

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250616.002

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250616.1649.004>

基于 VEGF/PI3K/AKT 信号通路探讨贝伐珠单抗对缺血性脑卒中小鼠的影响及作用机制

冯艺博¹, 常 青², 盖寒冰¹, 康超群¹, 张 辉¹✉

(1. 河北北方学院, 河北 张家口 075000; 2. 河北北方学院附属第一医院, 河北 张家口 075000)

[摘要] **目的:**探讨贝伐珠单抗(bevacizumab, BEV)对缺血性脑卒中损伤的影响及作用机制。**方法:**以雄性 C57BL/6J 小鼠为研究对象, 建立大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 将 42 只 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组: 假手术(Sham)组、MCAO 组、BEV 组, 每组 14 只。采用 Zea-Longa 评分、TTC 染色、H&E 染色、尼氏染色、免疫组化、Western blot 等方法检测 BEV 对 MCAO 小鼠的影响。**结果:**与 Sham 组相比, MCAO 组小鼠 Zea-Longa 评分及脑梗死体积百分比明显增加($P<0.01$); 缺血侧脑组织细胞结构形态破坏及神经元明显损伤, 尼氏小体含量减少; VEGF、AKT、PI3K 蛋白表达水平和 Bcl-2/Bax、P-AKT/AKT 蛋白比值明显降低($P<0.01$)。与 MCAO 组相比, BEV 组小鼠 Zea-Longa 评分及脑梗死体积百分比明显增加($P<0.01$); 缺血侧脑组织细胞结构形态破坏及神经元损伤更严重, 尼氏小体明显减少甚至消失; PI3K 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), VEGF 蛋白表达水平和 Bcl-2/Bax、P-AKT/AKT 蛋白比值进一步明显降低($P<0.05$)。**结论:**BEV 加重缺血性脑卒中小鼠的损伤, 其机制可能与 VEGF/PI3K/AKT 信号通路有关。

[关键词] 缺血性脑卒中; 脑缺血; 贝伐珠单抗; 神经损伤; 血管内皮生长因子; 细胞凋亡; VEGF/PI3K/AKT 信号通路

[中图分类号] R743.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2026)17-1296-10

Effects and mechanism of bevacizumab on ischemic stroke mice based on VEGF/PI3K/AKT signaling pathway

FENG Yibo¹, CHANG Qing², GAI Hanbing¹, KANG Chaoqun¹, ZHANG Hui¹✉

(1. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the Hebei Medical Research Project Plan (20200541)

[Author]: FENG Yibo, E-mail: 2908319953@qq.com.

[Correspondence to]: ZHANG Hui, Professor, Master's Supervisor, E-mail: zhanghui6312@126.com.

Received: 2025-02-25

Revised: 2025-05-21

JHMu, 2026;32(17):1296-1305

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of bevacizumab (BEV) on ischemic stroke injury. **Methods:** Male C57BL/6J mice were used to establish a middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. A total of 42 C57BL/6J mice were randomly assigned into three groups: Sham group, MCAO group, and BEV group, with 14 mice in each group. The effects of BEV on MCAO mice were detected by Zea-Longa score, TTC staining, H&E staining, Nissl staining, immunohistochemistry, and Western blot. **Results:** Compared to the Sham group, mice in the MCAO group exhibited increases in the Zea-Longa score and the percentage of cerebral infarct volume ($P<0.01$). The morphological structure of brain tissue cells on the ischemic side was disrupted, with significant neuronal injury and a reduction in Nissl body content. Additionally, there were decreases in the protein expression levels of VEGF, AKT, and PI3K, as well as Bcl-2/Bax and P-AKT/AKT protein ratios ($P<0.01$). Com-

[基金项目] 河北省医学科学研究课题计划(20200541)

[作者简介] 冯艺博, E-mail: 2908319953@qq.com。

[通讯作者] 张辉, 教授, 硕士生导师, E-mail: zhanghui6312@126.com。

[收稿日期] 2025-02-25

[修回日期] 2025-05-21

网络出版时间: 2025-06-17 07:49:45

pared to the MCAO group, mice in the BEV group showed significant increases in the Zea-Longa score and the percentage of cerebral infarct volume ($P<0.01$). The morphological structure of brain tissue cells on the ischemic side was more severely disrupted, with more pronounced neuronal injury and a significant reduction or even disappearance of Nissl bodies. The expression level of PI3K protein was decreased ($P<0.05$), and the expression level of VEGF protein, Bcl-2/Bax and P-AKT/AKT protein ratios were further significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion:** BEV aggravates the injury in mice with ischemic stroke, and its mechanism may be related to the VEGF/PI3K/AKT signaling pathway.

[Key words] Ischemic stroke; Cerebral ischemia; Bevacizumab; Nerve injury; Vascular endothelial growth factor; Apoptosis; VEGF/PI3K/AKT signaling pathway

脑卒中又称中风,是一种神经系统急症,主要分为出血性脑卒中与缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)。其中,以 IS 最为常见,占脑卒中总数的 87%^[1]。近些年来,IS 的发病率逐步上升,现已成为全球范围内的第二大死亡原因,对患者的生命健康与生活质量造成了严重威胁^[2]。其高死亡率、高致残率、高复发率不仅给患者家庭带来了沉重负担也对社会公共卫生服务构成了严重威胁。

IS 的发生与多种因素有关,这些因素包括不可干预因素(年龄、性别、遗传)和可干预因素(颈动脉狭窄、高脂血症等)^[3-7]。IS 发生后,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)通常呈现出一种复杂的动态变化。脑组织损伤后 VEGF 的表达降低,抑制血管生成并削弱神经保护作用,随后 VEGF 的表达逐步上调并通过结合 VEGFR2 受体,激活下游磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路促进缺血区域的内皮细胞增殖及血管新生,改善脑组织血流灌注,同时该通路通过调控 Bcl-2/Bax 表达平衡进一步发挥神经保护作用,有助于脑组织的功能恢复^[8-10]。此外,IS 与癌症之间也存在密切联系,这种关系的形成可能与肿瘤介导的高凝状态、肿瘤自身的质量效应以及肿瘤的治疗等因素密切相关。

