

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211215.1154.014.html\(2021-12-16\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211215.1154.014.html(2021-12-16))

普罗布考对脑出血模型小鼠血肿周围脑组织 MST1 和 LATS1 及 YAP 蛋白表达的影响*

董晓柳¹,刘蔚然¹,高 铭¹,司味鑫¹,张秀清¹,宋丽华¹,张 利²,董 伟²

(河北省唐山市人民医院:1.神经康复科;2.神经外科 063000)

[摘要] **目的** 观察普罗布考对脑出血(ICH)小鼠血肿周围脑组织哺乳动物不育系 20 样激酶(MST1)、大肿瘤抑制因子 1(LATS1)及 Yes 相关蛋白-1(YAP)表达的影响,探寻普罗布考发挥脑保护作用的可能机制。**方法** 将 54 只雄性 C57BL/6J 小鼠按随机数字表法分为假手术组(sham 组)、ICH 模型组(ICH 组)、ICH 模型+普罗布考治疗组(ICH+PB 组),每组 18 只。采用胶原酶法制作 ICH 模型。ICH+PB 组于造模后 6 h 开始灌胃给药普罗布考($500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),sham 组和 ICH 组于相应时间点给予等体积的生理盐水。在 ICH 后 1、3 d 采用神经功能损伤(mNSS)评分对小鼠进行神经功能学评价;在 ICH 后第 3 天,采用伊文思蓝(EB)渗透法检测小鼠脑组织 EB 含量;采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)法检测血肿周围脑组织神经元细胞凋亡情况;采用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测血肿周围脑组织 MST1、LATS1 和 YAP 的表达水平。**结果** 与 sham 组比较,ICH 组小鼠脑组织含水量、EB 含量、血肿周围脑组织中神经元细胞凋亡数、磷酸化 MST1(p-MST1)和 p-LATS1 及 p-YAP 表达水平明显升高,mNSS 评分也明显增加($P < 0.05$)。与 ICH 组比较,ICH+PB 组小鼠脑组织含水量、EB 含量、血肿周围脑组织中神经元细胞凋亡数及 p-MST1、p-LATS1 和 p-YAP 表达水平明显下降,mNSS 评分也明显降低($P < 0.05$)。**结论** 普罗布考可通过下调 p-MST1、p-LATS1 及 p-YAP 表达,发挥对 ICH 模型小鼠的脑保护作用。

[关键词] 脑出血;普罗布考;哺乳动物不育系 20 样激酶;大肿瘤抑制因子 1;Yes 相关蛋白-1**[中图法分类号]** R743.34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)07-1100-06

Effects of probucol on the expression of MST1, LATS1 and YAP protein in brain tissue around hematoma in the model mice with intracerebral hemorrhage*

DONG Xiaoliu¹, LIU Weiran¹, GAO Ming¹, SI Weixin¹, ZHAGN Xiuqing¹,SONG Lihua¹, ZHAGN Li², DONG Wei²

(1. Department of Neurorehabilitation; 2. Department of Neurosurgery,

Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of probucol on the expression of mammalian sterile 20-like kinase 1 (MST1), large tumor suppressor 1 (LATS1) and Yes associated protein (YAP) in the brain tissue around hematoma of the intracerebral hemorrhage (ICH) mice, and to explore the possible mechanism of probucol's brain protection. **Methods** A total of 54 male C57BL/6J mice were randomly divided into the sham operation group (the sham group), the ICH model group (the ICH group) and the ICH model + probucol treatment group (the ICH+PB group) by random number table method, with 18 mice in each group. Collagenase method was used to make the ICH model. The ICH+PB group was given probucol intragastric administration ($500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) at six hours after modeling, while the sham group and ICH group were given equal volume of normal saline at the corresponding time points. MNSS scores were used to evaluate the neurological function of the mice on the 1st and 3rd day after the ICH. On the 3rd day after the ICH, the Evans Blue (EB) leakage method was used to detect the content of EB in the brain tissue of the mice. Deoxyribonucleotide terminal transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) method was used to detect the cell apoptosis in the brain tissue around the hematoma. Western-blot method was used to detect the expression levels of MST1, LATS1

