

本文引用: 李亚鹏, 李 琴, 李 莉, 陈燕君, 彭 好. 水苏碱调节 Hippo-YAP 信号通路对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的神经保护作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 213-219.

## 水苏碱调节 Hippo-YAP 信号通路对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的神经保护作用

李亚鹏, 李 琴, 李 莉, 陈燕君, 彭 好\*

遂宁市中心医院儿科中心, 四川 遂宁 629000

**[摘要]** **目的** 探究水苏碱(stachydrine, STA)对缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)新生大鼠的神经保护作用, 并分析其作用机制。**方法** 将新生 SD 大鼠随机分为假手术组、HIBD 组、STA 低剂量(5 mg/kg)组、STA 中剂量(10 mg/kg)组、STA 高剂量(20 mg/kg)组、维替泊芬(10 mg/kg)+STA 高剂量(20 mg/kg)组, 除假手术组外, 其余大鼠构建 HIBD 大鼠模型。对各组大鼠进行神经功能缺损评分, 采用 Morris 水迷宫实验进行认知功能评价, 测定各组大鼠脑含水量和脑指数, HE 染色、尼氏染色观察脑组织神经元损伤, TUNEL 染色观察脑组织神经元细胞凋亡情况, Western blot 法检测 YES 相关蛋白(YES associated protein, YAP)、p-YAP、哺乳动物 STE20 样蛋白激酶 1(mammalian sterile 20-like kinase 1, MST1)、p-MST1、具有 PDZ 基序的转录共激活因子(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ)蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, HIBD 组海马组织损伤加重, 尼氏小体减少( $P<0.05$ ), 神经功能缺损评分、逃避潜伏期、脑组织含水量、脑指数、神经元细胞凋亡率、p-YAP/YAP 比值、p-MST1/MST1 比值显著增加( $P<0.05$ ), 穿越平台次数、TAZ 表达显著降低( $P<0.05$ ); 与 HIBD 组相比, STA 低、中、高剂量组海马组织损伤改善, 尼氏小体增加( $P<0.05$ ), 神经功能缺损评分、逃避潜伏期、脑组织含水量、脑指数、神经元细胞凋亡率、p-YAP/YAP 比值、p-MST1/MST1 比值显著降低( $P<0.05$ ), 穿越平台次数、TAZ 表达显著增加( $P<0.05$ ); 与 STA 高剂量组相比, 维替泊芬+STA 高剂量组海马组织损伤加重, 尼氏小体减少( $P<0.05$ ), 神经功能缺损评分、逃避潜伏期、脑组织含水量、脑指数、神经元细胞凋亡率、p-YAP/YAP 比值、p-MST1/MST1 比值显著增加( $P<0.05$ ), 穿越平台次数、TAZ 表达显著降低( $P<0.05$ )。**结论** STA 可能通过调控 Hippo-YAP 信号通路、减少神经损伤和神经元细胞凋亡、改善神经功能, 发挥对 HIBD 新生大鼠的神经保护作用。

**[关键词]** 缺氧缺血性脑损伤; 神经保护; 新生大鼠; 神经元; 细胞凋亡; 水苏碱; Hippo-YAP 相关蛋白信号通路

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.02.006

## Neuroprotective effects of stachydrine on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats by regulating Hippo-YAP signaling pathway

LI Yapeng, LI Qin, LI Li, CHEN Yanjun, PENG Hao\*

Pediatric Center, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan 629000, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the neuroprotective effects of stachydrine (STA) on neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) and analyze its mechanism of action. **Methods** Neonatal SD rats were randomly grouped into sham-operated group, HIBD group, low-, medium-, and high-dose STA groups (5 mg/kg, 10 mg/kg, and 20 mg/kg, respectively), and verteporfin (10 mg/kg)+high-dose STA (20 mg/kg) group. Except for the sham-operated group, other rats were applied to establishing HIBD rat models. The neurological deficits of rats in each group were scored, and Morris water maze experiment was performed to evaluate the cognitive

