

HIF-2 α 通过抑制炎症反应减轻大鼠脑出血损伤陈 辉¹, 甘 荟¹, 肖 涵¹, 张 莉¹, 王 璐¹, 蒋 宁², 翟 瑄¹

(1. 重庆医科大学附属儿童医院神经外科; 儿科学重庆市重点实验室; 儿童发育疾病研究教育部重点实验室; 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心(重庆); 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆 400014;
2. 重庆医科大学基础医学院病理与病理生理学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨缺氧诱导因子 2 α (hypoxia-inducible factor 2 α , HIF-2 α)在脑出血损伤后(intracerebral hemorrhage, ICH)的作用, 并明确其是否参与调控脑出血后的炎症反应。**方法:**健康雄性 SD 大鼠 95 只, 其中 35 只随机分配用于以下时间点分析: Sham、12 h、24 h、48 h、3 d、5 d 和 7 d, 每组 5 只; 另外 60 只随机分为 Sham 组(假手术组, 注射等量生理盐水)、ICH 组(脑出血模型组, 胶原酶诱导的脑出血模型)、Vehicle 组(空载体组, 建模前注射空载慢病毒载体)和 Oe-HIF-2 α 组(HIF-2 α 过表达组, 建模前注射 HIF-2 α 过表达慢病毒载体)用于脑含水量检测、神经功能评分、免疫印记分析和免疫荧光检测。通过脑含水量和 Garcia 神经功能评分评估脑损伤的严重程度; 免疫印记检测 HIF-2 α 及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素-18(interleukin 18, IL-18)和白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)的表达水平, 免疫荧光检测病灶周边髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的表达。**结果:**HIF-2 α 表达在 ICH 后 24 h(0.555 4 $\pm$ 0.070 2, $P=0.000$)开始上调并于 3 d(2.368 4 $\pm$ 0.346 6, $P=0.000$)达到峰值, 随后降低; 与 ICH 组相比较, Oe-HIF-2 α 组脑 3 d 时含水量明显降低(0.793 5 $\pm$ 0.002 5, $P=0.000$), 神经功能明显改善(14.700 0 $\pm$ 0.674 9, $P=0.000$); 与 ICH 组相比, Oe-HIF-2 α 组 TNF- α (1.350 4 $\pm$ 0.191 5, $P=0.000$)、IL-1 β (1.158 4 $\pm$ 0.070 8, $P=0.000$)、IL-18(0.784 2 $\pm$ 0.073 9, $P=0.000$)等炎性介质在 3 d 时表达明显降低; Oe-HIF-2 α 组(3.500 0 $\pm$ 0.534 5)病灶周边区域 MPO 表达明显低于 ICH 组(5.125 0 $\pm$ 0.991 0, $P=0.002$)。**结论:**脑出血后, HIF-2 α 表达上调并且通过抑制 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 等炎症因子的表达, 抑制炎症反应减轻大鼠脑出血损伤。

【关键词】缺氧诱导因子 2 α ; 炎症; 神经保护; 脑出血**【中图分类号】**R741.02**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-01-08HIF-2 α attenuates intracerebral hemorrhage injury in rats
by inhibiting inflammatory responseChen Hui¹, Gan Hui¹, Xiao Han¹, Zhang Li¹, Wang Lu¹, Jiang Ning², Zhai Xuan¹

(1. Department of Neurosurgery; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; National Clinical Research Center for Child Health and Disorders (Chongqing); China International Science and Technology Cooperation base of Child development and Critical Disorders; Children's Hospital of Chongqing Medical University; 2. Department of Pathology and Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the role of hypoxia-inducible factor 2 α (HIF-2 α) in intracerebral hemorrhage(ICH) injury, and to determine whether HIF-2 α is involved in the regulation of inflammatory response after ICH. **Methods:** There were 95 healthy male Sprague-Dawley rats, and 35 of them were randomly assigned to seven groups for different data collection time points: Sham, 12 h, 24 h,

48 h, 3 d, 5 d, and 7 d, with 5 rats in each group. The other 60 rats were randomly divided into Sham group (sham operation group with injection of the same amount of normal saline), ICH group (ICH model group with collagenase-induced ICH), Vehicle group (empty vector group with injection of empty lentiviral vector before modeling), and Oe-HIF-2 α group (HIF-2 α over-expression group with injection of HIF-2 α overexpression lentiviral vector before modeling) for brain water content mea-

