

葡萄籽原花青素通过恢复线粒体功能改善早产儿脑白质损伤模型小鼠低髓鞘化的研究

王妮娜, 王俊燕, 王 银*

宁夏医科大学基础医学院, 宁夏 银川

收稿日期: 2026年1月5日; 录用日期: 2026年2月25日; 发布日期: 2026年3月10日

摘要

目的: 本研究旨在探究葡萄籽原花青素(GSPE)对早产儿白质脑损伤(PWMI)模型小鼠的保护作用, 并阐明其潜在机制。材料与方法: 手术结扎P9日龄c57小鼠右侧颈动脉, 于8%低氧环境中并腹腔注射细菌脂多糖(LPS), 构建PWMI模型。在PWMI造模后立即口服GSPE (20 mg/Kg)连续5天, 至P14日龄。取材观察小鼠脑损伤情况, 统计并计算小鼠存活率。通过透射电镜(TEM)、Western blot及qPCR评价髓鞘损伤情况。对三组(假手术组、PWMI组、PWMI + GSPE组)小鼠右侧脑皮质进行RNA测序, 通过KEGG富集分析差异表达基因(DEGs)。采用qPCR对差异表达基因进行验证。结果: PWMI模型小鼠出现显著脑损伤且存活率较低。GSPE干预显著提高PWMI模型小鼠存活率并减轻髓鞘损伤。RNA测序分析显示各组间存在显著差异基因表达: PWMI组和sham组相比, 差异基因富集于炎症、缺血-缺氧信号通路、鞘脂信号通路、线粒体功能相关信号通路; GSPE干预组与PWMI组相比, 上调基因与鞘脂合成和线粒体稳态相关, 下调基因与凋亡和炎症相关。结论: GSPE通过改善线粒体功能从而改善缺氧缺血合并炎症所致的早产儿白质脑损伤。这些发现证实了GSPE在髓鞘保护中的潜在作用, 并提示GSPE可能成为PWMI的潜在治疗策略。

关键词

早产儿脑白质损伤, 葡萄籽原花青素, 线粒体

Grape Seed Proanthocyanidin Extracts Improve Hypomyelination by Restoring Mitochondrial Function in a Mouse Model of Premature White Matter Injury

Nina Wang, Junyan Wang, Yin Wang*

Basic Medical College of Ningxia Medical University, Yinchuan Ningxia

*通讯作者。

文章引用: 王妮娜, 王俊燕, 王银. 葡萄籽原花青素通过恢复线粒体功能改善早产儿脑白质损伤模型小鼠低髓鞘化的研究[J]. 生物医学, 2026, 16(2): 214-226. DOI: 10.12677/hjbm.2026.162023

Abstract

Objective: To investigate the protective effect of grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) on white matter brain injury (PWMI) in preterm mice and the underlying mechanism. **Materials and methods:** PWMI model was established by surgical ligation of the right carotid artery in P9-day-old c57 mice, which were subsequently exposed to 8% hypoxia and intraperitoneally injected with bacterial lipopolysaccharide (LPS). GSPE (20 mg/Kg) was administered orally for 5 consecutive days immediately after modeling until P14 days of age. The brain injury of mice was observed, and the survival rate of mice was counted and calculated. Transmission electron microscopy (TEM), Western blot and qPCR were used to evaluate myelin sheath injury. RNA sequencing was performed on the right cerebral cortex of the three groups of mice (sham operation group, PWMI group, PWMI + GSPE group), and the differentially expressed genes (DEGs) were analyzed by KEGG enrichment. qPCR was used to verify the differentially expressed genes. **Results:** PWMI mice showed significant brain damage and poor survival rate. GSPE intervention significantly improved the survival rate of PWMI mice and alleviated myelin sheath injury. RNA sequencing analysis showed that there were significant differentially expressed genes among all groups. Compared with the sham group, the differentially expressed genes in the PWMI group were enriched in inflammation, ischemia-hypoxia signaling pathway, sphingolipid signaling pathway, and mitochondrial function-related signaling pathway. The up-regulated genes were related to sphingolipid synthesis and mitochondrial homeostasis and the down-regulated genes were related to apoptosis and inflammation in the GSPE intervention group compared with the PWMI group. **Conclusions:** GSPE can improve mitochondrial function in preterm infants with white matter brain damage caused by hypoxic-ischemia and inflammation. These findings confirm the potential role of GSPE in myelin protection and suggest that GSPE may be a potential therapeutic strategy for PWMI.

Keywords

Premature White Matter Injury, Grape Seed Proanthocyanidin Extracts, Mitochondria

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

早产儿脑白质损伤(preterm white matter injury, PWMI)的主要神经病理学改变是脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)和神经元/轴突损伤[1]。截至目前尚无有效的防治办法,因此改善PWMI的低髓鞘化对其有效防治将具有重要意义。少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cell, OPC)在成人中枢神经系统中作为迁移和增殖的祖细胞存在,在多发硬化和中风等疾病中,分化为成熟的OL对受损的轴突进行再髓鞘化[2]。然而,OPC和OL都容易受到细胞毒性和兴奋性毒性因素的影响,在体内,如何诱导OPC分化并使受损的轴突再髓鞘化一直是一个难以克服的科学问题[3]-[5]。因此,抑制OPC细胞死亡,维持OPC池的稳定是髓磷脂修复的前提。研究表明生理性缺氧诱导因子 α (hypoxia-inducible factor α , HIF α)可短暂调节OPC分化,而持续性HIF α 激活则使OPC分化受阻[6]。因此,提高OPC的内在易损性势必与改善其线粒体功能密切相关。

据报道,葡萄籽原花青素(grape seed proanthocyanidin extract, GSPE)可抵抗氧化应激并促进DNA修

复[7]。多项研究表明, GSPE 还可以通过改善胰岛素抵抗或脂质代谢等方式影响代谢[8][9]。此外, GSPE 显示出强大的 AOX 活性, 有效降低细胞自由基水平[10]-[12]。临床实验证实, 使用 GSPE 可维持血管弹性和正常血压[13]。GSPE 可以通过抑制神经元氧化损伤、改善线粒体功能障碍和认知障碍对神经元起保护作用[14]。也有研究表明, GSPE 可改善高血糖引起的神经细胞凋亡, 也可通过抑制氧化应激来改善链脲佐菌素诱导的认知和突触可塑性缺陷[15]。研究证实, GSPE 可显著提高大鼠肝脏内的抗氧化酶活性[16]。本项目将利用分子生物学、形态学、转录组高通量测序等技术, 建立 PWMI 动物模型, 研究 GSPE 对 PWMI 的影响, 为治疗髓鞘相关疾病的治疗提供重要的理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠由宁夏医科大学实验动物中心饲养繁殖, 小鼠出生后进行适应性喂养(恒温: $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 光照 12 h/黑暗 12 h, 平均照度 80lx)。于出生后第九天(P9)进行模型制作。实验方案经宁夏医科大学实验动物中心动物伦理和使用机构委员会批准(伦理编号: 2022-N171)。

