

# Biphalin 激活 PI3K/Akt 通路减轻氧糖剥夺/复氧诱导的神经元损伤

陈玲, 张锦佳, 黄宇钧, 陆媛, 闵加威\*

(中南民族大学 生物医学工程学院, 武汉 430074)

**摘要** 为了探究 biphalin 对氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)诱导的原代皮层神经元细胞损伤的影响及其机制,将神经元细胞分5组处理:对照组常规培养;OGD/R组仅构建 OGD/R 损伤模型;OGD/R + biphalin 组细胞于造模过程中加入不同浓度 biphalin (0.01、0.1、1、10 nmol/L);OGD/R + biphalin + 纳洛酮组细胞在造模过程中用 0.1 nmol/L biphalin 和 0.1 mmol/L 纳洛酮处理;OGD/R + biphalin + LY294002 组细胞在造模过程中用 0.1 nmol/L biphalin 和 20  $\mu$ mol/L LY294002 处理. 采用 CCK-8 法、乳酸脱氢酶(LDH)释放法、碘化丙啶(PI)染色法测定 biphalin 对神经元细胞的影响. 采用蛋白质印迹法检测 Bcl-2、Bax、cleaved-caspase-3、p-PI3K、PI3K、p-Akt 和 Akt 的蛋白表达情况. 经 CCK-8 法检测细胞活力,选定 0.1 nmol/L biphalin 为最佳给药剂量. 与对照组相比,模型组细胞活力明显下降,细胞凋亡率和 LDH 释放量增加,cleaved-caspase-3 和 Bax 表达量升高. Biphalin 处理组细胞较模型组存活率显著提高,LDH 释放量减少,cleaved-caspase-3 和 Bax 表达量减少,Bcl-2 水平和 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值升高. 而阿片拮抗剂纳洛酮和 PI3K 抑制剂 LY294002 可以显著逆转 biphalin 的上述作用效果. 这表明 biphalin 通过阿片受体激活 PI3K/Akt 通路从而减轻了 OGD/R 介导的神经元损伤.

**关键词** biphalin 肽;新生儿缺氧缺血性脑损伤;氧糖剥夺/复氧(OGD/R);PI3K/Akt 通路;原代皮层神经元细胞

**中图分类号** R965.1 **文献标志码** A **文章编号** 1672-4321(2025)03-0357-08

**doi**:10.20056/j.cnki.ZNMDZK.20240727

## Biphalin alleviated oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal injury by activating PI3K/Akt signaling pathway

CHEN Ling, ZHANG Jinjia, HUANG Yujun, LU Yuan, MIN Jiawei\*

(College of Biomedical Engineering, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China)

**Abstract** To investigate the effects and mechanism of biphalin on primary cortical neuronal injury induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R), neurons were randomly divided into five groups, namely the control group (without intervention), the OGD/R group (underwent OGD/R only), the OGD/R + biphalin group (treated with 0.01, 0.1, 1, and 10 nmol/L biphalin during OGD/R), the OGD/R + biphalin + naloxone group (treated with 0.1 nmol/L biphalin and 0.1 mmol/L naloxone during OGD/R), the OGD/R + biphalin + LY294002 group (treated with 0.1 nmol/L biphalin and 20  $\mu$ mol/L LY294002 during OGD/R). Cell counting kit-8 (CCK-8), lactate dehydrogenase (LDH) assays and propidium iodide (PI) staining were performed to analyse the effects of biphalin on primary cortical neurons. The protein expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved-caspase-3, p-PI3K, PI3K, p-Akt and Akt were measured by Western blotting. Due to the greatest neuroprotection of biphalin was observed at 0.1 nmol/L, this concentration was chosen for subsequent studies. The decreased cell viability and increased cell death and LDH release were observed after OGD/R compared to the control group. The levels of cleaved-caspase-3 and Bax significantly increased in OGD/R group compared with the control group.

**收稿日期** 2023-11-01

\* **通信作者** 闵加威(1988-),男,副教授,博士,研究方向:神经系统损伤及其修复,E-mail:jiawei-min@hotmail.com

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目(82301574);湖北省自然科学基金资助项目(2024AFB875);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(CZQ23030);中南民族大学科学研究基金资助项目(YZZ19018)

Compared with the OGD/R group, biphalin significantly increased the survival rate and the level of Bcl-2 and the ratios of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt, reduced LDH release and the protein levels of cleaved-caspase-3 and Bax. However, both of them were mostly suppressed by the opioid antagonist naloxone and the PI3K inhibitor LY294002 respectively. These results suggest that biphalin protected against OGD/R injury in primary cortical neurons by activating PI3K/Akt signaling pathway via opioid receptor.

**Keywords** biphalin; neonatal hypoxic-ischemic brain injury; oxygen-glucose deprivation/ reoxygenation; PI3K/Akt signaling pathway; primary cortical neurons

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是由围产期缺氧窒息引发的一种急症<sup>[1]</sup>. 该病具有发病率高、致死率高的特点,且易诱发脑瘫、视觉和听觉障碍、癫痫以及孤独症等不良神经发育结果<sup>[2]</sup>. 目前,亚低温治疗是HIE唯一可靠的治疗手段<sup>[3]</sup>. 虽然相关研究表明亚低温疗法可以改善新生儿的远期预后,降低临床HIE死亡率<sup>[4]</sup>. 但是值得注意的是,仍有大量新生儿因此死亡或伴有严重不可逆性脑损害<sup>[5]</sup>. 因此,寻找新的治疗方法尤为重要.

