[文章编号] 1671-587X(2026)04-0977-10 DOI:10.13481/j.1671-587X.20260410

雷公藤甲素调控PTEN/PI3K/AKT信号通路对缺氧缺血性脑病新生大鼠海马神经元损伤的保护作用

马云霞，刘 丹，张 颖，马士凤
（天津医科大学总医院儿科，天津 300052）

[摘 要] **目的：**探讨雷公藤甲素（TP）对缺氧缺血性脑病（HIE）新生大鼠海马神经元损伤的影响，并阐明其基于第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因（PTEN）/磷脂酰肌醇3-激酶（PI3K）/蛋白激酶B（AKT）信号通路的相关作用机制。**方法：**随机选择12只新生大鼠作为假手术组，另58只用于造阿斯加德，以右颈总动脉结扎联合低氧暴露方法建立H1E模型，将造模成功的48只大鼠随机分为60只新生大鼠随机分成假手术组、HIE组、低剂量TP组（L-TP组）、高剂量TP组（H-TP组）和高剂量TP＋Ad-PTEN组（H-TP＋Ad-PTEN组），每组12只。评估各组大鼠神经功能评分，采用氯化三苯基四氮唑（TTC）染色法观察各组大鼠脑梗死情况，HE染色法观察各组大鼠海马CA1区病理形态表现，试剂盒检测各组大鼠血清中白细胞介素6（IL-6）、白细胞介素8（IL-8）和肿瘤坏死因子α（TNF-α）水平，试剂盒检测各组大鼠脑组织中超氧化物歧化酶（SOD）和过氧化氢酶（CAT）活性及谷胱甘肽（GSH）水平。末端脱氧核苷酸转移酶dUTP缺口末端标记法（TUNEL）检测各组大鼠海马神经元阳性细胞数，Western blotting法检测各组大鼠脑组织中凋亡相关蛋白、PTEN、PI3K和AKT蛋白表达水平，并计算磷酸化PI3K（p-PI3K）/PI3K和磷酸化AKT（p-AKT）/AKT比值。**结果：**与假手术组比较，HIE组大鼠神经功能评分，血清中IL-6、IL-8和TNF-α水平，海马组织中神经元阳性细胞数，脑组织中B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）相关X蛋白（Bax）、细胞色素c（Cyt c）、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶8（Caspase-8）、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3（Caspase-3）和PTEN蛋白表达水平升高（$P<0.05$）；脑组织中SOD和CAT活性及GSH水平，Bcl-2蛋白表达水平、p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值降低（$P<0.05$）。与HIE组比较，L-TP组和H-TP组大鼠脑组织中SOD和CAT活性及GSH水平和Bcl-2蛋白表达水平、p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值升高（$P<0.05$），Bax、Cyt c、Caspase-8、Caspase-3和PTEN蛋白表达水平均降低（$P<0.05$）。与H-TP组比较，H-TP＋Ad-PTEN组大鼠脑组织中SOD和CAT活性及GSH水平、Bcl-2蛋折表达水平、p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值降低（$P<0.05$），Bax、Cyt c、Caspase-8、Caspase-3和PTEN蛋白表达水平均升高（$P<0.05$）。**结论：**TP可抑制PTEN表达，激活PI3K/AKT信号通路，减轻HIE介导的新生大鼠海马神经元损伤、细胞凋亡、炎症反应及氧化应激，对HIE引起海马神经元损伤具有保护作用。

[关键词] 缺氧缺血性脑病；雷公藤甲素；凋亡；炎症；氧化应激
[中图分类号] R743.3 [文献标志码] A

[收稿日期] 2025-09-04 [录用日期] 2025-11-10
[基金项目] 天津市卫健委卫生健康科技项目（TJWJ2023MS297）
[作者简介] 马云霞（1981－），女，山东省威海市人，主治医师，医学硕士，主要从事新生儿疾病基础和临床方面的研究。
[通信作者] 马士凤（E-mail：mashf 2020@tmu.edu.cn）

©《吉林大学学报（医学版）》编辑部，开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。
© Editorial Board of Journal of Jilin University（Medicine Edition）. Open access under CC BY-NC-ND license.

Protective effect of triptolide on hippocampal neuron injury in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy by regulating PTEN/PI3K/AKT signaling pathway

MA Yunxia, LIU Dan, ZHANG Ying, MA Shifeng
(Department of Pediatrics, General Hospital, Tianjin Medical University Tianjin 300052, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of triptolide (TP) on hippocampal neuron injury in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE), and to clarify its related mechanism based on the phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway. Methods: Twelve neonatal rasts were randomly selected as sham operation group; another 58 neonatal rats were usedto establish models. The HIE model was established by right common carotid artery ligation combined with hypoxic exposure. The 48 successful modeling rats were randomly divided into HIE group, low dose of TP group (L-TP group), high dose of TP group (H-TP group) and high dose of TP+Ad-PTEN group (H-TP+Ad-PTEN group), with 12 rats in each group. The neurobehavioral function of the rats in various groups was evaluated; triphenyltetrazolium chloride(TTC) staining was used to observe the cerebral infarction status of the rats in various groups; HE staining was used to observe the pathological morphology of the hippocampal CA1 region of the rats in various groups; kits were used to detect the serum levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8(IL-8) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) of the rats in various groups; kits were used to detect the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and the levels of glutathione (GSH) in brain tissue of the rats in various groups; terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) method was used to detect the number of positive neurons of the rats in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of apoptosis-related proteins, PTEN, PI3K and AKT proteins, and phosphorylated PI3K(p-PI3K)/PI3K and phosphorylated AKT(p-AKT)/AKT ratios were caculated in brain tissue of the rats in various groups. Results: Compared with sham operation group, the neurological function score, serum levels of IL-6, IL-8 and TNF-α, the number of positive nenrrons in hippocampal tissue, and the expression levels of B cell lymphoma-2(Bcl-2)-associated X protein(Bax), Cytochrome c(Cyt c), cysteinyl aspartate-specific proteinase-8(Caspase-8), cysteinyl aspartate-specific proteinase-3(Caspase-3) and PTEN proteins in brain tissue of the rats in HIE group were increased ($P<0.05$); the activities of SOD and CAT, the level of GSH, the expression level of Bcl-2 protein, p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT ratios in brain tissue of the rats in HIE group were decreased ($P<0.05$). Compared with HIE group, the activities of SOD and CAT, the levels of GSH, the expression levels of Bcl-2 protein, and the p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT ratios in brain tissue of the rats in L-TP group and H-TP group were increased ($P<0.05$), and the expression levels of Bax, Cyt c, Caspase-8, Caspase-3, and PTEN proteins were decreased ($P<0.05$). Compared with H-TP group, the activities of SOD and CAT, the level of GSH, the expression level of Bcl-2, and the p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT ratios in H-TP+Ad-PTEN group were decreased ($P<0.05$), and the expression levels of Bax, Cyt c, Caspase-8, Caspase-3, and PTEN proteins were increased ($P<0.05$). Conclusion: TP can inhibit PTEN expression and activate the PI3K/AKT signaling pathway, thereby reducing HIE-mediated hippocampal neuron injury, apoptosis, inflammatory response and oxidative stress in the neonatal rats, and plays a protective role against hippocampal neuron injury induced by HIE.