**[收稿日期]** 2023-09-06

**[基金项目]** 四川省医学(青年创新)科研课题计划项目(S19015)。

**[通信作者]**\* 彭 好, 女, 硕士, 主任医师, E-mail: fggank@163.com。

function. The brain water content and brain index of rats in each group were measured. HE staining and Nissl staining were used to observe neuronal damage in the brain tissue, TUNEL staining to observe neuronal apoptosis, and Western blot to determine the protein expressions of YES associated protein (YAP), p-YAP, mammalian sterile20-like kinase 1 (MST1), p-MST1, and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ). **Results** Compared with sham-operated group, the hippocampal tissue damage in HIBD group was aggravated, the number of Nissl bodies decreased ( $P<0.05$ ), the neurological deficit score, escape latency, brain tissue water content, brain index, neuronal apoptosis rate, and ratios of p-YAP/YAP and p-MST1/MST1 were significantly higher ( $P<0.05$ ), but the platform crossing times and TAZ expression were significantly reduced ( $P<0.05$ ). Compared with HIBD group, the hippocampal tissue damage in the low-, medium-, and high-dose STA groups was reduced, the number of Nissl bodies increased ( $P<0.05$ ), the neurological deficit score, escape latency, brain tissue water content, brain index, neuronal apoptosis rate, and ratios of p-YAP/YAP and p-MST1/MST1 were significantly lower ( $P<0.05$ ), while the platform crossing times and TAZ expression significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with high-dose STA group, the hippocampal tissue damage in verteporfin+high-dose STA group was aggravated, the number of Nissl bodies decreased ( $P<0.05$ ), the neurological deficit score, escape latency, brain tissue water content, brain index, neuronal apoptosis rate, and ratios of p-YAP/YAP and p-MST1/MST1 were significantly elevated ( $P<0.05$ ), but the platform crossing times and TAZ expression were significantly reduced ( $P<0.05$ ). **Conclusion** STA may exert neuroprotective effects on HIBD neonatal rats by regulating Hippo-YAP signaling pathway, reducing neuron damage and neuronal apoptosis, and thus improving the neurological function.

[**Keywords**] hypoxic-ischemic brain damage; neuroprotection; neonatal rat; neuron; apoptosis; stachydrine; Hippo-YES associated protein signaling pathway

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是围产期新生儿死亡的主要原因,约占新生儿死亡率的25%<sup>[1]</sup>。HIBD幸存者伴随终生神经功能缺损的概率会增加,包括脑瘫、认知障碍、学习障碍、发育迟缓、自闭症和癫痫等<sup>[2]</sup>。此外,考虑到导致神经元细胞死亡的多重因素,HIBD的潜在机制仍然难以确定。亚低温治疗是目前治疗HIBD的标准疗法,然而,在亚低温治疗下存活的新生儿仍存在认知障碍、学习障碍和发育迟缓的风险,给家庭和社会带来沉重的负担<sup>[3]</sup>。因此,必须探索更有效的治疗策略来改善HIBD的结局。水苏碱(stachydrine, STA)是益母草的主要生物碱成分,已被证明具有抗炎、抗氧化、抗凝血、抗凋亡、血管扩张等广泛的生物活性<sup>[4]</sup>。研究发现,STA具有改善中枢神经系统疾病的作用,能够通过减少炎症和细胞凋亡对脑缺血/再灌注损伤发挥保护作用<sup>[5]</sup>。Hippo-YES相关蛋白(Hippo-YES associated protein, Hippo-YAP)信号通路是一条高度保守的信号通路,是维持细胞稳态、器官大小、组织再生和肿瘤抑制的关键调节因子<sup>[6]</sup>。Hippo-YAP信号通路中的关键蛋白是YAP和具有PDZ基序的转录共激活因子(transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ),活化的YAP/TAZ通路参与干细胞自我更新、细胞增殖、肿瘤发生和器官生长等<sup>[7]</sup>。研究表明,Hippo-YAP信号通路对受损的大脑具有

神经保护作用,可减轻脑缺血/再灌注损伤后血脑屏障破坏<sup>[8]</sup>。且有研究表明,过表达Hippo通路中YAP可减轻HIBD大鼠神经行为障碍和神经元损伤,改善认知<sup>[9]</sup>。但Hippo-YAP信号通路在HIBD中的报道较少,且STA是否通过调控Hippo-YAP信号通路对HIBD大鼠起神经保护作用尚不清楚。本研究通过探究STA对HIBD新生大鼠神经功能、神经元凋亡及Hippo-YAP信号通路的影响,为STA治疗HIBD提供临床依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

新生SD大鼠(出生7d),购自广东莱迪生物医药研究院有限公司,生产许可证号:SCXK(粤)2022-0064,体质量10~15g,饲养于遂宁市中心医院实验动物房内,本实验经遂宁市中心医院伦理委员会审批通过(伦理批准号:LLSNCH20200013)。

### 1.2 主要试剂与仪器

STA(纯度>97%,北京伊塔生物科技有限公司,批号:YT11672);维替泊芬、尼氏染色液(北京百奥莱博科技有限公司,批号:M06973-LTQ、YT167);HE染色液(北京伊塔生物科技有限公司,批号:SY2022);TUNEL染色试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号:A113-01);一抗YAP、p-YAP、哺乳动物

