

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002300

电针预处理通过抑制 AMPK-Beclin1/Vps34 通路介导的细胞自噬减轻脑缺血再灌注损伤

冯 刚¹, 封蔚彬², 青 云³, 涂小华¹, 潘 娟⁴

(1. 重庆医科大学附属康复医院骨与关节康复科, 重庆 400050; 2. 南华大学第一附属医院神经内科, 衡阳 421001;
3. 重庆医科大学附属第一医院璧山医院肿瘤科, 重庆 400016; 4. 重庆医科大学附属康复医院神经康复科, 重庆 400050)

【摘要】目的:探讨电针预处理治疗对大鼠脑缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤的影响及其相关机制。**方法:**将健康成年雄性 SD 大鼠 75 只随机分为 Sham 组, 脑缺血再灌注组(I/R 组), 电针预处理并缺血再灌注组(EA+I/R 组), 脑纹状体感染 AAV-VC(空载体病毒)后再给予电针预处理并缺血再灌注组(AAV-VC+EA+I/R 组)和脑纹状体感染 AAV-Beclin1(过表达 Beclin1 病毒)后再给予电针预处理并缺血再灌注组(AAV-Beclin1+EA+I/R 组), 每组 15 只大鼠。对各组大鼠脑中动脉梗死(middle cerebral artery occlusion, MCAO)术后 1、2、3 d 进行神经功能评分;在 MCAO 术后 7 d 处死大鼠, TTC 染色以测定脑梗死体积;TUNEL 染色法检测脑细胞凋亡状况;免疫印迹法检测自噬相关分子 LC3- I、LC3- II、AMPK 和 Beclin1 的蛋白表达水平;免疫共沉淀检测 Beclin1 与 Vps34 的相互作用。**结果:**与 Sham 组相比, I/R 组脑梗死体积与神经行为学评分明显增加(均 $P<0.05$)。机制研究显示缺血再灌注后 LC3- II/LC3- I 比值增加($P<0.05$), 且自噬调控蛋白 AMPK 与 Beclin1 上调表达(均 $P<0.05$), Beclin1 与 Vps34 复合物形成增多;与此同时, 细胞凋亡数目明显增加。给予电针预处理后, 上述指标均明显改善(均 $P<0.05$)。而在电针预处理之前对自噬关键蛋白 Beclin1 进行脑内过表达可以逆转电针预处理对缺血脑损伤的保护作用($P<0.05$)。**结论:**电针预处理可能通过抑制 AMPK-Beclin1/Vps34 通路减少自噬, 发挥神经保护作用。

【关键词】电针;细胞自噬;缺血再灌注**【中图分类号】**R741.05**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-12-27

Electroacupuncture pretreatment reduces cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting the AMPK-Beclin1/Vps34 pathway-mediated autophagy

Feng Gang¹, Feng Weibin², Qing Yun³, Tu Xiaohua¹, Pan Juan⁴

(1. Department of Bone and Joint Rehabilitation, The Affiliated Rehabilitation Hospital of Chongqing Medical University; 2. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of University of South China; 3. Department of Oncology, Bishan Hospital, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 4. Department of Neurological Rehabilitation, The Affiliated Rehabilitation Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effect of electroacupuncture(EA) pretreatment on cerebral ischemia/reperfusion(I/R) injury in rats and its relevant mechanism. **Methods:** Seventy-five healthy adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into Sham group, I/R group, EA+I/R group, corpus striatum infection with adeno-associated virus-vector control(AAV-VC, an empty virus vector)+EA+I/R group, and corpus striatum infection with adeno-associated virus-Beclin1(AAV-Beclin1, a Beclin1-overexpressing virus)+EA+I/R group, with 15 rats in each group. The neurological function scores of the rats in each group were evaluated 1, 2, and 3 days after a middle cerebral artery occlusion(MCAO); the rats were sacrificed 7 days after the MCAO, and their cerebral infarct volumes were measured by TTC staining; cerebral cell apoptosis was evaluated by TUNEL staining; the protein expression levels of the autophagy-related molecules LC3- I, LC3- II, AMPK, and Beclin1 were determined by Western blot; the interaction between Beclin1

and Vps34 was evaluated by co-immunoprecipitation assay.

