

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research天麻素调控 SYNPO2 影响 PI3K/Akt/mTOR
信号通路改善新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的
机制研究Study on the mechanism by which gastrodin regulates SYNPO2 to influence the
PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and improve hypoxic – ischemic brain damage
in neonatal rats胡清宇¹, 刘文娟¹, 吕宗立²(1. 山西药科职业学院 药学系 山西 太原
030031; 2. 山西省汾阳市人民医院 呼吸内科 山
西 汾阳 032200)HU Qing – yu¹, LIU Wen – juan¹,
LÜ Zong – li²(1. Department of Pharmacy, Shanxi
Pharmaceutical Vocational College,
Taiyuan 030031, Shanxi Province, China;
2. Respiratory Medicine, People's
Hospital of Fenyang City, Shanxi
Province, Fenyang 032200, Shanxi
Province, China)基金项目: 山西省中医药管理局科研课题基金
资助项目(2024ZYCY077)作者简介: 胡清宇(1980 –), 女, 副教授, 主要
从事药物成分及药理作用方面的工作

通信作者: 吕宗立, 主任医师

MP: 18734139133

E – mail: qingyu77@sina.com

摘要:目的 探讨天麻素调控突触相关蛋白 2(SYNPO2)对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的作用及其机制。方法 结扎新生大鼠左侧颈总动脉,置于缺氧箱中持续缺氧 40 min,建立 HIBD 模型。将大鼠随机分为假手术组(不进行结扎颈总动脉和缺氧处理)、模型组(建立 HIBD 模型)、天麻素组(分别于颈总动脉结扎前 1 h、缺氧后 1 h、缺氧后 12 h 腹腔注射天麻素 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、天麻素 + oe – NC 组(造模前第 3 d,大鼠侧脑室内移植 $3 \mu\text{L}$ oe – NC,随后处理同天麻素组)和天麻素 + oe – SYNPO2 组(造模前第 3 d,大鼠侧脑室内移植 $3 \mu\text{L}$ oe – SYNPO2,随后处理同天麻素组),每组 10 只。蛋白免疫印迹法检测 SYNPO2、磷脂酰肌醇 3 – 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路相关蛋白水平;短期行为学测试检测各组大鼠神经功能;干湿重法检测大鼠脑含水量;原位末端标记染色法检测各组大鼠脑组织细胞凋亡率;免疫荧光法检测各组大鼠脑组织中溶酶体相关膜蛋白 1(LAMP1)和微管相关蛋白 1 轻链 3β (LC3B)蛋白水平。结果 假手术组、模型组、天麻素组、天麻素 + oe – NC 组和天麻素 + oe – SYNPO2 组 SYNPO2 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 2.05 ± 0.34 、 1.38 ± 0.18 、 1.35 ± 0.17 和 1.68 ± 0.22 ,磷酸化 PI3K(p – PI3K)/PI3K 蛋白相对水平分别为 1.00 ± 0.19 、 0.25 ± 0.04 、 0.65 ± 0.08 、 0.68 ± 0.07 和 0.35 ± 0.05 ,磷酸化 Akt(p – Akt)/Akt 蛋白相对水平分别为 1.00 ± 0.13 、 0.28 ± 0.04 、 0.49 ± 0.06 、 0.51 ± 0.07 和 0.31 ± 0.04 ,磷酸化 mTOR(p – mTOR)/mTOR 蛋白相对水平分别为 1.00 ± 0.16 、 0.22 ± 0.04 、 0.52 ± 0.06 、 0.54 ± 0.07 和 0.29 ± 0.05 ,翻正反射潜伏期分别为 (2.56 ± 0.33) 、 (14.86 ± 2.12) 、 (5.66 ± 0.75) 、 (5.23 ± 0.79) 和 (10.33 ± 1.56) s,负趋地性潜伏期分别为 (17.86 ± 2.44) 、 (56.33 ± 8.22) 、 (22.12 ± 3.56) 、 (23.05 ± 3.22) 和 (40.22 ± 5.66) s,避崖反射潜伏期分别为 (7.11 ± 0.85) 、 (16.55 ± 2.32) 、 (7.22 ± 0.85) 、 (7.83 ± 0.96) 和 (13.55 ± 2.45) s,含水量分别为 $(51.56 \pm 6.47)\%$ 、 $(62.16 \pm 6.22)\%$ 、 $(55.02 \pm 6.25)\%$ 、 $(54.63 \pm 7.22)\%$ 、 $(61.98 \pm 5.17)\%$,凋亡率分别为 $(5.17 \pm 0.65)\%$ 、 $(75.32 \pm 9.65)\%$ 、 $(25.65 \pm 3.89)\%$ 、 $(23.85 \pm 2.98)\%$ 和 $(50.56 \pm 6.89)\%$,LAMP1 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.15 、 3.85 ± 0.44 、 1.14 ± 0.15 、 1.18 ± 0.19 和 3.22 ± 0.39 ,LC3B 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.18 、 3.45 ± 0.52 、 1.25 ± 0.16 、 1.21 ± 0.15 和 1.68 ± 0.19 。模型组的上述指标与假手术组相比,天麻素组的上述指标与模型组相比,天麻素 + oe – SYNPO2 组的上述指标与天麻素 + oe – NC 组相比,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。结论 天麻素通过抑制 SYNPO2,减轻 HIBD 大鼠脑水肿和神经功能障碍,保护神经元结构完整性,减少神经元凋亡,减轻过度自噬,可能是通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路实现的。

