

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003230

GLP-1受体激动剂对新生儿缺氧缺血性脑损伤模型小鼠 在突触可塑性方面的保护作用

谭美娟¹, 谭红燕¹, 向垚林¹, 方超策¹, 周玉¹, 张杰²

(1. 湖北民族大学附属民大医院新生儿科, 恩施 445000; 2. 湖北宣恩县人民医院儿科, 宣恩 445599)

【摘要】目的:探讨胰高血糖素样肽-1受体(glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R)激动剂(agonist, NLY01)对新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxia ischemia, HI)模型小鼠在突触可塑性方面的保护作用。**方法:**实验1, 将P7小鼠分配到对照组(Con组)、HI组、NLY01组和HI+NLY01组, 每组16只; 实验2, 将P7小鼠分配到HI组、HI+NLY01组、HI+Ex9-39组和HI+NLY01+Ex9-39组, 每组8只。其中, Ex9-39用于阻断GLP-1R。进行行为测试以测量学习能力。高尔基染色用于测量齿状回突触的可塑性。通过蛋白质印迹和免疫荧光评估突触和神经炎症相关蛋白的表达。**结果:** NLY01对GLP-1R的激活防止了由HI引起认知缺陷。NLY01阻止了HI诱导的GLP-1R水平降低。GLP-1R的激活显著改善了突触可塑性的损害, 阻止了炎症因子的上调, 并抑制了核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)磷酸化和小胶质细胞M1极化。在HI模型中, NLY01对HI诱导的新生小鼠急性脑损伤的保护作用被Ex9-39阻断。**结论:** GLP-1R可能是调节新生小鼠急性脑损伤炎症途径的功能靶点, 支持GLP-1R激动剂在HI诱导新生小鼠脑损伤中的潜在治疗作用。

【关键词】胰高血糖素样肽-1受体; NLY01; 小鼠; 胶质细胞; 缺氧缺血性脑损伤

【中图分类号】R742.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2022-08-12

Protective effect of GLP-1 receptor agonists on synaptic plasticity in neonatal hypoxic-ischemic brain injury model mice

Tan Meijuan¹, Tan Hongyan¹, Xiang Yaolin¹, Fang Chaoce¹, Zhou Yu¹, Zhang Jie²

(1. Department of Neonatology, Minda Hospital Affiliated to Hubei University for Nationalities;

2. Department of Pediatrics, Hubei Xuanen Country People's Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the protective effect of glucagon-like peptide-1 receptor(GLP-1R) agonist(NLY01) on synaptic plasticity in neonatal hypoxia ischemia(HI) model mice. **Methods:** In experiment 1, P7 mice were assigned to one of the following four groups, $n=16/\text{group}$: control group (Con group), HI group, NLY01 group and HI+NLY01 group. In experiment 2, P7 mice were assigned to four groups ($n=8/\text{group}$): HI group, HI+NLY01 group, HI+Ex9-39 group and HI+NLY01+Ex9-39 group. Among them, Ex9-39 was used to block GLP-1R. Behavioral tests were performed to measure learning ability. Golgi staining was used to measure dentate gyrus synaptic plasticity. Expression of synaptic and neuroinflammation-related proteins was assessed by Western blotting and immunofluorescence. **Results:** Activation of GLP-1R by NLY01 prevented the emotional and cognitive deficits caused by HI. NLY01 prevented HI-induced reduction in GLP-1R levels. Activation of GLP-1R significantly ameliorated the impairment of synaptic plasticity, prevented the upregulation of inflammatory factors, and suppressed nuclear factor-κB(NF-κB) phosphorylation and microglial M1 polarization. In the HI model, the protective effect of NLY01 on HI-induced neonatal mice was blocked by Ex9-39. **Conclusion:** GLP-1R may be a functional target regulating inflammatory pathways in acute brain injury in neonatal mice, supporting a potential therapeutic role of GLP-1R agonists in HI-induced neonatal mice.

【Key words】glucagon-like peptide-1 receptor; NLY01; mice; glial cell; hypoxia ischemia

围产期缺氧缺血性脑损伤(hypoxia ischemia, HI)是婴儿发病和死亡的最常见原因之一。尽管在

作者介绍: 谭美娟, Email: tltl20079@163.com,

研究方向: 新生儿医学。

基金项目: 湖北省卫生健康科研基金资助项目(编号: 20210726)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1046.r.20230602.1414.018.html>

(2023-06-06)

阐明HI的潜在机制方面取得了重大进展, 但仍然没有成熟的临床有效治疗方法来减少这些儿童的脑损伤及长期后遗症^[1]。因此, 迫切需要探索新的治疗干预措施和目标, 以尽量减少这种神经系统后果。活化的小胶质细胞显著促进神经炎症, 并代表中枢神经系统(central nervous system, CNS)中炎症

