

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 22. 012

黄芪甲苷调控 LC3/mTOR 自噬通路在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用*

史楠, 张燕, 李晋峰, 金磊, 张蔚, 赵梅珍, 罗峥, 赵玫

(上海健康医学院附属周浦医院神经内科, 上海 201318)

摘要:目的 探讨 LC3/mTOR 自噬通路调控黄芪甲苷在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用和意义。方法 将 50 只成年雄性 Wistar 大鼠构建大鼠脑缺血再灌注损伤(MCAO)模型, 随机分为对照组、模型组、雷帕霉素(RAPA)组、3-MA 组、黄芪甲苷(AST)组。采用灌胃方法在造模前分别灌注雷帕霉素, 3-MA 和黄芪甲苷。按 Longa 评分标准进行神经功能缺陷评分; 计算梗死灶体积和 HE 染色观察脑损伤情况; 采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 mTOR、LC3、Beclin-1、ATG5、SQSTM1/p62 和 Caspase-3 mRNA 和蛋白质表达。结果 与模型组相比, RAPA 组、3-MA 组、AST 组 Longa 评分显著降低, 梗死面积(%)显著减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。黄芪甲苷治疗后, 大鼠 Longa 评分最低, 梗死面积(%)最少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比, AST 组 mTOR、p62 和 Caspase-3 mRNA 和蛋白质水平显著降低, LC3 和 Beclin-1 mRNA 和蛋白质水平显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 黄芪甲苷可以有效治疗和缓解大鼠 MCAO, LC3/mTOR 自噬通路在此过程中发挥重要的作用。

关键词: 自噬通路; LC3/mTOR; 黄芪甲苷; 脑缺血再灌注损伤**中图分类号:** R743.3**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2018)22-3363-04

The effect of LC3/mTOR autophagy pathway regulating astragaloside in cerebral ischemia reperfusion injury in rats*

SHI Nan, ZHANG Yan, LI Jinfeng, JIN Lei, ZHANG Wei, ZHAO Meizhen, LUO Zheng, ZHAO Mei

(Department of Neurology, Zhoupu Hospital Affiliated to Shanghai Health Medical College, Shanghai 201318, China)

Abstract: Objective To investigate the role of LC3 / mTOR autophagy pathway in the regulation of astragaloside in cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** Fifty adult male Wistar rats were used to establish a model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. The rats were randomly divided into control group, model group, rapamycin group, 3-MA group, Astragaloside A (AST) group. The gavage method was used to perfuse rapamycin, 3-MA and astragaloside respectively before modeling. Longa score was used to evaluate neurological deficit. Infarct volume and HE staining were used to evaluate brain injury. Real-time PCR and Western blot were used to detect mTOR, LC3, Beclin-1, ATG5, SQSTM1/p62 and Caspase-3 mRNA And protein expression. **Results** Compared with the model group, the Longa score of RAPA group, 3-MA group and AST group decreased significantly and infarct area (%) decreased significantly ($P < 0.05$). Astragaloside treatment, the Longa score the lowest, infarct size (%) least, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The mRNA and protein levels of mTOR, p62 and Caspase-3 in AST group were significantly lower than those in model group, while the contents of LC3 and Beclin-1 mRNA and protein were significantly increased in AST group ($P < 0.05$). **Conclusion** Astragaloside can effectively treat and relieve cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, and LC3/mTOR autophagy pathway plays an important role in this process.

Key words: autophagy pathway; LC3/mTOR; astragaloside; cerebral ischemia-reperfusion injury

脑卒中是全世界第三大致死疾病之一, 具有高发病率、高致残率、高病死率及高复发率的特点。根据 2009 年 WHO 调查报告显示, 我国脑卒中发病率以每年 8.7% 的速率迅速增长^[1-2]。研究发现, 脑梗死再复发时患者病情通常会加重, 脑卒中常引起长期残疾且

