DOI:10.16016/j.2097-0927.202312135

G 蛋白偶联受体 39 在小鼠脑出血后脑损伤的作用及机制研究

张忠意,唐于广,代金雨,谢宗义 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院神经外科

［**摘要**］ **目的** 探究激活 G 蛋白偶联受体 39(G-protein-coupled receptor 39, GPR39)对小鼠脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)后神经炎症和脑损伤的影响及其作用机制。**方法** 176 只雄性 C57/BL6 小鼠按随机数字表法分成 8 组:Sham 组($n=42$)、ICH 组($n=34$)、ICH+Vehicle 组($n=32$)、ICH+TC-G 1008 组($n=44$)、ICH+GPR39 siRNA 组($n=6$)、ICH+Scramble siRNA 组($n=6$)、ICH+TC-G 1008+666-15 组($n=6$)、ICH+TC-G 1008+Vehicle 2 组($n=6$)。通过小鼠自体血建立 ICH 模型。在小鼠 ICH 建模后 1 h 和 25 h 灌胃 GPR39 特异性激动剂 TC-G 1008 治疗。在 ICH 建模前 24 h,通过侧脑室注射 GPR39 siRNA、环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)抑制剂 666-15 分别抑制内源性的 GPR39 和 p-CREB 的表达。小鼠 ICH 后 48 h,通过改良的加西亚实验、前肢置放实验、转角实验评估小鼠短期的神经功能缺陷,脑组织湿/干法测定脑含水量;免疫荧光检测血肿周围脑组织 GPR39 与神经元、小胶质细胞共定位和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3,NLRP3)在神经元中的表达情况;ELISA 检测血肿周围组织中的白介素-1β(interleukin-1β,IL-1β),肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的含量;TUNEL 检测血肿周围凋亡神经元的数量;尼氏染色评估血肿周围神经元损伤情况;Western blot 检测血肿周围脑组织中 GPR39、p-CREB、CREB、NRLP3、裂解型半胱天冬酶 1(Cleaved caspase-1,C-caspase-1)、gasdermin-D 蛋白(GSDMD)的表达。**结果** GPR39 在小鼠 ICH 后 48 h 达到表达高峰($P<0.05$),在神经元和小胶质细胞均有表达。TC-G 1008(24 mg/kg)激活 GPR39 后显著改善了小鼠 ICH 后改良的加西亚实验评分,左前肢放置成功率和左转次数增加($P<0.05$)。同侧基底节(basal ganglia, BG)和皮层(cortex,CX)的脑水肿显著减轻($P<0.05$)。血肿周围凋亡和受损的神经元数量显著减少($P<0.05$)。焦亡相关分子 NLRP3、C-caspase-1、GSDMD 的表达和炎症相关因子 IL-1β、TNF-α、MPO 的水平降低($P<0.05$)。敲低 GPR39 和下调 p-CREB 的表达显著增加了小鼠 ICH 后血肿周围脑组织焦亡相关分子的表达和炎症相关因子的含量($P<0.05$)。**结论** GPR39 激活可能部分通过 CREB 信号通路抑制小鼠 ICH 后的神经炎症和脑损伤,GPR39 可能是 ICH 后减轻神经炎症和脑损伤潜在的治疗靶点。

［**关键词**］ 脑出血;细胞焦亡;脑损伤;G 蛋白偶联受体 39
［**中图法分类号**］ R341; R363.21; R743.34 ［**文献标志码**］ A

Role and mechanisms of G-protein-coupled receptor 39 in brain injury after intracerebral hemorrhage in mice

ZHANG Zhongyi, TANG Yuguang, DAI Jinyu, XIE Zongyi Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

［**Abstract**］ **Objective** To investigate the effect and underlying mechanisms of G-protein-coupled receptor 39 (GPR39) activation on neuroinflammation and brain injury after experimental intracerebral hemorrhage in mice. **Methods** Mouse model of intracerebral hemorrhage (ICH) was established by intracerebral injection of autologous blood. A total of 176 male C57/BL6 mice were randomly divided into 8 groups: Sham group ($n=42$), ICH group ($n=34$), ICH+Vehicle group ($n=32$), ICH+TC-G 1008 group

［**基金项目**］ 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0107)
［**通信作者**］ 谢宗义, E-mail: zyxie2008@cqmu.edu.cn

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/)

(n=44), ICH+GPR39 siRNA group (n=6), ICH+Scramble siRNA group (n=6), ICH+TC-G 1008+666-15 group (n=6), and ICH+TC-G 1008+Vehicle 2 group (n=6). GPR39-specific agonist TC-G 1008 was administered *via* oral gavage at 1 and 25 h post-ICH modeling. Additionally, GPR39 siRNA and cAMP response element binding protein (CREB) inhibitor 666-15 were intracerebroventricularly injected 24 h before induction of ICH to inhibit the expression levels of GPR39 and p-CREB. At 48 h after ICH, modified Garcia test, forelimb placement test and corner turn test were used to evaluate the short-term neurological deficits in mice. Brain water content was determined by wet/dry method. Immunofluorescence assay was performed to detect the co-localization of GPR39 in neurons and microglia in the brain tissue surrounding the hematoma, as well as the expression of NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) in neurons. ELISA was employed to measure IL-1β, TNF-α and myeloperoxidase (MPO) levels in peri-hematoma tissue. TUNEL staining was performed to quantify apoptotic neurons around the hematoma. Nissl staining was utilized to evaluate neuronal damage. Western blotting was conducted to detect the expression of GPR39, p-CREB, CREB, NLRP3, Cleaved caspase-1 (C-caspase-1), and gasdermin-D protein (GSDMD) in peri-hematoma brain tissue. **Results** GPR39 expression peaked at 48 h post-ICH in mice (P<0.05), and it was expressed in both neurons and microglia. Activation of GPR39 by TC-G 1008 (24 mg/kg) significantly improved the modified Garcia score, and increased success rate of left forelimb placement and the number of left turns (P<0.05). Brain edema in the ipsilateral basal ganglia (BG) and cortex (CX) was significantly reduced (P<0.05). The numbers of apoptotic and damaged neurons around the hematoma were obviously decreased (P<0.05). The expression of pyroptosis-related molecules, including NLRP3, C-caspase-1 and GSDMD and the levels of inflammation-related factors, including IL-1β, TNF-α and MPO were notably decreased (P<0.05). However, knockdown of GPR39 and downregulation of p-CREB expression significantly increased the expression of pyroptosis related molecules and inflammatory-related factors in peri-hematoma brain tissue post-ICH in mice (P<0.05). **Conclusion** GPR39 activation may inhibit neuroinflammation and brain injury after ICH in mice partly through the CREB signaling pathway. Therefore, GPR39 may be a potential therapeutic target for mitigating neuroinflammation and brain damage after ICH.

[**Key words**] intracerebral hemorrhage; pyroptosis; brain injury; G-protein-coupled receptor 39

Supported by the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSX0107). Corresponding author: XIE Zongyi, E-mail: zyxie2008@cqmu.edu.cn

脑出血(intracerebral hemorrhage,ICH)的预后差与血肿形成后的继发性脑损伤(secondary brain injury,SBI)密切相关[1]。SBI 的病理生理机制包括氧化应激、细胞凋亡、铁死亡、线粒体功能障碍和神经炎症等,然而目前 SBI 的发病机制尚未完全阐明[2]。神经炎症作为 ICH 后 SBI 病理生理学的主要因素之一,介导了 ICH 后继发性的神经元死亡。焦亡是一种由炎症小体介导的新型程序性细胞死亡,其特点是质膜快速破裂和胞内物质的释放,其中炎性物质的释放可进一步促进 ICH 后过度的神经炎症反应[3-4]。因此,抑制神经元焦亡从而减少炎性物质释放可能是减轻 ICH 后的神经炎症和脑损伤的治疗靶点。

