



电子、语音版

· 论 著 ·

## 信号转导和转录激活因子 3 调控音猬因子信号途径 对脑出血引发神经损伤的影响

刘蔚然<sup>1</sup>, 王辉<sup>2</sup>, 董晓柳<sup>1</sup>, 张秀清<sup>1</sup>, 宋丽华<sup>1</sup>, 高铭<sup>1</sup>

1. 唐山市人民医院神经康复科, 河北唐山 063000

2. 唐山市开平区医院神经内科, 河北唐山 063000

**摘要:**目的 探究信号转导和转录激活因子 3(STAT3)调控音猬因子(Shh)信号途径对脑出血(ICH)引起神经细胞损伤的影响。方法 将大鼠神经元 PC12 细胞分为对照组和 ICH 模型组,通过 qRT-PCR 和蛋白质印迹检测两组细胞中 STAT3 和 Shh 的 mRNA 和蛋白质表达水平,MTT 分析两组细胞的增殖曲线,流式细胞术检测细胞的凋亡率。将 BALB/c 小鼠随机分为假手术组、ICH 模型组、ICH+PBS 组与 ICH+Stattic 组,通过 HE 染色评估各组小鼠脑损伤情况。使用干扰 RNA 技术敲降 ICH 模型组 PC12 细胞,分组为对照组、ICH 模型组、ICH+shRNA 阴性对照组、ICH+sh-STAT3 组,并为证实 STAT3 对 Shh 的调控作用,同时敲降 STAT3 和 Shh,设置 ICH+sh-STAT3+sh-Shh 组。此外,通过转染过表达载体增加 ICH 模型组 PC12 细胞中 Shh 的表达,分组为对照组、ICH 模型组、ICH+空白载体对照组、ICH+Shh 过表达组。采用 MTT 和流式细胞术检测以上各组增殖曲线和凋亡变化。**结果** 在 ICH 模型组 PC12 细胞和 ICH 模型组小鼠脑组织中 STAT3 mRNA 和蛋白质表达水平增加( $P<0.05$ ),而 Shh 表达减少( $P<0.05$ )。敲降 STAT3 减轻了 ICH 小鼠的脑损伤。敲降 STAT3 后,ICH 模型中 Shh 信号相关蛋白(Shh, SMO 和 Gli-1)表达增加( $P<0.05$ ),ICH 模型组 PC12 细胞的增殖增加( $P<0.05$ ),细胞凋亡率减少( $P<0.05$ )。过表达 Shh 后促进 ICH 模型中 PC12 细胞的增殖( $P<0.05$ ),并且减少了细胞凋亡( $P<0.05$ )。**结论** STAT3 调控 Shh 信号途径影响 ICH 细胞模型中 PC12 细胞的增殖和凋亡水平。

**关键词:**脑出血;信号转导和转录激活因子 3;Shh 信号途径;神经损伤;细胞凋亡

中图分类号:R743

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2025.01.002

### Signal transducer and activator of transcription 3 influences nerve injury caused by intracerebral hemorrhage by regulating the sonic hedgehog signal pathway

LIU Weiran<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>2</sup>, DONG Xiaoliu<sup>1</sup>, ZHANG Xiuqing<sup>1</sup>, SONG Lihua<sup>1</sup>, GAO Ming<sup>1</sup>

1. Department of Neurorehabilitation, Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China

2. Department of Neurology, Tangshan Kaiping District Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China

Corresponding author: LIU Weiran, Email: lwr2022@163.com

**Abstract:** **Objective** To investigate the influence of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) on neural cell injury caused by intracerebral hemorrhage (ICH) by regulating the sonic hedgehog (Shh) signaling pathway. **Methods** Rat neuron PC12 cells were divided into control group and ICH model group, and qRT-PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression levels of STAT3 and Shh. MTT assay was used to analyze the proliferation curve of cells in the two groups, and flow cytometry was used to measure cell apoptosis rate. BALB/c mice were randomly divided into sham-operation group, ICH model group, ICH+PBS group, and ICH+Stattic group. HE staining was used to assess brain injury in each group of mice. PC12 cells in the ICH model group were subjected to knockdown using RNA interference technology and divided into the following groups: control group, ICH model group, ICH + shRNA negative control group, and ICH + sh-STAT3 group. To confirm the regulatory role of STAT3 on Shh, both STAT3 and Shh were knocked down, and the ICH+sh-STAT3+sh-Shh group was established. Additionally, Shh expression was enhanced in ICH model PC12 cells by transfection with overexpression vectors, with the groups categorized as: control group, ICH model group, ICH + empty vector control group, and ICH + Shh overexpression group. Proliferation curves and apoptosis