多为终身性疾病。脑卒中已严重威胁到广大人民群众的健康, 脑梗死会对个人、家庭、社会造成严重的负担。积极探寻脑梗死新的治疗方法具有重要的意义^[3-4]。

缺血性脑卒中是因多种病因造成脑动脉闭塞导

* 基金项目: 上海健康医学院种子基金项目(HMSF-17-22-037); 上海市浦东新区重点专病项目(PWZzb2017-11)。

作者简介: 史楠, 男, 主治医师, 主要从事脑血管病的研究。

致脑组织缺血缺氧,进而导致脑组织出现兴奋性毒性、线粒体功能失调、氧化应激、炎症、离子失衡及酸中毒,最终导致脑组织不可逆性损伤,神经细胞坏死,出现神经功能及认知功能缺失^[5]。缺血所引的脑组织损伤是致死性疾病的主要原因。但在急性脑梗死的抢救和治疗过程中,人们发现在恢复血液供应后,这部分重新获得血液供应的脑组织内的神经细胞死亡增多,脑组织损伤加重,患者症状加重,这种损伤叫做“缺血再灌注损伤”。近些年来,许多自噬相关研究已证实自噬参与了脑缺血的病理生理过程,在前期实验中笔者发现在缺血再灌注早期黄芪甲苷可增强自噬水平,并可减少海马细胞的死亡^[6]。因此,研究黄芪甲苷对自噬的调控,寻找靶作用点,探索其在脑梗死缺血再灌注中的作用机制是一个新方向,对脑梗死的防治具有重要的临床价值。

1 材料与方法

1.1 材料 选取 50 只成年雄性 Wistar 大鼠 SPF 级,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司。置于相对湿度 40%~70%,昼夜 12 h 循环光照,温度适宜的环境下。

1.2 方法

1.2.1 大鼠脑缺血再灌注损伤(MACO)模型制备^[7] 将SD大鼠按设计方案分成5组,每组10只;分别为对照组、模型组、雷帕霉素(RAPA)组、3-甲基腺嘌呤(3-MA)组、黄芪甲苷(AST)组。采用Zea Longa线栓法建立大鼠缺血性脑损伤模型。SD大鼠用10%水合氯醛(35 mg/kg)腹腔注射麻醉。仰卧位固定,颈正中线切口,沿胸锁乳突肌内缘分离肌肉和筋膜,分离左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),在CCA远心端、近心端及ECA处挂线备用。用动脉夹暂时夹闭ICA,然后近心端结扎CCA、ECA。然后在距CCA分叉部4 mm处剪1个小口,将拴线插入到ICA,这时用绕在CCA远心端的细线轻轻系牢拴线。用眼科镊轻推拴线,从血管分叉处开始算距离,当插入深度在18 mm时,紧紧系牢CCA远心端的细线。栓塞1 h后,打开栓塞制作再灌注模型。做完模型后,终止麻醉,将所有大鼠放归笼里。造模前RAPA组、3-MA组、AST组以40 mg·kg⁻¹·d⁻¹的黄芪甲苷灌胃3 d,对照组、模型组给予等量的5%羧甲基纤维素钠溶液,于末次给药1 h后造模。

1.2.2 大鼠 Longa 评分^[8] 动物苏醒后,参照 Longa 等评分标准进行神经功能缺陷评分。0分:无神经损伤症状;1分:不能完全伸展对侧前爪;2分:向对侧转圈;3分:向对侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失。1~3分为模型成功,0分和4分予以剔除,并在后续实验中补足每组动物数。

1.2.3 采样与指标检测 大鼠用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,留取大脑海马组织,用10%中性甲醛固定,

常规脱水、透明及浸蜡包埋,连续石蜡切片6张(每张5 μm),切片用于HE染色和2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)检测观察脑组织形态变化和颜色变化,计算梗死面积。

1.2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 离心大鼠脑组织,冰上裂解2 h,蛋白质水平检测使用BCA试剂盒,调整每组的蛋白质水平总量为30 μg/μL。各组蛋白质样品依次加入在10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)中进行,按1:500的稀释比例转膜至PVDF膜,加入多克隆抗体mTOR、LC3、Beclin-1、ATG5、SQSTM1/p62和Caspase-3、ACTB和二抗。显色使用ECL显色剂,成像使用Bio-Pro凝胶成像分析仪,各泳道条带进行灰度扫描得出相应蛋白质表达量用Quantity-one软件进行分析。

1.2.5 实时荧光定量PCR(RT-PCR)检测基因表达 Trizol法提取大鼠脑组织内总RNA。按照试剂盒说明书逆转录合成cDNA并进行RT-PCR分析。每个实验mTOR、LC3、Beclin-1、ATG5、SQSTM1/p62和Caspase-3至少重复3次。分析:通过计算mTOR、LC3、Beclin-1、ATG5、SQSTM1/P62和Caspase-3得到循环阈值CT值来确定基因的表达量。

