

## 补阳还五汤对脑出血大鼠 PI3K/AKT 信号通路的影响 及其神经保护作用的机制

吴晓光<sup>1</sup>, 李蒙蒙<sup>1</sup>, 仇志富<sup>1</sup>, 李义学<sup>2</sup>, 苗光新<sup>1</sup>

1. 河北省中医药抗痴呆重点研究室/承德医学院基础医学研究所, 河北省承德市 067000

2. 承德医学院附属医院, 河北省承德市 067000

**摘要:**目的 观察并探究补阳还五汤对脑出血大鼠脑组织磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (PI3K/AKT) 信号转导通路的影响及其神经保护作用的可能机制。方法 72 只 SD 大鼠随机分为四组:假手术组、模型组、补阳还五汤组、银杏叶片组, 每组 18 只。其中模型组、补阳还五汤组、银杏叶片组采用 Rosenberg 法制作脑出血大鼠模型。Garcia 法检测大鼠神经功能评分, 电镜观察神经元线粒体超微结构, western blot 法检测磷酸化蛋白激酶 (p-AKT) 蛋白表达, TUNEL 法检测细胞凋亡变化, 免疫组化法检测 B 细胞淋巴瘤基因-2 (bcl-2) 蛋白、Bcl-2 相关 X 蛋白 (bax) 的表达, 甲酰胺法检测血脑屏障 (BBB) 通透性, 干湿重法检测脑组织含水量。结果 与脑出血模型组相比, 补阳还五汤治疗明显提高神经功能学评分 ( $P < 0.05$ ), 降低 BBB 通透性, 减少脑组织含水量 ( $P < 0.05$ ), 上调 p-AKT、bcl-2 蛋白表达, 下调 bax 蛋白表达, 减轻线粒体损伤, 抑制神经元凋亡。结论 补阳还五汤抗脑出血引起脑损伤的作用机制可能与其激活 PI3K/AKT 信号途径, 抑制神经元凋亡, 降低 BBB 通透性, 减轻脑水肿有关。

**关键词:**补阳还五汤; 凋亡; 磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; 信号通路; B 细胞淋巴瘤基因-2; Bcl-2 相关 X 蛋白; 血脑屏障; 大鼠

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2016.02.005

## Neuroprotective effect of Buyang Huanwu decoction on the PI3K/AKT signaling pathway in rats with cerebral hemorrhage and possible mechanisms

Wu Xiao-Guang, Li Meng-Meng, Qiu Zhi-Fu, Li Yi-Xue, Miao Guang-Xin. Institute of basic medical science, Chengde Medical College/Hebei Provincial Key Laboratory of traditional Chinese medicine, Chengde, Hebei 067000, China

Corresponding Author: Miao Guang-Xin, E-mail: mgx8088@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the neuroprotective effect of Buyang Huanwu decoction on the phosphatidylinositol 3-kinase/serine/threonine protein kinase (PI3K/AKT) signaling pathway in the brain tissue of rats with cerebral hemorrhage and possible mechanisms. **Methods** A total of 72 Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operation group, model group, Buyang Huanwu decoction group, and Ginkgo leaf tablet group, with 18 rats in each group. In the model group, Buyang Huanwu decoction group, and Ginkgo leaf tablet group, the Rosenberg method was used to establish the rat model of cerebral hemorrhage. The Garcia method was used to determine the neurological score, electron microscopy was performed to observe the neuronal mitochondrial ultrastructure, Western blot was used to measure the protein expression of phosphorylated protein kinase (p-AKT), TUNEL was used to measure the changes in cell apoptosis, immunohistochemistry was used to measure the expression of B cell lymphoma-2 protein (bcl-2) and bcl-2-associated X protein (bax), formamide assay was performed to determine the permeability of blood-brain barrier (BBB), and the wet-dry weighting method was used to measure the water content in brain tissue. **Results** Compared with the cerebral hemorrhage model group, Buyang Huanwu decoction significantly increased neurological score ( $P < 0.05$ ), reduced the permeability of BBB, reduced the water content in brain tissue ( $P < 0.05$ ), upregulated the protein expression of p-AKT and bcl-2, downregulated the protein expression

**基金项目:**河北省高等学校重点学科病理学与病理生理学项目资助(2013);承德医学院校级重点资助项目(201607)

**收稿日期:**2015-09-23; **修回日期:**2016-04-06

**作者简介:**吴晓光(1975-),男,副教授,主要从事中医药抗痴呆研究。Email:ewxg@qq.com。

**通讯作者:**苗光新(1980-),男,副研究员,硕士研究生导师,主要从事老年性脑病研究。Email:mgx8088@163.com。

of bax, relieved mitochondrial injury, and inhibited neuronal apoptosis. **Conclusions** The mechanism of the protective effect of Buyang Huanwu decoction against cerebral hemorrhage caused by brain injury may be related to the activation of the PI3K/AKT signaling pathway, inhibition of neuronal apoptosis, reduction in BBB permeability, and alleviation of cerebral edema.

