

. 实验研究 .

# C3G 通过 PKA/CREB 信号通路减轻成年小鼠 SAH 后早期脑损伤

杨新宇 韩雨薇 陈立刚 李佳朔 潘鹏宇 梁国标

**【摘要】目的** 探讨矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(C3G)对小鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后早期脑损伤(EBI)的影响及作用机制。**方法** 取 72 只雄性 C57 小鼠随机分成 6 组:假手术组、SAH 组、溶剂组、低剂量 C3G 组(10 mg/kg)、中剂量 C3G 组((20 mg/kg)、高剂量 C3G 组(30 mg/kg);每组 12 只。应用颈动脉穿刺法制作小鼠 SAH 模型,术后 24 h 进行 Garcia 评分和平衡木评分评估神经功能;每组小鼠随机取 6 只取外周血检测活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)含量,然后取出完整脑组织进行 SAH 出血评分、脑水含量检测;每组剩余 6 只小鼠取外周血检测 GSH/GSSG 水平,然后取脑组织应用免疫印迹法检测 PKA、p-PKA、CREB、p-CREB 和 GCLC 表达水平。**结果** 与假手术组相比,SAH 组小鼠神经功能评分明显下降( $P<0.05$ ),脑水含量、SAH 出血评分、外周血 ROS 和 MDA 含量均显著增加( $P<0.05$ ),外周血 GSH/GSSG 比值明显下降( $P<0.05$ ),脑组织 p-PKA、p-CREB 和 GCLC 表达明显上调( $P<0.05$ )。C3G 明显增加小鼠神经功评分( $P<0.05$ ),明显降低 SAH 评分降低、脑含水量( $P<0.05$ ),明显降低外周血 ROS、MDA 含量( $P<0.05$ ),明显增加外周血 GSH/GSSG 比值( $P<0.05$ ),明显下调脑组织 p-PKA、p-CREB 和 GCLC 表达( $P<0.05$ )。**结论** C3G 明显改善小鼠 SAH 后 EBI,其机制可能是抑制 PKA/CREB 信号通路,下调 GCLC 表达,进而抑制氧化应激损伤。

**【关键词】** 蛛网膜下腔出血;矢车菊素-3-O-葡萄糖苷;早期脑损伤;PKA/CREB 信号通路;成年小鼠

**【文章编号】** 1009-153X(2022)04-0278-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.9

**Cyanidin-3-O-glucoside attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage in adult mice through PKA/CREB signaling pathway**

YANG Xin-yu<sup>1,2</sup>, HAN Yu-wei<sup>1</sup>, CHEN Li-gang<sup>1</sup>, LI Jia-shuo<sup>1,2</sup>, PAN Peng-yu<sup>1</sup>, LIANG Guo-biao<sup>1</sup>. 1. Department of Neurosurgery, General Hospital of Northern Theater Command, PLA, Shenyang 110016, China; 2. Graduate School of China Medical University, Shenyang 110121, China

**【Abstract】Objective** To study the effect of cyanidin-3-O-glucoside (C3G) on early brain injury (EBI) after subarachnoid hemorrhage (SAH) in adult mice. **Methods** Seventy-two male C57 mice were randomly divided into 6 groups, including sham operation group, SAH group, vehicle group, low-dose C3G group (10 mg/kg), medium-dose C3G group (20 mg/kg), and high-dose C3G group (30 mg/kg), with 12 mice in each. Twenty-four hours after SAH, the neurological function was assessed by Garcia score and balance beam score. The content of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) in the peripheral blood were detected and then the whole brain tissue was separated for the detection of SAH grade and brain water content in 6 mice of each group. The ratio of GSH/GSSG in the peripheral blood was detected and then the brain tissues were separated for detection of the expression of PKA, p-PKA, CREB, p-CREB and GCLC in the other 6 mice of each group. **Results** Compared with the sham operation group, the Garcia and balance beam scores and the ratio of GSH/GSSG significantly decreased, and the content of brain water, the SAH grade, the contents of ROS and MDA in the peripheral blood and the expression levels of -PKA and p-CREB and GCLC significantly increased in SAH group ( $P<0.05$ ). C3G significantly increased the Garcia and balance beam scores and the ratio of GSH/GSSG, and significantly decreased the SAH grade, the brain water content, the contents of ROS and MDA in the peripheral blood and the expression levels of p-PKA, p-CREB and GCLC in adult mice after SAH. **Conclusions** C3G can improve the EBI in adult mice after SAH, which may be related to the inhibition of PKA/CREB signaling and down-regulation of GCLC expression, and subsequent inhibition of oxidative stress damage.

