

· 实验研究 ·

枸杞多糖对大鼠放射性脑损伤海马神经元凋亡的保护作用及其对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路影响



王亿龙, 刘青峰

【摘要】目的 了解枸杞多糖对放射性脑损伤海马神经元的保护作用并观察其与氧化应激和 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的关系。**方法** 体内实验: SD 大鼠, 分为对照 A (ConA) 组、模型 A (ModA) 组和枸杞多糖 A (LBPA) 组, 每组 16 只。LBPA 组在照射前 2 周开始采用枸杞多糖 50 mg/kg 灌胃, ConA 组和 ModA 组予以等剂量生理盐水灌胃, ConA 组不予照射。水迷宫检测认知功能, 海马组织行尼氏染色, TUNEL 染色和检测氧化应激指标 MDA、SOD、GSH-Px。体外实验 (B): 原代胎鼠海马神经元培养, 分组为对照 B (ConB) 组, 模型 B (ModB) 组, 枸杞多糖 B (LBPB) 组。对 ModB 组和 LBPB 组进行放射性处理, ConB 组不处理。MTT 测细胞活性, annexin V-FITC/PI 流式细胞仪检测细胞凋亡, Western blot 检测 PI3K、Akt、mTOR、Bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达水平。**结果** 与 ConA 组比较, LBPA 组大鼠逃避潜伏期和空间探索时间明显缩短, 海马神经元细胞形态改善显著, 细胞凋亡率显著减少; LBPA 组较 ModA 组 MDA 含量明显降低, SOD 和 GSH-Px 活性明显升高; 与 ModB 组比较, LBPB 组细胞存活率增高, 凋亡率降低, PI3K、pAkt、mTOR 和 Bcl-2 表达明显增高, Bax 和 caspase-3 的表达下降。**结论** 枸杞多糖能够抑制放射性脑损伤海马神经元的凋亡, 其作用可能与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路和氧化应激有关, 具备神经保护作用。

【关键词】 枸杞多糖; 放射性脑损伤; 海马神经元; PI3K/Akt/mTOR 信号通路; 氧化应激

中图分类号: R 818.05 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2019)08-1043-03 DOI: 10.11847/zgggws1124336

Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide protecting against apoptosis of hippocampal neurons and on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in rats with radiation-induced brain injury

WANG Yi-long, LIU Qing-feng (Department of Radiation Oncology, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning Province 110001, China)

【Abstract】 Objective To observe protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on hippocampal neuron injury induced by radiation *in vivo* and *in vitro* and to explore the associations of oxidative stress and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway with the effect in rats and rat embryonic cells. **Methods** For *in vivo* experiment, Sprague-Dawley (SD) rats were divided into three groups (16 in each group): model group (ModA) with a single electron beam irradiation on brain at the dosage of 20 Gy and saline gavage, LBP group (LBPA) with intragastric administration of 50 mg/kg LBP two weeks before the irradiation, and control group (ConA) without irradiation but with saline gavage. Thirty days after the treatments, water maze test was used to test cognitive function of the rats; Nissl-stained hippocampal tissues were observed; TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) method was been employed to detect apoptosis of hippocampal neurons; malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in hippocampal tissue homogenate were detected. For *in vitro* experiments, hippocampal neurons of primary fetal SD rats were cultured and also divided into three groups: model group (ModB) with single 30 Gy X-ray irradiation LBP group (LBPB) with the irradiation and LBP administration in culture fluid one hour before the irradiation at the concentration of 50 μ g/ml, and control group (ConB) without the irradiation and LBP treatment. Cell activity was determined with 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay; cell apoptosis was detected with annexin V-fluorescein/propidium iodide (FITC/PI) flow cytometry; and protein expressions of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR), B-cell lymphoma/leukemia 2 (bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and caspase-3 were detected with Western blot. **Results** Compared with those of the ModA rats, the escape latency period and space exploration time of LBPA rats were significantly shortened; the morphology of damaged hippocampal neurons was significantly improved; and the apoptosis rate was significantly reduced. The LBPA rats had significantly lower MDA content and significantly higher SOD and GSH-Px activity than the ModA rats ($P < 0.01$ for all). In comparison with the ModB cells, LBPB cells showed increased survival rate, decreased apoptosis rate, significantly increased expression of PI3K, pAkt, mTOR and bcl-2, and decreased expression of Bax and caspase-3 (all $P < 0.01$). **Conclusion** LBP can inhibit radiation-induced apoptosis of hippocampal neurons and the neuroprotective effect may be related to regulations of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and oxidative stress.

