

6-姜酚改善新生小鼠缺氧、缺血性脑损伤后认知行为及其机制

姚远 赵曼 杜静怡 周文娟*

(山东大学基础医学院组织学胚胎学系,教育部实验畸形学重点实验室,山东省精神疾病基础与临床重点实验室,济南 250012)

[摘要] 目的 探讨 6-姜酚对新生鼠缺氧、缺血性脑损伤(HIE)后认知行为的作用,通过观察对突触可塑性、神经元存活、神经干细胞增殖的影响,探讨 6-姜酚对新生小鼠 HIE 脑损伤保护的作用机制。方法 利用出生后第 7 天昆明小鼠幼仔(78 只)进行右侧颈总动脉结扎,然后进行 90 min 的缺氧处理,构建新生小鼠、缺氧缺血性脑病模型,并通过腹腔注射 6-姜酚,利用水迷宫行为学方法检测认知行为;采用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色观察脑损伤变化情况;利用透射电子显微镜检测突触结构和数目的改变;采用 HE 染色、尼氏染色、二氢乙锭(DHE)染色观察各组小鼠海马组织病理形态学变化;利用免疫荧光和 Real-time PCR 检测各组神经干细胞增殖情况和相关转录因子的表达水平;利用 Western blotting 检测增殖相关信号通路 Akt 信号通路的变化。结果 6-姜酚早期处理可改善小鼠 HIE 后成年学习记忆能力,减轻新生小鼠 HIE 后脑损伤和增加突触数目和结构完整性。6-姜酚处理组 HIE 病变侧海马细胞排列紊乱现象有所改善,坏死细胞数目减少,海马神经干细胞增殖能力及神经干细胞增殖相关转录因子 Nestin 和性别决定区转录因子 2(Sox2)表达水平显著升高,磷酸化 Akt(p-Akt)水平增加。结论 6-姜酚可改善 HIE 小鼠成年后学习记忆能力并减轻 HIE 后脑组织损伤,其作用机制可能通过抑制活性氧簇(ROS)的产生而减轻神经元损伤并激活 Akt 信号通路促进海马神经干细胞的增殖能力。

[关键词] 6-姜酚;缺氧、缺血性脑损伤;神经干细胞;神经元;认知行为;透射电子显微镜;新生小鼠

[中图分类号] R321 [文献标志码] A [DOI] 10.16098/j.issn.0529-1356.2023.03.007

Effect and mechanism of 6-gingerol on neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and cognitive behavior in neonatal mice

YAO Yuan, ZHAO Man, DU Jing-yi, ZHOU Wen-juan *

(Key Laboratory for Experimental Teratology of Ministry of Education, Shandong Key Laboratory of Mental Disorders, Department of Anatomy and Histoembryology, School of Basic Medical Sciences, Shandong University, Ji'nan 250012, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of 6-gingerol treatment on cognitive behavior after hypoxic-ischemic brain injury (HIE) in neonatal mice, and to explore the protective mechanism of 6-gingerol on HIE brain injury in neonatal mice by observing the effects on neuronal survival and neural stem cell proliferation. Methods The right common carotid artery was ligated in Kunming mice (78) on the 7th day after birth and HIE model was established after 90 minutes of hypoxic treatment. 6-gingerol was injected intraperitoneally. The cognitive behavior was detected by Morris water maze test; 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining was used to observe the changes of brain injury; The changes of synaptic structure and number were observed by transmission electron microscopy; HE staining, Nissl staining and dihydroethidium (DHE) staining were used to observe the pathomorphological changes of hippocampus in each group; The proliferation of neural stem cells and the expression of related transcription factors were detected by immunofluorescence and Real-time PCR; The changes of Akt signal pathway were detected by Western blotting. Results 6-gingerol treatment could improve the long-term learning and memory ability, reduce the brain injury and brain edema of neonatal mice after HIE, and improve synaptic plasticity of mice after HIE. In the 6-gingerol treatment group, the disorder of hippocampal cells in the diseased side of HIE was improved, the number of necrotic cells decreased, the proliferation ability of hippocampal neural stem cells and the expression levels of nestin and sex determining region box transcription factor 2 (Sox2) related transcription factors increased significantly, and the level of phosphorylated Akt (p-Akt) increased. Conclusion It is

[收稿日期] 2021-08-31 [修回日期] 2021-10-29
[作者简介] 姚远(1996—),男(汉族),山东省济南市人,在读硕士研究生。
* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)
E-mail: wenjuanzhou@sdu.edu.cn Tel: (0531)88382050

found that 6-gingerol can improve the learning and memory ability of HIE mice in adulthood and reduce brain tissue injury after HIE. 6-gingerol may play a role in inhibiting the production of reactive oxygen species (ROS), reducing neuronal injury and upregulating the expression of Akt signal pathway, promoting the proliferation of hippocampal neural stem cells, so as to provide potential drugs for the treatment of neonatal HIE.

[Key words] 6-gingerol; Hypoxic ischemic brain injury; Neural stem cells; Neurons; Cognitive behavior; Transmission electron microscope; Neonatal mouse

新生儿缺氧、缺血性脑病 (hypoxic ischemic encephalopathy, HIE) 是指因围产期窒息而引起的新生儿脑部损伤,是全世界新生儿死亡和致残的重要原因之一,发达国家中新生儿发病率为 2‰~3‰,严重影响新生儿的生命健康,给社会和家庭带来沉重的负担^[1,2]。HIE 死亡率较高,幸存患儿临床表现为一系列脑病症状,如意识障碍、智力发育障碍和运动功能损伤等神经系统后遗症,病情危重者可有惊厥及呼吸衰竭^[3~5]。已有研究报道,其病理生理变化主要为兴奋性毒性,氧化应激以及各种形式的神经细胞死亡包括坏死、凋亡和自噬等^[6~8]。目前临床多采用对症治疗和支持疗法,结合亚低温治疗等方法,然而治疗效果并不理想,缺氧、缺血性脑损伤引起神经元不可逆死亡,导致预后不佳,脑部神经恢复十分有限^[9]。因此,积极探索有效的治疗方式,具有重要的意义。6-姜酚(6-gingerol)是新鲜生姜中一种酚类物质,目前研究发现,6-姜酚具有多种生物学作用,其可通过调控核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号通路增加细胞抗氧化酶的水平减轻糖尿病肾病损伤;通过调控 p38 MAPK 信号通路改善心脏功能^[10,11]。近年来,研究表明,6-姜酚通过调节细胞凋亡和自噬增强细胞抗氧化能力减弱 β 淀粉样蛋白诱导的人神经母细胞瘤细胞(简称 SH-SY5Y 细胞)死亡;可通过调节微小 RNA (microRNA, miR)-103/Bcl-2/腺病毒 E1B 19kD 相互作用蛋白 3 (Bcl-2/adenovirus E1B19kD interacting protein 3, BNIP3) 减少缺氧诱导的 PC12 细胞凋亡和自噬进而发挥神经保护作用;可透过血脑屏障并在多种神经系统疾病中发挥重要作用,如自身免疫性脑脊髓炎、脑炎等^[12~14]。目前鲜见有关 6-姜酚在新生儿 HIE 中作用的报道,且对其作用机制尚有待探索。