1.3 统计学处理 采用SPSS22.0统计软件进行处理,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析和Bonferroni's Multiple Comparison Test,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经组织学评分结果 对照组大鼠脑组织呈均匀红色,未见苍白缺血区;模型组损伤脑组织可见苍白梗死灶,且缺血灶范围随再灌注时间的延长而扩大。手术后,RAPA组、3-MA组、AST组和模型组大鼠Longa评分显著增高,梗死面积(%)显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比,RAPA组、3-MA组、AST组Longa评分显著降低,梗死面积(%)显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。黄芪甲苷治疗后,大鼠Longa评分最低,梗死面积(%)最少,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

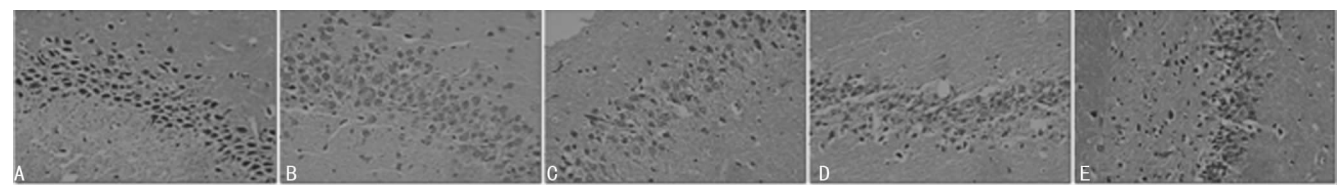
表 1 大鼠神经组织学评分结果($\bar{x} \pm s$)		
组别	Longa 评分(分)	梗死面积(%)
对照组	0.62±0.21	0
模型组	3.48±0.42*	30.35±2.14*
3-MA 组	3.22±0.38*#	26.26±2.75*#
RAPA 组	2.74±0.35*#△	22.61±2.72*#△
AST 组	2.24±0.20*#	15.66±2.69*#

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与AST组比较,△ $P < 0.05$

2.2 HE染色结果 对照组大鼠脑海马回神经细胞胞膜、核膜清晰,核仁明显,细胞形态无异常,见图1。模型组大鼠神经细胞多无完整的细胞结构,呈不同程度的缺血性坏死,细胞核固缩,染色质浓缩集聚,甚至

形成核碎片,星形胶质细胞呈簇样增生。RAPA 组、3-MA 组、AST 组缺血区神经细胞仅有轻、中度缺血

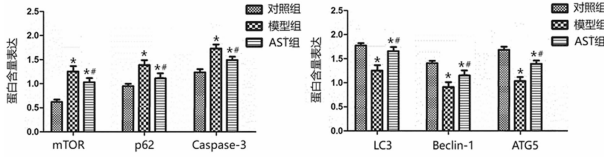
性改变,细胞肿胀程度、间隙及细胞核改变均较模型组轻,缺血区脑梗死现象明显减轻。



注:A为对照组;B为模型组;C为3-MA组;D为RAPA组;E为AST组

图1 染色结果(HE,×400)

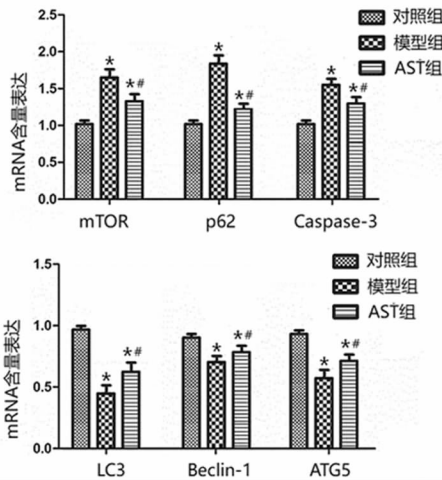
2.3 Western blot 检测蛋白质表达结果 与对照组相比,模型组和 AST 组大鼠脑组织中 mTOR、p62 和 Caspase-3 的蛋白质水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);LC3、Beclin-1 和 ATG5 的蛋白质水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,AST 组 mTOR、p62 和 Caspase-3 的蛋白质水平显著降低,LC3、Beclin-1 和 ATG5 的蛋白质水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。



注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

图2 蛋白质表达水平

2.4 RT-PCR 检测基因表达结果 与对照组相比,模型组和 AST 组大鼠脑组织中 mTOR、p62 和 Caspase-3 mRNA 水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);LC3、Beclin-1 和 ATG5 mRNA 水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,AST 组 mTOR、p62 和 Caspase-3 mRNA 水平显著降低,LC3、Beclin-1 和 ATG5 mRNA 水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3。



