中药调控 PI3K/Akt 信号通路治疗脑缺血再灌注损伤的研究进展

高京¹, 刘飞祥², 张运克^{1,2*}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450000;

2. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450046)

[摘要] 脑缺血再灌注损伤(CIRI)是指脑缺血后梗死区脑组织血流和氧供恢复,引起缺血脑组织继发性损伤的一种复杂的瀑布级联反应过程。目前尽快溶栓,恢复脑组织供血仍是治疗脑卒中的唯一策略,但相当一部分患者再灌注后其症状较前会更加严重,使患者面临神经功能损伤甚至死亡等不良结局,严重影响患者的生活质量和生命安全,因此深入探索脑缺血再灌注损伤的作用机制与治疗策略具有重要的临床意义。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路影响着细胞的增殖、生长和分化,作为经典的抗凋亡/促增殖的信号传导通路之一,是预防 CIRI 的关键级联信号通路,在线粒体障碍、细胞凋亡、细胞自噬、氧化应激和炎症反应等多种机制中处于核心位点,与 CIRI 的发生发展密切相关。传统中医药对于临床治疗脑卒中及其并发症已有上千年历史,近年来中医药防治 CIRI 的临床成效也得到大量研究结果的肯定,进一步阐明了中药单体、活性成分及其复方可凭借多靶点、多组分和多途径的生物学优势直接或间接调控 PI3K/Akt 信号通路,并对 CIRI 起到整体性保护作用。笔者通过分析近年来国内外中医药相关研究进展,对调控 PI3K/Akt 信号通路在 CIRI 中的防治作用及机制进行综述,期为中医药临床防治 CIRI 的作用机制研究提供进一步的理论依据。

[关键词] 中药; 中药复方; 脑缺血再灌注损伤; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路; 研究进展

[中图分类号] R2-0;R22;R242;R2-031;R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)06-0253-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231123 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20230412.0857.001>

[网络出版日期] 2023-04-12 12:06:12

Treatment of Cerebral Ischemia-reperfusion Injury by Traditional Chinese Medicine Based on PI3K/Akt Signaling Pathway: A Review

GAO Jing¹, LIU Feixiang², ZHANG Yunke^{1,2*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] Cerebral ischemia/reperfusion injury (CIRI) is a complex cascade reaction process in which the blood flow and oxygen supply of brain tissue in the infarcted area recover after cerebral ischemia, resulting in secondary injury of ischemic brain tissue. At present, thrombolysis as soon as possible and restoration of cerebral blood supply are still the only strategies for the treatment of stroke, but a considerable number of patients' symptoms will be more serious after reperfusion, making patients face adverse outcomes such as neurological function injury and even death and seriously affecting the quality of life and safety of patients. Therefore, an in-depth exploration of the mechanism and treatment strategy of CIRI has important clinical significance. The phosphatidylinositol 3- kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway is one of the classic anti-

[收稿日期] 2023-02-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81974564,82104730);中原英才计划——科技创新领军人才项目(224200510027)

[第一作者] 高京,硕士,从事中医药防治脑血管疾病研究,E-mail:290255884@qq.com

[通信作者] *张运克,博士,主任医师,教授,从事中医药防治脑血管疾病研究,E-mail:henanzky@126.com

apoptosis/reproductive-promoting signal transduction pathways, which is responsible for cell proliferation, growth, and differentiation. It is the key cascade signaling pathway of CIRI, located at the core site in many mechanisms such as mitochondrial disorder, apoptosis, autophagy, oxidative stress, and inflammation. It is closely related to the occurrence and development of CIRI. Traditional Chinese medicine has been used in the clinical treatment of stroke and its complications for thousands of years, and the clinical effect of traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of CIRI has been affirmed by a large number of research results in recent years. It is further clarified that the monomers, active components, and their compound prescriptions of traditional Chinese medicine can directly or indirectly regulate the PI3K/Akt signaling pathway by virtue of the biological advantages of multi-targets, multi-components, and multi-pathways and play an overall protective role in CIRI. By analyzing the related research progress of traditional Chinese medicine in China and abroad in recent years, the authors summarized the role and mechanism of regulating the PI3K/Akt signaling pathway in the prevention and treatment of CIRI, so as to provide further theoretical basis for the study of the mechanism of clinical prevention and treatment of CIRI.

[Keywords] traditional Chinese medicine; compound of traditional Chinese medicine; cerebral ischemia reperfusion injury; phosphatidylinositol 3- kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway; research progress

脑血管疾病是近年来世界各地中老年人死亡的主要原因。其中,缺血性脑损伤约占所有脑血管患者的70%~80%,其特点为高死亡率、高致残率和高复发率,严重威胁中老年人健康^[1]。早期再灌注仍是目前治疗缺血性脑卒中的唯一有效策略,但大脑缺血区域在经历缺血、再灌注后,脑组织细胞将引起一系列的复杂病变如炎症反应、细胞自噬、氧化应激和细胞凋亡等各种病损效应,加重神经元的损伤与大脑功能障碍,这种病理性反应被称为脑缺血再灌注损伤(CIRI)^[2]。磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路影响着细胞的增殖、生长、分化和葡萄糖转运及在脑缺血损伤时修复神经细胞,提升其存活率等^[3],是关键的抗凋亡/促增殖信号传导途径之一。大量文献证实,PI3K/Akt信号通路在调节CIRI的病理生理过程中发挥了重要作用,是防治CIRI的关键信号传导途径。随着近年来对中医药多途径、多层次和多靶点治疗作用的认识不断深入,中医药防治CIRI的作用机制也逐渐揭露,PI3K/Akt信号通路的上下游因子可受相关中药调控,并可通过不同的配伍来影响相应因子的活性,这不仅提高了中医药治疗CIRI的科学性、合理性,也进一步为中医药治疗CIRI提供临床应用保障。本文着重梳理了近年来中医药调控PI3K/Akt信号通路治疗CIRI的相关研究进展,以期中医药防治CIRI提供客观参考。

