DOI:10.16016/j.1000-5404.201906063

抑制 Fyn 可激活 Nrf2 信号通路减轻大鼠脑出血后氧化应激损伤

张 莉[1],王 露[1],肖 涵[1],甘 荟[1],陈 辉[1],郑淑月[1],翟 瑄[1],赵 敬[2],梁 平[1] 400016 重庆,重庆医科大学: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,儿科学重庆市重点实验室[1],基础医学院病理生理学教研室[2]

[摘要] **目的** 探讨抑制酪氨酸激酶 Fyn(tyrosine kinase Fyn)对大鼠脑出血(intracerebral hemorrhage,ICH)后氧化应激的影响及其潜在机制。**方法** 96 只雄性 SD 大鼠采用随机数字表法分为 4 组:假手术组(Sham 组)、脑出血组(ICH 组)、阴性对照组(ICH+Si-NC 组)和 Fyn 敲低组(ICH+Si-Fyn 组)。基底节注入 50 μL 自体血建立 ICH 模型,侧脑室注射小干扰片段抑制 Fyn 的表达,ICH 后 24 h 进行病死率统计、尼氏染色、神经功能评分、血脑屏障通透性检测,ELASA 检测 ICH 大鼠血肿周围脑组织的 SOD、GSH、GSH-PX、MDA、H_2O_2 含量,Western blot 检测脑组织中 Fyn、核因子 E2 相关因子 2(factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)及 Nrf2 下游血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)和醌氧化还原酶 1(quinine oxidoreductase 1, NQO1)的表达。**结果** 与 Sham 组相比,ICH 组脑组织中 Fyn 的表达增高($P<0.05$),大鼠病死率增高、神经元变性坏死增多、改良 Garcia 评分减低、平衡木实验评分增加($P<0.05$),血脑屏障通透性降低;脑组织 SOD、GSH、GSH-PX 活力减少($P<0.05$),而 MDA、H_2O_2 含量增加($P<0.05$);脑组织中 Nrf2、HO-1、NQO1 的表达增高($P<0.05$)。ICH 组与 ICH+Si-NC 组无明显差异。与 ICH+Si-NC 组相比,siRNA-Fyn 可有效抑制 Fyn 的表达,ICH+Si-Fyn 组大鼠病死率降低、神经元变性坏死减少、神经功能评分改善($P<0.05$),血脑屏障通透性降低;脑组织血肿周围 SOD、GSH、GSH-PX 活力增加($P<0.05$),而 MDA、H_2O_2 含量减低($P<0.05$);脑组织中 Nrf2、HO-1、NQO1 的表达增加($P<0.05$)。**结论** 抑制 Fyn 可减轻大鼠脑出血后氧化应激损伤,其机制可能与激活 Nrf2 信号通路有关。

[关键词] 脑出血;Fyn;核因子 E2 相关因子 2;氧化应激;HO-1
[中图法分类号] R345; R363.22; R743.34 [文献标志码] A

Inhibition of Fyn activates Nrf2 signaling pathway to attenuate oxidative stress injury after intracerebral hemorrhage in rats

ZHANG Li[1], WANG Lu[1], XIAO Han[1], GAN Hui[1], CHEN Hui[1], ZHENG Shuyue[1], ZHAI Xuan[1], ZHAO Jing[2], LIANG Ping[1] [1]Department of Neurosurgery, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders (Chongqing), China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of tyrosine kinase Fyn on oxidative stress after intracerebral hemorrhage (ICH) in rats and its potential mechanism. **Methods** A total of 96 male SD rats were randomly assigned to 4 groups, that is, Sham group, ICH group, negative control group (ICH+Si-NC group) and Fyn knockdown group (ICH+Si-Fyn) group. ICH model was induced *via* injecting 50 μL autologous blood into the basal ganglia. Small interfering fragments were injected into the lateral ventricle to

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81671158);重庆市卫计委重点项目(2015ZDXM016);重庆市科委基础科学与前沿技术重点研究(CSTC2015jcyjBX0144)

[通信作者] 梁 平,E-mail:liangping868@sina.com

inhibit the expression of Fyn. Mortality, Nissl staining, neurological function score, blood-brain barrier permeability test were detected at 24 h after ICH, and ELASA was used to detect the contents of SOD, GSH, GSH-PX, MDA, and H_2O_2 in the brain tissue of ICH rats. The expression of Fyn, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and Nrf2 downstream proteins, heme oxygenase-1 (HO-1) and quinine oxidoreductase 1 (NQO1) were detected by Western blotting. **Results** Compared with the Sham group, the ICH group had increased expression of Fyn in brain tissue ($P<0.05$), elevated mortality, increased neuronal degeneration and necrosis, decreased modified Garcia score ($P<0.05$), elevated score of balance beam test ($P<0.05$), decreased blood-brain barrier permeability, inhibited activities of brain tissue SOD, GSH and GSH-PX ($P<0.05$), increased contents of MDA and H_2O_2 ($P<0.05$), and enhanced expression levels of Nrf2, HO-1 and NQO1 ($P<0.05$). There were no significant differences in above indicators between the ICH group and the ICH + Si-NC group. Compared with the ICH + Si-NC group, Si-Fyn transfection effectively inhibited the expression of Fyn, decreased the mortality of the ICH + Si-Fyn group, attenuated neuronal degeneration and necrosis, improved neurological function score ($P<0.05$), and decreased blood-brain barrier permeability. The activities of SOD, GSH and GSH-PX of the brain tissue around hematoma were enhanced ($P<0.05$), while the contents of MDA and H_2O_2 were decreased ($P<0.05$) and the expression of Nrf2, HO-1 and NQO1 were up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** Inhibition of Fyn attenuates oxidative stress injury after cerebral hemorrhage in rats, and its mechanism may be related to activation of Nrf2 signaling pathway.