G 蛋白偶联受体 39(G protein-coupled receptor39,GPR39)是细胞膜上 G 蛋白偶联受体家族的成员之一[5]。研究表明 GPR39 可以调节大量的生理功能,如细胞的增殖和分化、细胞连接和离子的转运等[6]。最近,越来越多的体外证据表明,激活 GPR39 通过减少促炎细胞因子白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)的表达、增强抗炎细胞因子白介素-10(interleukin-10, IL-10)的产生发挥抗炎活性。在中枢神经系统中,GPR39 被证实在维持神经系统、神经精神和神经血管生理稳态中都发挥着重要的作用,并展现出其作为相关疾病治疗靶点的潜力[7-9]。体外的细胞实验证明,激活 GPR39 可以减轻由皮质酮引起的神经元细胞损伤[10]。在体内大鼠模型的研究中,激活 GPR39 可通过抑制因缺血缺氧脑病导致的神经炎症,从而改善新生大鼠的神经功能和脑损伤[11]。然而,激活 GPR39 在 ICH 后脑损伤是否具有神经保护作用,目前仍然不清楚。

研究表明 GPR39 激活后可引起磷酸化的环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein,CREB)表达增加[12]。在小鼠 ICH 模型中,通过激活 CREB 信号通路可抑制氧化应激和改善神经炎症从而提供神经保护[13]。最近的研究表明 CREB 激活可以调节 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3

(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3,NLRP3)的表达,从而起到抗炎作用[14]。

本研究假设激活 GPR39 可能部分通过 CREB 信号通路抑制神经元焦亡引起的神经炎症。通过自体血注射法建立小鼠 ICH 模型,探索激活 GPR39 后可能的神经保护作用及其相关机制,旨在为 ICH 后改善 SBI 寻找新的临床治疗方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

176 只雄性 C57/BL6 小鼠(SPF 级,年龄 6~8 周,体质量 20~25 g)从重庆医科大学动物实验中心购买[生产许可证:SCXK(渝)2022-0010,使用许可证:SYXK(渝)2022-0016]。将小鼠置于温度为(22±1)℃和周期为 12 h 自然光和暗光的受控环境中,在生活区内可以不受限制地获得新鲜食物和干净的水。动物实验经重庆医科大学动物伦理委员会审核通过(IACUG-CQMU-2022-0015)。所有的操作过程和处死方案遵循国际通用实验动物使用指南。小鼠按随机数字表法分成 8 组:Sham 组(n=42)、ICH 组(12 h、24 h、48 h、72 h、7 d,n=34)、ICH+Vehicle 组(n=32)、ICH+TC-G 1008 组(n=44)、ICH+GPR39 siRNA 组(n=6)、ICH+Scramble siRNA 组(n=6)、ICH+TC-G 1008+666-15 组(n=6)、ICH+TC-G 1008+Vehicle 2 组(n=6)。GPR39 抗体购自中国博奥森公司,抗神经元细胞核(NeuN)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,抗离子钙接头分子-1(Iba1)抗体购自中国艾方生物公司,p-CREB 抗体、C-caspase-1 和 NLRP3 抗体购自美国 Abcam 公司,CREB 抗体、gasdermin-D 蛋白(GSDMD)抗体和 β-actin 抗体购自中国武汉三鹰公司,抗鼠或抗兔二抗购自中国爱博泰克公司。ELISA 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司,TUNEL 凋亡和尼氏染色试剂盒购自中国塞维尔生物。蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒等购自中国碧云天生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脑出血模型的建立 小鼠经腹腔注射 1%戊巴比妥(50 mg/kg)深度麻醉后,俯卧位固定于立体定位仪框架内,在前囟右侧距离颅骨中线 2 mm 处,使用直径 1 mm 的钻头钻 1 个小孔。从小鼠尾部抽取 30 mL 尾静脉血,然后将未抗凝的血液通过微量注射器缓慢注射至小鼠右侧基底节,其立体定位坐标为:前囟前方 0.2 mm,前囟右侧 2.3 mm,颅骨腹侧 3.5 mm。在目标位置上方 0.7 mm 处先注射 5 mL 血液并保持微量注射器在原位 5 min,将剩余的 25 mL 血液输送到 3.5 mm 深度。注射后固定针头 10 min,接着以 1 mm/min 的速度缓慢退出针头。最后用骨蜡覆盖钻孔,缝皮后消毒。ICH 组小鼠都进行了脑出血模型的建立,其中 Sham 组小鼠在相同位置注射等体积的无菌生理盐水。

1.2.2 侧脑室注射 小鼠深度麻醉后固定于立体定位仪,去除毛发消毒后沿中线做纵向切口,在前囟右侧距离颅骨右侧 1 mm 处,钻 1 个小孔以方便针头穿过,并在 2.5 mm 深度将药物注射到侧脑室。将 GPR39 siRNA(GenePharma,上海,正义链 5′-GCGCUA-CAUUGCCAUUUGUTT-3′,反义链 5′-ACAAAUGGCA-AUGUAGCGCTT-3′)或 Scramble siRNA(GenePharma,上海,正义链 5′-UUCUCCGAACGUACGUTT-3′,反义链 5′-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3′)或 CREB 抑制剂 666-15(MCE,美国)按照制造商的说明溶解在无菌无核酸水中。使用微型注射器将 GPR39 siRNA 或 Scramble siRNA(100 pmol/2 μL)或 666-15(10 mg/kg)的混合物注入侧脑室。注射完毕后,将针头保持在原位 5 min 后,再缓慢拔出针头。最后用骨蜡封住颅骨针刺口,缝合切口并消毒。在手术干预和术后恢复期间全程用加热垫保持合适的温度以保持小鼠体温。其中 ICH+GPR39 siRNA 组(n=6)、ICH+Scramble siRNA 组(n=6)、ICH+TC-G 1008+666-15 组(n=6)、ICH+TC-G 1008+Vehicle 2(n=6)组都进行了对应药物或对照载体的侧脑室注射操作。

1.2.3 TC-G 1008 灌胃 在小鼠 ICH 建模后 1 h 和 25 h 根据小鼠体质量给予 3 种不同剂量的 TC-G 1008(8、24、72 mg/kg)灌胃。轻柔的抓住小鼠,使其头、颈和身体呈一直线,将溶解充分的 TC-G 1008 混合液灌胃。灌胃过程中控制好速度,以减少小鼠的不适感,灌胃完成后,仔细观察小鼠反应。其中 ICH+Vehicle 组和 ICH+TC-G 1008 组所有的小鼠进行了药物或对照载体溶剂灌胃治疗。

1.2.4 神经行为功能评估 神经行为功能评估包括改良的加西亚实验、前肢置放实验和转角实验三部分。改良的加西亚实验评分由 7 个独立的子测试组成,包括自由运动(0~3 分)、轴向感觉(1~3 分)、爪接触反应(1~3 分)、侧向转身(0~3 分)、前肢伸展(0~3 分)、肢体对称性运动(0~3 分)和攀爬能力(1~3 分),共 21 分,评分越低表明神经损伤越严重。前肢置放实验是由实验人员轻柔地抬起小鼠的身体,让它的前肢摇摆,让小鼠左侧触须擦拭台面的边缘,统计 10 次实验后小鼠左前肢成功放在台面的次数,每次实验间隔 1 min,成功次数越低表明神经损伤越严重。转角实验是将小鼠被放在 1 个 30°的角落,小鼠可自由地向右转或向左转离开拐角。进行 10 次实验,2 次实验之间至少间隔 30 s。计算出 10 次转向中小鼠左转次数的百分比,小鼠左转的次数比例越高表明神经功

能损伤恢复越好。测试均由对本实验不知情的实验员测试并记录。其中 Sham 组(n=12)、ICH+Vehicle 组(n=6)、ICH+TC-G 1008(8 mg/kg)组(n=6)、ICH+TC-G 1008(24 mg/kg)组(n=6)、ICH+TC-G 1008(72 mg/kg)组(n=6)、ICH+TC-G 1008 组(n=6)、ICH+TC-G 1008+666-15 组(n=6)、ICH+TC-G 1008+Vehicle 2 组(n=6)小鼠进行了神经行为评估。