随着科学技术的不断进步以及医学综合治疗方案的逐步完善,癌症患者的平均生存期得到了明显延长。据报道,部分癌症患者的五年生存率已提升至 43% 以上^[11]。然而,在长期抗肿瘤治疗提高生存率的过程中也逐渐暴露出其对心脑血管健康的潜在威胁。许多癌症治疗药物和激素治疗已被证实与血栓栓塞事件的发生及脑卒中的风险增加有关^[12-15]。贝伐珠单抗(bevacizumab, BEV)是一种重组人源化抗 VEGF 抑制剂,已广泛应用于肿瘤(如结直肠癌、肾细胞癌、非小细胞癌、卵巢癌等)的靶向治疗^[16-18]。但临床研究结果显示,BEV 在抗肿瘤治疗的同时伴随出现多种不良反应^[19-22],尤其是促进并加重 IS 的发生。这些不良反应严重影响临床治疗效果。因此,深入探讨 BEV 与 IS 之间的关系对于改善患者管理和提高治疗安全性至关重要。

本研究以小鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型为研究对象,观察 BEV 在小鼠缺血损伤模型中的神经损伤、脑组织病理变化及 VEGF、PI3K、AKT、P-AKT、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响,旨在探讨其发生机制。

1 材料与方法

1.1 实验药品、试剂及设备

BEV 注射液(齐鲁制药有限公司,国药准字 S20190040,规格 100 mg:4 mL,生产批号:202303-013KEE);MCAO 线栓(北京西浓,货号:A2-162020);2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC,河北瑞帕特生物,批号:BCBH1872V);尼氏染色液(甲苯胺蓝法,雷根生物,货号:DK0023);SP 鼠/兔通用免疫显色试剂盒(河北瑞帕特生物科技有限公司,货号:RP-RK9000);DAB 显色液(中杉金桥,货号:ZLI-9018-3ML);柠檬酸钠抗原修复液(雷根生物,货号:IH0305);RIPA 组织解液(河北瑞帕特生物科技有限公司,货号:RP-RW0006);超敏 ECL 发光试剂盒(河北瑞帕特生物科技有限公司,货号:RP-RW0601);VEGF (ABclonal,货号:A0280);PI3K (PI3 Kinase p85 alpha,爱博泰克,货号:A4992);AKT (华安生物,货号:ET1609-51);磷酸化 AKT (Phospho-Akt-S473,爱博泰克,货号:AP1453);Bax (爱博泰克,货号:A0207);Bcl-2 (爱博泰克,货号:A0208);山羊抗兔 HRP 二抗(河北瑞帕特,货号:S1002-100); β -actin(爱博泰克,货号:AC026)。

电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);恒温水浴箱(德国 JULABO 公司),万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);凝胶成像分析系统(美国 GE 公司)。

1.2 实验动物

6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2019-0010。所有小鼠在 SPF 实验动物环境中饲养。照明时间为 12 h/12 h 昼夜交替。小鼠被随机分为以下 3 组:假手术(Sham)组、MCAO 组、BEV 组。根据相关 BEV 实验研究及预实验结果并结合

临床常规用量选择对 BEV 组小鼠在第 1、5、8、12 天予以 BEV 15 mg/kg 腹腔注射, Sham 组和 MCAO 组腹腔注射等量 0.9% NaCl^[23,24]。所有动物实验符合动物伦理委员会的标准(批准号: YJS-20231222020)。

1.3 建立小鼠 MCAO 模型

采用改良的大脑中动脉栓塞法制备脑缺血模型,小鼠术前禁食 12 h,异氟烷麻醉后固定小鼠,切开皮肤,钝性分离颈总、颈内、颈外动脉,结扎颈总动脉及颈外动脉,于颈总动脉近心端剪一小切口,将线栓经切口处送入颈内动脉,当线栓上黑色标记点恰好位于颈总动脉分叉口时固定线栓,消毒并缝合皮肤。

1.4 神经功能缺损评分

MCAO 手术后 24 h 采用 Zea-Longa 评分评估小鼠神经损伤^[25]。0 分:无神经功能缺损;1 分:对侧前爪不能完全伸展;2 分:向对侧旋转;3 分:向对侧倾倒;4 分:失去意识、不能行走。评分越高表示神经功能缺损越严重。得分在 1~3 分的小鼠表示 MCAO 模型建立成功。

1.5 TTC 染色

采用 TTC 染色检测脑梗死区域大小及计算脑梗死体积百分比。各组小鼠于 MCAO 模型建立 24 h 后处死。取小鼠脑组织,并置于一 20℃ 冰箱中 20 min。将冷冻的脑组织切成 5 块,厚度为 2 mm。将切片在 37℃ 避光下用 2% TTC 染色 20 min,正常脑组织染色后呈红色,脑梗死区域为白色。在 4% 多聚甲醛固定后拍照,并使用 ImageJ 软件扫描图片进行梗死体积分析,计算公式如下:梗死体积百分比=梗死体积/总体积×100%。

1.6 H&E 染色

将切片依次置于二甲苯和梯度乙醇中脱蜡水化,蒸馏水冲洗,滴加苏木素,流水冲洗,1% 盐酸酒精分化、反蓝,滴加伊红染液,水洗后置于梯度乙醇进行脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察拍照。

1.7 尼氏染色(甲苯胺蓝法)

切片依次置于二甲苯和梯度乙醇中脱蜡水化,蒸馏水冲洗,切片入尼氏染色液,将染色缸置于恒温箱 50℃ 浸染 30 min,水洗后置于梯度乙醇进行脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,镜下观察拍照。

1.8 免疫组化染色

取脑切片进行脱蜡水化,加热修复抗原,冷却后流水冲洗。之后滴加内源性过氧化物酶阻断剂, PBS 缓冲液冲洗,滴加一抗(VEGF 1:150、AKT

1:50、Bax 1:100、Bcl-2 1:100)于湿盒内 4℃ 孵育过夜,复温后 PBS 缓冲液冲洗,滴加酶标羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物,37℃ 孵育 20 min; PBS 缓冲液冲洗,滴加显色液,复染,脱水透明后封片。每组免疫组化结果选择 6 个高倍视野(×400)分别采集图像,采用 ImageJ 软件计算并统计分析阳性区域面积百分比(%)。