作者介绍: 陈 辉, Email: 455981900@qq.com,

研究方向: 脑出血疾病基础研究。

通信作者: 翟 瑄, Email: zhaixuan@163.com。**基金项目:** 重庆市委基础科学与前沿技术研究重点资助项目(编号: cstc2015jcyjBX0144); 中国抗癫痫协会癫痫科研基金—UCB 基金资助项目(编号: 2018003)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190522.0859.008.html>
(2019-05-22)

surement, neurological function scoring, Western blot analysis, and immunofluorescence detection. The severity of brain injury was assessed by brain water content and Garcia neurological deficit scores. The expression levels of HIF-2 α , tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 18 (IL-18), and interleukin 1 beta (IL-1 β) were determined by Western blot, and the expression of myeloperoxidase (MPO) was determined by immunofluorescence assay. **Results:** The expression of HIF-2 α began to increase at 24 hours after ICH ($0.555\ 4 \pm 0.070\ 2, P=0.000$), peaked on day 3 ($2.368\ 4 \pm 0.346\ 6, P=0.000$), and then decreased. Compared with the ICH group on day 3, the Oe-HIF-2 α group had significantly decreased brain water content ($0.793\ 5 \pm 0.002\ 5, P=0.000$), significantly improved neurological function ($14.700\ 0 \pm 0.674\ 9, P=0.000$), and significantly reduced expression of inflammatory mediators including TNF- α ($1.350\ 4 \pm 0.191\ 5, P=0.000$), IL-1 β ($1.158\ 4 \pm 0.070\ 8, P=0.000$), and IL-18 ($0.784\ 2 \pm 0.073\ 9, P=0.000$); the expression of MPO in the surrounding area of lesion was significantly lower in the Oe-HIF-2 α group than in the ICH group ($3.500\ 0 \pm 0.534\ 5$ vs. $5.125\ 0 \pm 0.991\ 0, P=0.002$). **Conclusion:** After ICH, HIF-2 α is upregulated, and it can suppress the expression of inflammatory factors including TNF- α , IL-1 β , and IL-18 to reduce inflammatory response and ICH injury in rats.

[Key words] hypoxia-inducible factor 2 α ; inflammation; neuroprotection; intracerebral hemorrhage

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是由于脑部血管突然破裂、血液渗入到周围脑实质形成的一种严重中风亚型, 占有中风的 10%~15%^[1-2]。研究表明, 炎症参与脑出血后的继发性损伤并加重脑损伤^[3]。缺氧诱导因子-2 α (hypoxia-inducible factor-2 α , HIF-2 α) 是维持氧稳态的主要转录因子, 对于细胞适应缺氧损伤至关重要。HIF-2 α 在参与红细胞生成调节^[4]、血管生成和发育^[5]、激素信号传导^[6]及骨骼的发育和再生^[7]等众多病理生理过程。已有研究表明在其他疾病模型中, HIF-2 α 可以通过抑制疾病进程中的炎症反应从而发挥保护作用^[8]。然而, 脑出血中关于 HIF-2 α 的研究还未见报道。本研究拟探讨 HIF-2 α 在脑出血损伤后的作用, 并明确其是否参与调控脑出血后的炎症反应。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年的雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (体质量 250~300 g) 购自重庆医科大学实验动物中心。所有 95 只大鼠被随机分到: ① sham、12 h、24 h、48 h、3 d、5 d 和 7 d 用于 HIF-2 α 时间点检测, 每组 5 只, 共 35 只。② 另外 60 只分为如下 4 组: Sham 组 (假手术组, 注射等量的生理盐水)、ICH 组 (模型组, 胶原酶诱导的大鼠脑出血模型)、Vehicle 组 (空载体组, 空载慢病毒载体注射后建立 ICH 模型) 和 Oe-HIF-2 α 组 (HIF-2 α 过表达组, 注射过表达 HIF-2 α 的病毒载体后建立 ICH 模型); 其中, 20 只用于脑含水量检测, 20 只用于免疫荧光检测, 20 只用于免疫印迹分析, 所有老鼠在建模后第 3 天进行神经功能评分。所有动物实验均通过重庆医科大学实验伦理委员会授权。

