

迷迭香酸通过 AMPK/mTOR 通路减轻新生大鼠缺血缺氧性脑损伤研究

赵玉霞, 陈莺倩

驻马店市中心医院 儿童康复科, 河南 驻马店 463000

摘要: 目的 探讨迷迭香酸对新生大鼠缺血缺氧性脑损伤 (hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE) 的影响, 及其对单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) /雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路的调控作用, 初步探讨其脑保护机制。方法 取 7 d 龄 SD 新生大鼠, 随机分为对照组、模型组、迷迭香酸 (300 mg/kg) 组、AMPK/mTOR 激动剂 MT6378 (10 mg/kg) 组、AMPK 抑制剂 GSK-690693 (30 mg/kg) 组和迷迭香酸 (300 mg/kg) + MT6378 (10 mg/kg) 组, 每组 20 只。建立 HIE 模型, 给予相应药物进行干预, 采用 TTC 染色法检测大鼠脑梗死情况; 透射电镜 (TEM) 观察大鼠海马神经元结构损伤及自噬状况; 免疫荧光法检测大鼠海马神经元自噬标记物微管相关蛋白 1 轻链 3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B) 阳性表达; TUNEL 法检测大鼠海马神经元凋亡率; 免疫组化法检测大鼠海马神经元磷酸化 AMPK (p-AMPK) 阳性表达; Western blotting 检测大鼠海马组织活化的半胱氨酸蛋白酶 3 (cleaved Caspase-3)、mTOR 及其磷酸化蛋白 (p-mTOR)、Unc-51 样自噬激活激酶 1 (uncoordinated-51 like autophagy activating kinase 1, Ulk1) 及其磷酸化蛋白 (p-Ulk1)、LC3B 表达。结果 与对照组相比, 模型组大鼠脑梗死严重, 海马神经元结构损伤及自噬空泡形成较多, 细胞自噬及凋亡水平升高, AMPK/mTOR 通路活化 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 迷迭香酸组及 GSK-690693 组大鼠脑梗死、海马神经元结构损伤、凋亡及自噬减弱, AMPK/mTOR 通路被抑制 ($P < 0.05$); MT6378 组海马组织 AMPK/mTOR 通路进一步激活, 大鼠脑梗死、海马神经元结构损伤、凋亡及自噬进一步加重 ($P < 0.05$); MT6378 可逆转迷迭香酸的上述作用 ($P < 0.05$)。结论 迷迭香酸可能通过抑制 AMPK/mTOR 通路激活, 降低海马神经元自噬及凋亡进程, 发挥抗 HIE 脑损伤作用。

关键词: 迷迭香酸; 缺血缺氧性脑损伤; AMPK/mTOR 通路; 新生大鼠; 自噬; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)22-6897-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.22.015

Rosmarinic acid attenuates hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats through AMPK/mTOR pathway

ZHAO Yu-xia, CHEN Ying-qian

Children's Rehabilitation Department, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of rosmarinic acid on neonatal rats with hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) and regulation on adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, and preliminarily explore its brain protection mechanism. **Methods** Seven-day-old SD neonatal rats were randomly divided into control group, model group, rosmarinic acid (300 mg/kg) group, AMPK/mTOR agonist MT6378 (10 mg/kg) group, AMPK inhibitor GSK-690693 (30 mg/kg) group and rosmarinic acid (300 mg/kg) + MT6378 (10 mg/kg) group, with 20 rats in each group. HIE model was established, corresponding drugs were given for intervention, TTC staining method was used to detect cerebral infarction; Transmission electron microscope (TEM) was used to observe the structure damage and autophagy of hippocampal neurons; Immunofluorescence method was used to detect the positive expression level of autophagy marker protein microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B); TUNEL method was used to detect neuronal cell apoptosis rate; Immunohistochemistry was used to detect the positive expression level of phosphorylated AMPK (p-AMPK); Western blotting was used to detect the expressions of cleaved Caspase-3, mTOR and its phosphorylated protein (p-mTOR), uncoordinated-51 like autophagy activating kinase 1 (Ulk1) and its phosphorylated protein (p-Ulk1), LC3B in hippocampal tissue. **Results** Compared with control group, rats in model group had severe cerebral infarction, hippocampal neuron structure damage and autophagy vacuoles were more formed, autophagy and

收稿日期: 2021-06-29

作者简介: 赵玉霞 (1983—), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事儿童康复方面研究。E-mail: zyx09871@163.com

apoptosis levels were increased, AMPK/mTOR pathway was activated ($P < 0.05$). Compared with model group, rats in rosmarinic acid group and GSK-690693 group had cerebral infarction, hippocampal neuron structural damage and apoptosis and autophagy were weakened, and AMPK/mTOR pathway was inhibited ($P < 0.05$); AMPK/mTOR pathway was further activated in hippocampal tissue of rats in MT6378 group, cerebral infarction, hippocampal neuron structural damage, apoptosis and autophagy were further aggravated ($P < 0.05$); MT6378 reversed the above effects of rosmarinic acid ($P < 0.05$). **Conclusion** Rosmarinic acid may play an anti-HIE brain injury effect through inhibiting the activation of AMPK/mTOR pathway and reducing the autophagy and apoptosis of hippocampal neurons.

