

甜菜碱对大鼠脑微血管内皮细胞氧糖剥夺损伤的改善作用及对 PI3K/AKT 通路的影响

陈 敏, 朱慧艳, 陶 静, 徐奕鹏

(新疆维吾尔自治区人民医院康复医学科, 新疆 乌鲁木齐 830001)

[摘 要] **目的:** 探讨甜菜碱在大鼠脑微血管内皮细胞 (BMECs) 氧糖剥夺损伤中的作用, 阐明甜菜碱对磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) / 蛋白激酶 B (AKT) 通路的调节机制。**方法:** 选取 5 只 7 日龄 SD 大鼠, 获取大鼠 BMECs, 在低氧低糖条件下制备 BMECs 氧糖剥夺模型, 分为模型组, 低、中和高剂量甜菜碱组及阳性对照组, 另设空白对照组 (不进行造模), 空白对照组和模型组大鼠 BMECs 给予新鲜培养基, 阳性对照组大鼠 BMECs 给予终浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的尼莫地平, 低、中和高剂量甜菜碱组大鼠 BMECs 分别给予终浓度为 0.5 、 1.0 及 $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甜菜碱。采用 CCK-8 法检测培养 12、24 和 48 h 时各组大鼠 BMECs 存活率, 试剂盒检测各组大鼠 BMECs 中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和三磷酸腺苷 (ATP) 水平, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组大鼠 BMECs 上清液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 和 IL-18 水平, 试剂盒检测各组大鼠 BMECs 中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平, 使用跨内皮电阻 (TEER) 分析仪检测各组大鼠 BMECs 的 TEER 值, 使用插入式细胞培养器检测各组大鼠 BMECs 的辣根过氧化物酶 (HRP) 通透率, 缺口末端标记 (TUNEL) 染色法检测各组大鼠 BMECs 凋亡率, Western blotting 法检测各组大鼠 BMECs 中磷酸化 PI3K (p-PI3K) / PI3K 和磷酸化 AKT (p-AKT) / AKT 比值。**结果:** 与空白对照组比较, 模型组大鼠 BMECs 存活率, SOD 活性, ATP 水平和 TEER 值及大鼠 BMECs 中 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值均明显降低 ($P < 0.05$); LDH 活性, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-18 和 MDA 水平, BMECs 凋亡率和 HRP 通透率均明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 低、中和高剂量甜菜碱组及阳性对照组大鼠 BMECs 存活率, SOD 活性, ATP 水平和 TEER 值及大鼠 BMECs 中 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值均明显升高 ($P < 0.05$); LDH 活性、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-18 和 MDA 水平, BMECs 凋亡率和 HRP 通透率均明显降低 ($P < 0.05$)。**结论:** 甜菜碱能够修复大鼠 BMECs 氧糖剥夺损伤, 抑制 BMECs 氧化损伤及凋亡, 改善大鼠 BMECs 通透性, 其机制可能与调节 PI3K/AKT 通路有关。

[关键词] 甜菜碱; 氧糖剥夺; 再灌注损伤; 磷脂酰肌醇 3 激酶; 蛋白激酶 B

[中图分类号] R96; R743 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-03-14 **[录用日期]** 2024-05-20

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技厅自然科学基金项目 (2022D01C113, 2022D01C125)

[作者简介] 陈 敏 (1986—), 女, 山东省济宁市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事脑血管疾病、骨关节病及老年疾病康复的基础与临床方面的研究。

[通信作者] 徐奕鹏, 副主任医师 (E-mail: penn119@126.com)

© 《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Ameliorating effect of betaine on oxygen-glucose deprivation injury in rat brain microvascular endothelial cells and its influence in PI3K/AKT pathway

