

PI3K/Akt 通路在电针预处理诱导脑缺血耐受中的机制研究 *

何二涛¹ 张霞婧¹ 马 磊¹ 朱萧玲¹ 王 强¹
曹 丽¹ 李 丽¹ 赵宁侠² 左志义³ 陈绍洋^{1△}

(1 第四军医大学西京医院麻醉科 陕西 西安 710032 2 第四军医大学唐都医院中医科 陕西 西安 710038 ;

3 Department of Anesthesiology, University of Virginia, Charlottesville Va. 22906 USA)

摘要 目的 通过观察电针预处理对磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶(PI3K/Akt)通路的变化以及该通路抑制剂对电针预处理的脑保护的影响,探讨电针预处理诱导脑缺血耐受的可能机制。方法 线栓法单侧阻断大脑中动脉 120min,再灌注 24h 制备大鼠大脑局灶性缺血再灌注 (I/R) 模型,Western Blot 检测 Akt 磷酸化水平的变化;侧脑室注射 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002,神经行为学评分(Garcia 标准)及 TTC 染色检测脑梗死体积比评价脑损伤程度。结果 电针预处理使大鼠神经行为学评分增高,脑梗死体积比降低($P<0.05$);可上调 Akt 磷酸化水平, I/R2h 达高峰($P<0.05$)。侧脑室注射 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002,拮抗电针预处理的脑保护作用($P<0.05$)。结论:电针预处理增加 Akt(Ser473)磷酸化水平,在缺血再灌注早期上调 PI3K/Akt 通路可能是诱导大鼠脑缺血耐受的产生的主要机制。

关键词 电针;预处理;脑保护;PI3K/Akt 通路

中图分类号:Q95-3 R743 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)07-1215-04

Electroacupuncture Preconditioning Attenuate Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Through PI3K/Akt Signal Pathway in Rats*

HE Er-tao¹, ZHANG Xia-jing¹, MA Lei¹, ZHU Xiao-ling¹, WANG Qiang¹,
CAO Li¹, LI Li¹, ZHAO Ning-xia², ZUO Zhi-yr³, CHEN Shao-yang^{1△}

(1 Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China ;

2 Department of Anesthesiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China ;

3 Department of Anesthesiology, University of Virginia, Charlottesville, Va. 22906, USA)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of PI3K/Akt signal pathway in electroacupuncture preconditioning against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods:** Focal cerebral ischemia was induced by middle cerebral artery occlusion using the intraluminal filament technique in male rats. Brain ischemic injury was evaluated by neurologic scores, infarction volumes. What's more, the expression of pAkt were examined by Western blotting. **Results:** Electroacupuncture improved neurologic outcome, reduced infarct size as well as up-regulated the expression of pAkt at the early phase of reperfusion. Pretreatment with LY294002 completely reversed the protection of EA against cerebral reperfusion injury. **Conclusion:** Up regulation of pAkt expression induced by activation of PI3K/Akt signal pathway is involved in the protective effect of electroacupuncture preconditioning against focal cerebral I/R injury in rats.

Key words: Electroacupuncture; Brain; Ischemia reperfusion; Preconditioning

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R743 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)07-1215-04

前言

最新研究表明电针预处理可激活大鼠脑内的内源性大麻素系统^[1-3],诱导脑缺血耐受,其中上调 CB2 受体可诱导重复电针预处理延迟相脑保护作用^[4];另有文献报道^[5]上调神经元 CB2 受体可激活 PI3K / Akt 信号通路促进神经细胞的存活。那么,电针预处理上调 CB2 受体产生的延迟相脑保护效应,是否与 PI3K / Akt 信号通路有关尚不清楚。为此,本实验旨在探讨 PI3K / Akt 信号通路在重复电针预处理诱导延迟相脑保护效应的可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理

雄性健康清洁级 SD 大鼠 40 只,体重 280-320 g,由第四军医大学实验动物中心提供。

实验 1 SD 大鼠 18 只随机数字表法分为两组(n=9):MCAO 组和 EA 组。MCAO 组:采用线栓法单侧阻断大脑中动脉(MCAO)120min,再灌注 24h 制备大鼠大脑局灶性缺血再灌注(I/R)模型;EA 组:重复电针刺激百会穴 5 天,最后一次电针 24h 后制备 MCAO 模型。分别于缺血前即刻、再灌后 2h、再灌

* 基金项目 国家自然科学基金项目(81028006,81173394)

作者简介:何二涛(1984-),女,硕士研究生,主要研究方向:脑保护

△通讯作者:陈绍洋, Tel: +86-29-84773989, Fax: +86-29-83244986, E-mail: csyicu@126.com

(收稿日期:2012-10-05 接受日期:2012-10-31)

