

基于PI3K/Akt通路探讨氯吡格雷对脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用

温瑶 郑文旭 姜巍 王玲

116001 大连市友谊医院神经内一科

通信作者: 郑文旭, Email: 457835577@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2020.01.008

【摘要】目的 基于磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)通路探讨氯吡格雷对脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用。**方法** 建立脑缺血再灌注大鼠模型,随机分为模型组、氯吡格雷组、LY294002(PI3K抑制剂)组、氯吡格雷+LY294002组,每组12只,另取12只SD大鼠设为假手术组。分组处理后,所有大鼠进行神经功能缺损评分并尾静脉取血,处死大鼠,HE染色检测各组大鼠神经元病理情况;三苯基氯化四氮唑(TTC)染色检测各组大鼠脑组织梗死面积;ELISA检测血清中中枢神经特异性蛋白(S100 β)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;蛋白免疫印迹法检测脑组织中PI3K/Akt通路蛋白表达情况。**结果** 与假手术组相比,模型组大鼠脑组织神经元出现坏死、核收缩变小等病理变化,神经功能缺损评分、脑梗死面积、血清中S100 β 、NSE、IL-6及TNF- α 水平均明显升高($P < 0.05$),脑组织中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt明显降低($P < 0.05$);与模型组相比,氯吡格雷组大鼠神经元病理损伤减轻,神经功能缺损评分、脑梗死面积、血清中S100 β 、NSE、IL-6及TNF- α 水平均降低($P < 0.05$),脑组织中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt升高($P < 0.05$);LY294002组大鼠神经元病理损伤加重,神经功能缺损评分、脑梗死面积、血清中S100 β 、NSE、IL-6及TNF- α 水平均升高($P < 0.05$),脑组织中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt降低($P < 0.05$)。与LY294002组相比,氯吡格雷+LY294002组大鼠神经元病理损伤减轻,神经功能缺损评分、脑梗死面积、血清中S100 β 、NSE、IL-6及TNF- α 水平均降低($P < 0.05$),脑组织中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt升高($P < 0.05$)。与氯吡格雷组相比,氯吡格雷+LY294002组大鼠神经元病理损伤加重,神经功能缺损评分、脑梗死面积、血清中S100 β 、NSE、IL-6及TNF- α 水平均升高($P < 0.05$),脑组织中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt降低($P < 0.05$)。**结论** 氯吡格雷可通过激活PI3K/Akt通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤,保护脑组织。

【关键词】 氯吡格雷; PI3K/Akt通路; 脑缺血再灌注损伤; 神经保护

Neuroprotective effect of clopidogrel on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats based on PI3K/Akt pathway

Wen Yao, Zheng Wenxu, Jiang Wei, Wang Ling

Neurology Department I, Dalian Friendship Hospital, Dalian 116001, China

Corresponding author: Zheng Wenxu, Email: 457835577@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the neuroprotective effect of clopidogrel on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats based on PI3K/Akt pathway. **Methods** Rat models of cerebral ischemia reperfusion were established and randomly divided into model group, clopidogrel group, LY294002 (PI3K/Akt pathway inhibitor) group and clopidogrel + LY294002 group, with 12 rats in each group, and another 12 SD rats were used as sham operation group. After grouping, all rats were scored for neurological deficit and blood was taken from caudal vein to execute the rats. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the pathological changes of neurons in each group, the infarct size of brain tissue was measured by TTC staining, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of serum central nervous specific protein (S100 β), neuron specific enolase (NSE), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α), and the expression of PI3K/Akt pathway protein in brain tissue was detected by Western blotting. **Results** Compared with sham-operated group, neuron necrosis and nuclear contraction decreased in model group; neurological deficit score, cerebral infarction area, levels of serum S100 β , NSE, IL-6 and TNF- α increased significantly ($P < 0.05$),

