DOI:10.16016/j.2097-0927.202405009

罗沙司他调控线粒体分裂与融合减轻热射病小鼠脑损伤

周 欢,黄雪妍,申婷婷,张伯翼,何根林,罗 雪,杨学森 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系热带医学教研室,极端环境医学教育部重点实验室

[**摘要**] **目的** 探究缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor,HIF)脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase,PHD)抑制剂罗沙司他(FG-4592)对热射病(heat stroke,HS)导致的脑损伤的保护作用及其机制。**方法** 选取140只6~8周龄的雄性C57BL/6J小鼠,体质量为18~22 g。其中40只按随机数字表法分为热射病(HS)组,罗沙司他低剂量(LD,5 mg/kg)组、中剂量(MD,10 mg/kg)组、高剂量(HD,20 mg/kg)组,每组10只,进行热打击实验,观察各组小鼠24 h生存情况,确定最佳给药剂量。另外100只小鼠按随机数字表法分为正常对照(Control)组、罗沙司他(FG-4592)组、热射病(HS)组、罗沙司他+热射病(FG-4592+HS)组,每组25只,进行热打击实验,建立HS动物模型。采用改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score,mNSS)评价神经功能,脑切片HE染色观察病理损伤情况;Fluoro-Jade C染色观察神经元变性;测定脑组织总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性、丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量评价氧化应激情况;透射电镜观察线粒体损伤;Western blot检测大脑皮层中Caspase-3、Cleaved Caspase-3、Mfn1、Mfn2、Opa1、Drp1、p-Drp1(Ser616)、Fis1、HIF-1α、HO-1蛋白表达水平。**结果** 与HS组比较,FG-4592可以显著提高热射病小鼠24 h内的生存率,且MD组生存率最高。与Control组比较,HS组小鼠mNSS评分增加($P<0.05$),大脑皮层MDA含量增加($P<0.05$),总SOD活性降低($P<0.05$),且大脑皮层组织出现显著病理损伤和神经元变性,大脑皮层组织线粒体结构明显损伤,Caspase-3、Cleaved Caspase-3、Fis1、HIF-1α、HO-1蛋白表达和p-Drp1(Ser616)/Drp1比值升高($P<0.05$),Mfn1、Mfn2、Opa1蛋白表达降低($P<0.05$)。经FG-4592预处理后显著降低HS小鼠的mNSS评分($P<0.05$),降低了组织MDA含量($P<0.05$),增加了总SOD活性($P<0.05$);同时FG-4592预处理改善了大脑皮层组织病理损伤、减轻了神经元变性和线粒体结构损伤,并降低了Caspase-3、Cleaved Caspase-3、Fis1蛋白表达和p-Drp1(Ser616)/Drp1比值($P<0.05$),增加了Mfn1、Mfn2、Opa1、HIF-1α、HO-1蛋白表达($P<0.05$)。**结论** 罗沙司他调控线粒体分裂融合平衡,减轻线粒体结构损伤,减少氧化应激和细胞凋亡,减轻热射病脑损伤。

[**关键词**] 罗沙司他;热射病;氧化应激;线粒体;缺氧诱导因子1-α
[**中图法分类号**] R594.11;R742;R977.6 [**文献标志码**] A

Roxadustat attenuates brain injury in mice with heat stroke by regulating mitochondrial fission and fusion

ZHOU Huan, HUANG Xueyan, SHEN Tingting, ZHANG Boyi, HE Genlin, LUO Xue, YANG Xuesen Department of Tropical Medicine, Key Laboratory of Extreme Environmental Medicine of Ministry of Education, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the protective effect and underlying mechanism of roxadustat (FG-4592), hypoxia-inducible factor-α (HIF-α) prolyl hydroxylase inhibitor, on brain injury caused by heat stroke (HS). **Methods** A total of 140 male C57BL/6J mice (6~8 weeks old, weighing 18~22 g) were

[**通信作者**] 杨学森,E-mail:xuesenyyy@hotmail.com

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

subjected, and 40 of them were randomly divided into HS group, and low-, medium- and high-dose roxadustat groups (LD, MD and HD groups, 5, 10 and 20 mg/kg), with 10 mice in each group. The 24-hour survival rate was observed to determine the optimal dosage of roxadustat after modeling. Additionally, the remaining 100 mice were randomly allocated to normal control (Control) group, roxadustat (FG-4592) group, HS group, and roxadustat+HS (FG-4592+HS) group, with 25 mice in each. Heat shock was inflicted to establish mouse model of HS. Modified neurological severity score (mNSS) was used to assess neurological function. HE staining of brain sections was performed to examine pathological damage, and Fluoro-Jade C staining was applied to observe neuronal degeneration. The activity of total superoxide dismutase (SOD) and content of malondialdehyde (MDA) in brain tissue were measured to assess oxidative stress. Transmission electron microscopy was employed to visualize mitochondrial damage. Western blotting was performed to assess the protein levels of Caspase-3, Cleaved Caspase-3, Mfn1, Mfn2, Opa1, Fis1, HIF-1α, HO-1 and p-Drp1 (Ser616)/Drp1 ratio in the cerebral cortex. **Results** Compared to the HS group, FG-4592 significantly improved the survival rate of HS mice within 24 h, with the MD group showing the highest survival rate. Compared to the Control group, the HS group showed an increase in mNSS score ($P<0.05$), an elevation in the MDA content in the cerebral cortex ($P<0.05$), and a decrease in total SOD activity in the cerebral cortex ($P<0.05$); HE staining revealed pathological damage in the cerebral cortex, and Fluoro-Jade C staining displayed obvious neuronal degeneration in the cerebral cortex; Electron microscopy revealed obvious mitochondrial structural damage in the cerebral cortex tissue; The protein expression of Caspase-3, Cleaved Caspase-3, Fis1, HIF-1α, HO-1 and p-Drp1(Ser616)/Drp1 ratio was increased ($P<0.05$), while that of Mfn1, Mfn2, and Opa1 was decreased ($P<0.05$). Pretreatment with FG-4592 significantly reduced the mNSS score in HS mice ($P<0.05$), decreased MDA content ($P<0.05$), and enhanced total SOD activity ($P<0.05$). Additionally, FG-4592 pretreatment improved pathological damage in the cerebral cortex, reduced neuronal degeneration, and mitigated mitochondrial structural damage. Furthermore, it decreased the protein levels of Caspase-3, Cleaved Caspase-3, Fis1 and p-Drp1(Ser616)/Drp1 ratio ($P<0.05$), while increased the levels of Mfn1, Mfn2, Opa1, HIF-1α, and HO-1 ($P<0.05$). **Conclusion** Roxadustat regulates the balance between mitochondrial fission and fusion, reduces mitochondrial structural damage, oxidative stress and apoptosis, and alleviates heat stroke-induced brain injury.

