

. 实验研究 .

白藜芦醇对大鼠脑缺血再灌注损伤的作用

汪 雷 胡火军 马金阳 董元训 黄 松 符常涛 袁 高 周有东

【摘要】目的 探讨白藜芦醇(Res)预处理对脑缺血再灌注大鼠神经功能损伤的作用及其机制。**方法** 将 80 只成年雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、Res 组、Res+PI3K 抑制剂组,每组 20 只。以线栓法建立大脑中动脉阻塞后缺血再灌注模型。造模前 6 d,Res 组和 Res+PI3K 抑制剂组腹腔注射 Res(15 μg/g,1 次/d),假手术组和模型组腹腔注射等体积生理盐水;造模前 30 min,Res 组和 Res+PI3K 抑制剂组先腹腔注射 Res(15 μg/g),然后,Res+PI3K 组用微量注射器向右侧脑室注射 PI3K 抑制剂 3-MA 5 μl(50 μg),假手术组和模型组右侧脑室注射等体积生理盐水。造模后 24 h 处死大鼠采用 TTC 染色法评估大鼠脑梗死面积,取材前行神经功能评分;以尼氏染色以及透射电镜观察神经细胞尼氏体和自噬体数量;通过 Q-PCR 法检测脑组织自噬基因 mRNA 水平,免疫印迹法检测脑组织 PI3K/Akt/ mTOR 信号通路相关蛋白及磷酸化表达水平。**结果** 与假手术组相比,模型组神经功能评分明显增高($P<0.05$),脑梗死体积明显增大($P<0.05$),损伤脑组织尼氏体明显减少($P<0.05$),自噬相关基因 Beclin1 mRNA 水平明显升高($P<0.05$),PI3K、mTOR 和 Akt 蛋白表达水平无显著变化($P>0.05$),而各自蛋白磷酸化水平均显著降低($P<0.05$)。相比于模型组,Res 组上述变化明显改善($P<0.05$),而 PI3K 抑制剂明显抑制 Res 的作用($P<0.05$)。**结论** Res 能有效减轻缺血再灌注模型大鼠脑组织造成的神经功能损伤,可能与抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进细胞自噬有关。

【关键词】 脑缺血再灌注损伤;白藜芦醇;细胞自噬;神经保护作用;大鼠

【文章编号】 1009-153X(2020)05-0303-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743

Role of cell autophagy in protection of resveratrol against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

WANG Lei^{1,2}, HU Huo-jun^{1,2}, Ma Jin-yang², DONG Yuan-xun², HUANG Song², FU Chang-tao², YUAN Gao², ZHOU You-dong². 1. Institute of Neurology, The First Clinical Medical College of Three Gorges University, Yichang 443003, China; 2. Department of Neurosurgery, Yichang Central People's Hospital, Yichang 443003, China

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of resveratrol (Res) pretreatment on neurological damage in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods** Eighty adult male SD rats were randomly divided into four groups, i.e., sham operation group, model group, Res group, Res+PI3K inhibitor group, with 20 rats in each group. The model of ischemia-reperfusion injury was established by tread embolization of middle cerebral artery. Six days before injury, the rats in Res group and Res+PI3K inhibitor group were intraperitoneally injected with Res (15 μg/g, once a day), and the rats in sham operation group and model group were intraperitoneally injected with equal volume of saline. Thirty minutes before injury, the rats in Res group and Res+PI3K inhibitor group were injected with Res (15 μg/g) intraperitoneally. Then, the rats in Res+PI3K group was injected with PI3K inhibitor 3-MA (5 μl, 50 μg) into the right ventricle using a microsyringe. An equal volume of saline was injected into the right ventricle of rats in the model group. Twenty-four hours after injury, nerve function scores were assessed in all the rats and then were sacrificed. TTC staining method was used to evaluate the cerebral infarction area of rats. Nissl staining and transmission electron microscopy were used to observe the number of Nissl bodies and autophagosomes. The mRNA level of autophagy gene in brain tissue was detected by Q-PCR method. The protein and phosphorylation expression levels of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway were detected by immunoblotting. **Results** Compared with the sham operation group, the neurological function score was significantly increased ($P<0.05$), the volume of cerebral infarction was significantly increased ($P<0.05$), the damaged brain tissue Nissl body was significantly reduced ($P<0.05$), autophagy gene Beclin1 mRNA level was significantly increased ($P<0.05$), and the phosphorylation level of PI3K/Akt/mTOR protein was significantly reduced ($P<0.05$) in the model group. Compared with the model group, the above changes in the Res group were significantly improved ($P<0.05$), while PI3K inhibitors significantly inhibited the effect of Res ($P<0.05$). **Conclusions** Res can effectively reduce the neurological damage caused by ischemia-reperfusion injury in rats, which may be related to the promotion of cell autophagy by inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

