

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250107.001

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250107.1655.002>

H₂S通过JAK2/STAT3信号通路抑制新生大鼠缺氧缺血性脑病

刘剑锋, 何攀, 贺来彪, 霍佳雯✉

(南华大学附属第二医院儿科, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] **目的:** 观察硫化氢(H₂S)的供体硫氢化钠(NaHS)对幼鼠缺氧缺血性脑病(HIE)的影响并探讨其可能的作用机制。 **方法:** 7日龄的雄性Wistar幼鼠, 先进行右颈总动脉双结扎, 再放入缺氧舱2 h, 建立幼鼠的HIE模型。每日1次腹腔注射NaHS(50 μmol/kg), 共30 d。每天观察幼鼠的情况, 测量体重, 并对神经功能不全进行评分。幼鼠海马区神经元细胞通过TUNEL染色检测细胞凋亡。利用ELISA技术对幼鼠海马组织中的白介素-1β(IL-1β)、IL-4、IL-6和IL-10的水平进行检测。通过Western blot技术检测幼鼠的海马组织中的精氨酸酶1(Arg1)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、JAK2的磷酸化形式(p-JAK2), 以及STAT3的磷酸化状态(p-STAT3)的水平。观察JAK2/STAT3信号通路的激动剂SC-39100对NaHS效应的影响。 **结果:** 与对照组相比较, HIE模型组幼鼠在模型制备后的第4天至第30天体重均显著降低, 神经功能缺失评分显著性升高, 海马DG区组织中神经元凋亡明显增多, 海马组织中iNOS蛋白表达上调, Arg1蛋白表达下调, IL-4和IL-10水平降低, IL-1β和IL-6水平增加, p-JAK2的蛋白表达水平和p-JAK2/t-JAK2比值, 以及p-STAT3的蛋白表达水平和p-STAT3/t-STAT3比值均显著性增加($P<0.05$)。与HIE模型组比较, HIE+NaHS组大鼠在造模后第6天至第30天体重均明显增加, 神经功能缺失评分显著性降低, 海马DG区组织中神经元凋亡明显减少, 海马组织中iNOS蛋白表达下调, 而Arg1蛋白的表达水平上调, IL-4和IL-10的水平均增加, 而IL-1β和IL-6的水平均降低, p-JAK2的蛋白表达水平和p-JAK2/t-JAK2比值, 以及p-STAT3蛋白的表达水平和p-STAT3/t-STAT3比值均显著性降低($P<0.05$)。SC-39100逆转了NaHS降低HIE大鼠神经功能缺失评分的作用。 **结论:** 外源性H₂S对幼鼠的HIE具有保护作用, 其机制可能与H₂S抑制JAK2/STAT3信号通路的激活, 抑制小胶质细胞的M1型极化, 诱导其M2型极化, 从而抑制神经炎症反应有关。

[关键词] 硫化氢; 缺氧缺血性脑病; 幼鼠; 小胶质细胞极化; JAK2/STAT3信号通路

[中图分类号] R722.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2025)17-1327-09

H₂S inhibits hypoxic-ischemic encephalopathy in juvenile rats through the JAK2/STAT3 signaling pathway

LIU Jianfeng, HE Pan, HE Laibiao, HUO Jiawen✉

(Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China)

[Foundation Project]: This study was supported by Hunan Provincial Natural Science Foundation Project (2021JJ70036), Hengyang Science and Technology Plan Project (202150063524); Hunan Province Clinical Medical Technology Innovation Guidance Project (2020SK51702)

[Author]: LIU Jianfeng, Chief Physician, M.M., E-mail: liujianfeng389@126.com.

[Correspondence to]: HUO Jiawen, Attending Physician, M.M., E-mail: huojiawen163@163.com.

Received: 2024-08-19

Revised: 2024-12-23

JHMu, 2025;31(17):1327-1335

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] Objective: To observe the effect of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide (NaHS) on hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) in juvenile rats and exploration of its possible mechanism. **Methods:** Seven-day-old Wistar rats were subject-

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2021JJ70036); 衡阳市科技计划项目(202150063524); 湖南省临床医疗技术创新引导项目(2020SK51702)

[作者简介] 刘剑锋, 主任医师, 硕士, E-mail: liujianfeng389@126.com。

[通讯作者] 霍佳雯, 主治医师, 硕士, E-mail: huojiawen163@163.com。

[收稿日期] 2024-08-19

[修回日期] 2024-12-23

网络出版时间: 2025-01-08 09:03:26

ed to double ligation of the right common carotid artery and placed in a hypoxic chamber to establish a neonatal rat model of HIE. NaHS (50 $\mu\text{mol/kg}$) was administered *via* intraperitoneal injection daily for 30 days. The condition of rats was observed and the weight of the rats was measured every day, and score for neurological deficits was calculated. TUNEL staining was used to observe neuronal cell apoptosis in rat hippocampal tissue, and ELISA was used to detect the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-4, IL-6, and IL-10 in rat hippocampal tissue. The protein expression levels of arginase 1 (Arg1), inducible nitric oxide synthase (iNOS), phosphorylated JAK2 (p-JAK2), and phosphorylated STAT3 (p-STAT3) in rat hippocampal tissue were detected by Western blot. The effect of JAK2/STAT3 pathway agonist SC-39100 on the action of NaHS was observed. **Results:** Compared with the control group, the body weight of rats from day 4 to day 30 after modeling were significantly decreased, the neurological deficit score was significantly increased, the neuronal apoptosis in the hippocampal DG region was obviously increased, iNOS protein expression was significantly upregulated, Arg1 protein expression was significantly downregulated, IL-4 and IL-10 levels were significantly decreased, IL-1 β and IL-6 levels were significantly increased, and p-JAK2 and p-STAT3 protein expression, as well as p-JAK2/t-JAK2 and p-STAT3/t-STAT3 ratios were significantly increased in the HIE model group (all $P<0.05$). Compared with the HIE model group, the body weight of rats from day 6 to day 30 after modeling were significantly increased, the neurological deficit score was significantly decreased, the neuronal apoptosis in the hippocampal DG region was obviously decreased, iNOS protein expression was significantly downregulated, Arg1 protein expression was significantly upregulated, IL-4 and IL-10 levels were significantly increased, IL-1 β and IL-6 levels were significantly decreased, and p-JAK2 and p-STAT3 protein expression, as well as p-JAK2/t-JAK2 and p-STAT3/t-STAT3 ratios were significantly decreased in the HIE+NaHS model group (all $P<0.05$). SC-39100 reversed the effect of NaHS on reducing the neurological deficit score in HIE rats. **Conclusion:** Exogenous H₂S has a protective effect on HIE in juvenile rats, and its mechanism may be related to activating the JAK2/STAT3 signaling pathway, inhibiting M1 polarization of microglia, inducing M2 polarization, and thereby inhibiting the neuroinflammation.

