

论著 · 实验研究

PI3K/Akt 信号通路对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后学习记忆能力的影响

姚丹 何雪 王金湖 赵正言

(浙江大学医学院附属儿童医院儿童保健科, 浙江 杭州 310003)

[摘要] **目的** 研究 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 wortmannin 对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)后远期学习记忆及认知功能的影响。**方法** 于制备新生大鼠左脑 HIBD 模型前 30 min,应用脑立体定位仪定位大鼠左侧海马区,注射 wortmannin 2 μL,同时建立 HIBD + DMSO 组、HIBD 模型组、假手术组及空白对照组。于大鼠 28 日龄时用 Morris 水迷宫试验检测各组大鼠的学习记忆能力。**结果** 随游泳次数增加各组大鼠逃避潜伏期(EL)时间均有不同程度缩短;从第 2 天开始,HIBD + wortmannin 组 EL 明显长于假手术组和空白对照组($t = 2.637, P = 0.023$; $t = 3.585, P = 0.003$),且随着时间的延长差距逐渐扩大。到第 4 天和第 8 天时,HIBD + wortmannin 组 EL 值明显长于其他 4 组($P < 0.05$; $P < 0.01$)。而在空间探索试验撤去平台后 120 s 内,HIBD + DMSO 组和 HIBD 组的穿越平台次数低于假手术组和空白对照组($P < 0.05$),HIBD + wortmannin 组的穿越平台次数低于 DMSO + HIBD 组和 HIBD 组($P < 0.05$),同时亦明显低于假手术组和空白对照组($P < 0.01$)。**结论** 抑制 PI3K/Akt 信号通路可加重大鼠认知功能障碍,从而影响远期的学习记忆及认知功能。 [中国当代儿科杂志,2011,13(5):424-427]

[关键词] 缺氧缺血性脑损伤; PI3K/Akt; Morris 水迷宫; 学习记忆; 新生大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)05-0424-04

Effects of PI3K/Akt signaling pathway on learning and memory abilities in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

YAO Dan, HE Xue, WANG Jin-Hu, ZHAO Zheng-Yan. Department of Pediatric Health Care, Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China (Zhao Z-Y, Email: zhaozy@zju.edu.cn)

Abstract: Objective To study the effects of PI3K/Akt signaling pathway inhibitor wortmannin on long-term learning and memory abilities in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Forty-eight neonatal rats were randomly assigned to blank control ($n = 8$), sham-operated ($n = 8$), HIBD model ($n = 10$), HIBD + DMSO (dimethyl sulfoxide, $n = 8$) and HIBD + wortmannin groups ($n = 8$). Wortmannin (2 μL) was injected to the left hippocampus 30 minutes before HIBD inducement in the HIBD + wortmannin group. The Morris water maze test was used to examine the long-term learning and memory abilities at the age of 28 days. **Results** With the increased number of swimming, the escape latency was shortened in various groups. From the second day, the escape latency in the HIBD + wortmannin group was significantly longer than that in the sham-operated and the blank control groups ($P < 0.05$), and the differences increased with the time. On the fourth day, there were significant differences in the escape latency between the HIBD + wortmannin group and the HIBD + DMSO group as well as the HIBD model group ($P < 0.05$). On the eighth day (retention trial), there were the most obvious differences in the escape latency between the HIBD + wortmannin group with the other four groups. In the space exploration test, the number of times crossing the former platform location within 120 seconds after removing the platform in the HIBD + DMSO and the HIBD model group was lower than the sham-operated and the blank control groups ($P < 0.05$). The HIBD + wortmannin group showed lower number of times crossing the former platform location compared with the HIBD + DMSO and the HIBD model groups ($P < 0.05$), as well as the sham-operated and the blank control groups ($P < 0.01$). **Conclusions** PI3K/Akt signaling pathway inhibitor wortmannin can aggravate the cognitive impairments, thus affecting adversely long-term learning and memory abilities in neonatal rats with HIBD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (5):424-427]