KEYWORDS Hypoxic-ischemic encephalopathy; Triptolide; Apoptosis; Inflammation; Oxidative stress

缺氧缺血性脑病（hypoxic-ischemic encephalopathy，HIE）是指由多种因素引起的脑缺氧缺血性损伤，临床表现为发育迟缓、脑瘫、认知和运动功能障碍[1]。研究[1]显示：因HIE死亡的新生儿约占全球死亡新生儿的五分之一，是新生儿死亡的主要原因之一。在临床实践中，亚低温疗法是目前唯一获得广泛认可的治疗手段，但其有效时间窗口相对狭窄，针对新生儿重症HIE患者的疗效和神经功能修复作用均存在一定局限性[2]。因此，寻找安全有效的辅助治疗方法协同亚低温治疗脑损伤具有重要意义。雷公藤甲素（triptolide，TP）源自传统中药雷公藤，可被用于治疗多种疾病，具有抑制肿瘤生长、抗炎和免疫抑制等作用[3]。此外，研究[4]显示：TP具有显著的神经保护作用，是阿尔茨海默病、帕金森病、创伤性脑损伤和脊髓损伤等多种神经系统疾病的潜在治疗药物。然而，TP在HIE中的具体作用机制仍需进一步研究。

在低浓度抗氧化剂环境下，未成熟大脑对活性氧和活性氮介导的损伤极为敏感，这使得发育中的大脑对缺氧高度易感。既往研究[5]显示：在HIE中，脑细胞能量产生的耗竭、氧化应激损伤、线粒体损伤和炎症等因素均可导致细胞损伤的发生发展。磷脂酰肌醇3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，AKT）信号通路在神经元存活、凋亡调控、增殖活动和代谢平衡等生理过程的调控中起关键作用。该通路的激活受上游信号分子第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因（phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10，PTEN）的调控[6]。研究[7]显示：抑制PTEN活性以激活PI3K/AKT通路，是减轻神经损伤的有效关键策略[7]。研究[8]显示：TP可通过抑制PTEN表达减轻小鼠胶原性关节炎。然而，目前尚不明确TP能否通过调控PTEN/PI3K/AKT信号通路来改善HIE大鼠海马神经元的损伤。因此，本研究通过建立HIE模型，探讨TP对新生大鼠HIE的影响，并基于PTEN/PI3K/AKT信号通路探讨相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 选择70只无特定病原体级、7日龄、体质量为（14±1）g的雄性新生SD大鼠，由北京维通达生物技术有限公司提供，实验动物生产许可证号：SCXK（京）2023-0014。本研究中，实验动物的饲养环境得到严格调控，温度与湿度均保持适宜状态，并设置12 h光照/12 h黑暗的交替周期。实验期间，动物可自由进食与饮水。本研究的动物实验计划已通过本院动物伦理审查委员会的审核与批准（伦理审批号：IRB2026-DW-86）。

TP（纯度≥98%）购自上海源叶生物公司，腺病毒介导的PTEN基因过表达载体Ad-PTEN及其阴性对照Ad-NC由上海吉玛公司设计并合成，氯化三苯基四氮唑（triphenyltetrazolium chloride，TTC）染色试剂盒和HE染色试剂盒购自上海和序生物科技有限公司，末端脱氧核苷酸转移酶dUTP缺口末端标记法（terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling，TUNEL）染色试剂盒购自美国Roche公司，超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、白细胞介素8（interleukin-8，IL-8）和肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）的酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）检测试剂盒购自上海纪宁生物公司，白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、过氧化氢酶（catalase，CAT）和谷胱甘肽（glutathione，GSH）的ELISA试剂盒购自武汉赛培生物公司，B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）相关X蛋白（Bcl-2-associated X protein，Bax）、Cyt c、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3（cysteinyl aspartate-specific proteinase-3，Caspase-3）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）和PTEN抗体购自美国Abcam公司；Bcl-2、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶8（cysteinyl aspartate-specific proteinase-8，Caspase-8）、PI3K、磷酸化PI3K（phosphorylated PI3K，p-PI3K）、AKT和磷酸化AKT（phosphorylated AKT，p-AKT）抗体购自武汉三鹰生物公司。台式低温高速离心机、石蜡包埋机和切片机购自德国Leica公司，酶标仪购自瑞士Roche公司。

1.2 新生大鼠HIE模型的制备和给药 随机挑选12只新生大鼠作为假手术组，其余大鼠采用改良Rice-Vannucci法构建HIE模型[9]。对大鼠使用异氟醚进行麻醉处理，随后分离其右侧颈总动脉，并在5 min内完成结扎与切断操作。术后让大鼠静养恢复2 h，之后将其放入含有92%氮气和8%氧气的潮湿混合气体环境中，以3 L·min^{-1}的流速通风