[Key words] Hydrogen sulfide; Hypoxic-ischemic encephalopathy; Juvenile rats; Microglia polarization; JAK2/STAT3 signaling pathway

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是指围生期缺氧或窒息、脑血流不足而引起胎儿或新生儿脑损伤。它的病情紧急,死亡率较高,后遗症的发生率也较高,对新生儿及后期的生存质量造成了严重的影响^[1,2]。目前,HIE的治疗方法和效果都不尽如人意。硫化氢(Hydrogen sulfide, H₂S)被认为是广泛分布于机体内部各个器官和系统的第三种气体信号分子。H₂S具有广泛的生理作用,对许多疾病的发生和发展均有一定程度的参与^[3,4]。研究发现,H₂S对神经炎症有明显抑制作用,对神经具有保护作用^[5]。两种小胶质细胞极化类型的作用各不相同,M1型具有促炎作用,M2型具有炎性抵抗的效应^[6]。JAK2/STAT3信号通路是调控小胶质细胞极化表型转变的关键信号分子,H₂S是JAK2/STAT3信号通路活化的调节的重要因素^[7,8]。本课题组之前的研究表明,H₂S能够调控小胶质细胞的极化,依赖抑制JAK2/STAT3信号通路而发挥抗神经炎症作用^[9]。但H₂S对HIE有没有保护作用,其作用机理又是如何迄今还不清楚。因此,本研究利用硫氢化钠(Sodium hydrogen sulfide, NaHS)作为H₂S的供体,从JAK2/STAT3信号通路的角度观察H₂S对HIE幼鼠的影响,并探讨H₂S保护HIE的可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料

NaHS、JAK2/STAT3信号通路特异性激活剂SC-39100从美国西格玛(Sigma)公司购得。兔抗鼠精氨酸酶1(Arginase 1, Arg1)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthetase, iNOS)、JAK2和p-JAK2、STAT3和p-STAT3的单克隆抗体以及 β -actin的一抗、对应的二抗均从美国圣塔克鲁兹(Santa Cruz)公司购得。蛋白定量试剂盒(BCA法)从美国赛默飞(Thermo Fisher)公司购得。白介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、IL-4、IL-6和IL-10酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)的检测试剂盒由武汉博士德公司提供。

1.2 方法

1.2.1 HIE幼鼠动物模型的制备 从北京维通利华实验动物有限公司所购买到的7日龄Wistar鼠,SPF级,雄性,体重为12~18 g,鼠均饲养在温度设定为28~30 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中。实验动物许可证号:SCXK(京)2022-0006。使用100 mg/kg的剂量,将1%的异戊巴比妥钠注射到幼鼠的腹腔中,使其麻醉后在小型手术台上固定成仰卧姿势。在将颈部的皮肤行常规消毒后,沿着颈部的正中线做切口,将右侧颈总动脉小心分离开来,再用双结扎法将右

侧颈总动脉扎紧,使血流不通。颈部缝合皮肤,放回原位前先对幼鼠局部消毒。待幼鼠麻醉清醒2 h后,把幼鼠放入恒温(37℃)密闭缺氧舱,将混合气体(8%O₂和92%N₂的)充入舱内,流速为5 L/min,时间为2 h。手术完成后,将幼鼠取出,重新放入母鼠笼中和母鼠一起饲养。对照组的幼鼠只进行右侧颈总动脉钝性分离但未打结的颈部皮肤切开手术,最后对皮肤进行缝合^[10]。HIE幼鼠动物模型成功的标准是幼鼠出现明显的神经功能障碍,神经功能评分大于1分。该研究获得南华大学伦理委员会和南华大学附属第二医院临床研究伦理委员会批准[批准号:伦审快(2024021)号]。

1.2.2 实验分组 实验分为对照组(Control)、HIE幼鼠模型组(HIE)、NaHS处理组(NaHS)、HIE+NaHS处理组(HIE+NaHS)、JAK2/STAT3信号通路激活剂SC-39100组(SC-39100)组和HIE+NaHS+SC-39100组(HIE+NaHS+SC-39100),每组10只。对照组的幼鼠只进行右侧颈总动脉钝性分离但未打结以及颈部皮肤切开手术。HIE模型组幼鼠通过以上介绍的方法建立HIE鼠模型。NaHS组幼鼠在假手术后每天给予H₂S的供体NaHS(50 μmol/kg)腹腔注射给予30 d。HIE+NaHS组幼鼠在造模成功后每天给予NaHS(50 μmol/kg)腹腔注射给予30 d。SC-39100组幼鼠在造模成功后每天SC-39100腹腔注射30 d。HIE+NaHS+SC-39100组在造模成功后每天SC-39100腹腔注射0.5 h后,再给予NaHS(50 μmol/kg)腹腔注射30 d。

