

王晓宏,孙凯,朴丽,等. 白藜芦醇通过 HIF-1 α /BNIP3 介导的自噬信号通路促进小鼠缺氧性脑损伤修复 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 43-48.

Wang XH, Sun K, Piao L, et al. Protective effect and mechanism of resveratrol on hypoxic brain injury in mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 43-48.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.006

白藜芦醇通过 HIF-1 α /BNIP3 介导的自噬信号通路促进小鼠缺氧性脑损伤修复

王晓宏¹, 孙凯², 朴丽¹, 徐兆宁¹, 于秀丽¹, 林佳楠¹, 周莉¹, 夏美慧^{1*}

(1. 吉林大学第一医院, 长春 130021; 2. 北大荒集团总医院, 哈尔滨 150088)

【摘要】 目的 探讨白藜芦醇通过 HIF-1 α /BNIP3 介导的自噬信号通路促进小鼠缺氧性脑损伤修复的作用机制。方法 利用 CQY-1 型小动物缺氧检测系统建立小鼠间歇性缺氧模型。检测小鼠缺氧耐受时间、呼吸频率和心率变化。组织病理学染色检测大鼠脑组织形态学改变。Western blot 方法检测小鼠脑组织中 HIF-1 α 、P53、BNIP3、Beclin 1、LC3、P62 的蛋白表达水平。结果 与缺氧组比, 白藜芦醇能够延长小鼠缺氧耐受时间, 增大缺氧小鼠的呼吸频率, 降低缺氧小鼠的心率, 缓解海马区脑组织损伤, 下调 HIF-1 α 、P53、Beclin 1、LC3 蛋白表达, 上调 P62 蛋白表达。结论 白藜芦醇下调 HIF-1 α /BNIP3 介导的自噬信号通路, 达到促进小鼠缺氧性脑损伤修复的作用。

【关键词】 缺氧性脑损伤; 白藜芦醇; HIF-1 α /BNIP3; 自噬

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0043-06

Protective effect and mechanism of resveratrol on hypoxic brain injury in mice

WANG Xiaohong¹, SUN Kai², PIAO Li¹, XU Zhaoning¹, YU Xiuli¹, LIN Jianan¹, ZHOU Li¹, XIA Meihui^{1*}

(1. the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China.

2. Beidahuang Group General Hospital, Herbin 150088)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of resveratrol on the repair of hypoxic brain injury through the HIF-1 α /BNIP3-mediated autophagy signaling pathway in mice. **Methods** A mouse model of intermittent hypoxia was established using the CQY-1 small animal hypoxia detection system. The hypoxia tolerance time, respiratory rate, and heart rate changes of the mice were detected. Histopathological staining was used to detect morphological changes to the mice brain. Western blot was used to detect the protein expression levels of HIF-1 α , P53, BNIP3, Beclin 1, LC3 and P62 in mice brain tissue. **Results** Compared with the findings in the hypoxia group, resveratrol prolonged the hypoxia tolerance time; increased the respiratory rate and reduced the heart rate of hypoxic mice; alleviate brain tissue damage in the hippocampus; down-regulated HIF-1 α , P53, Beclin 1 and LC3 protein expression; and up-regulated P62 protein expression. **Conclusions** Resveratrol down-regulates HIF-1 α /BNIP3-mediated autophagy signaling pathway gene expression to promote the repair of hypoxic brain injury in mice.

