

# 栝楼桂枝颗粒抑制 MCAO 大鼠神经元凋亡的机制研究

曾洁<sup>a</sup>, 张玉琴<sup>b</sup>, 王宏运<sup>b</sup>, 黄彬<sup>a</sup>, 徐伟<sup>b</sup>, 林羽<sup>b\*</sup> (福建中医药大学, a. 康复医疗技术国家地方联合工程研究中心; b. 药学院, 福州 350122)

**摘要:** 目的 研究栝楼桂枝颗粒(Gualou Guizhi granule, GLGZG)是否通过调控 PI3K/AKT 通路抑制脑缺血再灌注损伤大鼠神经元凋亡从而达到抗脑缺血再灌注损伤的作用。方法 SD 大鼠 36 只, ♂, 分为假手术组、大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)组、GLGZG 组, 每组 12 只。其中 MCAO 组、GLGZG 组采用线栓法致 MCAO 建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型, GLGZG 灌胃给药, 连续给药 7 d。采用改良的神经功能缺损评分法对大鼠神经功能损伤进行评分, MRI 观察大鼠脑梗死体积, Real-time PCR 检测脑组织中 PI3K、Akt mRNA 的表达, Western blot 法检测大鼠缺血侧脑组织 PI3K(p85)、Akt、p-Akt、PDK1、Bcl-2、Bcl-xL、cleaved-caspase-3、Bad、Bax 蛋白表达。结果 与 MCAO 组比较, GLGZG 组神经行为学评分降低, 第 5、7 天神评分显著低于 MCAO 组( $P < 0.05$ ); 与 MCAO 组比较, MRI 观察发现 GLGZG 组大鼠脑梗死体积显著减小( $P < 0.05$ ); PI3K(p85)、p-Akt、PDK1、Bcl-2、Bcl-xL 蛋白的表达上调( $P < 0.01$ ), cleaved-caspase-3、Bad、Bax 蛋白的表达下调( $P < 0.01$ ), 对 Akt 的表达没有影响。结论 GLGZG 能够提高 MCAO 大鼠神经功能, 抑制神经细胞凋亡, 其作用机制可能是通过激活 PI3K/AKT 信号通路抑制 MCAO 大鼠神经元凋亡。

**关键词:** 栝楼桂枝颗粒; PI3K/AKT; 脑缺血再灌注损伤; 大脑中动脉栓塞

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)07-1007-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.07.014

引用本文: 曾洁, 张玉琴, 王宏运, 等. 栝楼桂枝颗粒抑制 MCAO 大鼠神经元凋亡的机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 1007-1011.

## Mechanism of Gualou Guizhi Granule Inhibits Neuronal Cell Apoptosis in MCAO Rats

ZENG Jie<sup>a</sup>, ZHANG Yuqin<sup>b</sup>, WANG Hongyun<sup>b</sup>, HUANG Bin<sup>a</sup>, XU Wei<sup>b</sup>, LIN Yu<sup>b\*</sup> (Fujian University of Traditional Chinese Medicine, a. National-local Joint Engineering Research Center of Rehabilitation Medicine Technology; b. Pharmacy College, Fuzhou 350122, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the inhibitive effect of Gualou Guizhi granule (GLGZG) on nerve cell apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injury rat through activating PI3K/AKT pathway. **METHODS** Thirty-six male SD rats were divided into sham operation group, middle cerebral artery occlusion (MCAO) model group and GLGZG group, 12 for each group. MCAO model group and GLGZG group subjected to focal cerebral ischemia reperfusion with suture-occluded induced MCAO method. GLGZG was given by intragastric administration, once daily for 7 d. Neurobehavioral deficit was performed with modified neurological severity score (mNSS) scale. MRI was used to observe the cerebral infarct volume in rats. PI3K, Akt mRNA were detected by qRT-PCR in the infarcted cortex. The protein expression of PI3K(p85), p-Akt, PDK1, Bcl-2, Bcl-xL, cleaved-caspase-3, Bad, Bax were detected by Western blot. **RESULTS** The mNSS score of GLGZG group was reduced compared with the MCAO model group, especially on 5th and 7th day ( $P < 0.05$ ). Compared with MCAO group, the cerebral infarct volume in GLGZG group rats were decreased significantly ( $P < 0.05$ ) and upregulated the proteins expression of PI3K(p85), p-Akt, PDK1, Bcl-2, Bcl-xL ( $P < 0.01$ ), downregulated cleaved-caspase-3, Bad, Bax ( $P < 0.01$ ), however, the protein expression of Akt was not change. **CONCLUSION** GLGZG can improve the nerve function deficit of MCAO rat and inhibit the apoptosis of neural cell, which may be associated with activating the PI3K/AKT pathway.

