DOI:10.16016/j.2097-0927.202110078

缺氧诱导因子-1α对坏死性小肠结肠炎小鼠脑损伤的保护作用

邹 谋,王 雪,余玉娟,赵 薇,徐 颖 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院麻醉科,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室

[摘要] **目的** 探究缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)对坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis,NEC)小鼠脑损伤的影响。**方法** 将81只5日龄C57BL/6小鼠按随机数字表法分为:①对照组(CON组,$n=15$,与母鼠同笼,母乳喂养),②坏死性小肠结肠炎组[NEC组,$n=24$,饲养在保育箱,采用配方奶喂养+缺氧+口服脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)的方法诱导NEC小鼠模型],③HIF-1α稳定剂组(DMOG组,$n=19$,在NEC组基础上给予HIF-1α稳定剂DMOG),④HIF-1α抑制剂组(2ME2组,$n=23$,在NEC组基础上给予HIF-1α抑制剂2ME2)。建模过程中记录小鼠死亡情况,建模4 d后处死所有小鼠;HE染色观察小鼠肠道病理表现;Western blot检测脑组织中HIF-1α蛋白的表达水平;免疫组化检测小鼠海马活化的小胶质细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞的数量;RT-qPCR检测炎症因子IL-1β和TNF-α mRNA在小鼠脑中的表达水平。**结果** 与CON组相比,NEC组小鼠肠道受损,海马活化的小胶质细胞数量增加(0.80±0.75 *vs* 4.00±0.63,$P<0.05$),星形胶质细胞激活增加($P<0.05$),炎症因子TNF-α、IL-1β表达水平升高($P<0.05$),少突胶质细胞数量减少(64.40±7.26 *vs* 45.60±2.80,$P<0.05$),HIF-1α表达水平增加($P<0.05$)。给予腹腔注射HIF-1α稳定剂DMOG后,与NEC组相比,小鼠的生存率上升(66.67% *vs* 84.21%,$P<0.05$),肠道损伤减轻,小胶质细胞(4.00±0.63 *vs* 1.60±0.49,$P<0.05$)和星形胶质细胞的活化被抑制($P<0.05$),炎症因子TNF-α、IL-1β表达水平下降($P<0.05$),少突胶质细胞数量增多(45.60±2.80 *vs* 56.00±5.22,$P<0.05$);腹腔注射HIF-1α抑制剂2ME2则得到相反的结果。**结论** HIF-1α在NEC小鼠脑中保护性上调,其稳定高表达可减轻NEC小鼠脑中神经炎症,具有脑保护作用。

[关键词] 坏死性小肠结肠炎;脑损伤;缺氧诱导因子;神经炎症;早产儿
[中图法分类号] R725.745; R742.05; R977.6 [文献标志码] A

Protective effect of hypoxia-inducible factor-1α on brain injury in mice with necrotizing enterocolitis

ZOU Mou, WANG Xue, YU Yujuan, ZHAO Wei, XU Ying Department of Anesthesiology, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) on the brain injury of necrotizing enterocolitis (NEC) mice. **Methods** Eighty-one C57BL/6 mice aged 5 d were randomly divided into 4 groups: Control group (CON, $n=15$, breastfed, in cages with their mothers), NEC group ($n=24$, fed in an incubator, with formula milk+hypoxia+oral lipopolysaccharide to induce NEC mouse model), DMOG group ($n=19$, given HIF-1α stabilizer DMOG on the base of NEC model), and 2ME2 group ($n=23$, given HIF-1α inhibitor 2ME2 on the base of NEC model). The mortality of mice was recorded during modeling. All mice were sacrificed in 4 d after modeling, and the intestinal pathological features of mice were

[基金项目] 重庆市技术创新与应用示范(社会民生类)一般项目(cstc2018jscx-msybX0104)
[通信作者] 徐 颖,E-mail:xuyingxy3066@126.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

observed by HE staining. Western blotting and immunohistochemical assay were performed respectively to detect the expression of HIF-1α protein in brain tissue and the numbers of activated microglia, astrocytes and oligodendrocytes in the hippocampus. The mRNA levels of inflammatory cytokines IL-1β and TNF-α were determined by RT-qPCR in brain tissue. **Results** As compared with the CON group, the mice of the NEC group showed intestinal tract damage, increased activated microglia (0.80±0.75 *vs* 4.00±0.63, $P<0.05$) and astrocytes ($P<0.05$) in the hippocampus, decreased number of oligodendrocytes (64.40±7.26 *vs* 45.60±2.80, $P<0.05$), and higher levels of TNF-α, IL-1β and HIF-1α ($P<0.05$). After intraperitoneal injection of HIF-1α stabilizer DMOG, the survival rate of mice in the DMOG group was increased (66.67% *vs* 84.21%, $P<0.05$), and the intestinal injury was reduced. The activation of microglia (4.00±0.63 *vs* 1.60±0.49, $P<0.05$) and astrocytes ($P<0.05$) was inhibited, while the number of oligodendrocytes was elevated (45.60±2.80 *vs* 56.00±5.22, $P<0.05$), and the expression of TNF-α and IL-1β was down-regulated ($P<0.05$). However, intraperitoneal injection of HIF-1α inhibitor 2ME2 resulted in opposite outcomes. **Conclusion** HIF-1α is protectively up-regulated in the brain of NEC mice, and its stable and high expression reduces the neuroinflammation in the brain of NEC mice, exerting a protective effect on the brain.