基金项目:唐山市卫生健康委医学科学研究课题(20211512)。

收稿日期:2024-02-21;修回日期:2024-12-13

通信作者:刘蔚然(1988—),女,主治医师,硕士研究生,Email: lwr2022@163.com。

changes in these groups were analyzed using the MTT assay and flow cytometry. **Results** STAT3 mRNA and protein expression levels were elevated ( $P < 0.05$ ), while Shh expression was reduced ( $P < 0.05$ ) in ICH model PC12 cells and mouse brain tissues. Knockdown of STAT3 alleviated brain injury in ICH model mice. Silencing STAT3 increased the expression of Shh signaling-related proteins (Shh, SMO, and Gli-1) ( $P < 0.05$ ), enhanced proliferation ( $P < 0.05$ ), and reduced apoptosis ( $P < 0.05$ ) in ICH model PC12 cells. Overexpression of Shh promoted proliferation ( $P < 0.05$ ) and decreased apoptosis ( $P < 0.05$ ) in ICH model cells. **Conclusions** STAT3 influences the proliferation and apoptosis of PC12 cells in ICH cell model by regulating the Shh signaling pathway.

**Keywords:** intracerebral hemorrhage; signal transducer and activator of transcription 3; Shh signaling pathway; nerve injury; cell apoptosis

脑卒中是一种急性脑血管疾病,具有高发病率和死亡率的特点<sup>[1-2]</sup>。脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是脑卒中的一种重要类型,约占所有脑卒中的10%~20%。相较于其他类型的脑卒中,ICH具有更高的发病率和死亡率<sup>[3]</sup>。ICH发生时,血液会通过破碎的血管渗入脑实质中,最终导致原发性和继发性脑损伤<sup>[4-5]</sup>。神经功能缺损是ICH严重的后遗症之一<sup>[6]</sup>。在大鼠中的研究表明,ICH导致的脑水肿持续的时间越长,大鼠的神经功能损伤越严重<sup>[7]</sup>。因此,对于ICH引起神经功能损伤的修复对于ICH的治疗至关重要。

信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)的表达与ICH神经功能损伤密切相关<sup>[8-9]</sup>。研究显示,STAT3的激活会增加脑损伤后星形胶质细胞增生<sup>[10]</sup>。并且STAT3通路参与调节ICH损伤后小胶质细胞极化,促进ICH引起的神经炎症<sup>[11]</sup>。通过减少STAT3的磷酸化可以改善ICH引起的神经功能损伤<sup>[12]</sup>。然而关于STAT3特别是STAT3下游调控通路在ICH中尚未有清晰的研究,需要进一步探究。

音猬因子(sonic hedgehog, Shh)是参与调控脊椎动物中枢神经系统的一种主要的信号分子。Shh是哺乳动物前脑分化和生长所必需的一种蛋白质,并且Shh通路参与大脑发育过程中大脑形成的级联反应调控<sup>[13]</sup>。最近的研究证明,Shh信号通路在驱动脑神经损伤后的再生修复中具有突出作用<sup>[14]</sup>。Shh通路还被证实能够参与和保护血脑屏障、减轻脑水肿<sup>[15]</sup>。在非小细胞肺癌的研究中发现STAT3可以调控Shh的基因表达<sup>[16]</sup>。但是关于STAT3是否通过调控Shh通路来影响ICH的神经损伤尚未有报道。本研究在大鼠神经元PC12细胞系和小鼠ICH模型中探究STAT3和Shh通路的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大鼠神经元PC12细胞来自通派(上海)生物科技有限公司;实验BALB/c小鼠购自广东省医学实验动物中心[生产许可证:SCXK(粤)2022-0002,使用许可证:SYXK(粤)2022-0002];苏木素伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);Stattic(STAT3抑制剂)购自Sigma-Aldrich。一步法实时荧光定量PCR(qRT-PCR)试剂盒(SYBR Green)来自上海联迈生物工程有限公司;

ANNEXIN V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);MTT试剂盒/细胞毒性检测试剂盒/细胞增殖检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);RIPA裂解缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);Lipo6000™转染试剂(上海碧云天生物技术有限公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 细胞培养

大鼠神经元PC12细胞在DMEM/Ham's F-12培养基(Gibco)中培养,同时添加双抗(100 u/mL青霉素-链霉素)放置在37 °C含有5%的CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养。根据已报道的方法构建ICH体外模型<sup>[17]</sup>。将PC12细胞分为对照组(未做任何处理)和ICH模型组。ICH模型组PC12细胞在添加了10 μmol/L氯高铁血红素的无葡萄糖培养基中,放置在含1%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、94%N<sub>2</sub>的37 °C缺氧培养箱中培养4 h。然后进行后续检测。

#### 1.2.2 细胞增殖检测

将待检测的PC12细胞以1×10<sup>5</sup>个/孔的密度置于96孔板中。继续培养12、24、36及48 h后,根据MTT试剂盒的说明进行细胞活性的检测。96孔板在490 nm波长处检测吸光度。

