

脑苷肌肽对缺氧缺血性脑病新生大鼠 SIRT1/mTOR/p70S6K 通路及神经元凋亡的影响

刘永兴, 张世昌, 李 萍, 庄方利, 王莉萍

河南科技大学附属许昌市中心医院 儿科, 河南 许昌 461000

摘要: **目的** 探讨脑苷肌肽对缺氧缺血性脑病 (HIE) 新生大鼠沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (SIRT1)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)/p70 核糖体蛋白 S6 激酶 (p70S6K) 通路及神经元凋亡的影响。**方法** 采用结扎左侧颈总动脉及缺氧玻璃仓的方法建立新生大鼠 HIE 模型, 造模大鼠随机分为 5 组: 模型组、脑苷肌肽低剂量组 (0.8 mg/kg)、脑苷肌肽中剂量组 (1.6 mg/kg)、脑苷肌肽高剂量组 (3.2 mg/kg)、尼莫地平组 (10 mg/kg), 每组 12 只, 另取 12 只设为假手术组。分组处理后, 观察各组大鼠神经行为活动并进行评分; 测定各组大鼠脑组织含水量; TUNEL 染色检测各组大鼠脑皮质神经元凋亡情况; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测各组大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 水平; 免疫印迹法检测各组大鼠脑组织 SIRT1/mTOR/p70S6K 通路相关蛋白表达情况。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠神经功能缺损评分、脑组织含水量、脑皮质神经元凋亡率、血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平、脑组织 SIRT1/mTOR/p70S6K 通路相关蛋白 p-mTOR/mTOR 及 p-p70S6K/p70S6K 明显升高, 脑组织 SIRT1 表达降低 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 脑苷肌肽低、中、高剂量组及尼莫地平组大鼠神经功能缺损评分、脑组织含水量、脑皮质神经元凋亡率、血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平、脑组织 SIRT1/mTOR/p70S6K 通路蛋白 p-mTOR/mTOR 及 p-p70S6K/p70S6K 降低, 脑组织 SIRT1 表达升高 ($P < 0.001$), 且脑苷肌肽各组呈剂量依赖性 ($P < 0.001$), 脑苷肌肽高剂量组与尼莫地平组相比, 大鼠各指标差异无统计学意义。**结论** 脑苷肌肽可促使 HIE 新生大鼠脑组织 SIRT1 表达, 降低 mTOR、p70S6K 磷酸化水平, 抑制炎症, 减轻脑水肿及神经元凋亡, 修复神经功能, 改善其临床症状。

关键词: 脑苷肌肽; 缺氧缺血性脑病; 新生大鼠; SIRT1/mTOR/p70S6K 通路; 神经元凋亡

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)07-1368-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.07.005

Effects of cattle encephalon glycoside and ignotin on SIRT1/mTOR/p70S6K pathway and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy

LIU Yong-xing, ZHANG Shi-chang, LI Ping, ZHUANG Fang-li, WANG Li-ping

Department of Pediatric, Xuchang Central Hospital, Xuchang 461000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of cattle encephalon glycoside and ignotin on sirtuin 1 (SIRT1)/mammalian target of rapamycin (mTOR)/p70 ribosomal protein S6 kinase 1 (p70S6K) pathway and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). **Methods** neonatal rats HIE model were established by ligating left common carotid artery and hypoxic glass chamber, they were randomly divided into 5 groups: model group, low dose (0.8 mg/kg), medium dose (1.6 mg/kg), high dose (3.2 mg/kg) groups of cattle encephalon glycoside and ignotin, and nimodipine group (10 mg/kg), with 12 in each group, another 12 rats were set as sham operation group. After grouping, the neurobehavioral activities of rats in each group were observed and scored, the water content of brain tissue was measured, the apoptosis of cerebral cortex neurons was detected by TUNEL staining, the serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the expression of SIRT1/mTOR/p70S6K pathway related proteins was detected by Western blotting. **Results** Compared with those in the sham operation group, the neurological deficit score, water content of brain tissue, apoptosis rate of cortical neurons, levels of serum TNF- α and IL-1 β , SIRT1/mTOR/p70S6K pathway related proteins p-mTOR/mTOR and p-p70S6K/p70S6K pathway were significantly