1.2.3 幼鼠神经功能评分 各组幼鼠在NaHS给药30 d后处死,处死之前进行神经功能评分,按感觉、运动、平衡和反射功能4个方面的神经功能缺失评分法评定,总成绩计为0~18分。评分的成绩分数越高,表明幼鼠有越严重的神经功能受损。以下是评分标准:提起鼠尾时,如果前肢和后肢都呈屈曲状态,头的运动偏离垂直线10°以上,能维持30 s,计1分。将老鼠放在地面上,使其头部和身体成10°,保持30 s的观察时间,老鼠能爬行正常,计0分;不能直线前进,计1分;旋转至患侧者计2分;倒向患侧者计3分。老鼠爬到桌子上,身体不能收起来或不能支起来,计1分;老鼠用爪子向桌面边沿推鼠爪,四肢动作快,计1分。横梁实验中,没有多余动作,正常抓握计0分;抓住横梁边缘,计1分;抓住横梁但有一只脚掉下来,计2分;老鼠能抓稳横梁但有两只脚掉下来或在上面进行旋转60 s,计3分;尽量让身体平衡在横梁上,但仅能坚持40 s,计4分;努

力让身体平衡在横梁上,只能坚持20 s,计5分;从横梁上面掉到地面,计6分。对耳道进行刺激,摇头晃脑者,计1分;用棉絮对角膜进行刺激,眨眼者,计1分;突然发出的声响触发了老鼠运动或惊叫,计1分;肌肉抽动或不正常的肌紧张状态计1分^[11]。

1.2.4 Tunel荧光染色检测 将幼鼠的海马组织取出来,浸入的聚甲醛溶液(4%)中,经24 h固定后,进行切片。烤箱中65℃的温度下烤1 h,然后脱蜡处理。用100%的乙醇浸泡切片3次,再用95%的乙醇浸泡切片3次。将柠檬酸盐缓冲溶液(pH值为6.0)加入染色盒中,在染色盒中的能耐高温的塑料切片架上放置切片,经历10 min的高温高压处理。将染盒取出自然冷却,再取出玻片,反复用PBS洗净即可。取100 mL浓度为3%的H₂O₂溶液,将切片浸泡其中,在室温下继续孵育10 min,PBS反复冲洗。取100 mL血清封闭液,将切片浸泡其中,室温继续孵育5 min,PBS反复冲洗。加入蛋白酶K后将切片在37℃下孵育15 min,PBS洗涤后加入破膜液进行破膜。然后再加入Tunel反应混合物,37℃下孵育继续1 h。用PBS反复冲洗切片,取50 mL的DAPI溶液,将切片浸入其中,避光情况下孵育10 min,用PBS反复冲洗。加入防荧光淬灭剂后,在进行完封片处理后再进行观察和拍照等工作。

1.2.5 ELISA法检测炎症因子水平 将幼鼠的海马组织收集起来,将其切碎后放入碾钵中,经过反复研磨,使其变成脑组织匀浆。通过ELISA方法检测组织匀浆上清液中的IL-1β、IL-4、IL-6、IL-10水平,定量组织匀浆上清液中的总蛋白水平,用μg/g组织蛋白来表示其水平。

1.2.6 Western-blot检测总蛋白水平 样本总蛋白浓度是在总蛋白提取后通过BCA法测定的。在加样缓冲液中加入总蛋白样品,电炉煮熟,使蛋白彻底变性。将已经完全变性的蛋白质经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,再经电转移到聚偏氟乙烯(polyvinyl fluoride, PVDF)膜上。常温下用5%脱脂牛奶将PVDF薄膜进行2 h的孵育,达到阻断非特异性抗原的目的。加入兔抗鼠iNOS(1:400)、Arg-1(1:500)、JAK2(1:300)、p-JAK2(1:200)、STAT3(1:200)、p-STAT3(1:200)、β-actin(1:400)的抗体(一抗),4℃条件下进行一夜的孵育。将PVDF薄膜用TBST溶液漂洗3遍,再加入二抗工作液在4℃条件下继续孵育4 h,再漂洗3遍。经过曝光、显影、定影等步骤后,扫描影片。使用图像分析软件,以β-actin为内参照对结果进行半定量的分析。

1.3 统计学处理

结果分析使用 SPSS20.0 统计软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析进行多组均数间的比较,LSD- t 检验进行两两对比。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

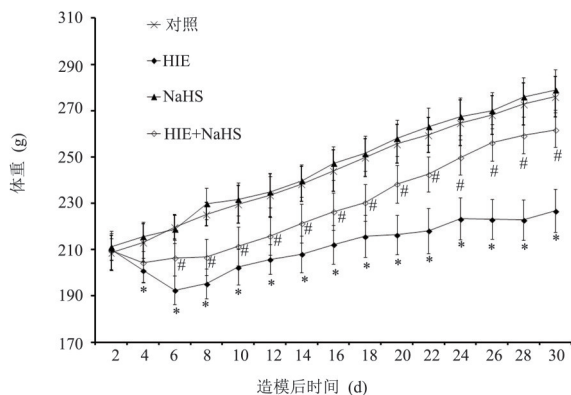
2 结果

2.1 幼鼠的一般情况

对照组的幼鼠,7日龄,两只耳朵可以竖起,细小的绒毛开始出现在皮肤上;约在10日龄被毛长齐;约13日龄幼鼠双目可睁开,活动正常。HIE组幼鼠有呼吸困难,身体翻滚,在口周和四肢有明显青紫,躯体颤动,不能翻身,夹住鼠尾而原地左旋转,右眼可以睁开,左眼不能睁开。与HIE模型组相比,HIE+NaHS组的幼鼠,约13日龄部分幼鼠可睁开左眼,活动正常。

2.2 NaHS对HIE幼鼠体重的影响

每组幼鼠的体重增长速度各不相同,其中HIE模型组的幼鼠体重在成模后的第4天至第30天显著性低于对照组($P < 0.05$)。对照组和NaHS组的两组幼鼠体重无明显差别($P > 0.05$)。与HIE模型组比较,HIE+NaHS组幼鼠从成模后第6天至第30天体重均明显升高($P < 0.05$)(图1)。



