

. 实验研究 .

白藜芦醇通过激活 PI3K/Akt 信号通路减轻大鼠  
脑缺血再灌注损伤

雷军荣 涂献坤 张华斌 张 晶 秦 军 罗 杰 石松生 杨卫忠

**【摘要】目的** 探讨 PI3K/Akt 信号通路在白藜芦醇减轻大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用。**方法** 将 48 只成年 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、白藜芦醇组、LY294002 组 (Akt 抑制剂), 每组 12 只。利用线栓法制备大鼠脑缺血再灌注损伤模型, 造模后 24 h 进行大鼠神经功能损伤评分和检测脑梗死体积、脑组织髓过氧化物酶 (MPO) 的活性, 免疫印迹法检测脑组织 p-Akt、t-Akt 的表达水平, ELISA 法检测脑组织肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的含量。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠神经功能损伤评分、脑梗死体积、缺血脑组织 MPO 活性和 TNF- $\alpha$  含量均明显增高 ( $P<0.05$ ), 缺血脑组织 p-Akt 表达水平也明显增高 ( $P<0.05$ ); 与模型组相比, 白藜芦醇显著降低大鼠神经功能损伤评分、脑梗死体积、缺血脑组织 MPO 活性和 TNF- $\alpha$  含量 ( $P<0.05$ ), 也显著降低缺血脑组织 p-Akt 表达水平 ( $P<0.05$ ); 脑室内注射 LY294002, 显著抑制白藜芦醇的这些作用 ( $P<0.05$ )。**结论** 白藜芦醇通过激活 PI3K/Akt 信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤。

**【关键词】** 脑缺血再灌注; 白藜芦醇; 炎症反应; PI3K/Akt; 大鼠

**【文章编号】** 1009-153X(2016)07-0425-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743

**Resveratrol reduces cerebral ischemia-reperfusion injury through the activation of PI3K/Akt signaling pathway in rats**  
LEI Jun-rong<sup>1</sup>, TU Xian-kun<sup>2</sup>, ZHANG Hua-bin<sup>2</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, QIN Jun<sup>1</sup>, LUO Jie<sup>1</sup>, SHI Song-sheng<sup>2</sup>, YANG Wei-zhong<sup>2</sup>.  
Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; 2. Department of Neurosurgery, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

**【Abstract】Objective** To study the effect of resveratrol on cerebral injury induced by ischemic-reperfusion and its mechanism in rats. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into 4 groups of 12 animals each, including sham operation group, control group, experimental group I in which the animal received the intraperitoneal injection of resveratrol 2 hours after the cerebral ischemia, and experimental group II in which the animal received the intraventricular injection of LY294002 before the cerebral ischemia and the intraperitoneal injection of resveratrol 2 hours after the cerebral ischemia-reperfusion. The ischemia-reperfusion models were made by the suture occlusion in the control group, and experimental groups I and II. Neurological deficit scores, cerebral infarct volume and myeloperoxidase (MPO) activity in injured cerebral tissues were assessed 24 hours after cerebral ischemia-reperfusion. The expressions of p-Akt and t-Akt and content of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the injured cerebral tissues were detected by western blot and ELISA respectively in all the groups. **Results** The neurological deficit scores and cerebral infarct volume were significantly bigger in the control group 24 hours after the ischemia-reperfusion than those in the experimental group I ( $P<0.05$ ), which were significantly smaller in the experimental group II. The level of MPO activity and TNF- $\alpha$  in the injured cerebral tissues were significantly higher in the control group than those in the experimental group II ( $P<0.05$ ), which were significantly higher in experimental group I ( $P<0.05$ ), which were significantly higher in sham operation group ( $P<0.05$ ). The levels of p-Akt and t-Akt expressions in the injured cerebral tissues were significantly higher in experimental group I than those in experimental group II ( $P<0.05$ ), which were significantly higher in control group ( $P<0.05$ ). **Conclusions** It is suggested that resveratrol can reduce cerebral ischemic-reperfusion injury and inflammatory reaction through the activation of PI3K/Akt signaling pathway in the rats.

