

本文引用: 蒋心如, 凌 晨, 祁 芳, 曾学究, 余 艳, 唐 暹, 易细芹, 艾 坤. 早期多感觉刺激对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马 p-ERK/p-CREB/BDNF/TrkB 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(11): 1999–2006.

早期多感觉刺激对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马 p-ERK/p-CREB/BDNF/TrkB 信号通路的影响

蒋心如¹, 凌 晨², 祁 芳¹, 曾学究¹, 余 艳¹, 唐 暹¹, 易细芹^{1*}, 艾 坤^{1*}

1. 湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南 长沙 410208; 2. 郴州市第一人民医院, 湖南 郴州 423000

〔摘要〕 **目的** 观察早期多感觉刺激对缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)新生大鼠海马区磷酸化的细胞外信号调节激酶(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, p-ERK)/磷酸化的环磷腺苷效应元件结合蛋白(phosphorylated cAMP-response element binding protein, p-CREB)/脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)/酪氨酸激酶受体 B(tyrosinekinase receptor B, TrkB)信号途径及其介导的突触重塑的影响。**方法** 将 48 只 7 日龄健康新生大鼠以随机数字表法分为假手术组、模型组、早期多感觉刺激组, 每组 16 只。模型组和早期多感觉刺激组大鼠制备 HIBD 模型, 假手术组仅暴露颈总动脉。早期多感觉刺激组自造模 24 h 开始施以持续 28 d 的早期多感觉刺激干预, 余组不进行处理。采用水迷宫实验检测各组大鼠空间学习和记忆能力; 透射电镜观察海马突触亚微结构变化; 免疫组织化学法检测大鼠海马 BDNF、TrkB 表达水平; Western blot 检测各组大鼠海马中 p-ERK、p-CREB、BDNF、TrkB、突触蛋白 1(Synapsin1, Syn1)的蛋白表达水平。**结果** 与假手术组比较, 模型组新生大鼠训练第 3、4、5 天逃避潜伏时间显著延长($P<0.01$), 训练第 6 天穿越平台次数显著减少($P<0.01$); 海马突触亚微结构模糊不清, 突触密度降低, 突触小泡减少; 海马 p-ERK、p-CREB、BDNF、TrkB、Syn1 蛋白表达水平显著下调($P<0.01$)。与模型组比较, 早期多感觉刺激组新生大鼠训练第 4、5 天逃避潜伏时间显著缩短($P<0.01$), 训练第 6 天穿越平台次数增多($P<0.05$); 海马突触密度增加, 突触连接增多, 突触前膨大可见清亮圆形的突触小泡; 海马 p-ERK、p-CREB、BDNF、TrkB、Syn1 蛋白表达水平显著上调($P<0.01$)。**结论** 早期多感觉刺激可有效促进新生缺氧缺血性脑损伤大鼠认知功能, 促进缺血侧海马突触重塑, 其作用机制可能与激活 p-ERK/p-CREB/BDNF/TrkB 信号通路有关。

〔关键词〕 新生缺氧缺血性脑损伤; 早期多感觉刺激; 突触重塑; 磷酸化的细胞外信号调节激酶; 磷酸化的环磷腺苷效应元件结合蛋白; 脑源性神经营养因子

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.11.009

Effects of early multisensory stimulation on the p-ERK/p-CREB/BDNF/TrkB signaling pathway in the hippocampus of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

JIANG Xinru¹, LING Chen², QI Fang¹, ZENG Xuejiu¹, SHE Yan¹, TANG Xian¹, YI Xiqin^{1*}, AI Kun^{1*}

1. School of Acupuncture-moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First People's Hospital of Chenzhou City, Chenzhou, Hunan 423000, China

〔Abstract〕 Objective To observe the effects of early multisensory stimulation on the signaling pathway of phosphorylated

〔收稿日期〕2024-07-31

〔基金项目〕湖南省残疾人康复科研项目(2019XK017); 湖南中医药大学医学技术一流学科开放基金项目(2018YXJS05)。

〔通信作者〕* 艾 坤, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: aikun650@qq.com; 易细芹, 女, 硕士, 讲师, E-mail: 995010568@qq.com。

