血肿周围组织氧化损伤产物 [8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG)、过氧化氢酶 (CAT)、丙二醛 (MDA)、蛋白质羰基 (PCO)]含量。**结果** A组大鼠mNSS为0。建模后24 h, D组大鼠mNSS低于F组 ($P<0.05$); 建模后48 h, C、D组大鼠mNSS低于B组, F组大鼠mNSS高于D组 ($P<0.05$); 建模后72 h, D组大鼠mNSS低于B组, F组大鼠mNSS高于D组 ($P<0.05$)。建模后72 h, B组大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平高于A、E组, 低于C、D组 ($P<0.05$); 建模后72 h, D组大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平高于C、F组 ($P<0.05$); 建模后72 h, E组大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平低于F组 ($P<0.05$)。建模后72 h, E组大鼠脑血肿周围组织8-OHdG含量高于B、F组, 脑血肿周围组织CAT含量低于B组 ($P<0.05$)。**结论** PPAR γ 受体激动剂能有效减轻脑出血模型大鼠继发性损伤, 其机制可能与HIF-1 α /BNIP3信号通路介导的自噬水平升高、DNA损伤产物生成减少有关。

【关键词】 脑出血; 脑损伤; PPAR γ 受体激动剂; 缺氧诱导因子1 α ; BNIP3; 自噬; 大鼠

【中图分类号】 R 743.34 **【文献标识码】** A **DOI:** 10.12114/j.issn.1008-5971.2024.00.096

Mechanism of PPAR γ Receptor Agonist in Reducing Secondary Injury of Cerebral Hemorrhage Model Rats Through HIF-1 α /BNIP3 Signaling Pathway

YAO Lin^{1,2}, LUO Teng², YANG Lei², MU Qiong¹

1. General Medical Department, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

2. Clinical Medical College of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

Corresponding author: MU Qiong, E-mail: mu0731@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the mechanism of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) receptor agonist in reducing secondary injury of cerebral hemorrhage model rats through hypoxia inducible factor 1- α (HIF-1 α) / Bcl2-adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3 (BNIP3) signaling pathway. **Methods** The experimental period was from July 2021 to July 2022. A total of 95 healthy SPF male SD rats were selected. Ten rats were selected for model screening, and 25 rats were selected to determine the index detection time. A total of 30 rats were randomly divided into groups A, B, C, D, E and F, with 5 rats in each group. Rats in group A were injected with 0.9% sodium chloride injection instead of autologous blood during the preparation of modified cerebral hemorrhage model, and were given 0.9% sodium chloride solution by gavage before modeling, 0.9%

sodium chloride solution by gavage and intraperitoneal injection after modeling. The rats in groups B, C, D, E and F were used to prepare the modified cerebral hemorrhage model. The rats in group B were given 0.9% sodium chloride solution by gavage before modeling, and 0.9% sodium chloride solution by gavage and intraperitoneal injection after modeling. Rats in group C were given 0.9% sodium chloride solution by gavage before modeling, and rosiglitazone (RSG) by gavage and 0.9% sodium chloride solution by intraperitoneal injection after modeling. Rats in group D were given RSG by gavage before modeling, and RSG by gavage and 0.9% sodium chloride solution by intraperitoneal injection after modeling. Rats in group E were given 0.9% sodium chloride solution by gavage before modeling, and 0.9% sodium chloride solution by gavage and 2-methoxyestradiol (2ME2) by intraperitoneal injection after modeling. The rats in group F were given RSG by gavage before modeling, and RSG by gavage and 2ME2 by intraperitoneal injection after modeling. The modified Neurological Severity Score (mNSS) at 24, 48 and 72 h after modeling, the expression levels of HIF-1 α , microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), BNIP3 in the tissues around the hematoma at 72 h after modeling were compared among the six groups. A total of 30 rats were randomly divided into groups A, B, C, D, E and F, with 5 rats in each group. The intervention methods of each group were the same as before. The contents of oxidative damage products [8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO)] in the tissues around the hematoma at 72 h after modeling were compared among the six groups. **Results** The mNSS of rats in group A was 0. At 24 h after modeling, the mNSS of rats in group D was lower than that in group F ($P < 0.05$). At 48 h after modeling, the mNSS of rats in groups C and D was lower than that in group B, and the mNSS of rats in group F was higher than that in group D ($P < 0.05$). At 72 h after modeling, the mNSS of rats in group D was lower than that in group B, and the mNSS of rats in group F was higher than that in group D ($P < 0.05$). At 72 h after modeling, the expression levels of HIF-1 α , LC3 and BNIP3 in the tissues around the hematoma of rats in group B were higher than those in groups A and E, and those were lower than those in groups C and D ($P < 0.05$). At 72 h after modeling, the expression levels of HIF-1 α , LC3 and BNIP3 in the tissues around the hematoma of rats in group D were higher than those in groups C and F ($P < 0.05$). At 72 h after modeling, the expression levels of HIF-1 α , LC3 and BNIP3 in the tissue around the hematoma of rats in group E were lower than those in group F ($P < 0.05$). At 72 h after modeling, the content of 8-OHdG in the tissues around the hematoma of rats in group E was higher than that in groups B and F, and the content of CAT was lower than that in group B ($P < 0.05$). **Conclusion** PPAR γ receptor agonist can effectively reduce the secondary injury in rats with cerebral hemorrhage model. The mechanism may be related to the increase of autophagy level and the decrease of DNA damage products mediated by HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway.

