

基于 Akt/GSK-3 β 通路研究紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠脑保护作用及血管内皮间质过度转化的影响

汪宁¹, 高军¹, 白方会¹, 刘圆方², 温昌明^{1*}

1. 南阳市中心医院 神经内科脑血管病介入病区, 河南 南阳 473000

2. 南阳市中心医院 儿外科, 河南 南阳 473000

摘要: 目的 研究紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠的脑保护作用, 并考察其对血管内皮间质过度转化与蛋白激酶 B/糖原合成激酶-3 β (protein kinase B/glycogen synthesizing kinase-3 β , Akt/GSK-3 β) 通路的影响。方法 建立脑缺血再灌注大鼠模型, 给予紫檀芪和硫酸氢氯吡格雷片干预 6 d 后, 检测大鼠神经功能缺损程度; 采用 ELISA 法检测各组大鼠血清血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF)、血小板源性 CD40 配体 (CD40L) 和血小板 P 选择素 (P-sellectin, CD62P) 水平; 采用试剂盒检测各组大鼠脑组织超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察各组大鼠脑皮质病理变化; 采用免疫荧光染色法检测各组大鼠脑血管内皮和间质标志物血小板-内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1, 又名 CD31)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 表达; 采用 Western blotting 法检测各组大鼠脑血管 CD31、 α -SMA 和脑皮质 Akt 和 GSK-3 β 蛋白表达情况; 采用免疫组化法检测各组大鼠脑皮质 Akt 和 GSK-3 β 蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高 ($P < 0.05$); 血清 PAF、CD40L 和 CD62P 水平显著升高 ($P < 0.05$); 脑组织 SOD 活性显著降低, MDA 水平升高 ($P < 0.05$); 脑皮质细胞形态破坏, 呈空泡样坏死, 细胞间隙增大, 染色变浅, 残存细胞体积缩小, 细胞核固缩、深染, 细胞边界不清; 脑血管 CD31 表达减弱, α -SMA 表达增强; 脑血管 CD31 和脑皮质 p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 脑血管 α -SMA 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组大鼠神经功能缺损评分显著降低 ($P < 0.05$); 血清 PAF、CD40L 和 CD62P 水平降低 ($P < 0.05$); 脑组织 SOD 活性升高 ($P < 0.05$), MDA 水平降低 ($P < 0.05$); 脑皮质细胞形态、排列、细胞核清晰度以及间质染色均匀度等均改善; 脑血管 CD31 表达增强, α -SMA 表达减弱; 脑血管 CD31 和脑皮质 p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 脑血管 α -SMA 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠具有脑保护作用, 可抑制血管内皮-间质过度转化, 其作用机制可能与激活 Akt/GSK-3 β 通路有关。

关键词: 紫檀芪; 脑缺血再灌注; 血管内皮-间质过度转化; 蛋白激酶 B; 糖原合成激酶-3 β

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)08-2399-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.08.017

Effect of pterostilbene on brain protection and vascular endothelial mesenchymal transition in rats with cerebral ischemia-reperfusion based on Akt/GSK-3 β pathway

WANG Ning¹, GAO Jun¹, BAI Fang-hui¹, LIU Yuan-fang², WEN Chang-ming¹

1. Interventional Ward of Cerebrovascular Disease, Department of Neurology, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China

2. Department of Pediatric Surgery, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China

Abstract: Objective To study the cerebral protective effect of pterostilbene on cerebral ischemia-reperfusion rats, and investigate its effect on vascular endothelial mesenchymal transition and protein kinase B/glycogen synthesizing kinase-3 β (Akt/GSK-3 β) pathway.

Methods A rat model of cerebral ischemia-reperfusion was established, and after 6 d of intervention with pterostilbene and

收稿日期: 2021-12-24

基金项目: 河南省科技发展计划项目 (192102310349)

作者简介: 汪宁 (1983—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向为神经内科脑血管介入。E-mail: 17165864481@163.com

*通信作者: 温昌明 (1974—), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向为神经内科脑血管介入。E-mail: qtxvjh@163.com

