

益气活血法对大鼠脑缺血再灌注损伤后 PI3K/AKT 通路的影响*

郜 峦¹, 王 键^{△1}, 胡建鹏¹, 何 玲¹, 管 威¹, 唐 巍¹, 王晓戎²

(1. 安徽中医学院, 安徽合肥 230038; 2. 安徽中医药高等专科学校, 安徽芜湖 241000)

〔摘 要〕目的: 观察局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带 PI3K/AKT 通路的动态表达及益气活血方药对其影响。方法: 以线栓法阻塞大鼠左侧大脑中动脉, 复制局灶性脑缺血再灌注模型, 缺血 2h 再灌注 3、7、14d, 用免疫组织化学染色 SABC 法分别检测缺血半暗带 PI3K/AKT 的表达。结果: 脑缺血再灌注损伤发生后, 模型组 PI3K/AKT 表达增加。活血组在脑缺血再灌注 14d, 能够明显增加 PI3K/AKT 的表达 ($P < 0.001$)。益气活血组在脑缺血再灌注 3d、7d、14d, 能够明显增加 PI3K/AKT 的表达 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。组间比较显示, 益气活血组在脑缺血再灌注 14d 显著优于益气组和活血组 ($P < 0.01$)。结论: 益气活血法能上调细胞存活信号通路 PI3K/AKT 通路的表达, 从而对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织产生保护作用。

〔关键词〕 益气活血法; 脑缺血再灌注损伤; PI3K/AKT 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2012)04—0022—03

脑血管病是威胁人类健康的三大疾病之一, 以其发病率高、复发率高、致残率高、死亡率高的特点给社会和家庭带来沉重的负担, 综述表明, 在发达国家, 中风是第三个最常见的死亡原因, 也是成年中致残的最主要原因, 带来了极重的社会负担和经济负担^[1]。其中, 缺血性脑卒中最为多见, 卒中后智力障碍与肢体致残是一严重的社会问题和医学难题。因此, 研究如何促进神经再生, 重建神经网络, 修复损伤的脑组织, 从而提高患者的生活质量, 有着十分重大的意义。随着脑缺血研究的不断深入, 中医药的防治日益得到医学界的重视。多年来, 我们课题组一直从事中医药防治中风治则治法研究, 较好地阐明了名老中医王乐旬教授所创立的益气活血法及其代表方剂脑络欣通的神经保护作用。本次研究拟选用大脑中动脉线栓法制作局灶性脑缺血再灌注大鼠模型, 观察局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠缺血半暗带 PI3K/AKT 通路的动态表达及益气活血方药对其影响, 探讨其神经保护机制。

1 材料

1.1 实验动物

健康 SD 大鼠 120 只, 体重 280 ~ 320g, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(皖) 2011—002, 实验前饲养观察 3d。

1.2 药物与试剂

益气活血法方组药物为脑络欣通(由黄芪、川芎、当归、三七、蜈蚣等组成), 益气法组药物为黄芪, 活血法组方为川芎、当归、三七、蜈蚣等构成。PI3K/AKT 试剂盒、DAB 显色剂均由武汉博士德生物科技有限公司提供。

1.3 主要仪器

T3—200 型分析天平: 成都科学仪器厂。101—A 恒温干燥箱: 宁波自动化仪表厂。石蜡包埋机: 英国 HIS2TOCENTRE 公司。石蜡切片机: 英国 FINESSE 公司。OLYMPUS VANOX 显微镜。

2 方法

2.1 分组方法

* 基金项目: 国家自然科学基金(NO: 81102547); 国家自然科学基金(NO: 30873293); 安徽省教育厅省级自然科学研究重点项目(NO: KJ2010A212)

收稿日期: 2012—06—26 修回日期: 2012—07—16

作者简介: 郜峦(1978~), 女, 安徽淮北人, 博士, 副教授, 主要研究方向: 中医药防治中风脑病研究。△通讯作者: 王键, E-mail: wangjian6301@163.com