**【Key words】** Subarachnoid hemorrhage; Cyanidin-3-O-glucoside; Early brain injury; PKA/CREB signaling pathway; Adult mice

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2022.04.011

基金项目:国家自然科学基金(81971133)

作者单位:110016 沈阳,中国人民解放军北部战区总医院神经外科(杨新宇、韩雨薇、陈立刚、李佳朔、潘鹏宇、梁国标);110121 沈阳,中国医科大学研究生院(杨新宇、李佳朔)

通信作者:梁国标,E-mail:liangguobiao6708@163.com

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是一类病死率较高的颅内出血性疾病,病死率高达 50%,出血后早期脑损伤(early brain injury, EBI)是重要的死亡原因之一<sup>[1]</sup>。氧化应激是 EBI 的重要的病理机制,导致抗氧化成分的减少以及脂质过氧化产物增加<sup>[2]</sup>,造成神经元凋亡,与 SAH 症状和

预后直接相关<sup>[2]</sup>。据报道,cAMP/PKA 信号通路够参与抑制氧化应激的过程,抑制脑组织炎症反应过程<sup>[3,4]</sup>。矢车菊素,又名花青素,具有抗氧化、抗炎等作用<sup>[5,6]</sup>。矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(Cyanidin-3-O-glucoside,C3G)是矢车菊素家族中最常见的一种<sup>[7]</sup>。据报道,C3G 对脑缺血再灌注损伤具有保护作用<sup>[8]</sup>;而且,C3G 能通过 cAMP/PKA 信号通路抑制氧化应激反应<sup>[9]</sup>。本文探讨 C3G 对小鼠 SAH 后 EBI 的影响及 PKA/CREB 信号通路在其中的作用。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 取 72 只 4~6 周龄、体重 28~32 g 的清洁级雄性 c57 鼠[长生生物有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(辽)2020-0001],随机分为假手术组、SAH 组、溶剂组、低剂量(10 mg/kg)C3G 组、中剂量(20 mg/kg)C3G 组、高剂量(30 mg/kg)C3G 组。

1.2 SAH 模型制作 应用颈动脉穿刺法制作小鼠 SAH 模型<sup>[9]</sup>。腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉小鼠后,取颈部正中切口,分离左侧颈总动脉、颈内动脉与颈外动脉。夹闭颈总动脉、颈内动脉,结扎颈外动脉远端根部。在颈总动脉分叉处上部穿入长 1.5 cm、直径 0.625 mm 的尼龙线,打开颈内动脉,并将尼龙线穿入,推进约 10 mm 后,刺破颈内动脉/后交通动脉分叉附近的 Willis 环,会有轻微落空感,小鼠呼吸节律会改变,然后取出尼龙线,结扎颈外动脉,开放颈总动脉,缝合切口。假手术组进行同样的操作,但不刺破血管。

1.3 药物干预及取材 SAH 后 30 min,腹腔注射 C3G,浓度分别为 10、20、30 mg/kg<sup>[10,11]</sup>。溶剂组注射等体积生理盐水。SAH 后 24 h,进行 Garcia 和平衡木实验;然后,每组随机取 6 只小鼠取外周血进行活性氧(reactive oxygen species,ROS)和丙二醛(Malondialdehyde,MDA)含量检测,再取出完整脑组织进行 SAH 出血量评分,立即称重检测脑水含量;每组剩余 6 只取外周血进行还原型谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽比值(GSH/GSSG)检测后,脱颈处死取出脑组织进行免疫印迹法检测。