处理2 h。若大鼠出现站立不稳、右侧肢体瘫痪以及提尾时对侧前肢无法伸展等典型体征，则判定造模成功[10]。假手术组大鼠不结扎、不缺氧，其余操作同造模组。58只大鼠参与造模，其中52只大鼠造模成功，6只大鼠死亡。在造模成功的大鼠中随机选择48只，随机分为HIE组、低剂量TP组（L-TP组）、高剂量TP组（H-TP组）和高剂量TP＋Ad-PTEN组（H-TP＋Ad-PTEN组），每组12只。L-TP组和H-TP组大鼠分别腹腔注射给药0.2和0.4 mg·kg^{-1}TP[11-12]；H-TP＋Ad-PTEN组大鼠在腹腔注射0.4 mg·kg^{-1} TP的同时，于双侧脑室注射0.2 μL·kg^{-1} Ad-PTEN，每日给药1次，连续注射7 d。末次给药12 h后，依据Zea Longa评分体系[13]对各组大鼠神经行为学功能进行评估。

1.3 TTC染色法观察各组大鼠脑梗死情况 完成神经行为学功能评估后，采集每组大鼠主动脉血样，3 000 r·min^{-1}离心10 min，分离得到血清。随后，对大鼠进行麻醉处理，断头取脑。从每组大鼠中随机选取6只大鼠，对其脑组织进行相应处理与切片，并采用2% TTC溶液进行染色，37 ℃下避光孵育15 min，之后观察并记录脑组织切片情况。

1.4 HE染色观察各组大鼠海马CA1区病理形态表现 取每组剩余的6只大鼠，将其大脑进行冠状切割，取冠状切面中段（含海马结构）约2 mm厚脑片，立即投入4%多聚甲醛溶液中固定，4 ℃条件下固定24 h。石蜡包埋后进行切片，行HE染色，观察脑组织海马区域的病理学变化。剩余脑组织（含皮层和海马等）快速分离为左右半球，用预冷磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered solution，PBS）冲洗血迹后，称质量并记录。将组织剪碎成1 mm^{3}小块，分装至冻存管中，液氮速冻后转移至－80 ℃冰箱保存，用于后续Western blotting及氧化应激指标检测。

1.5 试剂盒检测各组大鼠血清中IL-6、IL-8和TNF-α水平 依据相应试剂盒说明书，检测各组大鼠血清中炎症因子IL-6、IL-8和TNF-α水平。

1.6 试剂盒检测各组大鼠脑组织中SOD和CAT活性及GSH水平 称取大鼠海马组织，按1∶9的比例加入预冷生理盐水，冰浴中充分研磨匀浆，以3 000 r·min^{-1}在4 ℃条件下离心15 min后取上清液备用。依据相应试剂盒说明书，检测各组大鼠脑组织中氧化应激指标SOD和CAT活性及GSH水平。

1.7 TUNEL法检测各组大鼠海马神经元阳性细胞数 获取石蜡切片，经脱蜡处理后，置于0.1% Triton X-100室温孵育8 min。随后用95 ℃柠檬酸/柠檬酸钠溶液修复抗原10 min，再以TUNEL溶液37 ℃孵育60 min。接着与NeuN抗体4 ℃过夜孵育，PBS缓冲液洗涤后，加荧光二抗室温孵育60 min，DAPI染核。TUNEL阳性神经元呈绿色荧光，DAPI染核呈蓝色，于荧光显微镜下观察计数。

1.8 Western blotting法检测各组大鼠脑组织中凋亡相关蛋白及PTEN、p-PI3K、PI3K、p-AKT和AKT蛋白表达水平 利用放射性免疫沉淀分析缓冲液（Radioimmunoprecipitation Assay Buffer，RIPA）裂解液对大脑海马组织进行裂解处理，随后将裂解产物14 000 g、4 ℃离心30 min。收集上清液，采用BCA法测定蛋白浓度。取等量蛋白质（30 μg）行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis，SDS-PAGE），转印至聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜后，用5%脱脂牛奶封闭1 h，再与一抗（稀释比例均为1∶1 000）于4 ℃环境中孵育过夜。次日，将膜与辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的山羊抗兔IgG二抗（稀释比例为1∶2 000）于室温下孵育1 h，最后采用增强化学发光（enhanced chemiluminescence，ECL）法Plus试剂进行显色，同时选取GAPDH作为内参。通过Image-Pro Plus 6.0软件进行灰度分析，目的蛋白表达水平＝目的蛋白条带灰度值/GAPDH条带灰度值。

1.9 统计学分析 采用SPSS 22.0进行统计学分析。各组大鼠的神经功能评分、炎症因子（IL-6、IL-8和TNF-α）水平、氧化应激指标（SOD和CAT活性及GSH水平）、神经元阳性细胞数以及脑组织中凋亡和PTEN/PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达水平等计量资料均符合正态分布且方差齐性，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用SNK-q检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠神经功能评分 与假手术组比较，HIE组大鼠神经功能评分升高（$P<0.05$）；与HIE组比较，L-TP组和H-TP组大鼠神经功能评分降低（$P<0.05$）；与L-TP组比较，H-TP组大鼠神经功能评分降低（$P<0.05$）；与H-TP组比较，H-TP＋Ad-PTEN组大鼠神经功能评分升高（$P<0.05$）。见表1。

表1 各组新生大鼠神经功能评分

Tab. 1 Neurological function scores of neonatal rats in various groups ($n=12$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Neurological function score
Sham operation	0.00±0.00
HIE	2.80±0.19*
L-TP	2.21±0.15△
H-TP	1.35±0.16△#
H-TP+Ad-PTEN	2.16±0.18*○
F	603.875
P	<0.001

*$P<0.05$ compared with sham operation group; △$P<0.05$ compared with HIE group; #$P<0.05$ compared with L-TP group; ○$P<0.05$compared with H-TP group.