【Key words】 *Lycium barbarum* polysaccharide; radioactive brain injury; hippocampal neuron; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; oxidative stress

放射性脑损伤为头颅经放射治疗导致神经系统损害, 多表现为进行性认知、记忆、理解、信息处理能力受损, 影响患者生存质量。海马为大脑中最重要的脑区之一, 与认知记忆密切相关, 研究发现, 放射性脑损伤认知受损程度与海马凋亡高度相关^[1-2]。

枸杞多糖 (*Lycium barbarum* polysaccharides, LBP) 是枸杞的主要有效成分, 具有神经保护作用, 能够改善神经病变和神经缺损^[3-5]; 但 LBP 对放射性脑损伤的作用尚未见报道。为观察 LBP 对大脑放射性脑损伤海马神经元凋亡的保护作用, 本研究拟从动

作者单位: 中国医科大学附属第一医院肿瘤放射治疗科, 沈阳 110001

作者简介: 王亿龙 (1987 -), 男, 辽宁人, 主管技师, 本科, 主要从事肿瘤放射治疗研究。

数字出版日期: 2019-08-02 17:29

数字出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20190802.1729.002.html>

物实验和细胞实验观察 LBP 对大鼠放射性脑损伤和放射性损伤原代培养海马神经元的保护作用,并观察其与氧化应激和 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料 雄性 SD 大鼠体重 180~200 克 8 只每组 16 只,孕 17 天 SD 大鼠,SPF 级,SCXK(京)2015-0036,北京维通利华公司采购。动物实验得到中国医科大学附属第一医院动物伦理委员会批准。TUNEL 凋亡试剂盒(美国罗氏公司),尼氏染色试剂盒(北京雷根生物科技有限公司),MTT(美国 Sigma 公司),磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)、磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶(phosphorylated serine/threonine kinase, pAkt)、雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因蛋白(B-cell lymphoma/leukemia 2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白基因蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)均购自英国 Abcam 公司,蛋白质定量试剂盒(Bradford 法, P1510)、caspase-3 活性测定试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司,谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所, LBP 购于上海康舟真菌多糖公司。

1.2 实验仪器 -80℃ 冰箱(MDF-U73V, 日本 SANYO 公司), OLYMPUS X71 光学显微镜(日本索尼公司), Western blot 系统(美国 BIO-RAD 公司), Morris 水迷宫(XR-XM101, 上海欣软信息科技有限公司), 紫外分光光度计(UV-7504, 上海欣茂仪器有限公司), 细胞培养箱(美国 Thermo Forma 公司)。

1.3 方法

1.3.1 体内实验(A)分组及模型建立 大鼠称重, 4% 水合氯醛腹腔注射(1ml/100g)麻醉, 俯卧位固定于自制木板架上, 直线加速器 6MeV 电子线对模型 A(ModA)组、枸杞多糖 A(LBPA)组大鼠行全脑单次 20 Gy 垂直照射, 吸收剂量率为 200 cGy/min, 源皮距 100 cm, 在 10 cm × 10 cm 的限光筒铅模中, 照射野大小为 2.5 cm × 2.5 cm, 照射野前界为双眼内眦连线, 后界为双耳后连线。对照 A(ConA)组大鼠麻醉后, 放入相同环境, 但不予照射。LBPA 组在照射前 2 周采用枸杞多糖 50 mg/kg 灌胃, ConA 组和 ModA 组予以等剂量生理盐水灌胃, 至照射结束后 30 天行后续实验。