1.4 Garcia 评分 按文献[12]报道方法进行评分,总分 2~15 分,分数越高表示神经功能越好。首先,观察小鼠在笼子内自发活动 5 min,评分标准为无活动(0 分),有活动、仅有位置变化(1 分),有活动但接触笼子四个边缘少于 3 个(2 分),有活动、接触笼子四个边缘(3 分);其次,观察四肢活动左右对称性,一侧肢体无活动(0 分),一侧肢体轻度活动(1 分),一侧肢

体活动缓慢(2 分),双侧对称,与 SAH 前期无明显差别(3 分);第三,提起尾巴观察四肢活动左右对称性,一侧肢体无活动、肢体无外展(0 分),一侧肢体轻微活动和外展(1 分),肢体有活动、比另一侧稍弱(2 分),双侧肢体活动基本对称、与 SAH 前无明显差异(3 分);第四,观察爬网能力,不能攀爬(1 分),一侧肢体稍弱(2 分),爬网能力正常、与 SAH 前无明显差异(3 分);第五,触碰一侧身体反应评分,无反应(1 分),一侧反应稍弱(2 分),双侧对称(3 分)。

1.5 平衡木实验评分 取平衡木器材,实验前小鼠在两边平板上分别放置 10 s,然后把小鼠放在横木中间,观察 40 s 移动情况:0~1 分,没有移动、跌落;2 分,移动 22 cm 且停留至少 25 s;3 分,移动超过 22 cm 且停留至少 25 s;4 分,到达平板或 25 s 内走完一半的距离没爬上平板;5 分,25 s 内到达平板。

1.6 出血量评分 参照文献[12]报道方法进行出血量评分。将基底池分为 6 段,每段根据血凝块数量分为 0~3 级:0 级为无血凝块,1 级为极少血凝块,2 级为中度血凝块、但动脉可识别,3 级为掩盖该段内的所有动脉。SAH 出血分级的最终评分为六个部位之和:0~7 分为轻度出血,8~12 分为中度出血,13~18 为重度出血。排除评分小于 8 分的小鼠,将中度和重度出血小鼠选为 SAH 模型。

1.7 干湿重法检测脑水含量 术后 24 h 脊椎脱臼法处死小鼠,取脑组织称重(湿重),在 100 ℃下烘干至脑组织重量不再改变(干重)。脑含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.8 外周血 ROS 和 MDA 含量检测 用毛细采血管采取小鼠眼球静脉血,4 ℃下 10 000 转/min 离心 10 min,抽取血清待测。用 ROS 试剂盒和 MDA 试剂盒按照说明书进行测定 ROS 和 MDA。

1.9 GSH/GSSG 比值检测 选用标准 GSH/GSSG 试剂盒按照说明书进行标准化操作。

1.10 免疫印迹法检测 小鼠脱颈处死后取出血侧脑组织,检测 PKA、CREB、GCLC、p-PKA、p-CREB 表达水平。先将脑组织研磨后加入 RIPA 裂解液,蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂,静置裂解 30 min 后,4 ℃下 12 000 转/min 离心 10 min,取上清液待测。使用 BCA 试剂盒进行定量,先将蛋白质样本进行电泳分离后,转移到 PVDF 膜。BSA 封闭后,应用一抗和二抗孵育,使用 BeyoECL 发光溶液进行曝光。 $\beta$ -actin 为内参,使用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.11 统计学分析 应用 GraphPad Prism v9.0 软件进行统计学分析;计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方