**KEY WORDS:** Gualou Guizhi granule; PI3K/AKT; cerebral ischemia-reperfusion injury; middle cerebral artery occlusion

由于社会和生活方式的改变以及人口老龄化加重, 中风的发病率持续上升, 成为导致人类死亡的第二大病因, 也是导致严重残疾的主要原因<sup>[1]</sup>。

栝楼桂枝颗粒 (Gualou Guizhi granule, GLGZG, 批件号: 闽 2013S0001) 为福建省第二人民医院的院内制剂, 临床上主要用于治疗脑卒中

后痉挛性偏瘫。课题组在临床上观察发现栝楼桂枝方对中风后患者的运动功能、痉挛状态、以及日常生活活动能力均有明显的改善<sup>[2-3]</sup>, 另外, 研究者祝玉朴、战美玲<sup>[4-5]</sup>应用栝楼桂枝汤治疗患者脑卒中后下肢痉挛, 发现可有效改善下肢运动功能、提高患者日常生活活动能力。在实验研究方

基金项目: 国家自然科学基金项目(81674046); 福建省教育厅资助省属高校科研专项立项项目(JK2017023)

作者简介: 曾洁, 男, 副主任药师 Tel: (0591)22861135 E-mail: zjftcm@163.com \*通信作者: 林羽, 男, 博士, 教授 Tel: (0591)22861693 E-mail: lyfjlab@163.com

面,课题组前期研究发现栝楼桂枝汤能够提高脑缺血再灌注损伤大鼠的网屏抓握能力及肌力、H-反射,抑制兴奋性氨基酸(谷氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸)的释放,改善脑缺血再灌注损伤大鼠的痉挛状态<sup>[6-7]</sup>。同时研究还发现栝楼桂枝汤能够抑制神经元凋亡、抑制谷氨酸诱导的兴奋性毒性损伤与细胞凋亡的作用<sup>[8-9]</sup>。本课题组根据栝楼桂枝汤/方制备了GLGZG,疗效确切,但其作用机制尚不明确。内源性保护PI3K/Akt信号通路是脑缺血过程中重要的细胞存活通路。为探讨GLGZG是否应用内源性保护机制,通过PI3K/Akt信号通路减轻脑缺血损伤,抑制神经元凋亡,减轻神经功能损伤,本研究在前期药效学研究基础上<sup>[6-7]</sup>,选择有效的剂量浓度观察基于PI3K/Akt信号通路的GLGZG对脑缺血再灌注损伤大鼠的抗神经元凋亡作用。

## 1 仪器与材料

### 1.1 动物

36只SPF级SD大鼠,♂,体质量240~260g,购于上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号:SC-SCXK(沪)2007-0005,由福建中医药大学实验动物中心饲养。