2.2 各组大鼠脑梗死情况 与假手术组比较，HIE组大鼠脑梗死体积增加。与HIE组比较，L-TP组和H-TP组大鼠脑梗死体积减小，且H-TP组大鼠脑梗死改善效果更优于L-TP组。与H-TP组比较，H-TP+Ad-PTEN组大鼠脑梗死体积增加。见图1。

2.3 各组大鼠海马CA1区病理形态表现 假手术组大鼠海马CA1区细胞形态规整，排列致密，未见显著病理损伤表现。与假手术组比较，HIE组大鼠海马CA1区多数神经元核固缩，胞质呈三角形浓染，部分神经元脱失。与HIE组比较，L-TP组和H-TP组大鼠海马CA1区神经元病变明显减轻，且H-TP组大鼠神经元病变减轻程度优于L-TP组。H-TP+Ad-PTEN组大鼠海马CA1区多数神经元呈三角形浓染，病变程度重于H-TP组。见图2。

2.4 各组大鼠血清中IL-6、IL-8和TNF-α水平 与假手术组比较，HIE组大鼠血清中IL-6、IL-8和TNF-α水平升高（$P<0.05$）；与HIE组比较，L-TP组和H-TP组大鼠血清中IL-6、IL-8和TNF-α水平降低（$P<0.05$）；与L-TP组比较，H-TP组大鼠血清中IL-6、IL-8和TNF-α水平降低（$P<0.05$）；与H-TP组比较，H-TP+Ad-PTEN组大

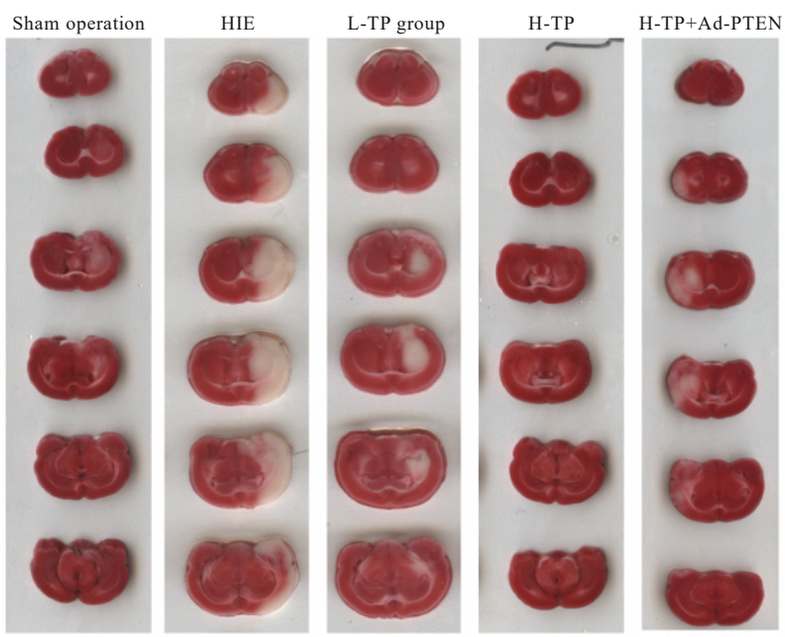


图1 各组大鼠脑梗死情况

Fig. 1 Brain infarction status of rats in various groups

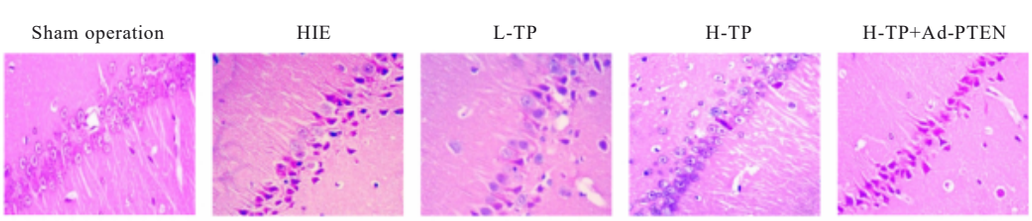


图2 各组大鼠海马CA1区病理形态表现(HE，×200)

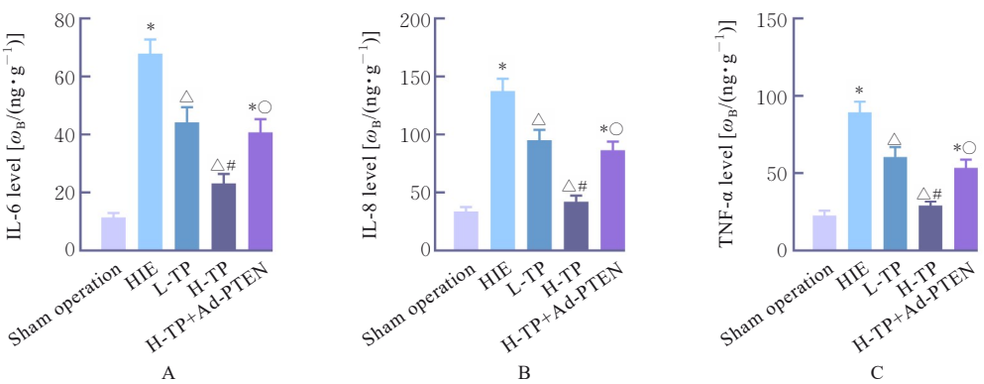
Fig. 2 Pathomorphology of hippocampal CA1 region of rats in various groups (HE, ×200)

鼠血清中IL-6、IL-8和TNF-α水平升高（$P<0.05$）。见图3。

2.5 各组大鼠脑组织中SOD和CAT活性及GSH水平 与假手术组比较，HIE组大鼠脑组织中SOD和CAT活性及GSH水平降低（$P<0.05$）；与HIE组比较，L-TP组和H-TP组大鼠脑组织中SOD和CAT活性及GSH水平升高（$P<0.05$）；与L-TP组比较，H-TP组大鼠脑组织中SOD和CAT活性及GSH水平升高（$P<0.05$）；与H-TP组比较，H-TP＋Ad-PTEN组大鼠脑组织中SOD和CAT活性及GSH水平降低（$P<0.05$）。见图4。

2.6 各组大鼠海马神经元阳性细胞数 与假手术组比较，HIE组大鼠海马组织中神经元阳性细胞数增加（$P<0.05$）；与HIE组比较，L-TP组和H-TP组大鼠神经元阳性细胞数减少（$P<0.05$）；与L-TP组比较，H-TP组大鼠神经元阳性细胞数减少（$P<0.05$）；与H-TP组比较，H-TP＋Ad-PTEN组大鼠神经元阳性细胞数增加（$P<0.05$）。见图5。