[**Key words**] intracerebral hemorrhage; Fyn; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; oxidative stress; heme oxygenase-1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81671158), the Key Project of Chongqing Municipal Health and Family Planning Commission (2015ZDXM016), and the Key Project of Basic Science and Frontier Technology Research of Chongqing Science and Technology Commission (CSTC2015jcyjBX0144). Corresponding author: LIANG Ping, E-mail: liangping868@sina.com

脑出血(intracerebral hemorrhage,ICH)是一种极具破坏性的卒中亚型,全球年死亡率约为43.1人/10万人[1],5年病死率约为70%[2],大多数幸存者患有不同程度的神经功能障碍[3]。虽历经多年研究,但其治疗手段仍有限,探索新的治疗方式是近年来的研究热点。研究表明,脑出血急性期诱发的氧化应激是加剧脑出血后继发脑损伤的关键因素。ICH后,机体释放的大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)和自由基致脂质过氧化、线粒体功能障碍和溶酶体损伤等加速神经细胞的死亡和加重脑损伤[4-5]。因此,探寻脑出血后氧化应激损伤相关的内源性蛋白质可能为脑出血的基础研究和治疗提供新的依据。

酪氨酸激酶Fyn(tyrosine kinase Fyn)是Src激酶家族(Src family kinases, SFK)中的一员,参与神经细胞的生长、分化、信号转导等[6]。研究表明,酪氨酸磷酸酶的抑制减轻了急性肺损伤的氧化应激损伤[7],突变Fyn的酪氨酸213位点致人肝母细胞瘤Nrf2与NQO1表达减低,此外Fyn的缺失在抑郁症、帕金森和阿尔茨海默等多种神经疾病中发挥神经保护作用[8-12],但其在脑出血中的作用仍未可知。

核因子E2相关因子2(factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是细胞抵抗氧化损伤的主要调节因子[13],通过调控抗氧化反应元件(anti-oxidative response element, ARE)诱导下游抗氧化基因表达,如GST、HO-1、SOD、NQO-1等,在减轻氧化应激损伤和维持体内氧化和抗氧化的平衡中起着重要作用[14-16]。多项研究表明,在脑缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型后24 h,Nrf2及其靶向抗氧化基因HO-1和SOD的蛋白表达水平在大鼠的缺血半暗带周围皮质中增加[17]。ICH模型中,Nrf2激活对大鼠具有抗氧化应激损伤作用[18]。

本研究采用小干扰片段侧脑室注射的方法抑制Fyn的表达,用自体血法构建大鼠ICH模型,探讨抑制Fyn在大鼠脑出血后氧化应激中的作用及其可能的机制,为临床治疗ICH提供新思路和基础实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Nrf2、β-actin、兔二抗及鼠二抗抗体购于武汉三鹰,HO-1购于上海生工,NQO-1购于美国Affinity。Evans blue及尼氏染色试剂盒购于美国Sigma。总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)测定试剂

盒(WST-1 法)、丙二醛(malondialdehyde,MDA) 测定试剂盒(TBA 法)、还原型谷胱甘肽(glutathione,GSH)测定试剂盒(分光光度法)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-PX)测定试剂盒(比色法)、过氧化氢测定试剂盒(比色法)均购于南京建成生物科技公司。

1.2 体内转染 siRNA

ICH 建模前 24 h 侧脑室注射大鼠 Fyn 基因的小干扰片段(Si-Fyn,上海吉玛),Negative control RNA(Si-NC)作为阴性对照。大鼠麻醉后固定于脑立体定位仪,用微量注射泵将 Si-RNA(浓度 250 μmol/L,体积 10 μL)以 0.5 μL/min 的速度注入大鼠右侧侧脑室(前囟后 1.0 mm,右旁开 2.0 mm,深 3.5 mm),留针 10 min 后缝合头皮。Fyn siRNA 序列:正义链:5′-CCCAAGAGGUACCUUUCUUTT-3′,反义链:5′-AAGAAAGGUACCUCUUGGGTT-3′;Negative control RNA 序列:正义链:5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′,反义链:5′-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3′。