CHEN Min, ZHU Huiyan, TAO Jing, XU Yipeng

(Department of Rehabilitation Medicine, People's Hospital, Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of betaine in oxygen-glucose deprivation injury of rat brain microvascular endothelial cells (BMECs), and to clarify the regulatory effect of betaine on phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) pathway. **Methods:** Five SD rats aged 7 d were selected and the rat BMECs were obtained. The oxygen-glucose deprivation model of rat BMECs was prepared under hypoxic and hypoglycemic conditions; the experiment was divided into model group, and low dose, medium dose, and high dose of betaine groups and positive control group, at the same time, blank control group (without modeling) was set up. The BMECs in blank control group and model group were treated with fresh medium, the BMECs in positive control group were given a final concentration of $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ nimodipine, and the BMECs in low, medium and high doses of betaine groups were treated with betaine at final concentration of 0.5, 1.0 and $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The survival rates of BMECs in various groups were determined by CCK-8 method at 12, 24 and 48 h after culture; the activities of lactate dehydrogenase (LDH) and the levels of adenine ribonucleoside triphosphate (ATP) in the rat BMECs in various groups were determined using kits, and the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-1 β , and IL-18 in supernatants of the BMECs in various groups were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the activities of superoxide dismutase (SOD) and levels of malondialdehyde (MDA) in the BMECs in various groups were determined by kits; the transendothelial resistance (TEER) values of rat BMECs in various groups were determined by TEER analyzer, and the horseradish peroxidase (HRP) permeabilities of BMECs in various groups were determined by an insertion cell culture apparatus. TUNEL staining was used to determine the apoptotic rates of rat BMECs in various groups, and Western blotting method was used to determine the ratios of phosphorylated PI3K (p-PI3K)/PI3K and phosphorylated AKT (p-AKT)/AKT in the rat BMECs in various groups. **Results:** Compared with blank control group, the survival rate of BMECs, activity of SOD, and level of ATP, value of TEER, and ratios of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT of the rat BMECs in model group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the activity of LDH, the levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-18, and MDA, the apoptotic rate of the BMECs, and HRP permeability were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the survival rates of the BMECs, activities of SOD, and levels of ATP, values of TEER, and ratios of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT of the BMECs in low, medium, and high doses of betaine groups and positive control group were significantly increased ($P < 0.05$), while the activities of LDH, the levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-18, and MDA, the apoptotic rates of BMECs and HRP permeabilities were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Betaine can significantly repair the oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury in the rat BMECs, inhibit the oxidative damage and apoptosis of BMECs, and improve the permeability of the cells; its mechanism may be related to the regulation of the PI3K/AKT pathway.

KEYWORDS Betaine; Oxygen and sugar deprivation; Reperfusion injury; Phosphoinositide 3-kinase; Protein kinase B

脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMECs) 氧糖剥夺损伤与脑细胞及神经损伤的发生存在密切关联, 研究^[1]表明: 氧糖剥夺再灌注可能导致BMECs炎症反应及氧化应激反应加剧, 影响BMECs的功能, 如不及时干预, 可能导致脑卒中等疾病的发生^[2]。因此, 对于BMECs氧糖剥夺再灌注损伤治疗药物的研发仍是当前研究的重点。磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B (protein kinase B, AKT) 通路是近年来研究并证实与氧糖剥夺再灌注损伤过程存在密切关联的信号通路, PI3K/AKT通路的过度抑制可能是导致BMECs损伤的关键因素^[3-4]。甜菜碱是广泛存在于各种动植物中的生物碱, 具有抗肿瘤和调节血压等多种药理作用^[5-6]。近年来, 研究^[7]表明其在细胞氧糖剥夺再灌注损伤的修复过程中具有较大潜力。然而, 有关甜菜碱对于BMECs氧糖剥夺再灌注的保护作用及其机制的研究尚未见相关报道, 因此本研究探讨甜菜碱对BMECs氧糖剥夺再灌注损伤的保护作用及其机制, 为BMECs氧糖剥夺再灌注损伤治疗药物的研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 5只7日龄SD大鼠, 雄性, 体质量12~20 g, 健康清洁级, 购自新疆医科大学实验动物中心, 实验动物生产许可证号: SCXK(新)2023-0001。本研究动物实验经本院伦理委员会审核批准(批准文号: KY2022061519)。甜菜碱(标准品, 纯度 $\geq 98\%$, 货号: B8230)、尼莫地平(标准品, 纯度 $\geq 98\%$, 货号: SN8560)和磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(货号: P1022)购自北京索莱宝科技有限公司, 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(货号: hlk3939)购自上海佰利莱生物科技有限公司, 三磷酸腺苷(adenosine-triphosphate, ATP)试剂盒(货号: S0026)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒(货号: PT516)、白细胞介素(interleukin, IL)-6试剂盒(货号: PI328)、IL-1 β 试剂盒(货号: PI303)、IL-18试剂盒(货号: PI555)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(货号: S0101)、丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)试剂盒(货号: S0131)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)试剂盒(货号:

ST2569)、缺口末端标记(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)凋亡试剂盒(货号: T2196)、甘油醛3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(货号: AF1186)、磷酸化PI3K(phosphorylated PI3K, p-PI3K)(货号: AF5905)、PI3K(货号: AF7742)、磷酸化AKT(phosphorylated-AKT, p-AKT)(货号: AF1546)、AKT兔抗体(货号: AA326)、山羊抗兔二抗(货号: A0208)、化学发光试剂盒(货号: P0018)和蛋白测定试剂盒(货号: P0011)均购自碧云天生物科技有限公司。Artemis ST型跨内皮电阻(transsepithelium electrical resistant, TEER)分析仪购自荷兰Locsense公司, DM IRB型荧光倒置显微镜购自德国Leica公司, Gel Doc EZ型凝胶成像仪购自美国Bio-Rad公司, Allegra X-30R型高速冷冻离心机购自美国Beckman Coulter公司, iD5型酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司。