本研究选取出生后第 7 天胎鼠对其进行右侧颈总动脉结扎,然后进行 90 min 的缺氧构建新生鼠 HIE 模型,并通过腹腔注射 6-姜酚,探讨 6-姜酚在新生儿 HIE 中的神经保护作用。本实验重点观察 6-姜酚处理对 HIE 小鼠成年后认知行为的改善及海马组织病理形态学的影响,进一步探讨 6-姜酚发挥神经保护作用的机制。结果表明,6-姜酚可减轻新生小鼠 HIE 后脑梗死面积,并改善成年后学习记忆能力。进一步研究发现,6-姜酚可降低活性氧簇

(reactive oxygen species, ROS) 的产生而减轻海马神经元损伤,激活 Akt 信号通路促进内源性神经干细胞的增殖能力。因此,6-姜酚可被认为是治疗新生儿 HIE 脑损伤的有效候选药物,本研究为 6-姜酚应用于临床治疗新生儿 HIE 提供更充足的科学依据。

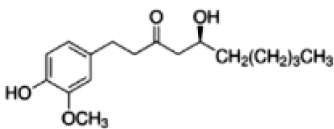
材料和方法

1. HIE 模型制作

根据《动物研究国际指导原则》进行动物实验,程序已得到山东大学动物伦理与福利委员会的批准。实验小鼠购自山东大学动物实验中心,动物许可证号:SCXK(鲁)2019 0001。在本研究中使用微小修改后 Rice-Vannucci 模型。将出生后第 7 天胎小鼠(昆明小鼠,共 78 只,模型制作后死亡 7 只,体重为 2~4 g)进行 2%~3% 异氟烷吸入麻醉,分离并结扎小鼠右颈总动脉,手术后回窝休息 1 h 后置于 37 ℃、含有 8% 氧气的缺氧箱中缺氧 90 min,假手术组仅进行麻醉并剥离右颈总动脉处理。

2. 小鼠腹腔注射及药物处理

本实验中 6-姜酚是单体,其分子式为 C₁₇H₂₆O₄,具体结构如下图所示。根据产品说明书配置 6-姜酚(成都德思特生物技术有限公司)工作液和阴性对照液(含 1% DMSO 的无菌生理盐水)。胎小鼠随机分为 3 组:假手术组(sham 组,26 只),HIE+生理盐水组(HIE 组,26 只),HIE+6-姜酚组(HIE+6G 组,26 只)。胎小鼠 HIE 处理之前 24 h 腹腔注射 6-姜酚(2 mg/kg),持续至 HIE 后 3 d。HIE 组中的胎小鼠注射含有 1% DMSO 的生理盐水。



3. Morris 水迷宫实验

采用 Morris 水迷宫评价小鼠的学习记忆能力。游泳池(直径 120 cm; 深度 30 cm)分为 4 个象限。在 1 个象限内放置 1 个透明的圆形平台(直径 10 cm)。池子里装满了不透明的墨水,台子不可见,水温保持在 24 ℃,实验前,小鼠经过 5 d 的训练。每只小鼠每天测试 4 次,休息间隔为 15 min。小鼠被随机放置在远离平台的 1 个象限,每只小鼠有 60 s 的时间去寻找平台,记录 60 s 内小鼠找到并爬上平台的时间,然

后小鼠在平台上停留 1 min。如果小鼠在 60 s 内没有找到平台,则人为引导其找到平台,并在站台停留 1 min。5 d 训练后进行正式测试,使用视频分析系统(Ethvision XT5)记录小鼠行为学指标。

4. 梗死面积测量及脑水含量检测

通过 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色测量脑梗死面积。简言之,HIE 损伤后 3 d,断头后分离小鼠脑组织,-80 ℃冷冻 2 min,切成 2 mm 厚的冠状切片后放入 2% TTC 溶液中(北京索莱宝科技有限公司),37 ℃避光染色 25 min,4%多聚甲醛固定 24 h,光学显微镜下观察并摄片。脑缺血面积表示为总梗死面积(白色区域)与总脑面积的比率。使用 Image J v1.8.0 软件对脑梗死面积进行分析。HIE 后 3 d(P10),获取大脑后立即称重,然后将大脑放入 100 ℃烤箱 48 h,再次称重。脑含水量计算公式为:脑含水量(%)=[(湿重-干重)/湿重]×100%。

5. 组织学染色

HIE 损伤后 3 d,对胎小鼠进行异氟烷深度麻醉以使其安乐死,依次用 10 ml 生理盐水和 10 ml 4%多聚甲醛进行心脏灌注,然后将小鼠脑在 4%多聚甲醛中固定 24 h。二甲苯脱蜡及梯度乙醇脱水后,石蜡包埋鼠脑,切成 4 μm 厚的冠状切片进行后续染色。根据产品说明进行 HE 和 Nissl 染色(江苏凯基生物技术股份有限公司)以观察组织形态变化和细胞增殖情况。

6. 免疫荧光染色

HIE 损伤后 3d 不同处理组小鼠脑在 4%多聚甲醛中固定 24 h。30%蔗糖沉糖处理,进行冷冻切片并保存。使用 1×PBS 清洗脑片 3 次,0.5% PBST(含 Triton-100)配置 10%山羊血清封闭液,封闭透化处理 2 h,一抗,兔抗 Ki67 多克隆抗体(1:200 Abcam 公司)4 ℃孵育过夜。0.1%PBST 洗片 3 次,二抗,山羊抗兔(1:500 Proteintech 中国公司)避光室温孵育 1 h,再用 0.1%PBST 洗片 3 次后,进行 DAPI 染色并用防荧光淬灭剂封片,在光学显微镜下观察免疫荧光染色后细胞增殖情况并摄片。