收稿日期: 2020-12-28

基金项目: 河南省科技攻关项目 (LHGJ20191385)

作者简介: 刘永兴 (1982—), 男, 本科, 主治医师, 研究方向为儿科及新生儿科常见病、多发病的诊治。E-mail: lsn81sn@163.com

increased in the model group, the expression of SIRT1 in brain tissue was decreased ($P < 0.001$). Compared with those in the model group, the neurological deficit score, water content of brain tissue, apoptosis rate of cortical neurons, levels of serum TNF- α and IL-1 β , SIRT1/mTOR/p70S6K pathway related proteins p-mTOR/mTOR and p-p70S6k/p70S6K pathway were significantly decreased in the low, medium and high dose groups of cattle encephalon glycoside and igitonin, and nimodipine group. The expression of SIRT1 in brain tissue was increased ($P < 0.001$), there was a dose-dependent effect in groups of cattle encephalon glycoside and igitonin ($P < 0.001$). There was no significant difference in each index between high-dose group of cattle encephalon glycoside and igitonin and nimodipine group. **Conclusion** Cattle encephalon glycoside and igitonin can promote the expression of SIRT1 in brain tissue of neonatal rats with HIE, reduce the phosphorylation levels of mTOR and p70S6K, inhibit inflammation, relieve brain edema and neuronal apoptosis, and repair nerve function and improve clinical symptoms.

Key words: cattle encephalon glycoside and igitonin; hypoxic-ischemic encephalopathy; neonatal rats; SIRT1/mTOR/p70S6K pathway; neuronal apoptosis

新生儿缺氧缺血性脑病 (hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE) 是新生儿因围产期窒息而引起的缺血缺氧性脑损伤疾病, 患儿会出现意识丧失、肌张力松弛、惊厥等短期症状, 还会引发癫痫、脑瘫、智力低下等长期症状, 不及时救治可导致神经元凋亡等中枢神经系统损害, 遗留永久性的脑病后遗症, 严重危害新生儿的神经发育^[1-3]。免疫炎症反应在新生儿 HIE 中起关键调控作用, 患儿促炎因子水平明显升高, 引发的脑部炎症是 HIE 脑损伤病理过程的主要环节^[4]。沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (sirtuin 1, SIRT1) 是哺乳动物中有高度保守性的脱乙酰酶, 可负调控下游的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) /p70 核糖体蛋白 S6 激酶 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1, p70S6K) 信号通路, 在细胞增殖、衰老、凋亡、自噬、分化等生理过程中发挥重要作用, 上调 SIRT1 可降低 mTOR、p70S6K 磷酸化水平, 减少炎症因子合成释放, 抑制炎症反应, 改善糖尿病肾病临床症状, 并可通过增强自噬延缓人脐静脉内皮细胞衰老^[5-6]; 减少 β -淀粉样肽积累, 起到神经保护作用^[7], 因而 SIRT1/mTOR/p70S6K 可作为 HIE 的潜在治疗靶点。脑苷肌肽是一种新型的蛋白质制剂, 可明显降低急性脑梗死患者炎症及应激反应水平, 减轻其神经功能缺损, 缓解临床症状^[8], 并可促进脑卒中患者神经修复再生, 改善其神经功能^[9], 但脑苷肌肽是否可通过调控 SIRT1/mTOR/p70S6K 信号通路减轻 HIE 新生大鼠脑损伤, 目前还未见报道, 故本研究建立 HIE 新生大鼠模型, 探讨脑苷肌肽对模型大鼠 SIRT1/mTOR/p70S6K 信号通路及神经元凋亡的影响, 进一步研究其神经保护作用, 为临床应用提供参考和借鉴。

1 材料

1.1 实验动物

SD 大鼠购自上海市公共卫生临床中心, 生产许可证号 SCXK (沪) 2020-0002, SPF 级, 出生 7 d, 体质量 12~18 g。饲养条件: 和母鼠合笼饲养, 温度 25 °C, 自由光照, 相对湿度 50%, 环境干净安静、通风良好。实验方案经河南科技大学附属许昌市中心医院动物实验伦理委员会批准 (批准号为 DWLL-201600502)。