Key words: Hypoxic-ischemic brain damage; PI3K/Akt; Morris water maze; Learning and memory ability; Neonatal rats

[收稿日期]2011-01-06;[修回日期]2011-02-27
[作者简介]姚丹,女,硕士,医师。
[通信作者]赵正言,教授。

围生期窒息所致缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是由于宫内或出生时窒息、缺氧引起的细胞代谢障碍,常引起新生儿死亡和其后神经系统的发育障碍^[1]。脑缺氧缺血的病理生理机制包括兴奋性氨基酸毒性、能量衰竭、自由基、钙离子超载及细胞凋亡等^[2-3],目前许多研究均揭示PI3K/Akt信号通路与这些机制密切相关^[4-5]。但目前有关PI3K/Akt信号通路对发育期大脑HIBD后认知功能障碍相关性的研究甚少。

PI3K/Akt信号通路是一个经典的抗凋亡、促存活的信号转导途径^[6]。磷酸肌醇激酶(PI3K)是一类特异的催化磷脂酰肌醇脂类物质的激酶,参与细胞内信号的转导。PI3K功能上是Akt活化的首要调节者。Akt是信号转导途径中重要的蛋白激酶,是PI3K的直接靶基因,能介导多种生物学效应,调控细胞生长和增殖、细胞运动和侵袭、细胞存活和凋亡,新生血管的生成等多种细胞活动和生物学效应,是重要的抗凋亡调节因子^[7-8]。

近年研究表明,PI3K/Akt信号通路与HIBD有关,大脑缺氧缺血后p-Akt表达迅速增加并参与HIBD中的病理损伤过程^[9]。给予PI3K/Akt信号通路抑制剂wortmannin在一定程度上可以阻断海马缺血耐受所致的神经元保护作用,加重新生大鼠HIBD后急性中枢神经损伤^[10]。本研究旨在明确给予PI3K/Akt信号通路抑制剂wortmannin干预HIBD新生大鼠后是否对其远期的学习记忆及认知障碍存在加重作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康7日龄Sprague-Dawley(SD)大鼠由浙江大学紫金港动物中心试验室提供,体重12~20 g,共48只。随机分为空白对照组(8只),假手术组(8只),HIBD组(10只),HIBD+DMSO(dimethyl sulfoxide,二甲基亚砷)组(8只),HIBD+wortmannin组(8只),麻醉后脑室注射时死亡2只,缺氧过程中死亡4只。于大鼠28日龄时进行Morris水迷宫检测。

1.2 模型制作

1.2.1 HIBD模型 参照Rice-Vannucci法^[11],采用Nakajima等^[12]改良的动脉结扎法建立新生大鼠缺氧缺血模型。新生大鼠在室温下用乙醚吸入麻醉后取仰卧位,四肢固定,消毒皮肤后行颈前中切口,无菌下分离左侧颈总动脉,并用外科7-0灭菌手术丝线双道结扎左侧颈总动脉,中间剪断,缝合伤口

并再次消毒皮肤。整个手术在15 min内完成。放入恒温箱中(37℃)恢复30 min至2 h后置于容积为2 L的密闭容器内。以1~2 L/min的速度输入体积浓度为8%氧气和92%氮气的混合气体,持续2 h。建模成功后置于室温下约1~2 h,最后放回鼠笼由母鼠喂养。

1.2.2 Wortmannin和DMSO干预 将wortmannin溶解于DMSO中并用PBS稀释成浓度为0.16 μg/μL的稀释液,按16 μg/kg的剂量,在脑立体定位仪的帮助下,依据脑立体定位图谱准确定位海马区,在建模前30 min将2 μL稀释溶液注入新生大鼠左侧海马区;DMSO干预组则仅将同等稀释的2 μL DMSO于模型建立前30 min注入左侧海马区内。

