

. 实验研究 .

姜黄素通过 PI3K/AKT 信号通路激活细胞自噬对大鼠颅脑损伤的神经保护作用

杨伟科 孙林林 李小亮

【摘要】目的 探讨姜黄素对颅脑损伤(TBI大鼠)的神经保护作用及其机制。**方法** 48 只成年雄性SD大鼠随机分成假手术组、TBI组、溶媒组、姜黄素组,每组 12 只。采用重物撞击法制作控制皮质冲击伤模型。造模后,姜黄素组腹腔注射姜黄素(60 mg/kg),溶媒组腹腔注射姜黄素溶媒磷酸缓冲盐溶液;姜黄素干预 72 h 采用改良神经功能损伤量表(mNSS)评分评估神经功能;每组取 6 只大鼠采用 Nissl 染色评估损伤面积,采用 TUNEL 染色评估细胞凋亡率;另取 6 只大鼠免疫印迹法检测 PI3K/AKT 信号通路以及细胞自噬相关蛋白(LC3、Beclin-1、P62 蛋白)表达水平。**结果** 与假手术组比较,TBI组和溶媒组 mNSS 评分显著增加($P<0.05$),损伤面积和神经元凋亡率均明显增加($P<0.05$),LC3、Beclin-1 表达水平明显增高($P<0.05$),P62 表达水平明显降低($P<0.05$),而 PI3K 和 AKT 蛋白表达水平无明显变化($P>0.05$);TBI组和溶媒组均无统计学差异($P>0.05$)。与溶媒组相比,姜黄素组 mNSS 评分明显下降($P<0.05$),损伤面积和神经元凋亡率显著降低($P<0.05$),磷酸化 PI3K/AKT 水平明显增高($P<0.05$),LC3、Beclin-1 表达水平明显增高($P<0.05$),P62 表达水平明显降低($P<0.05$)。**结论** 姜黄素对 TBI 大鼠具有显著神经保护作用,机制可能是通过 PI3K/AKT 信号通路激活自噬。

【关键词】 颅脑损伤;姜黄素;PI3K/AKT;细胞自噬;大鼠

【文章编号】 1009-153X(2020)09-0613-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.1+5

Neuroprotective effect of curcumin on traumatic brain injury by activating autophagy via PI3K/AKT signaling pathway in adult rats

YANG Wei-ke¹, SUN Lin-lin¹, LI Xiao-liang². 1. Department of Neurosurgery, Zhengzhou No. 7 People's Hospital, Zhengzhou 450000, China; 2. Department of Neurosurgery, North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan 063000, China

【Abstract】Objective To explore the neuroprotective effect of curcumin on rats after traumatic brain injury (TBI). **Methods** Forty-eight male SD rats were randomly divided into sham operation group, TBI group, vehicle group and curcumin group, 12 rats in each group. A heavy object impact method was used to establish the model of controlled cortical impact injury. After injury, the curcumin group was intraperitoneally injected with curcumin (60 mg/kg), and the vehicle group was intraperitoneally injected with curcumin solvent phosphate buffered saline solution. Seventy-two hours after curcumin treatment, the neurological function was evaluated using the modified neurological impairment scale (mNSS). Six rats in each group were used to evaluate the damage area by Nissl staining and the apoptosis rate by TUNEL staining after the evaluation of neurological function. Six rats in each group were used to detect PI3K/AKT signaling pathway and the expression level of autophagy-related proteins (LC3, Beclin-1, P62 protein) by western blotting. **Results** Compared with the sham operation group, the mNSS score, the injury area, the neuronal apoptosis rate and the expression levels of LC3 and Beclin-1 were significantly increased ($P<0.05$), the expression level of P62 was significantly reduced ($P<0.05$), and the expression levels of PI3K and AKT protein did not significantly change ($P>0.05$) in TBI and vehicle groups. There was no statistical difference between the TBI and vehicle groups ($P>0.05$). Compared with the vehicle group, the mNSS score, the damage area and the neuronal apoptosis rate were significantly reduced ($P<0.05$), the phosphorylated PI3K/AKT level was significantly increased ($P<0.05$), the LC3 and Beclin-1 expression levels were significantly increased ($P<0.05$), and the expression level of P62 was significantly decreased ($P<0.05$) in curcumin group. **Conclusion** The curcumin has neuroprotective effect on rats after TBI by activating autophagy via PI3K/AKT signaling pathway.

