

补阳还五汤对急性脑缺血再灌注大鼠脑组织 AKT 和 p-AKT 蛋白表达的影响

蔡俊¹, 张继平^{2*}, 姚晖², 祝赫³, 黄海艳³, 徐愉林¹

(1. 广东医学院, 广东 湛江 524023; 2. 南方医科大学 附属佛山医院, 广东 佛山 528000;
3. 广东药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**探讨补阳还五汤对急性脑缺血再灌注大鼠脑组织蛋白激酶 B(AKT)和磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)蛋白表达的影响,分析其对脑缺血再灌注损伤的保护机制。**方法:**将 SPF 级 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、氯吡格雷组、补阳还五汤高、低剂量组,每组 20 只。氯吡格雷组,补阳还五汤高、低剂量组分别按照动物体表面积换算,灌胃给予氯吡格雷 $6.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,补阳还五汤 $26, 6.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,其余各组给予蒸馏水。连续给药 14 d 后,采用双侧颈总动脉阻断诱导大鼠急性脑缺血再灌注模型,比较各组病理组织学、脑组织皮层和海马 CA1 区 AKT 和 p-AKT 的表达水平。**结果:**HE 染色结果提示,与模型组比较,补阳还五汤高、低剂量组能明显改善急性脑缺血再灌注大鼠脑组织损伤程度,随剂量增大而逐渐增强;免疫组化结果显示,各组的皮层和海马 CA1 区胞核和胞浆均可见 AKT 和 p-AKT 的阳性表达。与模型组比较,氯吡格雷组、补阳还五汤高剂量组 AKT 的阳性表达明显增加 ($P < 0.05$);与假手术组相比,模型组 p-AKT 的阳性表达明显降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,氯吡格雷组、补阳还五汤高剂量组 p-AKT 阳性表达明显增加 ($P < 0.05$)。**结论:**补阳还五汤对急性脑缺血再灌注损伤模型大鼠的脑保护作用机制可能与上调 PI3K/AKT 信号通路中 AKT,p-AKT 的表达,促进 AKT 的磷酸化有关。

[关键词] 补阳还五汤;急性脑缺血再灌注;磷脂酰肌醇 3 激酶;蛋白激酶 B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0122-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060122

Influence of Buyang Huanwu Tang on Expressions of AKT and Phosphorylated-AKT in Acute Cerebral Ischemia-reperfusion Rat CAI Jun¹, ZHANG Ji-ping^{2*}, YAO Hui², ZHU He³, HUANG Hai-yan³, XU Yu-lin¹ (1. Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2. Foshan Hospital Affiliated to Southern Medical University, Foshan 528000, China; 3. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Buyang Huanwu Tang (BHT) on the expressions of protein kinase B (AKT) and phosphorylated protein kinase B (p-AKT) in acute cerebral ischemia reperfusion rat. **Method:** The specific pathogen free SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, positive control group and BHT (high, low dose) groups, each group contains 20 rats, Clopidogrel dose was $6.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, and BHT high low dose was $26, 6.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The other groups were given distilled water. The acute cerebral ischemia-reperfusion models were established by bilateral carotid artery occlusion, using HE staining to observe Bcerebral pathological histology, using immunohistochemical method to detect brain cortex and hippocampus CA1 area AKT and p-AKT positive expression level. **Result:** BHT could significantly improve the degree of acute cerebral ischemia-reperfusion injury in rat brain tissue. HE Staining showed that the number of cortex neuron cells of acute cerebral ischemia-reperfusion rats decreased, cell arranged loosely and not regular, cell nucleus become atrophy, cells surrounding space became big obviously. The number of hippocampus CA1 area

[收稿日期] 20140822(011)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(S2013010012284);广东省中药局中医药强省资助课题项目(20132029);佛山市科技发展专项资金项目(2012AA100111);佛山市医学类科技攻关项目(201208079)