while p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the pathological damage of neurons in clopidogrel group was alleviated; neurological deficit score, cerebral infarction area, levels of serum S100 β , NSE, IL-6 and TNF- α decreased significantly ($P < 0.05$), while p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt increased significantly ($P < 0.05$). Neuronal pathological damage in LY294002 group was aggravated; neurological deficit score, cerebral infarction area, levels of serum S100 β , NSE, IL-6 and TNF- α increased significantly ($P < 0.05$), while p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with LY294002 group, the pathological damage of neurons in clopidogrel + LY294002 group was alleviated; the neurological deficit score, cerebral infarction area, levels of serum S100 β , NSE, IL-6 and TNF- α decreased significantly ($P < 0.05$), while p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt increased significantly ($P < 0.05$). Compared with clopidogrel group, neuropathological damage was aggravated in clopidogrel + LY294002 group; neurological deficit score, cerebral infarction area, levels of serum S100 β , NSE, IL-6 and TNF- α increased significantly ($P < 0.05$), while p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** Clopidogrel can alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury and protect brain tissue by activating PI3K/Akt pathway in rats.

【Key words】 Clopidogrel; PI3K/Akt pathway; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Neuroprotection

脑卒中是临床常见的心脑血管危急病症,病情进展迅速,致残、致死率高,是造成居民死亡的三大疾病之一,其中大多数为缺血性脑卒中,约占全部患者的80%^[1]。缺血性脑卒中患者预后差,大多数会有肺损伤、脑功能障碍等并发症,其中约50%患者发生偏瘫,约30%患者有行走障碍,严重影响患者生活质量,因此减轻脑卒中后脑缺血再灌注损伤是临床研究热点^[2-3]。

氯吡格雷是一种血小板聚集抑制剂,可抑制缺血再灌注引起的炎症反应,保护血管内皮细胞免受损伤,临床上用于治疗缺血性脑卒中进而保护脑功能^[4-5],但其作用机制目前尚不清楚。磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)通路介导脑缺血再灌注后免疫炎症、氧化应激、细胞凋亡、血管生成等多种生理、病理过程,激活该通路,可促进缺血性卒中后血管生成,修复脑损伤^[6],是川芎嗪硝酮发挥神经保护作用治疗缺血性脑卒中的作用机制^[7]。而马杰等^[8]在对脑缺血再灌注大鼠研究中发现,硫酸氢氯吡格雷可促进脑组织Akt蛋白的磷酸化,因此磷酸化激活PI3K/Akt通路可能是氯吡格雷对脑缺血再灌注损伤大鼠发挥神经保护作用的药理机制。本文通过建立脑缺血再灌注大鼠模型,基于PI3K/Akt通路探讨氯吡格雷对脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用。

一、材料与方法

1. 实验动物: SD雄性大鼠购自康美华大基因技术有限公司,许可证号: SYXK(粤)2019-0205, SPF清洁级,体重(200 \pm 20)g。所有大鼠在清洁、安静、通风良好的环境中饲养,温度约25 $^{\circ}$ C,相对湿度约50%,大鼠自由饮食、饮水,12 h/12 h交替照明,定期更换垫料、清理消毒鼠笼,并添加饲料及饮用水。

2. 主要试剂及仪器: 氯吡格雷(货号: HJIR-11460, 厦门慧嘉生物科技有限公司); LY294002(货号: HY-10108, 美国MCE公司); 三苯基氯化四氮唑(2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchloride, TTC)(货号: 298964, 美国Amresco公司); 大鼠S100 β ELISA试剂盒(货号: YS04063B, 上海雅吉生物科技有限公司); 大鼠NSE ELISA试剂盒(货号: SBJ-R0081, 南京森贝伽生物科技有限公司); 大鼠IL-6及TNF- α ELISA试剂盒、兔源GAPDH、PI3K、p-PI3K、AKT及p-AKT一抗、羊抗兔二抗(货号分别为: ab100772、ab100785、ab181602、ab151549、ab138364、ab179463、ab38449、ab150077, 美国Abcam公司); SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、TBST缓冲液(货号分别为: P1200、T1081, 索莱宝公司); RIPA裂解液、BCA试剂盒、HE染色试剂盒(货号分别为: P0013K、P0011、C0105, 上海碧云天公司)等。

