

## · 基础研究 ·

# 运动训练对脑缺血大鼠 PI3K/Akt 抗凋亡信号转导通路的影响

徐丽丽 胡永善 吴毅 白玉龙 崔晓 朱大年

**【摘要】目的** 观察运动训练对脑缺血大鼠磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 抗凋亡信号转导通路的影响,探讨运动训练促进脑缺血后神经功能恢复可能的信号通路。**方法** 成年雄性 SD 大鼠 24 只,随机分成运动组、对照组和假手术组,每组 8 只。用大脑中动脉闭塞法造模 24 h 后,运动组给予 Treadmill 跑台训练,每天 30 min,连续训练 2 周,对照组及假手术组不进行运动干预。采用 Western blot 方法定量检测 PI3K/Akt 通路的磷酸化水平,并定量测定凋亡相关蛋白 Bax 的表达。**结果** 2 周后,运动组 PI3K/Akt 通路中 p-PI3K、p-Akt 的磷酸化水平明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ),而凋亡相关蛋白 Bax 的表达则明显低于对照组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 运动训练能促进脑缺血大鼠神经功能恢复,这种改变可能与 PI3K/Akt 抗凋亡通路激活增加有关。

**【关键词】** 脑缺血; 运动训练; 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B

## The effect of physical training on the PI3K/Akt signal transduction pathway after focal brain ischemia in rats

XU Li-li, HU Yong-shan, WU Yi, BAI Yu-long, CUI Xiao, ZHU Da-nian. \* Department of Rehabilitation Medicine, Huashan Hospital, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200040, China

**【Abstract】Objective** To investigate whether physical training can activate the PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/Protein Kinase B) signal transduction pathway after focal brain ischemia, leading to the reduction of endothelial cell apoptosis. **Methods** Twenty-four male adult Sprague-Dawley rats (2 ~ 3 month old,  $n = 24$ ) were subjected to 60-min right middle cerebral artery occlusion (MCAO). All rats were randomly assigned to one of the three groups: physical training group, control group and sham operation group. 24 hours after MCAO, physical training group underwent 30 min treadmill training per day for 2 weeks. **Results** After two weeks, the phosphorylation level of PI3K/Akt in the physical training group was significantly higher when compared with that in the control group ( $P < 0.05$ ), while the expression level of Bax in physical training group was lower when compared with that in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Physical training can activate PI3K/Akt signal transduction pathway, which may be associated with the neurological recovery.

**【Key words】** Cerebral ischemia; Physical training; PI3K/Akt pathway

运动训练作为脑缺血后康复治疗的重要组成部分,其促进神经功能恢复的作用已被大量临床研究所证实<sup>[1,2]</sup>。在前期的实验研究中,我们发现运动训练可以促进脑缺血再灌注后大鼠的神经功能恢复,并且这可能与血管生成素 (angiopoietin, Ang) 表达增加有关<sup>[3]</sup>。脑缺血再灌注后血管生成素-1 (angiopoietin-1, Ang-1) 表达增加,与其内皮特异性酪氨酸激酶受体 Tie-2 结合,可以抑制脑微血管内皮细胞的凋亡<sup>[4]</sup>,减轻脑缺血后血脑屏障的渗漏;而磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 则是 Ang-1/Tie-2 的主要下游通路<sup>[5]</sup>。因此,本研究试图观察运动训练对 PI3K/Akt 抗凋亡通

路的影响,从而探讨运动训练促进脑缺血后神经功能恢复可能的信号转导通路。

## 材料与方法

### 一、动物与分组

雄性成年 SD 大鼠 24 只 (上海中科院提供,清洁级),体重为 220 ~ 250 g,2.5 月龄。在进行大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 造模手术前随机分为运动组、对照组和假手术组,每组 8 只。笼内饲养,给予充足的食物和饮水,每日 12 h 光照,室温 ( $23 \pm 1$ ) °C。

### 二、实验试剂

牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) (Amerco), Tris Base (Sigma 产品), 十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) (Sigma 产品), 抗 p-PI3K 单克隆抗体 (cell signaling technology), 抗 p-Akt 单克隆抗体 (cell signaling technology), 抗 Akt 单克隆抗体

基金项目:复旦大学基础和临床交叉基金(校 200681);上海市长宁区卫生局科研基金资助项目(2004104001)