1.3.2 水迷宫实验 使用 Morris 水迷宫评价大鼠认知功能^[5]。定位航行实验: 将大鼠随机从 4 个象限入水, 记录每只大鼠入水后 2 min 内到达隐蔽平台的时间, 即为逃避潜伏期。若 2 min 内未到达平台, 记录为潜伏期 120 s。空间探索实验: 实验第 6 天, 移走平台, 大鼠随机从任意入水点入水, 观察大鼠穿过平台区域的时间, 即为空间探索时间。

1.3.3 体内实验指标 大鼠给药结束后灌注固定: 取脑内海马组织, 低温冰冻切片, 行尼氏染色, 显微

镜下观察, 行 TUNEL 染色, 计算细胞凋亡率; 分离海马组织, 组织匀浆; 测定氧化应激指标 MDA 含量、GSH-Px 和 SOD 活性。

1.3.4 体外实验(B)原代胎鼠海马神经元的培养 原代海马神经元取自孕 17d SD 大鼠胚胎, 镜下解剖大鼠海马, 进行海马神经元的培养, 细胞培养第 7 天, 枸杞多糖 B(LBPB)组中提前 1h 加入药物枸杞多糖, 终浓度为 50 μg/ml, 对照 B(ConB)组和模型 B(ModB)组加入等体积细胞培养液。ModB 组和 LBPB 组采用直线加速器, 剂量率 400cGy/min 的 6MV 的 X 线照射, 单次照射剂量为 30Gy。照射后继续培养行下一步研究。

1.3.5 体外实验指标 细胞活性测定使用 MTT 方法, 计算细胞存活率; 流式细胞仪检测海马神经元细胞凋亡; Western blot 测定 BAX、BCL-2、AMPK、pAMPK、mTOR 蛋白的表达。

1.4 统计分析 采用 SPSS18.0 软件进行分析, 采用方差分析进行多组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体内实验(A)枸杞多糖对放射性脑病大鼠海马 CA3 区神经元形态的影响 ConA 组大鼠海马 CA3 神经元细胞层次丰富, 排列整齐, 包膜完整, 形态正常, 未见细胞坏死。ModA 组大鼠海马神经元层次变少, 细胞萎缩、排列稀疏, 胞核变小甚至固缩, 坏死细胞多见。LBPA 组海马神经元细胞层次丰富, 细胞形态规则, 坏死细胞较少, 较 ModA 组大鼠海马神经元形态改善显著。

2.2 体内实验(A)枸杞多糖对放射性脑病大鼠海马神经元细胞凋亡的影响 ConA 组凋亡细胞数量少见, 凋亡率(8.7 ± 1.86)%; ModA 组凋亡细胞显著增加(42.8 ± 4.95)%, 与 ConA 组相比具有统计学差异($P < 0.01$); LBPA 组凋亡率(19.4 ± 1.93)%, 与 ModA 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 体内实验(A)枸杞多糖放射性脑病大鼠海马 MDA 含量及 SOD、GSH-Px 活性的影响(表 1) 与 ConA 组比较, ModA 组 MDA 含量明显升高($P < 0.05$)、SOD($P < 0.05$)和 GSH-Px($P < 0.05$)活性明显降低; 与 ModA 组比较, LBPA 组 MDA 含量明显降低($P < 0.05$)、SOD($P < 0.05$)和 GSH-Px($P < 0.05$)活性明显升高。

表 1 不同组别 MDA 含量及 SOD、GSH-Px 活性($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA (nmol/mg pro)	SOD (U/mg pro)	GSH-Px (U/mg pro)
ConA	1.83 ± 0.12	264.62 ± 17.73	200.23 ± 11.80
ModA	2.98 ± 0.28	118.59 ± 13.09	123.43 ± 12.07
LBPA	2.02 ± 0.15	207.21 ± 17.73	180.45 ± 17.52