clopidogrel hydrogen sulfate tablets, degree of neurological deficit in rats was detected; Platelet activating factor (PAF), platelet-derived CD40 ligand (CD40L) and platelet P-selectin (CD62P) levels in serum were detected by ELISA; Kits were used to detect superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) level in brain tissue of rats in each group; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of cerebral cortex of rats in each group; Immunofluorescence staining was used to detect the cerebral vascular endothelial and interstitial markers platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, also known as CD31) and α -smooth muscle actin (α -SMA) expressions of rats in each group; Western blotting was used to detect CD31 and α -SMA protein expressions in cerebrovascular, Akt and GSK-3 β protein expressions in cerebral cortex of rats; Akt and GSK-3 β expressions in cerebral cortex of rats in each group were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with sham group, neurological deficit score of rats in model group was significantly increased ($P < 0.05$); Levels of PAF, CD40L and CD62P in serum were significantly increased ($P < 0.05$); SOD activity in brain tissue was significantly decreased, and MDA level was increased ($P < 0.05$); Cerebral cortical cells were morphologically damaged, showing vacuolar necrosis, intercellular space was increased, staining was lighted, residual cell volume was reduced, nuclei were pyknotic and hyperchromatic, and cell boundaries were unclear; CD31 expression in cerebral blood vessels was weakened, α -SMA expression was enhanced; CD31 protein expression in cerebrovascular, p-Akt and p-GSK-3 β protein expressions in cerebral cortex of rats were significantly decreased ($P < 0.05$), α -SMA protein expression in cerebrovascular was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, neurological deficit score of rats in each administration group were significantly decreased ($P < 0.05$); Levels of PAF, CD40L and CD62P in serum were decreased ($P < 0.05$); SOD activity in brain tissue was increased ($P < 0.05$), MDA level of cerebral cortex was decreased ($P < 0.05$); Morphology, arrangement, nuclear clarity and interstitial staining uniformity of cerebral cortex were improved; CD31 expression in cerebral blood vessels was increased, and α -SMA expression was decreased; CD31 protein expression in cerebrovascular, p-Akt and p-GSK-3 β protein expressions in cerebral cortex of rats were significantly increased ($P < 0.05$), α -SMA protein expression in cerebrovascular was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Pterostilbene has cerebral protective effect on cerebral ischemia-reperfusion rats, and can inhibit the excessive transition of vascular endothelium to mesenchyme, and its mechanism may be related to the activation of Akt/GSK-3 β pathway.

Key words: pterostilbene; cerebral ischemia-reperfusion; endothelial-mesenchymal excessive transition; protein kinase B; glycogen synthesis kinase-3 β

缺血性脑血管病为常见中枢神经系统疾病，以脑血液循环障碍为主要特征。脑缺血再灌注是指缺血性脑血管病患者脑部缺血一段时间后恢复血供，但脑功能非但没有恢复，反而出现更严重的脑功能障碍的现象^[1]。脑缺血再灌注损伤是一个复杂的动态生理病理过程，主要原因是氧化应激损伤、细胞炎症损伤等造成病理级联反应^[2]。Pan 等^[3]发现缺血性脑血管病与个体血小板功能异常有关；Chen 等^[4]发现缺血性脑血管病可诱导血管的内皮间质转化与血管纤维化，并认为内皮间质转化是脑血管病的潜在治疗靶点。脑缺血再灌注后过量自由基攻击重获血液供应的组织细胞，导致脑血管内皮细胞受损，发生内皮间质转化。

紫檀芪是白藜芦醇同系衍生物，是从黑莓、蓝莓等浆果中提取的一类非黄酮类多酚化合物。Song 等^[5]发现紫檀芪可抑制肝细胞上皮-间质转化；Malik 等^[6]发现紫檀芪可减少氧化应激性损伤；Liu 等^[7]经动物实验发现紫檀芪可通过抗炎减轻脑缺血再灌注损伤。蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/糖原合

成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 信号通路参与调节细胞凋亡，其中 GSK-3 β 是一种进化保守的丝氨酸/苏氨酸激酶，可调节细胞分化、增殖和凋亡等生物学行为，在脑缺血再灌注时可诱导细胞凋亡，放大级联反应，加重脑血管细胞凋亡损伤。本研究旨在探究紫檀芪对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用，并考察其对血管内皮间质转化的影响。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只，7 周龄，体质量 260~270 g，购自北京斯贝福生物技术有限公司，生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010。动物饲养于动物房，温度 24~26 °C，相对湿度 40%~60%，昼夜周期为 12 h，自由摄食饮水，实验开展前适应性饲养 1 周。动物实验操作均符合 3R 原则，经实验动物伦理委员会批准 (批准号 2020042216-007)。