介质的主要来源^[2]。小胶质细胞可以极化为 2 种极端状态:经典(M1)和替代(M2)表型。M1 激活的小胶质细胞释放炎性细胞因子,包括肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 和白细胞介素(interleukin, IL)-1 β ,它们会增强脑损伤。M2 激活的小胶质细胞释放抗炎细胞因子和生长因子,包括 IL-10 和转化生长因子 β ,保护神经。许多研究结果表明,介导与 CNS 损伤相关的小胶质细胞表型变化,包括新生动物的 HI,可以对神经恢复产生有益影响^[3]。因此,这些证据表明小胶质细胞的异常与 HI 神经损伤的发病机制密切相关。胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)是一种肠促胰岛素激素,通过作用于体循环和中枢神经系统中的胰高血糖素样肽-1受体(glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R)来调节血糖、体质量和饱腹感^[4]。NLY01 是一种长效 GLP-1R 激动剂,具有延长的半衰期和良好的血脑屏障渗透性^[5]。在帕金森病小鼠模型中,NLY01 已被证明可减少小胶质细胞 C1q、TNF- α 和 IL-1 β 的产生,从而阻断 A1 星形胶质细胞转化,减少多巴胺能细胞死亡,并改善帕金森病小鼠模型的运动症状^[5]。鉴于 NLY01 在大脑中的免疫调节作用,假设 NLY01 的神经保护作用与抑制炎症和调节小胶质细胞有关。本研究探讨 NLY01 激活 GLP-1R 对 HI 新生小鼠中的神经炎症影响,并试图阐明这种影响是否对小鼠的行为和突触可塑性损伤产生改善作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立和分组处理

妊娠 C57BL/6J 小鼠(>15 d 妊娠)购自北京维通利华实验动物技术有限公司,在标准化环境条件下饲养。本实验中使用的 HI 动物模型是基于 Rice-Vannucci 模型,并稍作修改^[6]。既往报道中,分离并结扎了出生第 7 天(P7)幼鼠的右颈总动脉。在室温下恢复 30 min 后,幼鼠在缺氧室(加湿 8%O₂+92%N₂)暴露于缺氧损伤 120 min。然而,使用这种方法建立模型时,大约有 40% 的幼鼠死亡。随后修改方法。具体操作为,P7 幼鼠用 2.5% 异氟醚麻醉,切开皮肤后,分离并结扎右侧颈总动脉。在室温下恢复 60 min 后,幼鼠在缺氧室(加湿 8%O₂+92%N₂)暴露于缺氧损伤 90 min。经过多次初步实验,改进后的办法可以成功建立模型,降低小鼠死亡率。对照组在出生第 7 天用 2.5% 异氟醚麻醉,分离右侧颈总动脉但不结扎。

实验涉及 2 个方案。实验 1,将 P7 小鼠分配到以下 4 组,对照组(Con 组):非 HI, i.p. 生理盐水;HI 组:建立 HI 模型, i.p. 生理盐水;NLY01 组:非 HI 模型, i.p. NLY01(5 mg/kg)^[7];HI+NLY01 组:建立 HI 模型, i.p. NLY01(5 mg/kg)。每组 16

只,采用随机完整区组设计。在 HI 模型建立后 30 min, NLY01(5 mg/kg)以恒定体积 i.p. 给药,每周 2 次,连续治疗 2 周。实验 2,以随机完整区组设计将 P7 小鼠分配到 4 组,HI 组:建立 HI 模型, i.p. 生理盐水;HI+NLY01 组:建立 HI 模型, i.p. NLY01(5 mg/kg);HI+Ex9-39 组:将不锈钢导管植入小鼠侧脑室(立体定位坐标:前囟后 0.5 mm, 中线外侧 1.1 mm, 前囟腹侧 2.5 mm)。恢复 1 周后,建立 HI 模型前 30 min, 脑室内注射 5 μ L Ex9-39(50 nmol/kg)^[8], 其他组小鼠注射相应的溶剂;HI+NLY01+Ex9-39 组:建立 HI 模型前 30 min, 脑室内注射 5 μ L Ex9-39(50 nmol/kg), i.p. NLY01(5 mg/kg)。每组 8 只。

1.2 行为测试

在 HI 后 2 周,由对治疗方案不知情的观察者进行行为测试。所有行为实验均在 7:00 至 19:00 之间进行。Morris 水迷宫(Morris water maze, MWM)用于评估小鼠的空间学习和记忆^[9-11]。MWM 测试分为 2 个阶段,包括初始训练阶段和空间探索测试。在初始训练阶段,每只小鼠接受 5 次训练(每天 1 次)。每个阶段包含 4 个试验,每只小鼠可以在一个试验中搜索隐藏的平台 60 s。如果小鼠找到平台,则将其带到笼中,并在笼中停留 3 s。当小鼠在 60 s 内未能找到平台时,将其引导到平台上,并允许其在平台上停留至少 3 s。记录每次试验的逃逸潜伏期和游泳速度。逃逸潜伏期是小鼠在 MWM 初始训练阶段找到隐藏平台所需的时间。在训练阶段完成 24 h 后,使用 1 次不带平台的试验来执行空间探索测试。将小鼠从平台的另一侧单独释放到水中,并允许其自由游泳 60 s。记录平台穿越和在目标象限花费的时间。鼠标的运动由连接到个人计算机的摄像机监测,通过 Ethovision 2.0 相机驱动的跟踪器系统(荷兰 Noldus 公司)收集和分析数据。

1.3 高尔基染色

进行高尔基染色以表征海马 DG 内神经元树突棘密度的潜在变化。将脑组织在室温和黑暗条件下用高尔基染色溶液浸泡 14 d^[12-13]。使用振动刀将脑组织连续切片为 100 μ m 冠状切片,每个切片连接到载玻片上。通过以下处理过程对载玻片进行染色和清洁:Na₂CO₃ 20 min, 蒸馏水 1 s, 70% 酒精 10 min, 90% 酒精 15 min, 100% 酒精 20 min, 二甲苯 20 min。最后,将切片嵌入中性香脂中。为了计算树突棘的数量,选择具有明确棘分辨率且长于 10 μ m 的直末端分枝进行分析。选取 10 个神经元测量海马 DG 区。使用 Image J 分析树突棘的数量。