1 PI3K/Akt信号通路的构成及调控

PI3K属于胞内磷脂酰肌醇激酶,是细胞中的

关键信号传递因子,分为I、II、III 3种亚型。其中,I型研究最为广泛,又分为IA和IB 2种类型,IA由调节亚基p85和催化亚基p110构成^[4],为具有蛋白激酶和脂类激酶双重活性的特异性催化磷脂酰肌醇脂类蛋白激酶。在受到细胞内外多种因子刺激后,调节亚基p85对催化亚基p110的抑制解除,导致PI3K活化并产生磷脂酰肌醇-(3,4,5)-三磷酸(PIP3),即特异性催化磷脂酰肌醇环上第3位羟基被磷酸化^[5]。Akt是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,为PI3K下游重要的靶激酶,其在生长因子和细胞外刺激存在的情况下,对干预细胞的生长、生化、凋亡与增殖起关键调节作用,尤其是在脑缺血/再灌注损伤中^[4,6]。Thr308磷酸化位点由磷脂酰肌醇依赖激酶1(PDK1)磷酸化后激活,PDK1与蛋白激酶C相关激酶2(PRK2)结合后可激活Akt底物结合部位的磷酸化位点Ser473,同时,Ser473也可由磷脂酰肌醇依赖激酶2(PDK2)激活。PI3K被激活后产生的PIP3可将Akt定位到细胞膜,Akt活化后直接促进Ser473与Thr308位点磷酸化,生成磷酸化蛋白激酶B(p-Akt),从而导致信号转导通路的级联反应^[7-8]。

PI3K/Akt通路的直接下游靶点为Akt,通过活化Akt能够进一步激活B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)家族、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、炎症因子血清丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、核转录因子- κ B

(NF- κ B)、核因子E₂相关因子2(Nrf2)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)、自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin-1)等^[9-12]。上述因子可分别从抑制细胞凋亡、调节细胞自噬、抑制炎症反应、抗氧化应激等方面参与CIRI的发生与发展,与PI3K/Akt信号通路的调控密切相关。

2 PI3K/Akt信号通路在CIRI中的防治作用

CIRI直接影响脑缺血患者预后的情况,其病灶可由缺血程度的不同分为中心区和半影区,缺血程度较低的为半影区、较高的为中心区。中心区的神经元在缺血后会迅速坏死,且随着时间增加,会累及半影区。然而缺血区的血流即时恢复后,再灌注可能会进一步引起缺血区一系列复杂的病变。因此,缓解CIRI对大脑神经功能的损伤,是近年来的重点研究方向。

PI3K/Akt信号通路在心肌缺血再灌注、肾缺血再灌注、肝缺血再灌注及脑缺血再灌注的发生进展中均发挥着重要保护作用。而在CIRI中,PI3K/Akt信号通路可通过缓解脑神经功能损伤,进而改善脑组织病理损伤来保护脑功能,是PI3K/Akt信号通路针对CIRI治疗的独特优势。在一项关于CIRI的实验中,治疗组通过药物逆转PI3K/Akt的磷酸化,与对照组比较,发现脑梗死面积减少,脑水肿也有所改善^[13]。在药物处理后,PI3K/Akt信号通路被激活,同时减轻了小鼠神经功能障碍和缺血性脑水肿的体积,缓解缺血性脑损伤,而在抑制PI3K/Akt信号通路后此效应逆转^[14]。另有研究表明,使用药物调控PI3K/Akt的表达,亦可调控炎症通路Toll样受体4(TLR4)/Nrf2来抑制促炎细胞因子的分泌,从而达到缓解CIRI的目的^[15]。近年来研究发现,PI3K/Akt信号通路在CIRI的病理过程中发挥着不可或缺的作用,是防治CIRI的重要信号通路。

3 中药干预PI3K/Akt信号通路在CIRI中的机制研究

大量文献证实I/R神经细胞脑组织中磷酸化-PI3K(p-PI3K)和p-Akt蛋白表达明显降低,药物治疗可能使其表达水平升高,而中药在治疗诸多危急重症中也有着不错的疗效。本文着重梳理了近年来的相关研究进展,从中药干预PI3K/Akt信号通路减轻CIRI细胞凋亡、细胞自噬、炎症反应和氧化应激等方面进行阐述。

3.1 抑制细胞凋亡 脑内细胞凋亡升高是CIRI的常见后果,减轻细胞凋亡对改善神经功能至关重要。细胞凋亡主要由3种途径调控,分别为死亡

受体途径、内质网应激凋亡途径和线粒体途径^[16]。而PI3K/Akt信号通路作为经典的抗凋亡信号途径,主要通过级联反应直接调控、抗线粒体凋亡因子释放和影响凋亡转录因子活性3种方式抑制细胞凋亡,对防治CIRI有积极影响^[17]。

