

PI3K/PKB 信号途径在远程肢体缺血后处理减轻脑缺血再灌注损伤中的作用

王国峰,王滨,刘伯芹

摘要 目的:通过观察肢体缺血后处理(LIP)后 p-Akt、Caspase-9 及 Bcl-2 蛋白的表达,探讨 PI3K/PKB 信号途径在远程 LIP 减轻脑缺血再灌注损伤中的作用。**方法**:42 只大鼠随机分成对照组、缺血再灌注(IR)组和 LIP 组各 14 只,后 2 组采用线栓法制备局灶性脑缺血再灌注模型,LIP 组在缺血 2 h 后再灌注前实施 3 个循环健侧股动脉缺血 5 min 再灌注 5 min 的 LIP。采用 TTC 染色测定脑梗死体积,免疫组化法检测 p-Akt、Caspase-9、Bcl-2 蛋白的表达。**结果**:LIP 组大鼠脑梗死体积较 IR 组明显减小($P<0.05$)。LIP 组 p-Akt、Bcl-2 蛋白表达较 IR 组明显增高($P<0.05$),LIP 组 Caspase-9 蛋白表达较 IR 组明显降低($P<0.05$)。**结论**:LIP 可上调 p-Akt、Bcl-2 表达,下调 Caspase-9 表达,并减轻脑梗死体积,PI3K/PKB 信号通路在 LIP 减轻脑缺血再灌注损伤中可能发挥重要保护作用。

关键词 肢体缺血后处理;磷脂酰肌醇 3 激酶;蛋白激酶 B;缺血再灌注

中图分类号 R741;R743.3;R741.02 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2018.12.001

作者单位

青岛市市立医院西
院区神经内科

山东 青岛 266002

收稿日期

2017-12-30

通讯作者

刘伯芹

764678381@qq.

com

Effects of PI3K/PKB Signal Transduction Pathway in Limb Ischemic Postconditioning against Cerebral Ischemia Reperfusion Injury WANG Guo-feng, WANG Bin, LIU Bo-qin. Department of Neurology, Qingdao Municipal Hospital, Shandong 266002, China

Abstract Objective: To investigate the changes in expression of p-Akt, Caspase-9, and Bcl-2 protein in the rat model of limb ischemic postconditioning (LIP) and examine the effect of the phosphatidylinositol 3-kinase/Protein Kinase B (PI3K/PKB) signal transduction pathway in LIP against cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **Methods:** A total of 42 Wistar rats were randomly assigned to the sham surgery group, ischemia/reperfusion (IR) group, and LIP group with 14 rats in each group. The filament occlusion method was employed to generate the focal cerebral ischemia reperfusion model in the latter two groups. Two hours after the middle cerebral artery occlusion model was established and before reperfusion, LIP was carried out in LIP group rats by three cycles of 5 minutes occlusion/5 minutes release of the left femoral artery. Brain sections were stained with TTC for surveying the volume of infarction. The expression of p-Akt, Caspase-9, and Bcl-2 proteins was determined by immunohistochemical staining. **Results:** Compared with the IR group, the LIP group showed significantly decreased infarct volume ($P<0.05$). The expression of p-Akt protein and Bcl-2 protein significantly increased in the LIP group compared with that in the IR group ($P<0.05$). The expression of caspase-9 protein significantly decreased in the LIP group compared with that in the IR group ($P<0.05$). **Conclusion:** Limb ischemic postconditioning may upregulate the expression of p-Akt and Bcl-2 proteins, downregulate the expression of caspase-9 protein, and reduce the cerebral infarct volume. The PI3K/PKB signal transduction pathway may play important roles in limb ischemic postconditioning against cerebral ischemia reperfusion injury.

Key words limb ischemic postconditioning; phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinase B; ischemia reperfusion

急性缺血性脑卒中作为卒中最常见的类型,其高致残率、高死亡率带来巨大的社会和经济负担^[1]。目前,急性缺血性脑卒中的治疗,无论是公认和首选的静脉溶栓治疗,还是动脉溶栓、桥接、机械取栓、血管成形、支架术等血管内介入治疗,其最终目的都是为了开通血管,实现缺血脑组织的再灌注。但在脑缺血再灌注过程中,再灌注损伤会加剧神经细胞的死亡。2017年急性缺血