【Keywords】 hypoxic brain injury; resveratrol; HIF-1 α /BNIP3; autophagy

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20210506020ZP); 吉林省卫生健康科技能力提升项目(2021JC008); 吉林大学第一医院青年发展基金(第十一届)(JDYY11202011)。

[作者简介] 王晓宏(1986—), 女, 本科, 研究方向: 临床护理。E-mail: wxh19861217lw@163.com

[通信作者] 夏美慧(1981—), 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 缺氧机制研究。E-mail: xiamh@jlu.edu.cn

临床上,缺氧是多种疾病导致组织病理改变的共同始发因素,而脑组织是机体对缺氧最为敏感的靶器官,在缺氧环境中很容易受到“伤害”^[1]。脑缺氧损伤过程中,缺氧诱导因子 HIF-1 α 起到关键的作用^[2]。BNIP3 作为缺氧诱导因子 HIF-1 α 下游直接的靶分子,在缺氧状态下同样可以被诱导表达上调^[3]。近年来的研究显示,BNIP3 在调控自噬体-溶酶体融合过程中发挥了关键作用^[4]。还有报道显示,BNIP3 是线粒体自噬途径中的受体,可以直接与 LC3 相结合并诱导细胞自噬的发生^[5]。白藜芦醇(resveratrol, Re)具有抗炎、抗氧化、抗癌、心血管保护等多种功能^[6-8]。虽然有足够的证据表明白藜芦醇在许多相关的功能和途径中发挥作用,但白藜芦醇对缺氧暴露引起的脑损伤的作用机制还需要进一步的探索。本研究旨在研究白藜芦醇对小鼠间接性缺氧导致的脑损伤的保护作用机制,为临床治疗缺氧性脑损伤提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

20 只 SPF 级 BALB/c 小鼠,雄性,8 周龄,体重 20~22 g,购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司[SCXK(吉)2020-0002]。随机数字法将 20 只 BALB/c 小鼠分为对照组(Con)、缺氧组(Hypoxia)、白藜芦醇组(Re)、缺氧+白藜芦醇组(Re+Hypoxia),每组 5 只,用于研究白藜芦醇对小鼠缺氧性脑损伤作用机制研究。所有小鼠在建模前均适应性常规喂饲 1 周,屏障环境设施中每天 07:00~19:00 定时光照,昼夜规律。依据预实验结果,白藜芦醇组小鼠每日缺氧前 1 h 尾静脉注射 25 mg/kg 白藜芦醇溶液。本研究经吉林大学基础医学院实验动物福利伦理委员会批准((2021 年)研审第(197)号),在吉林大学基础医学院动物实验中心屏障动物实验设施进行[SYXK(吉)2018-0001]。

1.2 主要试剂与仪器

白藜芦醇购自北京索莱宝科技有限公司(中国);HIF-1 α 、P53、BNIP3、LC3、Beclin 1、P62、 β -actin 一抗购自 Cell signaling technology 公司(美国);二抗购自碧云天生物公司(中国)。CQY-1 型小动物缺氧检测系统购自中国成都仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠间歇性缺氧模型的建立

利用 CQY-1 型小动物缺氧检测系统,将小鼠置

于缺氧瓶内,封闭好后,连接仪器,打开监测程序。初始氧含量为 21.21%,当氧含量降至 15%时,将小鼠取出,连续进行 7 d。

1.3.2 指标检测

(1)小鼠缺氧耐受时间。记录每组小鼠从初始氧含量 21.21%降至 15%时所需的时间。

(2)小鼠呼吸频率。利用软件计算小鼠瞬时呼吸频率。

(3)小鼠心率。利用软件计算小鼠瞬时心率。

1.3.3 脑组织 HE 染色

实验结束后,二氧化碳吸入法对小鼠实施安乐死,迅速分离脑组织,福尔马林固定,石蜡包埋切片,HE 染色,显微镜下观察小鼠脑组织海马区病理情况。

1.3.4 Western blot

取脑组织,RIPA 裂解液裂解脑组织。测定蛋白浓度后煮沸变性,SDS-PAGE 进行分离。湿法转膜 120 V,30 min。一抗、二抗孵育后使用 Syngene Bio Imaging ECL 发光成像系统检测蛋白表达检测和观察分析。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 25.0 软件处理。计量资料用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。本研究中的所有测量值均表示为至少 3 个独立实验的平均值。使用 Student's *t* 检验或方差分析对组比较结果进行分析。如果 $P<0.05$,所有差异均具有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对小鼠体重的影响