3.1.1 Bcl-2途径 在脑细胞受到缺血刺激后,会快速激活表层的PI3K,通过级联反应直接调控Bcl-2家族,包括抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-xL与促凋亡蛋白Bax、磷酸化Bcl-2基因相关启动子(Bad)等。Bad的作用取决于其2个磷酸化位点Ser112和Ser136,激活的Akt可使其磷酸化后与细胞中的14-3-3伴侣蛋白结合,促使抗凋亡蛋白Bcl-xL或Bcl-2从异源二聚体中游离,发挥抗凋亡保护作用^[17-18]。研究发现黄芩苷^[19]、长春西汀^[20]、四甲基吡嗪二苯基甲基哌嗪(CXC195)^[21]、白藜芦醇^[22]、异联素^[23]、黄连素^[24]、醒脑静^[25]、枸杞多糖^[26]和藁本内酯^[27]均可通过Akt/Bcl-2途径显著提高I/R损伤大鼠Bcl-2/Bax,减少神经元凋亡,改善神经元损失。此外,茯苓酸^[28]还可通过此途径提高大鼠脑缺血时p-PDK1、p-Akt、p-Bad的表达,发挥抗凋亡作用。

3.1.2 eNOS途径 eNOS是主要的NOS亚型,负责血管内产生的大部分NO,其损失导致血管疾病和各种病理生理后果。在调节eNOS活性中,Ser1177磷酸化被认为特定位点中最重要的因素之一,而上调PI3K/Akt可以刺激并提高eNOS的磷酸化。已有研究发现,醒脑静通过PI3K/Akt/eNOS通路在CIRI后调节细胞凋亡方面具有潜力,可显著增加脑组织磷酸化PI3K/Akt的水平,通过提高eNOS的磷酸化,增加NO的表达^[25]。

3.1.3 GSK-3 β 途径 GSK-3 β 在大脑中分布广泛,激活的Akt可通过磷酸化下游分子GSK-3 β 抑制其活性,激活环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)后发挥抗凋亡作用,同时CREB是Bcl-2的有效激活剂之一,其通过抑制Caspases激活进而抑制细胞凋亡^[16]。CXC195能够增加I/R损伤大鼠半暗带皮层中Akt、GSK-3 β 的磷酸化水平,提示CXC195通过PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路发挥抗凋亡作用^[21]。二萜银杏内酯葡胺注射液(DGMI)可使I/R大鼠CREB磷酸化蛋白表达明显上调,而当使用Akt抑制剂(LY)抑制PI3K/Akt通路的表达时,DGMI的CREB激活和神经保护作用显著减弱^[29]。羟基红花黄A^[30]可以通过增加Bcl-2/Bax来抑制I/R损伤大鼠半影皮层的凋亡,这种神经保护作用可能与PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路的激活有关。

3.1.4 NF- κ B 途径 激活后的 Akt 可连续诱导 NF- κ B 激酶抑制剂磷酸化,使活化的 NF- κ B 进入细胞核后激活抗凋亡基因如人第 10 号染色体缺失的磷酸酶(PTEN),PTEN 在中枢神经系统的神经元中高度表达,并负面调节 PI3K/Akt 信号通路及其下游靶点,目前 p-PTEN 在 CIRI 中的作用仍存在争议,但最新研究发现,p-PTEN 在 CIRI 后 24 h 减少,而茯苓酸^[29]、通心络^[31]可提高大鼠脑缺血时 p-PTEN 的表达,并将 p-PTEN 维持在较高水平,且 LY 预处理均对 p-PTEN 的表达无影响,这也许为此途径防治 CIRI 提示了新的方向。

3.1.5 抗线粒体凋亡因子释放 脑缺血发生时,线粒体膜去极化,Bax 与 Bcl-2 在线粒体表面形成多聚体,从而改变膜的通透性,释放线粒体内的细胞色素 C(Cyt C),Cyt C 继续结合凋亡蛋白酶激活因子 -1 (Apaf-1) 并活化 Caspase-9,从而激活 Caspase-3,导致级联反应后的细胞凋亡。而 Akt 可通过调节其下游 Bcl-2 家族来扭转线粒体的通透性,抑制细胞色素 C 的释放。此外,Akt 被激活后,可磷酸化 Caspase-9 致其失活,从而下调 Caspase-3 并避免了 Caspase 级联反应^[18]。黄芩苷^[19]、长春西汀^[20]、CXC195^[21]、枸杞多糖^[27]、藜芦内酯^[28]、茯苓酸^[29]、通心络^[31]和醒脑静^[26]均能够通过 PI3K/Akt 通路抑制 I/R 损伤大鼠 Caspase-3 的激活、降低 cleaved Caspase-3 水平,缓解线粒体去极化,保护脑组织。