性脑卒中早期血管内介入治疗流程与规范专家共识中明确指出,血管再通后的过度灌注综合征是一种非常严重的并发症^[2]。如何最大限度降低脑缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤成为脑血管领域研究的热点问题。研究发现,肢体缺血后处理(limb ischemic postconditioning, LIP)可通过多种机制参与脑缺血再灌注损伤的保护^[3]。而磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidyl inositol 3

kinase, PI3K)、蛋白激酶B(protein kinases B, PKB)信号通路在脑缺血再灌注损伤中扮演重要角色,激活后可通过多种途径抑制细胞凋亡,减轻缺血再灌注损伤,发挥神经保护作用^[4,5]。但是,关于PI3K/PKB信号途径在LIP减轻脑缺血再灌注损伤中的研究,国内外鲜有报道。本研究通过创建LIP大鼠模型,观察脑缺血再灌注后p-Akt、Caspase-9、Bcl-2蛋白的表达,探讨PI3K/PKB信号途径在LIP减轻脑缺血再灌注损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 健康雄性Wistar大鼠42只,3月龄,SPF级,体质量250~300 g,由青岛市药物检验所实验动物中心提供[动物合格证号:SCXK(鲁)20130010]。大鼠随机分为对照组、IR组、LIP组各14只。其中,每组7只用于TTC染色测定脑梗死体积,7只用于免疫组织化学法测定p-Akt、Caspase-9、Bcl-2蛋白表达。所有大鼠于实验开始前适应环境7 d,单笼饲养,自由饮食。实验动物及实验过程符合中华人民共和国科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》要求^[6]。

1.1.2 主要试剂及材料 直径0.24 mm线栓、即用型SABC试剂盒、DAB显色试剂盒、抗p-Akt单克隆抗体、抗Bcl-2单克隆抗体、抗Caspase-9单克隆抗体(购于武汉博士德生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型制作 ①IR模型制备:采用线栓法,参照Zea-Longa等^[7]大脑中动脉局灶性脑缺血模型的制备方法,10%水合氯醛腹腔注射大鼠麻醉后仰卧于手术台上,分离左侧颈总、颈外及颈内动脉,结扎颈外动脉远端,动脉夹夹闭颈总及颈内动脉,在颈外动脉结扎线近端距分叉5 mm处剪一约0.2 mm小口并导入线栓(线栓直径0.24 mm),经颈总动脉分叉部进入颈内动脉,向上深入至分叉以上(18.5±2)mm,遇阻力停止。结扎颈外动脉近心端,松开颈总和颈内动脉夹,2 h后轻轻抽出栓线至分叉处形成再灌注。②LIP模型制备:参照Ren等^[8]处理方法制作LIP模型,局灶性脑缺血2 h后再灌注前,分离左侧股动脉,使用动脉夹夹闭左侧股动脉,行3个循环缺血5 min和再灌注5 min的LIP。对照组均为假手术,给予暴露颈总动脉及左侧股动脉,不插线栓,不实施后处理。IR组在缺血2 h再灌注前亦分离左侧股动脉,但不实施后处理。按Menzies^[9]等级评分法,在动物清醒状态下,出现右前肢不能伸展、爬行时向右侧转圈并存活至规定时间点作为造模成功的标

准。所有动物均在再灌注24 h后处死。死亡动物通过随机原则补齐数量并重新造模。

1.2.2 TTC染色检测梗死体积 按谢惠芳^[10]等的处理方法进行操作。每组随机选取7只大鼠,快速断头取脑,距额极2 mm向后连续等距切取5个冠状脑片,间距2 mm,37℃水浴,避光、体积分数0.01TTC缓冲液染色30 min,蒸馏水冲洗、40 g/L多聚甲醛的PBS溶液中固定保存。正常脑组织染为红色,梗死组织为白色。使用Simple PCI图像分析软件(购于美国Compix公司)计算梗死体积百分比,(非缺血侧体积-缺血侧正常脑组织体积)/非缺血侧体积×100%,非缺血侧体积或者缺血侧正常脑组织体积=(s1+s2+s3+s4+s5)×2,其中s表示每片应该计算的面积,2表示每片厚度(mm)^[11]。