### 1.2 试剂

GLGZG(由福建省第二人民医院药学部提供,批号:20160809);异氟烷(瑞沃德生命技术有限公司,批号:R510-22);RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher,批号:K1622);Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix(Thermo Fisher,批号:4367659);PI3K(p85)单克隆抗体(批号:#4257)、p-Akt单克隆抗体(批号:#4060)、Akt单克隆抗体(批号:#4685)、PDK1单克隆抗体(批号:#5662)、Bcl-2单克隆抗体(批号:#3498)、Bcl-x1单克隆抗体(批号:#2764)、cleaved-caspase-3单克隆抗体(批号:#9661)、Bad单克隆抗体(批号:#9292)、Bax单克隆抗体(批号:#2772)、 $\beta$ -actin抗体(批号:#4970)均购自Cell Signaling Technology公司;SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒(碧云天生物技术有限公司);HRP结合山羊抗兔IgG、HRP结合兔抗鼠IgG均购自厦门鹭隆生物科技有限公司。

### 1.3 仪器

Biospec 70/20USR型7.0T小动物核磁共振成像系统(Bruker);气体麻醉机(瑞沃德生命技术有限公司);7900HT型实时荧光定量PCR仪(AppLied Biosystems);ChemiDoc XRS+型凝胶成像分析系

统(Bio-Rad);PrimoR型高速台式冷冻离心机(ThermoFisher)。

## 2 方法

### 2.1 建立大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)动物模型

SD大鼠适应性喂养1周后造模,实验前动物禁食12h,自由饮水。根据参考文献及前期经验<sup>[6-7]</sup>实行左侧MCAO手术。假手术组除不插入线栓外其余操作相同,自由摄食饮水。

实验动物分为假手术组、MCAO组、GLGZG组(灌胃给药),每组各12只。假手术组和MCAO组给予0.9%氯化钠溶液(10 mL·kg<sup>-1</sup>);根据人体与动物药物等效剂量换算<sup>[10]</sup>,GLGZG组灌胃给予GLGZG(3.6 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),GLGZG被配制成0.4 g·mL<sup>-1</sup>的药液,故灌胃体积为0.9 mL·(100 g)<sup>-1</sup>,于造模后2h给药,连续给药7d。

### 2.2 大鼠神经行为学评价

使用国际上公认的大鼠脑卒中后神经功能缺损评价标准即改良的神经功能缺损评分法(modified neurological severity score, mNSS)对大鼠进行神经行为学评价<sup>[11-12]</sup>,包括平衡木实验、行走测试、反常运动、感觉测试、反射缺失和提尾反射。评判标准:1~6分认为轻型受损;7~12分认为中型受损;13~18分认为重型受损。纳入标准:以mNSS评分>6分,且4项神经功能均有缺损为标准,判定模型成功。

### 2.3 大鼠核磁共振成像观察与分析

假手术组、MCAO组、GLGZG组分别于最后一次灌胃后6h采用小动物核磁共振仪观察。各组大鼠使用异氟烷进行麻醉后,将头部固定于核磁共振推进床,呈俯卧位。大鼠头部表面线圈检测,观察前先进行冠状位定位扫描,后用T2WI增强系列扫描。MRI成像参数为:T2WI采用TSE序列;Repetition Time: 2 000 ms;Echo Time: 28 ms;扫描层数: 24层;Field of view: 30 mm×30 mm;Number of Signal Averaged: 15;扫描时间为5 min 50 s。

观察健侧脑区、缺血周围脑区有无异常信号强化,以及强化部位、类型。观察T2WI脑结构扫描图像,利用Image J图像处理软件,计算脑梗死体积百分比,公式为脑梗死体积百分比=[每层脑梗死面积×(层间距+层厚)]/[同层面全脑面积×(层间距+层厚)]=每层脑梗死体积/同层面全脑体积×100%。一共统计15层。