以缺氧 7 d 建立的小鼠间歇性缺氧模型开展实验。动物分组为:对照组、缺氧组、白藜芦醇组、缺氧+白藜芦醇组。比较各组小鼠体重差异,结果如图 1 显示,与缺氧组相比,缺氧+白藜芦醇组小鼠的体重有所上升,提示白藜芦醇可能具有保护作用。

2.2 小鼠缺氧耐受时间的比较

比较缺氧组和缺氧+白藜芦醇组小鼠缺氧耐受能力。结果如图 2 所示,与缺氧组相比,缺氧+白藜芦醇组小鼠的缺氧耐受时长明显提高。这提示,白藜芦醇可能提高了小鼠脑组织中氧的利用率。

2.3 小鼠呼吸频率的变化

比较缺氧组和缺氧+白藜芦醇组小鼠呼吸频率的变化。利用软件分析缺氧组及缺氧+白藜芦醇组小鼠每次缺氧时呼吸频率的变化。结果如图 3 所

示,与缺氧组小鼠相比,缺氧+白藜芦醇组小鼠的呼吸频率显著降低。

2.4 小鼠心率的变化

比较缺氧组和缺氧+白藜芦醇组小鼠心率的差异。结果如图 4 显示,与缺氧组小鼠相比,缺氧+白藜芦醇组小鼠的心率明显增加。利用软件进行计算,缺氧+白藜芦醇组小鼠的平均心率为 333 bpm,明显高于缺氧 7 d 小鼠的平均心率为 298 bpm,但低于对照组平均心率为 353 bpm。

2.5 小鼠脑组织海马区病理学改变

为了更直观的观察白藜芦醇对小鼠脑组织海马区的影响。HE 染色结果比较各组海马区的形态。如图 5 所示,与缺氧组相比,缺氧+白藜芦醇组小鼠的海马区的神经细胞明显增多,且水肿情况得到显著改善。神经细胞和胶质细胞间的细胞间隙明显变小,说明白藜芦醇对小鼠脑组织缺氧性损伤具有保护作用。

2.6 缺氧标志蛋白表达水平

Western blot 方法检测间歇性缺氧组小鼠缺氧标志蛋白 HIF-1 α 、P53 的表达水平。检测结果如图 6 所示,与缺氧组相比,缺氧+白藜芦醇组小鼠脑组织中的 HIF-1 α 、P53 的基因表达水平显著降低。

2.7 白藜芦醇通过 HIF-1 α /BNIP3 介导的自噬信号通路促进小鼠缺氧性脑损伤修复的机制

BNIP3 作为缺氧诱导因子 HIF-1 α 下游直接的靶分子,在缺氧状态下同样可以被诱导表达上调。近年来的研究显示,BNIP3 在调控自噬体-溶酶体融合过程中发挥了关键作用。还有报道显示,