[第一作者] 蔡俊,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:819171183@qq.com

[通讯作者] *张继平,硕士生导师,研究员,主任中医师,从事中药复方药理研究,Tel:0757-88032005,E-mail:fszjping@163.com

neurons decreased significantly, disordered arrangement of cells, and each dose group tissue damage degree were eased. Immunohistochemical results showed that each group of cortex and hippocampus CA1 area were seen AKT (Ab473) and p-AKT (ser473) positive expression. Compared with the sham operation group, model group AKT (Ab473) positive expression had no significant difference. Compared with model group, positive control group, BHT high dose group positive expression of AKT was obviously increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The neuroprotective effect of Buyang Huanwu Tang against acute cerebral ischemia-reperfusion in rat may be associated with upregulation of AKT and p-AKT.

[Key words] Buyang Huanwu Tang; acute cerebral ischemia-reperfusion; phosphatidylinositol 3 kinase; protein kinase B

磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 参与细胞增殖分化,抑制细胞凋亡,是细胞生存的重要信号通路之一。有研究表明 PI3K/AKT 信号通路的激活,能够抑制细胞凋亡而发挥脑保护作用^[1]。目前对补阳还五汤的研究主要集中在对急性脑缺血损伤后的脑保护作用^[2-3],而对其脑保护作用的分子机制研究较少。本文建立大鼠急性脑缺血再灌注损伤模型,观察补阳还五汤对该模型脑组织神经细胞病理形态学和 PI3K/AKT 信号通路中关键蛋白 AKT 及其磷酸化 AKT 的表达变化的影响,探讨其防治急性脑缺血再灌注损伤的分子作用机制,为治疗缺血性脑卒中提供新的作用靶点。

1 材料

1.1 试剂与仪器 石蜡切片机(德国徕卡仪器公司),全自动生物组织包埋机(PR 公司),防脱玻片(世态公司),AKT (Phospho-Ser473) Antibody, AKT (Ab-473) Antibody[Signalway Antibody(SAB)公司,批号 5117],即用型 SABC(武汉博士德公司,批号 09C22C),DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司,批号 09C22C22)。

1.2 药物与制剂 硫酸氢氯吡格雷片(赛诺菲制药有限公司,批号 2A782);补阳还五汤颗粒剂水溶液按照《医林改错》所载的药味用量进行制备。处方为:生黄芪 120 g,当归尾 6 g,赤芍 4.5 g,地龙、桃仁、红花、川芎各 3 g(黄芪颗粒剂,批号 311001T;当归颗粒剂,批号 1307117;赤芍颗粒剂,批号 309081T;地龙颗粒剂,批号 1308137;川芎颗粒剂,批号 1308137;桃仁颗粒剂,批号 309127T;红花颗粒剂,批号 1307190),取相当于饮片等量的各味药颗粒剂(由广东一方制药有限公司提供)混合后,用 100 °C 蒸馏水配制成补阳还五汤水溶液备用。

1.3 动物 SPF 级 SD 大鼠 100 只,体重 250 ~ 300 g,广东省医学实验动物中心提供,实验动物合格证号 SCXK(粤)20130002。动物实验设施是由广东药

学院实验动物中心提供。

2 分组

2.1 分组与给药 大鼠按完全随机法分为 5 组,每组 20 只。即假手术组、模型组、氯吡格雷组($6.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),补阳还五汤高、低剂量组($26, 6.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。适应性饲养 1 周后,再按照相应的药物给药,每天 1 次,连续 2 周。

2.2 大鼠急性脑缺血再灌注模型制作^[4-5] 给药 2 周后大鼠禁食不禁水 12 h,经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,再用粗线将大鼠四肢及头部仰卧固定于手术台上,颈部皮肤剪毛备皮,颈前正中切开皮肤及皮下组织,长度约 1.5 cm,分离双侧颈总动脉(CCA),注意避免损伤迷走神经,小心将神经组织分离,充分游离一段血管,用微型无创伤动脉夹同时夹闭之,60 min 后同时打开动脉夹,使血液再灌注 1 h 后取材,假手术组仅分离双侧 CCA,不作夹闭。