1.2.3 免疫组化法检测p-Akt、Caspase-9、Bcl-2蛋白的表达 对p-Akt、Caspase-9、Bcl-2蛋白的检测采用免疫组织化学染色法,参照试剂盒提供的实验步骤进行操作:石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2 室温10 min,切片浸入0.01 mol/L的枸橼酸盐缓冲液,微波炉加热至沸腾后断电,间隔5 min后,反复2次。滴加5%的BSA封闭液,室温20 min。滴加1:100工作浓度的一抗,4℃过夜后滴加生物素化二抗,37℃孵育30 min。滴加试剂SABC,37℃孵育30 min。DAB室温显色,镜下控制反应时间。所有切片均在同一光强度下,同一放大倍数下进行,细胞浆出现棕色颗粒为阳性着色。在低倍镜下选择观察缺血灶周围区视野,主要在皮质区取4个象限选择视野,然后在高倍镜下计数阳性细胞。

1.3 统计学处理

采用SPSS19.0软件包对数据进行统计学处理。所有定量数据进行正态性和方差齐性检验,符合正态分布以(均值±标准差)表示。各组均数间的比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组脑梗死体积比较

TTC染色显示对照组脑组织呈均匀红色,无梗死灶。LIP组与IR组脑组织染色均见白色缺血灶,主要位于额、顶、颞叶皮质,纹状体及海马区亦可见缺血灶(图1)。LIP组脑梗死体积显著小于IR组($P<0.05$)(表1、图1)。

2.2 p-Akt、Bcl-2、Caspase-9蛋白表达

p-Akt蛋白在对照组即有表达,包括皮质、纹状体及海马区内的神经元细胞浆内,表现为棕色颗粒。IR组的p-Akt蛋白表达有所升高,LIP组p-Akt蛋白表达较对照组及IR组增多,差异均有统计学意义($P<0.05$)

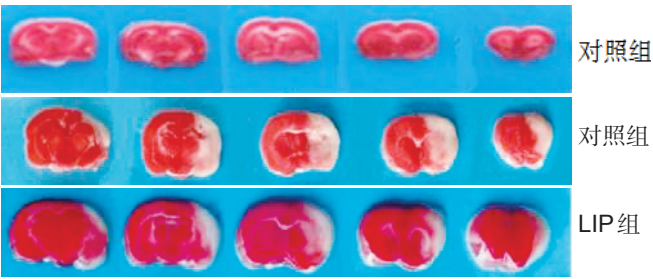
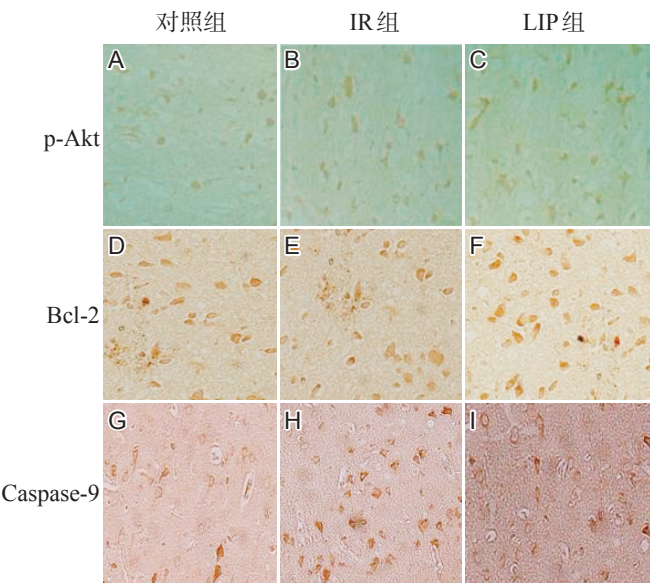


图1 3组脑组织TTC染色

(表1、图2A-C)。Bcl-2蛋白在对照组表达较多,IR组的Bcl-2蛋白表达下降,较对照组差异有统计学意义($P<0.05$),且LIP组Bcl-2蛋白表达较对照组及IR组增多,差异均有统计学意义($P<0.05$)(表1、图2D-F)。Caspase-9蛋白在对照组极少表达,散在于神经元细胞浆中,阳性细胞呈棕黄色颗粒。IR组的Caspase-9蛋白表达明显增加,分布于缺血灶周边神经元细胞浆,皮质、纹状体区均可见到,且LIP组Caspase-9蛋白表达较IR组明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$)(表1、图2G-I)。



注:A、D、G为对照组,B、E、H为IR组,C、F、I为LIP组;A-C为p-Akt;D-F为Bcl-2蛋白;G-I为Caspase-9蛋白

图2 各组脑组织p-Akt、Bcl-2、Caspase-9蛋白表达(SABC染色,×400)