后 24h 随机取 3 只大鼠,采用 Western Blot 方法检测缺血半暗带大脑皮层^[6]pAkt 的表达。

实验 2 SD 大鼠 40 只,随机分为 5 组 (n=8) Sham 组、MCAO 组、EA 组、LY294002 组和 Vehicle 组。Sham 组:不做任何处理;MCAO 组:同实验 1;EA 组:同实验 1。LY294002 组和 Vehicle 组重复电针刺激百会穴 5 天,在 MCAO 模型前 1h 经侧脑室注射 LY294002 或 Vehicle,于模型后 24h 行神经功能学评分和脑梗死体积百分比检测。

1.2 具体实验方法

1.2.1 电针预处理 参照《实验针灸学》的常用实验动物针灸穴位,在两耳前缘连线中点定位“百会”穴,用 0.25mm×13mm 无菌针灸针向前平刺 2mm,与“百会”穴形成回路的另一电极夹于大鼠右耳,接 WQ-10D1 型电针刺激仪(北京市海淀电子仪器厂),以大鼠右耳微颤^[7]为穴位刺激有效指标。选用疏密波、频率 2/15Hz、电流强度 1mA,时间 30min,每天 1 次,连续重复 5d^[8]。

1.2.2 MCAO 模型制作 2%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,保留自主呼吸,根据 Wang 等^[9]的方法制作 MCAO 模型,阻断大脑中动脉 120min 后抽出尼龙线,然后恢复再灌注。术中采用激光多普勒血流仪(LDF,Perimed AB,瑞典百灵威公司),光纤探头固定于前囟后 2mm,中线旁开 2mm,检测大脑中动脉供血区的缺血再灌注前后变化的脑血流值,该值减少超过 85%,则视为 MCAO 模型制作成功。术中体温由肛温探头连接多功能检测(Spacelab 公司,美国)检测,调节烤灯维持体温在 37~37.5℃。

1.2.3 侧脑室注射药物 LY294002 组和 Vehicle 组在 MCAO 模型前 1h 经侧脑室注射药物。LY294002 稀释方法^[10]:DMSO 稀释其至 50mM(15μg/μl),然后 PBS 稀释至 10mM(3μg/μl);Vehicle 注射液:相同容积的 DMSO 加入相同容积的 PBS,DMSO 终浓度 20%。注射位置及深度:Bregma 点旁开 0.9mm 向后 1.5mm,深度 0.38mm 造模前 1h 侧脑室注射,给药量 10μl(30μg),给药速度 1μl/min,静置 3min。缓慢出针缝合。

1.2.4 神经功能损害评估和脑梗死体积比检测 动物麻醉苏醒后放回鼠笼,自由饮食。脑缺血再灌注后 24h,由一名不了解分组情况的观察者依据 Garcia 评分法^[11],评估记录神经功能学评分。脑梗死体积百分比测定:神经功能学评分完成后,给大鼠 2%戊巴比妥钠深度麻醉后断头取脑,立即放于-20℃冰盐水中。15min 中后取出置于特制脑槽中,冠状面均匀切片。将脑片放入 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液中,37℃水浴 15min 至显色,40g/L 多聚甲醛 4℃保存,24h 后用数码相机拍照后输入计算机,用图像处理软件(Adobe Photoshop 7.0)计算梗死面积(粉红色区域为正常脑组织,白色区域为梗死区),为减少缺血侧脑组织水肿对实验结果的影响,采用校正的脑梗死体积比^[12]表示:校正的脑梗死体积百分比=(对侧脑组织体积-缺血侧正常脑组织体积)÷对侧脑组织体积×100%

1.2.5 Western Blot 检测 采用 KeyGEN 全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)提取总蛋白 0.5ml/100mg 加入预冷的组织细胞裂解液,充分匀浆,4℃下 10000 转/min 离心 10min,取上清液。以 BCA 为标准蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量。在样品处理液中加入上样缓冲液,于 100℃水浴锅中

加热 10min 使蛋白变性。60μg 总蛋白经 10%SDS-PAGE 电泳分离,用 Bio-Rad 电泳仪将蛋白质转移到 PVDF 膜上,于 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 2h,滴加兔抗鼠 pAkt(Ser473)多克隆抗体(1:400,Cell Signal 公司,美国)4℃24h,TBST 洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000,武汉博士德生物工程有限公司),室温孵育 1h,再用化学发光底物孵育,最后用 Alpha Innotech 扫膜,发光。采用 Image J 分析,以目的蛋白灰度值与内参照 β-actin 灰度值的比值表示 pAkt(Ser-473)的表达。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计学软件进行分析,正态分布的计量资料以均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,偏态分布的计量资料以中位数(四分位数间距)[M(Q)表示],组间比较采用秩和检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电针预处理对大鼠局灶性缺血再灌注损伤的影响