Results: Compared with the Sham group, the I/R group showed significant increases in cerebral infarct volume and neurobehavioral score(both $P<0.05$). The mechanism research showed a significantly increased LC3- II/LC3- I ratio and up-regulated expression of the autophagy regulatory proteins AMPK and

作者介绍: 冯 刚, Email: 2156451653@qq.com,

研究方向: 脑卒中后康复治疗。

通信作者: 潘 娟, Email: 2797412733@qq.com。

基金项目: 湖南省自然科学基金面上资助项目(编号: 2018JJ2358)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190917.1305.064.html>

(2019-09-18)

Beclin1 (all $P<0.05$) with increased formation of Beclin1 and Vps34 complex after I/R treatment; meanwhile, the number of apoptotic cells increased significantly. The above indices were significantly improved after EA pretreatment (all $P<0.05$). However, intracerebral overexpression of the key autophagy-related protein Beclin1 prior to EA pretreatment reversed the protective effect of EA pretreatment against I/R injury ($P<0.05$). **Conclusion:** EA pretreatment may play a neuroprotective role through inhibiting the AMPK-Beclin1/Vps34 pathway to reduce autophagy.

[Key words] electroacupuncture; autophagy; ischemia/reperfusion

急性缺血性脑卒中是一种常见的中枢神经系统疾病,是由于脑血管中血栓形成使脑血流供应障碍,造成氧气和葡萄糖等营养物质供应减少,导致受影响脑区功能及结构受到暂时性或者永久性损伤所形成的^[1-2]。缺血性脑卒中约占中风病例的 80%^[3]。对于 60 岁以上群体,缺血性脑卒中是仅次于心血管疾病的第二大致死因素,在全球范围内每年造成死亡人数可达 670 万^[2-3]。缺血性脑卒中也是成年人永久性残疾的首要病因,以及造成痴呆的第二大常见病因^[4-5]。但是,面对缺血性脑卒中这一重大疾病,目前其治疗策略仍十分局限且受益患者极少^[6]。因此,对急性脑卒中有效治疗方法的研究显得尤为迫切。

近年来,电针用于治疗缺血性脑卒中的研究日渐深入。在动物模型中,大量研究显示电针预处理可有效减轻缺血再灌注引起的脑损伤^[7-9]。有报道表明,电针预处理可以激活促存活信号分子 Akt 的上调表达以抑制 Caspase-9 介导的细胞凋亡^[7];可以通过调控 NMDA 受体和减少活性氧自由基 (reactive oxide species, ROS) 的产生促进神经元存活^[10-11];同时也可以通过抑制 NO 产生保护效应^[12]。电针对于脑缺血再灌注损伤中的多重损伤因素的抵抗作用也促使我们更深入更多元化探讨其作用机制。

日益增多的证据显示自噬在缺血性脑损伤过程中扮演着一个具有争议性的角色^[13-16]。一些研究表明脑缺血过程中自噬的发生会造成神经细胞死亡从而加剧脑损伤^[13-14],同时也有研究显示自噬对神经细胞的存活及后续修复过程是必不可少的^[15-16]。但是,电针预处理是否通过调控自噬过程参与对缺血性脑损伤的保护作用却知之甚少。