3 讨论

缺血后处理不是新概念,是相对于先前提出的缺血预处理而言,由于缺血事件存在太多的不可预见性,在缺血预处理得不到广泛临床应用的情况下,缺血后处理就显得颇为重要,但在实际工作中,由于急性缺血再灌注受时间窗的限制、靶器官缺血的复杂多变以及增加原位缺血可能会进一步加剧缺血组织的损害等诸多因素,这种原位缺血后处理的临床应用也受到限制^[12]。伴随研究的深入,LIP的概念逐渐被提出,在机体重要器官发生致命的缺血缺氧损伤后,再灌注发生开始前或开始后,通过给肢体进行短暂、可逆的非创伤性缺血缺氧刺激,可激活机体的内源性保护机制,并通过多种细胞信号通路途径,作用于靶器官,从而降低靶器官的损伤^[13,14]。本研究通过3个循环缺血5 min、再灌注5 min的方式反复夹闭健侧股动脉建立LIP缺模型,发现LIP组大鼠脑梗死体积较IR组明显减小,说明通过短暂、反复夹闭健侧股动脉的LIP可以减轻脑缺血再灌注损伤。

PI3K/PKB信号通路是一种重要的细胞信号通路,激活后可通过多种途径抑制细胞凋亡,减轻缺血再灌注损伤。活化的Ras能直接结合并激活PI3K的P110催化亚基,PI3K活化后将二磷酸磷脂酰肌醇转化生成第二信使三磷酸磷脂酰肌醇,然后通过激活生存信号激酶PKB等靶蛋白来调控细胞生存。其中,PKB又称Akt,是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,主要通过PI3K激活。PI3K可使Akt的Ser473和Thr308位点磷酸化,激活后的Akt可通过对含有丝氨酸/苏氨酸残基的底物磷酸化,譬如激活其下游的Bcl蛋白、caspase蛋白等发挥其广泛的生物学效应,包括促进细胞凋亡、抗细胞凋亡、促细胞生存等功能^[15,16]。而LIP在脑梗死急性期具有明显的神经保护作用,其机制也可能是通过降低神经细胞凋亡水平来实现^[17]。在动物实验模型中发现^[18],远程缺血后处理可通过提高fibulin-5 mRNA和蛋白的表达从而激活PI3K/AKT信号途径来抑制细胞凋亡。本研究发现,缺血再灌注后p-Akt蛋白表达有所升高,LIP可

表1 各组大鼠脑梗死体积、p-Akt、Bcl-2、Caspase-9蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	梗死体积百分比/%	p-Akt/(个/视野)	Bcl-2/(个/视野)	Caspase-9/(个/视野)
对照组	7	0	6.90±0.97	14.91±1.20	1.6±0.52
IR组	7	38.29±2.27	8.94±1.10 ^①	11.30±1.66 ^①	9.77±1.47 ^①
LIP组	7	31.11±3.00 ^②	14.74±1.51 ^{①②}	18.61±1.81 ^{①②}	4.97±1.07 ^{①②}
F值		25.35	78.14	37.59	96.64
P值		0.00	0.00	0.00	0.00

注:与对照组比较,^① $P<0.05$;与IR组比较,^② $P<0.05$

明显增加p-Akt蛋白的表达,说明脑缺血再灌注可影响p-Akt蛋白的表达,而通过LIP可进一步激活Akt,刺激p-Akt蛋白的表达。同时,活化的Akt对其下游底物产生影响,其中,缺血灶周边区Bcl-2蛋白的表达明显增加,Caspase-9蛋白表达明显减少。而远程LIP又是如何从远端肢体传递到脑组织、由肢体的缺血改变影响到脑组织蛋白变化发挥缺血再灌注损伤的保护作用的呢?尽管具体机制仍未完全阐明,但本研究推测,通过短暂的、反复的远端肢体缺血、缺氧刺激,可能导致机体产生启动信号,同时发生机械信号与生物信号的相互转导,诱导机体内源性保护因子的触发和释放,由此激活PI3K/PKB信号通路,上调p-Akt蛋白,而活化的Akt对其下游底物产生影响,上调Bcl-2和下调Caspase-9蛋白的表达,并通过神经、循环、内分泌等多种途径,最终作用于脑组织。其中,上调的Bcl-2蛋白可能通过抑制内质网Ca²⁺的释放、调节核内外运输及、阻止促凋亡基因信号传递、抑制氧自由基等多种途径发挥抗细胞凋亡作用,同时Caspase-9蛋白表达减少可通过降低其下游的Caspases启动和级联瀑布效应减少细胞凋亡、减轻缺血再灌注损伤,从而通过多方面最终发挥脑缺血再灌注损伤的神经保护作用。

