

右美托咪定通过 HIF-1 α 对缺血性脑卒中 线粒体功能的调控*

张雯 梅静 张宇轩 李瑞轩 陈哲徐 徐桂萍

(新疆维吾尔自治区人民医院麻醉科, 新疆 乌鲁木齐 830001)

【摘要】 目的 基于 HIF-1 α 对线粒体功能调节作用, 探讨右美托咪定对缺血性脑卒中大鼠神经功能的保护。方法 将 48 只 SD 大鼠随机分为假手术组、脑缺血组和右美托咪定组、右美托咪定+YC-1 组。除假手术组大鼠, 各组大鼠采用 Longa 法构建脑缺血再灌注模型, 期间腹腔注射右美托咪定(50 μ g/kg)或 YC-1(5 mg/kg)。24 h 后先评估大鼠神经功能与脑梗死体积占比, 再取脑组织后提取线粒体检测线粒体膜电位与线粒体呼吸链复合物活性, 最后通过试剂盒检测 ROS、GSH 与 ATP 水平, 以 Western blot 检测 HIF-1 α 表达。结果 脑缺血组大鼠神经功能评分降低, 出现了脑梗死区域。与脑缺血组相比, 右美托咪定明显增加了大鼠的神经功能评分, 减少了脑梗死体积占比。此外, 右美托咪定上调了线粒体膜电位水平, 提高了线粒体呼吸链复合物 I / II / III 活性。与此同时, 右美托咪定组大鼠脑组织中 HIF-1 α 表达明显上调, ROS 水平下降的同时 GSH 与 ATP 水平明显增加。然而, 右美托咪定+YC-1 组大鼠脑组织中 HIF-1 α 表达明显降低, 且线粒体膜电位明显减低, 呼吸链复合物活性降低。最终大鼠神经功能评分增加, 脑梗死体积占比增加。结论 右美托咪定通过上调 HIF-1 α 表达, 改善了线粒体功能, 从而降低氧化应激反应, 减少脑梗死区域, 最终发挥神经功能保护作用。

【关键词】 右美托咪定; 低氧诱导因子-1 α ; 线粒体功能; 缺血性脑卒中

【中图分类号】 R743.3 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.09.004

Regulation of dexmedetomidine on mitochondrial function in ischemia stroke through HIF-1 α

ZHANG Wen, MEI Jing, ZHANG Yuxuan, LI Ruixuan, CHEN Zhexu, XU Guiping

(Department of Anesthesiology, The People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China)

【Abstract】 **Objective** Based on the regulation of mitochondrial function through HIF-1 α , to explore the effects of dexmedetomidine on the neurological function of rats with ischemic stroke. **Methods** 48 SD rats were randomly divided into Sham group, Ischemia stroke group, Dexmedetomidine group, and Dexmedetomidine+YC-1 group. Longa method was applied to construct cerebral ischemia / reperfusion model in rats except for Sham group, during which dexmedetomidine (50 μ g/kg) or YC-1 (5mg/kg) was injected intraperitoneally. After 24 hours, neurological function and the cerebral infarction volume were evaluated, and then the brains were taken and mitochondria were extracted to detect the activity of mitochondrial membrane potential and mitochondrial respiratory chain complexes. Finally, the levels of ROS, GSH and ATP were detected by the kit, and HIF-1 α was detected by Western blot. **Results** Rats in Ischemia stroke group appeared decreases in the neurological score and cerebral infarction. Compared with Ischemia group, dexmedetomidine significantly increased the neurological scores of rats and reduced the proportion of cerebral infarction volume. In addition, dexmedetomidine up-regulated the level of mitochondrial membrane potential and increased the activity of mitochondrial respiratory chain complex I / II / III. At the same time, the expression of HIF-1 α in brain of the dexmedetomidine group was significantly increased, and the level of ROS decreased while the level of GSH and ATP increased significant-

基金项目:国家自然科学基金委员会资助项目(81960053);新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2020D01C236)

通信作者:徐桂萍,主任医师,教授,博士生导师,E-mail:Olivine@tom.com

引用本文:张雯,梅静,张宇轩,等.右美托咪定通过 HIF-1 α 对缺血性脑卒中线粒体功能的调控[J].西部医学,2022,34(9):1265-1271. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.09.004

ly. However, the expression of HIF-1 α in the brain tissue of rats in the dexmedetomidine + YC-1 group significantly reduced, and the mitochondrial membrane potential significantly reduced, the activity of respiratory chain complexes reduced as well. In the end, rats showed an increase in neurological score and an increase in the proportion of cerebral infarction volume. **Conclusion** Dexmedetomidine improves mitochondrial function by up-regulating the expression of HIF-1 α , thereby reducing oxidative stress, reducing cerebral infarction areas, and ultimately exerting neuroprotective effects.