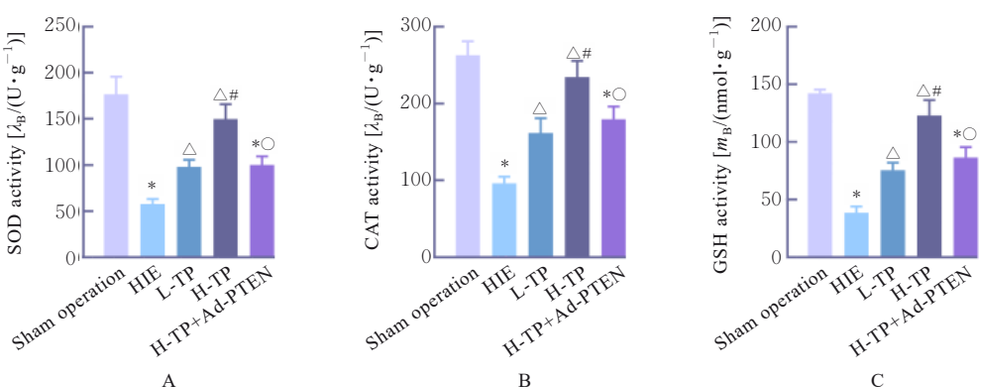
2.7 各组大鼠脑组织中凋亡相关蛋白表达水平 与假手术组比较，HIE组大鼠脑组织中Bax、Cyt c、Caspase-8和Caspase-3蛋白表达水平升高（$P<0.05$），Bcl-2蛋白表达水平降低（$P<0.05$）；与HIE组比较，L-TP组和H-TP组大鼠脑组织中Bax、Cyt c、Caspase-8和Caspase-3蛋白表达水平降低（$P<0.05$），Bcl-2蛋白表达水平升高（$P<0.05$）；与L-TP组比较，H-TP组大鼠脑组织中Bax、Cyt c、Caspase-8和Caspase-3蛋白表达水平降低（$P<0.05$），Bcl-2蛋白表达水平升高（$P<0.05$）；与H-TP组比较，H-TP＋Ad-PTEN组大鼠脑组织中Bax、Cyt c、Caspase-8和Caspase-3蛋白表达水平升高（$P<0.05$），Bcl-2蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。见图6。



*$P<0.05$ compared with sham operation group; △$P<0.05$ compared with HIE group; #$P<0.05$compared with L-TP group; ○$P<0.05$ compared with H-TP group.

图3 各组大鼠血清中IL-6、IL-8和TNF-α水平

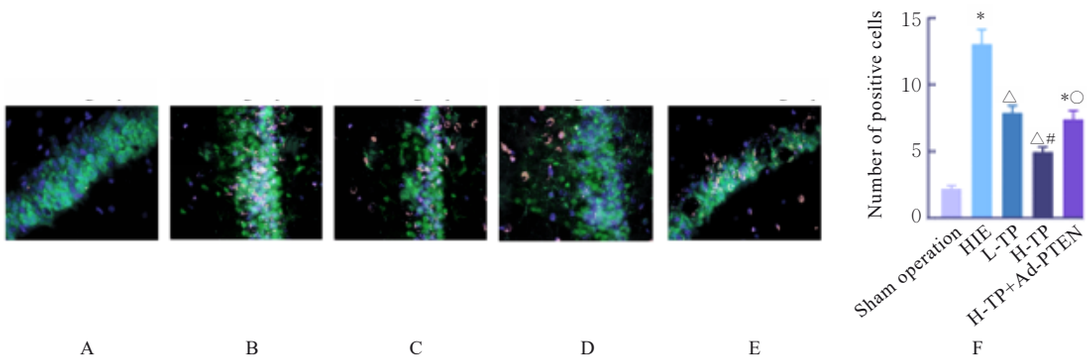
Fig. 3 Levels of IL-6, IL-8 and TNF-α in serum of rats in various groups



*$P<0.05$ compared with sham operation group; △$P<0.05$ compared with HIE group; #$P<0.05$ compared with L-TP group; ○$P<0.05$ compared with H-TP group.

图4 各组大鼠脑组织中SOD(A)和CAT(B)活性及GSH(C)水平

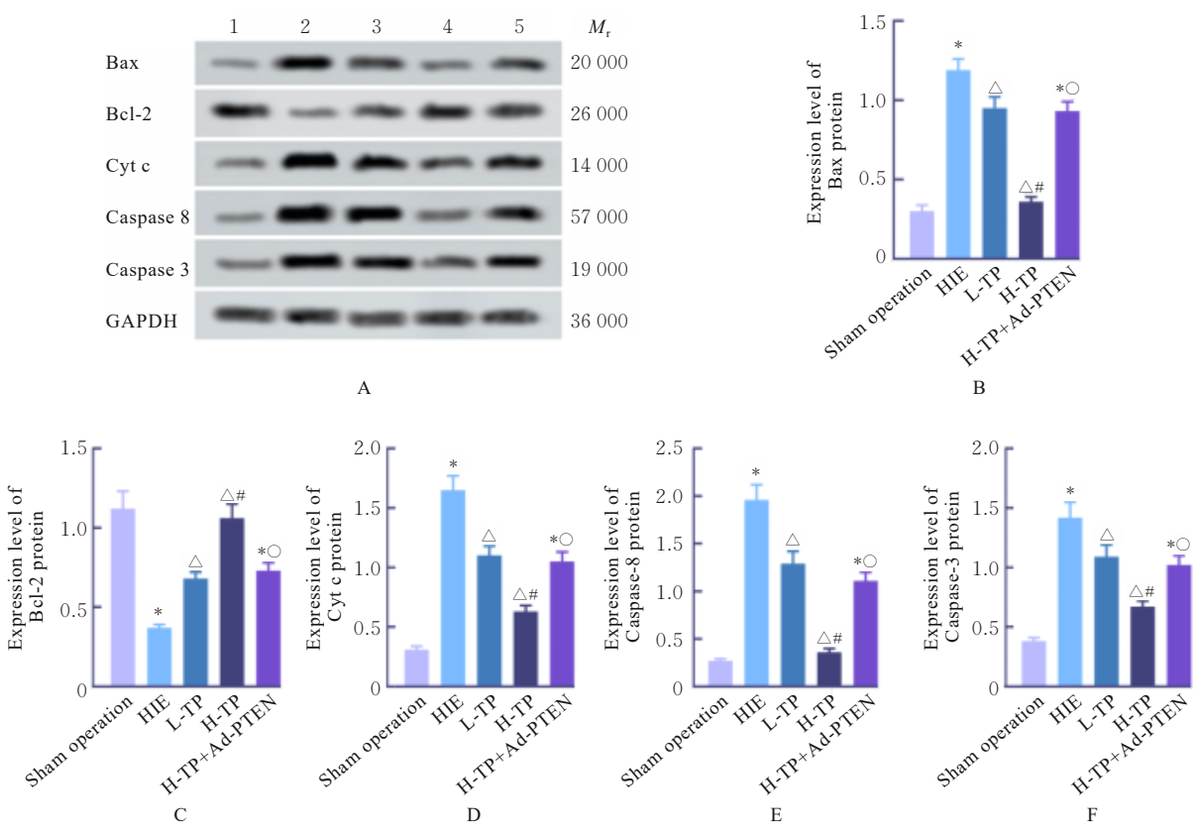
Fig. 4 SOD(A), CAT(B) activities and GSH(C) levels in brain tissue of rats in various groups