关键词: 天麻素;突触相关蛋白 2;缺氧缺血性脑损伤;磷脂酰肌醇 3 – 激酶/蛋白

激酶 B/雷帕霉素靶蛋白;自噬

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.04.011

中图分类号:R722.1 文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2026)04-0523-07

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of gastrodin regulating synaptopodin 2 (SYNPO2) on hypoxic - ischemic brain damage (HIBD) in neonatal rats. **Methods** The left common carotid artery of neonatal rats was ligated, and the rats were placed in a hypoxic chamber for 40 minutes to establish the HIBD model. Rats were randomly divided into sham operation group (no common carotid artery ligation or hypoxia treatment), model group (HIBD model established), gastrodin group (intraperitoneal injection of gastrodin $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 1 hour before common carotid artery ligation, 1 hour after hypoxia, and 12 hours after hypoxia), gastrodin + oe - NC group (3 days before modeling, 3 microliters oe - NC was transplanted intracerebroventricularly in rats, subsequent treatment same as the gastrodin group) and gastrodin + oe - SYNPO2 group (3 days before modeling, 3 microliters oe - SYNPO2 was transplanted intracerebroventricularly in rats, subsequent treatment same as the gastrodin group), with 10 rats in each group. Western blot was used to detect the levels of SYNPO2 and phosphatidylinositol 3 - kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mechanistic target of rapamycin (mTOR) signaling pathway - related proteins; short - term behavioral tests were used to detect neurological function in each group; the dry - wet weight method was used to detect brain water content; TdT - mediated dUTP nick end labeling was used to detect the apoptosis rate of brain tissue cells in each group; immunofluorescence was used to detect the levels of lysosomal associated membrane protein 1 (LAMP1) and microtubule associated protein 1 light chain 3 beta (LC3B) proteins in brain tissue of each group. **Results** The relative expression levels of SYNPO2 protein in the sham operation group, model group, gastrodin group, gastrodin + oe - NC group and gastrodin + oe - SYNPO2 group were 1.00 ± 0.16 , 2.05 ± 0.34 , 1.38 ± 0.18 , 1.35 ± 0.17 and 1.68 ± 0.22 , respectively; the relative expression levels of phosphorylated PI3K (p - PI3K)/PI3K protein were 1.00 ± 0.19 , 0.25 ± 0.04 , 0.65 ± 0.08 , 0.68 ± 0.07 and 0.35 ± 0.05 , respectively; the relative expression levels of phosphorylated Akt (p - Akt)/Akt protein were 1.00 ± 0.13 , 0.28 ± 0.04 , 0.49 ± 0.06 , 0.51 ± 0.07 and 0.31 ± 0.04 , respectively; the relative levels of phosphorylated mTOR (p - mTOR)/mTOR protein were 1.00 ± 0.16 , 0.22 ± 0.04 , 0.52 ± 0.06 , 0.54 ± 0.07 and 0.29 ± 0.05 , respectively; the righting reflex latency periods were (2.56 ± 0.33), (14.86 ± 2.12), (5.66 ± 0.75), (5.23 ± 0.79) and (10.33 ± 1.56) s, respectively; the negative geotaxis latency periods were (17.86 ± 2.44), (56.33 ± 8.22), (22.12 ± 3.56), (23.05 ± 3.22) and (40.22 ± 5.66) s, respectively; the cliff avoidance reflex latency periods were (7.11 ± 0.85), (16.55 ± 2.32), (7.22 ± 0.85), (7.83 ± 0.96) and (13.55 ± 2.45) s, respectively; the water contents were (51.56 ± 6.47)%, (62.16 ± 6.22)%, (55.02 ± 6.25)%, (54.63 ± 7.22)% and (61.98 ± 5.17)%, respectively; the apoptosis rates were (5.17 ± 0.65)%, (75.32 ± 9.65)%, (25.65 ± 3.89)%, (23.85 ± 2.98)% and (50.56 ± 6.89)%, respectively; the relative fluorescence intensity of LAMP1 were 1.00 ± 0.15 , 3.85 ± 0.44 , 1.14 ± 0.15 , 1.18 ± 0.19 and 3.22 ± 0.39 , respectively; the relative fluorescence intensity of LC3B were 1.00 ± 0.18 , 3.45 ± 0.52 , 1.25 ± 0.16 , 1.21 ± 0.15 and 1.68 ± 0.19 , respectively; the above indicators of the model group were statistically significant compared with the sham operation group, the above indicators of the gastrodin group were statistically significant compared with the model group, and the above indicators of the gastrodin + oe - SYNPO2 group were statistically significant compared with the gastrodin + oe - NC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** Gastrodin inhibits SYNPO2, alleviates brain edema and neurological dysfunction in HIBD rats, protects neuronal structural integrity, reduces neuronal apoptosis, and alleviates excessive autophagy, which may be achieved by activating the PI3K/Akt/mTOR pathway.