Key words: rosmarinic acid; hypoxic-ischemic encephalopathy; AMPK/mTOR pathway; neonatal rats; autophagy; apoptosis

新生儿缺血缺氧性脑损伤 (hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE) 为围产期因窒息缺氧而引起脑神经损伤性疾病^[1]。HIE 具有较高的致死率及致残率, 严重影响新生儿的生命健康^[2]。寻找安全有效的药物及治疗方法, 来保护 HIE 并促进 HIE 神经系统康复, 一直是临床研究的重点任务之一。迷迭香酸为酚酸类物质, 广泛分布于唇形科、紫草科、葫芦科等多种植物中, 为薄荷、丹参、迷迭香、紫苏叶等多种药材中的有效活性成分^[3]。研究发现, 迷迭香酸能通过抗氧化、抗炎、抗凋亡途径, 缓解脑缺血再灌注损伤^[4]。但迷迭香酸是否也能在 HIE 疾病过程中发挥脑保护作用尚未见报道。自噬在缺血缺氧性神经元损伤、凋亡、神经胶质活化等生理活动过程中发挥重要调控作用, 并越来越受到 HIE 研究的重视^[5]。单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) 可抑制下游调控因子哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 蛋白激活, 抑制 Unc-51 样自噬激活激酶 1 (uncoordinated-51 like autophagy activating kinase 1, Ulk1) 磷酸化, 来诱导自噬复合体的形成, 并参与自噬调控过程^[6], 且已有研究证实, AMPK 在 HIE 大鼠脑组织中处于持续激活状态^[7-8], 提示 AMPK/mTOR 通路可能在 HIE 神经元凋亡及自噬过程中发挥重要调控作用。本研究建立 HIE 大鼠模型, 考察迷迭香酸是否能通过 AMPK/mTOR 介导的自噬途径来缓解 HIE 脑损伤, 以期迷迭香酸的开发及应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 120 只, 7 d 龄, 体质量 10~12 g, 购自福州海王福药制药有限公司, 动物许可证号 SCXK (闽) 2020-0001。动物于驻马店市中心医院动物房常规饲养, 动物实验经驻马店市中心医院动物使用伦理委员会批准 (批准号 IACUC-101093), 符合 3R 原则。

1.2 药品与试剂

迷迭香酸对照品 (批号 20190312003, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海宝曼生物科技有限公司; AMPK 抑制剂 GSK-690693 (批号 20190419001)、AMPK/mTOR 激动剂 MT6378 (批号 20190329002) 购自美国 MCE 公司; 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色试剂盒 (批号 20190321001) 购自上海瓦兰生物科技有限公司; TUNEL 染色试剂盒 (批号 20190227004) 购自北京伊塔生物科技有限公司; DAPI 染色试剂盒 (批号 20190225006) 购自北京百奥莱博科技有限公司; 微管相关蛋白 1 轻链 3B (microtubule-associated protein1 light chain3, LC3B) 抗体、磷酸化 AMPK (p-AMPK) 抗体、活化的半胱氨酸蛋白酶 3 (cleaved Caspase-3) 抗体、mTOR 抗体、磷酸化 mTOR (p-mTOR) 抗体、 β -actin 抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体、FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体 (批号分别为 20190124001、20190222001、20190303002、20190403002、20190208004、20190302001、20190314005、20190204008) 购自美国 Abcam 公司; Ulk1 抗体 (批号 20190223002) 购自武汉博欧特生物科技有限公司; 磷酸化 Ulk1 (p-Ulk1) 抗体 (批号 20190131001) 购自上海邦景实业有限公司。

1.3 仪器

Q250 型透射电镜 (TEM, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); LF200 型荧光显微镜 (广州莱特光电技术有限公司); JS-1070P 型化学发光成像仪 (上海向帆仪器有限公司); Hettich MIKRO220 型离心机 (德国 Hettich 公司); PowerPac HV Power Supply 高电压电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 大鼠 HIE 模型的建立、分组与给药