[**Key words**] necrotizing enterocolitis; brain injury; hypoxia-inducible factor; neuroinflammation; premature infants

Supported by the General Project of Technology Innovation and Application Demonstration for Social Livelihood of Chongqing (cstc2018jscx-msybX0104).
Corresponding author: XU Ying, E-mail: xuyingxy3066@126.com

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis,NEC)是早产儿常见的严重胃肠道疾病之一,其特征是伴有不同程度出血、坏死的全肠道炎症。NEC 在极低出生体质量(<1 500 g)出生儿中发病率为7%[1],其病死率高达30%~50%[2]。NEC 幸存儿常患有多种短期和长期并发症,不仅包括短肠综合征、肠道狭窄等肠道疾病,还会导致神经发育障碍[3]。研究报道,与未患 NEC 的同年龄早产儿相比,约45%的 NEC 患儿存在神经发育障碍[4]。一些使用大脑核磁共振成像(magnetic resonance imaging,MRI)研究显示,NEC 患儿出现了髓鞘发育受损、脑容量减少的病理改变[5-7]。在 NEC 动物模型研究中发现,NEC 小鼠脑中小胶质细胞由 TLR 通路激活,导致少突胶质细胞减少,髓鞘发育异常[8]。目前,关于 NEC 对大脑损伤的研究比较局限,其导致脑损伤的具体机制仍有待探索,且临床上尚缺乏针对 NEC 患儿神经保护的措施。

缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)被认为是机体在应激条件下起关键作用的转录因子,在机体炎症的发生、氧化应激、细胞凋亡等多个过程中都发挥着作用[9],且与 NEC 的病理过程中的炎症反应、缺血缺氧密切相关。一项临床试验发现,NEC 患儿肠道 HIF-1α 表达明显升高[10]。在 NEC 小鼠模型中,肠道 HIF-1α 表达同样升高,并且进一步激活其表达可以提高 NEC 小鼠的生存率,减轻 NEC 肠道炎症[11]。在新生大鼠缺血缺氧性脑病中,HIF-1α 高表达可改善脑部缺血,具有神经保护作用[12]。但目前缺乏有关 HIF-1α 是否能对 NEC 脑损伤产生神经保护的作用的相关研究。因此,本研究采用经典 NEC 小鼠模型,检测小鼠脑中少突胶质细胞的数量及神经炎症的情况,以期模拟临床 NEC 患儿脑损伤状况,并加以 HIF-1α 稳定剂和抑制剂干预,探讨 HIF-1α 在 NEC 脑损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

5日龄 C57BL/6 小鼠81只,购自重庆医科大学动物实验中心,雌雄不限,体质量2.0~3.0 g,饲养于重庆医科大学附属儿童医院动物实验中心,本研究已通过重庆医科大学附属儿童医院动物实验中心伦理审查委员会批准。

1.2 主要试剂

Similac 配方奶(Abbott Laboratories 公司,美国);犬代乳奶粉(Pet-Ag 公司,美国);脂多糖(lipopolysaccharide,LPS,Sigma 公司,美国);全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白含量检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);SDS-PAGE 电泳凝胶配制试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司);5×蛋白上样缓冲液(Biosharp 公司);快速封闭液(上海碧云天生物科技有限公司);HIF-1α Rabbit pAb、GAPDH 抗体(成都正能生物技术有限责任公司);0.22 μm PVDF 膜(Millipore 公司,德国);TRIzol(Invitrogen 公司,美国);RT Master Mix for QPCR、SYBR(MCE 公司);引物(上海生工生物工程股份有限公司);4%多聚甲醛、柠檬酸钠修复液(北京赛维尔公司);DAB 显色试剂盒、兔二步法检测

试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);Iba-1 抗体(abcam 公司,美国),GFAP 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国);少突胶质细胞转录因子-2(oligodendrocyte transcription factor 2,Olig2)抗体(GeneTex 公司,美国);2-Methoxyestradiol(Selleck Chemicals 公司,美国);Dimethyloxallyl Glycine(MCE 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与 NEC 模型建立 SPF 级新生 5 d 的 C57BL/6 小鼠采用随机数字表法分为 4 组:对照组(CON 组,$n=15$),坏死性小肠结肠炎组(NEC 组,$n=24$),HIF-1α 稳定剂组(DMOG 组,$n=19$)和 HIF-1α 抑制剂组(2ME2 组,$n=23$)。

CON 组小鼠与母鼠同笼,母乳喂养,不做任何处理。NEC 组小鼠依照 CHEN 等[13]的方法建立 NEC 模型,饲养于恒温保育箱中[温度(36±1)℃,湿度 45%~60%],配方奶(0.03~0.05 mL/g)灌胃喂养,每日 5 次;于缺氧箱(5% O_2+95% N_2)中缺氧处理 10 min,每日 3 次;LPS 灌胃(5 mg/kg),每日 1 次;连续建模 4 d。DMOG 组建模方法同 NEC 组,每日腹腔注射 HIF-1α 稳定剂 DMOG 溶液(40 mg/kg)[11]。2ME2 组建模方法同 NEC 组,每日腹腔注射 HIF-1α 抑制剂 2ME2 溶液(5 mg/kg)[14]。

