doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.20.007

香草醛对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的神经保护作用研究 *

汤丽萍[1] 闫 瑾[2] 范 芳[1] 王 浩[1] 任丽芬[3△]

（1 空军军医大学西京医院儿科 陕西 西安 710032；2 西安医学院医学技术学院 陕西 西安 710021；
3 空军军医大学西京医院检验科 陕西 西安 710032）

摘要 目的：探讨香草醛对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBI)的神经保护作用及机制。**方法：**参考 Rice-Vannucci 方法建立 HIBI 大鼠模型。HIBI 大鼠建模后立即腹腔注射 20 mg/kg(HIBI+20Van 组)或 40 mg/kg(HIBI+40Van 组)的香草醛，每隔 12 h 给药，连续 7 d。然后评估大鼠的神经行为及脑组织中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平。对 BV2 小胶质细胞进行氧糖剥夺 / 复氧(OGD/R)处理，并用 20 μM 香草醛培养。通过 Western blot 及免疫荧光检测 HMGB1、NF-κB p65、SIRT1、MyD88 和 TLR4 的表达水平。通过乳酸脱氢酶(LDH)释放测定试剂盒测定用不同 BV2 细胞培养基处理的原代神经元的 LDH 释放。**结果：**与 HIBI 组比较，HIBI+20Van 组和 HIBI+50Van 组新生大鼠的前肢悬吊时间和旷场得分均升高，脑组织中的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平均降低。香草醛均升高了 HIBI 大鼠和 OGD/R 处理的 BV2 细胞质中的 SIRT1 的表达水平，降低了 TLR4、MyD88 和 HMGB1 的表达水平及细胞核中 NF-κB p65 的表达水平（$P<0.05$）。香草醛降低了原代神经元的 LDH 释放量（$P<0.05$）。**结论：**香草醛通过调节 SIRT1/HMGB1/TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路抑制 HIBI 引起的神经炎症，从而提高 HIBI 大鼠的神经功能。

关键词：新生儿缺氧缺血性脑病；香草醛；缺氧缺血性脑损伤；神经炎症；高迁移率族蛋白 -1

中图分类号：R-33；R722.12；R743 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2021)20-3833-08

The Neuroprotective Effect of Vanillin on Hypoxic-ischemic Brain Injury in Neonatal Rats*

TANG Li-ping[1], YAN Jin[2], FAN Fang[1], WANG Hao[1], REN Li-fen[3△]

(1 Department of Pediatrics, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;
2 College of Medical Technology, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710021, China;
3 Department of Laboratory Medicine, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the neuroprotective effect and mechanism of vanillin on hypoxic-ischemic brain injury (HIBI) in neonatal rats. **Methods:** The HIBI model was established by referring to the Rice-Vannucci method. HIBI rats were injected intraperitoneally with 20 mg/kg (HIBI+20Van group) or 40 mg/kg (HIBI+40Van group) of vanillin immediately after modeling. The drug was administered once every 12 h for 7 consecutive days. Neurological behavior and the levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α in the brain tissue of the rats were assessed. BV2 microglia were treated with oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R), and cultured with 20 μM vanillin. The expression of HMGB1, NF-κBp65, SIRT1, MyD88 and TLR4 was detected by Western blot and immunofluorescence. The LDH release of primary neurons treated with different BV2 cell culture media was measured by a lactate dehydrogenase (LDH) release assay kit. **Results:** Compared with the HIBI group, the forelimb suspension time and open field scores of neonatal rats in the HIBI+20Van group and HIBI+50Van group were increased, and the levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α in the brain tissue decreased ($P<0.05$). Vanillin increased the expression of SIRT1 in the cytoplasm of HIBI rats and BV2 treated with OGD/R, while decreased the expression of TLR4, MyD88 and HMGB1, and the expression of NF-κ Bp65 in the nucleus. Vanillin decreased the release of LDH from primary neurons ($P<0.05$). **Conclusion:** Vanillin inhibits the neuroinflammation caused by HIBI by regulating the SIRT1/HMGB1/TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway, thereby improving the nerve function of HIBI rats.

Key words: Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy; Vanillin; Hypoxic-ischemic brain injury; Neuroinflammation; High mobility group protein-1

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R722.12; R743 Document code: A

Article ID:1673-6273(2021)20-3833-08

---

* 基金项目：陕西省自然科学基础研究计划项目(2019JM-514)

作者简介：汤丽萍(1984-)，主治医师，主要研究方向：呼吸道疾病，E-mail：TLinger45081@163.com，电话：13319278085

△ 通讯作者：任丽芬(1981-)，主管技师，主要研究方向：免疫检验和儿童生长发育诊断，E-mail：renlifen@163.com，电话：15991691350

(收稿日期：2021-03-04 接受日期：2021-03-28)

前言

新生儿缺氧缺血性脑病(Hypoxic Ischemic Encephalopatly, HIE)或缺氧缺血性脑损伤(Hypoxic-Ischemic Brain Injured, HIBI)是由脑血流和氧气供应障碍引起的,是围产期脑损伤最常见的原因,可导致新生儿死亡或不可逆转的精神和身体残疾,包括癫痫、脑瘫和认知功能障碍[1]。目前,该病的发病率较高。尽管治疗性低温提供了神经保护,但对疾病的治疗效果并不理想,接受治疗的新生儿仍有很多无法存活,大约 1/3 到 1/2 的患者在 6 到 7 岁时表现出持续性的神经异常或低智商[2]。因此,需要开发更有效的替代或补充疗法。

香草醛(Vanillin, Van)又名香兰素,是香草豆中的一种气味宜人的有机芳香化合物,广泛应用于烹饪、饮料、食品添加剂、化妆品和制药行业。无论是口服还是腹腔注射,香草醛在高浓度下对大鼠没有毒性作用[3]。研究表明,香草醛具有多种生物活性,包括抗氧化、抗炎、抗癌、抗菌和抗突变活性[4]。此外,最近发现香草醛可以通过血脑屏障,通过减少体内和体外的氧化应激损伤而发挥神经保护作用[5]。此外,香草醛给药可减轻沙土鼠全脑缺血后的神经元损伤[6]。然而,香草醛在 HIBI 中的可能作用尚不清楚。作为一种促炎因子,高迁移率族蛋白 -1(High Mobility Group Box 1, HMGB1)已被报道与多种神经系统疾病的发病有关[7]。例如,HIE 患儿外周血中 HMGB1 水平升高[8]。然而,HMGB1 在 HIBI 中的作用仍未完全阐明。本研究旨在探讨香草醛对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的神经保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 香草醛购自上海吉至生化科技有限公司。小鼠 BV2 小胶质细胞购自美国 ATCC。苏木精 - 伊红(HE)染色试剂、尼氏染色试剂、酶联免疫吸附(ELISA)、Alexa Fluor 488 或 552 标记的二抗、CCK-8 试剂、LDH 细胞毒性测定试剂盒、DAPI 购自碧云天生物技术研究所。胰蛋白酶、Dulbecco 改良 Eagle 培养基 -F12 (DMEM-F12)、Neurobasal 培养基(NBM)购自美国 Gibco 公司。谷氨酸购自美国 Sigma 公司。细胞质和核蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白分析试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。HMGB1、NF-κB p65、SIRT1、MyD88、TLR4、β-actin、Lamin B1、NeuN 一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗购自英国 Abcam 公司。Iba1 一抗购自日本 Wako Chemical 公司。