本文的创新点在于,目前尽管缺血后处理在脑保护中的作用机制研究比较多,但PI3K/PKB信号途径在LIP减轻脑缺血再灌注损伤中的研究鲜有报道,本研究首次通过夹闭健侧股动脉的远程LIP来检测再灌注后p-Akt蛋白及其下游Bcl-2、Caspase-9蛋白的表达,并探讨PI3K/PKB信号通路在脑缺血再灌注损伤中的保护作用。这对临床工作,尤其是在急性缺血性脑卒中早期实施溶栓治疗或血管内介入治疗时,适时予以远程LIP干预,可能不仅减轻脑血管再通后带来的缺血再灌注损伤,同时也为新疗法和新药物的开发提供全新思路 and 全新靶向,并提供初步实验依据。诚然,本研究也存在许多不足,未应用PI3K抑制剂对模型进行干预,以进一步反证PI3K/PKB信号途径在LIP减轻脑缺血再灌注损伤中的保护作用,同时细胞凋亡、炎症反应、神经血管发生等因素也未进行进一步检测。

参考文献

- [1] Zhou M, Wang H, Zhu J, et al. Cause-specific mortality for 240 causes in China during 1990-2013: a systematic subnational analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Lancet*, 2016, 387: 251-272.
- [2] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会神经血管介入协作组. 急性缺血性脑卒中早期血管内介入治疗流程与规范专家共识[J]. *中华神经科杂志*, 2017, 50: 172-177.
- [3] Gao S, Zhan L, Yang Z, et al. Remote Limb Ischaemic Postconditioning Protects Against Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury in Mice: Activation of JAK/STAT3-Mediated Nrf2-Antioxidant Signalling[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43: 1140-1151.
- [4] Gao F, Gao E, Yue TL. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia reperfusion: the roles of PI3 kinase, Akt and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation [J]. *Circulation*, 2002, 105: 1479-1502.
- [5] Rocha-Ferreira E, Rudge B, Hughes MP, et al. Immediate Remote Ischemic Postconditioning Reduces Brain Nitrotyrosine Formation in a Piglet Asphyxia [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 5763743.
- [6] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [8] Ren C, Yan Z, Wei D, et al. Limb remote ischemic postconditioning protects against focal ischemic in rats[J]. *Brain Res*, 2009, 1288: 88-94.
- [9] Menzies SA, Hoff JT, Betz AL. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model [J]. *Neurosurgery*, 1992, 31: 100-107.
- [10] 谢惠芳, 徐如祥, 陈中灿. 线栓法制作大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型的改进[J]. *中华神经医学杂志*, 2007, 6: 340-342.
- [11] 胡晓静, 张贵斌, 谢敏杰. 可溶性环氧化物水解酶抑制剂TPPU对大鼠局灶脑缺血后血脑屏障的保护作用[J]. *神经损伤与功能重建*, 2017, 4: 286-289.
- [12] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285: H579-588.
- [13] Zhou Y, Fathali N, Lekic T, et al. Remote limb ischemic postconditioning protects against neonatal hypoxicischemic brain injury in rat pups by the opioid receptor Akt pathway [J]. *Stroke*, 2011, 42: 439-444.
- [14] Li H, Zhou S, Wu L, et al. The role of p38MAPK signal pathway in the neuroprotective mechanism of limb postconditioning against rat cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *J Neurol Sci*, 2015, 357: 270-275.
- [15] Linares-Palomino J, Husainy MA, Lai VK, et al. Selective blockade of protein kinase B protects the rat and human myocardium against ischaemic injury [J]. *J Physiol*, 2010, 15: 2173-2191.
- [16] Sung SM, Jung DS, Kwon CH, et al. Hypoxia/reoxygenation stimulates proliferation through PKC-dependent activation of ERK and Akt in mouse neural progenitor cells [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32: 1932-1939.
- [17] Ramagiri S, Taliyan R. Remote limb ischemic post conditioning during early reperfusion alleviates cerebral ischemicreperfusion injury via GSK-3 β /CREB/ BDNF pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 15: 84-93.
- [18] Zhang W, Wang Y, Bi G, et al. Limb remote ischaemic postconditioning-induced elevation of fibulin-5 confers neuroprotection to rats with cerebral ischaemia/reperfusion injury: Activation of the AKT pathway [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2017, 44: 656-663.

(本文编辑:王晶)