【Key words】 Dexmedetomidine; Hypoxia-inducible factor-1 α ; Mitochondrial function; Ischemia stroke

缺血性脑卒中(Ischemia stroke, IS)是一种严重威胁中老年人健康的脑血管疾病^[1-2]。目前 IS 主要以静脉溶栓等方式恢复缺血区血流,但这常会伴随再灌注损伤的风险。其机制包括活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的生成和释放,线粒体凋亡途径启动,线粒体结构的破坏^[3]。如何减轻 IS 治疗过程中再灌注损伤已成为目前国内外研究热点。低氧诱导因子-1 α (Hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 是机体应对缺氧反应的重要调节因子^[4]。缺氧条件下,由于线粒体呼吸链电子传递阻断会造成 ROS 的大量产生,在此过程中,HIF-1 α 由于脯氨酰羟化酶的抑制而在细胞核中积累。然而已有研究表明,低氧环境中,HIF-1 α 可以通过多种途径修复呼吸链损伤,转变能量产生方式,减少细胞内 ROS 的产生^[5]。因此,HIF-1 α 表达增加可能是低氧环境下机体内源性保护通路的启动,对 IS 局部缺血区具有正向的调节作用。右美托咪定是一种选择性 α_2 肾上腺素受体激动剂,具有良好的镇静、镇痛作用而被广泛用于围手术期的各个过程^[6]。近年来研究表明右美托咪定对身体器官的缺血/再灌注损伤具有明显保护作用,涉及线粒体功能的保护,氧化应激与炎症反应的抑制^[7-8]。然而,右美托咪定对于 HIF-1 α 信号通路调节研究鲜少。因此,本研究拟通过脑缺血再灌注模型构建,探究 HIF-1 α 在右美托咪定调节 IS 神经功能与梗死面积中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 48 只 SPF 级健康的雄性大鼠,7 周龄,体质量 220~250g,由新疆医科大学动物实验中心提供,动物生产合格证号:SCXK(新)2018-0001。所有大鼠饲养于 SPF 级动物房中,恒温(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,恒湿(60 \pm 5)%,日常采用日光灯采光,周期为 12h,自由饮食饮水。本实验动物的操作和处理过程全部遵守《中华人民共和国卫生部动物实验管理条例》及《实验动物管理规定》,并经我院伦理委员会审核批准。

1.2 实验试剂与仪器 盐酸右美托咪定(美国 MCE 公司,纯度:98.54%,批号:420397);YC-1(美国 MCE 公司,纯度:99.48%,批号:370255);脑缺血线栓(广州佳灵生物科技有限公司,型号:L3200,批号:1020-1905);戊巴比妥钠(上海思域化工科技有限公司,批

号:394003),乙酰水杨酸(麦克林试剂公司,批号:M390293),2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC,北京索莱宝生物科技有限公司)溶液;线粒体分离试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,批号:379843);BCA 试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,批号:463721);线粒体膜电位检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号:A350-17);线粒体呼吸链复合物 I / II / III 试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号:A659-20);谷胱甘肽(GSH)试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号:A673-31);ATP 检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号:A932-13);HIF-1 α (武汉三鹰生物科技有限公司,批号:4304-1583)与 β -actin(武汉三鹰生物科技有限公司,批号:4307-1674)。分光光度计(上海元析仪器公司,型号:AA3800);荧光酶标仪(美国 Thermo 公司,型号:Fluoroskan FL);凝胶电泳装置(美国 Biorad 公司,型号:Mini-protean Tetra);化学发光成像仪(上海天能生物公司,型号:5200)。

1.3 实验分组与方案 大鼠入组后随机分为假手术组、脑缺血组、右美托咪定组、右美托咪定+YC-1 组,每组 12 只。所有大鼠适应性喂养 1 周后,开展中动脉缺血/再灌注模型的构建,在中动脉封闭后,根据不同的分组腹腔注射右美托咪定或者 YC-1,参考文献中药剂量,右美托咪定为 50 μ g/kg^[9],YC-1 剂量为 5 mg/kg^[10]。假手术组与脑缺血组大鼠腹腔注射生理盐水,2 h 后拔出线栓,恢复缺血区血流,24 h 后开展神经功能评估测试。最后,处死所有大鼠,取脑组织开展脑梗死体积染色、线粒体功能评估,氧化/还原因子检测与 Western blot。

1.4 中动脉缺血/再灌注模型构建 参考文献^[11]中改进的 Longa 线栓法构建中动脉缺血/再灌注模型。取非假手术组大鼠麻醉(0.3%戊巴比妥钠,腹腔注射,0.1~0.15 mL/10g),固定于鼠板上,颈部消毒、开口并分离出左侧颈动脉,夹闭颈总动脉、颈内动脉并结扎颈外动脉。颈外动脉开口,插入线栓,前进至颈内动脉约 16 mm。固定线栓,待中动脉缺血 2 h,麻醉大鼠(若苏醒则补加 0.1 mL 戊巴比妥钠),拔出线栓并结扎,缝合伤口。假手术组大鼠麻醉后,分离出颈动脉血管,不插线栓。所有动物手术过程中使用保温