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华山医院康复医学科(徐丽丽、胡永善、吴毅、白玉龙);上海长宁区天山中医院(崔晓);复旦大学上海医学院生理和病理生理实验室(朱大年)

(Santa Cruz), 抗 Bax 单克隆抗体 (Santa Cruz), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (Santa Cruz), 偏二氟乙烯膜 (immobilon-P transfer membrane, PVDF 膜) (MILLIPORE), 细胞裂解液 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) (上海申能博彩生物科技有限公司)。其余试剂为国产分析纯。

### 三、大鼠大脑 MCAO 模型制备

运动组与对照组采用 Longa 等<sup>[6]</sup>线栓法阻塞大鼠右侧大脑中动脉造成相应供血区脑组织缺血。大鼠经 10% 水合氯醛 (300 mg/kg 体重) 腹腔麻醉后, 行颈部正中切口, 钝性分离右侧颈总动脉、右颈外动脉和右颈内动脉。结扎右颈外动脉分支枕动脉、甲状腺上动脉, 动脉夹暂时夹闭右颈内动脉分支翼腭动脉。结扎并剪断右颈外动脉远心端, 斜剪一切口, 将预先处理过的尼龙线的圆钝端沿切口插入近心端。将颈外动脉的近心端拉至与右颈内动脉成一直线, 沿右颈内动脉缓慢推进尼龙线, 直至尼龙线顶端感阻塞感, 约距右颈总动脉分叉处 18 ~ 20 mm。缺血 60 min 后, 缓慢退出尼龙线, 缝合皮肤。在手术过程中, 大鼠肛温控制在 (37 ± 0.5) °C。清醒后回笼, 自由进食。假手术组的手术步骤同运动组与对照组, 只是尼龙线栓不入颅, 不阻塞大脑中动脉。

### 四、处理方法

各组大鼠在手术前均经过适应性跑步训练 3 d, 每天 10 min。

1. 运动组: 在大鼠缺血再灌注 24 h 后, 予以跑台训练, 每天 30 min, 每周 5 d, 连续 2 周。跑台训练采用 DSPT-202 型五跑道电动跑台。跑台参数设置: 平板斜度为 0°; 履带传输速度——术前 3 d, 12 m/min, 术后第 1 天, 5 m/min, 术后第 2 天, 8 m/min, 术后第 3 天及以后, 12 m/min。

2. 对照组及假手术组: 笼内自由活动, 不进行运动干预。

### 五、模型评价-神经功能缺失体征评分

MCAO 术后 24 h, 依照 Longa 等<sup>[6]</sup>的方法对大鼠进行神经行为学评分。使用 6 分法评价大鼠脑缺血后运动及行为学缺陷, 具体如下: 5 分——正常; 4 分——对侧前肢持续弯曲; 3 分——瘫痪侧抵抗侧推力的能力下降; 2 分——拉鼠尾时向瘫痪侧旋转; 1 分——大鼠自由行动时向瘫痪侧旋转; 0 分——鼠被放在地面上无自发活动。评分为 0 ~ 4 分的大鼠表明造模成功, 并将评分为 2 ~ 4 分的大鼠入组。

### 六、蛋白浓度测定

按 Lowry 法<sup>[7]</sup>测定上清蛋白浓度, 牛血清白蛋白为标准品。

### 七、Western blot 检测

大鼠经 10% 水合氯醛腹腔麻醉后, 低温开颅取梗死侧纹状体及其周边的皮质 (假手术组选取与手术组相对应的脑区), 加 RIPA 裂解缓冲液低温下匀浆, 冰上静置 10 min, 4 °C 14000 r/min 离心 30 min, 收集上清。根据相应的蛋白浓度每个样本的上样量为 50 μg。Western blot 检测<sup>[5]</sup>操作的主要步骤如下: 用 10% SDS 聚丙烯酰胺电泳分离蛋白质 (100 V, 100 min), 将已分离的区带电转移到醋酸纤维素膜 (310 mA, 2 h)。5% 脱脂奶粉室温下摇动 2 h 封闭非特异结合部位, 分别用抗 p-PI3K (1:500)、抗 p-Akt (1:500)、抗 Akt (1:1000)、抗 Bax (1:1000) 及 GAPDH (1:10000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后辣根过氧化物酶 (HRP) 链接的二抗 (1:3000 稀释) 室温孵育 4 h, TBST 洗膜后加入 ECL 试剂反应 1 min, 进入专用暗室操作, X 光底片曝光 2 min、显影 2 min、定影 1 min。使用 Tatallab 软件并对底片上反应条带进行光密度定量, 计算其灰度值。将相对灰度值 (目的条带灰度值/同一样品 GAPDH 条带灰度值, 其中 p-Akt/Akt 求比值) 作为统计学分析的原始数据, 去除蛋白不均降解造成的误差。