[**Key words**] roxadustat; heat stroke; oxidative stress; mitochondria; hypoxia-inducible factor-1α

Corresponding author: YANG Xuesen, E-mail: xuesenyyy@hotmail.com

热射病(heat stroke,HS)是一种危及生命的疾病,其特征是患者核心体温迅速升高至40°C以上,并伴有神经系统的改变,如出现谵妄、抽搐或昏迷等症状[1]。在全球范围内,严重热浪出现的频率在过去20年间有所上升[2]。有研究者发现,热浪发生期间HS人群发病率明显增加[3]。患者在HS发病早期阶段均存在中枢神经系统损伤,并且超过30%的HS患者发展为长期中枢神经系统功能障碍[4]。既往关于HS导致脑损伤的研究主要关注海马[5]、下丘脑[6]及小脑[7]等区域的损伤,较少关注大脑皮层的损伤。

线粒体是双膜结合的细胞器,可产生细胞能量并协调机体应激反应,从而决定细胞的生死[8]。线粒体形状取决于分裂和融合之间的平衡,并由多种介导线粒体内外膜重塑的蛋白质控制,包括线粒体分裂相关蛋白[动力蛋白相关蛋白1(dynamin related protein 1,Drp1)和线粒体分裂蛋白1(mitochondrial fission 1 protein,Fis1)]和融合相关蛋白[线粒体融合蛋白1(mitofusin 1,Mfn1)、线粒体融合蛋白2(mitofusin 2,Mfn2)和视神经萎缩蛋白1(optic atrophy 1,Opa1)][9]。研究表明,抑制线粒体分裂可恢复高热应激下的线粒体功能,并改善高热引起的组织氧化损伤[10],因此,线粒体分裂和融合可能是热射病的治疗靶点之一。

罗沙司他(FG-4592)是一种缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor,HIF)脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase,PHD)抑制剂,其商品化药物由中国国家

药品监督管理局在2018年12月17日批准上市,用于治疗肾性贫血[11]。该药物通过抑制PHD活性来稳定缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α,HIF-1α)水平。已有研究证实,FG-4592可以促进机体神经发生,并通过对抗帕金森病诱导的氧化应激损伤来发挥对中枢神经系统的保护作用[12]。既往研究表明,FG-4592通过调控HIF-1α及其靶基因血红素加氧酶1(heme oxygenase 1,HO-1)来调控线粒体动力学平衡,对抗氧化应激,减轻急性肾损伤[13]。

然而,FG-4592在热射病中的作用尚不清楚。因此,本研究将通过建立HS小鼠模型,探讨FG-4592对HS脑损伤的保护作用,并初步阐明其作用机制,以期为HS脑损伤的防治提供理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

140只6~8周健康雄性C57BL/6J小鼠(体质量18~22 g),购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号:SCXK(湘)-2019-0004]。所有小鼠饲养于恒温(23±1)℃和恒湿(50±5)%的条件下,保持昼夜12 h交替循环,自由进食饮水。适应性饲养3 d后方进行实验。所有动物实验程序按照实验指南进行,并获得陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会的批准(AMUWEC20222970)。

1.2 试剂

FG-4592、PEG300购自美国MCE公司;二甲基亚砜(DMSO)购自广州赛国生物科技有限公司;阿佛丁麻醉剂购自大连美仑生物技术有限公司;HE染色试剂盒、脂质氧化(MDA)检测试剂盒、总SOD活性检测试剂盒和RIPA裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;Fluoro-Jade C染色试剂盒购自美国Biosensis公司;4%多聚甲醛固定液、2.5%戊二醛固定液购自南京森倍伽生物科技有限公司;HIF-1α兔多克隆抗体购自美国NOVUS公司;HO-1兔多克隆抗体、Caspase-3兔多克隆抗体、Mfn1兔多克隆抗体、HRP标记β-actin鼠单克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;Cleaved Caspase-3兔单克隆抗体、Mfn2兔单克隆抗体、Opa1兔单克隆抗体、Fis1兔单克隆抗体、Drp1兔单克隆抗体、磷酸化Drp1(Ser616)兔单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PVDF膜购自美国Bio-Rad公司;超敏型ECL发光液购自武汉亚科因生物技术有限公司。

1.3 仪器与设备

高温环境模拟舱购自中国豪特氧业设备有限公司;四通道温度测量仪购自中国群特公司。

1.4 实验动物分组

40只C57BL/6J雄性小鼠按照随机数字表法分为4组($n=10$):热射病(HS)组,罗沙司他低剂量(LD)组、中剂量(MD)组、高剂量(HD)组。根据FG-4592的毒物代谢动力学研究[14]以及关于FG-4592保护作用的研究报道[15-18],分别选择5、10、20 mg/kg为低、中、高剂量进行给药。FG-4592使用10% DMSO、40% PEG300、5% Tween80、45% ddH_2O作为溶剂进行配制。FG-4592给药各组分别腹腔注射相对应浓度的FG-4592,HS组腹腔注射同等体积的溶剂,每日1次,连续7 d。第7天腹腔注射后2 h,将小鼠置于高温环境模拟舱进行热打击实验。出舱后观察各组小鼠24 h生存情况,确定FG-4592最佳给药剂量。

100只C57BL/6J雄性小鼠按照随机数字表法分为4组($n=25$):正常对照(Control)组、罗沙司他(FG-4592)组、热射病(HS)组、罗沙司他+热射病(FG-4592+HS)组。FG-4592给药剂量通过前期实验确定。按上文同样方法进行药物配制及给药,并进行热打击实验。

1.5 方法

1.5.1 HS动物模型的建立 小鼠置于高温环境模拟舱中加热,环境温度(40.0±0.5)℃,相对湿度(50±5)%,期间禁食水,使用四通道温度测量仪间断监测小鼠直肠温度,直至直肠温度达到42.7 ℃,结束加热。

1.5.2 改良神经功能缺损评分 小鼠在结束加热1 h后进行改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score,mNSS),以对比各组神经功能缺损情况,总评分由运动和感觉、平衡木测试、不正常反射和活动3个部分的评分构成,总评分范围为0~18分,分值越高表示小鼠神经功能缺损越严重。评分结束后再进行下一步取材。