光学显微镜(型号: SMZ745, 日本尼康公司); 切片仪(型号: CM3050S, 德国Leica公司); 酶标仪(型号: XELx800, 美国Perkin Elmer公司); 蛋白电泳仪、转膜仪(型号: Mini PROTEAN)购自美国Bio-Rad公司; 凝胶成像系统(型号: 2500, 上海天能公司); 酶标仪、蛋白电泳仪、转膜仪(型号分别为: ELx800、1659001、Trans-Blot Turbo, 美国Bio-Rad公司); 轮转切片仪、包埋机、烤片机(型号分别为: RM2035、EG1160、HI1220, 德国Leica公司); 低温高速离心机(型号: Centrifuge 5424R, 德国Eppendorf股份公司); 凝胶成像仪(型号: GIS-500, Miulab公司)等。

3. 动物模型制备及分组给药: 参考文献[9]中方法, 腹腔注射2.5%戊巴比妥钠(剂量为45 mg/kg)麻醉大鼠, 以仰卧位固定在手术台上, 喷洒75%酒精消毒后铺巾, 颈部备皮, 逐层切开皮肤、肌肉组织,

使左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)及颈内动脉(internal carotid artery, ICA)暴露后分离, 结扎CCA、ECA近心端并以动脉夹夹闭ICA, 使用手术剪在离CCA分叉部4 mm处剪一小口, 插入一根直径0.24 mm栓线直到ICA, 阻断大脑中动脉血流, 最后缝合切口, 将栓线尾端部分固定于皮肤外, 缺血2 h后, 抽出栓线即可完成模型制备。参照Longa分级法^[10]对造模后大鼠神经功能缺损进行评分, 标准见表1, 评分为1~3分时表示模型制备成功。共制备模型55只, 成功48只, 随机分为模型组、LY294002组、氯吡格雷组、氯吡格雷+LY294002组, 每组12只。另取12只大鼠仅做CCA、ECA、ICA分离处理后缝合伤口, 设为假手术组。

参照文献[11], 以生理盐水溶解氯吡格雷配制为0.771 mg/ml溶液, 氯吡格雷组、氯吡格雷+LY294002组大鼠以10 ml/kg剂量灌胃, 氯吡格雷组大鼠再与LY294002组同剂量的生理盐水尾静脉注射; LY294002组、氯吡格雷+LY294002组大鼠以0.3 mg/kg^[12]剂量尾静脉注射, LY294002组大鼠再与氯吡格雷组等剂量的生理盐水灌胃; 假手术组与模型组大鼠以与LY294002组同剂量的生理盐水尾静脉注射, 并以与氯吡格雷组等剂量的生理盐水灌胃, 持续7 d。

表1 神经功能缺损评分(分)

神经功能缺损行为	评分
无神经功能缺损	0
不能完全伸展对侧前爪	1
行走向对侧转圈	2
行走向对侧倾倒	3
意识丧失, 不能自行行走	4
死亡	5

4. 大鼠神经损伤检测及标本收集: 末次给药24 h后, Longa分级法对各组大鼠神经功能缺损进行评分, 然后尾静脉取血2 ml, 静置20 min, 3 000 r/min, 4 °C离心20 min, 取上清液(血清)储存在-80 °C备用。各组随机选6只大鼠麻醉后处死, 分离脑组织, 剪取约0.5 g储存在-80 °C备用。剩余组织经生理盐水漂洗、4%多聚甲醛固定、梯度酒精(从低到高)脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后, 以切片机做病理切片, 选取完整的切片进行脱蜡、梯度酒精(由高到低)浸泡处理, 然后参照说明书步骤以HE试剂盒进行染色, 再次经脱水、透明后封片, 在光学显微镜下观