1.2 药品与试剂

紫檀芪 (质量分数 98.0%，批号 20190811) 购

自宝鸡市国康生物科技有限公司,用时以含 0.5%聚山梨酯 80 的生理盐水溶解成混悬液;硫酸氢氯吡格雷片(批号 20191105)购自深圳信立泰药业股份有限公司,用时研碎成粉末,溶于蒸馏水,超声溶解定容到 1 mg/mL;大鼠血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)、血小板源性 CD40 配体(CD40L)和血小板 P 选择素(P-selectin, CD62P) ELISA 试剂盒购自上海科顺生物科技有限公司,批号分别为 20190513、20190814、20191108;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号 20190712)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号 20190917)购自南京建成生物工程研究所;尼龙线栓购自北京西浓科技有限公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 ab6721)、荧光血小板-内皮细胞黏附分子-1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1, 又名 CD31)抗体(批号 ab28364)、荧光 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(批号 ab232784)、Alexa Fluor 488 偶联的驴抗兔二抗(批号 ab150077)、兔抗大鼠蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 抗体、磷酸化 Akt (phosphorylated Akt, p-Akt) 抗体、糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 抗体、p-GSK-3 β 抗体、CD31 抗体、 α -SMA 抗体、GAPDH 抗体(批号分别为 ab8805、ab18785、ab141295、ab145937、ab108424、ab8425、ab9485)购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

Infinite M20 Pro 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); Light Cycler 96 qRT-PCR 仪(瑞士 Roche 公司); Kestrel 200 型光学测量显微镜(英国 Vision 公司); PowerPacUniversal 通用电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药

取 50 只大鼠建立脑缺血再灌注大鼠模型^[8]:大鼠麻醉后,在颈部正中取切口,暴露右颈内、外动脉以及总动脉,眼科剪将颈总动脉剪 1 个小口,插入线栓直至颈内动脉,深度为距离动脉分叉 2 mm,结扎颈内动脉,栓塞 2 h 后拔出线栓。剩余 10 只大鼠作为假手术组,其操作同上,但不实施栓塞处理。拔出线栓再灌注 24 h,大鼠清醒后,参考 Zea-Longa 评分法^[9]评估大鼠神经功能缺损程度,评分为 1~3 分表示造模成功,纳入实验。共 40 只大鼠造模成

功,随机分为模型组及紫檀芪低、高剂量(5、10 mg/kg)^[10]组和硫酸氢氯吡格雷(6.8 mg/kg)组,每组 10 只。各给药组 ip 相应药物,模型组和假手术组 ip 含 0.5%聚山梨酯 80 的生理盐水,1 次/d,连续 6 d。

2.2 神经行为学检测

末次给药 2 h 后,参考 Zea-Longa 神经功能缺损评分标准^[9],评估大鼠神经行为学。评分标准:无神经功能缺损征象为 0 分,提尾时病灶对侧前肢收缩为 1 分,向瘫痪侧旋转为 2 分,向病灶对侧跌倒为 3 分,无自发活动和意识障碍为 4 分。

2.3 ELISA 检测血清 PAF、CD40L 和 CD62P 水平

完成神经行为学检测后处死大鼠,腹主动脉采血 10 mL,离心取血清,于 -80 °C 保存备用。按照 ELISA 试剂盒说明书测定大鼠血清 PAF、CD40L 和 CD62P 水平。

2.4 脑组织 SOD 活性和 MDA 水平的检测

各组大鼠采血后,断头取脑,快速冲洗后滤纸吸干水分,于冰上快速分离右侧额极后 3~5 mm 处大脑皮层,用超声波细胞粉碎机制成组织匀浆,3500 r/min 离心 15 min,取上清液,按照试剂盒说明书采取黄嘌呤氧化酶法检测脑组织 SOD 活性,硫代巴比妥酸法检测 MDA 水平。

2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠脑皮质病理变化

取各组大鼠脑组织,于 4%多聚甲醛固定 2 d,梯度乙醇脱水后石蜡包埋,制作 4 μ m 厚的石蜡切片,进行 HE 染色,经脱水、透明后,中性树胶封片,于显微镜下观察脑皮质组织染色结果。

2.6 免疫荧光染色法检测大鼠脑血管内皮和间质标志物 CD31 和 α -SMA 表达

取大鼠脑组织石蜡切片,脱蜡至水,二甲苯透明,梯度乙醇脱水, TBS 冲洗,进行抗原修复,加入 3% H₂O₂ 阻断,用 10%山羊血清封闭 30 min,弃血清,滴加 50 μ L CD31 抗体(1:800),4 °C 孵育过夜; TBST 冲洗,滴加 50 μ L HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1:4000),37 °C 孵育 45 min;滴加 50 μ L CY3 工作液(1:200),室温孵育 10 min;以 pH 6.0 柠檬酸抗原修复 5 min,蒸馏水浸洗 3 min,加入 10%山羊血清,室温封闭 30 min;弃血清,滴加 50 μ L α -SMA 抗体(1:200),4 °C 孵育过夜;滴加 50 μ L Alexa Fluor 488 偶联的驴抗兔二抗(1:400),37 °C 孵育 45 min;滴加 50 μ L DAPI 工作液