新生 SD 大鼠麻醉, 手术暴露左侧颈主动脉搏并结扎缝合伤口后, 放回原饲养环境, 恢复 3 h, 置于常压缺氧舱内 (温度 37 °C、湿度 45%~55%、8%

氧气-92%氮气)缺氧处理 2.5 h,若大鼠出现左旋即造模成功^[9],共造模成功 100 只,随机分为模型组、迷迭香酸(300 mg/kg)^[10]组、AMPK/mTOR 激动剂 MT6378(10 mg/kg)组、AMPK 抑制剂 GSK-690693(30 mg/kg)^[11-12]组和迷迭香酸(300 mg/kg)+MT6378(10 mg/kg)组,每组 20 只;另取 20 只大鼠,相同方法暴露左侧颈主动脉,但不结扎,常规饲养后作为对照组。于造模成功后,各给药组 ig 迷迭香酸(10 mL/kg),尾 iv MT6378 或 GSK-690693(10 mL/kg);对照组及模型组 ig 等体积 0.9%氯化钠溶液,1 次/d,连续 3d。

2.2 TTC 法检测大鼠脑梗死面积

给药结束后,各组随机取 6 只大鼠,断头处死,取左脑,用切片机由前往后切成厚度为 5 μm 的组织切片。取切片,于 2% TTC 溶液中室温孵育 35 min,PBS 溶液洗涤、10%中性甲醛固定后,用数码相机采集图片,梗死部分为白色,正常为红色,用 Image J 软件分析并计算梗死面积百分比。

梗死面积百分比=梗死部分面积/总面积

2.3 TEM 观察大鼠海马神经元超微结构

给药结束后,各组随机取 6 只大鼠,断头取左脑,于冰上用解剖镜迅速剥离取完整海马组织,剪下组织块(0.3 cm×0.3 cm),于 2.5%戊二醛及 1%锇酸溶液中固定后,送于电镜室镜检。剩余组织迅速置于 4%多聚甲醛中固定 24 h,常规透明、浸蜡、包埋后切成 5 μm 切片,备用。

2.4 免疫荧光法检测大鼠海马神经元自噬标记物表达情况

取“2.3”项下海马组织石蜡切片,脱蜡、水化、曲拉通透化后,加入 LC3B 抗体(1:400),4℃孵育过夜;避光加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体(1:200),DAPI 染核、甘油封片后,于荧光显微镜下观察并拍照,用 Image Pro Plus 5.0 软件分析。

2.5 TUNEL 法检测大鼠海马神经元凋亡

取“2.3”项下海马组织石蜡切片,按 TUNEL 染色液说明书方法染色、封片后,于显微镜下观察并拍照,凋亡细胞被染成棕黄色,用 Image-pro plus 软件检测凋亡细胞数目,计算细胞凋亡率。

细胞凋亡率=凋亡细胞数/细胞总数

2.6 免疫组化法检测大鼠海马组织 p-AMPK 表达

取“2.3”项下海马组织石蜡切片,复温、透化及抗原修复后,加入 p-AMPK 抗体(1:500),4℃孵育过夜,加入 HRP 标记的羊抗兔抗体(1:500),

室温孵育 1 h,DAB 显色、苏木精复染封片后,于显微镜下观察并拍照,采用 Image Pro Plus 5.0 软件分析。

2.7 Western blotting 法检测海马组织 cleaved Caspase-3、LC3B、mTOR、p-mTOR、Ulk1、p-Ulk1 蛋白表达

取剩余大鼠,断头处死,于冰上解剖取左半球海马组织,加入裂解液,于冰上匀浆后提取蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,封闭后分别加入 cleaved Caspase-3、LC3B、mTOR、p-mTOR、Ulk1、p-Ulk1 抗体(1:800)以及 β-actin 抗体(1:1000),4℃孵育过夜,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(1:1000),室温孵育 2.5 h,加入化学发光试剂显色,采用化学发光成像仪曝光条带并拍照,Image J 软件分析。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析及 SNK-*q* 检验进行多组间比较及两两比较。

3 结果

3.1 迷迭香酸对 HIE 大鼠脑梗死面积的影响

如图 1 和表 1 所示,与对照组相比,模型组大鼠脑梗死面积显著增加($P<0.05$);与模型组相比,迷迭香酸组及 GSK-690693 组大鼠脑梗死面积显著减少($P<0.05$),MT6378 组脑梗死面积进一步增加($P<0.05$);与迷迭香酸组相比,迷迭香酸+MT6378 组脑梗死面积显著增加($P<0.05$),GSK-690693 组脑梗死面积差异无统计学意义。