extracellular signal-regulated kinase (p-ERK)/phosphorylated cAMP-response element binding protein (p-CREB)/brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/tyrosine kinase receptor B (TrkB) and its mediated synaptic remodeling in the hippocampus of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Forty-eight healthy seven-day-old neonatal rats were randomized into sham-operated group, model group, and early multisensory stimulation group, with 16 rats in each group. A HIBD model was established in the model and early multisensory stimulation groups. The sham-operated group only had the common carotid arteries exposed without further intervention. The early multisensory stimulation group received continuous early multisensory stimulation interventions for 28 days starting 24 h post-modeling, while the other groups did not receive any treatment. Morris water maze test was performed to assess the spatial learning and memory ability of rats; transmission electron microscopy was utilized to observe changes in hippocampal synaptic ultrastructure; immunohistochemistry was used to measure the expression levels of BDNF and TrkB in the hippocampus; Western blot was employed to analyze the protein expression levels of p-ERK, p-CREB, BDNF, TrkB, and Syn1 in the hippocampus. **Results** Compared with the sham-operated group, the model group showed significantly prolonged escape latencies on training days 3, 4, and 5 ($P<0.01$) and a significantly reduced number of platform crossings on training day 6 ($P<0.01$); the hippocampal synaptic ultrastructure was blurred, with decreases in synaptic density and synaptic vesicles; the protein expression levels of p-ERK, p-CREB, BDNF, TrkB, and Syn1 in the hippocampus were significantly downregulated ($P<0.01$). Compared with the model group, the early multisensory stimulation group exhibited shorter escape latencies on training days 4 and 5 ($P<0.01$) and an increased number of platform crossings on training day 6 ($P<0.05$); there was an increase in hippocampal synaptic density, with more synaptic connections, and clear, round synaptic vesicles in the presynaptic enlargements; the protein expression levels of p-ERK, p-CREB, BDNF, TrkB, and Syn1 in the hippocampus were significantly upregulated ($P<0.01$). **Conclusion** Early multisensory stimulation can effectively enhance cognitive function in neonatal rats with HIBD and promote synaptic remodeling in the ischemic hippocampus. The mechanism of action may be related to the activation of the p-ERK/p-CREB/BDNF/TrkB signaling pathway.

[**Keywords**] neonatal hypoxic-ischemic brain damage; early multisensory stimulation; synaptic remodeling; phosphorylated extracellular signal-regulated kinase; phosphorylated cAMP-response element binding protein; brain-derived neurotrophic factor

缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是围产期窒息导致缺氧、脑血流量减少或暂停引起的胎儿和新生儿脑功能障碍的病症,是新生儿脑损伤最常见的病因之一^[1]。研究表明,海马突触的丧失是 HIBD 遗留认知障碍的关键发病机制^[2-3]。HIBD 后动物早期发育期间神经轴突生长和突触发生出现延迟,神经递质释放和结合异常,进一步诱导神经细胞坏死、凋亡^[2]。临床研究证实,早期多感觉刺激治疗 HIBD 疗效确切,安全无毒副作用^[4-5]。研究表明,早期多感觉刺激可以促进 HIBD 大鼠海马区脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达,减轻 HIBD 后突触超微结构的损伤、促进突触的重建,明显改善 HIBD 大鼠的学习记忆能力^[6-7],但具体机制尚不明确。本课题组前期研究表明,早期多感觉刺激治疗 HIBD 大鼠能有效改善 HIBD 后功能障碍^[8]。

研究发现,细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)激活后可以较持久地活化转录因子环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB),引发 BDNF

等神经营养因子的转录,BDNF 与其特异性受体酪氨酸激酶受体 B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)结合,诱导 Trk 介导的生存机制,增强突触连接,实现突触重塑和神经作用^[9-10]。因此,p-ERK/p-CREB/BDNF/TrkB 信号途径可作为减轻 HIBD 的潜在干预靶点。本研究选用经典 RICE 法制备 HIBD 模型,以 p-ERK/p-CREB/BDNF/TrkB 信号途径为观察指标,探讨早期多感觉刺激对 HIBD 大鼠海马突触重塑的影响,为早期多感觉刺激干预 HIBD 的调控机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级 SD 孕鼠 4 只,孕 15 d,由湖南中医药大学实验中心提供[合格证编号:SYXK(湘)2019-0009]。SPF 级标准环境下饲养至分娩,共得到 50 只新生大鼠。在 7 日龄时对其进行称重(体质量 12~17 g),排除体质量异常或精神状态不佳的 2 只新生大鼠,剩余 48 只新生大鼠按照随机数字表法随机分为 2 组:假手术组(16 只)和造模组(32 只)。本实验

经湖南中医药大学实验动物伦理委员会的批准(伦理批准编号:LL2020081801),所有实验步骤均严格按照国家科技部《关于善待实验动物的指导性意见》^[11]进行。

1.2 主要试剂和仪器

异氟烷购(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司,批号:R510-22-10);组化试剂盒DAB显色剂(湖南艾方生物科技,批号:AFIHC004); β -actin抗体(Bioworld生物科技有限公司,批号:BS1002P);兔抗p-ERK、兔抗p-CREB、兔抗BDNF、兔抗TrkB、兔抗突触蛋白1(Synapsin1, Syn1)(美国Affinity Biosciences公司,批号:AF3240、AF3189、DF6387、DF6387、AF6201)。SMART 3.0小动物行为学视频记录与分析系统(西班牙Panlab公司,型号:2021001496);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);透射电镜(日本Hitachi,型号:HT7700);数码显微成像系统(日本尼康,型号:DS-U3)。