1.2 药品与试剂

脑苷肌肽注射液 (规格: 2 mL/支, 本品每毫升组分含多肽 3.2 mg、多种神经节苷脂 50 μ g), 吉林四环制药有限公司生产, 批号 20141204; 尼莫地平片 (规格: 20 mg/片), 正大青春宝药业有限公司生产, 批号: 2015068128; TUNEL 凋亡检测试剂盒, 南京凯基生物科技发展有限公司, 批号 KGA112; 大鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒, 南京建成生物工程研究所, 货号 H002; 大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒、兔源 SIRT1、mTOR、p-mTOR、p70S6K、p-p70S6K 及 GAPDH 一抗、羊抗兔二抗, 美国 Abcam 公司, 货号分别为 ab100785、ab189494、ab134903、ab137133、ab32529、ab59208、ab181602、ab150077; RIPA 裂解液、BCA 试剂盒、HE 染色试剂盒, 上海碧云天公司, 货号分别为 P0013K、P0011、C0105 等。

1.3 仪器

XELx800 酶标仪, Perkin Elmer 公司; RM2035 轮转切片机, 德国 Leica 公司; 1X70 光学倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; Centrifuge 5424R 低温高速离心机, 德国 Eppendorf 股份公司; 1659001 蛋白电泳仪、Trans-Blot SD 半干转膜仪, 美国 Bio-Rad 公司; 2500 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司。

2 方法

2.1 动物模型制备及分组给药

参照文献方法^[10]制备模型。新生大鼠 ip 40 mg/kg 2.5%戊巴比妥钠麻醉,仰卧位固定于手术台,颈部消毒,于正中切开,分离左侧颈总动脉并结扎其远、近心端,缝合后消毒,放回母鼠旁,2 h 后将新生大鼠放入浸泡在 37 °C 水浴中的缺氧玻璃舱内,舱内同时不断通入 8% O₂ 及 92% N₂ 混合气体,持续缺氧 2 h 后将其放回母鼠处继续喂养,然后以短期行为学实验测试建模后大鼠的神经功能并进行评分,得 1~3 分的大鼠为模型成功,共建模 63 只,成功 60 只。建模成功大鼠随机分为模型组、脑苷肌肽低、中、高剂量(0.8、1.6、3.2 mg/kg)组、尼莫地平(10 mg/kg)组,共 5 组,每组 12 只,另取 12 只新生大鼠只分离左侧颈总动脉不结扎,且不进行缺氧,设为假手术组。

参照文献方法^[11],在模型制备成功后,脑苷肌肽各组分别以 0.8、1.6、3.2 mg/kg 的剂量尾 iv 给药,同时以与尼莫地平组同量的生理盐水 ig;尼莫地平组以 10 mg/kg^[12]的剂量 ig 给药,同时以与脑苷肌肽高剂量组等量的生理盐水尾 iv;假手术组及模型组大鼠以与尼莫地平组同量的生理盐水 ig,同时以与脑苷肌肽高剂量组等量的生理盐水尾 iv,每组均每天给药 1 次,共给药 7 d。

2.2 大鼠神经功能缺损情况检测

结束给药后 24 h,观察各组大鼠行为活动,参照 Longa 分级法^[13]进行神经功能缺损评分:大鼠行为正常,0 分;大鼠左侧前肢不能完全伸展,1 分;大鼠行走过程中转圈,2 分;大鼠行走过程中倾倒,3 分;大鼠意识不清,不能自发行走,4 分;大鼠死亡,5 分。

2.3 大鼠脑水肿情况检测和标本收集

神经功能缺损评分结束后,自颈动脉取血 2 mL,静置、离心,收集血清,储存于-80 °C 备用;将各组大鼠以乙醚麻醉,断头处死,取出大脑,每组随机选 6 只大鼠,称得取出的大脑质量,即为湿重,然后放入烤箱中烤干,称质量即为干质量,计算脑组织含水量,具体公式为脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量。各组剩余 6 只大鼠,取出大脑后,取约 0.5 g 组织,剪碎,置于蛋白裂解液中,匀浆,制备为匀浆液,离心,收集上清,以 BCA 法测量其中总蛋白浓度,然后根据结果将各样本浓度调至相同,最后储存于液氮中备用;剩余脑组织

以 PBS 冲洗、10%多聚甲醛固定、50%~100%的梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,以切片机做连续病理切片备用。