1.2 试剂和抗体

VII 型胶原酶 (Sigma-Aldrich, USA, 5U); 兔抗 HIF-2 α (abcam, ab199, 1 : 200); 兔抗 TNF- α (proteintech, 60291-1-Ig, 1 : 500); 鼠抗 cleaved IL-18 (R&D Systems, USA, AF521, 1 : 200); 兔抗 cleaved IL-1 β (Affinity, USA, AF4006, 1 : 200); 鼠抗 β -actin (ABclonal, China, AC004, 1 : 100 0); 兔抗 MPO (abcam, ab45977, 1 : 100); 山羊抗兔 IgG (H + L) (ABclonal, China, AS014, 1 : 300 0) 和山羊抗鼠 IgG (H + L) (ABclonal, China, AS003, 1 : 300 0); 山羊抗兔 DyLight 488 (Abbkine, green, A23240, 1 : 200)。

1.3 胶原酶诱导的大鼠脑出血模型

参考曾军等^[9]的方法建立胶原酶诱导脑出血模型: 将胶原酶溶于生理盐水中使其浓度为 0.2 U/ μ L。使用 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉的大鼠, 并将大鼠俯卧位固定于脑立体定位仪 (瑞沃德, 68025, 中国)。剪开大鼠头皮, 暴露前囟, 以前囟为参考点进行颅骨钻孔, 定位坐标为: 前囟为原点, 前 0.1 mm, 右侧 3.5 mm, 得到 1 个直径为 1 mm 的钻孔。将 5 μ L 微量注射器固定于立体定位仪上, 沿钻孔缓缓进入, 到达右侧纹状体区域停止进针, 其坐标为: 前囟为原点, 前 0.1 mm, 右侧 3.5 mm, 深度 6.0 mm。使用 5 μ L 微量注射器将 1 μ L 上述胶原酶 (0.2 U/ μ L) 注射到右侧纹状体。注射完成后留针 10 min, 然后取出微量注射器, 骨蜡密封颅骨钻孔, 缝合皮肤。Sham 组不含胶原酶注射等量生理盐水。

1.4 过表达慢病毒载体构建与立体定向注射

过表达慢病毒构建: 用于 hif-2 α 基因 (NM_023090.1) 的过表达慢病毒载体由 GenePharma (中国上海) 设计。简言之, 将 GenePharma 公司设计的 hif-2 α cDNA 克隆到 pSuper-puro-RFP 载体, 得到重组载体 pSuper-puro-RFP-hif-2 α , 其中空载体 pSuper-puro-RFP-empty 用于阴性对照。将以上病毒载体导入 293T 细胞中复制以获得合格的 hif-2 α 基因过表达载体。立体定向注射: 将大鼠麻醉后, 俯卧位固定在脑立体定位仪上。剪开大鼠头皮, 暴露前囟, 以前囟为参考点进行

颅骨钻孔,定位坐标为:前囟为原点,后 1.5 mm,右侧 1.0 mm,得到 1 个直径为 1 mm 的钻孔。通过 25 μ L 注射器将 10 μ L 慢病毒注射到右侧侧脑室,定位坐标为:前囟为原点,后 1.5 mm,右侧 1.0 mm,深度 3.2 mm^[9]。注射完成后,留针 5 min 防止病毒溢出,然后缓慢移除,骨蜡密封颅骨钻孔,缝合皮肤。大鼠回笼恢复 14 d 后进行 ICH 建模^[10]。

1.5 脑含水量检测

在手术后第 3 天,使用 He 等^[11]的方法测定脑含水量,即在深度麻醉下将 ICH 大鼠断头,并立即取出它们的大脑。将所得大脑分为两部分:出血性病变侧和对侧。在电子分析天平上称重以确定湿重(wet weight, WW),然后在 120 $^{\circ}$ C 恒温烤箱中烘干 24 h 至恒重,再次称量以确定干重(dry weight, DW)。脑水含量计算为 $(WW-DW)/WW \times 100\%$ 。

1.6 Garcia 神经系统评分

建模前和建模后 3 d 对所有老鼠进行评分,按 You 等^[12]所述方法进行。Garcia 评分包括六个方面:自发活动,轴向感觉,触须本体感觉,肢体伸展,侧向转动和前肢行走。每项的分范围为 0~3 分(0=最差,3=最佳);最大总分 18 分,最小 0 分,分值越大表示神经功能越好。