【Key words】 I ischemia-reperfusion injury; Resveratrol; Autophagy; Neuroprotection; Rats

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.05.015
基金项目:湖北省卫生和计划生育委员会科研项目(WJ2017M221)
作者单位:443003 湖北宜昌,三峡大学第一临床医学院神经病学研究所(汪 雷、胡火军);443003 湖北,宜昌市中心人民医院神经外科(汪 雷、胡火军、马金阳、董元训、黄 松、符常涛、袁 高、周有东)

脑血管病病人继发脑功能障碍往往是神经元凋亡和脑微循环损伤的结果^[1]。静脉纤溶酶原激活剂是治疗急性缺血性脑卒中唯一有效的药物^[2],但治疗时间窗短,还有潜在的出血风险,只有一小部分病人获益^[3]。白藜芦醇(resveratrol, Res)是一种多酚类植物抗毒素,具有抗氧化、抗炎、抗凋亡及抗癌作用,能透过血脑屏障并发挥神经保护作用^[4,5]。有研究报道 Res 可以通过介导磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB 或 Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路发挥神经保护作用^[6]。本研究通过建立大鼠大脑中动脉阻塞缺血后再灌注模型,探讨 Res 对大鼠脑缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I-R)损伤的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 试剂 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-Triphenyl-tetrazolium Chloride, TTC)购自中国医药上海化学试剂公司, Res 和 3-MA 均购自美国 Sigma 公司, PCR 试剂盒购自南京 Vazyme 公司。兔多抗 mTOR 及 p-mTOR (289 KD) 购自美国 Affinity Biosciences 公司, 兔单抗 Akt 及 p-Akt (60 KD) 均购自美国 Cell Signaling 公司, 鼠单抗 PI3K (85 KD) 购自武汉三鹰生物技术有限公司, 兔多抗 p-PI3K (85KD) 购自美国 Abcam 公司, HRP 标记的羊抗小鼠和羊抗兔二抗均购自武汉博士德生物工程有限公司, 兔多抗 GAPDH (37 KD) 购自杭州贤至生物有限公司。

1.2 实验动物及分组 SPF 级雄性 SD 大鼠 80 只, 7 周龄, 体重 (250±30)g, 由武汉大学动物实验中心提供(合格证编号: SCXK 鄂 2016-0004)。大鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为假手术组、模型组、Res 组和 Res+PI3K 抑制剂组, 每组 20 只。

1.3 模型建立和干预 参照 Yanamoto 等^[7]报道的线栓法制备大鼠中动脉阻塞模型, 缺血 2 h, 再灌注 24 h。造模前 6 d, Res 组和 Res+PI3K 抑制剂组腹腔注射 Res (15 μg/g, 1 次/d), 假手术组和模型组腹腔注射等体积生理盐水; 造模前 30 min, Res 组和 Res+PI3K 抑制剂组先腹腔注射 Res (15 μg/g), 然后, Res+PI3K 抑制剂组用微量注射器向右侧脑室(前囟点旁开 1.6 mm, 向后 0.9 mm, 腔深 3.8 mm)注射 PI3K 抑制剂 3-MA 5 μl (50 μg), 假手术组和模型组右侧脑室注射等体积生理盐水。