1.3 ICH 模型的制备及分组

8~12 周龄、体质量(300±20)g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠,由重庆医科大学实验动物中心提供。本研究获得重庆医科大学医学研究伦理委员会批准(2017 年 11 月 15 日)。大鼠经 4%水合氯醛(1 mL/100 g)腹腔注射麻醉后,分离股动脉并采血 50 μL 备用,固定大鼠于脑立体定位仪(深圳瑞沃德),用微量注射泵将 50 μL 自体血于 10 min 内匀速(5 μL/min)注射入大鼠右基底节(前囟后 0.2 mm,右旁开 3 mm,深 5.8 mm),留针 10 min 以防止血液反流,缓慢拔针,缝合头皮。术中维持大鼠体温(37.0±0.5)℃。96 只大鼠编号后采用随机数字表法分为 4 组:Sham 组、ICH 组、ICH+Si-NC 组和 ICH+Si-Fyn 组,其中 Sham 组 24 只;ICH 组初建模 28 只,ICH 1 d 后存活 24 只;ICH+Si-NC 组初建模 29 只,ICH 1 d 后存活 24 只;ICH+Si-Fyn 组初建模 25 只,ICH 1 d 后存活 24 只。Sham 组注入 50 μL 生理盐水[19],ICH 组仅建立 ICH 模型,ICH+Si-NC 组侧脑室注射 Si-NC 24 h 后建立 ICH 模型,ICH+Si-Fyn 组侧脑室注射 Si-Fyn 24 h 后建立 ICH 模型。ICH 24 h 后,每组 6 只大鼠评分后用于 Nissl 染色,每张切片取同侧大脑半球血肿周围髓质中 6 个显微镜视野(×200 倍)。另外,每组 6 只大鼠 ICH 24 h 后生理盐水灌注取脑用于 Western blot 检测,6 只用于氧化应激试剂盒的检测,其余每组 6 只用于血脑屏障通透性的检测。

1.4 尼氏染色

石蜡切片脱蜡脱苯后,焦油紫工作液染色 15 min,蒸馏水中漂洗 10 min,将切片依次在 70%、85%、95%和 100%乙醇中各 2 min,随后将切片置于二甲苯中约 10 min,滴加中性树胶加盖盖玻片封片。

1.5 神经功能评分

ICH 24 h 后采用改良加西亚评分[20]和平衡木实验评分[21]。改良加西亚评分主要包括 6 项:自发运动、四肢运动的对称性、前爪伸展、本体感觉、触碰反应和触须反应。评分越低损伤越重,而平衡木实验评分越高损伤越重。

1.6 血脑屏障通透性检测

ICH 24 h 后,大鼠股静脉内给予伊文思蓝(Evans Blue)染料(4%EB,5 mL/kg,Sigma),使其循环 1 h 后先用生理盐水灌注,后予以 4%多聚甲醛灌注后取脑,置于 4%多聚甲醛中固定 2 d,10%、20%、30%蔗糖梯度脱水,快速冰冻后切片(厚度 8 μm),Olympus 共聚焦显微镜采图。

1.7 分光光度计检测 ICH 大鼠血肿周围脑组织的 SOD、GSH、GSH-PX、MDA、H_2O_2 含量

ICH 24 h 后,取各组血肿周围脑组织约 0.5 g 研磨匀浆,离心取上清液后,按照各试剂盒说明书分别检测。

1.8 Western blot 检测

取右基底节血肿周围约 150 mg 脑组织研磨并提取组织上清液后,用 BCA 法测蛋白浓度。将蛋白质样品(50 μg/泳道)上样于 10%或 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上,电泳分离并电转至 PVDF 膜(Millipore 公司),5%的脱脂牛奶室温封闭 2 h。将 PVDF 膜转入 Fyn、Nrf2、HO-1 和 NQO1 的一抗稀释液(1∶1 000 TBST 稀释)4 ℃孵育过夜,之后用 TBST 洗膜(5 min×4 次),二抗室温孵育 1 h 后再次用 TBST 洗膜(5 min×4 次),随后用化学发光液检测试剂盒(Affinity 公司)显影。使用 Image Lab 软件分析蛋白条带。

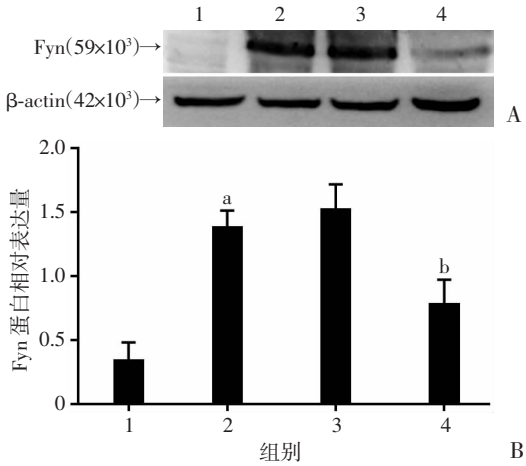
1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。使用 GraphPad Prism 7.0 进行统计分析。单因素方差分析进行组间比较,非配对 t 检验用于两组之间的统计分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 验证小干扰片段抑制 Fyn 表达的效果

大鼠侧脑室注射 Fyn 干扰片段 48 h(即 ICH 建模后 24 h)后,Western blot 检测干扰效果:与 sham 组相比,ICH 组 Fyn 表达增加($P<0.01$);ICH 组与 ICH+Si-NC 组差异无统计学意义;与 ICH+Si-NC 组相比,ICH+Si-Fyn 组 Fyn 表达明显减低($P<0.01$,图 1),提示 Fyn 干扰片段可有效抑制 Fyn 的表达。



1:Sham 组;2:ICH 组;3:ICH+Si-NC 组;4:ICH+Si-Fyn 组;A:大鼠脑组织 Fyn 蛋白表达;B:大鼠脑组织 Fyn 相对蛋白表达量分析　a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.01$,与 ICH+Si-NC 组比较