1.1.2 实验动物 80 只无特定病原体 (SPF) 的 7 日龄 Sprague-Dawley (SD) 新生大鼠由西安医学院 [SYXK (陕) 2016-004]提供,体重 11~15 g,雌雄不限,饲养在标准条件下(21~24℃,12 h 光照 - 黑暗交替),由母鼠自由哺乳。

1.2 方法

1.2.1 HIBI 大鼠模型构建 参考 Rice- Vannucci 方法建立 HIBI[9]。取 60 只新生 SD 大鼠进行 HIBI 模型构建,新生大鼠用异氟醚麻醉,切开颈部皮肤前中线,暴露右侧颈总动脉,分别结扎近端和远端,切断中动脉血流,缝合皮肤。整个手术持续时间限制在 5 min 内。然后,将新生大鼠放于 37℃暖箱中保暖 2 h。随后,将新生大鼠置于 37℃低氧舱(8%氧气 +92%氮气)中 1 h,然后将新生大鼠放回母鼠身边,由母鼠自由哺乳。另取 20 只新生大鼠进行假手术,只进行麻醉和皮肤切开,不进行 HI。

1.2.2 动物分组及给药 建模后,取存活的新生大鼠随机分为 4 组,每组 15 只。即假手术组 (Sham 组)、HIBI 组、HIBI+20 mg/kg 香草醛组(HIBI+20Van 组)和 HIBI +40 mg/kg 香草醛组(HIBI+40Van 组)。香草醛纯度≥ 99.5%,在给药前将香草醛溶于 0.9%生理盐水中。在 HIBI 后立即腹腔注射香草醛,每隔 12 h 给药,连续 7 d。HIBI+20Van 组和 HIBI+40Van 给予香草醛治疗,Sham 组和 HIBI 组给予等体积 0.9%生理盐水。根据新生大鼠体重推算注射量为 45~55 μL/ 只。

1.2.3 前肢悬吊实验 将一根直径 0.5 cm 的光滑玻璃棒被放在 45 cm 高的架子上,玻璃棒下放置海绵垫。将新生大鼠放在玻璃棒上,计时开始,当大鼠落下时计时结束。前肢悬吊实验可反映大鼠的肌肉力量和运动协调性。悬吊时间越短,肌肉力量和运动协调性就越差。

1.2.4 旷场实验 在 HI 损伤 3 周后进行旷场实验,用于评估自发活动和探索行为。旷场装置为一个白色正方形(50× 50× 50 cm)塑料装置,底部被划分为 5 cm× 5 cm 大小的正方形格。将新生大鼠放在正中央一格中,记录下大鼠跑出此格的时间(延迟时间)。此外,记录水平移动的格子数(水平得分)和肢体直立次数(垂直得分),时间为 5 min,二者之和为旷场得分。

1.2.5 组织学检查 治疗 7 d 后,分离大鼠脑组织,石蜡包埋,切成 4 μm 厚的冠状切片。然后用二甲苯脱蜡,梯度浓度乙醇水化。将切片用苏木精 - 伊红(HE)染色和尼氏染色,在光学显微镜下观察放大 400 倍时海马 CA1 区形态学改变。

1.2.6 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 采用酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒检测脑组织中细胞因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的浓度。ELISA 实验的所有步骤均按试剂盒说明进行。

1.2.7 原代神经元培养和 BV2 小胶质细胞培养 将新生大鼠麻醉后,用 75%乙醇浸泡 5 min,断头处死。分离大脑皮质,在 37℃下用 1.25%胰蛋白酶消化 20 min,然后用含 10%胎牛血清的 DMEM-F12 终止消化。细胞悬液以 1000 rpm 离心 10 min,取上清液。沉淀物用 10%胎牛血清、1% 0.5 mmol/L 谷氨酸和 1%青霉素 / 链霉素重新悬浮在 DMEM-F12 中。用 70 μm 尼龙滤网去除碎屑后,将细胞接种在装有 0.1 mg/mL 聚 D- 赖氨酸的共聚焦培养皿中(1.0× 10^5 细胞 / 孔)。6 h 后,将培养基更改为含有 2% B27、1% 0.5 mmol/L 谷氨酸和 1%青霉素 / 链霉素的 Neurobasal 培养基 (NBM)。第 3 d 添加胞嘧啶阿拉伯糖苷(2.5 μg/mL)以抑制非神经元细胞的过度增殖,并在 24 h 后丢弃。此后每 2 d 用新培养基替换一半培养基,并在 7-10 d 将培养的皮质神经元用于实验。

将小鼠 BV2 小胶质细胞在添加 10%胎牛血清、4500 mg/L 葡萄糖和 1%青霉素 / 链霉素的高糖 DMEM 中培养。所有的细胞都培养在 37℃和 5% CO_2 的加湿培养箱中。

1.2.8 细胞增殖实验 将 BV2 细胞以每孔 1× 10^4 细胞密度接种于 96 孔板中 24 h,然后用不同浓度的香草醛(5、10、20、40、80、160 μM)处理 24 h。每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂并在 37℃、5% CO_2 孵育 1 h,用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度。

1.2.9 BV2 细胞的氧糖剥夺 / 复氧(OGD/R)模型构建 用香草醛预处理 3 h 后,用 PBS 洗涤 3次。将正常培养液换成不含葡萄糖和胎牛血清的 DMEM 培养液,然后在 37℃、1% O_2/5%

CO_2/94% N_2 的缺氧室中孵育 4 h。OGD 处理结束后，立即将培养液换成正常培养液进行 OGD/R，并在正常条件下孵育 24 h。此外，将 BV2 细胞分为对照组（Control 组）、OGD/R 组和 OGD/R+20 μM 香草醛组（OGD/R+20Van 组）。HIBI+20Van 组细胞用 20 μM 香草醛培养，Control 组和 OGD/R 组给予正常培养基培养。

1.2.10 Western blot 实验　使用细胞质和核蛋白提取试剂盒按照制造商的说明分离细胞质和核蛋白。制备脑组织和细胞裂解液后，用 BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白质浓度。蛋白质在 SDS-PAGE 凝胶上电泳并转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂奶粉封闭 30 min，然后分别与 HMGB1（1∶1000）、NF-κB p65（1∶5000）、SIRT1（1∶3000）、MyD88（1∶3000）、TLR4（1∶2000）、β-actin（1∶2000）、Lamin B1（1∶2000）在 4℃过夜孵育。然后将膜辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶5000）室温下孵育 2h，并使用 ECL 检测试剂显影。采用 ImageJ 软件进行灰度值分析。Lamin B1 作为细胞核蛋白对照，β-Actin 作为细胞质蛋白对照。