与对照组比较,* $P < 0.05$;与HIE组比较,# $P < 0.05$

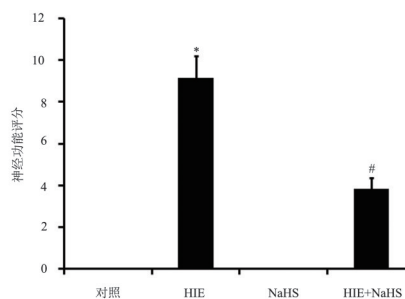
图1 NaHS对HIE幼鼠体重的影响

Fig 1 Effect of NaHS on the weight in juvenile rats with HIE

2.3 NaHS对HIE幼鼠神经功能评分的影响

未发现有神经功能缺失存在于对照组和NaHS组两组的幼鼠,神经功能均计0分。HIE模型组幼鼠的神经功能评分与对照组比较明显上升($t = 137.64, P < 0.05$);HIE+NaHS组幼鼠的神经功能

评分与HIE模型组比较显著性降低($t = 57.83, P < 0.05$)(图2)。



与对照组比较,* $P < 0.05$;与HIE组比较,# $P < 0.05$

图2 NaHS对HIE幼鼠神经功能评分的影响

Fig 2 Effect of NaHS on the neurological function score in juvenile rats with HIE

2.4 NaHS对HIE幼鼠海马组织神经元凋亡的影响

HIE模型组幼鼠在海马DG区组织中的神经元凋亡现象与对照组相比有显著增加,对照组和HIE模型组细胞凋亡率分别为 $(4.13 \pm 0.29)\%$ 和 $(19.37 \pm 1.66)\%$, $t = 67.45, P < 0.05$ 。HIE+NaHS组幼鼠海马DG区组织中神经元的凋亡与HIE模型组比较明显减少,HIE模型组和HIE+NaHS组细胞凋亡率分别为 $(19.37 \pm 1.66)\%$ 和 $(8.18 \pm 0.11)\%$, $t = 45.62, P < 0.05$ 。对照组和NaHS组两组幼鼠海马DG区组织中神经元的凋亡情况没有明显差异,对照组和NaHS组细胞凋亡率分别为 $(4.13 \pm 0.29)\%$ 和 $(4.91 \pm 0.52)\%$, $t = 0.69, P > 0.05$ (图3)。

2.5 NaHS对HIE幼鼠海马小胶质细胞极化的影响

HIE模型组的幼鼠海马中,iNOS的蛋白表达水平较对照组有明显上调($t = 57.92, P < 0.05$),而Arg1的蛋白表达水平则有明显下降($t = 65.33, P < 0.05$)。HIE+NaHS组幼鼠的海马组织中iNOS的蛋白表达与HIE模型组比较明显下调($t = 42.07, P < 0.05$),而Arg1蛋白表达水平却明显上调($t = 46.84, P < 0.05$)(图4)。

HIE模型组幼鼠的海马组织中IL-4和IL-10的水平与对照组比较显著性降低($P < 0.05$),而IL-1 β 和IL-6的水平显著性增加($P < 0.05$);HIE+NaHS组幼鼠的海马组织中IL-4和IL-10水平与HIE模型组比较明显增加,而IL-1 β 和IL-6水平明显降低(均 $P < 0.05$)。见表1。

2.6 NaHS对HIE幼鼠的海马组织中JAK2和

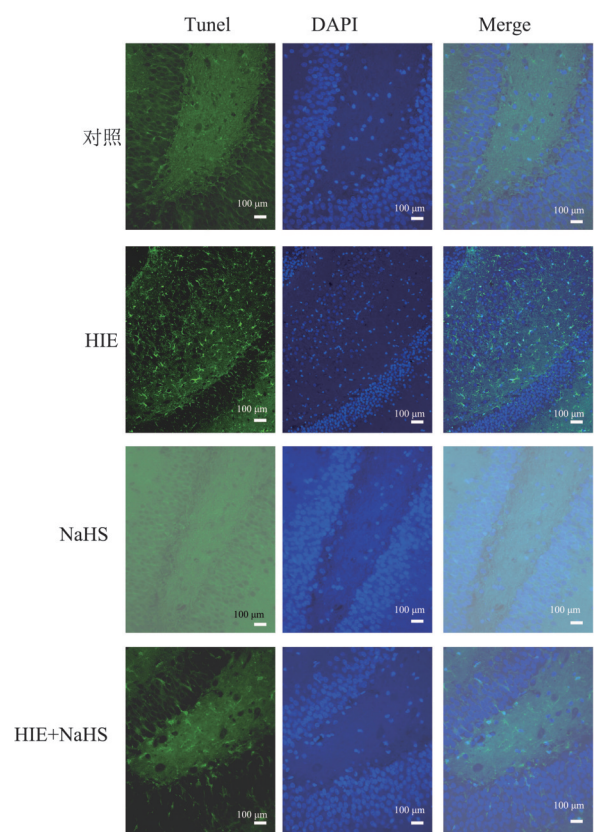


图3 NaHS对HIE幼鼠海马DG区神经元凋亡的影响(×400)

Fig 3 Effect of NaHS on the apoptosis of neuron in the hippocampal DG region of juvenile rats with HIE (×400)

STAT3表达水平的影响

HIE模型组幼鼠的海马组织中p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平与对照组比较显著性上调($t_1=68.36, t_2=73.95$, 均 $P<0.05$), 而 p-JAK2/

表1 NaHS对HIE幼鼠海马组织中炎症因子水平的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of NaHS on the levels of inflammatory factors in the hippocampal tissue of juvenile rats with HIE ($n=10, \bar{x} \pm s$)