(1 : 500), 避光染核 5 min; 加入荧光封片剂进行封片, 避光保存。经荧光、明场扫描系统 Tissue FAXS PLUS 扫描, 随机采集 CD31/ α -SMA 阳性染色大鼠脑组织微血管照片, 采用 Image J 软件测定 α -SMA 荧光强度, 进行半定量分析。

2.7 Western blotting 检测大鼠脑血管 CD31 和 α -SMA 蛋白表达

取各组大鼠脑血管组织, 加入裂解液提取蛋白, 加入上样缓冲液, 沸水浴使蛋白变性, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 分别加入 CD31、 α -SMA 和 GAPDH 抗体, 孵育过夜; 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体, 孵育 1 h; 加入 ECL 发光液显影, 采用 Image J 软件检测蛋白条带灰度值。

2.8 免疫组化法检测大鼠脑组织 Akt 和 GSK-3 β 蛋白表达

取各组大鼠脑组织石蜡切片, 脱蜡至水, 加柠檬酸, 用微波炉进行抗原修复, 加入 3% H₂O₂ 室温孵育, 分别加入 Akt、GSK-3 β 抗体, 孵育过夜; 加入二抗孵育 1 h, DAB 染色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片, 于光学显微镜下观察并拍照。

2.9 Western blotting 检测大鼠脑皮质 Akt 和 GSK-3 β 蛋白表达

取假手术组、模型组和紫檀芪低、高剂量组大鼠脑皮质组织, 按“2.6”项下方法提取蛋白, 检测 Akt、p-Akt、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白表达情况。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐则进行单因素方差分析与 LSD-*t* 比较。

3 结果

3.1 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损评分的影响

如表 1 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠神经功能缺损评分显著降低 ($P < 0.05$)。

3.2 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠血清 PAF、CD40L 和 CD62P 水平的影响

如表 2 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 PAF、CD40L 和 CD62P 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清 PAF、CD40L 和 CD62P 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

表 1 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of pterostilbene on scores of neurological deficits in rats with cerebral ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	评分
假手术	—	0
模型	—	3.44 ± 0.39*
紫檀芪	5	2.55 ± 0.18#
	10	1.96 ± 0.22#
硫酸氢氯吡格雷	6.8	1.14 ± 0.11#

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, 下同
* $P < 0.05$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs model group, same as below tables

表 2 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠血清 PAF、CD40L 和 CD62P 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of pterostilbene on PAF, CD40L and CD62P levels in serum of rats with cerebral ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	PAF/ (ng·mL ⁻¹)	CD40L/ (ng·mL ⁻¹)	CD62P/ (ng·mL ⁻¹)
假手术	—	0.03 ± 0.01	13.42 ± 1.29	4.15 ± 0.82
模型	—	0.18 ± 0.03*	30.45 ± 2.78*	11.49 ± 1.18*
紫檀芪	5	0.15 ± 0.02#	25.17 ± 2.16#	9.42 ± 0.95#
	10	0.11 ± 0.02#	20.39 ± 1.47#	7.58 ± 0.81#
硫酸氢氯吡格雷	6.8	0.07 ± 0.01#	16.88 ± 1.12#	6.55 ± 0.45#

3.3 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠脑组织 SOD 活性和 MDA 水平的影响

如表 3 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织 SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$), MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠脑组织 SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$), MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.4 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠脑皮质病理变化的影响

如图 1 所示, 假手术组大鼠脑皮质区细胞形态

表 3 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠脑组织 SOD 活性和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of pterostilbene on SOD activity and MDA level in brain tissue of rats with cerebral ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/ (mmol·mg ⁻¹)
假手术	—	43.69 ± 3.18	1.22 ± 0.25
模型	—	24.99 ± 2.47*	3.88 ± 0.41*
紫檀芪	5	31.28 ± 3.24#	2.98 ± 0.32#
	10	36.94 ± 2.12#	2.35 ± 0.27#
硫酸氢氯吡格雷	6.8	40.82 ± 2.55#	1.77 ± 0.16#

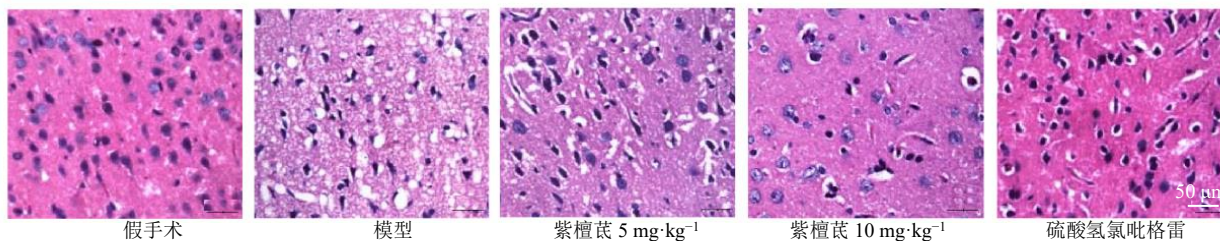


图 1 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠脑皮质病理变化的影响 (HE, ×400)