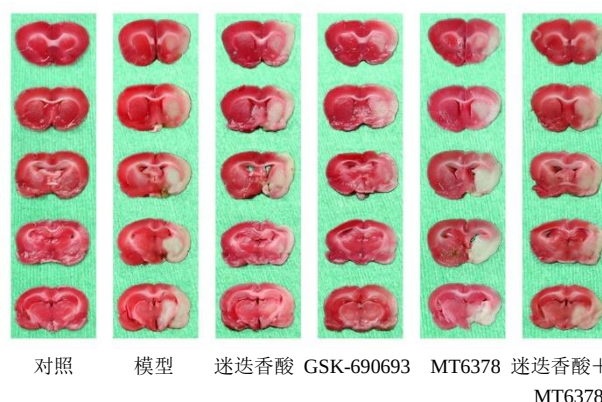


图 1 迷迭香酸对 HIE 大鼠脑梗死面积的影响

Fig. 1 Effect of rosmarinic acid on cerebral infarction area in HIE rats

表 1 迷迭香酸对 HIE 大鼠脑梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 1 Effect of rosmarinic acid on cerebral infarction area in HIE rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	梗死面积/%
对照	—	0
模型	—	29.49±2.07 [#]
迷迭香酸	300	18.45±1.34 [*]
GSK-690693	30	19.09±1.01 [*]
MT6378	10	34.13±2.11 [▲]
迷迭香酸+MT6378	300+10	27.76±2.07 [▲]

与对照组比较: [#] $P<0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$; 与迷迭香酸组比较: [▲] $P<0.05$, 下表同

[#] $P<0.05$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs model group; [▲] $P<0.05$ vs rosmarinic acid group, same as below tables

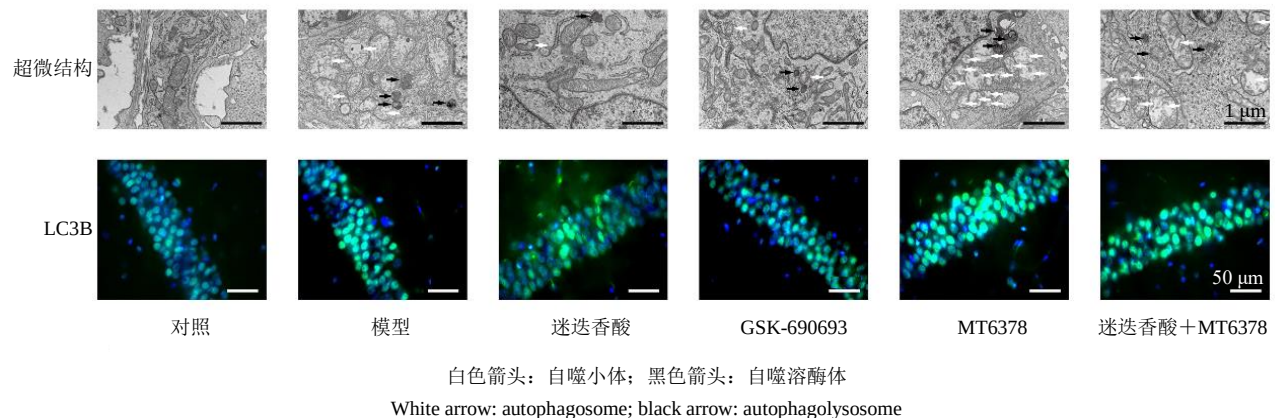


图 2 迷迭香酸对 HIE 大鼠海马神经元超微结构及自噬标记物 LC3B 表达的影响

Fig. 2 Effect of rosmarinic acid on ultrastructure and expression of autophagy markers LC3B of hippocampal neurons in HIE rats

表 2 迷迭香酸对 HIE 大鼠海马神经元 LC3B 阳性表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of rosmarinic acid on positive expression of LC3B in hippocampal neurons of HIE rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	A/mm ²
对照	—	1.11±0.10
模型	—	2.25±0.26 [#]
迷迭香酸	300	1.41±0.13 [*]
GSK-690693	30	1.44±0.14 [*]
MT6378	10	2.93±0.29 [▲]
迷迭香酸+MT6378	300+10	2.27±0.25 [▲]

($P<0.05$)。与模型组相比, 迷迭香酸组及 GSK-690693 组大鼠海马神经元核固缩减少, 线粒体肿胀缓解, 自噬空泡及自噬溶酶体形成减少, LC3B 阳性表达显著减少 ($P<0.05$); MT6378 组可见自噬空泡及自噬溶酶体形成进一步增加, LC3B 阳性表达进一步升高 ($P<0.05$)。