本研究采用大鼠中脑动脉梗死为模型,将对自噬过程是否参与电针预处理对缺血性脑损伤的保护作用进行具体研究,以期电针治疗缺血性脑卒

中提供更丰富的临床前研究证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂以及抗体 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 购自天津市科密欧化学试剂有限公司;免疫荧光/组化抗体稀释液 (Cat: S3022)、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (Cat: C1086) 购自江苏碧云天生物试剂公司;哺乳动物细胞裂解液 (Cat: 78501)、IP 裂解液 (Cat: 87787) 购自 Thermo Fisher Scientific 公司;BCA 蛋白质定量试剂盒 (Cat: ab102536) 购自 Abcam 公司;IP 蛋白 A/G 磁珠 (Cat: B23202) 购自 Biotool 公司;AMPK (Cat: 2535)、Beclin1 (Cat: 3495)、LC3 (Cat: 4108) 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司;AAV-Beclin1 与 AAV-VC 重组病毒由上海吉玛公司合成,其中 AAV-Beclin1 携带全长 Beclin1 基因序列,AAV-VC 携带无已知基因重复的乱码序列。

1.1.2 实验主要仪器设备 蛋白质电泳槽、转膜槽、Chem-Doc™ 成像系统购自 Bio-Rad 公司;多功能酶标仪购自 Synergy H1 公司;激光共聚焦显微镜购自 Nikon 公司;Syringe Infusion Pump (Cat: KDS 310 plus) 购自 Kd Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠分组与大鼠中脑动脉梗死 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型制作 SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠 75 只,体质量 260~290 g (购自北京维通利华实验动物技术有限公司),随机分为 Sham 组、缺血再灌注组 (I/R 组)、电针预处理+缺血再灌注组 (EA+I/R 组)、AAV-VC+电针预处理+缺血再灌注组 (AAV-VC+EA+I/R 组)、AAV-Beclin1+电针预处理+缺血再灌注组 (AAV-Beclin1+EA+I/R 组),每组 15 只。根据参考文献制作大鼠 MCAO 模型^[17]。在手术前大鼠禁食 12 h,自由饮水。用 60 mg/kg 苯巴比妥钠腹腔注射进行麻醉。大鼠固定于手术台,暴露出颈总动脉进行结扎,颈外动脉远端同时进行结扎。利用眼科剪在结扎点外将颈外动脉剪断,将颈外动脉拉向外下方,使其与颈内动脉处于同一直线。之后,在颈外动脉与颈总动脉之间剪一缺口,将直径 0.28 mm 尼龙栓线插入直至颈内动脉有阻力感。120 min 后,拔出栓线,实现再灌注过程。Sham 组:完成 MCAO 全部手术,但不插入栓线;I/R 组:完成

MCAO全部手术;EA+I/R组:电针在大鼠百会穴处沿皮下进针2 mm,以0.5 mA电流采用3/15 Hz频率每天刺激百会穴30 min,连续刺激5 d后,进行MCAO手术;AAV-VC+EA+I/R组和AAV-Beclin1+EA+I/R组:脑纹状体分别给予AAV-VC(空载体病毒)、AAV-Beclin1病毒,15 d后(第16天开始)每天利用电针刺激百会穴30 min,第21天进行MCAO手术。

1.2.2 脑纹状体内注射 AAV-VC(空载体病毒)、AAV-Beclin1 病毒方法 测定 AAV-Beclin1 与乱序对照组 AAV-VC 重组病毒滴度为 3.5×10^{12} VG/mL。将大鼠固定于脑立体定位仪上,碘伏消毒后剪开皮肤,找到前囟位置。根据以下坐标找到注射部位:前囟前方 1.0 mm,中线右侧 3.0 mm。利用微孔牙科转打孔,进针深度为硬膜下 4.5 mm。注射病毒体积为 2 μ L,注射速度为 0.2 μ L/min。注射完毕后,微量注射器停留在注射部位 5 min 之后再拔出。注射 15 d 后(第 16 天开始)给予每天利用电针刺激百会穴 30 min,第 21 天给予 MCAO。