1.3.2 生存情况观察 记录小鼠每日死亡情况。

1.3.3 组织取材和切片制备 NEC 建模结束后 12 h,断头处死所有小鼠,获取胃端至直肠的整肠组织,观察肠道组织的大体形态后,取回肠部用 4%多聚甲醛固定;在冰上迅速剥离出脑组织后沿着纵轴将其一分为二,随机取一半冻存于-80 ℃,另一半用 4%的多聚甲醛固定。肠道和半脑经脱水和石蜡包埋后,进行切片,切片厚度为 4 μm,烘干后备用。

1.3.4 Western blot 检测脑组织中 HIF-1α 的表达

从每组动物中随机选取 3 只小鼠进行 Western blot 检测。取-80 ℃冻存的脑组织,加入裂解缓冲液,组织匀浆,4 ℃离心 15 min(12 000×g),收集上清液,用 BCA 法行蛋白浓度定量检测。取上清液加入 5×蛋白上样缓冲液煮沸 15 min,冻存备用。取 50 μg 总蛋白样品进行凝胶电泳,转膜至 PVDF 膜,封闭 15 min,孵育一抗(HIF-1α 抗体稀释浓度为 1∶1 000,GAPDH 抗体稀释浓度为 1∶2 000),4 ℃孵育过夜,孵育二抗(稀释浓度为 1∶10 000),ECL 显影。分析软件采用 Image J,目的蛋白相对表达量以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值比值表示。

1.3.5 肠道组织 HE 染色 取肠道组织石蜡切片于烤箱烘烤 2 h,二甲苯脱蜡,HE 染色后中性树脂封片,在光学显微镜下观察肠道组织病理形态学变化。采用双盲法行肠组织损伤评分,根据 DRUCKER 等[15]的评分标准,每个标本随机选取 3 个视野,取平均值作为该标本评分值,评分≥2 分认定为 NEC 建模成功。

1.3.6 免疫组化染色检测 Iba-1 小胶质细胞、GFAP 星形胶质细胞、Olig2 少突胶质细胞的表达 采用随机数字表法,从每组小鼠中选择 5 只小鼠的半脑石蜡切片进行免疫组化染色,每只小鼠选取 3 张切片。取切片常规脱蜡至水;自来水冲洗 2 min;柠檬酸钠缓冲液(pH=6)修复 20 min;内源性过氧化氢酶阻断剂,室温孵育 10 min;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;孵育一抗(Iba-1、GFAP、OLIG2 抗体,1∶200 稀释),4 ℃过夜;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;滴加反应增强液,室温孵育 20 min;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;滴加增强酶标山羊抗兔 IgG 聚合物,室温孵育 20 min;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;滴加新鲜配制的 DAB 显色液,室温孵育 7 min;自来水冲洗 2 min;苏木精复染,透明,干燥后中性树胶封片观察。应用 Image J 软件进行图像分析。

1.3.7 荧光定量 PCR 检测脑组织 IL-1β 和 TNF-α mRNA 的表达水平 采用随机数字表法,从每组动物中选取 6 只小鼠进行实时定量 PCR 分析。取冻存的脑组织,TRIzol 法提取总 RNA,分光光度计检测 RNA 浓度,将 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板扩增 IL-1β 和 TNF-α,GAPDH 作为内参。反应条件设定为:95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,55 ℃ 20 s,共 40 个循环。引物序列如下:IL-1β(175 bp)正义 5′-CCAGCTTCAAATCTCACAGCAG-3′,反义 5′-CTTCTTTGGGTATTGCTTGGGATC-3′;TNF-α(179 bp)正义 5′-ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC-3′,反义 5′-GCTTGTCACTCGAATTTTGAGA-3′;GAPDH(102 bp)正义 5′- TGAAGCAGGCATCTGAGGG-3′,反义 5′-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG-3′。

1.4 统计学分析

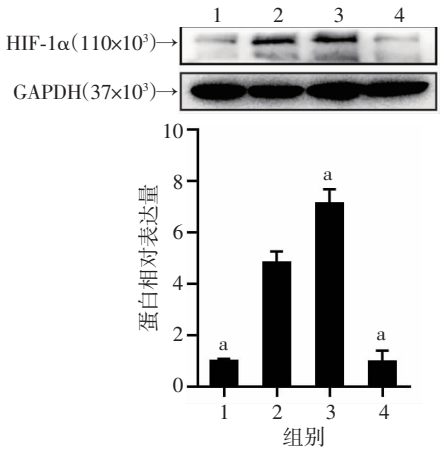
分析和作图软件采用 GraphPad Prism 7.0。采用正态性分布检验分类定量资料,用 $\bar{x}\pm s$ 表示正态分布且方差齐的定量资料,独立样本 t 检验比较两组间差异;多组间比较采用单因素方差分析。不符合正态性分布或方差不齐的定量资料,用 Wilcoxon Mann-Whitney 检验进行组间比较。生存分析采用 Kaplan-Meier 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF-1α 在小鼠脑组织中的表达水平