2.3 大鼠脑组织病理形态学观察

2.3.1 标本采集 大鼠颈椎脱臼处死,脑组织以 4 °C 生理盐水冲洗,除去血液,滤纸吸干,取大脑中间含有海马部分放入 4% 多聚甲醛固定液中固定两天。

2.3.2 脑组织病理 常规固定,石蜡包埋后,进行石蜡切片及 HE 染色,光镜下观察各组脑组织病理组织学变化。

2.3.3 脑组织 AKT 和 p-AKT 蛋白表达 蜡块连续切片,厚度 $4 \mu\text{m}$,贴片于防脱载玻片上,烤片 5 h,将组织切片脱蜡后,用中性树脂封片,光学显微镜下观察并统计阳性细胞表达率以及 AKT 的磷酸化率,以 ser473 位点磷酸化 AKT 和 AKT 吸光度 A 比值(p-AKT/AKT)表示 AKT 活化水平。免疫组化阳性信号呈棕黄色,定位于细胞浆或细胞核。采用 Image Pro Plus5.0 图像分析软件分析,根据 A 对免疫组化阳性信号进行定量。

2.3.4 数据统计分析 采用 SPSS 20.0 统计软件,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较采用单因素方差

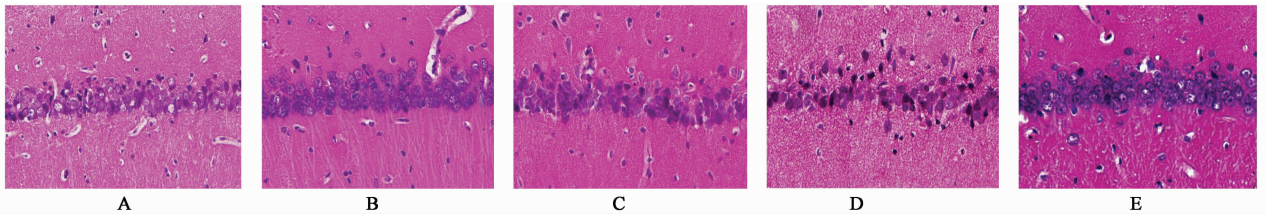
分析检验和方差齐性检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对急性脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织的影响

模型组海马 CA1 区细胞明显减少,排列紊

乱,细胞核固缩深染,形成空泡。假手术组 CA1 区神经细胞形态正常,结构完整;与模型组比较,给药组多数神经细胞结构完整,细胞形态改变相对较轻,核固缩少,且补阳还五汤对脑损伤的改善程度随剂量增大而逐渐增强。见图 1。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 氯吡格雷 $6.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;D. 补阳还五汤 $26 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;E. 补阳还五汤 $6.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (图 2~5 同)

图 1 各组海马 CA1 区细胞形态变化 (HE, $\times 400$)

Fig. 1 Each group of morphological changes in hippocampal CA1 region (HE, $\times 400$)

3.2 对缺血再灌注损伤大鼠脑组织 AKT 和 p-AKT 蛋白表达的影响

研究发现,氯吡格雷组和补阳还五汤高剂量组皮层 AKT 和 p-AKT 的阳性表达率较模型组有显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,氯吡格雷组、补阳还五汤各剂量组 AKT 磷酸化率明显增加 ($P < 0.05$)。观察海马 CA1 区可

知,AKT 和 p-AKT 在氯吡格雷组和补阳还五汤组阳性表达较为明显。与模型组比较,补阳还五汤高剂量组 AKT 磷酸化率明显增加 ($P < 0.05$)。以上结果说明补阳还五汤可能通过上调 AKT, p-AKT 基因的表达,激活 PI3K/AKT 信号通路从而发挥脑保护作用。见表 1~2,图 2~5。