**Key words:** Buyang Huanwu decoction; apoptosis; phosphatidylinositol 3-kinase/serine/threonine protein kinase; signaling pathway; B cell lymphoma-2; bcl-2-associated X protein; blood-brain barrier; rat

脑出血中最常出现的是细胞凋亡,细胞凋亡的机制复杂多样,在众多细胞凋亡机制涉及的信号转导通路中,磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(PI3K/AKT)信号转导通路是极为重要的,其可通过调控凋亡蛋白和凋亡基因发挥抑制细胞凋亡的作用<sup>[1]</sup>。补阳还五汤是临床上用于治疗出血性脑血管病的常用药物之一,其能通过减少神经元死亡、促进神经修复再生等机制来发挥防治作用<sup>[2]</sup>。脑出血研究中补阳还五汤能够激活数条与细胞凋亡联系密切的信号转导通路,然而其对 PI3K/AKT 信号通路的影响却鲜有报道。本研究通过观察补阳还五汤对脑出血模型大鼠血肿周围脑组织中磷酸化蛋白激酶(p-AKT)、B 细胞淋巴瘤基因-2(bcl-2)蛋白、Bcl-2 相关 X 蛋白(bax)表达,细胞凋亡数量,血脑屏障通透性的改变及脑水肿的变化,探究 PI3K/AKT 信号通路在补阳还五汤对大鼠脑出血大鼠神经保护的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及试剂

成年雄性清洁级 SD 大鼠 72 只,体质量(250 ± 20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。补阳还五汤由生黄芪 120 g、当归尾 6 g、赤芍 4.5 g、川芎 4.5 g、干地龙 3 g、桃仁 3 g、红花 3 g 组成,购自承德大药房。银杏叶片购自北京双鹤药业有限公司。p-AKT 兔抗大鼠单克隆抗体,购自上海雅吉生物科技有限公司。兔抗大鼠 Bcl-2、BAX 多克隆抗体,购自上海延生实业有限公司。缺口末端标记法(TUNEL)凋亡检测试剂盒,购自武汉博士德生物科技有限公司。其它试剂皆为国产分析纯。

### 1.2 动物分组

大鼠称重编号后用随机数字表法分组:假手术组、模型组、补阳还五汤组和银杏叶片组,每组各 18 只。

### 1.3 模型制作及给药

采用 Rosenberg 法<sup>[3]</sup>制备大鼠脑出血模型。在造模后第 2 天起,补阳还五汤组、银杏叶片组大鼠分别灌胃给予 26 g/Kg/d 和 3.5 mg/Kg/d,连续干预 14 d;假手术组及模型组大鼠灌胃给予等量生

理盐水。

### 1.4 神经功能障碍评分

采用双盲法,利用 Garcia<sup>[4]</sup>的方法对各组大鼠进行神经功能行为学评分。

### 1.5 电镜观察神经元线粒体超微结构

取血肿周围 1 mm<sup>3</sup> 大小脑组织,2.5% 戊二醛、4% 多聚甲醛混合液固定 24 h,1% 锇酸后固定 1 h,梯度丙酮脱水,Epon812 环氧树脂包埋,醋酸铀、枸橼酸铅双重染色,JEOL 100CX-II 型透射电镜观察线粒体超微结构。

### 1.6 p-AKT 蛋白表达检测

从各组蛋白样品中取 30 μg 总蛋白量进行 10% SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭。一抗 p-AKT (1:60) 4℃ 冰箱内过夜,二抗 37℃ 温箱内孵育 1 h,ELC 发光液发光,X 线片显影,利用 Quantity One 软件分析 X 线胶片上 p-AKT 蛋白表达的灰度值。