察神经元病理变化, 选取5个视野进行拍照。

5. 大鼠脑梗死面积测定: 各组剩余6只大鼠麻醉后处死, 解剖分离脑组织, 沿冠状切面切为5片, 使其厚度大致相同, 以2% TTC染液在37 °C下避光染色30 min, 经蒸馏水漂洗后, 加入4%多聚甲醛固定, 肉眼观察并对切片进行拍照, 以Image pro软件分析图片得出大鼠脑梗死面积, 公式为: 脑梗死面积=全脑梗死面积/全脑片面积×100%。

6. 大鼠血清S100 β 、NSE、IL-6、TNF- α 水平检测: 大鼠标本收集的血清置于4 °C解冻, 使用大鼠ELISA试剂盒检测各组大鼠血清S100 β 、NSE、IL-6、TNF- α 水平, 参照说明书进行操作。

7. 大鼠脑组织PI3K/Akt通路蛋白表达检测: 大鼠脑组织剪碎后, 加入蛋白裂解液, 以匀浆机制备为匀浆液, 3 000 r/min, 4 °C离心20 min, 取上清液置于新的Ep管中, 各组分别做好标记, 以BCA试剂盒测得蛋白总浓度, 具体操作参照说明书进行, 各组取含相同质量总蛋白的样品液进行电泳, 将分离蛋白转移至PVDF膜上, 以5%脱脂奶粉封闭后根据目的蛋白分子量截取蛋白条带置于小盒中, 分别做好标记, 加入兔源GAPDH、PI3K、p-PI3K、AKT及p-AKT一抗, 4 °C孵育过夜后, TBST漂洗3次, 加入羊抗兔二抗, 室温孵育2 h, TBST漂洗3次, 增强化学发光法显色, 以凝胶成像系统对蛋白条带拍照, 并以Quantity One软件分析各组蛋白的相对表达量。

8. 统计学方法: 采用SPSS 24.0软件对数据进行统计分析, 计数资料采用率(%)表示; 计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较行LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 各组大鼠脑梗死面积: 见图1(见本期封三)、表2。与假手术组相比, 模型组大鼠脑梗死面积明显升高($P < 0.05$)。与模型组相比, 氯吡格雷组大鼠脑梗死面积降低($P < 0.05$); LY294002组大鼠脑梗死面积升高($P < 0.05$)。与LY294002组相比, 氯吡格雷+LY294002组大鼠脑梗死面积降低($P < 0.05$)。与氯吡格雷组相比, 氯吡格雷+LY294002组大鼠脑梗死面积升高($P < 0.05$)。

2. 各组大鼠脑损伤的影响: 见图2(见本期封三)、表3。假手术组大鼠神经元细胞完好, 无损伤。与假手术组相比, 模型组大鼠神经元出现坏死、核收缩变小等病理变化, 神经功能缺损评分明显升高($P < 0.05$)。与模型组相比, 氯吡格雷

组大鼠神经元病理损伤减轻,神经功能缺损评分降低($P < 0.05$); LY294002组大鼠神经元病理损伤加重,神经功能缺损评分升高($P < 0.05$)。与 LY294002组相比,氯吡格雷+LY294002组大鼠神经元病理损伤减轻,神经功能缺损评分降低($P < 0.05$)。与氯吡格雷组相比,氯吡格雷+LY294002组大鼠神经元病理损伤加重,神经功能缺损评分升高($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠脑梗死面积(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	脑梗死面积
假手术组	6	0
模型组	6	32.12 ± 4.68 ^a
氯吡格雷组	6	15.52 ± 3.52 ^b
LY294002组	6	53.58 ± 9.52 ^b
氯吡格雷+LY294002组	6	33.25 ± 7.52 ^{bcd}
F值		134.94
P值		< 0.05