1.2.5 脑水含量测定 小鼠经深度麻醉后立即予以处死,完整的取出脑组织。脑组织被迅速分为 5 个部分:同侧(ipsilateral)和对侧(contralateral)的基底节(basal ganglia, BG)组织、同侧和对侧的皮层(cortex, CX)组织、小脑(cerebellum)组织,其中小脑组织作为内部对照。使用电子分析天平称量每个部分湿质量(wet weight, WW),在 100 ℃下干燥 72 h 以获得干质量(dry weight, DW)。脑含水量=[(WW-DW)/WW]×100%。其中 Sham 组(n=6)、ICH+Vehicle 组(n=6)、ICH+TC-G 1008(8 mg/kg)组(n=6)、ICH+TC-G 1008(24 mg/kg)组(n=6)、ICH+TC-G 1008(72 mg/kg)组(n=6)进行了脑水含量测定。

1.2.6 脑切片的制备 小鼠深度麻醉后,通过心尖灌注 4 ℃预冷的 20 mL 磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L,pH=7.4)置换出体内的血液,快速收集整个大脑,然后在 4%的多聚甲醛中于 4 ℃固定 24 h。分别在 10%、20%、30%的蔗糖溶液中脱水后经 OCT 化合物包埋。在-25 ℃的低温恒温切片机将脑组织切成厚度为 10 μm 的冠状切片,用于进行后续免疫荧光、TUNEL 染色和尼氏染色实验。

1.2.7 免疫荧光染色 将经脱蜡、抗原修复、破膜后的脑组织切片用 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次后,每次 10 min。然后与一抗 4 ℃孵育过夜:抗离子钙接头分子-1(Iba1, 1∶100)、抗神经元细胞核(NeuN, 1∶200)、GPR39(1∶250)、NLRP3(1∶250),随后与荧光二抗抗鼠或抗兔(1∶250,Abbkine,中国)在 37 ℃孵育 1 h,最后用 DAPI 染色 10 min 后封片。封片后用荧光显微镜(U-HGLGPS, OLYMPUS,日本)观察并拍照。其中 Sham 组(n=8)、ICH-24h 组(n=4)、ICH+Vehicle 组(n=4)和 ICH+TC-G 1008(n=4)组小鼠脑切片进行了免疫荧光染色。

1.2.8 ELISA 检测炎性相关因子 将小鼠麻醉后立即处死,获得完整的小鼠的脑组织,取出血肿周围(0.5~2.0 mm)脑组织加入含有蛋白酶抑制剂的裂解液并匀浆,匀浆充分后的混合液在 4 ℃超速离心机(10 000×g)离心 10 min,取上清液进行测定。最后根据试剂商提供的 ELISA 试剂盒说明书分别在各自的不同波长处测量所得上清液中白介素-1β(IL-1β),肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-α,TNF-α)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)的 OD 值,记录标准品、对照品的平均 OD 值,然后将数据生成标准曲线,最后带入各个样品孔的平均 OD 值后计算出对应的数值。其中 Sham 组(n=12)、ICH+Vehicle 组(n=12)、ICH+TC-G 1008 组(n=12)、ICH+GPR39 siRNA 组(n=6)和 ICH+Scramble siRNA 组(n=6)小鼠脑组织进行了 IL-1β、TNF-α 和 MPO 检测。

1.2.9 TUNEL 染色 使用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒检测神经元的凋亡情况。脑切片按先前概述的方法制备和脱蜡处理后用按免疫荧光处理方法,切片在 4 ℃与小鼠抗 NeuN 抗体(1∶100)孵育 12 h,然后用蛋白酶 K 溶液(20 mg/mL)在 37 ℃下处理切片 20 min。处理后的切片用 PBS 洗涤 3 次,每次 10 min,洗涤后将脑切片与 TUNEL 溶液(含 TdT 酶溶液)在 37 ℃黑暗环境中孵育 30 min。孵育用 PBS 洗涤 3 次后与 Alexa Fluor-594 (1∶500)标记的二抗在 37 ℃下孵育 1 h,用 DAPI 染色液以显示细胞核。最后封片后在荧光显微镜观察。其中 Sham 组(n=4)、ICH+Vehicle 组(n=4)、ICH+TC-G 1008(n=4)组小鼠脑切片进行了 TUNEL 染色检测。

1.2.10 尼氏染色 尼氏染色用于观察血肿周围神经元细胞的形态特征和细胞密度。石蜡切片经过脱蜡和再水化后,脑切片在甲苯胺蓝溶液(塞维尔生物)中染色 40 min,温度 50~60 ℃。切片在梯度酒精下脱水,用二甲苯澄清,用中性树脂封片。最后在显微镜下观察血肿周围存活神经元结构和形态并计数。其中 Sham 组(n=4)、ICH+Vehicle 组(n=4)、ICH+TC-G 1008(n=4)组小鼠脑切片进行了尼氏染色检测。

1.2.11 Western blot 分析 小鼠深度麻醉后断头取脑组织(靠近血肿周围组织 0.5~2.0 mm),使用 RIPA 裂解缓冲液制备蛋白样本。然后将等量 30 μg 的脑组织提取蛋白标本装载到 8%浓度的 SDS-PAG 凝胶上并进行电泳。电泳完成后将载装蛋白的凝胶转移到 PVDF 膜上,250 mA 恒定电流转膜,转膜后室温封闭膜 1 h,封闭完成后的 PVDF 膜在 4 ℃与对应的蛋白一抗稀释液孵育 12 h。孵育后的条带用 TBST 清洗 3 次,每次 10 min,随后将条带在 37 ℃与对应的二抗(抗兔或抗鼠)室温继续孵育 1 h。最后用 ECL 显影液在曝光分析仪下成像并保留图片。采集的图片采用 Image J 软件分析得出灰度值并记录。其中 Sham 组(n=18)、ICH 组(n=30)、ICH+Vehicle 组(n=12)、ICH+TC-G 1008 组(n=6)、ICH+GPR39 siRNA 组(n=6)、ICH+Scramble siRNA 组(n=6)、ICH+TC-G 1008+666-15 组(n=6)、ICH+TC-G 1008+Vehicle 2 组(n=6)小鼠脑组织进行了 Western blot 检测。

1.3 统计学分析

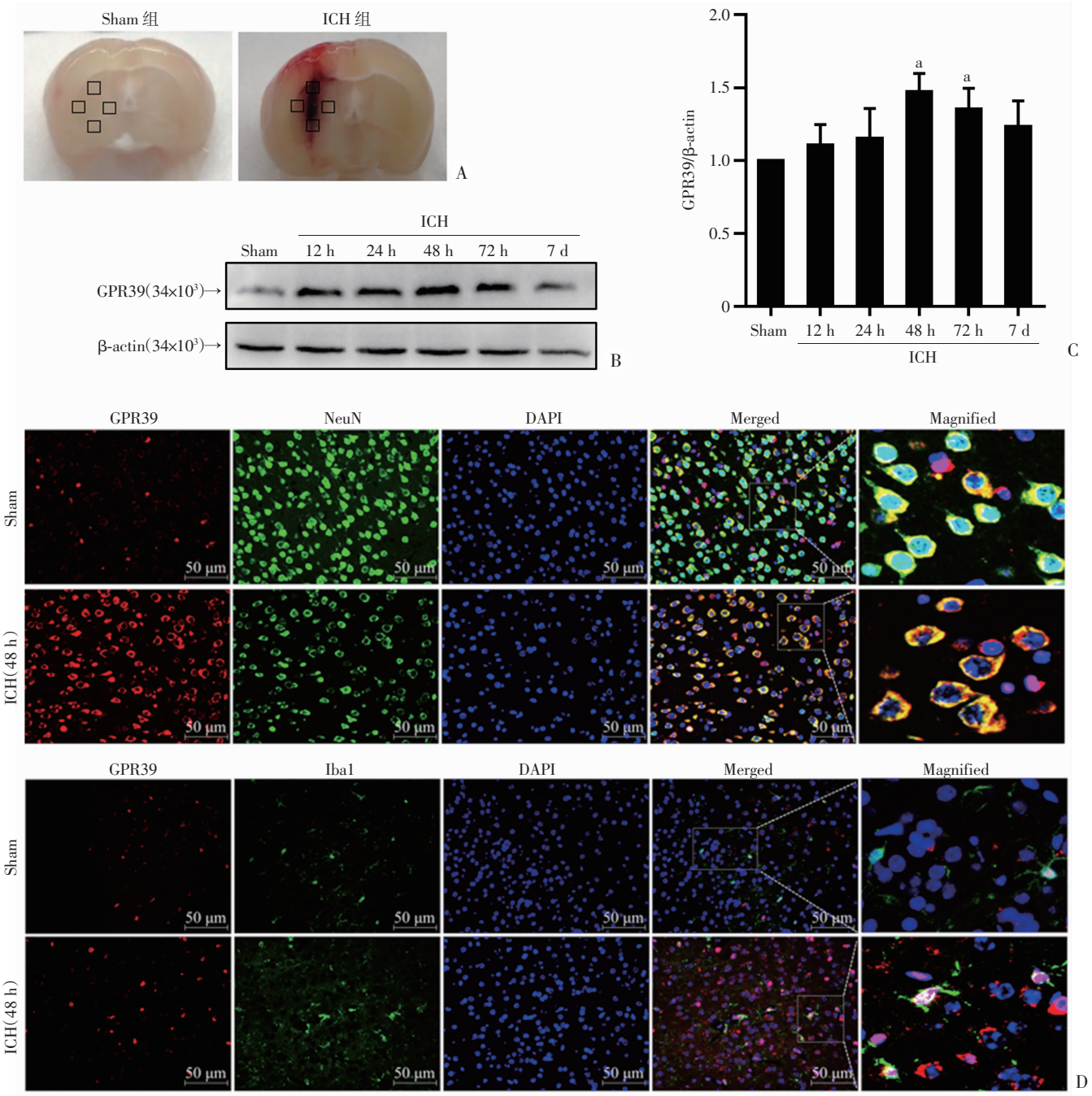
采用 GraphPad Prism 9 进行数据的统计分析,数据用 $\bar{x}\pm se$ 表示。2 组之间采用 Tukey's 检验,多组间