【Key words】 Traumatic brain injury; Curcumin; PI3K/AKT; Autophagy; Rat

颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)至今仍然是危害人们健康的主要外伤之一,包括原发性损伤和继发性损伤,其中继发性损伤的危害更大,主要机制有细胞凋亡、自由基生成和炎症反应等^[1]。研究表明,在脑损伤模型中,细胞自噬与细胞凋亡同时发生^[2]。细胞自噬是一个高度调控的过程,细胞成分在饥

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.09.012
作者单位:450000,郑州市第七人民医院神经外科(杨伟科、孙林林);
063000 河北唐山,华北理工大学附属医院神经外科(李小亮)
通讯作者:孙林林,E-mail:sls201509@163.com

饿期间被降解和再循环,细胞质中受损的细胞器和功能失调的蛋白质在自噬过程中被包装成膜泡,然后被蛋白酶体处理并最终降解^[3]。姜黄素具有抗炎、抗氧化及诱导细胞自噬的作用^[4]。本文探讨姜黄素对TBI大鼠的保护作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康雄性SD大鼠48只,体重250~300 g,购于沈阳长生生物技术有限公司[许可证号:SCXK(辽)2019-0003]。按随机数字表法随机分为假手术组、TBI组、溶媒组、姜黄素组,每组12只。

1.2 模型制作及干预 按程世翔等^[5]报道的方法制作控制性皮质冲击伤模型。2%戊巴比妥(50 mg/kg)腹腔注射进行麻醉。用手持式环钻进行颅骨钻孔,直径约4.0 mm,暴露硬脑膜后,在颞顶叶皮质硬脑膜表面进行单次挫伤。伤后,头盖骨放回原位,并用骨蜡固定。假手术组大鼠只钻骨孔,不进行重物撞击。

溶媒组造模后腹腔注射姜黄素溶媒磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS),姜黄素组造模后腹腔注射姜黄素(60 mg/kg;美国Sigma公司)。

1.3 神经功能评估 造模后72 h,采用改良神经功能损伤量表(modified neurological severity scale, mNSS)评分评估神经功能^[6],总分0~18分,0分正常,得分越高,受伤越严重。

1.4 Nissl 染色和TUNEL 染色观察神经元损伤情况 神经功能评估结束后,每组取6只大鼠灌注固定,分离脑组织,石蜡包埋、切片。根据试剂盒说明书进行Nissl 染色(北京索莱宝生物技术有限公司)和TUNEL 染色(瑞士Roche公司),然后显微镜下观察并拍照。用Image J 软件计算400倍视野下Nissl 染色神经元损伤的面积数和TUNEL 染色的阳性细胞数(其与总细胞数比值的百分比即为细胞凋亡率)。

1.5 免疫印迹法检测脑组织自噬通路相关蛋白的表达 神经功能评估结束后,每组取6只大鼠,断头处死并分离伤侧大脑皮层组织匀浆,提取蛋白。BCA法(江苏凯基生物技术有限公司)测量蛋白浓度,取40 μg 蛋白体系进行SDS-PAGE电泳,然后转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉室温封闭2 h。然后用磷酸化磷酸肌醇3激酶(phosphorylated phosphoinositol 3 kinase, p-PI3K; 1:800;美国Abcam公司)、PI3K(1:800;美国Abcam公司)、蛋白激酶B(protein kinase B, AKT; 1:1 000;美国Abcam公司)、p-AKT(1:1 000;美国Abcam公司)、自噬相关基因Beclin-1(1:1 000;美国Santa Cruz公司)、微管相关蛋白1轻链蛋

白3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3; 1:1 000;美国Santa Cruz公司)、选择性自噬接头蛋白p62(sequestosome1, P62; 1:1000;美国Santa Cruz公司)、内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH; 1:2 000;北京中杉金桥公司)等抗体覆盖PVDF膜,4℃孵育过夜。洗膜缓冲液洗涤三遍,每次10 min。加入二抗(1:5 000)室温孵育2 h。洗膜缓冲液洗涤三遍,发光显影,然后用Image J 软件分析灰度值。

1.6 统计学方法 采用SPSS 22.0软件分析;定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和t检验;P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对TBI大鼠mNSS评分的影响 与假手术组比较,TBI组和溶媒组mNSS评分均显著增加(P<0.05),而TBI组和溶媒组无统计学差异(P>0.05)。与溶媒组比较,姜黄素组mNSS评分明显下降(P<0.05),但仍明显高于假手术组(P<0.05)。见图1。