2.2. PWMI 模型制作和实验设计

60 只 SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 在出生后第 9 天(P9)被随机分为 3 个实验组(每组 20 只): sham 组、PWMI 组和 PWMI + GSPE 组。PWMI 组小鼠经 1%异氟烷麻醉后手术结扎右侧颈总动脉。缝合皮肤后, 将小鼠置于保温垫上直至完全清醒, 之后置于缺氧箱(8% O_2 + 92% N_2)中 80 min, 最后腹腔注射 15 μL LPS (1 mg/kg) [17]。假手术组仅于术中分离右侧颈总动脉, 腹腔注射等量生理盐水。PWMI + GSPE 组小鼠在建立 PWMI 模型后至 P14 每日给予 GSPE 灌胃[18]。在 P14 日取脑组织进行后续实验。

2.3. 形态学分析

在 P14 日龄小鼠通过二氧化碳吸入法处死后取其脑组织。随后将脑组织浸入 Bouin 固定液中固定 24 h, 再置于 70%乙醇中浸泡 1 天。经酒精脱水后, 将固定好的脑组织包埋于石蜡中, 切成 5 μm 切片, 然后进行苏木精 - 伊红(HE)染色和尼氏(Nissl)染色。使用显微镜观察右侧皮质区域的形态学改变。

2.4. 透射电镜

在小鼠胼胝体区取 2~3 块组织; 2%戊二醛 4°C 固定 2 h, 0.1M 磷酸缓冲液漂洗 3 次; 1%锇酸 2 h, 0.1M 磷酸缓冲液漂洗 15 min \times 3 次; 接着进行梯度酒精脱水, 环氧丙烷渗透 15 min \times 2 次; 使用不完全包埋剂与环氧丙烷等体积混合液进行室温渗透 1 h; 而后将样品置于包埋剂中 35°C 6 h, 转移至包埋板 42°C 过夜、 60°C 48 h; 切片后先后使用 4%醋酸铀染色 20 min, 枸橼酸铅染色 5 min。于透射电镜下观察拍照。

2.5. qPCR

分离小鼠大脑右侧皮质区并提取总 RNA。使用 RNA PCR 试剂盒(ABclonal), 以 1000 ng RNA 为模板在 10 μL 反应体系中生成 cDNA。GAPDH 作为内参。引物序列见表 1。PCR 扩增条件如下: 95°C 预变性 30 sec, 随后进行 40 个循环(95°C 3 sec, 55°C 30 sec, 72°C 3 sec), 最后进行终末延伸: 95°C 1 min, 55°C 30 sec, 95°C 30 sec。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法测定基因的相对表达水平。

2.6. Western blot

从小鼠右侧大脑皮层中提取总蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜。用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭膜后, 分别用针对 Olig2 (Abcam, ab109186, 1:5000)、NG2 (Abcam, ab129051, 1:2000)、 β -actin

(Proteintech, 66009-1-Ig, 1:5000)的一抗在 4℃下孵育过夜。随后用 1×TBST 洗涤膜 3 次, 每次 5 min。接着, 在室温下用山羊抗兔 IgG (Proteintech, SA00001-2, 1:5000)和山羊抗小鼠 IgG (Proteintech, SA00001-2, 1:5000)二抗孵育 2 h, 再用 1×TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。通过增强化学发光法显影。使用 Image J 软件对蛋白条带进行定量分析。

Table 1. qPCR primer sequences
表 1. qPCR 引物序列

基因名称	引物序列	产物长度
Olig2	F:TTACAGACCGAGCCAACACC R:TGGCCCCAGGGATGATCTAA	129 bp
NG2	F:GGCTTGTGCTGTTCTCACA R:CACAGACTCTGGACAGACGG	167 bp
Vat1	F:TGACTTCGGCAACCTGAGAC R:GCCGTTCCAAACACTGTCC	120 bp
Tpp1	F:CAGCATGGGACAGGACTCTT R:TCATGGCACGAAAGGGTCAA	181 bp
Vamp8	F:CGCCTACCTGGAGAAACCTG R:TGCCACGCTTCTCTCTTT	130 bp
Myoc	F:CAGCAGCGAGGAGGTAACAA R:CACTCCATACTGCCAGCGA	292 bp
Abcg1	F:GACGCACTGGTGTCTGTGTA R:GGTGACTGGGAAGGACTTGG	180 bp
Acot	F:CAGGACGACCACAACCTGGAA R:TGTACCTTTCCCAACCTCC	335 bp
Tnfrsf1a	F:GGCTCTGCTGATGGGGATAC R:CAGGTAGCGTTGGAAGTGGT	361 bp
Stom	F:TCTGACAAACGGCAGTCCAG R:CTCCTTGCAAAATGCGACCC	220 bp
Pdnp	F:TTGTGACCCAGGTACAGGA R:TGGCAAGCCATCTATTGGG	278 bp
Mgst1	F:TCCTGTTGGTGAAAAGTCCCAG R:TTATCCTCTGGAATGCGGTCG	221 bp

2.7. 转录组学测序

总 RNA 使用 TRIzol 试剂(Invitrogen)从右侧皮质样本中提取, 操作步骤遵循制造商说明。RNA 的纯度和定量使用 NanoDrop 2000 分光光度计(赛默飞世尔科技)测定, RNA 完整性则通过 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies)进行评估。随后, 使用 VAHTS Universal V6 RNA-seq 文库制备试剂盒构建 cDNA 文库。转录组测序与分析由上海欧易生物科技有限公司(中国上海)完成。差异表达基因基于倍数变化(FC) > 2 或 < 0.5 且 $p < 0.05$ 的标准被鉴定, 并使用京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库进行分析。

3. 结果

3.1. PWMI 模型的建立

为了探究 GSPE 对 PWMI 模型小鼠脑白质损伤的影响, 使用 P9 日龄小鼠建立模型, 之后立即灌胃 GSPE (20 mg/kg), sham 组及 PWMI 模型组口服等量纯水, 连续 5 天直至 P14 日取材, 然后对样本进行

形态及分子生物学检测(图 1(a))。通过 HE 染色(图 1(b))和 Nissl 染色(图 1(c))观察到 sham 组小鼠右侧脑组织结构完整, 结构清晰, 未见脑室扩大。而 PWMI 组小鼠右侧脑组织有明显损毁, 轮廓不清, 皮质塌陷, 海马受损, 脑室扩大。结果表明通过上述造模方式成功建立了 PWMI 模型小鼠, 并将用于后续实验。

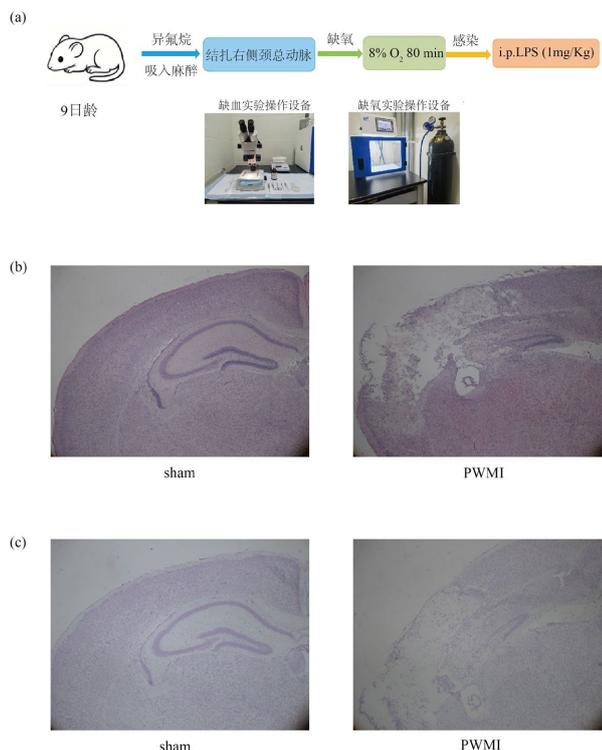


Figure 1. Establishment of the PWMI model. (a) Preparation process of the PWMI model; (b) Observation of the right brain tissue of mice by HE staining; (c) Observation of the right brain tissue of mice by Nissl staining

