DOI:10.16016/j.1000-5404.2015010071

液态氟碳纳米粒在大鼠蛛网膜下腔出血中对低氧诱导因子1α的抑制作用

许 伟,朱 继 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科)

[摘要] **目的** 初步探讨液态氟碳(perfluorooctyl-bromide,PFOB)纳米粒对蛛网膜下腔出血后早期脑损的保护作用及其与低氧诱导因子1α(HIF-1α)的关系。**方法** 健康雄性SD大鼠100只分为5个组:假手术组(Sham)、蛛血组(SAH)、蛛血+安慰剂组(SAH+vehicle)、蛛血+5 g/kg PFOB组(SAH+5 g/kg PFOB)和蛛血+10 g/kg PFOB组(SAH+10 g/kg PFOB),每组20只。采用颈内动脉穿刺法制作SAH模型。造模后24 h对每组大鼠进行神经行为功能缺损评分,检测脑含水量和血脑屏障(BBB)通透性,末端脱氧核苷酸介导的X-dUTP缺口末端标记法(TUNEL)检测神经元凋亡,免疫组化和Western blot检测HIF-1α蛋白表达情况。**结果** PFOB纳米粒能够显著降低早期脑损伤,包括改善神经功能缺失、减轻脑水肿、降低血脑屏障通透性和减少神经元凋亡,且SAH+10 g/kg PFOB组降低效果明显高于SAH+5 g/kg PFOB组($P<0.05$)。PFOB在降低早期脑损伤的同时能够显著抑制HIF-1α蛋白表达,且SAH+10 g/kg PFOB组抑制效果明显高于SAH+5 g/kg PFOB组($P<0.05$)。**结论** 液态氟碳纳米粒对蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的保护作用可能与抑制HIF-1α蛋白表达有关。

[关键词] 蛛网膜下腔出血;早期脑损伤;液态氟碳纳米粒;低氧诱导因子1α
[中图法分类号] R743.35; R965; R979.9 [文献标志码] A

Perfluorooctyl-bromide nanoparticles inhibit hypoxia-inducible factor 1α in early brain injury of rats after subarachnoid hemorrhage

Xu Wei, Zhu Ji (Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the protective effect of perfluorooctyl-bromide (PFOB) nanoparticles on the early brain injury (EBI) in rats after subarachnoid hemorrhage (SAH) and its relationship with hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1α). **Methods** A total of 100 healthy male Sprague Dawley rats were randomly divided into 5 groups, that is, sham-operation, SAH, SAH + vehicle, SAH + 5 mg/kg PFOB and SAH + 10 mg/kg PFOB, with 20 animals in each group. Rat SAH model was established by endovascular perforation, and PFOB treatment (injected through the caudal vein) was initiated in 1 h after SAH. After their neurobehavioral function was evaluated in 24 h after surgery, all rats were subsequently sacrificed to detect brain water content and the blood-brain barrier (BBB) permeability. TUNEL staining was used to detect neural apoptosis, immunohistochemical assay and Western blotting to detect HIF-1α expression. **Results** PFOB treatment significantly alleviated EBI, including neurological dysfunction, brain edema, blood-brain barrier disruption and neural cell apoptosis, with the high-dose group more obvious ($P<0.05$). In addition, it also suppressed the expression of HIF-1α in the rat hippocampus. The effects of 10 g/kg PFOB were more obvious than those of 5 g/kg PFOB ($P<0.05$). **Conclusion** PFOB alleviates EBI after SAH, potentially through down-regulation of HIF-1α.

[**Key words**] subarachnoid hemorrhage; early brain injury; perfluorooctyl-bromide nanoparticles; hypoxia-inducible factor 1α

Supported by the Project of National Clinical Key-discipline Construction Program (2011-170). Corresponding author: Zhu Ji, E-mail: a68690569@sina.com

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目经费资助(财社[2011]170号)
[通信作者] 朱 继,E-mail:a68690569@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151229.1537.007.html(2015-12-29)

动脉瘤性蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)是一种高发病率和高病死率的毁灭性疾病[1]。早期脑损伤(early brain injury,EBI)被认为是导致SAH患者高风险死亡和不良预后的主要因素[2-3]。尽管对于SAH后EBI的发病机制尚不清楚,但是大多数学者认为SAH后颅内压急剧升高和脑血流量减少导致的急性脑缺血在EBI中发挥重要作用[4]。低氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α,HIF-1α)是缺血缺氧条件下广泛存在哺乳动物和人体内的一种转录因子,能够激活下游多种基因的表达,从而调节机体对外界刺激的应答反应[5]。大量研究报道,在大鼠SAH模型的脑实质内可见HIF-1α表达[6-9],同时通过不同的方式抑制HIF-1α可以减轻脑水肿、血脑屏障通透性和神经元凋亡等EBI表现[10]。因此抑制HIF-1α可能为EBI治疗提供新思路。