#### 1.2.3 ICH小鼠模型构建

将实验小鼠随机分为假手术组、ICH模型组、ICH+PBS组和ICH+STAT3组(每组6~8只)。对小鼠腹腔内注射4%水合氯醛(400 mg/kg)进行麻醉。使用立体定向技术沿小鼠脑中线切开头皮,并在颅骨左侧钻1个孔(额前0.2 mm,侧2.5 mm)。将从股动脉获得的30 μL自体血转移到50 μL注射器中。注射器与微量注射泵相连,针头通过钻孔(深度,距骨表面3.5 mm)插入大脑。在10 min内注射30 μL自体血液。10 min后抽出注射器,ICH+PBS组和ICH+STAT3组小鼠在原位再次注射PBS或者Stattic(5 mg/kg,溶于生理盐水中)。手术后,颅骨孔用骨蜡密封,切口用缝线缝合。为了避免手术后脱水,手术后立即给每只小鼠皮下注射生理盐水(0.5 mL)。假手术组只切开小鼠头皮,不进行后续损伤处理。

#### 1.2.4 HE染色

收集假手术组、ICH模型组、ICH+PBS组和ICH+STAT3组小鼠的脑组织海马区,进行石蜡包埋后制作成

厚3~4 μm的切片。选择具有最大凝块的切片并用HE染色试剂盒进行染色。用徕卡DM6显微镜扫描切。

### 1.2.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

根据试剂盒的说明步骤提取了PC12细胞中的总RNA。然后使用cDNA合成试剂盒将RNA反转录为cDNA。使用SYBR Green进行qRT-PCR检测。GAPDH为内参管家基因。基因相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算。引物序列见表1。

表1 引物序列表

引物名称	序列	引物长度/bp
STAT3	正向:5'-AGCTGCACCTGATCACCTTT-3'	20
	反向:5'-TCTTGGGGTTATTGGTCAGC-3'	20
Shh	正向:5'-AAAAGCTGACCCCTTTAGCC-3'	20
	反向:5'-GCTCCGGTGTTCCTTCATC-3'	20
GAPDH	正向:5'-GCAAGTTCAACGGCACAG-3'	18
	反向:5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3'	20

### 1.2.6 蛋白质印迹检测

PC12细胞和小鼠海马区脑组织中蛋白质通过RIPA裂解液提取后,然后进行BCA蛋白浓度测定。蛋白质(20 μg)进行SDS-PAGE电泳分离后进行转膜处理。在37 °C下,膜与5%的脱脂牛奶封闭处理2 h。接着加入一抗与膜在4 °C过夜作用。PBS洗涤膜5次后在37 °C下,与HRP二级抗体一起孵育2 h。最后加入ECL进行显色处理后通过Image J软件量化条带强度。一抗:anti-STAT3(ab68153, Abcam, 1:1 000);anti-Shh(ab135240, Abcam, 1:1 000);anti-SMO(ab124964, Abcam, 1:1 000);anti-GLi-1(ab273018, Abcam, 1:1 000);anti-GAPDH(ab8245, Abcam, 1:1 000)。使用凝胶成像系统(WD-9413B)对印迹条带进行成像,并通过Gel-Pro-Analyzer软件(Media Cybernetics)进行分析。实验重复进行3次,所有蛋白质水平平均标准化为GAPDH的表达(靶蛋白值/GAPDH值)。

### 1.2.7 细胞转染

使用shRNA敲降ICH模型组PC12细胞,分组为对照组、ICH模型组、ICH+shRNA阴性对照组、ICH+sh-STAT3

组;并为证实STAT3对Shh的调控作用,同时敲降STAT3和Shh,设置ICH+sh-STAT3+sh-Shh组。此外,通过转染Shh过表达载体增加ICH模型组PC12细胞中Shh的表达,分组为对照组、ICH模型组、ICH+空白载体对照组、ICH+Shh过表达组。STAT3特异性的短发夹RNA(shRNA)、Shh过表达载体和特异性的短发夹RNA都由吉玛生物科技有限公司(上海)设计并合成。PC12细胞在6孔板中贴壁生长至70%~80%时,使用Lipo 6000™转染试剂进行载体的PC12细胞转染。

### 1.2.8 细胞凋亡

根据ANNEXIN V-FITC/PI凋亡检测试剂盒的操作说明对PC12细胞进行处理后使用流式细胞仪(Becton Dickinson, CA, USA)进行上机样品分析。以FITC标记的Annexin V作为探针,FITC最大激发波长为488 nm,最大发射波长525 nm,FITC的绿色荧光在FL1通道检测;PI-DNA复合物的最大激发波长为535 nm,最大发射波长为615 nm,PI的红色荧光在FL2或FL3通道检测。通过软件分析,绘制双色散点图,FITC为横坐标,PI为纵坐标。细胞凋亡比例=第三象限(UR)+第三象限(LR)值。通过以上方法检测PC12细胞对照组、ICH模型组、ICH+shRNA阴性对照组、ICH+sh-STAT3组、ICH+sh-STAT3+sh-Shh组凋亡水平的变化。