1.9 Western blot

从 -80℃ 冰箱取出小鼠梗死侧脑组织,剪碎后置于 EP 管中,加入蛋白裂解液,匀浆,离心后取上清,BCA 检测法测总蛋白浓度。蛋白加上样缓冲液后煮沸变性,之后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭后加入一抗(PI3K 1:1 500、AKT 1:5 000、P-AKT 1:1 000、 β -actin 1:500 000),4℃ 孵育过夜; TBST 清洗 3 次,滴加二抗(1:10 000)室温孵育 1.5 h, TBST 清洗, ECL 显色后曝光。使用 ImageJ 软件分析计算蛋白相对表达水平。

1.10 统计学处理

使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学数据分析。满足正态分布且方差齐的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BEV 对 IS 小鼠神经功能损伤的影响

通过 Zea-Longa 评分对各组小鼠进行神经功能缺损程度评估。神经行为学评分结果显示, Sham 组小鼠未见神经功能缺损。与 Sham 组比较, MCAO 组小鼠 Zea-Longa 评分明显升高($P < 0.01$); 与 MCAO 组比较, BEV 组 Zea-Longa 评分明显升高($P < 0.01$)。提示 BEV 存在加重神经功能缺损的情况,见图 1。

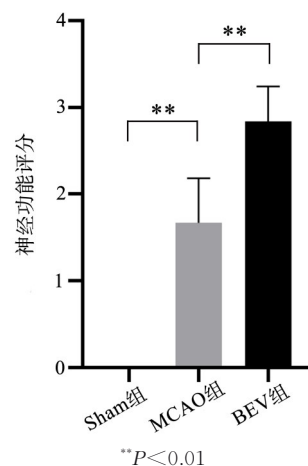


图1 各组小鼠神经功能评分

Fig 1 Neurological function score of mice in each group

2.2 BEV对IS小鼠脑梗死体积的影响

通过 TTC 染色实验发现 BEV 对 MCAO 小鼠的梗死体积的改变,检测各组小鼠梗死侧区域体积的百分比大小。TTC 染色结果显示,正常脑组织呈

红色,梗死后脑组织呈白色。与 Sham 组比较, MCAO 组小鼠脑梗死体积百分比明显增加($P<0.01$);与 MCAO 组比较, BEV 组小鼠脑梗死体积百分比明显增加($P<0.01$),见图 2。

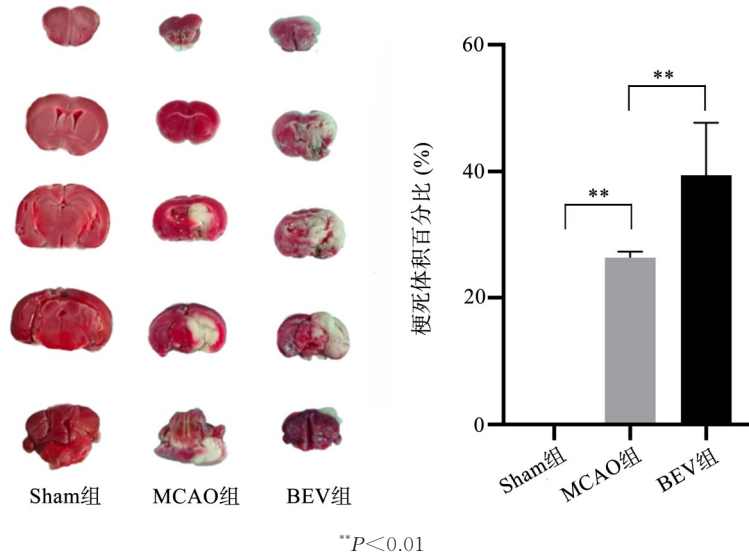


图2 各组小鼠脑梗死体积百分比

Fig 2 Percentage of cerebral infarct volume of mice in each group

2.3 BEV对IS小鼠脑组织病理的影响

为进一步检测 BEV 对 MCAO 小鼠的病理学改变,通过 H&E 染色在光学显微镜下观察发现, Sham 组小鼠海马区神经细胞排列紧密,神经细胞形态正常,结构完整,胞质染色均匀,核仁清晰,间质无明显

显水肿,未见明显病理学改变。MCAO 小鼠脑组织细胞间隙增宽,组织结构疏松,呈现空泡化改变,出现少量神经细胞变性、固缩、深染。BEV 组神经细胞结构形态破坏更明显,可见大量神经细胞变性,核固缩、深染更明显,大量空泡化改变,见图 3。

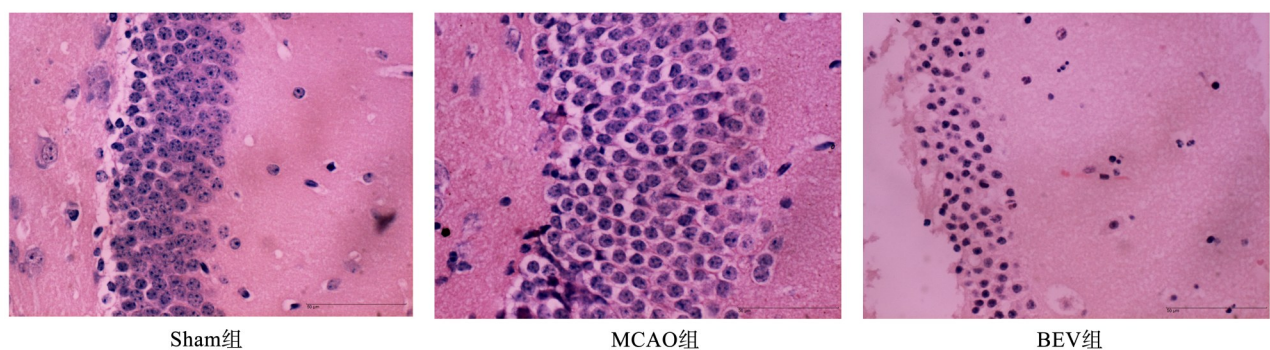


图3 各组小鼠脑组织病理形态变化(H&E染色, ×400)