表 1 补阳还五汤对缺血再灌注损伤大鼠脑组织皮层内 AKT, p-AKT 阳性细胞率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Influence of Buyang Huanwu Tang on brain cortex positive rate of AKT and phosphorylated-AKT in acute cerebral ischemia-reperfusion rat ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	p-AKT/%	AKT/%	p-AKT/AKT/%
假手术	-	0.021 ± 0.001	0.069 ± 0.011	$23.030 \pm 0.437^{1)}$
模型	-	0.029 ± 0.004	0.063 ± 0.012	40.124 ± 1.547
氯吡格雷	6.8×10^{-3}	$0.041 \pm 0.003^{1)}$	$0.080 \pm 0.007^{1)}$	$51.208 \pm 0.787^{1)}$
补阳还五汤	26	$0.046 \pm 0.003^{1,2)}$	$0.070 \pm 0.006^{1,2)}$	$67.032 \pm 0.987^{1,2)}$
	6.5	0.033 ± 0.004	0.058 ± 0.008	49.330 ± 1.455

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与补阳还五汤低剂量组比较²⁾ $P < 0.05$;(表 2 同)。

表 2 补阳还五汤对缺血再灌注损伤大鼠脑组织海马 CA1 区 AKT, p-AKT 阳性细胞率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Influence of Buyang Huanwu Tang on hippocampi CA1 positive rate of AKT and phosphorylated-AKT in acute cerebral ischemia-reperfusion rat ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	p-AKT/%	AKT/%	p-AKT/AKT/%
假手术	-	0.019 ± 0.007	0.073 ± 0.002	$13.056 \pm 1.431^{1)}$
模型	-	0.030 ± 0.005	0.061 ± 0.006	35.567 ± 0.896
氯吡格雷	6.8×10^{-3}	$0.043 \pm 0.001^{1)}$	0.059 ± 0.008	55.210 ± 1.234
补阳还五汤	26	$0.046 \pm 0.003^{1,2)}$	$0.065 \pm 0.009^{2)}$	$69.654 \pm 0.987^{1,2)}$
	6.5	0.023 ± 0.005	0.070 ± 0.003	49.382 ± 1.438

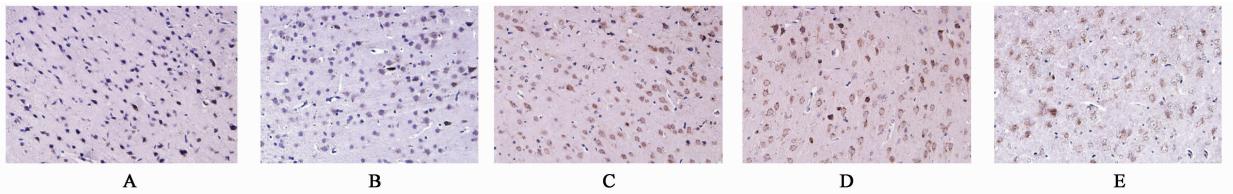


图 2 各组大鼠脑组织皮层 AKT 蛋白的表达(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Expression of rat brain cortex region of AKT protein(IHC, ×400)

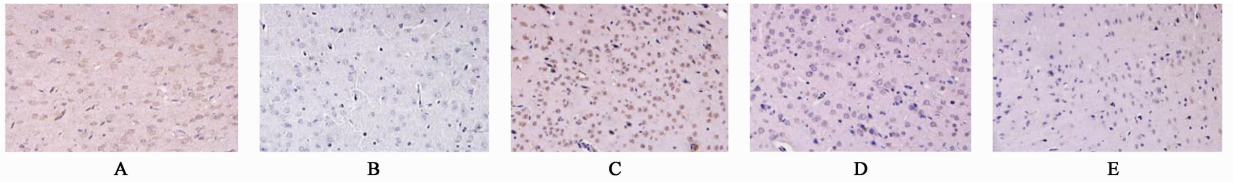


图 3 各组大鼠脑组织皮层 P-AKT 蛋白的表达(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Expression of rat brain cortex region of P-AKT protein(IHC, ×400)