【Key words】 Cerebral hemorrhage; Brain injuries; PPAR γ receptor agonist; Hypoxia-inducible factor 1- α ; BNIP3; Autophagy; Rats

脑出血是严重危害中老年人群健康的临床疾病, 自噬在脑出血后继发性损伤中扮演着关键角色^[1]。研究表明, Bcl2/腺病毒E1B相互作用蛋白3 (Bcl2-adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3, BNIP3) 可直接通过自噬相关基因微管相关蛋白1轻链3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 与自噬体结合, 进而完成线粒体自噬, 且其表达受到缺氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor 1- α , HIF-1 α) 的调控^[2-3]。研究表明, HIF-1 α /BNIP3信号通路介导的自噬在肾脏、心脏保护等方面均发挥了巨大作用^[4-5], 但其在脑保护方面作用的研究报道较少。此外, 另一项研究表明, 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 受体与线粒体自噬密切相关^[6]。基于此, 本研究旨在探讨PPAR γ 受体激动剂通过HIF-1 α /BNIP3信号通路减轻脑出血模型大鼠继发性损伤的机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验时间

本实验时间为2021年7月—2022年7月。

1.2 实验动物

选取健康SPF级雄性SD大鼠95只, 平均体质量(250 ± 30) g, 由贵州医科大学实验动物中心提供〔实验单位使用许可证编号: SYXK(黔)2018-0001〕。单笼饲养, 饲养环境为洁净级, 温度20 $^{\circ}$ C, 12 h/12 h昼夜交替。每天定时补给水和食物, 每3 d更换垫料。本研究经贵州医科大学附属医院实验动物伦理委员会许可批准(2101392)。

1.3 主要实验试剂

LC3抗体、HIF-1 α 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司, BNIP3抗体购自Abcam公司, 山羊抗小鼠IgG(H+L)、山羊抗兔IgG(H+L)购自北京康为世纪生物技术有限公司, β -actin抗体购自京天成生物技术(北京)有限公司, 罗格列酮(rosiglitazone, RSG)、2-甲氧基雌二醇(2-methoxyestradiol, 2ME2)购自MCE公司, 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)酶联免疫吸附试验试剂盒购自中国伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 过氧化氢酶(catalase, CAT)、丙二醛(malondialdehyde,

MDA)、蛋白质羰基(protein carbonyl, PCO)测试盒购自南京建成生物工程研究所有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 模型制备