1.5.3 HE染色 小鼠用阿佛丁麻醉剂麻醉,预冷的0.01 mol/L PBS溶液经左心室灌入,直至右心耳处流出清亮液体,用4%多聚甲醛固定液灌注,直至小鼠四肢僵硬,完整取出整个脑组织,经固定、脱水、石蜡包埋后切片,石蜡切片经二甲苯脱蜡、HE染色后用中性树脂封片,在光学显微镜下观察脑组织病理学改变。

1.5.4 Fluoro-Jade C染色 将灌注后的脑组织完整取出,经固定、脱水、OCT,包埋后进行连续冰冻切

片,厚度 30 μm。玻片放入 50 ℃烘箱烘干 2 h,置于溶液 A(NaOH)与 80%乙醇溶液按照体积 1∶9的比例配置的混合液中浸泡 5 min,蒸馏水洗涤后,用 70%乙醇溶液浸泡 2 min,置于溶液 B($KMnO_4$)与蒸馏水按照体积 1∶9的比例配置的混合液中浸泡 10 min,蒸馏水洗涤后,用 Fluoro-Jade C 工作液避光染色 30 min,蒸馏水洗涤后,置于 50 ℃烘箱避光烘干 10 min,浸入二甲苯 5 min,用 DPX 封片剂封片,荧光显微镜下观察大脑皮层区域神经元变性情况。

1.5.5　脑组织透射电镜观察　　将大脑皮层枕叶组织块经 2.5%戊二醛固定液固定后,经脱水、包埋、切片和染色,使用透射电镜观察大脑皮层区神经元细胞内线粒体形态结构。

1.5.6　脑组织中氧化应激相关指标的含量和活性测定　　冰上分离大脑皮层枕叶组织,分别加入对应裂解液后匀浆,4 ℃ 12 000×*g* 离心 10 min,取上清,然后根据试剂盒说明书分别测定丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量和总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性。

1.5.7　Western blot 检测　　冰上分离大脑皮层枕叶组织,加入 RIPA 裂解液,匀浆,冰上裂解 20 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min,吸取上清液,BCA 法测定蛋白浓度。取 50 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h,经 TBST 洗涤后,分别孵育一抗 HIF-1α(1∶1 000)、HO-1(1∶1 000)、Cleaved Caspase-3(1∶1 000)、Caspase-3(1∶1 000)、Opa1(1∶1 000)、Mfn1(1∶1 000)、Mfn2(1∶1 000)、Drp1(1∶1 000)、p-Drp 1(Ser616,1∶1 000)、Fis1(1∶1 000)、β-actin(1∶5 000),置于 4℃过夜。TBST 洗涤 3 次后室温孵育辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗 IgG(1∶30 000)1 h,ECL 化学发光法显影,使用 Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像,Image J 软件分析灰度值,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。

1.6　统计学分析

采用 SPSS 22.0 版软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　FG-4592 不同给药剂量对 HS 小鼠存活率的影响

通过对比各组小鼠 24 h 存活率,明确 FG-4592 的最佳给药剂量,HS 组 24 h 存活率为 40%,LD、MD、HD 组存活率分别为 50%、80%、60%,说明 FG-4592 低、中、高剂量均可以提高 HS 小鼠存活率,且 MD 组效果最佳(图 1)。根据实验结果,本研究选择 10 mg/kg 的 FG-4592 给药剂量用于后续实验。

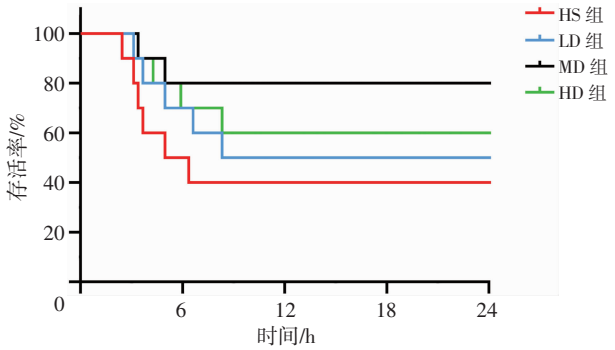


图 1　FG-4592 对 HS 小鼠存活情况的影响($n=10,\bar{x}\pm s$)

2.2　FG-4592 对小鼠神经功能损伤的影响

通过 mNSS 评分对各组小鼠的神经功能缺损情况进行评价。结果表明,Control 组和 FG-4592 组小鼠 mNSS 评分为 0,表明 2 组小鼠神经功能正常;与 Control 组比较,HS 组小鼠 mNSS 评分明显增加($P<0.05$);与 HS 组比较,FG-4592 预处理后,FG-4592+HS 组小鼠 mNSS 评分明显减少($P<0.05$,表 1),提示 FG-4592 预处理能够减少 HS 导致的神经功能缺损。

表 1　各组小鼠 mNSS 评分($n=10,\bar{x}\pm s$)

组别	运动和感觉评分	平衡木测试评分	不正常反射和活动评分	总评分
Control 组	0	0	0	0
FG-4592 组	0	0	0	0
HS 组	3.70±0.82[a]	4.50±0.53[a]	2.70±0.48[a]	10.90±1.20[a]
FG-4592+HS 组	1.40±0.52[b]	2.20±0.42[b]	1.00±0.47[b]	4.60±0.70[b]

a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 HS 组比较

2.3　FG-4592 对小鼠脑组织病理的影响

通过 HE 染色观察各组小鼠大脑皮层组织病理损伤情况。结果表明,Control 组和 FG-4592 组大脑皮层组织细胞排列清晰,无明显病理改变;与 Control 组比较,HS 组细胞排列紊乱,出现大量细胞核固缩和深染,可见部分异形细胞;与 HS 组比较,FG-4592+HS 组细胞排列稍紊乱,细胞核固缩和深染明显减少(图 2),提示 FG-4592 预处理明显减轻了热射病导致的大脑皮层组织病理损伤。