1.2.11 免疫荧光　治疗 7 d 后，用生理盐水和 4%多聚甲醛对大鼠心脏灌注，取出脑组织并在 4%多聚甲醛中固定 24 h，然后在 20-30%蔗糖溶液脱水，OCT 包埋剂包埋。随后，用冷冻切片机将脑组织标本切成 20 μm 厚的切片。切片与 Iba1（1∶500）和 HMGB1（1∶500）一抗在 4℃孵育过夜，然后与 Alexa Fluor 488 或 552 标记的二抗（1∶200）在室温孵育 1 h。细胞核用 DAPI 复染。在奥林巴斯 FV1000 共聚焦激光扫描显微上观察荧光共聚焦图像。BV2 细胞及原代神经元在 4%多聚甲醛中固定 15 min，在 0.2% Triton X-100/PBS 中透化，然后在室温下用牛血清白蛋白（BSA）封闭 1 h。将原代神经元与 HMGB1（1∶500）和 NeuN（1∶500）在 4℃下过夜孵育。同时，将 BV2 细胞与 HMGB1 在 4℃下过夜孵育。然后在室温与相应的二抗孵育 1 h。细胞核用 DAPI 复染。

1.2.12 乳酸脱氢酶（LDH）释放测定　将原代神经元以 2× 10^4 个细胞 / 孔的密度接种在 96 孔板中，并添加 BV2 细胞培养后的条件培养液，24 h 后收集上清液。根据制造商的说明，通过 LDH 细胞毒性测定试剂盒测量 LDH 的释放。使用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度。

1.3 统计分析

数据使用均数± 标准差表示，用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析。两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析（ANOVA）。P<0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 香草醛对 HIBI 新生大鼠神经行为和脑损伤的影响

结果如图 1 所示，与 Sham 组比较，HIBI 组新生大鼠的前肢悬吊时间和旷场得分均降低（P<0.05）。与 HIBI 组比较，HIBI+20Van 组和 HIBI+50Van 组新生大鼠的前肢悬吊时间和旷场得分均升高，且呈剂量依赖性方式变化（P<0.05）。HE 染色和尼氏染色结果如图 2 所示，Sham 组新生大鼠海马 CA1 区细胞排列整齐，结构正常，锥体细胞数量较多。HIBI 组细胞排布紊乱，形态不一，锥体细胞数量减少。HIBI+20Van 组和 HIBI+50Van 组细胞排列较整齐，形态基本正常，但锥体细胞数量较 Sham 组减少。

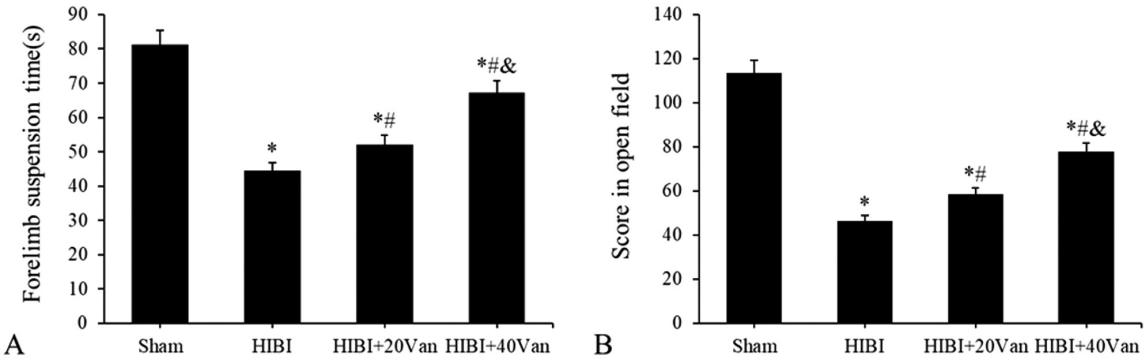

图 1 香草醛改善了 HIBI 新生大鼠的神经行为

Fig.1 Vanillin improved the neurobehavior of HIBI newborn rats

Note: A: Forelimb suspension time; B: Score in open field; vs Sham group, *P<0.05; vs HIBI group, #P<0.05; vs HIBI+20Van group, &P<0.05.

2.2 香草醛对 HIBI 新生大鼠神经炎性反应的影响

结果如表 1 所示，与 Sham 组比较，HIBI 组新生大鼠脑组织中炎症细胞因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平均升高（P<0.05）；与 HIBI 组比较，HIBI+20Van 组和 HIBI+50Van 组的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平均降低（P<0.05）。

2.3 香草醛对 HIBI 新生大鼠脑组织中 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路和 SIRT1 和 HMGB1 的影响

结果如图 3 所示，与 Sham 组比较，HIBI 组新生大鼠脑组织中细胞质蛋白 SIRT1 的表达水平降低，而 TLR4、MyD88 和 HMGB1 的表达水平升高（P<0.05）；与 HIBI 组比较，HIBI+20Van 组和 HIBI+50Van 组的 SIRT1 的表达水平升高，而 TLR4、MyD88 和 HMGB1 的表达水平降低（P<0.05）。与 Sham 组比较，HIBI 组新生大鼠脑组织中细胞核蛋白 NF-κB p65 的表达水平升高（P<0.05）；与 HIBI 组比较，HIBI+20Van 组和 HIBI+50Van 组的 NF-κB p65 的表达水平降低（P<0.05）。免疫荧光染色检测 HMGB1 和小胶质细胞特异性标志物 Iba1 的共定位结果如图 4 所示，HIBI 组新生大鼠皮层小胶质细胞质中 HMGB1 和 Iba1 的荧光强度明显升高，而 HIBI+20Van 组和 HIBI+50Van 组的 HMGB1 和 Iba1 的荧光强度明显降低。

2.4 香草醛对 OGD/R 诱导的小胶质细胞中 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路和 SIRT1 和 HMGB1 的影响

CCK-8 法检测结果如图 5 所示，当香草醛浓度达到 40 μm

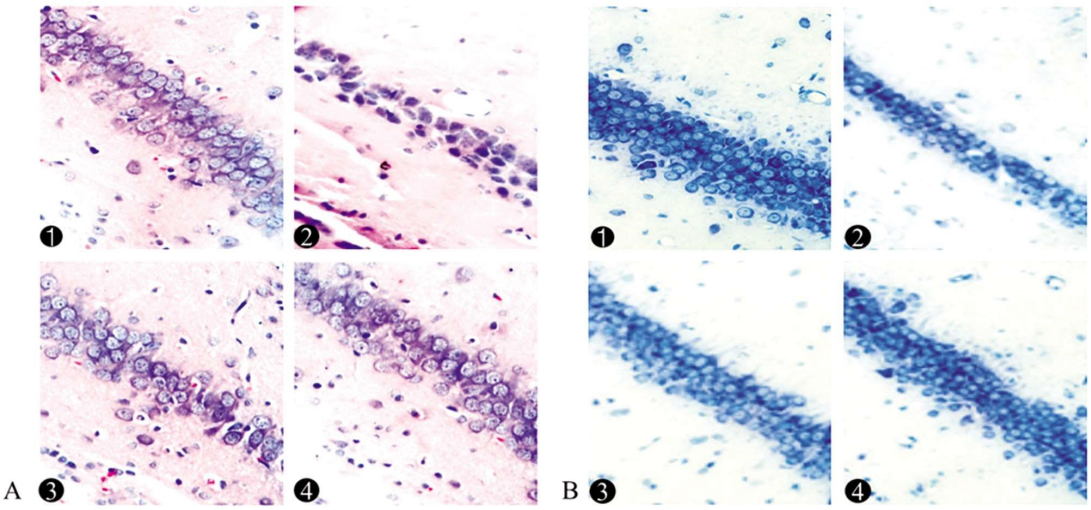

图 2 香草醛减轻了 HIBI 新生大鼠的脑损伤

Fig.2 Vanillin reduceed brain damage in HIBI newborn rats

Note: A: HE staining (× 400); B: Nissl staining (× 400); 1: Sham group; 2: HIBI group; 3: HIBI+20Van group; 4: HIBI+40Van group.