**【Key words】** Cerebral ischemia-reperfusion; Resveratrol; Inflammatory reaction; PI3K/Akt; Rats

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.07.012  
基金项目:国家自然科学基金(81100987);教育部博士点基金新教师类(20113518120005)  
作者单位:442000 十堰,湖北医药学院附属十堰市太和医院神经外科(雷军荣、张 晶、秦 军、罗 杰);350001 福州,福建医科大学附属协和医院神经外科(涂献坤、张华斌、松生、杨卫忠)  
通讯作者:涂献坤, E-mail: tuxiankun@163.com

脑缺血是一种严重的脑血管疾病,病死率和致残率高。白藜芦醇是一种存在于葡萄皮、百合科和豆科等植物中的多酚类化合物。我们之前的研究表明白藜芦醇可通过抑制炎症反应和血脑屏障破坏减轻大鼠脑缺血再灌注损伤<sup>[1]</sup>。磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol 3-hydrxy kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt) 信号通路是一条

促细胞生存的信号通路,在脑缺血的神经保护中发挥重要的作用<sup>[2]</sup>。本研究探讨白藜芦醇是否通过 PI3K/Akt 信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** 白藜芦醇购自美国 Sigma 公司,生理盐水溶解,稀释成 100 mg/ml,储存于 -20 ℃,用时根据需要进行稀释。2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染料购自美国 Amersco 公司。髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)检测试剂盒购自南京建成生物技术公司。肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自美国 RD 公司。兔抗大鼠 p-Akt、t-Akt 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。蛋白裂解液购于碧云天生物技术有限公司。选择性的磷酸化 Akt 抑制剂 LY294002 购自美国 Sigma 公司。免疫印迹法试剂盒购自厦门泰京生物技术公司。

**1.2 动物分组及脑缺血模型的制备** 成年雄性清洁级 SD 大鼠,体重(250 $\pm$ 20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。大鼠共 48 只,随机分为四组,每组各 12 只,即假手术组、模型组、白藜芦醇 40 mg/kg 治疗组、LY294002 脑室内给药+白藜芦醇给药组。脑缺血后 2 h,白藜芦醇或溶媒(生理盐水)经腹腔注射给药,其剂量及给药方式参考雷军荣等报道的方法<sup>[1]</sup>。

大鼠脑缺血模型根据前期实验采用的方法<sup>[3]</sup>,采用直径 0.32 mm 的尼龙鱼线,10%水合氯醛(0.3 ml/100g)腹腔注射麻醉,钝性分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,然后结扎颈外动脉。在颈外动脉剪一“V”形切口,插入尼龙鱼线,用镊子轻轻将栓线送至大脑中动脉起始处,平均进线(18.0 $\pm$ 2.0)mm(距离颈总动脉分叉点),固定栓线,2 h 后拔除栓线制备再灌注损伤模型。假手术组只分离血管,不插入尼龙线。

LY294002 于脑缺血前行脑室内注射选择性的磷酸化 Akt 抑制剂用于抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活。LY294002 溶于二甲基亚砜,并用 PBS 稀释成 10  $\mu$ mol/L,取 10  $\mu$ l LY294002 于脑缺血前运用立体定向注射仪行脑室内注射,立体定向仪参数参考文献<sup>[4]</sup>:以前囟前方 0.8 mm,中线外侧 1.5 mm 为穿刺点,穿刺深度 3.5 mm。LY294002 给药方式及剂量参考 Tu 等<sup>[2]</sup>报道的方法。

**1.3 神经功能损伤评分** 脑缺血再灌注损伤后 24 h,

对大鼠进行神经功能评分;无神经功能障碍,0 分;提起大鼠尾巴,对侧前肢屈曲,1 分;行走时地上打转,静止时身体无偏斜,2 分;行走时地上打转,静止时身体也偏向对侧者,3 分;严重意识障碍,4 分。

**1.4 脑梗死体积测定** 脑缺血再灌注损伤后 24 h,处死大鼠,快速取出大脑,沿冠状面将大脑进行切片,每片厚度 2 mm,放在 2% TTC 溶液中避光孵育 20 min。正常脑组织呈鲜红色,白色为梗死脑组织。利用 IPP 软件测量大脑梗死体积,并按如下公式计算脑梗死体积:  $V = t \times (A_1 + A_2 + \dots + A_n)$ , V 为梗死体积, t 为脑片厚度, A 为梗死面积。

**1.5 测定脑组织 MPO 的活性** 脑缺血再灌注损伤后 24 h,处死大鼠,取大鼠缺血脑组织,匀浆,按试剂盒说明书步骤操作,计算 MPO 活性。

**1.6 免疫印迹法检测脑组织 p-Akt 或 t-Akt 的表达水平** 脑缺血再灌注 24 h,取缺血脑组织 100 g 加入到蛋白裂解液,匀浆,离心提取总蛋白,并测定蛋白浓度。经灌胶、上样、10%聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭等步骤后,加入一抗(兔抗大鼠 p-Akt 或 t-Akt 多克隆抗体、 $\beta$ -actin 单克隆抗体),4 ℃孵育过夜,加入相应二抗,室温孵育 2 h,再经显影、定影、图像采集等,最后用 Quantity one 软件定量分析蛋白条带。