1.3 模型制备及处理

参照改良RICE法^[12]建立HIBD大鼠模型,予7日龄新生大鼠异氟烷吸入麻醉,消毒后切开颈部皮肤,充分暴露新生大鼠左侧颈总动脉,分离左侧颈总动脉并使用电凝笔电凝左侧颈总动脉做永久性阻断,手术时间控制在5 min内。术后保温恢复60 min,将幼鼠暴露于恒温缺氧舱(加湿8%氧气和92%氮气)内120 min,置于带有母鼠气味的垫料中10 min,回笼母乳喂养。经过前期实验^[8],上述制备方法可成功建立模型,降低小鼠死亡率。假手术组仅分离左侧颈总动脉但不进行电凝,其余处理相同。

模型制备过程中,观察新生大鼠是否出现抽搐、夹尾、左旋等行为表现,待大鼠清醒后采用Longa评分法^[13]进行评定,评分2分及以上并出现上述行为视为造模成功,造模组32只均造模成功,纳入实验。随后使用随机数字表法对造模组进行二次随机分组,分为模型组(16只)、早期多感觉刺激组(16只)。

1.4 早期多感觉刺激干预方案

造模后24 h,早期多感觉刺激组予7 d早期抚触干预,采用不同材质、大小及软硬的毛刷沾染不同味道的浴盐,以从头到尾的顺序给新生大鼠刷毛,15 min/次,4次/d,上、下午各2次。自第8天起,将大鼠置入丰富环境笼内,2 h/次,1次/d,干预周期3

周。共进行28 d的早期多感觉刺激干预。假手术组和模型组置于无特殊刺激的标准环境中饲养,饲养天数与早期多感觉刺激组相同。丰富环境笼设计参考文献^[14]研究自制透明丰富环境笼,长宽高70 cm×60 cm×50 cm,底部铺垫料,不同质感的砂纸、树叶予触觉刺激;柠檬味和草莓味的浴砂、柠檬、橙子等水果予嗅觉及味觉刺激;不同颜色的斜坡、台阶、楼梯、钻筒、转盘、平衡木予运动觉刺激;明暗交替、不同颜色的灯光予视觉刺激;轻柔舒缓的音乐、 α 脑波音乐予听觉刺激;凉席、冰凉金属予温度刺激。每天干预后清理笼内卫生,每3天更换一次环境布置。

1.5 观察指标

1.5.1 Morris水迷宫评估大鼠的空间学习和记忆能力 所有新生大鼠于早期多感觉刺激干预结束后,即造模后28 d,开始进行6 d的Morris水迷宫试验^[15],训练前Morris水迷宫水池中加入适量的印度墨汁,使水池成为不透明色,温度维持在 $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$,将水池均等分4个象限,记I~IV,平台隐藏于第III象限水面下1 cm。每天同一时间段将新生大鼠面向池壁依次从I~IV象限同一入水点入水,记录从入水至四肢完全站立于平台上的耗时为逃避潜伏时间;若超出90 s新生大鼠仍未至平台上,则引导新生大鼠至平台停留30 s,该情况新生大鼠逃避潜伏时间记90 s,4次/d,两次训练时间间隔30 min,持续5 d。第6天撤去平台,将新生大鼠面向池壁从第I象限入水(原平台对侧象限),记录新生大鼠穿越原平台区域的次数。统计各组新生大鼠第3、4、5天水迷宫潜伏期数据及第6天穿越平台次数,潜伏期缩短和穿越平台次数增多提示大鼠空间学习和记忆能力改善^[16]。SuperMaze+软件用于记录和分析各组新生大鼠逃避潜伏时和穿越原平台区域次数。

1.5.2 透射电子显微镜观察大鼠缺血侧海马组织突触亚微结构变化 行为学检测结束后,各组均随机选取3个样本快速断头,冰上取左侧海马组织,行电镜固定液固定、饿酸后固定、PBS洗涤、梯度乙醇溶液脱水、渗透、60 $^{\circ}\text{C}$ 聚合48 h包埋以制备透射电镜样本,切片机切超薄切片,2%醋酸铀饱和水溶液,枸橼酸铅,各染色15 min,至此染色结束。切片室温干燥过夜,5 000 $\times$ 和20 000 $\times$ 透射电镜下观察缺氧

缺血侧海马组织突触亚微结构变化。

1.5.3 免疫组织化学法检测大鼠缺血侧海马组织 BDNF、TrkB 表达 行为学检测结束后,腹腔注射 2%的戊巴比妥钠使大鼠深度麻醉。各组均随机选取 6 个样本,快速断头,冰上取左侧海马组织,使用 4%多聚甲醛作为固定液固定 24 h 以上。将海马组织从固定液中取出,制备石蜡切片,切片脱蜡水化,置于修复盒,于微波炉进行抗原修复,自然冷却,PBS 洗涤,3%过氧化氢溶液室温避光孵育 15 min 阻断内源性过氧化物酶,PBS 洗涤,封闭液封闭内源性过氧化物酶活性 30 min,PBS 洗涤。在海马组织上滴加一抗 BDNF、TrkB,湿盒内 4 ℃孵育过夜,洗涤,滴加二抗覆盖组织,室温孵育 50 min,洗涤,滴加新鲜配制的 DAB 显色,自来水冲洗终止反应,苏木素复染细胞核,自来水冲洗,PBS 反蓝,自来水冲洗,梯度乙醇溶液脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,400×显微镜下采集图像。ImageJ 软件对数据进行记录和统计学分析。