假手术组仅予以分离左侧颈总动脉,不结扎剪断,缝合切口后不予以缺氧处理。空白对照组未给予任何处理。

1.3 HIBD后学习记忆能力检测

在鼠龄28 d时行Morris水迷宫试验测试空间学习记忆能力。Morris水迷宫DMS-2系统由浙江大学紫金港动物房动物中心实验室提供。迷宫上方安置带有显示系统的摄像机,计算机自动跟踪计时并同步记录大鼠的游泳轨迹,Morris水迷宫数据采集和分析软件记录相关数据及图象结果。

1.3.1 迷宫适应训练和游泳能力检验 正式开始实验前1 d,撤去平台,选择池壁一固定点,让大鼠面向池壁入水,自由游泳2 min,并录下游泳轨迹。目的是让大鼠适应环境,并对大鼠游泳能力进行初步检验,对明显异常者予以剔除。

1.3.2 定位航行试验 用于检测大鼠的学习和记忆能力。大鼠连续接受4 d训练,每天将大鼠面向池壁分别从4个入水点放入水中,每次实验以120 s为限,记录动物寻找并爬上平台所需时间即逃避潜伏期(escape latency, EL)以及在这段时间内的游泳路程和速度,以爬上平台所需时间作为学习和记忆成绩。若设定时间内未找到平台,计算机停止跟踪,记录时间为120 s,未找到平台的动物由实验者将其引上平台。每次训练间隔30 s,即做好1次训练后在平台上休息停留30 s后再继续下一次。各组大鼠每天4次EL的平均值作为当天的成绩。

1.3.3 空间探索试验 用于测量大鼠学会寻找平台后,对平台空间位置的准确记忆,即记忆保持能力。在定位航行试验后(即水迷宫的第5天)移去平台,然后任选1个固定象限作为入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录其120 s内的游泳轨迹及穿越原平台位置的次数,考察大鼠对原平台的记忆能力。

1.3.4 远期记忆能力测试 探索实验结束后,休息3 d,即水迷宫的第8天,再对全部新生鼠进行1次水迷宫测试,方法同定位航行试验,用4次EL的平均值作为最后的成绩。用来测试其远期记忆能力。

1.4 统计学分析

采用SPSS 17.0统计学软件进行,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。EL比较采用重复测量的方差分析;空间搜索试验中穿越目标次数及远期记忆潜伏期采用单因素方差分析,并以LSD法进行组间的两两比较;两组间比较用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

28日龄时,经Morris水迷宫测试发现:随着游泳次数增加,各组大鼠EL均有不同程度缩短;无论

是EL还是空间探索结果,空白对照组和假手术组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),HIBD组和HIBD + DMSO组之间差异也无统计学意义($P > 0.05$),提示假手术和DMSO干预对大鼠空间学习记忆能力无明显影响,故分析时不再单独列出来说明。

2.1 游泳能力的检测

通过测试,全部大鼠第1天游泳能力均正常。

2.2 定位航行试验

2.2.1 各组大鼠EL的比较 第1天5组间的EL时间差异无统计学意义($P > 0.05$)。随游泳次数增加,各组大鼠EL时间均有不同程度缩短。从第2天开始,HIBD + wortmannin组EL明显长于假手术组和空白对照组($t = 2.637, P = 0.023; t = 3.585, P = 0.003$),且随着时间的延长差距逐渐扩大。到第4天和第8天时,HIBD + wortmannin组EL值明显长于其他4组($P < 0.05; P < 0.01$)。见表1。

表1 各组大鼠EL比较 ($s, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第1天	第2天	第3天	第4天	第8天
空白对照	8	75 ± 30	55 ± 21	36 ± 29	30 ± 15	27 ± 15
假手术	8	85 ± 22	55 ± 3	66 ± 36	59 ± 36	68 ± 32
HIBD	10	87 ± 31	81 ± 13	66 ± 36	59 ± 36 ^a	68 ± 32 ^a
HIBD + DMSO	8	109 ± 22	93 ± 24	72 ± 24	61 ± 36	68 ± 24
HIBD + Wortmannin	8	108 ± 13	99 ± 12 ^a	93 ± 28 ^b	95 ± 21 ^{b,c}	97 ± 20 ^{b,c}