在抗线粒体凋亡因子释放的过程中,PI3K/Akt 信号通路的上游靶点也发挥了重要作用。脑源性神经营养因子(BDNF)与内源性 BDNF 结合受体(TrkB)结合可以激活 PI3K/Akt 通路,黄连素可以逆转脑中动脉闭塞(MCAO)模型大鼠的 BDNF 和 TrkB 水平的下降,同时抑制 Akt 磷酸化与 Caspase-3/cleaved Caspase-3 下调,通过 BDNF-TrkB-PI3K/Akt 通路减少神经元凋亡发挥神经保护作用^[24]。白藜芦醇可下调 MCAO 模型大鼠 Caspase-3 并提升 p-Akt 和 p-mTOR 蛋白的表达,通过 PI3K/Akt/m-TOR 通路抑制细胞凋亡,而这一过程可能是通过激活酪氨酸蛋白激酶 2(JAK2)/信号传导及转录激活因子 3(STAT3)间接上调 PI3K/Akt 通路而完成的,因为当 p-mTOR 和 p-JAK2、p-STAT3 和 p-Akt 蛋白表达增加时,总 mTOR 和 JAK2、STAT3、Akt 的表达无明显变化,且 LY 对 JAK2 和 STAT3 磷酸化水平影响并不显著,这为白藜芦醇介导的分子机制和信号通路治疗脑缺血的研究提供了新的认识和靶点^[22];同时,异联素作为一种新的

白藜芦醇类似物,在对脑缺血再灌注的神经保护,也对 PI3K/Akt 通路的调节产生类似影响^[23]。

3.1.6 影响凋亡转录因子活性 凋亡基因 p53 参与 DNA 的损伤再修复过程,激活的 Akt 通过磷酸化 MDM2 癌基因(MDM2),可使 p53 蛋白降解失活,阻断其导致的凋亡反应。研究发现了丹红注射液对 MCAO 模型大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用,其通过下调 p53 基因的表达抑制细胞凋亡,而 LY 可减弱这种作用,提示丹红注射液的抗凋亡作用机制与 PI3K/Akt 信号通路有关^[32]。

3.2 调节细胞自噬 自噬是一种与细胞内稳态、防御和适应不同环境有关的细胞功能,包括 3 个不同的阶段:自噬体的起始、延伸、成熟为自溶酶体^[33]。生理上,基础水平的自噬维持了细胞内环境的稳定。相比之下,过度激活的自噬通过过度的自我消化和细胞基本成分的降解引发非凋亡程序性细胞死亡(自噬细胞死亡)^[34]。在脑和脊柱中,短暂缺血引起的激活自噬促进神经元损伤,而 PI3K/Akt 信号通路可调节多种自噬因子如 mTOR、Beclin-1、p62、LC3 等,对防止神经元的损伤起积极作用。

3.2.1 调节 LC3 与 p62 LC3 与 p62 为 PI3K/Akt 信号通路的下游因子,由磷酸化的 Akt 激活。LC3 II 作为自噬的标志性蛋白,在自噬发生时,由 LC3 转化为 LC3 I,并在细胞浆内脂化形成,同时,作为连接物的 p62 使 LC3 II 与泛素化底物结合并相互作用,在整合到自噬溶酶体后降解^[35]。已有研究证实,黄芩苷^[19]、人参皂苷 Rb₁^[36]、枸杞多糖^[26]、丹参酮 II_A^[37]、羟基红花黄 A^[38]、三角素^[33]、姜黄素^[39]、通窍活血汤^[40]、中风胶囊^[41]和黄芪红花合剂^[42]均能通过 PI3K/Akt 信号通路降低 I/R 模型大鼠 LC3 II / I。

3.2.2 调节 Beclin1 Beclin1 同 LC3 II 与 p62 一样,作为 PI3K/Akt 通路的下游因子,是调节细胞自噬的标志性蛋白,主要负责促进自噬体的形成与成熟。在 CIRI 发生后,Beclin-1 表达水平上调并与蛋白激酶 1(PINK1)和促凋亡蛋白(BNIP3L)/Nip 样蛋白(Nix)相互结合,从而诱导线粒体自噬。人参皂苷 Rb₁^[36]、枸杞多糖^[26]、羟基红花黄 A^[38]、三角素^[33]、通窍活血汤^[40]、中风胶囊^[41]和黄芪红花合剂^[42]均可通过调节 PI3K/Akt 信号通路干预大鼠 I/R 模型,降低 Beclin-1 的表达并抑制细胞过度自噬。

3.2.3 mTOR 途径 在 CIRI 发生后,mTOR 过度活化,反而控制神经细胞及其代谢途径负向调节自噬因子,加速自噬的发展,导致细胞坏死,而损伤后激活的 PI3K 可刺激 Akt 促使调节其下游 mTOR 通路,

对 CIRI 发生后的过度细胞自噬起保护作用。最新研究证实,黄芪红花合剂通过 PI3K/Akt/mTOR 通路减弱线粒体中 LC3 II 和 Beclin-1 并提高 p62 的表达调节自噬,同时,黄芪红花合剂还可预防缺血性脑卒中后肠道菌群失衡,其通过阻止肠道微生物结构的改变和诱导自噬来治疗 CIRI,为肠道菌群有望在中枢神经系统疾病的防治方面取得突破性进展^[42]。此外尚有文献报道^[43],黄连解毒汤可通过抑制 mTOR 复合物 1(mTORC1)的激活来诱导自噬,因 mTORC1 的主要成分 mTOR 表达水平被黄连解毒汤呈剂量依赖性显著抑制,同时黄连解毒汤对 CIRI 具有神经保护作用,其作用机制可能与通过调节丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号诱导保护性自噬有关,这种不依赖于 PI3K/Akt 信号通路的保护性自噬有利于 CIRI 的治疗,避免了不利的副作用。