### 1.7 凋亡调控蛋白的检测

5 μm 脑切片常规 SABC 法进行免疫组化染色[一抗兔抗大鼠 bcl-2 (1:150)、bax (1:100)]。通过 Image pro plus 5.01 图像处理软件分析每组 5 张切片,5 个不同视野阳性表达的积分光密度值(integral optical density, IOD)。

### 1.8 细胞凋亡数量检测

TUNEL 法检测细胞凋亡变化,严格按照 TUNEL 凋亡检测试剂盒操作说明进行。

### 1.9 脑组织含水量检测

大鼠断头、取脑,去除嗅球部分,分析天平称湿重后于 90℃ 真空干燥 24 h,再次称重。按公式:含水量(%) = (湿重 - 干重)/湿重 × 100% 来计算脑组织含水量。

### 1.10 血脑屏障通透性检测

2% 伊文思蓝于大鼠的尾部静脉注射,3 h 后以 200 ml 生理盐水左心室插管冲洗血管内血液,取脑称重,脑组织放于甲醛胺内,置于 60℃ 水浴 24 h,匀浆后离心(转速:1000 r/min、时间:6 min),635 nm 波长处检测上清液的 OD 值,以此计算伊文思蓝含量。

1.11 统计学处理

SPSS 17.0 统计软件系统,方差分析采用 one-way ANOVA 方法,先进行方差齐性检验,若方差齐则进行 LSD 检验,若方差不齐则进行 Games-Howell 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能评分的变化

大鼠造模术后 6 h 进行评分,脑出血模型组大鼠出现严重的神经功能障碍,站立不稳,左侧肢体无力,无法攀援、追尾等现象。模型组大鼠神经功能评分 ( $8.24 \pm 0.76$ ) 较假手术组 ( $17.32 \pm 1.81$ ) 显著降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,补阳还五汤组和银杏叶片组大鼠神经功能障碍明显改善,神经功能评分显著升高 ( $12.85 \pm 1.32$ ),差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

2.2 p-AKT 蛋白表达灰度值的变化

假手术组 p-AKT 表达较低,脑出血模型组 p-AKT 蛋白表达有所增加;与模型组比较,补阳还五

汤组和银杏叶片组 p-AKT 表达明显增多 ( $P < 0.05$ ) 即补阳还五汤可诱导 p-AKT 表达增加,激活 PI3K/AKT 信号通路。见图 1、表 1。

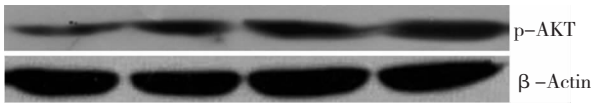


图 1 各组大鼠血肿周围脑组织 p-AKT 蛋白表达的变化

2.3 各组大鼠血肿周围脑组织神经元线粒体超微结构的变化

电镜下,可见假手术组神经元内线粒体数量丰富,体积较小,线粒体脊排列规则。模型组线粒体数量明显减少,或出现嵴断裂、空泡化,或致密,嵴分辨不清。与模型组比较,补阳还五汤组、银杏叶片组大鼠脑组织线粒体数量显著增多,线粒体肿胀现象明显减轻,线粒体脊排列区域规则。见图 2。

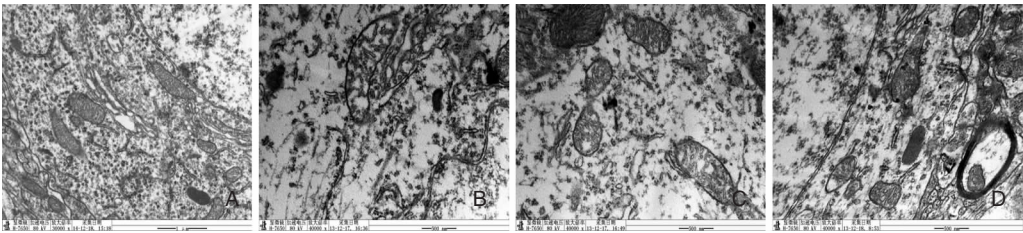


图 2 各组大鼠血肿周围脑组织神经元线粒体超微结构的变化。A:假手术组;B:模型组;C:补阳还五组;D:银杏叶片组。

2.4 细胞凋亡数量的变化

假手术组大鼠大脑皮质内可见零星的、散在的 TUNEL 阳性细胞,TUNEL 阳性细胞中大部分为神经元,少部分为胶质细胞和血管内皮细胞。模型组大鼠血肿周围皮质 TUNE 阳性细胞较假手术组显著增加 ( $P < 0.05$ );补阳还五汤组和银杏叶片组 TUNE 阳性细胞较模型组显著减少 ( $P < 0.05$ );补阳还五汤组和银杏叶片组两组间比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 3、表 1。