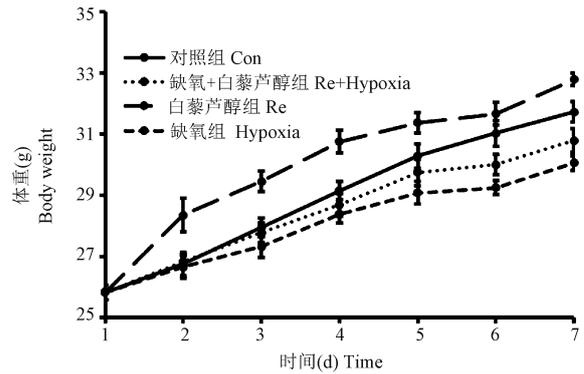


图 1 小鼠体重变化

Figure 1 Body weight of mice

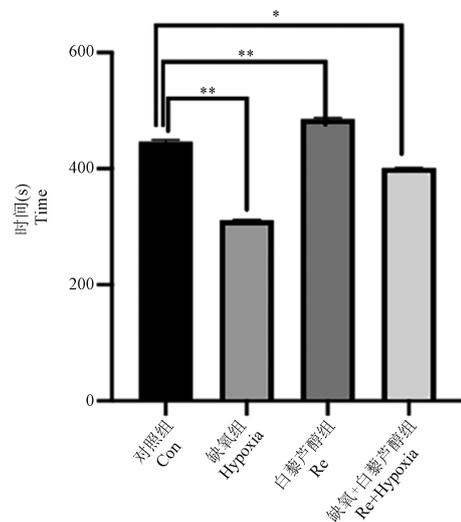


图 2 小鼠缺氧耐受时间

Figure 2 Hypoxia tolerance time of mice

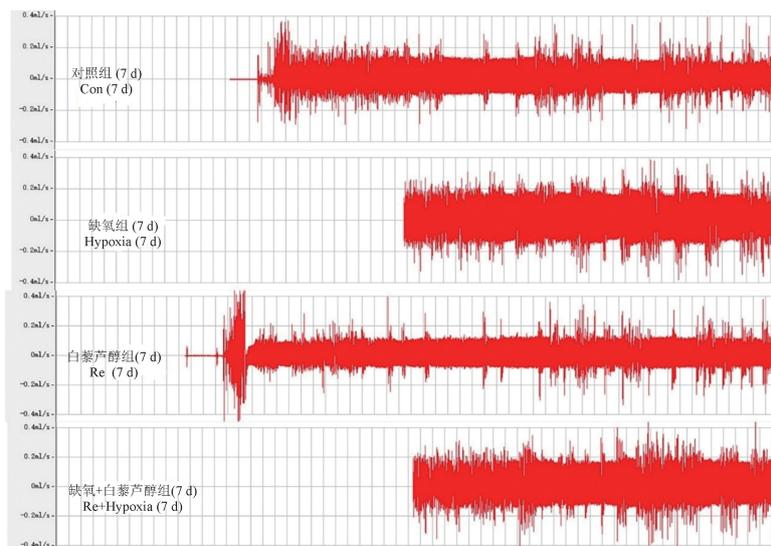


图 3 小鼠呼吸频率

Figure 3 The respiratory rate of mice

BNIP3 是线粒体自噬途径中的受体,可以直接与 LC3 相结合并诱导细胞自噬的发生。

为了分析白藜芦醇对小鼠间接性缺氧导致的脑损伤的保护作用,采用 Western blot 方法检测间歇性缺氧对小鼠脑组织中 BNIP3 及其介导的自噬相关蛋白表达的影响。检测结果如图 7 和图 8 显示,

与对照组相比,缺氧组中 BNIP3、Beclin 1、LC3 表达水平显著上调。加入白藜芦醇预处理,上述蛋白表达明显下调。与对照组相比,缺氧组中 P62 表达水平显著下调。加入白藜芦醇预处理,P62 蛋白表达明显上调。这与 BNIP3、Beclin 1 等蛋白的作用相一致。P62 作为自噬受体蛋白,在自噬过程中随着自