* 基金项目:唐山市人才资助项目(CA202010019);河北省医学科学研究课题计划项目(20211512)。 作者简介:董晓柳(1981-),副主任医师,博士,主要从事脑血管疾病的临床及基础研究。

and YAP in the brain tissue around the hematoma. **Results** Compared with those of the sham group, the water content, EB content, apoptosis number in the brain tissue around hematoma, mNSS score, p-MST1, p-LATS1 and p-YAP protein expression levels in the ICH group significantly increased ($P < 0.05$). Compared with those of the ICH group, the water content, EB content, apoptosis number in the brain tissue around hematoma, mNSS score, p-MST1, p-LATS1 and p-YAP protein expression levels in the ICH + PB group decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Probuco can protect the brain of the ICH model mice by down-regulating the expression levels of p-MST1, p-LATS1 and p-YAP.

[Key words] intracerebral hemorrhage; probuconol; mammalian sterile 20-like kinase 1; large tumor suppressor 1; Yes associated protein

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是指非外伤性脑实质内出血, 临床症状主要表现为脑卒中发作, 出现头痛、呕吐、偏身瘫痪及(或)感觉障碍甚至意识障碍等, 仅有 20% 的患者在 ICH 后 6 个月达到功能独立^[1-2], 是死亡率和致残率较高的疾病。因此, 截至目前 ICH 的防治仍是我国疾病防控的重点。普罗布考不仅具有降脂、抗氧化等作用, 亦具有抗炎、减轻脑水肿、改善认知功能、减轻神经功能障碍等脑保护作用^[3], 但其发挥保护作用的具体机制目前尚不清楚。Hippo 信号通路是首次在果蝇体内被发现^[4], 在组织修复、调控组织器官大小、调节细胞增殖与凋亡等方面具有重要的作用^[5]。哺乳动物不育系 20 样激酶(MST1)是 Hippo 信号通路的核心组件, 大肿瘤抑制因子 1(LATS1)是 Hippo 通路的核心激酶^[6], 其下游分子 Yes 相关蛋白-1(YAP)是 Hippo 通路的主要转录调控激活因子^[7]。有研究报道, 在 ICH 中, 抑制 Hippo 通路可减轻脑损伤^[8]。然而, 普罗布考是否通过 Hippo 通路在 ICH 脑损伤中发挥保护作用目前尚不明确。因此本研究通过观察普罗布考对 MST1 和 LATS1 及 YAP 表达的影响, 为急性期 ICH 临床治疗寻找新靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

正常健康雄性 C57BL/6J 小鼠, 6~8 周龄, 体重 20~25 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司[许可证号: SCXK(京)2019-0008]。实验动物在华北理工大学屏障环境动物实验室由专人饲养, 饲养条件为通风, 清洁, 自然光线 12 h/12 h 昼夜交替照明, 昼夜室温控制在 20~25 °C, 相对湿度控制在 45%~55%, 分笼饲养, 避免强光及噪音, 给予充足自来水和标准颗粒饲料喂养。动物适应性喂养 7 d 后进行造模, 在实验设计及实际操作过程中尽可能降低实验动物的需要量, 尽量避免实验动物因不合理操作导致死亡, 同时减轻其在实验过程中所承受的痛苦。

1.2 药物与试剂

普罗布考片(齐鲁制药有限公司, 批准文号: 国药准字 H10980054); 兔抗 MST1 抗体、兔抗 p-MST1 抗体、兔抗 p-YAP 抗体、兔抗 YAP 抗体、兔抗 p-LATS1、兔抗 LATS1(美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号: 49332、14946、13008、14074、8654、

3477); 兔抗 Neun 抗体(美国 Abcam 公司, 批号: ab177487); 兔抗 β -肌动蛋白抗体、HRP 标记的山羊抗兔二抗(北京中山金桥, 货号: TA-09、87768); 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)试剂盒、伊文思蓝(EB)染液(北京索莱宝科技有限公司, 货号: T2190、314-13-6)。