1.4 蛋白质印迹

使用研磨机将海马分离并在 200 μ L 含有苯甲烷磺酰氟化物的裂解缓冲液(北京 Solarbio 公司)中裂解提取蛋白。在 4°C 下以 1 200g 离心裂解缓冲液 15 min, 并收集上清液。通过 SDS-PAGE 从每个样品(20 μ g)中分离等量的蛋白质。将分离的蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜(美国 Millipore 公司)。将膜在 10% 脱脂牛奶中封闭 2 h, 并在 4 °C 下暴露过夜, 适当稀释一级抗体:抗 GLP-1R(1:2 000), 抗突触后密度蛋白 95 (postsynaptic density-95, PSD95)(1:2 000), 抗突触素(synaptophysin, SYP)(1:2 000), 抗核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)转录因子 P65(1:2 000, Abcam), 抗 NF- κ B 转录

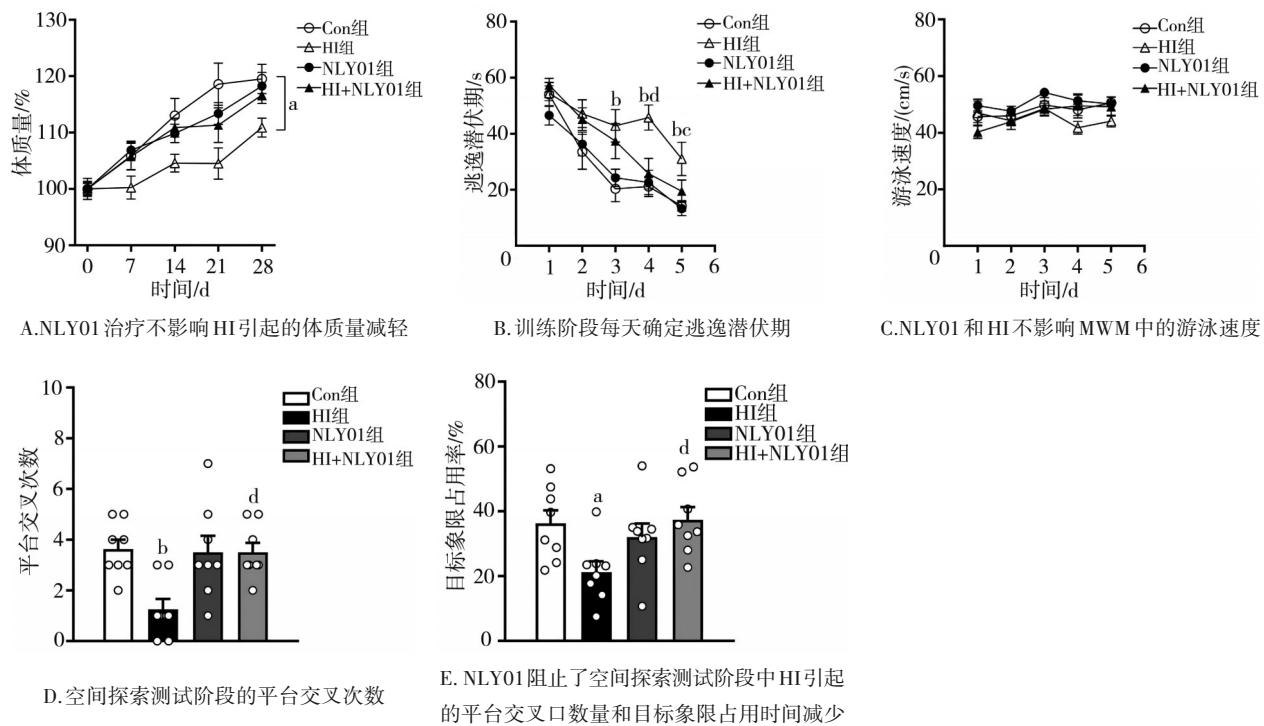
因子 P65(磷酸化 ser536)(1:2 000), 抗诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)(1:2 000), 抗环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX2)(1:2 000), 抗 TNF- α (1:2 000), 抗 IL-6(1:2 000) 和抗 β -肌动蛋白(1:5 000)(均购自英国 Abcam 公司)。然后将膜与辣根过氧化物酶结合的二级抗体(1:4 000 稀释液; 美国 Promega 公司)在室温下孵育 2 h。使用增强化学发光检测试剂盒测量所有蛋白质, 使用 Image J 定量, 并与 β -肌动蛋白进行比较。所有数据均来自每组 5 只小鼠。

1.5 免疫荧光测定

小鼠通过腹腔内输注 30% 氨基甲酸乙酯溶液进行麻醉, 并用磷酸盐缓冲盐水($pH=7.4$)和 4% 多聚甲醛缓慢灌注。切除大脑并在 4% 多聚甲醛中固定 72 h。使用振动刀将大脑连续切片为 30 μm 冠状切片。切片用 Triton X-100 渗透, 并用 10% 山羊血清封闭。使用原代多克隆兔抗离子钙结合适配器分子-1(Iba-1)(1:500, 日本 WAKO 公司)和小鼠抗 CD86(1:500, 英国 Abcam 公司)进行 Iba-1 和 CD86 免疫荧光分析。然后荧光共轭山羊抗兔 IgG Alexa-Fluor 647 共轭物和抗小鼠 IgG Alexa-Fluor 488 共轭物(1:2 000, 美国 Thermo Fisher Scientific)。使用 TCSSP5 共焦扫描显微镜(德国 Leica 公司)获取荧光图像。