图 1　侧脑室注射 Fyn 基因的小干扰片段对大鼠脑组织 Fyn 蛋白表达的影响

2.2　抑制 Fyn 后可减少 ICH 大鼠神经元变性坏死

大鼠脑组织尼氏染色切片荧光显微镜镜下观察:与 Sham 组相比,ICH 组染色较浅,大鼠脑组织间质疏松肿胀,神经元数量及尼氏小体明显减少,细胞核固缩、移位、溶解。ICH 组与 ICH+Si-NC 组无明显差异。与 ICH+Si-NC 组相比,ICH+Si-Fyn 组染色较深,脑组织间质疏松减轻,神经元数量及尼氏小体增加,细胞核固缩、移位、溶解减轻(图 2)。

2.3　抑制 Fyn 后可降低 ICH 大鼠血脑屏障通透性

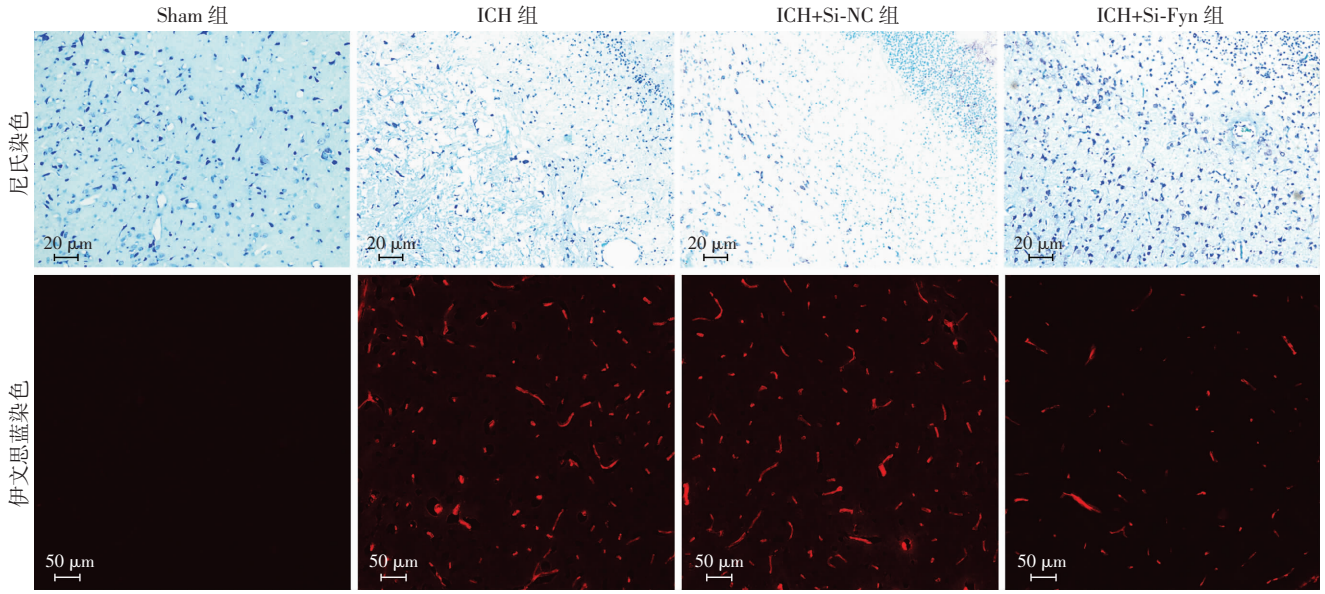
图 2 中红色荧光含量表示渗透入大鼠脑组织中的伊文思蓝染料,红色荧光含量越多,表示渗透入大鼠脑组织中的伊文思蓝染料越多,即对血脑屏障的破坏越重。ICH 组在 ICH 24 h 后用伊文思蓝法检测血脑屏障通透性,结果显示:与 sham 组相比,ICH 组红色荧光含量明显增多;ICH 组与 ICH+Si-NC 组无明显差异;与 ICH+Si-NC 组相比,ICH+Si-Fyn 组红色荧光含量明显减少。

2.4　抑制 Fyn 后可改善 ICH 大鼠神经功能评分

与 Sham 组相比,ICH 组在 ICH 24 h 后改良 Garcia 评分显著减低($P<0.01$,图 3A),平衡木实验评分明显增加($P<0.01$,图 3B),提示 ICH 引起大鼠显著的神经功能缺损,而 ICH 组与 ICH+Si-NC 组差异无统计学意义,表明 ICH+Si-NC 组 RNA 处理不影响神经学结果。与 ICH+Si-NC 组相比,ICH+Si-Fyn 组改良 Garcia 评分增加,平衡木实验评分明显减低($P<0.01$)。