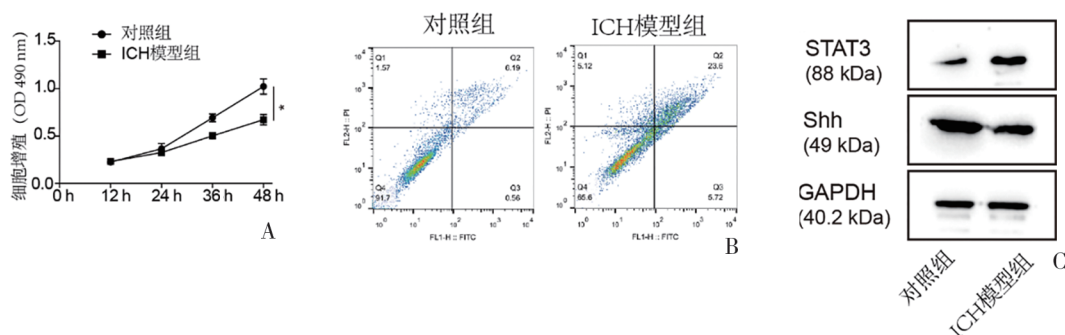
### 1.3 统计学方法

所有数据通过GraphPad Prism 5.0软件进行分析。计量资料使用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较使用独立样本t检验,多组间比较采用方差分析(ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ICH体外模型中STAT3、Shh的表达情况

与对照组相比,ICH模型组的48 h时细胞活性减少( $P < 0.05$ ),而凋亡率增加( $P < 0.05$ )。ICH模型组细胞中STAT3的转录水平增加,Shh的转录水平减少( $P < 0.05$ )。蛋白质印迹检测蛋白质水平的表达也发现同样的趋势。在ICH模型组细胞中STAT3蛋白质表达增加,而Shh蛋白质表达减少( $P < 0.05$ )。见图1,表2。



A: MTT分析PC12细胞增殖;B:流式细胞仪检测PC12细胞凋亡比例;C:蛋白质印迹检测PC12细胞中STAT3和Shh的表达水平。\*,组间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

图1 ICH体外模型的PC12细胞增殖、凋亡以及STAT3和Shh蛋白质的表达情况

表2 ICH体外模型的细胞增殖、凋亡和相关基因和蛋白质的表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

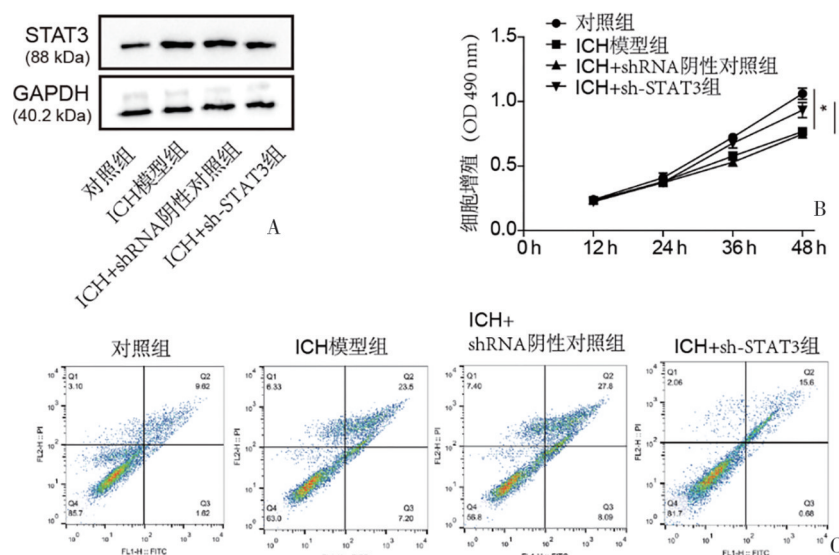
组别	n	细胞增殖(48 h)	细胞凋亡比例	STAT3 mRNA	Shh mRNA	STAT3蛋白质	Shh蛋白质
对照组	3	1.023±0.080	7.090±2.408	1.040±0.085	1.023±0.111	0.237±0.117	0.653±0.123
ICH模型组	3	0.673±0.055	30.080±2.857	2.420±0.141	0.473±0.189	0.833±0.093	0.293±0.076
t值		6.231	10.66	14.44	4.354	6.926	4.296
P值		0.003	0.000	0.000	0.012	0.002	0.013

### 2.2 敲降STAT3对ICH模型细胞增殖和凋亡的影响

通过向PC12细胞转染STAT3特异性的短发夹RNA (sh-STAT3)后,ICH模型细胞中STAT3 mRNA和蛋白质的表达水平降低(见图2A,表3, $P<0.05$ )。并且增加了ICH细胞的增殖活性(见图2B, $P<0.05$ ),细胞凋亡率也因为STAT3表达的降低而减少(见图2C, $P<0.05$ )。

