

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.002

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.002>

染料木素对实验性脑出血大鼠 PI3K/Akt 通路的影响

吴环立, 马现启, 赵海洋

(南阳市第二人民医院神经外科, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的: 探讨染料木素对实验性脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)大鼠神经功能损伤的保护作用及相关的机制。方法: 随机将大鼠分为假手术组、ICH模型组、染料木素低剂量组(5 mg/kg)、中剂量组(10 mg/kg)和高剂量组(15 mg/kg)。通过注射IV型胶原酶建立ICH大鼠模型, 采用Garcia法对大鼠进行神经功能缺损评分, 湿重法检测脑含水量, 比色法检测脑组织中SOD与过氧化氢酶(catalase, CAT)的含量水平, TUNEL法检测血肿周围脑组织细胞凋亡数, Western印迹法检测脑组织中p-PI3K与p-Akt蛋白表达水平。结果: 与ICH模型组相比, 染料木素给药后, 大鼠的神经功能缺损评分显著升高, 脑含水量明显下降, 脑组织中SOD与CAT的含量水平升高, 血肿周围脑组织的细胞凋亡数降低, p-PI3K与p-Akt的蛋白表达明显上调。结论: 染料木素对ICH后的脑损伤具有一定的保护作用, 可能与染料木素的抗氧化作用及调控PI3K/Akt通路有关。

[关键词] 染料木素; 脑出血; 抗氧化; PI3K/Akt

Effects of genistein on PI3K/Akt pathway in cerebral hemorrhage rats

WU Huanli, MA Xianqi, ZHAO Haiyang

(Department of Neurosurgery, Second General Hospital of Nanyang, Nanyang He'nan 473000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the protective effects of genistein on neuronal function in cerebral hemorrhage rats and explore the underlying mechanisms. **Methods:** Rats were randomly divided into the following groups: a sham group, a model group, and cerebral hemorrhage rats treated with low, medium or high dose of genistein groups. Cerebral hemorrhage rat model was induced by injection of type IV collagenase. Neuronal functions were determined by Garcia method; the brain water content (BWC) was measured by wet weight method; SOD and catalase (CAT) levels in brain tissue were examined with colorimetric method; cell apoptosis was observed by TUNEL staining, and the expressions of p-PI3K and p-AKT were detected by Western blot. **Results:** Compared with the model group, neuronal function was significantly improved after genistein treatment. Moreover, the BWC and cell apoptosis in the brain were decreased, while the levels of SOD and CAT, and the expression of p-PI3K and p-AKT were increased after genistein treatment. **Conclusion:** Genistein can improve neuronal function in cerebral hemorrhage rats, which may be associated with its anti-oxidative effects and regulation of PI3K/Akt pathway.

Keywords genistein; cerebral hemorrhage; anti-oxidative effect; PI3K/Akt

收稿日期 (Date of reception): 2017-12-08

通信作者 (Corresponding author): 吴环立, Email: 2982257918@qq.com

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是神经科常见的非外伤性致死性疾病,具有高发病率、高致残率的特征,近年来ICH发病呈年轻化趋势,且发病率逐年增高^[1],为社会与患者家庭带来沉重的经济负担。ICH发生后,血肿周围脑组织的血流量减少,乳酸堆积,进一步引起周围脑组织缺血缺氧,导致细胞进行性凋亡,出现神经组织损伤。目前ICH的发病机制尚不明确,临床上常以内科保守治疗为主,但有时预后并不理想^[2]。

染料木素(genistein)又称染料木黄酮,属异黄酮类化合物,在大豆、燕麦、大麦、玉米中的含量较高^[3],具有与雌激素相似的结构,被称为植物雌激素。研究^[4-5]发现:染料木素有多种药理学作用,如抗肿瘤,抗糖尿病,预防心血管系统疾病,抗氧化作用等。此外,染料木素还具有较强的氧化应激损伤保护作用^[6]。研究^[7]发现:将染料木素植入DNA中,可影响DNA结构的完整性,减少由紫外线辐射引起的8-OHdG的形成,进而起到抗氧化的作用。但目前国内外关于染料木素对ICH后脑组织的作用研究和文献报道较少。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

健康SD大鼠50只,雌雄各半,清洁级,体重180~250 g,购自河北医科大学实验动物中心,饲养于22~25℃室温中,昼夜各12 h,自由饮水进食,进行适应性饲养1周。

1.1.2 试剂

染料木素购自江苏碧云天生物技术有限公司;胶原酶IV购自Sigma公司;TUNEL试剂盒购自瑞士Roche公司;p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt和GADPH抗体购自美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