## 2.4 Real-Time PCR 检测脑组织中相关基因 mRNA 的表达

每组随机抽取 5 只大鼠，取大鼠脑组织 100 mg，加入 Trizol 试剂 1 mL 后匀浆，提取总 RNA。测量  $A_{260}$  值，根据  $A_{260}$  计算 RNA 浓度， $-80^{\circ}\text{C}$  保存。采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 进行逆转录反应，各目的基因的扩增引物序列见表 1。实时定量 PCR 反应： $50^{\circ}\text{C}$  预热 2 min， $95^{\circ}\text{C}$  预热 10 min， $95^{\circ}\text{C}$  变性 15 s， $60^{\circ}\text{C}$  退火 30 s， $60^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s，共 40 个循环；采用荧光定量 PCR 仪上的软件进行数据的分析处理，计算目的基因 mRNA 相对表达水平。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

基因	引物序列	
PI3K	Forward	5'-GCACGGCGATTACACTCTTAC-3'
	Reverse	5'-TGGACACTGGGTAGAGCAACT-3'
Akt	Forward	5'-ACTCATTCCAGACCCACGAC-3'
	Reverse	5'-AGCCCGAAGTCCGTTAT-3'
GADPH	Forward	5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'
	Reverse	5'-GCTTACCACCTTCTTGATGTC-3'

## 2.5 Western blot 检测大鼠脑组织 PI3K(p85)、Akt、p-Akt、PDK1、Bcl-2、Bcl-xL、cleaved-caspase-3、Bad、Bax 蛋白的表达

提取总蛋白：采用 SDS-PAGE 垂直板全湿法电泳，蛋白经 SDS-PAGE 胶分离后，将凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜，用封闭液封闭 2 h 后，加入稀释的一抗(稀释比例均为 1:1 000)， $4^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜，次日 TBST 洗 3 遍，每次 10 min，加入 1:5 000 稀释 HRP 标记的第二抗体，室温下孵育 2 h，TBST 洗 3 遍。加 ECL 显色剂经凝胶成像分析系统检测，分析目标条带的灰度值，以目标蛋白与  $\beta$ -actin 的灰度值比值作为目标蛋白的相对量，并统计各组之间的差异。

## 2.6 统计学方法

用 SPSS 18.0 统计软件进行分析，数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，各组数据间的差别用 ANOVA 方法分析，以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 GLGZG 对 MCAO 大鼠神经功能损伤的影响

采用 mNSS 评分法对大鼠进行神经行为学评价。结果显示，MCAO 大鼠术后 3 d 内神经功能缺损情况逐渐加重，mNSS 评分显著高于假手术组 ( $P < 0.01$ )；GLGZG 干预后，mNSS 评分下降，均低于 MCAO 组，即 GLGZG 可逆转 MCAO 大鼠模型神经功能缺损，但是第 1, 3 天 2 组间无显著性

差异，第 5, 7 天 mNSS 评分显著低于 MCAO 组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )，提示 GLGZG 可提高 MCAO 组大鼠的神经功能。各组大鼠 mNSS 评分见表 2。

表 2 GLGZG 对大鼠神经行为学的影响

Tab. 2 Effect of GLGZG on neurological deficits in rats

组别	mNSS 评分			
	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
假手术组	0	0	0	0
MCAO 组	9.87 $\pm$ 2.37 <sup>1)</sup>	14.64 $\pm$ 3.25 <sup>1)</sup>	13.47 $\pm$ 2.88 <sup>1)</sup>	10.23 $\pm$ 2.32 <sup>1)</sup>
GLGZG 组	9.41 $\pm$ 2.38	9.18 $\pm$ 1.12	8.38 $\pm$ 1.12 <sup>2)</sup>	5.13 $\pm$ 1.82 <sup>3)</sup>

注：与假手术组相比，<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ；与 MCAO 组相比，<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ，<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。  
Note: Compared with the sham operation group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with the MCAO group, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ .

### 3.2 大鼠核磁共振成像结果分析

以 T2WI 系列，大鼠 MRI 观察灌胃给药 GLGZG 对 MCAO 模型大鼠脑梗死体积的影响。实验结果表明，相较于假手术组，模型组大鼠造模后，脑梗死体积占全脑体积百分比显著提升[0 vs (58.226 $\pm$ 8.8)%]，且差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。GLGZG 组大鼠脑梗死体积比相较于 MCAO 模型组显著降低[(35.169 $\pm$ 5.2)% vs (58.226 $\pm$ 8.8)%]，且差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。以上结果表明 GLGZG 连续灌胃给药 7 d 可以显著减少 MCAO 模型大鼠脑梗死体积。MRI 扫描图见图 1。

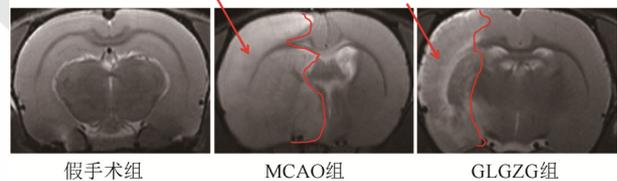


图 1 大鼠脑梗死体积 MRI 扫描图

Fig. 1 MRI scan of cerebral infarction in rats

### 3.3 GLGZG 对大鼠脑组织中 PI3K、Akt mRNA 的影响

与假手术组比较，MCAO 组大鼠 PI3K mRNA、Akt mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.01$ )。与 MCAO 组比较，GLGZG 组大鼠 PI3K mRNA、Akt mRNA 表达明显增高 ( $P < 0.01$ )。提示 GLGZG 对 MCAO 模型大鼠的神经功能损伤具有保护作用。结果见图 2。

### 3.4 GLGZG 对 MCAO 大鼠脑组织 Bcl-2、Bcl-xL、cleaved-caspase-3、Bad、Bax 蛋白表达的影响

采用 Western blot 检测 Bcl-2、Bcl-xL、cleaved-caspase-3、Bad、Bax 蛋白表达。结果显示，与假手术组相比，MCAO 模型组 Bcl-2、Bcl-xL 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.01$ )；与 MCAO 组相比，GLGZG 组 Bcl-2、Bcl-xL 则显著上调 ( $P < 0.01$ )。与

假手术组相比, MCAO 模型组中 cleaved-caspase-3、Bad、Bax 蛋白表达量显著升高( $P<0.01$ ); 与 MCAO 组相比, GLGZG 组 cleaved-caspase-3、Bad、Bax 显著下调( $P<0.01$  或  $P<0.05$ )。结果见图 3。

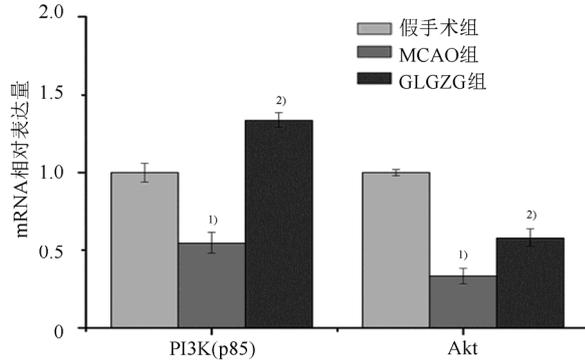


图 2 GLGZG 对 MCAO 大鼠脑组织中 PI3K、Akt mRNA 的影响

与假手术组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与 MCAO 组相比, <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effect of GLGZG on mRNA expression of PI3K, Akt in MCAO rats

Compared with the sham operation group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with MCAO group, <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

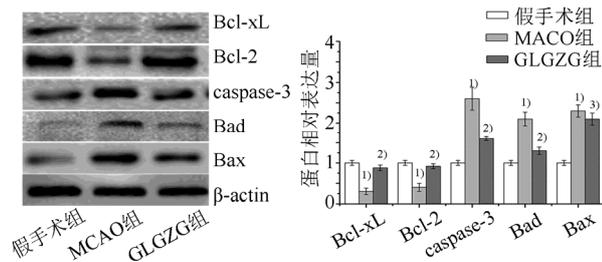


图 3 GLGZG 对 MCAO 大鼠脑组织中 Bcl-2、Bcl-xL、caspase-3、Bad、Bax 蛋白的影响

与假手术组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与 MCAO 组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of GLGZG on protein expression of Bcl-2, Bcl-xL, caspase-3, Bad, Bax in MCAO rats