STE20 样蛋白激酶 1(mammalian sterile 20-like kinase 1, MST1)、p-MST1、TAZ、GAPDH 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号:12395、13619、14946、49332、83669、3683);HRP 标记羊抗小鼠二抗(上海烜雅生物科技有限公司,批号:XY6161)。

酶标仪(美国 Molecular Devices 公司,型号:SpectraMax 190);光学显微镜(德国徕卡公司,型号:DM500);荧光显微镜(日本尼康公司,型号:Ni-U/Ni-E);电泳仪(美国 Bio-rad 公司,型号:1658033)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 HIBD 模型构建、分组和药物干预 构建大鼠 HIBD 模型<sup>[10]</sup>:异氟醚麻醉大鼠,仰卧位固定在手术台上,切开皮肤,暴露右侧颈总动脉,用 5-0 缝合线结扎后缝合切口。术后 2.5 h,待幼鼠清醒后放入缺氧箱(8% O<sub>2</sub>、92% N<sub>2</sub> 混合气)中 2 h,体温维持在 37 ℃。另选取 15 只正常新生大鼠作为假手术组,假手术组大鼠在麻醉状态下手术暴露颈总动脉,但不结扎和不做缺氧处理。

造模过程中新生大鼠死亡 6 只,将剩余造模成功的 75 只大鼠分为:HIBD 组、STA 低剂量组、STA 中剂量组、STA 高剂量组、维替泊芬+STA 高剂量组,每组 15 只。对各组大鼠进行药物干预,其中 STA 低、中、高剂量组分别腹腔注射 5、10、20 mg/kg STA<sup>[11]</sup>,维替泊芬+STA 高剂量组腹腔注射 10 mg/kg 维替泊芬<sup>[12]</sup>后注射 20 mg/kg STA,每天 1 次,连续 7 d。假手术组和 HIBD 组注射相同剂量的生理盐水。

1.3.2 神经功能缺损评分 各组大鼠在治疗第 1、4、7 天相同时间点,采用 Longa 评分<sup>[13]</sup>对大鼠神经功能缺损情况进行评估,评分范围 0~4 分。0 分:无神经功能缺损;1 分:幼鼠左前臂轻瘫;2 分:行走时向左转;3 分:向左跌倒,无自发活动;4 分:无法活动和意识障碍。评分为 1~3 分的大鼠用于后续实验。

1.3.3 Morris 水迷宫实验 采用一个充满水的黑色圆形水池(直径 180 cm,高 60 cm),水温(22±1) ℃,水深 40 cm。将水池分为 4 个象限,并在其中一个象限的水面下 1 cm 处放置(12 cm)平台。给药 7 d 后,对大鼠进行 Morris 水迷宫实验。训练大鼠 4 d,每天从 4 个象限将大鼠放入水中,记录定位平台所需的时间,即逃避潜伏期,若大鼠超过 60 s 未能找到平台,将其引导至平台上,并在平台上停留 10 s,则记逃避潜伏期为 60 s。记录第 5 天时大鼠在 4 个

象限的平均逃避潜伏期。随后撤除平台,进行空间探索实验,记录大鼠 60 s 内穿越平台位置的次数。

1.3.4 脑含水量和脑指数测量 上述实验完成后,各组随机选取 5 只大鼠麻醉处死,取脑组织标本,测量左右大脑半球湿重,后将大脑半球在 106 ℃烘箱中干燥 24 h,测量干重。脑含水量(%)=(湿量-干量)/湿重×100%,脑指数(%)=脑质量/体质量×100%。

1.3.5 HE 染色、尼氏染色 各组随机选取 5 只大鼠,麻醉后处死,取脑海马组织 CA1 区固定、脱水、石蜡包埋,制成 5 μm 切片,后用 HE 染色液或尼氏染色液染色,梯度乙醇脱水,封片后在显微镜下观察。并随机选取视野,统计尼氏染色细胞的数量,使用 Image-Pro Plus 6.0 进行分析。

1.3.6 TUNEL 染色 取大鼠脑海马组织 CA1 区石蜡切片,蛋白酶 K 处理后与 TUNEL 反应混合液在 37 ℃避光标记 1 h,PBS 清洗切片并用苏木精染色,凋亡细胞被染成棕色,非凋亡细胞被染成蓝色。使用电子显微镜进行拍照分析,并计算凋亡率。

1.3.7 Western blot 检测 Hippo-YAP 信号通路蛋白表达 取各组剩余 5 只大鼠,收集大鼠海马组织,在 RIPA 裂解缓冲液中裂解,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,采用 SDS-聚丙烯酰胺分离凝胶电泳分离蛋白,将条带转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶溶液封闭 4 h 后,将膜与一抗 YAP、p-YAP、MST1、p-MST1、TAZ 和 GAPDH(1:1 000)在 4 ℃孵育过夜,洗涤后与二抗(1:10 000)在室温下孵育 1 h。ECL 化学发光试剂盒显影并通过成像系统进行量化。