采用Fredrik法^[7]制备脑出血模型,具体如下:使用水氯醛腹腔注射麻醉大鼠,将其置于脑立体定位仪上,摆好卧位体位。备皮,术区消毒,铺清洁敷料,采用手术刀沿矢状线切开大鼠头皮,暴露前凶矢状线。颅骨穿刺点位于前凶前1 mm,中线右侧旁开3 mm,采用颅骨钻钻孔,孔径1.5 mm,钻孔过程中有突破感时立即停止。然后消毒尾动脉,使用手术刀切开尾动脉,使用微量注射器快速分两次抽取不凝血50 μ l,沿钻孔垂直进针约6 mm,5 min内匀速注入100 μ l不凝血,留针15 min后缓慢退出。未见出血后,使用洁净骨蜡填塞颅骨钻孔,采用碘伏反复消毒手术切口,无菌缝合手术切口,无菌敷贴包扎手术切口。建模结束后处死大鼠,观察其脑组织横切面,有血肿形成且改良神经功能缺损评分(modified Neurological Severity Score, mNSS) \geq 1分为脑出血模型制备成功^[8]。

制备改良脑出血模型,即在脑出血模型基础上进行如下改良:手术刀切开尾动脉,快速使用微量注射器抽取不凝血100 μ l,中间停顿1 min,再抽取100 μ l,然后沿钻孔垂直进针约6 mm,3 min内平均分两次匀速注入200 μ l不凝血,留针15 min后缓慢退出。其他过程及模型制备成功标准均同脑出血模型。

1.4.2 筛选模型及确定指标检测时间

选取10只大鼠,随机分为模型组和改良模型组,每组5只。其中模型组大鼠制备脑出血模型,改良模型组大鼠制备改良脑出血模型,记录两组大鼠建模后24、48、72 h神经功能损伤程度(采用mNSS评估)。选取25只大鼠,随机分为假手术组、改良模型6 h组、改良模型24 h组、改良模型48 h组、改良模型72 h组,每组5只,其中假手术组大鼠在改良脑出血模型制备过程中注入0.9%氯化钠注射液代替自体血,建模后6 h处死大

鼠;改良模型6 h组、改良模型24 h组、改良模型48 h组、改良模型72 h组大鼠制备改良脑出血模型,并分别于建模后6、24、48、72 h处死大鼠。比较五组大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 表达水平。

1.4.3 分组及干预方法

选取30只大鼠,随机分为A、B、C、D、E、F组,每组5只,六组大鼠干预方法及处死时间见表1。比较六组大鼠建模后24、48、72 h mNSS,建模后72 h脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平。选取30只大鼠,随机分为A、B、C、D、E、F组,每组5只,六组大鼠干预方法及处死时间见表1。比较六组大鼠建模后72 h脑血肿周围组织氧化损伤产物(8-OHdG、CAT、MDA、PCO)含量。

1.5 观察指标及评价方法

(1) mNSS和神经功能损伤程度:mNSS是一种评价实验动物神经功能的评分系统,该量表包括提尾试验、开放场地步行、平衡木试验、反射缺失检查及圆筒试验,满分18分,评分越高提示神经功能损伤程度越严重,其中13~18分为重度损伤、7~12分为中度损伤、1~6分为轻度损伤^[9]。(2) HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平:采用Western blot法检测大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平,具体如下:取脑血肿周围组织块,提取蛋白,然后进行灌胶、电泳、转膜、封闭、抗体孵育。在反应盒中加入高灵敏度化学发光检测试剂盒工作液,放入PVDF膜浸泡5 min,然后曝光、定影,扫描、分析胶片。采用Gel-Pro analyzer4图像分析软件测定各条带灰度值,目的基因条带灰度值与内参条带灰度值的比值为目的基因表达水平。(3) 氧化损伤产物:采用酶联免疫吸附试验检测脑血肿周围组织8-OHdG含量,采用比色法检测脑血肿周围组织CAT、MDA、PCO含量,严格按照相关试剂盒/测试盒说明书进行操作。