图 1. PWMI 模型的建立。(a) PWMI 模型制备过程; (b) HE 染色观察小鼠右侧脑组织; (c) Nissl 染色观察小鼠右侧脑组织

3.2. GSPE 可减轻 PWMI 模型小鼠脑损伤、提高存活率

肉眼观察 P14 日龄小鼠脑组织, sham 组小鼠脑组织完整无损伤, PWMI 组小鼠右侧大脑明显肿胀, 出现大面积病灶, 病灶部位脑组织软化, 而在 GSPE 干预后, 小鼠右侧脑组织病灶体积缩小, 肿胀较 PWMI 组减轻(图 2)。将 P9 日龄小鼠造模后连续统计 6 天(P9~P14)存活率(表 2)。PWMI 组小鼠手术后存活率较低, 从造模起至取材每日都有死亡小鼠, GSPE 干预后存活率有所提升, 死亡小鼠数量减少。

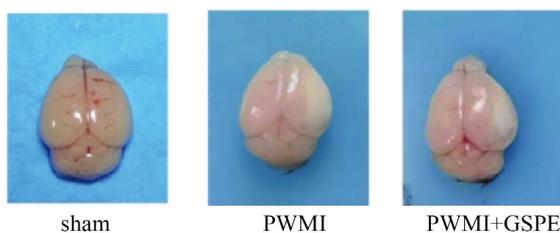


Figure 2. GSPE can alleviate brain injury in PWMI model mice

图 2. GSPE 可减轻 PWMI 模型小鼠脑损伤

Table 2. Statistics of survival rates of three groups of mice over 6 consecutive days (P9~P14)**表 2.** 三组小鼠连续 6 天(P9~P14)存活率统计

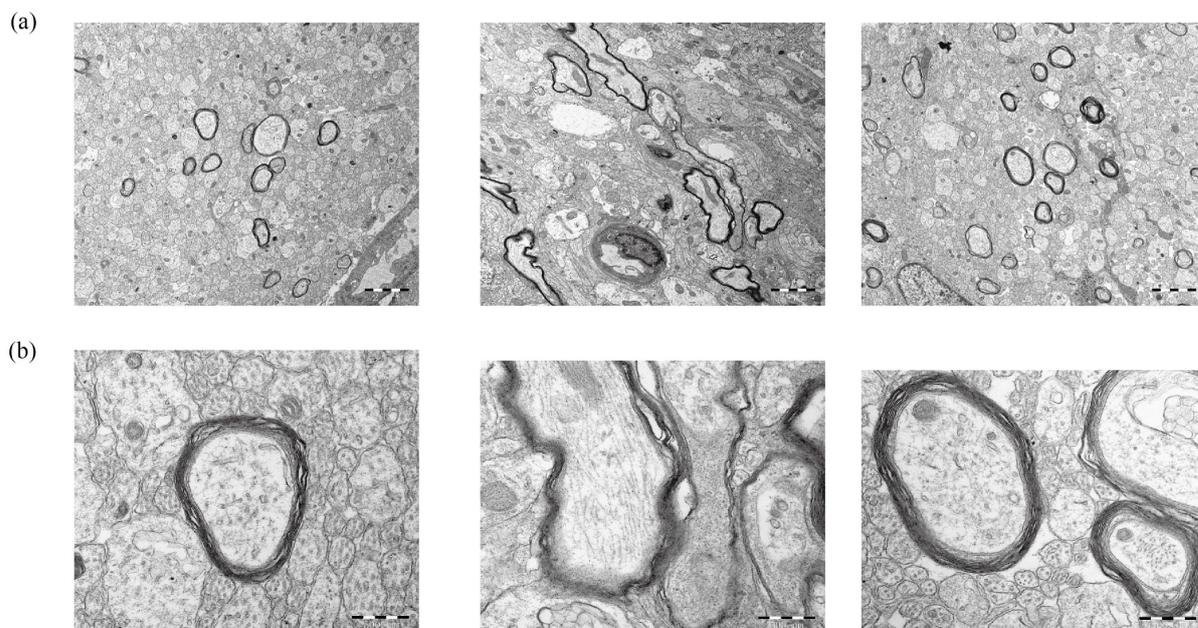
	Day 1 (P9)	Day 2 (P10)	Day 3 (P11)	Day 4 (P12)	Day 5 (P13)	Day 6 (P14)
sham	100%	95.38%	95.38%	90.27%	90.27%	86.73%
PWMI	68.42%	63.16%	58.95%	55.79%	54.74%	48.30%
PWMI + GSPE	95.79%	94.32%	89.60%	89.60%	86.22%	84.53%

3.3. GSPE 减轻 PWMI 模型小鼠脑髓鞘损伤，促进 OPC 增殖

为进一步探究 GSPE 对 PWMI 模型小鼠脑髓鞘的影响，取小鼠胼胝体区进行透射电镜观察，低倍镜下 sham 组小鼠胼胝体区髓鞘丰富，数量较多，高倍镜下可见髓鞘板层较厚且排列整齐清晰，髓鞘内可见线粒体和完整微管横断面。PWMI 组小鼠胼胝体区髓鞘数量较少，且髓鞘板层受损模糊溶解，髓鞘内未见完整微管横断面。GSPE 干预后小鼠的髓鞘形态明显改善，髓鞘板层结构增厚，形态规则，板层排列趋于正常，清晰完整，髓鞘内线粒体结构完整清晰(图 3(a), 图 3(b))。qPCR 结果显示，三组小鼠脑组织中少突全系标志物 Olig2 表达无明显差异(图 3(c))，而 OPC 标志物 NG2 表达却有明显变化。PWMI 组 NG2 都明显降低，而经 GSPE 干预后显著升高(图 3(d))。WB 结果显示，PWMI 组小鼠 Olig2 表达稍有升高，而 GSPE 干预后有所下降。NG2 的表达趋势与 qPCR 结果相一致(图 3(e)~(g))。以上结果表明，GSPE 可减轻 PWMI 模型小鼠的髓鞘损伤，促进 OPC 的增殖。

3.4. 转录组学探究 GSPE 对 PWMI 模型小鼠髓鞘的保护机制

三组样本间的差异表达基因的整体分布情况如火山图所示(图 4(a))，其中灰色为非显著性差异的基因，红色为显著性上调基因，蓝色为显著性下调基因；横轴为 $\log_2\text{FoldChange}$ ，纵轴为 $-\log_{10}q\text{-value}$ 。利用聚类热图展示基因分布的总体趋势。PWMI 组与 sham 组相比(图 4(b1))，有显著性差异的基因包括与髓鞘合成相关的基因 *Gm2446*，参与脂质代谢的 *Sirpb1c*，与 TNF- α 密切相关的 *MMP3*，参与坏死性凋亡的 *Fermt1*，在炎症反应中高表达 *Saa3*、*Itgax* 和 *Bcl2a1b*，说明 PWMI 模型小鼠确实发生髓鞘损伤，损伤的