3.3 抑制炎症反应 神经系统的炎症反应是缺血性脑血管病的另一重要病理特征,无论缺血还是再灌注,缺血区域都会引发炎症的瀑布式反应。炎症不仅是 CIRI 的重要因素,同时也可参与组织修复^[44]。CIRI 后,活性氧(ROS)通过 NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等氧化产物直接或间接激活炎症信号通路促进小胶质细胞、星形胶质细胞的激活并释放炎症因子。炎症反过来又有助于 ROS 的形成,这两种途径形成一个正反馈回路,从而加重脑组织水肿,随着致炎症因子不断透过血脑屏障,最终加重炎症反应^[45]。CIRI 发生时 PI3K/Akt 信号通路的活性降低,而使用药物激活 PI3K/Akt 信号通路能够抑制星形胶质细胞与 M1 极化小胶质细胞释放的促炎因子 NF- κ B、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)、TNF- α 等,增强 M2 极化小胶质细胞释放抗炎因子白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-10(IL-10)等,同时还可促进 M1 型小胶质细胞向 M2 型小胶质细胞转化^[16,46]。

穿心莲内酯可明显下调 CIRI 小鼠促炎细胞因子白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-18(IL-18)和 TNF- α 的水平,并上调 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白的表达,同时经穿心莲内酯预处理的小鼠大脑中编码 IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA 的表达明显降低,提示穿心莲内酯对大脑的保护作用^[47]。鼠尾草酚通过 PI3K/Akt 通路降低了 OGD 处理小鼠小胶质细胞中丙二醛(MDA)、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平,并增加了谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、IL-4 和 IL-10 的水平,提示了鼠尾草酚的抗炎、抗氧化应激作用^[14]。静脉注射川芎嗪后,CIRI 大鼠可呈剂量依赖

性抑制 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的产生,同时促进脑组织 PI3K、p-Akt 表达,但川芎嗪是否直接作用于血管内皮生长因子或者其他的信号通路仍有待研究^[48]。当归补血汤可调控 PI3K/Akt 信号通路,通过降低 CIRI 模型大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平和脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 表达水平发挥抗 CIRI 作用^[49]。左归丸可显著改善 CIRI 大鼠的神经功能,缩小梗死面积,同时下调其血清中 IL-1 β 、TNF- α 水平,在给予内质网应激(ERs)拮抗剂 ICI182780 阻断 ERs/PI3K/Akt 通路后,左归丸的上述保护作用被抑制,p-PI3K 与 p-Akt 的表达也明显降低^[50]。绞股蓝皂苷 X VII 可明显下调 CIRI 模型大鼠缺血半暗带中的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量,并显著降低 PI3K 和 Akt 的蛋白表达,提示绞股蓝皂苷通过调控 PI3K/Akt 通路抗炎症反应^[51]。

胶质纤维酸性蛋白(GFAP)主要存在于中枢神经系统的星形胶质细胞内,对神经元有保护作用,其增殖与缺血后的梗死面积密切相关^[21]。连接蛋白 43(Cx43)是治疗脑缺血的潜在靶点,对脑缺血后干预神经系统功能至关重要,其具体作用机制目前尚不明确,且很多研究只观察了 Cx43 的总体水平,并未涉及磷酸化 Cx43 的水平变化。现已有研究发现,长春西汀可调控 PI3K/Akt 通路阻断 OGD/R 模型大鼠损伤后星形胶质细胞 TNF- α 、GFAP 和 IL-1 β 的表达升高,并有效地增强了 Cx43 和 p-Cx43 的表达,发挥抗炎作用^[21]。p38 MAPK 和 JNK 是 MAPK 家族中的两个重要成员,他们都在炎症反应中发挥关键的调节作用,并在 CIRI 后被激活,没食子酰芍药苷可通过 PI3K/Akt 信号通路抑制 OGD 诱导的 PC12 细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 的合成与释放,进而缓解 CIRI,同时,没食子酰芍药苷能以剂量依赖的方式显著减少缺血/再灌注区的小胶质细胞数量,并明显减少 CIRI 后磷酸化(p)-p38 MAPK 和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)阳性细胞的数量,这提示了没食子酰芍药苷的抗炎作用也可能通过 p38 MAPK 和 JNK 途径实现^[52]。中风胶囊对大鼠大脑中动脉闭塞的影响是分别通过 PI3K/Akt 和 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制神经元凋亡和炎症反应实现的,但激活 PI3K/Akt 通路的同时可抑制促炎细胞因子的分泌,这为中风胶囊缓解 CIRI 的另一种机制提供了新的研究方向^[16]。