3.2 迷迭香酸对 HIE 大鼠海马神经元超微结构及自噬标记物表达的影响

LC3B 是自噬形成的标记物, 其表达高低可反映自噬通量的强弱。如图 2 和表 2 所示, 对照组大鼠海马组织神经元结构正常, 线粒体、高尔基体及内质网结构清晰, 有少量溶酶体形成; LC3B 在海马神经元胞质中弱阳性表达。与对照组相比, 模型组及迷迭香酸+MT6378 组大鼠海马神经元胞质及胞核固缩, 线粒体肿胀, 高尔基体及内质网结构模糊甚至消失, 泡状自噬体及自噬溶酶体形成较多, 部分自噬泡中包裹有未消化的细胞质, 海马神经元胞质中 LC3B 阳性染色, LC3B 阳性表达显著升高

3.3 迷迭香酸对 HIE 大鼠海马神经元凋亡的影响

如图 3 和表 3 所示, 对照组海马神经元少量细胞呈棕黄色, 与对照组相比, 模型组大鼠细胞染色加深, 细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$)。与模型组相比, 迷迭香酸组及 GSK-690693 组细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$); MT6378 组细胞凋亡率进一步升高 ($P<0.05$)。与迷迭香酸组相比, 迷迭香酸+MT6378 组大鼠海马神经元凋亡率显著升高 ($P<0.05$), GSK-690693 组海马神经元凋亡率差异无统计学意义。

3.4 迷迭香酸对 HIE 大鼠海马神经元 p-AMPK 表达的影响

如图 4 和表 4 所示, p-AMPK 在对照组大鼠海马神经元胞质中呈弱阳性表达。与对照组相比, 模型组大鼠海马神经元胞质中 p-AMPK 阳性表达升高 ($P<0.05$)。与模型组相比, 迷迭香酸组及 GSK-690693 组大鼠海马神经元 p-AMPK 阳性表达

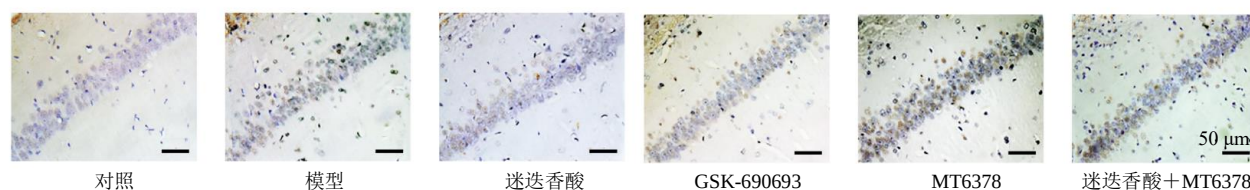


图 3 迷迭香酸对 HIE 大鼠海马神经元凋亡的影响 (×200)

Fig. 3 Effect of rosmarinic acid on apoptosis of hippocampal neurons in HIE rats (× 200)

表 3 迷迭香酸对 HIE 大鼠海马神经元凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of rosmarinic acid on apoptosis rate of hippocampal neurons in HIE rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	凋亡率/%
对照	—	1.18 ± 0.19
模型	—	31.39 ± 3.03 [#]
迷迭香酸	300	16.66 ± 1.05 [*]
GSK-690693	30	16.99 ± 1.08 [*]
MT6378	10	45.12 ± 4.02 ^{*▲}
迷迭香酸+MT6378	300+10	30.35 ± 3.03 [▲]

降低 ($P < 0.05$)。与迷迭香酸组相比, 迷迭香酸+MT6378 组大鼠海马神经元 p-AMPK 阳性表达升高 ($P < 0.05$), GSK-690693 组 p-AMPK 阳性表达差异无统计学意义。

3.5 迷迭香酸对 HIE 大鼠海马组织 cleaved Caspase-3、LC3B、mTOR、p-mTOR、Ulk1、p-Ulk1 蛋白表达的影响

如图 5 和表 5 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠海马组织 cleaved Caspase-3、LC3B-II/I 蛋白表达

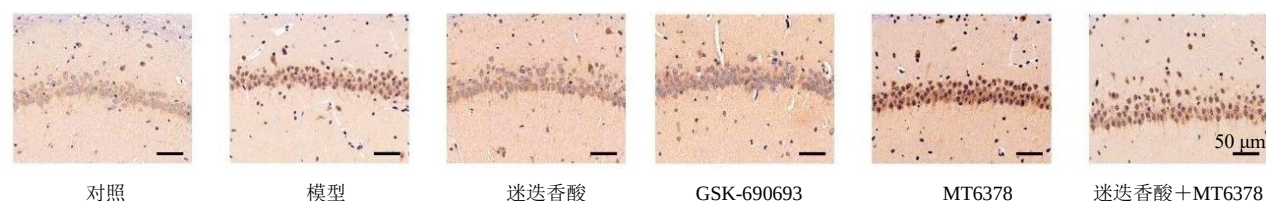


图 4 迷迭香酸对 HIE 大鼠海马神经元 p-AMPK 表达的影响 (×200)