差分析; $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 C3G 对小鼠 SAH 后神经功能的影响 与假手术组相比,SAH 组 Garcia 评分和平衡木实验评分均明显降低( $P<0.05$ ;图 1);C3G 明显增加 Garcia 评分和平衡木实验评分( $P<0.05$ ;图 1),且以中剂量 C3G 作用最明显( $P<0.05$ ;图 1)。因此,选取 20 mg/kg 为最适剂量进行后续实验。

2.2 C3G 对小鼠 SAH 后脑含水量和出血量评分的影响 与假手术组相比,SAH 组脑含水量明显增加、出血量评分明显增高( $P<0.05$ ;图 2)。C3G 明显减轻脑含水量、降低出血量评分( $P<0.05$ ;图 2)。

2.3 C3G 对小鼠 SAH 后外周血氧化应激产物的影响 与假手术组比较,SAH 组外周血 ROS、MDA 含量明显增高( $P<0.05$ ;图 3),而 GSH/GSSG 比值明显降低

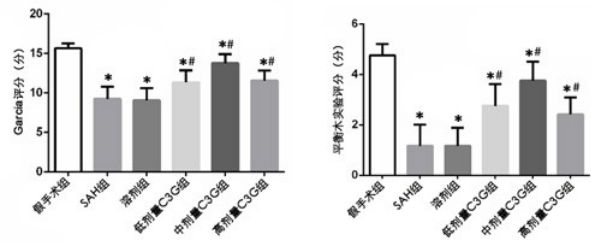


图 1 C3G 对小鼠 SAH 后神经功能的影响 与假手术组相应值比,\*  $P<0.05$ ;与 SAH 组相应值比,#  $P<0.05$

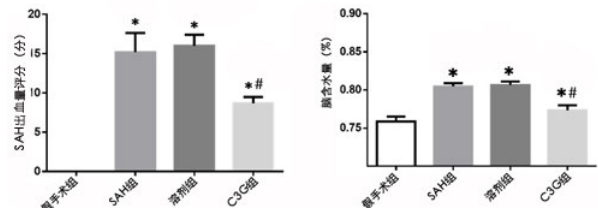


图 2 C3G 对小鼠 SAH 后脑含水量和出血量评分的影响 与假手术组相应值比,\*  $P<0.05$ ;与 SAH 组相应值比,#  $P<0.05$

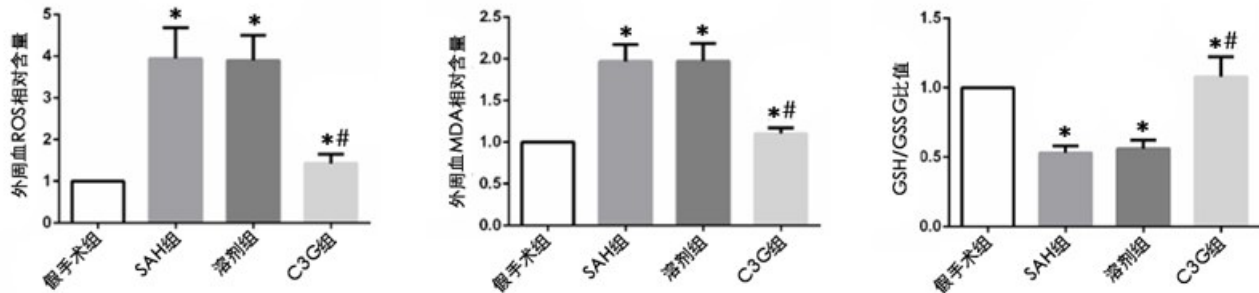


图 3 C3G 对小鼠 SAH 后外周血氧化应激产物的影响 与假手术组相应值比,\*  $P<0.05$ ;与 SAH 组相应值比,#  $P<0.05$