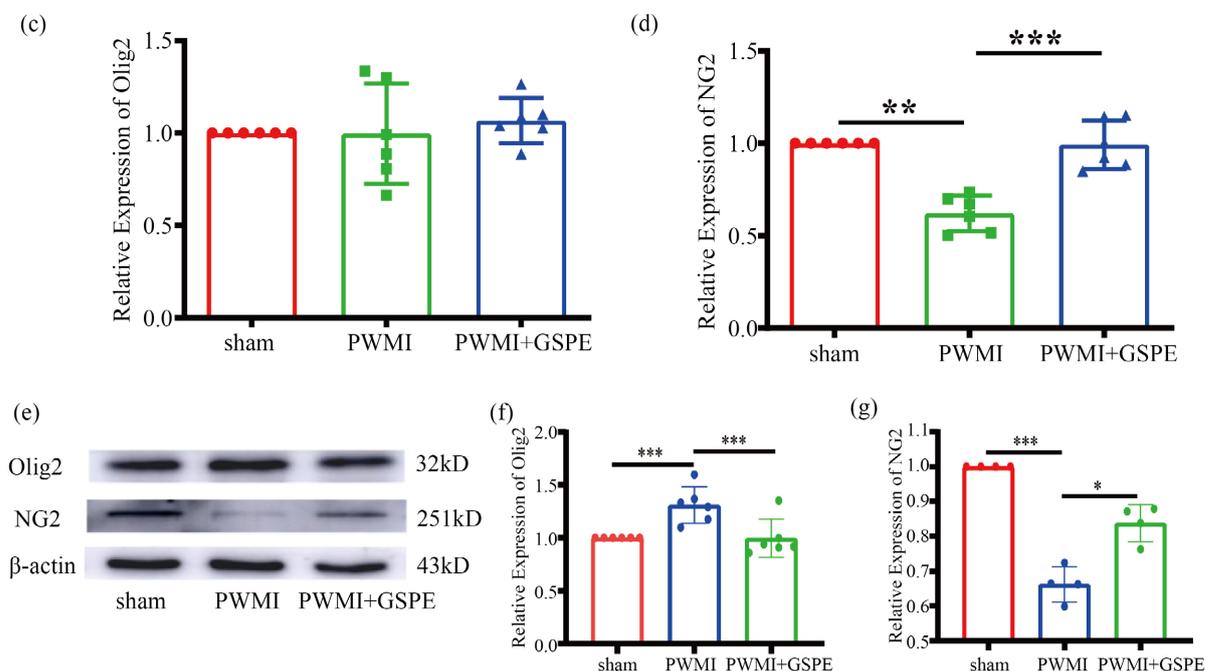
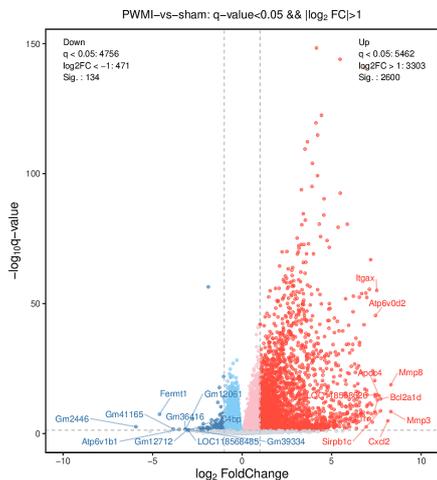


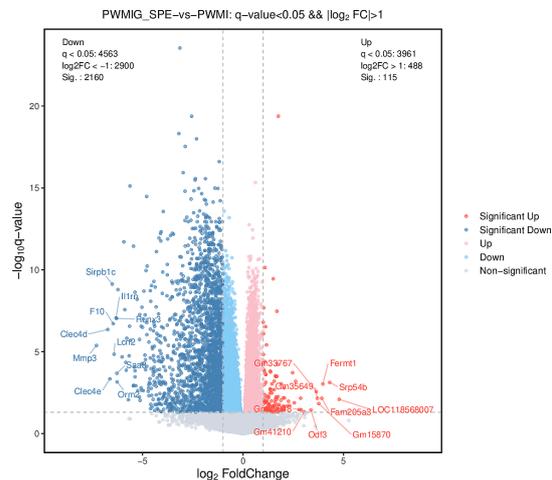
Figure 3. GSPE alleviates myelin damage in the brains of PWMI model mice and promotes OPC proliferation. (a), (b) Transmission electron microscopy was used to observe myelin morphology in the three groups of mice; (c), (d) qPCR was performed to detect the expression of Olig2 and NG2 genes in the right cerebral cortex of the three groups of mice; (e)~(g) Western Blot was used to detect the expression of Olig2 and NG2 proteins in the right cerebral cortex of the three groups of mice. All data are presented as mean \pm SD ($n = 5$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

图 3. GSPE 减轻 PWMI 模型小鼠脑髓鞘损伤, 促进 OPC 增殖。(a), (b) 透射电镜观察三组小鼠髓鞘形态; (c), (d) qPCR 检测三组小鼠右侧脑皮质中 Olig2、NG2 基因的表达; (e)~(g) Western Blot 检测三组小鼠右侧脑皮质中 Olig2、NG2 蛋白的表达。所有数据采用 mean \pm SD ($n = 5$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

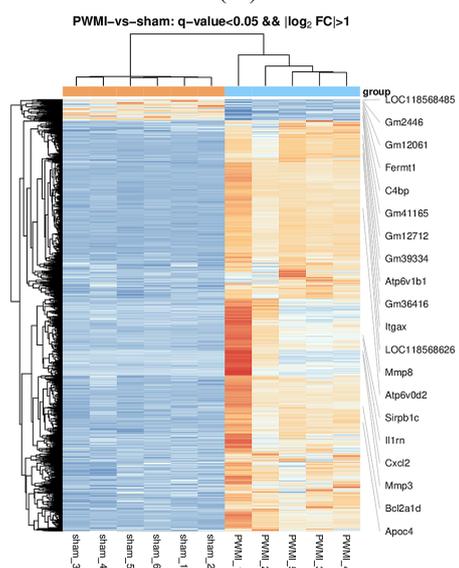
发生与炎症、坏死性凋亡和脂质代谢有关。经 GSPE 干预后, PWMI + GSPE 组与 PWMI 组相比(图 4(b2)), 差异表达基因包括与髓鞘合成相关的 *Orn2* 和 *Fam205a3*, 可抑制线粒体功能障碍 *Runx3*, 参与调节线粒体分裂-融合的 *Lcn2*。以上基因表达出现显著性差异证实 GSPE 的干预可对髓鞘发生保护作用, 并且可改善 PWMI 模型小鼠脑内线粒体功能受损。根据富集显著性挑选前 20 的通路即 KEGG 富集分析 Top20 气泡图。PWMI 组与 sham 组相比(图 4(c1))及 PWMI + GSPE 组与 PWMI 组相比富集通路主要集中与自噬相关的吞噬体; 与慢性炎症相关的 NF-kappa B 信号通路; 还包括了大量神经退行性疾病。而经 GSPE 干预后, 与 PWMI 组相比(图 4(c2)), 差异表达基因的主要富集通路也与吞噬体、炎症相关 TNF 信号通路、代谢及免疫密切相关。KEGG 富集通路在 Level2 的水平共包含 Cell growth and death (细胞生长和死亡)、Transcription (转录)、Development (生长发育)和 Amino acid metabolism (氨基酸代谢)等 44 个分类将上调差异表达基因及下调差异表达基因分布进行了比较(图 4(d1))。PWMI 组与 sham 组相比在信号转导方面有大量富集通路, 包括在髓鞘合成过程中发挥关键作用的鞘脂信号通路、自噬相关的 mTOR 信号通路、与缺血缺氧相关的 HIF-1 信号通路、参与细胞凋亡和炎症的 TNF 信号通路以 Wnt 信号通路。PWMI + GSPE 组与 PWMI 组相比(图 4(d2)), 差异表达基因主要富集的信号通路同样集中在髓鞘合成、自噬相关、细胞存活凋亡和炎症以及 Wnt 信号通路。以上结果证实缺血缺氧合并感染诱导的 PWMI 模型小鼠发生髓鞘损伤, 并且表明 PWMI 模型小鼠线粒体功能受损、自噬障碍。同时也证实 GSPE 改善 PWMI 模型小鼠髓鞘损伤和线粒体功能受损中的重要作用。