1.3 主要仪器

脑立体定位仪(北京金洋万达科技有限公司); Tissuelyser-192 组织匀浆仪(上海净信实业发展有限公司); 12003153 型凝胶成像仪、酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。CM1900 型冰冻切片仪(德国 Leica 公司); 免疫荧光显微镜(日本 Nikon 公司); -80 °C 冰箱(海尔公司); 恒温水浴箱(美国 Amersham Biosciences 公司)。

1.4 动物分组及给药方法

采用随机数字表法将实验小鼠分为假手术组(sham 组)、ICH 模型组(ICH 组)、ICH 模型 + 普罗布考治疗组(ICH + PB 组), 每组 18 只。ICH + PB 组于造模后 6 h 开始灌胃给药普罗布考($500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), sham 组和 ICH 组于相应时间点给予等体积的生理盐水。

1.5 模型制备

采用胶原酶法制作小鼠 ICH 模型^[9]。将 0.037 5 U 的细菌胶原酶溶于 0.5 μL 0.9% 生理盐水, 避光放置于冰上备用。造模前 12 h 禁食, 4 h 禁饮, 5% 水合氯醛(0.7 mL/kg)腹腔注射麻醉小鼠, 将其固定在脑立体定位仪上, 沿矢状位作一长 1 cm 的皮肤切口, 前囟为原点, 向前 0.5 mm、向右 2.3 mm 处钻一直径为 1 mm 小圆孔作为注射孔, 将吸入细菌胶原酶溶液的微量注射器固定好, 针头沿注射孔垂直缓慢插入脑实质, 深度约 3.7 mm, 以 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度注入细菌胶原酶溶液, 注射完毕后停针 10 min, 缓慢向上拔针, 每向上拔针 1 mm 停针 5 min, 直至全部拔出^[10]。最后用骨蜡封闭注射孔, 手术线缝合伤口, 碘伏消毒。sham 组除不注射细菌胶原酶溶液外, 其余操作均与 ICH 组一致。根据 BEDERSON 等^[11]的评定方法分为 3 级, 0 级: 没有神经缺失症状; 1 级: 提尾, 瘫痪侧前肢回收屈曲腹下, 健侧前肢向地面伸展; 2 级: 除了有 1 级体征外, 向瘫痪侧推小鼠时手所受到的阻力较对侧明显变小; 3 级: 除以上体征外, 小

鼠行走时向瘫痪侧旋转或倾倒。ICH 后 1 h 对小鼠进行评定。评定达 1、2、3 级判断为造模成功。

1.6 神经功能行为学评价

神经功能评估采用改良的神经功能损伤(mNSS)评分,主要包括感觉、运动、反射及平衡功能^[12]等,分别在 ICH 后第 1、3 天分别进行。0 分无神经功能缺损;1~6 分为轻度神经功能缺损;7~12 分为中度神经功能缺损;13~18 分为重度神经功能缺损。

1.7 脑组织含水量测定

采用经典干湿重法测量各组小鼠脑组织含水量,含水量的多少可以反映脑水肿的严重程度。于 ICH 后第 3 天水肿高峰期时,采用颈椎脱臼法处死小鼠,取新鲜脑组织,自中线将大脑切分为左右两个半球,并分离出小脑组织。电子天平称得 3 部分组织湿重并记录(精确到 0.1 mg)。测完后分别用锡纸包裹好,迅速置于 100 °C 烤箱中,24 h 后再称重,此时称得的重量即为干重。计算脑组织含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.8 血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)渗透性测定

采用 EB 作为示踪剂来评估 BBB 渗透性。于 ICH 后第 3 天,尾静脉注射 2% EB(2 mL/kg),注射成功标志:小鼠巩膜、耳廓、手掌、脚掌等部位迅速变为蓝色。注射成功 2 h 后,行心脏灌注后断头取脑,去掉嗅球及小脑,将取得的大脑半球在精度为 0.1 mg 的电子天平上称质量后将脑组织匀浆,并将其加入装有 5 mL 二甲基甲酰胺的试管中,于 60 °C 恒温水浴锅孵育 72 h,离心弃去沉淀,取上清液检测。采用分光光度计于波长 450 nm 的波谱处分析、测定吸光度(A)值,绘制标准曲线,根据以下方程计算脑组织 EB 含量:脑组织中 EB 含量($\mu\text{g/g}$)=EB 浓度×二甲基甲酰胺体积(mL)/湿重(g)。