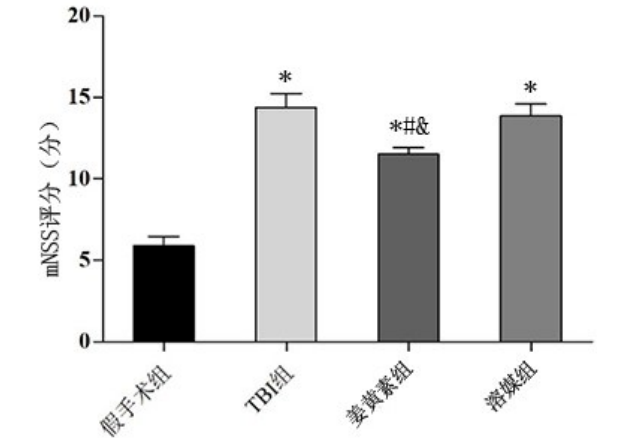


图1 姜黄素对颅脑损伤大鼠mNSS评分的影响 与假手术组相应值比,* P<0.05;与TBI组相应值比,# P<0.05;与溶媒组相应值比,& P<0.05;TBI. 颅脑损伤;mNSS. 改良神经功能损伤量表

表1 各组大鼠Nissl 染色评估损伤面积和TUNEL 染色评估细胞凋亡率比较

组别	损伤面积(×100 mm ² /每个400倍视野)	细胞凋亡率(%)
假手术组	13±1.9	9.11±3.14
TBI组	31±2.6*	47.86±2.73*
姜黄素组	20±3.1*##	32.17±4.01*##
溶媒组	29±3.5*	48.02±4.53*