### 1.4 统计学处理

数据采用 SPSS 22.0 统计软件和 GraphPad Prism 7.0 软件进行处理,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。两组间比较采用 Tukey's 事后检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 STA 对各组大鼠神经功能缺损评分的影响

与假手术组比较,HIBD 组大鼠第 1、3、7 天神经功能缺损评分显著升高( $P<0.05$ );与 HIBD 组比较,STA 低、中、高剂量组第 3、7 天神经功能缺损评分显著降低( $P<0.05$ );与 STA 高剂量组比较,维替泊芬+STA 高剂量组第 3、7 天神经功能缺损评分显著升高( $P<0.05$ )。详见表 1。

表1 各组大鼠神经功能缺损评分比较( $\bar{x}\pm s, n=15$ )

组别	神经功能缺损评分/分		
	第1天	第3天	第7天
假手术组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
HIBD组	2.86±0.23*	2.88±0.26*	2.91±0.28*
STA低剂量组	2.78±0.21*	2.26±0.31**	1.48±0.19**
STA中剂量组	2.83±0.16*	1.82±0.20**	1.25±0.14**
STA高剂量组	2.89±0.11*	1.37±0.16**	0.82±0.10**
维替泊芬+STA高剂量组	2.85±0.14*	2.31±0.28** <sup>△</sup>	2.06±0.25** <sup>△</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与HIBD组比较,\*\* $P<0.05$ ;与STA高剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

## 2.2 STA对各组大鼠Morris水迷宫实验结果的影响

与假手术组比较,HIBD组大鼠逃避潜伏期显著延长、穿越平台次数显著减少( $P<0.05$ );与HIBD组比较,STA低、中、高剂量组大鼠逃避潜伏期显著缩短、穿越平台次数显著增加( $P<0.05$ );与STA高剂量组比较,维替泊芬+STA高剂量组大鼠逃避潜伏期显著延长、穿越平台次数显著减少( $P<0.05$ )。详见表2、图1。

表2 各组大鼠逃避潜伏期和穿越平台次数比较( $\bar{x}\pm s, n=15$ )

组别	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次
假手术组	19.36±2.28	6.39±1.14
HIBD组	49.63±5.13*	1.26±0.47*
STA低剂量组	38.93±4.22 <sup>#</sup>	3.28±0.64 <sup>#</sup>
STA中剂量组	31.28±3.63 <sup>#</sup>	4.42±0.51 <sup>#</sup>
STA高剂量组	23.14±3.52 <sup>#</sup>	5.96±0.68 <sup>#</sup>
维替泊芬+STA高剂量组	42.85±4.62 <sup>△</sup>	2.57±0.46 <sup>△</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与HIBD组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与STA高剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

## 2.3 STA对各组大鼠脑含水量和脑指数的影响

与假手术组比较,HIBD组大鼠脑组织含水量、脑指数显著升高( $P<0.05$ );与HIBD组比较,STA低、中、高剂量组大鼠脑组织含水量、脑指数显著降低( $P<0.05$ );与STA高剂量组比较,维替泊芬+STA高剂量组大鼠脑组织含水量、脑指数显著升高( $P<0.05$ )。详见表3。

表3 各组大鼠脑含水量和脑指数比较( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	脑组织含水量/%	脑指数/%
假手术组	0.33±0.06	67.83±4.31
HIBD组	0.65±0.09*	89.53±5.82*
STA低剂量组	0.52±0.07 <sup>#</sup>	82.37±6.08 <sup>#</sup>
STA中剂量组	0.41±0.08 <sup>#</sup>	76.26±5.39 <sup>#</sup>
STA高剂量组	0.35±0.06 <sup>#</sup>	71.68±6.37 <sup>#</sup>
维替泊芬+STA高剂量组	0.61±0.08 <sup>△</sup>	85.94±6.72 <sup>△</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与HIBD组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与STA高剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

## 2.4 STA对各组大鼠脑组织神经元细胞损伤的影响

HE染色显示,假手术组大鼠海马组织结构正常,未见损伤;HIBD组大鼠海马组织结构紊乱、萎缩,细胞排列错乱,水肿变性;STA低、中、高剂量组大鼠海马组织结构有所恢复,细胞排列整齐,形态有所恢复;维替泊芬+STA高剂量组相比于STA高剂量组大鼠海马组织结构损伤严重。尼氏染色显示,假手术组大鼠海马神经元细胞大而圆,排列整齐,细胞核周围观察到许多尼氏小体;与假手术组比较,HIBD组大鼠海马组织可见形态不规则、体积相对较小的神经元细胞坏死、死亡和丢失,尼氏小体显著减少( $P<0.05$ );与HIBD组比较,STA低、中、高剂量组大鼠海马神经元细胞恢复,尼氏小体显著增加( $P<0.05$ );与STA高剂量组比较,维替泊芬+STA高剂量组大鼠神经元细胞损伤,尼氏小体减少( $P<0.05$ )。详见图2、表4。