1.9 神经元细胞凋亡检测方法

采用 TUNEL 法检测神经元细胞凋亡情况。于 ICH 后第 3 天,行心脏灌注取脑,脑组织冰冻切片均采用 0.3% Triton-X100 打孔,3% 牛血清清蛋白(BSA)封闭,PBS 洗 3 次,每次 5 min,滴加神经元标志蛋白 Neun 一抗(1:500),4 °C 过夜,在预先混合好的 TUNEL 反应液中加入荧光二抗,滴加 40 μL 于玻片上,37 °C 湿盒内避光孵育 2 h,PBS 洗 3 次,每次 5 min,封片,荧光显微镜下观察免疫荧光结果。

1.10 MST1、LATS1、YAP 表达情况检测

采用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测血肿周围脑组织 MST1、LATS1 和 YAP 的表达变化。于给药后第 3 天,行心脏灌注取脑,取 200 mg 脑组织,加入 1 mL 预冷的(RIPA)缓冲液及 10 μL 苯甲基磺酰氟(PMSF)裂解组织,组织匀浆仪研磨后,冰上放置 30 min。将匀浆好的脑组织移入离心管中,离心,取上清液。应用蛋白浓度测量仪测定蛋白浓度,将提取的蛋白加入 4×上样缓冲液,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白,转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,用 TBST 于摇床上摇洗 3 次,每次 10

min,洗完后将 PVDF 膜放入含有 5% 脱脂奶粉的容器中,常温慢摇 1 h 进行封闭。将膜与一抗(兔抗 MST1 抗体稀释比例 1:1 000;兔抗 p-MST1 抗体稀释比例 1:1 000;兔抗 P-YAP 抗体稀释比例 1:1 000;兔抗 YAP 抗体稀释比例 1:1 000;兔抗 P-LATS1 稀释比例 1:1 000;兔抗 LATS1 稀释比例 1:1 000;兔抗 β -肌动蛋白抗体稀释比例 1:2 000)4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次,分别加入二抗(HRP 标记山羊抗兔抗体稀释比例 1:5 000),室温孵育 1 h。使用增强型化学发光(美国 Cell Signaling Technology 公司)试剂使印迹可视化。Bio-rad Quantity One4.4.0 成像仪显影。目的条带采用 ImageJ 软件进行灰度值分析。

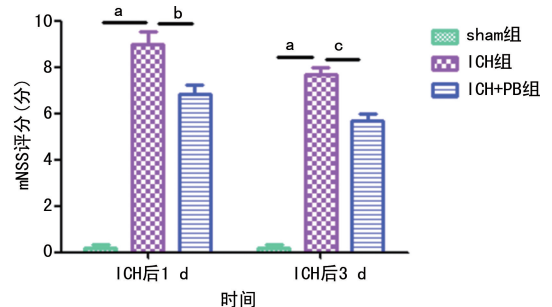
1.11 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据统计分析,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 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能评分比较

与 sham 组比较,ICH 组小鼠在 ICH 后第 1、3 天 mNSS 评分明显增加($P < 0.01$);与 ICH 组比较,ICH+PB 组小鼠在 ICH 后第 1、3 天 mNSS 评分明显减低($P < 0.05$)。见图 1。

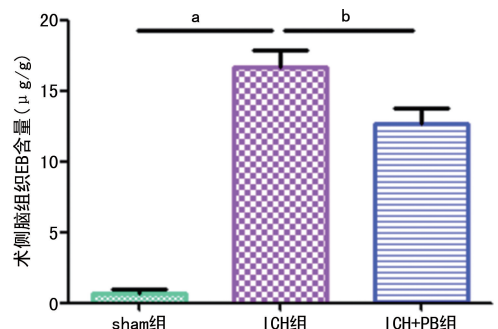


^a: $P < 0.01$, 与 sham 组比较; ^b: $P < 0.05$; ^c: $P < 0.01$, 与 ICH 组比较。

图1 小鼠 ICH 后 mNSS 评分比较

2.2 BBB 渗透性测定

与 sham 组比较,ICH 组小鼠在 ICH 后第 3 天 EB 含量明显增加($P < 0.01$);与 ICH 组比较,ICH+PB 组小鼠在 ICH 后第 3 天 EB 含量明显降低($P < 0.05$)。见图 2。