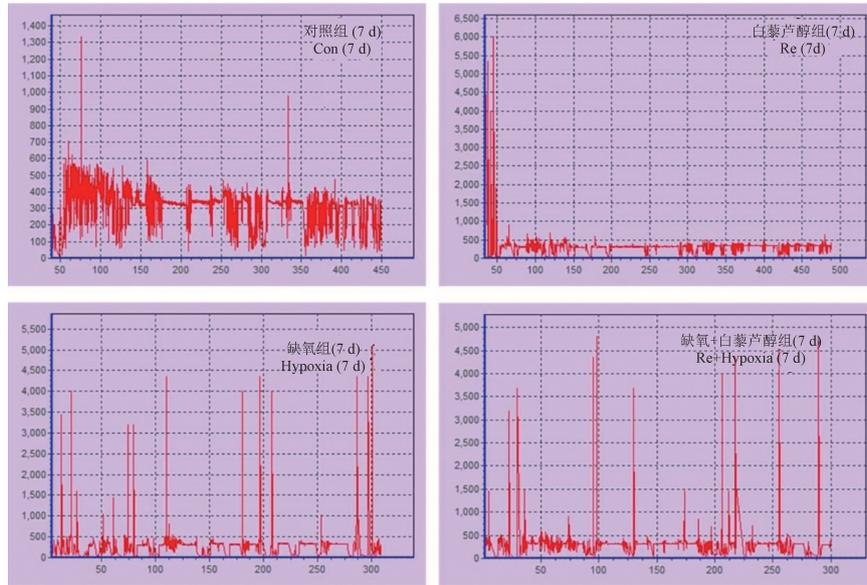


图 4 小鼠心率水平

Figure 4 Heart rate levels of mice

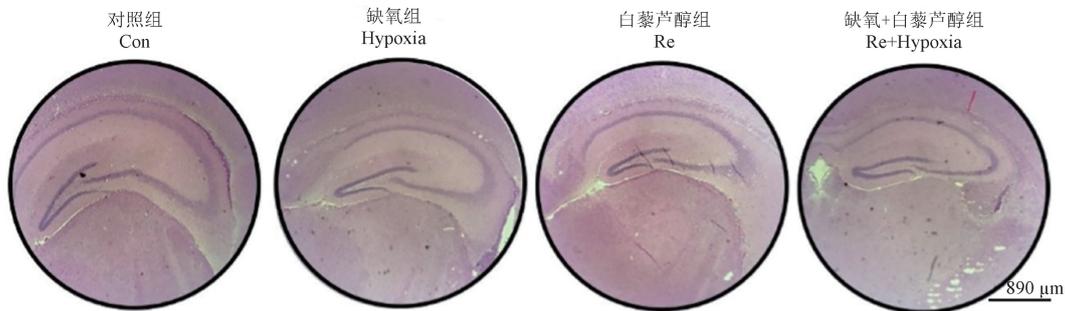


图 5 小鼠脑组织海马体形态

Figure 5 Morphology of hippocampus of mice brain tissue

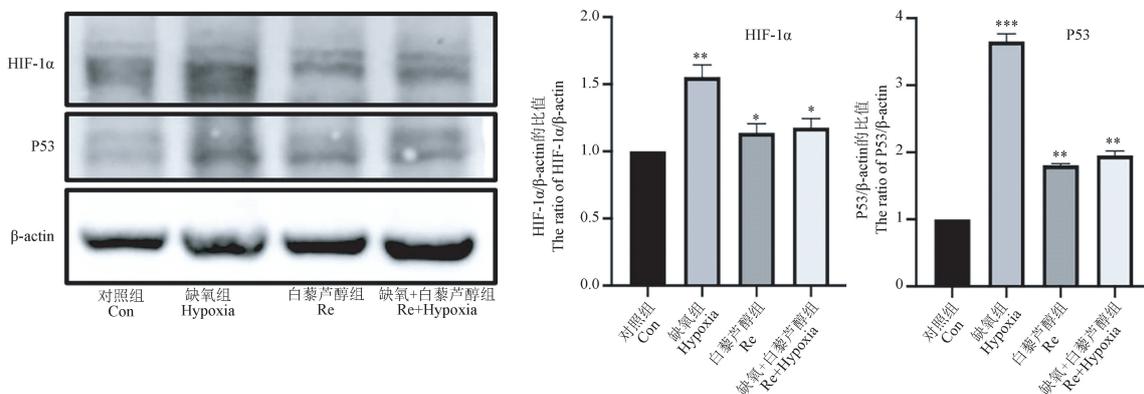


图 6 缺氧小鼠脑组织缺氧标志蛋白表达水平

Figure 6 Expression levels of hypoxia marker proteins in the brain tissue of hypoxic mice