液态氟碳(perfluorooctyl-bromide,PFOB)属于新三代全氟碳化合物(perfluorocarbon,PFC),具有性质稳定、良好的携氧功能、低表面张力、低毒性等独特的性质,使其广泛应用于临床治疗、新型造影剂、靶向药物载体等领域[11-12]。而纳米粒级的PFOB直径更小、半衰期更长、循环时间更长、更易穿过血管内皮间隙等特点[13]。本课题组前期初步证实PFOB纳米粒对SAH后EBI有神经保护作用[14],但是其发挥作用具体机制还不清楚。因此我们提出假设:PFOB纳米粒对EBI的神经保护作用,可能与抑制HIF-1α蛋白表达相关。本研究采用颈内动脉穿刺法建立SAH模型,给予不同剂量PFOB纳米粒干预,观察PFOB对SAH后HIF-1α的影响。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

液态氟碳购自Alliance Pharmaceutical公司,于重庆医科大学超声影像学研究所乳化成纳米粒;TUNEL试剂盒购自Roche公司;免疫组化试剂盒(PV9001)和DAB显色剂购自中杉金桥公司;HIF-1α(ab51608)蛋白抗体购自Abcam公司。GAPDH内参购自博奥森公司。其余试剂由重庆医科大学附属第一医院实验中心提供。

1.2 实验对象及分组

健康雄性SD大鼠100只,由重庆医科大学动物实验中心提供,体质量为(300±20)g,分为5个组:假手术组(Sham)、蛛血组(SAH)、蛛血+安慰剂组(SAH+vehicle)、蛛血+5 g/kg液态氟碳纳米粒组(SAH+5 g/kg PFOB)和蛛血+10 g/kg液态氟碳纳米粒组(SAH+10 g/kg PFOB)。SAH组采用颈内动脉穿刺法制作模型;Sham组同SAH组,但不刺破动脉;PFOB纳米粒造模成功后1 h尾静脉注射,安慰剂组注射等量的生理盐水。

1.3 SAH模型制作

采用改良颈内动脉穿刺法制作SAH模型[15-16]。大鼠经10%水合氯醛(3.5 mL/kg)腹腔麻醉,仰卧位固定于手术架上,取颈部正中切口,分离一侧颈总动脉颈内动脉和颈外动脉,将2-0单股尼龙线由一侧颈外动脉进入,导入同侧的颈内动脉,刺入18~20 mm后感觉阻力存在,继续插入约3 mm,刺破大脑中动脉和大脑前动脉分叉处,抽出细线,缝合颈部皮肤。假手术组除了不刺破血管,其余步骤与SAH组相同。如建模过程中出现大鼠死亡情况,及时补充新的大鼠以保证每组20只。

1.4 神经行为功能缺损评分

在SAH造模后24 h,对各组大鼠进行神经行为功能缺损评分,主要根据Yamaguchi神经评分系统[17],按照表1评分标准,评分越高,表明神经行为功能损伤越明显。

表1 神经行为功能缺损评分标准

项目	行为活动	评分
进食量	吃完所给食物	0
	吃了所给食物的一部分	1
	没有吃	2
活动力	在笼子里自由行走	0
	在刺激下才走	1
	几乎不动	2
功能缺损	无功能缺损	0
	行走不稳	1
	不能行走	2

1.5 脑水肿测定

造模24 h后每组各取5只大鼠,10%水合氯醛(3.5 mL/kg)腹腔麻醉端头处死后,迅速取出脑组织并立即称重(湿质量)。然后将所有脑组织至于105 ℃烤箱,48 h后再次称量(干质量)。脑水肿可用公式求得:[(湿质量-干质量)/湿质量]×100%。

1.6 血脑屏障通透性检测

血脑屏障通透性的定量分析是通过伊文思蓝渗透率的表现的。股静脉注射2%伊文思蓝(evans blue,EB)染料,1 h后,麻醉大鼠并用PBS灌注取脑,脑组织称重后超声匀浆破碎,4 ℃,2 000 r/min离心20 min,收集上清,重复3次。取上清测定620 nm条件下的光密度值[D(620)],标准曲线上获取EB含量(mg/g)。

1.7 原位细胞凋亡检测技术(TUNEL)

大鼠经用10%水合氯醛麻醉,先后用磷酸盐缓冲

液(PBS)和4%多聚甲醛灌注,迅速取出脑组织置于4%多聚甲醛固定48 h,切除小脑及前三分之一的脑组织,剩余脑组织石蜡包埋,并取冠状位连续切4 μm薄片贴敷于载玻片,选取海马结构完整的切片经常规、水化;0.4% Triton室温下破膜10 min,滴加TUNEL试剂1和试剂2(1∶9)、37 ℃孵育60 min,DAB显色、复染、盐酸酒精分化、返蓝、脱水、中性树胶封片。各组选取位置在相同范围内的切片各5张,光学显微镜下观察大鼠海马神经细胞,以棕黄色颗粒的有核细胞为阳性细胞,每张切片高倍镜(10×40)下随机选择5个不同的视野(均取自海马CA1区),运用Image-Pro Plus软件计数每个视野阳性细胞率,取其平均值。