1.2.3 神经功能学评分 本研究根据 mNSS 评分法^[18]对再灌注第 1 天、第 2 天、第 3 天和第 7 天大鼠在急性期的神经功能缺陷进行评分。mNSS 评分量表包含运动测试、感觉测试、平衡测试和反射测试组成,各测试评分总和为最终神经功能缺陷评分;其中 0 分为无神经功能障碍,0 分<mNSS 评分 $\leq$ 6 分为轻度神经功能障碍,7 分 $\leq$ mNSS 评分 $\leq$ 12 分为中度神经功能障碍,13 分 $\leq$ mNSS 评分<18 分为重度神经功能障碍,18 分为代表极重神经功能障碍。若大鼠发生抽搐和持续意识障碍的大鼠将被剔除出组。

1.2.4 TTC 染色测量脑梗死体积 再灌注第 7 天,每组任取 9 只大鼠,给予过量麻醉剂处死大鼠,断头迅速取出鼠脑,置于-20℃冰箱中 10 min,取冠状面均匀连续 6 次切成 2 mm 厚脑片,迅速放入 1% 的 TTC 溶液中于 37℃染色 30 min,完全去除 PBS,加入 4%多聚甲醛固定脑片。24 h 拍照,利用图像处理软件(ADOBE PHOTOSHOP CS6)计算每片脑片的梗死面积(红色区为正常脑组织,白色区为梗死区)后积分转换为梗死容积。梗死体积=每片脑片的梗死区域体积之和/每片脑片的全脑组织体积之和。

1.2.5 TUNEL 染色法检测组织细胞凋亡状况 再灌注第 7 天,取各组剩余 6 只大鼠,取梗死侧半球脑水肿组织或 Sham 组同部位脑组织,分为 2 部分,一部分直接冻存在-80℃冰箱,另外一部分直接制作石蜡包埋组织。取石蜡包埋组织,进一步制作石蜡切片,55℃烤片过夜。二甲苯脱蜡 2 次,每次 10 min。之后进行无水乙醇 3 min,95%乙醇 3 min,80%乙醇 3 min,70%乙醇 3 min,双蒸水 3 min。在组织切片上滴加 20 μ g/mL 不含 DNase 的蛋白酶 K,37℃数箱孵育 20 min,用 PBS 缓冲液彻底去除蛋白酶 K。根据 TUNEL 染色试剂盒说明书加入染料,利用激光共聚焦显微镜拍照。

1.2.6 免疫印迹检测 AMPK,Beclin1,LC3 蛋白表达水平 取各组大鼠梗死侧半球脑水肿组织或 Sham 组同部位脑组织至 EP 管中,加入 2 倍组织量体积的裂解液,冰上超声破碎至无

肉眼可见的组织块,利用 BCA 蛋白质定量试剂盒进行蛋白定量。样品定量至相同浓度后,每组样品取 20 μ g 蛋白,加入上样缓冲液后在沸水中煮 5 min 以使蛋白完全变性。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至 PVDF 膜。室温以 5%脱脂奶粉封闭 1 h,加入相应的抗体,4℃孵育过夜。次日以 TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。再加入相对应的二抗,室温孵育 1 h。TBST 洗涤后利用化学发光法成像。

1.2.7 免疫共沉淀检测 Beclin1 与 Vps34 的相互作用 取各组大鼠梗死侧半球脑水肿组织或 Sham 组同部位脑组织至 EP 管中,加入 2 倍组织量体积的 IP 裂解液,冰上超声破碎至无肉眼可见的组织块,利用 BCA 蛋白质定量试剂盒进行蛋白定量。以 IP 裂解液稀释各组样品至相同浓度后,每个样品中取出 40 μ L 至一新的 EP 管用做 input。剩余样品各取出等量体积至一新的 EP 管(按照剩余体积的最小样品量计算),根据抗体说明书加入适量的抗体。4℃孵育过夜。次日剧烈涡旋重悬磁珠,按照每个反应 50 μ L 使用量取磁珠悬液至 EP 管中,在磁力架上去除上清,加入 IP 裂解液洗涤磁珠 3 次。完全去除上清后,将上述反应液对应加入各个 EP 管中。4℃反应 2 h。反应结束后去除上清,加 50 μ L SDS-PAGE 上样缓冲液重悬样品,100℃煮 5 min 以打断反应形成的磁珠-抗体-抗原复合物。去除磁珠,保留上清进行 SDS-PAGE 电泳。后续同方法 1.2.6。