1.6 统计学方法

应用SPSS 26.0统计学软件进行数据处理。计量资料

表1 六组大鼠干预方法及处死时间

Table 1 Intervention methods and execution time of six groups of rats

组别	模型制备	建模前干预方法	建模后干预方法	处死时间
A组	制备改良脑出血模型过程中注入0.9%氯化钠注射液代替自体血	建模前7 d给予等剂量0.9%氯化钠溶液灌胃,1次/d	分别于建模后0.5、24、48 h给予等剂量0.9%氯化钠溶液灌胃、等剂量0.9%氯化钠溶液腹腔注射	建模后72 h
B组	制备改良脑出血模型	建模前7 d给予等剂量0.9%氯化钠溶液灌胃,1次/d	分别于建模后0.5、24、48 h给予等剂量0.9%氯化钠溶液灌胃、等剂量0.9%氯化钠溶液腹腔注射	建模后72 h
C组	制备改良脑出血模型	建模前7 d给予等剂量0.9%氯化钠溶液灌胃,1次/d	分别于建模后0.5、24、48 h给予RSG 4 mg/kg灌胃、等剂量0.9%氯化钠溶液腹腔注射	建模后72 h
D组	制备改良脑出血模型	建模前7 d给予RSG 4 mg/kg灌胃,1次/d	分别于建模后0.5、24、48 h给予RSG 4 mg/kg灌胃、等剂量0.9%氯化钠溶液腹腔注射	建模后72 h
E组	制备改良脑出血模型	建模前7 d给予等剂量0.9%氯化钠溶液灌胃,1次/d	分别于建模后0.5、24、48 h给予等剂量0.9%氯化钠溶液灌胃、2ME2 15 mg/kg腹腔注射	建模后72 h
F组	制备改良脑出血模型	建模前7 d给予RSG 4 mg/kg灌胃,1次/d	分别于建模后0.5、24、48 h给予RSG 4 mg/kg灌胃、2ME2 15 mg/kg腹腔注射	建模后72 h

注:RSG=罗格列酮,2ME2=2-甲氧基雌二醇。

以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验或Tamhane's T2检验(方差不齐);等级资料以相对数表示,组间比较采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

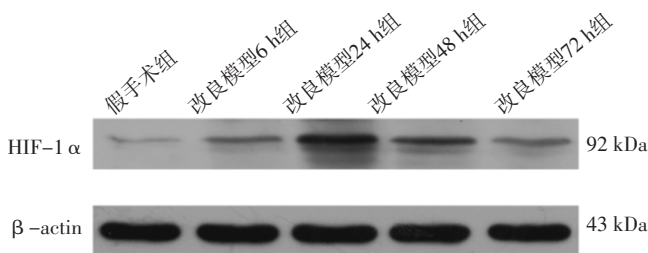
2.1 筛选模型及确定指标检测时间

建模后24、48 h,改良模型组大鼠神经功能损伤程度重于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);建模后72 h,模型组与改良模型组大鼠神经功能损伤程度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。假手术组、改良模型6 h组、改良模型24 h组、改良模型48 h组、改良模型72 h组大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 表达水平分别为(0.07 ± 0.01)、(0.19 ± 0.02)、(0.66 ± 0.03)、(0.39 ± 0.02)、(0.18 ± 0.02),见图1。五组大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 表达水平比较,差异有统计学意义($F = 622.730, P < 0.001$);其中改良模型6 h组脑血肿周围组织HIF-1 α 表达水平高于假手术组,改良模型24 h组脑血肿周围组织HIF-1 α 表达水平高于改良模型6 h组和改良模型48 h组,改良模型72 h组脑血肿周围组织HIF-1 α 表达水平低于改良模型48 h组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 模型组与改良模型组大鼠不同时间神经功能损伤程度比较($n/N, N=5$)

Table 2 Comparison of the degree of neurological impairment between the model group and the modified model group at different time

组别	建模后24 h			建模后48 h			建模后72 h		
	轻度损伤	中度损伤	重度损伤	轻度损伤	中度损伤	重度损伤	轻度损伤	中度损伤	重度损伤
模型组	0	4/5	1/5	0	5/5	0	4/5	1/5	0
改良模型组	3/5	2/5	0	3/5	2/5	0	5/5	0	0
Z值	2.032			2.141			1.000		
P值	0.042			0.032			0.317		



注: HIF-1 α =缺氧诱导因子1 α 。

图1 Western blot法检测五组大鼠HIF-1 α 表达水平的SDS-PAGE图
Figure 1 SDS-PAGE diagram of expression level of HIF-1 α detected by Western blot method of the five groups of rats