3.4 抗氧化应激 在 CIRI 期间 ROS 过量产生,机体抗氧化防御屏障遭到破坏,是直接导致脑神经元损伤的主要机制之一^[53]。乳酸脱氢酶(LDH)是一

种稳定的胞质酶。在正常情况下存在于各种细胞中,当细胞受到自由基、超氧阴离子、羟基自由基、细胞因子等损伤因素的损伤时,LDH会迅速通过细胞膜泄漏到细胞外液或血液中,LDH的释放是评估脑缺血损伤程度的重要指标之一。三七皂苷通过激活 Nrf2/HO-1 抗氧化通路,依赖 PI3K/Akt 信号通路,抑制 ROS 的产生,对 OGD/R 诱导的脑微血管内皮细胞损伤和血脑屏障破坏具有保护作用^[12]。但目前三七总皂对 OGD/R 损伤的脑微血管内皮细胞的保护作用,尤其是对其屏障功能的保护作用及其机制尚不清楚。丹酚酸、长春西汀均可通过 PI3K/Akt 信号通路调控 Cx43 抑制氧化应激反应,对 CIRI 起保护作用,此外,长春西汀还可调控 PI3K/Akt 通路干预 I/R 大鼠模型可降低 MDA 并升高 SOD 的表达,同时体外实验发现长春西汀可降低细胞内 ROS 的表达并提高细胞外 NO 水平,对 CIRI 引起的氧化应激具有保护作用^[20,54]。半枝莲总黄酮预处理 CIRI 大鼠后,p-PI3K、p-Akt 和 p-mTOR 蛋白表达均明显增加,同时升高脑组织匀浆中 SOD 水平,降低 MDA 水平^[55]。左归丸可通过 ERs/PI3K/Akt 信号通路显著改善 CIRI 大鼠的神经功能,缩小梗死面积,降低其血清中 MDA 的表达水平^[50]。川芎嗪可激活 PI3K/Akt 通路保护 I/R 模型大鼠,同时用 PI3K 抑制剂 wortmannin 干预可逆转川芎嗪治疗后 NO、p-Akt 和磷酸化 eNOS(p-eNOS)水平升高,说明川芎嗪可通过 PI3K/Akt 信号通路抑制氧化应激^[56]。同时,CXC195 对大鼠 CIRI 损伤的保护作用优于川芎嗪,其通过激活 PI3K/Akt 信号通路并诱导 eNOS 磷酸化、增加 NO 的生成实现,为 CXC195 在 CIRI 治疗中的神经保护作用提供了新的解释^[57]。

Nrf2 是维持细胞氧化还原动态平衡的关键转录因子,可调节内源性抗氧化防御,在抵抗细胞内 ROS 方面发挥积极作用。在生理条件下,Nrf2 以非活性形式与其抑制因子 Kelch-like ECH 相关蛋白 1 (Keap1) 结合在细胞质中。当氧化应激发生时,Nrf2 从 Keap1 解离,移位到细胞核,并与抗氧化反应元件(ARE)结合,促进解毒酶和抗氧化防御酶如血红素加氧酶-1(HO-1)的基因表达以减轻氧化应激造成的损害。萝卜水提取物可通过诱导 PI3K/Akt/mTOR 通路的磷酸化水平降低抑制 LDH 和 ROS 的释放,进而抑制 MCAO 模型大鼠氧化应激并保护局灶性脑缺血损伤^[58]。二萜银杏内酯葡胺注射液治疗后的 Nrf2、HO-1 蛋白在 I/R 大鼠体内显著上调,其通过激活 PI3K/Akt 介导 Nrf2 信号通路改善大鼠 I/R

损伤^[29]。没食子酰芍药苷能降低 CIRI 大鼠的 ROS 与 MDA 水平,上调 SOD 活性,同时增加其 p-Akt 和 Nrf2 的水平并促进了 Nrf2 的易位^[52]。24-脱氢胆固醇还原酶(Dhcr24)可显著抑制氧化应激和缺氧诱发的脑梗死,通心络预处理 CIRI 大鼠可上调 HO-1、DHCR24 和重组人铁蛋白重链 1(FTH1)mRNA 的表达,下调诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 的表达,同时提高 p-Akt/Akt,在 CIRI 中发挥抗氧化应激作用^[59]。Nrf2 是中药调控 PI3K/Akt 信号通路抑制氧化应激的主要途径,目前对其他通路的研究还不够深入,需要进一步探讨。中药基于 PI3K/Akt 信号通路治疗脑缺血再灌注损伤的作用机制见增强出版附加材料。

4 总结与展望

中药及其复方防治 CIRI 的机制研究近年来已经取得了重大进展,PI3K/Akt 信号通路作为经典的抗凋亡/促增殖通路,在 CIRI 的发展中干预细胞自噬、凋亡、炎症反应、氧化应激等复杂病理过程,是防治 CIRI 的关键靶点。CIRI 的发病机制极为复杂,目前西医尚且未有疗效明确的药物,而中药凭借丰富的药理活性和化学结构在 CIRI 的防治中有着显著的优势,其潜力有待挖掘。近些年来,中药复方为中医药临床应用的主要方式,但目前涉及的研究多倾向于单味药中某个提取物或者提取成分的作用,往往忽略了药性、药味与证型之间的对应及中药复方内部各因子之间的联系,对组分的不同配伍和相互作用的差异性研究也涉及较少,未能彰显中药配伍多靶点、多重功效的理念,且大部分实验研究未能充分的为临床所用,因此聚焦实验研究与临床实践的结合,从多层面、多维度揭示中药药效、药理的作用机制,中医药防治 CIRI 任重道远。

[参考文献]

- [1] KIM J Y, PARK J, HA J, et al. Specific isotope-responsive breathing transition in flexible metal-organic frameworks[J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(31):13278-13282.
- [2] WICHA P, TOCHARUS J, JANYOU A, et al. Hexahydrocurcumin alleviated blood-brain barrier dysfunction in cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. *Pharmacol Rep*, 2020, 72(3):659-671.
- [3] PANG Y, ZHU S, PEI H. Pachymic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Metab Brain Dis*, 2020, 35(4):673-680.