毯维持体温,在术后接受镇痛/抗炎治疗(乙酰水杨酸 5 mg/kg)。参考文献^[12]中改进的神经功能缺损评分标准对再灌注 24h 大鼠进行神经功能评估,总分由 0 分至 18 分,其中 0 分代表神经功能正常,评分增加代表神经功能损伤加重。测试内容包括:提尾测试,运动测试,感觉测试,平衡测试,反射评估和不正常运动评估。

1.5 脑梗死体积占比评估 将大鼠处死,取完整脑组织,-20℃环境中冷冻变硬,切成 5 片,约 2 mm。将切片浸润于 2% TTC 溶液中,37℃避光孵育,每 5 min 翻动一次,共 30 min。染色后,将切片按顺序排列,拍照后分析梗死区面积,最终计算得出梗死体积占比。TTC 染色原理是正常活细胞组织存在脱氢酶,将 TTC 还原成红色甲臢化合物,但梗死区细胞死亡,脱氢酶活力丧失,无法还原 TTC。

1.6 大鼠线粒体指标检测

1.6.1 大鼠脑组织线粒体分离 脑缺血再灌注后 24 h,大鼠处死后分离脑组织,按照质量:体积=1:4 的比例加入 PMSF 溶液与预冷的线粒体分离缓冲液混合溶液匀浆。将匀浆液在 1000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液。将上清液转移到另一个离心管中,在 15000 r/min 条件下离心 10 min,得到沉淀即为线粒体。将线粒体沉淀以 100 μL 分离缓冲液重悬,通过 BCA 法测定线粒体蛋白浓度。

1.6.2 线粒体膜电位检测 取新鲜分离的线粒体样品,采用 JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位。用 PBS 洗涤线粒体样品,取试剂盒中 incubation buffer,混匀并预热至 37℃。吸取 100 μL incubation buffer,加入 10 μL JC-1 试剂,涡旋混匀配成 JC-1 工作液,加入 10 μg 的线粒体样品,37℃孵育 15 min,混匀细胞,使用荧光酶标仪扫描激发波长 550 nm,发射波长 600 nm 条件下红色荧光与激发波长 485 nm,发射波长 535 nm 条件下绿色荧光。最终结果以红色/绿色相对荧光强度表示线粒体膜电位,比值高表明线粒体膜电位正常。

1.6.3 大鼠脑组织线粒体呼吸链复合物活性测定

取新鲜分离的线粒体样品,测试原理与步骤如下:复合物 I 通常称为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶 Q 还原酶(NADH-CoQ),基于辅酶 Q 底物,在鱼藤酮存在的情况下,通过复合物 I 催化转化成还原型泛醌,同时还原型 NADH 转化为氧化型 NADH,造成 340 nm 处吸收峰值的降低,由此测定复合物 I 的活性。移取 780 μL 缓冲液(reagent A)至新的比色皿中,加入 100 μL 反应液(regent B),再加入 20 μL 底物液(reagent D),30℃条件下孵育 3 min,加入 10 μg

线粒体样品蛋白,混匀后在分光光度仪下检测,样品活性读数:0 分钟时(340 波长读数-380 波长读数)-3 分钟时(340 波长读数-380 波长读数)。复合物 II 通常称为琥珀酸-辅酶 Q 还原酶,基于琥珀酸底物,通过复合物 II 的催化氧化为富马酸,同时氧化型二氯酚靛酚(Dichlorophenol-indophenol, DCPIP)被还原,造成 600 nm 处吸光度值降低,由此测定复合物 II 的活性。移取 780 μL 缓冲液(reagent A)至新的比色皿中,加入 100 μL 反应液(regent B),再加入 20 μL 底物液(reagent D),30℃条件下孵育 3 min,加入 10 μg 线粒体样品蛋白,混匀后在分光光度仪下检测,样品活性读数:0 分钟时(600 波长读数)~5 分钟时(600 波长读数)。复合物 III 通常称为辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶,基于还原型辅酶 Q 底物,在抗霉素存在的情况下,通过复合物 III 的催化,转化为泛醌或辅酶 Q,同时氧化型细胞色素 C 转化为还原型细胞色素 C,造成 550 nm 处吸光值的降低,由此测定复合物 III 的活性。移取 870 μL GENMED 缓冲液(reagent A)至新的比色皿中,加入 10 μL GENMED 反应液(regent B),再加入 20 μL GENMED 底物液(reagent D),室温下静置 10 min,加入 20 μL GENMED 专性液(reagent E),加入 15 μg 线粒体样品蛋白,混匀后在分光光度仪下检测,样品活性读数:2 分钟时(550 波长读数)~0 分钟时(550 波长读数)。