电针预处理后,EA 组与 MCAO 组比较,I/R24h 大鼠的 Garcia 评分升高(11.5vs8.0),脑梗死体积百分比明显下降(30±3%vs48±5%),见表 1。

2.2 电针预处理对 Akt 磷酸化水平的影响

EA 组电针预处理前,Akt 磷酸化水平明显较对照组增强(P<0.05);I/R2h 时,Akt 磷酸化水平达高峰,且明显高于相同时间点 MCAO 组(P<0.05),I/R24h 时,EA 组与 MCAO 组 Akt 磷酸化水平相仿,均较 I/R2h 明显降低,但仍明显高于 I/R 前水平,见图 1。

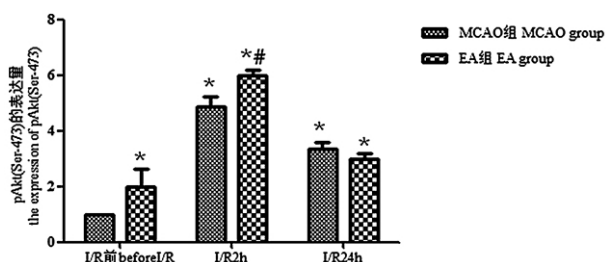


Fig.1 The expression of pAkt(Ser-473) in the ischemia cerebral cortex of rats in the first experiment (n=3).

* 与 I/R 前 MCAO 组比较 P<0.05; # 相同时间点 MCAO 组与 EA 组比较 P<0.05

*vs MCAO group before I/R, P<0.05; #EA group vs MCAO group at the same time point, P<0.05

2.3 PI3K/Akt 通路抑制剂对电针预处理的脑保护作用的影响

侧脑室注射 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 组较 MCAO 组的神经行为学评分降低(9.0vs8.0,P<0.05),脑梗死体积百分比升高(41±4%vs48±5%,P<0.05),而 Vehicle 组神经行为学评分及脑梗死体积百分比与 EA 组均无明显差异,见表 1。

3 讨论

本实验表明电针预处理可有效改善大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤,诱导脑缺血耐受的产生。电针预处理可使 Akt (Ser-473)磷酸化水平升高,缺血再灌注早期达到高峰,且明显高于对照组,但缺血前给予 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 可使大

表 1 各组神经行为学评分及脑梗死体积百分比比较[n=8,M(Q), $\bar{x}\pm$ S.D.]

Table 1 Neurological scores and infarct volume percentages in each group in the second experiment(n=8). Data are respectively presented as M(Q)and mean $\pm$ S.D.

组别(Groups)	神经行为学评分(Neurological scores)	脑梗死体积百分比(%) (Infarct volume percentages %)
Sham	18.0(0)	0
MCAO	8.0(2)	48 $\pm$ 5
EA	11.5(3)*	30 $\pm$ 3*
LY294002	9.0(3)#	41 $\pm$ 4*#
Vehicle	11.0(4)*	33 $\pm$ 8*

注：* 与 MCAO 组比较 P<0.05 # 与 EA 组比较 P<0.05
Note: * vs MCAO group before I/R,P<0.05; #vs EA group, P<0.05

鼠神经行为学评分降低,脑梗死容积增加,拮抗重复电针预处理产生的脑缺血耐受效应,表明重复电针预处理可能通过激活 PI3K/Akt 通路,上调 Akt(Ser473)的磷酸化水平,产生脑缺血耐受作用。

磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) / 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶(Akt)通路是细胞内重要的信号传导途径,在细胞增殖中发挥着重要作用。在缺血再灌注损伤时,活化的 Akt 可抑制细胞凋亡^[13-15]。该通路能直接磷酸化多种转录因子,如 FKHR1、NF- κ B 和 Bcl-2,抑制凋亡基因的表达和增强抗凋亡基因的表达,从而促进神经细胞的存活。另外,PI3K/Akt/Nrf-2 可减少能促进细胞凋亡的晚期炎症介质 HMGB1 的产生^[16],抑制 Bax/bcl-2 和 caspase c 的生成,促进神经元存活。Kao TC 等^[17]也发现甘草酸可上调 PI3K/Akt /GSK3 β 通路,降低炎症因子的释放,发挥脑保护作用。表明 PI3K/Akt 通路也可能通过调节炎症因子的释放促进神经细胞存活。