2.4 体外实验(B)各组原代胎鼠海马神经元细胞的存活率及凋亡率 ConB 组海马神经元细胞生长良好; ModB 组海马神经元出现大量凋亡及坏死细胞, 细胞出现萎缩, 生长稀疏, 活力下降; LBPB 组

海马神经元出现部分坏死及凋亡细胞,但较 ModB 组明显改善。ConB 组、ModB 组、LBPB 组胎鼠海马神经元细胞存活率分别为 100%、(38.8 ± 14.4)%、(77.2 ± 13.6)%; ModB 组较 ConB 组存活率明显下降 ($P < 0.01$), LBPB 组较 ModB 组存活率明显上升 ($P < 0.01$)。ConB 组、ModB 组、LBPB 组凋亡率分别为 (6.8 ± 4.08)%、(44.5 ± 3.87)%、(26.6 ± 7.27)%; ModB 组凋亡率较 ConB 组明显增加 ($P < 0.01$), LBPB 组较 ModB 组明显降低 ($P < 0.01$)。

2.5 体外实验 (B) 各组原代胎鼠海马神经元细胞 PI3K/Akt/mTOR/BAX/Bcl-2 蛋白表达 (图 1) ModB 组 Bax、capsase-3 表达较 ConB 组增加, PI3K、Akt、mTOR、Bcl-2 表达较 ConB 组降低。LBPB 组 Bax、capsase-3 表达较 ModB 组降低, PI3K、Akt、mTOR、Bcl-2 表达较 ModB 组增加。

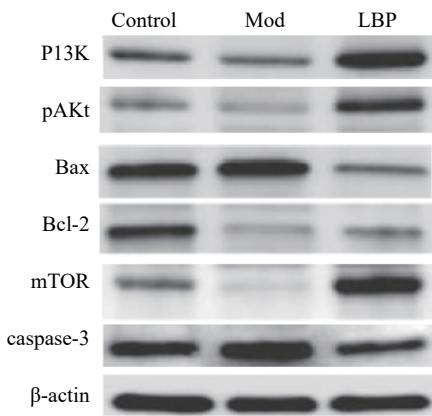


图 1 枸杞多糖对放射性损伤海马神经元凋亡蛋白的影响

3 讨论

放射性脑损伤是头颈部肿瘤患者放疗后的并发症之一,常导致患者认知功能障碍,影响生活质量。如何防治放射性脑损伤亦成为重要议题。枸杞多糖是枸杞主要的有效成分。近年来,多项研究显示,枸杞多糖对帕金森病^[6]、癫痫^[7]、脑缺血^[8-9]、视网膜损伤^[10-11]等均有保护作用,枸杞多糖还具有抗神经系统肿瘤的作用^[12]。本研究显示,枸杞多糖在体内实验能够减轻放射性脑损伤大鼠的认知功能障碍,抑制海马神经元的凋亡;在体外实验能够减少放射性脑损伤模型海马神经元细胞的凋亡率,提高存活率,提示枸杞多糖对放射性脑损伤大鼠具备神经保护作用。神经细胞经放射性照射后胞体内出现大量氧自由基及炎性介质,同时线粒体功能受到放射性损伤,氧自由基清除减少,导致自由基大量蓄积,诱发炎症反应,促进细胞凋亡,此为放射性脑损伤的重要原因之一^[1];MDA、SOD 和 GSH-Px 是氧化应激的标志性物质。枸杞多糖具有抗氧化应激作用^[13-14];本研究显示,与模型组相比,LBP 组 MDA 含量显著降低,SOD 和 GSH-Px 活性显著升高,提示枸杞多糖能够改善放射性脑损伤的氧化应激反应。PI3K/Akt/mTOR 信号通路在放射性脑损伤过程神经细胞存活、凋亡过程中发挥重要的生物学功能^[15]。放射性损伤造成线粒体膜电位