7. 总 RNA 提取及 Real-timePCR

HIE 后 3 d 收集脑组织,利用 Trizol 法提取总 RNA,使用 Thermo 反转录试剂盒反转录获得 cDNA,加入基因特异性引物和 SybrGreen 配制成 PCR 反应溶液,置于 Real-time PCR 仪上进行 Real-time PCR 反应,使用 β-actin 作为内参。

8. ROS 生成的测量

通过荧光探针二氢乙锭(dihydroethidium, DHE,上海碧云天生物技术有限公司)检测切片中海马区域细胞内活性氧 ROS 水平。石蜡切片经二

甲苯脱蜡 40 min、梯度乙醇(100%、90%、80%、70%、50%)水化后,将切片在 PBS 中洗涤 3 次,每次 20 min。DHE(1 μmol/L)于 37 ℃孵育 30 min。用 PBS 洗涤 3 次,每次 20 min,防荧光淬灭剂封片,在正置荧光显微镜下观察并摄片。

9. Western blotting 检测

HIE 后 3 d 收集脑组织,每管组织加入两粒无菌研磨珠及蛋白酶抑制剂和 RIPA 裂解液后在冰上制备为匀浆。将匀浆在 4 ℃下以 12 000 r/min 离心 20 min。收集上清液,并使用 BCA 分析(皮尔斯生物科技股份有限公司)进行定量。将样品与上样缓冲液混合并煮沸 5 min。将等量的蛋白用 10%丙酮酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳。将蛋白质转印到 PVDF 膜上。用 5%牛奶孵育 2 h 后,一抗,兔抗突触后致密蛋白 95(postsynaptic dense protein 95, PSD-95)(1:500, Proteintech 中国公司),兔抗 Akt 单克隆抗体(1:1000, CST 生物技术有限公司),兔抗 p-Akt 单克隆抗体(1:1000, CST 公司),鼠抗 β-actin 单克隆抗体(1:2000,北京全式金生物技术有限公司)4℃孵育 24 h;TBST 溶液洗涤后,用 HRP 耦联的二抗,山羊兔(1:5000)、山羊抗鼠(1:5000)均 Proteintech 中国公司,室温孵育 1 h。最后用 TBST 缓冲液洗涤后,利用 ECL 试剂盒将 A 液和 B 液依照 1:1 配制显影工作液,进行显影。

10. 透射电子显微镜观察

取大约 1 m³ 海马组织块,4%戊二醛固定 2 h, PBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 10 min,锇酸固定 1 h, PBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 10 min,梯度乙醇(30%、50%、70%、90%、100%)脱水,树脂包埋样品,超薄切片机切片,厚 50 μm,重金属(铅盐)染色后透射电子显微镜观察并摄片,分析突触结构和数目。

11. 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 统计学软件进行分析。以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多重比较采用 Tukey 检验后的单因素方差分析方法(ANOVA)。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 6-姜酚对成年后学习认知能力的改善作用

Morris 水迷宫是一种公认的评价动物学习记忆等认知功能的行为测试。在 Morris 水迷宫实验中,与 sham 组相比,HIE 组小鼠需要花更多时间寻找逃生平台,而 6-姜酚处理组小鼠寻找平台潜伏期明显降低。空间记忆功能测试发现,HIE 组小鼠在平台象限停留时间和跨越平台象限的次数明显减少,而 6-姜酚处理组小鼠得到改善(图 1A~1C)。结果表明 6-姜酚能改善 HIE 后小鼠的学习和记忆等认知功能障碍。