^a: $P < 0.01$, 与 sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ICH 组比较。

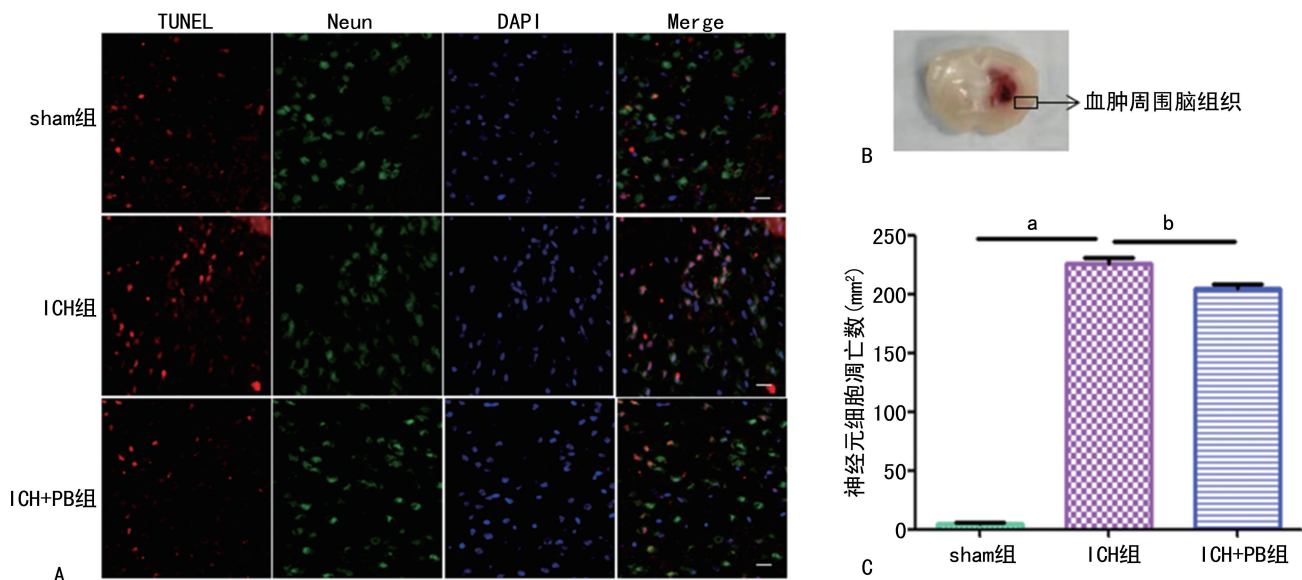
图2 小鼠 BBB 渗漏测定

2.3 凋亡细胞数检测

与 sham 组比较, ICH 组小鼠在 ICH 后第 3 天血肿周围脑组织神经元细胞数凋亡明显增加 ($P < 0.01$); 与 ICH 组比较, ICH+PB 组小鼠在 ICH 后第 3 天血肿周围脑组织神经元细胞数凋亡明显减少 ($P < 0.05$)。见图 3。