1.6 统计学处理

使用 SPSS 19.0 进行统计分析。使用三元混合 ANOVA 分析小鼠体质量 MWM 逃逸潜伏期。所有数据均以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。通过双向 ANOVA 分析从电生理测试、高尔基染色和蛋白质印迹获得数据。当相互作用效应显著时, 进行 Bonferroni 事后比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。



注: a: 与 Con 组相比, $P < 0.05$; b: 与 Con 组相比, $P < 0.01$; c: 与 HI 组相比, $P < 0.05$; d: 与 HI 组相比, $P < 0.01$

2 结 果

2.1 NLY01 改善 HI 引起的认知障碍

进行体质量测量、MWM 测试以评估 HI 和 NLY01 对空间学习记忆的影响。三因素混合方差分析表明, HI [$F=5.147, P<0.05$] 和时间 [$F=88.231, P<0.01$] 对体质量有明显影响。NLY01 没有主要作用, HI、NLY01 和时间之间也没有交互作用。事后分析表明, 与对照组相比, HI 组小鼠体质量增长显著减缓($P<0.05$, 图 1A)。在 MWM 中, 三因素混合方差分析显示, HI [$F=14.621, P<0.01$]、时间 [$F=53.965, P<0.01$] 具有显著影响, HI \times NLY01 \times 时间 [$F=2.803, P<0.05$] 具有明显交互作用。NLY01 或其他相互作用均无显著影响。事后分析显示, 与对照组相比, HI 组在第 3~5 天的逃逸潜伏期更高($P<0.01$), NLY01 在第 4 天和第 5 天明显阻止了 HI 诱导的逃逸潜伏期增加(第 4 天 $P<0.01$, 第 5 天 $P<0.05$, 图 1B)。此外, 4 组之间的游泳速度无统计学差异($P>0.05$, 图 1C)。双向 ANOVA 分析表明, HI 和 NLY01 [$F=6.402, P<0.05$; $F=5.119, P<0.05$] 具有明显影响, HI \times NLY01 [$F=6.411, P<0.05$] 在初始训练阶段和空间探索测试阶段对平台交叉具有明显交互作用。HI \times NLY01 [$F=6.926, P<0.05$] 之间存在明显交互作用, 且在这 2 个阶段, HI 和 NLY01 [$F=1.566, P>0.05$; $F=2.413, P>0.05$] 之间未检测到统计学效应。事后分析表明, 与对照组相比, HI 组的平台交叉较低($P<0.01$), 目标象限的花费时间较少($P<0.05$), NLY01 阻止了 HI 导致的平台交叉次数减少($P<0.01$), 目标象限占用率减少($P<0.01$, 图 1D、E)。

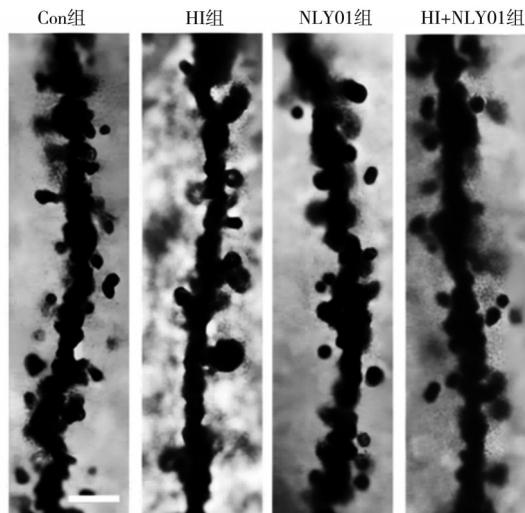
图 1 NLY01 改善 HI 引起的认知障碍

2.2 NLY01 改善 HI 诱导的突触可塑性损伤

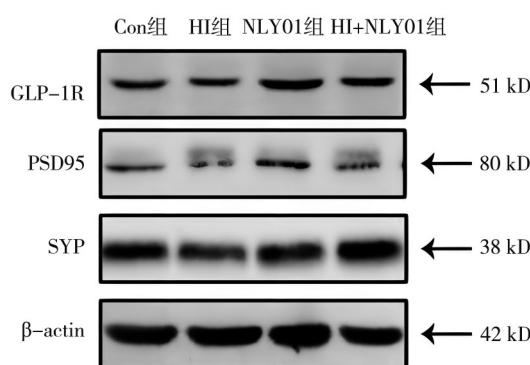
在高尔基染色试验中, 双向 ANOVA 显示 HI 和 NLY01 [$F=38.584, P<0.01$; $F=20.889, P<0.01$] 对 DG 区域的突触密度有显著影响, 并且 HI × NLY01 相互作用 [$F=17.296, P<0.01$]。事后分析表明, HI 显著减少树突棘的数量 ($P<0.01$), NLY01 显著阻止 HI 诱导的树突棘数量减少 ($P<0.01$, 图 2A、B)。在图 2C、D 中, 双向方差分析表明, HI 对 GLP-1R [$F=13.577, P<0.01$]、PSD95 [$F=7.768, P<0.05$] 和 SYP [$F=8.117, P<0.05$] 的蛋白含量有主要影响。NLY01 主要影响 GLP-1R [$F=6.303, P<0.05$]、PSD95 [$F=7.658, P<0.05$] 和 SYP [$F=5.522, P<0.05$] 的蛋白含量。在 GLP-1R、PSD95 和 SYP 的蛋白含量方面, HI 和 NLY01 之间没有显著的相互作用。事后分析表明, 与对照组相比, HI 暴露显著降低 GLP-1R、SYP 和 PSD95 的水平 ($P<0.01$), NLY01 治疗显著阻止 HI 诱导的突触蛋白水平下降 ($P<0.05$)。