A－E：×200；F：Histogram；A：Sham operation group；B：HIE group；C：L-TP group；D：H-TP group；E：H-TP＋Ad-PTEN group. Green fluorescence：TUNEL；Red fluorescence：NeuN；Blue fluorescence：DAPI. $^{*}P<0.05$ compared with sham operation group；$^{\triangle}P<0.05$ compared with HIE group；$^{\#}P<0.05$ compared with L-TP group；$^{\bigcirc}P<0.05$ compared with H-TP group.

图5 各组大鼠海马神经元染色情况(A－E)和阳性细胞数(F)

Fig. 5 TUNEL of staining hippocampal neurons(A－E) and number of positive cells(F) in rats in various groups



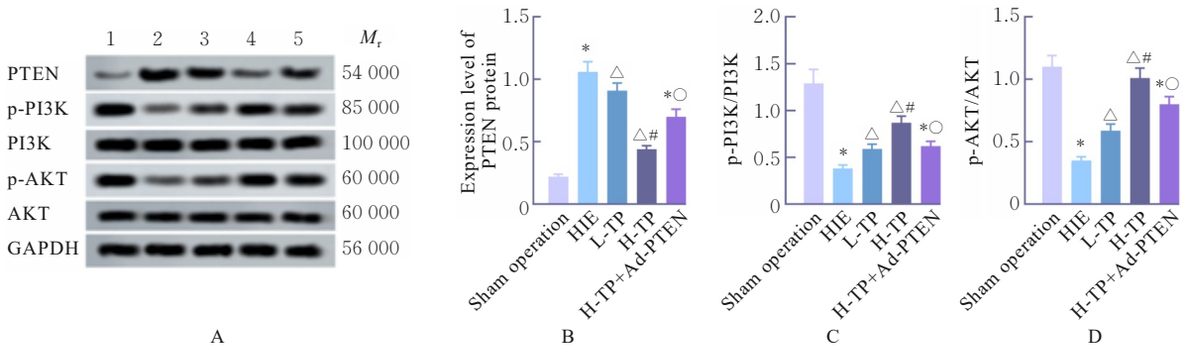
A：Electrophoregram (Lane 1：Sham operation group；Lane 2：HIE group；Lane 3：L-TP group；Lane 4：H-TP group；Lane 5：H-TP＋AD-PTEN group)；B－F：Histograms；B：Bax protein；C：Bcl-2 protein；D：Cyt c protein；E：Caspases-8 protein；F：Caspases-3 protein($^{*}P<0.05$ compared with sham operation group；$^{\triangle}P<0.05$ compared with HIE group；$^{\#}P<0.05$ compared with L-TP group；$^{\bigcirc}P<0.05$ compared with H-TP group).

图6 各组大鼠脑组织中凋亡相关蛋白表达电泳图和直条图

Fig. 6 Electrophoregram and histograms of expressions of apoptosis-related proteins in brain tissue of rats in various groups

2.8 各组大鼠脑组织中PTEN蛋白表达水平和p-PI3K/PI3K及p-AKT/AKT比值 与假手术组比较，HIE组大鼠脑组织中PTEN蛋白表达水平升高($P<0.05$)，p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值降低($P<0.05$)；与HIE组比较，L-TP组和H-TP组大鼠脑组织中PTEN蛋白表达水平降低

（$P<0.05$），p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 升高（$P<0.05$）；与 L-TP 组比较，H-TP 组大鼠脑组织中 PTEN 蛋白表达水平降低（$P<0.05$），p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值升高（$P<0.05$）；与 H-TP 组比较，H-TP＋Ad-PTEN 组大鼠脑组织中 PTEN 蛋白表达水平升高（$P<0.05$），p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值降低（$P<0.05$）。见图 7。



A：Electrophoregram（Lane 1：Sham operation group；Lane 2：HIE group；Lane 3：L-TP group；Lane 4：H-TP group；Lane 5：H-TP＋AD-PTEN group）；B－D：Histograms；B：Expression level of PIEN protein；C：p-PI3K/PI3K；D：p-AKT/AKT（$^{*}P<0.05$ compared with sham operation group；$^{\triangle}P<0.05$ compared with HIE group；$^{\#}P<0.05$ compared with L-TP group；$^{\bigcirc}P<0.05$ compared with H-TP group）.

图 7 各组大鼠脑组织中 PTEN、p-PI3K、PI3K、p-AKT 和 AKT 蛋白表达电泳图和直条图

Fig. 7 Electrophoregram and histograms of expressions of PTEN, p-PI3K, PI3K, p-AKT and AKT proteins in brain tissue of rats in various groups

