

## 6-姜烯酚抑制死亡相关蛋白激酶 1 介导的自噬减轻大鼠心搏骤停-心肺复苏后脑损伤

饶欧阳<sup>1</sup> 李世欣<sup>1</sup> 朱宁<sup>1</sup> 周航向<sup>1</sup> 胡杰<sup>1</sup> 李运<sup>1</sup> 陶浚泠<sup>2</sup> 李叶红<sup>2</sup> 刘颖<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>贵州医科大学临床医学院, 贵阳 550004; <sup>2</sup>贵州医科大学附属医院重症医学科, 贵阳 550004

通信作者: 刘颖, Email: liuying@gmc.edu.cn

**【摘要】** 目的 观察 6-姜烯酚(6-SH)在大鼠心搏骤停(CA)-心肺复苏(CPR)后全脑缺血/再灌注损伤(CIRI)中的神经保护作用。方法 采用计算机分子对接技术观察 6-SH 是否能自发性结合死亡相关蛋白激酶 1(DAPK1)。将 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为假手术组(5 只)、CPR 组(7 只)和 CPR+6-SH 组(7 只),再根据观察时间点将 CPR 组和 CPR+6-SH 组分为 12、24、48 h 3 个亚组。采用窒息法制备大鼠 CA-CPR 后全脑 CIRI 模型。假手术组仅进行气管插管、动静脉插管,不诱导窒息及 CPR; CPR 组制模成功后即刻腹腔注射生理盐水 1 mL; CPR+6-SH 组制模成功后即刻腹腔注射 20 mg/kg 6-SH 1 mL,之后每 12 h 注射 1 次,直至观察点结束。记录大鼠制模后各时间点的神经功能缺损评分(NDS);在各时间点观察结束后麻醉处死大鼠取脑组织标本。苏木素-伊红(HE)染色后光镜下观察神经细胞病理学改变;透射电镜下观察海马组织神经元超微结构及自噬情况;实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测脑组织 DAPK1、空泡分选蛋白 34(VPS34)、自噬相关蛋白 Beclin1 和微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)的 mRNA 表达;蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测脑组织 DAPK1、磷酸化 DAPK1(p-DAPK1)ser308、VPS34、Beclin1 和 LC3 的蛋白表达;荧光显微镜下观察脑组织 Beclin1 和 LC3 的免疫荧光表达。结果 分子对接结果表明,6-SH 能自发性结合 DAPK1。与假手术组比较,CPR 组大鼠制模各时间点 NDS 评分均显著升高;光镜下可见大鼠脑组织细胞排列紊乱,细胞间隙增宽,呈水肿表现,部分区域可见细胞核固缩、坏死;透射电镜下可见线粒体明显肿胀,膜完整,基质溶解,嵴减少、消失,空泡变,自噬体增多。与 CPR 组比较,CPR+6-SH 组大鼠制模各时间点 NDS 评分均显著降低;光镜下可见大鼠脑组织局部神经元水肿,胞核周围间隙增宽;透射电镜下可见线粒体大多轻度肿胀,膜完整,自噬体数量相对较少,损伤情况减轻。RT-qPCR 结果显示,与假手术组比较,CPR 各亚组脑组织 DAPK1、VPS34、Beclin1、LC3 的 mRNA 表达均显著升高,且以 CPR 24 h 组变化最显著;与 CPR 组比较,CPR+6-SH 各亚组脑组织上述指标的 mRNA 表达均显著降低[制模 24 h(相对表达量):DAPK1 mRNA 为  $3.41 \pm 0.68$  比  $4.48 \pm 0.62$ , VPS34 mRNA 为  $3.63 \pm 0.49$  比  $4.66 \pm 1.18$ , Beclin1 mRNA 为  $3.08 \pm 0.49$  比  $4.04 \pm 0.22$ , LC3 mRNA 为  $2.60 \pm 0.36$  比  $3.67 \pm 0.62$ , 均  $P < 0.05$ ]。Western blotting 结果显示,与假手术组比较,CPR 各亚组脑组织 DAPK1、VPS34、Beclin1 和 LC3 的蛋白表达均显著升高,p-DAPK1 ser308 的蛋白表达显著降低,且以 CPR 24 h 组变化最显著;与 CPR 组比较,CPR+6-SH 各亚组脑组织 DAPK1、VPS34、Beclin1 和 LC3 的蛋白表达均显著降低[制模 24 h:DAPK1/ $\beta$ -actin 为  $1.88 \pm 0.22$  比  $2.47 \pm 0.22$ , VPS34/ $\beta$ -actin 为  $2.55 \pm 0.06$  比  $3.46 \pm 0.05$ , Beclin1/ $\beta$ -actin 为  $2.12 \pm 0.03$  比  $2.87 \pm 0.03$ , LC3/ $\beta$ -actin 为  $2.03 \pm 0.24$  比  $3.17 \pm 0.23$ , 均  $P < 0.05$ ]。p-DAPK1 ser308 的蛋白表达显著升高[制模 24 h:p-DAPK1 ser308/ $\beta$ -actin 为  $0.40 \pm 0.02$  比  $0.20 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ]。荧光显微镜下显示,与假手术 24 h 组比较,CPR 24 h 组脑组织 Beclin1 和 LC3 的荧光强度均显著升高;与 CPR 24 h 组比较,CPR+6-SH 24 h 组大鼠脑组织 Beclin1 和 LC3 的荧光强度均显著降低。结论 6-SH 能够抑制 DAPK1 的表达,减轻大鼠 CA-CPR 后全脑 CIRI 的过度自噬,发挥神经保护作用,其机制可能与 DAPK1 ser308 位点磷酸化有关。

**【关键词】** 心搏骤停-心肺复苏后脑损伤; 6-姜烯酚; 死亡相关蛋白激酶 1 自噬

基金项目:贵州省科技计划项目(2023-401)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240724-00627

### 6-Shogaol alleviates cerebral injury after cardiac arrest-cardiopulmonary resuscitation in rats by inhibiting death-associated protein kinase 1-mediated autophagy

Rao Ouyang<sup>1</sup>, Li Shixin<sup>1</sup>, Zhu Ning<sup>1</sup>, Zhou Hangxiang<sup>1</sup>, Hu Jie<sup>1</sup>, Li Yun<sup>1</sup>, Tao Junling<sup>2</sup>, Li Yehong<sup>2</sup>, Liu Ying<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Clinical Medical School, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; <sup>2</sup>Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China