1.7 免疫印迹

心脏灌注后,迅速断头取出病灶周边 2 mm 内约 400 mg 脑组织。使用 MinuteTM 总蛋白质提取试剂盒进行蛋白质提取(invent Biotechnologies, SD001/SN002)。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(8%~12%电泳分离等量的蛋白质样品(50 μ g)并电转至 PVDF 膜(Millipore, Boston, USA)。用含有 TBST 缓冲液的 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h 左右,并在 4 $^{\circ}$ C 下与一抗孵育过夜。室温下孵育二抗 2 h 左右;采用 ECL 化学发光法显色。使用 Image Pro-Plus 软件分析条带目的蛋白的灰度值。根据目的蛋白灰度值与内参灰度值的比值确定各组样本目的含量的高低。

1.8 免疫荧光检测 MPO

心脏灌注后,迅速取出大鼠大脑。在 4 $^{\circ}$ C 环境中,采用 4%多聚甲醛固定和 30%蔗糖脱水后,在冰冻切片(Leica, CM1850)上切割冠状切片(8 μ m)并用于免疫荧光染色。将切片用 PBS 冲洗,用牛血清白蛋白(BSA)封闭((3% BSA+ 1% Triton X-100 溶于 PBS),在 4 $^{\circ}$ C 与一抗孵育过夜;二抗在室温下孵育 2 h 左右。在成像前将细胞核用 DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 1:500)复染 10 min。使用荧光显微镜(Nikon, Japan)采集免疫荧光信号。通过 Image J 图像分析软件计数单位面积(100 μ m $\times$ 100 μ m)内的 MPO 阳性细胞数。其中 MPO 为绿色荧光,DAPI 为蓝色荧光(细胞核)。

1.9 统计学处理

使用 GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, CA, USA) 软件进行数据分析。本研究涉及的所有计量资料均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示且采用单因素方差分析,其中组间比较分别采用 Dunnett's 检验和 Sidak's 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HIF-2 α 在脑出血损伤后不同时间点的表达

免疫印迹结果显示, HIF-2 α 的表达在脑出血后 24 h 开始上调($0.555 4 \pm 0.070 2, P=0.000$), 在 3 d 达到表达高峰($2.368 4 \pm 0.346 6, P=0.000$), 在 5 d 开始下降($1.718 8 \pm 0.235 5, P=0.001$), 因此把 3 d 作为后续实验的时间点(图 1, 表 1)。

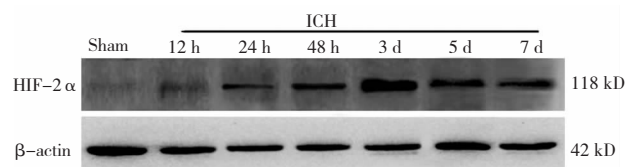


图 1 HIF-2 α 在大鼠脑出血模型中各时间点表达情况

表 1 HIF-2 α 各时间点相对表达量比较

组别	HIF-2 α / β -actin 灰度值
Sham 组	$0.114 8 \pm 0.023 3$
12 h 组	$0.166 4 \pm 0.041 4$
24 h 组	$0.555 4 \pm 0.070 2$
48 h 组	$1.086 7 \pm 0.143 8$
3 d 组	$1.527 4 \pm 0.097 0^a$
5 d 组	$1.252 2 \pm 0.093 1$
7 d 组	$1.132 3 \pm 0.075 8$
F 值	203.600
P 值	0.000

注:a, 与 Sham 组比较, $P=0.000$

2.2 免疫印迹分析 HIF-2 α 基因过表达效果

为了评估慢病毒转染后 HIF-2 α 基因的过表达效果, 采用免疫印迹在蛋白水平检测 HIF-2 α 的表达情况。与 ICH 组($1.522 5 \pm 0.133 1$)相比, Oe-HIF-2 α 组 HIF-2 α 表达($2.206 1 \pm 0.155 9$)明显上调($P=0.000$), 如图 2, 表 2 所示。

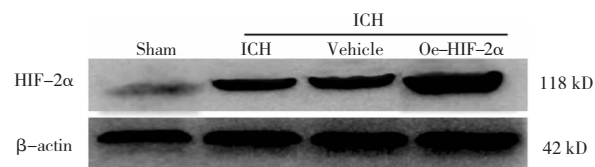


图 2 HIF-2 α 过表达效果分析

表 2 HIF-2 α 过表达效果相对灰度值分析

组别	HIF-2 α / β -actin 灰度值
Sham 组	$0.214 4 \pm 0.033 0$
ICH 组	$1.522 5 \pm 0.133 1^a$
Vehicle 组	$1.515 8 \pm 0.176 1$
Oe-HIF-2 α 组	$2.206 1 \pm 0.155 9^{bc}$
F 值	186.900
P 值	0.000