2.4 大鼠脑皮质神经元凋亡情况检测

选取“2.3”项中完整且具有脑皮质组织的病理切片,进行脱蜡、高浓度到低浓度梯度酒精浸泡处理,进行 TUNEL 染色,具体步骤参照试剂盒说明书进行,再次进行脱水、透明后封片,使用显微镜观察大鼠皮质神经元凋亡情况,任选 5 个视野拍照,计算大鼠皮质神经元凋亡率。凋亡率=TUNEL 阳性细胞数/总细胞数。

2.5 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平测定

“2.3”项中冻存的血清,取出后放在 4 °C 冰箱中缓慢解冻,采用 ELISA 法测定其中 TNF- α 、IL-1 β 水平,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

2.6 大鼠脑组织 SIRT1/mTOR/p70S6K 通路相关蛋白表达测定

“2.3”项中冻存的蛋白样品液,取出后置于 4 °C 冰箱中解冻,各取 20 μ L 上样,进行电泳,分离蛋白,湿转,将其转移至硝酸纤维素膜上,使用 5%脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h,根据蛋白相对分子质量截取目的条带,置于小盒中,加入兔源 SIRT1、mTOR、p-mTOR、p70S6K、p-p70S6K 及 GAPDH 一抗溶液(稀释比例均为 1:2 000),4 °C 下孵育过夜, TBST 漂洗 3 次后加入羊抗兔二抗溶液(稀释比例均为 1:1 000),室温孵育 2 h, TBST 再次漂洗 3 次,以增强化学发光法显色,采用凝胶成像仪拍照,以软件 Image Lab 对蛋白条带进行图像分析,得出各组目的蛋白相对表达量。

2.7 数据分析

实验数据采用软件 SPSS 24.0 进行统计分析,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据符合正态分布,多组间比较行单因素方差分析,两组进一步之间比较采用 LSD-*t* 检验;数据不符合正态分布,采用非参数检验,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,两两之间比较采用 Malm-Whitney 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 脑苷肌肽对大鼠神经功能的影响

与假手术组相比,模型组大鼠神经功能缺损评分明显升高($P < 0.001$);与模型组相比,脑苷肌肽低、中、高剂量组及尼莫地平组大鼠神经功能缺损评分降低,且脑苷肌肽各组呈剂量相关性($P <$

0.001); 脑苷肌肽高剂量组与尼莫地平组相比, 大鼠神经功能缺损评分差异无统计学意义, 见表1。

3.2 脑苷肌肽对大鼠脑水肿的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织含水量明显升高 ($P<0.001$); 与模型组相比, 脑苷肌肽低、中、高剂量组及尼莫地平组大鼠脑组织含水量降低, 且脑苷肌肽各组呈剂量相关性 ($P<0.001$), 脑苷肌肽高剂量组与尼莫地平组相比, 大鼠脑组织含水量差异无统计学意义, 见表2。

表1 各组大鼠神经功能缺损评分 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 1 Neurological deficit score of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	神经功能缺损评分
假手术	—	0.00±0.00
模型	—	3.57±0.36*
脑苷肌肽	0.8	2.62±0.29 [#]
	1.6	1.41±0.20 ^{#\$}
	3.2	0.56±0.19 ^{#\$&}
尼莫地平	10.0	0.49±0.15 ^{#\$&}

与假手术组比较: * $P<0.001$; 与模型组比较: [#] $P<0.001$; 与脑苷肌肽低剂量组比较: ^{\$} $P<0.001$; 与脑苷肌肽中剂量组比较: [&] $P<0.001$ * $P<0.001$ vs sham operation group; [#] $P<0.001$ vs model group; ^{\$} $P<0.001$ vs low dose of the cattle encephalon glycoside and igiton group; [&] $P<0.001$ vs medium dose of the cattle encephalon glycoside and igiton group

表2 各组大鼠脑组织含水量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Brain water content of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脑组织含水量/%
假手术	—	78.25±0.36
模型	—	85.71±0.45*
脑苷肌肽	0.8	83.45±0.37 [#]
	1.6	81.12±0.29 ^{#\$}
	3.2	78.81±0.28 ^{#\$&}
尼莫地平	10.0	78.69±0.27 ^{#\$&}