Corresponding author: Liu Ying, Email: liuying@gmc.edu.cn

**【Abstract】** **Objective** To observe the neuroprotective effect of 6-shogaol (6-SH) in global cerebral ischemia/reperfusion injury (CIRI) following cardiac arrest (CA) and cardiopulmonary resuscitation (CPR) in rats. **Methods** Computer-aided molecular docking was used to determine whether 6-SH could spontaneously bind to death-associated protein kinase 1 (DAPK1). SPF-grade male SD rats were randomly divided into a sham group ( $n = 5$ ), a CPR group ( $n = 7$ ), and a CPR+6-SH group ( $n = 7$ ). The CPR group and CPR+6-SH group were further divided into 12-, 24-, and 48-hour subgroups based on observation time points. A rat model of global CIRI after CA-CPR was established

by asphyxiation. In the sham group, only tracheal and vascular intubation was performed without asphyxia and CPR induction. The CPR group was intraperitoneally injected with 1 mL of normal saline immediately after successful modeling. The CPR+6-SH group received an intraperitoneal injection of 20 mg/kg 6-SH (1 mL) immediately after successful modeling, followed by administration every 12 hours until the endpoint. Neurological Deficit Score (NDS) was recorded at each time point after modeling. After completion of observation at each time point, rats were anesthetized and sacrificed, and brain tissue specimens were collected. Histopathological changes of neurons were observed under light microscopy after hematoxylin-eosin (HE) staining. Ultrastructural changes of hippocampal neurons and autophagy were observed by transmission electron microscopy (TEM). Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect mRNA expression levels of DAPK1, vacuolar protein sorting 34 (VPS34), Beclin1, and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) in brain tissues. Western blotting was used to detect protein expression levels of DAPK1, phosphorylated DAPK1 at serine 308 (p-DAPK1 ser308), VPS34, Beclin1, and LC3. Immunofluorescence was used to observe Beclin1 and LC3 expression in brain tissues under a fluorescence microscope. **Results** Molecular docking results indicated that 6-SH could spontaneously bind to DAPK1. Compared with the sham group, the NDS scores of the CPR group rats were significantly increased at all modeling time points; under light microscopy, disordered cell arrangement, widened intercellular spaces, and edema were observed in brain tissues, with pyknotic and necrotic nuclei in some areas; under TEM, mitochondria were markedly swollen with intact membranes, dissolved matrix, reduced or disappeared cristae, vacuolization, and increased autophagosomes. Compared with the CPR group, the NDS scores of the CPR+6-SH group rats were significantly decreased at all modeling time points; under light microscopy, local neuronal edema and widened perinuclear space were observed; under TEM, mitochondria were mostly mildly swollen with intact membranes, fewer autophagosomes, and alleviated injury. RT-qPCR results showed that compared with the sham group, mRNA expression levels of DAPK1, VPS34, Beclin1, and LC3 in brain tissues were significantly upregulated in all CPR subgroups, with the most pronounced changes at 24 hours. Compared with the CPR group, the CPR+6-SH group showed significantly lower mRNA expression of the above indicators at each time point [24 hours post-modeling (relative expression): DAPK1 mRNA:  $3.41 \pm 0.68$  vs.  $4.48 \pm 0.62$ ; VPS34 mRNA:  $3.63 \pm 0.49$  vs.  $4.66 \pm 1.18$ ; Beclin1 mRNA:  $3.08 \pm 0.49$  vs.  $4.04 \pm 0.22$ ; LC3 mRNA:  $2.60 \pm 0.36$  vs.  $3.67 \pm 0.62$ ; all  $P < 0.05$ ]. Western blotting results showed that compared with the sham group, the protein expression levels of DAPK1, VPS34, Beclin1, and LC3 in all CPR subgroups were significantly increased, while the expression of p-DAPK1 ser308 was significantly decreased, with the most pronounced changes observed in the CPR 24-hour subgroup. Compared with the CPR group, the CPR+6-SH subgroups exhibited significantly reduced protein expression of DAPK1, VPS34, Beclin1, and LC3 [24-hour post-modeling: DAPK1/ $\beta$ -actin:  $1.88 \pm 0.22$  vs.  $2.47 \pm 0.22$ ; VPS34/ $\beta$ -actin:  $2.55 \pm 0.06$  vs.  $3.46 \pm 0.05$ ; Beclin1/ $\beta$ -actin:  $2.12 \pm 0.03$  vs.  $2.87 \pm 0.03$ ; LC3/ $\beta$ -actin:  $2.03 \pm 0.24$  vs.  $3.17 \pm 0.23$ ; all  $P < 0.05$ ]. Conversely, the expression of p-DAPK1 ser308 was significantly upregulated in the CPR+6-SH group compared to the CPR group [24-hour post-modeling: p-DAPK1 ser308/ $\beta$ -actin:  $0.40 \pm 0.02$  vs.  $0.20 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ]. Under the fluorescence microscope, fluorescence intensities of Beclin1 and LC3 in the CPR 24-hour group were significantly higher than those in the sham 24-hour group; compared with the CPR 24-hour group, the CPR+6-SH 24-hour group showed significantly reduced fluorescence intensities of Beclin1 and LC3. **Conclusions** 6-SH inhibited the expression of DAPK1, alleviated excessive autophagy after global CIRC following CA-CPR in rats, and exerted neuroprotective effects. The mechanism may be related to phosphorylation at the DAPK1 ser308 site.

**【Key words】** Cardiac arrest-cardiopulmonary resuscitation cerebral injury; 6-Shogaol; Death-associated protein kinase 1; Autophagy

**Fund program:** Guizhou Provincial Science and Technology Program Project (2023-401)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20240724-00627

心搏骤停(cardiac arrest, CA)是指由于多种原因引起心脏射血停止,导致血液循环中断,患者出现心跳、呼吸停止,并伴有意识丧失的急危重症<sup>[1]</sup>。心肺复苏(cardiopulmonary resuscitation, CPR)被认为是抢救CA最有效的方法,随着医学技术的进步,特别是体外心肺复苏(extracorporeal cardiopulmonary resuscitation, ECPR)<sup>[2]</sup>等新技术的应用,越来越多的患者自主循环恢复(return of spontaneous circulation, ROSC),且出院后能够正常生活<sup>[3]</sup>。然而,即使成功实施了CPR并ROSC,患者也可能面临严重的神经损伤,神经损伤是由于患者CA-CPR后全脑缺血/再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)引起,是导致患者不良预后和死亡的主要原因之

一<sup>[3-5]</sup>。因此,近年来越来越多的学者开始关注能够减轻全脑CIRI的新治疗方法。

死亡相关蛋白激酶1(death-associated protein kinase 1, DAPK1)是一种Ca<sup>2+</sup>/钙调素(calmodulin, CaM)依赖的丝氨酸/苏氨酸激酶,其在大脑中高度表达,被认为是神经细胞死亡的重要调节因子<sup>[5-6]</sup>。有研究显示,DAPK1可通过增强自噬现象,介导细胞死亡<sup>[7]</sup>。在全脑CIRI中,适度自噬可以减轻脑损伤,但过度自噬则可能加重损伤<sup>[8]</sup>。因此,深入探究全脑CIRI过程中DAPK1的激活及其调控机制具有重要意义。

6-姜烯酚(6-shogaol, 6-SH)是干姜的主要活性成分之一,被广泛应用于许多疾病的治疗<sup>[9-10]</sup>。有

研究表明,6-SH能够保护星形胶质细胞免受氧化损伤,促进神经元生长和减少海马氧化损伤<sup>[11-12]</sup>;更为重要的是,6-SH能以被动扩散的形式穿透血脑屏障,在脑组织中广泛分布<sup>[13-15]</sup>,提示其在学习脑损伤中具有潜力。尽管有研究提出6-SH可能发挥神经保护效应,但其在全脑CIRI中的具体作用机制尚未明确。