将大鼠随机分为5组:假手术组(Sham组)、ICH模型组(ICH组)、染料木素低剂量组(Gen-L组, 5 mg/kg)、中剂量组(Gen-M组, 10 mg/kg)和高剂量组(Gen-H组, 15 mg/kg)。临用前用蒸馏水将配置成悬浮液,造模成功后每天灌胃1次,共给药14 d,假手术组与ICH模型组分别给予等容量生理盐水。

1.2.2 ICH 大鼠模型建立

参考Rosenberg等^[8]采用大鼠尾状核微量注射IV型胶原酶建立大鼠ICH模型,采用10%水合氯醛

(0.5 mL/100 g)腹腔麻醉大鼠,俯卧位将大鼠固定在立体定位仪,固定门齿调整使前后卤门在同一直线上,切开头皮,以前卤前右侧0.2 mm中旁3 mm进针,钻孔,采用微量注射器吸取2 μ L 0.30 U/ μ L的IV型胶原酶,注射完后留针数分钟,退针后缝合皮肤;假手术组大鼠注射等体积生理盐水,其余操作与ICH模型组相同。术后24 h,麻醉大鼠,取脑组织,观察造模情况。造模成功判定标准:术后24 h见明显肢体瘫痪,沿针道冠状切面切开脑组织可见血肿形成。术后分笼饲养,正常进食饮水。

1.2.3 神经功能缺损评分

采用Garcia法对各组大鼠进行神经功能行为学评分,分数越低代表神经功能障碍越严重,共进行6项测试:自主运动0~3分、活动对称性0~3分、触摸触须反应1~3分、金属丝鼠笼攀援1~3分、前肢对称性0~3分、触摸双侧躯干反应1~3分,各项得分相加即为神经功能评分。

1.2.4 脑含水量的测定

末次给药后,处死大鼠,冰盘上取出全脑,采用湿重法测定脑组织含水量(brain water content, BWC), $BWC = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$ 。

1.2.5 脑组织 SOD 与过氧化氢酶含量测定

采用比色法,测定各组大鼠脑组织中SOD与过氧化氢酶(catalase, CAT)的含量。

1.2.6 TUNEL 染色检测脑组织细胞凋亡情况

末次给药后,处死大鼠,将脑血肿组织制作成石蜡切片,浸入二甲苯I, II各30 min,依次浸入梯度乙醇(100%, 95%, 90%, 80%和70%)各5 min, PBS洗2次;3%过氧化氢室温孵育5 min, PBS洗涤3次;0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液100℃修复5 min, PBS洗2次;5%BSA室温封闭30 min,甩去多余液体。加入TUNEL检测液(1:500)室温孵育90 min, PBS洗3次;加入抗荧光素抗体(1:500)37℃孵育45 min, PBS洗涤3次;加入Hoechst 33258染色5 min, PBS洗涤3次,甘油封片,置于显微镜下观察。

1.2.7 Western 印迹法检测蛋白表达

末次给药后,处死大鼠,剪取大鼠脑血肿组织,冰上裂解30 min, 12 000 r/min 4℃离心5 min,收集细胞并提取细胞总蛋白,定量,调整蛋白量。取等量裂解产物,加入体积:上样缓冲液(1:4)进行12%SDS-PAGE。转膜,5%脱脂奶粉室温放置1 h,加入一抗,4℃孵育过夜, PBS洗3次,每次5 min;再加入相应二抗37℃孵育1 h, PBS洗3次,每次5 min,增强化学发光法(enhanced chemiluminescence assay, ECL)显色凝胶成像系统扫描灰度值进行分析。

1.3 统计学处理

采用SPSS 16.0统计软件进行分析, 结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组内数据采用单因素方差分析, 两组间数据采用Benferroni校正的*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型建立与神经功能缺损评分

术后24 h, 取大鼠脑组织, 血肿形成则表明模型建立成功(图1)。采用Garcia法对各组大鼠在给药后24 h, 72 h, 5 d, 7 d时进行神经功能评分, 结果显示: 假手术组大鼠极少神经功能缺损情况, 评分较高, 各时间点间差异无统计学意义($P > 0.05$); ICH模型组大鼠的神经功能缺损明显, 评分低于假手术组, 在72 h时最显著, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与ICH模型组相比, 染料木素给药后, 大鼠神经功能缺损情况明显好转, 并随药物浓度加大而评分上升(表1)。