Fig. 4 Effect of rosmarinic acid on expression of p-AMPK in hippocampal neurons of HIE rats (× 200)

表 4 迷迭香酸对 HIE 大鼠海马神经元 p-AMPK 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of rosmarinic acid on expression of p-AMPK in hippocampal neurons of HIE rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	A/mm ²
对照	—	1.07 ± 0.09
模型	—	2.09 ± 0.19 [#]
迷迭香酸	300	1.49 ± 0.11 [*]
GSK-690693	30	1.47 ± 0.12 [*]
MT6378	10	2.85 ± 0.27 ^{*▲}
迷迭香酸+MT6378	300+10	2.07 ± 0.21 [▲]

水平显著升高 ($P < 0.05$), p-mTOR/mTOR、p-Ulk1/Ulk1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 迷迭香酸组及 GSK-690693 组大鼠海马组织 cleaved Caspase-3、LC3B-II/I 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), p-mTOR/mTOR、p-Ulk1/Ulk1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与迷迭香酸组相比, 迷迭香酸+MT6378 组大鼠海马组织 cleaved

Caspase-3、LC3B-II/I 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), p-mTOR/mTOR、p-Ulk1/Ulk1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), GSK-690693 组上述蛋白表达差异均无统计学意义。

4 讨论

据流行病学分析, 发展中国家每 1000 个新生儿中, 有 8~26 个罹患 HIE^[2]。HIE 是新生儿危害最大的常见疾病之一, 目前临床上尚无有效的治疗方法^[13]。新生儿脑组织对缺血缺氧最为敏感, 本研究采用 7 日龄大鼠建立 HIE 模型后发现, 大鼠脑梗死面积增加, 海马神经元肿胀、核固缩坏死严重, 神经元细胞凋亡率升高, 提示造模成功。大鼠 ig 迷迭香酸后, 迷迭香酸在脑、心脏等多个脏器中均有分布^[14]; 姚润心等^[15]研究发现迷迭香酸可通过抗炎、抗氧化应激、抗凋亡途径发挥对脑缺血再灌注损伤的保护作用。本研究发现, 给予迷迭香酸干预后, 大鼠脑梗死面积下降 20%, 海马神经元细胞凋亡率

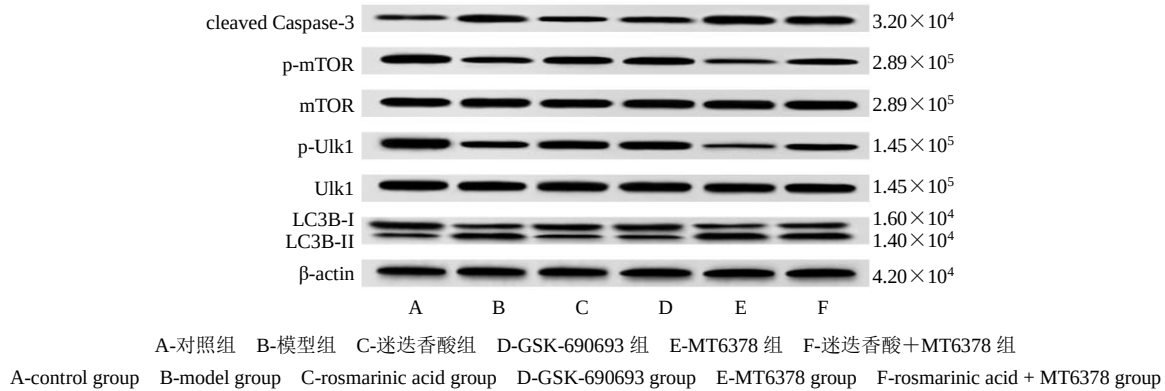


图 5 迷迭香酸对 HIE 大鼠海马组织 cleaved Caspase-3、LC3B、mTOR、p-mTOR、Ulk1、p-Ulk1 蛋白表达的影响
Fig. 5 Effect of rosmarinic acid on protein expressions of cleaved Caspase-3, LC3B, mTOR, p-mTOR, Ulk1 and p-Ulk1 in hippocampus of HIE rats