## 2.5 STA对各组大鼠脑组织神经元细胞凋亡的影响

与假手术组比较,HIBD组大鼠神经元细胞凋亡率显著升高( $P<0.05$ );与HIBD组比较,STA低、中、高剂量组大鼠神经元细胞凋亡率显著降低( $P<0.05$ );与STA高剂量组比较,维替泊芬+STA高剂量组大鼠神经元细胞凋亡率显著升高( $P<0.05$ )。详见图3、表5。

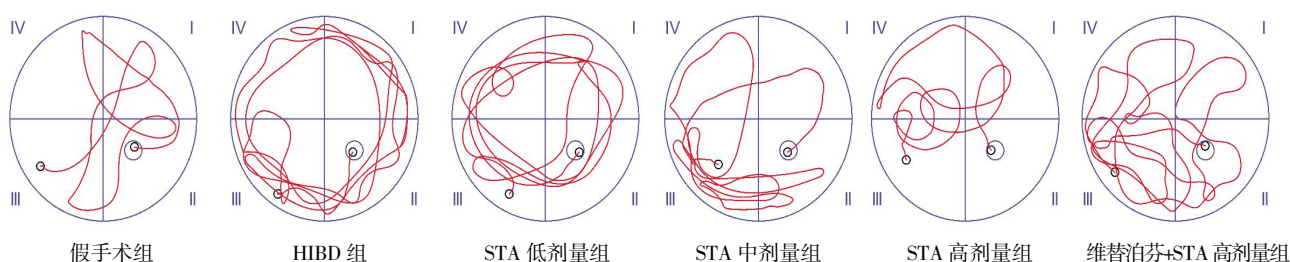


图1 Morris水迷宫动物轨迹图

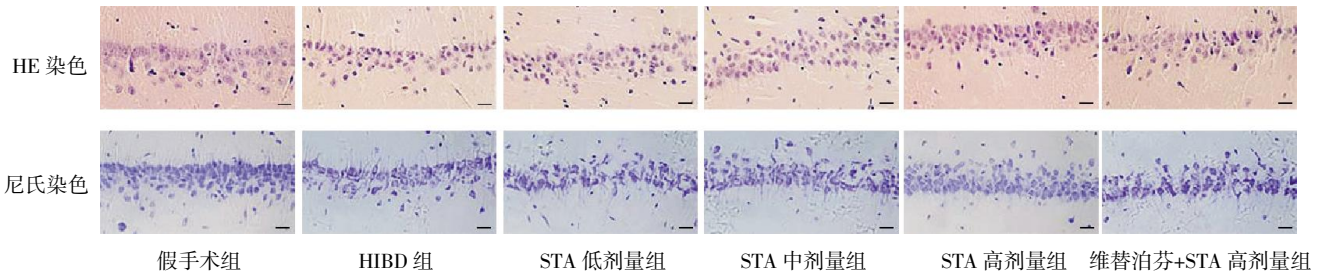


图 2 各组大鼠海马组织 HE、尼氏染色图(比例尺=20 μm,×400)

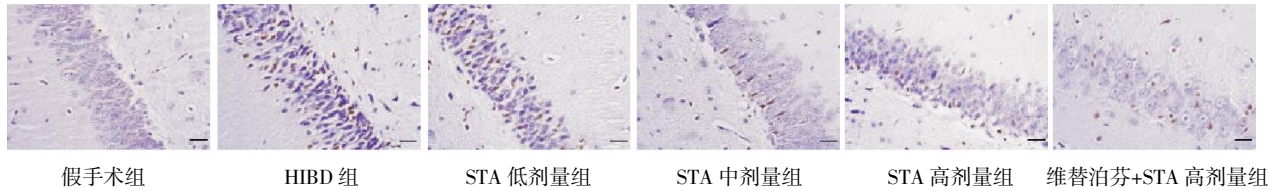


图 3 各组大鼠海马组织 TUNEL 染色图(比例尺=20 μm,×400)

表 4 各组大鼠海马组织尼氏小体数量比较( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	尼氏体数/个
假手术组	159.38±13.52
HIBD 组	73.80±7.46*
STA 低剂量组	91.57±9.26 <sup>#</sup>
STA 中剂量组	113.85±15.74 <sup>#</sup>
STA 高剂量组	135.91±13.19 <sup>#</sup>
维替泊芬+STA 高剂量组	82.47±8.36 <sup>△</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与 HIBD 组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 STA 高剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