Biphalin 是一种由 LIPKOWSKI 等于 1982 年首次合成并报道的二聚肽. 作为一种非选择性阿片受体激动剂, biphalin 具有镇痛、抗病毒、抗氧化、降血压、抗恶性细胞增殖等多种药理作用<sup>[6]</sup>. 有研究表明 biphalin 对缺血性脑卒中和轻度脑损伤有一定的神经保护作用<sup>[7-8]</sup>. 此外, biphalin 可以保护小鼠原代皮层神经元细胞免受谷氨酸介导的神经毒性<sup>[9]</sup>. PI3K/Akt 信号通路是细胞内关键信号通路, 它参与细胞内增殖、分化、自噬、凋亡等生命活动<sup>[10]</sup>. 据报道, 阿片受体介导的 PI3K/Akt 通路的激活可以减少缺氧-复氧诱导的成年大鼠心肌细胞损伤<sup>[11]</sup>. 本课题组前期研究结果表明 biphalin 可通过阿片受体调控 PI3K/Akt 信号通路来减轻新生小鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)<sup>[12]</sup>. 然而, biphalin 对氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)诱导的原代皮层神经元细胞损伤是否具有保护作用尚未可知. 因此,本研究通过体外构建 OGD/R 模型来探究 biphalin 对原代皮层神经元细胞的影响及其潜在作用机制.

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

多聚赖氨酸(索莱宝); B-27 添加剂、青霉素-链霉素溶液(双抗)、谷氨酰胺、Neurobasal 培养基、无糖 DMEM 培养基(美国 Gibco); Biphalin(南京肽业); 纳

洛酮(美国 TargetMol); LY294002(美国 Selleck Chemicals); LDH 试剂盒(南京建成); 碘化丙啶染料(翌圣生物); NeuN 抗体(英国 Abcam); 荧光二抗、蛋白酶抑制剂、RIPA 裂解液、脱脂奶粉、山羊抗兔二抗(白鲨); CCK-8 试剂盒、BCA 试剂盒、ECL 化学发光试剂盒(碧云天); SDS-PAGE 凝胶(雅酶); PVDF 膜(美国 Millipore); Bcl-2 抗体、Bax 抗体、cleaved-caspase-3 抗体、磷酸化 Akt 抗体、Akt 抗体(美国 Cell Signaling Technology); 磷酸化 PI3K 抗体、PI3K 抗体、 $\beta$ -actin 抗体(爱博泰克); 细胞培养箱、酶标仪(美国赛默飞); 缺氧小室(加拿大 StemCell Technologies); 激光共聚焦显微镜(日本尼康).

### 1.2 原代皮层神经元的培养

实验方法参考之前研究<sup>[13]</sup>. 取孕 16~18 d C57BL/6 胎鼠, 于冰上剔除脑膜以及血管, 分离大脑皮质并剪碎, 0.05% 胰酶消化 12 min 后接种于经多聚赖氨酸包被的培养皿中, 2 h 后加入含有 2% B-27、1% 青霉素-链霉素溶液和 2 mmol/L 谷氨酰胺的 Neurobasal 培养基, 置于温度为 37 °C、CO<sub>2</sub> 体积分数为 5% 的培养箱中常规培养, 每三天半量换液一次.

### 1.3 OGD/R 模型的构建

根据参考文献[14], 吸弃原培养基, 加入无糖 DMEM 培养基(预先通以 95% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 混合气)后将细胞培养皿置于缺氧小室中. 向缺氧小室中持续通以 5 min 95% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 混合气后将缺氧小室放入细胞培养箱. 4 h 后将无糖 DMEM 培养基更换为 Neurobasal 培养基并将其放回细胞培养箱继续培养 24 h 用于后续实验. 对照组细胞一直在完全培养基和正常环境中培养.

### 1.4 实验分组

将原代皮层神经元细胞随机分为 5 组: 对照组; OGD/R 组; OGD/R + biphalin 组; OGD/R + biphalin + 纳洛酮组; OGD/R + biphalin + LY294002 组. Biphalin 溶于生理盐水以制备储备液(1  $\mu$ mol/L), 用培养基稀释至特定浓度(0.01、0.1、1、10 nmol/L)后在造模过程中用于处理神经元. 阿片拮抗剂纳洛酮(0.1 mmol/L,

溶于1%生理盐水)和PI3K抑制剂LY294002(20  $\mu\text{mol/L}$ ,溶于0.1% DMSO)于造模前加入并持续存在于OGD/R期间<sup>[7,15]</sup>。

### 1.5 CCK-8法测定细胞活力

将原代皮层神经元细胞以 $2 \times 10^4$ /孔的密度接种于96孔板,按各实验分组要求处理完毕后依照说明书每孔加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8溶液,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育2.5 h后置于450 nm波长下检测吸光度值。每组实验设8个复孔,以对照组的吸光度值为100%,实验组细胞活力按以下公式计算:细胞活力=(实验组吸光度值/对照组吸光度值)  $\times$  100%。