基于以上背景,本研究旨在探索6-SH调节DAPK1对CA-CPR后全脑CIRI的神经保护作用,为减轻或预防全脑CIRI提供新的治疗策略。

## 1 材料和方法

**1.1 分子对接:**从UniProt数据库下载DAPK1蛋白结构(ID:A0A0G2K5V8),并从PubChem数据库获取小分子6-SH。以DAPK1为受体、6-SH为配体,使用AutoDockTools进行加氢、设置AD4原子类型、计算Gasteiger电荷,并构建对接网格盒,导出“.pdbqt”文件。随后利用AutoDock Vina完成分子对接,评估结合能。对蛋白-小分子复合物使用PyMOL和Discovery Studio 2019软件进行三维结构分析和二维作用力可视化,探讨其相互作用模式。

**1.2 主要试剂及仪器:**DAPK1抗体、磷酸化DAPK1(phospho-DAPK1, p-DAPK1)Ser308抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司),自噬相关蛋白Beclin1抗体、微管相关蛋白1轻链3(light chain 3, LC3)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司),空泡分选蛋白34(vacuolar protein sorting-associated protein 34, VPS34)抗体(美国Abcam公司);6-SH(美国Med Chem Express公司),盐酸肾上腺素注射液(黑龙江哈药集团三精制药有限公司);BCA蛋白检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),化学发光成像分析仪(上海勤兴科学仪器有限公司),DW-3000A型小动物呼吸机(北京海富达科技有限公司),ZL-620A型医学信号采集处理系统(合肥斯派克仪器科技有限公司)。

**1.3 实验动物:**SPF级雄性SD大鼠,体质量250~350 g,6~8周龄,由北京维通利华实验动物有限公司提供[动物许可证号:SCXK(粤)20220063]。大鼠饲养于温度(22±2)℃、12 h光照/黑暗循环的SPF级动物房,自由摄食饮水,适应性饲养7 d后制模。本研究动物实验方案经贵州医科大学动物伦理委员会批准(审批号:2304126),并遵循中国医学科学院相关动物管理规范执行。

**1.4 CPR后脑损伤模型的建立:**采用窒息法构建大鼠CA-CPR后全脑CIRI模型。经腹腔注射3 mL/kg

20%乌拉坦溶液麻醉大鼠,常规编号及备皮处理后,将大鼠仰卧位固定于手术板上,制模过程中借助电热毯维持体温。麻醉完成后对大鼠进行心电监测,气管插管用于连接小动物呼吸机,股动脉插管用于监测动脉血压,股静脉插管用于肾上腺素静脉给药。手术完成后,记录基线信息[体温、心率、平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)],采集心电图,封堵气管导管诱导大鼠窒息。将开始窒息至MAP降至25 mmHg(1 mmHg≈0.133 kPa)以下的时间以及心电图呈无脉性电活动或窦性停搏或室颤的时间定义为窒息致CA时间。间歇4 min后开始CPR。利用手动胸外按压和小动物呼吸机进行CPR,推注肾上腺素0.02 mg,每2 min注射1次。直至ROSC或复苏失败(CPR 10 min后仍未ROSC)。MAP≥60 mmHg且持续10 min的室上节律,被认定为复苏成功(即制模成功),记录复苏成功时间。复苏后继续机械通气并持续监测心电图、血压、心率1 h,若大鼠生命体征稳定,可终止机械通气,拔除所有导管,结扎相关血管后将大鼠放入笼中,自由进食饮水,环境温度维持在26℃。大鼠神经功能缺损评分(neurological deficit score, NDS)显著升高,苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色和透射电镜可见典型的脑CIRI的病理学改变,提示制模成功。

**1.5 动物分组及处理:**将SD大鼠随机分为假手术组(5只)、CPR组(7只)和CPR+6-SH组(7只),其中CPR组和CPR+6-SH组又以复苏成功时间点(即制模成功时间点)作为观察时间节点,分为12、24、48 h 3个亚组。假手术组仅进行气管插管和动静脉插管,不诱导窒息及CPR;CPR组CA 4 min后进行CPR直至ROSC,随后立即腹腔注射生理盐水1 mL;CPR+6-SH组CA 4 min后进行CPR直至ROSC,随后立即腹腔注射20 mg/kg 6-SH 1 mL<sup>[16-18]</sup>,之后每12 h注射1次,直至观察点结束。

## 1.6 指标检测及方法

**1.6.1 神经功能检测:**在脑缺血/再灌注后各时间点对大鼠意识、呼吸、颅神经反射、运动、感觉、协调等6个方面进行NDS评分,分数越高表示神经损伤越严重<sup>[19]</sup>。

**1.6.2 脑组织样本制备及检测:**各组大鼠在各时间点观察结束后,用20%乌拉坦溶液深麻醉处死大鼠,将脑组织进行冠状连续切片,均分为6块。从脑组织额极到枕极进行计数,取第2块脑片中的皮层组织检测mRNA和蛋白表达量,取第3块脑片中的

海马组织进行透射电镜检测,取第4块脑片组织用于免疫荧光检测,取第5块脑片组织用于HE染色。

**1.6.2.1 脑组织病理学观察:**取出脑组织后,将其置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h,随后依程序进行脱水及石蜡包埋处理。将包埋后的脑组织连续切片,制备成厚度为4  $\mu\text{m}$ 的冠状切片。经脱蜡和再水化处理行HE染色,光镜下观察切片并拍照记录。

**1.6.2.2 海马组织神经元超微结构观察:**取海马组织块约1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm大小,操作过程中尽量避免牵拉、挤压及其他机械性损伤,并置于4  $^{\circ}\text{C}$ 固定液中固定2~4 h。随后依次进行后固定、脱水、渗透及包埋处理,并制备超薄切片。组织切片经醋酸铀-枸橼酸铅双重染色处理15 min后于室温条件下自然干燥过夜,透射电镜下观察切片并采集图像分析。

**1.6.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR):**使用Trizol试剂提取总RNA,使用Hifair<sup>®</sup> III第1链cDNA合成SuperMix进行qPCR,以逆转录和合成cDNA。以 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)作为DAPK1的内部参考,检测DAPK1、VPS34、Beclin1和LC3的mRNA表达。

**1.6.2.4 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测:**采用RIPA裂解缓冲液提取总蛋白,并通过二喹啉甲酸(bicinchoninic acid assay, BCA)试剂盒测定蛋白浓度,进行蛋白定量分析;用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)法分离等量蛋白质,转移到聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,将膜浸入含吐温20的Tris缓冲液(Tris-buffered saline with Tween 20, TBST)中,封闭处理后依次进行一抗、二抗孵育,随后使用化学发光试剂并借助发光成像系统检测蛋白信号。抗体稀释比例分别为DAPK1抗体(1:2 000)、p-DAPK1 Ser308抗体(1:2 000)、VPS34抗体(1:5 000)、Beclin1抗体(1:2 500)、LC3抗体(1:2 500)、山羊抗兔抗体(1:5 000)。使用ImageJ图像分析软件对条带灰度值进行定量分析,通过目标蛋白与内参 $\beta$ -actin灰度比值评估DAPK1、p-DAPK1 ser308、VPS34、Beclin1和LC3的蛋白相对表达水平。