2.2 mNSS

A组大鼠mNSS为0。建模后24 h, D组大鼠mNSS低于F组,差异有统计学意义($P < 0.05$);建模后48 h, C、D组大鼠mNSS低于B组, F组大鼠mNSS高于D组,

差异有统计学意义($P < 0.05$);建模后72 h, D组大鼠mNSS低于B组, F组大鼠mNSS高于D组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

2.3 脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平

建模后72 h,六组大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);建模后72 h, B组大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平高于A、E组,低于C、D组,差异有统计学意义($P < 0.05$);建模后72 h, D组大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平高于C、F组,差异有统计学意义($P < 0.05$);建模后72 h, E组大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平低于F组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表4。

表3 五组大鼠不同时间mNSS比较($\bar{x} \pm s$,分, $n=5$)

Table 3 Comparison of mNSS scores among the five groups at different time

组别	建模后24 h	建模后48 h	建模后72 h
B组	12.20 \pm 3.35	10.00 \pm 1.41	6.60 \pm 2.30
C组	9.20 \pm 0.45	6.40 \pm 1.52 ^a	4.80 \pm 0.84
D组	8.80 \pm 0.45	6.20 \pm 0.45 ^a	4.00 \pm 1.22 ^a
E组	11.80 \pm 3.63	9.20 \pm 3.96	7.20 \pm 2.28
F组	11.00 \pm 1.00 ^b	10.00 \pm 1.87 ^b	9.00 \pm 2.35 ^b
F值	5.512	3.848	5.401
P值	0.015	0.018	0.004

注:^a表示与B组比较, $P < 0.05$;^b表示与D组比较, $P < 0.05$ 。

表4 六组大鼠建模后72 h脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Comparison of expression levels of HIF-1 α , LC3 and BNIP3 in the tissues around the hematoma among the six groups at 72 hours after modeling

组别	HIF-1 α	LC3	BNIP3
A组	0.07 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02	0.03 \pm 0.00
B组	0.28 \pm 0.02 ^a	0.33 \pm 0.03 ^a	0.06 \pm 0.01 ^a
C组	0.41 \pm 0.02 ^b	0.44 \pm 0.03 ^b	0.08 \pm 0.01 ^b
D组	0.68 \pm 0.03 ^{bc}	0.76 \pm 0.02 ^{bc}	0.19 \pm 0.02 ^{bc}
E组	0.17 \pm 0.01 ^b	0.21 \pm 0.04 ^b	0.01 \pm 0.00 ^b
F组	0.53 \pm 0.02 ^{de}	0.57 \pm 0.04 ^{de}	0.12 \pm 0.03 ^{de}
F值	784.345	336.545	141.994
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注: HIF-1 α =缺氧诱导因子1 α , LC3=微管相关蛋白1轻链3, BNIP3=Bcl2/腺病毒E1B相互作用蛋白3;^a表示与A组比较, $P < 0.05$;^b表示与B组比较, $P < 0.05$;^c表示与C组比较, $P < 0.05$;^d表示与D组比较, $P < 0.05$;^e表示与E组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 氧化损伤产物含量

建模后72 h,六组大鼠脑血肿周围组织8-OHdG、CAT含量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);其

中E组大鼠脑血肿周围组织8-OHdG含量高于B、F组，脑血肿周围组织CAT含量低于B组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。建模后72 h，六组大鼠脑血肿周围组织MDA、PCO含量比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见表5。

表5 六组大鼠建模后72 h脑血肿周围组织氧化损伤产物含量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 5 Comparison of the contents of oxidative damage products in the tissues around the hematoma among the six groups at 72 hours after modeling