与假手术组比较: * $P<0.001$; 与模型组比较: [#] $P<0.001$; 与脑苷肌肽低剂量组比较: ^{\$} $P<0.001$; 与脑苷肌肽中剂量组比较: [&] $P<0.001$ * $P<0.001$ vs sham operation group; [#] $P<0.001$ vs model group; ^{\$} $P<0.001$ vs low dose of the cattle encephalon glycoside and igiton group; [&] $P<0.001$ vs medium dose of the cattle encephalon glycoside and igiton group

3.3 脑苷肌肽对大鼠脑皮质神经元凋亡的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠脑皮质神经元凋亡率明显升高 ($P<0.001$); 与模型组相比, 脑苷肌肽低、中、高剂量组及尼莫地平组大鼠脑皮质神经元凋亡率降低, 且脑苷肌肽各组呈剂量相关性 ($P<0.001$), 脑苷肌肽高剂量组与尼莫地平组相比, 大鼠脑皮质神经元凋亡率差异无统计学意义, 见图1、表3。

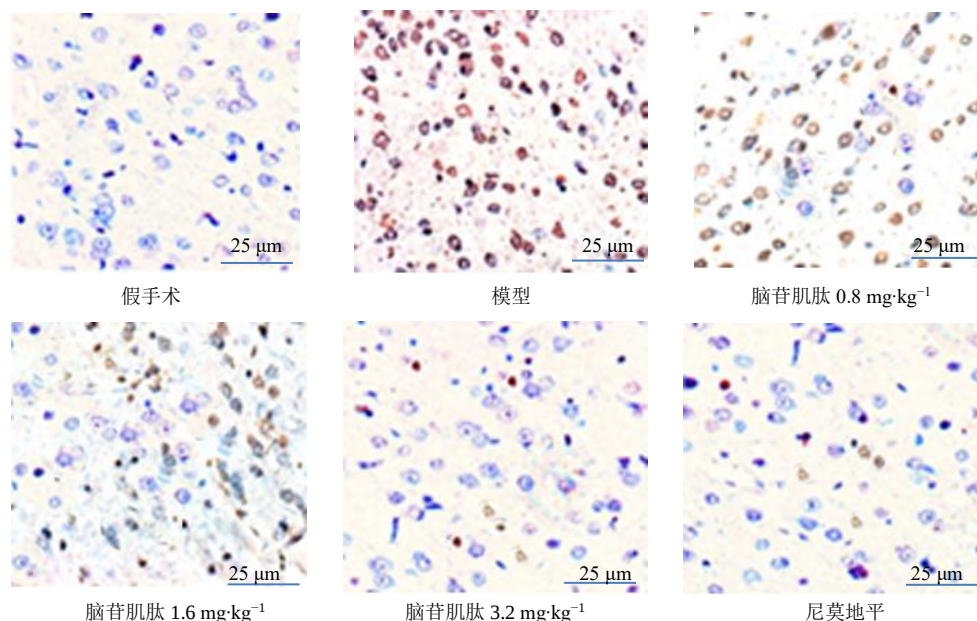


图1 TUNEL染色检测各组大鼠脑皮质神经元凋亡情况

Fig. 1 Apoptosis of cortical neurons of rats in each group detected by TUNEL staining

表 3 各组大鼠脑皮质神经元凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 3 The apoptosis rate of cortical neurons of rate in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	神经元凋亡率/%
假手术	—	0.65 ± 0.17
模型	—	87.14 ± 10.24*
脑苷肌肽	0.8	51.02 ± 6.72 [#]
	1.6	29.86 ± 3.92 ^{#S}
	3.2	1.63 ± 0.30 ^{#S&}
尼莫地平	10.0	1.59 ± 0.32 ^{#S&}

与假手术组比较: * $P < 0.001$; 与模型组比较: [#] $P < 0.001$; 与脑苷肌肽低剂量组比较: ^S $P < 0.001$; 与脑苷肌肽中剂量组比较: [&] $P < 0.001$
* $P < 0.001$ vs sham operation group; [#] $P < 0.001$ vs model group; ^S $P < 0.001$ vs low dose of the cattle encephalon glycoside and igitonin group; [&] $P < 0.001$ vs medium dose of the cattle encephalon glycoside and igitonin group