1.8 实时荧光定量PCR分析

每组选取5只大鼠,麻醉后迅速取脑组织并分离出海马,用TRIzol试剂盒提取各组总RNA,并用紫外分光光度计测浓度,然后运用AMV First Strand cDNA试剂盒(SK 2445)和CFX96™ Real-Time PCR检测系统将RNA反转录cDNA。根据检测目的基因,通过Gene Bank设计引物序列,HIF-1α:上游:5′-GTCAGTCACTGCCACCGCAACTG-3′,下游5′- CTGTCTGGTGAGGCTGTCCGA-3′,GAPDH:上游:5′- TAGTTGCGTTACACCCTTTCTTG-3′,下游:5′- TCACCTTCACCGTTCCAGTTT-3′。PCR反应条件:第1步,95 ℃变性30 s,第2步,95 ℃变性5 s、58 ℃退火34 s,共40个循环;绘制溶解曲线的条件为95 ℃变性15 min、60 ℃退火60 s、95 ℃变性15 s。数据运用公式RQ=$2^{-\Delta\Delta Ct}$的方法进行分析,以$2^{-\Delta\Delta Ct}$表示相关基因的mRNA表达水平,实验重复3次。

1.9 免疫组化检测HIF-1α蛋白表达

采用PV9001两步法:取含有海马完整海马结构的石蜡切片,经常规脱蜡、水化、抗原修复;3% H_2O_2室温下孵育10 min,PBS清洗后孵育一抗(HIF-1α 1∶50)4 ℃过夜;PBS冲洗后滴加试剂1、室温下孵育20 min;PBS冲洗再次冲洗后滴加试剂2、室温孵育20 min、PBS冲洗后DAB显色、复染、盐酸酒精分化、返蓝、脱水、中性树胶封片。各组选取位置在相同范围内的切片各5张,光学显微镜下观察大鼠海马神经细胞,以胞质或胞核内出现鲜艳的棕黄色颗粒的有核细胞为阳性细胞,每张切片高倍镜(10×40)下随机选择5个不同的视野(均取自海马CA1区),运用Image-Pro Plus软件计数每个视野阳性细胞率,取其平均值。

1.10 Western blot检测HIF-1α蛋白表达

每组随机取5只大鼠,麻醉后取脑组织并分离出海马组织,置于细胞裂解液中,再加入蛋白酶抑制剂,低温匀浆,静置40 min,4 ℃ 12 000×g离心15min,取上清,分装-80 ℃保存备用。BCA测蛋白浓度,根据蛋白浓度取等量蛋白,加5×SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)上样缓冲液煮沸5 min,进行SDS-PAGE电泳后将蛋白转移到PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉、1 g/L吐温-20的Tis-HCl缓冲盐溶液(TBST)封闭液置摇床上封闭2 h,经1×TBST充分漂洗(5 min,3次),HIF-1α单克隆抗体按照1∶1 000稀释,4 ℃孵育过夜,充分漂洗后加山羊抗兔二抗按照1∶2 000稀释,室温孵育1 h,ECL发光,暗室胶片显影。通过Fusion软件分析图像,以HIF-1α蛋白条带的灰度值与GAPDH蛋白条带的灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.11 统计学分析

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。采用SPSS 17.0统计软件,组间比较采用方差分析和t检验,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PFOB对神经行为功能缺失的影响

Sham组没有神经行为功能缺失。SAH组和SAH+vehicle组中大鼠神经行为功能缺失评分明显高于Sham组($P<0.05$),而这两组之间差异并无统计学意义($P>0.05$)。给予PFOB(5 g/kg和10 g/kg)纳米粒的干预治疗后,神经行为功能缺失与SAH组相比明显降低,且10 g/kg PFOB组降低较5 g/kg PFOB组更明显($P<0.05$,图1A)。