组别	8-OHdG (ng/mg)	CAT (U/mg)	MDA (nmol/mg)	PCO (nmol/mg)
A组	0.27 ± 0.05	1.38 ± 0.37	0.70 ± 0.21	1 634 ± 475
B组	0.30 ± 0.08	2.02 ± 0.62	1.47 ± 1.17	1 791 ± 899
C组	0.40 ± 0.08	2.26 ± 0.80	1.12 ± 0.98	1 303 ± 658
D组	0.36 ± 0.20	2.14 ± 0.96	1.07 ± 0.97	1 456 ± 635
E组	0.61 ± 0.06 ^a	0.93 ± 0.31 ^a	1.20 ± 0.85	1 210 ± 406
F组	0.32 ± 0.13 ^b	1.54 ± 0.48	1.27 ± 0.66	1 916 ± 1 216
F值	5.720	3.300	1.120	0.657
P值	0.001	0.021	0.409	0.659

注：8-OHdG=8-羟基脱氧鸟苷，CAT=过氧化氢酶，MDA=丙二醛，PCO=蛋白质羰基；^a表示与B组比较， $P < 0.05$ ；^b表示与E组比较， $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究前期预实验结果发现，按照Fredrik法制备的脑出血模型大鼠的偏瘫症状不明显，这对直观判断动物模型制备成功与否造成了一定困难，故本实验在Fredrik法制备脑出血模型的基础上进行了改良。本实验结果显示，建模后24、48 h，改良模型组大鼠神经功能损伤程度重于模型组，提示改良脑出血模型大鼠较Fredrik法制备的脑出血模型大鼠的偏瘫症状更明显，故本实验选取改良脑出血模型大鼠进行后续研究。

HIF-1 α 是细胞为适应低氧环境而存在的关键转录因子，当大脑处于应激状态时，其表达水平会发生变化，且其水平与脑出血模型大鼠预后相关^[10]。但HIF-1 α 是发挥保护作用^[11-12]还是损伤作用^[13-14]尚存在争议。本实验结果显示，改良模型6 h组脑血肿周围组织HIF-1 α 表达水平高于假手术组，改良模型24 h组脑血肿周围组织HIF-1 α 表达水平高于改良模型6 h组和改良模型48 h组，改良模型72 h组脑血肿周围组织HIF-1 α 表达水平低于改良模型48 h组，提示脑出血后24 h时HIF-1 α 表达水平到达峰值，之后其表达水平不断下降，且处于动态变化，与LÓPEZ-HERNÁNDEZ等^[15]研究结果相似。笔者所在团队认为，若能通过药物干预提高脑出血后72 h时的HIF-1 α 表达水平，进而减轻继发性脑损伤程度，将会具有重要的临床意义，故本实验将建模后72 h作为指标检测时间点。

研究表明，脑出血后自噬具有加重或减轻脑出血

后继发性损伤的作用^[16]。BNIP3与线粒体自噬密切相关，但其表达受到HIF-1 α 的调控^[2-3]。本实验结果显示，建模后24 h，D组大鼠mNSS低于F组；建模后48 h，C、D组大鼠mNSS低于B组，F组大鼠mNSS高于D组；建模后72 h，D组大鼠mNSS低于B组，F组大鼠mNSS高于D组，提示建模前后采用PPAR γ 受体激动剂干预能有效减轻脑出血模型大鼠继发性损伤，而增加HIF-1 α 抑制剂后会加重脑出血模型大鼠继发性损伤。本实验结果还显示，建模后72 h，B组大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平高于A、E组，低于C、D组，D组大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平高于C、F组，E组大鼠脑血肿周围组织HIF-1 α 、LC3、BNIP3表达水平低于F组，提示脑出血模型大鼠脑血肿周围组织自噬水平升高，采用PPAR γ 受体激动剂干预能有效增加脑出血模型大鼠脑血肿周围组织自噬水平，而增加HIF-1 α 抑制剂会降低脑出血模型大鼠脑血肿周围组织自噬水平，进一步提示PPAR γ 受体激动剂可能通过HIF-1 α /BNIP3信号通路减轻脑出血模型大鼠继发性损伤。