2.2 BWC 的比较

与假手术组相比, ICH模型组大鼠BWC显著

升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与ICH模型组相比, 采用染料木素给药后, 大鼠BWC随药物剂量增大而明显下降(表2)。

2.3 脑组织中 SOD 与 CAT 含量水平

与假手术组相比, ICH模型组大鼠脑组织中SOD与CAT的含量均显著下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组相比, 采用染料木素给药后, 大鼠脑组织中SOD与CAT的含量随给药剂量增加而上升(表3)。

2.4 脑组织细胞凋亡情况

与假手术组相比, ICH模型组脑组织细胞凋亡数显著增加; 与模型组相比, 采用染料木素给药后, 随药物剂量增大, 大鼠脑组织细胞凋亡数明显减少(图2)。

2.5 脑组织中 p-PI3K 与 p-Akt 蛋白表达的变化

与假手术组相比, ICH模型组脑组织中p-PI3K与p-Akt的蛋白表达显著下调; 与模型组相比, 采用染料木素给药后, 大鼠脑组织中p-PI3K与p-Akt的蛋白表达明显上调(图3)。

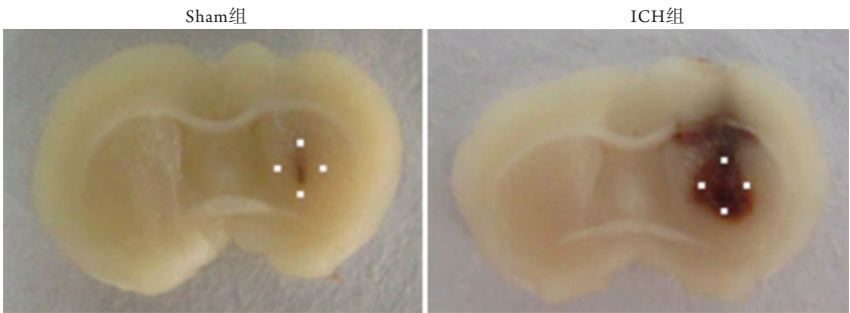


图1 ICH造模术后24 h血肿形成情况

Figure 1 Hematoma formed of 24 h after ICH induction

表1 染料木素对ICH大鼠神经功能缺损评分的影响($n=10$)

Table 1 Effect of genistein treatment on neurological deficit scores of ICH rats ($n=10$)

组别	神经功能缺损评分			
	24 h	72 h	5 d	7 d
假手术组	16.50 ± 0.88	16.90 ± 0.78	17.20 ± 0.81	17.60 ± 0.74
ICH模型组	8.50 ± 0.72*	7.20 ± 0.64*	9.80 ± 0.82*	12.20 ± 0.78*
染料木素低剂量组	9.20 ± 0.88**	8.40 ± 0.76**	11.80 ± 0.92**	13.90 ± 0.84**
染料木素中剂量组	9.60 ± 0.67**	9.10 ± 0.78**	12.70 ± 0.79**	14.40 ± 0.86**
染料木素高剂量组	9.70 ± 0.92**	9.60 ± 0.89**	14.20 ± 0.96**	15.80 ± 0.93**

同一时间点, 与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与ICH模型组相比, # $P < 0.05$ 。

At the same time point, compared with the sham group, * $P < 0.05$; compared with the ICH group, # $P < 0.05$.

表2 染料木素对BWC的影响(*n*=6)

Table 2 Effect of genistein on BWC (*n*=6)

组别	BWC/%
假手术组	75.67 ± 1.18
ICH模型组	86.27 ± 0.98*
染料木素低剂量组	82.68 ± 0.87* [#]
染料木素中剂量组	80.67 ± 0.99* [#]
染料木素高剂量组	78.86 ± 0.95* [#]

与假手术组相比, **P*<0.05; 与ICH模型组相比, [#]*P*<0.05。

Compared with the sham group, **P*<0.05; compared with the ICH group, [#]*P*<0.05.

表3 染料木素对脑组织中SOD与CAT含量水平的影响(*n*=6)

Table 3 Effect of genistein treatment on the levels of SOD and CAT in brain tissue (*n*=6)

组别	SOD/ (U·mg prot ⁻¹)	CAT/ (nmol·mg prot ⁻¹)
假手术组	75.67 ± 1.18	28.91 ± 2.11
ICH 模型组	86.27 ± 0.98*	9.17 ± 0.83*
染料木素低剂量组	82.68 ± 0.87* [#]	15.83 ± 1.34* [#]
染料木素中剂量组	80.67 ± 0.99* [#]	19.82 ± 1.64* [#]
染料木素高剂量组	78.86 ± 0.95* [#]	23.58 ± 2.27* [#]

与假手术组相比, **P*<0.05; 与ICH模型组相比, [#]*P*<0.05。

Compared with the sham group, **P*<0.05; compared with the ICH group, [#]*P*<0.05.