表 1 香草醛抑制了 HIBI 新生大鼠的神经炎性反应

Table 1 Vanillin inhibited neuroinflammatory in HIBI neonatal rats

Cytokines	Sham	HIBI	HIBI+20Van	HIBI+40Van
IL-1β(pg/mg)	22.45± 1.66	181.27± 13.39*	155.20± 11.46*#	122.68± 9.06*#&
IL-6(pg/mg)	20.09± 1.48	83.44± 6.16*	61.36± 4.53*#	52.66± 3.89*#&
TNF-α(pg/mg)	211.35± 15.61	616.84± 45.56*	332.75± 24.58*#	328.57± 24.27*#

Note: vs Sham group, *P<0.05; vs HIBI group, #P<0.05; vs HIBI+20Van group, &P<0.05.

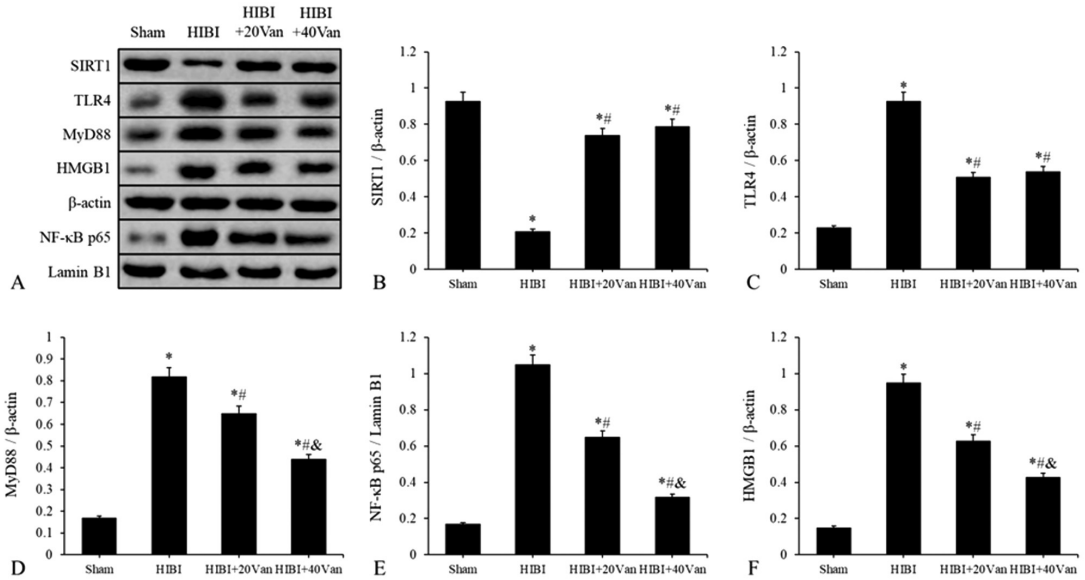

图 3 香草醛对 HIBI 新生大鼠脑组织中 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路和 SIRT1 和 HMGB1 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of vanillin on TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway and SIRT1 and HMGB1 protein expression in brain tissue of HIBI neonatal rats

Note: A: Western blot to detect protein expression level; B-F: cytoplasm (SIRT1, TLR4, MyD88 and HMGB1) and nuclear (NF-κB p65) protein expression level; vs Sham group, *P<0.05; vs HIBI group, #P<0.05; vs HIBI+20Van group, &P<0.05.

时，BV2 细胞活力明显降低，因此本研究在后续的实验中将香草醛浓度设为 20 μm。与 Control 组比较，OGD/R 组小胶质细胞中细胞质蛋白 SIRT1 的表达水平降低，而 TLR4、MyD88 和 HMGB1 的表达水平升高（P<0.05）；与 OGD/R 组比较，OGD/R+20Van 组的 SIRT1 的表达水平升高，而 TLR4、MyD88 和 HMGB1 的表达水平降低（P<0.05）。与 Control 组比较，OGD/R 组小胶质细胞中细胞核蛋白 NF-κB p65 的表达水平升高（P<0.05）；与 OGD/R 组比较，OGD/R+20Van 组的 NF-κB p65 的表达水平降低（P<0.05）。免疫荧光染色结果如图 6 所示，OGD/R 组小胶质细胞质中 HMGB1 的荧光强度明显升高，而