Fig 3 Pathomorphologic changes in the brain tissue of mice in each group (H&E staining, ×400)

2.4 BEV对IS小鼠脑组织神经元的影响

为检测 BEV 对 MCAO 小鼠的神经损伤情况,采用尼氏染色镜下观察各组小鼠神经损伤及尼氏小体存在状况。尼氏染色结果显示, Sham 组小鼠神经元结构完整,边界清晰,排列整齐紧密,可见深

蓝色的尼氏体,含量丰富。与 Sham 组比较, MCAO 组小鼠神经元排列疏松,形态多呈空泡样改变,细胞核固缩,尼氏体着色较浅,含量较少;与 MCAO 组比较, BEV 组小鼠表现出更严重的神经损伤,尼氏体明显减少甚至消失,见图 4。

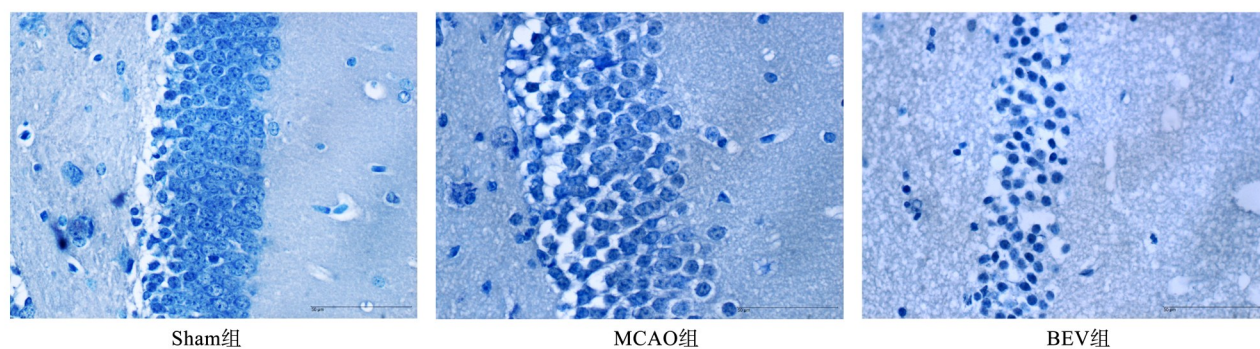


图4 各组小鼠脑组织神经细胞形态变化 (Nissl染色, $\times 400$)

Fig 4 Morphological changes of neuronal cells in the brain tissue of mice in each group (Nissl staining, $\times 400$)

2.5 BEV 对 IS 小鼠脑组织 VEGF、AKT、Bax、Bcl-2 蛋白的影响

为进一步检测梗死区域蛋白的表达变化,通过免疫组化染色及 Western blot 检测相关蛋白含量。免疫组化染色结果显示,与 Sham 组比较,MCAO 组

小鼠 VEGF、AKT 蛋白表达水平,Bcl-2/Bax 蛋白比值明显降低($P < 0.01$);与 MCAO 组比较,BEV 组小鼠 VEGF、AKT 蛋白表达水平,Bcl-2/Bax 蛋白比值表达明显降低($P < 0.01$),见图 5、6。

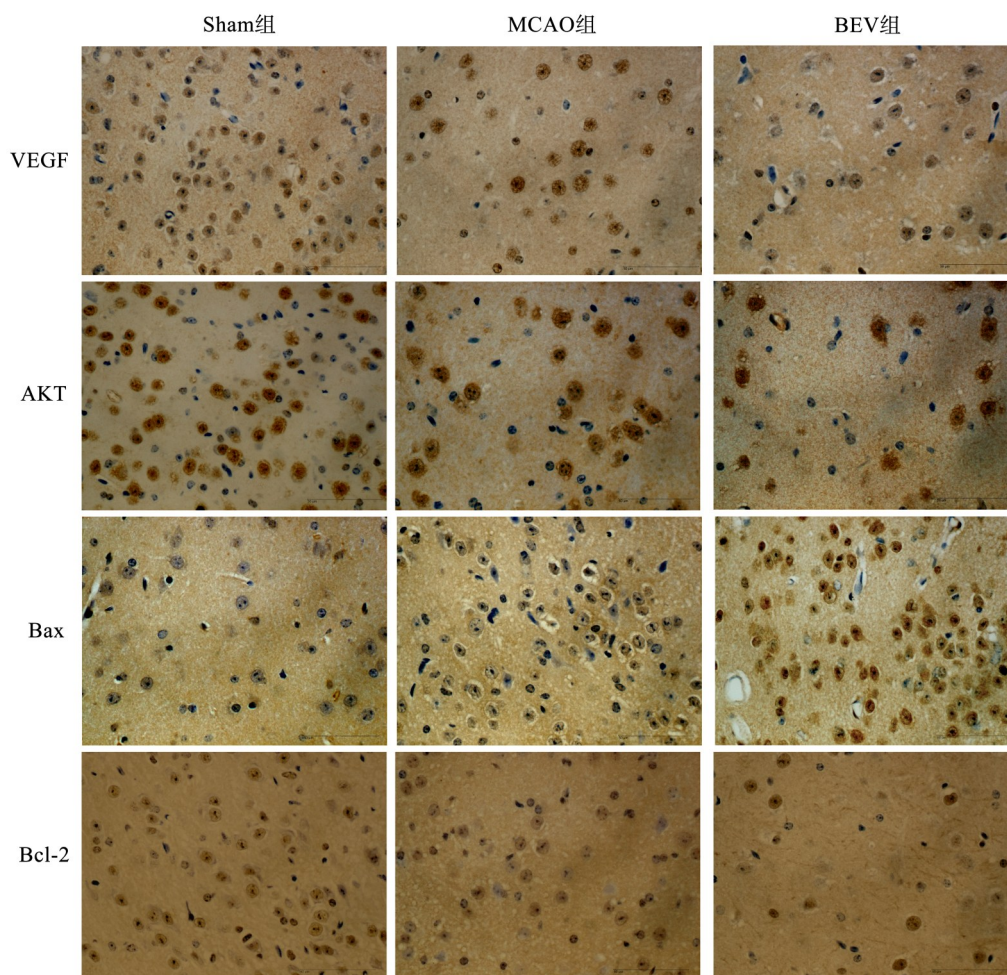


图5 各组小鼠脑组织 VEGF、AKT、Bcl-2、Bax 蛋白表达 (免疫组化, $\times 400$)