3 讨 论

雷公藤作为传统中药材，具有抗肿瘤、抗炎及免疫抑制作用，广泛用于多种炎症性和自身免疫性疾病的治疗。其主要活性提取物 TP 相对分子质量小、亲脂性强，易透过血脑屏障，对神经系统具有显著保护作用[14]。研究[12]显示：TP 可通过抑制阻止小胶质细胞向 M1 表型极化，抑制炎症反应，并通过与 BV-2 细胞相互作用抑制 HT-22 细胞凋亡，从而改善脑缺血/再灌注损伤。此外，TP 还能激活哺乳动物雷帕霉子靶蛋白/u1VC-51 样自噬激活激酶 1（mTOR/ULK1）信号通路抑制自噬，减少脑缺血卒中大鼠脑组织的梗死体积与水肿程度，发挥神经保护作用[11]。本研究采用右颈总动脉结扎联合低氧暴露法构建新生大鼠 HIE 模型，模拟缺氧缺血病理环境，结果显示：建模组大鼠出现显著神经功能缺损症状，海马组织神经元病理损伤加剧，同时伴随神经元凋亡水平有显升高。研究[15]显示：缺氧缺血性损伤可激活体内多种炎症相关信号通路，促使 IL-1β、IL-6、IL-8 和 TNF-α 等炎症细胞因子活化。本研究大鼠血清中 IL-6、IL-8 和 TNF-α 水平明显升高，支持了炎症反应在 HIE 病理过程中的关键作用。经 TP 干预后，HIE 新生大鼠的神经功能显著改善，受损神经元修复加速，炎症因子水平得到有效抑制，证实 TP 可能通过抑制炎症反应并促进海马神经元的修复来发挥其治疗作用。

氧化应激是 HIE 病理级联的关键因素[1]。新生儿大脑因高氧消耗和较弱的抗氧化能力，更易发生氧化应激损伤，导致脂质过氧化、蛋白质氧化、DNA 破坏和线粒体抑制[16]。内源性抗氧化机制包括酶和非酶防御体系，酶机制如 SOD、CAT 和含胱甘肽过氧化物酶，而非酶机制包括 GSH、维生素 C、维生素 E 和褪黑素等[17]。既往研究[18]表明：TP 能减轻深度低温循环停止状态下大鼠的炎症反应和氧化应激水平，改善其神经行为功能。本研究也发现：TP 可明显提升 SOD 和 CAT 活性及 GSH 水平，提示其可能通过诱导内源性抗氧化剂和酶发挥间接抗氧化作用。

除缺血核心区细胞早期坏死外，HIE 的二次能量衰竭可导致外周区以凋亡为主的神经元延迟死亡，这是 HIE 后脑细胞最终损失损伤的重要原因[19]。有研究[20]显示：新生 HIE 引起的氧化应激可损伤线粒体。缺氧缺血介导的损伤可调节 Bcl-2 家族蛋白，触发 Bax 依赖性线粒体外膜通透化及 Cyt c 释放[21]。细胞质中的 Cyt c 招募并激活 Apaf-1 和 Caspase-9，形成凋亡小体，进而激活 Caspase-3，导致内源性凋亡。同时，炎性星形胶质细胞和小胶

质细胞释放死亡受体配体，激活死亡受体及Caspase-8，引发外源性凋亡[22]。本研究也发现：HIE大鼠海马组织中Bax表达水平升高，Bcl-2表达水平降低，促进Cyt c释放，并激活Caspase-8，进一步触发了Caspase-3的激活，导致凋亡级联反应进入执行阶段。既往研究[23]显示：TP可通过抑制中枢神经元过度凋亡发挥抗抑郁作用；其也能够通过抑制心肌细胞凋亡改善心力衰竭大鼠心肌损伤[24]。本研究进一步通过检测多种凋亡相关蛋白以验证TP的抗凋亡特性，结果发现：TP干预可明显抑制大鼠海马组织中Bax、Cyt c和Caspase-8蛋白表达水平，并上调Bcl-2表达水平，提示TP可能通过内源性和外源性途径抑制HIE诱导的细胞凋亡。

PI3K/AKT信号通路广泛存在于多种组织和细胞中，参与调控细胞生长、存活和凋亡等众多重要生物学过程。在神经系统中，该通路的激活具有保护作用[25]。*PTEN*作为肿瘤抑制基因，在脑损伤后表达升高，可通过负反馈抑制PI3K/AKT信号通路的传导，参与介导缺血性卒中、神经退行性疾病和精神障碍的神经元损伤[26]。本研究在HIE模型中观察到PTEN表达水平升高，p-PI3K和p-AKT表达水平则降低，提示PTEN可能通过负反馈机制抑制PI3K/AKT信号通路的传导，从而加剧神经元损伤。研究[27]证实：抑制PTEN的表达与功能，可增强PI3K/AKT信号通路的转导活性，进而拮抗神经元凋亡，提升抗炎与抗氧化能力，发挥神经元保护作用。GAO等[28]通过数据库筛选TP的主要靶点，发现其可能通过下调PTEN调控机体对糖尿病肾病治疗中细胞因子、激素、氧化应激和凋亡信号通路的反应。另一项研究[29]显示：TP通过调控PTEN/PI3K/AKT/mTOR信号通路改善强直性脊柱炎滑膜损伤。本研究发现：TP可显著抑制PTEN蛋白表达水平，并促进PI3K和AKT蛋白磷酸化水平。进一步研究发现：在高剂量TP干预基础上过表达PTEN，会加剧大鼠的神经损伤、炎症及氧化应激水平，同时上调神经元凋亡水平；上述结果表明：TP可能通过抑制PTEN表达，激活PI3K/AKT信号通路，从而改善HIE大鼠的海马神经元损伤。

综上所述，TP可抑制PTEN表达，激活PI3K/AKT信号通路，减轻HIE介导的新生大鼠海马神经元损伤、细胞凋亡、炎症反应及氧化应激，对HIE引起海马神经元损伤具有保护作用。未来研究可进一步探讨TP在其他神经系统疾病中的应用潜力，并优化其给药方案，以提高临床疗效。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在任何利益冲突。

作者贡献声明：

马云霞负责研究实施和论文撰写，刘丹负责数据整理和研究设计，张颖与马士凤负责统计学分析及论文审阅。

[参考文献]

[1] HUANG Q Y, TANG J H, XIANG Y, et al. 4-Benzyl-2-methyl-1, 2, 4-thiadiazolidine-3, 5-dione rescues oligodendrocytes ferroptosis leading to myelin loss and ameliorates neuronal injury facilitating memory in neonatal hypoxic-ischemic brain damage [J]. Exp Neurol, 2025, 390: 115262.

[2] HTUN Y, NAKAMURA S, KUSAKA T. Hydrogen and therapeutic gases for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: potential neuroprotective adjuncts in translational research[J]. Pediatr Res, 2021, 89(4): 753-759.

[3] OORSCHOT D E, SIZEMORE R J, AMER A R. 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.