### 1.6 乳酸脱氢酶(LDH)释放法检测细胞损伤程度

将原代皮层神经元细胞以 $2 \times 10^5$ /孔的密度接种于96孔板并按各实验分组要求处理。取各组细胞上清液,按说明书要求加入LDH检测工作液后采用酶标仪于450 nm处检测吸光度值。每组实验设8个复孔,以对照组的吸光度值为1,实验组LDH释放量按以下公式计算:LDH释放量=实验组吸光度值/对照组吸光度值。

### 1.7 碘化丙啶(PI)染色法测定细胞凋亡情况

根据参考文献[16],将原代皮层神经元细胞以 $1.5 \times 10^5$ /孔的密度接种于24孔板。按实验分组要求进行相应处理后吸弃培养基,PBS清洗2次,每孔加入300  $\mu\text{L}$  PI染液(1:3000),室温孵育20 min。PBS清洗后加入4%多聚甲醛室温固定30 min。0.25% Triton X-100破膜5 min后加入5% BSA室温封闭30 min,PBS清洗,随后加入NeuN抗体(1:500)于4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,最后加入荧光二抗避光孵育1 h。将细胞置于20倍镜的激光共聚焦显微镜下,每个样本随机选取六个视野观察并拍照保存。每组四个样本,细胞凋亡率=[PI阳性细胞个数(红色)/总细胞个数(绿色)]  $\times$  100%。

### 1.8 蛋白质印迹法测定相关蛋白表达情况

根据参考文献[17],将原代皮层神经元细胞以 $7 \times 10^5$ /孔的密度接种于6孔板并按要求做相应处理。加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液后,4  $^{\circ}\text{C}$  12000 r/min离心15 min,取上清,用BCA方法测定蛋白浓度。等量蛋白经SDS-PAGE分离,然后转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭1 h。分别加入Bcl-2抗体(1:1000),Bax抗体(1:1000),cleaved-caspase-3抗体(1:1000),磷酸化PI3K抗体(1:500),PI3K抗体(1:2000),磷酸化Akt抗体(1:1000),Akt抗体(1:1000),和 $\beta$ -actin抗体(1:50000)4  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。然后加入山羊抗兔二抗在室温下孵育1 h,用

ECL化学发光试剂盒进行显影。最后使用Quantity One 4.6.1软件对条带进行分析,每组三个样本,最终结果以目的蛋白与内参蛋白的吸光度比值表示。

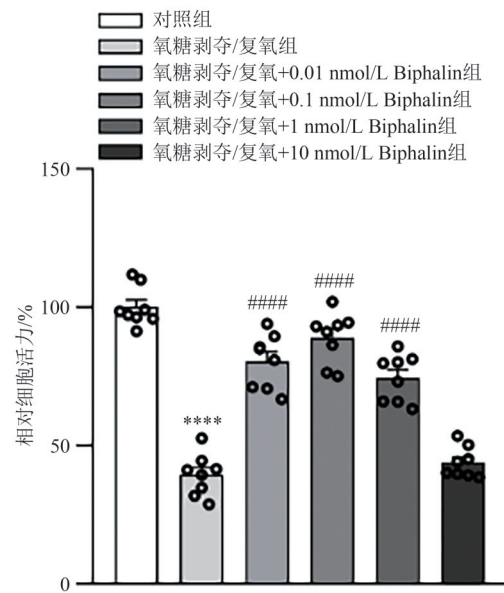
### 1.9 统计学分析

采用Graph Pad Prism 7.0软件进行数据处理与绘图分析。多组间差异比较采用单因素方差分析,实验数据均按均数 $\pm$ 标准误来表示,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 Biphalin最佳给药剂量的筛选

为探明biphalin的最佳给药剂量,在OGD/R过程中使用0.01、0.1、1、10 nmol/L浓度的biphalin分别干预原代皮层神经元细胞。与对照组相比,OGD/R模型组细胞活力显著降低( $P < 0.0001$ ),而0.01、0.1、1 nmol/L的biphalin可以有效抑制这种效应( $P < 0.0001$ )。其中0.1 nmol/L的biphalin具有最佳保护效应,遂选取该剂量进行后续实验(图1)。