1.4 神经功能评估 造模后 21 h, 采用 Zea Longa 评分

评估神经功能^[8]。

1.5 脑梗死体积的评估 造模后 24 h, 每组随机选取 4 只大鼠行 TTC 染色评估脑梗死体积。麻醉处死大鼠后, 取鼠脑置于 -20 度冰箱冷冻 20 min 后, 取出切片, 层厚 2 mm^[9]。然后, 将脑片置于 2% TTC 溶液中孵育, 完全显色后将其移入 4% 多聚甲醛中过夜固定后拍片。为避免因脑水肿产生数据误差, 我们采用梗死面积比[(对侧半球面积-患侧正常脑组织面积)/对侧半球面积]描述脑梗死程度。

1.6 尼氏染色观察脑组织尼氏体形态 术后 24 h, 每组随机选取 4 只大鼠以 10% 水合氯醛麻醉, 用生理盐水和 4% 多聚甲醛行心脏灌注和组织固定, 然后取鼠脑置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h, 经石蜡包埋、组织切片、脱蜡后, 再行 1% 的甲苯胺蓝染色, 95% 酒精快速分化, 脱色, 无水乙醇快速脱水, 二甲苯透明, 尼氏染色, 显微镜下观察。

1.7 透射电子显微镜观察自噬体形态 术后 24 h, 每组随机选取 4 只大鼠以 10% 水合氯醛麻醉, 采用 0.9% 生理盐水 250 ml 心脏灌注后, 再用 4% 多聚甲醛+2.5% 戊二醛混合液 250 ml 快速灌注固定, 然后, 快速分离右侧半球额顶区皮质, 大小约 1 mm³, 以预冷的 2% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛的 PBS 混合液 4℃ 固定过夜。再用四氧化锇固定 1 h, 梯度乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片(厚度 100 nm), 并用乙酸铀和柠檬酸铅染色, 最后在透射电子显微镜下观察。

1.8 PCR 检测脑组织自噬及凋亡相关基因转录水平 设计并合成大鼠 Beclin1 及 GAPDH 基因(内参照)的 PCR 引物。术后 24 h, 每组随机选取 4 只大鼠并收集脑缺血周边区组织约 50 mg, 分别提取其总 RNA 并予以定量检测。采用逆转录试剂盒(南京 Vazyme 公司)将 RNA 逆转录为 cDNA, 按其试剂盒操作说明进行 PCR 检测, 以 2^{-ΔΔCt} 法进行量化分析。beclin1 正义链 5'-GAGGTACCGACTTGTTCCT-3', 反义链 5'-CCTTTCTCCACGTCATCCT-3'。内参 GAPDH 正义链 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3', 5'-TTT-GAGGGTGCAGCGAACTT-3'。

1.9 免疫印迹法检测 mTOR、PI3K、Akt 及相应磷酸化水平 术后 24 h, 每组随机选取 4 只大鼠并分离脑缺血周边区组织, 提取各组织总蛋白, SDS-PAGE 分离各蛋白后转移到 PVDF 膜上。将 Akt (1:1 000), p-Akt (1:2 000), PI3K (1:4 000), p-PI3K (1:600), mTOR (1:1 000), p-mTOR (1:1 000) 相应一抗分别放入封闭液(5% 的脱脂奶粉的 TBST 溶液)中, 4℃ 孵育过夜, 分别加入辣根过氧化物酶标记二抗 (1:50 000), 室温