**1.7 ELISA 法检测大鼠脑组织 TNF- $\alpha$  的含量** 脑缺血再灌注损伤后 24 h,取大鼠缺血脑组织,匀浆。按 ELISA 试剂盒说明书步骤操作,最后测定各样品 450 nm 波长处的光密度值,根据标准曲线计算各待测样品的 TNF- $\alpha$  含量。

**1.8 统计学处理** 用 SPSS13.0 统计软件处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析和 LSD-e 法分析,  $P < 0.05$  具有显著性差异。

## 2 结果

**2.1 白藜芦醇减轻大鼠脑缺血神经功能损伤和减小脑梗死体积的作用被 LY294002 抑制** 假手术组大鼠无神经功能损伤和脑梗死,模型组大鼠神经功能损伤评分和脑梗死体积均显著增高( $P < 0.01$ ),白藜芦醇显著减轻大鼠神经功能损伤和减小脑梗死体积( $P < 0.01$ ),脑室内注射 LY294002 显著抑制白藜芦醇的这些作用( $P < 0.01$ ),详见表 1。

**2.2 白藜芦醇降低大鼠缺血脑组织炎症反应和 TNF- $\alpha$  表达的作用被 LY294002 抑制** 模型组脑组织 MPO 活性和 TNF- $\alpha$  含量明显高于假手术组( $P < 0.01$ ),白藜芦醇显著降低缺血脑组织 MPO 活性和 TNF- $\alpha$  含量( $P < 0.01$ ),脑室内注射 LY294002 显著抑

制白藜芦醇的这些作用( $P<0.01$ ),详见表2。

2.3 白藜芦醇激活 PI3K/Akt 信号通路的作用被 LY294002 抑制 与假手术组相比,模型组缺血脑组织 p-Akt 表达模型下降( $P<0.01$ ),白藜芦醇显著上调 p-Akt 的表达( $P<0.01$ ),脑室内注射 LY294002 显著抑制白藜芦醇这些作用( $P<0.01$ )。而各组 t-Akt 的表达水平没有统计学差异( $P>0.05$ ),详见图1。

3 讨论

目前,脑缺血再灌注损伤的神经保护治疗仍是神经科学的研究难点和热点之一。我们之前的研究表明白藜芦醇可以减轻大鼠脑缺血再灌注损伤,其机制可能是通过抑制炎症反应和血脑屏障破坏发挥神经保护作用<sup>[1]</sup>。尽管如此,白藜芦醇神经保护的分子机制仍未全面阐述。

PI3K/Akt 信号通路是一条促细胞生存的信号通路,广泛存在细胞中,是参与细胞生长、增殖、分化调节的信号转导通路<sup>[5-8]</sup>。PI3K 由催化亚基 p110 和调节亚基 p85 构成,p85 的氨基端含有 SH3 结构域和能与 SH3 结构域结合的脯氨酸富集区,其羧基端含有 2 个 SH2 结构域及 1 个与 p110 结合的区域。PI3K 的 p110 亚基与蛋白激酶具有同源性,本身既具有 Ser/Thr 激酶的活性,也具有磷脂酰肌醇激酶的活性。Akt,又称蛋白激酶 B,是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。当细胞受到细胞外信号的刺激后,PI3K 活化产生 PIP3 使 Akt 转位到细胞膜后,不仅使 Akt 本身获得催化活性,催化其自身的 Ser124 和 Thr450 磷酸化,并且使 Akt 和磷酸肌醇依赖性激酶 1 (phosphoinositide-dependent kinase 1, PDK-1)同时定位在细胞膜上,PDK-1 就能催化 Akt 的 Ser473 和

表 1 各组大鼠脑缺血再灌注损伤神经功能评分和脑梗死体积的比较( $\bar{x}\pm s$ )

分组	神经功能评分(分)	脑梗死体积(mm <sup>3</sup> )
假手术组	0	0
模型组	2.4±0.6 <sup>##</sup>	195.43±13.68 <sup>##</sup>
白藜芦醇组	1.6±0.4 <sup>***</sup>	149.57±8.52 <sup>***</sup>
LY294002 组	2.0±0.7 <sup>##△</sup>	173.46±10.81 <sup>##△</sup>