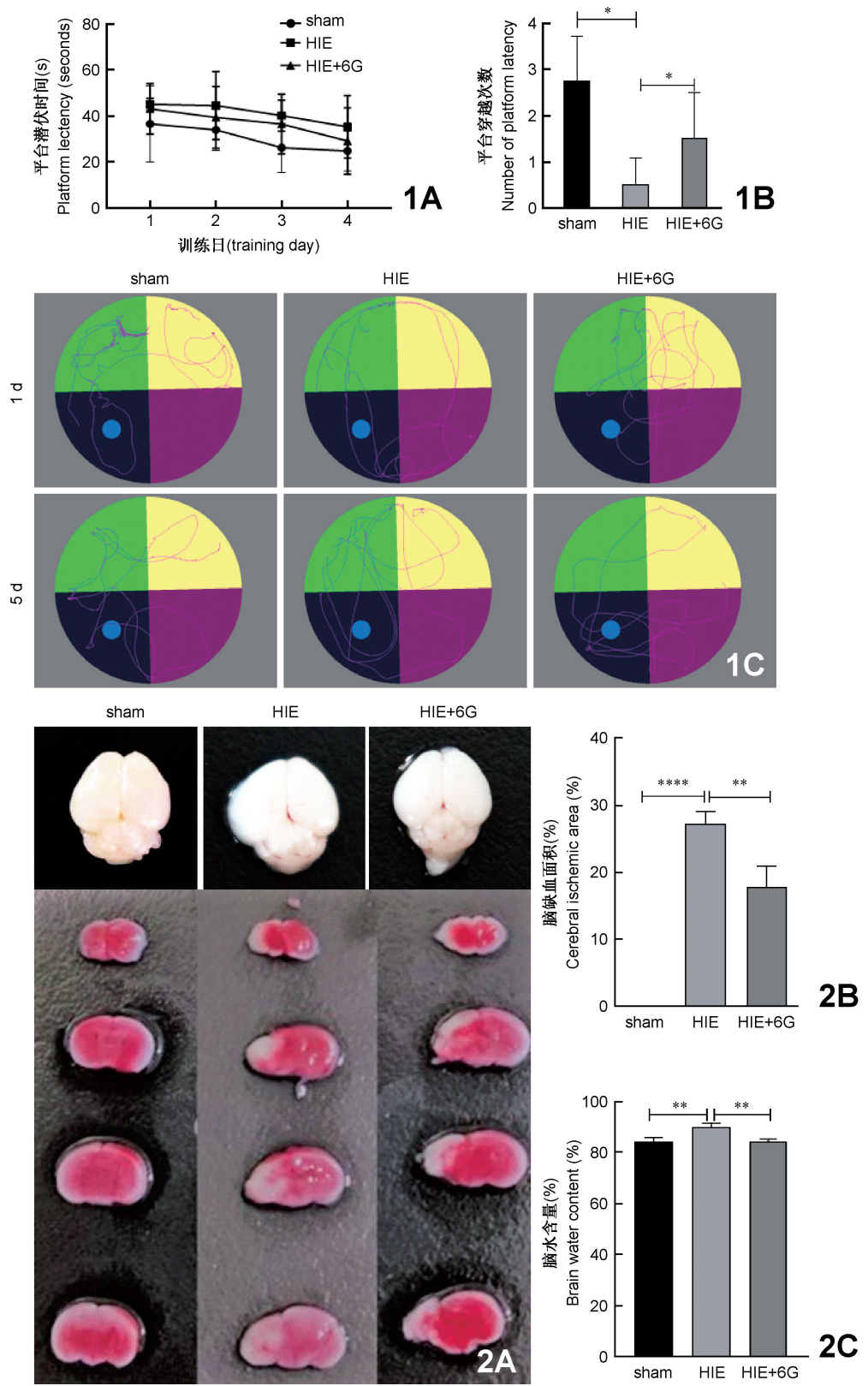


图 1 Morris 水迷宫检测小鼠 HIE 后学习记忆能力
A.小鼠 HIE 后学习能力评价; B. 60 s 内小鼠穿越平台次数以评估小鼠 HIE 后记忆能力, * $P<0.05$; C. 小鼠游泳路线的代表图片, $n=6$
图 2 6-姜酚对小鼠 HIE 后脑缺血面积和脑水肿的影响
A. HIE 损伤后 3 d,不同组代表性 TTC 染色的脑冠状切片; B. TTC 染色脑缺血面积统计结果; 缺血面积=(对侧半球面积-同侧非缺血面积)/对侧半球面积; C. 脑水含量检测, $n=3$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$
Fig.1 Morris water maze was used to test the learning and memory ability of mice after HIE
A, Evaluation of learning ability in mice after HIE; B, The statistical results of the times of mice crossing the platform in 60 s econds were used to evaluate the memory ability of mice after HIE, * $P<0.05$; C, Representative picture of the swimming route of mice, $n=6$
Fig.2 Effect of 6-gingerol on cerebral ischemia area and brain edema after HIE in mice

A, Coronal brain sections stained with TTC from different groups 3 days after HIE injury; B, Statistical results of cerebral ischemia area stained by TTC; Ischemic area = (contralateral hemisphere area-ipsilateral non-ischemic area)/contralateral hemisphere area; C, Content of brain water, $n = 3$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$

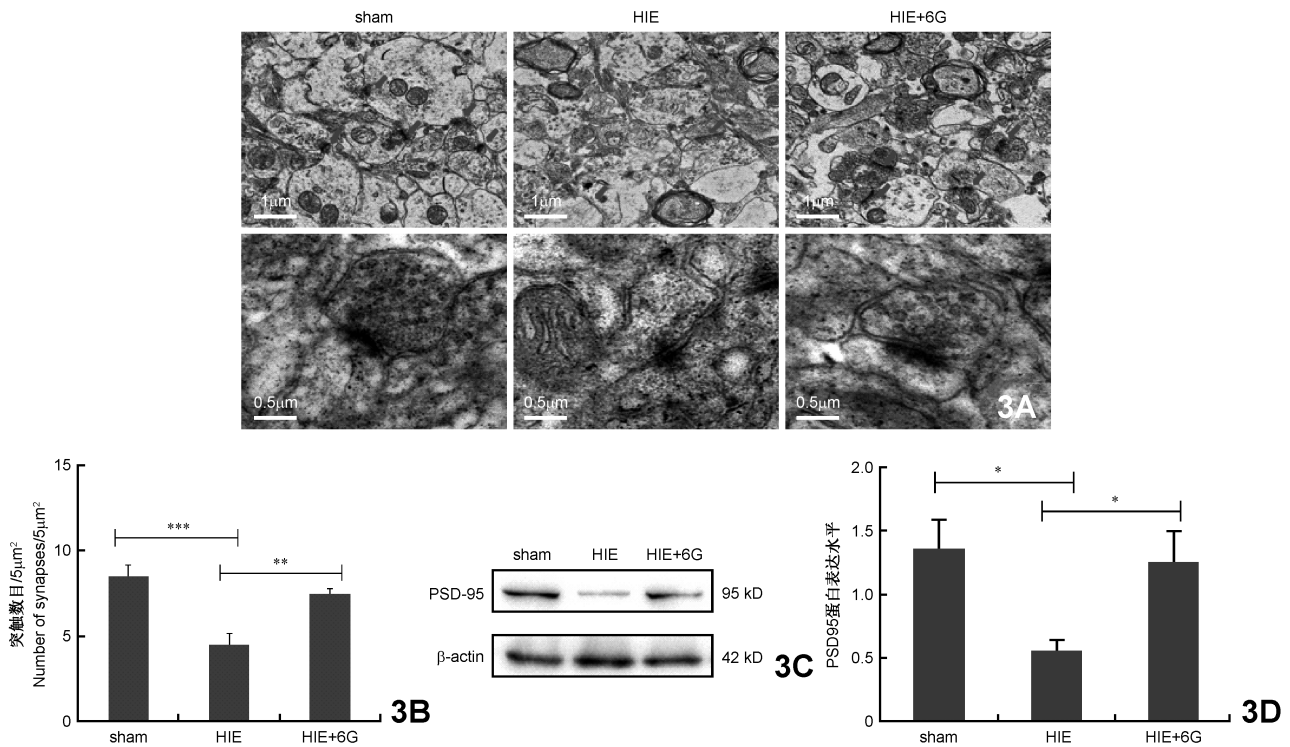


图3 6-姜酚对小鼠 HIE 后突触结构和数目的影响
A. 不同处理组海马脑区代表性透射电子显微镜结果,箭头指示突触数目,对照组海马区突触结构正常;HIE 组突触结构明显改变,突触数量较对照组减少;6-姜酚处理后突触数目和突触小泡较模型组增多 标尺示 1 μm ,标尺示,0.5 μm ; B. 不同处理组突触数目的统计结果, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; C. Western blotting 分析不同处理组突触后致密物 PSD-95 的表达变化; $n=3$; D. 统计图; $n=3$, * $P<0.05$