3.4 脑苷肌肽对大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平明显升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 脑苷肌肽低、中、高剂量组及尼莫地平组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平降低, 且脑苷肌肽各组呈剂量相关性 ($P < 0.001$), 脑苷肌肽高剂量组与尼莫地平组相比, 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平差异无统计学意义, 见表 4。

3.5 脑苷肌肽对大鼠 SIRT1/mTOR/p70S6K 通路相关蛋白表达的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织 SIRT1 表达明显降低 ($P < 0.001$), p-mTOR/mTOR、p-p70S6K/p70S6K 明显升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 脑苷肌肽低、

表 4 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 4 TNF- α and IL-1 β levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	75.83 ± 12.06	127.64 ± 21.05
模型	—	502.92 ± 40.13*	658.07 ± 45.87*
脑苷肌肽	0.8	376.83 ± 53.56 [#]	512.46 ± 43.01 [#]
	1.6	217.63 ± 42.26 ^{#S}	332.15 ± 28.69 ^{#S}
	3.2	89.54 ± 18.26 ^{#S&}	144.02 ± 20.13 ^{#S&}
尼莫地平	10.0	85.78 ± 17.93 ^{#S&}	140.96 ± 17.79 ^{#S&}

与假手术组比较: * $P < 0.001$; 与模型组比较: [#] $P < 0.001$; 与脑苷肌肽低剂量组比较: ^S $P < 0.001$; 与脑苷肌肽中剂量组比较: [&] $P < 0.001$
* $P < 0.001$ vs sham operation group; [#] $P < 0.001$ vs model group; ^S $P < 0.001$ vs low dose of the cattle encephalon glycoside and igitonin group; [&] $P < 0.001$ vs medium dose of the cattle encephalon glycoside and igitonin group

中、高剂量组及尼莫地平组大鼠脑组织 SIRT1 表达升高 ($P < 0.001$), p-mTOR/mTOR、p-p70S6K/p70S6K 降低 ($P < 0.001$), 且脑苷肌肽各组呈剂量相关性 ($P < 0.001$), 脑苷肌肽高剂量组与尼莫地平组相比, SIRT1/mTOR/p70S6K 通路相关蛋白表达差异无统计学意义, 见图 2、表 5。

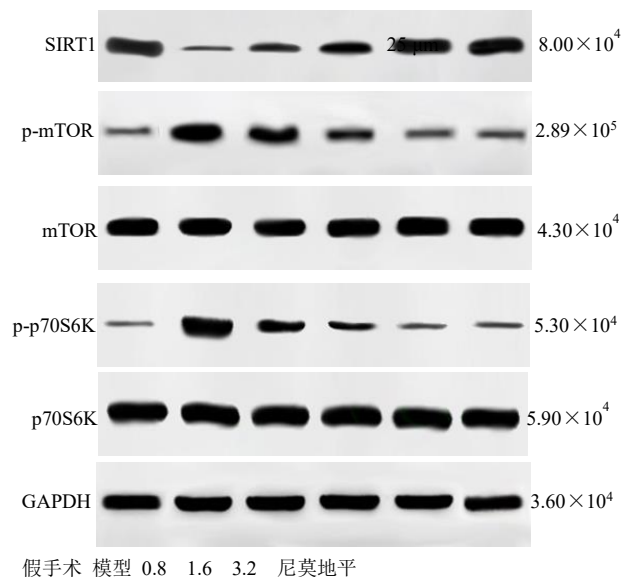


图 2 免疫印迹检测各组大鼠脑组织 SIRT1/mTOR/p70S6K 通路相关蛋白表达

Fig. 2 The expression of SIRT1/mTOR/p70S6K pathway related proteins in brain tissue of rats in each group detected by Western blot

4 讨论

HIE 患儿发生脑损伤的病理机制复杂, 颅内压升高、神经营养因子减少、氧自由基过度生成、炎症因子大量合成释放均与脑神经元损伤密切相关, 因而增加神经营养供给、抗炎均对 HIE 的治疗具有关键作用^[14-16]。脑苷肌肽作为一种复合蛋白制剂, 主要成分为神经节苷脂、多肽、氨基酸等, 可提供神经营养供给, 参与神经修复、神经递质合成、神经元发育等过程, 并可抑制机体炎症反应, 能有效减轻急性颅脑损伤患儿病情; 改善急性脑梗死患者神经功能, 与脑栓通胶囊联合应用, 可明显提高临床疗效^[17-18], 因而可用于治疗 HIE 患儿脑损伤。本研究以阻断血流后缺氧的方法复制 HIE 大鼠模型, 结果显示, 建模大鼠神经功能缺损评分、脑组织含水量、脑皮质神经元凋亡率、血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平明显升高, 表明缺血缺氧可诱导炎症因子大量合成, 引发严重的脑内炎症, 导致脑水肿, 脑皮质