2.2 PFOB对脑水肿和血脑屏障通透性的影响

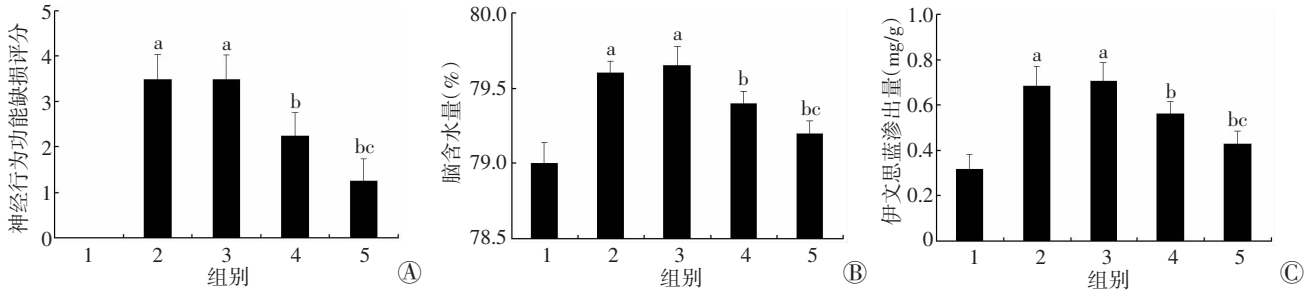
与Sham组相比,在SAH组和SAH+vehicle组中脑水肿和伊文思蓝渗出率明显增加($P<0.05$)。而予以PFOB纳米粒干预后,脑水肿和伊文思蓝渗出率较SAH组明显降低,且SAH+10 g/kg PFOB组降低程度较SAH+5 g/kg PFOB组更明显($P<0.05$,图1B、C)。

2.3 PFOB对神经元凋亡的影响

TUNEL染色结果显示,在造模24 h后Sham组海马区少量TUNEL阳性染色细胞,而在SAH组和SAH+vehicle组的海马区明显见到大量TUNEL阳性细胞标记的凋亡细胞。给予PFOB(5、10 g/kg)治疗干预后,在海马区TUNEL染色的凋亡细胞较SAH组明显减少,且SAH+10 g/kg PFOB组较SAH+5 g/kg PFOB组减少更明显($P<0.05$,图2)。

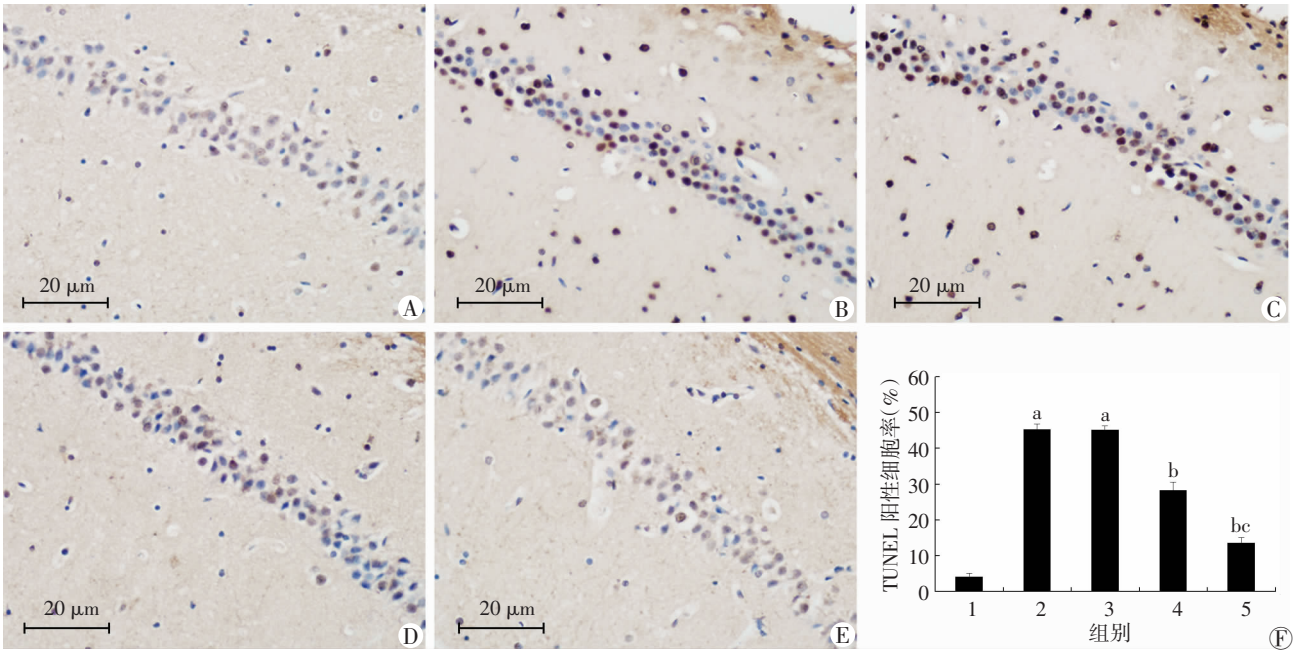
2.4 荧光定量PCR检测PFOB对HIF-1α mRNA的影响

HIF-1α mRNA在Sham组表达量极低。相比之下,HIF-1α mRNA在SAH组和SAH+vehicle组表达量明显增加($P<0.05$)。而在造模1 h后予以PFOB纳米粒干预,并不能降低HIF-1α mRNA表达水平(图3)。