1.5.4 Western blot 检测大鼠缺血侧海马 p-ERK、p-CREB、BDNF、TrkB、Syn1 表达水平 行为学检测结束后,各组均随机选取 7 个样本,冰上快速取左侧海马,液氮速冻,-80 ℃冰箱保存。检测时取整块海马,加入裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(50:1:1)提取蛋白原液,BCA 蛋白定量,根据所测浓度制备上样液,100 ℃加热 10 min,晾至室温,经上样、电泳、电转、封闭,得到与蛋白结合完成的 PVDF 膜,TBST 洗涤,加入对应一抗 p-ERK(1:1 000)、p-

CREB(1:1 000)、BDNF(1:1 000)、TrkB(1:1 000)、Syn1(1:1 000),4 ℃孵育过夜,TBST 洗涤,加入对应二抗室温孵育 1 h,TBST 洗涤,PVDF 膜置于避光孵育盒中滴加显影液,经化学成像仪曝光、显影,Image Lab 软件对各组蛋白相对含量进行定量分析。

1.6 统计学分析

所有数据用 SPSS 28.0 软件进行处理。符合正态分布的计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,方差齐者采用单因素方差分析,方差不齐者采用 *Dunnett's T3* 检验;非正态分布的计量数据采用 *Wilcoxon* 秩和检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组新生大鼠 Morris 水迷宫行为学检测结果

与假手术组相比,模型组新生大鼠训练第 3、4、5 天平均逃避潜伏时间显著延长($P < 0.01$);与模型组相比,早期多感觉刺激组训练第 4、5 天平均逃避潜伏时间显著缩短($P < 0.01$)。与假手术组相比,模型组新生大鼠训练第 6 天穿越平台次数显著减少($P < 0.01$);与模型组相比,早期多感觉刺激组训练第 6 天穿越平台次数增多($P < 0.05$)。详见图 1。

2.2 各组新生大鼠海马突触数量及分布情况

假手术组新生大鼠左侧海马神经元超微结构正常。模型组新生大鼠左侧海马突触密度降低,突触结构不完整,突触前膜突触小泡溶解、模糊不清,突触后致密物厚薄不均。早期多感觉刺激组干预后新生大鼠海马突触结构有所改善,突触密度增加,突触结

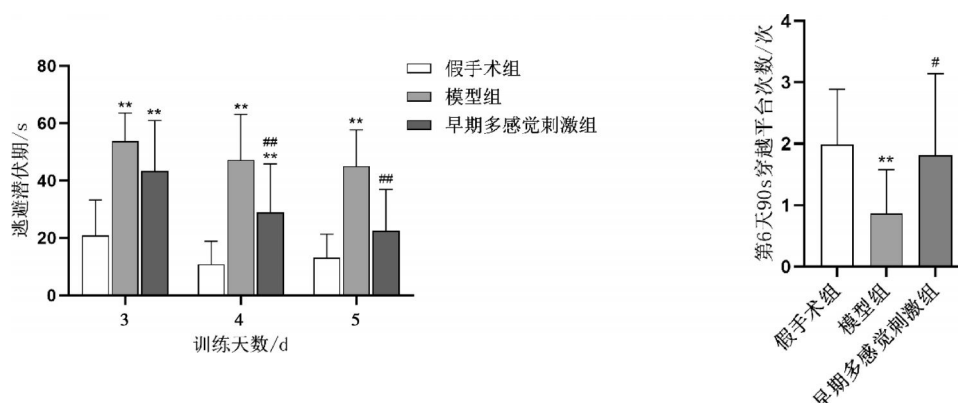


图1 各组大鼠 Morris 水迷宫行为学检测结果比较($n=16$)

Fig.1 Comparison of Morris water maze behavioral test results among the groups of rats ($n=16$)

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

构较完整,突触前膨大可见清亮圆形的突触小泡,突触后致密物增厚。详见图 2。

2.3 各组新生大鼠海马组织 BDNF、TrkB 的免疫组织化学结果

免疫组织化学显出的阳性表达呈棕黄色。与假手术组相比,模型组新生大鼠海马组织中 BDNF、TrkB 阳性表达率显著降低($P<0.01$);与模型组相比,早期多感觉刺激组新生大鼠海马组织中 BDNF、TrkB 阳性表达率显著升高($P<0.01$)。详见图 3。

