

丹参酮 II A 对大鼠脑缺血后 PTEN-PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响

徐璇 汤其强

摘要 目的 探讨丹参酮 II A (TSA) 调节人第 10 号染色体的磷酸酶 (PTEN) 对大鼠脑缺血后自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 的作用机制。方法 建立大鼠脑缺血模型 (MCAO), 并对成功建立 MCAO 的大鼠给予 TSA 处理。实验分为 3 组: 对照组 (NC 组)、手术组: MCAO + 生理盐水组 (MCAO 组) 和 MCAO + TSA 组 (TSA 组)。采用行为学评分、免疫组化及 Western blot 检测组织内各蛋白的表达。结果 与 NC 组比较, TSA 组 PTEN 蛋白的表达降低, PI3K、AKT、mTOR 的表达水平增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 MCAO 组比较, TSA 组的 PTEN 蛋白的表达增加, PI3K、AKT、mTOR 的表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 TSA 通过增强脑缺血大鼠 PTEN 的表达, 减少自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 的表达水平, 减轻脑缺血后脑细胞炎症, 从而保护大鼠的脑组织。

关键词 丹参酮 II A; PTEN; PI3K; 脑缺血

中图分类号 R 743.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)11-1706-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.012

PTEN 蛋白是 10 号染色体上的磷酸酶, 是胞内磷脂酰肌醇激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 的初级磷酸酶^[1], 通过降低 PI3K 的磷酸化, 减少信号通路蛋白激酶 B (protein kinase B, PI3K) / 雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的表达, 参与细胞的增殖、分化等多种功能^[2]。研究^[3]表明 PTEN 蛋白在脑缺血损伤后氧化增加, 导致自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 表达的增强, 从而加重脑损伤。减少 PTEN 蛋白的氧化, 对脑组织的保护具有重要意义。故寻找抑制 PTEN 氧化的新型药物至关重要。丹参酮 II A (tanshinone II A, TSA) 是植物丹参的提取物, 具有活血化瘀、清除氧自由基等功效, 在临床上常作为心脑血管疾病患者的治疗用药^[4]。研究^[5]表明 TSA 具有明确的调节自噬通路 PI3K/AKT 从而保护脑组织的作用。但是 TSA 对 PTEN/PI3K 信号通路的调节暂无研究。该研究拟探讨 TSA 调节 PTEN 对大鼠脑缺血后自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 TSA 购自美国 Selleck 公司, 配比浓度为 10 mg/kg^[6], 术前连续灌胃 4 d; 6 月龄健康雄性 SD 大鼠共 80 只, 体质量 230 ~ 280 g, 购自济南

2020-06-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81573807)

作者单位: 安徽医科大学附属医院神经内科, 合肥 230001

作者简介: 徐璇, 女, 硕士研究生;

汤其强, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: tq1995@126.com

the HK activity, PK activity, and ATP content in the RBC all increased, and upward trend with increasing glucose concentration, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); while ROS content and decay rate decreased, and decreased with increasing glucose concentration, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). After culturing erythrocytes with different concentrations of glucose (concentrations of 0, 6, 20, 30 mmol/L) for 48 h, the ROS content and erythrocyte decay rate in RBC of different concentrations increased with the incubation time, compared with 0 h, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); HK activity and PK activity gradually decreased, compared with 0 h, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The ATP content decreased in a fluctuating manner, and compared with 0 h, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Short-term high-glucose culture of RBC in vitro not only strengthens the energy metabolism in RBC, but also reduces the oxidative stress and eryptosis. However, no glucose supply leads to gradually exhausted ATP and increased oxidative stress and eryptosis.

Key words red blood cells; glucose; energy metabolism; eryptosis

朋悦实验动物繁育有限公司 标准饲养条件下喂养。PTEN(9188T)、AKT(4691T)、mTOR(3983T)抗体购自美国 CST 公司;PI3K(ab151549)抗体购自美国 Abcam 公司,浓度均为 1:1 000。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 随机将 SD 大鼠分为假手术组(10 只)和手术组(70 只)。假手术大鼠作为对照组标记为 NC 组;手术组大鼠再进行随机分两组,即给 TSA 药组(TSA 组)和给生理盐水组(MCAO 组)。根据大鼠拔线天数(1、3、7 d)不同,分别将手术组中 TSA 组第 1 天标记为 T1,第 3 天标记为 T3,第 7 天标记为 T7;MCAO 组分别对应为 M1、M3、M7。