统计采用单因素方差分析。$P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICH 后血肿周围组织的内源性 GPR39 表达增加

小鼠 ICH 后,按不同时间点取血肿周围组织,采用 Western blot 和免疫荧光检测内源性的 GPR39 的表达(图 1A)。Western blot 结果显示,与 Sham 组相比,GPR39 在小鼠 ICH 后 48 h 达到表达高峰($P<0.05$,图 1B、C)。双标免疫荧光结果表明,GPR39 在神经元和小胶质细胞中均有表达,与 Sham 组相比,ICH 后 48 h GPR39 的表达增加(图 1D)。



A:脑组织标本取样范围示意图;B、C: Western blot 检测 ICH 后各个时间点血肿周围组织中 GPR39 的表达及 GPR39 定量分析($n=6,\bar{x}\pm se$) a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;D:双标免疫荧光染色观察脑出血后 48 h GPR39 后神经元(NeuN)和小胶质细胞(Iba1)在血肿周围组织中的表达和细胞定位

图 1 小鼠 ICH 后血肿周围组织中 GPR39 的表达及细胞定位

2.2 TC-G 1008 激活 GPR39 改善小鼠 ICH 后短期神经功能缺陷和脑水肿

与 Sham 组相比,短期神经功能测试(改良的加西亚实验、前肢置放实验和转角实验)结果表明,在 ICH 后 48 h,小鼠出现严重的神经功能缺陷,相较于低剂量 ICH+TC-G 1008(8 mg/kg)组和高剂量 ICH+TC-G 1008(72 mg/kg)组,中等剂量组 ICH+TC-G 1008(24 mg/kg)组激活 GPR39 后显著改善了小鼠 ICH 后改良的加西亚实验评分、左前肢放置成功率和左转次数增加($P<0.05$,图 2A~C)。与 ICH+Vehicle 组相比,TC-G 1008(24 mg/kg)组小鼠同侧基底节和皮层的脑水肿显著减轻($P<0.05$,图 2D)。根据以上实验结果,后续实验选择 24 mg/kg 为 TC-G 1008 的最佳治疗剂量,并选择 ICH 后 48 h 作为实验终止时间点。

2.3 TC-G 1008 激活 GPR39 降低 ICH 后相关炎性因子的表达

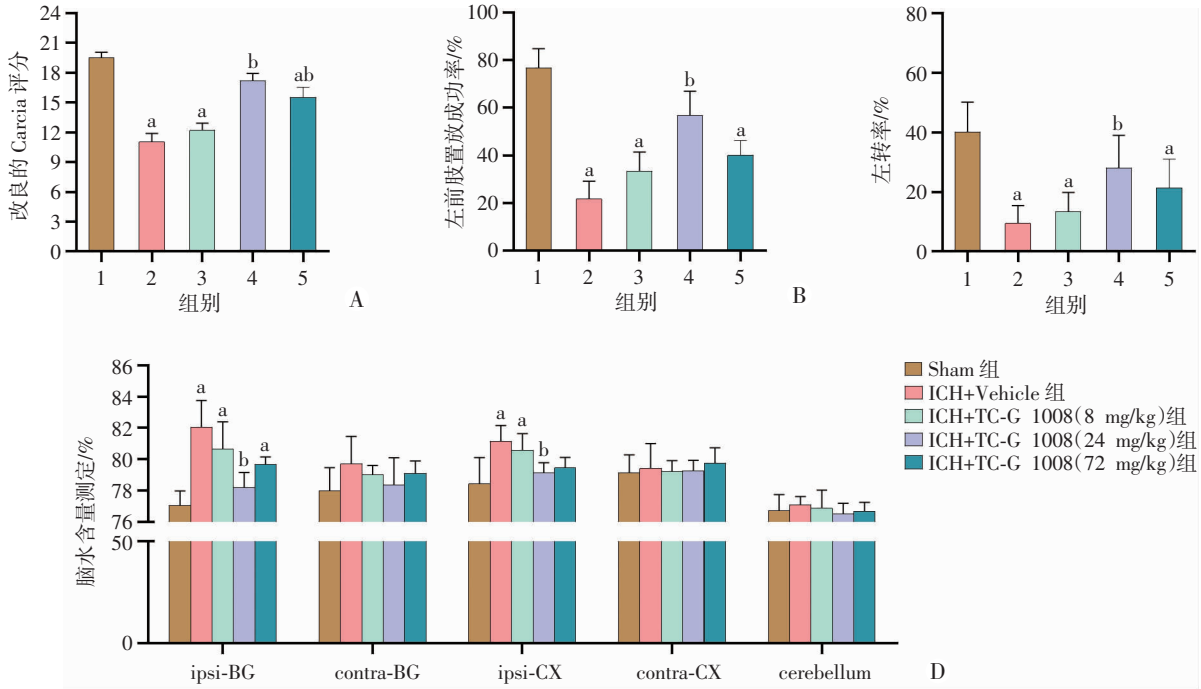
ELISA 结果表明,小鼠 ICH 后 48 h,与 Sham 组相比,ICH+Vehicle 组在 ICH 后 48 h 促炎相关因子 IL-1β、TNF-α 和 MPO 的水平显著升高。同 ICH+Vehicle 组相比,ICH+TC-G 1008 组中 IL-1β、TNF-α 和 MPO 的水平显著降低($P<0.05$,图 3A~C)。免疫荧光结果表明,同 Sham 组相比,ICH+Vehicle 组神经元中 NLRP3 炎症小体的表达明显升高,与 ICH+Vehicle 组相比,ICH+TC-G 1008 组神经元中 NLRP3 炎症小体的表达显著减少($P<0.05$,图 3D、E)。

2.4 TC-G 1008 激活 GPR39 减少 ICH 后血肿周围神经元的损伤

TUNEL 染色结果表明,小鼠 ICH 后 48 h,ICH+Vehicle 组小鼠脑组织血肿周围凋亡的神经元数量相较于 Sham 组显著升高,TC-G 1008 治疗后血肿周围的神经元凋亡的数量显著减少($P<0.05$,图 4A、B)。尼氏染色结果显示,ICH 后血肿周围的正常形态的存活的神经元数量减少,与 ICH+Vehicle 组相比,经 TC-G 1008 治疗后,血肿周围神经元细胞轮廓更清晰,存活的神经元数量增多($P<0.05$,图 4C、D)。