2.4 各组新生大鼠造模后 28 d 海马组织 p-ERK、p-CREB、BDNF、TrkB、Syn1 的 Western blot 结果比较

与假手术组相比,模型组新生大鼠海马组织中 p-ERK、p-CREB、BDNF、TrkB、Syn1 显著降低($P<0.01$);与模型组相比,早期多感觉刺激组新生大鼠海马中 p-ERK、p-CREB、BDNF、TrkB、Syn1 显著升高($P<$

0.01)。详见图 4。

3 讨论

新生儿缺氧缺血性脑损伤为脑血流量和脑氧灌注量减少的结果,其病理特征主要表现为后皮质、纹状体、海马回和丘脑以及皮质下和脑室周围白质损伤^[17]。研究表明,新生儿未成熟发育的脑组织具有很强的自我修复能力,因此在 HIBD 的治疗过程中,在大脑发育早期及时诱导内源性突触重塑、重建被破坏的神经回路有助于促进神经传导及病变组织的修复,最终减轻 HIBD^[18]。临床研究和动物实验均报道,早期多感觉刺激通过视觉、听觉、触觉等整体性干预 HIBD,促进缺氧缺血性脑病新生儿体格和神经系统的快速发育,提高神经运动功能^[5,19]。这与中医整体观念相契合^[20]。

本研究建立 7 日龄 HIBD 模型大鼠,探究早期

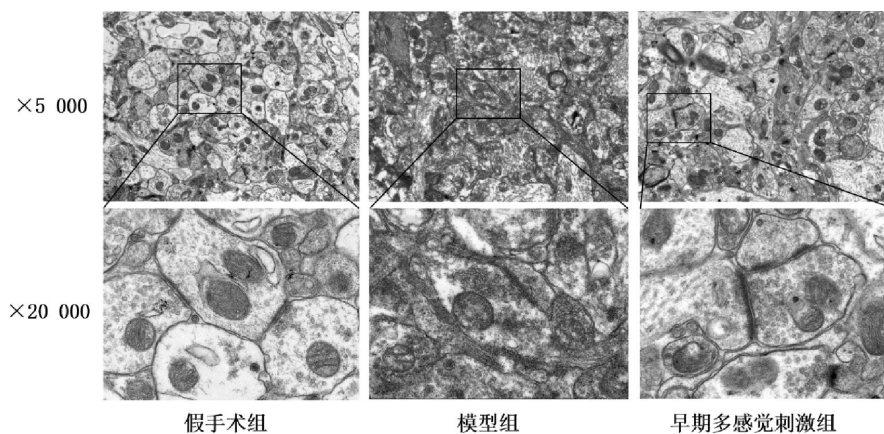


图 2 各组大鼠缺血侧海马电镜观察结果比较($n=3$)

Fig.2 Comparison of electron microscopic findings of the ischemic hippocampus among the groups of rats ($n=3$)

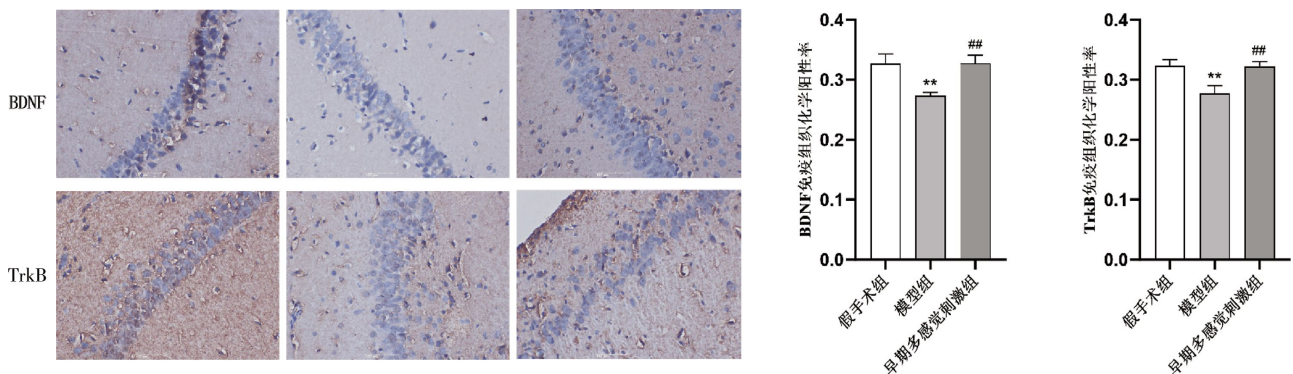


图 3 各组大鼠缺血侧海马 BDNF、TrkB 表达情况比较(免疫组织化学, $n=6$, $\times 400$)

Fig.3 Comparison of BDNF and TrkB expressions in the ischemic hippocampus among the groups of rats ($n=6$, $\times 400$)