- [4] RUAN C, GUO H, GAO J, et al. Neuroprotective effects of metformin on cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating PI3K/Akt pathway [J]. *Brain Behav*, 2021, 11(10): e2335.
- [5] 蒋寅. 黄芩苷对溃疡性结肠炎 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路的影响及其机制研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2016.
- [6] XIE W, ZHOU P, SUN Y, et al. Protective effects and target network analysis of ginsenoside Rg₁ in cerebral ischemia and reperfusion injury: A comprehensive overview of experimental studies [J]. *Cells*, 2018, 7(12):270.
- [7] 贾慧雨,冯志海,冯文帅,等. 中药单体调控 PI3K/Akt 信号通路干预糖尿病视网膜病变的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(12):265-273.
- [8] SARKAR C, JONES J W, HEGDEKAR N, et al. PLA2G4A/cPLA2-mediated lysosomal membrane damage leads to inhibition of autophagy and neurodegeneration after brain trauma [J]. *Autophagy*, 2020, 16(3):466-485.
- [9] 尹丽梅,袁建,陈楷,等. 解毒活血方调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对 ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠斑块稳定性的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(12):112-120.
- [10] 何俊芳,刘新平,吕学海,等. PI3K/Akt 信号通路介导脂联素对脑缺血再灌注大鼠的保护作用[J]. *中国卒中杂志*, 2022, 17(8):857-862.
- [11] HU S, WU Y, ZHAO B, et al. Panax notoginseng saponins protect cerebral microvascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced barrier dysfunction via activation of PI3K/Akt/Nrf2 antioxidant signaling pathway [J]. *Molecules*, 2018, 23(11):2781.
- [12] 巩子星,徐翌,刘远,等. 三七总皂苷调控 PI3K/Akt/mTOR 通路对乳腺增生大鼠乳腺组织细胞凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(2):98-103.
- [13] LI T F, MA J, HAN X W, et al. Chrysin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats by regulating the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Neurochem Int*, 2019, doi: 10.1016/j.neuint. 2019. 104496
- [14] YAN Y, LIU Y, YANG Y, et al. Carnosol suppresses microglia cell inflammation and apoptosis through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2022, 44(5): 656-662.
- [15] YAN C, AN F, WANG J, et al. Zhongfeng capsules protects against cerebral ischemia-reperfusion injury via mediating the phosphoinositide 3-kinase/Akt and toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B signaling pathways by regulating neuronal apoptosis and inflammation [J]. *Apoptosis*, 2022, 27(7/8):561-576.
- [16] 陈海,王建. PI3K/Akt 信号通路在缺血性脑卒中后细胞程序性死亡中的研究进展[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(2):247-252.
- [17] 张家伟. PI3K/Akt 信号通路及缺血性脑损伤引起的细胞凋亡研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2022, 42(11):2826-2831.
- [18] 卓清缘,陈美先,王羚. 桦木酸通过调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导人结肠癌细胞 SW620 凋亡及自噬[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(14):99-106.
- [19] YANG S, WANG H, YANG Y, et al. Baicalein administered in the subacute phase ameliorates ischemia-reperfusion-induced brain injury by reducing neuroinflammation and neuronal damage [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, doi: 10.1016/j.biopha. 2019. 109102
- [20] ZHAO M, HOU S, FENG L, et al. Vinpocetine protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by targeting astrocytic connexin43 via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Front Neurosci*, 2020, doi: 10.3389/fnins. 2020. 00223.
- [21] CHEN L, WEI X, HOU Y, et al. Tetramethylpyrazine analogue CXC195 protects against cerebral ischemia/reperfusion-induced apoptosis through PI3K/Akt/GSK3 β pathway in rats [J]. *Neurochem Int*, 2014, 66: 27-32.
- [22] HOU Y, WANG K, WAN W, et al. Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/Akt/mTOR pathway after stroke in rats [J]. *Genes Dis*, 2018, 5(3):245-255.
- [23] SUN X, CUI X. Isorhapontigenin alleviates cerebral ischemia/reperfusion injuries in rats and modulated the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020, 393(9): 1753-1760.
- [24] YANG J, YAN H, LI S, et al. Berberine ameliorates MCAO induced cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of the BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(3): 702-710.
- [25] ZHANG Y M, QU X Y, ZHAI J H, et al. Xingnaojing injection protects against cerebral ischemia reperfusion injury via PI3K/Akt-mediated eNOS phosphorylation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, doi:10.1155/2018/2361046.
- [26] 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.
- [27] WU Q, MAO Z, LIU J, et al. Ligustilide attenuates ischemia reperfusion-induced hippocampal neuronal apoptosis via activating the PI3K/Akt pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00979.
- [28] PANG Y, ZHU S, PEI H. Pachymic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Metab Brain Dis*, 2020, 35(4):673-680.
- [29] ZHANG W, SONG J K, YAN R, et al. Diterpene ginkgolides protect against cerebral ischemia/reperfusion damage in rats by activating Nrf2 and CREB through PI3K/Akt signaling [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(8):1259-1272.
- [30] CHEN L, XIANG Y, KONG L, et al. Hydroxysafflor yellow A protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by anti-apoptotic effect through PI3K/Akt/GSK3 β pathway in rat [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(11):2268-2275.
- [31] YU ZH, CAI M, XIANG J, et al. PI3K/Akt pathway contributes to neuroprotective effect of Tongxinluo against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 181:8-19.
- [32] FENG C, WAN H, ZHANG Y, et al. Neuroprotective effect of danhong injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by activation of the PI3K-Akt pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00298.
- [33] ZHANG Y, TIAN Z, WAN H, et al. Deltonin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury in correlation with modulation of autophagy and inflammation [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 16:871-879.
- [34] FUJITA S, SAKURAI M, BABA H, et al. Autophagy-mediated stress response in motor neurons after hypothermic spinal cord ischemia in rabbits [J]. *J Vasc Surg*, 2015, 62(5):1312-1319.
- [35] 罗苑,段小花,杨丽萍,等. 线粒体自噬相关信号通路和蛋白在脑缺血再灌注损伤中的作用及机制研究进展 [J]. *山东医药*, 2022, 62(14):112-115.
- [36] LUO T, LIU G, MA H, et al. Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt pathway contributes to the protection of ginsenoside Rb₁ against neuronal death caused by ischemic insults [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9):15426-15442.
- [37] ZHU Y, TANG Q, WANG G, et al. 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]. *Curr Neurovasc Res*, 2017, 14(2):132-140.
- [38] YANG G, WANG N, SETO S W, et al. Hydroxysafflor yellow a protects brain microvascular endothelial cells against oxygen glucose deprivation/reoxygenation injury: Involvement of inhibiting autophagy via class I PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 140:243-257.
- [39] HUANG L, CHEN C, ZHANG X, et al. Neuroprotective effect of curcumin against cerebral ischemia-reperfusion via mediating autophagy and inflammation [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 64(1):129-139.
- [40] HUA Y, ZHAI Y, WANG G, et al. Tong-Qiao-Huo-Xue decoction activates PI3K/Akt/mTOR pathway to reduce BMECs autophagy after cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, doi: 10.1016/j.jep.2022.115585.
- [41] LYU D H, AN F Y, YAN C L, et al. Effects of Zhongfeng capsule on autophagy related proteins expressions of brain tissue in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Chin J Appl Phys*, 2022, 38(1):25-31.
- [42] CHEN Y, LEI L, WANG K, et al. Huangqi-Honghua combination prevents cerebral infarction with qi deficiency and blood stasis syndrome in rats by the autophagy pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, doi:10.1155/2022/9496926.
- [43] WANG P R, WANG J S, ZHANG C, et al. Huang-Lian-Jie-Du-decotion induced protective autophagy against the injury of cerebral ischemia/reperfusion via MAPK-mTOR signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(1):270-280.
- [44] GU S X, BLOKHIN I O, WILSON K M, et al. Protein methionine oxidation augments reperfusion injury in acute ischemic stroke [J]. *JCI Insight*, 2016, 1(7):e86460.
- [45] SURINKAEW P, SAWADDIRUK P, APAIJAI N, et al. Role of microglia under cardiac and cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury [J]. *Metab Brain Dis*, 2018, 33(4):1019-1030.