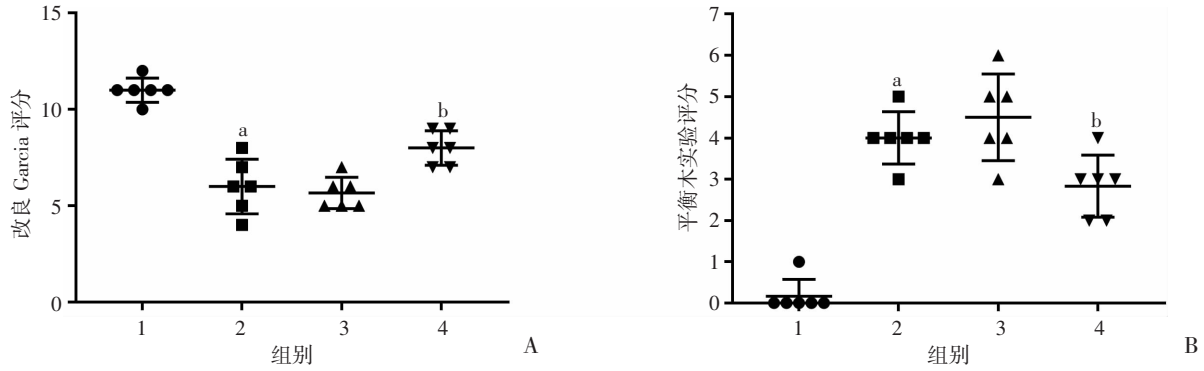
2.5　抑制 Fyn 后可增加 ICH 大鼠脑组织 SOD、GSH、GSH-PX 含量

ICH 后 24 h,取大鼠血肿周围脑组织用于检测 SOD、GSH、GSH-PX 含量。与 Sham 组相比,ICH 组氧化损伤加重,SOD(图 4A)、GSH(图 4B)、GSH-PX 活力(图 4C)减低($P<0.01$),ICH 组与 ICH+Si-NC 组差异无统计学意义。与 ICH+Si-NC 组相比,抑制 Fyn 可有效增加血肿周围脑组织中 SOD、GSH、GSH-PX 活力($P<0.01$)。



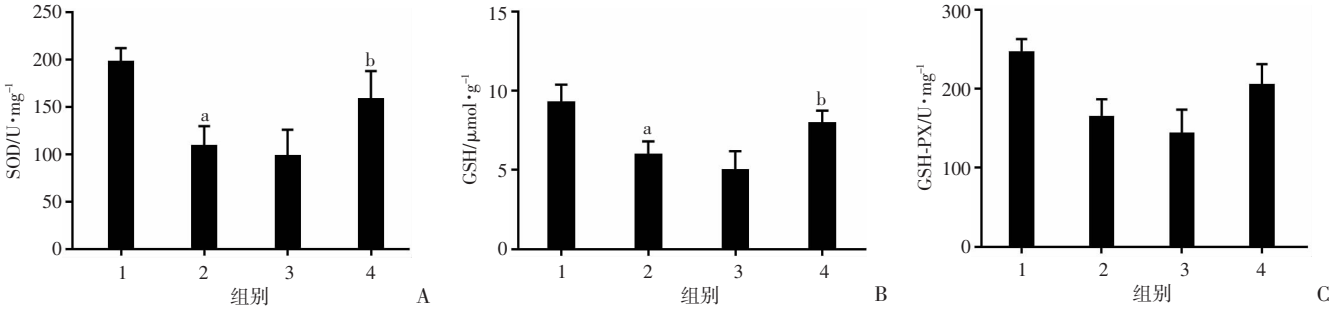
图中红色荧光示渗透入大鼠脑组织中的伊文思蓝

图 2　抑制 Fyn 对各组大鼠脑组织和血脑屏障通透性的影响



1:Sham 组;2:ICH 组;3:ICH+Si-NC 组;4:ICH+Si-Fyn 组;A:改良 Garcia 评分;B:平衡木实验评分 a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 ICH+Si-NC 组比较

图 3 抑制 Fyn 对各组大鼠神经功能的影响



1:Sham 组;2:ICH 组;3:ICH+Si-NC 组;4:ICH+Si-Fyn 组;A: SOD;B:GSH;C:GSH-PX 活力 a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.01$,与 ICH+Si-NC 组比较

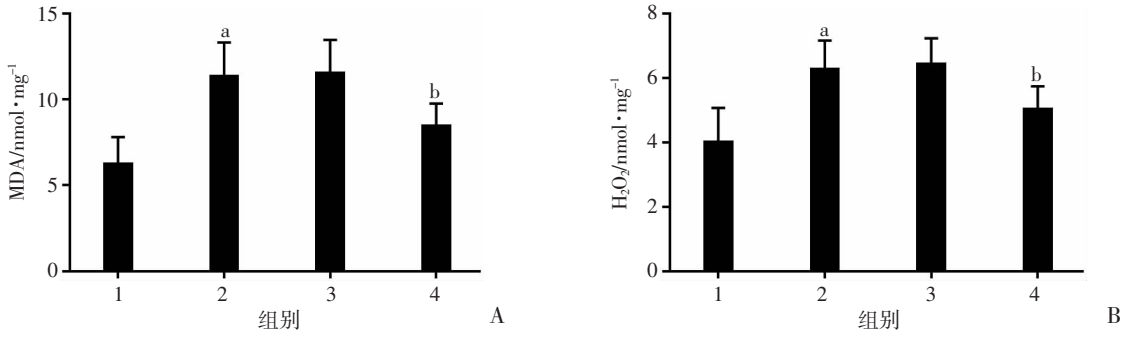
图 4 抑制 Fyn 对各组大鼠脑组织 SOD、GSH、GSH-PX 含量的影响