注:a, 与 Sham 组比较, $P=0.000$; b: 与 ICH 组相比, $P=0.000$; 与 Vehicle 组相比, $P=0.000$

2.3 HIF-2 α 过表达减轻脑出血后脑水肿并改善了神经功能评分

为了探讨 HIF-2 α 在脑出血损伤后的作用,在建模后第 3 天进行脑含水量检测和神经功能评分。结果显示,与 ICH 组 ($0.804\ 8 \pm 0.001\ 7$) 相比,Oe-HIF-2 α 组 ($0.793\ 5 \pm 0.002\ 5$) 在 3 d 时脑含水量明显降低 ($P=0.000$),并且 ICH 组 ($0.804\ 8 \pm 0.001\ 7$) 和 Vehicle 组 ($0.803\ 3 \pm 0.000\ 8$) 脑含水量没有明显的统计学差异 ($P=0.838$)。同样的,与 ICH 组 ($7.900\ 0 \pm 0.737\ 8$) 相比,Oe-HIF-2 α 组 ($14.700\ 0 \pm 0.674\ 9$) 大鼠在 3 d 时神经功能评分明显改善 ($P=0.000$)。以上结果说明,过表达 Oe-HIF-2 α 可以减轻大鼠脑出血损伤(表 3)。

表 3 各组大鼠神经功能评分和脑含水量测定

组别	Garcia评分	脑含水量
Sham组	$17.600\ 0 \pm 0.516\ 3$	$0.781\ 9 \pm 0.004\ 6$
ICH组	$7.900\ 0 \pm 0.737\ 8^a$	$0.804\ 8 \pm 0.001\ 7^a$
Vehicle组	$8.100\ 0 \pm 0.875\ 5$	$0.803\ 3 \pm 0.000\ 8$
Oe-HIF-2 α 组	$14.700\ 0 \pm 0.674\ 9^{bc}$	$0.793\ 5 \pm 0.002\ 5^{bc}$
<i>F</i> 值	463.300	56.480
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注:a,与 Sham 组比较, $P=0.000$;b:与 ICH 组比较, $P=0.000$;c:与 Vehicle 组比较, $P=0.000$

2.4 HIF-2 α 过表达在脑出血后降低 3 d 时下游炎症因子的表达水平

为了确定 HIF-2 α 对脑出血损伤后炎症反应的影响,在建模后第 3 天通过免疫印迹检测脑出血后肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)和白细胞介素-18(interleukin-18,IL-18)的表达水平。免疫印迹结果显示,与 Sham 组相比($0.786\ 3 \pm 0.123\ 7$, $0.373\ 1 \pm 0.029\ 4$, $0.270\ 4 \pm 0.018\ 5$),脑出血后 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-18 的表达水平($2.121\ 5 \pm 0.239\ 8$, $1.527\ 9 \pm 0.119\ 5$, $1.667\ 2 \pm 0.252\ 3$)明显升高 ($P=0.000$);与 ICH 组相比,HIF-2 α 过表达慢病毒处理后这些炎症因子在脑出血后的表达($1.350\ 4 \pm 0.191\ 5$, $1.158\ 4 \pm 0.070\ 8$, $0.784\ 2 \pm 0.073\ 9$)明显下降 ($P=0.000$)。以上结果说明,HIF-2 α 可以抑制脑出血后的炎症反应(图 3,表 4)。

2.5 HIF-2 α 过表达下调了病灶周边 MPO 的表达水平

通过免疫光染色检测了病灶周边髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)阳染细胞数目以进一步明确 HIF-2 α 对脑出血后炎症反应的影响。结果显示,与 Sham 组 ($0.625\ 0 \pm 0.517\ 5$) 相比,ICH 组 MPO 表达阳性细胞($5.125\ 0 \pm 0.991\ 0$)显著增加 ($P=0.000$);ICH 组与 Vehicle 组 MPO 阳性细胞无明显统计学差异 ($P=0.095$);Oe-HIF-2 α 组 MPO 阳性细胞($3.500\ 0 \pm 0.534\ 5$)明显少于 ICH 组及 Vehicle 组 ($P=0.002$),如图 4 所示。