2.3 NLY01 抑制 HI 诱导的小胶质细胞 M1 极化和炎症反应

HI 增加小胶质细胞的数量, 并促进小胶质细胞的激活, 其特征是观察到的肥大阿米巴状突起缩短和增厚。此外, 在 HI 暴露后, 小胶质细胞中 CD86 表达上调。与 HI 组相比, HI+NLY01 组的小胶质细胞拉长, 并显示分枝状突起, CD86 表达较低(图 3A)。研究评估海马中 P65 和 P-P65(Ser536) 的蛋白含量。双向 ANOVA 分析表明, HI 和 NLY01 [$F=19.703, P<0.01$; $F=7.671, P<0.05$] 显著影响 P-P65(Ser536) 的蛋白含量, HI 和 NLY01 [$F=6.122, P<0.05$] 之间存在显著交互作用。事后分析表明, 与对照组相比, HI 暴露明显促进了 P65 的磷酸化 ($P<0.01$), 而 NLY01 有效阻止了 HI 诱导的 P-P65/P65 蛋白含量的增加 ($P<0.01$, 图 3B、C)。此外, 还测定了 NF-κB 相关炎症介质的蛋白含量。双向 ANOVA 分析表明, HI 对 iNOS [$F=4.873, P<0.05$]、COX2 [$F=14.101, P<0.01$]、TNF-α [$F=18.850, P<0.01$] 和 IL-6 [$F=30.571, P<0.01$] 的蛋白含量有主要

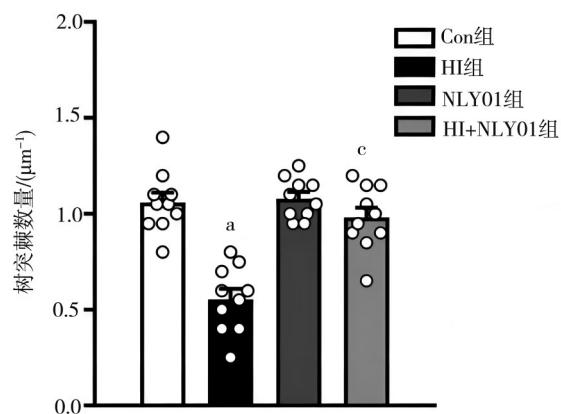


A. 四组树突棘的代表图(比例尺为 2 μm)

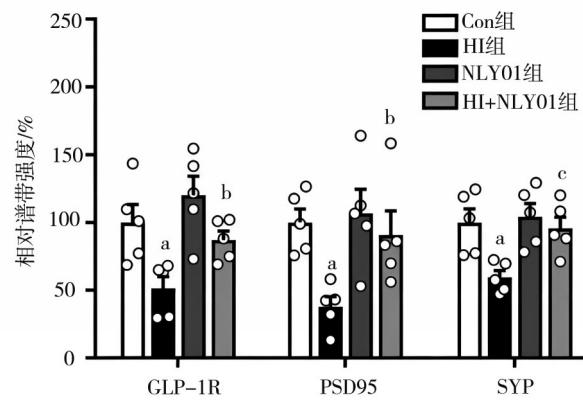


C. 从 GLP-1R、PSD95 和 SYP 的实验中获得的代表性结果

注:a, 与 Con 组相比, $P<0.01$; b: 与 HI 组相比, $P<0.05$; c: 与 HI 组相比, $P<0.01$



B. NLY01 在高尔基染色中防止 HI 引起的脊柱密度损害
(分析了每组 3 只小鼠的 10 个树突棘)



D. NLY01 阻止和 HI 诱导的 GLP-1R、PSD95 和 SYP 蛋白表达降低

图 2 GLP-1R 激动剂 NLY01 减轻 HI 诱导的突触可塑性损伤和 GLP-1R 表达的降低

影响。NLY01 主要影响 iNOS [$F=8.776, P<0.01$]、COX2 [$F=9.341, P<0.01$]、TNF- α [$F=5.835, P<0.05$] 和 IL-6 [$F=9.667, P<0.01$] 的蛋白含量。HI 和 NLY01 在 COX2 [$F=9.085, P<0.01$]、TNF- α [$F=10.031, P<0.01$] 和 IL-6 [$F=10.893, P<0.01$] 的蛋白含量上存在明显的交互作用。事后分析表明,与对照组相比,HI 组显著增加了 iNOS、COX2、TNF- α 和 IL-6 的水平 ($P<0.01$), NLY01 治疗阻止了炎症标记物水平的升高 ($P<0.01$, 图 3B,C)。

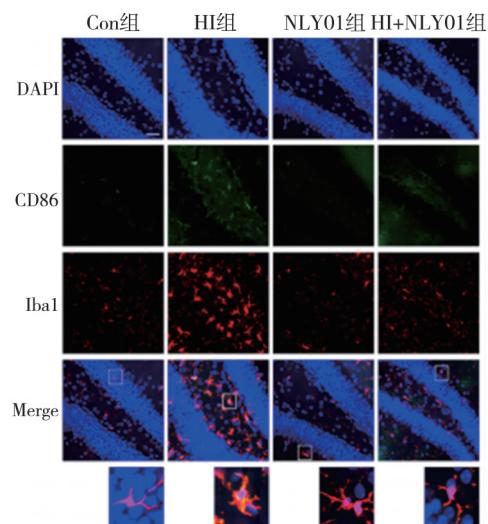
2.4 GLP-1R 拮抗剂 Ex9-39 在 HI 模型中阻断 NLY01 的作用