2.6 抑制 Fyn 后可减低 ICH 大鼠 MDA、H_2O_2 含量

ICH 后 24 h,取大鼠血肿周围脑组织用于检测 MDA、H_2O_2 含量。与 Sham 组相比,ICH 组氧化损伤加重,MDA(图 5A)、H_2O_2(图 5B)含量增加($P<0.01$),ICH 组与 ICH+Si-NC 组无统计学差异。与 ICH+Si-NC 组相比,抑制 Fyn 可有效减低血肿周围脑组织中 MDA、H_2O_2 含量($P<0.01$)。

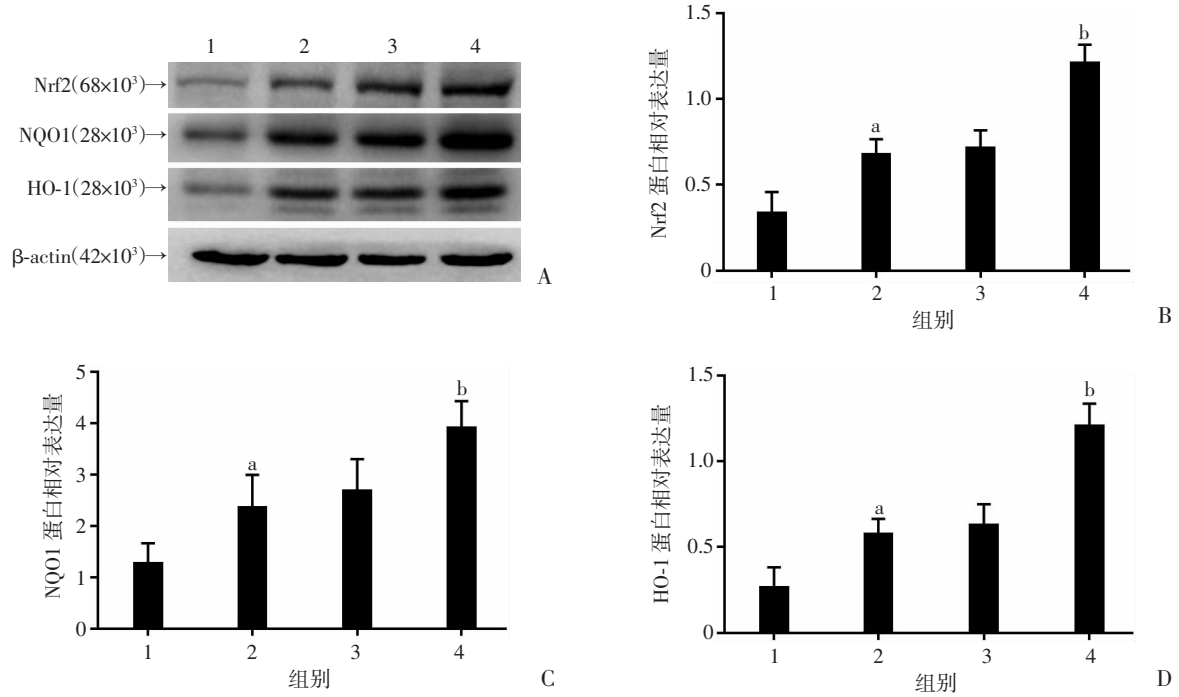
2.7 抑制 Fyn 增加脑组织中 Nrf2、HO-1、NQO1 的表达

ICH 后 24 h, Western blot 检测大鼠血肿周围脑组织中 Nrf2、HO-1、NQO1 的表达,结果示:与 Sham 组相比,ICH 组 Nrf2 及其下游蛋白 HO-1、NQO1 表达增加($P<0.01$);ICH 组与 ICH+Si-NC 组差异无统计学意义;与 ICH+Si-NC 组相比,ICH+Si-Fyn 组 Nrf2、HO-1、NQO1 表达明显减低($P<0.01$,图 6)。



1:Sham 组;2:ICH 组;3:ICH+Si-NC 组;4:ICH+Si-Fyn 组;A: 大鼠脑组织 MDA 含量;B:大鼠脑组织 H_2O_2 含量 a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.01$,与 ICH+Si-NC 组比较

图 5 抑制 Fyn 后对大鼠脑组织 MDA、H_2O_2 含量的影响



1:Sham 组;2:ICH 组;3:ICH+Si-NC 组;4:ICH+Si-Fyn 组;A:大鼠脑组织 Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达;B:大鼠脑组织 Nrf2 蛋白相对表达量;C:大鼠脑组织 NQO1 蛋白相对表达量;D:大鼠脑组织 HO-1 蛋白相对表达量 a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.01$,与 ICH+Si-NC 组比较

图 6 抑制 Fyn 对大鼠脑组织 Nrf2、HO-1、NQO1 表达的影响

3 讨论

抑制脑出血后继发神经功能损伤对于脑出血患者生活质量的提升具有重要的意义,因此,深入探究 ICH 的后氧化应激、炎症、线粒体功能障碍、凋亡与自噬等引起的继发损伤的机制对该疾病的发生、发展至关重要[17, 22]。体内氧化和抗氧化的失衡诱发氧化应激,而氧化应激损伤被证实是加剧脑出血后继发脑损伤的关键因素,研究认为清除体内过量的自由基和活性 ROS 有利于减轻脑出血后脑损伤[4-5]。