Western blot 结果显示,与 CON 组比较,NEC 组小鼠脑中 HIF-1α 表达显著上升($P<0.05$);与 NEC 组比

较,DMOG 组 HIF-1α 表达升高,2ME2 组 HIF-1α 表达降低($P<0.05$,图 1),说明成功稳定和抑制了 HIF-1α 的表达。

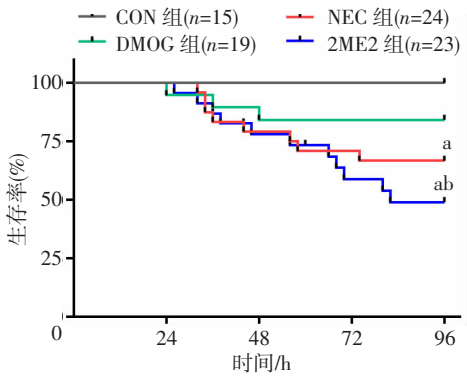


1:CON 组;2:NEC 组;3:DMOG 组;4:2ME2 组;a:$P<0.05$,与 NEC 组比较

图 1　Western blot 检测各组小鼠脑中 HIF-1α 的表达与定量分析　($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.2　HIF-1α 对小鼠生存率的影响

观察 4 组小鼠 96 h 生存率发现,CON 组小鼠无死亡,NEC 组生存率为 66.67%,差异具有统计学意义($P<0.05$);HIF-1α 稳定剂 DMOG 组生存率为 84.21%,与 CON 组差异无统计学意义;HIF-1α 抑制后,生存率明显下降,2ME2 组生存率为 48.95%,2ME2 组与 DMOG 组差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

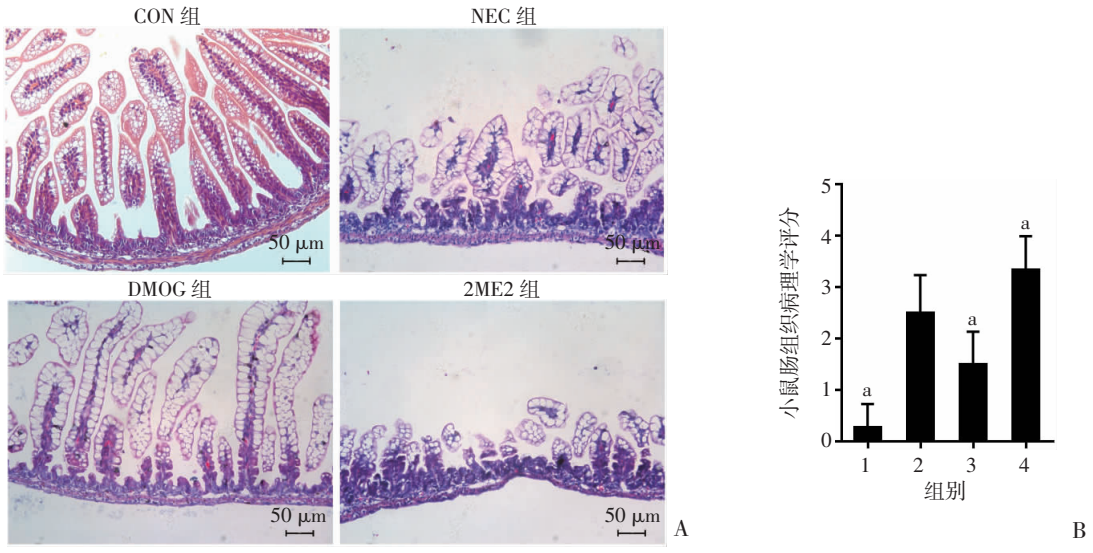


a:$P<0.05$,与 CON 组比较;b:$P<0.05$,与 DMOG 组比较

图 2　各组小鼠生存率分析

2.3　HIF-1α 对小鼠肠组织病理的影响

显微镜下观察肠道 HE 染色病理表现,CON 组肠组织结构清晰完整,绒毛完整,固有层、黏膜下层和肌层结构连接紧密;NEC 组肠组织结构紊乱,部分绒毛脱落,固有层及黏膜下层分离,肌层变薄;DMOG 组结构较完整,少量绒毛脱落,固有层无分离,黏膜下层轻度分离;2ME2 组肠组织结构完全破坏,绒毛坏死脱落,固有层及黏膜下层明显分离,肌层变薄甚至消失。见图 3A。病理学评分显示,NEC 组小鼠肠组织评分较 CON 组显著升高($P<0.01$);与 NEC 组比较,DMOG 组病理评分显著降低($P<0.01$),2ME2 组病理评分则明显升高($P<0.01$),见图 3B。



A:光学显微镜观察各组小鼠肠组织病理学改变;B:各组小鼠肠组织病理学评分　1:CON 组;2:NEC 组;3:DMOG 组;4:2ME2 组;a:$P<0.01$,与 NEC 组比较