1.7 脑组织中谷胱甘肽、ROS 和 ATP 水品检测 取大鼠缺血区组织,按质量:体积=1:4 加入 PBS 匀浆,3000 r/min 条件下离心后取上清液备用。谷胱甘肽是由谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸组成的三肽,基于还原型 GSH 可与二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)反应,生成一种黄色化合物,在 405 nm 下可以通过比色定量测定,结果以荧光强度表示。分别取一只酶管和非酶管,加入 0.2 mL 1 mmol/L 的 GSH 溶液与 0.2 mL 待测匀浆,37℃反应 5 min,加入 0.1 mL 试剂一应用液,37℃反应 5 min。3000 r/min 条件下离心 10 min,取 1 mL 上清液,加入 1 mL 试剂三应用液,0.25 mL 试剂四应用液与 0.05 mL 试剂五应用液,混匀后室温静置 15 min,分光光度仪在 412nm 条件下检测各管 OD 值。由于 DCFH-DA(2,7-Dichlorofluorescein Diacetate)探针可以自由穿过细胞膜,当进入细胞内,会被水解为 DCFH,在活性氧存在条件下,被氧化为强绿色荧光物质 DCF。取匀浆后细胞悬液,加入 DCFH-DA 荧光探针,避光孵育 30~60 min,3000 r/min 条件下离心,收集细胞沉淀,PBS 重悬。使用分光光度仪在激发波长 502 nm,发射波长 530 nm 处检测 DCF 荧光强度,结果以荧光强度表示。由于肌酸激酶催化

ATP 和肌酸生成磷酸肌酸,可以通过检测磷酸肌酸来反映 ATP 含量。取 30 μL 样本,加入 100 μL 底物 I, 200 μL 底物 II, 30 μL 促进剂,混匀后水浴 30 min。加入 50 μL 沉淀剂,充分混匀后,4000 r/min 离心 5 min,取上清液 300 μL 与 500 μL 显色液,混匀,室温静置 2 min,加入 500 μL 终止剂,室温静置 5 min,使用分光光度仪在 636 nm 处检测各管 OD 值,根据标曲计算出 ATP 含量。

1.8 HIF-1 α 蛋白表达检测 提取分离大鼠缺血区组织,按质量:体积=1:4加入 RIPA 裂解液,在冰上研磨成单细胞悬液,离心(12000 r/min, 10 min)后取上清液,加入 5 \times 上样缓冲液,蛋白煮沸变性后开展 SDS-PAGE 电泳。每个样品孔加入 10 μg 样品,设置电泳分离条件为 30V/30min,90V/60min,待上样缓冲液到达胶底。截取目标蛋白条带并开展湿法转膜,设置转膜条件为 2mA/60min。PBST 清洗,2%牛血清蛋白封闭 2 h。PBST 清洗,滴加检测 Anti-HIF-1 α 或 Anti- β -actin 一抗稀释液,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日取出条带, PBST 清洗,孵育二抗稀释液,滴加 ECL 发光液显影,获得条带后使用 ImageJ 软件进行分析,最终结果以 HIF-1 α 与 β -actin 蛋白灰度值的比值表示。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,所有数据以($\bar{x} \pm s$)统计,各组数据之间采用单因素方差分析(One way Anova), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 右美托咪定对 IS 大鼠神经功能的影响 假手术组大鼠未进行插线栓操作,神经功能评分为 0 分,脑缺血组大鼠神经功能评分增加,症状表现为前肢屈曲,单侧转圈且在平衡木上易于跌落;与脑缺血组比较,右美托咪定组大鼠神经功能评分减少($P < 0.05$)。与右美托咪定组相比,右美托咪定+YC-1 组大鼠神经功能评分明显增加($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 右美托咪定对 IS 大鼠缺血区梗死的影响 假手术组大鼠没有插入线栓,大脑切片 TTC 染色呈现为红色,但脑缺血组缺血侧脑组织展现出明显的白色区

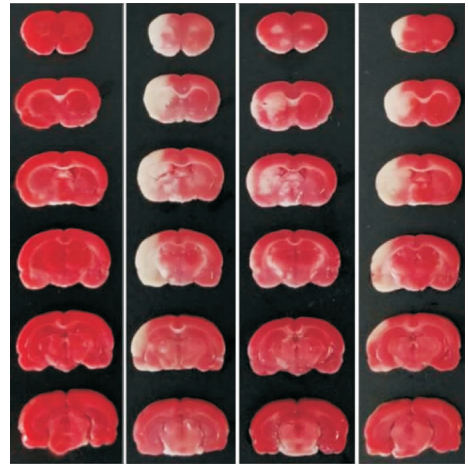
表 1 各组大鼠神经功能评分的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of neurological scores of rats in each group