Compared with the sham operation group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with the MCAO group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ 。

### 3.5 GLGZG 对 MCAO 大鼠脑组织 PI3K(p85)、Akt、p-Akt、PDK1 蛋白表达的影响

采用 Western blot 检测 PI3K(p85)、p-Akt、Akt、PDK1 蛋白表达。与假手术组相比, MCAO 组中 PI3K(p85)、p-Akt、PDK1 蛋白表达量显著降低( $P<0.01$ ); 与 MCAO 组相比, GLGZG 组 PI3K(p85)、p-Akt、PDK1 则显著上调( $P<0.01$ ), 各组中 Akt 蛋白表达差异无统计学意义。结果见图 4。

## 4 讨论

细胞凋亡的过程涉及一系列蛋白, 如 caspase 家族蛋白、Bcl-2 家族蛋白等。caspase-3 为半胱氨酸蛋白酶家族成员, 是细胞凋亡的重要执行者。Bcl-2 家族蛋白中 Bcl-xL、Bcl-2 发挥抑制凋亡的

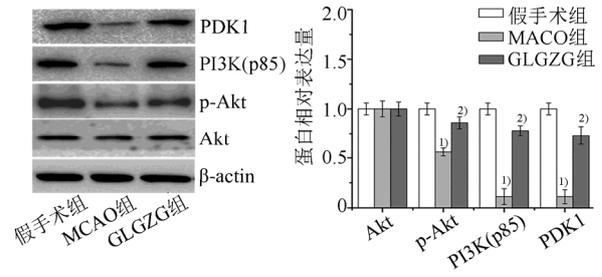


图 4 GLGZG 对 MCAO 大鼠脑组织中 PI3K(p85)、p-Akt、Akt、PDK1 蛋白的影响

与假手术组相比, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与 MCAO 组相比, <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effect of GLGZG on protein expression of PI3K(p85), p-Akt, Akt and PDK1 in brain tissues of MCAO rats

Compared with the sham operation group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with the MCAO group, <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

作用, 相反, Bax、Bad 蛋白发挥促凋亡作用<sup>[13]</sup>。林羽等<sup>[14]</sup>研究表明, GLGZG 能够显著升高谷氨酸损伤原代神经细胞的活力, 显著降低谷氨酸损伤原代海马神经元 caspase-3 mRNA、Bax mRNA 的表达, 升高 Bcl-2 mRNA 的表达; 蛋白表达的趋势与 mRNA 相似, GLGZG 组与模型组比较, 可降低大鼠海马组织 caspase-3、Bax 蛋白的表达, 升高 Bcl-2 蛋白的表达。据报道 GLGZG 可显著提高 NMDA 损伤神经元活性, 显著减少乳酸脱氢酶的 H 释放, 抑制 NMDA 诱导的神经元凋亡<sup>[15]</sup>。表明 GLGZG 可抑制神经细胞凋亡, 与本研究结果一致。