2.5 bcl-2、bax 蛋白表达变化

神经元胞浆呈棕黄色结果即为 bcl-2、bax 蛋白的阳性表达。在假手术组中 bcl-2 和 bax 有少量的表达。与模型组比较,补阳还五汤组和银杏叶片组 bcl-2 表达增加,bax 表达降低,bcl-2/bax 比值显著升高 ( $P < 0.05$ )。与银杏叶片组比较,补阳还五汤组脑组织 bcl-2/bax 蛋白表达比值差异无统计学

意义 ( $P > 0.05$ )。见图 4、图 5、表 2。

表 1 各组大鼠血肿周围脑组织 p-AKT 蛋白表达及 TUNEL 阳性细胞数的变化 ( $\bar{x} \pm s; n = 6$ )

组别	p-AKT(灰度值)	TUNEL 阳性细胞(个/视野)
假手术组	$5.42 \pm 1.17$	$0.92 \pm 0.06$
模型组	$6.76 \pm 1.34^*$	$6.34 \pm 2.01^*$
补阳还五汤组	$10.93 \pm 1.51^\#$	$3.97 \pm 1.45^\#$
银杏叶片组	$9.61 \pm 1.51^\#$	$4.65 \pm 1.98^\#$

注: \* 为与假手术组比较,  $P < 0.05$ ; # 为与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

表 2 各组脑组织 bcl-2、bax 蛋白的比较 (个/视野; $\bar{x} \pm s; n = 6$ )

组别	Bcl-2	BAX	Bcl-2/BAX
假手术组	$5.20 \pm 1.59$	$5.19 \pm 1.09$	$1.01 \pm 0.132$
模型组	$10.93 \pm 2.69^*$	$19.04 \pm 4.73^*$	$0.49 \pm 0.078^*$
补阳还五汤组	$20.37 \pm 4.95^\#$	$14.62 \pm 2.96^\#$	$1.39 \pm 0.365^\#$
银杏叶片组	$15.68 \pm 3.71^\#$	$13.16 \pm 3.20^\#$	$1.26 \pm 0.198^\#$

注: \* 为与假手术组比较,  $P < 0.05$ ; # 为与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

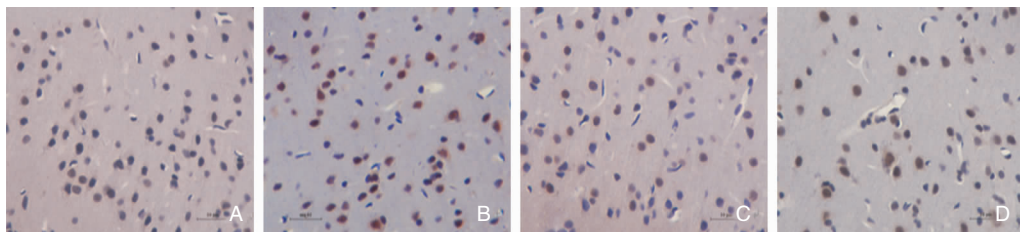


图3 各组大鼠血肿周围脑组织神经元凋亡的变化(TUNEL法,  $\times 400$ )。A:假手术组;B:模型组;C:补阳还五汤组;D:银杏叶片组。

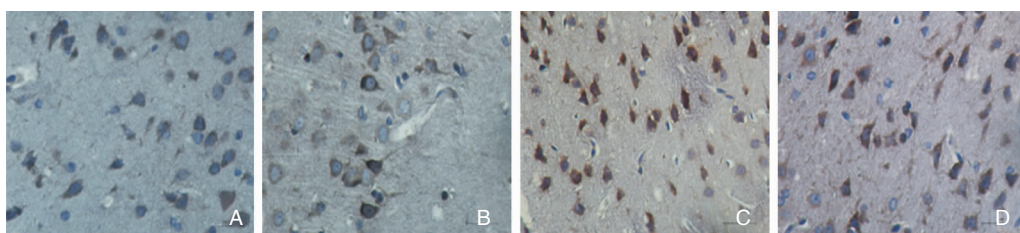


图4 各组大鼠血肿周围脑组织 bcl-2 蛋白表达变化(免疫组织化学法,  $\times 400$ )。A:假手术组;B:模型组;C:补阳还五汤组;D:银杏叶片组。