注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

图3 mRNA 表达水平

3 讨论

细胞自噬的调控有多种途径,如泛素样蛋白质系

统、mTOR 信号通路、miRNA、Caspase 等。在缺血缺氧条件下,ATP 水平下降,AMP 水平升高,导致 AMP 活化的蛋白激酶(AMPK)被激活,后者通过磷酸化 mTOR 抑制 mTOR 活性而激活自噬。Beclin-1 与 Bcl-2/Bcl-XL 解离与Ⅲ型 PI3K 相结合可诱导细胞自噬发生^[9-10]。许多自噬相关研究已证实自噬参与了脑缺血的病理生理过程。其可能机制为神经元缺血缺氧后 ATP 水平下降,通过多种途径导致自噬激活,细胞通过自噬清除了受损的细胞器等异常细胞结构,同时也为细胞提供能量,从而稳定细胞的形状、结构,维持细胞的正常功能。LC3(MASP1-LC3),LC3 的前体形成后被加工成 LC3-I,LC3-I 为胞质可溶性,LC3-I 被 ATG7 活化后转运至 ATG3,并被 ATG3 修饰成 LC3-II。LC3-II 为膜结合形式^[11]。LC3-II 存在于前自噬体及自噬体膜上,是自噬体的标志分子。当自噬发生后,LC3 的数量增高,同时,LC3-I 向 LC3-II 的转化增多,因此,LC3-II 的水平与自噬体的数量呈正比^[12]。可通过检测细胞内 LC3-II/LC3-I 以判断细胞自噬是否被激活。自噬体与溶酶体结合后,LC3-II 被溶酶体中的水解酶所降解。在 ATG5-/- 的胚胎干细胞中检测不到 LC3-II。由此可见,ATG5 参与了自噬的形成与发展,是自噬的主要的指标之一。Beclin-1 基因又称 BECN-1 基因,为酵母 ATG6 的同系物,Beclin-1 基因可通过Ⅲ型 PI3K 形成复合物调节自噬的活性,上调 Beclin-1 的表达增加自噬的发生^[13-14]。

黄芪甲苷从黄芪根中提取分离而得,为黄芪的主要活性成分之一。研究表明,黄芪甲苷口服后经肠道菌群的代谢转化,其代谢产物环黄芪醇-6-O-β-D-葡萄糖苷(CMG)吸收入血发挥药理作用。黄芪甲苷可特异性和非特异性的排除侵入机体的异物,促进机体抗体的生成,对特异免疫和非特异性免疫均有促进作用,提高机体的抗病能力。黄芪甲苷作为单核-巨噬细胞系统的有效激活剂,能显著提高球虫免疫鸡的淋巴细胞转化水平和 E 花环形成率,提高机体 GSH-PX、SOD 活性和体内抗氧化酶系统的功能,诱生白细胞介素和内源性干扰素,减少活性氧自由基对机体的损伤,进而提高免疫防御和免疫监视功能。黄芪甲苷作为促生长剂,能增强细胞生理代谢作用,促进血液循

环,增强动物机体的代谢,起到营养保健作用^[15-16]。国内外研究表明,黄芪甲苷能够通过促进胶质细胞生长,增加神经干细胞来源的神经元的数量,并加速其分泌修复损伤的神经元的生长因子和营养因子等,对新生神经元进行保护,促进神经干细胞增殖,诱导其向胶质细胞分化,在先期的实验中我们发现在缺血再灌注早期黄芪甲苷可增强自噬水平,并可减少海马细胞的死亡^[-17-18]。

本研究结果表明,黄芪甲苷可以有效降低 Longa 评分。黄芪甲苷可以减轻大鼠脑组织脑缺血损伤情况,改善损伤海马区不同程度的缺血性坏死和神经元损伤;显著降低大鼠海马区神经元内 mTOR、p62 和 Caspase-3 mRNA 和蛋白质水平表达,升高 LC3 和 Beclin-1 mRNA 和蛋白质水平表达,说明黄芪甲苷可通过调节 LC3/mTOR 信号通路改善大鼠 MCAO,为脑梗死的治疗提供新的理论依据、可能思路和靶向药物。

参考文献

[1] 周琪,张玉敏,顾全,等. 脂蛋白 a、N-末端脑钠肽前体和白细胞计数联合检测在脑卒中诊断中的应用价值[J]. 标记免疫分析与临床,2017,24(3):267-270.

[2] 周丽萍,乔羲,刘毓刚,等. 血清同型半胱氨酸及其代谢相关基因 MTHFR 多态性与缺血性脑卒中发生及预后的关系[J]. 标记免疫分析与临床,2017,24(3):241-246.