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与氯吡格雷组比较,^c $P < 0.05$;与LY294002组比较,^d $P < 0.05$

表3 各组大鼠神经功能缺损评分(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	神经功能缺损评分
假手术组	12	0
模型组	12	2.41 ± 0.42 ^a
氯吡格雷组	12	0.15 ± 0.03 ^b
LY294002组	12	3.56 ± 0.39 ^b
氯吡格雷+LY294002组	12	2.37 ± 0.51 ^{bcd}
F值		246.95
P值		< 0.05

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与氯吡格雷组比较,^c $P < 0.05$;与LY294002组比较,^d $P < 0.05$

3. 各组大鼠血清中S100β、NSE水平:见表4。与假手术组相比,模型组大鼠血清中S100β、NSE水平明显升高($P < 0.05$)。与模型组相比,氯吡格雷组大鼠血清中S100β、NSE水平降低($P < 0.05$); LY294002组大鼠血清中S100β、NSE水平升高($P < 0.05$)。与LY294002组相比,氯吡格雷+LY294002组大鼠血清中S100β、NSE水平降低($P < 0.05$)。与氯吡格雷组相比,氯吡格雷+LY294002组大鼠血清中S100β、NSE水平升高($P < 0.05$)。

4. 各组大鼠血清中IL-6、TNF-α水平:见表5。与假手术组相比,模型组大鼠血清中IL-6、TNF-α水平明显升高($P < 0.05$)。与模型组相比,氯吡格雷组大鼠血清中IL-6、TNF-α水平降低($P < 0.05$); LY294002组大鼠血清中IL-6、TNF-α水平升高($P < 0.05$)。与

LY294002组相比,氯吡格雷+LY294002组大鼠血清中IL-6、TNF-α水平降低($P < 0.05$)。与氯吡格雷组相比,氯吡格雷+LY294002组大鼠血清中IL-6、TNF-α水平升高($P < 0.05$)。

表4 各组大鼠血清中S100β、NSE水平(ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	S100β	NSE
假手术组	12	6.08 ± 0.96	73.38 ± 11.02
模型组	12	75.53 ± 8.97 ^a	150.82 ± 15.01 ^a
氯吡格雷组	12	8.83 ± 1.12 ^b	76.97 ± 12.03 ^b
LY294002组	12	102.79 ± 11.06 ^b	196.17 ± 16.85 ^b
氯吡格雷+LY294002组	12	73.49 ± 5.08 ^{bcd}	153.48 ± 16.02 ^{bcd}
F值		394.11	132.70
P值		< 0.05	< 0.05

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与氯吡格雷组比较,^c $P < 0.05$;与LY294002组比较,^d $P < 0.05$

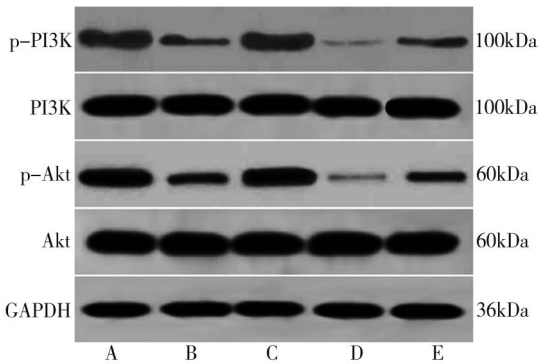
表5 各组大鼠血清中IL-6、TNF-α水平(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	IL-6	TNF-α
假手术组	12	32.09 ± 2.12	35.36 ± 2.34
模型组	12	75.53 ± 5.03 ^a	80.86 ± 5.12 ^a
氯吡格雷组	12	33.87 ± 2.13 ^b	36.76 ± 2.35 ^b
LY294002组	12	98.72 ± 6.02 ^b	106.17 ± 6.11 ^b
氯吡格雷+LY294002组	12	73.49 ± 5.08 ^{bcd}	79.48 ± 6.02 ^{bcd}
F值		417.82	412.19
P值		< 0.05	< 0.05