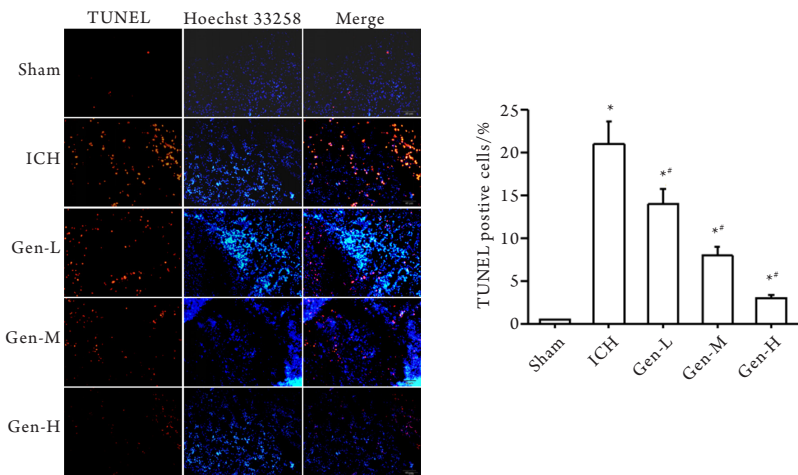


图2 染料木素对ICH后脑组织细胞凋亡的影响(×200)

Figure 2 Effect of genistein treatment on ICH-induced cell apoptosis in brain tissue (×200)

与假手术组相比, **P*<0.05; 与ICH模型组相比, [#]*P*<0.05。

Compared with the sham group, **P*<0.05; compared with the ICH group, [#]*P*<0.05.

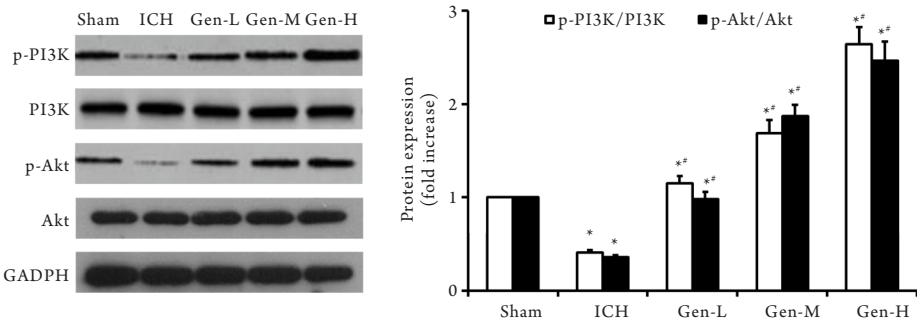


图3 染料木素对脑组织中p-PI3K与p-Akt蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of genistein treatment on ICH-induced protein expressions of p-PI3K and p-Akt in brain tissue

与假手术组相比, **P*<0.05; 与ICH模型组相比, [#]*P*<0.05。

Compared with the sham group, **P*<0.05; compared with the ICH group, [#]*P*<0.05.

3 讨论

脑水肿主要指脑组织液体增多导致脑容积增加, 根据血脑屏障是否受损, 将脑水肿分为血管源性水肿与细胞毒性水肿。ICH后血肿组织周围脑水肿有血管源性, 也有细胞毒性。脑水肿是颅内压增高的主要原因, 同样也是ICH继发病理变化的主要因素之一^[9]。因此, 脑组织的含水量在某种程度上可以反映ICH后脑损伤的严重程度与药物的治疗作用。本实验结果显示: 染料木素随剂量增大而不同程度地降低ICH后的脑含水量, 提示染料木素可能具有抑制ICH后脑含水量的增加, 从而改善脑组织的损伤程度的作用。