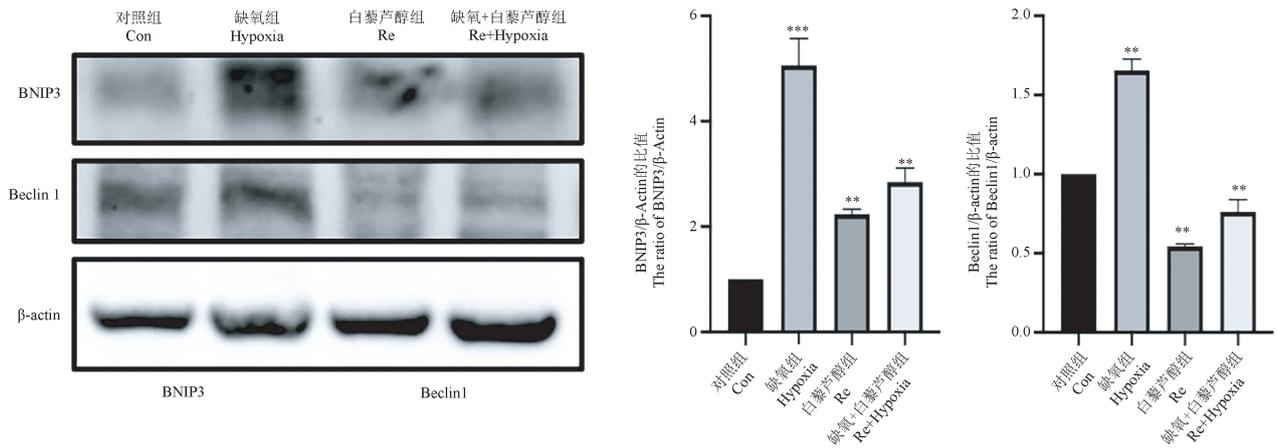


图 7 Western blot 方法检测 BNIP3、Beclin 1 蛋白表达水平
Figure 7 Western blot analysis of expression levels of BNIP3 and Beclin 1

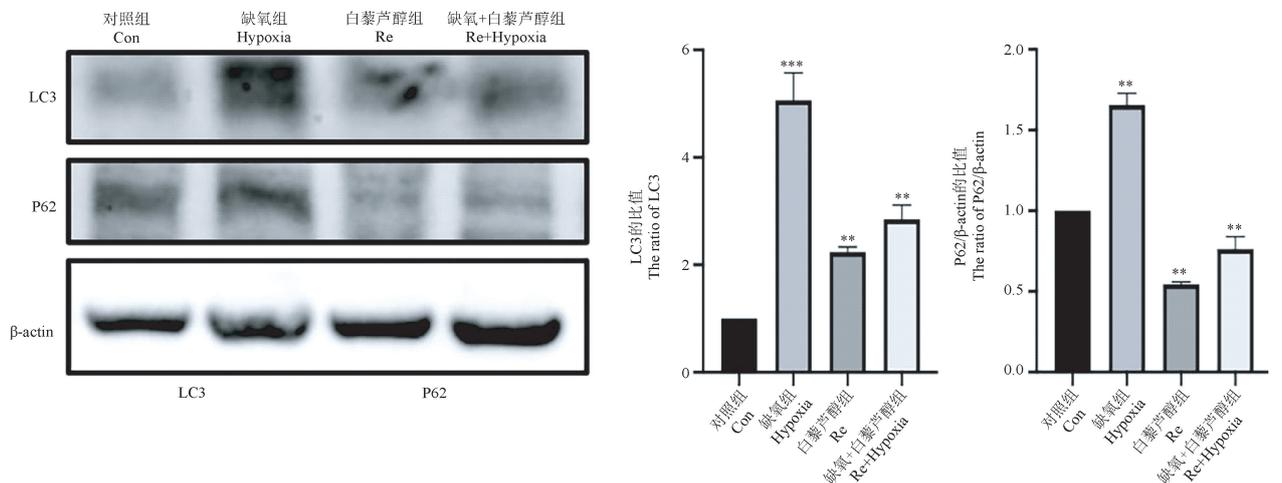


图 8 Western blot 方法检测 LC3、P62 蛋白表达水平
Figure 8 Western blot analysis of expression levels of LC3 and P62 protein