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与氯吡格雷组比较,^c $P < 0.05$;与LY294002组比较,^d $P < 0.05$

5. 各组大鼠脑组织中PI3K/Akt通路蛋白表达:见图3、表6。与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt明显降低($P < 0.05$)。与模型组相比,氯吡格雷组大鼠脑组织中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt升高($P < 0.05$); LY294002组大鼠脑组织中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt降低($P < 0.05$)。与LY294002组相比,氯吡格雷+LY294002组大鼠脑组织中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt升高($P < 0.05$)。与氯吡格雷组相比,氯吡格雷+LY294002组大鼠脑组织中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt降低($P < 0.05$)。

讨论 缺血性脑卒中可引起细胞凋亡、组织坏死等直接损伤,且再灌注能导致炎症、氧化应激等间接损伤^[13],最终导致脑神经功能不可逆性损伤,使患者肢体运动及认知功能减弱,严重时可能造成患者残疾或死亡,并给患者造成极大经济负担,因此对脑缺血再灌注后损伤的研究具有重大的临床及社会意义^[14]。本研究采用大脑中动脉线栓法建立脑缺血再灌注大鼠模型,结果显示,模型组大鼠出



注: A假手术组; B模型组; C氯吡格雷组; D LY294002组; E氯吡格雷+LY294002组

图3 各组大鼠脑组织中PI3K/Akt通路蛋白免疫印迹检测结果

表6 各组大鼠脑组织中PI3K/Akt通路蛋白相对表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
假手术组	6	1.02 ± 0.13	0.98 ± 0.12
模型组	6	0.43 ± 0.07 ^a	0.50 ± 0.09 ^a
氯吡格雷组	6	0.99 ± 0.14 ^b	0.97 ± 0.13 ^b
LY294002组	6	0.09 ± 0.02 ^b	0.10 ± 0.03 ^b
氯吡格雷+LY294002组	6	0.41 ± 0.08 ^{bed}	0.48 ± 0.11 ^{bed}
F值		162.99	127.57
P值		< 0.05	< 0.05

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与氯吡格雷组比较, ^c $P < 0.05$; 与LY294002组比较, ^d $P < 0.05$

现神经元凋亡,核收缩变小,脑组织坏死等病理损伤,神经功能缺损评分、脑梗死面积明显增大,表明大鼠脑组织因缺血出现大面积梗死,神经细胞凋亡、坏死,神经功能受损。S100β是星形胶质细胞标志蛋白,NSE是一种烯醇化酶,两者广泛分布于神经组织中;脑损伤时二者可通过受损的血脑屏障进入血液中,是反映脑损伤的敏感指标^[15]。IL-6、TNF-α是机体免疫细胞合成的促炎因子,可促使脑缺血再灌注后机体脑组织炎症的发展^[16]。本结果显示,模型组大鼠血清中S100β、NSE、IL-6、TNF-α水平均明显升高,表明脑缺血再灌注引起大鼠脑组织发生炎症反应,造成脑损伤,模型建立成功。

氯吡格雷作为一种血小板受体阻断剂,可抑制血小板聚集,降低缺血再灌注大鼠脑梗死面积,进而减少神经细胞凋亡,改善大鼠脑组织病理变化及神经症状,临床中广泛用于治疗脑梗死,具有较好的疗效^[17-18],且不良反应较小。因脑缺血再灌注损伤的发病机制复杂,自由基的生成、细胞内钙超载、兴奋性氨基酸毒性、白细胞高度聚集和高能磷酸化化合物的缺乏等在其中起到重要作用,而氯吡格雷对