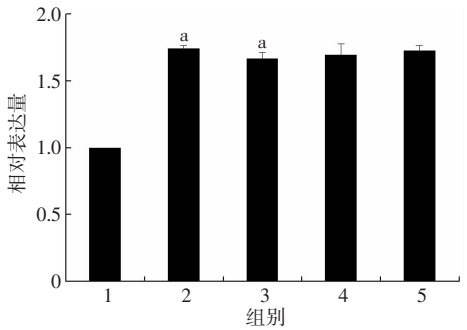
1:Sham 组;2:SAH 组;3:SAH + vehicle 组;4:SAH +5 g/kg PFOB 组;5:SAH +10 g/kg PFOB 组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 SAH 组和 SAH + vehicle 组比较;c:$P<0.05$,与 SAH +5 g/kg PFOB 组比较

图 1 各组大鼠神经行为功能缺损评分(A)、脑含水量(B)、伊文思蓝渗出量(C)比较



A:Sham 组;B:SAH 组;C:SAH + vehicle 组;D:SAH +5 g/kg PFOB 组;E:SAH +10 g/kg PFOB 组;F:半定量分析结果 1:Sham 组;2:SAH 组;3:SAH + vehicle 组;4:SAH +5 g/kg PFOB 组;5:SAH +10 g/kg PFOB 组 a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 SAH 组和 SAH + vehicle 组比较;c:$P<0.05$,与 SAH +5 g/kg PFOB 组比较

图 2 TUNEL 染色观察各组大鼠海马 CA1 区神经元凋亡情况

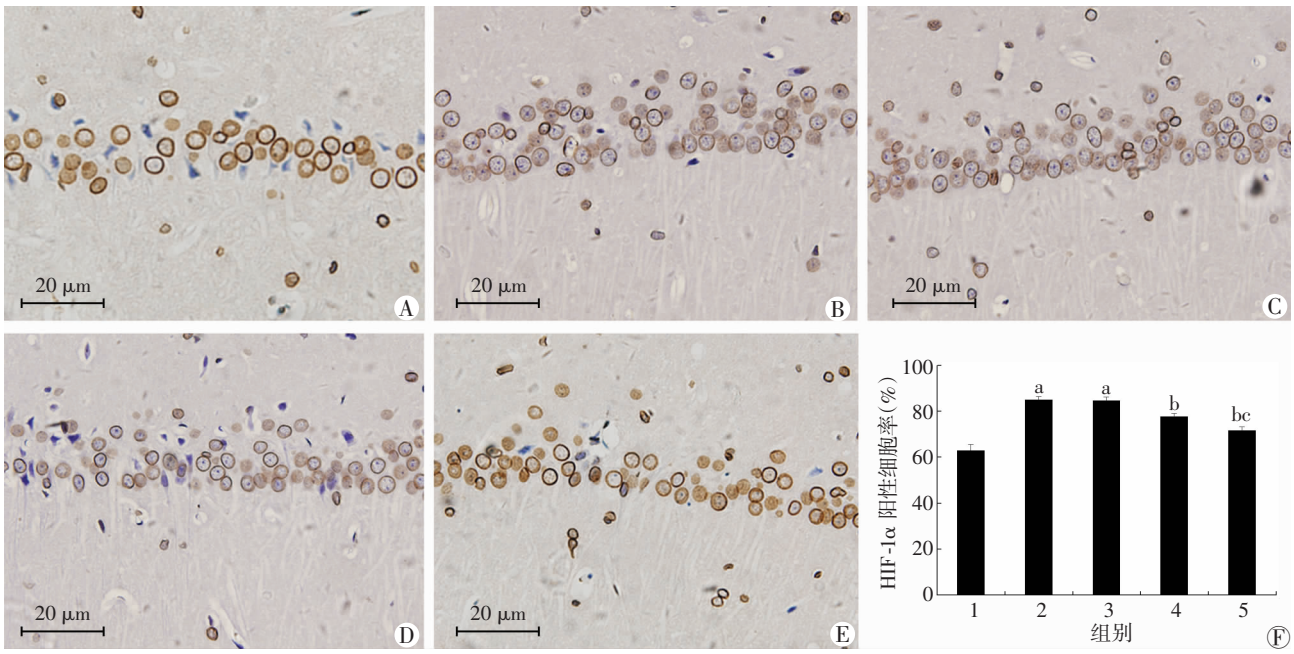


1:Sham 组;2:SAH 组;3:SAH + vehicle 组;4:SAH +5 g/kg PFOB 组;5:SAH +10 g/kg PFOB 组 a:$P<0.05$,与 Sham 组比较

图 3 荧光定量 PCR 检测各组 HIF-1α mRNA 的表达变化

2.5 免疫组化检测 PFOB 对 HIF-1α 表达影响

在脑组织海马中,HIF-1α 主要在神经元表达,既可以在细胞核中,也可以在胞质中表达。Sham 组海马区仅见少量的 HIF-1α 阳性染色细胞的表达,且主要表达在胞质。与 Sham 组相比,在造模 24 h 后 SAH 组和 SAH + vehicle 组中海马区的神经元 HIF-1α 阳性染色细胞明显增多。在造模 1 h 后给予 PFOB(5、10 g/kg)纳米粒干预,海马区 HIF-1α 阳性细胞数目较 SAH 明显减少($P<0.05$),且 SAH +10 g/kg PFOB 组阳性细胞减少较 SAH +5 g/kg PFOB 组更明显($P<0.05$,图 4)。