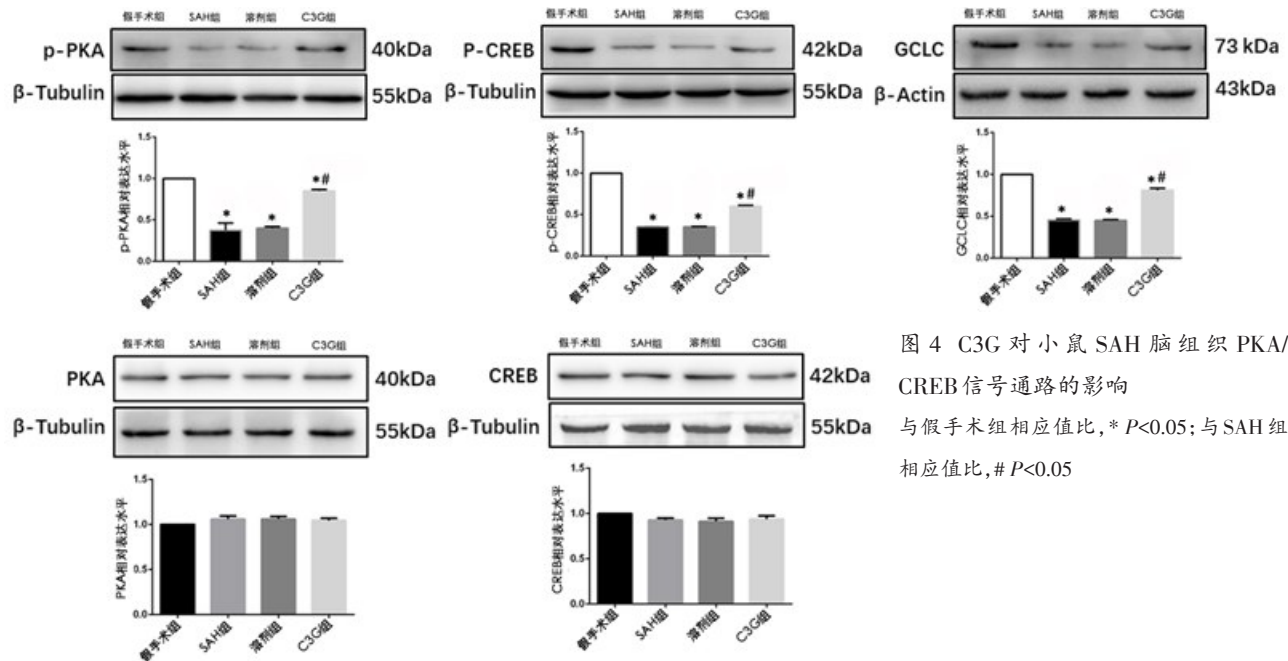


图 4 C3G 对小鼠 SAH 脑组织 PKA/ CREB 信号通路的影响 与假手术组相应值比,\*  $P<0.05$ ;与 SAH 组相应值比,#  $P<0.05$



( $P<0.05$ ;图 3)。C3G 明显降低外周血 ROS、MDA 含量( $P<0.05$ ;图 3),明显增加 GSH/GSSG 比值( $P<0.05$ ;图 3)。

2.4 C3G 对小鼠 SAH 脑组织 PKA/CREB 信号通路的影响 与假手术组比较,SAH 组 p-PKA、p-CREB 和 GCLC 表达水平明显降低( $P<0.05$ ;图 4),而 PKA、CREB 表达水平无明显变化( $P>0.05$ ;图 4)。C3G 明显增加 SAH 后脑组织 p-PKA、p-CREB、GCLC 表达水平( $P<0.05$ ;图 4),而对 PKA、CREB 表达水平无明显影响( $P>0.05$ ;图 4)。

3 讨论

本文结果显示,C3G 可能通过激活 PKA 信号通路,减轻氧化应激损伤,改善小鼠 SAH 后 EBI。EBI 为 SAH 后 72 h 内发生的一系列病理反应,为 SAH 死亡的主要原因<sup>[1,12]</sup>。EBI 损伤机制包括微循环衰竭、微血栓形成、离子稳态改变、兴奋性中毒、血脑屏障破坏、炎症和氧化级联反应、基质金属蛋白酶上调等,共同参与 SAH 后细胞死亡,最终功能障碍<sup>[1]</sup>。氧化应激损伤是其中至关重要的机制,发病 72 h 内,抗氧化成分的减少、脂质过氧化产物的急剧增加,与不良预后密切相关<sup>[1]</sup>。