脑缺血再灌注损伤发病过程的影响及其作用机制目前仍不清楚。PI3K/Akt通路是机体内经典的促增殖、抗凋亡信号,在脑缺血再灌注损伤过程中起关键的调节作用,激活PI3K/Akt通路能够抑制脑部炎症、氧化应激反应,进而抑制神经细胞凋亡,维持神经正常功能^[19]。研究发现,在脑缺血再灌注损伤过程中,PI3K/Akt通路处于磷酸化抑制状态,β-石竹烯预处理可通过激活PI3K/Akt信号减轻局灶性脑缺血再灌注损伤^[20],因而PI3K/Akt通路是治疗缺血性脑卒中的一个作用靶点,激活该通路可减少自由基生成,抑制炎症反应,推测氯吡格雷保护脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能的药理机制可能是激活PI3K/Akt信号。本研究以PI3K抑制剂LY294002处理脑缺血再灌注模型大鼠对此进行研究,结果显示,模型大鼠脑组织中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt明显降低,经氯吡格雷治疗后,其脑组织中PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平升高,表明氯吡格雷可能通过激活PI3K/Akt信号保护脑缺血再灌注大鼠神经功能。氯吡格雷及LY294002联合处理模型大鼠,结果显示大鼠脑组织中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt相比LY294002组升高,但低于氯吡格雷组;神经元病理损伤相比LY294002组减轻,但比氯吡格雷组加重;神经功能缺损评分、脑梗死面积、血清中S100β、NSE、IL-6及TNF-α水平相比LY294002组均降低,但高于氯吡格雷组,表明LY294002可抑制PI3K/Akt通路激活,促进自由基生成,增强大鼠脑部氧化应激及炎症反应,加重神经元损伤,使神经功能受损,促使疾病进展;而氯吡格雷可激活PI3K/Akt信号通路,从而减弱LY294002引起的大鼠脑部自由基生成增加、氧化应激及炎症反应加重、神经元损伤严重现象,进而降低神经元损伤,恢复神经功能,揭示氯吡格雷可通过激活PI3K/Akt信号对脑缺血再灌注大鼠发挥神经保护作用。

综上所述,氯吡格雷可磷酸化激活PI3K/Akt信号,降低脑缺血再灌注大鼠脑梗死面积,减轻炎症反应,抑制神经元细胞凋亡,修复受损神经功能,促使PI3K/Akt通路磷酸化激活是其药理机制之一。但目前只进行初步研究,氯吡格雷对PI3K/Akt通路的下游信号的调控机制未涉及,存在不足,更为清楚的分子机制还有待深入研究。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 试验设计、论文撰写为温瑶、郑文旭,研究实施、资料收集为温瑶、郑文旭、姜巍、王玲,论文修订为姜巍、郑文旭、王玲,王玲审校