1.2.2 脑缺血模型 根据 Longa et al^[7] 线栓法制作大鼠脑缺血模型。手术操作简述:10%水合氯醛麻醉,在大鼠颈部正中中线处切 1~2 cm 切口,分离出大鼠右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉,结扎颈外动脉远心端。从颈外动脉近颈总动脉分叉处切一小口,插入鱼线,鱼线至颈内动脉深入距约 2 cm 感觉有阻力时,即已插至大脑中动脉,阻断中动脉血流,达成栓塞条件。在栓塞 2 h 后拔鱼线。根据不同组的要求,在拔线后 1、3、7 d 进行断头取脑。

1.2.3 行为学评分 参照 Longa et al^[7] 方法进行评分:0 分:活动正常、无任何神经功能异常者;1 分:不能完全伸展左侧前爪者;2 分:爬行见向左侧追尾转圈;3 分:行走见身体向左侧倾倒、偏瘫;4 分:不能自行行走且有意识障碍;纳入者为 1~3 分。

1.2.4 免疫组织化学 取完整脑组织,石蜡包埋,切片。用 30%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶;山羊血清封闭非特异性蛋白;孵抗体;DAB 显色;复染、脱水、透明、封片。

1.2.5 Western blot 断头取脑,选择梗死侧脑组织进行彻底匀浆提蛋白,确保组织完全裂解后收集上清液,即蛋白总溶液。配制 SDS-PAGE 电泳、上样、转膜、孵抗体,曝光后将图片存档,用 ImageJ 软件分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,多组间比较用单因素方差分析,Levene 检验方差齐性,两组间比较用独立样本 *t* 检验,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Longa 评分 对造模成功的大鼠,根据 Longa 评分,对纳入统计的 TSA 组和 MCAO 组大鼠的行为学进行评分统计。通过观察对手术组大鼠的行为评

分,从而间接表达大鼠神经功能受损情况。其中 TSA 组大鼠的行为学评分较 MCAO 组低($F = 89.76$, $P < 0.05$),且差异有统计学意义。见图 1。

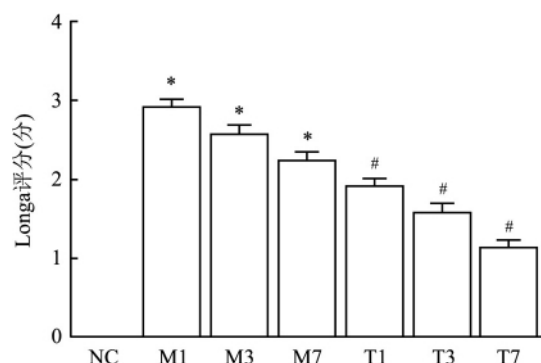


图1 各组大鼠的行为学评分情况

与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 MCAO 组比较: # $P < 0.05$

2.2 免疫组化检测各蛋白表达水平 免疫组织化学切片染色显示:与 NC 组比较,手术组的各蛋白表达水平明显改变:PTEN 减少,PI3K、AKT、mTOR 表达水平增加,随着时间变化逐渐恢复;手术组中 TSA 组的 PTEN 表达增加,PI3K、AKT、mTOR 表达降低。见图 2。

2.3 Western blot 检测各蛋白的表达 与 NC 组比较,MCAO 组 PTEN 蛋白表达减少,PI3K、AKT、mTOR 表达增加,差异有统计学意义。与 MCAO 组比较,TSA 组 PTEN 蛋白表达增加,PI3K、AKT、mTOR 表达降低,第 1 天最明显,差异有统计学意义($F_{PTEN} = 79.829$, $F_{PI3K} = 77.423$, $F_{AKT} = 42.400$, $F_{mTOR} = 27.896$, $P < 0.05$),见图 3。

3 讨论

随着研究的不断扩展,研究者发现 PTEN 蛋白在神经领域也不断出现^[8-9]:PTEN 对神经细胞及脑组织的再生有影响,且 PTEN 蛋白的表达增加对缺血损伤后的组织具有保护作用。在脑缺血后激活自噬通路 PI3K/AKT/mTOR,能够加重脑组织的损伤,但是关于自噬信号的激活机制目前说法不一。随着对蛋白 PTEN 的研究逐步加深,发现 PTEN 蛋白具有磷酸酶活性,能够促进 PI3K 的磷酸化,能够调节自噬通路的表达,对信号通路 PI3K/AKT/mTOR 具有重要的调节作用。本研究中,在大鼠发生脑缺血后,PTEN 蛋白的表达减少,尤其是第 1 天较为明显,随时间变化逐渐回升,而自噬蛋白 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白的表达明显增加,在第 1 天出现峰