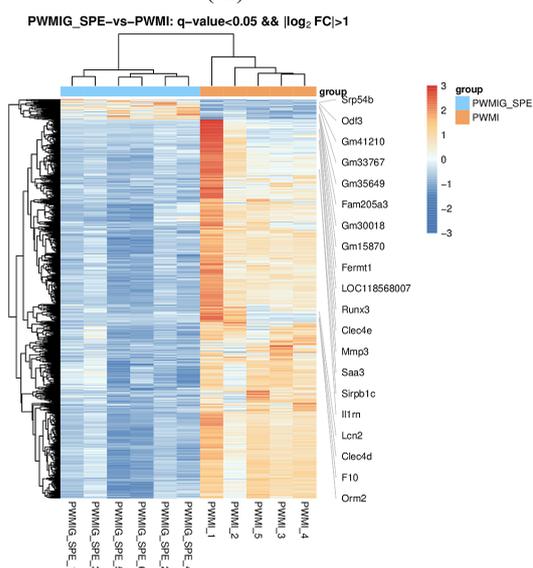
(a1)



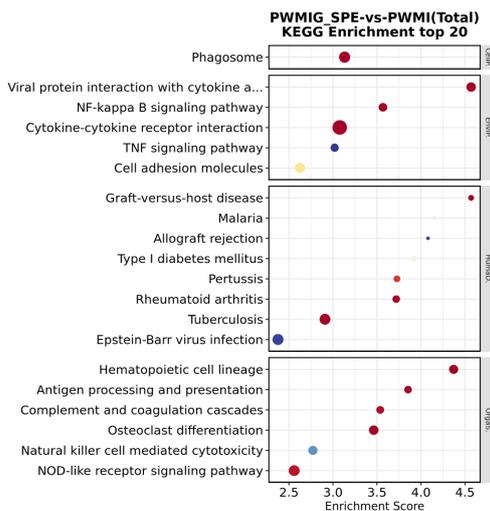
(a2)



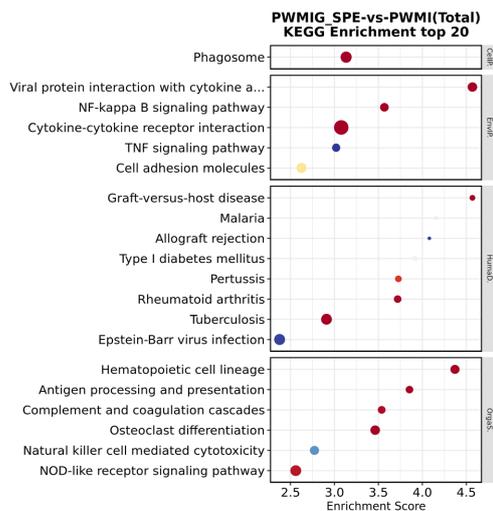
(b1)



(b2)



(c1)



(c2)

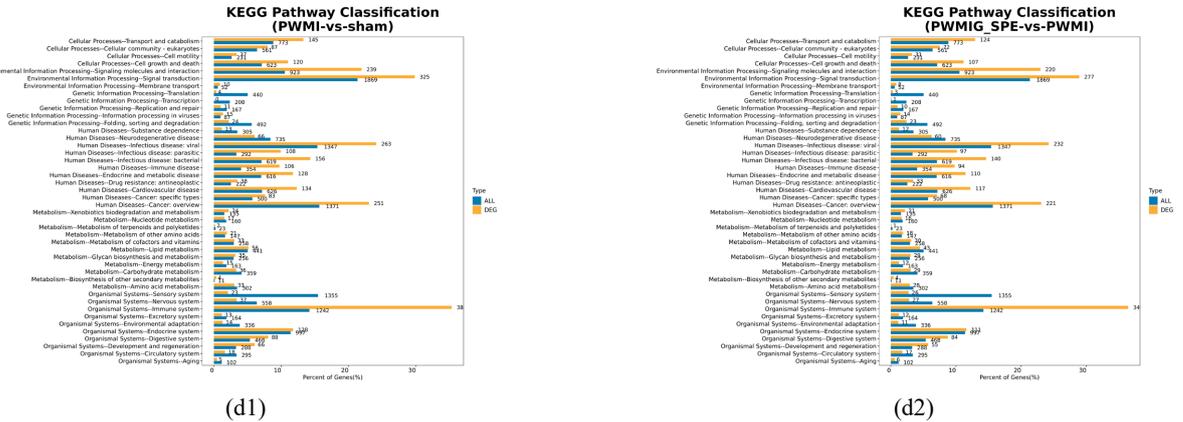
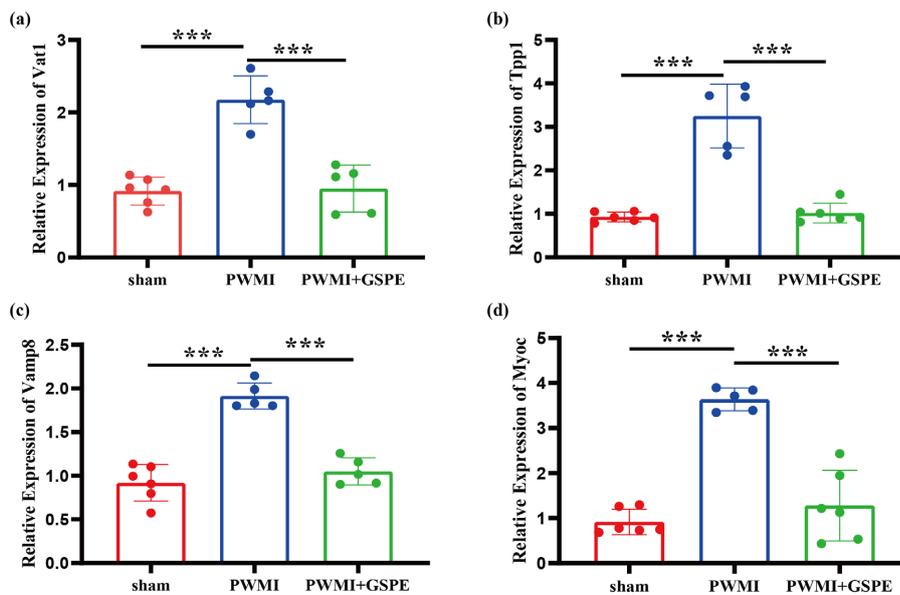