2.5 敲低 GPR39 对 ICH 后细胞焦亡相关分子表达和促炎相关因子影响

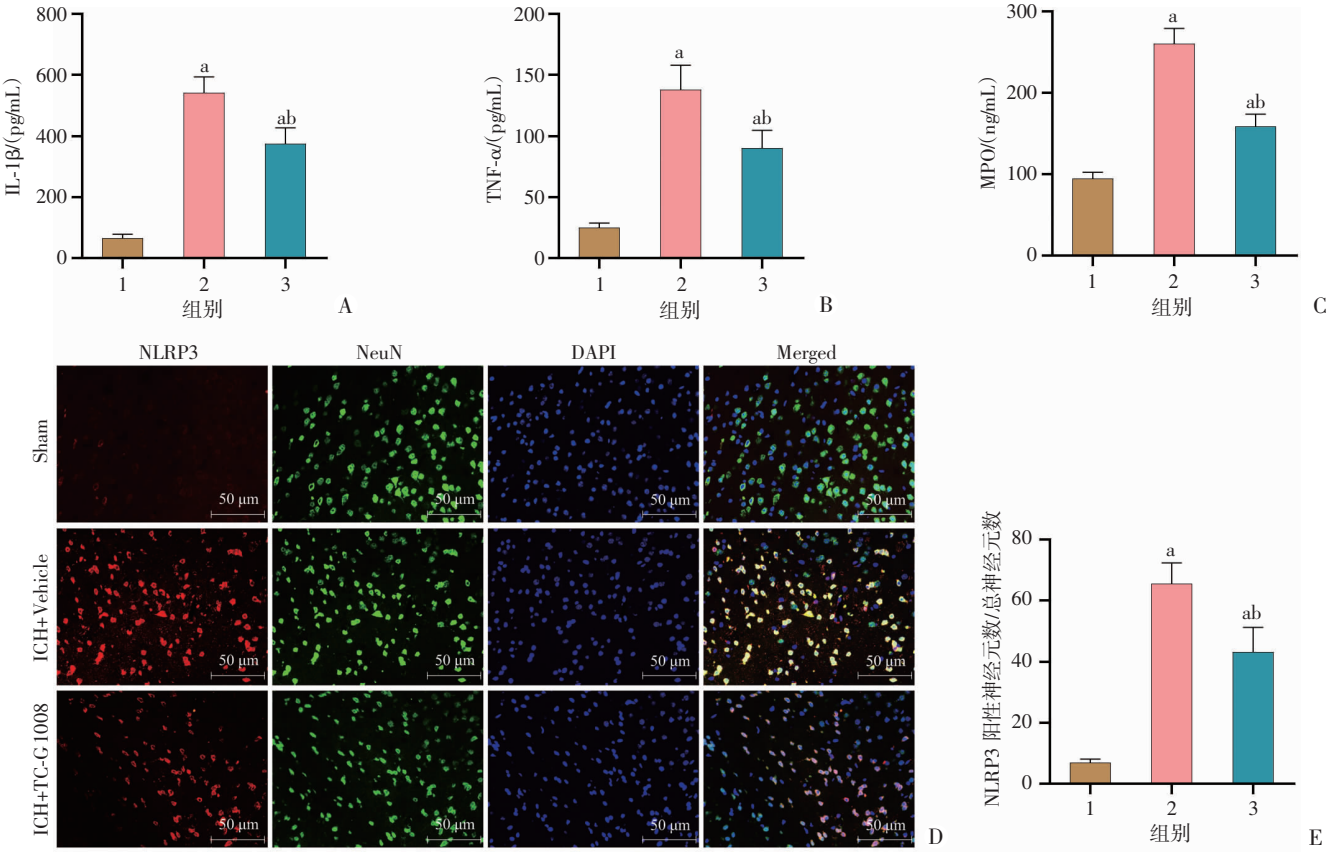
为了验证 GPR39 对焦亡相关分子的影响,在 ICH 建模前 24 h 经侧脑室注射 GPR39 siRNA 以抑制内源性 GPR39 的表达。Western blot 和 ELISA 检测结果表明,与 ICH+Vehicle 组相比,ICH+TC-G 1008 组中焦亡相关分子 NLRP3、C-caspase-1 和 GSDMD 的表达和促炎相关因子 IL-1β、TNF-α 和 MPO 的水平降低。然而,ICH+GPR39 siRNA 组与 ICH+Scramble siRNA 组相比,敲低 GPR39 后焦亡相关分子的表达和促炎相关因子的水平部分增加($P<0.05$,图 5)。



1:Sham 组;2:ICH+Vehicle 组;3:ICH+TC-G 1008(8 mg/kg)组;4:ICH+TC-G 1008(24 mg/kg)组;5:ICH+TC-G 1008(72 mg/kg)组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 ICH+Vehicle 组比较

A:各组小鼠改良 Garcia 评分;B:各组小鼠前肢置放实验;C:各组小鼠转角实验;D:各组小鼠不同部位的脑水含量

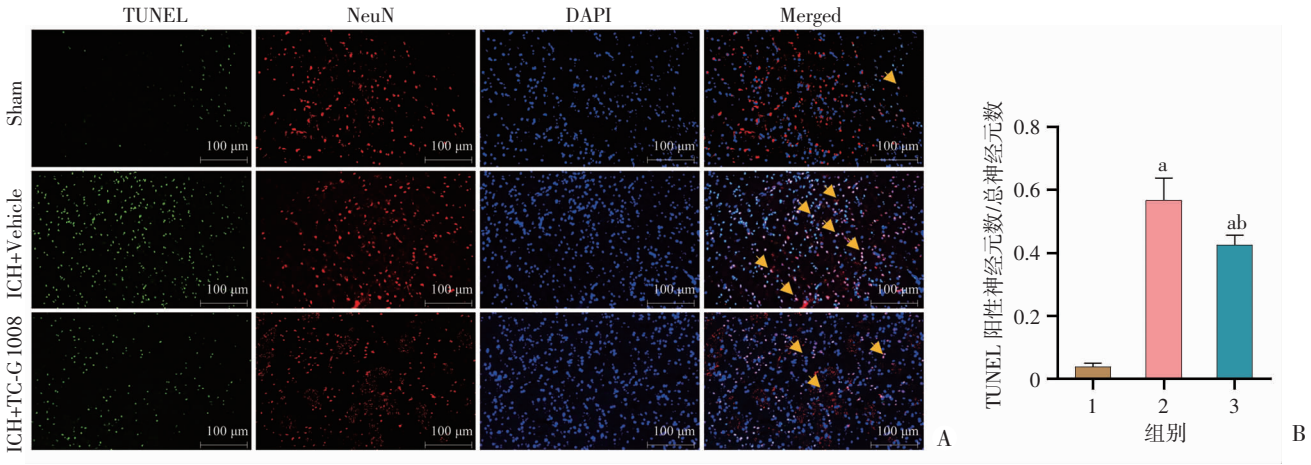
图 2 TC-G 1008 治疗 ICH 后 48 h 各组小鼠神经功能和脑水含量($n=6$,$\bar{x}\pm se$)



1:Sham 组;2:ICH+Vehicle 组;3:ICH+TC-G 1008 组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 ICH+Vehicle 组比较

A~C:小鼠 ICH 后 48 h 各组 IL-1β、TNF-α 和 MPO 的含量($n=6$,$\bar{x}\pm se$);D、E:免疫荧光观察 NLRP3 在各组的表达及半定量分析($n=4$,$\bar{x}\pm se$)