1.2 BMECs分离、培养及氧糖剥夺模型的制备

取7日龄新生SD大鼠, 断头处死后, 取大脑皮层, 剪碎后过100目筛, 收集血管组织, 使用0.2%胶原酶消化后, 1 000 r·min⁻¹离心10 min, 弃上清, 得到BMECs, 使用PBS缓冲液清洗3次, 接种于预先涂有1%明胶的培养皿中, 使用含1%双抗的DMEM完全培养基继续培养, 待细胞融合度达80%时进行传代。使用第3代细胞进行后续实验。使用含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM完全培养基, 将BMECs置于37℃、5%CO₂常氧恒温培养箱中培养, 待细胞融合度达90%时开始传代, 并进行后续实验。取对数生长期的BMECs, 使用PBS缓冲液清洗2次后, 使用无糖DMEM培养基, 置于37℃, 94% N₂、5% CO₂和1% O₂恒温小室中培养6 h, 制备BMECs氧糖剥夺模型^[8-9]。

1.3 细胞分组和处理 将氧糖剥夺培养后的大鼠BMECs置于37℃、5%CO₂培养箱中, 分别设置模型组, 低、中和高剂量甜菜碱组及阳性对照组, 另设空白对照组, 不进行造模, 使用完全培养基于37℃、5%CO₂培养箱中正常培养。各剂量甜菜碱组分别给予终浓度为0.5、1.0和2.0 mmol·L⁻¹的甜菜碱^[10], 阳性对照组给予终浓度为10 μ mol·L⁻¹的尼莫地平^[11], 空白对照组更换不含甜菜碱和尼莫地平的新鲜培养液, 置于完全培养基继续培养。每组设置3个复孔。

1.4 CCK-8法检测不同时间点各组大鼠BMECs存活率 各组大鼠BMECs按照“1.3”中的方法给药,另设调零组,只加入培养基和CCK-8试剂,不加细胞和药物,分别培养12、24和48 h,采用CCK-8法检测各组BMECs的存活率。细胞存活率=(实验组A值-调零组A值)/(对照组A值-调零组A值)×100%。

1.5 采用试剂盒检测各组大鼠BMECs中LDH活性和ATP水平 BMECs按照“1.3”中的方法给药后,继续培养24 h,使用胰酶消化并收集各组BMECs,使用试剂盒分别检测各组BMECs中LDH活性和ATP水平。

1.6 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测各组大鼠BMECs上清液中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和IL-18水平 BMECs按照“1.3”中的方法给药后,继续培养24 h,收集细胞上清液,3 500 r·min⁻¹、4℃离心5 min,取上清,ELISA法检测各组大鼠上清液中BMECs中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和IL-18水平。

1.7 采用试剂盒检测各组大鼠BMECs中SOD活性和MDA水平 BMECs按照“1.3”中的方法给药后,继续培养24 h,使用胰酶消化并收集各组BMECs,3 500 r·min⁻¹、4℃离心5 min,弃上清,使用试剂盒检测各组大鼠BMECs中SOD活性和MDA水平。

1.8 采用TEER分析仪和插入式细胞培养器检测各组BMECs的TEER值及HRP通透率 BMECs按照“1.3”中的方法给药后,继续培养24 h,使用TEER分析仪测定各组BMECs的TEER值,使用插入式细胞培养器测定各组BMECs的HRP通透率^[12-13]。HRP通透率=受体池HRP浓度×受体池培养液体积/(供体池HRP浓度×供体池培养液体积)×100%。

1.9 TUNEL法检测各组大鼠BMECs凋亡率 BMECs按照“1.3”中的方法给药后,继续培养24 h,使用TUNEL试剂盒测定各组大鼠BMECs凋亡率。细胞凋亡率=TUNEL阳性细胞数/总细胞数×100%。

1.10 Western blotting法检测各组大鼠BMECs中p-PI3K、PI3K、p-AKT和AKT蛋白表达水平 BMECs按照“1.3”中的方法给药后,继续培养24 h,使用胰酶消化并收集BMECs,使用细胞裂解液充分裂解后,8 000 r·min⁻¹、4℃离心10 min,

取上清,采用蛋白测定试剂盒测定总蛋白浓度,取蛋白浓度为40 μ g的裂解液,依次经电泳、分离和转膜后,使用质量分数为5%的脱脂牛奶室温封闭1 h,分别经GAPDH、p-PI3K、PI3K、p-AKT和AKT兔抗体(所有抗体按照1:500稀释)4℃孵育过夜,PBS缓冲液清洗3次,山羊抗兔二抗(1:1 000稀释)室温孵育1 h,PBS缓冲液再次清洗3次,使用化学发光液,置于凝胶成像系统拍照,计算p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值。