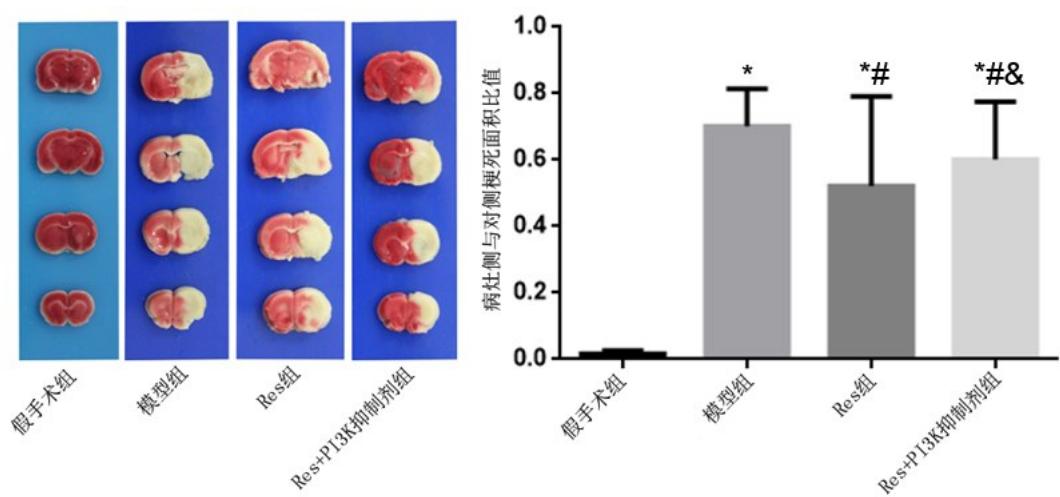


图1 各组脑组织TTC染色评估脑梗死体积比较
与假手术组相应值比,* $P<0.05$;与模型组相应值比,# $P<0.05$;与Res组相应值比,& $P<0.05$

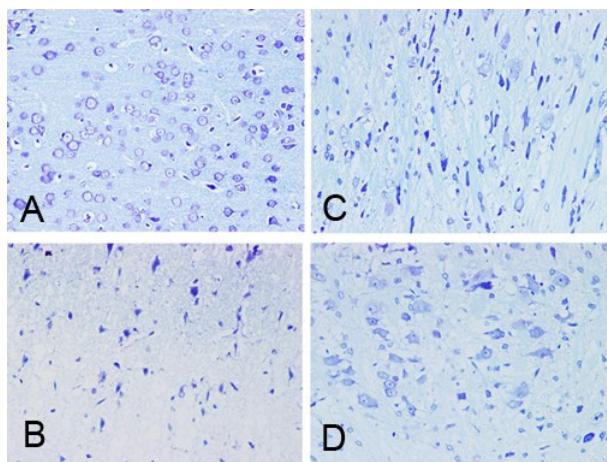


图2 各组大鼠脑组织尼氏染色,尼氏体呈蓝紫色,细胞核呈蓝色($\times 400$)

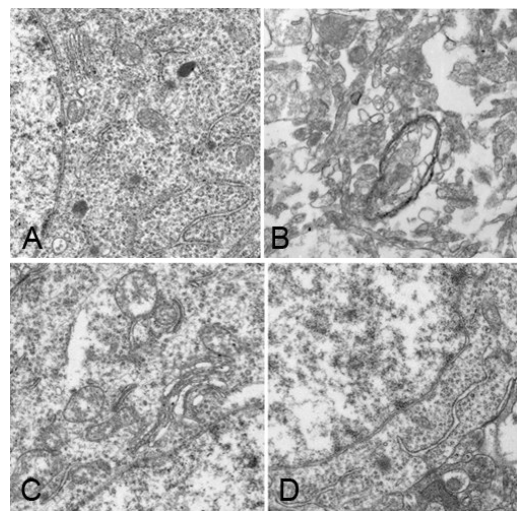


图3 电镜观察神经元自噬体形态($\times 5000$)
A. 假手术组;B. 模型组;C. Res组;D. Res+PI3K抑制剂组

孵2h,最后用增强化学发光显色,以GAPDH作内参。
1.10 统计学分析 采用SPSS 18.0进行分析;定量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用单因素方差分析; $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能评分比较 模型组Zea Longa评分[(3.09±0.19)分]明显高于假手术组[(0.19±0.16)分; $P<0.05$];与模型组比较,Res组Zea Longa评分[(1.95±0.24)分]和Res+PI3K抑制剂组Zea Longa评分[(2.66±0.22)分]均明显降低($PP<0.05$),而Res组和Res+PI3K抑制剂组之间无统计学差异($P>0.05$)。
2.2 各组大鼠脑梗死体积比较 假手术组大鼠脑组