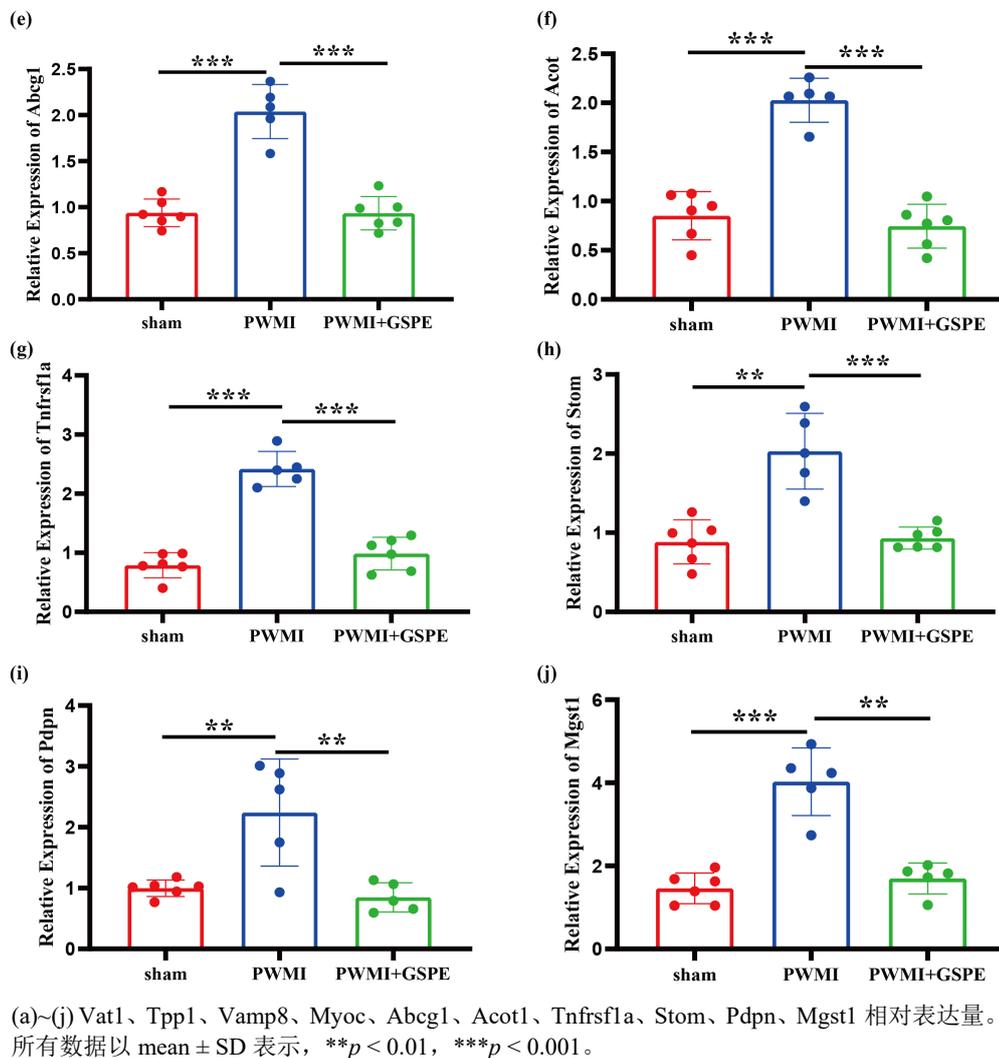
Figure 4. Transcriptomic investigation of the protective mechanism of GSPE on myelin in PWMI model mice. (a) Volcano plot of differentially expressed gene distribution in three groups of samples. (b) Cluster analysis of differentially expressed genes. PWMI group vs sham group; PWMI + GSPE group vs PWMI group. (c) KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes. PWMI group vs sham group; PWMI + GSPE group vs PWMI group. (d) Comparative bar chart of KEGG level 2 distribution of differentially expressed genes. PWMI group vs sham group, PWMI + GSPE group vs PWMI group

图 4. 转录组学探究 GSPE 对 PWMI 模型小鼠髓鞘的保护机制。(a) 三组样本差异表达基因分布火山图。(b) 差异基因聚类分析。PWMI 组 vs sham 组、PWMI + GSPE 组 vs PWMI 组。(c) 差异基因 KEGG 富集分析。PWMI 组 vs sham 组；PWMI + GSPE vs PWMI 组。(d) 差异基因 KEGG level2 水平分布比较图。PWMI 组 vs sham 组、PWMI + GSPE vs PWMI 组

3.5. qPCR 验证线粒体相关差异表达基因

将 PWMI 组与 sham 组相比具有显著差异表达的基因进行功能分类，将功能聚焦于线粒体，共筛选出 24 个差异表达基因；将 PWMI + GSPE 组与 PWMI 组进行比较，以线粒体功能为基础筛选出 21 个差异表达基因。最后取二者的交集，共有 10 个差异基因被筛选出来(图 5)，分别是 *Vat1* (vesicle amine transport 1)、*Tpp1* (tripeptidyl peptidase I)、*Vamp8* (vesicle-associated membrane protein 8)、*Myoc* (myocilin)、*Abcg1* (ATP binding cassette subfamily G member 1)、*Acot1* (acyl-CoA thioesterase 1)、*Tnfrsf1a* (tumor necrosis factor receptor superfamily member 1a)、*Stom* (stomatol)、*Pdpn* (podoplanin)、*Mgst1* (microosomal glutathione S-transferase 1)。通过 qPCR 对所筛选出的基因进行验证，结果与测序结果一致，证实测序结果真实有效。





(a)~(j) *Vat1*, *Tpp1*, *Vamp8*, *Myoc*, *Abcg1*, *Acot1*, *Tnfrsf1a*, *Stom*, *Pdpn*, *Mgst1* 相对表达量。所有数据以 mean ± SD 表示, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

Figure 5. qPCR verification of transcriptome sequencing results

图 5. qPCR 验证转录组学测序结果

4. 讨论

小鼠的胚胎发育过程与人类极为相似, 神经系统发育迅速, 仅数日便可完成。本研究中, 采用 P9 日龄 C57 小鼠手术截断右侧颈总动脉, 并置于低氧箱, 后腹腔注射 LPS, 以模拟早产儿缺血缺氧合并感染的诱因。通过形态学, 证实小鼠出现右侧脑损伤, 并且病灶周边出现大量凋亡细胞, 说明模型建立成功。为减少手术损伤及术后感染造成的差异, 对照组小鼠仅在术中分离右侧颈总动脉。通过 GSPE 干预证实了其对 PWMI 模型小鼠发挥脑保护作用, 主要在于对小鼠损伤部位的髓鞘产生影响。

原花青素作为天然提取物广泛存在于多种植物当中, 而葡萄作为常见水果, 其原料易得, 更为常见。研究表明, GSPE 通过直接或间接减少心肌中自由基的能力, 对再灌注引起的心脏损伤具有保护作用[19][20]。此外, 涉及 GSPE 的研究发现, 长期暴露于 GSPE 可调节与阿尔茨海默病或神经元变性相关小鼠特定脑蛋白的表达[21]。动物实验表明低温可以促进缺血缺氧小鼠脑内 OPC 的增殖和分化[22], 将年轻小鼠的脑脊液进行移植也可促进脑内 OPC 的增殖和分化[23]。少突胶质前体细胞(OPCs)是一类特殊的胶质前体细胞, 可分化为髓鞘形成少突胶质细胞, 而此类细胞对氧化损伤极为敏感。本研究发现, 在 PWMI