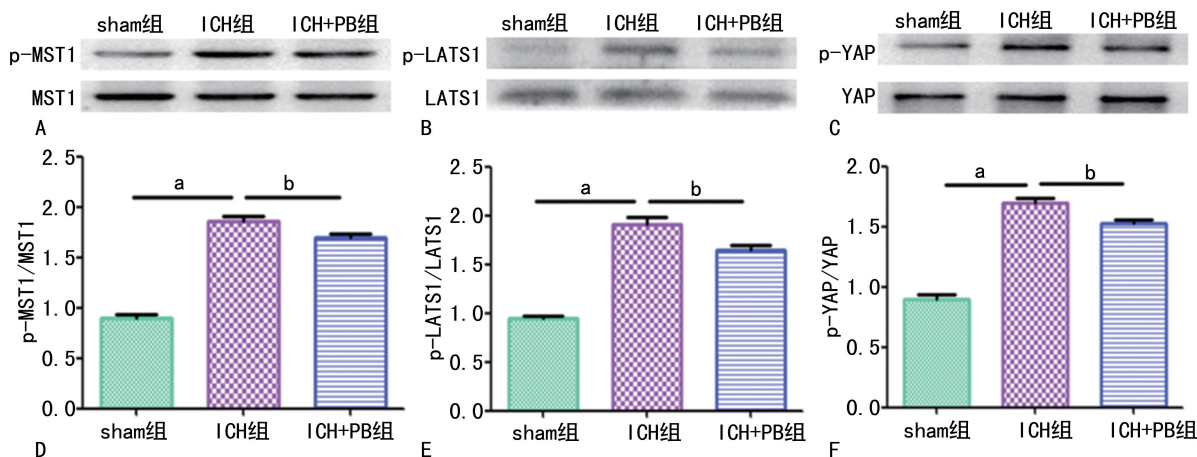
2.4 MST1、LATS1、YAP 表达检测结果

与 sham 组比较, ICH 组小鼠在 ICH 后第 3 天血肿周围脑组织 p-MST1、p-LATS1 及 p-YAP 表达水平明显增加 ($P < 0.05$); 与 ICH 组比较, ICH+PB 组小鼠在 ICH 后第 3 天血肿周围脑组织 p-MST1、p-LATS1 及 p-YAP 表达水平明显减低 ($P < 0.05$)。见图 4。



A: TUNEL 荧光图; B: 血肿周围组织; C: 血肿周围神经元细胞凋亡分析; ^a: $P < 0.01$, 与 sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ICH 组比较。

图 3 血肿周围脑组织细胞凋亡数



A、B、C: Western blot 图; D、E、F: Western blot 定量分析图; ^a: $P < 0.01$, 与 sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ICH 组比较。

图 4 血肿周围脑组织 p-MST1、p-LATS1 及 p-YAP 表达水平

3 讨论

ICH 后脑损伤机制主要包括各种信号通路的激活, 从而引发细胞的凋亡或者坏死。许多研究表明神经元细胞的凋亡和损伤是 ICH 后神经功能缺失的机制之一^[13], 是 ICH 后神经功能进行性发展、恶化的直接原因^[14]。ICH 后正常脑组织结构遭到破坏, 从而引发 BBB 完整性破坏, 导致有害物质进入脑组织而造成脑损害。研究表明, ICH 后继发的脑水肿危害巨大, 是导致神经功能障碍的关键因素, 其中 BBB 的破坏引起的血管源性脑水肿是继发性脑水肿的主要环节^[15], 并且 BBB 的破坏又能促进细胞凋亡、炎症反

应、氧化应激的放大等^[16-17], 从而加重 ICH 后多种继发性神经损害。既往动物实验研究表明, ICH 后第 3 天出现脑水肿和细胞凋亡高峰^[18], 一般最多持续 10~14 d^[19]。故本实验选择在 ICH 后第 3 天检测脑组织 BBB 渗透性及神经元细胞凋亡情况, 以评估脑损伤程度及给予干预措施后的治疗效果。

普罗布考属于新型调脂药, 相对分子质量小, 易透过 BBB。其作用除了调脂、抗氧化以外还具有下调炎症因子表达^[20]、改善血管内皮功能^[21]、改善认知^[22]、清除氧自由基、抗神经细胞凋亡^[23]等作用。研究表明, 在缺血再灌注模型中^[24], 给予普罗布考进行