OGD/R+20Van 组的 HMGB1 的荧光强度明显降低。

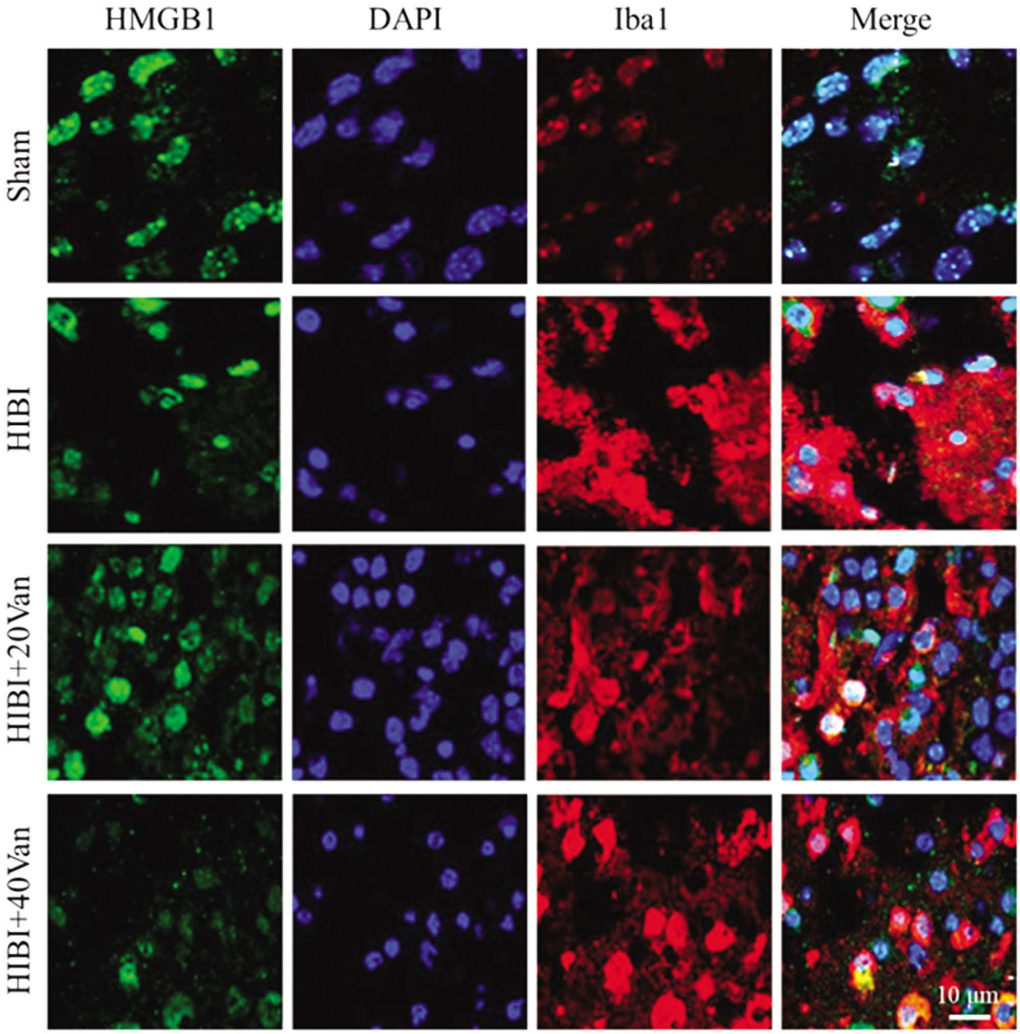

图 4 香草醛抑制了 HIBI 新生大鼠皮层小胶质细胞质中 HMGB1 的表达

Fig. 4 Vanillin inhibited the expression of HMGB1 in the cortical microglia of HIBI neonatal rats

Note: Immunofluorescence staining detects the co-localization of Iba1 and HMGB1 in microglia in the cortex.

2.5 香草醛和不同处理的小胶质细胞培养液对原代神经元的影响

Western blot 及 HMGB1 和神经细胞特异性标记 Neun 的免疫荧光染色结果如图 7 所示，与 Control 组比较，OGD/R 组小胶质细胞培养液培养的原代神经元细胞质中 HMGB1 的表达水平升高（$P<0.05$）；与 OGD/R 组比较，OGD/R+20Van 组 HMGB1 的表达水平降低（$P<0.05$）。与 Control 组比较，OGD/R 组原代神经元中 LDH 释放量升高（$P<0.05$）；与 OGD/R 组比较，OGD/R+20Van 组 LDH 释放量降低（$P<0.05$）。

3 讨论

香草醛具有抗微生物、抗突变、抗血管生成的作用[10]。此外，Dhanalakshmi 等人发现香草醛在鱼藤酮诱导的帕金森病大鼠模型中起神经保护作用[4]。本研究推测香草醛也可能在 HIBI 中具有神经保护作用。因此，本研究考察了香草醛治疗 HIBI 的可能作用及机制。已知神经炎症是HIE 发病的重要因素。许多研究描述了免疫细胞在缺氧缺血性级联反应的不同阶段在促进脑损伤和随后的组织修复和重塑中的重要作用[11]。在本研究中，香草醛明显抑制了 HIBI 新生大鼠的神经炎症反应。大量研究表明，香草醛在肝脏、结肠等组织中有抗炎作用[12]。因此，香草醛的抗炎作用可能是对 HIBI 的一种保护机制。

脑神经炎症的标志是小胶质细胞的激活。小胶质细胞在 HI 致急性脑损伤的神经炎症发展中起主导作用，作为大脑的固有免疫细胞，小胶质细胞在 HI 损伤后负责在未成熟的大脑中引发早期炎症反应[13]。大量研究表明，应激神经元可以诱导小胶质细胞活化，促进促炎细胞因子的释放，从而导致继发性神经元和少突胶质细胞损伤[14]。Yan 等人[15]研究表明香草醛可明显改善脂多糖诱导的帕金森病大鼠的运动功能障碍，抑制多巴胺能神经元变性，抑制小胶质细胞过度激活。因此，香草醛的抗炎作用可能也与抑制小胶质细胞过度激活有关。

虽然关于 HMGB1 在成年啮齿类动物脑损伤中的作用已有很多研究，但目前有关 HMGB1 在 HIBI 中的研究较少。本研究探讨了 HMGB1 是否也参与了香草醛抑制 HI 损伤所致的神经炎症及其可能的机制。在本研究中，HIBI 新生大鼠脑组织和氧糖剥夺 / 复氧 (OGD/R) 处理的小胶质细胞的细胞质中 HMGB1 的表达均显著升高。在用小胶质细胞培养液培养原代

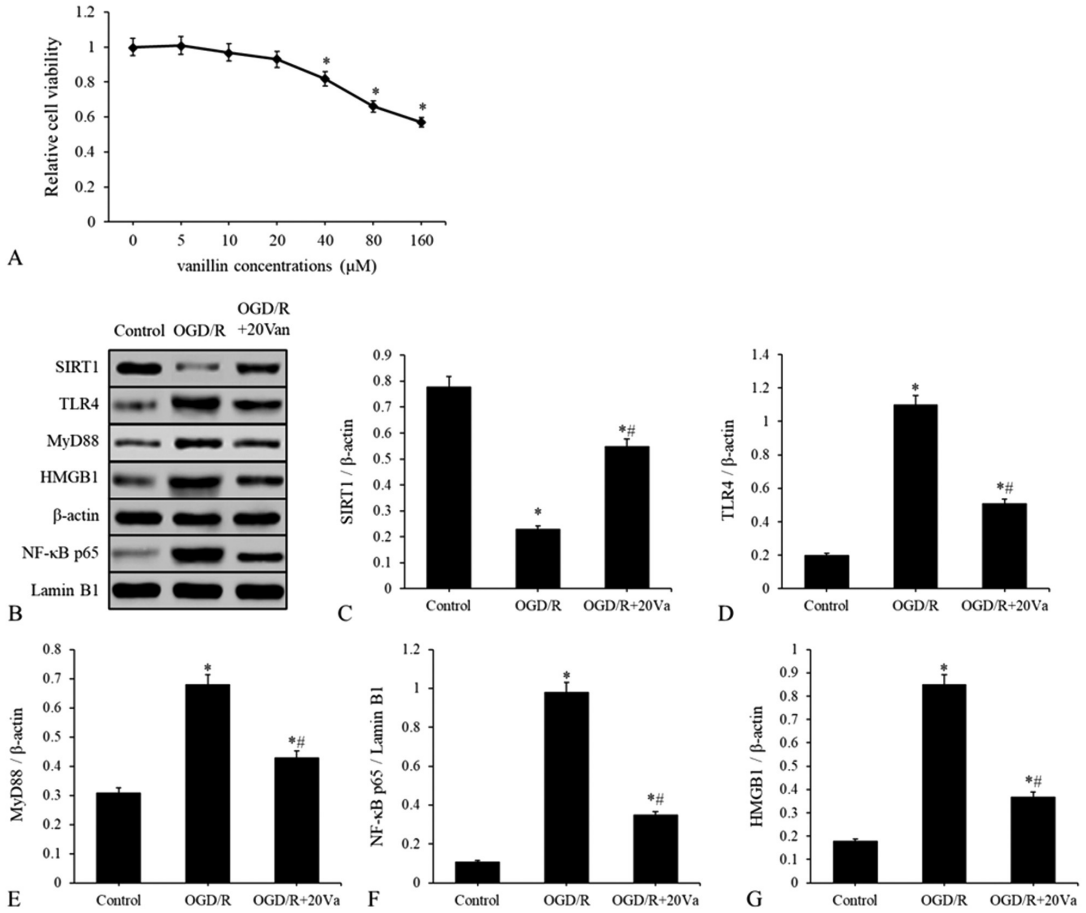

图 5 香草醛对 OGD/R 诱导的小胶质细胞中TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路和 SIRT1 和 HMGB1 蛋白表达的影响

Fig. 5 The effect of vanillin on the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway and the expression of SIRT1 and HMGB1 proteins in OGD/R-induced microglia

Note: A: CCK-8 method to detect the cell viability of BV2 cells cultured with vanillin at different concentrations for 24 h; B: Western blot to detect protein expression level; C-G: cytoplasm (SIRT1, TLR4, MyD88 and HMGB1) and nucleus (NF-κB) p65) protein expression level; vs Control group, $^{*}P<0.05$; vs OGD/R group, $^{\#}P<0.05$.