以往的研究^[18]发现电针刺激百会穴也可以模拟缺血预处理,诱导脑缺血耐受效应,但其机制尚不完全清楚。Wang SJ 等^[19] 研究结果发现局灶性脑缺血再灌注后电针刺激大鼠百会穴及人中穴,可增加大脑皮层中抗凋亡蛋白磷酸化 Akt 的表达水平,抑制促凋亡蛋白 caspase-9 的激活,减少神经元凋亡。但重复电针预处理是否可激活 PI3K/Akt 通路,从而发挥脑保护作用还有待探讨。近期研究发现电针可激活大鼠脑内的内源性大麻素系统^[1-3],上调 CB2 受体表达,在缺血再灌注后 24h 时达高峰,CB2 受体抑制剂可明显降低电针预处理的脑保护作用,表明 CB2 受体介导电针预处理延迟相脑保护效应^[4]。以上研究表明电针可激活脑内的 PI3K / Akt 信号通路和 CB2 受体,并在诱导脑缺血耐受中发挥重要作用。Ozaita A 等^[20]发现注射四氢大麻酚 THC 可激活 PI3K/Akt/GSK3 β 通路,且在大鼠半侧小脑切除术中^[5],损伤对侧小脑的神经元 CB2 受体被激活,上调 CB2 受体可促进神经细胞的存活,而 PI3K / Akt 信号通路抑制剂可使 CB2 受体的保护作用降低,说明内源性大麻素可激活 PI3K/Akt 通路,且激活神经元上 CB2 受体可能通过 PI3K / Akt 通路发挥脑保护作用。Molina-Holgado E 等^[21]发现激活星形胶质细胞上的大麻素受体可促进细胞的存活,该作用与 PI3K / Akt 通路减少 NO 的释放相关。因此,大麻素系统与 PI3K/Akt 通路在电针预处理诱导的脑保护方面密切相关。本实验发现电针预处理可激活 PI3K / Akt 通路,结合该通路对凋亡

相关基因的作用即可推测出,预处理可减弱凋亡基因的表达而增强抗凋亡基因的表达。在缺血再灌注早期 MCAO 组 Akt 磷酸化水平较 Sham 组显著升高,而且电针预处理使这种变化更为明显,大鼠的神经行为学评分改善,脑梗死容积也降低,而给予 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 后,电针预处理的保护作用被部分反转。综上所述,重复电针预处理可能通过激活 PI3K/Akt 通路,上调 Akt(Ser-473)的磷酸化水平,产生脑缺血耐受作用。至于这种保护效应是否通过 CB2 受体介导,以及电针对 PI3K / Akt 通路的主要靶点还需进一步研究。

致谢：
感谢本实验室王世全老师在动物模型方面给予的大力帮助！

参考文献(References)

[1] Wang Q, Chen S, Xiong L, et al. Pretreatment with electroacupuncture induces rapid tolerance to focal cerebral ischemia through regulation of endocannabinoid system[J]. Stroke, 2009,40(6): 2157-2164

[2] Du J, Wang Q, Chen S, et al. Involvement of ERK 1/2 activation in electroacupuncture pretreatment via cannabinoid CB1 receptor in rats [J]. Brain Res, 2010, 11; 1360: 1-7

[3] Su TF, Zhang LH, Li M, et al. Cannabinoid CB2 Receptors Contribute to Upregulation of beta-endorphin in Inflamed Skin Tissues by Electroacupuncture[J]. Mol Pain, 2011,19;7(1): 98

[4] Ma L, Zhu Z, Chen S, et al. Cannabinoid receptor type 2 activation yields delayed tolerance to focal cerebral ischemia[J]. Curr Neurovasc Res, 2011, 8(2): 145-152

[5] Viscomi MT, Oddi S, Maccarrone M, et al. Selective CB2 receptor agonism protects central neurons from remote axotomy-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway [J]. J Neurosci,2009,8,29 (14): 4564-4570

[6] Ashwal S, Tone B, Pearce WJ, et al. Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion[J]. Stroke, 1998, 29(5):1037-1046; discussion 1047

[7] 林文注,王佩,主编.实验针灸学[M]. 1 版. 上海 :上海科学技术出版社, 1999: 288

Lin Wen-zhu, Wang Pei, Experimental acupuncture[M]. The 1st printing. Shanghai Science Press, Shanghai, 1999: 288

[8] Xiong L, Lu Z, Chen S, et al. Pretreatment with repeated electroacupuncture attenuates transient focal cerebral ischemic injury in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116(1): 108-111