2.4　FG-4592 对小鼠神经元变性的影响

通过 Fluoro-Jade C 染色观察各组小鼠大脑皮层神经元变性情况。Control 组和 FG-4592 组有个别阳性

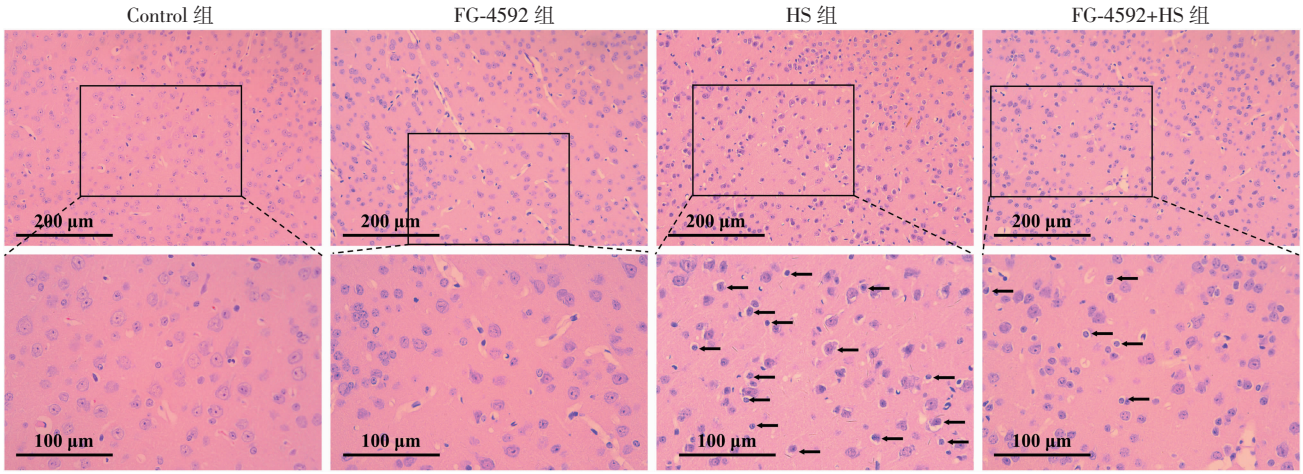
细胞,而 HS 组存在大量阳性细胞;与 HS 组比较,FG-4592+HS 组阳性细胞明显减少(图 3)。结果表明,FG-4592 能够改善 HS 导致的脑组织神经元变性。

2.5 FG-4592 对小鼠脑组织氧化应激的影响

通过测定 MDA 含量和总 SOD 活性评价各组小鼠大脑皮层氧化应激情况。与 Control 组比较,HS 组小鼠脑组织中 MDA 含量增加($P<0.05$,图 4A),总 SOD 活性降低($P<0.05$,图 4B)。与 HS 组比较,FG-4592 预处理后,FG-4592+HS 组小鼠脑组织中 MDA 含量减少($P<0.05$,图 4A),总 SOD 活性升高($P<0.05$,图 4B),提示 FG-4592 预处理能够改善 HS 导致的氧化应激损伤。

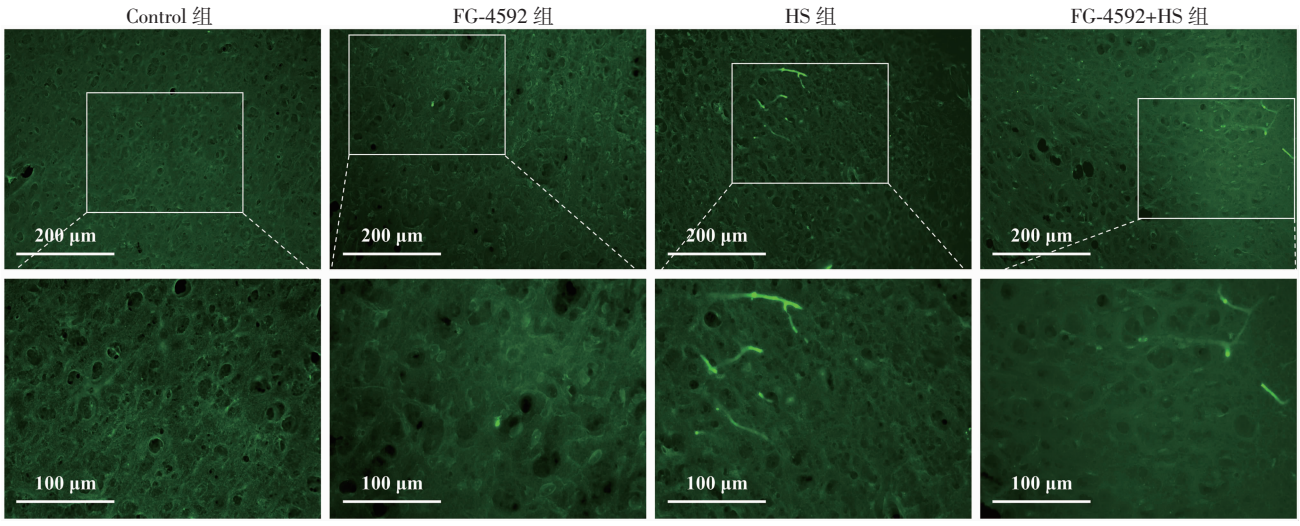
2.6 FG-4592 对小鼠脑组织细胞凋亡的影响

通过 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Caspase-3、Cleaved Caspase-3 的蛋白表达水平评价各组凋亡情况。与 Control 组比较,HS 组 Caspase-3、Cleaved Caspase-3 蛋白表达上调($P<0.05$);与 HS 组比较,FG-4592+HS 组 Caspase-3、Cleaved Caspase-3 蛋白表达下调($P<0.05$,图 5),提示 FG-4592 预给药抑制了 HS 诱导的细胞凋亡。



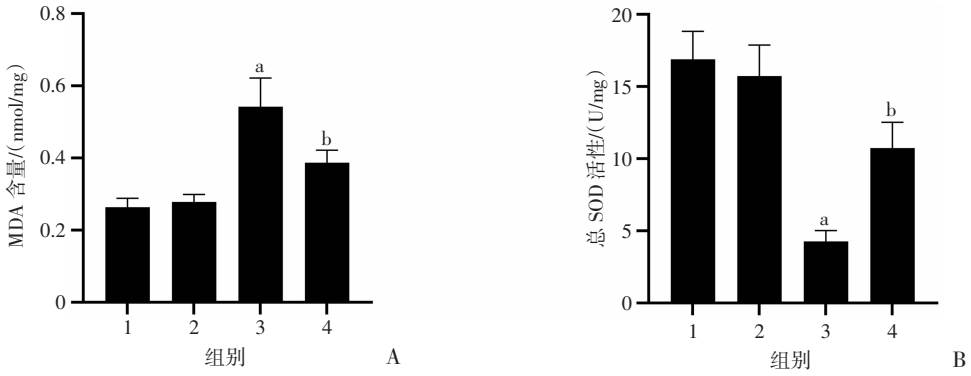
箭头:示损伤细胞

图 2 FG-4592 对小鼠脑组织病理的影响($n=3$)