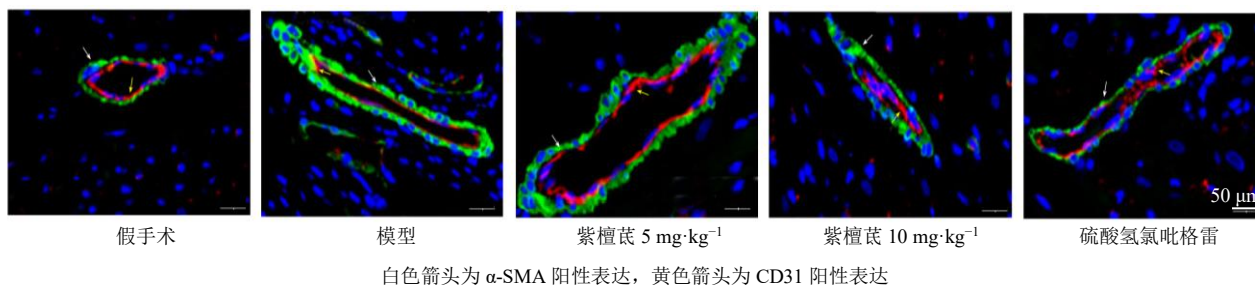
Fig. 1 Effect of pterostilbene on pathological changes of cerebral cortex in rats with cerebral ischemia-reperfusion (HE, × 400)

完整, 排列整齐, 边缘清晰, 细胞核与间质着色均匀; 模型组大鼠脑皮质区细胞形态破坏, 呈空泡样坏死, 细胞间隙增大, 染色变浅, 残存细胞体积缩小, 细胞核固缩、深染, 细胞边界不清; 与模型组比较, 各给药组大鼠脑皮质细胞形态、排列、细胞核清晰度以及间质染色均匀度等均改善。

3.5 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠脑血管 CD31 和 α -SMA 蛋白表达的影响

CY3 标记 CD31 为血管内皮细胞标记物, 呈红色荧光; Alexa Fluor 488 标记的 α -SMA 为血管间质

细胞标记物, 呈绿色荧光。如图 2、3 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑血管 CD31 表达减弱, α -SMA 荧光强度显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠脑血管 CD31 表达增强, α -SMA 荧光强度显著降低 ($P < 0.05$)。Western blotting 结果如图 4 和表 4 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑血管 CD31 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), α -SMA 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠脑血管 CD31 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), α -SMA 蛋白表达水平显著降低

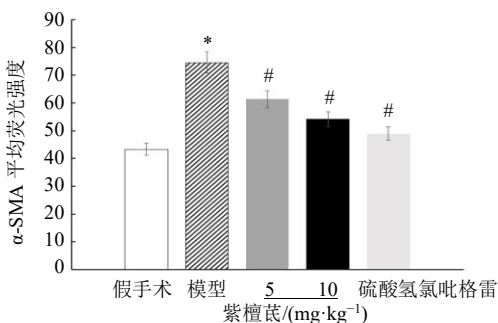


白色箭头为 α -SMA 阳性表达, 黄色箭头为 CD31 阳性表达

White arrow is positive expression of α -SMA, and yellow arrow is positive expression of CD31

图 2 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠脑血管 CD31 和 α -SMA 蛋白表达的影响 (×400)

Fig. 2 Effect of pterostilbene on protein expressions of CD31 and α -SMA in cerebral blood vessels of rats with cerebral ischemia-reperfusion (× 400)



与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs model group

图 3 各组大鼠脑血管 α -SMA 荧光强度定量分析

Fig. 3 Quantitative analysis of α -SMA fluorescence intensity in cerebral blood vessels

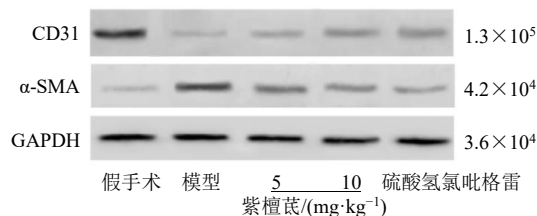


图 4 Western blotting 检测各组大鼠脑血管 CD31 和 α -SMA 蛋白表达

Fig. 4 CD31 and α -SMA protein expressions in cerebral blood vessels of rats detected by Western blotting

($P < 0.05$)。

3.6 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠脑皮质 Akt 和 GSK-3 β 蛋白表达的影响