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

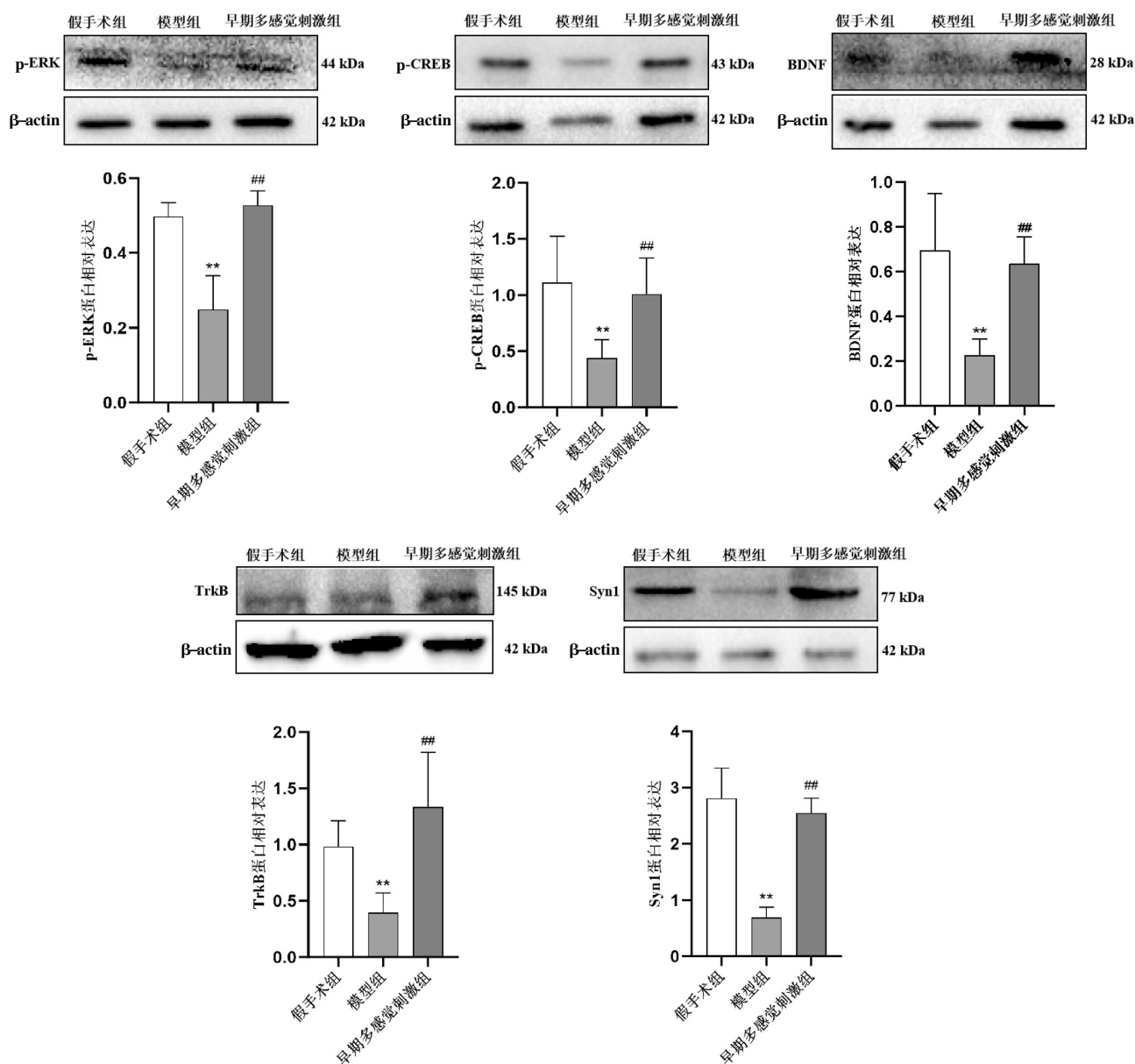


图4 各组大鼠缺血侧海马 p-ERK、p-CREB、BDNF、TrkB、Syn1 蛋白表达水平比较($n=7$)

Fig.4 Comparison of p-ERK, p-CREB, BDNF, TrkB, and Syn1 protein expression levels in the ischemic

hippocampus among the groups of rats ($n=7$)

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

多感觉刺激对 HIBD 的治疗效应和影响 HIBD 后海马突触重塑的分子机制,发现在早期多感觉刺激干预 28 d 后, Morris 水迷宫行为学检测结果显示,与模型组相比,早期多感觉刺激组训练第 4、5 天平均逃避潜伏时间显著缩短,训练第 6 天穿越平台次数显著增加,提示早期多感觉刺激可提升 HIBD 新生大鼠空间记忆和学习能力,改善认知功能障碍。透射电子显微镜表明,早期多感觉刺激干预后 HIBD 新生大鼠海马区神经元损伤程度减轻,突触密度增加,结构破坏有所改善,突触前膜内突触小泡数量增