Key words: gastrodin; synaptopodin 2; hypoxic - ischemic brain damage; phosphatidylinositol 3 - kinase/protein kinase B/mechanistic target of rapamycin; autophagy

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是围产期窒息引发的严重神经系统并发症,其病理机制涉及氧化应激、炎症反应及细胞死亡级联反应,导致脑白质软化、神经元凋亡及长期神经发育障碍^[1-2]。自噬失衡与磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mechanistic target of rapamycin, mTOR)信号通路的异常调控已被证实是神经元死亡的关键环节^[3]。突触相关蛋白2(synaptopodin 2, SYNPO2)在神经突触可塑性和凋亡过程中发挥重要调控作用,但其在HIBD中的具体机制尚未明确^[4]。天麻素作为传统中药天麻的主要活性成分,具有神经保护、抗凋亡及调节自噬的作用^[5]。中枢神经系统损伤后,星形胶质细胞激活并募集至缺血半暗带,胞体增生、突起增多,通过分泌大量细胞因子参与炎症反应和氧化应激,加剧继发性脑损伤。报道指出,天麻素能够发挥神经保护作用,其机制在于下调星形胶质细胞中单核细胞趋化因子1的表达水平,进而对HIBD产生保护效应^[6]。本研究拟构建新生大鼠HIBD模型,探讨天麻素是否通过靶向抑制SYNPO2表达,激活PI3K/Akt/mTOR信号通路,从而改善HIBD大鼠的神经功能缺损、脑水肿及神经元过度自噬,为开发新型神经保护策略提供实验依据。

材料与方法

1 材料

动物 SPF级SD(Sprague-Dawley)大鼠,雌雄比例为1:1,体重12~17 g,鼠龄7 d,购自山西三颗月生物科技有限公司。动物生产许可证号:SCXK(晋)2024-0003;动物使用许可证号:SYXK(晋)2024-0006。本实验经山西药科职业学院动物伦理委员会批准(伦理批号:2025-02719)。

药品与试剂 天麻素,规格:5 mg,纯度:99.70%,批号:S238301,美国Selleck生物科技有限公司生产。兔抗大鼠SYNPO2、PI3K、磷酸化PI3K(phosphorylated PI3K, p-PI3K)、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、溶酶体相关膜蛋白1(lysosomal associated membrane protein 1, LAMP1)、微管相关蛋白1轻链3 β (microtubule associated protein 1 light chain 3 beta, LC3B)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、山羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗、Alexa Fluor 488 标记荧光二抗和Alexa Fluor 680 标记荧光二抗,均由英国Abcam公

司生产;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒,北京伊塔生物科技有限公司生产;尼氏染色试剂盒,湖北武汉佰瑞得生物技术有限公司生产;原位末端标记染色(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)试剂盒,湖北亚科因(武汉)生物技术有限公司生产;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI),广东深圳欣博盛生物科技有限公司生产。

仪器 CFX96 Touch 实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪,美国BioRad公司产品;TS2 荧光显微镜,日本尼康公司产品。

2 实验方法

2.1 HIBD模型建立^[7]

将麻醉后新生大鼠仰卧固定于手术台,消毒后暴露并结扎其左侧颈总动脉。术后恢复1 h,将大鼠置于含8%氧气、92%氮气、温度维持在30~37℃的改进动物缺氧箱中持续缺氧40 min。缺氧箱底部放入适量钠石灰防止大鼠因CO₂浓度过高出现死亡。

2.2 分组与给药方法^[7]