免疫组化结果如图 5 所示, 与假手术组比较,

表 4 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠脑血管 CD31 和 α -SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of pterostilbene on CD31 and α -SMA protein expressions in cerebral blood vessels of rats with cerebral ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量	
		CD31	α -SMA
假手术	—	0.91 ± 0.08	0.09 ± 0.01
模型	—	0.16 ± 0.02*	0.89 ± 0.07*
紫檀芪	5	0.33 ± 0.03 [#]	0.65 ± 0.05 [#]
	10	0.45 ± 0.03 [#]	0.36 ± 0.04 [#]
硫酸氢氯吡格雷	6.8	0.66 ± 0.04 [#]	0.21 ± 0.03 [#]

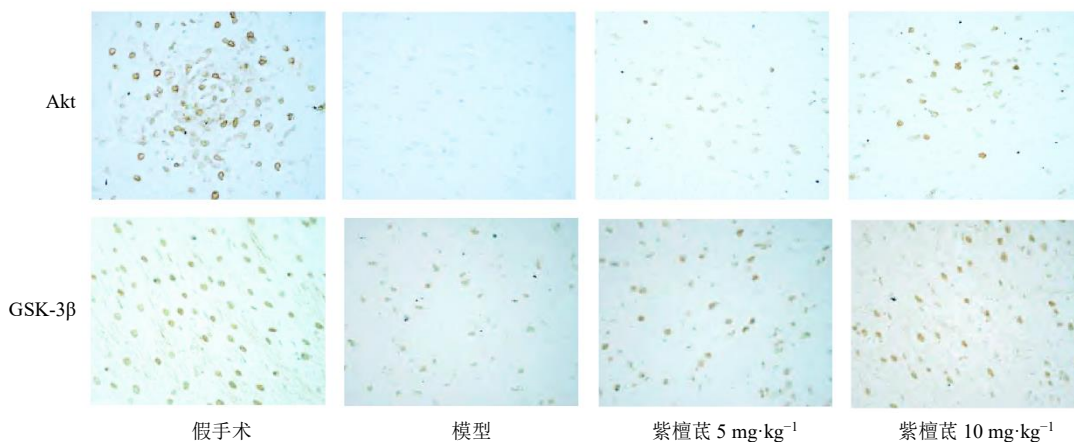


图 5 免疫组化法检测大鼠脑组织 Akt 和 GSK-3 β 蛋白表达 ($\times 400$)

Fig. 5 Akt and GSK-3 β protein expressions in brain tissue of rats detected by immunohistochemistry ($\times 400$)

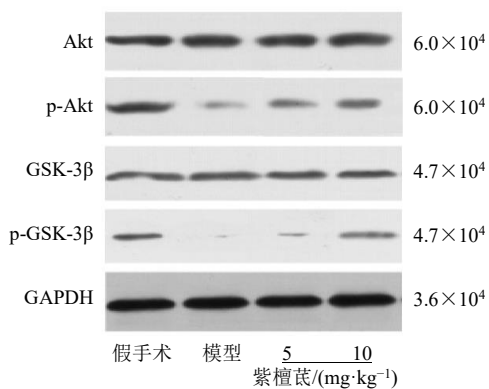


图 6 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠脑皮质 Akt 和 GSK-3 β 蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of pterostilbene on Akt and GSK-3 β protein expressions in brain cortex of rats with cerebral ischemia-reperfusion

现的脑部超微结构、功能与代谢等方面进一步损伤，是缺血性脑损伤的延续与恶化。随着对神经细胞死亡分子机制的深入研究，脑缺血后氧化应激损伤和炎症损伤已被证明是导致再灌注损伤的重要原因。紫檀芪作为一种天然、多功能抗氧化剂，可清除体

模型组大鼠脑皮质 Akt、GSK-3 β 阳性表达较少；与模型组比较，紫檀芪组大鼠脑皮质 Akt、GSK-3 β 阳性表达较多。Western blotting 结果如图 6 和表 5 所示，各组大鼠脑皮质 Akt、GSK-3 β 蛋白表达水平无统计学意义。与假手术组比较，模型组大鼠脑皮质 p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，紫檀芪组大鼠脑皮质 p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

4 讨论

脑缺血再灌注损伤时，缺血大脑恢复血供后出

表 5 紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠脑皮质 Akt 和 GSK-3 β 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of pterostilbene on Akt and GSK-3 β protein expressions in brain cortex of rats with cerebral ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量			
		Akt	p-Akt	GSK-3 β	p-GSK-3 β
假手术	—	0.93 ± 0.13	0.85 ± 0.09	0.81 ± 0.08	0.49 ± 0.04
模型	—	0.99 ± 0.11	0.07 ± 0.01*	0.82 ± 0.09	0.03 ± 0.01*
紫檀芪	5	0.97 ± 0.12	0.15 ± 0.03 [#]	0.79 ± 0.09	0.11 ± 0.02 [#]
	10	1.01 ± 0.13	0.36 ± 0.03 [#]	0.78 ± 0.08	0.23 ± 0.03 [#]