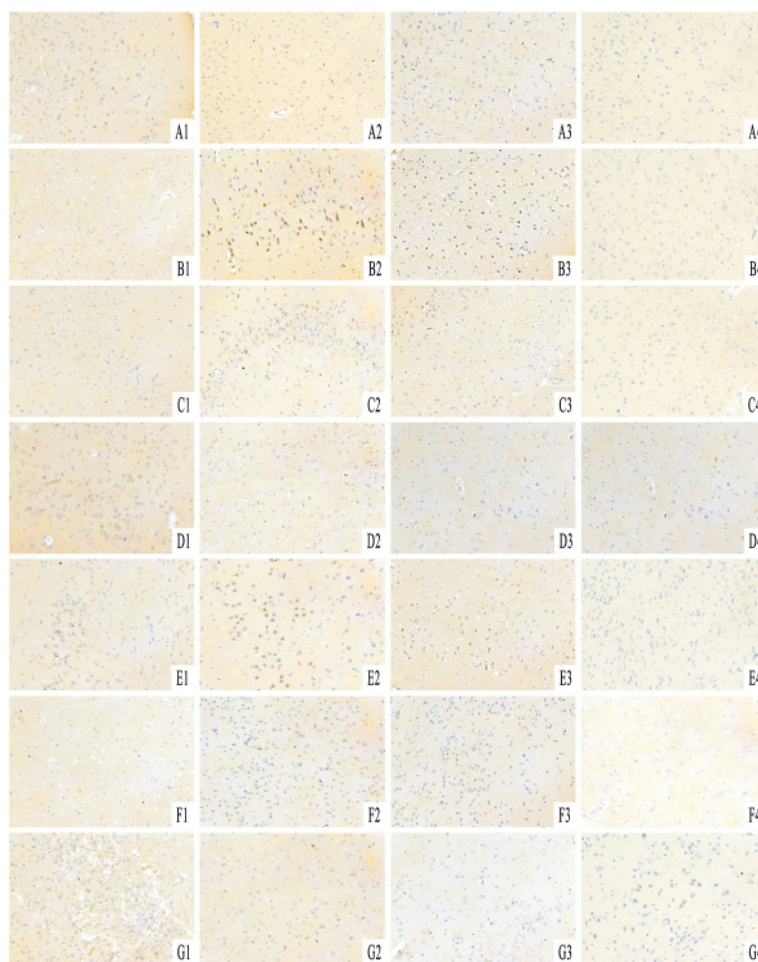


图2 梗死侧脑组织细胞免疫组织化学染色 ×200

A: NC 组; B: M1; C: M3; D: M7; E: T1; F: T3; G: T7; 1: PTEN; 2: PI3K; 3: AKT; 4: mTOR

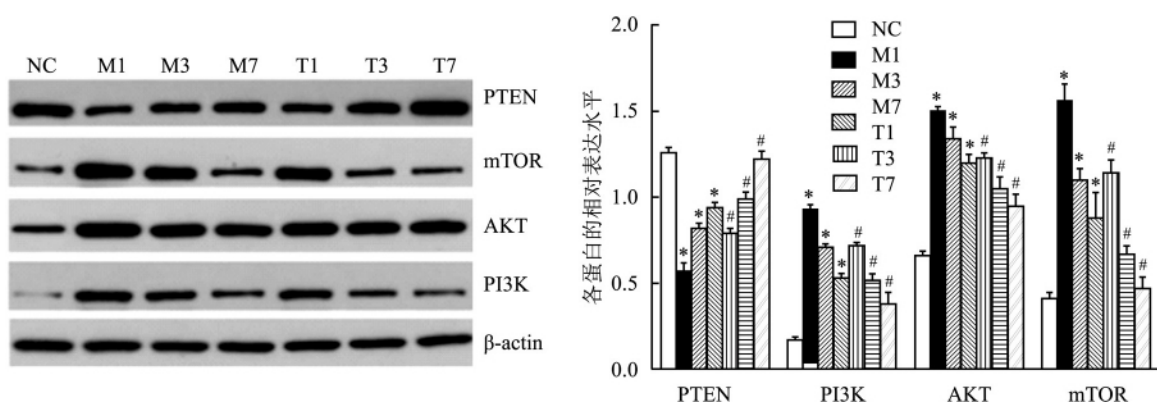


图3 Western blot 检测各组 PTEN、PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达