噬被降解,因此在自噬过程中 P62 表达水平下调。以上结果说明,白藜芦醇可能通过 HIF-1α/BNIP3 途径影响缺氧损伤时小鼠脑组织中的自噬水平。

3 讨论

由于疫情的发展,长时间的佩戴口罩,导致吸入氧减少,动脉血氧分压降低,产生轻微的乏氧现象,严重者会出现明显身体上的不适。此外,高原游已成为近年来大家向往的旅游热点地区。当高原平均海拔在 4000 m 以上时,就会出现空气稀薄,含氧量低的状况,而脑组织是机体对缺氧最为敏感的靶器官,在缺氧环境中很容易受到“伤害”^[9-10]。

本研究利用 CQY-1 型小动物缺氧检测系统,将小鼠置于缺氧瓶内,封闭后,连接仪器,打开监测程

序。初始氧含量为 21.21%,当氧含量降至 15%时,将小鼠取出,以建立小鼠间歇性缺氧模型。正常海平面氧浓度接近 21%,青海、西藏地区大约氧含量为海平面氧含量的 2/3,所以实验选择在氧浓度 15%时,停止实验,以模拟进入高原时的低氧环境。因系统中加入了钠石灰,可吸收缺氧过程中产生的二氧化碳,避免导致小鼠出现呼吸性酸中毒。

脑组织是缺氧最易受累的靶器官^[11]。脑缺氧损伤过程中,缺氧诱导因子 HIF-1α 起到关键的作用^[12]。在正常状态下,被脯氨酰羟化酶 (PHD) 调控的缺氧诱导因子 HIF-1α 不表达或低表达^[13]。当组织细胞缺氧时,脯氨酰羟化酶调控被抑制,下游的 HIF-1α 进入细胞核与 HIF-1β 相结合并进一步激活下游基因,调控包 EPO、NOS 等多种靶基因以

应对缺氧环境^[14-15]。本次研究利用 Western blot 的方法检测脑组织中 HIF-1 α 、P53 蛋白表达情况发现,缺氧组 HIF-1 α 、P53 蛋白表达显著增高,提示小鼠间歇性缺氧模型建立成功。

BNIP3 作为缺氧诱导因子 HIF-1 α 下游直接的靶分子,在缺氧状态下同样可以被诱导表达上调^[3,16]。近年来的研究显示,BNIP3 在调控自噬体-溶酶体融合过程中发挥了关键作用^[17]。还有报道显示,BNIP3 是线粒体自噬途径中的受体,可以直接与 LC3 相结合并诱导细胞自噬的发生^[18-20]。Western blot 方法检测间歇性缺氧对小鼠脑组织中 BNIP3 及其介导的自噬相关蛋白表达的影响。与对照组相比,缺氧组中 BNIP3、Beclin 1、LC3 表达水平显著上调。加入白藜芦醇预处理,上述蛋白表达明显下调。与对照组相比,缺氧组中 P62 表达水平显著下调。加入白藜芦醇预处理,P62 蛋白表达明显上调。

综上所述,白藜芦醇具有抗缺氧性脑损伤的作用,其机制是通过下调 HIF-1 α 、P53 蛋白表达,抑制 BNIP3 途径下游自噬水平,达到促进小鼠缺氧性脑损伤修复的作用。

参考文献:

- [1] Ejlersen M, Ilieva M, Michel TM. Superoxide dismutase isozymes in cerebral organoids from autism spectrum disorder patients [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2022, 129(5-6): 617-626.
- [2] Vetrovoy O, Sarieva K, Lomert E, et al. Pharmacological HIF1 inhibition eliminates downregulation of the pentose phosphate pathway and prevents neuronal apoptosis in rat hippocampus caused by severe hypoxia [J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(5): 635-646.
- [3] Macher-Goeppinger S, Keith M, Hatiboglu G, et al. Expression and functional characterization of the BNIP3 protein in renal cell carcinomas [J]. *Transl Oncol*, 2017, 10(6): 869-875.
- [4] Fu R, Deng Q, Zhang H, et al. A novel autophagy inhibitor berbamine blocks SNARE-mediated autophagosome-lysosome fusion through upregulation of BNIP3 [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 243.
- [5] Zeng C, Zou T, Qu J, et al. Cyclovirobuxine D induced-mitophagy through the p65/BNIP3/LC3 Axis potentiates its apoptosis-inducing effects in lung cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5820.
- [6] Sarkaki A, Rashidi M, Ranjbaran M, et al. Therapeutic effects of resveratrol on ischemia-reperfusion injury in the nervous system [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(12): 3085-3102.
- [7] Ren B, Kwah MX, Liu C, et al. Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives [J]. *Cancer Lett*, 2021, 515: 63-72.
- [8] Uddin MJ, Farjana M, Moni A, et al. Prospective pharmacological potential of resveratrol in delaying kidney aging [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8258.
- [9] Cai J, Ruan J, Shao X, et al. Oxygen Enrichment mitigates high-altitude hypoxia-induced hippocampal neurodegeneration and memory dysfunction associated with attenuated tau phosphorylation [J]. *High Alt Med Biol*, 2021, 22(3): 274-284.
- [10] Hoiland RL, Howe CA, Carter HH, et al. UBC-Nepal expedition: phenotypical evidence for evolutionary adaptation in the control of cerebral blood flow and oxygen delivery at high altitude [J]. *J Physiol*, 2019, 597(12): 2993-3008.
- [11] Kiyatkin E. Respiratory depression and brain hypoxia induced by opioid drugs: Morphine, oxycodone, heroin, and fentanyl [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 151: 219-226.
- [12] Vetrovoy O, Sarieva K, Galkina O, et al. Neuroprotective mechanism of hypoxic post-conditioning involves HIF1-associated regulation of the pentose phosphate pathway in rat brain [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(6): 1425-1436.
- [13] Minervini G, Masiero A, Moro S, et al. In silico investigation of PHD3 specific HIF1- α proline 567 hydroxylation: a new player in the VHL/HIF1- α interaction pathway? [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(18): 2996-3001.
- [14] Núñez-O' Mara A, Gerpe-Pita A, Pozo S, et al. PHD3-SUMO conjugation represses HIF1 transcriptional activity independently of PHD3 catalytic activity [J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(1): 40-49.
- [15] Millonig G, Hegedüsch S, Becker L, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α under rapid enzymatic hypoxia: cells sense decrements of oxygen but not hypoxia per se [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(2): 182-191.
- [16] Park CW, Hong SM, Kim ES, et al. BNIP3 is degraded by ULK1-dependent autophagy via MTORC1 and AMPK [J]. *Autophagy*, 2013, 9(3): 345-360.
- [17] Lin Q, Li S, Jiang N, et al. Inhibiting NLRP3 inflammasome attenuates apoptosis in contrast-induced acute kidney injury through the upregulation of HIF1 α and BNIP3-mediated mitophagy [J]. *Autophagy*, 2021, 17(10): 2975-2990.
- [18] Sun LL, Shao YN, You MX, et al. ApostichopusROS-mediated BNIP3-dependent mitophagy promotes coelomocyte survival in response to infection [J]. *Zool Res*, 2022, 43(2): 285-300.
- [19] Zhang Y, Liu D, Hu H, et al. HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109464.
- [20] Lin Q, Li S, Jiang N, et al. Inhibiting NLRP3 inflammasome attenuates apoptosis in contrast-induced acute kidney injury through the upregulation of HIF1 α and BNIP3-mediated mitophagy [J]. *Autophagy*, 2021, 17(10): 2975-2990.

[收稿日期] 2022-03-24