[3] 刘秦,邵明,陈盛强,等. 不同亚型缺血性脑卒中与磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶启动子 232 基因多态性的研究[J]. 解剖学研究,2016,38(6):433-436.

[4] 李珊珊,李国营. 缺血性脑卒中中药防治的研究进展[J]. 解剖学研究,2016,38(3):200-202.

[5] 周芹. 黄芪甲苷抗凋亡作用机制的研究进展[J]. 中国现代应用药学,2017,34(5):783-788.

[6] 樊开宇,王冰,梅骁乐,等. 滁菊总黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学与治疗学,2017,22(1):9-12.

[7] 张光茹,宫圣,王界成,等. 不同时间窗 MACO 模型大鼠脑脊液对星形胶质细胞活性的影响[J]. 兰州大学学报(医学版),2016,42(3):1-5.

[8] 刘恒涛. 地黄饮子治疗对脑缺血大鼠行为学评分的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(2):168-170.

[9] 蒲江涛,唐小军,胡智,等. SPOCK1 通过 mTOR-s6K 信号通路诱导肺癌细胞增殖、侵袭和迁移[J]. 东南大学学报(医学版),2017,36(5):746-752.

[10] 徐殿新,于跃利. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在甲状腺癌中的研究进展[J]. 现代医药卫生,2014,30(5):687-690.

[11] 丁亦含,李玉峰. mTOR 信号通路 with 自噬、凋亡之间的相互关系[J]. 现代医学,2015,43(6):801-804.

[12] 张吟眉,张捷. 急性肾损伤中的自噬[J]. 检验医学与临床,2016,13(2):272-275.

[13] 徐一娇,茅晓东,曹萌,等. 甲状腺癌与 mTOR 的研究进展[J]. 江苏医药,2016,42(13):1486-1488.

[14] 安丽,朱孔博,钱玲林,等. 自噬在他汀致胰岛细胞分泌功能障碍中的作用[J]. 现代医学,2017,45(8):1064-1066.

[15] 曹玉冰. 黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展[J]. 现代药物与临床,2017,32(5):954-960.

[16] 张建平,储利胜,陶水良,等. 黄芪甲苷和三七总皂苷配伍对脑缺血再灌注损伤大鼠海马 NSCs 的保护作用[J]. 中成药,2017,39(11):2372-2376.

[17] 郑静,金国琴,尹芳,等. 黄芪甲苷对皮质酮损伤海马神经细胞的保护作用及 GCR 和 SYN1 表达的影响[J]. 中药药理与临床,2016,32(2):83-87.

[18] 史楠,张燕,李晋峰,等. 黄芪甲苷通过 AKT-mTOR 信号通路促进脑缺血的自噬改善脑缺血再灌注损伤[J]. 中国临床神经科学,2017,25(6):601-612.

(收稿日期:2018-03-07 修回日期:2018-05-28)

(上接第 3362 页)

析[J]. 海南医学院学报,2018,24(3):301-303.

[8] 熊婵,蒋学慧,田亚平,等. II 型糖尿病患者与健康男性血清中 19 种微量元素含量对比[J]. 质谱学报,2017,38(2):195-202.

[9] 张宇,刘丽. 高危糖尿病患者血清微量元素和脂肪因子的异常变化与血糖水平的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(1):79-81.

[10] 邵小娟,胡文,郝海荣等. 2 型糖尿病病人微量元素铁水平与糖尿病肾病相关性分析[J]. 安徽医药,2017,21(4):699-702.

[11] BADRAN M, MORSY R, SOLIMAN H, et al. Assessment of trace elements levels in patients with Type 2 diabetes using multivariate statistical analysis[J]. J Trace

Elem Med Biol,2016(33):114-119.

[12] 卜莉,韩磊. 血清锌、铁含量与 2 型糖尿病患者糖脂代谢的关系[J]. 中国医师杂志,2017,19(8):1257-1259.

[13] 杨振宇. 膳食营养干预预防妊娠期糖尿病[J]. 中华预防医学杂志,2018,52(1):101-106.

[14] ZHANG H, YAN C, ZHEN Y, et al. Alterations of serum trace elements in patients with type 2 diabetes[J]. J Trace Elem Med Biol,2017(40):91-96.

[15] 刘宋芳,王述进,杜军辉,等. 血清中微量元素铬浓度与糖尿病罹患风险相关性的 Meta 分析[J]. 中国临床研究,2017,30(6):789-792.

(收稿日期:2018-05-12 修回日期:2018-07-18)