神经元后，神经元出现明显损伤，主要表现为 LDH 释放量增加，并且伴随着 HMGB1 的细胞质表达增加。这些结果说明 HIBI 发生后，神经元及小胶质细胞中的 HMGB1 表达水平均升高。其他研究者发现，窒息相关脑损伤新生儿血清 HMGB1 水平在出生后 30 min 内升高，并提示 HMGB1 可作为围产期窒息所致脑损伤的早期生物标志物[16]。Frasch 等人用脐带阻断模拟分娩过程中可能出现的缺氧性酸血症，证实了 HMGB1 在羊胎小胶质细胞核内发生了核质易位[17]。此外，HIE 患儿脐动脉 HMGB1 水平较对照组升高，脑低温治疗后降低，该作者认为涉及 HMGB1 的神经炎症可能在低温治疗的神经保护机制中发挥作用[8]。在本研究中，香草醛抑制了 HIBI 新生大鼠脑组织及 OGD/R 处理的小胶质细胞中 HMGB1 的表达，因此，香草醛的神经保护作用可能与 HMGB1 的下调有关。已知 HMGB1 是一种高度保守的非组蛋白 DNA 结合蛋白，也是一种促炎细胞因子。HMGB1 通常定位于细胞核，在多种因素刺激下进入细胞外间隙并作为一种损伤相关分子模式分子，与模式识别受体如 Toll 样受体(Toll-like receptors，TLR)[18]或晚期糖基化终产物受体结合，从而将小胶质细胞转变为促炎表型，并促进各种促炎细胞因子(如 IL-1 和 TNF-α)的分泌[19]。HMGB1 可以被转录后修饰，主要通过两个核定位位点的赖氨酸乙酰化来影响其在细胞中的定位。高乙酰化介导的 HMGB1 的主动释放发生在免疫细胞被刺激后。主动释放的 HMGB1 能够反过来刺激宿主细胞本身和邻近细胞，发挥自分泌和旁分泌作用，从而导致炎症的放大和炎症造成的损害[20]。因此，本研究推测，香草醛抑制了 HIBI 发生后 HMGB1 的表达及核质易位，从而减弱了小胶质细胞的活化及其介导的神经炎症，进而发挥了神经保护作用。

为了进一步揭示 HMGB1 介导的神经炎症信号传导机制。本研究检测了 Sirtuin1(SIRT1)和 Toll 样受体 4 (TLR4)在 HIBI 新生大鼠脑组织及 OGD/R 处理的小胶质细胞中的表达变化，发现 SIRT1 的表达水平降低，而 TLR4 升高。SIRT1 作为一种重要的脱乙酰酶，在调节细胞代谢、自噬和染色质可及性等方面发挥着重要作用，并与多种病理生理过程有关。据报道，SIRT1 在新生儿 HIBI 中的表达降低[21]。TLR4 是一种病原识别受体，主要表达在中枢神经系统的小胶质细胞中。由于小胶质细胞的激活受病原体识别受体的控制，TLR4 也参与了小胶质细胞介导的神经毒性。TLR4 信号的激活会增加脑梗死体积并损伤神经功能[22]，而 TLR4 缺陷小鼠在不同的脑梗死模型中表现出更好的神经行为[23]。本研究表明，香草醛升高了 HIBI 新生大鼠脑组织及 OGD/R 处理的小胶质细胞中的 SIRT1 表达，并降低了 TLR4 的表达。由于乙酰化是 HMGB1 的主要转录后修

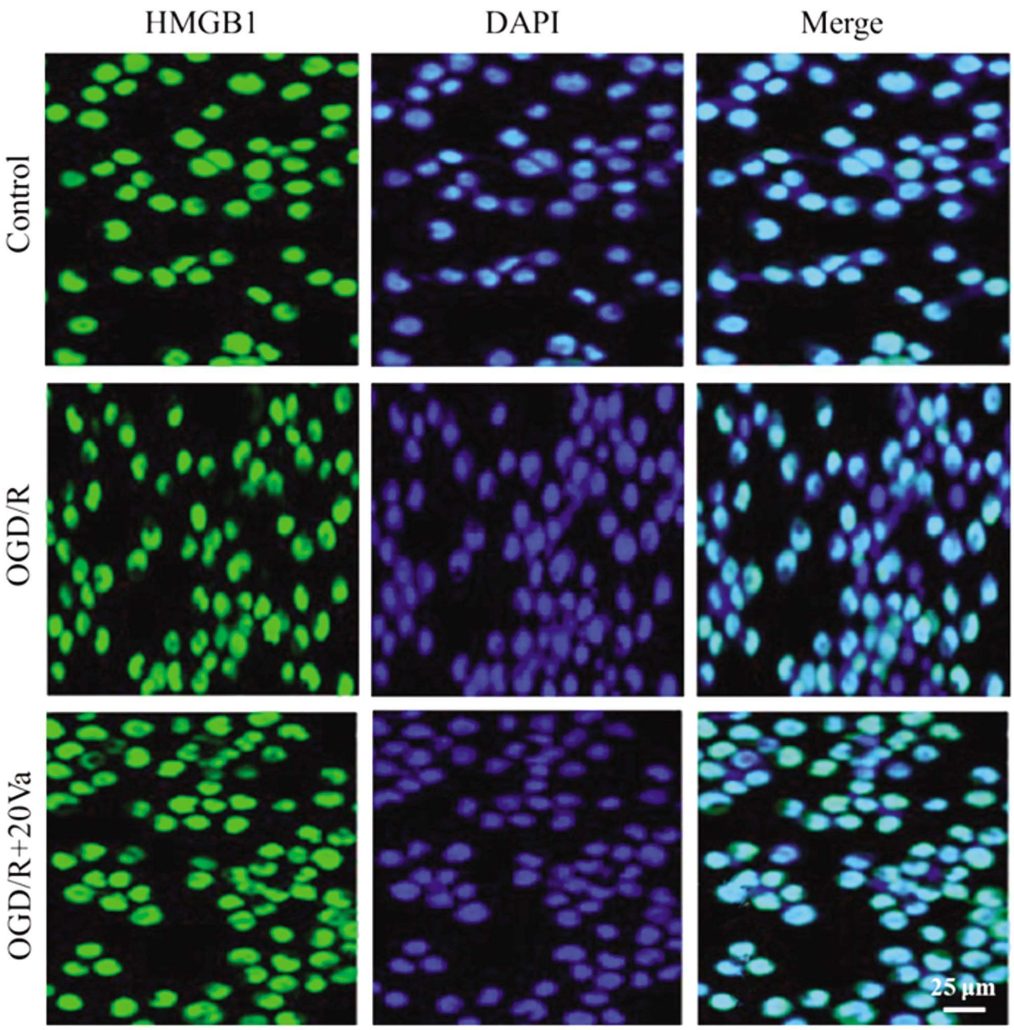

图 6 香草醛抑制了 OGD/R 诱导的小胶质细胞质中 HMGB1 的表达

Fig. 6 Vanillin inhibited the expression of HMGB1 in the microglia cytoplasm induced by OGD/R

Note: Immunofluorescence staining to detect the expression of HMGB1 in BV2 cells.