小鼠中,髓鞘在微结构和超微结构层面均存在严重损伤。GSPE 治疗可改善 PWMI 小鼠的髓鞘丢失、板层模糊及空隙现象。随后,我们探讨了 GSPE 对髓鞘相关基因和蛋白表达的影响。结果显示, PWMI 小鼠脑内少突胶质细胞谱系标志物 Olig2 基因的表达无显著差异,但 Olig2 蛋白表达显著增加。其原因可能是尽管缺血缺氧可因少突胶质前体细胞耐受性较低而导致大量死亡,但不同程度的缺氧对 OPCs 具有不同影响:轻度缺氧可刺激细胞增殖,从而导致脑内 Olig2 表达增加;而随着缺氧程度加重, Olig2 蛋白表达下降, NG2 的表达亦随之降低,提示缺氧不同程度地损伤了 OPCs 的增殖与分化。GSPE 治疗改善了 NG2 的表达,但未改善 Olig2 的表达,提示 GSPE 可能在促进 OPCs 分化方面的作用较其促进增殖的作用更为显著。

在病理条件下和血脑屏障受到损伤时,可以使大量淋巴细胞迁移到中枢神经系统[24]。此外,全身感染和由此引起的外周免疫系统的激活可加剧慢性神经退行性变。在模型建立时通常采用腹腔注射构建全身感染以模拟宫内感染状态,通过转录组测序结果发现 PWMI 组与 sham 组相比,小鼠右侧脑皮质内差异基因主要集中在 cellular response to lipopolysaccharide (细胞对脂多糖的反应)、response to bacterium (对细菌的反应)、positive regulation of inflammatory response (炎症反应的正向调节)、positive regulation of interleukin-1 beta production (白细胞介素-1 β 产生的正向调节),因此全身感染及缺血缺氧可引起脑内炎症反应。通过结扎右侧颈总动脉及缺氧 80 min,以模拟早产儿脑内缺血和全身缺氧状态,缺血缺氧会导致小鼠右侧脑皮质中线粒体功能受损,转录组学测序发现, PWMI 组与 sham 组相比,lysosome (溶酶体)、plasma membrane (质膜)功能发生严重影响,而 GSPE 可对上述细胞组分及分子功能产生积极影响。

PIVH 和 PVL 是 PWMI 的两种主要形式,均可导致严重的脑损伤。在 PWMI 中,线粒体功能障碍可能导致神经元凋亡。先前的研究已经报道线粒体功能障碍与许多疾病有关,包括糖尿病、神经变性和癌症[25]-[27]。中枢神经系统是一个代谢高度活跃的器官,需要消耗大约 20% 的身体总能量。因此,中枢神经系统的细胞中含有大量的线粒体,并且线粒体功能十分活跃[28]。但是中枢神经系统中的线粒体极易受到 ROS 介导的损伤,从而导致线粒体功能障碍。维持轴突运输和神经传导的神经元以及维持髓鞘形成的 OL 对能量需求特别高。因此,线粒体功能障碍与轴突变性和 OL 活力受损有关[29]。

葡萄籽含有多种类黄酮和非类黄酮,具有抗氧化和抗炎作用,此外,多酚和黄烷醇可以维持细胞的蛋白质平衡。由于蛋白平衡受损与所有淀粉样蛋白疾病密切相关,特别是神经退行性疾病,葡萄籽提取物可以成为一种有价值的治疗剂[30]。在动物模型中已被证明对多种疾病具有保护作用,包括糖尿病肾病、药物性肾毒性、癌症转移和缺血性心脏病[31],并能显著改善线粒体功能。神经退行性变导致小胶质细胞激活平衡向促炎状态转变。这导致趋化因子/细胞因子的产生,如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 IL-12,它们具有促炎特性[32]。同时,这些促炎细胞因子的分泌对关键的线粒体成分产生不利影响,导致线粒体呼吸链功能下降,加剧神经退行性病变[33]。而 GSPE 干预后可显著改善线粒体功能,以此来减轻缺血缺氧及炎症引起的损伤。

5. 结论

GSPE 可通过改善线粒体功能,以减轻缺血缺氧合并炎症对 PWMI 模型小鼠发挥脑保护作用,其保护作用主要体现能够改善 PWMI 模型小鼠低髓鞘化并促进 OPC 增殖。该研究证实 GSPE 可能为髓鞘疾病的潜在治疗药物,并为临床髓鞘损伤相关疾病提供新的治疗依据。