的下降甚至破坏线粒体,进而抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,诱导细胞凋亡^[1]。Caspases 是细胞凋亡程序执行者,其表达的升高可促进细胞凋亡。Bax 是促凋亡基因,Bcl-2 是抑制凋亡基因,两者广泛分布于线粒体内膜、核膜、细胞内质网等。多项研究显示,枸杞多糖能够通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路改善脑缺血再灌注的神经缺损症状^[16],减轻神经细胞凋亡^[17]。本研究显示,枸杞多糖能够抑制放射性脑损伤大鼠海马的氧化应激,同时能够增强氧糖剥夺/复氧海马神经元细胞的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的表达,升高 Bcl-2 表达,降低 Bax 和 caspase-3 的表达,上述作用与其神经保护功能相关。

参考文献

- [1] Balentova S, Adamkov M. Molecular, cellular and functional effects of radiation-induced brain injury: a review[J]. *Inter J Mol Sci*, 2015, 16(11): 27796 - 27815.
- [2] Greene-Schloesser D, Robbins ME, Peiffer AM, et al. Radiation-induced brain injury: a review[J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 73.
- [3] Xie Y, Wang X. *Lycium barbarum* polysaccharides attenuates the apoptosis of hippocampal neurons induced by sevoflurane[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3): 1834 - 1840.
- [4] Liu S, Chen L, Li X, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide protects diabetic peripheral neuropathy by enhancing autophagy via mTOR/p70S6K inhibition in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *J Chem Neuroanat*, 2018, 89(10): 37 - 42.
- [5] Zhao P, Zhou R, Zhu X, et al. Neuroprotective effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on focal cerebral ischemic injury in mice[J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(10): 2798 - 2813.
- [6] Li H, Ding F, Xiao L, et al. Food-derived antioxidant polysaccharides and their pharmacological potential in neurodegenerative diseases[J]. *Nutrients*, 2017, 9(7): 160 - 169.
- [7] Xing X, Liu F, Xiao J, et al. Neuro-protective mechanisms of *Lycium barbarum*[J]. *Neuromol Med*, 2016, 18(3): 253 - 263.
- [8] 陈伟,陈嘉勤,毛海峰,等. 有氧运动和黑果枸杞多糖对慢性脑缺血小鼠的干预及 Notch 通路相关因子的组织差异表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(8): 783 - 790.
- [9] 葛建彬,卢红建,宋新建,等. 枸杞多糖对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其抑制 NF-κB、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 表达的机制[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(2): 326 - 331.
- [10] Liu F, Zhang J, Xiang Z, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides protect retina in rd1 mice during photoreceptor degeneration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(1): 597 - 611.
- [11] Yang D, So K, Lo AC Y. *Lycium barbarum* polysaccharide extracts preserve retinal function and attenuate inner retinal neuronal damage in a mouse model of transient retinal ischaemia[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2017, 45(7): 717 - 729.
- [12] 单铁强,单铁英,董静,等. 枸杞多糖对脑胶质瘤病人免疫调节作用及预后的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2017, 15(20): 2632 - 2634.
- [13] Zhao P, Ma N, Chang R, et al. Mechanism of *Lycium barbarum* polysaccharides on primary cultured rat hippocampal neurons[J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 369(3): 455 - 465.
- [14] Xue M, Quan H, Wang R, et al. Mitigation of chronic unpredictable stress-induced cognitive deficits in mice by *Lycium barbarum L (Solanaceae)* polysaccharides[J]. *Trop J Pharm Res*, 2017, 16(8): 1893 - 1901.
- [15] Liu WJ, Jiang HF, Rehman FU, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides decrease hyperglycemia-aggravated ischemic brain injury through maintaining mitochondrial fission and fusion balance[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(7): 901 - 910.
- [16] Yu Y, Wu X, Pu J, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide protects against oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis and autophagic cell death via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in primary cultured hippocampal neurons[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 1187 - 1194.
- [17] Zhao W, Pan X, Li T, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides protect against trimethyltin chloride-induced apoptosis via sonic hedgehog and PI3K/Akt signaling pathways in mouse Neuro-2a cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 8(8): 72 - 79.