为了进一步证实 NLY01 的神经保护作用是通过激活 GLP-1R 产生的,研究在 HI 模型中使用了 GLP-1R 拮抗剂 Ex9-39。Ex9-39 在行为测试中明显阻断了神经保护作用 (图 4A~D, $P<0.01$)。此外,在 HI+NLY01 组中,Ex9-39 降低了 GLP-1R、PSD95 和 SYP 水平,增加了炎症标记物的水平 (图 4E,F)。

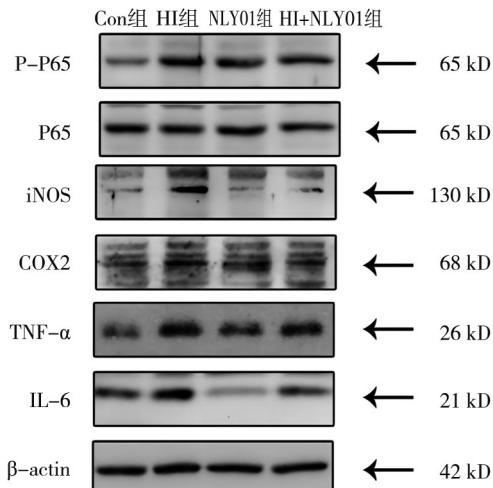
3 讨 论

本研究在 HI 诱导的新生小鼠急性脑损伤模型中评估了 GLP-1R 激动剂 NLY01 的神经保护作用,结果发现 NLY01 激活 GLP-1R 改善了学习记忆和突触可塑性损伤。此外,NLY01 有效抑制炎症途径的激活和小胶质细胞 M1 极化。

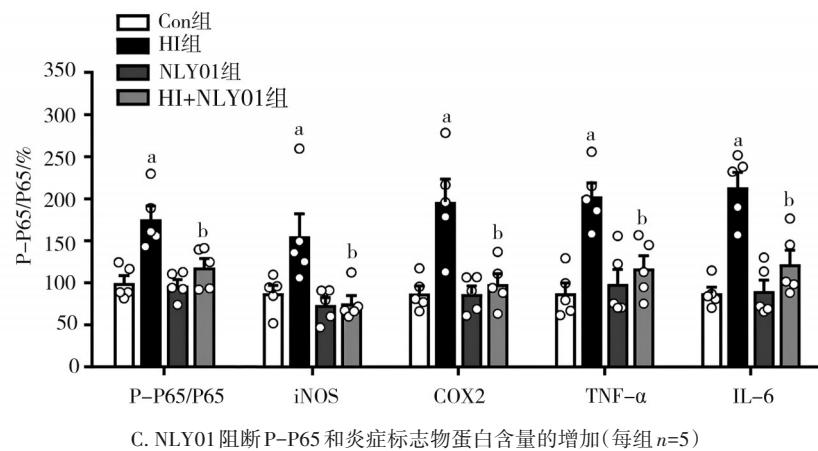
HI 诱导的新生小鼠急性脑损伤是一种高度异质性的疾病,其特征是行为症状多样^[14]。本研究探讨了 NLY01 在改善空间记忆缺陷方面的作用。结果显示,NLY01 对 HI 诱导的新生小鼠的记忆障碍有明显的缓解作用,表明 NLY01 激活 GLP-1R 可以改善 HI 引起的记忆损伤。突触可塑性是学习和记忆的分子基础,在 HI 引起的神经损伤中起直接作