Fig.3 Effect of 6-gingerol on synaptic structure and number after HIE in mice

A. Representative electron microscopic results of hippocampal brain regions in different treatment groups; The synaptic structure of the hippocampus in the control group was normal; The synaptic structure of HIE group changed significantly and the number of synapses decreased compared with the control group; The number of synapses and synaptic vesicles increased after 6-gingerol treatment compared with the model group Bar = 1 μm , Bar = 0.5 μm ; B. Statistical results of the number of synapses in different treatment groups, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; C, The expression of PSD-95 in postsynaptic density was analyzed by Western blotting; $n=3$; D. Statistical chart of PSD-95; $n=3$, * $P<0.05$

2. 6-姜酚能够减轻新生小鼠 HIE 后脑梗死面积和脑水肿

为了研究 6-姜酚在新生小鼠 HIE 中的作用,我们进行了 TTC 染色检测其对 HIE 后脑缺血面积的影响。图 2A 为小鼠冠状脑切片 TTC 染色的代表性图片,正常脑组织呈现均匀的红色,而缺血部位为苍白色。Sham 组小鼠没有明显的脑缺血区域,HIE 组脑缺血面积为 $(27.22\pm1.808)\%$,6-姜酚处理将脑缺血面积降低至 $(17.83\pm3.09)\%$ (图 2B)。以上结果表明,6-姜酚能够降低 HIE 后脑梗死面积。图 2C 为脑水检测结果,HIE 后小鼠脑水含量明显升高,应用药物治疗后脑水含量减少至 $(84.233\pm0.066)\%$ 。

3. 对新生小鼠 HIE 后突触可塑性的作用

突触的结构完整性和数目在学习记忆等众多生理功能中发挥重要作用。我们利用透射电子显微镜

观察海马区突触结构和数目的变化。结果显示,对照组海马区突触结构正常;HIE 组突触结构明显改变,突触前突触小泡数量减少,突触后致密物厚度变薄,突触数量较对照组减少;6-姜酚处理后突触数目和突触小泡较模型组增多,突触后致密物也较模型组增厚。同时 Western blotting 结果也显示,6-姜酚处理突触后致密物 PSD-95 的蛋白表达水平增多(图 3)。

4. 对新生小鼠 HIE 后神经元损伤的作用

运用 HE 染色和 Nissl 染色的方法检测 6-姜酚对 HIE 后海马神经元损伤的影响。实验结果显示,sham 组中海马区域结构完整且神经细胞形态数量正常;HIE 组中,海马区域结构模糊,神经细胞数量较少且形态异常。6-姜酚治疗后可显著减少海马神经细胞形态学损伤(图 4A)。Nissl 染色检测神经细胞凋亡情况,如图 4B 显示,sham 组海马神经元形态

完整,排列紧密,结构清晰。HIE 组呈现大面积脑组织水肿甚至组织损失、神经元排列疏松。对比 HIE 组,6-姜酚组脑组织损伤程度明显改善。利用 DHE 染色检测海马原位活性氧自由基 ROS 水平,发现与 Sham 组相比,HIE 组 ROS 水平升高,而 6-姜酚组

ROS 生成减少(图 4C)。进一步利用 Real-time PCR 检测各组神经元标记物微管关联蛋白 2 (microtubule associated protein 2, MAP2) 和 NeuroD1 的表达,结果显示,6-姜酚处理后能够逆转 HIE 引起的神经元标记物表达的降低(图 4D,4E)。

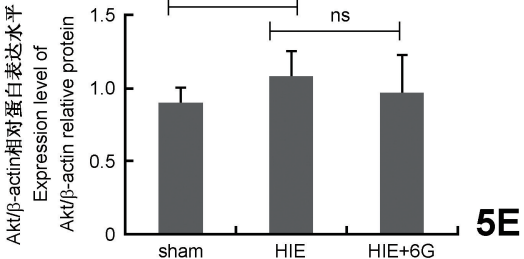
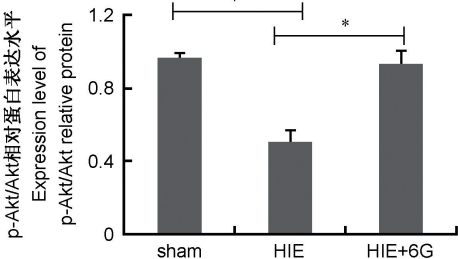
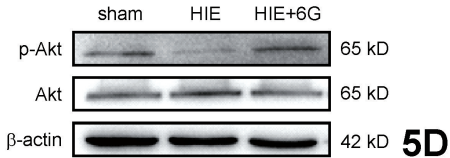
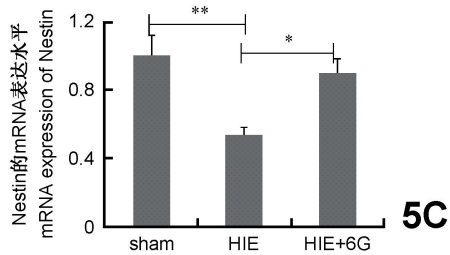
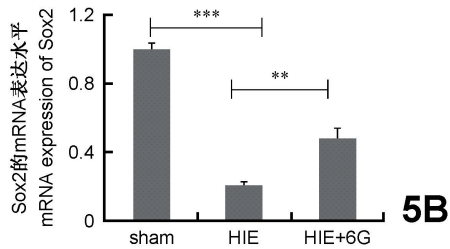
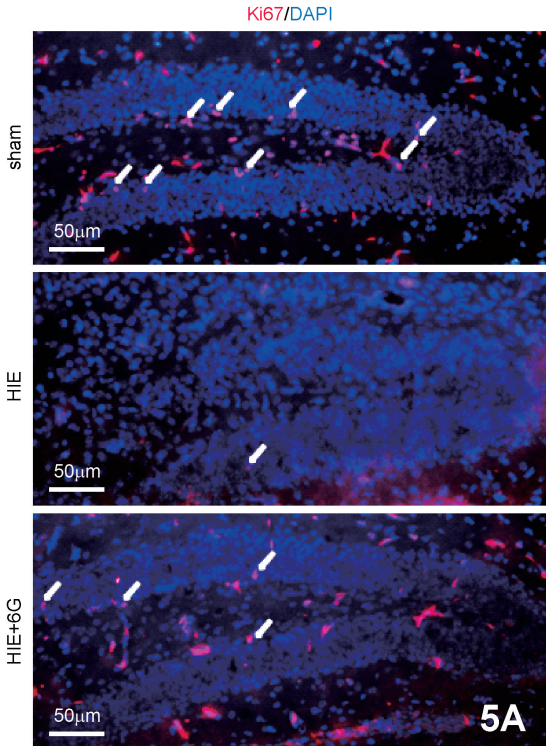
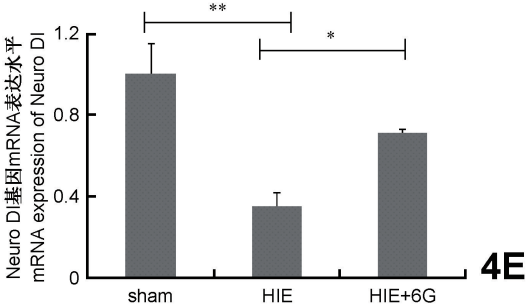
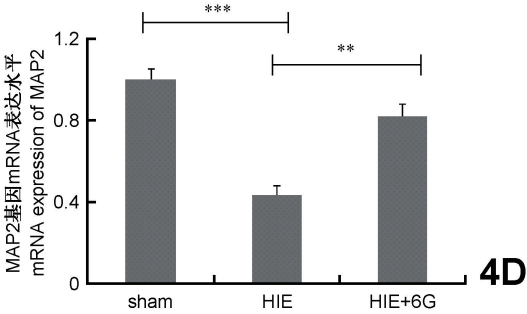
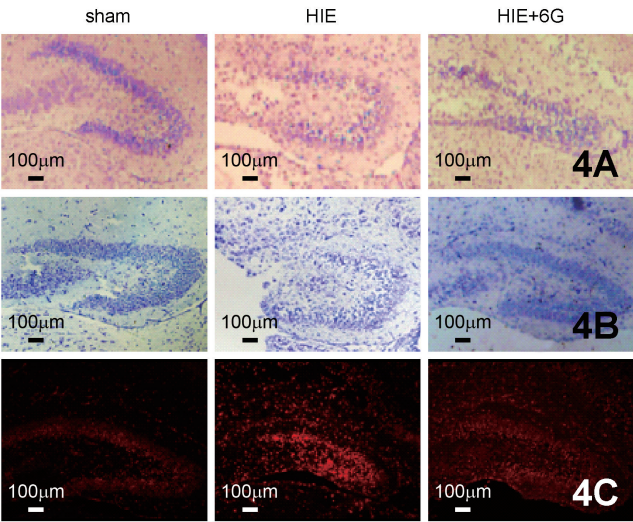