表 5 各组大鼠神经元凋亡率比较( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	凋亡率/%
假手术组	2.53±0.28
HIBD 组	22.47±2.58*
STA 低剂量组	17.25±1.36 <sup>#</sup>
STA 中剂量组	13.58±1.77 <sup>#</sup>
STA 高剂量组	7.14±1.08 <sup>#</sup>
维替泊芬+STA 高剂量组	19.72±2.04 <sup>△</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与 HIBD 组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 STA 高剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

### 2.6 STA 对各组大鼠 Hippo-YAP 信号通路蛋白表达的影响

与假手术组比较,HIBD 组大鼠 p-YAP/YAP 比值、p-MST1/MST1 比值显著升高( $P<0.05$ ),TAZ 表达显著降低( $P<0.05$ );与 HIBD 组比较,STA 低、中、高剂量组大鼠 p-YAP/YAP 比值、p-MST1/MST1 比值显著降低( $P<0.05$ ),TAZ 表达显著升高( $P<0.05$ );与 STA 高剂量组比较,维替泊芬+STA 高剂量组 p-YAP/YAP 比值、p-MST1/MST1 比值显著升高( $P<0.05$ ),TAZ 表达显著降低( $P<0.05$ )。详见图4、表 6。

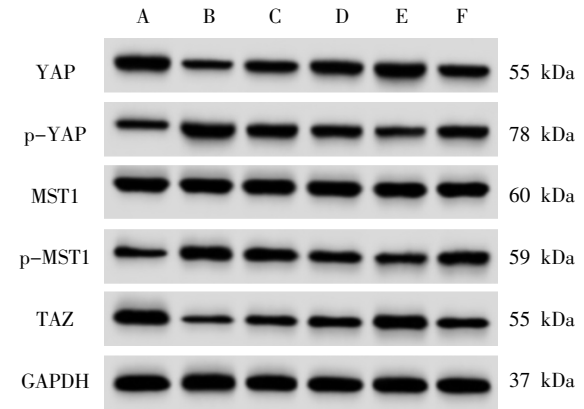


图 4 各组大鼠脑组织 Hippo-YAP 信号通路蛋白表达条带图

注:A.假手术组;B.HIBD 组;C.STA 低剂量组;D.STA 中剂量组;E.STA 高剂量组;F.维替泊芬+STA 高剂量组。

表 6 各组大鼠脑组织 Hippo-YAP 信号通路蛋白表达比较( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	p-YAP/YAP	p-MST1/MST1	TAZ
假手术组	0.30±0.04	0.41±0.05	1.02±0.11
HIBD 组	0.93±0.10*	0.95±0.10*	0.32±0.04*
STA 低剂量组	0.76±0.08 <sup>#</sup>	0.82±0.09 <sup>#</sup>	0.53±0.06 <sup>#</sup>
STA 中剂量组	0.52±0.07 <sup>#</sup>	0.66±0.07 <sup>#</sup>	0.71±0.09 <sup>#</sup>
STA 高剂量组	0.38±0.04 <sup>#</sup>	0.54±0.06 <sup>#</sup>	0.93±0.09 <sup>#</sup>
维替泊芬+STA 高剂量组	0.88±0.09 <sup>△</sup>	0.88±0.09 <sup>△</sup>	0.48±0.05 <sup>△</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与 HIBD 组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 STA 高剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

### 3 讨论

由缺氧和大脑血液供应中断引起的 HIBD,是导致新生儿死亡和终身残疾的主要原因之一<sup>[14]</sup>。尽管亚低温治疗对 HIBD 起到神经保护作用,但对儿童的预后改善作用有限。因此,需要发现新的治疗药



物来改善预后。STA 已被证明在各种神经系统疾病中表现出神经保护作用,SUN 等<sup>[15]</sup>发现,STA 能改善创伤性脑损伤大鼠神经功能、脑水肿和认知障碍,减少神经元细胞凋亡,起到神经保护作用;ZHANG 等<sup>[16]</sup>发现,STA 衍生物能显著减少大鼠中动脉闭塞模型大鼠的梗死体积,发挥神经保护作用;此外,张鲁等<sup>[17]</sup>也发现,STA 能够通过改善 HIBD 新生大鼠脑梗死、脑细胞凋亡、氧化应激反应及神经元炎症改善脑损伤。因此,STA 可能对 HIBD 新生大鼠有神经保护作用。