将大鼠随机分为假手术组、模型组、天麻素组、天麻素+oe-NC组和天麻素+oe-SYNPO2组,每组10只。除假手术组外,其余所有新生大鼠均采用2.1方法进行造模。假手术组:接受相同的手术操作,打开皮肤后缝合,不进行结扎颈总动脉和缺氧处理。天麻素组:大鼠分别于颈总动脉结扎前1 h、缺氧后1 h、缺氧后12 h腹腔注射天麻素(溶解于生理盐水中),剂量为100 mg·kg⁻¹。天麻素+oe-NC组:造模前第3 d,将大鼠麻醉,于大脑中缝处的头皮开口,使用脑立体定位仪固定大鼠,通过微量进样器,于侧脑室(AP: -0.5 mm; ML: -1.2 mm; DV: -2.0 mm)内移植3 μ L过表达阴性慢病毒(2.5×10^8 TU·mL⁻¹),注射速度1 μ L·min⁻¹,共持续3 min,其余处理同天麻素组一致。天麻素+oe-SYNPO2组:造模前第3 d,将大鼠麻醉,于大脑中缝处的头皮开口,使用脑立体定位仪固定大鼠,通过微量进样器,于侧脑室(AP: -0.5 mm; ML: -1.2 mm; DV: -2.0 mm)内移植3 μ L过表达慢病毒(2.5×10^9 TU·mL⁻¹),注射速度1 μ L·min⁻¹,共持续3 min,其余处理同天麻素组一致。分离侧脑室周围脑组织,采用qRT-PCR和蛋白免疫印迹分别检测大鼠脑组织SYNPO2的mRNA水平和蛋白表达水平,验证SYNPO2的过表达效率。

2.3 qRT-PCR检测SYNPO2 mRNA水平^[8]

取大鼠脑组织50 mg, TRIzol法提取总RNA。测

定 RNA 纯度后,取 1 μg RNA 反转录。将逆转录后的 cDNA 行 qRT-PCR 法检测,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 sec,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec,40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 相对表达量。引物序列:SYNPO2 上游:5'-AGAAGCAGCCCTTACAAGTTG-3',下游:5'-AGCCTCACTTATTCCACTGGAT-3'; GAPDH 上游:5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',下游:5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

2.4 蛋白免疫印迹检测 SYNPO2、PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白水平^[9]

取大鼠脑组织裂解于放射免疫沉淀缓冲液,测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转印至聚二偏氟乙烯板膜。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,孵育一抗(SYNPO2 1:1000;PI3K/p-PI3K、Akt/p-Akt、mTOR/p-mTOR 1:1500;GAPDH 1:5000)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。漂洗后孵育辣根过氧化物酶标记二抗(1:5000)室温 2 h。增强型化学发光试剂化学发光显影,以 GAPDH 为内参,计算各蛋白相对表达水平。

2.5 短期行为学测试检测各组大鼠神经功能^[10]

行为学测试场地选用隔音避光行为学实验箱,箱内温度严格控制为(22 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度维持在(55 $\pm$ 5)%。翻正反射:将大鼠仰卧置于海绵垫,记录恢复四肢着地所需时间,限时 30 s。负趋地性:将大鼠头朝下置于 45 $^{\circ}$ 斜坡,记录转身 180 $^{\circ}$ 所需时间,限时 90 s。避崖反射:将大鼠前爪置于平台边缘(距桌面 2 cm),记录后撤回避时间,限时 20 s。

2.6 干湿重法检测大鼠脑含水量^[8]

快速取出脑组织后,使用电子分析天平称取湿重;随后将样本置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥 24 h,再次称重获得干重。含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 $\times$ 100%。

2.7 HE 和尼氏染色检测各组大鼠脑部组织病理变化^[9]

采用断头法对大鼠实施处死后,将其大脑取出,随后用多聚甲醛对脑组织进行固定,再进行石蜡包埋与切片处理。HE 染色:先将切片通过梯度乙醇进行脱水,接着用苏木精对细胞核染色 3 分钟,之后用盐酸乙醇完成分化操作,再用伊红对细胞质染色 1 分钟,最后用中性树胶进行封片。尼氏染色:切片浸于 1% 焦油紫溶液(60 $^{\circ}\text{C}$)染 20 min,尼氏分化液分色,梯度乙醇脱水透明。光学显微镜下观察。

2.8 TUNEL 检测各组大鼠脑组织细胞凋亡率^[9]

大鼠脑组织石蜡切片首先经二甲苯处理以去除

石蜡,随后通过梯度乙醇进行水化处理。组织通透性通过蛋白酶 K 消化。TUNEL 反应混合液被滴加至切片表面,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光孵育 1 h。细胞核用 DAPI 染色 5 min 后,在荧光显微镜下进行观察。

2.9 免疫荧光检测各组大鼠脑组织中 LAMP1 和 LC3B 蛋白水平^[11]

取大鼠脑组织石蜡切片,二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化。进行柠檬酸钠缓冲液高压热修复。0.5% Triton X-100 通透 20 min,5% BSA 封闭 1 h。分别孵育一抗:LAMP1(1:200)、LC3B(1:300)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。加入二抗(1:500)避光孵育 1 h,DAPI 复染。抗淬灭封片剂封固,共聚焦显微镜观察。采集区域:聚焦大鼠脑组织损伤核心区及损伤周边区,同时选取对侧正常脑组织作为对照;每张切片在上述各区域随机选取 5 个不重叠视野;细胞计数采用双盲法,取平均值作为最终数据。

3 统计学处理

用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计数资料用率(%)表示,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两组间比较采用 $LSD-t$ 检验。