图 3 TC-G 1008 激活 GPR39 对小鼠 ICH 后血肿周围组织炎性因子的影响

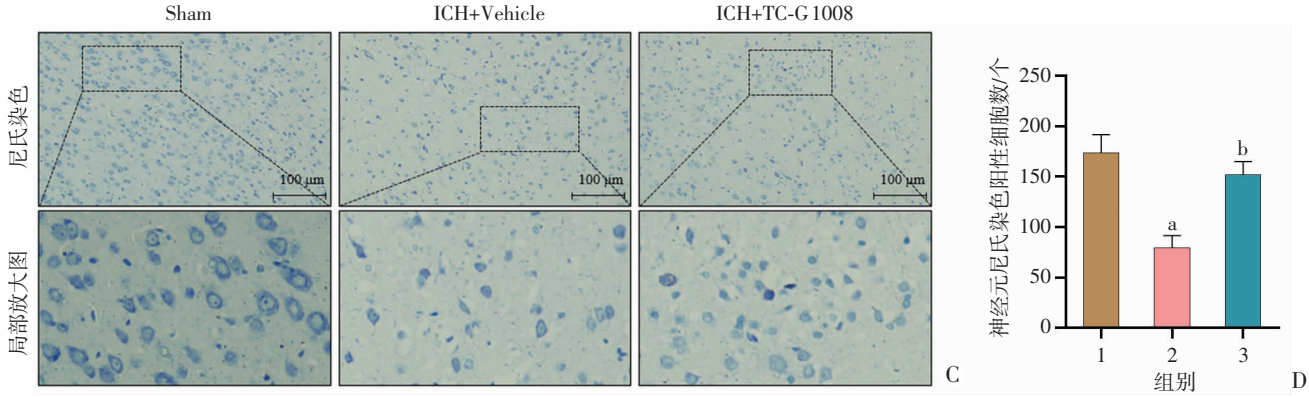


1:Sham 组;2:ICH+Vehicle 组;3:ICH+TC-G 1008 组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 ICH+Vehicle 组比较

A:ICH 后 48 h 各组 TUNEL 染色;B:TUNEL 阳性神经元数量与总神经元数量比值($n=4$,$\bar{x}\pm se$)

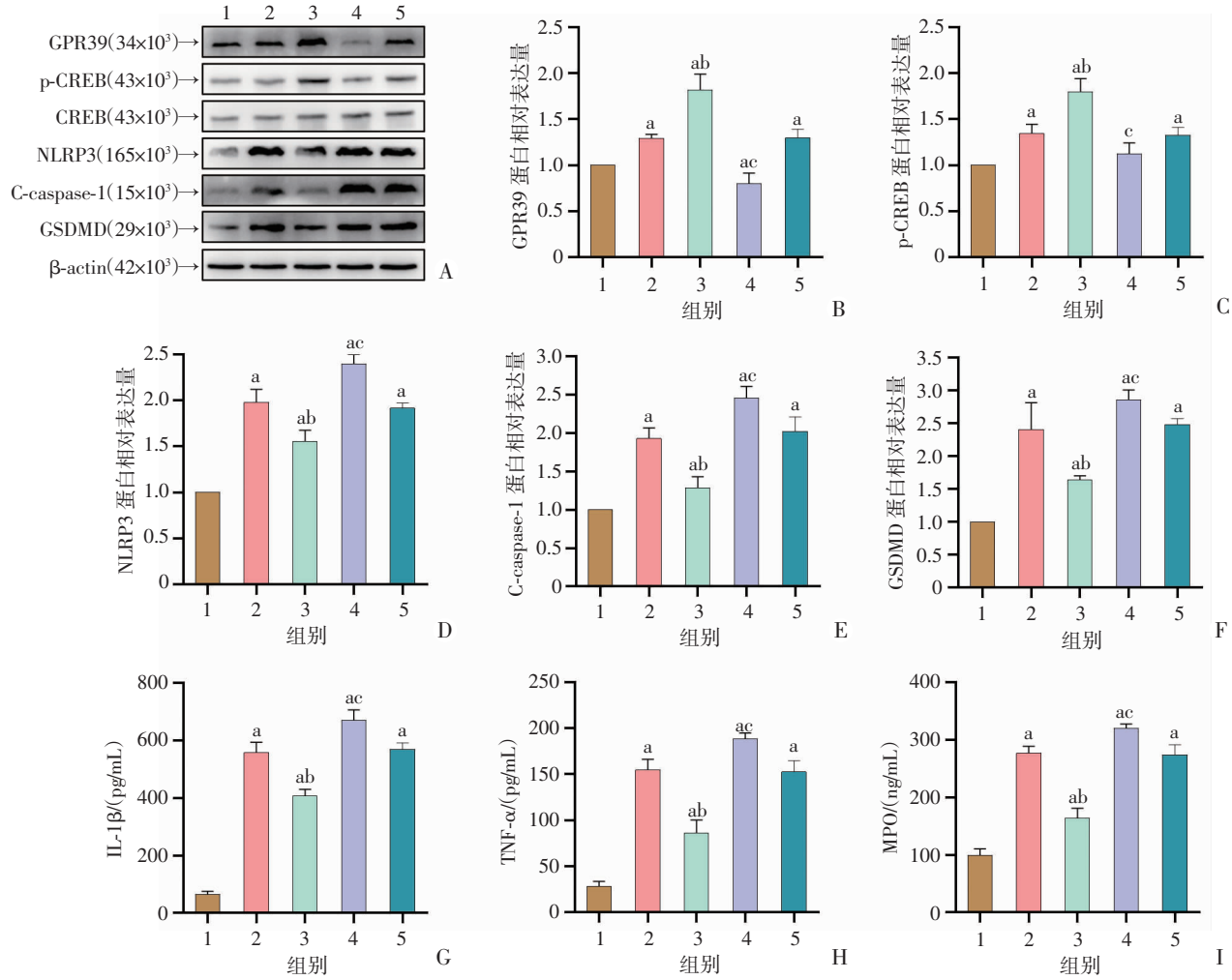
图 4 TC-G 1008 激活 GPR39 对 ICH 后血肿周围神经元损伤的影响

(图 C、D 续下页)



1:Sham 组;2:ICH+Vehicle 组;3:ICH+TC-G 1008 组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 ICH+Vehicle 组比较
C:ICH 后 48 h 各组尼氏染色;D:神经元尼氏染色阳性细胞数目($n=4$,$\bar{x}\pm se$)

续图 4 TC-G 1008 激活 GPR39 对 ICH 后血肿周围神经元损伤的影响



1:Sham 组;2:ICH+Vehicle 组;3:ICH+TC-G 1008 组;4:ICH+GPR39 siRNA 组;5:ICH+Scramble siRNA 组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 ICH+Vehicle 组比较;c:$P<0.05$,与 ICH+Scramble siRNA 组比较
A~F:Western blot 检测 GPR39、p-CREB、NLRP3、C-caspase-1、GSDMD 的蛋白表达及半定量分析;G~I:ICH 后 48 h 各组 IL-1β、TNF-α 和 MPO 的含量

图 5 敲低 GPR39 对 ICH 后血肿周围脑组织细胞焦亡相关分子和炎症相关因子的影响($n=6$,$\bar{x}\pm se$)