饰,以前的研究报道 SIRT1 的脱乙酰酶活性参与了 HMGB1 在急性肾损伤中的脱乙酰化[24]。其他研究已经证实,一些药物通过激活 SIRT1 抑制 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号通路[25]。因此,本研究结果提示,香草醛通过增加 SIRT1 的表达和活性,进而减少 HMGB1 的乙酰化并抑制其核质易位,从而抑制 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路介导的炎症反应。

综上所述,本研究表明香草醛通过调节 SIRT1/HMGB1/TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路抑制 HIBI 引起的神经炎症,从而提高 HIBI 大鼠的神经功能。

参 考 文 献(References)

[1] Gunn A J, Thoresen M. Neonatal encephalopathy and hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Handb Clin Neurol, 2019, 162: 217-237

[2] Azzopardi D, Strohm B, Marlow N, et al. Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes [J]. N Engl J Med, 2014, 371(2): 140-149

[3] Ho K, Yazan L S, Ismail N, et al. Toxicology study of vanillin on rats via oral and intra-peritoneal administration [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(1): 25-30

[4] Dhanalakshmi C, Janakiraman U, Manivasagam T, et al. Vanillin attenuated behavioural impairmen ts, neurochemical deficts, oxidative stress and apoptosis against rotenone induced rat model of parkinson's disease[J]. Neurochem Res, 2016, 41(8): 1899-1910

[5] Dhanalakshmi C, Manivasagam T, Nataraj J, et al. Neurosupportive role of vanillin, a natural phenolic compound, on rotenone induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 626028

[6] Kim H J, Hwang I K, Won M H. Vanillin, 4-hydroxybenzyl aldehyde and 4-hydroxybenzyl alcohol prevent hippocampal CA1 cell death following global ischemia[J]. Brain Res, 2007, 1181: 130-141

[7] Paudel Y N, Shaikh M F, Chakraborti A, et al. HMGB1: a common biomarker and potential target for tbi, neuroinflammation, epilepsy, and cognitive dysfunction[J]. Front Neurosci, 2018, 12: 628

[8] Nakamura T, Yamada S, Yoshioka T. Brain hypothermic therapy dramatically decreases elevated blood concentrations of high mobility group box 1 in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Dis Markers, 2013, 35(5): 327-330

[9] Yao D, Zhang W, He X, et al. Establishment and identification of a hypoxia-ischemia brain damage model in neonatal rats[J]. Biomed Rep, 2016, 4(4): 437-443

[10] Tai A, Sawano T, Yazama F, et al. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1810(2): 170-177

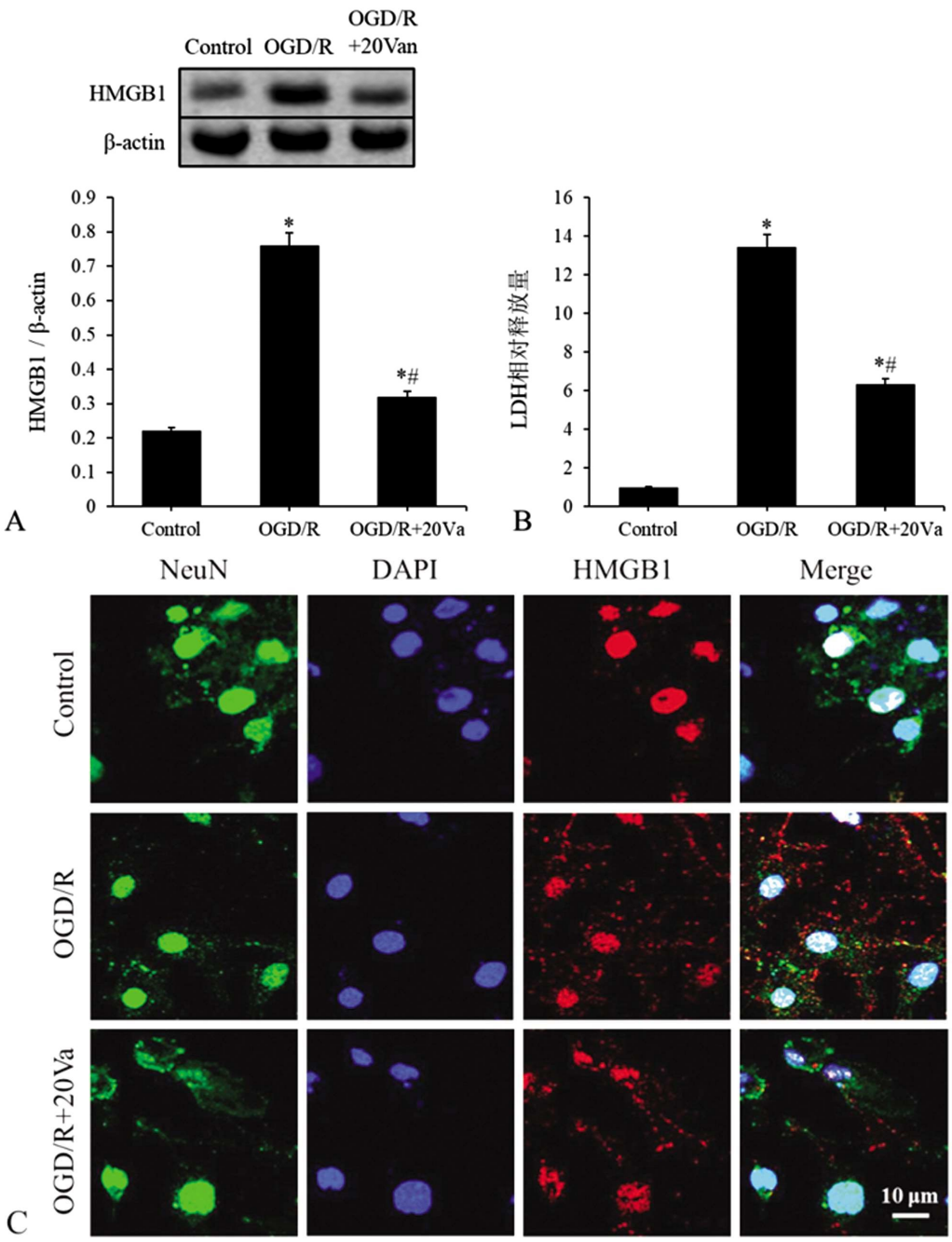

图 7 香草醛对各组小胶质细胞培养液处理的原代神经元中 HMGB1 的表达及 LDH 释放的影响

Fig. 7 The effect of vanillin on the expression of HMGB1 and the release of LDH in primary neurons treated with microglia culture medium in each group

Note: A: Western blot to detect HMGB1 protein expression level; B: Relative release of LDH; C: Immunofluorescence staining to detect the expression of HMGB1; vs Control group, *P<0.05; vs OGD/R group, #P<0.05.