PI3K/Akt 信号通路是介导细胞存活的 1 条经典通路<sup>[16]</sup>, 是细胞信号通路中 1 个重要的激酶家族<sup>[17]</sup>, 尤其对哺乳动物细胞的存活、生长、增殖起到关键作用<sup>[18]</sup>。通路的激活有助于发挥对神经细胞的保护作用, 尤其是在缺血/缺氧神经元受到损伤时。PI3K/Akt 作为一种促细胞存活的内源性保护机制信号通路, 在脑缺血时的神经保护作用受到越来越多的关注<sup>[19]</sup>。当脑损伤发生时, 激活 PI3K, 使 PI3K 磷酸化, 磷酸化的 PI3K 在蛋白 PIP2 作用下, 激活下游蛋白 PDK1, 使 PDK1 蛋白上的苏氨酸(Thr376、Thr373)位点、丝氨酸(Ser241)位点磷酸化, 磷酸化的蛋白在 PIP2 作用下, 活化蛋白 Akt, 使 Akt 蛋白上的 Thr308 位点、Ser473 位点磷酸化, 成为有活性的激酶, 从而激活或抑制下游靶蛋白, 进而调节细胞的凋亡、增殖等<sup>[20-21]</sup>。本研究采用 Real-time PCR、Western blot 法检测了 PI3K/Akt 信号通路上基因、蛋白的水平, 结果表明 GLGZG 干预后, PI3K、Akt 基因水平、PI3K(p85)、p-Akt、PDK1 蛋白表达增加。GLGZG 可能通过激活 p-Akt, 调控 PI3K/Akt 信号通路, 进而抑制 Bax、

Bad 蛋白的表达。

GLGZG 是经典的中药复方制剂,由多味中药组成,含有数百种成分<sup>[22]</sup>。课题组前期研究鉴定了栝楼桂枝汤的 42 个吸收入血成分。包括单萜苷类、黄酮类、酚酸类、姜酚类、三萜皂苷类及没食子酰糖类等<sup>[23]</sup>。推断 GLGZG 改善大鼠脑缺血再灌注损伤的作用可能是因为瓜氨酸、芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、异甘草素和甘草酸等成分入脑而发挥了神经保护作用<sup>[24-25]</sup>。GLGZG 的药效物质基础仍有待深入研究。

综上所述, GLGZG 具有减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的作用,其机制可能与调控 PI3K/Akt 信号通路有关。此外本课题仍有待深入研究,比如 GLGZG 激活 PI3K/Akt 信号通路对减轻卒中后肢体痉挛药效作用的影响还不够明确。今后有必要采用侧脑室注射 LY294002 抑制剂,研究 PI3K/Akt 信号通路被阻断后 GLGZG 对神经元凋亡的抑制作用。另外,还有必要利用体外原代神经细胞,建立氧糖剥夺/复氧模型进行相关研究,体外实验可以更好地控制实验条件,避免多种复杂因素的影响。体内、体外实验相结合,以求更准确阐释 GLGZG 激活 PI3K/AKT 通路抑制神经元凋亡的药理机制。

## REFERENCES

- [1] KIM J, FANN D Y, SEET R C, et al. Phytochemicals in ischemic stroke [J]. *Neuromol Med*, 2016, 18(3): 283-305.
- [2] 杨春梅, 陈立典, 陶静. 古方今用瓜蒌桂枝汤[J]. *辽宁中医杂志*, 2012, 39(8): 1599-1600.
- [3] CHEN Y L, CHEN L D, TAO J. Clinical research on treating limbs spasm from cerebral apoplexy with the Gualou Guizhi decoction [J]. *Clin J Chin Med(中医临床研究)*, 2013, 5(4): 7-9.
- [4] ZHU Y P. Clinical Effect analysis of Trichosanthes Kirilowii Cassia Twig Decoction for treatment of lower limb spasm after cerebral apoplexy patients [J]. *Guide Chin Med(中国医药指南)*, 2015, 13(29): 27-28.
- [5] 战美玲. 脑卒中后下肢痉挛应用栝楼桂枝汤治疗的效果分析[J]. *双足与保健*, 2017, 26(11): 160-161.
- [6] CHEN X, LI H, HUANG M, et al. Effect of Gua Lou Gui Zhi decoction on focal cerebral ischemia-reperfusion injury through regulating the expression of excitatory amino acids and their receptors [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1): 248-254.
- [7] HUANG J, TAO J, XUE X, et al. Gua Lou Gui Zhi decoction exerts neuroprotective effects on post-stroke spasticity via the modulation of glutamate levels and AMPA receptor expression [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(4): 841-848.
- [8] LI Z F, LI R H, MAO J J, et al. Protective effect of Gualou Guizhi decoction on BV-2 cells injured by glutamate [J]. *J Fujian Univ Tradit Chin Med(福建中医药大学学报)*, 2013, 23(5): 14-17.
- [9] LI Z, HU H, LIN R, et al. Neuroprotective effects of Gua Lou Gui Zhi decoction against glutamate-induced apoptosis in