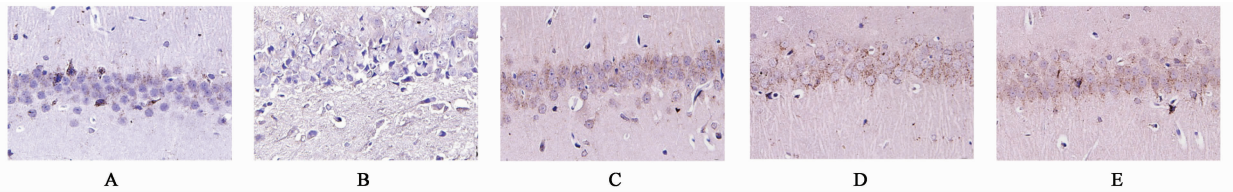


图 4 各组大鼠海马 CA1 区 AKT 蛋白的表达(免疫组化, ×400)

Fig. 4 Expression of rat brain hippocampal CA1 region of AKT protein(IHC, ×400)

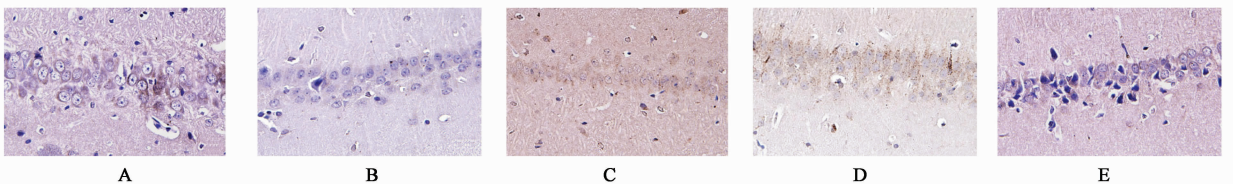


图 5 各组大鼠脑组织海马 CA1 区 P-AKT 蛋白的表达(免疫组化, ×400)

Fig. 5 Expression of rat brain hippocampal CA1 region of P-AKT protein(IHC, ×400)

4 讨论

急性脑缺血再灌注损伤是一个复杂的生理病理过程,涉及能量代谢障碍、局部酸中毒、炎症因子释放、自由基损伤、细胞凋亡等方面^[6],其中海马区细胞凋亡起着重要的作用。本研究采用改进的右侧颈总动脉阻断联合低压的急性脑缺血再灌注模型,发现急性脑缺血再灌注大鼠海马 CA₁区神经细胞发生凋亡,细胞数目明显减少、排列紊乱、无层次感、核固缩形成空泡,这与文献报道一致^[7-8]。而本文发现补阳还五汤对急性脑缺血再灌注大鼠海马组织病理损伤具有明显的改善作用。因此,探讨补阳还五汤对急性脑缺血再灌注损伤保护作用,是通过何种信号转导机制而发挥的,具有重要的临床指导意义。

PI3K/AKT 信号通路是目前与细胞增殖和凋亡相关最重要的信号通路。AKT 作为 PI3K 下游的主

要靶因子,一旦 PI3K 被激活,AKT 就会在苏氨酸和丝氨酸(Thr308/Ser473)的调节位点发生磷酸化^[9-10]。Kroner^[11]等研究发现,Thr308 和 Ser473 位点的磷酸化作用是前后相继进行的,互相独立,AKT 活性的最终实现需要 Ser473 的磷酸化,因此众多研究把测定 p-AKT(Ser473)的水平作为 AKT 活化的主要标志,可反映磷酸化 AKT 的整体量^[12-13]。Fujio 等^[14]应用荧光双染技术显示缺血再灌注损伤后,发现 AKT 阳性细胞不是凋亡细胞,并指出 PI3K/AKT 信号通路的活化可以防止细胞凋亡,促进细胞的存活。本实验对大鼠皮层和海马 CA₁区 AKT(Ab473),p-AKT(Ser473)检测结果显示,与模型组 AKT(Ab473)的表达量相比较,补阳还五汤高、低剂量和氯吡格雷组均能增加 AKT(Ab473)的阳性表达率;p-AKT(Ser473)在模型组的表达明显低于假手