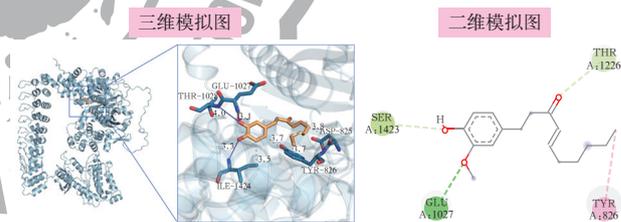
**1.6.2.5 免疫荧光:**脑组织经固定、包埋、切片、透化和封闭后,4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗(LC3、Beclin1)过夜;PBS洗涤3次,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育二抗1 h,再PBS洗涤3次;随后37  $^{\circ}\text{C}$ 用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染核2 h,荧光显微镜下观察

Beclin1和LC3的免疫荧光表达并拍照。

**1.7 统计学分析:**所有实验均进行至少3次独立生物学重复,使用GraphPad Prism 9.5软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用非配对 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析,并通过Tukey检验进行后续多重比较。检验水准 $\alpha$ 值取双侧0.05。

## 2 结果

**2.1 6-SH自发性结合DAPK1:**小分子6-SH与DAPK1蛋白之间的结合能为-28.45 kJ/mol。三维图显示,配体小分子6-SH可通过2条分别为3.1 $\text{\AA}$ 和4.0 $\text{\AA}$ 的氢键结合至受体DAPK1蛋白的1 027号GLU氨基酸残基和1 028号THR氨基酸残基中,通过2条分别为3.3 $\text{\AA}$ 和3.5 $\text{\AA}$ 的氢键的疏水作用力结合至受体DAPK1蛋白的1 424号ILE氨基酸残基中,通过2条均为3.7 $\text{\AA}$ 的疏水作用力结合至受体DAPK1蛋白的826号TYR氨基酸残基中,通过1条3.8 $\text{\AA}$ 的疏水作用力结合至受体DAPK1蛋白的825号ASP氨基酸残基中;此外,二维作用力分析也得到了相似的结果(图1)。



注:三维模拟图中,黄色棒状结构代表6-姜烯酚(6-SH),蓝色丝带结构代表死亡相关蛋白激酶1(DAPK1)蛋白的整体构象,蓝红色棒状结构代表DAPK1蛋白的氨基酸残基,蓝色实线代表氢键,黑色虚线代表疏水作用力

图1 6-SH与DAPK1分子对接的三维和二维模拟示意图

**2.2 6-SH可降低CPR后大鼠NDS评分(表1):**与假手术组比较,CPR各亚组及CPR+6-SH各亚组大鼠NDS评分均显著升高(均 $P<0.05$ ),以CPR 24 h组NDS评分最高;与CPR各亚组比较,CPR+6-SH各亚组大鼠NDS评分均显著降低(均 $P<0.05$ )。

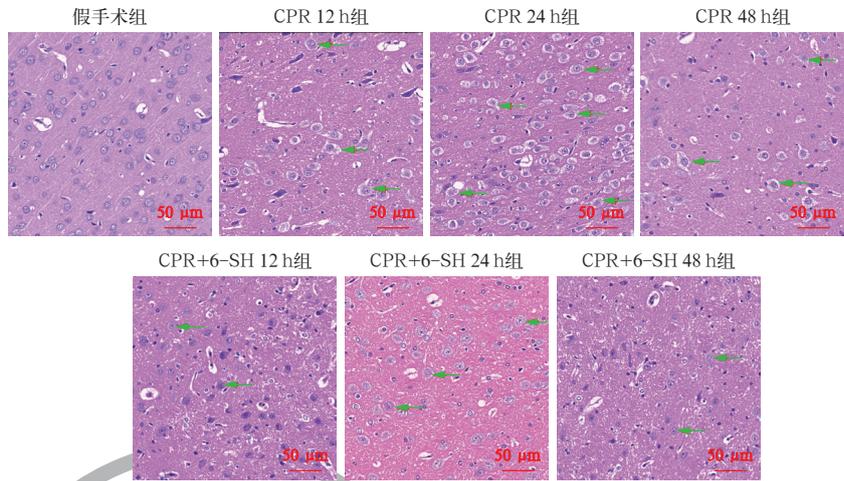
表1 各组大鼠制模各时间点NDS评分比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数 (只)	制模各时间点 NDS 评分(分)		
		12 h	24 h	48 h
假手术组	7	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
CPR组	7	51.83 $\pm$ 2.79 <sup>a</sup>	75.00 $\pm$ 4.98 <sup>a</sup>	53.50 $\pm$ 3.51 <sup>a</sup>
CPR+6-SH组	7	31.33 $\pm$ 4.72 <sup>ab</sup>	59.00 $\pm$ 3.69 <sup>ab</sup>	39.50 $\pm$ 10.62 <sup>ab</sup>

注:NDS为神经功能缺损评分,CPR为心肺复苏,6-SH为6-姜烯酚;与假手术组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与CPR组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$

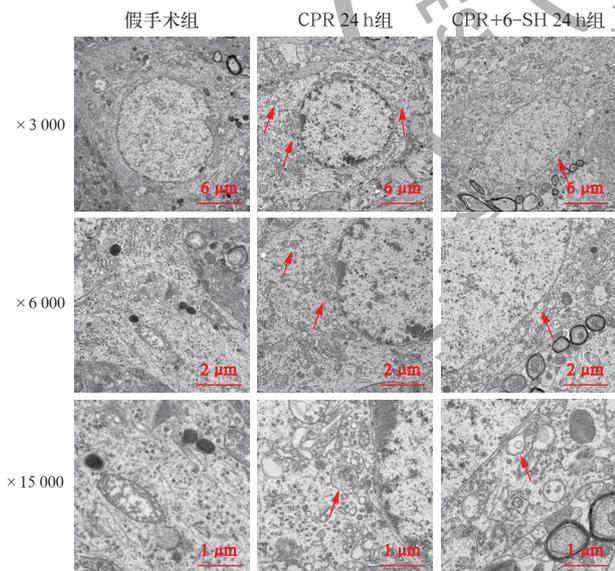
**2.3 6-SH可减轻CPR后大鼠病理损伤(图2):**光镜下显示,假手术组脑组织细胞未见病理学改变;CPR各亚组脑组织均表现出明显损伤,主要特征为神经元排列紊乱、细胞间隙增宽及脑水肿表现,部分区域可见核固缩和坏死,以CPR 24 h组损伤最为严重;CPR+6-SH各亚组脑组织损伤程度有所缓解,局部神经元水肿减轻,胞核周围间隙轻度扩大,病理学改变较CPR组减轻。