1.11 统计学分析 采用SPSS 26.0软件进行统计学分析。各组大鼠BMECs存活率,BMECs中LDH和SOD活性以及ATP和MDA水平,BMECs上清中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和IL-18水平,BMECs的TEER值、HRP通透率和细胞凋亡率,BMECs中p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间点各组大鼠BMECs存活率 与空白对照组比较,培养12、24和48 h时模型组大鼠BMECs存活率明显降低($P<0.05$);与模型组比较,培养12、24和48 h时,低、中和高剂量甜菜碱组及阳性对照组大鼠BMECs存活率明显升高($P<0.05$),且随着甜菜碱剂量的升高,培养12、24和48 h时大鼠BMECs存活率逐渐升高。依据大鼠BMECs存活率结果,确定后续实验BMECs给药后培养时间为24 h。见表1。

2.2 各组大鼠BMECs中LDH活性和ATP水平 与空白对照组比较,模型组大鼠BMECs中LDH活性明显升高($P<0.05$),ATP水平明显降低($P<0.05$);与模型组比较,低、中和高剂量甜菜碱组及阳性对照组大鼠BMECs中LDH活性明显降低($P<0.05$),ATP水平明显升高($P<0.05$),且随着甜菜碱剂量的升高,大鼠BMECs中LDH活性逐渐降低($P<0.05$),ATP水平逐渐升高($P<0.05$)。见表2。

2.3 各组大鼠BMECs上清液中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和IL-18水平 与空白对照组比较,模型组大鼠BMECs上清液中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和IL-18水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,低、中和高剂量甜菜碱组及阳性对照组大鼠BMECs上清液中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 以及IL-18水平明显降低

表1 各组大鼠BMECs存活率

Tab. 1 Survival rates of rat BMECs in various groups

 $(n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%)$

Group	Survival rate			
	(t/h)	12	24	48
Blank control		100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
Model		42.26±1.72*	46.08±2.90*	35.68±3.31*
Positive control		96.04±4.47 [△]	92.73±5.26 [△]	88.71±0.96 [△]
Betaine				
Low dose		64.97±0.70 ^{△#}	70.97±1.50 ^{△#}	67.28±5.20 ^{△#}
Medium dose		78.25±4.98 ^{△#○}	84.88±3.25 ^{△#○}	76.13±3.70 ^{△#○}
High dose		89.44±1.88 ^{△#□}	93.26±2.98 ^{△#□}	81.97±3.00 ^{△#□}

* $P<0.05$ compared with blank control group; [△] $P<0.05$ compared with model group; [#] $P<0.05$ compared with positive control group; [○] $P<0.05$ compared with low dose of betaine group; [□] $P<0.05$ compared with medium dose of betaine group.

表2 各组大鼠BMECs中LDH活性和ATP水平

Tab. 2 Activities of LDH and levels of ATP in rat BMECs in various groups

 $(n=3, \bar{x} \pm s)$

Group	LDH/	ATP
	$[\lambda_B/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})]$	$[m_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})]$
Blank control	36.21±1.13	3.57±0.10
Model	105.18±2.77*	0.32±0.04*
Positive control	49.43±2.38 [△]	2.52±0.26 [△]
Betaine		
Low dose	81.67±2.68 ^{△#}	1.16±0.12 ^{△#}
Medium dose	58.99±4.90 ^{△#○}	2.05±0.10 ^{△#○}
High dose	47.94±4.28 ^{△#□}	3.27±0.15 ^{△#□}

* $P<0.05$ compared with blank control group; [△] $P<0.05$ compared with model group; [#] $P<0.05$ compared with positive control group; [○] $P<0.05$ compared with low dose of betaine group; [□] $P<0.05$ compared with medium dose of betaine group.

($P<0.05$), 且随着甜菜碱剂量的增加, 大鼠BMECs上清液中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和IL-18水

平逐渐降低 ($P<0.05$)。见表3。

2.4 各组大鼠BMECs中SOD活性和MDA水平

与空白对照组比较, 模型组大鼠BMECs中SOD活性明显降低 ($P<0.05$), MDA水平明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 低、中和高剂量甜菜碱组及阳性对照组大鼠BMECs中SOD活性明显升高 ($P<0.05$), MDA水平明显降低 ($P<0.05$), 且随着甜菜碱剂量的升高, 大鼠BMECs中SOD活性逐渐升高 ($P<0.05$), MDA水平逐渐降低 ($P<0.05$)。见表4。

2.5 各组大鼠BMECs的TEER值和HRP通透率

与空白对照组比较, 模型组大鼠BMECs的TEER值降低 ($P<0.05$), HRP通透率升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 低、中和高剂量甜菜碱组及阳性对照组大鼠BMECs的TEER值升高 ($P<0.05$), HRP通透率降低 ($P<0.05$), 且随着甜菜碱剂量的升高, 大鼠BMECs的TEER值逐渐升高 ($P<0.05$),

表3 各组大鼠BMECs上清液中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和IL-18水平Tab. 3 Levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and IL-18 in supernatants of rat BMECs in various groups $(n=3, \bar{x} \pm s, \rho_B/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}))$