表 5 迷迭香酸对 HIE 大鼠海马组织 cleaved Caspase-3、LC3B、mTOR、p-mTOR、Ulk1、p-Ulk1 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 5 Effect of rosmarinic acid on protein expressions of cleaved Caspase-3, LC3B, mTOR, p-mTOR, Ulk1 and p-Ulk1 in hippocampus of HIE rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量			
		cleaved Caspase-3/ β -actin	p-mTOR/mTOR	p-Ulk1/Ulk1	LC3B-II/LC3B-I
对照	—	0.32 ± 0.04	0.98 ± 0.11	1.06 ± 0.10	0.19 ± 0.11
模型	—	0.84 ± 0.08 [#]	0.36 ± 0.03 [#]	0.42 ± 0.04 [#]	1.57 ± 0.15 [#]
迷迭香酸	300	0.57 ± 0.06 [*]	0.63 ± 0.06 [*]	0.71 ± 0.06 [*]	0.57 ± 0.05 [*]
GSK-690693	30	0.59 ± 0.07 [*]	0.65 ± 0.05 [*]	0.73 ± 0.07 [*]	0.59 ± 0.06 [*]
MT6378	10	0.97 ± 0.10 ^{*▲}	0.16 ± 0.11 ^{*▲}	0.11 ± 0.03 ^{*▲}	2.07 ± 0.27 ^{*▲}
迷迭香酸+MT6378	300+10	0.86 ± 0.09 [▲]	0.39 ± 0.04 [▲]	0.40 ± 0.02 [▲]	1.54 ± 0.14 [▲]

显著降低, 神经元肿胀及坏死明显缓解, 提示迷迭香酸可减轻 HIE 脑损伤及神经元凋亡症状, 在 HIE 领域有潜在的应用价值。

细胞自噬可清除受损的细胞器, 降解并再利用相关细胞器、蛋白质等维护细胞内环境稳态、避免细胞凋亡, 产生能量以避免离子失衡和细胞坏死, 从而发挥神经保护作用^[16]。但细胞内分子和细胞器损伤及功能损害进一步增强, 自噬过度活化后, 神经细胞难以通过自噬使细胞回归正常状态而诱导神经细胞死亡, 发挥神经破坏作用^[17]。自噬在 HIE 过程中的调控作用一直是临床研究的热点之一, 但自噬激活在 HIE 过程中发挥神经保护作用, 还是神经破坏作用, 还一直存在争议^[5]。Li 等^[18]用氯喹抑制脑缺血缺氧 24 h 的新生 10 日大鼠自噬后, 脑损伤加重, 神经元凋亡增加, 推测自噬激活在 HIE 过程中发挥保护作用。Wang 等^[19]发现抑制 HIE 大鼠脑皮质神经自噬后, 大鼠脑损伤及神经元凋亡减少, 推测 HIE 过程中存在自噬过度激活, 损害神经。本研究发现 HIE 大鼠海马神经元中自噬体及自噬溶酶体形成较多, 自噬标记蛋白 LC3B 表达升高, 提示

HIE 大鼠海马神经元中存在自噬激活现象; 迷迭香酸组大鼠海马神经元中自噬溶酶体及自噬标记蛋白表达降低, 提示迷迭香酸发挥抗 HIE 脑损伤作用, 可能与抑制自噬有关, 与 Wang 等^[19]研究结果一致。

AMPK 及 mTOR 均可直接磷酸化 Ulk1, 调控自噬。研究证实, 缺血缺氧条件下, 脑组织糖氧消耗量增大, 而脑组织糖元储备不足, 神经元能量耗竭严重时, AMPK 激活, 一方面能抑制能量消耗, 刺激能量产生来降低脑部能量消耗^[20], 另一方面能抑制 mTOR 活化, 减轻 Ulk1 磷酸化, 促进 AMPK-Ulk1 相互作用而激活自噬, 清除受损细胞器来发挥脑保护作用^[21]。本研究发现, 模型组大鼠海马组织神经元胞质中 p-AMPK 表达升高, p-Ulk1、p-mTOR 表达异常降低; MT6378 进一步激活 AMPK 后, p-AMPK 表达升高, p-Ulk1、p-mTOR 表达进一步降低, 大鼠死亡及脑梗死严重, 神经元自噬及凋亡进一步加重, 与容志惠等^[7]报道的 AMPK 过度激活会促进 Caspase-3 蛋白表达而加重脑损伤观点相一致, 也与 Wang 等^[19]报道的激活自噬加重 HIE 脑损伤观点相一致。迷迭香酸与 AMPK 抑制剂

GSK-690693 组作用一致, p-AMPK 表达降低, p-Ulk1、p-mTOR 表达升高, 自噬及凋亡降低, 提示迷迭香酸抑制 HIE 海马神经元自噬及凋亡作用, 可能与抑制 AMPK/mTOR 通路激活有关, 而 MT6378 可逆转迷迭香酸的上述作用。