与同时点空白对照组和假手术组比较,a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$; c: 与同时点HIBD组和HIBD + DMSO组比较, $P < 0.05$

2.3 空间探索试验

撤去平台后120 s内,HIBD + DMSO组和HIBD组的穿越平台次数低于假手术组和空白对照组(均 $P < 0.05$),HIBD + wortmannin组的穿越平台次数低于HIBD + DMSO组和HIBD组($t = 2.283, P = 0.042; t = 2.179, P = 0.045$),同时亦明显低于假手术组和空白对照组($t = 3.581, P = 0.002; t = 5.409, P < 0.01$)。见图1。

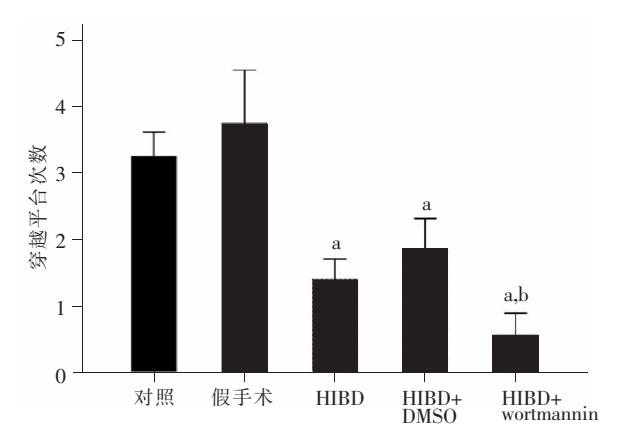


图1 各组大鼠穿越平台次数的比较 a: 与对照组和假手术组比较, $P < 0.01$; b: 与HIBD组和HIBD + DMSO组比较, $P < 0.05$

3 讨论

近年研究表明,PI3K/Akt信号通路与HIBD有关。Kitagawa等^[13]在1999年首次发现了Akt在脑缺血时被激活。Li等^[14]发现大脑中动脉闭塞模型大鼠在缺血再灌注后1~3 h p-Akt在神经元中的表达增加,1 h为高峰,说明PI3K/Akt信号通路在缺血再灌注早期参与了脑缺血诱导的应激反应,提示PI3K/Akt信号通路参与了脑缺血的病理过程,且与脑缺血损伤程度有关。Li等^[9]通过建立新生大鼠HIBD模型,应用免疫组化和免疫印迹检测发现模型组大鼠中大脑神经元p-Akt蛋白表达增加,且p-Akt蛋白表达有一定的时间规律性,复氧后4 h表达达高峰,以后降低,其表达趋势与缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)一致,但表达高峰时间早于HIF-1 α 。表明PI3K/Akt信号通路在缺氧缺血后被激活,Akt磷酸化增加,同时提示PI3K/Akt信号通路可能参与调节神经元缺氧诱导的HIF-1 α 表达,参与抗细胞凋亡作用。Jiang等^[15]通过体外细胞培养,研究星形胶质细胞在缺血条件下发生的细胞凋亡与p-Akt

之间的关系,发现 TUNEL 阳性细胞在缺血后 6 h 开始出现,12 h 增加,而 p-Akt 在缺血后 6 ~ 12 h 表达增多,说明 p-Akt 与缺血诱导的细胞凋亡之间有很好的相关性。上述结果均表明 PI3K/Akt 信号通路对缺血后细胞的生长情况起着重要的调控作用。

目前,Akt 被作为信号通路治疗脑缺血的分子靶点,进行了大量的药物干预性研究。冯美江等^[10]应用 PI3K/Akt 特异性抑制剂 wortmannin 脑室预注射后发现凋亡细胞比对照组明显增多,提示 wortmannin 可在一定程度上阻断海马缺血耐受所致神经元保护作用。