织未见梗死灶;模型组、Res组和Res+PI3K抑制剂组大鼠右侧大脑半球皮层和皮层下可见明显白色梗死灶,左侧大脑半球脑组织呈正常红色。Res组和Res+PI3K抑制剂组脑梗死体积均明显小于模型组($P<0.05$),而且Res+PI3K抑制剂组脑梗死体积较Res组明显增大($P<0.05$)。见图1。
2.3 各组脑组织尼氏体形态比较 与假手术组相比,模型组尼氏体明显减少,而且染色加深,形状不规则。与模型组比较,Res组和Res+PI3K抑制剂组尼氏体数量则明显增加;与Res组比较,Res+PI3K抑制剂组尼氏体数量则相对减少。见图2。
2.4 各组脑组织自噬体形态比较 假手术组大鼠脑组织细胞质中线粒体、内质网、核糖体等结构清晰,

未见明显自噬泡;模型组可见明显细胞核固缩、碎裂、深染,胞膜轮廓不清,胞质疏松,可见大量空泡和液化灶,同时可见线粒体肿胀变形,线粒体嵴断裂;Res 组细胞形态结构基本正常,可见细胞质中线粒体、内质网、和双层膜自噬体等;Res+PI3K 抑制剂组可见少量自噬体和其他细胞器。见图3。

2.5 各组脑组织自噬相关基因转录水平比较 与假手术组相比,模型组 Beclin1 mRNA 水平明显升高 ($P<0.05$);与模型组相比,Res 组和 Res+PI3K 抑制剂组 Beclin1 mRNA 水平明显增高 ($P<0.05$);与 Res 组相比,Res+PI3K 抑制剂组 Beclin1 mRNA 水平明显降低 ($P<0.05$)。见图4。

2.6 各组脑组织自噬相关蛋白表达及其磷酸化水平比较 与假手术组相比,模型组 PI3K、mTOR 和 Akt 蛋白表达水平无显著差异 ($P>0.05$),而各自蛋白磷酸化水平均显著降低 ($P<0.05$);相比于模型组,Res 组

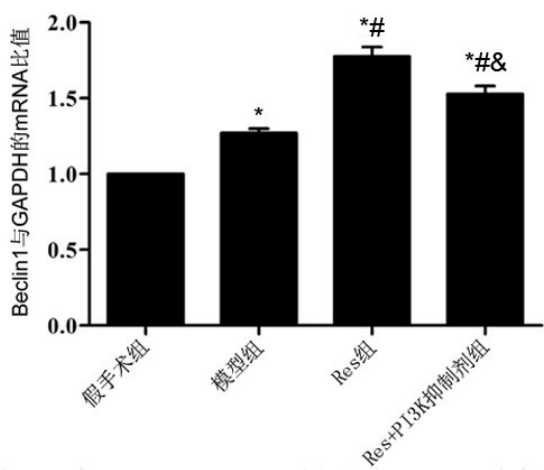


图4 各组大鼠脑组织自噬相关基因 Beclin 1 mRNA 水平比较
与假手术组相应值比,* $P<0.05$;与模型组相应值比,# $P<0.05$;与 Res 组相应值比,& $P<0.05$