结 果

1 天麻素对 HIBD 脑部组织中 SYNPO2 水平影响

与假手术组相比,模型组中 SYNPO2 mRNA 和蛋白水平均明显升高(均 $P < 0.001$);与模型组相比,天麻素组中 SYNPO2 mRNA 和蛋白水平均明显降低(均 $P < 0.001$);与天麻素组相比,天麻素+oe-NC 组中 SYNPO2 mRNA 和蛋白水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与天麻素+oe-NC 组相比,天麻素+oe-SYNPO2 组中 SYNPO2 mRNA 和蛋白水平均明显升高($P < 0.01$, $P < 0.001$),见表 1。

2 天麻素通过 SYNPO2 改善 HIBD 大鼠神经功能障碍

与假手术组相比,模型组中翻正反射、负趋地性和避崖反射潜伏期明显延长(均 $P < 0.001$),脑部含水量明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,天麻素组中翻正反射、负趋地性和避崖反射潜伏期均明显缩短(均 $P < 0.001$),脑部含水量明显降低($P < 0.05$);与天麻素组相比,天麻素+oe-NC 组中翻正反射、负趋地性、避崖反射潜伏期和脑部含水量在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与天麻素+oe-NC 组相比,天麻素+oe-SYNPO2 组中翻正反射、负趋地

性和避崖反射潜伏期均明显延长(均 $P < 0.001$), 脑部含水量明显升高($P < 0.05$), 见表 2。

表 1 各组脑组织中突触相关蛋白 2 (SYNPO2) mRNA 和蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of synaptopodin 2 (SYNPO2) mRNA and protein levels in brain tissues of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	SYNPO2	
		mRNA	Protein
Sham operation	10	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.16
Model	10	1.98 ± 0.22***	2.05 ± 0.34***
Gastrodin	10	1.22 ± 0.18###	1.38 ± 0.18###
Gastrodin + oe - NC	10	1.28 ± 0.14	1.35 ± 0.17
Gastrodin + oe - SYNPO2	10	1.75 ± 0.19 $\Delta\Delta\Delta$	1.68 ± 0.22 $\Delta\Delta$

SYNPO2: Synaptopodin 2; Gastrodin group: Intraperitoneal injection of gastrodin 100 mg · kg⁻¹ 1 hour before common carotid artery ligation, 1 hour after hypoxia, and 12 hours after hypoxia; Gastrodin + oe - NC group: 3 days before modeling, 3 microliters oe - NC was transplanted intracerebroventricularly in rats, subsequent treatment same as the gastrodin group; Gastrodin + oe - SYNPO2 group: 3 days before modeling, 3 microliters oe - SYNPO2 was transplanted intracerebroventricularly in rats, subsequent treatment same as the gastrodin group; Compared with the sham operation group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, ### $P < 0.001$; Compared with the gastrodin + oe - NC group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

表 2 各组新生大鼠翻正反射、负趋地性、避崖反射潜伏期和脑含水量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of righting reflex, negative geotaxis, and cliff avoidance reflex latency periods and brain water content of neonatal rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Righting reflex latency (s)	Negative geotaxis latency (s)	Cliff avoidance reflex latency (s)	Water content (%)
Sham operation	2.56 ± 0.33	17.86 ± 2.44	7.11 ± 0.85	51.56 ± 6.47
Model	14.86 ± 2.12***	56.33 ± 8.22***	16.55 ± 2.32***	62.16 ± 6.22**
Gastrodin	5.66 ± 0.75###	22.12 ± 3.56###	7.22 ± 0.85###	55.02 ± 6.25 [#]
Gastrodin + oe - NC	5.23 ± 0.79	23.05 ± 3.22	7.83 ± 0.96	54.63 ± 7.22
Gastrodin + oe - SYNPO2	10.33 ± 1.56 $\Delta\Delta\Delta$	40.22 ± 5.66 $\Delta\Delta\Delta$	13.55 ± 2.45 $\Delta\Delta\Delta$	61.98 ± 5.17 Δ

Dose and n refer to table1. Compared with the sham operation group, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ### $P < 0.001$; Compared with the gastrodin + oe - NC group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

5 天麻素通过 SYNPO2 调节 HIBD 脑部神经自噬

与假手术组相比, 模型组中自噬标志物 LAMP1 和 LC3B 相对荧光强度均明显升高(均 $P < 0.001$); 与模型组相比, 天麻素组中 LAMP1 和 LC3B 相对荧光强度均明显降低(均 $P < 0.001$); 与天麻素组相比, 天麻素 + oe - NC 组中 LAMP1 和 LC3B 相对荧光强度在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$); 与天麻素 + oe - NC 组相比, 天麻素 + oe - SYNPO2 组中 LAMP1 和 LC3B 相对荧光强度