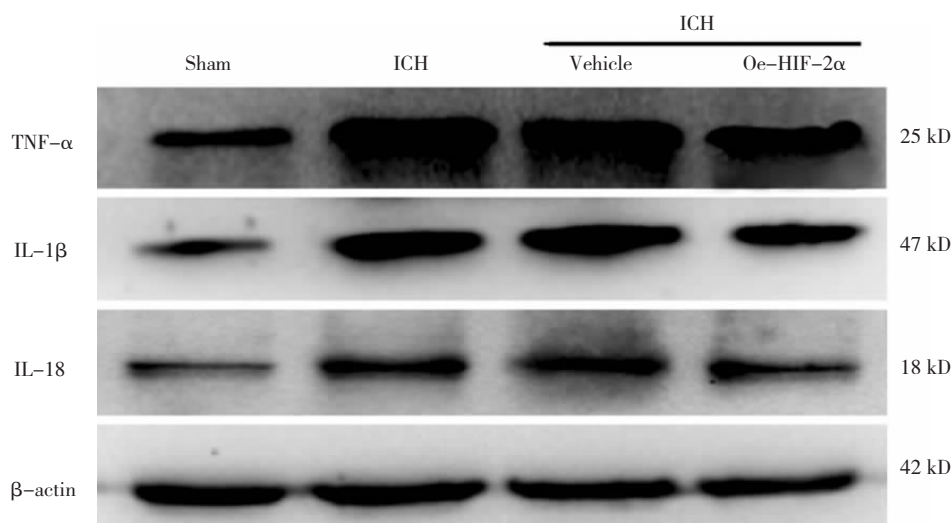
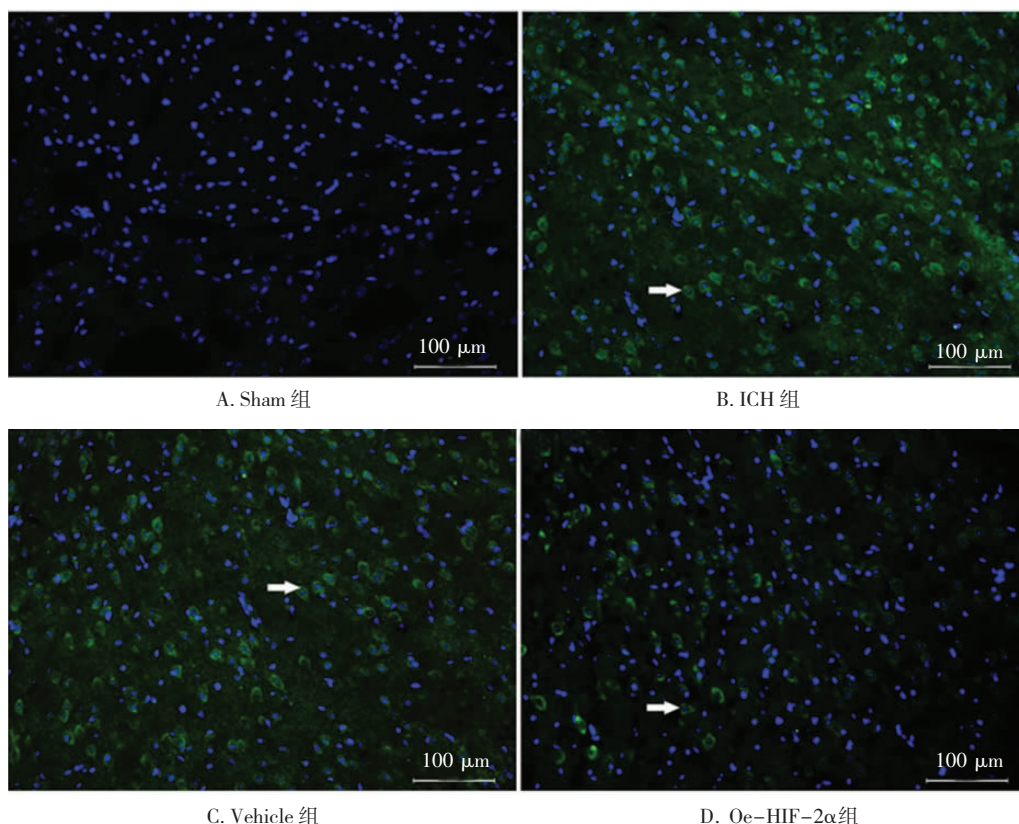