A:Sham 组;B:SAH 组;C:SAH + vehicle 组;D:SAH + 5 g/kg PFOB 组;E:SAH + 10 g/kg PFOB 组;F:半定量分析 1: Sham 组;2:SAH 组;3:SAH + vehicle 组;4: SAH + 5 g/kg PFOB 组;5:SAH + 10 g/kg PFOB 组 a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 SAH 组和 SAH + vehicle 组比较;c:$P<0.05$,与 SAH + 5 g/kg PFOB 组比较

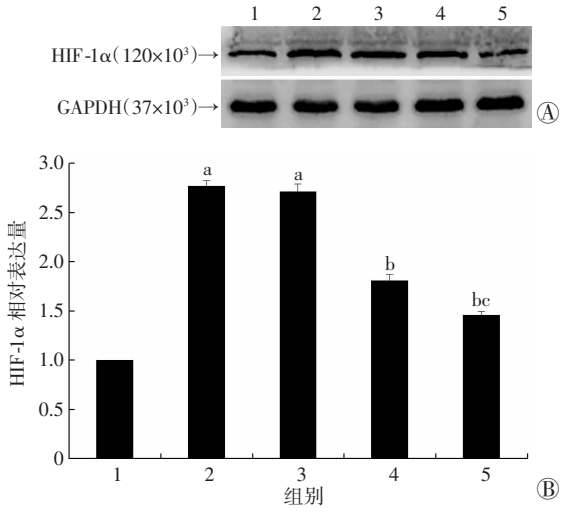
图 4 免疫组化观察各组大鼠海马 CA1 区神经元 HIF-1α 的表达

2.6 Western blot 检测 PFOB 对 HIF-1α 蛋白的影响

造模 24 h 后,Western blot 检测结果显示 Sham 组海马区 HIF-1α 蛋白表达量很低。相比之下,在 SAH 组和 SAH + vehicle 组中 HIF-1α 蛋白表达量明显升高($P<0.05$)。而在造模 1 h 后予以 PFOB 治疗能够明显降低 HIF-1α 蛋白表达,且 SAH + 10 g/kg PFOB 组降低程度明显高于 SAH + 5 g/kg PFOB 组($P<0.05$,图 5)。

3 讨论

SAH 是具有高病死率和致残率的临床重症,占所有脑卒中的 5%,约 30% 的存活者留有不同程度的残疾[1]。目前研究认为 EBI 是导致 SAH 患者病死率较高和决定预后的首要因素。EBI 是指 SAH 后 72 h 之内整个脑组织发生的直接损伤,涉及迟发性脑血管痉挛出现前(3 d 至 3 周)脑组织内发生的所有病理生理过程,包括脑水肿、血脑屏障(blood brain barrier,BBB)破坏、脑细胞死亡等[3]。虽然对于 EBI 的发病机制尚不清楚,但是多数学者认为 SAH 后颅内压急剧升高和脑血流量锐减导致的急性脑缺血在 EBI 中发挥重要作用。因此,对 EBI 的干预成为能够改善 SAH 预后的关键。



1: Sham 组;2:SAH 组;3:SAH + vehicle 组;4: SAH + 5 g/kg PFOB 组;5: SAH + 10 g/kg PFOB 组

A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 SAH 组和 SAH + vehicle 组比较;c:$P<0.05$,与 SAH + 5 g/kg PFOB 组比较

图 5 液态氟碳纳米粒对大鼠 SAH 后 24 h 海马区 HIF-1α 蛋白表达的影响

HIF-1 是 1992 年 Semenza 等[18]在 Hep3B 细胞提取物中发现。它是由对氧敏感的 α 亚基和稳定表达的 β 亚基组成的异源二聚体,而 HIF-1α 既是 HIF-1 的

调节亚基又是活性亚基,因此 HIF-1 的生物效应是由 HIF-1α 亚基实现的。大量研究证实 HIF-1α 与脑外伤、脑缺血和脑出血性疾病密切相关[19-20]。Ostrowski 等[6]首先报道 SAH 模型 24 h 后大鼠脑实质内可见 HIF-1α 高表达。Wang 等[8]研究发现大鼠 SAH 后大量表达的 HIF-1α 通过调节水孔蛋白-4 和金属基质蛋白酶-9 在 SAH 后脑水肿的发生中发挥重要作用。随后胡强等[21]研究报道,HIF-1α 在大鼠 SAH 后大量表达,并且在 12 h 明显增多,24 h 达高峰,72 h 显著下降;同时 HIF-1α 参与早期脑损伤中的神经元凋亡。因此,他们认为 HIF-1α 参与 EBI 的发生,而抑制 HIF-1α 能够发挥神经保护作用。同时 Ostrowski 等[6]研究发现高压氧治疗能够减轻 SAH 后早期脑损伤,部分原因是其抑制 HIF-1α 及其下游的 VEGF 和 BNIP3 蛋白表达。Wu 等[10]研究报道通过 HIF-1α 的抑制剂 2ME2 干预 SAH,在不影响颅内压、脑灌注压和脑血流量的情况下,能够减轻脑水肿和神经元凋亡等早期脑损伤的表达。这些研究都进一步证实在 SAH 后 EBI 中通过不同的方式抑制 HIF-1α 及其下游靶基因蛋白的表达,能够发挥神经保护作用。