正常情况下, 机体通过非酶系统和酶系统不断生成自由基, 另一方面自由基通过脂质过氧化反应诱导组织损伤, 同时机体具有抗氧化防御系统, 如SOD与非酶体系的维生素C, E等, 可将自由基清除, 维持动态平衡^[10]。SOD能够有效抑制脂质过氧化, 是体内的抗氧化酶; 同样CAT也可催化细胞内过氧化氢的分解, 具有保护细胞的作用, 是机体抗氧化能力的指标之一。本实验结果显示: 染料木素能够增加ICH后脑组织中SOD与CAT的含量, 提示染料木素可能通过增加脑组织抗氧化酶的含量, 清除自由基, 从而减少脑细胞膜结构的损伤, 这可能与染料木素的多羟基酚的结构有关^[11]。

PI3K/Akt信号转导通路是细胞生存的主要信号通路之一, 在细胞增殖、分化与凋亡中发挥重要作用。当机体发生ICH后, 释放出ROS等物质, 进一步激活PI3K活性, 激活的PI3K与下游Akt的PH结构域结合, 使Akt产生磷酸化, 进一步激活下游凋亡靶点, 如Bad, NF- κ B, 糖原合成激酶3等蛋白磷酸化发挥抗凋亡作用^[12]。本研究发现: 染料木素具有抑制ICH后脑组织细胞凋亡的作用, 同时下调p-PI3K与p-Akt蛋白表达, 推测染料木素可能通过下调PI3K/Akt信号来发挥抑制ICH后脑组织细胞凋亡的作用。

综上所述, 染料木素对ICH后的神经功能损伤具有一定的保护作用, 可能与通过下调PI3K/Akt信号转导通路和增加脑组织抗氧化酶的含量有关。

参考文献

1. Detante O, Moisan A, Hommel M, et al. Controlled clinical trials of cell therapy in stroke: meta-analysis at six months after treatment[J]. *Int J Stroke*, 2017, 12(7): 748-751.
2. Wang HQ, Bao CL, Jiao ZH, et al. Efficacy and safety of penetration

- acupuncture on head for acute intracerebral hemorrhage: a randomized controlled study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(48): e5562.
3. 牛迎凤, 张忠廉, 李海涛, 等. 响应面分析法优化大叶千斤拔中染料木素提取工艺[J]. *中药材*, 2013, 36(10): 1689-1693.
- NIU Yingfeng, ZHANG Zhonglian, LI Haitao, et al. Optimal extraction technology for genistein in *flemingia macrophylla* with response surface method[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2013, 36(10): 1689-1693.
4. Wenner MM, Taylor HS, Stachenfeld NS. Peripheral microvascular vasodilatory response to estradiol and genistein in women with insulin resistance[J]. *Microcirculation*, 2015, 22(5): 391-399.
5. Mukund V, Mukund D, Sharma V, et al. Genistein: its role in metabolic diseases and cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 119: 13-22.
6. Mansour DF, Saleh DO, Mostafa RE. Genistein ameliorates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by modulation of oxidative stress and inflammatory mediators[J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2017, 5(7): 836-843.
7. Wei H, Ca Q, Rahn R, et al. DNA structural integrity and base composition affect ultraviolet light-induced oxidative DNA damage[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(18): 6485-6490.
8. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Stroke*, 1990, 21(5): 801-807.
9. Zhang J, Li Q, Zhang Z, et al. Pseudo-subarachnoid hemorrhage in a patient with hypoxic encephalopathy[J]. *Neurochirurgie*, 2015, 61(1): 35-37.
10. Bai K, Xu W, Zhang J, et al. Assessment of free radical scavenging activity of dimethylglycine sodium salt and its role in providing protection against lipopolysaccharide-induced oxidative stress in mice[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155393.
11. 刘娜, 周泉城. 染料木素衍生物的合成及其生物活性研究[J]. *食品与药品*, 2016, 18(4): 235-238.
- LIU Na, ZHOU Quancheng. Synthesis and biological activity of genistein derivative[J]. *Food and Drug*, 2016, 18(4): 235-238.
12. 吴晓光, 李蒙蒙, 仇志富, 等. 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[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2016, 43(2): 119-123.
- WU Xiaoguang, LI Mengmeng, QIU Zhifu, et al. Neuroprotective effect of Buyang Huanwu decoction on the PI3K/AKT signaling pathway in rats with cerebral hemorrhage and possible mechanisms[J]. *Journal of International Neurology and Neurosurgery*, 2016, 43(2): 119-123.

本文引用: 吴环立, 马现启, 赵海洋. 染料木素对实验性脑出血大鼠PI3K/Akt通路的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(5): 917-921. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.002

Cite this article as: WU Huanli, MA Xianqi, ZHAO Haiyang. Effects of genistein on PI3K/Akt pathway in cerebral hemorrhage rats[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(5): 917-921. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.002