抗氧化剂或者阻断氧化应激反应的药物有助于减轻氧化应激损伤。C3G 是花青素家族中最常见的一种抗氧化性强的成分<sup>[14]</sup>。C3G 可以减轻体外培养的神经元的氧化应激损伤,显著提高细胞活力和减少细胞凋亡<sup>[15]</sup>。研究发现 C3G 可能是通过保护线粒体 GSH 发挥抗氧化应激的神经保护作用<sup>[16,17]</sup>。C3G 也可能是由其他物质介导神经保护作用。首先 C3G 在生理 pH 值下不稳定,可以被降解成原儿茶酸和氰化物等物质,这两种代谢产物都能抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的线粒体功能障碍和 DNA 片段化;其次,C3G 被吸收后,主要被结合到细胞膜上,因此,C3G 的作用还需要其他物质介导<sup>[17]</sup>。本实验结果显示,小鼠 SAH 后脑水肿加剧,外周血 ROS 和 MDA 含量明显增加,神经功能严重受损;而 C3G 明显减轻脑水肿,降低 ROS 和 MDA 水平,增加 GSH、p-PKA 和 p-CREB,GSH 生成的关键酶 GCLC 也明显上调。这提示 C3G 可能是通过激活 PKA 通路,上调 GCLC,促进 GSH 生成,减轻氧化应激损伤,从而发挥神经保护作用。

研究表明,减轻或抑制氧化应激,可减轻 SAH 后 EBI<sup>[9]</sup>。SAH 后,作为血液成分之一的氧合血红蛋白自身会产生 ROS,线粒体和酶也会促进 ROS 的生成,内源性抗氧化保护系统受到抑制,氧化应激显著

加重<sup>[20]</sup>。哺乳动物依赖 GSH 的抗氧化系统在细胞防御活性氧的过程中起重要作用,cAMP/PKA 信号通路可以促进 GSH 的生成。C3G 明显促进 PKA 磷酸化,进而促进 CREB 磷酸化,诱导 GCLC 表达,促进 GSH 的生成,起抗氧化作用<sup>[21]</sup>。

本研究尚有不足之处。在 SAH 模型制作中,每只小鼠的 SAH 评分并不一致,这可能会影响小鼠的各类指标,目前缺少更严谨的评价指标。此外,EBI 的发生机制十分复杂,还包括炎症反应等多种病理反应<sup>[22]</sup>,氧化应激的过程也是多种病理机制构成,涉及到多种因子之间的反应。本实验仅针对 C3G 对于 ROS 和 MDA 的变化进行验证,GSH/GSSG、p-PKA、p-CREB 和 GCLC 的增加虽然提示了 C3G 可能的作用通路,但 C3G 是否与其它因子间存在相互作用尚不清楚。因此,C3G 对于 EBI 是如何发挥作用的还需要进一步研究。

总之,C3G 能减轻小鼠 SAH 后 EBI,改善小鼠神经功能,其机制肯能是激活 PKA 信号通路,上调 GCLC 表达,抑制氧化应激反应,从而减轻氧化应激损伤。

【参考文献】

[1] Rass V, Helbok R. Early brain injury after poor-grade subarachnoid hemorrhage [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2019, 19(10): 78.

[2] Kamp MA, Steiger HJ, van Lieshout JH. Experimental aneurysmal subarachnoid hemorrhage: tiding over [J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11(1): 1-3.

[3] Matsukawa T, Villareal MO, Motojima H, *et al.* Increasing cAMP levels of preadipocytes by cyanidin- 3- glucoside treatment induces the formation of beige phenotypes in 3T3-L1 adipocytes [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 40: 77-85.