与对照组相比较,\*\*\*\* $P < 0.0001$ ;与氧糖剥夺/复氧组相比较,#### $P < 0.0001$ 。

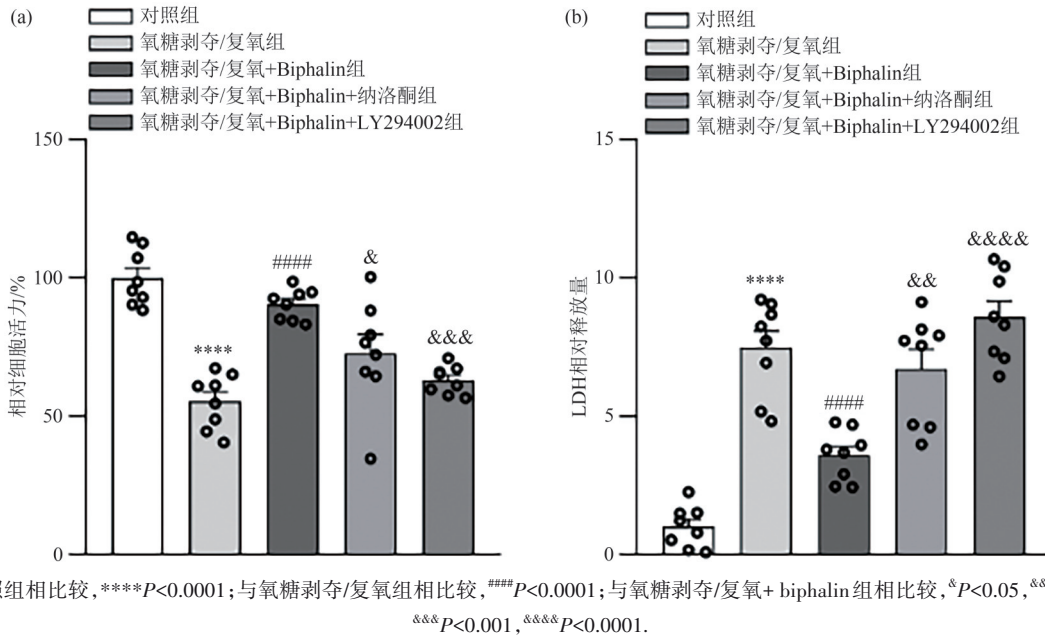
图1 Biphalin对氧糖剥夺/复氧(OGD/R)后神经元细胞活力的影响  
Fig. 1 Effect of biphalin on cell viability of neurons exposed to OGD/R

### 2.2 Biphalin减轻神经元细胞损伤

为了探究biphalin是否对神经元损伤具有保护作用,于OGD/R 24 h后测定细胞活力和LDH释放量。阿片拮抗剂纳洛酮和PI3K抑制剂LY294002用于进一步探究biphalin的作用机制。CCK-8结果显示,biphalin可以有效抑制OGD/R导致的细胞活力

下降 ( $P < 0.0001$ ), 而纳洛酮和 LY294002 逆转了 biphalin 的治疗效果 (纳洛酮,  $P < 0.05$ ; LY294002,  $P < 0.001$ ). LDH 结果显示, 与对照组相比, OGD/R 组细胞 LDH 释放量显著升高 ( $P < 0.0001$ ). 给药组 LDH 释放量较 OGD/R 组明显降低 ( $P < 0.0001$ ), 而这种效应

可被纳洛酮和 LY294002 有效抑制 (纳洛酮,  $P < 0.01$ ; LY294002,  $P < 0.0001$ ). 上述结果表明 biphalin 通过阿片受体激活 PI3K/Akt 通路减轻了 OGD/R 诱导的神经元损伤 (图 2).



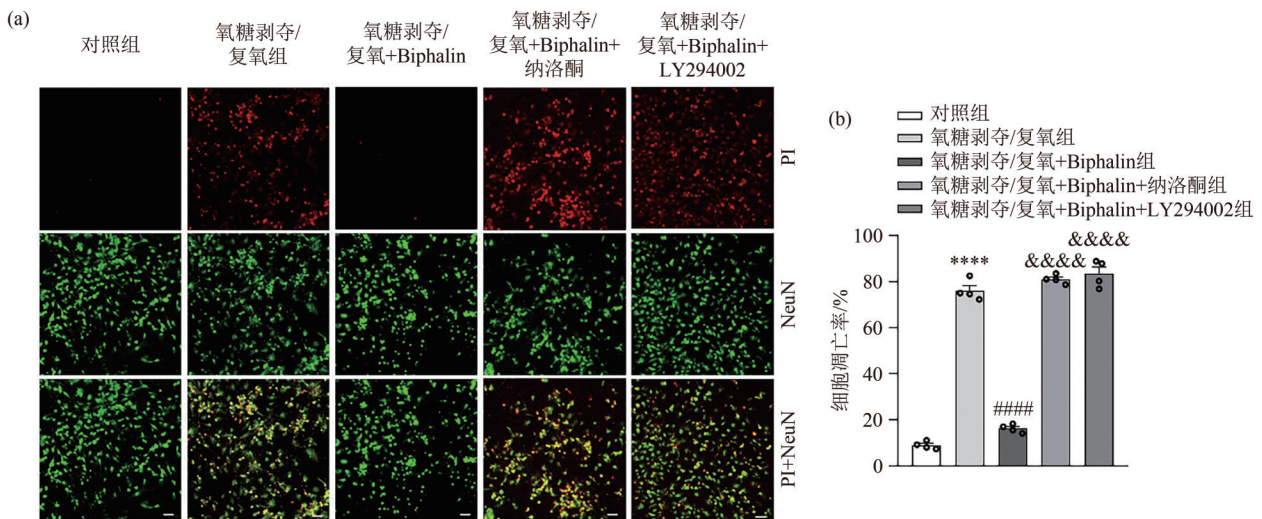
(a) 各组神经元细胞活力; (b) 各组神经元细胞 LDH 释放量  
图 2 Biphalin 对氧糖剥夺/复氧 (OGD/R) 诱导的神经元损伤的影响

Fig. 2 Effect of biphalin on OGD/R-induced neuronal injury

### 2.3 Biphalin 抑制神经元细胞凋亡

在 OGD/R 24 h 后采用 PI 染色法探究 biphalin 对神经元细胞凋亡的影响. 实验结果显示 (图 3), 对照组 PI 阳性细胞占总细胞数的 8.86%, OGD/R 组细胞

凋亡率为 76.12%, 给药组细胞凋亡率为 16.17%, 纳洛酮和 LY294002 处理后细胞凋亡率分别为 81.02% 和 83.48%. 这些结果提示 biphalin 抑制了 OGD/R 诱导的神经元凋亡, 而纳洛酮和 LY294002 可部分抵



与对照组相比较, \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; 与氧糖剥夺/复氧组相比较, #### $P < 0.0001$ ; 与氧糖剥夺/复氧+ biphalin 组相比较, &&&& $P < 0.0001$ .