参 考 文 献

- [1] Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality[J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133(2):245-261. DOI: 10.1007/s00401-017-1667-0.
- [2] Feng J, Chen X, Guan B, et al. Inhibition of Peroxynitrite-Induced Mitophagy Activation Attenuates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(8): 6369-6386. DOI: 10.1007/s12035-017-0859-x.
- [3] Anderson CS, Robinson T, Lindley RI, et al. Low-Dose versus Standard-Dose Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke[J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(24):2313-2323. DOI: 10.1056/NEJMoa1515510.
- [4] Kwong W, Parker JD. The Effect of Clopidogrel on the Response to Ischemia Reperfusion[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2017, 22(4): 368-373. DOI: 10.1177/1074248416683047.
- [5] Johnston SC, Easton JD, Farrant M, et al. Clopidogrel and Aspirin in Acute Ischemic Stroke and High-Risk TIA[J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(3): 215-225. DOI: 10.1056/NEJMoa1800410.
- [6] Yu X, Peng Y, Liang H, et al. TSLP/TSLPR promote angiogenesis following ischemic stroke via activation of the PI3K/AKT pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 3411-3417. DOI: 10.3892/mmr.2017.8217.
- [7] Zhang G, Zhang T, Wu L, et al. Neuroprotective Effect and Mechanism of Action of Tetramethylpyrazine Nitron for Ischemic Stroke Therapy[J]. *Neuromolecular Med*, 2018, 20(1): 97-111. DOI: 10.1007/s12017-018-8478-x.
- [8] 马杰, 谢薇. 补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠脑组织AKT蛋白表达的影响研究[J]. *中国民康医学*, 2018, 30(9): 1-3. DOI: 10.3969/j.issn.1672-0369.2018.09.001.
Ma J, Xie W. Study on effects of Buyang Huanwu decoction on expression of AKT protein in brain tissue of rats with cerebral ischemia reperfusion injury[J]. *Medical Journal of Chinese People's Health*, 2018, 30(9): 1-3.
- [9] 郭东艳, 范好, 赵晓平, 等. 健脑益智胶囊不同纯化工艺对脑缺血再灌注模型大鼠脑组织炎症反应的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(3): 538-540. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2017.03.007.
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [11] 张亚雯, 时红, 张宇明, 等. 氯吡格雷对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及机制[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(10): 2390-2392. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2017.10.018.
- [12] 胡洪凭, 张洪凯, 吴滨. 丙泊酚通过PI3K/Akt/mTOR通路对脑外伤大鼠的神经保护作用[J]. *中国药师*, 2019, 22(7): 1215-1219. DOI: 10.3969/j.issn.1008-049X.2019.07.007.
Hu HP, Zhang HK, Wu B. Neuroprotective Effects of Propofol Through PI3K/Akt/mTOR Pathway in Rats with Brain Injury[J]. *China Pharmacist*, 2019, 22(7): 1215-1219.
- [13] Chen B, Wang G, Li W, et al. Memantine attenuates cell apoptosis by suppressing the calpain-caspase-3 pathway in an experimental model of ischemic stroke[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 351(2): 163-172. DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.12.028.
- [14] Zheng PD, Mungur R, Zhou HJ, et al. Ginkgolide B promotes the proliferation and differentiation of neural stem cells following cerebral ischemia/reperfusion injury, both in vivo and in vitro[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(7): 1204-1211. DOI: 10.4103/1673-5374.232476.
- [15] Kanavaki A, Spengos K, Moraki M, et al. Serum Levels of S100b and NSE Proteins in Patients with Non-Transfusion-Dependent Thalassemia as Biomarkers of Brain Ischemia and Cerebral Vasculopathy[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12). DOI: 10.3390/ijms18122724.
- [16] Xu H, Qin W, Hu X, et al. Lentivirus-mediated overexpression of OTULIN ameliorates microglia activation and neuroinflammation by depressing the activation of the NF- κ B signaling pathway in cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 83-100. DOI: 10.1186/s12974-018-1117-5.
- [17] Kheiri B, Osman M, Abdalla A, et al. Clopidogrel and aspirin after ischemic stroke or transient ischemic attack: an updated systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2019, 47(2): 233-247. DOI: 10.1007/s11239-018-1786-z.
- [18] Zhao Y, Yang W, Tan Z, et al. Clopidogrel loading dose versus maintenance dose to treat patients with acute ischaemic stroke in China (CLASS-China): results from a prospective double-blind randomised clinical trial[J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2017, 2(3): 118-123. DOI: 10.1136/svn-2017-000072.
- [19] Ou B, Tao W, Yang S, et al. The Antiapoptosis Effect of *Geum japonicum* Thunb. var. *chinense* Extracts on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury via PI3K/Akt Pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 7290170. DOI: 10.1155/2018/7290170.
- [20] Zhang Q, An R, Tian X, et al. β -Caryophyllene Pretreatment Alleviates Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Activating PI3K/Akt Signaling Pathway[J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(5): 1459-1469. DOI: 10.1007/s11064-017-2202-3.

(收稿日期: 2019-06-19)

(本文编辑: 戚红丹)