注:与假手术组相应值比,* P<0.05;与TBI组相应值比,# P<0.05;与溶媒组相应值比,& P<0.05;TBI. 颅脑损伤

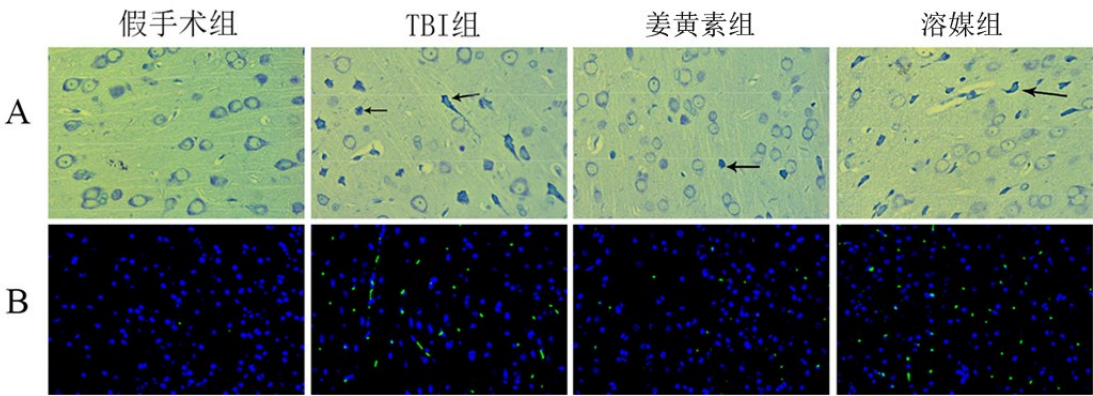


图2 各组大鼠脑组织 Nissl 染色和 TUNEL 染色结果(×400)
A. Nissl 染色; B. TUNEL 染色; TBI. 颅脑损伤

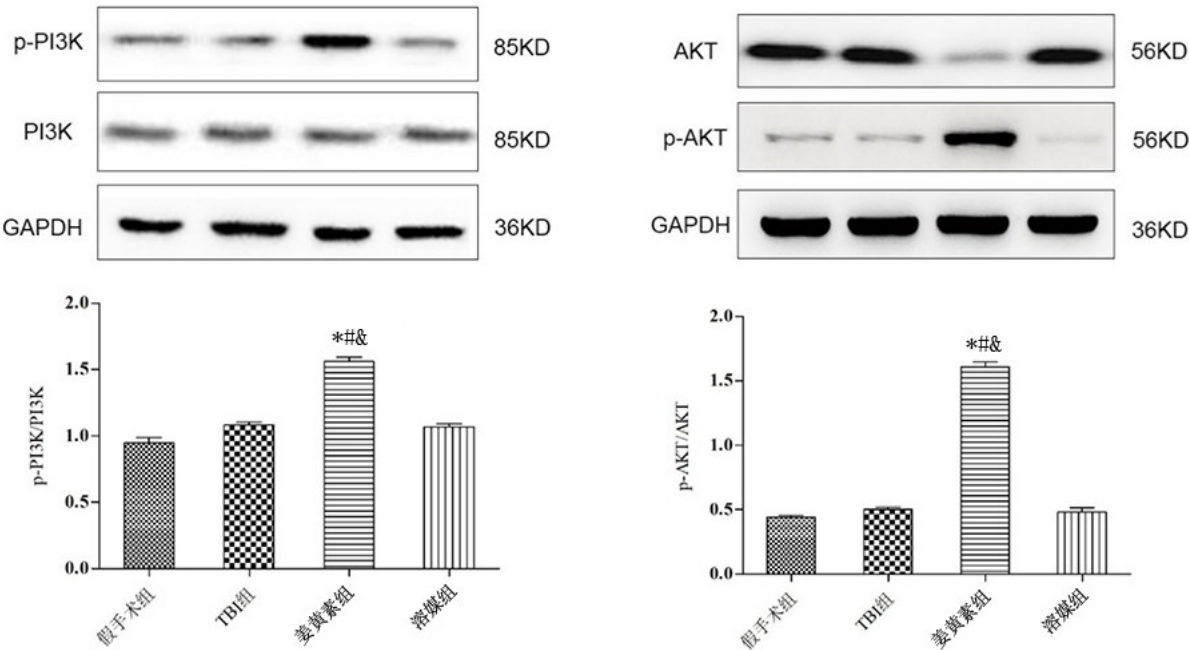


图3 各组大鼠伤侧脑皮层组织PI3K/AKT信号通路相关蛋白的表达水平比较

与假手术组相应值比,**P*<0.05;与TBI组相应值比,#*P*<0.05;与溶媒组相应值比,&*P*<0.05;TBI. 颅脑损伤;p-PI3K. 磷酸化磷酸肌醇3激酶;PI3K. 磷脂酰肌醇激酶;AKT. 蛋白激酶B;p-AKT. 磷酸化蛋白激酶B;GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

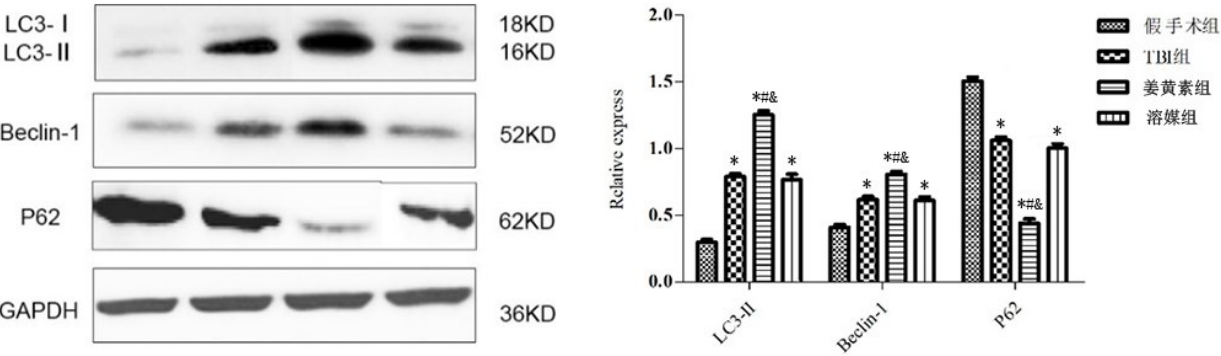


图4 各组大鼠伤侧脑皮层组织自噬相关蛋白的表达水平比较

与假手术组相应值比,**P*<0.05;与TBI组相应值比,#*P*<0.05;与溶媒组相应值比,&*P*<0.05;TBI. 颅脑损伤;LC3. 微管相关蛋白1轻链蛋白3;LC3-I. 胞浆型LC3;LC3-II. 膜型LC3;Beclin-1. 自噬相关基因Beclin-1;P62. 选择性自噬接头蛋白p62;GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