(a) 各组神经元细胞 PI (红色) 和 NeuN (绿色) 染色图, 标尺=20  $\mu\text{m}$ ; (b) 图(a) 的统计图

图 3 Biphalin 对氧糖剥夺/复氧 (OGD/R) 后神经元凋亡的影响

Fig. 3 Effect of biphalin on neuronal apoptosis after OGD/R

消biphalin的抗凋亡作用。

#### 2.4 Biphalin对凋亡相关蛋白表达的影响

为了进一步探究biphalin对神经元细胞凋亡的影响,在OGD/R处理24h后检测了Bcl-2、Bax和cleaved-caspase-3的蛋白表达情况。结果表明:OGD/R处理后cleaved-caspase-3和Bax表达明显上升(cleaved-caspase-3,  $P<0.05$ ; Bax,  $P<0.001$ )。而biphalin对OGD/R诱导的细胞凋亡有抑制作用,表现为Bcl-2表达增多( $P<0.05$ ),cleaved-caspase-3和Bax表达减少( $P<0.05$ )。纳洛酮和LY294002则可逆转biphalin引起的凋亡相关蛋白的变化情况。上述结果进一步说明biphalin具有一定的抗凋亡作用,该作用与阿片受体/PI3K/Akt通路的激活相关,结果见图4。

#### 2.5 Biphalin对PI3K/Akt通路相关蛋白表达的影响

采用蛋白质印迹法检测PI3K/Akt通路相关蛋白表达情况以深入了解biphalin的作用机制。结果显示,与OGD/R组相比,biphalin组细胞内p-PI3K/PI3K和p-Akt/Akt比值显著升高(p-PI3K/PI3K,  $P<0.01$ ; p-Akt/Akt,  $P<0.05$ )。纳洛酮部分逆转了biphalin的作用效果,表现在p-PI3K/PI3K和p-Akt/Akt比值的减小(p-PI3K/PI3K,  $P<0.05$ ; p-Akt/Akt,  $P<0.01$ )。同样的,LY294002也抑制了biphalin介导的p-PI3K/PI3K和p-Akt/Akt比值的减小(p-PI3K/PI3K,  $P<0.05$ ; p-Akt/Akt,  $P<0.01$ )。这些结果表明biphalin通过阿片受体激活PI3K/Akt通路减轻了OGD/R导致的神经元损伤(图5)。