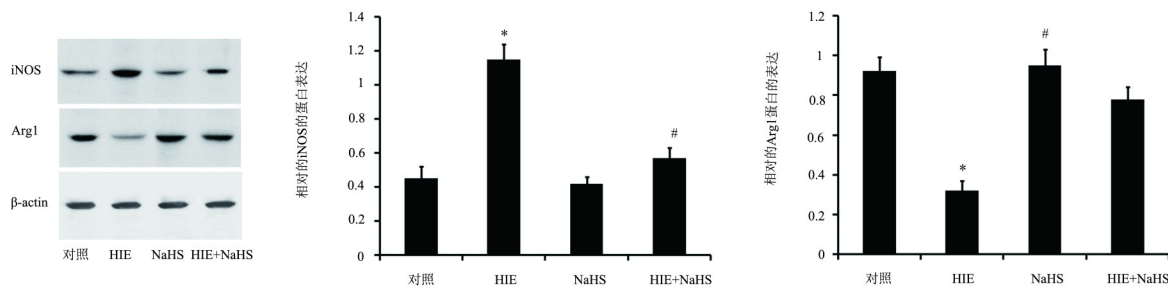
组别	组织($\mu\text{g/g}$ 组织蛋白)			
	IL-1 β	IL-6	IL-4	IL-10
对照	24.16 $\pm$ 2.56	17.64 $\pm$ 1.64	31.25 $\pm$ 4.58	57.49 $\pm$ 6.04
HIE	56.65 $\pm$ 5.97*	50.83 $\pm$ 6.43*	13.49 $\pm$ 1.94*	25.31 $\pm$ 3.43*
NaHS	21.37 $\pm$ 3.16	20.35 $\pm$ 3.51	29.77 $\pm$ 2.76	62.07 $\pm$ 7.06
HIE+NaHS	30.74 $\pm$ 4.22 [#]	29.25 $\pm$ 3.27 [#]	22.15 $\pm$ 3.12 [#]	47.22 $\pm$ 4.56 [#]
<i>F</i>	87.54	67.13	57.78	92.47
<i>P</i>	0.005	0.009	0.008	0.005

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与HIE组比较,[#] $P<0.05$ 。

t-JAK2和p-STAT3/t-STAT3比值相较于对照组也均明显增加($t_1=42.73, t_2=50.09$, 均 $P<0.05$); HIE+NaHS组幼鼠的海马组织中p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平与HIE模型组比较显著性下调($t_1=48.55, t_2=56.87$, 均 $P<0.05$), 而 p-JAK2/t-JAK2和p-STAT3/t-STAT3比值相较于对照组也均明显降低($t_1=38.96, t_2=46.63$, 均 $P<0.05$)(图5)。

2.7 JAK2/STAT3通路激活剂SC-39100对NaHS改善HIE幼鼠神经功能缺损作用的影响

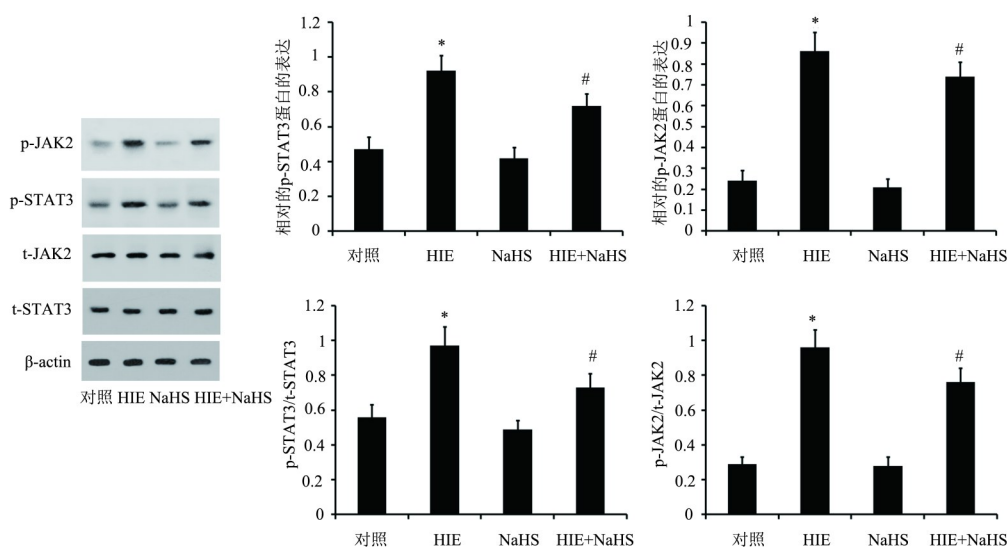
HIE模型组幼鼠的神经功能评分相较于对照组显著性升高($t=115.48, P<0.05$); HIE+NaHS组幼鼠的神经功能评分与HIE模型组相比较显著性降低($t=48.72, P<0.05$)。HIE+NaHS+SC-39100组幼鼠的神经功能评分与HIE+NaHS组相比较显著性升高($t=29.67, P<0.05$)(图6)。



与对照组比较,* $P<0.05$;与HIE组比较,[#] $P<0.05$

图4 NaHS对HIE幼鼠海马小胶质细胞极化的影响

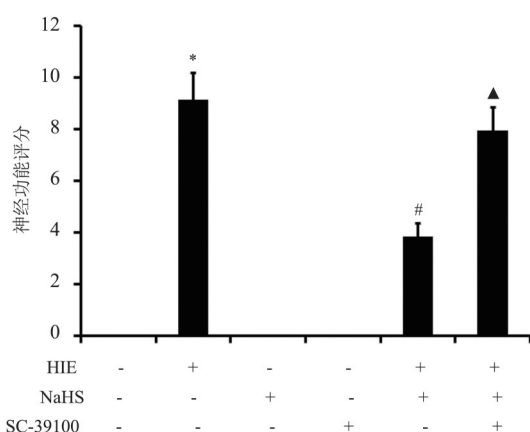
Fig 4 Effect of NaHS on the polarization of hippocampal microglia in juvenile rats with HIE



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 HIE 组比较, # $P < 0.05$

图5 NaHS对HIE幼鼠海马组织中JAK2和STAT3表达水平的影响

Fig 5 Effect of NaHS on the expression levels of JAK2 and STAT3 in the hippocampal tissue of juvenile rats with HIE