本研究通过应用 PI3K /Akt 信号通路抑制剂 wortmannin 干预新大生鼠 HIBD 模型,发现随游泳次数增加,各组大鼠 EL 时间均有不同程度缩短;从第 2 天开始,HIBD + wortmannin 组 EL 值明显长于空白对照组和假手术组,且随着时间的延长差距逐渐扩大。到第 4 天和第 8 天,HIBD + wortmannin 组 EL 值明显长于其他 4 组,提示 HIBD + wortmannin 组空间学习记忆能力障碍最为严重,PI3K/Akt 通路阻断后对远期记忆的影响较为显著。而在空间探索试验中,假手术组和空白对照组大鼠运动轨迹主要集中在原平台位置,而其余 3 组则多沿池壁游泳,说明各组大鼠采取不同的空间搜索策略,而假手术组和空白对照组大鼠搜索策略更趋合理。撤去平台后 120 s 内,HIBD + wortmannin 组的穿越平台次数明显低于其他 4 组,说明 PI3K/Akt 信号通路阻断后大鼠的空间记忆保持能力及空间定位的准确性更差。

综上所述,wortmannin 可以加重 HIBD 后大鼠远期学习记忆认知能力损伤,证明了 PI3K/Akt 信号通路可影响发育期大脑 HIBD 后的学习记忆能力,与后期的脑功能恢复密切相关,为临床防治儿童认知障碍提供了理论依据,期待以 PI3K/Akt 信号通路为靶点的神经保护剂可以用于临床治疗 HIBD。

[参 考 文 献]

[1] McAuliffe JJ, Miles L, Vorhees CV. Adult neurological function

following neonatal hypoxia-ischemia in a mouse model of the term neonate: water maze performance is dependent on separable cognitive and motor components[J]. Brain Res, 2006, 1118(1): 208-221.

[2] Sharrard RM, Maitland NJ. Regulation of protein kinase B activity by PTEN and SHIP2 in human prostate-derived cell lines[J]. Cell Signal, 2007, 19(1):129-138.

[3] Janas ML, Hodson D, Stamataki Z, Hill S, Welch K, Gambardella L, et al. The effect of deleting p110delta on the phenotype and function of PTEN-deficient B cells[J]. J Immunol, 2008, 180(2):739-746.

[4] 赵学芹,黄宪章. Akt/PKB 信号通路调控机制的研究进展[J]. 广东医学, 2009,12(30): 1920-1922.

[5] 吴日平,黄昌明. PI3K/Akt 信号通路与肿瘤关系的研究进展[J]. 医学综述, 2009,15(10): 1501-1504.

[6] Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR, et al. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an akt/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(14): 5099-5104.

[7] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 59-71.

[8] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream[J]. Cell, 2007, 129(7): 1261-1274.

[9] Li L, Qu Y, Mao M, Xiong Y, Mu D. The involvement of phosphoinositid 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factor-1alpha in the developing rat brain after hypoxia-ischemia[J]. Brain Res, 2008, 1197: 152-158.

[10] 冯美江,丁新生,吴祖舜. 脑室预注射 Wortmannin 对沙土鼠海马缺血耐受的影响[J]. 南京医科大学学报, 自然科学版, 2004,24(1):75-76.

[11] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131-141.

[12] Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic-ischemia in the newborn rat[J]. J Neurosci, 2000, 20(21): 7994-8004.

[13] Kitagawa H, Warita H, Sasaki C, Zhang WR, Sakai K, Shiro Y, et al. Immunoreactive Akt, PI3-K and ERK protein kinase expression in ischemic rat brain[J]. Neurosci Lett, 1999, 274(1): 45-48.

[14] Li F, Omori N, Jin G, Wang SJ, Sato K, Nagano I, et al. Cooperative expression of survival p-ERK and p-Akt signals in rat brain neurons after transient MCAO[J]. Brain Res, 2003, 962(1-2): 21-26.

[15] Jiang Z, Zhang Y, Chen XQ, Lam PY, Yang H, Xu Q, et al. Apoptosis and activation of Erkl/2 and Akt in astrocytes postischemia[J]. Neurochem Res, 2003, 28(6): 831-837.

(本文编辑:王霞)