图 3　HE 染色观察各组小鼠肠道病理学改变

2.4　HIF-1α 对小鼠海马小胶质细胞的影响

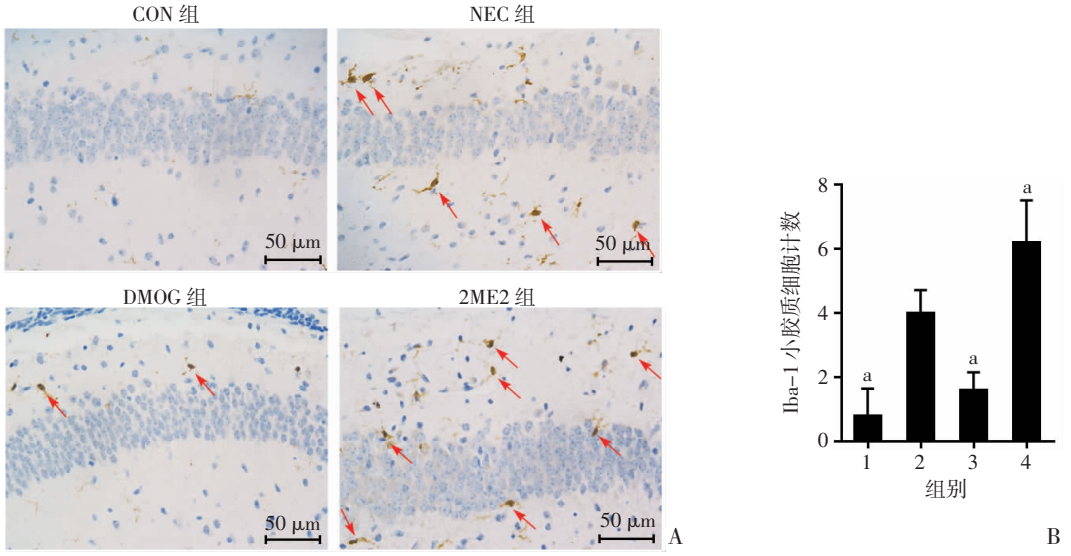
免疫组化结果显示,与 CON 组比较,NEC 组小鼠海马区小胶质细胞增多($P<0.05$),且胞体较对照组变大,呈活化状态;与 NEC 组比较,DMOG 组小胶质细胞减少($P<0.05$),2ME2 组小胶质细胞则增加($P<0.05$)。见图 4。

2.5　HIF-1α 对小鼠海马星形胶质细胞的影响

免疫组化结果显示,与 CON 组比较,NEC 组海马区星形胶质细胞激活增加;给予 HIF-1α 稳定剂 DMOG 之后,抑制了海马区星形胶质细胞的激活;抑制 HIF-1α 后海马区活化的星形胶质细胞较 NEC 组增加。积分光密度半定量分析显示,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见图 5。

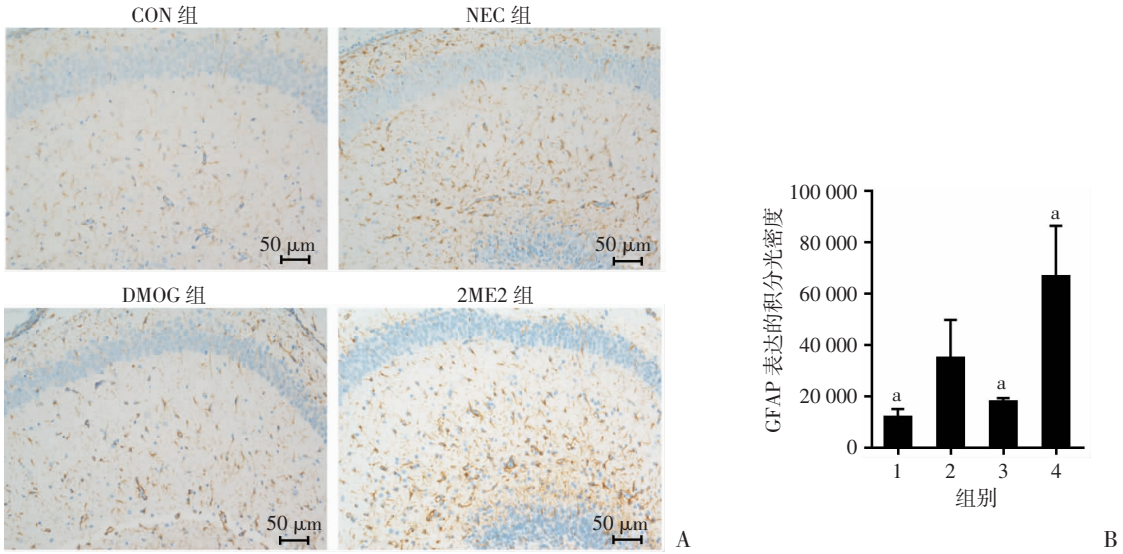
2.6　HIF-1α 对小鼠脑组织中炎症因子的影响

RT-qPCR 结果显示,NEC 组炎症因子 IL-1β、TNF-α 较 CON 组表达上升($P<0.05$);与 NEC 组比较,DMOG 组 IL-1β、TNF-α 表达降低,2ME2 组 IL-1β、TNF-α 表达升高($P<0.05$)。见图 6。