与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 HIE 组比较, # $P < 0.05$;

与 HIE+NaHS 组比较, ▲ $P < 0.05$

图6 JAK2/STAT3通路激活剂SC-39100对NaHS改善HIE幼鼠神经功能缺损作用的影响

Fig 6 Effect of JAK2/STAT3 pathway activator SC-39100 on the role of NaHS improving neurological deficits in juvenile rats with HIE

3 讨论

新生儿HIE是脑血流中断和随后发生的缺氧所导致的脑损伤疾患,是导致新生儿死亡甚至终生残疾风险增加的主要原因之一。HIE的病理、生理过程主要有脑血流灌注不足或灌注过度、脑细胞的代谢功能障碍、自由基诱导的损伤及神经元的各种形式的死亡,如凋亡、坏死性凋亡、铁死亡、焦亡和铜死亡等^[12]。由于新生儿的大脑组织中含有较多的不饱和脂肪酸、低水平的抗氧化物质、高含量的

自由基和大量的未成熟细胞等,大脑组织需要更多的氧气供应,因此脑组织对缺血缺氧均异常的敏感。缺氧缺血可触发脑组织中的氧化应激反应,细胞内发生钙过载、自由基的大量产生和酸中毒等,进而激活小胶质细胞,产生神经性炎症反应,最后引发脑组织中各种形式的细胞死亡^[13,14]。新生儿HIE的临床治疗策略以高压氧、亚低温治疗、保持脑部血流灌注等综合措施为主,但临床效果不是很理想^[15]。

H₂S被称为第三种气体信号传递分子,是继一氧化氮、一氧化碳后发现的重要气体信号分子,也被鉴定为新型神经递质,具有臭鸡蛋气味。在身体组织器官如神经系统、心血管系统及肾脏、肝脏中H₂S的含量较高,而在脑组织液中,H₂S浓度可达60~170 μmol/L^[16]。参与神经系统中内源性H₂S合成的关键酶有两种:胱硫醚-β-合成酶(Cystathionine-β-synthase, CBS)和胱硫醚-β-裂解酶。其中CBS多分布于海马、小脑、大脑皮层、脑干等人体的中枢神经组织中,而中枢神经组织中胱硫醚-β-裂解酶只有少量存在^[17]。H₂S具有降低氧化应激、清除氧自由基、抑制脑缺血再灌注损伤、保护神经元等神经保护作用,近年来H₂S的抑制神经炎症功效也备受关注^[18]。研究显示H₂S可抑制神经元中Aβ1-42的合成及其诱导的神经炎症,其机制与组织蛋白酶S的激活和STAT3信号分子的抑制有关^[19]。也有研究发现,H₂S对冰毒(甲基苯丙胺)诱发的神经性炎症有抑制作用,并能减少神经毒性^[20]。

在生物体内,有NaHS和H₂S两种形式的H₂S存在,H₂S与NaHS在液态环境下能保持动态平衡。作为H₂S的供体,NaHS更容易使H₂S的浓度在溶液中保持相对稳定。研究显示,外源性H₂S供体NaHS溶液经腹腔注射后,能穿透血液和大脑屏障,对神经起到保护作用^[21]。研究表明,脑溢血后纹状体内CBS表达降低,外源性H₂S处理后,一定程度上恢复了神经功能的缺失,其机制可能与内源性H₂S水平增高有关^[22]。本研究结果表明,HIE+NaHS组的幼鼠在术后第6天至第30天与HIE模型组相比较体重明显增加,神经功能的评分显著性降低,在海马DG区组织中神经元凋亡明显减少,这些结果表明外源性H₂S保护了HIE幼鼠的神经损伤。

神经炎症反应是导致HIE神经元死亡的重要机制,也是其神经功能受到损害的重要原因。小胶质细胞是一种异质性的功能细胞,表现不同的极化表型,对神经炎症有介导作用。M1型极化的小胶质细胞呈现促炎特征,并释放出肿瘤坏死因子 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12等促炎细胞因子和趋化因子-2等细胞因子。在M1型小胶质细胞中也会表达iNOS,所以iNOS也可以看作是M1型小胶质细胞极化的标志^[23]。M2型极化的小胶质细胞抑制炎症,可分泌包括IL-4、IL-10和转化生长因子- β 等抗炎细胞因子,同时激发Arg1的表达,Arg1也成为M2型小胶质细胞的标志物^[24]。在神经炎的进展过程中,H₂S在调节两种不同极化表型的小胶质细胞功能平衡方面发挥了重要作用。研究发现,CBS-H₂S途径参与了脑缺血后的小胶质细胞介导的神经炎症的调控^[25]。本研究结果表明,与对照组比较,HIE模型组海马组织中iNOS蛋白表达上升,IL-4和IL-10水平下降($P<0.05$),Arg1蛋白表达下降,IL-1 β 和IL-6水平上升;与HIE模型组比较,HIE+NaHS组海马组织中iNOS蛋白表达降低,IL-4和IL-10水平提高,Arg1蛋白表达提高,IL-1 β 和IL-6水平降低。这些研究结果表明,外源性H₂S对HIE幼鼠中小胶质细胞的M1型极化有抑制作用,对M2型极化有诱导作用,进而抑制神经炎症。

小胶质细胞极化的调控机制十分复杂,许多信号路径涉及其中。近几年的研究表明,JAK2/STAT3信号路径对调节小胶质细胞极化作用显著。JAK2是一种无受体依赖的酪氨酸蛋白激酶,而STAT3家族则是位于染色体内的转录因子和JAK2底物。JAK2/STAT3信号通路参与多种生理和病理生理过程,如细胞增殖、细胞分化、凋亡和炎症反应等^[26]。当胞外的细胞因子与其膜上的受体