图 4 6-姜酚对小鼠 HIE 后脑组织形态学损伤的影响

A. HIE 损伤后 3 d, HE 染色冠状切片中海马结构变化的代表性照片, sham 组中海马区域结构完整, 数量正常; HIE 组中, 海马区域结构模糊, 神经细胞数量较少, 6-姜酚治疗后海马神经细胞形态学损伤减轻; B. HIE 损伤后 3 d, 小鼠大脑冠状切片海马代表性 Nissl 染色图, sham 组海马神经元形态完整, HIE 组神经元排列疏松; 对比 HIE 组, 6-姜酚组脑组织损伤程度减轻; C. DHE 染色的代表性图像反映海马中的 ROS 水平; A~C. 标尺示 100 μm ; D. Real-time PCR 检测神经元标记物 MAP2 的表达变化; E. Real-time PCR 检测神经元标记物 NeuroD1 的表达变化; $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图 5 6-姜酚对小鼠海马内源性神经干细胞增殖的影响

A. Ki67 免疫荧光染色检测细胞增殖情况, 箭头指示 Ki67 阳性细胞位置, 标尺示 50 μm ; B. 神经干细胞增殖相关转录因子 Sox2 的 mRNA 表达水平; C. 神经干细胞增殖相关转录因子 Nestin 的 mRNA 表达水平; D. Akt 信号通路的表达情况; $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; E. 统计图; $n=3$, * $P<0.05$, ns. 无差异

Fig.4 Effect of 6-gingerol on brain histomorphological damage after HIE in mice

A, Representative images of the hippocampus in the HE stained coronal sections 3 days after HIE injury; In sham group, the hippocampal structure was intact and the number was normal; In HIE group, the hippocampal region structure was fuzzy and the number of nerve cells was small, and the morphological damage of hippocampal nerve cells was relieved after 6-gingerol treatment; B, Representative Nissl staining of the hippocampus in coronal sections of the mouse brain 3 days after HIE injury; The morphology of hippocampal neurons in sham group was intact, while the arrangement of neurons in HIE group was loose; Compared with the HIE group, the degree of brain tissue injury in 6-gingerol group reduced; C, Representative images of DHE staining reflected the ROS levels in the hippocampus A-C, Bar=100 μm ; D, The expression of neuronal marker MAP2 was detected by Real-time PCR; E, The expression of neuron marker NeuroD1 was detected by Real-time PCR; $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Fig.5 Effect of 6-gingerol on the proliferation of neural stem cells in mouse hippocampus

A, Ki67 immunofluorescence staining was used to detect cell proliferation, arrows indicate Ki67 positive cells, Bar=50 μm ; B, The mRNA expression level of Sox2, a transcription factor related to neural stem cell proliferation; C, The mRNA expression level of nestin, a transcription factor related to neural stem cell proliferation; D, The expression of Akt signaling pathway; $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; E, Statistical chart of p-Akt and Akt; $n=3$, * $P<0.05$, ns, No significant difference

5. 6-姜酚通过调控新生小鼠 HIE 后神经干细胞增殖影响成年认知行为

我们进一步检测了 6-姜酚对内源性神经干细胞增殖的影响, 结果显示, 如图 5A 所示, 与 sham 相比, HIE 组增殖标记物 Ki67 阳性细胞数目减少, 6-姜酚处理后增殖数目增多。同时 Real-time PCR 结果显示, HIE 组中与神经干细胞增殖相关转录因子 Sox2 和 Nestin 的表达明显下降, 6-姜酚处理后可显著增加 Sox2 和 Nestin 的表达水平(图 5B, 5C)。Akt 信号通路神经干细胞增殖潜能密切相关, Western blotting 结果证明, HIE 组中 Akt 磷酸化水平降低, 而 6-姜酚可增加 p-Akt 的水平(图 5D)。以上结果提示, 6-姜酚可能通过激活 Akt 信号通路促进 HIE 后神经干细胞增殖。