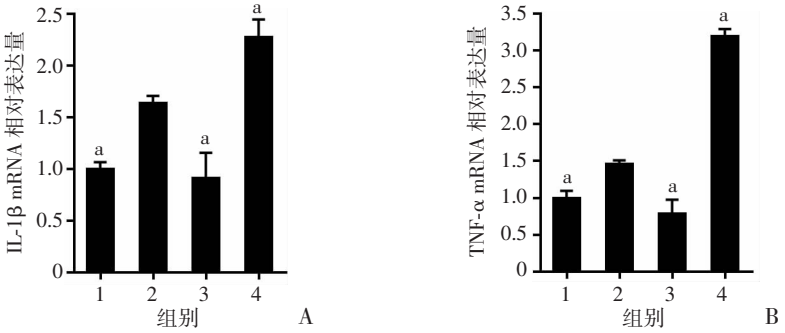
A:免疫组化检测小鼠海马星形胶质细胞 Iba-1 的表达　↑:示活化的小胶质细胞;B:各组海马活化 Iba-1 细胞计数　1:CON 组;2:NEC 组;3:DMOG 组;4:2ME2 组;a:$P<0.05$,与 NEC 组比较

图 4　免疫组化检测各组小鼠海马 Iba-1 小胶质细胞表达情况　($\bar{x}\pm s, n=5$)



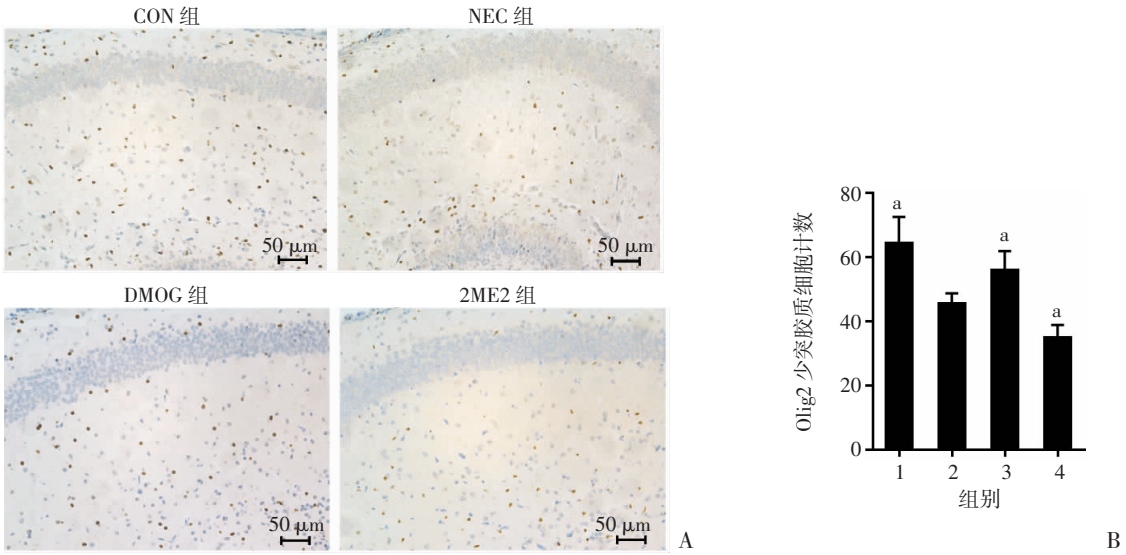
A:免疫组化检测小鼠海马星形胶质细胞 GFAP 的表达;B:各组海马 GFAP 表达的积分光密度分析　1:CON 组;2:NEC 组;3:DMOG 组;4:2ME2 组;a:$P<0.05$,与 NEC 组比较

图 5　免疫组化检测各组小鼠海马 GFAP 活化星形胶质细胞表达情况　($\bar{x}\pm s, n=5$)



a:$P<0.05$,与 NEC 组比较; 1:CON 组;2:NEC 组;3:DMOG 组;4:2ME2 组

图 6 RT-qPCR 检测各组小鼠脑组织炎症因子 IL-1β(A)、TNF-α(B)的表达 ($\bar{x}\pm s$,$n=6$)



A:免疫组化检测小鼠海马少突胶质细胞 Olig2 的表达;B:各组海马 Olig2 少突胶质细胞计数 1:CON 组;2:NEC 组;3:DMOG 组;4:2ME2 组;a:$P<0.05$,与 NEC 组比较

图 7 免疫组化检测各组小鼠海马 Olig2 少突胶质细胞表达情况 ($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

2.7 HIF-1α 对小鼠海马少突胶质细胞的影响

免疫组化结果显示(图 7),与 CON 组比较,NEC 组小鼠海马区少突胶质细胞减少,差异具有统计学意义($P<0.05$);与 NEC 组比较,DMOG 组小鼠海马区少突胶质细胞数量增加,2ME2 组小鼠海马区少突胶质细胞数量减少,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 NEC 小鼠模型特点及建模成功

NEC 多发生于早产儿中,此时大脑正处于神经发生与神经元成熟的关键神经发育时期,易受到缺血缺氧、营养不良、炎症等因素的影响,因此 NEC 患儿易出现神经发育障碍。啮齿类动物出生后 1~7 d 相当于人类胎龄 32 周前的脑组织发育程度[16]。为模拟早产儿脑部发育情况,本研究选用新生 5 d 的 C57/BL 小鼠进行建模。目前,多数学者认为 NEC 的发病由多因素所致,包括早产、炎症反应、缺氧缺血、喂养不当等[17]。因此,本研究采用配方奶喂养、LPS 灌胃以及缺氧的经典 NEC 建模方法进行建模,以期更好地模拟 NEC 多因素发病的机制,探究 NEC 对神经发育的影响。结果显示 NEC 组小鼠生存率降低,肠道肿胀积气明显;病理学观察结果显示其肠道结构紊乱,绒毛部分脱落,肌层变薄甚至消失,表明成功建立了 NEC 小鼠模型。