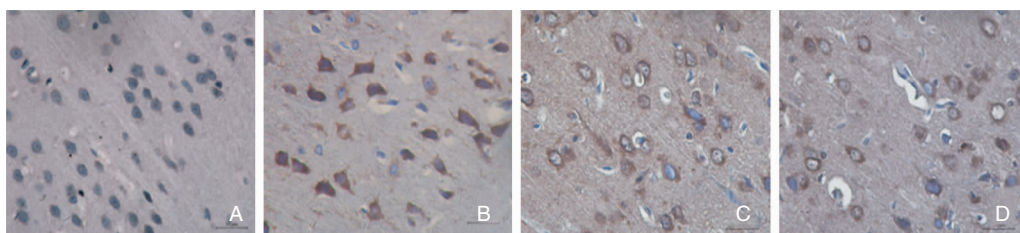


图5 各组大鼠血肿周围脑组织 bax 蛋白表达变化(免疫组织化学法,  $\times 400$ )。A:假手术组;B:模型组;C:补阳还五汤组;D:银杏叶片组。

## 2.6 脑组织含水量的变化

模型组大鼠脑组织含水量( $78.76 \pm 5.20$ )%显著高于假手术组( $59.97 \pm 2.59$ )%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );补阳还五汤组和银杏叶片组大鼠脑组织含水量分别为( $73.56 \pm 4.19$ )%和( $69.87 \pm 3.65$ )%,均显著低于模型组( $P < 0.05$ );补阳还五汤组和银杏叶片组两组脑组织含水量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 2.7 脑组织中伊文思蓝(EB)含量的变化

模型组大鼠每克脑组织 EB 含量( $26.53 \pm 1.09$ )  $\mu\text{g}$  明显高于假手术组( $2.03 \pm 1.70$ )  $\mu\text{g}$ , 差异有统计学意义( $P < 0.05$ );补阳还五汤组和银杏叶片组大鼠脑组织每克脑组织 EB 含量分别为( $17.58 \pm 0.98$ )  $\mu\text{g}$  和( $14.66 \pm 0.87$ )  $\mu\text{g}$ , 明显低于模型组( $P < 0.05$ );补阳还五汤组和银杏叶片组两组间脑组织 EB 含量比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

脑出血可导致血肿周围脑组织发生迟发性神经元死亡,其主要的原因是神经元凋亡,有效的抑制或减少细胞凋亡是实现脑保护作用的重要手段。PI3K/AKT 信号转导通路作为细胞生存的信号通路之一,其在细胞增殖、分化、抑制神经细胞凋亡方面起到了重要的作用。脑出血后,机体本身可以释放出一些能够将具有酪氨酸激酶活性受体激活的物质,如神经细胞生长因子、整合素等,受体经过其磷酸化以后会特异性的结合 PI3K 的调节亚基,从而将 PI3K 激活。PI3K 结合其下游的效应分子 AKT 的 PH 结构域,AKT 从细胞质向细胞膜转位,构象改变,Thr308 位点以及 Ser473 位点发生磷酸化,由抑制状态变为激活状态,即成为 p-AKT。p-AKT 可直接将其下游凋亡靶点如 Bad、caspase-9、forkhead 家族的 DAF-16、I $\kappa$ B 激酶、糖原合成激酶 3、Caspase-3、NF- $\kappa$ B 等蛋白磷酸化发挥抗凋亡作用。

其中 Bad 属于 bcl-2 家族,是首个被确认受 AKT 调控的凋亡蛋白,Bad 与 bcl-xl 结合,使 bcl-xl 维持线粒体膜完整性的功能丧失<sup>[6]</sup>。p-AKT 可以使 Bad 磷酸化,并使其与 14-3-3 蛋白结合,与 bcl-xl 脱离,起到抑制细胞凋亡,促进细胞存活的作用。本实验在建立脑出血模型大鼠的基础上,以补阳还五汤灌胃给药,发现给药组 p-AKT 蛋白阳性表达显著升高,凋亡细胞数量显著降低,此结果与李峰<sup>[7]</sup>的研究结果一致,提示脑出血中补阳还五汤能发挥抑制神经细胞凋亡的脑保护效果必然与 PI3K/AKT 信号通路的激活密不可分。