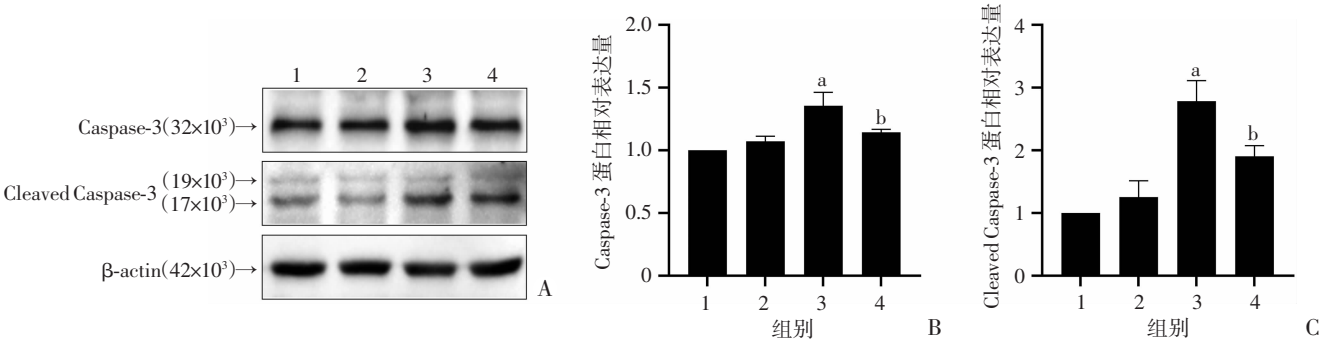
绿色荧光:示神经元变性阳性细胞

图 3 FG-4592 对小鼠脑皮层组织神经元变性的影响($n=3$)



1:Control 组;2:FG-4592 组;3:HS 组;4:FG-4592+HS 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 HS 组比较

图 4 FG-4592 对小鼠脑组织 MDA 含量(A)和总 SOD 活性(B)的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)



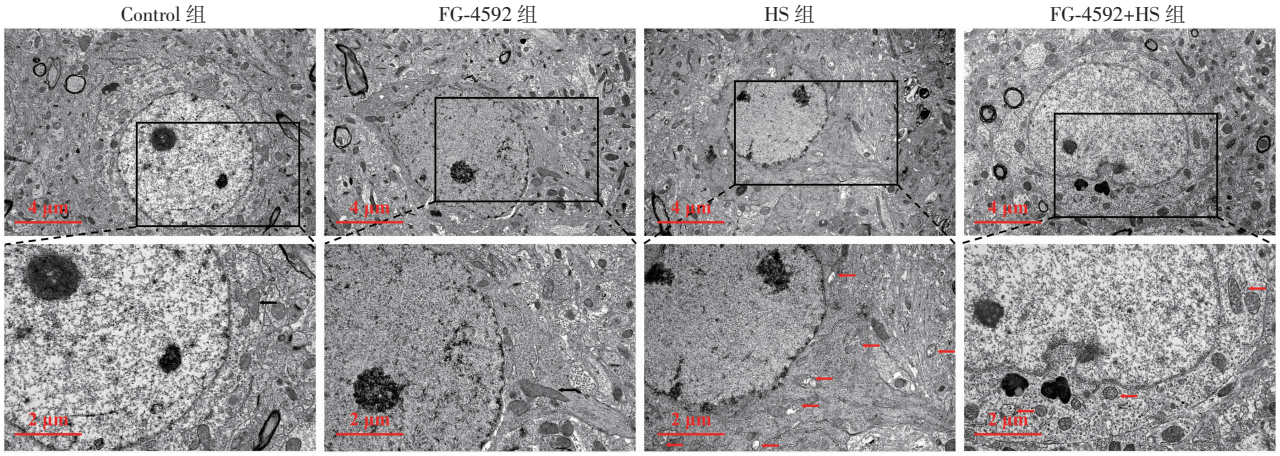
1:Control 组;2:FG-4592 组;3:HS 组;4:FG-4592+HS 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 HS 组比较

A:Western blot 检测结果;B、C:蛋白半定量分析($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

图 5 FG-4592 对小鼠脑皮层组织细胞凋亡的影响

2.7 FG-4592 对小鼠脑组织线粒体结构的影响

通过透射电镜观察各组小鼠脑皮层组织评价各组线粒体。透射电子显微镜观察结果显示,Control 组和 FG-4592 组小鼠大脑皮层线粒体未见明显结果改变,呈现正常的细长管状形态或椭圆形,大小适中,线粒体嵴排列较整齐且清晰;与 Control 组比较,HS 组小鼠大脑皮层线粒体形态异常,线粒体肿胀明显,较多线粒体嵴断裂、模糊;与 HS 组比较,FG-4592+HS 组小鼠大脑皮层线粒体损伤明显减轻,空泡化线粒体数量减少,部分嵴断裂(图 6)。结果表明,FG-4592 预处理减轻了 HS 导致的大脑皮层线粒体损伤。



黑色箭头:示正常结构线粒体;红色箭头:示结构受损线粒体

图 6 FG-4592 对小鼠脑皮层组织线粒体结构的影响($n=3$)

2.8 FG-4592 对小鼠脑皮层组织线粒体分裂、融合的影响

通过 Western blot 检测线粒体分裂、融合相关蛋白表达情况(图 7A、F)。与 Control 组比较,HS 组大脑皮层组织中 Fis1 蛋白表达明显升高($P<0.05$,图 7B),Mfn1、Mfn2 和 Opa1 蛋白表达明显降低($P<0.05$,图 7C~E),p-Drp1(Ser616)/Drp1 比值升高($P<0.05$,图 7G)。与 HS 组比较,FG-4592+HS 组大脑皮层组织 Fis1 蛋白表达明显降低($P<0.05$),Mfn1、Mfn2 和 Opa1 蛋白表达明显升高($P<0.05$),p-Drp1(Ser616)/Drp1 比值降低($P<0.05$)。结果表明:FG-4592 预处理改善了 HS 导致的线粒体过度分裂,增加了线粒体融合。