综上所述, 迷迭香酸可能通过抑制 AMPK/mTOR 通路激活, 降低海马神经元自噬及凋亡进程, 发挥抗 HIE 脑损伤作用。但 HIE 海马神经元凋亡及损伤的调控网络复杂, 涉及多种途径多条调控机制, 迷迭香酸发挥抗 HIE 脑损伤的其他机制还有待深入探究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kamino D, Almazrooei A, Pang E W, *et al.* Abnormalities in evoked potentials associated with abnormal glycemia and brain injury in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Clin Neurophysiol*, 2021, 132(1): 307-313.
- [2] Cinelli D, Lacroix C, Myers K A. Rhythmic sawtooth electroencephalograph waveforms in neonatal hypoxic-ischemic/hypoglycemic encephalopathy [J]. *Pediatr Neurol*, 2019, 91: 70-71.
- [3] 甘亚, 何钢, 刘崑, 等. 迷迭香酸及其衍生物的合成研究进展 [J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2020, 39(2): 131-137.
- [4] 曹雯, 张文娟, 潘金凤, 等. 迷迭香酸药理作用的研究进展 [J]. 广西中医药, 2019, 42(1): 54-58.
- [5] 黄林, 鲁利群. 细胞自噬与缺氧缺血性脑损伤的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(35): 40-43.
- [6] Holczer M, Hajdú B, Lőrincz T, *et al.* Fine-tuning of AMPK-ULK1-mTORC1 regulatory triangle is crucial for autophagy oscillation [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 17803.
- [7] 容志惠, 刘伟, 李文斌, 等. 单磷酸腺苷激活的蛋白激酶在新生大鼠缺氧缺血性脑损伤中的动态变化 [J]. 中华围产医学杂志, 2016, 19(8): 603-607.
- [8] Cai C C, Zhu J H, Ye L X, *et al.* Glycine protects against hypoxic-ischemic brain injury by regulating mitochondria-mediated autophagy via the AMPK pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4248529.
- [9] 朱波, 杨艳, 苏仁意, 等. 丹参酮 II_A 注射液对缺血缺氧性脑损伤新生大鼠皮质神经元自噬及 Akt-mTOR 通路的影响 [J]. 中国中医急症, 2019, 28(2): 204-208.
- [10] 郭少波, 徐露露, 蒋丽娟, 等. 迷迭香酸的大鼠体内代谢产物及代谢途径分析 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(21): 4704-4712.
- [11] Zadra G, Photopoulos C, Tyekucheva S, *et al.* A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis [J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(4): 519-538.
- [12] Liu T T, Ding T L, Ma Y, *et al.* Selective α 1B-and α 1D-adrenoceptor antagonists suppress noradrenaline-induced activation, proliferation and ECM secretion of rat hepatic stellate cells *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35(11): 1385-1392.
- [13] 黄文卿, 张巍, 刘巍巍. 新生儿缺氧缺血性脑病相关药物治疗的研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26(22): 4457-4461.
- [14] 张磊, 雷玲, 杨薇, 等. 迷迭香酸灌胃给予后在大鼠主要脏器组织中分布及排泄的初步研究 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(5): 79-83.
- [15] 姚润心, 王歆烨, 杨瑞瑞. 迷迭香酸对脑缺血再灌注损伤保护作用的研究 [J]. 农垦医学, 2020, 42(5): 448-452.
- [16] Maiti P, Peruzzaro S, Kolli N, *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 induces autophagy response and promotes neuroprotection in a rat model of TBI [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8): 5211-5224.
- [17] Wang Z F, Gao C, Chen W, *et al.* Salubrinal offers neuroprotection through suppressing endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis in a mouse traumatic brain injury model [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2019, 161: 12-25.
- [18] Li P, Hao L, Guo Y Y, *et al.* Chloroquine inhibits autophagy and deteriorates the mitochondrial dysfunction and apoptosis in hypoxic rat neurons [J]. *Life Sci*, 2018, 202: 70-77.
- [19] Wang S, Xue H, Xu Y, *et al.* Sevoflurane postconditioning inhibits autophagy through activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade, alleviating hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(2): 347-356.
- [20] Li W, Chaudhari K, Shetty R, *et al.* Metformin alters locomotor and cognitive function and brain metabolism in normoglycemic mice [J]. *Aging Dis*, 2019, 10(5): 949-963.
- [21] Chen S J, Guo D D, Lei B B, *et al.* Biglycan protects human neuroblastoma cells from nitric oxide-induced death by inhibiting AMPK-mTOR mediated autophagy and intracellular ROS level [J]. *Biotechnol Lett*, 2020, 42(4): 657-668.

[责任编辑 李亚楠]