2.2 姜黄素对 TBI 大鼠脑组织损伤和神经元凋亡的影响 与假手术组比较, TBI 组和溶媒组脑组织损伤面积和神经元凋亡率都显著增加 ($P < 0.05$), TBI 组和溶媒组无统计学差异 ($P > 0.05$)。与溶媒组对比, 姜黄素组损伤面积明显缩小 ($P < 0.05$), 神经元凋亡率明显降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 姜黄素对 PI3K/AKT 信号通路的影响 与假手术组比较, TBI 组和溶媒组 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达水平没有显著增加 ($P > 0.05$)。与溶媒组相比, 姜黄素组 p-PI3K、p-AKT 水平显著增加 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 姜黄素对 Beclin-1、LC3 及 P62 蛋白表达的影响 与假手术组比较, TBI 组和溶媒组 LC3、Beclin-1 表达水平明显增高 ($P < 0.05$), P62 表达水平明显降低 ($P < 0.05$); TBI 组和溶媒组无统计学差异 ($P > 0.05$)。与溶媒组相比, 姜黄素组 LC3、Beclin-1 表达水平明显增高 ($P < 0.05$), P62 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

TBI 的治疗主要是针对继发性损伤, 而细胞凋亡、炎症反应以及自由基的形成等是导致 TBI 继发性损伤的主要机制。姜黄素具有抗氧化、抗炎症反应等作用, 对肺、心肌细胞和肝脏等组织缺血再灌注损伤具有保护作用^[7]。本文结果表明, 姜黄素可显著改善 TB 大鼠神经功能, 机制可能是通过 PI3K/AKT 信号通路激活自噬。

细胞自噬作为一个进化上保守的过程, 涉及到细胞质物质和受损细胞器的分离和降解, 以供循环利用^[8]。在营养素缺乏^[9]、蛛网膜下腔出血^[10]等应激条件下, 自噬被进一步诱导并提供营养物质, 如游离脂肪酸和氨基酸, 以维持必要的代谢和促进生存^[11]。研究表明, 自噬是一种生物进化保守的溶酶体降解途径, 能够清除细胞内异常或功能障碍的大分子或细胞器, 维持细胞能量平衡和内环境稳定^[12]。自噬在 TBI 中具有神经保护作用^[13]。本文发现大鼠 TBI 后, 膜型 LC3 和 Beclin-1 蛋白表达明显增加, P62 表达明显降低, 表明机体为了保护皮层细胞免于凋亡亦或是凋亡激活了自噬, 以期尽可能的维持细胞稳态, 这可能是机体自身的一种对抗外界刺激的保护机制。姜黄素处理的大鼠自噬途径的激活明显增加, 表现为膜型 LC3 和 Beclin-1 蛋白表达进一步增加, P62 表达进一步降低。

研究表明 PI3K/AKT 信号通路在调节细胞存活

方面具有非常重要的作用^[14]。同时, 一些神经保护剂, 如雌二醇^[15]和他汀类药物^[16], 能够激活 PI3K/AKT 通路, 对 TBI 发挥潜在的治疗作用。本文实验结果显示, TBI 后, 大鼠脑组织 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白并未出现显著变化, 但却出现了自噬现象。我们推测可能是创伤使体内自由基、炎症的积聚通过另外信号通路调介自噬途径。先前研究表明, 大鼠弥漫性脑创伤中, JNK 通路可以通过介导 p53 的磷酸化调控自噬因子 DRAM、Beclin-1 的表达, 达到调控神经元自噬的目的^[17]。本文姜黄素组 PI3K/AKT 磷酸化水平明显增加。因此, PI3K/AKT 信号通路可能参与姜黄素调控自噬来发挥神经保护的作用。

【参考文献】

- [1] 曾子桓, 张 灏, 陈伟强, 等. 颅脑损伤后继发性脑损伤发病机制的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2019, 24(12): 777-779.
- [2] Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36: 2405-2419.
- [3] Qin ZH, Wang Y, Kegel KB, *et al.* Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments [J]. Hum Mol Genet, 2003, 12: 3231-3244.
- [4] 任 婧, 张丹参. 姜黄素纳米剂型及在神经系统疾病中应用的研究进展[J]. 神经药理学报, 2017, 7(5): 45-51.
- [5] 程世翔, 张海博, 陈旭义, 等. 控制性脑皮质撞击致不同损伤程度颅脑创伤大鼠模型的建立[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2014, 23(10): 865-868.
- [6] Zhang Y, Chopp M, Meng Y, *et al.* Effect of exosomes derived from multipotential mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury [J]. J Neurosurg, 2015, 122: 856-867.
- [7] Zhong W, Qian K, Xiong J, *et al.* Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation via PI3K/AKT and NF- κ B related signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 302-313.
- [8] Sheng R, Zhang LS, Han R, *et al.* Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning [J]. Autophagy, 2010, 6: 482-494.
- [9] Mizushima N. Autophagy: process and function [J]. Genes Dev, 2007, 21: 2861-2873.