实验动物随机分为假手术组、模型组、益气活血法方组（脑络欣通组）、益气法方组、活血法方组。每组再分为缺血再灌注 3d, 7d, 14d 3 个亚组。

2.2 模型制作方法

参考 Longa 大脑中动脉线栓法改良制作局灶性脑缺血再灌注动物模型。动物称重后，以 10% 水合氯醛（0.36mL/100g 体重）麻醉大鼠，颈前术区脱毛、消毒，沿颈部正中线切开皮肤，逐层分离暴露颈总、颈外、颈内动脉，结扎并剪断颈外动脉远心端，从近心端做切口置入直径为 0.25mm 尼龙线，（头端加热成直径约 0.30mm 的圆球形）由颈外向颈内插入约 18 ~ 20mm，感觉少许阻力为止，阻断大脑中动脉血流，逐层缝合切口。缺血 2h 后再灌注时，将尼龙线拔出约 10mm。模型成功的标志为出现同侧 Horner 征和对侧前肢为重的偏瘫。假手术组只分离，不插入尼龙线。

2.3 给药方法

益气方、活血方、益气活血方由安徽中医学院中药制剂室制备成汤剂，根据以往药效学实验结果，益气、活血、益气活血组分别按 3.5g/kg、5.04g/kg、8.54g/kg（即 1.42mL/kg, 1.56 mL/kg, 1.34 mL/kg），每日总剂量分早晚 2 次灌胃使用。假手术组及模型组按同样方法予以等量生理盐水灌胃。给药时间分别为 3d, 7d, 14d。

2.4 取材方法

每组动物均于缺血 2h 再灌注，分别于脑缺血再灌注 3d, 7d, 14d 后麻醉大鼠，打开胸腔，于右心耳部剪一小口，从左心室插入导管至主动脉，向主动脉内缓慢注入 37℃ 肝素化的生理盐水 200mL，至右心房流出液变清亮，注入 4% 多聚甲醛溶液 250mL 进行内固定，然后立即取出大脑，正中割开，置于 4% 多聚甲醛溶液中固定。固定 1 周脱水、透明、浸蜡，连续脑部冠状切片。

2.5 指标检测方法

PI3K、AKT 指标均用免疫组织化学 SABC 法测定，均由专业人员严格按试剂盒说明书进行操作。

2.6 统计学方法

用南京捷达 801 图像分析系统对 PI3K、AKT 免疫组织化学染色阳性细胞平均吸收光密度进行图像分析，取平均值。数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示，用 SPSS13.0 for Windows 软件处理，采用方差分析。

3 结果

表 1 不同时间点益气活血法对 PI3K 影响

组别	3d	7d	14d
假手术组	0.35 ± 0.05	0.30 ± 0.04	0.31 ± 0.06
模型组	0.51 ± 0.14	0.51 ± 0.14 [△]	0.57 ± 0.12 [△]
益气组	0.65 ± 0.25	0.57 ± 0.10	0.57 ± 0.15 ^{##}
活血组	0.72 ± 0.25	0.67 ± 0.32	0.93 ± 0.33 ^{*#}
益气活血组	0.78 ± 0.12 [*]	0.87 ± 0.21 [*]	1.00 ± 0.15 ^{*#}

和假手术比较， $\Delta P < 0.05$ 。和模型组比较， $* P < 0.01$ ， $* * P < 0.001$ 。和益气活血组组间比较， $\# P < 0.01$ ； $\# \# P < 0.001$ （下同）

表 2 不同时间点益气活血法对 AKT 影响

组别	3d	7d	14d
假手术组	0.23 ± 0.04	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.03
模型组	0.34 ± 0.04	0.38 ± 0.08	0.38 ± 0.06
益气组	0.38 ± 0.12 ^{##}	0.40 ± 0.15 ^{##}	0.46 ± 0.15 ^{##}
活血组	0.53 ± 0.12 [#]	0.56 ± 0.15	0.85 ± 0.14 ^{*#}
益气活血组	0.73 ± 0.12 [*]	0.82 ± 0.09 ^{**}	1.08 ± 0.13 ^{*#}

实验结果显示，脑缺血再灌注损伤发生后，模型组和假手术比较，PI3K、AKT 表达增加。其中缺血再灌注 7d, 14d，模型组 PI3K 表达显著高于假手术组。和模型组比较，益气组、活血组、益气活血组 PI3K、AKT 表达均增加。其中，活血组在脑缺血再灌注 14d，能够明显增加 PI3K、AKT 的表达。益气活血组在脑缺血再灌注 3d, 7d, 14d，能够明显增加 PI3K、AKT 的表达。

组间比较显示，益气活血组在脑缺血再灌注 14d，能够明显增加 PI3K、AKT 的表达，显著优于益气组和活血组。而活血组在脑缺血再灌注 14d，能够明显增加 PI3K、AKT 的表达，显著优于益气组。