讨 论

近年来, 随着医疗水平的不断提高和持续发展, 产前和新生儿护理得到改善, 但新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)仍然是全世界新生儿发病率和死亡率的重要原因之一。目前, 临床治疗仍以对症支持治疗为主, 其目的为恢复神经细胞的能量代谢, 以及促使受损神经细胞的修复和再生, 常用药物苯巴比妥控制惊厥, 呋塞米降低颅内压, 纳洛酮消除脑干症状, 神经营养因子促进神经恢复, 但疗效不佳, 治疗后仍存在早期新生儿死亡, 幸存者也往往存在认知障碍、癫痫发作和运动功能损伤等一系列神经系统损伤后遗症, 这些神经系统损伤后遗症的发生无疑给社会

和家庭带来沉重负担^[9, 15, 16]。新生儿 HIE 的发病机制复杂, 疗效差, 至今尚无有效的治疗措施, 因此, 探索新的有效手段减少疾病损伤是目前亟待解决的问题。本实验构建了缺氧、缺血新生小鼠模型探讨了 6-姜酚对新生儿 HIE 脑组织的保护作用。

本研究发现, 6-姜酚能够减轻新生鼠 HIE 后脑组织损伤以及改善成年后认知行为。6-姜酚是新鲜生姜中提取的酚类物质, 由于生姜具有药食同源性的特点, 使得 6-姜酚在治疗新生儿疾病中具有一定优势^[17]。近年来, 越来越多的研究表明, 6-姜酚在神经系统疾病中发挥着重要作用; 6-姜酚能够通过 NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路调节树突状细胞活化, 进而抑制实验性自身免疫性脑脊髓炎中炎症细胞在中枢神经系统的浸润, 并减少神经炎症和脱髓鞘反应^[18]。然而, 目前鲜有研究报道 6-姜酚在新生儿 HIE 中的作用。新生儿 HIE 患者中近半数患儿死亡, 而存活患儿伴发永久性的中枢神经系统后遗症如认知障碍、运动缺陷等, 因此, 能否改善幸存患儿生活质量是 HIE 治疗的关键。本实验利用 TTC 染色发现 6-姜酚可减轻新生小鼠 HIE 后脑损伤, 同时水迷宫实验表明 6-姜酚对 HIE 新生小鼠成年后的认知行为具有显著的改善作用。因此, 6-姜酚不仅对新生儿 HIE 早期的脑损伤有保护作用, 也对患儿成年后的认知障碍这一中枢神经系统后遗症有一定的改善作用。

缺氧、缺血性脑损伤患儿导致认知功能障碍的

分子机制尚不清楚。突触可塑性是学习认知功能的分子机制,对维持认知功能至关重要,包括突触的数量、形态变化及突触后致密物多少^[19]。HIE 患儿可见明显的突触数目减少,突触结构异常,突触致密物 PSD95 的表达下降;而 6-姜酚能够增加突触数目和 PSD95 的表达。神经元凋亡是 HIE 的主要病理特征,可在早期发生并持续数周,大量研究表明,抑制细胞凋亡是治疗 HIE 的有效方法。本实验通过 HE 染色、尼氏染色等方法发现,6-姜酚能够减轻神经元凋亡,神经元标记物 MAP2 和 NeuroD1 等表达增加。缺氧、缺血性脑损伤可导致过量氧自由基的产生,氧自由基生成是导致神经细胞坏死或凋亡的重要原因之一^[20,21],而 6-姜酚处理可显著降低 ROS 的产生,提示其可能通过阻止脑内氧自由基产生发挥神经功能保护作用。

脑缺氧、缺血致使神经损伤的病理生理过程十分复杂,通常是不可逆性损伤。新生儿 HIE 能够引起损伤区神经元和胶质细胞的大面积死亡,如何补充和替换损伤、坏死的细胞是治疗 HIE 的突破点。神经干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的多能干细胞,能够通过对称分裂的方式实现细胞数目的扩增,通过不对称分裂产生神经组织中的各类细胞。神经干细胞的特性,使其能够产生新的神经元和胶质细胞,参与修复缺损的脑组织^[22]。因此,促进内源性神经干细胞的增殖分化潜能,是治疗新生儿 HIE 的重要策略^[23]。近年来发现,Akt 通路在神经系统疾病中的作用日益突出,已有文献证明其可在各种神经细胞中发挥作用,参与细胞生长、代谢、增殖,参与胶质细胞和神经元的存活、分化、凋亡等过程。在脊髓损伤疾病中,Akt 信号通路促进内源性神经干细胞的增殖和神经元分化以及脊髓损伤的功能恢复^[24]。此外,研究表明,6-姜酚的保护作用涉及 Akt 信号通路,Akt 信号通路作为重要的炎症相关通路,参与脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的神经炎症中小胶质细胞的激活进而发挥抗炎作用^[25]。我们的研究结果也表明,6-姜酚处理后能够增强神经干细胞增殖的潜能以及相关转录因子的表达,激活 Akt 信号通路。因此,6-姜酚可能通过激活内源性神经干细胞增殖的潜能发挥神经保护作用,从而为缺氧、缺血性脑损伤的治疗提供新的途径和方法。

综上所述,6-姜酚发挥神经保护作用涉及多种重要机制,此外,6-姜酚是从生姜中提取的一种酚类化合物,作为食品和中草药在世界各地广泛使用,安全性较高。因此,6-姜酚有望成为新生儿缺氧、缺血性脑病的安全有效的治疗候选药物,具有潜在的临床应用价值。

参 考 文 献

[1] Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network [J]. *Pediatrics*, 2010, 126(3): 443-456.

[2] Graham EM, Ruis KA, Hartman AL, et al. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2008, 199(6): 587-595.

[3] Aridas JD S, Yawno T, Sutherland E, et al. Detecting brain injury in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: closing the gap between experimental and clinical research [J]. *Exp Neurol*, 2014, 261:281-290.

[4] Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain [J]. *J Exp Biol*, 2004, 207(Pt 18): 3149-3154.

[5] Low JA. Determining the contribution of asphyxia to brain damage in the neonate [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2004, 30(4): 276-286.

[6] Arteaga O, Álvarez A, Revuelta M, et al. Role of antioxidants in neonatal hypoxic-ischemic brain injury: new therapeutic approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2):265.

[7] Wen YD, Sheng R, Zhang LS, et al. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways [J]. *Autophagy*, 2008, 4(6): 762-769.