HIBD 的主要病理因素包括氧化应激、脑水肿、脑缺血再灌注、炎症、线粒体功能障碍以及促凋亡机制的激活,导致神经元死亡,最终引发神经损伤<sup>[18]</sup>。其中脑缺血、缺氧会导致脑血流量减少,引发无氧代谢、细胞外氨基酸积累和细胞肿胀,导致线粒体功能障碍、大量活性氧产生以及细胞内钙离子、各种炎症因子的释放,诱导神经元细胞凋亡<sup>[19]</sup>。本研究通过构建新生大鼠 HIBD 模型发现,HIBD 大鼠海马组织损伤严重,神经元细胞凋亡,神经功能和认知功能下降,表明 HIBD 发生时,脑组织受损严重,大量神经元细胞凋亡,进而导致神经损伤。STA 已被报道能够减少脑缺血/再灌注损伤大鼠的神经功能障碍、神经元损伤,减少神经元凋亡<sup>[9]</sup>。本研究发现,STA 治疗后,大鼠海马组织损伤减轻,神经功能缺损评分、脑组织含水量、脑指数、神经元细胞凋亡率均显著下降,认知障碍减轻,表明 STA 提高了脑组织功能、神经功能和认知功能,抑制神经元损伤,对 HIBD 大鼠神经损伤有保护作用。

Hippo 通路由 MST1/2 和肿瘤抑制因子 1/2 组成,YAP 是 Hippo 通路的主要下游介质<sup>[20]</sup>。Hippo 通路的激活导致 MST1/2 下游的 YAP 直接磷酸化失活,YAP/TAZ 复合物解离,抑制细胞分化、迁移和信号转导<sup>[21]</sup>。Hippo-YAP 信号通路在中枢神经系统发育中发挥重要作用,已有研究发现,Hippo-YAP 信号通路中 YAP/TAZ 活化可减少体内神经缺损、脑含水量、神经元死亡和凋亡以及脑梗死体积,对脑缺血/再灌注损伤大鼠有神经保护作用<sup>[22]</sup>。Hippo-YAP 信号通路也参与新生儿脑病的发生发展,YAN 等<sup>[9]</sup>发现,过表达 Hippo 信号通路中 YAP1 可减轻新生大鼠 HIBD 神经行为障碍和神经元损伤,减缓神经元凋亡,促进海马神经元的细胞活力;LIN 等<sup>[23]</sup>发现,氧-

糖剥夺小鼠神经元细胞中 YAP1 蛋白水平受到抑制,导致神经元线粒体自噬受到抑制,出现脑功能失调。此外,Hippo 信号通路对中枢神经系统发育的影响可能与其影响神经元细胞凋亡有关,当 Hippo 信号通路失活时,YAP/TAZ 分子发生核易位,复合体转录抗凋亡基因并维持细胞存活和细胞增殖;而该通路的激活导致 YAP 磷酸化激活及 YAP/TAZ 核易位受限,磷酸化的 YAP/TAZ 留在细胞质中并进行蛋白水解降解,迫使细胞发生凋亡<sup>[24]</sup>。如在围产期脑损伤动物(缺氧缺血性和宫内炎症)模型中,细胞核 YAP 的减少和细胞内 let-7b-5p 的减少与神经元凋亡相关<sup>[25]</sup>。本研究发现,HIBD 组大鼠海马组织 p-YAP/YAP 比值、p-MST1/MST1 比值显著升高,TAZ 表达显著降低,表明缺血缺氧可能抑制脑组织中 Hippo-YAP 信号通路的激活,抑制神经元细胞增殖,促进凋亡,引发神经损伤。经 STA 治疗后,p-YAP/YAP 比值、p-MST1/MST1 比值显著降低,TAZ 表达升高,表明 STA 可能通过激活脑组织 Hippo-YAP 信号通路,发挥神经保护作用。维替泊芬为 YAP 抑制剂,能够抑制 YAP 与 TEAD 结合,抑制细胞增殖。本研究在 STA 高剂量组的基础上使用维替泊芬,结果发现 p-YAP/YAP 比值、p-MST1/MST1 比值升高,TAZ 表达降低,且 STA 高剂量组对神经损伤的改善作用被逆转。由此表明,STA 对 HIBD 模型的神经保护作用可能与 Hippo-YAP 信号通路激活有关。

综上所述,STA 可能通过调控 Hippo-YAP 信号通路,减少神经损伤和神经元细胞凋亡,改善神经功能,发挥对 HIBD 新生大鼠的神经保护作用。本研究为 STA 在临床上治疗 HIBD 后脑损伤提供了实验基础,但 HIBD 涉及多种信号通路且与神经发生关系密切,后续还需进一步研究其他通路并探讨 STA 对神经发育相关指标的影响。