Fyn 参与多种疾病的氧化应激损伤,如抑制 Fyn 可减轻高糖诱导的内皮细胞损伤[23],抑制 GSK-3β/Fyn 通路可减轻由内质网应激介导的铀诱导的肾细胞凋亡等[24]。且 Fyn 参与多种神经疾病的发生、发展,研究表明,在 AD 小鼠模型中,过表达 Fyn 加速神经细胞中的突触丢失和认知障碍的发作[25]。另一项研究表明,抑制 Fyn 的表达可减轻癫痫发生过程中的神经炎症[12]。但 Fyn 在脑出血的作用尚未探明。本研究证实 SFK 家族成员 Fyn 可减轻 ICH 大鼠脑出血后氧化应激损伤。通过 siRNA 干扰的方式抑制 Fyn 的蛋白表达,Western blot 检测侧脑室注射小干扰片段对 Fyn 蛋白表达的抑制效果,结果显示:与 ICH+Si-NC 组相比,Fyn 的蛋白表达量明显降低,提示 Fyn 的表达被有效抑制。与 ICH+Si-NC 组相比,抑制 Fyn 可显著减轻 ICH 大鼠神经元的变性坏死,改善神经功能评分和降低血脑屏障通透性。

Nrf2 是机体维持氧化和抗氧化平衡的重要转录因子,本研究检测了 Nrf2/ARE 信号通路中 Nrf2 的蛋白表达水平及其下游因子 HO-1,NQO1 的表达。研究发现:与 ICH+Si-NC 组相比,抑制 Fyn 后 Nrf2 的蛋白表达量明显增高,其下游因子 HO-1,NQO1 也显著增加,说明抑制 Fyn 激活了 Nrf2/ARE 信号通路的活性,从而有效促进了下游抗氧化因子的表达,对抗 ICH 后的氧化应激对脑组织的损伤,改善神经功能。SOD、GSH、GSH-PX 是体内重要的抗氧化物酶,对于机体抵抗氧化损伤至关重要[26]。本研究结果表明:与 ICH+Si-NC 组相比,抑制 Fyn 后脑组织 SOD、GSH、GSH-PX 活力明显增加,表明抑制 Fyn 可增加抗氧化能力。MDA 是脂质过氧化的副产物,是氧化损伤的可靠标志物,H_2O_2 是 ROS 的重要组成部分[27]。因此,本研究检测了血肿周围组织 MDA 和 H_2O_2 含量。与 ICH+Si-NC 组相比,抑制 Fyn 后脑组织 MDA 和 H_2O_2 含量显

著减低,上述结果表明抑制 Fyn 可减轻大鼠脑出血后氧化应激损伤,再次验证抑制 Fyn 激活了 Nrf2/ARE 信号通路。但在此模型中,通过侧脑室注射干扰片段,我们仅证实抑制 Fyn 减轻大鼠脑出血后氧化应激损伤可能与激活 Nrf2 信号通路有关,还需进一步确认该通路的激活及效应。而且实验仅涉及蛋白层面,抑制 Fyn 对 Nrf2/ARE 信号通路的 mRNA 的影响,是否涉及 Fyn 和 Nrf2 的核转位和磷酸化,是否存在蛋白与蛋白的直接或间接相互作用,以及在生理状态下 Fyn 的上游调控机制等,这些问题仍值得进一步探究。

综上,本研究表明:抑制 Fyn 可减轻大鼠脑出血后氧化应激损伤,改善神经功能和减轻血脑屏障通透性。这种作用可能通过诱导 Nrf2/ARE 信号通路的活化,增加 Nrf2/ARE 信号通路下游 HO-1、NQO1、SOD 等抗氧化因子的表达来实现。因此,抑制 Fyn 蛋白的表达水平可能是减轻脑出血后氧化应激损伤的一种新策略。

参考文献:

[1] GBD CAUSES OF DEATH COLLABORATORS. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. Lancet, 2017, 390(10100): 1151-1210. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32152-9.

[2] POON M T, FONVILLE A F, AL-SHAHI SALMAN R. Long-term prognosis after intracerebral haemorrhage: systematic review and meta-analysis[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2014, 85(6): 660-667. DOI: 10.1136/jnnp-2013-306476.

[3] HEMPHILL J C 3rd, GREENBERG S M, ANDERSON C S, *et al*. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: A guideline for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association[J]. Stroke, 2015, 46(7): 2032-2060. DOI: 10.1161/STR.0000000000000069.

[4] XU W L, LI T, GAO L S, *et al*. Sodium benzoate attenuates secondary brain injury by inhibiting neuronal apoptosis and reducing mitochondria-mediated oxidative stress in a rat model of intracerebral hemorrhage: possible involvement of DJ-1/akt/IKK/NFκB pathway[J]. Front Mol Neurosci, 2019, 12: 105. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00105.

[5] ZHENG J W, SHI L G, LIANG F, *et al*. Sirt3 ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction after intracerebral hemorrhage in diabetic rats[J]. Front Neurosci, 2018, 12: 414. DOI: 10.3389/fnins.2018.00414.

[6] BARE D J, LAUDER J M, WILKIE M B, *et al*. P59fyn in rat brain is localized in developing axonal tracts and subpopulations of adult neurons and Glia[J]. Oncogene, 1993, 8(6): 1429-1436.