A. 海马中 Iba1/CD86 染色的代表性显微照片(比例尺为 50 μm)



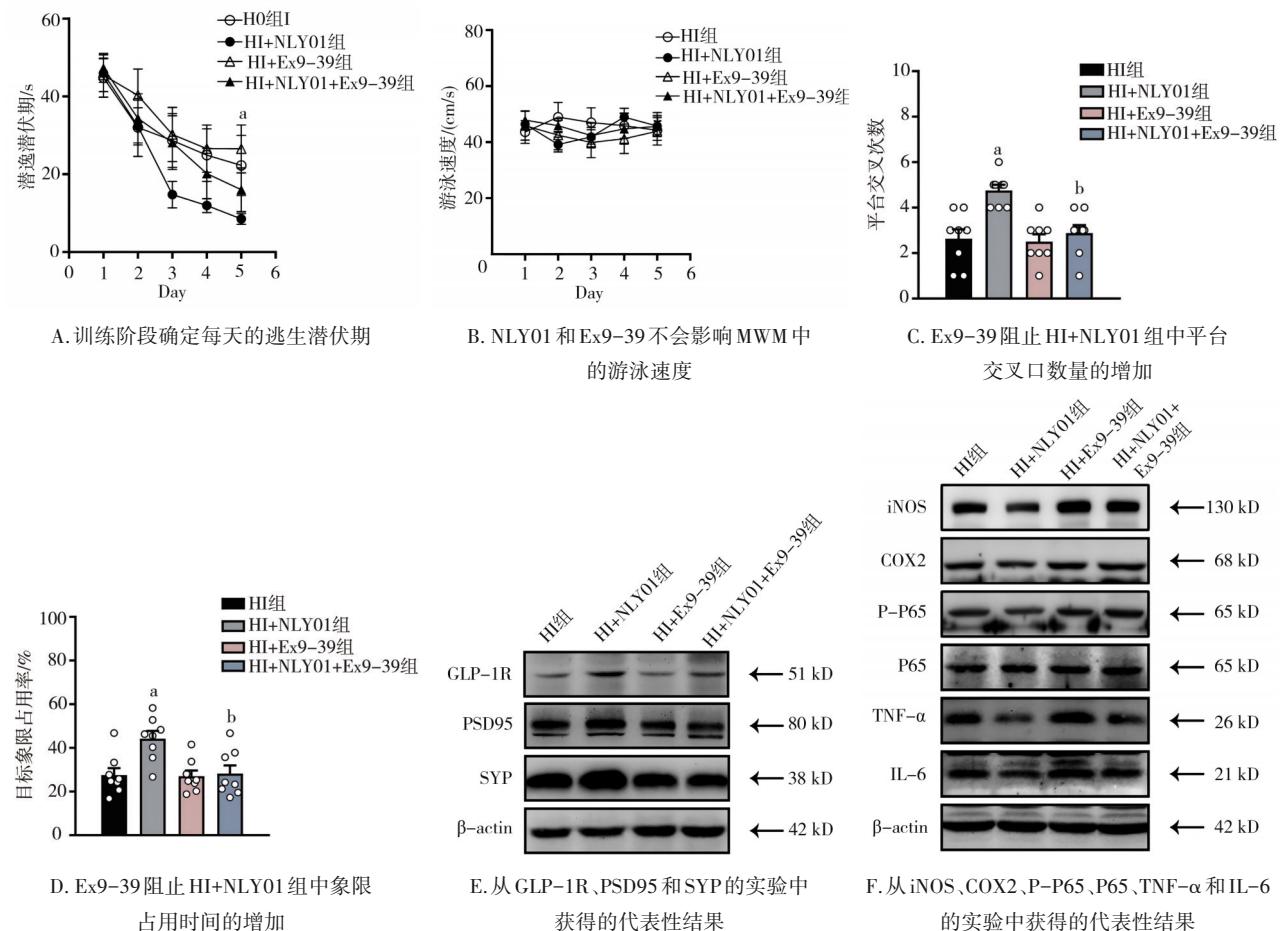
B. 从 P65、P-P65、iNOS、COX2、TNF- α 和 IL-6 的实验中获得的代表性结果



C. NLY01 阻断 P-P65 和炎症标志物蛋白含量的增加(每组 $n=5$)

注:a,与 Con 组相比, $P < 0.01$; b:与 HI 组相比, $P < 0.01$

图 3 GLP-1R 激动剂 NLY01 可防止 HI 诱导的小胶质细胞 M1 极化和海马中炎症标志物免疫含量的增加



注: a:与 HI 组相比, $P < 0.01$; b:与 HI+NLY01 组相比, $P < 0.01$

图 4 GLP-1R 拮抗剂 Ex9-39 在 HI 模型中阻断了 NLY01 的影响

用^[15]。与本研究的行为研究结果类似, NLY01 改善了 HI 诱导的突触可塑性损伤。

尽管 NLY01 是一种特异性 GLP-1R 激动剂, 但它还有其他非靶向药理作用^[7]。为了进一步证实 GLP-1R 在 NLY01 治疗新生小鼠的急性脑损伤中的作用, 在 HI 模型中使用了 GLP-1R 特异性拮抗剂 Ex9-39。通过脑室注射给予 Ex9-39, 能够更好地评估中枢 GLP-1R 的神经保护作用。Ex9-39 在行为测试中显著阻断了 NLY01 的作用, 表明 NLY01 的神经保护作用与中枢 GLP-1R 有关。

大脑中炎症反应的激活是 HI 发病机制中的关键步骤。炎症因子的上调和小胶质细胞的激活会导致突触可塑性和神经发生受损, 从而导致 HI 的病理生理学^[16]。本研究检验了由 HI 诱导的 GLP-1R 受损作用可能导致海马炎症反应的假设。结果显示, HI 模型的磷酸化 P65(Ser-536) 水平和小胶质细

胞数量均显著增加。NF- κ B 是调节炎症基因表达的关键转录因子, NF- κ B 的过度激活会促进 IL-6 和 TNF- α 等促炎因子的释放^[17]。通过基因调控或药物干预减少促炎因子的表达可以显著改善新生小鼠的急性脑损伤行为。NF- κ B 的激活还诱导炎症介质的表达, 例如 iNOS 和 COX2, 它们是炎症细胞因子产生的关键酶^[18]。值得注意的是, NLY01 阻止了 NF- κ B 及其下游途径的激活, 这可能与 GLP-1R 的恢复水平有关。NF- κ B 的抑制可能是使用 NLY01 改善新生小鼠急性脑损伤行为受损的潜在机制。

众所周知, 小胶质细胞在 CNS 中发挥免疫作用, 是 CNS 健康发育和维持所必需的。小胶质细胞是突触可塑性的关键调节因子, 在生理条件下在塑造和维持突触网络方面发挥重要作用^[13]。M1 极化小胶质细胞破坏抗氧化剂/氧化剂平衡以促进活性