Group	TNF- α	IL-6	IL-1 β	IL-18
Blank control	213.68±7.58	69.91±4.92	29.51±0.79	68.78±6.42
Model	1 068.56±6.82*	846.25±15.75*	103.59±6.90*	350.93±9.56*
Positive control	323.36±2.74 [△]	112.20±9.02 [△]	44.53±3.31 [△]	95.89±2.85 [△]
Betaine				
Low dose	526.85±2.47 ^{△#}	509.14±16.16 ^{△#}	86.91±5.25 ^{△#}	234.14±4.79 ^{△#}
Medium dose	427.25±5.22 ^{△#○}	227.26±7.09 ^{△#○}	60.44±4.09 ^{△#○}	164.55±4.09 ^{△#○}
High dose	279.35±2.27 ^{△#□}	110.96±3.72 ^{△#□}	39.70±2.64 ^{△#□}	85.63±14.69 ^{△#□}

* $P<0.05$ compared with blank control group; [△] $P<0.05$ compared with model group; [#] $P<0.05$ compared with positive control group; [○] $P<0.05$ compared with low dose of betaine group; [□] $P<0.05$ compared with medium dose of betaine group.

表4 各组大鼠BMECs中SOD活性和MDA水平

Tab. 4 Activities of SOD and levels of MDA in rat BMECs in various groups (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Group	SOD [$\lambda_B/(U\cdot mg^{-1})$]	MDA [$m_B/(\mu mol\cdot g^{-1})$]
Blank control	131.32±4.87	1.00±0.08
Model	65.92±6.92*	5.17±0.15*
Positive control	111.41±5.88 [△]	2.07±0.04 [△]
Betaine		
Low dose	99.03±0.64 ^{△#}	4.04±0.13 ^{△#}
Medium dose	115.82±2.31 ^{△○}	3.64±0.04 ^{△#○}
High dose	128.63±4.03 ^{△#○□}	1.69±0.17 ^{△#○□}

*P<0.05 compared with blank control group; [△]P<0.05 compared with model group; #P<0.05 compared with positive control group; [○]P<0.05 compared with low dose of betaine group; [□]P<0.05 compared with medium dose of betaine group.

表5 各组大鼠BMECs的TEER值和HRP通透率

Tab. 5 Values of TEER and HRP permeabilities of rat BMECs in various groups (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Group	TEER($\Omega\cdot cm^{-2}$)	HRP permeability ($\eta/\%$)
Blank control	48.40±1.63	0.44±0.16
Model	14.75±3.71*	4.98±0.06*
Positive control	39.59±0.89 [△]	1.50±0.08 [△]
Betaine		
Low dose	26.89±3.79 ^{△#}	4.23±0.09 ^{△#}
Medium dose	37.84±4.13 ^{△○}	2.96±0.13 ^{△#○}
High dose	47.21±6.54 ^{△#○□}	1.16±0.04 ^{△#○□}

*P<0.05 compared with blank control group; [△]P<0.05 compared with model group; #P<0.05 compared with positive control group; [○]P<0.05 compared with low dose of betaine group; [□]P<0.05 compared with medium dose of betaine group.

HRP 通透率逐渐降低 (P<0.05)。见表5。

2.6 各组大鼠BMECs凋亡率 与空白对照组 (1.01%±0.19%) 比较, 模型组大鼠BMECs凋亡率 (44.35%±2.46%) 明显升高 (P<0.05); 与模型组比较, 低 (31.78%±1.60%)、中 (17.40%±0.66%) 和高 (6.10%±0.89%) 剂量甜菜碱组及阳性对照组 (6.37%±0.83%) 大鼠BMECs凋亡率明显降低 (P<0.05), 且随着甜菜碱剂量的升高, 大鼠BMECs凋亡率逐渐降低 (P<0.05)。见图1。

2.7 各组大鼠BMECs中p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值 与空白对照组比较, 模型组大鼠BMECs中p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值明显降低 (P<0.05); 与模型组比较, 低、中和高剂量甜菜碱组及阳性对照组大鼠BMECs中p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值明显升高 (P<0.05), 且随着甜菜碱剂量的升高, 大鼠BMECs中p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值逐渐升高 (P<0.05)。见图2和表6。