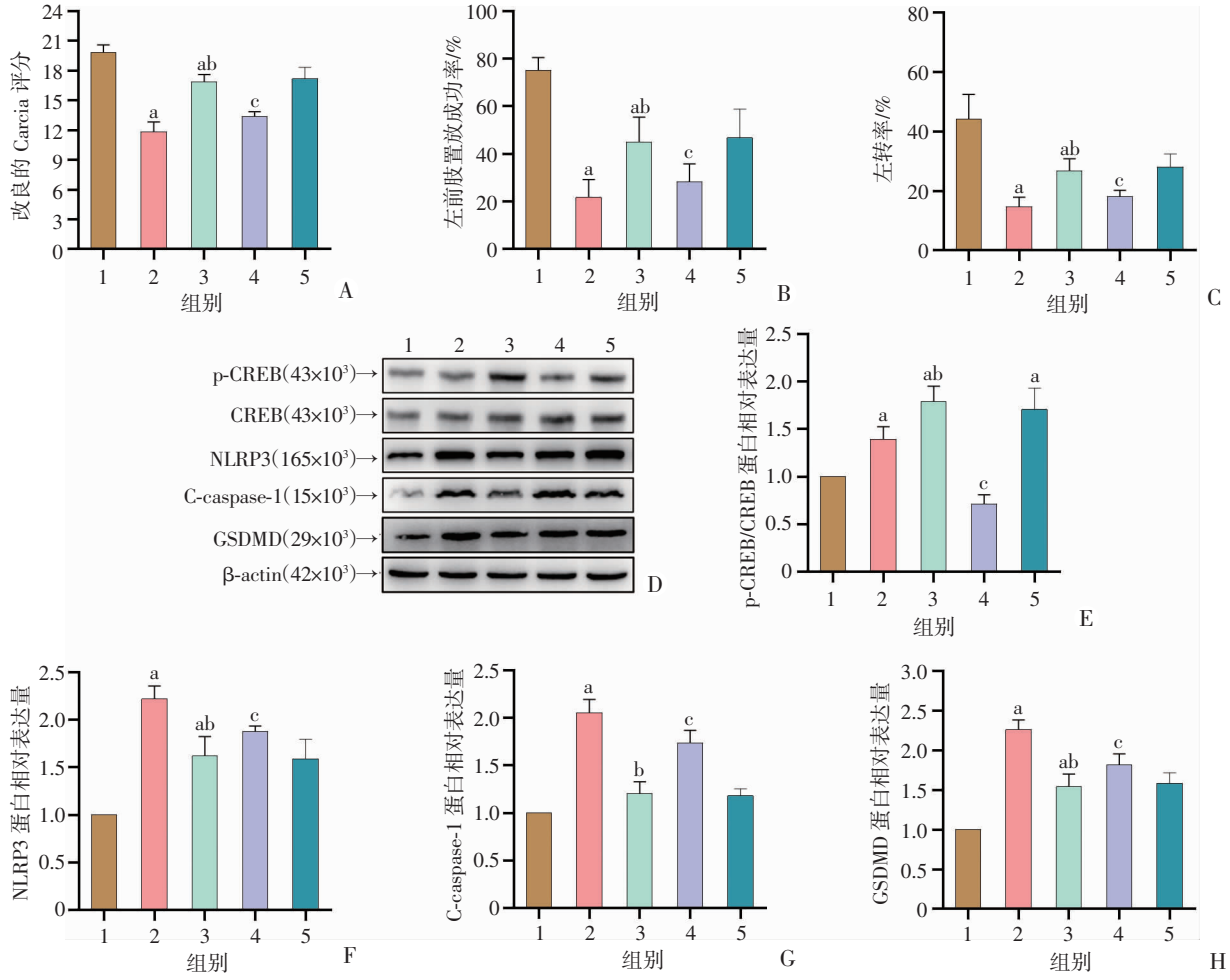
2.6 666-15 部分减少 TC-G 1008 激活 GPR39 的神经保护作用

为明确 TC-G 1008 激活 GPR39 的神经保护作用是否与 CREB 信号通路有关,在 ICH 建模前 24 h 通过侧脑室注射 666-15,并在建模后给予 TC-G 1008 治疗。与 ICH+TC-G 1008+Vehicle 2 组相比,ICH+TC-G 1008+666-15 组小鼠 ICH 后 48 h 呈现出明显的神经功能缺陷($P<0.05$,图 6A~C)。Western blot 检测结果表明,当下调 p-CREB 的表达后,与 ICH+TC-G 1008+Vehicle 2 组相比,ICH+TC-G 1008+666-15 组小鼠血肿周围组织中的 NLRP3、C-caspase-1 和 GSDMD 的表达增加($P<0.05$,图 6D~H)。

3 讨论

本研究利用小鼠 ICH 模型对 GPR39 的激活可能部分通过 CREB 信号通路抑制神经元焦亡后神经炎症的作用进行了探讨。观察到以下结果:①小鼠 ICH 后血肿周围组织内 GPR39 表达升高,神经元和小胶质细胞上均有 GPR39 表达;②TC-G 1008 激活 GPR39 可显著改善小鼠短期的神经功能障碍和脑水肿;③TC-G 1008 激活 GPR39 减轻了小鼠 ICH 后血肿周围组织神经元的损伤,并伴有 NLRP3 的表达减少,IL-1β、TNF-α 和 MPO 的水平降低;④敲低 GPR39 部分增加 ICH 后焦亡相关因子 NLRP3、C-caspase-1、GSDMD 和炎症相关因子的表达;⑤CREB 信号通路可能是 GPR39 介导神经保护的潜在机制。

焦亡的途径包含经典和非经典焦亡途径。其中经典的焦亡途径由 caspase-1 介导[15]。最新的研究表明,NLRP3 炎症小体可通过激活 caspase-1 触发 GSDMD 的切割和加速促炎性因子的成熟参与到 ICH 后的细胞



1:Sham 组;2:ICH+Vehicle 组;3:ICH+TC-G 1008 组;4. ICH+TC-G 1008+666-15 组;5:ICH+TC-G 1008+Vehicle 2 组;a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 ICH+Vehicle 组比较;c:$P<0.05$,与 ICH+TC-G 1008+Vehicle 2 组比较
A~C:ICH 后 48 h 各组小鼠改良 Garcia 评分、左前肢放置实验和转角实验;D~H:Western blot 检测各组 CREB、NLRP3、C-caspase-1 和 GSDMD 蛋白表达及半定量分析

图 6 666-15 部分减少 TC-G 1008 激活 GPR39 对 ICH 后小鼠的短期神经功能和细胞焦亡分子的影响($n=6$,$\bar{x}\pm se$)

焦亡的过程[16]。裂解的 GSDMD 在细胞膜上形成非选择的细胞膜孔,以加速细胞内炎症物质的释放,从而导致炎症反应进一步加重,最终导致细胞炎性死亡[17-18]。焦亡是 ICH 导致脑损伤的重要机制,可导致血肿周围神经元细胞在内的多种细胞炎性死亡[19]。本研究观察到小鼠 ICH 后血肿周围神经元内焦亡相关分子 NLRP3 的表达增加,表明神经元细胞焦亡参与了 ICH 后脑损伤的过程,因此抑制神经元细胞焦亡可能缓解 ICH 后过度的神经炎症和脑损伤。

G 蛋白偶联受体家族具有典型的七次跨膜结构,使它们能够检测各种细胞刺激,也使其成为药理学干预的理想靶点[20]。GPR39 已被证实在中枢神经系统中的杏仁核、海马区和听觉皮层中广泛表达[7]。Zn^{2+} 既往被确定为 GPR39 的生理激动剂,胞外的 Zn^{2+} 可激活 GPR39 受体从而触发多种信号传导途径[6]。缺锌饮食会导致海马区 GPR39 表达下降,膳食补锌后可显著消除 GPR39 的异常表达[21]。在中风的内环境下,脑组织的神经元会大量释放细胞外 Zn^{2+} 以促进促炎症细胞因子的产生[22]。本研究观察到 ICH 后血肿周围 GPR39 的表达以时间依赖性方式增加,可能是由于神经元释放的 Zn^{2+} 导致的。然而 Zn^{2+} 导致内源性 GPR39 的表达增加可能还不足以抵抗小鼠 ICH 后的整体脑损伤。因此,在给予激动剂进一步激活 GPR39 的表达后,本研究观察到小鼠短期神经行为缺陷的改善,这表明 GPR39 参与了 ICH 后的病理进展过程。

既往研究表明,GPR39 在促进伤口愈合、减轻炎症性肠病症状、减轻焦虑行为和促进胰岛素分泌等方面发挥着重要作用[23]。在中枢神经系统中,体外研究发现激活 GPR39 可以通过抗细胞凋亡和缓解内质网应激保护海马神经元细胞[10]。体内实验表明激活 GPR39 可以抑制神经炎症从而改善新生大鼠的神经行为缺陷[11]。在本研究中,TC-G 1008 激活 GPR39 显著改善了小鼠 ICH 后短期的神经行为缺陷和脑水肿,下调了小鼠血肿周围组织焦亡相关分子 NLRP3、C-capase-1 和 GSDMD 的表达,并降低了促炎相关因子 IL-1β,TNF-α 和 MPO 的水平。GPR39 siRNA 敲低 GPR39 后小鼠血肿周围组织 NLRP3、C-capase-1 和 GSDMD 以及炎性相关因子的表达增加。因此,GPR39 在小鼠 ICH 后可能通过抑制血肿周围组织神经元焦亡,减少炎性物质的释放,从而减轻神经炎症和脑损伤。