### 九、统计学分析

数据采用 SPSS 11.5 版统计软件进行分析。所有定量数据进行正态性和方差齐性检验, 多组均数间的比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。计量资料符合正态分布者以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

一、免疫印迹检测脑缺血再灌注区 PI3K/Akt 通路的激活水平

3 组大鼠脑缺血纹状体区及其周边皮质均可检测到 p-PI3K 及其下游信号蛋白 p-Akt 的特异性条带 (图 1)。运动组 p-PI3K 的激活水平明显高于对照组和假手术组 ( $P < 0.05$ ), 而对照组与假手术组 p-PI3K 的激活水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。运动组 p-Akt 的激活水平显著高于对照组和假手术组 ( $P < 0.05$ ), 对照组与假手术组 p-Akt 的激活水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 2 周后 3 组脑缺血区及其周边 PI3K/Akt 的磷酸化水平及凋亡相关蛋白 Bax 表达水平比较 (相对灰度值,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组 别  | n | p-Akt                          | p-PI3K                        | Bax                           |
|------|---|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 运动组  | 8 | 1.3330 ± 0.2544 <sup>a,b</sup> | 0.6227 ± 0.0745 <sup>ab</sup> | 0.5327 ± 0.1075 <sup>ab</sup> |
| 对照组  | 8 | 0.4478 ± 0.0818                | 0.1898 ± 0.0912               | 0.9347 ± 0.2234 <sup>b</sup>  |
| 假手术组 | 8 | 0.4800 ± 0.0848                | 0.1981 ± 0.0430               | 0.2017 ± 0.0749               |

注: 与对照组比较, <sup>a</sup>  $P < 0.05$ ; 与假手术组比较, <sup>b</sup>  $P < 0.05$

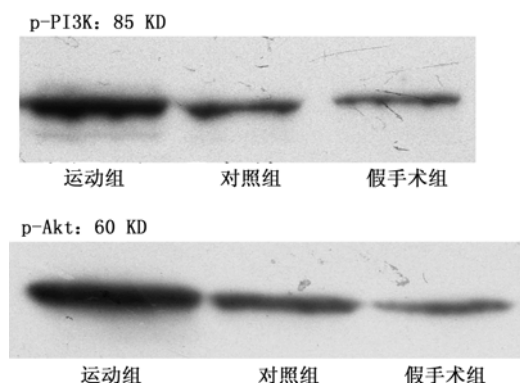


图1 运动训练对 PI3K/Akt 通路的激活水平的影响

## 二、免疫印迹检测脑缺血再灌注区凋亡相关蛋白 Bax 的表达水平

3 组大鼠脑缺血纹状体区及其周边皮质均可检测到凋亡相关蛋白 Bax 的特异性条带(图 2)。运动组凋亡相关蛋白 Bax 的表达水平明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 高于假手术组 ( $P < 0.05$ ); 而对照组 Bax 的表达水平则明显高于运动组和假手术组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

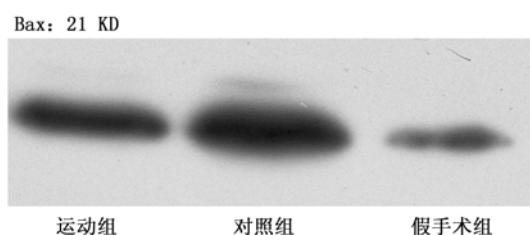


图2 运动训练对细胞凋亡相关蛋白 Bax 表达的影响

## 讨 论

运动训练在减轻缺血性脑损伤、促进损伤后神经功能恢复中的作用已被大量临床研究所验证。脑缺血后早期进行运动训练能够预防和治疗患者的运动、感觉、言语和认知等多种功能障碍,改善或恢复日常生活活动能力和工作能力,改善患者的异常精神状态,提高家庭回归率,并降低生活依赖性,同时减轻患者家庭和整个社会的经济负担<sup>[1,2]</sup>。