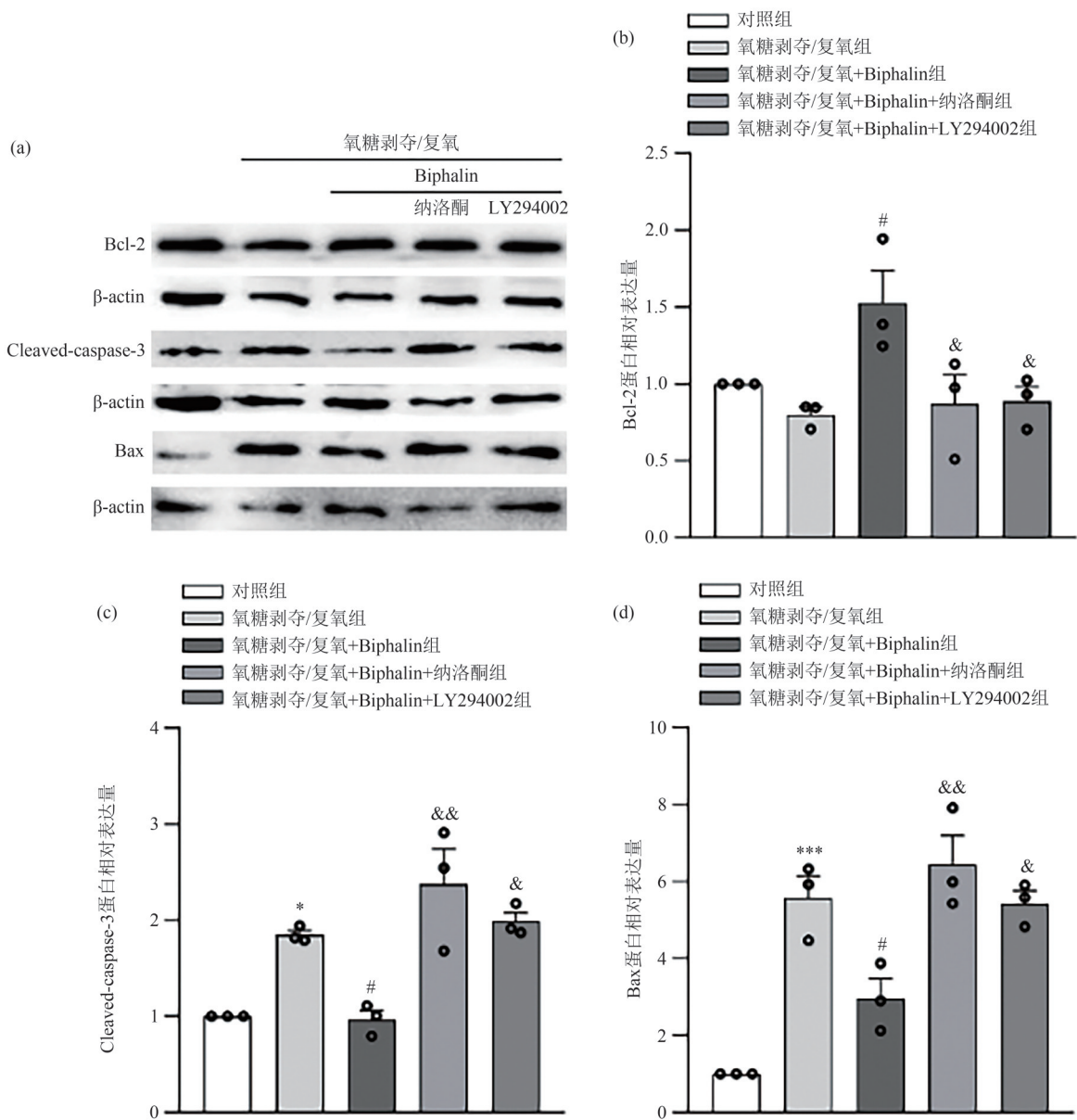
### 3 讨论

虽然近年来新生儿康复护理取得了巨大进展,但是仍有大量新生儿死于缺氧缺血性脑病或因该病从而伴有终身后遗症<sup>[18]</sup>。因此,迫切需要新的治疗措施去改变现有局面。作为一种强效非选择性阿片受体激动剂,biphalin自合成后便得到了众多科学家的青睐。研究表明除了具有显著的镇痛效果外,biphalin还在免疫调节、神经保护等方面发挥重要作用<sup>[19-20]</sup>。此外,与传统阿片类药物如吗啡相比,biphalin的成瘾性和胃肠道不良反应等副作用更小<sup>[6]</sup>。前期实验表明biphalin可以减小新生小鼠HIBD后脑梗死体积,抑制细胞凋亡并改善长期神经行为,且这些保护作用与阿片受体/PI3K/Akt信号通路的激活相关<sup>[12]</sup>。而在细胞层面,只有YANG等人

研究了biphalin对OGD/R诱导的原代皮层神经元细胞损伤的保护作用,并且仅仅关注了细胞体积这一个指标<sup>[20]</sup>。本研究采用原代皮层神经元细胞建立OGD/R损伤模型,探究biphalin对于OGD/R后细胞活力、LDH释放、细胞凋亡以及PI3K/Akt通路相关蛋白表达情况的影响。研究结果提示,biphalin可以提高OGD/R后细胞活力、抑制LDH释放、减少细胞凋亡并增大p-PI3K/PI3K和p-Akt/Akt比值,而这些效果均可被阿片拮抗剂纳洛酮和PI3K抑制剂LY294002逆转。上述结果表明biphalin可以通过阿片受体激活PI3K/Akt信号通路,从而减轻OGD/R诱导的神经元损伤。

细胞活力是检测神经元损伤的可靠指标<sup>[21]</sup>。本研究表明0.01、0.1、1 nmol/L的biphalin均可以抑制OGD/R导致的神经元细胞活力下降,其中0.1 nmol/L的biphalin作用效果最为明显。LDH是反映质膜完整性的重要指标<sup>[22]</sup>。本研究结果显示LDH释放量在OGD/R后显著增加,而biphalin可以逆转这一效应。先前的研究表明biphalin可以抑制谷氨酸应激诱导的大鼠海马神经元凋亡<sup>[23]</sup>。与该结果相类似,PI染色结果表明biphalin可以有效改善OGD/R导致的神经元细胞凋亡。为了进一步探究biphalin对细胞凋亡的影响,采用蛋白质印迹法检测了抗凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Bax和cleaved-caspase-3的表达水平。与OGD/R组相比,OGD/R + biphalin组细胞内Bax和cleaved-caspase-3表达明显减少而Bcl-2表达量显著增加。据报道,阿片样物质与受体的结合会导致PI3K/Akt信号通路的激活<sup>[12]</sup>。并且,越来越多的证据表明PI3K/Akt通路的激活能减轻OGD/R诱导的神经元损伤<sup>[24-26]</sup>。Biphalin对神经元细胞的保护作用是否是通过阿片受体激活PI3K/Akt信号通路实现的呢?本研究引入了非选择性阿片拮抗剂纳洛酮和特异性PI3K抑制剂LY294002进行离体培养神经细胞干预。实验结果提示纳洛酮阻断了biphalin的保护作用,具体表现在细胞活力的下降、LDH释放量的增加和细胞凋亡的加剧,这与YANG等人的研究结果一致<sup>[9]</sup>。LY294002也部分抵消了biphalin介导的细胞活力上升、LDH释放量和细胞凋亡减少的作用效果。上述结果表明biphalin通过阿片受体激活PI3K/Akt信号通路减轻了OGD/R诱导的神经元损伤。

为了深入研究biphalin在OGD/R诱导的神经元损伤中的保护机制,采用蛋白质印迹法检测了PI3K/Akt信号通路相关蛋白的表达情况。实验结果



与对照组相比较, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与氧糖剥夺/复氧组相比较, # $P < 0.05$ ; 与氧糖剥夺/复氧+ biphalin 组相比较, & $P < 0.05$ , && $P < 0.01$ .