### 2.3 抑制STAT3对ICH小鼠的影响

与假手术组相比,ICH小鼠出现了严重的脑损伤,而使用STAT3抑制剂处理后,小鼠脑损伤出现了缓解( $P<0.05$ )。蛋白质印迹检测显示,ICH小鼠脑组织中STAT3蛋白质水平增加,Shh蛋白水平降低;而STAT3抑制剂减少了小鼠脑组织中STAT3蛋白质水平,增加了Shh蛋白水平( $P<0.05$ )。见图3。



A: 蛋白质印迹检测PC12细胞中STAT3蛋白质的表达水平;B: MTT检测PC12细胞增殖;C: 流式细胞术检测PC12细胞凋亡。  
\*: 对照组与ICH模型组比较,ICH+shRNA阴性对照组与ICH+sh-STAT3组比较,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。

图2 敲降STAT3对ICH模型STAT3蛋白表达以及PC细胞增殖和凋亡的影响

表3 敲降STAT3对ICH模型细胞增殖和凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	STAT3 mRNA	STAT3蛋白质	细胞增殖(48 h)	细胞凋亡比例
对照组	3	1.040±0.085	0.373±0.071	1.060±0.044	10.840±2.049
ICH模型组	3	2.220±0.121	0.777±0.081	0.767±0.021	32.490±1.982
ICH+shRNA阴性对照组	3	2.323±0.087	0.720±0.076	0.747±0.021	33.610±2.139
ICH+sh-STAT3组	3	1.300±0.145*	0.517±0.065*	0.933±0.0586*	16.030±1.694*
F值		98.750	19.330	42.470	102.400
P值		0.000	0.001	0.000	0.000

注: \*与ICH+shRNA阴性对照组比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

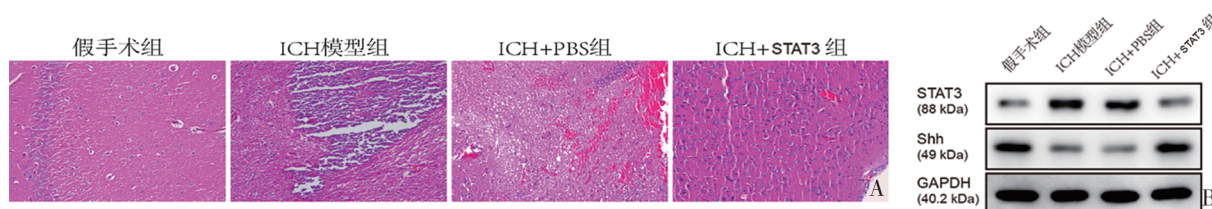
### 2.4 敲低STAT3对Shh通路的影响

ICH+shRNA阴性对照组与ICH+sh-STAT3组比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),STAT3表达水平降低后Shh基因的转录水平增加。蛋白质印迹检测

结果显示STAT3表达下调后,Shh通路相关蛋白质Shh、SMO、GLi-1表达增加( $P<0.05$ )。见表4,图4。

### 2.5 过表达Shh对ICH模型细胞增殖和凋亡的影响

ICH+空载体对照组与ICH+Shh过表达组比较,差异



A: HE 染色检测小鼠脑组织损伤情况;B: 蛋白质印迹检测小鼠脑组织中 STAT3 和 Shh 蛋白质的表达水平。

图3 抑制 STAT3 对 ICH 小鼠脑损伤以及 STAT3 和 Shh 蛋白表达的影响

表4 敲降 STAT3 对 Shh 通路相关蛋白质表达的影响比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Shh mRNA	Shh/GAPDH 蛋白质	SMO/GAPDH 蛋白质	GLI-1/GAPDH 蛋白质
对照组	3	1.003±0.086	0.733±0.047	0.950±0.070	0.793±0.061
ICH 模型组	3	0.513±0.055	0.267±0.074	0.467±0.086	0.287±0.042
ICH+shRNA 阴性对照组	3	0.490±0.066	0.303±0.061	0.460±0.046	0.323±0.060
ICH+sh-STAT3 组	3	0.843±0.086*	0.683±0.060*	0.927±0.068*	0.720±0.089*
F 值		34.390	48.200	47.400	48.790
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:\*与 ICH+shRNA 阴性对照组比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

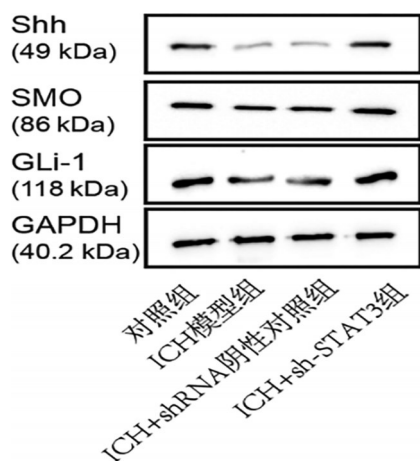


图4 蛋白质印迹检测 Shh 通路相关蛋白质的表达水平

具有统计学意义( $P<0.05$ )(见表5),向 ICH 细胞模型转染 Shh 基因的表达载体(oe-Shh),增加了 Shh 基因表达水平。增加 Shh 表达后 ICH 模型细胞的增殖也提高(见图 5A,  $P<0.05$ )。并且细胞的凋亡率也因为 Shh 的表达增加而受到了抑制(见图 5B,  $P<0.05$ )。