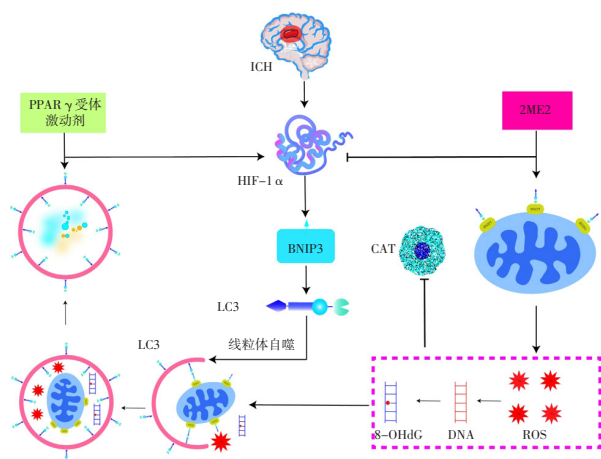
脑出血后升高的活性氧会攻击脑血肿周围组织中的DNA^[17]、脂质^[18]和蛋白质^[19]，形成氧化损伤产物，进而加剧氧化应激^[20]。本实验结果显示，建模后72 h，E组大鼠脑血肿周围组织8-OHdG含量高于B、F组，提示HIF-1 α 抑制剂能增加脑出血模型大鼠DNA氧化损伤产物，分析原因可能与在HIF-1 α /BNIP3信号通路介导的线粒体自噬过程中线粒体活性氧产生减少有关。建模后72 h，E组大鼠脑血肿周围组织CAT含量低于B组，且六组大鼠脑血肿周围组织MDA、PCO含量比较无统计学差异，分析原因可能为：与相对蛋白质及脂质相比，DNA更易受到氧自由基的攻击^[20]。PPAR γ 受体激动剂通过HIF-1 α /BNIP3信号通路减轻脑出血模型大鼠继发性脑损伤的可能机制见图2。

4 结论

综上所述，PPAR γ 受体激动剂能有效减轻脑出血模型大鼠继发性损伤，其机制可能与血肿周围组织HIF-1 α /BNIP3信号通路介导的自噬水平升高、DNA损伤产物生成减少有关。本实验对脑出血后线粒体自噬的作用机制研究具有一定参考价值，但仍存在一定局限性：出血量及建模方式可能影响HIF-1 α 表达水平，未通过敲除基因等方法进一步研究HIF-1 α 的作用。

作者贡献：姚林、穆琼进行文章的构思与设计及可行性分析；姚林进行研究的实施，结果分析与解释，撰写、修订论文；罗腾、杨磊进行数据收集、整理、分析；穆琼负责文章的质量控制及审核，并对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。



注: ICH=脑出血, PPAR γ =过氧化物酶体增殖物激活受体 γ , HIF-1 α =缺氧诱导因子1 α , 2ME2=2-甲氧基雌二醇, BNIP3=Bcl2/腺病毒E1B相互作用蛋白3, CAT=过氧化氢酶, LC3=微管相关蛋白1轻链3, 8-OHdG=8-羟基脱氧鸟苷, ROS=活性氧。

图2 PPAR γ 受体激动剂通过HIF-1 α /BNIP3信号通路减轻脑出血模型大鼠继发性脑损伤的可能机制

Figure 2 Possible mechanism of PPAR γ receptor agonist reducing secondary injury in intracerebral hemorrhage model rats through HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway

参考文献

- [1] YAO Z J, BAI Q Q, WANG G Q. Mechanisms of oxidative stress and therapeutic targets following intracerebral hemorrhage [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8815441. DOI: 10.1155/2021/8815441.
- [2] WANG Y, LIU N, LU B W. Mechanisms and roles of mitophagy in neurodegenerative diseases [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25 (7): 859-875. DOI: 10.1111/cns.13140.
- [3] XU W L, OCAK U, GAO L S, et al. Selective autophagy as a therapeutic target for neurological diseases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78 (4): 1369-1392. DOI: 10.1007/s00018-020-03667-9.
- [4] FU Z J, WANG Z Y, XU L, et al. HIF-1 α -BNIP3-mediated mitophagy in tubular cells protects against renal ischemia/reperfusion injury [J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101671. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101671.
- [5] ZHU N, LI J, LI Y L, et al. Berberine protects against simulated ischemia/reperfusion injury-induced H9C2 cardiomyocytes apoptosis in vitro and myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis in vivo by regulating the mitophagy-mediated HIF-1 α /BNIP3 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 367. DOI: 10.3389/fphar.2020.00367.
- [6] GIAMPIETRO L, GALLORINI M, FILIPPIS B D, et al. PPAR- γ agonist GL516 reduces oxidative stress and apoptosis occurrence in a rat astrocyte cell line [J]. *Neurochem Int*, 2019, 126: 239-245. DOI: 10.1016/j.neuint.2019.03.021.
- [7] NATH F P, JENKINS A, MENDELOW A D, et al. Early hemodynamic changes in experimental intracerebral hemorrhage [J]. *J Neurosurg*, 1986, 65 (5): 697-703. DOI: 10.3171/jns.1986.65.5.0697.
- [8] 丁绪平, 马凤杰, 张学敏, 等. 自体血注入法制备大鼠脑内囊出血模型的改良与体会 [J]. *潍坊医学院学报*, 2013, 35 (4): 277-279, 321. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3101.2013.04.013.
- [9] LYDEN P D, LU M, LEVINE S R, et al. A modified National Institutes of Health Stroke Scale for use in stroke clinical trials: preliminary reliability and validity [J]. *Stroke*, 2001, 32 (6): 1310-1317. DOI: 10.1161/01.str.32.6.1310.
- [10] 彭羽, 林赞, 侯晓林, 等. 亚低温治疗对脑出血模型大鼠动物行为学的影响及其机制 [J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40 (9): 1359-1364. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.09.21.
- [11] LI H T, ZHOU H J, ZHONG J H, et al. 2-methoxyestradiol inhibits intracerebral hemorrhage-induced angiogenesis in rats [J]. *Turk Neurosurg*, 2018, 28 (2): 241-247. DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.18901-16.1.
- [12] PENG Z R, YANG A L, YANG Q D. The effect of hyperbaric oxygen on intracerebral angiogenesis in rats with intracerebral hemorrhage [J]. *J Neuro Sci*, 2014, 342 (1/2): 114-123. DOI: 10.1016/j.jns.2014.04.037.
- [13] YOU P D, LIN M C, LI K Z, et al. Normobaric oxygen therapy inhibits HIF-1 α and VEGF expression in perihematoma and reduces neurological function defects [J]. *Neuroreport*, 2016, 27 (5): 329-336. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000542.
- [14] ZHU S Q, TANG Z P, GUO S G, et al. Experimental study on the expression of HIF-1 α and its relationship to apoptosis in tissues around cerebral bleeding loci [J]. *Curr Med Sci*, 2004, 24 (4): 373-375. DOI: 10.1007/BF02861871.
- [15] LÓPEZ-HERNÁNDEZ B, POSADAS I, PODLESNIY P, et al. HIF-1 α is neuroprotective during the early phases of mild hypoxia in rat cortical neurons [J]. *Exp Neurol*, 2012, 233 (1): 543-554. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.11.040.
- [16] TAN X, YANG Y, XU J G, et al. Luteolin exerts neuroprotection via modulation of the p62/Keap1/Nrf2 pathway in intracerebral hemorrhage [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1551. DOI: 10.3389/fphar.2019.01551.
- [17] WANG Z, ZHOU F, DOU Y, et al. Melatonin alleviates intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury in rats via suppressing apoptosis, inflammation, oxidative stress, DNA damage, and mitochondria injury [J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9 (1): 74-91. DOI: 10.1007/s12975-017-0559-x.
- [18] QU X, WANG N, CHENG W T, et al. MicroRNA-146a protects against intracerebral hemorrhage by inhibiting inflammation and oxidative stress [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18 (5): 3920-3928. DOI: 10.3892/etm.2019.8060.
- [19] HALL N C, PACKARD B A, HALL C L, et al. Protein oxidation and enzyme susceptibility in white and gray matter with in vitro oxidative stress: relevance to brain injury from intracerebral hemorrhage [J]. *Cell Mol Biol*, 2000, 46 (3): 673-683.
- [20] BERGAMINI C M, GAMBETTI S, DONDI A, et al. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10 (14): 1611-1626. DOI: 10.2174/1381612043384664.

(收稿日期: 2023-11-17; 修回日期: 2024-03-13)

(本文编辑: 谢武英)