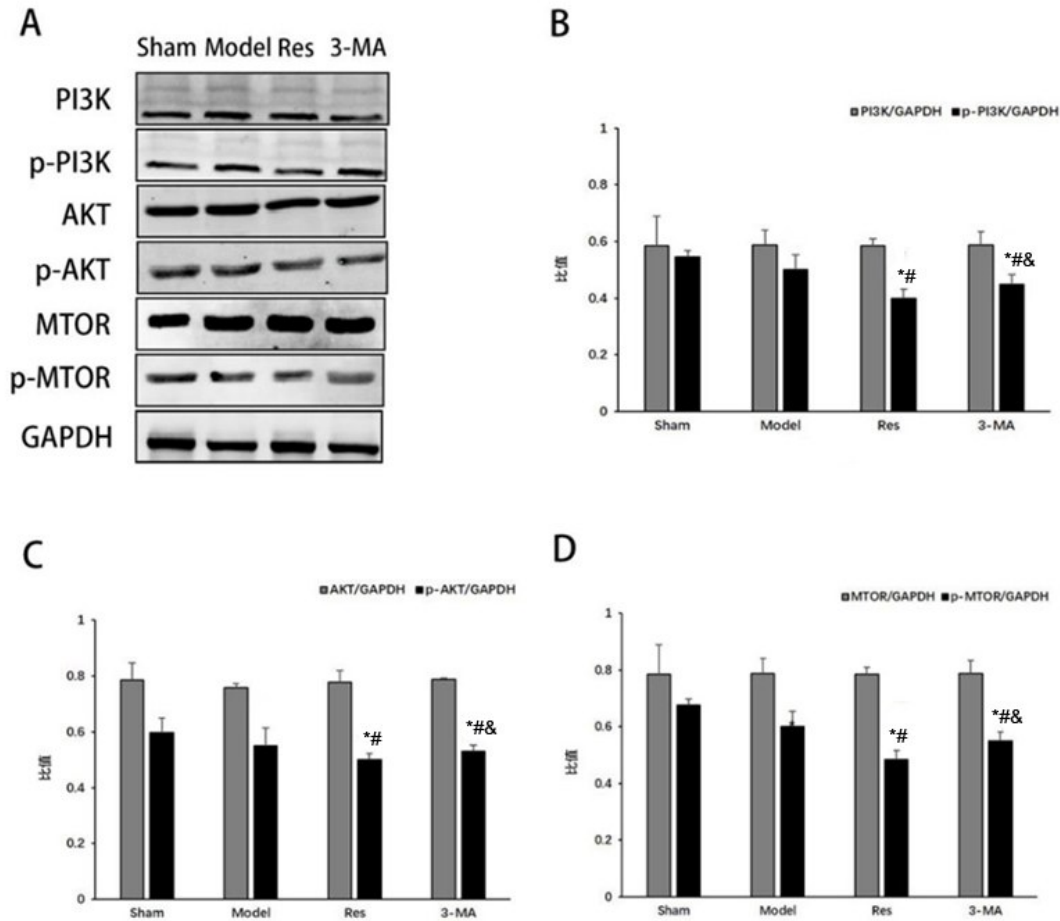


图5 各组脑组织自噬相关蛋白及其磷酸化水平比较

A. 自噬相关蛋白电泳图;B. PI3K/p-PI3K 水平比较;C. AKT/p-AKT 水平比较;D. MTOR/p-MTOR 水平比较;与假手术组相应值比,* $P<0.05$;与模型组相应值比,# $P<0.05$;与 Res 组相应值比,& $P<0.05$;Sham. 假手术组;Model. 模型组;3-MA. Res+PI3K 抑制剂组

和 Res+PI3K 抑制剂组 PI3K、mTOR 和 Akt 蛋白磷酸化水平明显下降($P<0.05$);和 Res 组相比,Res+PI3K 抑制剂组 PI3K、mTOR 和 Akt 蛋白磷酸化水平明显增加($P<0.05$)。见图 5。