加,呈清亮圆形。损伤后神经元修复的强诱导剂 BDNF^[21]和其特异性受体 TrkB^[22]的免疫组织化学结果显示,早期多感觉刺激干预后 HIBD 新生大鼠海马区 BDNF、TrkB 表达增高。上述实验结果初步证实,早期多感觉刺激可能通过诱导新生大鼠海马区大脑神经元之间的连接,增强突触发生和突触可塑性,从而改善 HIBD 后学习和记忆能力障碍。这与既往研究结果一致^[6,23]。

ERK 通路的激活在脑缺血后突触发生过程发挥重要作用,通过对细胞周期的调控能发挥神经保

护作用,促进突触可塑性及远期突触形成^[24],改善HIBD后神经功能障碍^[25]。ERK属丝氨酸苏氨酸蛋白激酶,磷酸化的ERK可通过磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶进一步磷酸化激活转录因子CREB,也可从细胞质移位至细胞核催化CREB中特定的丝氨酸和苏氨酸残基133ser磷酸化直接磷酸化激活CREB,从而作用于cAMP效应元件(cAMP response element, CRE),启动CRE依赖性的转录,增强含CRE序列的BDNF的表达^[10,26]。BDNF通过神经轴突逆行运输到神经元胞体,与其特异性神经细胞受体TrkB结合,激活TrkB诱导的生存通路^[27],促进发育中中枢神经系统神经元的生长、发育、存活、分化成熟和再生。WANG等^[28]观察发现,p-ERK/p-CREB信号传导的抑制可下调新生大鼠突触蛋白的表达,导致学习和记忆功能障碍。WANG等^[29]发现,ERK通过磷酸化特异性转录因子来调节BDNF的表达,从而维持神经元的存活、生长和突触可塑性的调节。上述研究结果提示,p-ERK/p-CREB/BDNF/TrkB信号通路可能在HIBD病理过程中扮演重要角色。本研究p-ERK、p-CREB、BDNF、TrkB的Western blot结果显示,与假手术组相比,模型组新生大鼠海马中p-ERK、p-CREB、BDNF、TrkB表达均显著降低;早期多感觉刺激干预后,p-ERK、p-CREB、BDNF、TrkB均显著升高。突触发生的标志物、突触的特异标志物Syn1的Western blot结果进一步支持上述研究结果,与模型组比较,早期多感觉刺激组新生大鼠海马中Syn1蛋白表达量显著增加。提示早期多感觉刺激能上调模型组新生大鼠海马中p-ERK、p-CREB、BDNF、TrkB的表达,加强损伤后海马区突触重塑,发挥脑保护作用。

综上所述,本研究以p-ERK/p-CREB/BDNF/TrkB信号途径为关键靶点展开研究,提示早期多感觉刺激可能是通过激活ERK,进一步磷酸化活化转录因子CREB,上调BDNF表达,BDNF与TrkB结合,引发TrkB介导的下游生存通路,促进HIBD后突触重塑,最终改善HIBD脑功能。研究为早期多感觉刺激治疗HIBD提供一定的证据支持,并为临床上药物治疗该疾病提供可能的潜在靶点。为了进一步探索早期多感觉刺激对于HIBD的治疗作用以及上述途径在早期多感觉刺激促进HIBD突触重塑的

作用机制,本研究下一步将针对不同的感觉输入设计正交实验以筛选最有利于脑保护作用的多感觉刺激方案,并设置关键蛋白的阻断剂或激动剂展开进一步研究。

参考文献

- [1] LUO L X, DENG L Y, CHEN Y T, et al. Identification of lipocalin 2 as a ferroptosis-related key gene associated with hypoxic-ischemic brain damage via STAT3/NF- κ B signaling pathway[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(1): 186.
- [2] CHEN X H, CHEN D T, LI Q, et al. Dexmedetomidine alleviates hypoxia-induced synaptic loss and cognitive impairment via inhibition of microglial NOX2 activation in the hippocampus of neonatal rats[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021: 6643171.
- [3] CHEN A D, CHEN X H, DENG J H, et al. Dexmedetomidine alleviates olfactory cognitive dysfunction by promoting neurogenesis in the subventricular zone of hypoxic-ischemic neonatal rats[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 983920.
- [4] 宋名杨, 朱路文, 叶涛, 等. 丰富环境促进缺血缺氧性脑损伤修复的研究进展[J]. *中国康复理论与实践*, 2016, 22(1): 61-64.
- [5] 徐欢岚, 梁冠军, 张何威, 等. 丰富环境康复训练对缺氧缺血性脑病新生儿的体格及神经行为发育的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2023, 38(12): 1701-1706.
- [6] 孙向峰. 丰富环境对HIBD新生大鼠学习记忆、海马区BDNF和Synaptophys蛋白表达的影响[D]. 青岛: 青岛大学, 2017.
- [7] DONG J C, DONG Y F, AN L J, et al. The role of the sensory input intervention in recovery of the motor function in hypoxic ischemic encephalopathy rat model[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2024, 131(5): 865-871.
- [8] 凌晨, 艾坤, 曹倩茹, 等. 丰富环境对新生缺氧缺血性脑损伤大鼠运动控制及海马脑源性神经营养因子和突触蛋白的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2022, 37(4): 451-457.
- [9] LV J W, LU C, JIANG N, et al. Protective effect of ginsenoside Rh2 on scopolamine-induced memory deficits through regulation of cholinergic transmission, oxidative stress and the ERK-CREB-BDNF signaling pathway[J]. *Phytotherapy Research*, 2021, 35(1): 337-345.
- [10] RAO J Y, LI H P, ZHANG H N, et al. Periplaneta Americana (L.) extract activates the ERK/CREB/BDNF pathway to promote post-stroke neuroregeneration and recovery of neurological functions in rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2024, 321: 117400.
- [11] 史晓萍, 宗阿南, 陶钧, 等. 《关于善待实验动物的指导性意见》的研究[J]. *中国医科大学学报*, 2007, 36(4): 493.