- BV-2 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(3): 597-604.
- [10] HUANG J H, HUANG X H, CHEN Z Y, et al. Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study [J]. *Chin J Clin Pharm Therap(中国临床药理学与治疗学)*, 2004, 9(9): 106-107.
- [11] GAO Y, CHEN T, LEI X, et al. Neuroprotective effects of polydatin against mitochondrial-dependent apoptosis in the rat cerebral cortex following ischemia/reperfusion injury [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6): 5481-5488.
- [12] JI Y, TENG L, ZHANG R, et al. NRG-1 $\beta$  exerts neuroprotective effects against ischemia reperfusion-induced injury in rats through the JNK signaling pathway [J]. *Neuroscience*, 2017(362): 13-24.
- [13] LEVESLEY J, STEELE L, BRÜNING-RICHARDSON A, et al. Selective BCL-xL inhibition promotes apoptosis in combination with MLN8237 in medulloblastoma and pediatric glioblastoma cells [J]. *Neuro Oncol*, 2017, 20(2): 203-214.
- [14] 林羽, 徐伟, 张玉琴, 等. 栝楼桂枝颗粒抗缺血性脑卒中大鼠神经元及原代海马神经元凋亡研究[J]. *康复学报*, 2015, (1): 38-43.
- [15] 王宏运, 张玉琴, 李煌, 等. 栝楼桂枝颗粒对 NMDA 诱导海马神经元兴奋性毒性损伤的保护作用[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(9): 4115-4120.
- [16] JIANG X, TANG X, ZHANG P, et al. Cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside protects primary mouse hepatocytes against glucose-induced apoptosis by modulating mitochondrial dysfunction and the PI3K/Akt pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90(2): 135-144.
- [17] 马陈晨. 新型 PI3K 抑制剂的设计合成及抗肿瘤活性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [18] FAIVRE S, DJELLOUL S, RAYMOND E. New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors [J]. *Semin Oncol*, 2006, 33(4): 407-420.
- [19] XUE X, YOU Y, TAO J, et al. Electro-acupuncture at points of Zusanli and Quchi exerts anti-apoptotic effect through the modulation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2014, (558): 14-19.
- [20] XUE M, JI X, XUE C, et al. Caspase-dependent and caspase-independent induction of apoptosis in breast cancer by fucidan via the PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017(94): 898-908.
- [21] ZHU X, JIANG X, LI A, et al. S-allylmercaptocysteine suppresses the growth of human gastric cancer xenografts through induction of apoptosis and regulation of MAPK and PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(3): 821-826.
- [22] XU W, HUANG M, LI H, et al. Chemical profiling and quantification of Gua-Lou-Gui-Zhi decoction by high performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015(986/987): 69-84.
- [23] XU W, WU X, HUANG M Q, et al. Analysis on pharmacodynamic constituents in Gualou Guizhi Decoction by serum pharmacochimistry [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2017, 48(10): 2033-2043.
- [24] ZHANG Y Q, LI H, XU W, et al. Effects of Gualou Guizhi granule on blood brain barrier permeability and neuroprotection in cerebral ischemia-reperfusion injury rat [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志)*, 2015, 30(5): 1410-1417.
- [25] 陈阿虹, 刘杰, 许文, 等. RRLC-MS/MS 法测定栝楼桂枝颗粒中  $\gamma$ -氨基丁酸和瓜氨酸含量[J]. *福建中医药*, 2015, 46(4): 43-45.

收稿日期: 2018-01-19  
(本文责编: 李艳芳)