术组,而阳性对照组和补阳还五汤高、低剂量组均能增加 p-AKT(Ser473)的阳性表达,提示补阳还五汤激活了 PI3K/AKT 信号通路,提高 AKT 的磷酸化率,从而改善急性脑缺血再灌注的脑损伤。这与刘氏^[15]发现 PI3K/AKT 信号通路的激活能够减轻缺血再灌注脑损伤作用一致。近年一些国外文献报道了^[16-18],从传统中药材中提取的一些化合物如羟基红花黄色素 A(HSYA),葛根素(puerarin),槲皮素(quercetin)等对缺血再灌注的脑保护损伤具有重要的保护作用,且也是通过介导 PI3K/AKT 信号通路而发挥作用,这与本文研究结果一致。

综上所述,补阳还五汤可通过上调 PI3K/AKT 信号通路中 AKT, p-AKT 蛋白的表达,促进 AKT 的磷酸化,进而预防急性脑缺血再灌注损伤而发挥脑保护作用,这可能是补阳还五汤抗急性脑缺血再灌注损伤的保护作用机制之一。

[参考文献]

[1] 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.

[2] 周赛男, 蔺晓源, 易健, 等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠神经功能及细胞形态的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(2):251-254.

[3] 张继平, 李齐欢, 文凤妮, 等. 补阳还五汤对慢性脑缺血大鼠大脑皮层血流量及全血黏度的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2013, 30(11):856-859.

[4] 蔡紫峰, 杨卓. 脑缺血损伤的研究进展[J]. *继续教育*, 2004, 18(4):53-55.

[5] 王树, 张力. 脑缺血及脑缺血再灌注损伤动物模型制备方法及其评价[J]. *神经药理学报*, 2011, 1(3):31-40.

[6] Turley K R, Toledo-Pereyra L H, Kothari R U. molecular mechanisms in the pathogenesis and treatment of acute ischemic stroke [J]. *J Invest Surg*, 2005, 18(9):207-216.

[7] 杨华丽, 韩冲芳, 周晓辉, 等. PI3K/AKT 信号通路在七氟醚预处理减轻大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2014, 12(9):1120-1121.

[8] 刘斌, 蔡梅芝, 李爱华, 等. 参芎化瘀胶囊对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(11):229-232.

[9] Osaki M, Oshimura M, Ito H. PBK-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer [J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6):667-676.

[10] Ma K, Cheung S M, Marshall A J, et al. PI(3,4,5)P3 and PI(3,4)P2 levels correlate with PKB/akt phosphorylation at Thr308 and Ser473, respectively; PI(3,4)P2 levels determine PKB activity [J]. *Cell Signal*, 2008, 20(4):684-694.

[11] Kroner C, Eybrechts K, Akkerman J W. Dual regulation of platelet protein kinase B [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(36):27790-27798.

[12] Chua B T, Gallego-Ortega D, Ramirez de Molina A, et al. Regulation of AKT(Ser473) phosphorylation by choline kinase in breast carcinoma cells [J]. *Mol Cancer*, 2009, 8(131):476-498.

[13] Riaz A, Zeller K S, Johansson S. Receptor-specific mechanisms regulate phosphorylation of AKT at Ser473: role of RICTOR in β_1 integrin-mediated cell survival [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):1-12.

[14] Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, et al. Akt promotes survival of cardiomyocytes *in vitro* and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart [J]. *Circulation*, 2000, 101(6):660-667.

[15] 刘必旺, 王坤芳, 梁志刚, 等. 乙酰葛根素对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的影响及机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(11):213-215.

[16] Chen L, Xiang Y, Kong L, et al. Hydroxysafflor yellow A protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by anti-apoptotic effect through PI3K/Akt/GSK3 β pathway in rat [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(11):2268-2275.

[17] 韩江全, 于奎营, 何敏, 等. 葛根素对大鼠脑缺血再灌注侧皮质区细胞凋亡及 p-Akt(Ser473)表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(8):1069-1072.

[18] Yao R Q, Qi D S, Yu H L, et al. Quercetin attenuates cell apoptosis in focal cerebral ischemia rat brain via activation of BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(12):2777-2786.

[责任编辑 聂淑琴]