Fig 5 Expression of VEGF, AKT, Bcl-2, and Bax proteins in brain tissue of mice in each group (immunohistochemistry, $\times 400$)

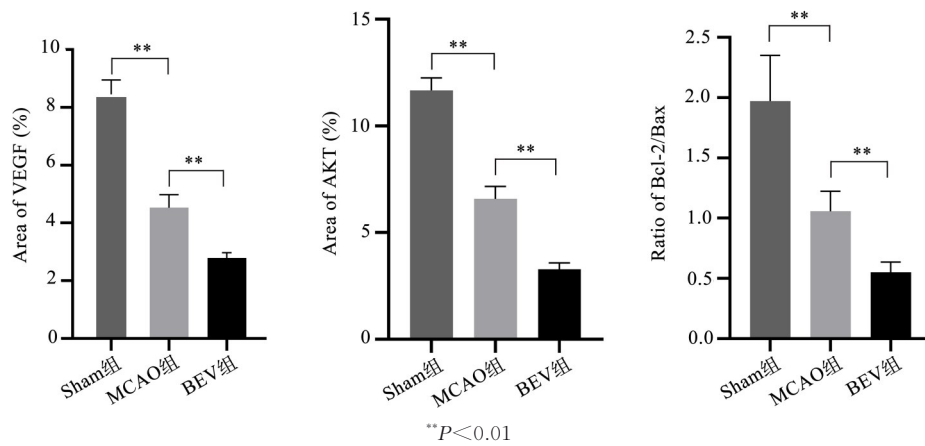


图6 各组小鼠脑组织 VEGF、AKT、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平

Fig 6 Expression levels of VEGF, AKT, Bcl-2, and Bax proteins in brain tissue of mice in each group

2.6 BEV 对 IS 小鼠脑组织 PI3K、AKT、P-AKT 蛋白的影响

Western blot结果显示,与 Sham 组相比,MCAO 组小鼠 PI3 蛋白表达水平,P-AKT/AKT、Bcl-2/Bax

蛋白比值明显降低($P<0.01$);与 MCAO 组相比, BEV 组小鼠 PI3K 蛋白表达水平,P-AKT/AKT、Bcl-2/Bax 蛋白比值明显降低($P<0.05$),见图 7。

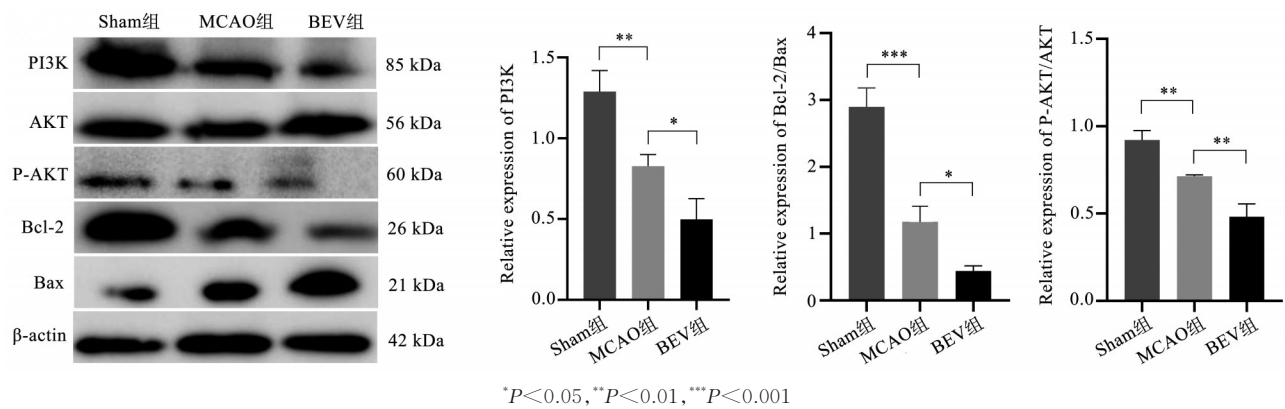


图7 各组小鼠脑组织 PI3K、AKT、P-AKT、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平

Fig 7 Expression levels of PI3K, AKT, P-AKT, Bcl-2, and Bax proteins in brain tissue of mice in each group

3 讨论

IS 是全球范围内致残和致死的主要原因之一,通常是由于脑血流中断导致脑组织因缺血缺氧进而引发神经元死亡及神经功能缺损。目前,全球已确诊 IS 的患者约为 1.01 亿,且卒中导致的伤残调整生命年高达 1.34 亿,并造成约 655 万人死亡^[1]。IS 的病理机制十分复杂,涉及氧化应激、炎症反应、细胞凋亡及自噬等多种信号通路的参与调控^[26,27]。尽管随着科学技术的发展与医疗方案的逐步完善,在 IS 的治疗和预防方面取得了一定的进展,但由于卒中发病机制的复杂性和个体化差异,其高发病率和致高致残率仍未得到有效的控制。

此外,越来越多的临床研究结果表明^[28-31],IS 与恶性肿瘤之间存在密切联系,这可能与多种因素相

互作用有关。首先,肿瘤引发的高凝状态,导致患者血栓形成风险增加,进而引发 IS 的发生^[32,33]。其次,肿瘤的直接压迫或浸润可导致邻近血管狭窄或闭塞,造成血流动力学的改变,从而进一步增加卒中的风险^[34]。另外,某些化疗药物(如 BEV、顺铂等)和放疗的副作用,可能通过诱导血管内皮损伤,从而进一步加重 IS 发展^[13,14,35]。BEV 作为一种靶向 VEGF 的人源化的单克隆抗体,通过特异性结合 VEGF,阻断血管生成,最终达到抑制肿瘤增殖的效果。目前 BEV 在恶性肿瘤的治疗中得到了广泛应用。然而,越来越多的研究结果发现,在进行 BEV 治疗的过程中存在诸多不良反应,如蛋白尿、胃肠道穿孔、高血压、脑卒中等,这些不良反应严重影响临床治疗效果^[19-21]。既往报道显示,接受 BEV 治疗