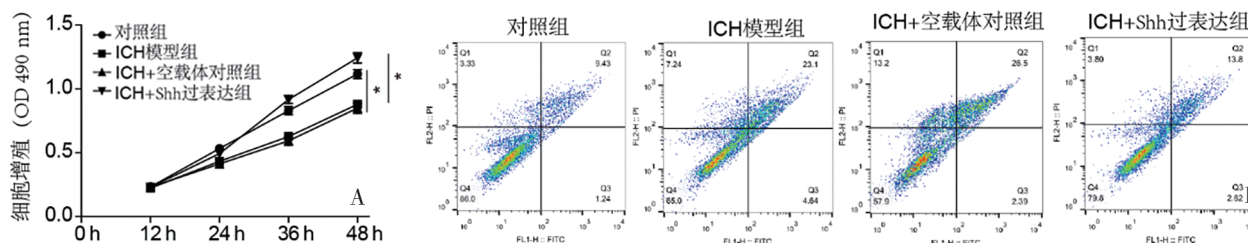
表5 过表达 Shh 对 ICH 模型细胞增殖和凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Shh mRNA	细胞增殖(48 h)	细胞凋亡比例
对照组	3	0.967±0.074	1.117±0.035	12.070±1.896
ICH 模型组	3	0.437±0.067	0.880±0.026	28.980±1.413
ICH+空载体对照组	3	0.470±0.076	0.850±0.040	29.430±1.778
ICH+Shh 过表达组	3	1.120±0.105*	1.234±0.040*	14.300±2.081*
F 值		54.060	83.380	79.290
P 值		0.000	0.000	0.000

注:\*与 ICH+空载体对照组比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

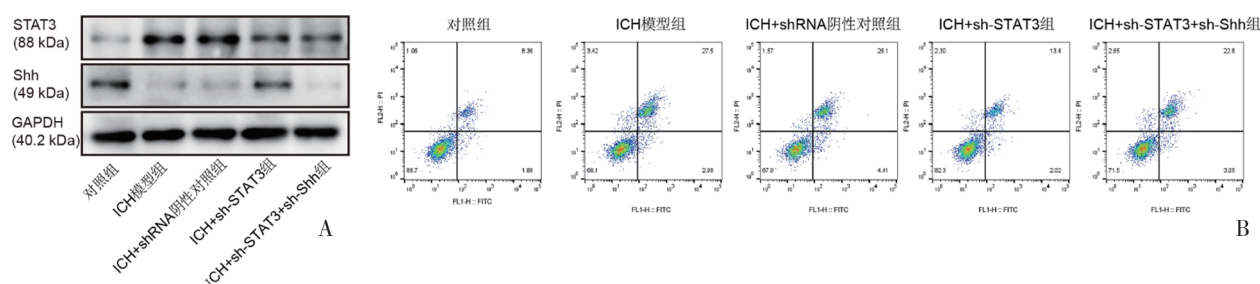
## 2.6 STAT3 调控 Shh 信号途径影响 PC12 细胞增殖和凋亡

向 ICH 细胞模型中同时转染 STAT3 和 Shh 基因的干扰 RNA。在 ICH 模型中敲低 STAT3 降低了 STAT3 蛋白的表达,增加了 Shh 的表达( $P<0.05$ )(见图 6,表 6)。,而同时敲降 Shh 后 STAT3 蛋白水平不变,Shh 蛋白质水平降低( $P<0.05$ )(见图 6,表 6)。检测细胞增殖发现,敲低 STAT3 增加了 ICH 模型细胞的活性,降低了细胞凋亡比例,而同时敲低 Shh 后逆转了这一变化( $P<0.05$ )。



A: MTT 检测 PC12 细胞增殖;B: 流式细胞术检测 PC12 细胞凋亡比例。\*: 对照组与 ICH 模型组比较, ICH+空载体对照组与 ICH+Shh 过表达组比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