评分	假手术组	脑缺血组	右美托咪定组	右美托咪定+YC-1 组
神经功能评分	0	10.47 \pm 4.49	6.40 \pm 1.64 ^①	9.80 \pm 2.62 ^②

注:与脑缺血组相比,① $P < 0.05$;与右美托咪定组相比,② $P < 0.05$

域,即梗死区域;与脑缺血组相比,右美托咪定组大鼠缺血侧梗死体积占比明显减少($P < 0.05$);然而,与右美托咪定组相比,右美托咪定+YC-1 组大鼠缺血侧梗死体积占比明显增加($P < 0.05$)。见图 1、表 2。



假手术组 脑缺血组 右美托咪定组 右美托咪定+YC-1组

图 1 各组大鼠脑梗死区域染色

Figure 1 Staining of cerebral infarct area of rats in each group

表 2 各组大鼠脑梗死区域占比的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Percentage of cerebral infarct area of rats in each group

项目	假手术组	脑缺血组	右美托咪定组	右美托咪定+YC-1 组
脑梗死体积占比($\times 10^{-2}$)	0	33.56 \pm 4.19	4.30 \pm 0.96 ^①	29.65 \pm 2.22 ^②

注:与脑缺血组相比,① $P < 0.05$;与右美托咪定组相比,② $P < 0.05$

2.3 右美托咪定对 IS 大鼠缺血区细胞线粒体膜电位的影响 与假手术组相比,脑缺血组 JC-1 水平明显降低($P < 0.05$);与脑缺血组相比,右美托咪定组 JC-1 水平明显增加($P < 0.05$);与右美托咪定组相比,右美托咪定+YC-1 组 JC-1 水平明显减少($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠线粒体膜电位的比较(RFU/mg, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of mitochondrial membrane potential of rats in each group

项目	假手术组	脑缺血组	右美托咪定组	右美托咪定+YC-1 组
JC-1 levels	25043.43 \pm 2903.48	17405.98 \pm 1836.43 ^①	22940.03 \pm 2069.63 ^②	18493.23 \pm 1978.83 ^③

注:与假手术组相比,① $P < 0.05$;与脑缺血组相比,② $P < 0.05$;与右美托咪定组相比,③ $P < 0.05$

2.4 右美托咪定对 IS 大鼠缺血区细胞线粒体复合物活性的影响 与假手术组相比,脑缺血组线粒体复合物 I / II / III 活性明显减少($P < 0.05$);与脑缺血组相

比,线粒体复合物 I / II / III 活性明显提高($P < 0.05$);与右美托咪定组相比,右美托咪定+YC-1 组线粒体复合物 I / II / III 活性明显升高($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠线粒体复合物活性的比较 (mmol/mg/min, $\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of mitochondrial complex activity of rats in each group

项目	假手术组	脑缺血组	右美托咪定组	右美托咪定+YC-1 组
Complex I	31.48 ± 0.11	19.38 ± 0.12 ^①	27.66 ± 0.11 ^②	21.48 ± 0.07 ^③
Complex II	13.91 ± 1.69	7.53 ± 0.59 ^①	11.89 ± 1.19 ^②	8.38 ± 0.71 ^③
Complex III	18.40 ± 0.04	12.09 ± 1.59 ^①	17.55 ± 2.56 ^②	11.38 ± 1.59 ^③

注:与假手术组相比,① $P < 0.05$;与脑缺血组相比,② $P < 0.05$;与右美托咪定组相比,③ $P < 0.05$

2.5 右美托咪定对 IS 大鼠缺血区 GSH、ROS 与 ATP 水平的影响 与假手术组相比,脑缺血组大鼠缺血区 GSH 水平增加,ROS 水平明显升高($P < 0.05$),而 ATP 水平明显减少;与脑缺血组相比,右美托咪定

组大鼠缺血区 GSH 与 ATP 水平明显增加,且 ROS 水平明显降低(均 $P < 0.05$);与右美托咪定组相比,右美托咪定+YC-1 组大鼠缺血区 GSH 与 ATP 水平明显降低,但 ROS 水平明显升高(均 $P < 0.05$)。见表 5。

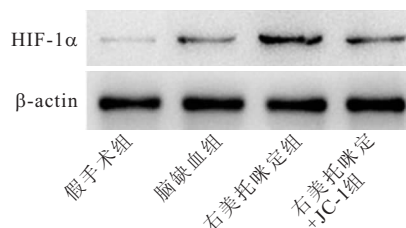
表 5 各组大鼠 GSH、ROS 与 ATP 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of GSH, ROS and ATP levels of rats in each group