**2.4 6-SH可减轻CPR后大鼠海马组织神经元超微结构损伤,减少自噬体形成(图3):**根据HE染色结果,选择损伤最重的CPR 24 h组行透射电镜观察,结果显示,假手术组海马组织神经元超微结构未见病理学改变;CPR 24 h组海马组织神经元细胞中部分线粒体明显肿胀,膜结构完整,基质溶解,嵴减少或消失,出现空泡变性,自噬体数量增多;与CPR 24 h组相比,CPR+6-SH 24 h组细胞损伤相对较轻,线粒体大多表现为轻度肿胀,膜完整,基质溶解,嵴减少或消失,自噬体数量较少。



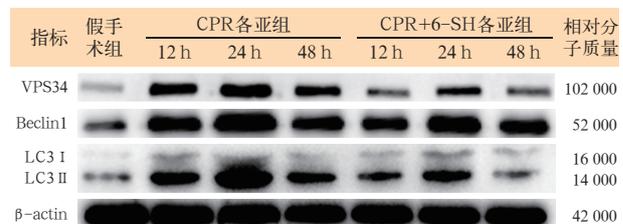
**图2** 光镜下观察各组大鼠脑组织病理学改变 绿色箭头所示为坏死、水肿的神经细胞。假手术组脑组织正常,细胞排列致密均匀,无明显液泡间隙,核仁清晰可见;心肺复苏(CPR)各亚组脑组织损伤较重,出现神经元排列紊乱、细胞间隙增宽、部分可见核固缩坏死现象等典型缺血/再灌注损伤病理表现,其中以CPR 24 h组损伤最严重;CPR+6-姜烯酚(6-SH)各亚组脑组织病理学改变较CPR组减轻,表现为局部神经元水肿减轻,胞核周围间隙轻度增宽 苏木素-伊红(HE)染色 中倍放大

CPR各亚组和CPR+6-SH各亚组大鼠脑组织VPS34、Beclin1、LC3的mRNA表达均显著升高(均 $P<0.05$ ),以CPR 24 h组变化最显著;与相应时间点CPR亚组比较,CPR+6-SH各亚组大鼠脑组织上述指标的mRNA表达均显著降低(均 $P<0.05$ )。Western blotting检测结果显示(图4;表3),与假手术组比较,CPR各亚组和CPR+6-SH各亚组大鼠脑组织VPS34、Beclin1、LC3的蛋白表达均显著升高(均 $P<0.05$ ),以CPR 24 h组变化最显著;与相应时间点CPR亚组比较,CPR+6-SH各亚组大鼠脑组织上述指标的蛋白表达均显著降低(均 $P<0.05$ )。选择自噬基因和蛋白表达水平最高的CPR 24 h组行免疫荧光检测,结果显示(图5;表4),与假手术组比较,CPR 24 h组大鼠脑组织Beclin1和LC3的荧光强度均显著升高(均 $P<0.05$ );与CPR 24 h组比较,CPR+6-SH 24 h组大鼠脑组织Beclin1和LC3的荧光强度均显著降低(均 $P<0.05$ )。



**图3** 透射电镜下观察各组大鼠海马组织神经元超微结构 红色箭头所示为自噬小体或自噬溶酶体。假手术组海马组织细胞结构正常,细胞核完整;心肺复苏(CPR)24 h组海马组织线粒体部分明显肿胀,膜完整,基质溶解,嵴减少或消失,出现空泡化,自噬体增多;CPR+6-姜烯酚(6-SH)24 h组海马组织细胞损伤较轻,线粒体轻度肿胀,膜完整,基质溶解,嵴减少,自噬体数量相对较少 醋酸铀-枸橼酸铅双重染色

**2.5 6-SH可降低CPR后大鼠脑组织自噬水平:**RT-qPCR检测结果显示(表2),与假手术组比较,



VPS34为空泡分选蛋白34, Beclin1为自噬相关蛋白, LC3为微管相关蛋白1轻链3, CPR为心肺复苏, 6-SH为6-姜烯酚, β-actin为β-肌动蛋白

**图4** 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组大鼠脑组织VPS34、Beclin1、LC3的蛋白表达

**表 2 各组大鼠脑组织 VPS34、Beclin1 和 LC3 的 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	时间点	动物数 (只)	VPS34 mRNA (相对表达量)	Beclin1 mRNA (相对表达量)	LC3 mRNA (相对表达量)
假手术组	制模 12 h	3	1.00±0.28	1.00±0.29	1.00±0.30
	制模 24 h	3	1.00±0.28	1.00±0.29	1.00±0.30
	制模 48 h	3	1.00±0.28	1.00±0.29	1.00±0.30
CPR 组	制模 12 h	3	3.59±0.33 <sup>a</sup>	3.12±0.39 <sup>a</sup>	2.63±0.38 <sup>a</sup>
	制模 24 h	3	4.66±1.18 <sup>a</sup>	4.04±0.22 <sup>a</sup>	3.67±0.62 <sup>a</sup>
	制模 48 h	3	3.77±0.58 <sup>a</sup>	3.28±0.19 <sup>a</sup>	3.18±0.68 <sup>a</sup>
CPR+6-SH 组	制模 12 h	3	2.85±0.43 <sup>ab</sup>	2.08±0.36 <sup>ab</sup>	1.93±0.32 <sup>ab</sup>
	制模 24 h	3	3.63±0.49 <sup>ab</sup>	3.08±0.49 <sup>ab</sup>	2.60±0.36 <sup>ab</sup>
	制模 48 h	3	3.09±0.70 <sup>ab</sup>	2.73±0.22 <sup>ab</sup>	1.84±0.60 <sup>ab</sup>

注: VPS34 为空泡分选蛋白 34, Beclin1 为自噬相关蛋白, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, CPR 为心肺复苏, 6-SH 为 6-姜烯酚; 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 CPR 组比较; <sup>b</sup> $P < 0.05$

**表 3 各组大鼠脑组织 VPS34、Beclin1 和 LC3 的蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	时间点	动物数 (只)	VPS34/ $\beta$ -actin	Beclin1/ $\beta$ -actin	LC3/ $\beta$ -actin
假手术组	制模 12 h	3	1.00±0.04	1.00±0.00	1.00±0.26
	制模 24 h	3	1.00±0.04	1.00±0.00	1.00±0.26
	制模 48 h	3	1.00±0.04	1.00±0.00	1.00±0.26
CPR 组	制模 12 h	3	2.93±0.02 <sup>a</sup>	2.44±0.05 <sup>a</sup>	2.45±0.15 <sup>a</sup>
	制模 24 h	3	3.46±0.05 <sup>a</sup>	2.87±0.03 <sup>a</sup>	3.17±0.23 <sup>a</sup>
	制模 48 h	3	2.78±0.03 <sup>a</sup>	2.11±0.07 <sup>a</sup>	1.89±0.27 <sup>a</sup>
CPR+6-SH 组	制模 12 h	3	1.33±0.98 <sup>ab</sup>	1.70±0.04 <sup>ab</sup>	1.58±0.13 <sup>ab</sup>
	制模 24 h	3	2.55±0.06 <sup>ab</sup>	2.12±0.03 <sup>ab</sup>	2.03±0.24 <sup>ab</sup>
	制模 48 h	3	1.79±0.03 <sup>ab</sup>	1.49±0.05 <sup>ab</sup>	1.62±0.28 <sup>ab</sup>