的肿瘤患者发生血管病变(包括IS和颅内出血)的风险明显增加^[36]。此外,有研究发现恶性胶质瘤患者在给予BEV后出现血栓栓塞事件^[37]。Seet等^[38]研究发现脑血管事件是BEV治疗中出现的早期和严重并发症,尤其是在患者表现出急性神经功能恶化时。目前,针对BEV不良反应的研究主要集中在蛋白尿和胃肠道穿孔等方面,而对于BEV加重IS发生、发展的具体机制有待详细阐述^[39,40]。

本研究通过建立小鼠MCAO模型,探讨BEV对IS小鼠的影响。本研究结果显示,与Sham组相比,MCAO组小鼠的神经功能缺损评分与脑梗死体积百分比明显升高。与MCAO组相比,BEV组小鼠的神经功能缺损评分与脑梗死体积百分比明显升高,提示BEV可能加重IS的损伤。进一步通过尼氏染色镜下观察发现,MCAO组小鼠缺血侧脑组织尼氏小体含量明显低于Sham组,而BEV组小鼠缺血侧脑组织尼氏小体含量相比于MCAO组明显减少甚至消失。尼氏小体是神经元内粗面内质网的聚集体,其含量的减少反映了神经元蛋白质合成功能的降低和细胞损伤的加重^[41]。上述发现与以往研究报道的BEV在肿瘤治疗中可能引起神经毒性的结果一致。此外,H&E染色结果显示,BEV组小鼠缺血侧脑组织细胞结构形态破坏更为严重,提示BEV可能通过血脑屏障,进一步加重了IS的病理损伤。综合神经功能缺损评分、脑梗死体积百分比及H&E染色和尼氏染色的结果,可以初步确定BEV的应用存在加重IS发生、发展的潜在风险。

VEGF作为一种核心的信号分子,在血管生成和血管通透性的调控中发挥重要作用。在肿瘤的微环境中,肿瘤细胞通过分泌大量的VEGF诱导血管结构紊乱、通透性异常,最终导致异常血管新生,加速肿瘤的侵袭和转移。研究显示,VEGF的高表达与肿瘤的恶性程度、侵袭性及患者预后不良密切相关^[42-44]。在IS中,VEGF的表达在不同时期产生不同的变化趋势。在VEGF表达下降阶段,内皮细胞增殖与血管生成延缓,神经保护作用降低。在VEGF表达上升阶段,内皮细胞增殖、迁移及血管新生明显提升,同时激活PI3K/AKT信号通路,最终减少神经元的凋亡并促进损伤后脑组织修复。

本研究结果显示,与Sham组相比,MCAO组小鼠VEGF表达明显降低,在给予BEV干预后,BEV组小鼠VEGF表达相比MCAO组小鼠出现进一步明显降低,导致血管生成减少,血脑屏障破坏,加重了IS的损伤。VEGF的下调可能会进一步影响下游信号通路,尤其是PI3K/AKT信号通路的活性。

免疫组化染色及Western blot结果显示,MCAO组小鼠的PI3K、AKT蛋白表达水平及P-AKT/AKT比值明显降低,表明IS发生后PI3K/AKT信号通路受到抑制,可能与神经元凋亡的增加有关。而BEV干预后小鼠的PI3K蛋白表达进一步降低,P-AKT/AKT比值也明显降低,表明BEV可能通过抑制VEGF,进一步抑制了PI3K/AKT信号通路的活性。

VEGF/PI3K/AKT是一个经典的信号转导通路,参与细胞生存、增殖、代谢与凋亡等多种生物学过程,在肿瘤的生长转移和IS的发生、发展过程中发挥关键作用^[45,46]。VEGF通过与其特异性受体VEGFR相结合,激活PI3K生成磷脂酰肌醇三磷酸(PIP3),进而导致AKT的磷酸化,促进多种下游反应,包括细胞凋亡、细胞增殖等生物学效应。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡,具有高度调控性和特异性,对维持机体内环境稳态、发育以及免疫调节方面至关重要。作为一种基本的生理过程,细胞凋亡在细胞和组织生长中发挥重要作用,不仅可以解释疾病的发病机制,也可以为疾病的治疗提供重要线索^[47,48]。在IS中,PI3K/AKT信号通路的激活被认为是一种重要的神经保护机制。Bcl-2家族蛋白是调控细胞凋亡的关键分子,其中Bcl-2具有抗凋亡作用,而Bax则具有促凋亡作用。Bcl-2/Bax比值的变化可以反映细胞凋亡的趋势^[49]。本研究发现,与Sham组相比,MCAO组小鼠的Bcl-2/Bax比值表达明显下调,提示缺血导致了神经元凋亡的增加。为进一步探究BEV在IS中的机制,本研究检测了BEV组小鼠的Bcl-2/Bax比值变化。结果显示,与MCAO组相比,BEV组小鼠的Bcl-2/Bax比值明显降低,这提示BEV可能通过抑制Bcl-2的表达或促进Bax的表达,加重了神经元的凋亡。

本研究存在一些局限性。首先,本研究仅聚焦于VEGF/PI3K/AKT信号通路,而IS的病理机制涉及多种通路的交互作用,BEV可能通过其他通路间接调控神经功能损伤,未来需进一步探讨其潜在的多通路调控机制。其次,本研究仅采用固定的给药剂量(腹腔注射15 mg/kg),未探索不同剂量梯度(如高、中、低剂量)对结局的影响。未来需要进一步系统地评估这些因素对BEV作用的影响。

综上所述,本研究通过构建小鼠MCAO模型,初步探讨了BEV在IS中的潜在风险及其作用机制。本研究发现,BEV干预可进一步加重IS后的神经功能障碍,其机制可能与抑制VEGF/PI3K/AKT