[7] DUAN J X, YANG Z, HUANG J, *et al*. Inhibition of tyrosine kinases protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by preventing nuclear export of Nrf2[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 12331-12339. DOI: 10.1002/jcb.28497.

[8] KASPAR J W, JAISWAL A K. Tyrosine phosphorylation controls nuclear export of Fyn, allowing Nrf2 activation of cytoprotective gene expression[J]. FASEB J, 2011, 25(3): 1076-1087. DOI: 10.1096/fj.10-171553.

[9] MAO L M, WANG J Q. Tyrosine phosphorylation of glutamate receptors by non-receptor tyrosine kinases: roles in depression-like behavior[J]. Neurotransmitter (Houst), 2016, 3: e1118.

[10] NYGAARD H B. Targeting Fyn kinase in Alzheimer's disease[J]. Biol Psychiatry, 2018, 83(4): 369-376. DOI: 10.1016/j.biopsych.2017.06.004.

[11] PANICKER N, SARKAR S, HARISCHANDRA D S, *et al*. Fyn kinase regulates misfolded α-synuclein uptake and NLRP3 inflammasome activation in microglia[J]. J Exp Med, 2019, 216(6): 1411-1430. DOI: 10.1084/jem.20182191.

[12] SHARMA S, CARLSON S, PUTTACHARY S, *et al*. Role of the Fyn-PKCδ signaling in SE-induced neuroinflammation and epileptogenesis in experimental models of temporal lobe epilepsy[J]. Neurobiol Dis, 2018, 110: 102-121. DOI: 10.1016/j.nbd.2017.11.008.

[13] HAYES J D, DINKOVA-KOSTOVA A T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism[J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39(4): 199-218. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.02.002.

[14] LIU L, VOLLMER M K, FERNANDEZ V M, *et al*. Korean red ginseng pretreatment protects against long-term sensorimotor deficits after ischemic stroke likely through Nrf2[J]. Front Cell Neurosci, 2018, 12: 74. DOI: 10.3389/fncel.2018.00074.

[15] MA Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity[J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 2013, 53: 401-426. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.

[16] LIU L, LOCASCIO L M, DORÉ S. Critical role of Nrf2 in experimental ischemic stroke[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 153. DOI: 10.3389/fphar.2019.00153.

[17] ZHAO Y, FU B, ZHANG X, *et al*. Paeonol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury *via* upregulating expression of pAkt, Nrf2, HO-1 and ameliorating BBB permeability in mice [J]. Brain Res Bull, 2014, 109: 61-67. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2014.09.008.

[18] CHEN-ROETLING J, REGAN R F. Targeting the Nrf2-heme oxygenase-1 axis after intracerebral hemorrhage [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(15): 2226-2237. DOI: 10.2174/1381612822666161027150616.

[19] FAN X Z, MU L S. The role of heme oxygenase-1 (HO-1) in the regulation of inflammatory reaction, neuronal cell proliferation and apoptosis in rats after intracerebral hemorrhage (ICH)[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2017, 13: 77-85. DOI:10.2147/NDT.S120496.

[20] MA Q Y, HUANG B, KHATIBI N, *et al*. PDGFR-α inhibition preserves blood-brain barrier after intracerebral hemorrhage[J]. Ann Neurol, 2011, 70(6): 920-931. DOI:10.1002/ana.22549.

[21] YOU D, YOU H. Repression of long non-coding RNA MEG3 restores nerve growth and alleviates neurological impairment after cerebral ischemia-reperfusion injury in a rat model[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 1447-1457. DOI:10.1016/j.biopha.2018.12.067.

[22] ZHENG H P, CHEN C L, ZHANG J, *et al*. Mechanism and therapy of brain edema after intracerebral hemorrhage [J]. Cerebrovasc Dis, 2016, 42(3/4): 155-169. DOI: 10.1159/000445170.

[23] CHEN G, CHEN X J, NIU C, *et al*. Baicalin alleviates hyperglycemia-induced endothelial impairment 1 *via* Nrf2 [J]. J Endocrinol, 2018, 240(1): JOE-J18-0457.R1. DOI:10.1530/JOE-18-0457.

[24] YI J, YUAN Y, ZHENG J F, *et al*. Hydrogen sulfide alleviates uranium-induced kidney cell apoptosis mediated by ER stress *via* 20S proteasome involving in Akt/GSK-3β/Fyn-Nrf2 signaling[J]. Free Radic Res, 2018, 52(9): 1020-1029. DOI:10.1080/10715762.2018.1514603.

[25] KAUFMAN A C, SALAZAR S V, HAAS L T, *et al*. Fyn inhibition rescues established memory and synapse loss in Alzheimer mice[J]. Ann Neurol, 2015, 77(6): 953-971. DOI:10.1002/ana.24394.

[26] DUAN X C, WEN Z J, SHEN H T, *et al*. Intracerebral hemorrhage, oxidative stress, and antioxidant therapy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 1203285. DOI: 10.1155/2016/1203285.

[27] TSIKAS D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges[J]. Anal Biochem, 2017, 524:13-30. DOI: 10.1016/j.ab.2016.10.021.

(**收稿**:2019-06-11;**修回**:2019-07-11)

(编辑 吴培红)