- [46] LIU H, WEI X, KONG L, et al. NOD2 is involved in the inflammatory response after cerebral ischemia-reperfusion injury and triggers NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(5):525-535.
- [47] LI Y, XIANG L L, MIAO J X, et al. Protective effects of andrographolide against cerebral ischemia reperfusion injury in mice[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(4):186.
- [48] 朱百科,王新新,赵恒. 川芎嗪通过激活 VEGF 介导的 PI3K/Akt 信号通路缓解大鼠脑缺血再灌注引起的损伤[J]. *河北医学*, 2020, 26(6):912-917.
- [49] 石娅,刘文,刘兴德,等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探究当归补血汤干预大鼠实验性脑缺血再灌注损伤的作用机制[J]. *中草药*, 2022, 53(16):5052-5065.
- [50] 刘家峰,舒庆,张颖. 左归丸通过 ERs/PI3K/Akt 通路保护大鼠脑缺血/再灌注损伤的作用研究[J]. *临床医学研究与实践*, 2021, 6(35):5-8.
- [51] 王文杰,舒升,徐煜彬,等. 绞股蓝皂苷 X VII 调控 PI3K/Akt 信号通路对脑缺血再灌注模型大鼠的保护作用[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(3):233-236, 276-278.
- [52] WEN Z, HOU W, WU W, et al. 6'-O-Galloylpaconiflorin attenuates cerebral ischemia reperfusion-induced neuroinflammation and oxidative stress via PI3K/Akt/Nrf2 activation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, doi:10.1155/2018/8678267.
- [53] MA C, WANG X, XU T, et al. Qingkailing injection ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury and modulates the AMPK/NLRP3 inflammasome signalling pathway [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1):320.
- [54] HOU S, ZHAO M M, SHEN P P, et al. Neuroprotective effect of salvianolic acids against cerebral ischemia/reperfusion Injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7):1190.
- [55] 卜一,张硕,钱旭东,等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨半枝莲总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能和氧化应激损伤的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2022, 22(18):3440-3446.
- [56] DING Y, DU J, CUI F, et al. The protective effect of ligustrazine on rats with cerebral ischemia-reperfusion injury via activating PI3K/Akt pathway[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2019, 38(10):1168-1177.
- [57] YAN S, CHEN L, WEI X, et al. Tetramethylpyrazine analogue CXC195 ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via PI3K/Akt signaling [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(3):446-454.
- [58] HUA H, ZHANG W, LI J, et al. Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion by dietary phytochemical extracts from Tibetan turnip (*Brassica rapa* L.) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, doi:10.1016/j.jep.2020.113410.
- [59] 孙明烁. 通心络通过 PI3K/Akt 通路对大鼠脑缺血再灌注损伤的治疗作用及其机制研究[D]. 长春:吉林大学, 2018.

[责任编辑 张丰丰]