项目	假手术组	脑缺血组	右美托咪定组	右美托咪定+YC-1 组
GSH(mmol/mg)	1.25 ± 0.04	1.42 ± 0.19	2.51 ± 0.37 ^②	1.25 ± 0.17 ^③
ROS	1.00 ± 0.12	2.55 ± 0.32 ^①	1.70 ± 0.14 ^②	2.38 ± 0.24 ^③
ATP(mmol/mg)	0.89 ± 0.07	0.46 ± 0.05 ^①	0.73 ± 0.12 ^②	0.57 ± 0.06 ^③

注:与假手术组相比,① $P < 0.05$;与脑缺血组相比,② $P < 0.05$;与右美托咪定组相比,③ $P < 0.05$

2.6 右美托咪定对 IS 大鼠缺血区 HIF-1 α 蛋白的影响 与假手术组相比,脑缺血组大鼠缺血区 HIF-1 α 蛋白增加;与脑缺血组相比,右美托咪定组大鼠缺血区 HIF-1 α 蛋白明显增加($P < 0.05$);与右美托咪定组相比,右美托咪定+YC-1 组大鼠缺血区 HIF-1 α 蛋白明显降低($P < 0.05$)。见图 2、表 6。

图 2 各组大鼠 HIF-1 α 蛋白表达Figure 2 HIF-1 α protein expression of rats in each group表 6 各组大鼠 HIF-1 α 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 6 Comparison of HIF-1 α protein expression of rats in each group

项目	假手术组	脑缺血组	右美托咪定组	右美托咪定+YC-1 组
HIF-1 α / β -actin	0.07 ± 0.00	0.26 ± 0.04 ^①	0.62 ± 0.06 ^②	0.37 ± 0.04 ^③

注:与假手术组相比,① $P < 0.05$;与脑缺血组相比,② $P < 0.05$;与右美托咪定组相比,③ $P < 0.05$

3 讨论

IS 是神经内科及围手术期常见的病理损伤,常表现为口眼歪斜,半身不遂的症状^[13]。本研究参考 Longa 线栓法构建了大鼠脑缺血/再灌注模型^[8],结果显示脑缺血组大鼠出现与临床相似的病理特征^[14],即前肢无法完全伸展,行走困难,且脑组织中出現梗死区域。因此,本研究脑缺血/再灌注模型成功模拟了 IS 患者溶栓后可能出现的再灌注损伤的现象。

寻找安全高效的脑保护药对于 IS 的治疗具有重要意义。近年来,右美托咪定作为临床麻醉过程中常用药物,被发现具有抗脑缺血/再灌注损伤的作用,但其机制尚未完全阐明^[4-5]。本研究中,在大鼠脑缺血发生后,给予右美托咪定发现大鼠的神经功能评分明显减少,且梗死体积的百分比明显减少。

线粒体是细胞内氧化磷酸化和 ATP 合成的主要

场所,是为细胞生命活动提供能量的重要细胞器^[15]。在 IS 患者中,由于缺血区血流受阻, O_2 水平下降,线粒体呼吸链电子流传递受阻,从而产生 ROS^[16]。由于 ROS 累积会继续攻击线粒体,造成线粒体复合物活性的降低,在 O_2 恢复后仍会出现线粒体呼吸链电子流传递阻滞的现象^[3]。因此,研究中常报道部分 IS 患者恢复了血流后,会出现更严重的再灌注损伤的情况^[17]。与此同时,再灌注损伤过程中往往会伴随着线粒体膜电位下降,DNA 损伤触发和蛋白质和脂质氧化,最终引起细胞功能障碍或死亡。本研究中也显示,与对照组相比,脑缺血组大鼠缺血区 ROS 水平升高,且线粒体膜电位明显降低,线粒体呼吸链复合物 I/II/III 活性都明显降低。与此同时,右美托咪定的干预明显减少了缺血区 ROS 水平,且增加了 ATP 与 GSH 水平,此外,线粒体膜电位明显增加,线粒体呼吸

链复合物 I / II / III 活性都明显升高。对应着行为学指标中,右美托咪定明显提高了脑缺血大鼠神经功能评分,且减少了大鼠的脑梗死体积占比。因此,线粒体呼吸链传递受阻是脑缺血后系列损伤的源头和始动环节,提高线粒体呼吸链复合物活性是减轻再灌注损伤的继发性关键因素。