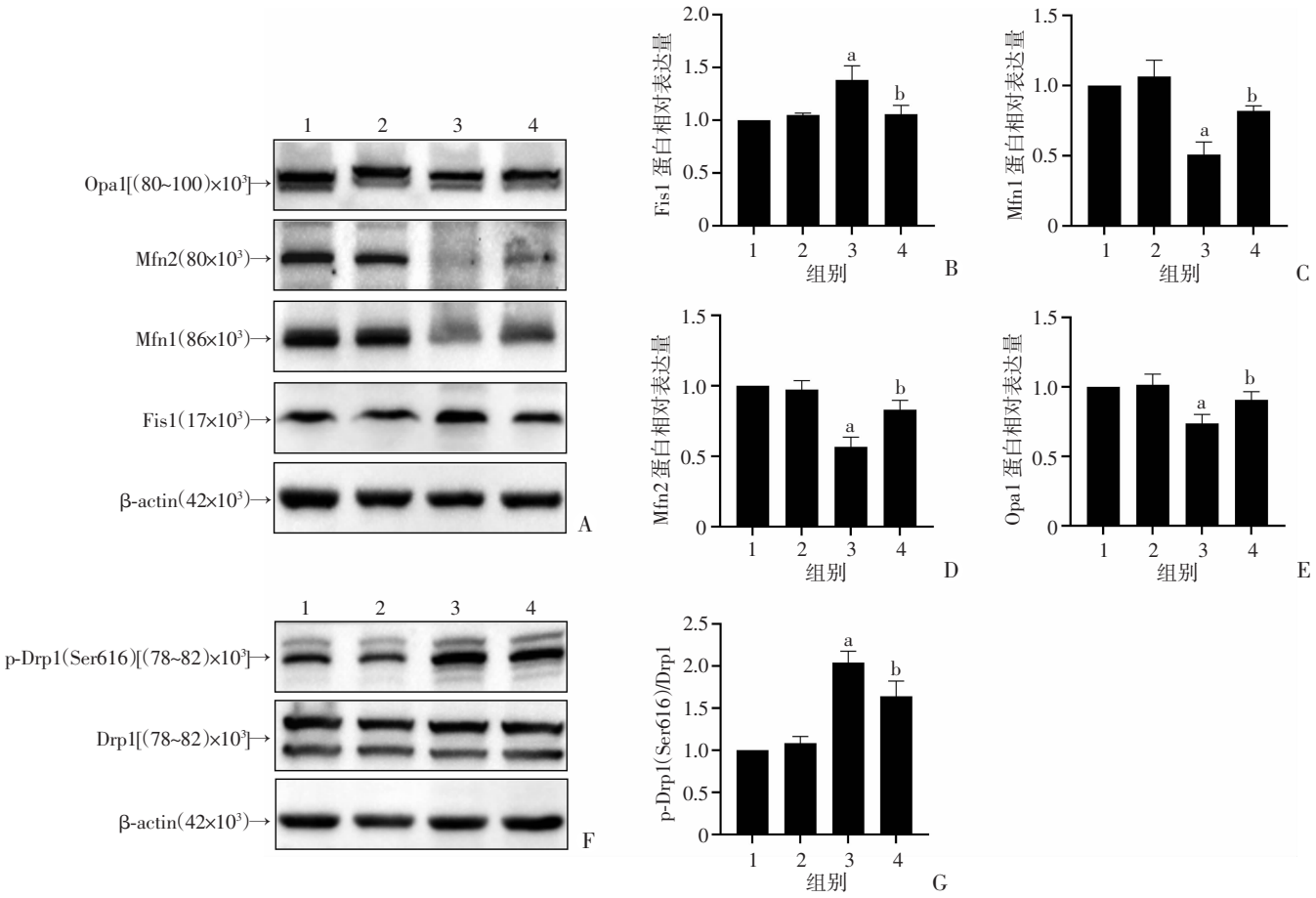
2.9 FG-4592 对小鼠脑组织 HIF-1α 和 HO-1 蛋白表达的影响

通过 Western blot 检测 HIF-1α 和 HO-1 蛋白表达情况(图 8A)。结果表明:与 Control 组比较,FG-4592 组、HS 组和 FG-4592+HS 组大脑皮层组织中 HIF-1α、HO-1 蛋白表达升高($P<0.05$,图 8B、C);与 HS 组比较,FG-4592+HS 组大脑皮层组织中 HIF-1α、HO-1 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。结果显示,HIF-1α/HO-1 信号通路可能与 FG-4592 对 HS 的保护作用有关。

3 讨论

本研究通过高温环境模拟舱模拟高热环境建立 HS 小鼠模型。所有小鼠在舱内直肠温度达到 42.7 ℃后出舱,其中 HS 组小鼠在出舱 2~3 h 出现死亡,所以选择在小鼠出舱 2 h 开始进行取材,本研究主要集中在 HS 导致的急性脑损伤的研究,所以并未对 HS 导致的长期中枢神经系统损伤进行探索。

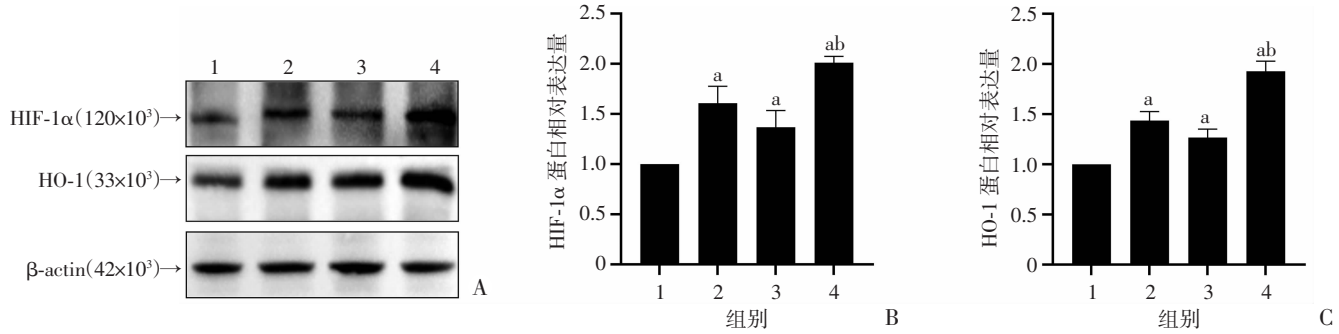
研究结果提示,FG-4592 能显著提高 HS 小鼠的 24 h 存活率。给予 FG-4592 预处理后,HS 小鼠 mNSS 评分降低,大脑皮层病理改变减轻,神经元变性减少,表明 FG-4592 对 HS 小鼠脑损伤具有一定的保护作用。



1:Control 组;2:FG-4592 组;3:HS 组;4:FG-4592+HS 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 HS 组比较

A、F:Western blot 检测结果;B~E、G:蛋白半定量分析($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

图 7 FG-4592 对小鼠脑皮层组织线粒体分裂、融合的影响



1:Control 组;2:FG-4592 组;3:HS 组;4:FG-4592+HS 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 HS 组比较