注: VPS34 为空泡分选蛋白 34, Beclin1 为自噬相关蛋白, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白, CPR 为心肺复苏, 6-SH 为 6-姜烯酚; 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 CPR 组比较; <sup>b</sup> $P < 0.05$

**表 4 各组大鼠脑组织 Beclin1 和 LC3 的荧光强度表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

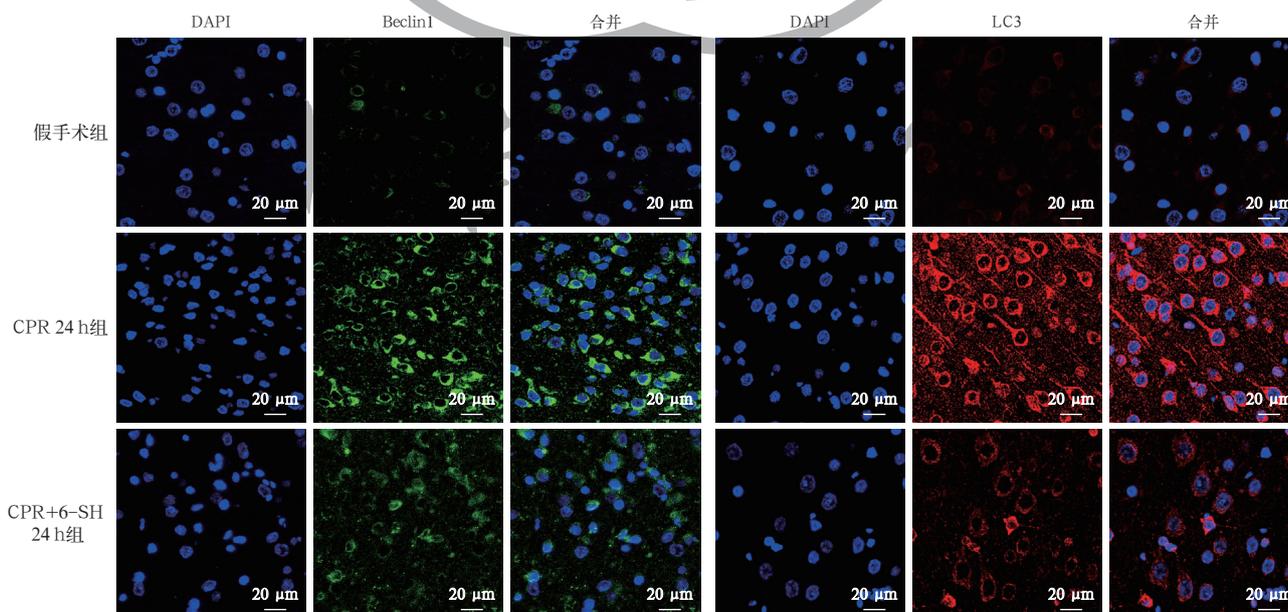
组别	动物数 (只)	Beclin1 (荧光强度)	LC3 (荧光强度)
假手术组	3	1.00±0.05	1.00±0.06
CPR 24 h 组	3	8.75±0.16 <sup>a</sup>	7.17±0.17
CPR+6-SH 24 h 组	3	5.49±0.18 <sup>b</sup>	4.94±0.13

注: Beclin1 为自噬相关蛋白, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, CPR 为心肺复苏, 6-SH 为 6-姜烯酚; 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 CPR 24 h 组比较; <sup>b</sup> $P < 0.05$

**2.6 6-SH 可促进 CPR 后大鼠脑组织 DAPK1 磷酸化、抑制 DAPK1 表达:** RT-qPCR 检测结果显示 (表 5), 与假手术组比较, CPR 各亚组和 CPR+6-SH 各亚组大鼠脑组织 DAPK1 mRNA 表达均显著升高 (均  $P < 0.05$ ), 以 CPR 24 h 组变化最显著; 与 CPR 各亚组比较, CPR+6-SH 各亚组大鼠脑组织 DAPK1 mRNA 表达均显著降低 (均  $P < 0.05$ )。Western blotting 检测结果显示 (图 6; 表 5), 与假手术组比较, CPR 各亚组和 CPR+6-SH 各亚组大鼠脑组织 DAPK1 的蛋白表达均显著升高, p-DAPK1 ser308 表达均显著降低 (均  $P < 0.05$ ), 以 CPR 24 h 组变化最显著; 与 CPR 各亚组比较, CPR+6-SH 各亚组大鼠脑组织 DAPK1 的蛋白表达均显著降低, p-DAPK1 ser308 的蛋白表达均显著升高 (均  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

脑 CIRI 是一种严重的神经系统损伤, 分为局部脑 CIRI 和全脑 CIRI<sup>[20-21]</sup>。目前脑 CIRI 研究主要

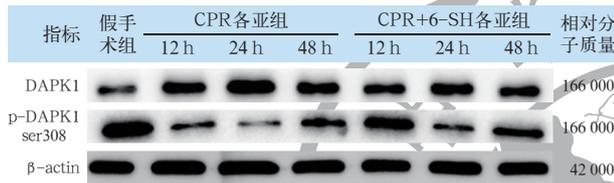


**图 5 荧光显微镜下观察各组大鼠脑组织自噬相关蛋白 Beclin1 和微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 的荧光表达** Beclin1 表达呈绿色, LC3 表达呈红色, 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染细胞核呈蓝色。假手术组脑组织 Beclin1 和 LC3 荧光信号较弱, 呈散在分布; 心肺复苏 (CPR) 组脑组织 Beclin1 和 LC3 荧光显著增强, 呈弥漫分布; CPR+6-姜烯酚 (6-SH) 组脑组织 Beclin1 和 LC3 荧光强度较 CPR 组明显减弱。免疫荧光染色。高倍放大

**表 5 各组大鼠脑组织 DAPK1 的 mRNA 表达及 DAPK1 和 p-DAPK1 ser308 的蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	时间点	动物数 (只)	DAPK1 mRNA (相对表达量)	DAPK1/ $\beta$ -actin	p-DAPK1 ser308/ $\beta$ -actin
假手术组	制模 12 h	3	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.08
	制模 24 h	3	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.08
	制模 48 h	3	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.08
CPR 组	制模 12 h	3	3.49 ± 0.52 <sup>a</sup>	1.95 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.02 <sup>a</sup>
	制模 24 h	3	4.48 ± 0.62 <sup>a</sup>	2.47 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.07 <sup>a</sup>
	制模 48 h	3	3.25 ± 0.43 <sup>a</sup>	1.90 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.07 <sup>a</sup>
CPR+6-SH 组	制模 12 h	3	2.32 ± 0.27 <sup>ab</sup>	1.27 ± 0.17 <sup>ab</sup>	0.64 ± 0.12 <sup>ab</sup>
	制模 24 h	3	3.41 ± 0.68 <sup>ab</sup>	1.88 ± 0.22 <sup>ab</sup>	0.40 ± 0.02 <sup>ab</sup>
	制模 48 h	3	2.70 ± 0.24 <sup>ab</sup>	1.35 ± 0.14 <sup>ab</sup>	0.66 ± 0.04 <sup>ab</sup>