内氧自由基，Keser 等^[11]研究表明紫檀芪在急性肾缺血再灌注损伤治疗中有辅助作用。故本研究选择紫檀芪为实验药物，为紫檀芪在脑缺血再灌注治疗中的应用提供理论基础。

动物神经功能变化是检测脑缺血再灌注大鼠模型的宏观指标，神经功能缺损评分可反映其神经系统破坏程度。本研究结果显示，紫檀芪组大鼠神经功能缺损评分低于模型组，提示紫檀芪可优化脑缺血再灌注大鼠的神经功能恢复效果。脑皮质是脑缺血再灌注容易损伤的区域，大鼠脑皮质的 HE 染色

结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑皮质细胞质、细胞核和细胞形态等均发生明显的病理改变,而紫檀芪组大鼠脑皮质细胞变性、坏死等病理改善,提示紫檀芪可减轻大鼠脑皮质细胞损伤,这对减少脑部神经细胞凋亡、保护神经功能有一定作用。Khan等^[12]发现紫檀芪可通过抗氧化应激作用,改善全脑缺血再灌注和氧化损伤诱导的神经行为改变。脑缺血发生时脑组织氧供减少,产生大量自由基,引起神经元死亡,酶活性丧失。SOD为机体内重要的抗氧化酶,对体内抗氧化平衡有重要作用。MDA是脂质过氧化作用的产物,可反映脂质过氧化程度,间接反映了细胞受损程度。本研究发现,与模型组比较,紫檀芪组大鼠脑组织SOD活性增强,MDA水平降低,提示紫檀芪可减轻大鼠脑组织氧化应激损伤。Chen等^[13]发现血小板活化与脑缺血再灌注损伤的发生有关。PAF为内源性磷酸介质,Belayev等^[14]研究表明PAF可诱导血小板聚集,快速促进血小板活化。CD40L是肿瘤坏死因子超家族成员,血清中CD40L含量升高是血小板活化标志,也是预测心脑血管事件的独立指标。CD62P为选择素家族成员,是血小板活化的高灵敏度、特异度指标之一。本研究结果显示,紫檀芪组大鼠血清PAF、CD40L和CD62P水平低于模型组,提示紫檀芪可抑制血小板活化。除血小板活化外,血管功能的稳定性也是脑缺血再灌注发生的重要原因。脑缺血后,内皮细胞脱离血管内皮,经内皮间质转化为肌成纤维细胞,导致血管周围间质中产生大量细胞外基质,从而产生间质细胞,减弱内皮功能,破坏血管微环境,减少血供。因此,保护血管内皮细胞、减轻内皮间质转化程度,可能对缺血再灌注的脑组织有益。为考察紫檀芪对大鼠脑血管内皮间质转化的影响,进行CD31/ α -SMA免疫荧光染色,发现紫檀芪组大鼠脑血管CD31表达增强, α -SMA表达减弱,且经半定量检测发现 α -SMA荧光强度降低,提示紫檀芪对内皮间质转化有抑制作用。

Akt信号通路是膜受体信号向细胞内传导的主要途径转移,在心、肺等多种器官缺血再灌注损伤中发挥了抑制细胞凋亡的作用^[15-16]。Akt蛋白是一种在脑缺血后发挥保护作用的促生存激酶,可通过磷酸化Ser473残基而激活,从而磷酸化其下游蛋白如GSK-3 β 。GSK-3 β 是广泛存在于生物体内的多功能丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,被激活后,可抑制线粒体通透性转换孔开口,减少线粒体膜电位,从而减

少自由基产生,发挥抗氧化应激作用。Li等^[17]发现脑缺血再灌注损伤的改善与Akt/GSK-3 β 的激活有关,Li等^[18]发现Akt可能是结肠癌细胞中上皮间质转化的关键调节因子,白藜芦醇可能通过Akt/GSK-3 β /Snail信号通路逆转上皮间质转化。本研究结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达水平降低,提示脑缺血再灌注的发生抑制了大鼠脑组织Akt、GSK-3 β 蛋白表达;与模型组比较,紫檀芪组大鼠脑组织p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达水平升高,提示紫檀芪可促进p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白磷酸化,激活Akt/GSK-3 β 通路,从而减轻氧化应激损伤,抑制血小板活化和内皮间质转化,发挥脑保护作用,这可能是其改善脑缺血再灌注损伤的作用机制。