(a) 各组神经元细胞 Bcl-2、cleaved-caspase-3 和 Bax 蛋白表达条带图; (b-d) Bcl-2、cleaved-caspase-3 和 Bax 蛋白的统计图

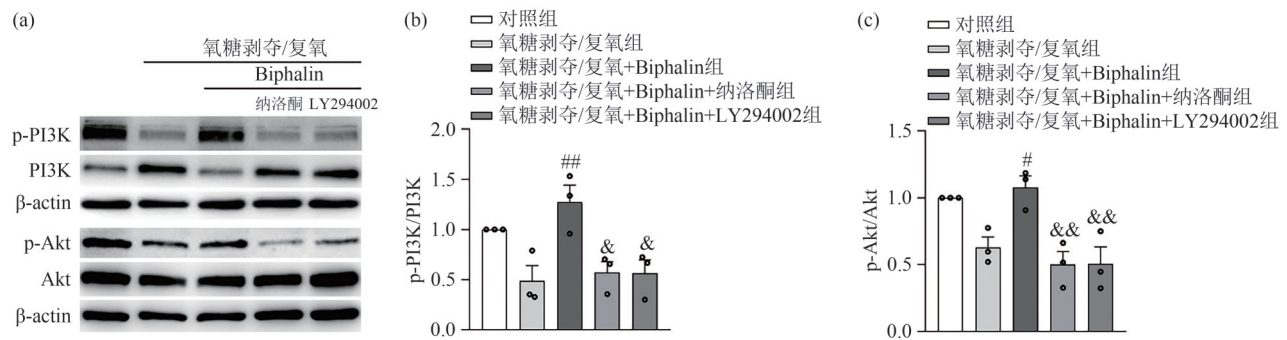
图 4 Biphalin 对凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of biphalin on the expressions of apoptotic proteins

显示, 与 OGD/R 组相比, OGD/R + biphalin 组细胞内 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比值显著升高, 而阿片拮抗剂纳洛酮和 PI3K 抑制剂 LY294002 均可逆转这一效应. 这进一步证实 biphalin 通过阿片受体激活 PI3K/Akt 信号通路减轻 OGD/R 诱导的神经元损伤. 本研究尚存在一些不足之处: 第一, HIE 的发病机制是复杂的, 涉及氧化应激、炎症、线粒体功能障碍等多种病理因素<sup>[27]</sup>, 本文仅仅关注了细胞凋亡, 因此将在之后的研究中进一步探究这些问题. 第二, 有研究表明使用纳洛酮可能会导致多种不良反应<sup>[28]</sup>, 在本研究中没有设置相应实验组去探究纳洛酮对

biphalin 保护作用的逆转是否与其自身的不良效果有关. 第三, biphalin 的作用机制有待进一步研究, 比如激活 PI3K/Akt 通路后是否可以进一步激活核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 等关键转录因子从而更好的维持胞内稳态.

综上所述, biphalin 对 OGD/R 诱导的神经元损伤具有保护作用, 且该保护作用与阿片受体/PI3K/Akt 通路的激活相关. 此研究结果与前期动物实验结果相一致, 进一步说明 biphalin 可能是一种治疗新生儿缺氧缺血性脑损伤的潜在药物.



与氧糖剥夺/复氧组相比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与氧糖剥夺/复氧+biphalin组相比较,<sup>&</sup> $P < 0.05$ ,<sup>&&</sup> $P < 0.01$ .