注: DAPK1 为死亡相关蛋白激酶 1, p-DAPK1 为磷酸化 DAPK1,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白, CPR 为心肺复苏, 6-SH 为 6-姜烯酚; 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 CPR 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$



DAPK1 为死亡相关蛋白激酶 1, p-DAPK1 为磷酸化 DAPK1,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白, CPR 为心肺复苏, 6-SH 为 6-姜烯酚

**图 6 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组大鼠脑组织 DAPK1 和 p-DAPK1 ser308 的蛋白表达**

聚焦于局部脑 CIRI, 但全脑 CIRI 与局部脑 CIRI 在严重性方面存在明显差异。全脑 CIRI 通常指整个大脑缺血后重新灌注的情况, 可能发生在 CA、严重心律失常或低血压灌注等情况下, 具有更广泛、更严重、更复杂的特点<sup>[22]</sup>。尽管全脑 CIRI 领域的研究取得了一些进展<sup>[23-26]</sup>, 但其机制尚不明确。

本研究通过窒息法诱导大鼠 CA, 构建全脑 CIRI 模型, 深入探讨了脑 CIRI 导致神经细胞过度自噬的机制, 并评估了 6-SH 调节 DAPK1 对该过程的影响。

首先, 本研究显示, CPR 后 24 h 是大鼠脑损伤最严重的时间点。本实验观察到大鼠 CPR 后 24 h 的 NDS 评分最高, 伴随着严重的脑组织病理损伤, 这与临床上 CPR 后脑损伤患者早期病情较重相符合<sup>[27]</sup>。此外, 透射电镜下观察显示, CPR 24 h 组的神经元超微结构损伤最为显著, 伴随着大量自噬小体的形成。进一步的分子生物学分析显示, 与假手术 24 h 组相比, CPR 24 h 组 DAPK1 的 mRNA 和蛋白表达显著升高, 同时 p-DAPK1 ser308 的蛋白表达显著降低, 这反映了 DAPK1 活性的增加可能与细胞死亡途径的激活有关。

其次, 本研究验证了 DAPK1 在全脑 CIRI 中的关键作用。DAPK1 是一种钙调蛋白依赖性丝氨酸/苏

氨酸蛋白激酶, 在大脑中高度表达, 已被证明参与调控细胞凋亡和自噬等过程<sup>[28-29]</sup>。DAPK1 的活性受到 p-DAPK1 ser308 磷酸化水平的调控。有研究表明, 在脑缺血等应激状态下, 钙离子通过激活 CaM 促进其与蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 结合, 去磷酸化 Ser308 并活化 DAPK1; 活化的 DAPK1 通过两种机制调控 VPS34 复合物, 促进自噬体形成: 一是激活磷酸化蛋白激酶 D (protein kinases D, PKD), 间接磷酸化 VPS34; 二是直接磷酸化 Beclin1, 促进其脱离 Bel-2, 增强 Beclin1-VPS34 复合物形成, 提升自噬流并诱导自噬性细胞死亡<sup>[30]</sup>。上述研究表明, 脑 CIRI 会引起自噬的过度激活。本研究通过构建全脑 CIRI 模型得到了相同的结果, CPR 后大鼠脑组织 DAPK1 表达显著升高, p-DAPK1 ser308 表达显著降低, 表明全脑 CIRI 后 DAPK1 去磷酸化从而激活 DAPK1, 活化后的 DAPK1 引起过度自噬; 透射电镜下可见自噬体及自噬溶酶体数量明显增加, 同时自噬相关蛋白和基因如 VPS34、Beclin1、LC3 的表达显著上调, 提示神经元在全脑 CIRI 后自噬活性增强。

最后, 本研究明确了 6-SH 在 CPR 后脑损伤的神经保护作用。6-SH 是干姜中最丰富的姜辣素类似物, 具有多种生物活性。研究显示, 6-SH 通过抑制神经炎症途径发挥神经保护作用, 提示 6-SH 可能是潜在的神经保护剂<sup>[31]</sup>。Nazim 和 Park<sup>[32]</sup> 研究发现, 6-SH 处理会增加 p62 的表达并减少 LC3 的表达, 抑制自噬, 减轻细胞死亡。本实验观察到 6-SH 处理可显著降低大鼠 NDS 评分, 减轻脑组织的病理损伤; 透射电镜下观察进一步显示, 相比 CPR 组, CPR+6-SH 组细胞损伤减轻, 自噬体数量减少。这可能表明 6-SH 通过保护神经元的超微结构, 减少自噬体的形成来发挥神经保护作用。此外, 分子生物学分析结果显示, 6-SH 治疗能够降低自噬相关基因和蛋白的表达水平, 同时促进 DAPK1 ser308 位点的磷酸化, 并降低 DAPK1 的表达水平。这提示 6-SH 可能通过调节抑制 DAPK1 介导的自噬来实现其神经保护作用。

尽管本实验结果显示 6-SH 对 CA-CPR 后脑损伤具有神经保护作用, 但仍然存在一些不足之处。首先, 本研究只设置了 20 mg/kg 的 6-SH 剂量, 未来的研究应该探索不同剂量下 6-SH 的效应, 并确定最佳的治疗剂量; 其次, 本研究动物模型的 CA 时间是 4 min, ROSC 后设置了 12、24、48 h 3 个观察点, 这并