氧的产生,从而导致氧化应激^[19]。高水平的活性氧会导致四氢生物蝶呤氧化并破坏多巴胺、去甲肾上腺素和血清素的合成^[20]。此外,氧化应激会降低突触相关蛋白的表达并损害突触功能。抑制 NF-κB 磷酸化可有效抑制小胶质细胞活化。免疫荧光结果表明,NLY01 抑制 HI 诱导的小胶质细胞 M1 极化。Ex9-39 对 GLP-1R 功能的抑制阻断了 NLY01 的抗炎和小胶质细胞抑制作用。

本研究中,NLY01 作为一种特异性 GLP-1R 激动剂,可以改善由 HI 引起的认知障碍。NLY01 通过抑制炎症反应和小胶质细胞激活,改善了海马突触可塑性的损伤。NF-κB 信号通路可能在 NLY01 神经保护作用中发挥重要作用。这些结果表明,GLP-1R 可能是调节新生小鼠急性脑损伤炎症途径的功能靶点,支持 GLP-1R 激动剂在 HI 诱导新生小鼠脑损伤中的潜在治疗作用。

参 考 文 献

- [1] Huang R, Xu Y, Lu X, et al. Melatonin protects inner retinal neurons of newborn mice after hypoxia-ischemia[J]. J Pineal Res, 2021, 71(1):e12716.
- [2] Liu DX, Bai XM, Ma WW, et al. Purmorphamine attenuates neuroinflammation and synaptic impairments after hypoxic-ischemic injury in neonatal mice via Shh signaling[J]. Front Pharmacol, 2020, 11:204.
- [3] Chen XH, Chen DT, 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]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021:6643171.
- [4] Yaribeygi H, Ashrafizadeh M, Henney NC, et al. Neuromodulatory effects of anti-diabetes medications: a mechanistic review[J]. Pharmacol Res, 2020, 152:104611.
- [5] Yang XY, Feng P, Ji R, et al. Therapeutic application of GLP-1 and GIP receptor agonists in Parkinson's disease[J]. Expert Opin Ther Targets, 2022, 26(5):445-460.
- [6] Jackson TC, Herrmann JR, Garman RH, et al. Hypoxia-ischemia-mediated effects on neurodevelopmentally regulated cold-shock proteins in neonatal mice under strict temperature control[J]. Pediatr Res, 2022[Epub ahead of print]. DOI: 10.1038/s41390-022-01990-4.
- [7] Sterling JK, Adetunji MO, Guttha S, et al. GLP-1 receptor agonist NLY01 reduces retinal inflammation and neuron death secondary to ocular hypertension[J]. Cell Rep, 2020, 33(5):108271.
- [8] Heiss CN, Mannerås-Holm L, Lee YS, et al. The gut microbiota regulates hypothalamic inflammation and leptin sensitivity in Western diet-fed mice via a GLP-1R-dependent mechanism[J]. Cell Rep, 2021, 35(8):109163.
- [9] Zhang LJ, Tang MM, Xie XF, et al. Ginsenoside Rb1 induces pro-neurogenic microglial phenotype via PPARγ activation in male mice exposed to chronic mild stress[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1):171.
- [10] Zhang K, Yang C, Chang LJ, et al. Essential role of microglial transforming growth factor-β1 in antidepressant actions of (R)-ketamine and the novel antidepressant TGF-β1[J]. Transl Psychiatry, 2020, 10(1):32.
- [11] Bruszt N, Bali ZK, Tadepalli SA, et al. Potentiation of cognitive enhancer effects of Alzheimer's disease medication memantine by alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PHA-543613 in the Morris water maze task[J]. Psychopharmacology, 2021, 238(11):3273-3281.
- [12] Liang R, Wang L, Sun SF, et al. Medial prefrontal cortex and hippocampus in mice differently affected by simulate microgravity and social isolation associated with the alternation of emotional and cognitive functions[J]. Life Sci Space Res, 2022, 33:21-32.
- [13] Zhang JW, Tabassum S, Jiang JX, et al. Optimized Golgi-cox staining validated in the *Hippocampus* of spared nerve injury mouse model[J]. Front Neuroanat, 2020, 14:585513.
- [14] Fleiss B, Van Steenwinckel J, Bokobza C, et al. Microglia-mediated neurodegeneration in perinatal brain injuries[J]. Biomolecules, 2021, 11(1):99.
- [15] Díaz-Alonso J, Morishita W, Incontro S, et al. Long-term potentiation is independent of the C-tail of the GluA1 AMPA receptor subunit [J]. eLife, 2020, 9:e58042.
- [16] Zinni M, Pansiot J, Léger PL, et al. Sildenafil-mediated neuroprotection from adult to neonatal brain injury: evidence, mechanisms, and future translation[J]. Cells, 2021, 10(10):2766.
- [17] Le K, Song ZP, Deng J, et al. Quercetin alleviates neonatal hypoxic-ischemic brain injury by inhibiting microglia-derived oxidative stress and TLR4-mediated inflammation[J]. Inflamm Res, 2020, 69(12):1201-1213.
- [18] Tang R, Lin YM, Liu HX, et al. Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid in rat traumatic brain injury model via regulation of TLR4/NF-κB signaling pathway[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2018, 99:64-71.
- [19] Guo YX, Gan XH, Zhou HF, et al. Fingolimod suppressed the chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors via affecting microglial and NLRP3 inflammasome activation[J]. Life Sci, 2020, 263:118582.
- [20] van den Ameele S, Fuchs D, Coppens V, et al. Markers of inflammation and monoamine metabolism indicate accelerated aging in bipolar disorder[J]. Front Psychiatry, 2018, 9:250.

(责任编辑:周一青)