基金项目

宁夏自然科学基金(2023AAC03238),宁夏医科大学科学研究资助项目(XT2023002)。

参考文献

- [1] Volpe, J.J., Kinney, H.C., Jensen, F.E. and Rosenberg, P.A. (2011) The Developing Oligodendrocyte: Key Cellular Target in Brain Injury in the Premature Infant. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **29**, 423-440. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.02.012>
- [2] Nishiyama, A., Boshans, L., Goncalves, C.M., Wegrzyn, J. and Patel, K.D. (2016) Lineage, Fate, and Fate Potential of NG2-glia. *Brain Research*, **1638**, 116-128. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.08.013>
- [3] Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D. and Dombrowski, Y. (2019) Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*, **8**, Article 1424. <https://doi.org/10.3390/cells8111424>
- [4] van Tilborg, E., Heijnen, C.J., Benders, M.J., van Bel, F., Fleiss, B., Gressens, P., et al. (2016) Impaired Oligodendrocyte Maturation in Preterm Infants: Potential Therapeutic Targets. *Progress in Neurobiology*, **136**, 28-49. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.11.002>
- [5] Shen, D., Wu, W., Liu, J., Lan, T., Xiao, Z., Gai, K., et al. (2022) Ferroptosis in Oligodendrocyte Progenitor Cells Mediates White Matter Injury after Hemorrhagic Stroke. *Cell Death & Disease*, **13**, Article No. 259. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04712-0>
- [6] Zhang, S., Wang, Y., Xu, J., Kim, B., Deng, W. and Guo, F. (2020) HIF α Regulates Developmental Myelination Independent of Autocrine Wnt Signaling. *The Journal of Neuroscience*, **41**, 251-268. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0731-20.2020>
- [7] Li, S.G., Ding, Y.S., Niu, Q., et al. (2015) Grape Seed Proanthocyanidin Extract Alleviates Arsenic-Induced Oxidative Reproductive Toxicity in Male Mice. *Biomedical and Environmental Sciences*, **28**, 272-280.
- [8] Montagut, G., Bladé, C., Blay, M., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, M.J., et al. (2010) Effects of a Grapeseed Procyandin Extract (GSPE) on Insulin Resistance. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **21**, 961-967. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.08.001>
- [9] Pons, Z., Margalef, M., Bravo, F.I., Arola-Arnal, A. and Muguerza, B. (2017) Chronic Administration of Grape-Seed Polyphenols Attenuates the Development of Hypertension and Improves Other Cardiometabolic Risk Factors Associated with the Metabolic Syndrome in Cafeteria Diet-Fed Rats. *British Journal of Nutrition*, **117**, 200-208. <https://doi.org/10.1017/s0007114516004426>
- [10] Puiggròs, F., Llopiz, N., Ardévol, A., Bladé, C., Arola, L. and Salvadó, M.J. (2005) Grape Seed Procyanidins Prevent Oxidative Injury by Modulating the Expression of Antioxidant Enzyme Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 6080-6086. <https://doi.org/10.1021/jf050343m>
- [11] Liu, M., Yun, P., Hu, Y., Yang, J., Khadka, R.B. and Peng, X. (2020) Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Obesity. *Obesity Facts*, **13**, 279-291. <https://doi.org/10.1159/000502235>
- [12] Cortés-Espinar, A.J., Ibarz-Blanch, N., Soliz-Rueda, J.R., Bonafos, B., Feillet-Coudray, C., Casas, F., et al. (2023) Rhythm and ROS: Hepatic Chronotherapeutic Features of Grape Seed Proanthocyanidin Extract Treatment in Cafeteria Diet-Fed Rats. *Antioxidants*, **12**, Article 1606. <https://doi.org/10.3390/antiox12081606>
- [13] Odai, T., Terauchi, M., Kato, K., Hirose, A. and Miyasaka, N. (2019) Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Vascular Endothelial Function in Participants with Prehypertension: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Nutrients*, **11**, Article 2844. <https://doi.org/10.3390/nu11122844>
- [14] Sun, Q., Jia, N., Li, X., Yang, J. and Chen, G. (2019) Grape Seed Proanthocyanidins Ameliorate Neuronal Oxidative Damage by Inhibiting GSK-3 β -Dependent Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening in an Experimental Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Aging*, **11**, 4107-4124. <https://doi.org/10.18632/aging.102041>
- [15] Gao, W., Li, X., Dun, X., Jing, X., Yang, K. and Li, Y. (2020) Grape Seed Proanthocyanidin Extract Ameliorates Strep-tozotocin-Induced Cognitive and Synaptic Plasticity Deficits by Inhibiting Oxidative Stress and Preserving AKT and ERK Activities. *Current Medical Science*, **40**, 434-443. <https://doi.org/10.1007/s11596-020-2197-x>
- [16] Wang, S., Liu, Z., Wang, Y., Shi, B., Jin, Y., Wang, Y., et al. (2022) Grape Seed Extract Proanthocyanidin Antagonizes Aristolochic Acid I-Induced Liver Injury in Rats by Activating PI3K-AKT Pathway. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **33**, 131-140. <https://doi.org/10.1080/15376516.2022.2103479>
- [17] Wang, J., Wang, D., Zheng, X., Li, Y., Li, Y., Ma, T., et al. (2022) A2B Adenosine Receptor Inhibition Ameliorates Hypoxic-Ischemic Injury in Neonatal Mice via PKC/Erk/Creb/HIF-1 α Signaling Pathway. *Brain Research*, **1782**, Article ID: 147837. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.147837>
- [18] Tu, X., Wang, M., Liu, Y., Zhao, W., Ren, X., Li, Y., et al. (2019) Pretreatment of Grape Seed Proanthocyanidin Extract Exerts Neuroprotective Effect in Murine Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury by Its Antiapoptotic Property. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **39**, 953-961. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00691-7>
- [19] Pataki, T., Bak, I., Kovacs, P., Bagchi, D., Das, D.K. and Tosaki, A. (2002) Grape Seed Proanthocyanidins Improved Cardiac Recovery during Reperfusion after Ischemia in Isolated Rat Hearts. *The American Journal of Clinical Nutrition*,

- 75, 894-899. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.5.894>
- [20] Yamakoshi, J., Saito, M., Kataoka, S. and Tokutake, S. (2002) Procyanidin-Rich Extract from Grape Seeds Prevents Cataract Formation in Hereditary Cataractous (ICR/f) Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4983-4988. <https://doi.org/10.1021/jf0201632>
- [21] Deshane, J., Chaves, L., Sarikonda, K.V., Isbell, S., Wilson, L., Kirk, M., *et al.* (2004) Proteomics Analysis of Rat Brain Protein Modulations by Grape Seed Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7872-7883. <https://doi.org/10.1021/jf040407d>
- [22] Iram, T., Kern, F., Kaur, A., Myneni, S., Morningstar, A.R., Shin, H., *et al.* (2022) Young CSF Restores Oligodendrogenesis and Memory in Aged Mice via Fgf17. *Nature*, **605**, 509-515. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04722-0>
- [23] Wittstatt, J., Weider, M., Wegner, M. and Reiprich, S. (2020) MicroRNA miR-204 Regulates Proliferation and Differentiation of Oligodendroglia in Culture. *Glia*, **68**, 2015-2027. <https://doi.org/10.1002/glia.23821>
- [24] Di Donato, S. (2000) Disorders Related to Mitochondrial Membranes: Pathology of the Respiratory Chain and Neurodegeneration. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **23**, 247-263. <https://doi.org/10.1023/a:1005684029429>
- [25] Liu, H., Cao, M., Wang, Y., Li, L., Zhu, L., Xie, G., *et al.* (2015) Endoplasmic Reticulum Stress Is Involved in the Connection between Inflammation and Autophagy in Type 2 Diabetes. *General and Comparative Endocrinology*, **210**, 124-129. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.09.006>
- [26] Placido, A.I., Pereira, C., Duarte, A., Candeias, E., Correia, S., Carvalho, C., *et al.* (2015) Modulation of Endoplasmic Reticulum Stress: An Opportunity to Prevent Neurodegeneration? *CNS & Neurological Disorders—Drug Targets*, **14**, 518-533. <https://doi.org/10.2174/1871527314666150429112353>
- [27] Oakes, S.A. and Papa, F.R. (2015) The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, **10**, 173-194. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104649>
- [28] Morató, L., Bertini, E., Verrigni, D., Ardisson, A., Ruiz, M., Ferrer, I., *et al.* (2014) Mitochondrial Dysfunction in Central Nervous System White Matter Disorders. *Glia*, **62**, 1878-1894. <https://doi.org/10.1002/glia.22670>
- [29] Federico, A., Cardaioli, E., Da Pozzo, P., Formichi, P., Gallus, G.N. and Radi, E. (2012) Mitochondria, Oxidative Stress and Neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences*, **322**, 254-262. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.05.030>
- [30] Sönmez, M.F. and Tascioglu, S. (2015) Protective Effects of Grape Seed Extract on Cadmium-Induced Testicular Damage, Apoptosis, and Endothelial Nitric Oxide Synthases Expression in Rats. *Toxicology and Industrial Health*, **32**, 1486-1494. <https://doi.org/10.1177/0748233714566874>
- [31] Yuan, W., Zhan, X., Liu, W., Ma, R., Zhou, Y., Xu, G., *et al.* (2023) Mmu-miR-25-3p Promotes Macrophage Autophagy by Targeting DUSP10 to Reduce Mycobacteria Survival. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **13**, Article 1120570. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1120570>
- [32] Williamson, J.M. and Lyons, D.A. (2018) Myelin Dynamics Throughout Life: An Ever-Changing Landscape? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **12**, Article 424. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00424>
- [33] Trapp, B.D. and Stys, P.K. (2009) Virtual Hypoxia and Chronic Necrosis of Demyelinated Axons in Multiple Sclerosis. *The Lancet Neurology*, **8**, 280-291. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(09\)70043-2](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(09)70043-2)