表5 各组大鼠脑组织 SIRT1/mTOR/p70S6K 通路相关蛋白相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 5 Relative expression of SIRT1/mTOR/p70S6K pathway related protein in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SIRT1/GAPDH	p-mTOR/mTOR	p-p70S6K/p70S6K
假手术	—	1.15 ± 0.13	0.11 ± 0.03	0.08 ± 0.02
模型	—	0.14 ± 0.03*	1.03 ± 0.16*	0.95 ± 0.12*
脑苷肌肽	0.8	0.50 ± 0.05 [#]	0.71 ± 0.11 [#]	0.50 ± 0.10 [#]
	1.6	0.89 ± 0.09 [#] ^{\$}	0.42 ± 0.07 [#] ^{\$}	0.31 ± 0.06 [#] ^{\$}
	3.2	1.14 ± 0.09 [#] ^{\$} ^{&}	0.13 ± 0.03 [#] ^{\$} ^{&}	0.09 ± 0.02 [#] ^{\$} ^{&}
尼莫地平	10.0	1.13 ± 0.10 [#] ^{\$} ^{&}	0.14 ± 0.04 [#] ^{\$} ^{&}	0.10 ± 0.03 [#] ^{\$} ^{&}

与假手术组比较: * $P < 0.001$; 与模型组比较: [#] $P < 0.001$; 与脑苷肌肽低剂量组比较: ^{\$} $P < 0.001$; 与脑苷肌肽中剂量组比较: [&] $P < 0.001$

* $P < 0.001$ vs sham operation group; [#] $P < 0.001$ vs model group; ^{\$} $P < 0.001$ vs low dose of the cattle encephalon glycoside and ignotin group; [&] $P < 0.001$ vs medium dose of the cattle encephalon glycoside and ignotin group

神经元受损、凋亡及神经功能损伤,揭示模型建立成功。以脑苷肌肽处理 HIE 模型大鼠后,大鼠神经功能缺损评分、脑组织含水量、脑皮质神经元凋亡率、血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平降低,且呈剂量依赖性,表明脑苷肌肽可明显抑制炎症反应,减轻脑组织水肿及神经元凋亡,改善神经功能受损症状,且随剂量升高而作用增强。

SIRT1/mTOR/p70S6K 通路在细胞增殖、凋亡及机体免疫炎症反应等生理病理过程中起到重要的调控作用,激活 SIRT1 可下调下游 mTOR/p70S6K 信号通路,降低 mTOR 和 p70S6K 蛋白磷酸化水平,减少促炎因子合成释放,抑制炎症反应,进而改善动脉粥样硬化症状,并促使 β -淀粉样肽降解,对阿尔茨海默病患者起到神经保护作用^[5-7, 19-20],由此可知, SIRT1/mTOR/p70S6K 信号通路是 HIE 的潜在治疗靶点。本研究结果显示 HIE 大鼠脑组织 SIRT1 表达明显降低, p-mTOR/mTOR 及 p-p70S6K/p70S6K 明显升高,以脑苷肌肽处理后,大鼠脑损伤减轻,且脑组织 SIRT1 表达升高, mTOR 及 p70S6K 磷酸化水平降低,且脑苷肌肽各组呈剂量依赖性,表明 SIRT1/mTOR/p70S6K 通路介导 HIE 大鼠脑损伤过程,且脑苷肌肽可上调 HIE 大鼠脑组织 SIRT1 的表达,抑制下游 mTOR/p70S6K 通路表达,进而减轻脑组织炎症损伤,改善其神经功能缺损症状。