4 讨论

脑缺血再灌注损伤是一个涉及多环节、多因素、多途径损伤的过程，目前尚缺乏治疗特效的药物和方法，已有的研究表明中医理论指导下的中医药及针灸疗法都具有整体良性调节作用^[2-3]。我们

课题组在既往的研究中,从形态学、血液流变学、凝血和纤溶、兴奋性氨基酸、自由基损伤、细胞因子调节网络、神经元与胶质细胞的关系、细胞凋亡及其信号转导通路、诱导干细胞增殖分化等环节,对益气活血法及其代表方剂脑络欣通进行了多角度研究,已证实了其具有较好的神经保护作用。

近年的研究表明,PI3K/AKT 信号转导途径是重要的细胞存活信号通路,在多种细胞因子介导的细胞生存中发挥重要作用^[4]。磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)是一种细胞内蛋白激酶,参与细胞的生长代谢、增殖分化及凋亡等多种生物过程。在神经系统中,PI3K 参与神经元和神经胶质细胞的生存和分化。PI3K 的主要下游信号分子是 AKT,又称蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB),是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。活化的 PI3K 催化产生 PI-3, 4-P2 和 PIP3,后者诱导无活性的 AKT 和磷脂酰肌醇依赖的激酶-1 转位至浆膜内表面,从而实现 AKT 的激活,通过 AKT 的活化引起下游靶基因的变化^[5-6]。近年来,更有学者日渐重视其在神经干细胞中的作用。如有研究提示神经干细胞存活依赖于 PI3K/AKT 途径的活化^[7]。另有学者应用 PI3K 特异性阻滞剂 LY294002 孵育大鼠神经干细胞,探讨 PI3K/AKT 信号转导通路在 NSCs 中的作用实验结果表明,PI3K/AKT 信号转导通路对大鼠 NSCs 的存活、增殖、分化起重要作用,且 LY294002 对 NSCs 的存活、增殖和分化的影响呈剂量依赖性^[8]。

本实验结果显示,脑缺血再灌注损伤发生后,模型组和假手术比较,PI3K、AKT 表达增加。PI3K/Akt 信号通路是细胞的凋亡过程中的一条重要存活通路,脑缺血再灌注发生后,PI3K/Akt 信号通路激活,起到神经保护作用。实验结果提示,脑缺血再灌注损伤发生后,益气活血组能够明显激活 PI3K/AKT 信号通路,且显著优于益气组和活血

组。而组间的比较还显示,活血组在脑缺血再灌注 14d,能够明显增加 PI3K、AKT 的表达,显著优于益气组。提示益气药物可能需配合活血方法一起使用,才能显示其最佳疗效。实验表明,益气活血法脑保护作用的可能机制是上调细胞存活信号通路 PI3K/Akt 通路的表达,从而对脑缺血模型大鼠脑组织产生保护作用,其具体作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Saeed Ansari, Maryam Rahman, Michael F, et al. Recanalization therapy for acute ischemic stroke, part 1: surgical embolectomy and chemical thrombolysis [J]. *Neurosurg Rev*, 2011, 34 (1): 1 - 9.
- [2] 许幸仪,王春雷. 通络 IV 号对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡的影响 [J]. *云南中医学院学报*, 2007, 30 (4): 38 - 40.
- [3] 周鹏,马晓明. 电针治疗脑缺血再灌注损伤机理的研究概况 [J]. *云南中医学院学报*, 2008, 31 (6): 72 - 74.
- [4] 聂莹雪,刘华岩,翟志勇. 大鼠脑缺血再灌注后海马组织 PI3K 信号通路的变化 [J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27 (10): 943 - 944.
- [5] 张薇薇. PI3K/AKT 信号通路及其在神经疾病中的研究进展 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2007, 24 (6): 755 - 757.
- [6] Waite K, Eickholt BJ. The neurodevelopmental implications of PI3K signaling [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 346: 245 - 265.
- [7] 王爽,贾延劼,谢鹏,等. 体外神经干细胞培养过程中蛋白激酶磷脂酰肌醇-3 激酶/AKT 信号途径的作用 [J]. *中国临床康复*, 2004, 8 (34): 7671 - 7674.
- [8] 赵宇,谢鹏,朱晓峰,等. 大鼠神经干细胞中 PI3K/AKT 信号转导通路的研究 [J]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2009, 29 (10): 1191 - 1195.

(编辑:迟越)