已有研究证实,HIF-1 α 在线粒体功能障碍中的发挥正向调节作用^[18]。生理条件下,HIF-1 α 被迅速降解,但缺氧组织中,因为氧气浓度降低导致羟基化酶无法发挥作用,脯氨酸羟基化无法实现,进而 HIF-1 α 无法被泛素化蛋白酶体水解,最终 HIF-1 α 水平增加^[19]。本研究也有显示,HIF-1 α 在脑缺血组大鼠缺血区表达增加,且 GSH 水平升高。此外,在右美托咪定的作用下,HIF-1 α 表达与 GSH 水平继续增加。因此,HIF-1 α 可能是缺氧环境中,机体避免氧化应激内源性保护通路的起点^[20]。有研究表明,HIF-1 α 在缺氧期间通过多种途径降低 ROS 水平,包括:通过将细胞色素 c 氧化酶亚基 COX4-1 转换为 COX4-2 来提高复合体 IV 的效率;丙酮酸脱氢酶激酶 1 将丙酮酸从线粒体中分流,而乳酸脱氢酶 A 的诱导将丙酮酸转化为乳酸^[21-22]。此外,在 BNIP3 的诱导下,触发线粒体选择性自噬,在溶酶体中将受损的线粒体溶解为新裂变的线粒体提供能量^[23-24]。本研究结果也表明,在 HIF-1 α 抑制剂 YC-1 的作用下,相比于右美托咪定组,线粒体复合物 I / II / III 活性都出现了明显的降低,与脑缺血组水平相似,且 ROS 水平明显升高,而 GSH 水平降低。最终,行为学方面也有显示,脑缺血大鼠神经功能评分增加,且脑梗死体积占比增加。

4 结论

HIF-1 α 表达上调激活了机体内源性抗氧化通路,在脑缺血后恢复血流的过程中,通过提高线粒体复合体活性,促进了呼吸链中电子流的传递,降低缺血区 ROS 水平,最终减少了大鼠缺血区脑死体积占比,改善了大鼠神经功能。

【参考文献】

[1] MATHISEN S M, DALEN I, LARSEN J P, *et al.* Long-Term Mortality and Its Risk Factors in Stroke Survivors[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(3): 635-641.

[2] 殷鹏, 齐金蕾, 刘韞宁, 等. 2005~2017 年中国疾病负担研究报告[J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(12): 1145-1154.

[3] WANG H, ZHOU J, BI H, *et al.* Bioactive Ingredients from *Nitraria tangutorun* Bobr. Protect Against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury Through Attenuation of Oxidative Stress and the Inflammatory Response[J]. *J Med Food*, 2021, 24(7): 686-696.

[4] 林建国, 刘冰冰, 梁飞, 等. JAK2/STAT3/HIF-1 α 信号通路对

脑卒中的影响[J]. *新医学*, 2020, 51(1): 6-11.

[5] BOK S, KIM Y E, WOO Y, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α regulates microglial functions affecting neuronal survival in the acute phase of ischemic stroke in mice[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(67): 111508-111521.

[6] 刘相乐. 右美托咪定在临床麻醉中的应用效果分析[J]. *数理医药学杂志*, 2021, 34(9): 1361-1363.

[7] CHEN L, CAO J, CAO D, *et al.* Protective effect of dexmedetomidine against diabetic hyperglycemia-exacerbated cerebral ischemia/reperfusion injury: An in vivo and in vitro study[J]. *Life Sci*, 2019, 235: 116553.

[8] ZHU Y, LI S, LIU J, *et al.* Role of JNK Signaling Pathway in Dexmedetomidine Post-Conditioning-Induced Reduction of the Inflammatory Response and Autophagy Effect of Focal Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats[J]. *Inflammation*, 2019, 42(6): 2181-2191.

[9] FANG H, LI H F, YAN J Y, *et al.* Dexmedetomidine-up-regulated microRNA-381 exerts anti-inflammatory effects in rats with cerebral ischaemic injury via the transcriptional factor IRF4[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(4): 2098-2109.

[10] JIANG Q, GENG X, WARREN J, *et al.* Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) Mediates NLRP3 Inflammasome-Dependent-Pyrototic and Apoptotic Cell Death Following Ischemic Stroke[J]. *Neuroscience*, 2020, 448: 126-139.

[11] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.

[12] MORRIS G P, WRIGHT A L, TAN R P, *et al.* A Comparative Study of Variables Influencing Ischemic Injury in the Longa and Koizumi Methods of Intraluminal Filament Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e0148503.

[13] 王勇, 陈胜利, 李赛男, 等. 急性缺血性卒中血管内治疗后出血转化的预测因素研究进展[J]. *当代医学*, 2021, 27(18): 191-194.

[14] CHEN Y, HONG Q, LIU J, *et al.* Effects of anterior border-zone angle grading on predicting the 90-day prognosis after recanalization of acute middle cerebral artery occlusion[J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 700732.

[15] BETIU A M, CHAMKHA I, GUSTAFSSON E, *et al.* Cell-Permeable Succinate Rescues Mitochondrial Respiration in Cellular Models of Amiodarone Toxicity[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11786.

[16] 王明洋, 孙争宇, 张丽, 等. 山茱萸环烯醚萜苷对脑缺血再灌注大鼠线粒体损伤的影响[J]. *首都医科大学学报*, 2020, 41(3): 385-390.