[4] Hu X, Yan J, Huang L, *et al.* INT-777 attenuates NLRP3-ASC inflammasome-mediated neuroinflammation via TGR5/cAMP/PKA signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 91: 587-600.

[5] Zhang J, Wang B, Zhao B, *et al.* Blueberry anthocyanin alleviate perfluorooctanoic acid-induced toxicity in planarian (*Dugesia japonica*) by regulating oxidative stress biomarkers, ATP contents, DNA methylation and mRNA expression [J]. *Environ Pollut*, 2019, 245: 957-964.

[6] Chen S, Zhou H, Zhang G, *et al.* Anthocyanin from myrica

- rubra ameliorated d-galactose-induced memory impairment, oxidative stress, and neuroinflammation in adult rats [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(11): 3140-3149.
- [7] Bagchi D, Sen CK, Bagchi M, *et al.* Anti-angiogenic, anti-oxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2004, 69(1): 75-80.
- [8] Cui HX, Chen JH, Li JW, *et al.* Protection of anthocyanin from myrica rubra against cerebral ischemia-reperfusion injury via modulation of the TLR4/NF-kappaB and NLRP3 pathways [J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1788.
- [9] Muroi C, Fujioka M, Marbacher S, *et al.* Mouse model of subarachnoid hemorrhage: technical note on the filament perforation model [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2015, 120: 315-320.
- [10] Di Giacomo C, Acquaviva R, Santangelo R, *et al.* Effect of treatment with cyanidin-3-O-beta-D-glucoside on rat ischemic/reperfusion brain damage [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 285750.
- [11] Contrera JF, Matthews EJ, Kruhlak NL, *et al.* Estimating the safe starting dose in phase I clinical trials and no observed effect level based on QSAR modeling of the human maximum recommended daily dose [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2004, 40(3): 185-206.
- [12] Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, *et al.* A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model [J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 167(2): 327-334.
- [13] Shao A, Lin D, Wang L, *et al.* Oxidative stress at the crossroads of aging, stroke and depression [J]. *Aging Dis*, 2020, 11(6): 1537-1566.
- [14] Rashid K, Wachira FN, Nyabuga JN, *et al.* Kenyan purple tea anthocyanins ability to cross the blood brain barrier and reinforce brain antioxidant capacity in mice [J]. *Nutr Neurosci*, 2014, 17(4): 178-185.
- [15] Im SE, Nam TG, Lee H, *et al.* Anthocyanins in the ripe fruits of *Rubus coreanus* Miquel and their protective effect on neuronal PC-12 cells [J]. *Food Chem*, 2013, 139(1-4): 604-610.
- [16] Kelsey N, Hulick W, Winter A, *et al.* Neuroprotective effects of anthocyanins on apoptosis induced by mitochondrial oxidative stress [J]. *Nutr Neurosci*, 2011, 14(6): 249-259.
- [17] Hassimotto NM, Lajolo FM. Antioxidant status in rats after long-term intake of anthocyanins and ellagitannins from blackberries [J]. *J Sci Food Agric*, 2011, 91(3): 523-531.
- [18] Williams CM, El MM, Vauzour D, *et al.* Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(3): 295-305.
- [19] 周有东, 马金阳, 黄松, 等. 舒芬太尼对大鼠蛛网膜下腔出血后脑损伤的保护作用[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2021, 26(7): 531-536.
- [20] Fumoto T, Naraoka M, Katagai T, *et al.* The role of oxidative stress in microvascular disturbances after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *Transl Stroke Res*, 2019, 10(6): 684-694.
- [21] Zhu W, Jia Q, Wang Y, *et al.* The anthocyanin cyanidin-3-O-beta-glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: involvement of a cAMP-PKA-dependent signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(2): 314-327.
- [22] 刘彬冰, 史怀璋. 蛛网膜下腔出血后炎症反应的研究进展[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2018, 23(9): 636-638.

(2021-12-13 收稿, 2022-03-24 修回)