[10] Fang Y, Chen S, Reis C, *et al.* The role of autophagy in subarachnoid hemorrhage: an update [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16: 1255–1266.

[11] Carloni S, Girelli S, Scopa C, *et al.* Activation of autophagy and AKT/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia [J]. *Autophagy*, 2010, 6: 366–377.

[12] 汤宏, 刘家传. 脑损伤中的自噬现象[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2009, 14(11): 526–528.

[13] 刘政委. 丁苯酞对小鼠创伤性脑损伤中神经保护作用及机制研究[D]. 南方医科大学, 2018.

[14] 王赞, 张宗泽, 张婧婧, 等. PI3K/AKT 通路在槲皮素后处理减轻心肌细胞缺氧/复氧损伤中的作用[J]. 山东医药, 2019, 59(23): 6–9.

[15] Bao YJ, Li LZ, Li XG, *et al.* 17Beta-estradiol differentially protects cortical pericontusional zone from programmed cell death after traumatic cerebral contusion at distinct stages via non-genomic and genomic pathways [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2011, 48: 185–194.

[16] Wu H, Lu D, Jiang H, *et al.* Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/AKT pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2008, 25: 130–139.

[17] 洪铭岩. 大鼠弥漫性脑创伤中 JNK 介导的 P53 通路对神经元自噬的分子机制研究[D]. 河北医科大学, 2012.

(2019-09-22 收稿, 2019-11-07 修回)

. 个案报告 .

颈动脉内膜斑块剥脱术后颈部急性血肿抢救 2 例

游慧超 李文琦 欧阳和平 孙登江 王利容

【关键词】 颈动脉内膜剥脱术; 颈部血肿; 急诊手术
【文章编号】 1009-153X(2020)09-0617-01 【文献标志码】 B 【中国图书资料分类号】 R 651.1*1

1 病例资料

病例 1: 72 岁女性, 因头晕 1 d 入院。DSA 示左侧颈动脉重度狭窄, 排除手术禁忌后行左侧颈动脉内膜斑块剥脱术(carotid endarterectomy, CEA)。术后 6 h 出现胸闷、呼吸困难。紧急行颈部 CT 检查, 示颈部大量血肿形成(图 1)。胸闷半小时内手术, 期间呼吸困难逐渐加重, 血氧饱和度急剧下降, 伴全身紫绀、浅昏迷。进入手术室后立即气管插管, 但气道狭窄明显, 插管困难, 遂在球囊辅助呼吸的同时迅速剪开颈部缝线, 吸引器吸除部分血肿后顺利完成插管, 血氧饱和度逐渐好转, 继续清除颈部血肿, 见软组织内小动脉活动性出血, 予以结扎止血。术后 7 d 出院, 无后遗症。

病例 2: 56 岁男性, 因头晕伴四肢乏力 1 个月入院。CTA 示左侧颈内动脉重度狭窄、右侧颈内动脉闭塞。排除手术禁忌后行左侧 CEA。术后 1 d 起床时伤口突发涌血, 立即送至手术室行气管插管并麻醉, 迅速开放伤口并探查, 见颈总动

脉近分叉处部分缝线撕裂, 伴搏动性出血, 予以按压颈动脉止血, 并同时缝合撕裂处颈动脉。术后 9 d 出院, 无后遗症。

2 讨论

颈部伤口急性血肿形成是 CEA 后严重并发症之一, 因血肿进展可迅速压迫气管, 在短时间内窒息而危及病人生命。术后出血的常见原因为颈动脉缝线撕裂、软组织内小血管出血及凝血功能异常等, 因此术中在缝合动脉时, 针距、边距应适宜, 打结要牢固, 周围软组织止血需彻底, 缝线结扎小动脉及静脉, 减少因电凝不彻底致术后小动脉再出血的几率。再者, 颈部组织疏松, 间隙多, 术后纱布覆盖伤口, 不利于颈部血肿观察, 当出现胸闷不适时, 已经有大量血肿形成, 提示气管受压。因此术后应仔细观察颈部周围组织肿胀范围及程度, 注意伤口引流及渗血情况, 尽早发现颈部血肿。同时, 根据伤口渗血速度及血肿范围迅速判断是否为活动性出血及出血速度, 及时决定手术干预。当出血呼吸困难时, 宜紧急气管插管、改善通气, 必要时可拆除颈部缝线, 清除部分血肿, 减轻气道狭窄以改善通气。

(2018-09-11 收稿, 2018-09-26 修回)