A:Western blot 检测结果;B、C:蛋白半定量分析($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

图 8 FG-4592 对小鼠脑皮层组织 HIF-1α、HO-1 蛋白表达的影响

大脑是机体能量需求最旺盛的区域之一,而作为细胞动力工厂的线粒体的正常功能的发挥对神经元的存活至关重要[19]。当线粒体损伤时,不仅会导致 ATP 水平降低,还会导致 ROS 的过度产生,氧化应激损伤增加,从而对细胞的存活和恢复产生不利影响[20]。已有大量研究表明高热应激会导致线粒体出现结构损伤的发生[21-22]。本研究电镜结果也显示大脑皮层线粒体损伤,表现为线粒体肿胀和嵴膜溶解。

线粒体在能量需求和环境刺激下,通过融合和分裂不断改变形态,调节细胞存活并协调整个细胞的应激反应[23]。线粒体分裂融合失衡会导致线粒体功能障碍,并导致各种急性和慢性疾病的发生[24]。通过 Drp1/Fis1 相互作用介导的线粒体过度断裂已被证明在多种疾病模型中诱导氧化应激[25-27]。高热应激导致 Drp1 的激活和 Opa1 的裂解,从而使线粒体分裂融合平衡转向分裂,出现线粒体过度分裂,从而导致线粒体碎片化[28]。而抑制线粒体分裂可减少高热应激引起的细胞线粒体膜电位损失和 ROS 的产生,减少氧化应激损伤[29]。

FG-4592 通过抑制 HIF 的降解来稳定和促进 HIF 的活性;*HO*-1 作为 HIF-1 的靶基因,FG-4592 同样能促进其表达[16]。研究表明,HO-1 可通过抑制 Fis1 和 Drp1 的上调,增加 Mfn1、Mfn2 和 Opa1 的表达,保持线粒体分裂融合平衡,对抗氧化应激,减少细胞凋亡,缓解重金属、缺氧和内毒素等导致的组织损伤[30-32]。本研究结果也表明,HS 导致线粒体分裂相关蛋白 Drp1 的磷酸化和 Fis1 的表达增加,融合相关蛋白 Mfn1、Mfn2 和 Opa1 的表达减少;而 FG-4592 预处理能够明显改善这一变化,即线粒体分裂相关蛋白 Drp1 的磷酸化抑制和 Fis1 的表达减少,融合相关蛋白 Mfn1、Mfn2 和 Opa1 的表达增加,而组织 MDA 水平减少,SOD 活性增加。该结果提示 HS 导致的脑损伤可能与线粒体分裂融合失衡相关,而 FG-4592 预处理可改善 HS 导致的线粒体分裂融合失衡,并减少组织氧化应激损伤。

本研究也发现,FG-4592 预处理提高了 HIF-1α、HO-1 的蛋白表达水平,这表明 HIF-1α/HO-1 在机体对抗 HS 导致的脑组织损伤中可能发挥保护作用。但值得注意的是,与 Control 组比较,HS 组 HIF-1α、HO-1 蛋白水平也出现升高。本研究认为,机体在受到高热应激后,由于体温升高,机体通过血流重分布将血液从中央循环分流到肌肉和皮肤,包括大脑在内的多个器官灌注相对减少,导致其出现相对缺血和缺氧[33],这可能导致 HIF-1α 的水平出现一过性增加,其下游靶基因 HO-1 同样被激活,减轻 HS 导致的细胞和器官损伤,发挥保护作用。但这种应激反应持续时间有限,只能发挥有限保护作用。在其他关于 FG-4592 保护作用的研究中,也同样观察到损伤模型组的 HIF-1α 和 HO-1 水平的应激性升高,而经过 FG-4592 预处理后,HIF-1α 和 HO-1 水平升高更加显著[17,34-35],这可能有利于保护作用的稳定发挥。

综上所述,FG-4592 对 HS 导致的脑组织损伤具有一定的保护作用,可减轻氧化应激损伤,减少线粒体损伤,同时调节凋亡相关蛋白,抑制细胞凋亡,其作用机制可能与调控 HIF-1α/HO-1 信号通路,抑制线粒体过度分裂与增加融合有关。

参考文献:

[1] BOUCHAMA A, ABUYASSIN B, LEHE C, *et al*. Classic and exertional heatstroke[J]. Nat Rev Dis Primers, 2022, 8(1): 8. DOI: 10.1038/s41572-021-00334-6.

[2] PERKINS-KIRKPATRICK S E, LEWIS S C. Increasing trends in regional heatwaves[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 3357. DOI: 10.1038/s41467-020-16970-7.

[3] BOBB J F, OBERMEYER Z, WANG Y, *et al*. Cause-specific risk of hospital admission related to extreme heat in older adults[J]. JAMA, 2014, 312(24): 2659-2667. DOI: 10.1001/jama.2014.15715.

[4] ARGAUD L, FERRY T, LE Q H, *et al*. Short- and long-term outcomes of heatstroke following the 2003 heat wave in Lyon, France[J]. Arch Intern Med, 2007, 167(20): 2177-2183. DOI: 10.1001/archinte.167.20.ioi70147.

[5] YUAN R, WANG L, DENG Z H, *et al*. Protective effects of mesenchymal stem cells against central nervous system injury in heat stroke[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2023, 18(3): 401-409. DOI: 10.2174/1574888x17666220511144254.

[6] CHANG C Y, CHEN J Y, CHEN S H, *et al*. Therapeutic treatment with ascorbate rescues mice from heat stroke-induced death by attenuating systemic inflammatory response and hypothalamic neuronal damage[J]. Free Radic Biol Med, 2016, 93: 84-93. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.017.

[7] WANG L, DENG Z H, ZHAO Y, *et al*. Mesenchymal stem cells regulate activation of microglia cells to improve hippocampal injury of heat stroke rats[J]. J Therm Biol, 2021, 101: 103081. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2021.103081.

[8] YU T Z, WANG L, YOON Y. Morphological Control of mitochondrial bioenergetics[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2015, 20(2): 229-246. DOI: 10.2741/4306.

[9] WESTERMANN B. Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission[J]. J Biol Chem, 2008, 283(20): 13501-13505. DOI: 10.1074/jbc.R800011200.

[10] YU T Z, PARK Y M, WANG L, *et al*. L-citrulline prevents heat-induced mitochondrial dysfunction and cell injury through nitric oxide-mediated Drp1 inhibition in mouse C2C12 myoblasts[J]. Br J Nutr, 2022: 1-24. DOI: 10.1017/S0007114522001982.