图 3 脑出血后 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-18 的表达

表 4 各组大鼠病灶周边区域 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-18 相对表达量分析

组别	TNF- α / β -actin 灰度值	IL-1 β / β -actin 灰度值	IL-18/ β -actin 灰度值
Sham组	$0.786\ 3 \pm 0.123\ 7$	$0.373\ 1 \pm 0.029\ 4$	$0.270\ 4 \pm 0.018\ 5$
ICH组	$2.121\ 5 \pm 0.239\ 8^a$	$1.527\ 9 \pm 0.119\ 5^a$	$1.667\ 2 \pm 0.252\ 3^a$
Vehicle组	$2.138\ 5 \pm 0.377\ 2$	$1.500\ 3 \pm 0.061\ 8$	$1.685\ 9 \pm 0.193\ 7$
Oe-HIF-2 α 组	$1.350\ 4 \pm 0.191\ 5^{bc}$	$1.158\ 4 \pm 0.070\ 8^{bc}$	$0.784\ 2 \pm 0.073\ 9^{bc}$
<i>F</i> 值	36.230	241.200	90.510
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与 Sham 组比较, $P=0.000$;b:与 ICH 组比较, $P<0.05$;c:与 Vehicle 组比较, $P<0.05$



注:箭头所示为阳性表达细胞

图 4 免疫荧光检测脑出血后病灶周边 MPO 的表达 ($n=5$)

3 讨论

脑出血是一种严重的中风亚型,目前尚缺乏有效的临床干预手段。脑出血可导致原发性脑损伤和继发性脑损伤^[1],其中继发性脑损伤是脑出血患者神经功能恶化的关键原因^[13-14]。而脑出血后的炎症反应是引起继发性脑损伤的关键原因^[15-16]。病灶周边炎症细胞浸润,如中性粒细胞、巨噬细胞和小胶质细胞等,以及炎症介质的释放,加重了血脑屏障破坏、组织损伤和脑细胞死亡。

HIF-2 α 是缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factors, HIFs) 的重要亚型,是氧稳态的主要转录调节因子,对于适应缺氧损伤至关重要。HIF-2 α 广泛参与神经母细胞瘤^[17]、急性呼吸窘迫综合征^[18]和肥厚性心肌病^[19]等疾病过程。Kapitsinou 等^[8]发现 HIF-2 α 可以通过抑制炎症反应减轻小鼠急性肾损伤, Martín-Aragón 等^[20]证明在缺血性中风中 HIF-2 α 被优先激活,进而介导神经元低氧适应从而减轻脑缺血损伤,然而在脑出血中损伤中 HIF-2 α 的作用还

未见报道。本研究表明,脑出血后 HIF-2 α 的表达上调且在第 3 天达到峰值。过表达 HIF-2 α 有效降低了脑出血 3 d 时的脑水肿和病灶周边的 MPO 表达,并且明显改善了神经功能。

脑出血后, TNF- α 、IL-18 和 IL-1 β 等炎症因子的释放是导致继发性损伤的重要原因^[21-23]。Li 等^[24]发现核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 可以通过调节 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 等炎症因子的表达进而调控脑出血后的炎症反应。D' Ignazio 等^[25]提出 NF- κ B 可以诱导 HIF-2 α 的表达,并且受 HIF-2 α 反馈调节。本研究表明,过表达 HIF-2 α 能有效降低脑出血 3 d 时 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 等炎症因子的表达水平,推测这可能是由于 HIF-2 α 反馈抑制 NF- κ B 表达,从而降低下游炎症因子的表达水平。这一猜想将在本课题组后续的研究中得到验证。此外, HIF-2 α 可能通过调控巨噬细胞的活化影响脑出血后的炎症反应。脑出血后巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞(促炎性)活化是导致炎症损伤的重要原因^[24-26]。Choe 等^[27]发现 HIF-2 α 通过诱导巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞活化(抑炎型)减轻了脂肪组织炎症和胰

岛素抵抗。

以上结果说明,在脑出血损伤后,HIF-2 α 表达上调并且通过抑制炎症反应减轻大鼠的脑出血损伤。本研究表明 HIF-2 α 可能是脑出血治疗的潜在靶点,但是 HIF-2 α 对于脑出血后炎症调控的具体机制还需深入探究。