[8] Vasiljević B, Maglajlić-Djukić S, Gojnić M, et al. The role of oxidative stress in perinatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Srp Arh Celok Lek*, 2012, 140(1-2): 35-41.

[9] Oorschot DE, Sizemore RJ, Amer AR. Treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy with erythropoietin alone, and erythropoietin combined with hypothermia: history, current status, and future research [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4):1487

[10] Ma SQ, Guo Z, Liu FY, et al. 6-gingerol protects against cardiac remodeling by inhibiting the p38 mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021,42(10):1575-1586.

[11] Almatroodi SA, Alnuqaydan AM, Babiker AY, et al. 6-Gingerol, a bioactive compound of ginger attenuates renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats by regulating the oxidative stress and inflammation [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(3):317.

[12] Lee C, Park GH, Kim CY, et al. 6-gingerol attenuates β -amyloid-induced oxidative cell death via fortifying cellular antioxidant defense system [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(6): 1261-1269.

[13] Kang C, Kang M, Han Y, et al. 6-gingerols (6G) reduces hypoxia-induced PC-12 cells apoptosis and autophagy through regulation of miR-103/BNIP3 [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1653-1661.

[14] Simon A, Darcsi A, Kéry Á, et al. Blood-brain barrier permeability study of ginger constituents [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 177:112820.

[15] Eunson P. The long-term health, social, and financial burden of hypoxic-ischaemic encephalopathy [J]. *Dev Med Child Neurol*, 2015, 57(Suppl 3): 48-50.

[16] Favié LMA, Groenendaal F, van den Broek MPH, et al. Phenobarbital, midazolam pharmacokinetics, effectiveness, and

drug-drug interaction in asphyxiated neonates undergoing therapeutic hypothermia [J]. Neonatology, 2019, 116(2): 154-162.

[17] Huh E, Lim S, Kim HG, et al. Ginger fermented with Schizosaccharomyces pombe alleviates memory impairment via protecting hippocampal neuronal cells in amyloid beta plaque injected mice [J]. Food Funct, 2018, 9(1): 171-178.

[18] Han JJ, Li X, Ye ZQ, et al. Treatment with 6-gingerol regulates dendritic cell activity and ameliorates the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Mol Nutr Food Res, 2019, 63(18): e1801356.

[19] Silva AJ. Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory [J]. J Neurobiol, 2003, 54(1): 224-237.

[20] Lewén A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury [J]. J Neurotrauma, 2000, 17(10): 871-890.

[21] Yan Y, Luo L, Kang J. Microrna-155 aggravates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats by regulating nucleotide-binding oligomerization domain protein 1/nuclear factor κB signaling pathway [J]. Acta Anatomica Sinica, 2020, 51(6): 848-854. (in Chinese)

颜云, 罗李, 康贾. 微小 RNA-155 通过调控核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 1/核因子 κB 信号通路加剧新生大鼠缺氧缺血性脑损伤 [J]. 解剖学报, 2020, 51(6): 848-854.

[22] Christie KJ, Turnley AM. Regulation of endogenous neural stem/progenitor cells for neural repair-factors that promote neurogenesis and gliogenesis in the normal and damaged brain [J]. Front Cell Neurosci, 2013, 6:70.

[23] Niimi Y, Levison SW. Pediatric brain repair from endogenous neural stem cells of the subventricular zone [J]. Pediatr Res, 2018, 83(1-2): 385-396.

[24] Huang F, Gao T, Wang W, et al. Engineered basic fibroblast growth factor-overexpressing human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improve the proliferation and neuronal differentiation of endogenous neural stem cells and functional recovery of spinal cord injury by activating the PI3K-Akt-GSK-3β signaling pathway [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1):468.

[25] Liu Y, Deng S, Zhang Z, et al. 6-Gingerol attenuates microglia-mediated neuroinflammation and ischemic brain injuries through Akt-mTOR-STAT3 signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 883:173294.

(编辑 安晓意)

《解剖学报》可以直接使用的英文及英文缩略词

一、以下词汇在文中首次出现时可直接用英文或英文缩略词

| | |
|--------------------------|-----------------------------|
| ABC (亲和素-生物素过氧化物酶体系) | HE(苏木素-伊红) |
| Akt(蛋白激酶 B) | HRP(辣根过氧化物酶) |
| Annexin V(膜联蛋白 V) | JAK(Janus 激酶) |
| BCA (二喹啉甲酸) | MAPK(丝裂原活化蛋白激酶) |
| BCIP(5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐) | MRI(磁共振成像) |
| Bcl-2(B 淋巴细胞瘤-2 基因) | MTT(四甲基偶氮唑盐) |
| BrdU(5-溴脱氧尿嘧啶核苷) | NBT(氯化硝基四氮唑蓝) |
| BSA(牛血清清蛋白) | Nestin(巢蛋白) |
| Cas(CRISPR 关联) | OCT(最佳切割温度复合物) |
| Caspase(含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶) | PB(磷酸缓冲液) |
| CCK-8(细胞计数试剂盒 8) | PBS(磷酸盐缓冲液) |
| CRISPR(成簇规律间隔短回文重复序列) | PBST(磷酸盐吐温缓冲液) |
| CT(计算机 X 线断层摄影术) | PI(碘化丙啶) |
| DAB(二氨基联苯胺) | PI3K(磷脂酰肌醇-3 激酶) |
| DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶) | PVDF(聚偏二氟乙烯) |
| DMEM(缓冲液培养基) | Real-time PCR(实时定量聚合酶链反应) |
| DMSO(二甲基亚砷) | RT-PCR(反转录聚合酶链反应) |
| DNase(脱氧核糖核酸酶) | SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳) |
| ECL(增强型化学发光法) | SP(链酶卵白素-过氧化物酶法) |
| EDTA(乙二胺四乙酸) | STAT(信号转导子及转录激活因子) |
| ELISA(酶联免疫吸附测定) | TBST(三乙醇胺缓冲盐水) |
| ERK(细胞外调节蛋白激酶) | TRITC(四甲基异硫氰酸罗丹明) |
| FBS(胎牛血清) | TUNEL(原位缺口末端标记) |
| FITC(异硫氰酸荧光素) | Western blotting(免疫印迹法) |
| GAPDH(3-磷酸甘油醛脱氢酶) | |

二、其他在论文中首次出现的专业词汇应执行稿约规定,即中文全称(英文全称,缩略词)