[9] Hu B, Wang Q, Chen S, et al. Neuroprotective effect of WIN 55,212-2

- pretreatment against focal cerebral ischemia through activation of extracellular signal-regulated kinases in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 645(1-3): 102-107
- [10] Noshita N, Lewen A, Chan PH, et al. Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(12): 1442-1450
- [11] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral occlusion in rats [J]. Statistical validation. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-634
- [12] Wang Q, Zhang X, Xiong L, et al. Limb remote postconditioning alleviates cerebral reperfusion injury through reactive oxygen species-mediated inhibition of delta protein kinase C in rats [J]. *Anesth Analg*, 2011, 113(5): 1180-1187
- [13] Mamoru Shibata, Takemori Yamawaki, et al. Upregulation of Akt phosphorylation at the early stage of middle cerebral artery occlusion in mice[J]. *Brain Research*, 942 (2002):1-10
- [14] Hu J, Chai Y, Du L, et al. PI3K p55 γ promoter activity enhancement is involved in the anti-apoptotic effect of berberine against cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674(2-3):132-142
- [15] De la Torre AV, Junyent F, Camins A, et al. GSK3 β inhibition is involved in the neuroprotective effects of cyclin-dependent kinase inhibitors in neurons[J]. *Pharmacol Res*, 2011 Aug 22 [Epub ahead of print]
- [16] Ha YM, Kim MY, Chang KC, et al. Higenamine reduces HMGB1 during hypoxia-induced brain injury by induction of heme oxygenase-1 through PI3K/Akt/Nrf-2 signal pathways [J]. *Apoptosis*, 2011, Dec, 20 [Epub ahead of print]
- [17] Kao TC, Shyu MH, Yen GC. Glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid inhibit inflammation via PI3K/Akt/GSK3 β signaling and glucocorticoid receptor activation[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58 (15):8623-8629
- [18] Wang Q, Peng Y, Xiong L, et al. Pretreatment with electroacupuncture induces rapid tolerance to focal cerebral ischemia through regulation of endocannabinoid system[J]. *Stroke*, 2009, 40(6):2157-2164
- [19] Wang SJ, Omori N, Li F, et al. Potentiation of Akt and suppression of caspase-9 activations by electroacupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 331 (2): 115-118
- [20] Ozaita A, Puighermanal E, Maldonado R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain [J]. *J Neurochem*. 2007, 102(4):1105-1114
- [21] Molina-Holgado E, Vela JM, Guaza C, et al. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(22): 9742-9753

(上接第 1204 页)

- [7] Jung K. Safety and tolerability of immunotherapy using various uposing schedules of a new SCIT product with an optimised allergen/aluminium hydroxide ratio[J]. *Allergy*, 2011, 66(95):41-43
- [8] 曹瑞娟, 许昱. 尘螨 DNA 疫苗在变应性疾病中的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(19): 3768-3771
CAO Rui-juan, XU Yu. Research on DNA vaccine of dust mites in allergic diseases [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2010, 10(19): 3768-3771
- [9] Li J, Sun B, Huang Y, et al. A multicentre study assessing the prevalence of sensitizations in patients with asthma and/or rhinitis in China[J]. *Allergy*, 2009, 64(7): 1083-1092
- [10] Umetsu DT, Dekruyff RH. Natural killer T cells are important in the pathogenesis of asthma: the many pathways to asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(5):975-979
- [11] Gadue P, Stein P L. NKT cell precursors exhibit differential cytokine regulation and require Itk for efficient maturation [J]. *J Immunol*, 2002, 169(5):2397-2406
- [12] 李付广, 王芳, 杜英. 儿童过敏性哮喘尘螨特异性免疫治疗中干扰素- γ 、白介素 4、T-bet 和 GATA-3 mRNA 表达变化的研究[J]. *中国实用儿科杂志*, 2009, 24(4):267-269
LI Fu-guang, WANG Fang, DU Ying. Changes of expression of IFN- γ , IL-4, T-bet and GATA-3 mRNA during house dust mites specific immunotherapy for children with allergic asthma[J]. *Chinese Journal of Practical Pediatrics*, 2009, 24(4):267-269
- [13] Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, et al. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and V α 14 iNKT cells[J]. *J Exp Med*, 2006, 203 (3): 755-766
- [14] Matsuda JL, Zhang Q, Ndonge R, et al. T-bet concomitantly controls migration, survival, and effector functions during the development of V α 14 iNKT cells[J]. *Blood*, 2006, 107 (7) 2798 - 2805
- [15] Kim PJ, Pai SY, Briggman et al. GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells[J]. *J Immunol*, 2006, 177 (10) : 6650-6659