信号通路活性有关,为进一步探讨 BEV 对脑血管系统的影响及其临床应用的潜在危险性提供了参考,也为临床医生合理选择药物治疗方案、降低患者治疗风险提供了理论依据。未来研究需进一步系统评估 BEV 的多通路调控机制及剂量效应,以期为临床治疗提供更全面的实验依据。

作者贡献度说明:

冯艺博:实验实施、数据分析、文章撰写;常青:实验技术指导及文稿审校;盖寒冰、康超群:数据分析;张辉:提出研究思路、设计研究方案。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(10): 795-820.
- Saini V, Guada L, Yavagal DR. Global epidemiology of stroke and access to acute ischemic stroke interventions [J]. *Neurology*, 2021, 97(20 Suppl 2): S6-S16.
- O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): A case-control study[J]. *Lancet*, 2010, 376(9735): 112-123.
- Sifat AE, Nozohouri S, Archie SR, et al. Brain energy metabolism in ischemic stroke: Effects of smoking and diabetes[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8512.
- Zhang C, Li Z, Liu L, et al. The role of hypertension and diabetes mellitus on the etiology of middle cerebral artery disease[J]. *Brain Behav*, 2022, 12(4): e2521.
- Centers for Disease Control and Prevention. Vital signs: Prevalence, treatment, and control of high levels of low-density lipoprotein cholesterol-United States, 1999-2002 and 2005-2008 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2011, 60(4): 109-114.
- Yaghi S, Elkind MS. Lipids and cerebrovascular disease: Research and practice[J]. *Stroke*, 2015, 46(11): 3322-3328.
- Liu X, Xiao X, Han X, et al. A new therapeutic trend: Natural medicine for ameliorating ischemic stroke *via* PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Molecules*, 2022, 27(22): 7963.
- 周经霞, 陈琳, 陈肇臻, 等. 血管内皮生长因子通过 PI3K-Akt 和 MAPK-ERK 通路促进脑梗死大鼠血管新生机制[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(15): 3749-3752.
- Zhou JX, Chen L, Chen BC, et al. Vascular endothelial growth factor promotes angiogenesis in rats with cerebral infarction through PI3K-Akt and MAPK-ERK pathways [J]. *Chin J Gerontol*, 2019, 39(15): 3749-3752.
- 陈慧, 郑晓梅, 夏晓, 等. PI3K/Akt 信号通路对脐血间充质干细胞减轻缺血性脑损伤和炎症反应的调节作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(2): 155-160.
- Chen H, Zheng XM, Xia X, et al. Regulation effect of PI3K/Akt signaling pathway on umbilical cord blood mesenchymal stem cells in alleviating ischemic brain injury and inflammatory response [J]. *Chin J Immunol*, 2021, 37(2): 155-160.
- Zeng H, Zheng R, Sun K, et al. Cancer survival statistics in China 2019-2021: A multicenter, population-based study[J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(3): 203-213.
- Chitkara A, Kaur N, Desai A, et al. Risks of hypertension and thromboembolism in patients receiving bevacizumab with chemotherapy for colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(24): 21579-21591.
- Sliwa-Tytka P, Kaczmarek A, Lejman M, et al. Neurotoxicity associated with treatment of acute lymphoblastic leukemia chemotherapy and immunotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5515.
- Zito C, Manganaro R, Carerj S, et al. Peripheral artery disease and stroke [J]. *J Cardiovasc Echogr*, 2020, 30(Suppl 1): S17-S25.
- Asowed M, Elander NO, Pettersson L, et al. Activity and safety of KEES-An oral multi-drug chemo-hormonal metronomic combination regimen in metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): 309.
- Farrukh M, Ali MA, Naveed M, et al. Efficacy and safety of checkpoint inhibitors in clear cell renal cell carcinoma: A systematic review of clinical trials[J]. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2023, 16(3): 170-185.
- You B, Purdy C, Copeland LJ, et al. Identification of patients with ovarian cancer experiencing the highest benefit from bevacizumab in the first-line setting on the basis of their tumor-intrinsic chemosensitivity (KELIM): The GOG-0218 validation study [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(34): 3965-3974.
- 李福英, 王亚峰, 张若宇, 等. 贝伐珠单抗对卵巢癌的疗效及对血清 SCC、CA15-3、CYFRA21-1 的水平影响 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2025, 26(1): 63-64.
- Li FY, Wang YF, Zhang RY, et al. Therapeutic efficacy of bevacizumab on ovarian cancer and its impact on serum SCC, CA15-3, and CYFRA21-1 levels [J]. *Chin J Clin Obstet Gynecol*, 2025, 26(1): 63-64.
- Li Z, Guo F, Han Y, et al. Efficacy and safety of bevacizumab in pretreated metastatic breast cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *Oncol Res Treat*, 2022, 45(10): 608-617.