3 天麻素通过 SYNPO2 改善 HIBD 脑部组织病理变化

假手术组大鼠脑组织神经元数量丰富, 结构完整, 分布均匀, 尼氏小体数量丰富; 与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织神经元细胞排列紊乱, 核固缩, 染色加深, 尼氏小体数量减少, 细胞空泡化明显; 与模型组相比, 天麻素组大鼠脑组织上述病理特征明显降低; 与天麻素组相比, 天麻素 + oe - NC 组中上述病理特征无明显差异; 与天麻素 + oe - NC 组相比, 天麻素 + oe - SYNPO2 组中上述病理特征明显升高。

4 天麻素通过 SYNPO2 抑制 HIBD 大鼠脑部组织细胞凋亡

假手术组、模型组、天麻素组、天麻素 + oe - NC 组和天麻素 + oe - SYNPO2 组大鼠脑组织细胞凋亡率分别为 (5.17 ± 0.65)%、(75.32 ± 9.65)%、(25.65 ± 3.89)%、(23.85 ± 2.98)% 和 (50.56 ± 6.89)%。与假手术组相比, 模型组中脑部组织细胞凋亡率明显升高($P < 0.001$); 与模型组相比, 天麻素组中细胞凋亡率明显降低($P < 0.001$); 与天麻素组相比, 天麻素 + oe - NC 组中细胞凋亡率在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$); 与天麻素 + oe - NC 组相比, 天麻素 + oe - SYNPO2 组中细胞凋亡率明显升高($P < 0.001$)。

均明显升高(均 $P < 0.001$), 见表 3。

6 天麻素通过 SYNPO2 影响 PI3K/Akt/mTOR 信号通路

与假手术组相比, 模型组中 p - PI3K/PI3K、p - Akt/Akt 和 p - mTOR/mTOR 的相对表达水平均明显降低(均 $P < 0.001$); 与模型组相比, 天麻素组中 p - PI3K/PI3K、p - Akt/Akt 和 p - mTOR/mTOR 的相对表达水平均明显升高($P < 0.001$); 与天麻素组相比, 天麻素 + oe - NC 组中 p - PI3K/PI3K、p - Akt/Akt 和

p-mTOR/mTOR 的相对表达水平在统计学上差异无统计学意义 ($P>0.05$);与天麻素+oe-NC 组相比,天麻素+oe-SYNPO2 组中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 的相对表达水平均明显降低 (均 $P<0.001$),见图 1 和表 4。

表 3 各组大鼠脑部组织溶酶体相关膜蛋白 1 (LAMP1) 和微管相关蛋白 1 轻链 3β (LC3B) 相对荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of relative fluorescence intensity of lysosomal associated membrane protein 1 (LAMP1) and microtubule associated protein 1 light chain 3 beta (LC3B) in brain tissue across groups of rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	LAMP1	LC3B
Sham operation	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.18
Model	3.85 ± 0.44 ***	3.45 ± 0.52 ***
Gastrodin	1.14 ± 0.15 ###	1.25 ± 0.16 ###
Gastrodin + oe - NC	1.18 ± 0.19	1.21 ± 0.15
Gastrodin + oe - SYNPO2	3.22 ± 0.39 $\Delta\Delta\Delta$	1.68 ± 0.19 $\Delta\Delta\Delta$

Dose and n refer to table1. LAMP1: Lysosomal associated membrane protein 1; LC3B: Microtubule associated protein 1 light chain 3 beta; Compared with the sham operation group, *** $P<0.001$; Compared with the model group, ### $P<0.001$; Compared with the gastrodin + oe - NC group, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$.

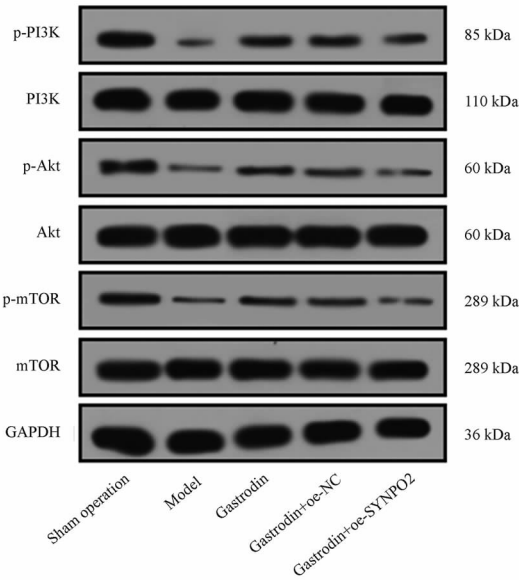


图 1 各组大鼠脑部组织中磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路相关蛋白水平

Figure 1 Protein levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mechanistic target of rapamycin (mTOR) signaling pathway-related proteins in brain tissue across groups of rats