## 参考文献

- [1] RUSS J B, SIMMONS R, GLASS H C. Neonatal encephalopathy: Beyond hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Neoreviews*, 2021, 22(3): e148-e162.
- [2] ZHOU K Q, MCDOU ALL A, DRURY P P, et al. Treating seizures after hypoxic-ischemic encephalopathy-current controversies and future directions[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 7121-7134.
- [3] HU Y, CHEN F, XIANG X, et al. Early versus delayed enteral

- nutrition for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy undergoing therapeutic hypothermia: A randomized controlled trial[J]. *Italian Journal of Pediatrics*, 2022, 48(1): 146-159.
- [4] LIAO L, TANG Y, LI B, et al. Stachydrine, a potential drug for the treatment of cardiovascular system and central nervous system diseases[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 161(1): 1-10.
- [5] LI L, SUN L, QIU Y, et al. Protective effect of stachydrine against cerebral ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation and apoptosis through P65 and JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11(1): 64-77.
- [6] WEI X, HUANG G, LIU J, et al. An update on the role of Hippo signaling pathway in ischemia-associated central nervous system diseases[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162(1): 2-11.
- [7] GONG S, MA H, ZHENG F, et al. Inhibiting YAP in endothelial cells from entering the nucleus attenuates blood-brain barrier damage during ischemia-reperfusion injury[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12(1): 1-13.
- [8] GONG P, ZHANG Z, ZOU C, et al. Hippo/YAP signaling pathway mitigates blood-brain barrier disruption after cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Behavioural Brain Research*, 2019, 356(1): 8-17.
- [9] YAN G, TAO Z, XING X, et al. Down-regulated microRNA-192-5p protects against hypoxic-ischemic brain damage via regulation of YAP1-mediated Hippo signaling pathway[J]. *Neurochemical Research*, 2022, 47(5): 1243-1254.
- [10] 赵玉霞, 陈莺倩. 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[J]. *中草药*, 2021, 52(22): 6897-6903.
- [11] YU N, HU S, HAO Z. Beneficial effect of stachydrine on the traumatic brain injury induced neurodegeneration by attenuating the expressions of Akt/mTOR/PI3K and TLR4/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Translational Neuroscience*, 2018, 9(1): 175-182.
- [12] LIANG L, XU W, SHEN A, et al. Inhibition of YAP1 activity ameliorates acute lung injury through promotion of M2 macrophage polarization[J]. *MedComm*, 2023, 4(3): e293-e310.
- [13] ROTHER J. Neuro protection does not work[J]. *Stroke*, 2008, 39(2): 523-524.
- [14] VICTOR S, ROCHA-FERREIRA E, RAHIM A, et al. New possibilities for neuroprotection in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *European Journal of Pediatrics*, 2022, 181(3): 875-887.
- [15] SUN M, AN Z, WEI H, et al. Xenon attenuates hypoxic-ischemic brain damage by inhibiting autophagy in neonatal rats[J]. *Neuroreport*, 2023, 34(5): 273-279.
- [16] ZHANG L, LI F, HOU C, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel stachydrine derivatives as potent neuroprotective agents for cerebral ischemic stroke [J]. *Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2020, 393(12): 2529-2542.
- [17] 张鲁. 水苏碱改善新生大鼠脑组织缺血损伤的相关研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [18] SECHI G P, BARDANZELLU F, PINTUS MC, et al. Thiamine as a possible neuroprotective strategy in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 11(1): 42-56.
- [19] CHEN T, HU Y, LU L, et al. Myricetin attenuates hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats via NRF2 signaling pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14(1): 1-17.
- [20] FU M, HU Y, LAN T, et al. The Hippo signalling pathway and its implications in human health and diseases[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7(1): 376.
- [21] ZHENG M, LI RG, SONG J, et al. Hippo-Yap signaling maintains sinoatrial node homeostasis[J]. *Circulation*, 2022, 146(22): 1694-1711.
- [22] GONG P, ZOU Y, ZHANG W, et al. The neuroprotective effects of insulin-like growth factor 1 via the Hippo/YAP signaling pathway are mediated by the PI3K/AKT cascade following cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Brain Research Bulletin*, 2021, 177(1): 373-387.
- [23] LIN C, LI L, XU Q, et al. Yap1-Usp14 axis inhibits neuronal mitophagy during neonatal hypoxia-ischemia encephalopathy by regulation of beclin-1 ubiquitination in mouse[J]. *Molecular Neurobiology*, 2023, 60(8): 4273-4287.
- [24] SAHU M R, MONDAL A C. Neuronal Hippo signaling: From development to diseases[J]. *Developmental Neurobiology*, 2021, 81(2): 92-109.
- [25] PONNUSAMY V, IP RTH, MOHAMED MAEK, et al. Neuronal let-7b-5p acts through the Hippo-YAP pathway in neonatal encephalopathy[J]. *Communications Biology*, 2021, 4(1): 1143.