脑出血后脑水肿是影响脑出血死亡率及神经功能恢复的重要因素。血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性破坏引发的脑水肿对于迟发性神经细胞损伤和凋亡发挥着促进作用,使细胞功能障碍和坏死现象加重<sup>[8]</sup>。本研究发现,补阳还五汤给药后,大鼠脑组织 BBB 通透性降低,脑水肿现象减轻,补阳还五汤发挥了较好的脑保护效果。bcl-2、bax 作为 bcl-2 家族的两类标志性凋亡蛋白,bcl-2/bax 值直接影响细胞凋亡状态一促进或抑制,bcl-2/bax 值越大,则对凋亡起抑制作用越明显,反之,则促进凋亡。二者发挥作用的方式都是经过上游生物学信号激活之后,通过对相关下游基因的激活来完成的,其中 PI3K/AKT 信号通路便可激活二者,调节两者之间的比值变化<sup>[9,10]</sup>。PI3K/AKT 信号通路激活后,AKT 发生磷酸化能够促使 Ser136 位点的 Bad 发生磷酸化,形成一个可以与伴侣蛋白 14-3-3 结合的位点进而形成复合物,当复合物形成时,bcl-2 或者 bcl-xl 形成的异源二聚体中的 Bad 脱落下来,从而增加胞质中的 bcl-2 或者 bcl-xl 等的游离状态,以此来发挥抗凋亡的作用<sup>[11,12]</sup>。人们在对小鼠进行 AKT 基因剔除后发现,AKT 的磷酸化水平降低了,导致了胞质中 bcl-2 的表达下调、bax 的表达上调,使脑损害程度<sup>[9]</sup>进一步加重。本实验中补阳还五汤给药后,两者比值发生显著性变化,提示由 PI3K/AKT 信号通路的激活可能引发了 bcl-2/bax 值的变化。

综上所述,补阳还五汤对脑出血诱发的神经元损伤具有保护作用。但由于本实验没有做 bcl-

2、bax 阻断剂的干预,补阳还五汤对 bcl-2、bax 蛋白表达比值的调节是否确由 PI3K/AKT 信号通路介导,还需进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] Li Q, Lei H, Zhang C, et al. Icaritin induces AML cell apoptosis via the MAPK/ERK and PI3K/AKT signal pathways. *Int J Hematol*, 2013, 97(5): 617-623.
- [2] 周成,刘宏坤.补阳还五汤治疗脑梗死的临床疗效分析. *中药药理与临床*, 2015, 31(3): 165-167.
- [3] Rosenberg NF, Matthew BM, Adam KR, et al. Surveillance neuroimaging and neurologic examinations affect care for intracerebral hemorrhage. *Neurology*, 2013, 82(13): 108-109.
- [4] Garcia JH, Wagner S, Liu KF, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats statistical validation. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-635.
- [5] 张雯,宋俊科,杜冠华,等.缺血再灌注损伤与细胞凋亡信号转导通路. *中国药理学杂志*, 2015, 50(7): 565-569.
- [6] 仇志富,吴晓光,孟杰,等.补阳还五汤提取物灌胃对脑出血大鼠脑组织中 PI3K、AKT、caspase-3 表达的影响. *山东医药*, 2016, 56(9): 29-31.
- [7] 李峰,余颜,易健,等.补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠 APJ、Apelin、p-PI3K/AKT 表达的影响. *中药材*, 2015, 38(6): 1258-1262.
- [8] 李超.应用甘油果糖联合吡拉西坦治疗 2 型糖尿病患者脑出血后脑水肿的临床观察. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2015, 42(4): 324-329.
- [9] 张凡喜,张健民,黄晓龙,等. Dickkopf-1 在脑出血大鼠神经元凋亡中的作用及机制研究. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2016, 17(1): 19-25.
- [10] 崔勇,王艳杰,赵丹玉,等.藏花素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导氧化应激细胞模型凋亡的影响. *中华中医药杂志*, 2015, 30(5): 1818-1821.
- [11] 韩军,宣佳利,胡浩然,等.金丝桃苷预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用与 PI3K/Akt 信号通路的关系. *中国中药杂志*, 2015, 40(1): 118-123.
- [12] 殷俊,李艳冰,沈琴,等. ERK 和 CREB 磷酸化在硫氢化钠对大鼠脑缺血再灌注神经保护的机制探讨. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2015, 42(3): 223-228.