干预后可减少梗死面积和血管渗漏,保持 BBB 的完整性,起到抗神经元细胞凋亡、改善神经功能障碍的作用。在血管性痴呆和阿尔茨海默病(AD)的早期,给予普罗布考可降低 BBB 通透性,从而改善认知^[25]。在生理状态下 EB 在血管内与蛋白结合,很难进入脑组织,只有在 BBB 结构受损、通透性升高的情况下,EB 才能进入脑组织,因此脑组织内 EB 含量可用来衡量 BBB 通透性的程度。本研究发现,ICH 后小鼠 BBB 通透性明显升高,脑组织 EB 含量升高,经普罗布考干预 3 d 后,小鼠脑组织 EB 含量明显降低,同时神经功能障碍得到改善,提示普罗布考可减轻 ICH 所致的脑损害。

Hippo 通路由丝氨酸激酶级联反应组成,通过激酶之间的相互作用和级联磷酸化来传导信号。Hippo 通路可调控与生长相关的基因,参与细胞的增殖和凋亡过程,控制组织器官中细胞的数量和组织的大小。在哺乳动物中,Hippo 通路的激活,可导致 p-MST1 水平升高,p-MST1 与 Sav 形成复合物,可以磷酸化并激活 LATS1,继而磷酸化 YAP/TAZ 使 p-YAP/TAZ 静置在细胞质中^[26],因此 YAP1 的凋亡抑制作用将会消失^[27],相反,YAP/TAZ 去磷酸化可以使其发生核转位并激活转录因子促进细胞增殖、抑制凋亡^[28]。既往研究表明,在 ICH 血模型中^[29],Hippo 信号通路的抑制可缓解缺血缺氧造成的 BBB 损伤,起到神经保护作用。在 ICH 模型中,Hippo 信号通路的抑制可减轻 ICH 期间的脑水肿、BBB 损伤和神经功能障碍^[30]。本研究发现,ICH 后血肿周围脑组织 p-MST1、p-LATS1 及 p-YAP 表达水平明显上升、EB 渗漏增加、神经元细胞凋亡数明显增多,与既往研究一致。给予普罗布考干预后,与 ICH 组比较,血肿周围脑组织中 p-MST1、p-LATS1 及 p-YAP 表达水平明显下降,说明普罗布考可起到抑制 Hippo 通路的作用,并且给予普罗布考后 EB 渗漏降低、神经元细胞凋亡数减少,从而推测普罗布考可能通过抑制 Hippo 通路从而起到脑保护作用。

综上所述,普罗布考对 ICH 模型小鼠具有脑保护作用,该作用可能是通过抑制 Hippo 通路而发挥保护 BBB、抗神经元细胞凋亡、改善神经功能障碍的作用,从而减轻脑损伤。

参考文献

- [1] VAN ASCH C J, LUITSE M J, RINKEL G J, et al. Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(2):167-176.
- [2] HANGGI D, STEIGER H J. Spontaneous intracerebral haemorrhage in adults: a literature overview [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2008, 150(4):371-379.
- [3] MAMO J C, LAM V, BROOK E, et al. Probuco prevents blood-brain barrier dysfunction and cognitive decline in mice maintained on pro-diabetic diet [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2019, 16(1):87-97.
- [4] CREASY C L, CHERNOFF J. Cloning and characterization of a member of the MST sub-family of Ste20-like kinases [J]. *Gene*, 1995, 167(1/2):303-306.
- [5] HARVEY K, TAPON N. The salvador-warts-Hippo pathway-an emerging tumour-suppressor network [J]. *Nature Rev Cancer*, 2007, 7(3):182-191.
- [6] CHIYODA T, SUGIYAMA N, SHIMIZU T, et al. LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 and regulate mammalian mitotic progression, 2012, 197(5):625-641.
- [7] YU F X, ZHAO B, GUAN K L. Hippo Pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer [J]. *Cell*, 2015, 163:811-828.
- [8] CHEN X, XU C X, LIANG H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells transplantation alleviates brain injury after intracerebral hemorrhage in mice through the Hippo signaling pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(7):6306-6323.
- [9] LUAN D, ZHANG Y X, YUAN L L, et al. MST4 modulates the neuro-inflammatory response by regulating IkappaBalpha signaling pathway and affects the early outcome of experimental ischemic stroke in mice [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 154:43-50.
- [10] CHHOR V, LE CHARPENTIER T, LEBON S, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro [J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2013, 32:70-85.
- [11] BEDERSON J B, PITTS L H, TSUJI M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3):472-476.
- [12] ZHAO J L, CHEN Y J, YU J, et al. ISO-alpha-acids improve the hematoma resolution and prevent peri-hematoma inflammations by transforming microglia via PPARgamma-CD36 axis in ICH rats [J]. *Int Immunopharmacol*,