结合后,信号转导链被激活,从而导致JAK激活,暴露出STAT3的组胺位点,促进STAT3磷酸化,发生核转位,进一步调控目标基因的表达^[27]。研究发现,炎症可导致JAK2/STAT3信号通路活化,而H₂S则起到调节JAK2/STAT3信号通路的作用^[28]。本研究结果显示,与对照组相比较,HIE模型组的幼鼠海马组织中p-JAK2表达水平上调和p-JAK2/t-JAK2比例增加,同时p-STAT3的蛋白表达水平上调和p-STAT3/t-STAT3的比例也明显上升。与HIE模型组相比较,HIE+NaHS组的大鼠海马组织中的p-JAK的蛋白表达水平和p-JAK2/t-JAK2比例均显著降低,同时p-STAT3蛋白表达水平和p-STAT3/t-STAT3的比例都明显下降。进一步的结果发现JAK2/STAT3信号通路激活剂SC-39100可部分逆转NaHS改善HIE幼鼠神经功能缺损的作用。这些结果提示NaHS改善HIE幼鼠神经功能缺损的作用涉及到JAK2/STAT3信号通路的抑制。

综上,本次研究结果表明,外源性H₂S对HIE幼鼠的神经损伤具有保护作用,其机制可能是通过抑制JAK2/STAT3信号通路活化、抑制小胶质细胞M1型极化、诱导M2型极化进而抑制神经炎症的发生而达到的。

作者贡献度说明:

刘剑锋:实验方案的设计,幼鼠缺氧缺血性脑病模型的建立,实验指导,论文构思与撰写;何攀:幼鼠缺氧缺血性脑病模型的建立,动物饲养、给药、体重检测、神经功能评分和取材,ELISA、Western Blot等实验室检测;贺来彪:动物饲养与管理、取材,ELISA、Western Blot等实验室检测;霍佳雯:动物取材、免疫荧光检测、数据整理,统计学分析、论文撰写与修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- 1 Pappas A, Milano G, Chalak LF. Hypoxic-ischemic encephalopathy: Changing outcomes across the spectrum [J]. Clin Perinatol, 2023, 50(1): 31-52.
- 2 刘春阳,曾会勤,刘敏,等. MicroRNA在缺氧缺血性脑病调控机制中的研究进展[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(24): 1907-1913.
- 3 Liu CY, Zeng HQ, Liu M, et al. Research progress of microRNA in the regulatory mechanism of hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. J Hainan Med Univ, 2020, 26(24): 1907-1913.
- 3 Cornwell A, Badiei A. The role of hydrogen sulfide in the retina[J]. Exp Eye Res, 2023, 234: 109568.
- 4 张瑞,王敏,蒋喜秀,等. 硫化氢缓解羰基应激拮抗轴

- 诱导的大鼠肾毒性[J]. 华夏医学, 2024, 37(1): 30-37.
- Zhang R, Wang M, Jiang XX, et al. Hydrogen sulfide antagonizes uranium-induced rats nephrotoxicity by alleviating carbonyl stress[J]. Acta Med Sinica, 2024, 37(1): 30-37.
- 5 Li X, Yin X, Pang J, et al. Hydrogen sulfide inhibits lipopolysaccharide-based neuroinflammation-induced astrocyte polarization after cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Eur J Pharmacol, 2023, 949: 175743.
- 6 张森, 高兴红, 胡源. 和厚朴酚调控 SIRT3 抑制慢性缺氧诱导的小胶质细胞极化[J]. 海南医学院学报, 2024, 30(2): 81-87.
- Zhang M, Gao XH, Hu Y. Effect of Honokiol regulating SIRT3 on chronic hypoxia-induced microglia and astrocyte polarization[J]. J Hainan Med Univ, 2024, 30(2): 81-87.
- 7 Luan HF, Zhao ZB, Zhao QH, et al. Hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia and reperfusion injury mediated by the JAK2/STAT3 survival pathway [J]. Braz J Med Biol Res, 2012, 45(10): 898-905.
- 8 张春青, 唐坤鹏, 闫丽萍, 等. 基于 JAK2/STAT3/SOCS1 信号通路探讨电针不同腧穴对急性结肠炎大鼠的作用机制[J]. 海南医学院学报, 2024, 30(3): 161-167.
- Zhang CQ, Tang KP, Yan LP, et al. Exploring the mechanism of electroacupuncture at different acupoints on acute colitis rats based on JAK2/STAT3/SOCS1 signaling pathway [J]. J Hainan Med Univ, 2024, 30(3): 161-167.
- 9 刘剑锋, 陈杉杉, 冯伟, 等. 硫化氢通过 JAK2/STAT3 通路抑制脂多糖诱导的小胶质细胞 M1 型极化[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2020, 27(3): 184-189, 194.
- Liu JF, Chen SS, Feng W, et al. Hydrogen sulfide inhibits lipopolysaccharide induced M1 polarization in microglia through the JAK2/STAT3 pathway [J]. Chin J Neuroimmunol Neurol, 2020, 27(3): 184-189, 194.
- 10 Li C, Wu Z, Xue H, et al. Ferroptosis contributes to hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: Role of the SIRT1/Nrf2/GPx4 signaling pathway [J]. CNS Neurosci Ther, 2022, 28(12): 2268-2280.
- 11 张洋, 陈美月, 崔莹, 等. 丹参酮 II A 对缺氧缺血性脑病新生大鼠海马组织中 miR-132 表达的调节作用及其机制 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2022, 48(4): 905-914.
- Zhang Y, Chen MY, Cui Y, et al. Effects of tanshinone II A on miR-132 expression in hippocampus tissue of neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy and its mechanism [J]. J Jilin Univ (Med Ed), 2022, 48(4): 905-914.
- 12 Molloy EJ, Branagan A, Hurley T, et al. Neonatal encephalopathy and hypoxic-ischemic encephalopathy: Moving from controversy to consensus definitions and subclassification [J]. Pediatr Res, 2023, 94(6): 1860-1863.
- 13 Li Y, Wisnowski JL, Chalak L, et al. Mild hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE): Timing and pattern of MRI brain injury [J]. Pediatr Res, 2022, 92(6): 1731-1736.
- 14 Montaldo P, Burgod C, Herberg JA, et al. Whole-blood gene expression profile after hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. JAMA Netw Open, 2024, 7(2): e2354433.
- 15 刘滢, 蒋红斌, 赵宇琳, 等. 高压氧结合亚低温治疗新生儿缺氧缺血性脑病的临床效果[J]. 华夏医学, 2022, 35(1): 128-130.
- Liu Y, Jiang HB, Zhao YL, et al. Clinical effect of hyperbaric oxygen combined with hypothermia in the treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Acta Med Sinica, 2022, 35(1): 128-130.
- 16 闵宇懿, 刘璇. 缺氧缺血性脑病新生儿血浆硫化氢水平变化及意义[J]. 黑龙江医学, 2022, 46(6): 698-699.
- Moin YY, Liu X. Changes and significance of hydrogen sulfide levels in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Heilongjiang Med J, 2022, 46(6): 698-699.
- 17 Nam B, Lee W, Sarkar S, et al. *In vivo* detection of hydrogen sulfide in the brain of live mouse: Application in neuroinflammation models [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2022, 49(12): 4073-4087.
- 18 范凌, 陈立锋, 范静. 硫化氢对豚鼠左心室乳头肌电生理特性和收缩能力的影响[J]. 海南医学院学报, 2019, 25(6): 419-423.
- Fan L, Chen LF, Fan J. Effects of hydrogen sulfide on electrophysiological features and contractility of guinea pig ventricular papillary muscle [J]. J Hainan Med Univ, 2019, 25(6): 419-423.
- 19 Aschner M, Skalny AV, Ke T, et al. Hydrogen sulfide H₂S signaling as a protective mechanism against endogenous and exogenous neurotoxins [J]. Curr Neuropharmacol, 2022, 20(10): 1908-1924.
- 20 Ghanbari F, Khaksari M, Vaezi G, et al. Hydrogen sulfide protects hippocampal neurons against methamphetamine neurotoxicity *via* inhibition of apoptosis and neuroinflammation [J]. J Mol Neurosci, 2019, 67(1): 133-141.
- 21 Kumar M, Sandhir R. Hydrogen sulfide attenuates