[4] SONG J, HE G N, DAI L. A comprehensive review on celastrol, triptolide and triptonide: Insights on their pharmacological activity, toxicity, combination therapy, new dosage form and novel drug delivery routes [J]. Biomedecine Pharmacother, 2023, 162: 114705.

[5] CUI Y R, JIANG X J, FENG J. The therapeutic potential of triptolide and celastrol in neurological diseases[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1024955.

[6] ZHU J J, YU B Y, HUANG X K, et al. Neferine protects against hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats by suppressing NLRP3-mediated inflammasome activation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6654954.

[7] 李春雨，刘思思，李 辰，等. 补肾益髓方含药骨髓间充质干细胞外泌体调控miR-223介导PTEN/PI3K/Akt通路抑制CPZ小鼠神经元凋亡的机制研究[J]. 环球中医药，2025，18(3)：457-467.

[8] 姬 斌，刘丽娟. 西红花苷调节PTEN-PI3K/Akt信号通路保护脑缺血再灌注大鼠神经功能[J]. 解剖科学进展，2025，31(2)：189-191，196.

[9] HUANG Y, BA X, WANG H, et al. Triptolide alleviates collagen-induced arthritis in mice by modulating Treg/Th17 imbalance through the JAK/PTEN-STAT3 pathway [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2023, 133(1): 43-58.
[10] 张艺森，张 玉，张 新. 基于Nrf2/NF-κB信号通路研究连翘苷对缺氧缺血性脑病新生大鼠神经元凋亡的影响[J]. 中草药, 2025, 56(10): 3577-3584.
[11] 扎西吉，张 赟，马凤美，等. 基于PKC/ERK通路探讨败酱总黄酮对缺氧缺血性脑病新生大鼠神经元凋亡的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2023, 43(6): 786-794.
[12] 李向斌，侯芳芳. 雷公藤甲素通过mTOR/ULK1途径抑制自噬功能减轻脑缺血卒中造成的神经功能损伤[J]. 中国药师, 2022, 25(1): 1-5, 17.
[13] ZHOU J J, YE W, CHEN L, et al. Triptolide alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury *via* regulating the Fractalkine/CX3CR1 signaling pathway [J]. Brain Res Bull, 2024, 211: 110939.
[14] 余 恒，宋光捷. 去甲斑蝥素通过Nrf2通路保护新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的机制[J]. 西北药学杂志, 2022, 37(4): 82-86.
[15] PAN W Y, XU Z M. Triptolide mediates Wnt/β- catenin signalling pathway to reduce cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Folia Neuropathol, 2020, 58(4): 324-333.
[16] ZHENG Y H, LI L Y, CHEN B W, et al. Chlorogenic acid exerts neuroprotective effect against hypoxia-ischemia brain injury in neonatal rats by activating Sirt1 to regulate the Nrf2-NF-κB signaling pathway[J]. Cell Commun Signal, 2022, 20(1): 84.
[17] LU L Y, PANG M D, CHEN T T, et al. Protopine exerts neuroprotective effects on neonatal hypoxic-ischemic brain damage in rats *via* activation of the AMPK/PGC1α pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2024, 18: 4975-4992.
[18] SHAW P, KUMAR N, SAHUN M, et al. Modulating the antioxidant response for better oxidative stress-inducing therapies: how to take advantage of two sides of the same medal?[J]. Biomedicines, 2022, 10(4): 823.
[19] CHEN Q, LEI Y Q, LIU J F, et al. Triptolide improves neurobehavioral functions, inflammation, and oxidative stress in rats under deep hypothermic circulatory arrest[J]. Aging, 2021, 13(2): 3031-3044.
[20] DIETZ R M, DINGMAN A L, HERSON P S. Cerebral ischemia in the developing brain [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2022, 42(10): 1777-1796.
[21] AYCAN N, ÇAY DEMIR D, YÜREKTÜRK E, et al. Oxidative and antioxidative biomarker profiles in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: insights for pathophysiology and treatment strategies [J]. Med Sci Monit, 2024, 30: e945045.
[22] SAMAIYA P K, KRISHNAMURTHY S, KUMAR A. Mitochondrial dysfunction in perinatal asphyxia: role in pathogenesis and potential therapeutic interventions [J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(12): 4421-4434.
[23] FANG Y, ZHENG Y H, GAO Q Q, et al. Activation of the Nrf2/Keap1 signaling pathway mediates the neuroprotective effect of Perillyl alcohol against cerebral hypoxic-ischemic damage in neonatal rats [J]. Redox Rep, 2024, 29(1): 2394714.
[24] 张亚茹，庄 耀，陶 柱，等. 基于CREB/BDNF/TrkB信号通路探究雷公藤甲素改善皮质酮诱发小鼠抑郁的作用及机制[J]. 中国药理学通报, 2025, 41(4): 677-685.
[25] 赵彩霞，刘建芳，刘 宏，等. 雷公藤甲素对心力衰竭大鼠心肌损伤及AMPK/mTOR通路的影响[J]. 中南医学科学杂志, 2025, 53(1): 23-27, 69.
[26] RAN Y Y, YE L, DING Z T, et al. Melatonin protects against ischemic brain injury by modulating PI3K/AKT signaling pathway *via* suppression of PTEN activity[J]. ASN Neuro, 2021, 13: 17590914211022888.
[27] ZHAO M M, GAO J L, ZHANG Y N, et al. Elevated miR-29a contributes to axonal outgrowth and neurological recovery after intracerebral hemorrhage *via* targeting PTEN/PI3K/Akt pathway [J]. Cell Mol Neurobiol, 2021, 41(8): 1759-1772.
[28] WU H, PEI H Y, LIU J Z, et al. Protective effect of total saponins of ginseng stems and leaves (GSLS) on chlorpyrifos-induced brain toxicity in mice through the PTEN/PI3K/AKT axis[J]. Aging, 2022, 14(22): 8982-8999.
[29] GAO Y, GUO Z A, LIU Y Y. Analysis of the potential molecular biology of triptolide in the treatment of diabetic nephropathy: a narrative review [J]. Medicine, 2022, 101(48): e31941.
[30] 王 磊，吕成银，刘强晖，等. 放射学阴性中轴型脊柱关节炎的诊疗进展[J]. 中国实用内科杂志, 2026, 46(3): 245-249.