与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 MCAO 组比较: # $P < 0.05$

值 随着时间延长,蛋白表达水平逐渐恢复正常,差异有统计学意义;这一实验结果表明在大鼠发生脑缺血后,机体 PTEN 蛋白的表达受抑制,从而减少 PI3K 的磷酸化,激活自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 表

达,加重脑组织损伤,验证了脑缺血后 PTEN 蛋白的氧化能够激活自噬信号通路 PI3K/AKT/mTOR, PTEN 蛋白具有调控自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 的作用。

TSA 作为临床常用药物,在保护脑缺血方面具有肯定疗效。作为中药,TSA 的治疗机制暂无全面了解。前期的研究^[4]发现,在大鼠脑缺血发生后,TSA 通过调节自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 的表达,减轻脑组织损伤,从而起到护脑的作用。关于 TSA 如何下调 PI3K/AKT/mTOR 的表达,目前暂无研究说明。本研究在 TSA 组的大鼠脑缺血发生后,PTEN 蛋白的表达虽然呈下降趋势,但与 MCAO 组比较,幅度明显小,PI3K/AKT/mTOR 蛋白表达的增加趋势较小,再一次验证了 TSA 有下调自噬信号通路表达的作用。而 TSA 能够促进 PTEN 蛋白的表达,从而通过减轻自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 的过度表达,减轻脑缺血后导致的脑组织损伤。再结合大鼠的行为学评分,TSA 组的行为学评分较 MCAO 组低,在手术后第 1 天明显,且差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 TSA 治疗大鼠脑缺血具有临床意义。

参考文献

- [1] Zhao N A, Li S M, Fang X X, et al. Study of the relationship between bone mineral density and serum uric acid in senile diabetic patients[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis* 2014(7): 784-8.
- [2] Malaney P, Uversky V N. PTEN proteoforms in biology and disease[J]. *CMLS*, 2017, 74(15): 2783-94.
- [3] Zheng T, Shi Y, Zhang J, et al. MiR-430a exerts neuroprotective effects against ischemic stroke through PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109117.
- [4] Zhu Y C, Tang Q Q, Wang G P. Tanshinone II A protects hippocampal neuronal cells from reactive oxygen species through changes in autophagy and activation of phosphatidylinositol 3-Kinase, protein kinase B, and mechanistic target of rapamycin pathways[J]. *Current Neurovascular Research* 2017, 14(2): 132-40.
- [5] Tang Q Q, Han R D, Xiao H, et al. Protective effect of tanshinone II A on the brain and its therapeutic time window in rat models of cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(5): 1616-22.
- [6] Wang J G, Bondy S C, Zhou L, et al. Protective effect of Tanshinone II A against infarct size and increased HMGB1, NF- κ B, GFAP and apoptosis consequent to transient middle cerebral artery occlusion[J]. *Neurochemical Research*, 2014, 39(2): 295-304.
- [7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] Grizzanti J, Lee H G, Camins A, et al. The therapeutic potential of metabolic hormones in the treatment of age-related cognitive decline and Alzheimer's disease[J]. *Nutrition Research (N. Y.)*, 2016, 36(12): 1305-15.
- [9] Benowitz L I, He Z. Reaching the brain: Advances in optic nerve regeneration[J]. *Experimental Neurology* 2017, 287(Pt 3): 365-73.

Effects of tanshinone II A on the PTEN-PI3K /AKT/mTOR signaling pathway after cerebral ischemia in rats

Xu Xuan, Tang Qiqiang

(Dept of Neurology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the mechanism of tanshinone II A (TSA) regulating PTEN on the autophagy pathway PI3K/AKT/mTOR after cerebral ischemia in rats. **Methods** Rat model of cerebral ischemia (MCAO) was established and treated with TSA. The experiment was divided into three groups: normal control group, MCAO + saline (NS) group and MCAO + TSA group. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the protein expression. **Results** Compared with the control group, the expression of PTEN protein in the MCAO + TSA group decreased, the levels of PI3K, AKT and mTOR increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the two groups in the surgery group, the PTEN protein in the TSA group decreased significantly compared with the MCAO group, while the expression levels of PI3K, AKT and mTOR in the TSA group increased slightly compared with the MCAO group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** By enhancing the expression of PTEN in rats with cerebral infarction, TSA can reduce the expression level of PI3K/AKT/mTOR in autophagy pathway, reduce the inflammation of cerebral infarction cells, so as to protect the brain tissue of rats.

Key words tanshinone II A; PTEN; PI3K; cerebral ischemia