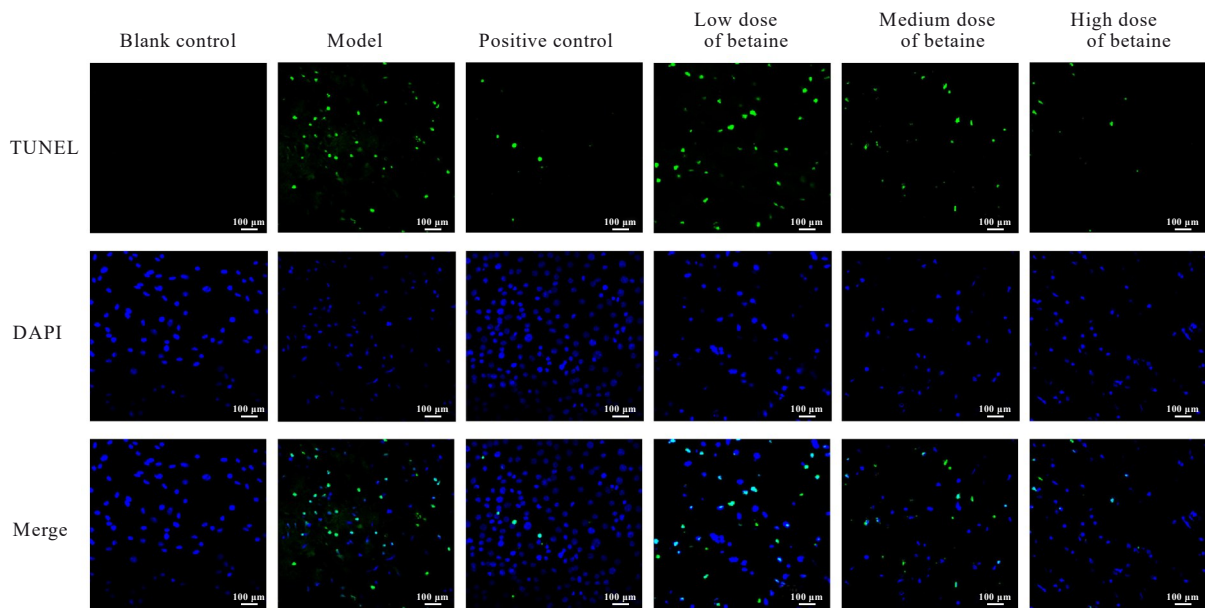
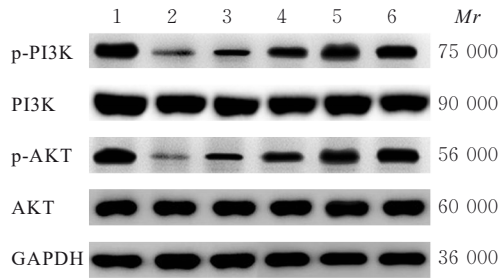


图1 各组大鼠BMECs凋亡情况

Fig. 1 Apoptosis of rat BMECs in various groups



Lane 1: Blank control group; Lane 2: Model group; Lane 3: Low dose of betaine group; Lane 4: Medium dose of betaine group; Lane 5: High dose of betaine group; Lane 6: Positive control group.

图2 各组大鼠BMECs中p-PI3K、PI3K、p-AKT和AKT蛋白表达电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of expressions of p-PI3K, PI3K, p-AKT, and AKT proteins in rat BMECs in various groups

表6 各组大鼠BMECs中p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT比值
Tab. 6 Ratios of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT in rat BMECs in various groups (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
Blank control	0.87±0.09	0.96±0.04
Model	0.36±0.03*	0.30±0.05*
Positive control	0.75±0.04 [△]	0.77±0.04 [△]
Betaine		
Low dose	0.47±0.04 ^{△#}	0.46±0.02 ^{△#}
Medium dose	0.67±0.04 ^{△#○}	0.57±0.04 ^{△#○}
High dose	0.90±0.05 ^{△#□}	0.90±0.04 ^{△#□}

* $P < 0.05$ compared with blank control group; [△] $P < 0.05$ compared with model group; [#] $P < 0.05$ compared with positive control group; [○] $P < 0.05$ compared with low dose of betaine group; [□] $P < 0.05$ compared with medium dose of betaine group.

3 讨论

脑卒中具有发生率高、死亡风险大和预后差等特点，而脑血管内皮细胞损失是导致脑卒中发生发展的关键因素^[14-15]。缺血缺氧环境引发的BMECs细胞氧糖剥夺是导致脑血管内皮细胞和神经细胞损伤的重要原因。因此，抑制BMECs氧糖剥夺/再灌注损伤可能是预防脑血管病变及脑卒中发生的重要途径。研究^[16-18]显示：甜菜碱对于缺血再灌注损伤的治疗具有显著的改善作用，其在细胞缺血缺氧后再灌注损伤的修复中具有较大潜力。因此，本研究探讨甜菜碱对大鼠BMECs氧糖剥夺/再灌注损伤的修复作用及其机制，为甜菜碱的药理作用研究提供参考。

LDH是细胞氧糖剥夺的重要代谢标志物^[19-20]，夏霜莉等^[21]研究显示：降低LDH活性能够显著改善大鼠脑血管内皮细胞和神经元细胞损伤。由此可见，调节大鼠BMECs代谢水平，抑制LDH释放，是改善大鼠BMECs氧糖剥夺/再灌注损伤的有效途径。同时，TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和IL-18水平是反映细胞损伤及炎症水平的重要标志^[22-24]，调节TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和IL-18水平可能是治疗BMECs氧糖剥夺/再灌注损伤的有效途径和方法。本研究结果表明：甜菜碱能够呈剂量依赖性地抑制LDH释放，调节BMECs中ATP水平，进而显著改善氧糖剥夺/再灌注后BMECs炎症损伤，降低TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和IL-18水平。同时，甜菜碱呈剂量依赖性升高SOD活性并降低MDA水平，进一步改善BMECs氧化损伤，缓解炎症损伤，与文献^[25-26]报道结果一致。