参 考 文 献

- [1] Zhou Y, Wang Y, Wang J, et al. Inflammation in intracerebral hemorrhage: from mechanisms to clinical translation[J]. Prog Neurobiol, 2014, 115: 25–44.
- [2] Keep RF, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets[J]. Lancet Neurol, 2012, 11(8): 720–731.
- [3] Wilkinson DA, Pandey AS, Thompson BG, et al. Injury mechanisms in acute intracerebral hemorrhage[J]. Neuropharmacology, 2018, 134(Pt B): 240–248.
- [4] Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors[J]. Blood Rev, 2013, 27(1): 41–53.
- [5] Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch[J]. Trends Biochem Sci, 2012, 37(9): 364–372.
- [6] Dehne N, Fuhrmann D, Brune B. Hypoxia-inducible factor (HIF) in hormone signaling during health and disease[J]. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2013, 11(2): 125–135.
- [7] Maes C, Carmeliet G, Schipani E. Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease[J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8(6): 358–366.
- [8] Kapitsinou PP, Sano H, Michael M, et al. Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury[J]. J Clin Invest, 2014, 124(6): 2396–2409.
- [9] Zeng J, Chen Y, Ding R, et al. Isoliquiritigenin alleviates early brain injury after experimental intracerebral hemorrhage via suppressing ROS- and/or NF- κ B-mediated NLRP3 inflammasome activation by promoting Nrf2 antioxidant pathway[J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 119.
- [10] Chen X, Zhang X, Chen T, et al. Inhibition of immunoproteasome promotes angiogenesis via enhancing hypoxia-inducible factor-1 α abundance in rats following focal cerebral ischaemia[J]. Brain Behav Immun, 2018, 73: 167–179.
- [11] He Q, Li Z, Wang Y, et al. Resveratrol alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through Sirt1-dependent autophagy induction[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 50: 208–215.
- [12] You Y, Hou Y, Zhai X, et al. Protective effects of PGC-1 α via the mitochondrial pathway in rat brains after intracerebral hemorrhage[J]. Brain Res, 2016, 1646: 34–43.
- [13] Babu R, Bagley JH, Di C, et al. Thrombin and hemin as central factors in the mechanisms of intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury and as potential targets for intervention[J]. Neurosurg Focus, 2012, 32(4): E8.
- [14] Elliott J, Smith M. The acute management of intracerebral hemorrhage: a clinical review[J]. Anesth Analg, 2010, 110(5): 1419–1427.
- [15] Chen S, Yang Q, Chen G, et al. An update on inflammation in the acute phase of intracerebral hemorrhage[J]. Transl Stroke Res, 2015, 6(1): 4–8.
- [16] Aronowski J, Zhao X. Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: secondary brain injury[J]. Stroke, 2011, 42(6): 1781–1786.
- [17] Pahlman S, Mohlin S. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in neuroblastoma[J]. Cell Tissue Res, 2018, 372(2): 269–275.
- [18] Dotsch A, Eisele L, Rabeling M, et al. Hypoxia inducible factor-2 α and prolinhydroxylase 2 polymorphisms in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS)[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(6): E1266.
- [19] Lin Q, Yun Z. The hypoxia-inducible factor pathway in adipocytes: the role of HIF-2 in adipose inflammation and hypertrophic cardiomyopathy[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2015, 6: 39.
- [20] Martín-Aragón Baudel MAS, Rae MT, Darlison MG, et al. Preferential activation of HIF-2 α adaptive signalling in neuronal-like cells in response to acute hypoxia[J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0185664.
- [21] Ma Q, Chen S, Hu Q, et al. NLRP3 inflammasome contributes to inflammation after intracerebral hemorrhage[J]. Ann Neurol, 2014, 75(2): 209–219.
- [22] Fang HY, Ko WJ, Lin CY. Inducible heat shock protein 70, interleukin-18, and tumor necrosis factor α correlate with outcomes in spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. J Clin Neurosci, 2007, 14(5): 435–441.
- [23] Feng L, Chen Y, Ding R, et al. P2X7R blockade prevents NLRP3 inflammasome activation and brain injury in a rat model of intracerebral hemorrhage: involvement of peroxynitrite[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 190.
- [24] Li Z, He Q, Zhai X, et al. Foxo1-mediated inflammatory response after cerebral hemorrhage in rats[J]. Neurosci Lett, 2016, 629: 131–136.
- [25] D'Ignazio L, Batie M, Rocha S. Hypoxia and inflammation in cancer, focus on HIF and NF- κ B[J]. Biomedicines, 2017, 5(2): E21.
- [26] Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(11): 738–749.
- [27] Choe SS, Shin KC, Ka S, et al. Macrophage HIF-2 α ameliorates adipose tissue inflammation and insulin resistance in obesity[J]. Diabetes, 2014, 63(10): 3359–3371.

(责任编辑: 冉明会)