血管内皮细胞损伤是脑缺血性损伤的关键所在。脑缺血早期,在缺血、缺氧等应激因素的作用下,血管内皮细胞发生凋亡,可导致血脑屏障功能障碍,促进脑水肿的形成;而脑水肿可进一步加剧脑缺血损伤,形成恶性循环,加重缺血区神经细胞的损伤<sup>[8]</sup>。如能采取措施减轻血管内皮细胞凋亡、减低血脑屏障的通透性及减轻脑水肿,则可减轻缺血后的脑损伤<sup>[9,10]</sup>。

Ang 是一族新近发现的分泌型生长因子,该家族主要由 Ang-1<sup>[11]</sup>、Ang-2<sup>[12]</sup>、Ang-3 及 Ang-4<sup>[13]</sup> 4 个成员组成。目前对 Ang-1 及 Ang-2 的作用了解较多,发

现两者在血管生成、重塑、抗血管内皮细胞凋亡及内皮细胞迁移中发挥着非常重要的作用<sup>[14]</sup>。最近的研究发现,Ang-1 通过与其内皮特异性酪氨酸激酶受体 Tie 结合,引起 Tie-2 受体的磷酸化,可以消除或减弱过氧化氢等<sup>[15,16]</sup> 多种因素诱导的内皮细胞凋亡<sup>[17]</sup>。Murakami 等<sup>[18]</sup> 和 Yin 等<sup>[19]</sup> 的研究证实,PI3K/Akt 是 Ang-1 发挥其抗内皮细胞凋亡作用的主要下游通路:使用 LY294002 抑制 PI3K 的功能,则 Ang-1 诱导的抗细胞凋亡作用被减弱;在阻断 Tie-2 功能的情况下激活 Akt,同样可以发挥抗内皮细胞凋亡的作用<sup>[20]</sup>。但这些研究都局限在离体细胞培养的情况下,对体内 PI3K/Akt 抗凋亡信号通路的激活水平还研究甚少。在本研究中,我们研究运动训练对活体情况下 PI3K/Akt 抗凋亡信号通路激活水平的影响,并观察其对细胞凋亡水平的影响。我们发现,脑缺血 2 周后,运动组 PI3K/Akt 抗凋亡信号通路的磷酸化水平明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ),而对照组和假手术相比差异无统计学意义;运动组凋亡相关蛋白 Bax 的表达水平明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ),但仍高于假手术组 ( $P < 0.05$ )。

Lin 等<sup>[21]</sup> 的研究发现,局灶性脑缺血发生后 48 ~ 72 h,Ang-1 及 Tie-2 表达增加,可减少内皮细胞的凋亡,减轻血管渗漏,减轻缺血性脑损伤,促进新生血管内皮细胞向梗塞灶生长<sup>[22]</sup>。Tie-2 受体与其配体结合后自身磷酸化,激活 PI3K 的 p-85 亚基<sup>[19]</sup>,从而促进 Akt 的磷酸化,发挥抗内皮细胞凋亡的作用。同时,我们前期的研究发现,脑缺血早期开始的运动训练可以改善脑缺血大鼠的神经行为能力,减小脑梗死体积,并促进 Ang-1 及其受体 Tie-2 的表达,提示这可能是运动训练促进脑缺血后神经功能恢复的可能机制。研究表明,脑缺血后早期的运动训练可以提高 PI3K/Akt 抗凋亡信号通路的激活水平,减轻脑缺血后的内皮细胞凋亡,这可能是运动训练减轻脑缺血损伤、促进神经功能恢复的机制之一。

## 参 考 文 献

- [1] 姜从玉,胡永善,吴毅,等. 规范三级康复治疗对脑卒中患者生存质量的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28: 611-614.
- [2] 姜从玉,胡永善,吴毅,等. 脑卒中患者早期康复治疗的成本-效果分析. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26: 604-607.
- [3] 孙莉敏,郑庆平,胡永善,等. 运动对缺血性脑卒中大鼠血管生成素基因表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29: 85-88.
- [4] Vonnahme KA, Redmer DA, Borowczyk E, et al. Vascular composition, apoptosis, and expression of angiogenic factors in the corpus luteum during prostaglandin F2alpha-induced regression in sheep. Reproduction, 2006, 131: 1115-1126.
- [5] DeBusk LM, Hallahan DE, Lin PC. Akt is a major angiogenic mediator downstream of the Ang1/Tie2 signaling pathway. Exp Cell Res, 2004, 298: 167-177.

- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [7] Chabane H, Barbara J, Hrabina M, et al. Competitive immunoassay for antigenic latex protein measurement: rabbit antiserum-based assay compared to modified lowry and human IgE-inhibition methods. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 1999, 9: 372-379.
- [8] Gasche Y, Copin JC. Blood-brain barrier pathophysiology and ischaemic brain oedema. *Ann Fr Anesth Reanim*, 2003, 22: 312-319.
- [9] Kumai Y, Ooboshi H, Ibayashi S, et al. Postischemic gene transfer of soluble Flt-1 protects against brain ischemia with marked attenuation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27:1152-1160.
- [10] Shimamura N, Matchett G, Solaroglu I, et al. Inhibition of integrin alphavbeta3 reduces blood-brain barrier breakdown in focal ischemia in rats. *J Neurosci Res*, 2006, 84:1837-1847.
- [11] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, 1996, 87: 1161-1169.
- [12] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 1997, 277: 48-50.
- [13] Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, et al. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1904-1909.
- [14] Otrrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, et al. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis*, 2007, 39: 212-220.
- [15] Wang Z, Cui M, Sun L, et al. Angiopoietin-1 protects H9c2 cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis through AKT signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359:685-690.
- [16] Moon SO, Kim W, Kim DH, et al. Angiopoietin-1 reduces iopromide-induced endothelial cell apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/p70 S6 kinase. *Int J Tissue React*, 2005, 27:115-124.
- [17] Shi LG, Zhang GP, Jin HM. Inhibition of microvascular endothelial cell apoptosis by angiopoietin-1 and the involvement of cytochrome C. *Chin Med J(Engl)*, 2006, 119:725-730.
- [18] Murakami T, Takagi H, Suzuma K, et al. Angiopoietin-1 attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced SEK1/JNK phosphorylation through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 2005, 280:31841-31849.
- [19] Yin D, Li C, Kao RL, et al. Angiopoietin-1 inhibits doxorubicin-induced human umbilical vein endothelial cell death by modulating fas expression and via the PI3K/Akt pathway. *Endothelium*, 2004, 11: 247-252.
- [20] DeBusk LM, Hallahan DE, Lin PC. Akt is a major angiogenic mediator downstream of the Ang1/Tie2 signaling pathway. *Exp Cell Res*, 2004, 298:167-177.
- [21] Lin TN, Wang CK, Cheung WM, et al. Induction of angiopoietin and Tie receptor mRNA expression after cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20:387-395.
- [22] Lin TN, Nian GM, Chen SF, et al. Induction of Tie-1 and Tie-2 receptor protein expression after cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21:690-701.

(修回日期:2008-06-10)  
(本文编辑:松 明)

## 《中华物理医学与康复杂志》2008 年第 10 期 “继续教育园地”测试题

读杂志、获学分,本刊继续教育园地栏目每期推出,只要您每期阅读该栏目文章,正确填写答题卡寄回本刊编辑部,您就可获得国家 II 类继续教育学分,全年可获得 5 分。

测试题(文章见本期 718-720 页,答题卡见本期 676 页):

1、ICF 由过去的“疾病的结局”分类逐渐转变为:

- A. “功能”分类                      B. “健康的成份”分类  
C. “心理健康”分类                D. “运动功能”分类

2、采用基于 ICF 的术语系统对功能及残疾进行分类时,下面那一项不是其主要特点:

- A. 准确定义                          B. 结构与功能分离  
C. 用活动替代残疾                D. 用残障代替参与

3. 下列哪项不是世界卫生组织《残疾评定年表》(WHO-DAS II)的评价项目:

- A. 理解与交流                      B. 自我照料  
C. 与他人相处                      D. 肩关节活动功能

4. 下列哪项不属于 ICF 临床检查表的评定内容:

- A. 身体水平                          B. 个体水平  
C. 知识水平                          D. 社会水平

5. ICF 认为,一个人的功能评定应从 3 个方面进行评定,除了健康状况、个人因素以外,还包括下列哪个方面:

- A. 心理因素                          B. 环境因素  
C. 肢体功能                          D. 认知因素