TEER值是反映BMECs通透性的重要指标，张创等^[27]研究表明：TEER值降低与脑缺血再灌注小鼠BMECs通透性降低有关；陈丽等^[28]研究表明：TEER值下调与缺血再灌注大鼠血脑屏障通透性改变有关，上调TEER值与缓解血脑屏障通透性及减轻脑组织缺血后损伤有关联。由此可见，调节TEER值可能是改善BMECs氧糖剥夺/再灌注损伤的有效途径。窦晋芳等^[29]研究表明：HRP通透率升高与血脑屏障结构和功能存在关联，孙瑞等^[30]研究表明：降低HRP通透率可显著改善BMECs通透性。本研究结果表明：与模型组比较，各剂量甜菜碱组大鼠BMECs的TEER值呈剂量依赖性升高，HRP通透率降低，进而调节BMECs通透性，修复大鼠BMECs损伤。

PI3K/AKT通路是近年来发现的与BMECs氧糖剥夺/再灌注损伤相关的重要信号通路^[31-32]。王圣鑫等^[33]研究表明：氧糖剥夺/再灌注损伤的发生与HT22细胞中PI3K/AKT通路的过度抑制有关，激活PI3K/AKT通路能够显著修复细胞氧化应激损伤。由此可见，调节PI3K/AKT通路可能是修复BMECs损伤的有效途径和方法。本研究结果表明：与模型组比较，各剂量甜菜碱组大鼠BMECs中PI3K和AKT蛋白磷酸化水平呈剂量依赖性升高，大鼠BMECs存活率明显升高，抑制BMECs凋亡，促进BMECs氧糖剥夺/再灌注损伤的恢复。

综上所述，甜菜碱能够修复大鼠BMECs氧糖剥夺/再灌注损伤，抑制BMECs氧化损伤及凋亡，

改善大鼠BMECs通透性,其机制可能与调节PI3K/AKT通路有关。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

陈敏参与实验过程和论文撰写,朱慧艳和陶静参与实验过程、数据收集整理及统计学分析,徐奕鹏参与实验设计和论文审校。

[参考文献]

- [1] LIU D, XIAO H T, LIU J X, et al. Circ_0000566 contributes oxygen-glucose deprivation and reoxygenation (OGD/R)-induced human brain microvascular endothelial cell injury via regulating miR-18a-5p/ACVR2B axis[J]. *Metab Brain Dis*, 2023, 38(4): 1273-1284.
- [2] LIU W, JIA C, LUO L, et al. Novel circular RNAs expressed in brain microvascular endothelial cells after oxygen-glucose deprivation/recovery [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(12): 2104-2111.
- [3] SHI G, CHEN J M, ZHANG C, et al. Astragaloside IV promotes cerebral angiogenesis and neurological recovery after focal ischemic stroke in mice via activating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Heliyon*, 2023, 9(12): e22800.
- [4] WANG D P, JIN K Y, ZHAO P, et al. Neuroprotective effects of VEGF-A nanofiber membrane and FAAH inhibitor URB597 against oxygen-glucose deprivation-induced ischemic neuronal injury [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16(1): 3661-3678.
- [5] 李顺泽, 伍振煌, 王俊龙. 甜菜碱的生物功能、药理活性及其在动物生产中的应用研究进展[J]. *饲料研究*, 2022, 45(21): 150-155.
- [6] 李亚杰, 张航, 聂黎虹, 等. 甜菜碱抑制ABCBI逆转前列腺癌化疗耐药性的作用及其机制[J/OL]. *解放军医学杂志*, 1-12 [2025-03-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1056.R.20240508.1120.002.html>.
- [7] SARLAK M, ROUMIANI E, KHERADMAND A, et al. Evaluating the effects of betaine on testicular ischemia/reperfusion injury induced by torsion/detorsion in the rat[J]. *Andrologia*, 2022, 54(10): e14559.
- [8] 张蕴, 韩新生, 张洪阳, 等. N-乙酰半胱氨酸通过AMPK/SIRT1途径抑制缺氧诱导的大鼠脑微血管内皮细胞损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(2): 107-112.
- [9] 杨华, 何强华, 张爱华, 等. 丹参酮II A通过抑制TLR4/NF- κ B途径减轻糖氧剥夺对大鼠脑微血管内皮细胞的炎症损伤[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2020, 25(9): 610-612.
- [10] 金莉莉, 于炎巧, 朱晓玉, 等. 甜菜碱及叶酸的降血脂和抗氧化作用[J]. *辽宁大学学报(自然科学版)*, 2019, 46(2): 142-150.
- [11] 戴纪恒, 吴思鹏, 汪宁, 等. 通窍活血汤含药脑脊液对OGD/R损伤大鼠BMECs的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(14): 42-52.
- [12] 徐露, 张太君. 冰片联合灯盏花素对缺氧/复氧损伤血脑屏障通透性的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(2): 76-78.
- [13] 张欢, 丁纪茹, 陈耀, 等. 消渴通痹颗粒对高糖诱导的HUVEC屏障功能的影响及保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(3): 168-175.
- [14] QIAN Y, TANG B, ZHANG H, et al. Highly-expressed circ_0129657 inhibits proliferation as well as promotes apoptosis and inflammation in HBMECs after oxygen-glucose deprivation via miR-194-5p/GMFB axis[J]. *Autoimmunity*, 2023, 56(1): 2201405.
- [15] XU C, YU H L, CHEN B L, et al. Serum exosomal mir-340-5p promotes angiogenesis in brain microvascular endothelial cells during oxygen-glucose deprivation [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(4): 907-920.
- [16] 邱阳, 黄力新, 贺师鹏. 甜菜碱对大鼠肝细胞膜表皮生长因子受体及其酪氨酸蛋白激酶的作用[J]. *北京医科大学学报*, 1999, 31(4): 302-305.
- [17] 谢竹青, 马连龙, 王辉, 等. 甜菜碱对大鼠肝脏缺血-再灌注损伤的作用[J]. *中国新药与临床杂志*, 2020, 39(1): 48-52.
- [18] 向家培, 华晓芳, 王勇, 等. 甜菜碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤炎症及心肌细胞凋亡的影响[J]. *安徽医学*, 2018, 39(11): 1297-1300.
- [19] LU L, LU T T, SHEN J L, et al. Alisol A 24-acetate protects against brain microvascular endothelial cells injury through inhibiting miR-92a-3p/tight junctions axis[J]. *Aging*, 2021, 13(11): 15353-15365.
- [20] WU Z Y, LIANG Y D, YU S Z. Downregulation of microRNA-103a reduces microvascular endothelial cell injury in a rat model of cerebral ischemia by targeting AXIN2[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(5): 4720-4733.
- [21] 夏霜莉, 杨媛, 廖陈, 等. 3,4-二羟基苯甲醛作用星形胶质细胞减轻脑微血管内皮细胞和神经元氧糖剥夺/再灌注损伤[J]. *上海中医药大学学报*, 2021, 35(4): 67-72, 100.
- [22] FAN Y L, DING S H, SUN Y M, et al. MiR-377 regulates inflammation and angiogenesis in rats after cerebral ischemic injury [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 327-337.