PFOB 属于安全无毒全氟碳化合物(PFC)的一种,具有高度稳定性和良好的携氧功能,经过乳化的 PFOB 能够达到最小直径 90 nm,使其更容易通过血管内皮细胞间隙,并使停留在血管内时间大大延长,同时大大增加了 PFOB 的携氧能力和穿透能力。从最初利用 PFC 特殊的理化性质,到后来发现 PFOB 具有抗氧化应激损伤[22],再到 PFOB 具有抗炎症反应[23]等作用,PFOB 已经广泛应用于临床的各个领域,也越来越受到医学研究工作者的重视。在神经外科领域,PFC 被用于颅脑外伤后的意识恢复、脊髓外伤后神经保护和预防出血性梗死等疾病中[24-25],但是对于 PFOB 纳米粒作用于 SAH 的研究目前尚处于起步阶段。本团队前期实验通过视交叉前池注血法建立 SAH 模型,经尾静脉注射 PFOB 纳米粒对 SAH 大鼠干预发现,PFOB 纳米粒能够减轻脑水肿、神经元凋亡等早期脑损伤表现,发挥神经保护作用[14]。但是对于 PFOB 纳米粒发挥神经保护作用机制还不清楚。本实验采用颈内动脉穿刺法建立 SAH 后早期脑损伤的模型,于术后 1 h 经尾静脉予以(5、10 g/kg)不同剂量 PFOB 纳米粒干预,结果发现脑水肿、血脑屏障通透性、海马 CA1 区神经元凋亡等早期脑损伤表现较 SAH 组明显减轻,神经行为功能缺损明显改善,且 SAH + 10 g/kg PFOB 组作用效果比 SAH + 5 g/kg PFOB 组更明显。因此,进一步证实了 PFOB 纳米粒对 SAH 后 EBI 的神经保护作用。同时于造模 24 h 采取大鼠海马组织,分别采用免疫组化和 Western blot 检测 HIF-1α 蛋白表达情况,发现在 SAH 组 HIF-1α 蛋白的表达较 Sham 组明显升高,予以 PFOB 纳米粒干预后 HIF-1α 蛋白表达显著下降,同样 SAH + 10 g/kg PFOB 组抑制效果较 SAH + 5 g/kg PFOB 组更明显。上述实验表明 PFOB 纳米粒在 EBI 中能够抑制 HIF-1α 表达,而这种抑制作用可能与 PFOB 的神经保护作用密切相关。但是对于 PFOB 纳米粒作用于 HIF-1α 的是从调节 mRNA 水平还是翻译和翻译后水平,目前还不清楚。而本试验结果显示,PFOB 并不能改变 HIF-1α mRNA 表达。因此,我们认为可能的机制是:PFOB 纳米粒含有高浓度氧,能够改善脑组织的缺血缺氧状态,进而激活 HIF-1 羟化酶,使得 HIF-1α 被羟化,羟化的 HIF-1α 可与希佩尔-林道病肿瘤抑制蛋白结合,结合后的 HIF-1α 能够被 E3 泛素化蛋白识别,从而导致 HIF-1α 被 26S 蛋白酶泛素化降解,从而达到降低 HIF-1α 在胞质中的积累。当然这只是假设的机制之一,仍需进一步研究证实和明确具体的作用机制,为推动 PFOB 纳米粒尽早应用于临床,提供可靠的理论依据。

参考文献:

[1] Connolly E S Jr, Rabinstein A A, Carhuapoma J R, *et al*. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association [J]. Stroke, 2012, 43(6): 1711-1737. DOI: 10.1161/STR.0b013e3182587839

[2] Cahill W J, Calvert J H, Zhang J H. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(11): 1341-1353. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600283

[3] Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, *et al*. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(8): 916-925. DOI: 10.1097/01.WCB.0000125886.48838.7E

[4] Sehba F A, Bederson J B. Mechanisms of acute brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Neurol Res, 2006, 28(4): 381-398. DOI: 10.1179/016164106X114991

[5] Semenza G L, Agani F, Feldser D, *et al*. Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiologi of common human diseases [J]. Adv Exp Med Biol, 2000, 475: 123-130.