图5 过表达 Shh 对 ICH 模型 PC12 细胞增殖和凋亡的影响



A: 蛋白质印迹检测STAT3和Shh蛋白质的表达水平; B: 流式细胞术检测PC12细胞凋亡比例。

图6 同时敲降STAT3和Shh对ICH模型PC12细胞STAT3和Shh蛋白表达及凋亡的影响

表6 同时敲降STAT3和Shh对ICH模型细胞增殖和凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	STAT3蛋白质	Shh蛋白质	细胞增殖(48 h)	细胞凋亡比例
对照组	3	0.168±0.066	0.581±0.075	1.177±0.055	9.930±1.467
ICH模型组	3	0.671±0.081	0.145±0.057	0.873±0.057	29.860±1.950
ICH+shRNA 阴性对照组	3	0.665±0.101*	0.181±0.055*	0.913±0.025*	31.020±2.372*
ICH+sh-STAT3组	3	0.324±0.055	0.429±0.054	1.310±0.030	15.570±1.979
ICH+sh-STAT3+sh-Shh组	3	0.283±0.061	0.109±0.050*	0.907±0.050*	25.470±2.408*
F值		28.770	36.600	55.560	60.160
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:\*为与ICH+sh-STAT3组比较,差异具有统计学意义(P<0.05)。

### 3 讨论

ICH能够导致患者血肿周围脑组织出现神经元坏死或凋亡,并且进一步导致脑组织发生炎症反应和氧化应激<sup>[18-20]</sup>。本研究通过在大鼠神经元PC12细胞和小鼠模型中进行ICH导致神经损伤的机制探究(见图7)。结果发现在ICH体外PC12细胞模型中STAT3通过抑制Shh信号途径从而诱导PC12细胞凋亡水平增加。进一步明确了STAT3在ICH中的调控网络。

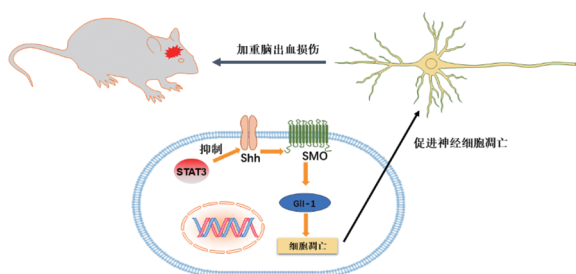


图7 ICH致神经损伤的机制图

研究显示,STAT3激活对ICH后神经修复产生负面调节的影响<sup>[21]</sup>。最新的一项研究证实,抑制STAT3信号通路能够减少ICH导致的血肿组织周围神经元损伤,改善脑水肿,促进出血后神经功能的恢复<sup>[22]</sup>。并且STAT3的激活加重ICH大鼠模型的脑损伤和原代脑微血管内皮细胞的功能障碍<sup>[23]</sup>。这些结果与本研究的结论一致,本研究首次在大鼠神经元细胞中进行了STAT3的功能探究,并且发现ICH处理后细胞中STAT3表达增加。接着,

通过敲降STAT3后ICH模型细胞的增殖增加,细胞凋亡减少。表明抑制STAT3的表达能够减轻PC12细胞的损伤。这些结果都进一步说明了STAT3在ICH引起的神经损伤中的重要调控作用。

Shh信号介导响应大鼠中枢神经系统损伤的再生功能<sup>[24]</sup>。通过在PC12细胞中也证实,Shh信号在ICH细胞模型中被抑制,而过表达Shh促进了ICH模型细胞的增殖,抑制细胞凋亡率。最近的一个研究发现Shh通过激活Ptc1信号通路,对抗谷氨酸神经毒性来保护多发性梗死性痴呆大鼠免于记忆丧失<sup>[25]</sup>。在脑梗死后缺血区的血管生成调控研究中发现,miRNA-153上调激活了Shh信号通路,从而促进脑缺血大鼠血管生成并改善预后<sup>[26]</sup>。在本研究中发现PC12细胞中敲降STAT3后Shh表达增加,并且在PC12细胞中首次发现了STAT3可通过抑制Shh通路从而加剧ICH神经损伤。

总之,本研究在PC12中证实了STAT3对Shh信号通路激活具有的调控作用,并且STAT3通过Shh通路调控PC12细胞的增殖和凋亡水平。然而对于STAT3对Shh的具体作用机制仍是未来研究的重点。本研究为ICH的治疗提供了新的可能的靶标基因,并且对于ICH的靶向治疗研究都具有重要的意义。

### 参 考 文 献

[1] TIAN G, JI Z, LIN ZZ, et al. Cerebral autoregulation is heterogeneous in different stroke mechanism of ischemic stroke caused by intracranial atherosclerotic stenosis[J]. Brain Behav, 2021, 11(1): e01907.