表 4 各组大鼠脑部组织磷酸化 PI3K (p-PI3K)/PI3K、磷酸化 Akt (p-Akt)/Akt 和磷酸化 mTOR (p-mTOR)/mTOR 蛋白相对水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of relative levels of phosphorylated PI3K (p-PI3K)/PI3K, phosphorylated Akt (p-Akt)/Akt and phosphorylated mTOR (p-mTOR)/mTOR proteins in brain tissue across groups of rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR
Sham operation	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.16
Model	0.25 ± 0.04 ***	0.28 ± 0.04 ***	0.22 ± 0.04 ***
Gastrodin	0.65 ± 0.08 ###	0.49 ± 0.06 ###	0.52 ± 0.06 ###
Gastrodin + oe - NC	0.68 ± 0.07	0.51 ± 0.07	0.54 ± 0.07
Gastrodin + oe - SYNPO2	0.35 ± 0.05 $\Delta\Delta\Delta$	0.31 ± 0.04 $\Delta\Delta\Delta$	0.29 ± 0.05 $\Delta\Delta\Delta$

Dose and n refer to table1. Compared with the sham operation group, *** $P<0.001$; Compared with the model group, ### $P<0.001$; Compared with the gastrodin + oe - NC group, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$.

讨 论

HIBD 至今仍然是导致新生儿死亡的关键因素之一,其发病机制尚未完全明确,也缺乏高效特异的治疗方法,患儿常遗留不同程度的神经系统损伤。研究表明,骨髓基质干细胞抑制 SYNPO2 表达,减轻神经自噬,改善 HIBD 大鼠损伤^[12]。天麻素作为一种天然酚性糖苷,系从传统中药天麻里提取所得,它能够抑制中枢神经系统过度亢奋,助力大脑皮质恢复正常的兴奋状态。研究发现,天麻素能通过激活 Akt 磷酸化水平,缓解新生小鼠 HIBD 炎症反应^[13]。且它还能够增强大鼠在缺氧环境下受损的脑微血管内皮细胞的活力,发挥抗炎、抗氧化以及抗凋亡的特性,减轻缺氧损伤^[14]。本研究发现,天麻素处理后 SYNPO2 水平显著降低,过表达 SYNPO2 逆转了天麻素的抑制作用,提示天麻素可能通过抑制 SYNPO2 发挥神经保护作用。这一发现为天麻素的作用机制提供了新的靶点视角。

HIBD 的病理进程涉及氧化应激、炎症反应、脑水肿及细胞凋亡等多种机制,最终导致神经元死亡与神经功能缺损。刘绒洁^[15]等研究指出,激动胆汁酸 G 蛋白偶联受体 5 可改善缺氧缺血性脑病新生大鼠的神经行为学表现,减轻脑水肿及脑组织损伤。赵斌等^[16]研究指出,圣草酚可降低脑含水率和脑指数,减轻脑组织损伤程度,抑制细胞凋亡,进而缓解 HIBD 大鼠损伤。本研究结果类似,发现天麻素可能通过抑制 SYNPO2 减轻脑水肿、神经功能障碍以及神经元凋亡。此外,已有研究证实,天麻素抑制了小胶质细胞 Toll

样受体4的表达,可对HIBD发挥神经保护作用^[17]。HIBD的致病机制和神经细胞自噬相关,遏制过度自噬能对神经元起到保护作用,降低脑损伤程度。作为溶酶体膜上的关键组成成分,LAMP1具有重要的生物学功能,该蛋白经过高度糖基化修饰后,其分子稳定性能够得到显著提升^[18]。LC3B水平与自噬小体数量呈正相关。本研究发现,模型组LAMP1和LC3B升高,而天麻素可能通过抑制SYNPO2减轻过度自噬,防止自噬性细胞死亡。PI3K/Akt/mTOR通路是调节细胞存活、生长和血管生成的关键通路。已有研究指出,天麻素能促进活化小胶质细胞中PI3K/AKT通路的表达^[19]。本研究进一步发现,天麻素可能通过抑制SYNPO2激活PI3K/Akt/mTOR通路,促进细胞存活并抑制自噬、凋亡。这与刘晨萌等^[20]研究发现,褪黑素可通过PI3K/AKT通路抑制大脑皮层神经细胞过度自噬,从而减轻HIBD新生大鼠损伤的结果相符。分析其原因可能是PI3K/Akt/mTOR是调控细胞增殖、代谢和凋亡的关键通路,SYNPO2通过结合通路蛋白或干扰膜受体信号传导,天麻素抑制SYNPO2后解除其对通路的负调控,促进Akt磷酸化,进而抑制凋亡因子并激活mTOR。

本研究提示:天麻素通过抑制SYNPO2,减轻HIBD大鼠脑水肿和神经功能障碍,保护神经元结构完整性,减少神经元凋亡,减轻过度自噬,可能是通过激活PI3K/Akt/mTOR通路实现的。这些发现揭示了天麻素神经保护作用的一个潜在新靶点,为HIBD的治疗提供了依据。但本研究也存在局限性,实验仅采用大鼠HIBD模型;SYNPO2与PI3K/Akt/mTOR通路之间的直接调控关系尚未在分子层面得到阐明;观察时间较短,缺乏对天麻素长期神经保护效果的评估。后续研究将深入探讨SYNPO2调控PI3K/Akt/mTOR通路的具体分子机制,并结合临床样本,分析SYNPO2在HIBD中的表达特征及其与预后的关联,为其临床应用提供更充分的依据。