[6] Ostrowski R P, Colohan A R, Zhang J H. Mechanisms of hyperbaric oxygen-induced neuroprotection in a rat model of subarachnoid hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25(5): 554-571. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600048

[7] Yan J, Chen C, Lei J, *et al*. 2-methoxyestradiol reduces cerebral vasospasm after 48 hours of experimental subarachnoid

hemorrhage in rats[J]. Exp Neurol, 2006, 202(2): 348 – 356. DOI: 10.1016/j.expneurol.2006.06.009

[8] Wang Z, Meng C J, Shen X M, *et al*. Potential contribution of hypoxia-inducible factor-1α, aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 to blood-brain barrier disruption and brain edema after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. J Mol Neurosci, 2012, 48(1): 273 – 280. DOI: 10.1007/s12031-012-9769-6

[9] Hishikawa T, Ono S, Ogawa T, *et al*. Effect of deferoxamine-activated hypoxia inducible factor-1 on the brainstem following subarachnoid haemorrhage[J]. Neurosurgery, 2008, 62(1): 232 – 241. DOI: 10.1227/01.NEU.0000311082.88766.33

[10] Wu C, Hu Q, Chen J, *et al*. Inhibiting HIF-1α by 2ME2 ameliorates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 437(3): 469 – 474. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.06.107

[11] Lin C Y, Javadi M, Belnap D M, *et al*. Ultrasound sensitive eLiposomes containing doxorubicin for drug targeting therapy[J]. Nanomedicine, 2014, 10(1): 67 – 76. DOI: 10.1016/j.nano.2013.06.011

[12] Chen J, Pan H, Lanza G M, *et al*. Perfluorocarbon nanoparticles for physiological and molecular imaging and therapy[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2013, 20(6): 466 – 478. DOI: 10.1053/j.ackd.2013.08.004

[13] Kaneda M M, Caruthers S, Lanza G M, *et al*. Perfluorocarbon nanoemulsions for quantitative molecular imaging and targeted therapeutics[J]. Ann Biomed Eng, 2009, 37(10): 1922 – 1933. DOI: 10.1007/s10439-009-9643-z

[14] Zhang H, Xu R, Xie F, *et al*. Protective effects of perfluorooctyl-bromide nanoparticles on early brain injuries following subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(8): 1404 – 1416.

[15] Veelken J A, Laing R J, Jakubowski J. The Sheffield model of subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Stroke, 1995, 26(7): 1279 – 1284.

[16] Bederson J B, Germano I M, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat[J]. Stroke, 1995, 26(6): 1086 – 1092.

[17] Yamaguchi M, Zhou C, Nanda A, *et al*. Ras protein contributes to cerebral vasospasm in a canine double-hemorrhage model[J]. Stroke, 2004, 35(7): 1750 – 1755. DOI: 10.1161/01.STR.0000129898.68350.9f

[18] Semenza G L, Wang G L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation[J]. Mol Cell Biol, 1992, 12(12): 5447 – 5454.

[19] Higashida T, Kreipke C W, Rafols J A, *et al*. The role of hypoxia-inducible factor-1α, aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury[J]. J Neurosurg, 2011, 114(1): 92 – 101. DOI: 10.3171/2010.6.JNS10207

[20] Chen C, Hu Q, Yan J, *et al*. Early inhibition of HIF-1α with small interfering RNA reduces ischemic-reperfused brain injury in rats[J]. Neurobiol Dis, 2009, 33(3): 509 – 517. DOI: 10.1016/j.nbd.2008.12.010

[21] 胡强, 吴骋, 陈敬寅, 等. 蛛网膜下腔出血大鼠早期大脑皮层低氧诱导因子-1α 表达与细胞凋亡相关性研究[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2014, 43(1): 58 – 65.

[22] Augustin A J, Spitznas M, Koch F, *et al*. Effects of perfluorooctylbromide and vitamin E on ischemia induced retinal oxidative tissue damage[J]. Exp Eye Res 1998, 66(1): 19 – 24.

[23] Rotta A T, Gunnarsson B, Fuhrman B P, *et al*. Perfluorooctyl bromide (perflubron) attenuates oxidative injury to biological and nonbiological systems[J]. Pediatr Crit Care Med, 2003, 4(2): 233 – 238.

[24] Zhou Z, Sun D, Levasseur J E, *et al*. Perfluorocarbon emulsions improve cognitive recovery after lateral fluid percussion brain injury in rats[J]. Neurosurgery, 2008, 63(4): 799 – 807. DOI: 10.1227/01.NEU.0000325493.51900.53

[25] Yacoub A, Hajec M C, Stanger R, *et al*. Neuroprotective effects of perflurocarbon (oxycyte) after contusive spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2014, 31(3): 256 – 267. DOI: 10.1089/neu.2013.3037

(收稿:2015-10-15;修回:2015-11-25)

(编辑 王小寒)