GPR39 是 G 蛋白偶联受体家族中的一员,其可能通过经典的 G 蛋白偶联受体/PKA 途径调节 CREB 信号进而调节炎症小体的表达[24-25]。在 ICH 的研究中,CREB 激活通常起到抗神经炎症的作用[26]。研究发现,激活 GPR39 可通过 CREB 信号通路抑制皮质酮诱导的海马细胞神经元凋亡[10]。最近的研究表明 CREB 参与了 ICH 后神经元焦亡的机制[24]。同之前研究一致,本研究观察到激活 GPR39 增加了 p-CREB 的表达,而 666-15 抑制 p-CREB 后部分减轻了 TC-G 1008 激活 GPR39 后的神经保护作用。表明激活 GPR39 可能部分通过 CREB 信号通路调节神经元焦亡从而抑制神经炎症。

据报道,GPR39 是一种多功能蛋白,研究证实激活 GPR39 可通过 Sirt1/PGC1-α/Nrf2 信号通路调节线粒体生物发生从而减轻神经炎症引起的慢性神经性疼痛,但本研究仅探索了 GPR39 激活后在 ICH 后抗神经元焦亡和神经炎症的作用。由于 GPR39 还在小胶质细胞中表达,其在 ICH 后参与小胶质细胞中的抗焦亡作用需要进一步研究。未来还需要进一步探索给予 TC-G 1008 激活 GPR39 后在 ICH 后脑损伤中的长期结局和其他的潜在机制。

综上所述,激活 GPR39 可能部分通过 CREB 信号通路抑制神经元焦亡,从而减轻因神经元焦亡后炎性物质释放导致的神经炎症,进而改善小鼠 ICH 后继发性脑损伤。因此,GPR39 可能作为 ICH 患者减轻脑损伤的治疗靶点。

参考文献:

[1] PUY L, PARRY-JONES A R, SANDSET E C, *et al*. Intracerebral haemorrhage[J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9(1): 14. DOI: 10.1038/s41572-023-00424-7.

[2] MAGID-BERNSTEIN J, GIRARD R, POLSTER S, *et al*. Cerebral hemorrhage: pathophysiology, treatment, and future directions[J]. Circ Res, 2022, 130(8): 1204-1229. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319949.

[3] GU L G, SUN M J, LI R H, *et al*. Didymin suppresses microglia pyroptosis and neuroinflammation through the asc/caspase-1/GSDMD pathway following experimental intracerebral hemorrhage[J]. Front Immunol, 2022, 13: 810582. DOI: 10.3389/fimmu.2022.810582.

[4] SONG D P, YEH C T, WANG J, *et al*. Perspectives on the mechanism of pyroptosis after intracerebral hemorrhage[J]. Front Immunol, 2022, 13: 989503. DOI: 10.3389/fimmu.2022.989503.

[5] MCKEE K K, TAN C P, PALYHA O C, *et al*. Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors[J]. Genomics, 1997, 46(3): 426-434. DOI: 10.1006/geno.1997.5069.

[6] HERSHFINKEL M. The zinc sensing receptor, ZnR/GPR39, in health and disease[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 439.

DOI: 10.3390/ijms19020439.

[7] XU Y F, BARNES A P, ALKAYED N J. Role of GPR39 in neurovascular homeostasis and disease[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 8200. DOI: 10.3390/ijms22158200.

[8] MLYNIEC K, SIODŁAK D, DOBOSZEWSKA U, *et al*. GPCR oligomerization as a target for antidepressants: focus on GPR39[J]. Pharmacol Ther, 2021, 225: 107842. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107842.

[9] DAVIS C M, BAH T M, ZHANG W H, *et al*. GPR39 localization in the aging human brain and correlation of expression and polymorphism with vascular cognitive impairment[J]. Alzheimers Dement, 2021, 7(1): e12214. DOI: 10.1002/trc2.12214.

[10] MO F F, TANG Y X, DU P, *et al*. GPR39 protects against corticosterone-induced neuronal injury in hippocampal cells through the CREB-BDNF signaling pathway[J]. J Affect Disord, 2020, 272: 474-484. DOI: 10.1016/j.jad.2020.03.137.

[11] XIE S C, JIANG X L, DOYCHEVA D M, *et al*. Activation of GPR39 with TC-G 1008 attenuates neuroinflammation via SIRT1/PGC-1α/Nrf2 pathway post-neonatal hypoxic-ischemic injury in rats[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 226. DOI: 10.1186/s12974-021-02289-7.

[12] JING W X, SUN W Y, ZHANG N, *et al*. The protective effects of the GPR39 agonist TC-G 1008 against TNF-α-induced inflammation in human fibroblast-like synoviocytes (FLSs)[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 865: 172663. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172663.

[13] WU X, FU S M, LIU Y, *et al*. NDP-MSH binding melanocortin-1 receptor ameliorates neuroinflammation and BBB disruption through CREB/Nr4a1/NF-κB pathway after intracerebral hemorrhage in mice[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 192. DOI: 10.1186/s12974-019-1591-4.

[14] KIM E N, NABENDE W Y, JEONG H, *et al*. The marine-derived natural product epiloliolide isolated from *Sargassum horneri* regulates NLRP3 *via* PKA/CREB, promoting proliferation and anti-inflammatory effects of human periodontal ligament cells[J]. Mar Drugs, 2021, 19(7): 388. DOI: 10.3390/md19070388.

[15] SHI J J, GAO W Q, SHAO F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death[J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(4): 245-254. DOI: 10.1016/j.tibs.2016.10.004.

[16] HUANG Y, XU W, ZHOU R B. NLRP3 inflammasome activation and cell death[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(9): 2114-2127. DOI: 10.1038/s41423-021-00740-6.

[17] CAI L, GONG Q Y, QI L, *et al*. ACT001 attenuates microglia-mediated neuroinflammation after traumatic brain injury via inhibiting AKT/NFκB/NLRP3 pathway[J]. Cell Commun Signal, 2022, 20(1): 56. DOI: 10.1186/s12964-022-00862-y.

[18] DING J, WANG K, LIU W, *et al*. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family[J]. Nature, 2016, 535(7610): 111-116. DOI: 10.1038/nature18590.

[19] GU L G, SUN M J, LI R H, *et al*. Activation of RKIP binding ASC attenuates neuronal pyroptosis and brain injury *via* caspase-1/GSDMD signaling pathway after intracerebral hemorrhage in mice[J]. Transl Stroke Res, 2022, 13(6): 1037-1054. DOI: 10.1007/s12975-022-01009-4.

[20] HAUSER A S, ATTWOOD M M, RASK-ANDERSEN M, *et al*. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(12): 829-842. DOI: 10.1038/nrd.2017.178.

[21] CHEN N N, ZHAO D J, SUN Y X, *et al*. Long-term effects of zinc deficiency and zinc supplementation on developmental seizure-induced brain damage and the underlying GPR39/ZnT-3 and MBP expression in the hippocampus[J]. Front Neurosci, 2019, 13: 920. DOI: 10.3389/fnins.2019.00920.

[22] HIGASHI Y, ARATAKE T, SHIMIZU S, *et al*. Brain zinc dyshomeostasis and glial cells in ischemic stroke[J]. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2019, 154(3): 138-142. DOI: 10.1254/fpj.154.138.

[23] LAITAKARI A, LIU L Z, FRIMURER T M, *et al*. The zinc-sensing receptor GPR39 in physiology and as a pharmacological target[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8): 3872. DOI: 10.3390/ijms22083872.

[24] YAN J, XU W L, LENAHAN C, *et al*. CCR5 activation promotes NLRP1-dependent neuronal pyroptosis *via* CCR5/PKA/CREB pathway after intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2021, 52(12): 4021-4032. DOI: 10.1161/STROKEAHA.120.033285.

[25] JIN P, DENG S X, TIAN M, *et al*. INT-777 prevents cognitive impairment by activating Takeda G protein-coupled receptor 5 (TGR5) and attenuating neuroinflammation via cAMP/PKA/CREB signaling axis in a rat model of sepsis[J]. Exp Neurol, 2021, 335: 113504. DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113504.

[26] WEN A Y, SAKAMOTO K M, MILLER L S. The role of the transcription factor CREB in immune function[J]. J Immunol, 2010, 185(11): 6413-6419. DOI: 10.4049/jimmunol.1001829.

(收稿:2023-12-28;修回:2024-02-23)

(编辑 吴培红)