注:与假手术组相应值比,##  $P<0.01$ ;与模型组相应值比,\*\*  $P<0.01$ ;与白藜芦醇组相应值比,△  $P<0.05$ ,△△  $P<0.01$

表 2 白藜芦醇对大鼠脑缺血再灌注损伤 MPO 含量和 TNF-α 表达的影响( $\bar{x}\pm s$ )

分组	MPO 含量 (U/g)	TNF-α 含量(ng/g)
假手术组	0.16±0.037	1.24±0.26
模型组	0.47±0.093 <sup>##</sup>	2.68±0.53 <sup>##△△</sup>
白藜芦醇组	0.28±0.049 <sup>***</sup>	1.67±0.37 <sup>***</sup>
LY294002 组	0.35±0.064 <sup>##△△</sup>	2.05±0.42 <sup>##△</sup>

注:与假手术组相应值比,##  $P<0.01$ ;与模型组相应值比,\*\*  $P<0.01$ ;与白藜芦醇组相应值比,△  $P<0.05$ ,△△  $P<0.01$ ;MPO:髓过氧化物酶;TNF-α:肿瘤坏死因子-α

Thr308 磷酸化,使 Akt 完全活化,从而引起信号传导通路的级联反应<sup>[9,10]</sup>。

脑缺血时,PI3K/Akt 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。短暂多次缺血预处理可减轻大鼠缺血性脑损伤,并上调脑组织 p-Akt 的表达,脑室内注射 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 可抑制 p-Akt 的表达和缺血预处理的神保护作用,表明 PI3K/Akt 信号通路参与调节缺血预处理对脑缺血的神经保护作用<sup>[2]</sup>。Zhang 等<sup>[11]</sup>研究表明瘦素可减轻小鼠脑缺血脑梗死体积、神经功能障碍和缺血性脑

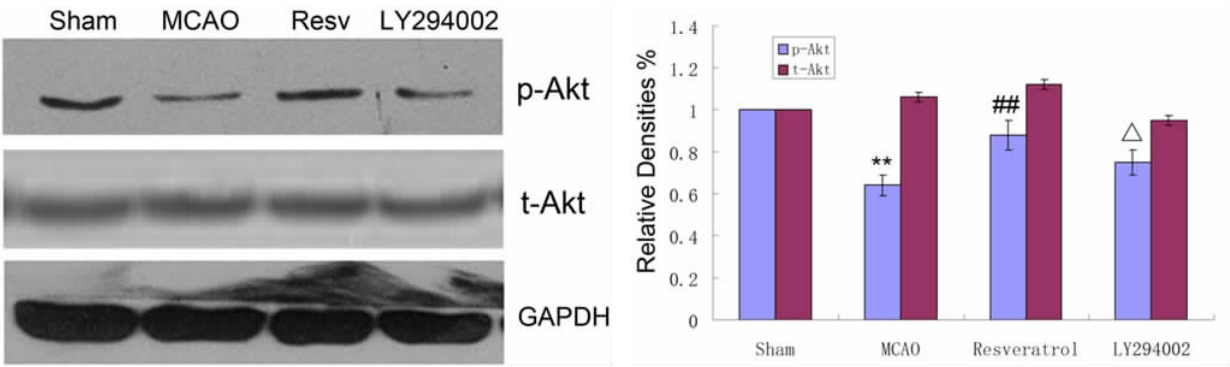


图1 白藜芦醇对大鼠脑缺血再灌注损伤后缺血脑组织 Akt 表达的影响

与假手术组相应值比,\*\*  $P<0.01$ ;与模型组相应值比,##  $P<0.01$ ;与白藜芦醇组相应值比,△  $P<0.05$ ;

Sham:假手术组;MCAO:模型组;Resv:白藜芦醇组

水肿,从而减轻大鼠缺血性脑损伤,尾静脉注射 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 可抑制瘦素的神经保护作用;脑缺血诱导 p-Akt 的高表达,瘦素则可进一步促进脑缺血 p-Akt 的表达,而 LY294002 抑制 p-Akt 的表达,这个研究表明瘦素通过激活 PI3K/Akt 信号通路保护小鼠脑缺血损伤。七氟烷可上调线粒体 p-Akt 和糖原合成酶激酶(glycogen synthase kinase, GSK)的表达并减轻大鼠神经功能障碍和脑梗死面积,而 LY294002 可抑制 p-Akt 和 GSK 的表达并抑制七氟烷对脑缺血的神经保护作用<sup>[12]</sup>。