综上所述,紫檀芪可能通过激活Akt/GSK-3 β 通路,从而发挥对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用,并抑制脑血管内皮间质转化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liao Y J, Cheng J B, Kong X X, *et al.* HDAC3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion-induced brain injury by regulating the microglial cGAS-STING pathway [J]. *Theranostics*, 2020, 10(21): 9644-9662.
- [2] Li X G, Cheng S L, Hu H, *et al.* Progranulin protects against cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury by inhibiting necroptosis and oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(3): 569-576.
- [3] Pan Y S, Elm J J, Li H, *et al.* Outcomes associated with clopidogrel-aspirin use in minor stroke or transient ischemic attack: A pooled analysis of clopidogrel in high-risk patients with acute non-disabling cerebrovascular events (CHANCE) and platelet-oriented inhibition in new TIA and minor ischemic stroke (POINT) trials [J]. *JAMA Neurol*, 2019, 76(12): 1466-1473.
- [4] Chen D Q, Li L, Wang Y, *et al.* Ischemia-reperfusion injury of brain induces endothelial-mesenchymal transition and vascular fibrosis via activating let-7i/TGF- β R1 double-negative feedback loop [J]. *FASEB J*, 2020, 34(5): 7178-7191.
- [5] Song L, Chen T Y, Zhao X J, *et al.* Pterostilbene prevents hepatocyte epithelial-mesenchymal transition in fructose-induced liver fibrosis through suppressing miR-34a/Sirt1/p53 and TGF- β 1/Smads signalling [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(11): 1619-1634.
- [6] Malik S A, Acharya J D, Mehendale N K, *et al.* Pterostilbene reverses palmitic acid mediated insulin

- resistance in HepG2 cells by reducing oxidative stress and triglyceride accumulation [J]. *Free Radic Res*, 2019, 53(7): 815-827.
- [7] Liu J Y, Xu J K, Mi Y, *et al.* Pterostilbene alleviates cerebral ischemia and reperfusion injury in rats by modulating microglial activation [J]. *Food Funct*, 2020, 11(6): 5432-5445.
- [8] 余智, 于民, 顾苏兵, 等. [Gly14]-Humanin 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响及其机制研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2019, 34(5): 515-520.
- [9] Xiao Q X, Wen S, Zhang X R, *et al.* miR-410-3p overexpression ameliorates neurological deficits in rats with hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 162: 218-230.
- [10] 田士来, 康军林, 魏玉娥, 等. 紫檀芪对小鼠缺血性脑损伤的神经保护机制研究 [J]. 神经解剖学杂志, 2020, 36(1): 71-76.
- [11] Keser H, Bozkurt Girit Ö, Majeed M, *et al.* Pterostilbene administration improves the recovery potential of extremely low-frequency magnetic field in acute renal ischemia-reperfusion injury: An FTIR spectroscopic study [J]. *Turk Biyoloji Dergisi*, 2020, 44(1): 48-60.
- [12] Khan M M, Badruddeen, Ahmad U, *et al.* Cerebroprotective effect of pterostilbene against global cerebral ischemia in rats [J]. *Heliyon*, 2021, 7(5): e07083.
- [13] Chen F F, Wang M M, Xia W W, *et al.* Tao-Hong-Si-Wu Decoction promotes angiogenesis after cerebral ischaemia in rats via platelet microparticles [J]. *Chin J Nat Med*, 2020, 18(8): 620-627.
- [14] Belayev L, Obenaus A, Mukherjee P K, *et al.* Blocking pro-inflammatory platelet-activating factor receptors and activating cell survival pathways: A novel therapeutic strategy in experimental ischemic stroke [J]. *Brain Circ*, 2020, 6(4): 260-268.
- [15] Liang S, Wang Y, Liu Y. Dexmedetomidine alleviates lung ischemia-reperfusion injury in rats by activating PI3K/Akt pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(1): 370-377.
- [16] Yu P, Ma S C, Dai X C, *et al.* Elabela alleviates myocardial ischemia reperfusion-induced apoptosis, fibrosis and mitochondrial dysfunction through PI3K/ AKT signaling [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(8): 4467-4477.
- [17] Li M, Gao W W, Liu L, *et al.* The Akt/glycogen synthase kinase-3 β pathway participates in the neuroprotective effect of interleukin-4 against cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(9): 1716-1723.
- [18] Li Y, Zhou M M, Huang D W, *et al.* Resveratrol inhibits the invasion and metastasis of colon cancer through reversal of epithelial-mesenchymal transition via the AKT/GSK-3 β /Snail signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(3): 2783-2795.

[责任编辑 李亚楠]