3.2 NEC 小鼠发生急性脑损伤

小胶质细胞是中枢神经系统中重要的天然免疫细胞,在大脑发生感染、创伤、局部缺血时,迅速活化,发挥免疫监视和吞噬作用,是神经炎症的起始因素[18]。当外周的炎症因子进入大脑后,首先激活小胶质细胞,

进而在炎症后期激活星形胶质细胞[19]。海马是大脑中负责学习和记忆的关键区域,在新生儿阶段受到损伤易影响长期认知功能。本研究发现,NEC 小鼠海马区小胶质细胞、星形胶质细胞激活增加,脑组织中炎症因子 IL-1β、TNF-α 的表达水平增加,提示在 NEC 小鼠脑组织中发生了急性神经炎症。BIOUSS 等[20]研究同样发现 NEC 组小鼠脑组织中多区域发生神经炎症。少突胶质细胞是中枢系统中的髓鞘生成细胞,它通过迁移至轴突周围,产生髓鞘包裹轴突[21]。本研究发现,NEC 组小鼠海马区少突胶质细胞较对照组减少,说明 NEC 干扰了小鼠脑中髓鞘的正常发育,与临床 NEC 患儿后期大脑 MRI 所呈现出的髓鞘发育障碍的病变特征相符[6-8]。

3.3 HIF-1α 对 NEC 小鼠脑损伤的保护作用

缺氧被认为是 NEC 发病过程中的关键因素。临床研究发现,与未患 NEC 的对照组新生儿相比,NEC 患儿脑氧合指数明显更低[22]。HIF-1 是机体在缺氧环境下的关键调控因子,由 α 和 β 两个亚基构成,α 亚基为 HIF-1 的主要活性亚基。HIF-1α 在常氧状态下迅速被脯氨酸羟化结构域酶(prolyl hydroxylasedomains,PHDs)泛素化降解;而在缺氧状态下,PHDs 被抑制,HIF-1α 可在细胞内积累表达,进入细胞核与 HIF-1β 结合,调控炎症发生、细胞凋亡、能量代谢等功能[10]。DMOG 和 2ME2 是 HIF-1α 常见的稳定剂和抑制剂:DMOG 可抑制 PHDs,导致 HIF-1α 的积聚;2ME2 可抑制 HIF-1α 蛋白的表达。本研究显示,在 NEC 小鼠腹腔注射 DMOG 后,小鼠生存率上升,肠道损伤减轻,海马区神经炎症得以抑制,少突胶质细胞数量明显上升,而 2ME2 组则得到相反结果。研究结果提示在 NEC 小鼠中,HIF-1α 的稳定高表达发挥着神经保护的作用。在 NEG 小鼠中,增加 HIF-1α 表达,可降低炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的表达水平,增强机体的抗炎能力[23]。在创伤性脑损伤中,通过 DMOG 稳定 HIF-1α 的表达,可减少神经元和总细胞死亡,同时改善长期的记忆和运动功能[24]。在大鼠脑缺血模型的大脑表面转染 HIF-1α 发现,HIF-1α 表达水平升高之后,脑中侧支循环的血管数量增加,大鼠脑缺血得以改善[13]。以上结果都证明,HIF-1α 在炎症和创伤中发挥着保护作用。因此,我们推测 HIF-1α 的稳定高表达可减轻 NEC 小鼠神经炎症。

本研究发现 NEC 可致新生小鼠脑中海马区少突胶质细胞减少,发生严重的神经炎症。HIF-1α 的稳定高表达可以减轻这一损伤,有望成为 NEC 神经保护的新靶点以改善 NEC 患儿神经发育结果,但其具体保护机制目前尚不清楚。此外,本研究仅观察 HIF-1α 对 NEC 小鼠急性脑损伤的作用,其是否能改善长期认知功能障碍还需进一步探索。

参考文献:

[1] HACKAM D, CAPLAN M. Necrotizing enterocolitis: pathophysiology from a historical context[J]. Semin Pediatr Surg, 2018, 27(1): 11-18. DOI: 10.1053/j.sempedsurg.2017.11.003.

[2] JONES I H, HALL N J. Contemporary outcomes for infants with necrotizing enterocolitis——a systematic review[J]. J Pediatr, 2020, 220: 86-92.e3. DOI: 10.1016/j.jpeds.2019.11.011.

[3] MUTANEN A, PIERRO A, ZANI A. Perioperative complications following surgery for necrotizing enterocolitis[J]. Zeitschrift Fur Kinderchirurgie, 2018, 28(2): 148-151. DOI: 10.1055/s-0038-1636943.

[4] REES C M, PIERRO A, EATON S. Neurodevelopmental outcomes of neonates with medically and surgically treated necrotizing enterocolitis[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2007, 92(3): F193-F198. DOI: 10.1136/adc.2006.099929.