[11] Hagberg H, Mallard C, Ferriero D M, et al. The role of inflammation in perinatal brain injury[J]. Nat Rev Neurol, 2015, 11(4): 192-208

[12] Makni M, Chtourou Y, Fetoui H, et al. Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 668(1-2): 133-139

[13] Tang K S, Tan J S. The protective mechanisms of polydatin in cerebral ischemia[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 842: 133-138

[14] Tang M, Alexander H, Clark R S, et al. Minocycline reduces neuronal death and attenuates microglial response after pediatric asphyxial cardiac arrest[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(1): 119-129

[15] Yan X, Liu D F, Zhang X Y, et al. Vanillin protects dopaminergic neurons against inflammation-mediated cell death by inhibiting ERK1/2, P38 and the NF-κB signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): 389

[16] Zhang X H, Zhang B L, Guo S M, et al. Clinical significance of dynamic measurements of seric TNF-α, HMGBl, and NSE levels and aEEG monitoring in neonatal asphyxia [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(19): 4333-4339

[17] Frasch M G, Szynkaruk M, Prout A P, et al. Decreased neuroinflammation correlates to higher vagus nerve activity fluctuations in near-term ovine fetuses: a case for the afferent cholinergic anti-inflammatory pathway?[J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(1): 103

（下转第 3855 页）

of biochemical parameters [J]. Novosti Khirurgii, 2014, 22 (3): 280-285

[8] 邵景立, 曹志强, 高国梁, 等. 高海拔地区家兔挤压综合征模型的初步实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(8): 1463-1468

[9] Takefumi Nakayama, Masanori Fujita, Masayuki Ishihara, et al. Improved Survival Rate by Temperature Control at Compression Sites in Rat Model of Crush Syndrome[J]. J Surg Res, 2014, 188(1): 250-259

[10] A Molčányiová, T Molčányi, M Mydlík. Crush syndrome of today - rhabdomyolysis of intoxication [J]. Vnitrní Lékarství, 2014, 60(3): 249-254

[11] De-Yang Kong, Li-Rong Hao, Li Zhang, et al. Comparison of two fluid solutions for resuscitation in a rabbit model of crush syndrome [J]. Clinical & Experimental Nephrology, 2015, 19(6): 1015-1023

[12] Rroji M, Seferi S, Barbullushi M. An Overview of Treatment of Crush Syndrome [J]. Albanian Journal of Trauma and Emergency Surgery, 2021, 5(1): 797-801

[13] Li Zhang, Ping Fu, Li Wang, et al. Hyponatraemia in Patients With Crush Syndrome During the Wenchuan Earthquake[J]. Emerg Med J, 2013, 30(9): 745-748

[14] Alissa Genthon, Susan R Wilcox. Crush Syndrome: A Case Report and Review of the Literature[J]. J Emerg Med, 2014, 46(2): 313-319

[15] Hui Zhang, Jian-wei Zeng, Guang-lin Wang, et al. Infectious Complications in Patients With Crush Syndrome Following the Wenchuan Earthquake[J]. Chin J Traumatol, 2013, 16 (1): 10-15

[16] Xia Zhang, Xiaofeng Bai, Qing Zhou. First-aid Treatments of Crush Injuries After Earthquake: 2 Special Cases [J]. Am J Emerg Med, 2014, 32(7): 817.e3-4

[17] 丁俊涛, 张连阳. 缺血后处理对后肢挤压伤兔全身炎症反应的抑制[J]. 创伤外科杂志, 2010, 12(1): 64-67

[18] 宋洁, 侯世科. 地震后挤压综合征围解压期现场救治现状及进展[J]. 中华灾害救援医学, 2015, 3(2): 108-112

[19] Shuchi Bhagi, Swati Srivastava, Shashi Bala Singh. High-altitude Pulmonary Edema: Review[J]. J Occup Health, 2014, 56(4): 235-243

[20] Buddha Basnyat, Jennifer M Starling. Infectious Diseases at High Altitude[J]. Microbiol Spectr, 2015, 3(4): 121-123

[21] Tsering Norboo, Tsering Stobdan, Norboo Tsering, et al. Prevalence of Hypertension at High Altitude: Cross-Sectional Survey in Ladakh, Northern India 2007-2011[J]. BMJ Open, 2015, 5(4): e007026

[22] Alhazzani A A, Mahfouz A A, Abolyazid A Y, et al. Risk Factors of the First-Time Stroke in the Southwest of Saudi Arabia: A Case-Control Study[J]. Brain Sciences, 2021, 11(2): 222

[23] 潘鑫, 邹圣强, 苏兆亮, 等. 双下肢不同时间大鼠挤压伤 - 挤压综合征模型生化与病理观察 [J]. 中国矫形外科杂志, 2015, 23(2): 156-159

[24] Shuiping Liu, Yangeng Yu, Bin Luo, et al. Impact of Traumatic Muscle Crush Injury as a Cause of Cardiomyocyte-Specific Injury: An Experimental Study[J]. Heart Lung Circ, 2013, 22(4): 284-290

[25] 孙震, 张启福, 王涛, 等. 挤压综合征家兔模型不同挤压时间后心、肾功能与病理观察[J]. 广东医学, 2018, 39(S2): 36-39

[26] 张伟, 曹志强, 高国梁, 等. 筋膜切开减压术治疗挤压综合征家兔模型的实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(9): 1646-1653

[27] Chen X, Liu Y, Xu W, et al. Experimental study on establishment of a simple model of rats crush injury-crush syndrome[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2013, 27(1): 77-82

[28] Jie Song, Hui Ding, Hao-Jun Fan, et al. Canine Model of Crush Syndrome Established by a Digital Crush Injury Device Platform[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6): 6117-6125

(上接第 3840 页)

[18] Tian J, Avalos A M, Mao S Y, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE[J]. Nat Immunol, 2007, 8(5): 487-496

[19] Lee S, Nam Y, Koo J Y, et al. A small molecule binding HMGB1 and HMGB2 inhibits microglia-mediated neuroinflammation [J]. Nat Chem Biol, 2014, 10(12): 1055-1060

[20] Mou K, Liu W, Han D, et al. HMGB1/RAGE axis promotes autophagy and protects keratinocytes from ultraviolet radiation-induced cell death[J]. J Dermatol Sci, 2017, 85(3): 162-169

[21] Carloni S, Riparini G, Buonocore G, et al. Rapid modulation of the silent information regulator 1 by melatonin after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain[J]. J Pineal Res, 2017, 63(3): e12434

[22] Caso J R, Pradillo J M, Hurtado O, et al. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke [J]. Circulation, 2007, 115(12): 1599-1608

[23] Cao C X, Yang Q W, Lv F L, et al. Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(2): 509-514

[24] Rabadi M M, Xavier S, Vasko R, et al. High-mobility group box 1 is a novel deacetylation target of Sirtuin1 [J]. Kidney Int, 2015, 87(1): 95-108

[25] Matsuzawa-Ishimoto Y, Shono Y, Gomez L E, et al. Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium [J]. J Exp Med, 2017, 214(12): 3687-3705