(a)各组神经元细胞p-PI3K,PI3K,p-Akt,Akt和β-actin蛋白表达条带图;(b-c)p-PI3K,PI3K和p-Akt,Akt蛋白的统计图

图5 Biphalin对PI3K/Akt通路相关蛋白表达情况的影响

Fig. 5 Effect of biphalin on the PI3K/Akt signaling pathway

### 参 考 文 献

- [1] WU Z, XIE C, KUANG H, et al. Oxytocin mediates neuroprotection against hypoxic-ischemic injury in hippocampal CA1 neuron of neonatal rats [J]. *Neuropharmacology*, 2021, 187:108488.
- [2] 何青, 王娟, 马学进, 等. MRI新技术在新生儿缺血缺氧性脑病预后评估的研究进展[J]. *磁共振成像*, 2022, 13(9):127-131.
- [3] HIGGINS R D, RAJU T, EDWARDS A D, et al. Hypothermia and other treatment options for neonatal encephalopathy: An executive summary of the Eunice Kennedy Shriver NICHD workshop [J]. *J Pediatr*, 2011, 159(5):851-858. e1.
- [4] 刘鹏, 何珊, 左泽兰. 亚低温治疗新生儿缺血缺氧脑病疗效及远期预后的Meta分析[J]. *重庆医学*, 2020, 49(5):796-801.
- [5] 毕登芹, 舒桂华. PDGF在新生儿缺血缺氧性脑损伤中脑保护作用的研究进展[J]. *医学综述*, 2022, 28(14): 2756-2761.
- [6] REDKIEWICZ P, DYNIEWICZ J, MISICKA A. Biphalin-a potent opioid agonist-as a panacea for opioid system-dependent pathophysiological diseases [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21): 11347.
- [7] YANG L, SHAH K, WANG H, et al. Characterization of neuroprotective effects of biphalin, an opioid receptor agonist, in a model of focal brain ischemia [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 339(2):499-508.
- [8] LESNIAK A, PICK C G, MISICKA A, et al. Biphalin protects against cognitive deficits in a mouse model of mild traumatic brain injury (mTBI) [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 101:506-518.
- [9] YANG L, ISLAM M R, KARAMYAN V T, et al. *In vitro* and *in vivo* efficacy of a potent opioid receptor agonist, biphalin, compared to subtype-selective opioid receptor agonists for stroke treatment [J]. *Brain Res*, 2015, 1609: 1-11.
- [10] 李想, 李安特, 孙秋霞, 等. PI3K/Akt信号通路与神经损伤修复的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43:246-249.
- [11] DOU M Y, WU H, ZHU H J, et al. Remifentanyl preconditioning protects rat cardiomyocytes against hypoxia-reoxygenation injury via delta-opioid receptor mediated activation of PI3K/Akt and ERK pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 789:395-401.
- [12] ZHANG J J, LI Y, CHEN S, et al. Biphalin, a dimeric opioid peptide, reduces neonatal hypoxia-ischemia brain injury in mice by the activation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Chem Neuroanat*, 2021, 115: 101967.
- [13] LI Y, ZHANG J J, CHEN R J, et al. Genistein mitigates oxidative stress and inflammation by regulating Nrf2/HO-1 and NF-κB signaling pathways in hypoxic-ischemic brain damage in neonatal mice [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(2):32.
- [14] LIU Y, MIN J W, FENG S, et al. Therapeutic role of a cysteine precursor, OTC, in ischemic stroke is mediated by improved proteostasis in mice [J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11(1):147-160.
- [15] ZHAO T Z, SHI F, HU J, et al. GPER1 mediates estrogen-induced neuroprotection against oxygen-glucose deprivation in the primary hippocampal neurons [J]. *Neuroscience*, 2016, 328:117-126.
- [16] LI Y, CHEN L, ZHENG D, et al. Echinocystic acid alleviated hypoxic-ischemic brain damage in neonatal mice by activating the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14:1103265.

- [17] MIN J W, KONG W L, HAN S, et al. Vitexin protects against hypoxic-ischemic injury via inhibiting  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-dependent protein kinase II and apoptosis signaling in the neonatal mouse brain [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15):25513-25524.
- [18] SILVEIRA R C, PROCIANOY R S. Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy [J]. *Jornal De Pediatria*, 2015, 91(6): S78-S83.
- [19] POPIOLEK-BARCZYK K, PIOTROWSKA A, MAKUCH W, et al. Biphalin, a dimeric enkephalin, alleviates LPS-induced activation in rat primary microglial cultures in opioid receptor-dependent and receptor-independent manners [J]. *Neural Plast*, 2017:3829472.
- [20] YANG L, WANG H, SHAH K, et al. Opioid receptor agonists reduce brain edema in stroke [J]. *Brain Res*, 2011, 1383:307-316.
- [21] 舒广文, 雷霄, 付千, 等. 鞣花酸对马兜铃酸 I 所致肾小管上皮细胞毒性的保护作用 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2023, 42(4):462-468.
- [22] SEBÓK C, WALMSLEY S, TRÁJ P, et al. Immunomodulatory effects of chicken cathelicidin-2 on a primary hepatic cell co-culture model [J]. *PLoS One*, 2022, 17(10): e0275847.
- [23] KAWALEC M, KOWALCZYK J E, BERESIEWICZ M, et al. Neuroprotective potential of biphalin, multireceptor opioid peptide, against excitotoxic injury in hippocampal organotypic culture [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(11):2091-2095.
- [24] YANG L, ZHU J, YANG L, et al. SCO-spondin-derived peptide NX210 rescues neurons from cerebral ischemia/reperfusion injury through modulating the integrin- $\beta$ 1 mediated PI3K/Akt pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 111:109079.
- [25] CHEN M, FAN L, WU G, et al. Histone methyltransferase enzyme enhancer of zeste homolog 2 counteracts ischemic brain injury via H3K27me3-mediated regulation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Environ Toxicol*, 2023.
- [26] ZHAO Q, SHAO X, DING X, et al. PDPOB Exerts multispect anti-ischemic effects associated with the regulation of PI3K/AKT and MAPK signaling pathways [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(23):4416-4427.
- [27] GRECO P, NENCINI G, PIVA I, et al. Pathophysiology of hypoxic-ischemic encephalopathy: A review of the past and a view on the future [J]. *Acta Neurol Belg*, 2020, 120(2):277-288.
- [28] RÖSNER S, HACKL-HERRWERTH A, LEUCHT S, et al. Opioid antagonists for alcohol dependence [J]. *Cochrane Db Syst Rev*, 2010(12): CD001867.

(责编&校对 姚春娜)