不能完全反映临床上各种 CA 患者的 CPR 情况,因此未来的研究有待设置更长的 CA 时间和观察点。

综上所述,本研究表明,CA 大鼠 CPR 后,DAPK1 被激活引起过度自噬,加重脑损伤;6-SH 能够抑制 DAPK1 的表达,减轻大鼠 CPR 后脑损伤的过度自噬,发挥神经保护作用,其机制可能与 DAPK1 ser308 位点磷酸化有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Greif R, Bray JE, Djäv T, et al. 2024 international consensus on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science with treatment recommendations: summary from the basic life support; advanced life support; pediatric life support; neonatal life support; education, implementation, and teams; and first aid task forces [J]. *Circulation*, 2024, 150 (24): e580–e687. DOI: 10.1161/CIR.0000000000001288.
- [2] Abrams D, MacLaren G, Lorusso R, et al. Extracorporeal cardiopulmonary resuscitation in adults: evidence and implications [J]. *Intensive Care Med*, 2022, 48 (1): 1–15. DOI: 10.1007/s00134-021-06514-y.
- [3] 夏澳林, 华天凤, 杨旻. 《国际复苏联络委员会关于改善心搏骤停后脑损伤预后的科学声明》摘译与解读 [J]. *中华危重病急救医学*, 2025, 37 (2): 97–102. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240921-00782.
- [4] Sandroni C, Cronberg T, Sekhon M. Brain injury after cardiac arrest: pathophysiology, treatment, and prognosis [J]. *Intensive Care Med*, 2021, 47 (12): 1393–1414. DOI: 10.1007/s00134-021-06548-2.
- [5] 李世欣, 饶欧阳, 朱宁, 等. 6-姜烯酚通过调控微小 RNA-26a-5p/DAPK1 减轻脑缺血/再灌注损伤的机制研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2024, 36 (6): 616–623. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240111-00031.
- [6] Khan ZA, Sumsuzzman DM, Choi J, et al. Neurodegenerative effect of DAPK1 after cerebral hypoxia-ischemia is associated with its post-transcriptional and signal transduction regulations: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 76: 101593. DOI: 10.1016/j.arr.2022.101593.
- [7] Won J, Lee S, Ahmad Khan Z, et al. Suppression of DAPK1 reduces ischemic brain injury through inhibiting cell death signaling and promoting neural remodeling [J]. *Brain Res*, 2023, 1820: 148588. DOI: 10.1016/j.brainres.2023.148588.
- [8] Liu SZ, Yao SJ, Yang H, et al. Autophagy: regulator of cell death [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14 (10): 648. DOI: 10.1038/s41419-023-06154-8.
- [9] Peng SJ, Yu SP, Zhang JM, et al. 6-shogaol as a novel thioredoxin reductase inhibitor induces oxidative-stress-mediated apoptosis in HeLa cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (5): 4966. DOI: 10.3390/ijms24054966.
- [10] Jia YX, Li X, Meng XQ, et al. Anticancer perspective of 6-shogaol: anticancer properties, mechanism of action, synergism and delivery system [J]. *Chin Med*, 2023, 18 (1): 138. DOI: 10.1186/s13020-023-00839-0.
- [11] da Rosa N, de Medeiros FD, de Oliveira J, et al. 6-shogaol exerts a neuroprotective factor in offspring after maternal immune activation in rats [J]. *Dev Neurosci*, 2022, 44 (1): 13–22. DOI: 10.1159/000519992.
- [12] Shim S, Kim S, Kwon YB, et al. Protection by [6]-shogaol against lipopolysaccharide-induced toxicity in murine astrocytes is related to production of brain-derived neurotrophic factor [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50 (3–4): 597–602. DOI: 10.1016/j.fct.2011.11.042.
- [13] Simon A, Darsci A, Kéry Á, et al. Blood-brain barrier permeability study of ginger constituents [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 177: 112820. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.112820.
- [14] Li LL, Cui Y, Guo XH, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of gingerols and shogaols from ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) in Rats by UPLC-Q-Exactive-HRMS [J]. *Molecules*, 2019, 24 (3): 512. DOI: 10.3390/molecules24030512.
- [15] Kou XR, Wang XQ, Ji RY, et al. Occurrence, biological activity and metabolism of 6-shogaol [J]. *Food Funct*, 2018, 9 (3): 1310–1327. DOI: 10.1039/c7fo01354j.
- [16] Ajeigbe OF, Maruf OR, Anyebe DA, et al. 6-Shogaol suppresses AOM/DSS-mediated colorectal adenoma through its antioxidant and anti-inflammatory effects in mice [J]. *J Food Biochem*, 2022, 46 (12): e14422. DOI: 10.1111/jfb.14422.
- [17] Qiu JL, Chai YN, Duan FY, et al. 6-Shogaol alleviates CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis by attenuating inflammatory response in mice through the NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Acta Biochim Pol*, 2022, 69 (2): 363–370. DOI: 10.18388/abp.2020\_5802.
- [18] Na JY, Song K, Lee JW, et al. Pretreatment of 6-shogaol attenuates oxidative stress and inflammation in middle cerebral artery occlusion-induced mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 788: 241–247. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.06.044.
- [19] Jia XF, Koenig MA, Nickl R, et al. Early electrophysiologic markers predict functional outcome associated with temperature manipulation after cardiac arrest in rats [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36 (6): 1909–1916. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181760eb5.
- [20] Jureau A, Simion A. Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: from pathophysiology to therapeutic strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23 (1): 14. DOI: 10.3390/ijms23010014.
- [21] Zhang Q, Jia M, Wang YF, et al. Cell death mechanisms in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47 (12): 3525–3542. DOI: 10.1007/s11064-022-03697-8.
- [22] Aoki T, Wong V, Endo Y, et al. Bio-physiological susceptibility of the brain, heart, and lungs to systemic ischemia reperfusion and hyperoxia-induced injury in post-cardiac arrest rats [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 3419. DOI: 10.1038/s41598-023-30120-1.
- [23] 赵彦叶, 顾乃刚. 影响院前急救心肺复苏成功的因素及提升策略分析 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2021, 28 (2): 154–158. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.02.007.
- [24] 马旭, 王云, 潘彤洁, 等. 心肺复苏后脑功能临床评价指标研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2024, 36 (12): 1329–1333. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240318-00245.
- [25] 王建红, 周满红. S-亚硝基化谷胱甘肽还原酶抑制剂调控心搏骤停-心肺复苏后脑损伤的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34 (9): 995–998. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-202100203-00198.
- [26] 丁福来. 体外心肺复苏在急诊心搏骤停患者中的应用研究 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2023, 30 (4): 436–438. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2023.04.010.
- [27] Medicherla CB, Lewis A. The critically ill brain after cardiac arrest [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2022, 1507 (1): 12–22. DOI: 10.1111/nyas.14423.
- [28] Luo QQ, Tian Y, Qu GJ, et al. The targeting of DAPK1 with miR-190a-3p promotes autophagy in trophoblast cells [J]. *Mol Reprod Dev*, 2024, 91 (1): e23724. DOI: 10.1002/mrd.23724.
- [29] Wu SY, Lu W, Cheng GB, et al. DAPK1 may be a potential biomarker for arterial aneurysm in clinical treatment and activated inflammation levels in arterial aneurysm through NLRP3 inflammasome by Beclin1 [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2021, 40 (12\_suppl): S563–S572. DOI: 10.1177/09603271211041667.
- [30] Tu WH, Xu X, Peng LS, et al. DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke [J]. *Cell*, 2010, 140 (2): 222–234. DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.055.
- [31] Ishaq S, Siyar S, Basri R, et al. Neuroprotective effects of shogaol in metals (Al, As and Pb) and high-fat diet-induced neuroinflammation and behavior in mice [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2023, 16 (7): 725–750. DOI: 10.2174/1874467215666220928110557.
- [32] Nazim UM, Park SY. Attenuation of autophagy flux by 6-shogaol sensitizes human liver cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via p53 and ROS [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43 (2): 701–708. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3994.

(收稿日期: 2024-07-24)

(责任编辑: 张耘菲)