[11] DHILLON S. Roxadustat: first global approval[J]. Drugs, 2019, 79(5): 563-572. DOI: 10.1007/s40265-019-01077-1.

[12] LI X, CUI X X, CHEN Y J, *et al*. Therapeutic potential of a prolyl hydroxylase inhibitor FG-4592 for Parkinson's diseases *in vitro* and *in vivo*: regulation of redox biology and mitochondrial function[J]. Front Aging Neurosci, 2018, 10: 121. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00121.

[13] LI X, JIANG B, ZOU Y, *et al*. Roxadustat (FG-4592) facilitates recovery from renal damage by ameliorating mitochondrial dysfunction induced by folic acid[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 788977. DOI: 10.3389/fphar.2021.788977.

[14] BECK J, HENSCHEL C, CHOU J, *et al*. Evaluation of the carcinogenic potential of roxadustat (FG-4592), a small molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase in CD-1 mice and sprague dawley rats[J]. Int J Toxicol, 2017, 36(6): 427-439. DOI: 10.1177/1091581817737232.

[15] LI A X, LIU Z Z, ALI T, *et al*. Roxadustat (FG-4592) abated lipopolysaccharides-induced depressive-like symptoms *via* PI3K signaling[J]. Front Mol Neurosci, 2023, 16: 1048985. DOI: 10.3389/fnmol.2023.1048985.

[16] LONG G F, PEI Z Y, WU M, *et al*. Novel function of Roxadustat (FG-4592) as an anti-shock drug in sepsis by regulating mitochondrial oxidative stress and energy metabolism[J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2023, 1867(1): 130264. DOI: 10.1016/j.bbagen.2022.130264.

[17] GAO Y Y, JIANG X M, YANG D G, *et al*. Roxadustat, a hypoxia-inducible factor 1α activator, attenuates both long- and short-term alcohol-induced alcoholic liver disease[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 895710. DOI: 10.3389/fphar.2022.895710.

[18] XIA P L, YANG Y J, LIU R L, *et al*. FG-4592 alleviates radiation-induced intestinal injury by facilitating recovery of intestinal stem cell and reducing damage of intestinal epithelial[J]. Toxicol Lett, 2022, 357: 1-10. DOI: 10.1016/j.toxlet.2021.12.011.

[19] LI C, SUN H, XU G D, *et al*. Mito-Tempo prevents nicotine-induced exacerbation of ischemic brain damage[J]. J Appl Physiol, 2018, 125(1): 49-57. DOI: 10.1152/japplphysiol.01084.2017.

[20] APOSTOLOVA N, VICTOR V M. Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications[J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(8): 686-729. DOI: 10.1089/ars.2014.5952.

[21] ZHANG W, PENG M, YANG Y, *et al*. Protective effects of salidroside on mitochondrial functions against exertional heat stroke-induced organ damage in the rat[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 504567. DOI: 10.1155/2015/504567.

[22] FANG W, YIN B, FANG Z J, *et al*. Heat stroke-induced cerebral cortex nerve injury by mitochondrial dysfunction: a comprehensive multi-omics profiling analysis[J]. Sci Total Environ, 2024, 919: 170869. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.170869.

[23] YOULE R J, VAN DER BLIEK A M. Mitochondrial fission, fusion, and stress[J]. Science, 2012, 337(6098): 1062-1065. DOI: 10.1126/science.1219855.

[24] ARCHER S L. Mitochondrial dynamics: mitochondrial fission and fusion in human diseases[J]. N Engl J Med, 2013, 369(23): 2236-2251. DOI: 10.1056/NEJMra1215233.

[25] KORNFELD O S, QVIT N, HAILESELASSIE B, *et al*. Interaction of mitochondrial fission factor with dynamin related protein 1 governs physiological mitochondrial function *in vivo*[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 14034. DOI: 10.1038/s41598-018-32228-1.

[26] JOSHI A U, SAW N L, VOGEL H, *et al*. Inhibition of Drp1/Fis1 interaction slows progression of amyotrophic lateral sclerosis[J]. EMBO Mol Med, 2018, 10(3): e8166. DOI: 10.15252/emmm.201708166.

[27] JOSHI A U, MOCHLY-ROSEN D. Mortal engines: Mitochondrial bioenergetics and dysfunction in neurodegenerative diseases[J]. Pharmacol Res, 2018, 138: 2-15. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.08.010.

[28] SANJUÁN SZKLARZ L K, SCORRANO L. The antiapoptotic OPA1/Parl couple participates in mitochondrial adaptation to heat shock[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1817(10): 1886-1893. DOI: 10.1016/j.bbabio.2012.05.001.

[29] YU T Z, DEUSTER P, CHEN Y F. Role of dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial fission in resistance of mouse C2C12 myoblasts to heat injury[J]. J Physiol, 2016, 594(24): 7419-7433. DOI: 10.1113/JP272885.

[30] GOROJOD R M, ALAIMO A, PORTE ALCON S, *et al*. Heme Oxygenase-1 protects astroglia against manganese-induced oxidative injury by regulating mitochondrial quality Control[J]. Toxicol Lett, 2018, 295: 357-368. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.07.045.

[31] HAN Q, LI G H, IP M S, *et al*. Haemin attenuates intermittent hypoxia-induced cardiac injury *via* inhibiting mitochondrial fission[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(5): 2717-2726. DOI: 10.1111/jcmm.13560.

[32] YU J B, SHI J, WANG D, *et al*. Heme oxygenase-1/carbon monoxide-regulated mitochondrial dynamic equilibrium contributes to the attenuation of endotoxin-induced acute lung injury in rats and in lipopolysaccharide-activated macrophages[J]. Anesthesiology, 2016, 125(6): 1190-1201. DOI: 10.1097/ALN.0000000000001333.

[33] BOUCHAMA A, KNOCHEL JAMES P. Heat stroke[J], N Engl J Med, 2002, 346(25): 1978-1988. DOI: 10.1056/NEJMra011089.

[34] FUJIMAKI A, OHUCHI K, TAKIZAWA S, *et al*. The neuroprotective effects of FG-4592, a hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitor, against oxidative stress induced by alpha-synuclein in N2a cells[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 15629. DOI: 10.1038/s41598-023-42903-7.

[35] ZHANG M, DONG R, YUAN J, *et al*. Roxadustat (FG-4592) protects against ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury through inhibiting the mitochondrial damage pathway in mice[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2022, 49(2): 311-318. DOI: 10.1111/1440-1681.13601.

(收稿:2024-05-06;修回:2024-05-27)

(编辑 吴培红)