- [2] 沈艳平, 朱天瑞, 赵彦新. 白细胞介素-20与急性缺血性脑卒中的关系[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2023, 50(4): 76-79.
- [3] GARG R, BILLER J. Recent advances in spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. F1000Res, 2019, 8: F1000 Faculty Rev-302.
- [4] KANG M, YAO Y. Oligodendrocytes in intracerebral hemorrhage[J]. CNS Neurosci Ther, 2019, 25(10): 1075-1084.
- [5] 孙瑜, 魏爱宣, 徐忠信. 急性缺血性卒中静脉溶栓后脑出血的危险因素及临床特点分析[J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(12): 1817-1819.
- [6] YANG Y, TAN X, XU JG, et al. Luteolin alleviates neuroinflammation via downregulating the TLR4/TRAF6/NF- $\kappa$ B pathway after intracerebral hemorrhage[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 126: 110044.
- [7] WANG CY, CAO JW, DUAN SR, et al. Effect of MicroRNA-126a-3p on bone marrow mesenchymal stem cells repairing blood-brain barrier and nerve injury after intracerebral hemorrhage[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2020, 29(5): 104748.
- [8] ZHU H, JIAN ZH, ZHONG Y, et al. Janus kinase inhibition ameliorates ischemic stroke injury and neuroinflammation through reducing NLRP3 inflammasome activation *via* JAK2/STAT3 pathway inhibition[J]. Front Immunol, 2021, 12: 714943.
- [9] 倪敏崑, 赵玉文, 秦都, 等. JAK2-STAT3通路在心脑血管疾病的应用[J]. 家庭生活指南, 2020(10): 167-168.
- [10] LI ZW, SONG YY, HE TT, et al. M2 microglial small extracellular vesicles reduce glial scar formation via the miR-124/STAT3 pathway after ischemic stroke in mice[J]. Theranostics, 2021, 11(3): 1232-1248.
- [11] LI SS, HUA XY, ZHENG MX, et al. PLXNA2 knockdown promotes M2 microglia polarization through mTOR/STAT3 signaling to improve functional recovery in rats after cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Exp Neurol, 2021, 346: 113854.
- [12] LI L, SUN LL, QIU Y, et al. Protective effect of stachydrine against cerebral ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation and apoptosis through P65 and JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 64.
- [13] SAGAI T, AMANO T, MAENO A, et al. SHH signaling mediated by a prechordal and brain enhancer controls forebrain organization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(47): 23636-23642.
- [14] MOREAU N, BOUCHER Y. Hedging against neuropathic pain: role of hedgehog signaling in pathological nerve healing[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23): 9115.
- [15] XING GBL, ZHAO TM, ZHANG XY, et al. Astrocytic sonic hedgehog alleviates intracerebral hemorrhagic brain injury via modulation of blood-brain barrier integrity[J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 575690.
- [16] YUAN LP, ZHANG HY, LIU JB, et al. STAT3 is required for Smo-dependent signaling and mediates Smo-targeted treatment resistance and tumorigenesis in Shh medulloblastoma[J]. Mol Oncol, 2022, 16(4): 1009-1025.
- [17] ZHENG XC, GAO JL, ZHAO MM, et al. Honokiol attenuates mitochondrial fission and cell apoptosis by activating Sirt3 in intracerebral hemorrhage[J]. Chin Med J (Engl), 2023, 136(6): 719-731.
- [18] WANG L, ZHENG SY, ZHANG L, et al. Histone deacetylation 10 alleviates inflammation after intracerebral hemorrhage via the PTPN22/NLRP3 pathway in rats[J]. Neuroscience, 2020, 432: 247-259.
- [19] SHI H, SU ZL, SU H, et al. Mild hypothermia improves brain injury in rats with intracerebral hemorrhage by inhibiting IRAK2/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Brain Behav, 2021, 11(1): e01947.
- [20] 管天媛, 肖伊宁, 吕佩源. 胰高血糖素样肽1受体激动剂在神经保护方面的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2022, 49(6): 82-86.
- [21] LI HT, ZHOU HJ. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 signaling attenuates neurogenesis in a rat model of intracerebral hemorrhage[J/OL]. Turk Neurosurg, 2018. (2018-09-03) [2023-12-10]. DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.23665-18.3.
- [22] XIONG J, ZHOU H, LU DL, et al. Levetiracetam reduces early inflammatory response after experimental intracerebral hemorrhage by regulating the Janus kinase 2 (JAK2)-signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e922741.
- [23] XIE LJ, WANG YY, CHEN Z. Early growth response protein 1 knockdown alleviates the cerebral injury in rats with intracerebral hemorrhage via STAT3/NF- $\kappa$ B pathway by reducing RXR $\alpha$  acetylation level[J]. Neuroscience, 2022, 487: 120-130.
- [24] ZHAO H, GAO XY, WU XJ, et al. The Shh/Gli1 signaling pathway regulates regeneration via transcription factor Olig1 expression after focal cerebral ischemia in rats[J]. Neurol Res, 2022, 44(4): 318-330.
- [25] LI XQ, WEN W, LI P, et al. Mitochondrial protection and against glutamate neurotoxicity via Shh/Ptch1 signaling pathway to ameliorate cognitive dysfunction by Kaixin San in multi-infarct dementia rats[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 5590745.
- [26] WANG BX, XU JJ, HU J, et al. Effects of miR-153 on angiogenesis in MCAO rats through Shh signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(2): 732-739.

责任编辑:王荣兵