- [12] VANNUCCI R C, VANNUCCI S J. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: Evolution of an animal model[J]. *Developmental Neuroscience*, 2005, 27(2/3/4): 81-86.
- [13] ZHANG Z B, TAN Y X, ZHAO Q, et al. miRNA-7a-2-3p inhibits neuronal apoptosis in oxygen-glucose deprivation (OGD) model[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2019, 13: 16.
- [14] NITHIANANTHARAJAH J, HANNAN A J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2006, 7: 697-709.
- [15] 李传金, 姜波, 王德利, 等. NLRP3/caspase-1 途径在电针联合高频重复经颅刺激改善局灶性脑梗死大鼠认知和运动功能中的作用[J]. *河北医药*, 2023, 45(22): 3382-3387.
- [16] 张 拳, 黄 琼, 吕细华, 等. 针刺对阿尔茨海默大鼠学习记忆功能影响的机制探究[J]. *针灸临床杂志*, 2024, 40(10): 84-88.
- [17] DAVIDSON J O, VAN DEN HEUJ L G, DHILLON S K, et al. Lack of neuroprotection with a single intravenous infusion of human amnion epithelial cells after severe hypoxia-ischemia in near-term fetal sheep[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(15): 8393.
- [18] HUANG J W, KIN PONG U, YANG F Y, et al. Human pluripotent stem cell-derived ectomesenchymal stromal cells promote more robust functional recovery than umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells after hypoxic-ischaemic brain damage[J]. *Theranostics*, 2022, 12(1): 143-166.
- [19] 易烜宇, 贺 雨, 艾 青, 等. 丰富环境促进缺氧缺血性脑损伤幼鼠髓鞘发育并改善神经功能[J]. *重庆医科大学学报*, 2024, 49(3): 246-253.
- [20] 张 辉, 张先庚, 王红艳, 等. 论从丰富环境改善认知构建大鼠“思”模型: 学习记忆与“脾主思”[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(1): 21-23.
- [21] 丁亚兵, 赵 媛, 张 凡, 等. 人神经干细胞移植对缺氧缺血性脑病大鼠神经修复的研究[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2024, 53(3): 287-294.
- [22] 徐 霞, 徐琳琳, 王 艺. 远端缺血后处理对新生缺氧缺血性脑病小鼠组织型纤溶酶原激活物/脑源性神经营养因子通路及海马突触可塑性的影响[J]. *临床神经病学杂志*, 2022, 35(4): 296-300.
- [23] 蒲昭霞, 赵聪敏, 鲁利群. 丰富环境对缺氧缺血性脑损伤大鼠海马突触超微结构及突触素表达的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(8): 816-818.
- [24] INDRIGO M, MORELLA I, ORELLANA D, et al. Nuclear ERK1/2 signaling potentiation enhances neuroprotection and cognition via Importin α 1/KPNA2[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2023, 15(11): e15984.
- [25] YANG H H, TIAN S F, XIE L C, et al. Intranasal administration of Cytochrome c modifies human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and improves hypoxic-ischemia brain damage in neonatal rats by modulating p38 MAPK signaling-mediated apoptosis[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 22(4): 3493-3503.
- [26] KIM M S, KIM B Y, KIM J I, et al. Mumefural improves recognition memory and alters ERK-CREB-BDNF signaling in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Nutrients*, 2023, 15(14): 3271.
- [27] COLUCCI-D'AMATO L, SPERANZA L, VOLPICELLI F. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(20): 7777.
- [28] WANG H, MA G, MIN J, et al. Inhibition of ERK/CREB signaling contributes to postoperative learning and memory dysfunction in neonatal rats[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2023, 101(3): 265-278.
- [29] WANG S S, ZHANG X L, ZHAO Y R, et al. BCI improves alcohol-induced cognitive and emotional impairments by restoring pERK-BDNF[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2024, 74(3): 59.

(本文编辑 田梦妍)