- [23] HE Z R, ZHAO Y Y, ZHU Y X, et al. Interfering TUG1 attenuates cerebrovascular endothelial apoptosis and inflammatory injury after cerebral ischemia/reperfusion via TUG1/miR-410/FOXO3 ceRNA axis[J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(1): 1-13.
- [24] RESCHKE M, SALVADOR E, SCHLEGEL N, et al. Isosteviol sodium (STVNA) reduces pro-inflammatory cytokine IL-6 and GM-CSF in an *in vitro* murine stroke model of the blood-brain barrier (BBB) [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(9): 1753.
- [25] 王 慧, 兰小兵, 郑 萍, 等. 獐牙菜苦苷对PC12细胞氧糖剥夺再灌注损伤的保护作用及机制[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2022, 36(2): 90-97.
- [26] 高 伟, 李慧颖, 李 丹. 普拉克索下调TXNIP表达对氧糖剥夺/再灌注心肌细胞p38/JNK通路的作用研究[J]. *河北医药*, 2023, 45(7): 965-970.
- [27] 张 创, 余孝君, 唐 波, 等. 胱天蛋白酶11介导的Hippo信号通路在脑缺血再灌注小鼠血脑屏障破坏中的作用和机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(2): 250-258.
- [28] 陈 丽, 折 霞, 谷超超, 等. 脂肪酸结合蛋白7对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障通透性的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2020, 37(11): 1004-1010.
- [29] 窦晋芳, 常佩芬, 胡超群, 等. 清开灵注射液对A β 42刺激下小鼠体外血脑屏障转运A β 的影响及机制研究[J]. *现代中医临床*, 2021, 28(3): 28-33.
- [30] 孙 瑞, 于德水. 抑制miR-429促进ZO-1、Occludin和Claudin-5蛋白表达改善血脊髓屏障通透性的体外实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2020, 34(9): 1163-1169.
- [31] HUA Y P, ZHAI Y, WANG G Y, 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, 298: 115585.
- [32] LI Y Z, GUO S Q, LIU W C, et al. Silencing of SNHG12 enhanced the effectiveness of MSCs in alleviating ischemia/reperfusion injuries via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 645.
- [33] 王圣鑫, 闫向丽, 郑昊圳, 等. 毛蕊异黄酮苷和芍药苷联用对氧糖剥夺再灌注HT22细胞PI3K/AKT信号通路的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(2): 138-142.