参考文献:

- [1] 郭涛,左涵珺,匡显锋,等.小胶质细胞介导的铁死亡在缺氧缺血性脑损伤中的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2025,41(6):552—558.
- [2] 左涵珺,李娟娟.小胶质细胞在缺氧缺血性脑损伤中的作用[J].神经解剖学杂志,2024,40(5):658—662.
- [3] 党双双,易甫,武锋,等.芒果苷通过PI3K/Akt/mTOR通路抑制缺氧缺血性脑损伤大鼠神经细胞凋亡及炎症反应[J].现代生物医学进展,2020,20(10):1820—1823,1896.
- [4] XUE L L, CHENG J, DU L R, *et al.* Bone marrow mesenchymal

stem cells alleviate neurological dysfunction by reducing autophagy damage via downregulation of SYNPO2 in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy rats [J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16 (1): 131—131.

- [5] 刘隼,金传山,张亚中,等.天麻产地加工方法与质量评价研究进展[J].世界中医药,2024,19(5):727—735.
- [6] 陈澍雨,杨雪珂,张晓丽娜,等.天麻素对缺血缺氧大鼠星形胶质细胞MCPI表达的影响[J].神经解剖学杂志,2023,39(3):289—294.
- [7] 左涵珺.天麻素通过调控活化小胶质细胞中PI3K/AKT信号通路对缺氧缺血性脑损伤保护作用的机制研究[D].云南昆明:昆明医科大学,2024.
- [8] 李思雨,赵敏,杨茂玲,等.视黄酸通过GSK—3 β 对大鼠缺氧缺血性脑损伤后海马神经干细胞增殖的调节作用[J].吉林大学学报(医学版),2021,47(5):1077—1085.
- [9] 张明晓,方峰,杨艳,等.人参皂苷Rg1对幼龄大鼠缺氧缺血性脑损伤和神经元凋亡的保护作用[J].西安交通大学学报(医学版),2021,42(5):693—699.
- [10] 陈琴,冯占辉,王筱雅,等.GW0742激动过氧化物酶体增殖物激活受体 β/δ 对新生大鼠生发基质出血的保护作用[J].中国新药杂志,2024,33(23):2512—2517.
- [11] 祝巍,王立君,沈文生,等.全身亚低温联合人脐带血间充质干细胞移植改善新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后认知障碍和能量衰竭的机制研究[J].中国现代医学杂志,2022,32(18):13—24.
- [12] 罗伯艳.BMSCs抑制SYNPO2表达调控神经自噬损伤改善新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的功能及机制研究[D].贵州遵义:遵义医科大学,2024.
- [13] 石金沙,张皓南,张幸霖,等.天麻素通过调节CCR5/AKT信号传导缓解新生小鼠缺血缺氧后小胶质细胞介导的炎症反应[J].南方医科大学学报,2024,44(10):1850—1857.
- [14] 王志昊,祝娜,唐茂红,等.天麻素与薯蓣皂苷元配伍对大鼠缺氧损伤脑血管内皮细胞的保护作用[J].医药导报,2024,43(5):667—679.
- [15] 刘绒洁,陈琴,熊英,等.INT-777激动TGR5对新生大鼠缺氧缺血性脑病的保护作用[J].中国药理学通报,2025,41(6):1085—1090.
- [16] 赵斌,王美玲,马文彬,等.圣草酚通过激活Nr2/HO-1通路减轻大鼠缺氧缺血性脑损伤[J].中国病理生理杂志,2022,38(3):495—501.
- [17] 李顺达,赵永强,杨雪珂,等.天麻素对缺血缺氧诱导的小胶质细胞中TLR4表达的影响[J].神经解剖学杂志,2024,40(1):50—56.
- [18] 张旭东,单李天一,王蓉,等.沉默调节蛋白3通过mTOR信号途径调节溶酶体功能抑制U87细胞凋亡[J].陆军军医大学学报,2023,45(18):1916—1926.
- [19] 左涵珺,段兆达,王朝,等.天麻素经PI3K/AKT通路改善新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后小胶质细胞介导的炎症反应[J].南方医科大学学报,2024,44(9):1712—1719.
- [20] 刘晨萌,高啸天,张海默,等.褪黑素通过PI3K/AKT通路减轻缺氧缺血性脑损伤新生大鼠大脑皮层神经细胞自噬的研究[J].中国当代儿科杂志,2024,26(6):631—638.

(本文编辑:崔兰卿 收稿日期 2025-09-22)