本实验通过建立大鼠脑缺血再灌注模型,证实白藜芦醇具有减轻脑缺血神经功能损伤和脑梗死体积的作用,即白藜芦醇对大鼠脑缺血具有神经保护作用,脑室内注射 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 可抑制白藜芦醇对大鼠脑缺血的神经保护作用,表明白藜芦醇通过激活 PI3K/Akt 信号通路减轻大鼠缺血性脑损伤。有研究表明 PI3K/Akt 信号通路参与缺血预处理对脑缺血炎症反应和炎症性细胞因子 TNF- $\alpha$  表达的调节作用<sup>[2]</sup>,因此本研究进一步探讨 PI3K/Akt 信号通路在白藜芦醇减轻脑缺血炎症反应和 TNF- $\alpha$  表达的作用,结果证实白藜芦醇可减轻大鼠脑缺血中性粒细胞浸润和 TNF- $\alpha$  的表达,即白藜芦醇对大鼠脑缺血具有抗炎作用,脑室内注射 LY294002 可抑制白藜芦醇对大鼠脑缺血的抗炎作用和其抑制 TNF- $\alpha$  表达的作用,表明白藜芦醇通过激活 PI3K/Akt 信号通路减轻大鼠脑缺血炎症反应和炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  的表达。本实验还检测了 p-Akt 的表达,发现白藜芦醇可上调大鼠脑缺血 p-Akt 的表达,而 LY294002 可抑制 p-Akt 的表达,证实了白藜芦醇对脑缺血 PI3K/Akt 信号通路的活性作用。

综上所述,白藜芦醇通过激活 PI3K/Akt 信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤和炎症反应。PI3K/Akt 信号通路作为一种促生存信号通路,将来可能成为缺血性脑血管疾病的治疗靶点。

#### 【参考文献】

[1] 雷军荣,张 晶,秦 军,等.白藜芦醇对大鼠缺血再灌注损伤后脑组织的保护作用[J].中国临床神经外科杂志,

2011,16(7): 410-412,416.

- [2] Tu XK, Yang WZ, Chen JP, *et al.* Repetitive ischemic pre-conditioning attenuates inflammatory reaction and brain damage after focal cerebral ischemia in rats: involvement of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathway [J]. J Mol Neurosci, 2015, 55(4): 912-922.
- [3] 雷军荣,秦 军,张 晶,等.姜黄素对大鼠缺血性脑损伤炎症反应和血脑屏障通透性的影响[J].中国药理学通报,2010,26(1):120-123.
- [4] 涂献坤,石松生,杨卫忠,等.齐留通通过激活 ERK1/2 信号通路减轻大鼠脑缺血炎症反应和缺血性脑损伤[J].中国药理学通报.2014,30(10):1441-1444.
- [5] 胡志明,刘金霞,陶胜忠.脑及治疗 ATM 及 PI3K 的表达及意义[J].中国临床神经外科杂志,2015,20(1):31-33.
- [6] 陈 奎,孙兆良,冯东福. mTOR 与中枢神经系统轴索再生[J].中国临床神经外科杂志,2015,20(8):506-508.
- [7] 钟 雷,张继青,唐运章,等.吉非替尼对表达 PTEN 的胶质瘤细胞株 U87 细胞增殖活性的影响[J].中国临床神经外科杂志,2014,19(4):220-222.
- [8] 王世召,田 野,王少勃,等.多胺类似物 DENSPM 诱导 U87 细胞凋亡[J].中国临床神经外科杂志,2013,18(4):220-223.
- [9] Guo H, German P, Bai S, *et al.* The PI3K/AKT pathway and renal cell carcinoma [J]. J Genet Genomics, 2015, 42(7): 343-353.
- [10] Xia P, Xu XY. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application [J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(5): 1602-1609.
- [11] Zhang J, Deng Z, Liao J, *et al.* Leptin attenuates cerebral ischemia injury through the promotion of energy metabolism via the PI3K/Akt pathway [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33(4): 567-574.
- [12] Ye Z, Xia P, Cheng ZG, *et al.* Neuroprotection induced by sevoflurane-delayed post-conditioning is attributable to increased phosphorylation of mitochondrial GSK-3  $\beta$  through the PI3K/Akt survival pathway [J]. J Neurol Sci, 2015, 348(1-2): 216-225.

(2015-10-16 收稿,2016-02-15 修回)