- 2020,83:106396.
- [13] SHEN H, LIU C, ZHANG D, et al. Role for RIP1 in mediating necroptosis in experimental intracerebral hemorrhage model both in vivo and in vitro[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2641.
- [14] ZHAO X R, GONZALES N, ARONOWSKI J. Pleiotropic role of PPAR γ in intracerebral hemorrhage: an intricate system involving Nrf2, RXR, and NF- κ B[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(4):357-366.
- [15] WILKINSON D A, PANDEY A S, THOMPSON B G, et al. Injury mechanisms in acute Intracerebral hemorrhage[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134(Pt B), 240-248.
- [16] WONG S M, JACOBUS F A J, ZHANG C E, et al. Measuring subtle leakage of the blood-brain barrier in cerebrovascular disease with DCE-MRI: test-retest reproducibility and its influencing factors[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2017, 46(1):159-166.
- [17] LEE M J, CHA J, CHOI H A, et al. Blood-brain barrier breakdown in reversible cerebral vasoconstriction syndrome: implications for pathophysiology and diagnosis[J]. *Ann Neurol*, 2017, 81(3):454-466.
- [18] XI G, KEEP R F, HOFF J T. Erythrocytes and delayed brain edema formation following intracerebral hemorrhage in rats[J]. *J Neurosurg*, 1998, 89(6):991-996.
- [19] STAYKOV D, WAGNER I, VOLBERS B, et al. Natural course of perihemorrhagic edema after intracerebral hemorrhage[J]. *Stroke*, 2011, 42(9):2625-2629.
- [20] LI T, CHEN W, AN F, et al. Probucol attenuates inflammation and increases stability of vulnerable atherosclerotic plaques in rabbits[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2011, 225(1):23-34.
- [21] ZAPOLSKA-DOWNAR D, ZAPOLSKI-DOWNAR A, MARKIEWSKI M, et al. Selective inhibition by probucol of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human vascular endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2001, 155(1):123-130.
- [22] POIRIER J. Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2005, 26(3):355-361.
- [23] ZHOU X, AI S, CHEN Z, et al. Probucol promotes high glucose-induced proliferation and inhibits apoptosis by reducing reactive oxygen species generation in Müller cells[J]. *Int Ophthalmol*, 2019, 39(12):2833-2842.
- [24] NAKAGAWA S, ARUGA J. Sphingosine 1-phosphate signaling is involved in impaired blood-brain barrier function in ischemia-reperfusion injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(3):1594-1606.
- [25] TAKECHI R, GALLOWAY S, PALLEBAGE-GAMARALLAGE M M, et al. Probucol prevents blood-brain barrier dysfunction in wild-type mice induced by saturated fat or cholesterol feeding[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2013, 40(1):45-52.
- [26] GUMBINER B M, KIM N G. The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth[J]. *J Cell Sci*, 2014, 127:709-717.
- [27] YU F X, GUAN K L. The Hippo pathway: regulators and regulations, 2013, 27(4):355-371.
- [28] HAO Y, CHUN A, CHEUNG K, et al. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283:5496-5509.
- [29] GONG P, ZHANG Z, ZOU C L, et al. Hippo/YAP signaling pathway mitigates blood-brain barrier disruption after cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Behav Brain Res*, 2019, 356:8-17.
- [30] ZHANG P, WANG T, ZHANG D, et al. Exploration of MST1-mediated secondary brain injury induced by intracerebral hemorrhage in rats via hippo signaling pathway[J]. *Transl Stroke Res*, 2019, 10(6):729-743.

(收稿日期:2021-10-29 修回日期:2021-12-25)