- 20 Nelson BE, Tsimberidou AM, Fu X, et al. A phase I trial of bevacizumab and temsirolimus in combination with valproic acid in advanced solid tumors[J]. *Oncologist*, 2023, 28(12): 1100-e1292.
- 21 Quintanilha JC, Wang J, Sibley AB, et al. Bevacizumab-induced hypertension and proteinuria: A genome-wide study of more than 1 000 patients[J]. *Br J Cancer*, 2022, 126(2): 265-274.
- 22 Totzeck M, Mincu RI, Rassaf T. Cardiovascular adverse events in patients with cancer treated with bevacizumab: A meta-analysis of more than 20 000 patients[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(8): e006278.
- 23 刘伟, 谢莉莹, 姜可园, 等. 益气温阳颗粒联合贝伐珠单抗对肺癌小鼠肿瘤组织微环境的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(5): 585-590, 708.
Liu W, Xie LY, Jiang KY, et al. Effects of Yiqi Wenyang granules combined with bevacizumab on tumor tissue microenvironment in mice with lung cancer[J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2022, 31(5): 585-590, 708.
- 24 闻妹, 陈映霞, 秦叔逵, 等. 贝伐珠单抗诱导小鼠蛋白尿的形成机制[J]. *医学研究生学报*, 2016, 29(8): 812-817.
Wen M, Chen YX, Qin SK, et al. Mechanisms of bevacizumab inducing proteinuria in mice models[J]. *J Med Postgrad*, 2016, 29(8): 812-817.
- 25 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- 26 Jurcau A, Simion A. Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: From pathophysiology to therapeutic strategies[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 14.
- 27 Xu Y, Liu Y, Li K, et al. COX-2/PGE2 pathway inhibits the ferroptosis induced by cerebral ischemia reperfusion[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(3): 1619-1631.
- 28 Lun R, Roy DC, Hao Y, et al. Incidence of stroke in the first year after diagnosis of cancer-A systematic review and meta-analysis[J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 966190.
- 29 Mishra RK, Chavda VK, Moscote-Salazar LR, et al. Systematic review and meta-analysis of studies comparing baseline D-dimer level in stroke patients with or without cancer: Strength of current evidence[J]. *J Neurosci Rural Pract*, 2024, 15(1): 16-28.
- 30 Bavle A, Srinivasan A, Choudhry F, et al. Systematic review of the incidence and risk factors for cerebral vasculopathy and stroke after cranial proton and photon radiation for childhood brain tumors[J]. *Neurooncol Pract*, 2021, 8(1): 31-39.
- 31 Hussain SM. Tumor embolism and acute arterial occlusion: A systematic review[J]. *Surg Open Sci*, 2022, 10: 216-222.
- 32 Navi BB, Zhang C, Sherman CP, et al. Ischemic stroke with cancer: Hematologic and embolic biomarkers and clinical outcomes[J]. *J Thromb Haemost*, 2022, 20(9): 2046-2057.
- 33 Lyman GH, Carrier M, Ay C, et al. American Society of Hematology 2021 guidelines for management of venous thromboembolism: Prevention and treatment in patients with cancer[J]. *Blood Adv*, 2021, 5(4): 927-974.
- 34 Grisold W, Oberndorfer S, Struhal W. Stroke and cancer: A review[J]. *Acta Neurol Scand*, 2009, 119(1): 1-16.
- 35 Huang R, Zhou Y, Hu S, et al. Radiotherapy exposure in cancer patients and subsequent risk of stroke: A systematic review and meta-analysis[J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 233.
- 36 Kreisl TN, Toothaker T, Karimi S, et al. Ischemic stroke in patients with primary brain tumors[J]. *Neurology*, 2008, 70(24): 2314-2320.
- 37 Iwamoto FM, Fine HA. Bevacizumab for malignant gliomas[J]. *Arch Neurol*, 2010, 67(3): 285-288.
- 38 Seet RC, Rabinstein AA, Lindell PE, et al. Cerebrovascular events after bevacizumab treatment: An early and severe complication[J]. *Neurocrit Care*, 2011, 15(3): 421-427.
- 39 陈文彬, 张楠, 谢凤, 等. 氯沙坦及雷公藤多苷对贝伐珠单抗诱导的小鼠蛋白尿的影响及其相关机制的研究[J]. *实用药物与临床*, 2020, 23(10): 890-896.
Chen WB, Zhang N, Xie F, et al. Effects of losartan and tripterygium glycosides on bevacizumab-induced proteinuria in mice and the related mechanisms[J]. *Pract Pharm Clin Remed*, 2020, 23(10): 890-896.
- 40 Da Silva WC, De Araujo VE, Lima EM, et al. Comparative effectiveness and safety of monoclonal antibodies (bevacizumab, cetuximab, and panitumumab) in combination with chemotherapy for metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. *Bio Drugs*, 2018, 32(6): 585-606.
- 41 秦智刚, 徐尤年, 李锟. 米诺环素预处理对老龄大鼠七氟醚麻醉致认知功能障碍及海马神经元凋亡的影响[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2022, 24(8): 797-801.
Qin ZG, Xu YN, Li K. Minocycline pretreatment improves cognitive dysfunction and hippocampal neuronal apoptosis induced by sevoflurane anesthesia in elderly rats[J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*, 2022, 24(8): 797-801.

- 42 Panchabhai S, Kelemen K, Ahmann G, et al. Tumor-associated macrophages and extracellular matrix metalloproteinase inducer in prognosis of multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2016, 30(4): 951-954.
- 43 陈梅林, 林栓全, 韦霞琳, 等. CCR7、VEGF 与鼻咽癌患者临床病理特征及预后的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(9): 2084-2087.
- Chen ML, Lin SQ, Wei XL, et al. Association of CCR7 and VEGF with clinicopathological characteristics and prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin J Gerontol*, 2024, 44(9): 2084-2087.
- 44 吴彩虹, 韩冬梅, 金昊. 核酸适配体在肾癌中的应用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2023, 50(9): 2077-2083.
- Wu CH, Han DM, Jin H. Applications of aptamers in renal carcinoma [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2023, 50(9): 2077-2083.
- 45 罗佳承, 阮豪南, 王露露, 等. 中药成分通过调节 PI3K/AKT 信号通路在前列腺癌治疗中的研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(9): 1148-1152.
- Luo JC, Ruan HN, Wang LL, et al. Research progress of traditional Chinese medicine ingredients in the treatment of prostate cancer by regulating PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Chin J Mod App Pharm*, 2021, 38(9): 1148-1152.
- 46 张建芳, 孙雪琴, 崔叶谦, 等. 血管内皮生长因子抑制剂在胆管细胞癌治疗中的应用进展[J]. *实用医学杂志*, 2024, 40(24): 3554-3560.
- Zhang JF, Sun XQ, Cui YQ, et al. Effects of VEGF inhibitors for treating cholangiocarcinoma: A review of literature[J]. *J Pract Med*, 2024, 40(24): 3554-3560.
- 47 Xu X, Lai Y, Hua Z. Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(1): BSR20180992.
- 48 Hata AN, Engelman JA, Faber AC. The BCL2 family: Key mediators of the apoptotic response to targeted anti-cancer therapeutics [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(5): 475-487.
- 49 Zeng B, Liu L, Liao X, et al. Thyroid hormone protects cardiomyocytes from H₂O₂-induced oxidative stress *via* the PI3K-AKT signaling pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 380(2): 205-215.

[本文编辑] 陈思润