- hyperhomocysteinemia-induced blood-brain barrier permeability by inhibiting MMP-9 [J]. *Int J Neurosci*, 2022, 132(11): 1061-1071.
- 22 Shan HY, Qiu JP, Chang P, et al. Exogenous hydrogen sulfide offers neuroprotection on intracerebral hemorrhage injury through modulating endogenous H₂S metabolism in mice[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 349.
 - 23 Hsu CH, Pan YJ, Zheng YT, et al. Ultrasound reduces inflammation by modulating M1/M2 polarization of microglia through STAT1/STAT6/PPARgamma signaling pathways[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(12): 4113-4123.
 - 24 Chen W, Gao X, Yang W, et al. Htr2b promotes M1 microglia polarization and neuroinflammation after spinal cord injury *via* inhibition of neuregulin-1/ErbB signaling [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(3): 1643-1654.
 - 25 Shentu YP, Chen MF, Wang H, et al. Hydrogen sulfide ameliorates lipopolysaccharide-induced anxiety-like behavior by inhibiting checkpoint kinase 1 activation in the hippocampus of mice[J]. *Exp Neurol*, 2024, 371: 114586.
 - 26 成桃, 韦燕飞, 刘欢, 等. 基于JAK2/STAT3信号通路探讨白花丹醌对人肝癌细胞迁移和侵袭的影响[J]. *海南医学院学报*, 2023, 29(1): 36-44.
 - Cheng T, Wei YF, Liu H, et al. Effects of plumbagin on migration and invasion of human hepatoma cell line *via* JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *J Hainan Med Univ*, 2023, 29(1): 36-44.
 - 27 Dai XY, Liu L, Song FH, et al. Targeting the JAK2/STAT3 signaling pathway for chronic pain [J]. *Aging Dis*, 2024, 15(1): 186-200.
 - 28 Lei YY, Feng YF, Zeng B, et al. Exogenous H₂S promotes cancer progression by activating JAK2/STAT3 signaling pathway in esophageal EC109 cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(7): 3247-3256.
- [本文编辑] 谭贝加 宋睿璞 朱金月

+++++

(上接第 1326 页)

- 27 Dziąbowska-Grabias K, Sztanke M, Zając P, et al. Antioxidant therapy in inflammatory bowel diseases[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10: 412.
 - 28 李姿慧, 蔡荣林, 孙娟, 等. 参苓白术散对溃疡性结肠炎脾虚湿困证大鼠结肠组织TLR2、MyD88、COX-2表达的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2021, 44(1): 45-53.
 - Li ZH, Cai RL, Sun J, et al. Effects of Shen Ling Bai Zhu San on the expression of TLR2, MyD88, and COX-2 in colon tissue of rats with spleen deficiency and dampness deficiency syndrome of ulcerative colitis [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2021, 44(1): 45-53.
 - 29 Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: An evolutionarily conserved mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73: 3221-3247.
 - 30 Peng S, Shen L, Yu X, et al. The role of Nrf2 in the pathogenesis and treatment of ulcerative colitis[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1200111.
 - 31 Nishikawa S, Inoue Y, Hori Y, et al. Anti-inflammatory activity of kurarinone involves induction of HO-1 *via* the KEAP1/Nrf2 pathway [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9: 842.
 - 32 He F, Ru X, Wen T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 4777.
 - 33 Lu MC, Ji JA, Jiang ZY, et al. The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: An update[J]. *Med Res Rev*, 2016, 36: 924-963.
 - 34 Liu H, Johnston LJ, Wang F, et al. Triggers for the Nrf2/ARE signaling pathway and its nutritional regulation: Potential therapeutic applications of ulcerative colitis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 11411.
- [本文编辑] 谭贝加 宋睿璞 朱金月