[17] WANG C, NIU F, REN N, *et al.* Hyperbaric Oxygen Improves Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats Probably via Inhibition of Autophagy Triggered by the Downregulation of Hypoxia-Inducing Factor-1 Alpha[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021(2):1-8.

[18] 王雪梅, 刘芬, 曹莹, 等. HIF-1 α 介导线粒体功能调控糖尿病心肌缺血再灌注损伤的作用机制研究[J]. *心血管病学进展*,

2020, 41(10): 1085-1090.

- [19] HE W, LIU H, HU L, *et al.* Icariin improves testicular dysfunction via enhancing proliferation and inhibiting mitochondria-dependent apoptosis pathway in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2021, 19(1): 168.
- [20] KIM J W, AN H J, YEO H, *et al.* Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Signaling Pathway Has the Protective Effect of Intervertebral Disc Degeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11355.
- [21] ZHOU S, XIE J, YU C, *et al.* CD226 deficiency promotes glutaminolysis and alleviates mitochondria damage in vascular endo-

thelial cells under hemorrhagic shock[J]. *FASEB J*, 2021, 35(11): e21998.

- [22] 王敏. 局灶性脑缺血损伤后 HIF-1 α 双重调节作用的研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(24): 3636-3638.
- [23] TORMOS K V, CHANDEL N S. Inter-connection between mitochondria and HIFs [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(4): 795-804.
- [24] LI H S, ZHOU Y N, LI L, *et al.* HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria[J]. *Redox Biol*, 2019, 25: 101109.

(收稿日期: 2021-09-09; 修回日期: 2022-06-19; 编辑: 张翰林)

(上接第 1264 页)

- [20] JIANG C, LIN X, ZHAO Z. Applications of CRISPR/Cas9 Technology in the Treatment of Lung Cancer[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2019, 25(11):1039-1049.
- [21] ZHANG H, QIN C, AN C, *et al.* Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1):126.
- [22] HAZAFA A, MUMTAZ M, FAROOQ M F, *et al.* CRISPR/Cas9: A powerful genome editing technique for the treatment of cancer cells with present challenges and future directions[J].

Life Sci, 2020, 263:118525.

- [23] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science (New York, N. Y.)*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [24] PAWELCZAK K S, GAVANDE N S, VANDERVERE-CAROZZA P S, *et al.* Modulating DNA Repair Pathways to Improve Precision Genome Engineering[J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(2):389-396.

(收稿日期: 2022-01-01; 修回日期: 2022-02-15; 编辑: 张翰林)

《西部医学》可直接使用缩写的常用词汇

缩略语	中文全称	缩略语	中文全称	缩略语	中文全称
AFP	甲胎蛋白	AIDS	获得性免疫缺陷综合征(艾滋病)	ALB	白蛋白
ALT	丙氨酸氨基转移酶	APTT	活化部分凝血活酶时间	AST	天冬氨酸氨基转移酶
AUC	曲线下面积	BMI	体重指数	BUN	尿素氮
Ccr	肌酐清除率	CEA	癌胚抗原	CRPC	反应蛋白
D-BIL	直接胆红素	ECG	心电图	eGFR	估算肾小球滤过率
ESR	血沉	FBS	胎牛血清	FIB	纤维蛋白原
GFR	肾小球滤过率	GGT	γ 谷氨酰转肽酶	Hb	血红蛋白
HBcAb	乙型肝炎病毒核心抗体	HBeAg	乙型肝炎病毒 e 抗原	HBsAg	乙型肝炎病毒表面抗原
HBsAb	乙型肝炎病毒表面抗体	HBV	乙型肝炎病毒	HCG	人绒毛膜促性腺激素
HCV	丙型肝炎病毒	HDL-C	高密度脂蛋白胆固醇	HIV	人类免疫缺陷病毒
HLA	人类白细胞抗原	IFN	干扰素	IL	白细胞介素
INR	国际标准化比值	LDL-C	低密度脂蛋白胆固醇	MIC	最小抑菌浓度
MRI	磁共振成像	NF-B	核因子 κ -B	NK	细胞自然杀伤细胞
PaCO ₂	动脉血二氧化碳分压	PaO ₂	动脉血氧分压	PBS	磷酸盐缓冲液
PSA	前列腺特异性抗原	PT	凝血酶原时间	PET	正电子发射断层扫描
PLT	血小板计数	PPD	结核菌素试验	RBC	红细胞计数
RCT	随机对照试验	ROC	曲线接受者操作特性曲线	SARS	严重呼吸窘迫综合征
SCr	血肌酐	SPECT	单光子发射计算机断层成像术	T3	三碘甲状原氨酸
T4	四碘甲状原氨酸(甲状腺素)	T-BIL	总胆红素	TC	总胆固醇
TG	甘油三酯	Th	辅助性 T 淋巴细胞	TNF	肿瘤坏死因子
TP	总蛋白	WBC	白细胞计数	WHO	世界卫生组织