本研究结果表明,脑苷肌肽可降低促炎因子合成释放,阻止脑组织炎症发生及进展,减轻脑水肿,抑制脑皮质神经元凋亡,促使神经功能修复,改善 HIE 大鼠临床症状,上调 SIRT1 表达并抑制下游 mTOR/p70S6K 信号通路激活可能是其药理机制之一,但本研究未通过使用 SIRT1 激活剂及抑制剂进

行对照验证,其确切作用机制还不能确定,还需进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cornet M C, Pasupuleti A, Fang A, *et al.* Predictive value of early EEG for seizures in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy undergoing therapeutic hypothermia [J]. *Pediatr Res*, 2018, 84(3): 399-402.
- [2] Chang L, Wynn J, Pacella M, *et al.* Enteral feeding as an adjunct to hypothermia in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Neonatology*, 2018, 113(4): 347-352.
- [3] Wu Q X, Ge W L, Chen Y H, *et al.* PKM2 involved in neuronal apoptosis on hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(7): 1602-1612.
- [4] Al Mamun A, Yu H, Romana S, *et al.* Inflammatory responses are sex specific in chronic hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(9): 1328-1339.
- [5] Zhang H, Yang X, Pang X, *et al.* Genistein protects against ox-LDL-induced senescence through enhancing SIRT1/LKB1/AMPK-mediated autophagy flux in HUVECs [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 455(1/2): 127-134.
- [6] Du Y, Zhang K, Gao Z, *et al.* Tangshen formula improves inflammation in renal tissue of diabetic nephropathy through SIRT1/NF- κ B pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2): 2156-2164.
- [7] Park S Y, Lee H R, Lee W S, *et al.* Cilostazol modulates autophagic degradation of β -amyloid peptide via SIRT1-coupled LKB1/AMPK α signaling in neuronal cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160620-e0160634.

- [8] 闫振文, 郑眉光, 李 梅. 脑苷肌肽注射液联合银杏达莫注射液治疗急性脑梗死的效果及对患者炎症反应和高凝状态的影响 [J]. 中国医药, 2020, 15(9): 1390-1393.
- [9] 向祖琼, 田卓华. 丹参注射液联合脑苷肌肽对急性缺血性脑卒中患者 NIHSS 评分 血流变及脑电图的影响 [J]. 中国药物与临床, 2020, 20(17): 2908-2910.
- [10] 韩遵华, 段 淼, 李清香. 依达拉奉对缺氧缺血性脑病新生大鼠脑水肿及 CD163/HO-1 信号通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 39-45.
- [11] 袁晓利. 脑苷肌肽辅助治疗新生儿缺氧缺血性脑病对神经损伤标志物、炎症介质的影响 [J]. 实用中西医结合临床, 2020, 20(12): 132-134.
- [12] Miao M, Yan X, Guo L, *et al.* Effects of the *Rabdosia rubescens* total flavonoids on focal cerebral ischemia reperfusion model in rats [J]. *Saudi Pharm J*, 2017, 25(4): 607-614.
- [13] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S R, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [14] Lee B S, Woo D C, Woo C W, *et al.* Exogenous β -hydroxybutyrate treatment and neuroprotection in a suckling rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Dev Neurosci*, 2018, 40(1): 73-83.
- [15] Lundgren C, Brudin L, Wanby A S, *et al.* Ante- and intrapartum risk factors for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2018, 31(12): 1595-1601.
- [16] Fang C Z, Xie L L, Liu C M, *et al.* Tanshinone II_A improves hypoxic ischemic encephalopathy through TLR-4-mediated NF- κ B signal pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 1899-1908.
- [17] 姬广春, 蒋 飞, 曲德海, 等. 脑苷肌肽对小儿急性颅脑损伤的疗效分析 [J]. 中国实用医药, 2020, 15(25): 108-110.
- [18] 赵淑萍, 刘雪景. 脑栓通胶囊联合脑苷肌肽治疗急性脑梗死的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(7): 1332-1336.
- [19] Zhao S M, Jiang Y N, Zhao J M, *et al.* Quercetin-3-methyl ether inhibits esophageal carcinogenesis by targeting the AKT/mTOR/p70S6K and MAPK pathways [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(11): 1540-1552.
- [20] Zheng H, Fu Y, Huang Y, *et al.* mTOR signaling promotes foam cell formation and inhibits foam cell egress through suppressing the SIRT1 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 3315-3323.

[责任编辑 刘东博]