[5] SHAH D K, DOYLE L W, ANDERSON P J, *et al*. Adverse neurodevelopment in preterm infants with postnatal sepsis or necrotizing enterocolitis is mediated by white matter abnormalities on magnetic resonance imaging at term[J]. J Pediatr, 2008, 153(2): 170-175, 175.e1. DOI: 10.1016/j.jpeds.2008.02.033.

[6] MERHAR S L, RAMOS Y, MEINZEN-DERR J, *et al*. Brain magnetic resonance imaging in infants with surgical necrotizing enterocolitis or spontaneous intestinal perforation versus medical necrotizing enterocolitis[J]. J Pediatr, 2014, 164(2): 410-412.e1. DOI: 10.1016/j.jpeds.2013.09.055.

[7] SHIN S H, KIM E K, YOO H, *et al*. Surgical necrotizing enterocolitis versus spontaneous intestinal perforation in white matter injury on brain magnetic resonance imaging[J]. Neonatology, 2016, 110(2): 148-154. DOI: 10.1159/000444387.

[8] NIÑO D F, ZHOU Q J, YAMAGUCHI Y, *et al*. Cognitive impairments induced by necrotizing enterocolitis can be prevented by inhibiting microglial activation in mouse brain[J]. Sci Transl Med, 2018, 10(471): eaan0237. DOI: 10.1126/scitranslmed.aan0237.

[9] DENGLER V L, GALBRAITH M, ESPINOSA J M. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2014, 49(1): 1-15. DOI: 10.

3109/10409238.2013.838205.

[10] CHEN Y, CHANG K T, LIAN D W, *et al*. The role of ischemia in necrotizing enterocolitis[J]. J Pediatr Surg, 2016, 51(8): 1255-1261. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2015.12.015.

[11] BOWKER R M, YAN X C, MANAGLIA E, *et al*. Dimethyloxalylglycine preserves the intestinal microvasculature and protects against intestinal injury in a neonatal mouse NEC model: role of VEGF signaling[J]. Pediatr Res, 2018, 83(2): 545-553. DOI: 10.1038/pr.2017.219.

[12] MATSUDA T, ABE T, WU J L, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1alpha DNA induced angiogenesis in a rat cerebral ischemia model[J]. Neurol Res, 2005, 27(5): 503-508. DOI: 10.1179/016164105X25144.

[13] CHEN Y, KOIKE Y, MIYAKE H, *et al*. Formula feeding and systemic hypoxia synergistically induce intestinal hypoxia in experimental necrotizing enterocolitis[J]. Pediatr Surg Int, 2016, 32(12): 1115-1119. DOI: 10.1007/s00383-016-3997-8.

[14] KHAN M, DHAMMU T S, BAARINE M, *et al*. GSNO promotes functional recovery in experimental TBI by stabilizing HIF-1α[J]. Behav Brain Res, 2018, 340: 63-70. DOI: 10.1016/j.bbr.2016.10.037.

[15] DRUCKER N A, JENSEN A R, TE WINKEL J P, *et al*. Loss of endothelial nitric oxide synthase exacerbates intestinal and lung injury in experimental necrotizing enterocolitis[J]. J Pediatr Surg, 2018, 53(6): 1208-1214. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2018.02.087.

[16] OHMURA Y, KUNIYOSHI Y. A translational model to determine rodent's age from human foetal age[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17248. DOI: 10.1038/s41598-017-17571-z.

[17] 马娜, Mohd Jaish Siddiqui, 夏斌. 新生儿坏死性小肠结肠炎发病机制的研究进展[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2020, 16(6): 739-744. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1673-5250.2020.06.018.

MA N, SIDDIQUI M J, XIA B. Research progresses of pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis[J]. Chin J Obstet Gynecol Pediatr Electron Ed, 2020, 16(6): 739-744. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1673-5250.2020.06.018.

[18] EYO U B, DAILEY M E. Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2013, 8(3): 494-509. DOI: 10.1007/s11481-013-9434-z.

[19] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, CLARKE L E, *et al*. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. Nature, 2017, 541(7638): 481-487. DOI: 10.1038/nature21029.

[20] BIOUSS G, ANTOUNIANS L, LI B, *et al*. Experimental necrotizing enterocolitis induces neuroinflammation in the neonatal brain[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 97. DOI: 10.1186/s12974-019-1481-9.

[21] BARKOVICH A J. Concepts of myelin and myelination in neuroradiology[J]. Am J Neuroradiol, 2000, 21(6): 1099-1109.

[22] HOWARTH C, BANERJEE J, LEUNG T, *et al*. Cerebral oxygenation in preterm infants with necrotizing enterocolitis[J]. Pediatrics, 2020, 146(3): e20200337. DOI: 10.1542/peds.2020-0337.

[23] KEELY S, CAMPBELL E L, BAIRD A W, *et al*. Contribution of epithelial innate immunity to systemic protection afforded by prolyl hydroxylase inhibition in murine colitis[J]. Mucosal Immunol, 2014, 7(1): 114-123. DOI: 10.1038/mi.2013.29.

[24] SEN T, SEN N. Treatment with an activator of hypoxia-inducible factor 1, DMOG provides neuroprotection after traumatic brain injury[J]. Neuropharmacology, 2016, 107: 79-88. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.03.009.

(**收稿**:2021-10-14;**修回**:2022-01-11)

(编辑 栾 嘉)