3 讨论

本研究探讨 Res 对大鼠脑 I/R 损伤的神经保护作用,结果发现,Res 可明显改善脑 I/R 损伤大鼠的神经功能,其机制可能与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,促进细胞自噬有关。细胞自噬是一种细胞内的自消化途径,负责清除长寿蛋白、受损的细胞器和在溶酶体生物合成中形成的畸形蛋白^[10]。自噬是真核细胞降解和再循环胞质内容物的主要细胞保护途径,对机体维持稳态起着重要的作用,适度的自噬可抑制炎症及凋亡^[11]。生理条件下,自噬被触发以维持体内平衡功能,并在营养缺乏或应激(如 I/R 损伤)时上调,以提供氨基酸和产生能量。在病理生理条件下,自噬功能障碍的特点是不能清除受损的细胞器或碎片^[12]。对 I/R 损伤后组织自噬的研究表明,受损线粒体的累积导致活性氧生成增加,促进细胞坏死和组织损伤^[13]。因此,改善脑组织对 I/R 损伤的自噬反应可以降低细胞凋亡和坏死水平,保护组织功能。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路是促进缺血神经细胞修复和生存的重要信号通路,而且与细胞自噬的激活紧密相关^[14]。本研究发现,Res 组大鼠神经元内可观察到自噬体,同时 Res 组大鼠脑内自噬相关基因 Beclin1 mRNA 表达水平也明显增高,表明 Res 通过促进脑 I/R 诱导的自噬水平,从而促进神经元存活;免疫印迹法检测结果显示 Res 能显著下调脑 I/R 损伤大鼠脑组织 p-PI3K、p-Akt、p-MTOR 水平,而 PI3K 抑制剂 3-MA 能够削弱 Res 的作用。这表明 Res 的自噬促进作用可能是通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路来实现的。

综上所述,Res 可以改善大鼠脑组织 I/R 损伤,可能与下调 PI3K、Akt、mTOR 等蛋白磷酸化水平、抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路、调控细胞自噬水平有关。

【参考文献】

[1] Baron JC, Yamauchi H, Fujioka M, *et al.* Selective neuronal loss in ischemic stroke and cerebrovascular disease [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2014, 34(1): 2-18.

[2] Molina CA, Alvarez-Sabin J. Recanalization and reperfusion therapies for acute ischemic stroke [J]. Cerebrovasc Dis, 2009, 27 Suppl 1: 162-167.

[3] Suzuki S, Yamashita T. Recent development of anticoagulation in stroke prevention for atrial fibrillation [J]. Nihon Rinsho, 2014, 72(7): 1282-1286.

[4] Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die [J]. Mol Nutr Food Res, 2009, 53(1): 115-128.

[5] Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, *et al.* Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 610(1-3): 42-48.

[6] 刘梦思,刘立亚,孙秀玉,等.对自噬信号通路的调控作用研究进展[J].山东医药,2017,57(42):108-110.

[7] Yanamoto H, Nagata I, Niitsu Y, *et al.* Evaluation of MCAO stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique [J]. Exp Neurol, 2003, 182(2): 261-274.

[8] Chen WW, Yang LC, Pan SW, *et al.* Preparation of Sprague-Dawley rat Models of focal cerebral ischemia-reperfusion injury by suture method [J]. J Tissue Engin Res, 2011, 15(50): 9377-9380.

[9] Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(6): 505-510.

[10] 高荣敏,马慧萍.缺血缺氧状态下细胞自噬相关分子机制的研究进展[J].医学综述,2013,19(7):1153-1156.

[11] Dar WA, Sullivan E, Bynon JS, *et al.* Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: cellular and molecular mechanisms [J]. Liver Int, 2019, 39(5): 788-801.

[12] Yang J, Wang Y, Sui M, *et al.* Tri-iodothyronine preconditioning protects against liver ischemia reperfusion injury through the regulation of autophagy by the MEK/ERK/mTORC1 axis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 467(4): 704-710.

[13] 张翔南,陈忠.缺血性脑损伤中的自噬——研究进展与挑战[J].中国科学:生命科学,2014,44(4):379-386.

[14] Wang R, Liu YY, Liu XY, *et al.* Resveratrol protects neurons and the myocardium by reducing oxidative stress and ameliorating mitochondria damage in a cerebral ischemia rat model [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(3): 854-864.

(2019-12-02 收稿,2020-04-12 修回)