1.3 统计学处理

实验数据均使用 GraphPad Prism 6 软件进行分析。实验结果均表述为均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)。定量资料采用 Shapiro-Wik 进行正态分布检验,采用 Levene 进行方差齐性检验;在满足正态分布或方差齐的条件下,对不同时间测量的神经功能评分采用重复测量方差分析;对 2 组数据比较采用 *t* 检验;对多组资料两两比较采用单因素方差分析,组间两两比较行 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 AAV-Beclin1 对电针预处理的神经功能评分的影响

全部大鼠入组。神经功能学评分结果(表 1)显示,时间因素对神经功能学评分的影响差异有统计学意义($F=14.123$, $P=0.000$),处理因素对神经功能学评分的影响差异有统计学意义($F=23.416$, $P=0.000$),交互因素对神经功能学评分的影响差异有统计学意义($F=4.583$, $P=0.012$);但相对于 Sham 组同时点,I/R 组大鼠神经功能学评分均明显升高(均 $P<0.05$),呈现神经功能缺陷;相对于 I/R 组同时点,EA+I/R 组大鼠神经功能学评分均明显降低(均 $P<0.05$),提示电针预处理可有效改善 MCAO 术后急性期内的神经功能障碍;相对于 EA+I/R 组或 AAV-VC+EA+I/R 组同时点,AAV-Beclin1+EA+I/R 组大鼠神经功能学评分均明显升高(均 $P<0.05$),说

2.3 AAV-Beclin1 逆转电针预处理减少的大鼠 MCAO 手术后脑组织神经元凋亡

自噬过程在大鼠中脑动脉梗死模型中发挥的作用一直存在争议。为研究电针预处理对其保护作用是否涉及自噬过程的参与,首先对梗死侧半球脑水肿组织或 Sham 组同部位脑组织进行 TUNEL 染色观察脑组织中 TUNEL 阳性细胞数量。如图 3 所示,在 MCAO 手术后,大鼠脑水肿组织普遍存在 TUNEL 阳性细胞;而 EA+I/R 组 TUNEL 阳性细胞明显减少;相对 EA+I/R 组,AAV-Beclin1+EA+I/R 组 TUNEL 阳性细胞明显增多。经数据分析,与 Sham 组相比,I/R 组 TUNEL 阳性细胞百分比(占全部细胞百分比)明显升高($P=0.000$);与 I/R 组相比,EA+I/R 组和 AAV-VC+EA+I/R 组 TUNEL 阳性细胞百分比明显降低($P=0.000$);与 EA+I/R 组相比,AAV-Beclin1+EA+I/R 组 TUNEL 阳性细胞百分比明显增加($P=0.000$)

(表2)。以上数据说明,电针预处理可有效减少大鼠MCAO手术所造成的脑神经元凋亡,而 Beclin1 能逆转电针预处理的保护作用。

表 2 各组大鼠梗死侧半球脑水肿组织或 Sham 组同部位脑组织 TUNEL 阳性细胞数百分比 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TUNEL阳性细胞数百分比/%
Sham组	0.45 ± 0.07
I/R组	26.16 ± 3.32^a
EA+I/R组	12.34 ± 1.74^b
AAV-VC+EA+I/R组	13.29 ± 2.36^c
AAV-Beclin1+EA+I/R组	35.48 ± 3.45^d
<i>F</i> 值	89.749
<i>P</i> 值	0.000

注:a,与 Sham 相比, $P=0.000$;与 I/R 组相比,b: $P=0.000$;c: $P=0.000$;d:与 EA+I/R 组相比, $P=0.000$

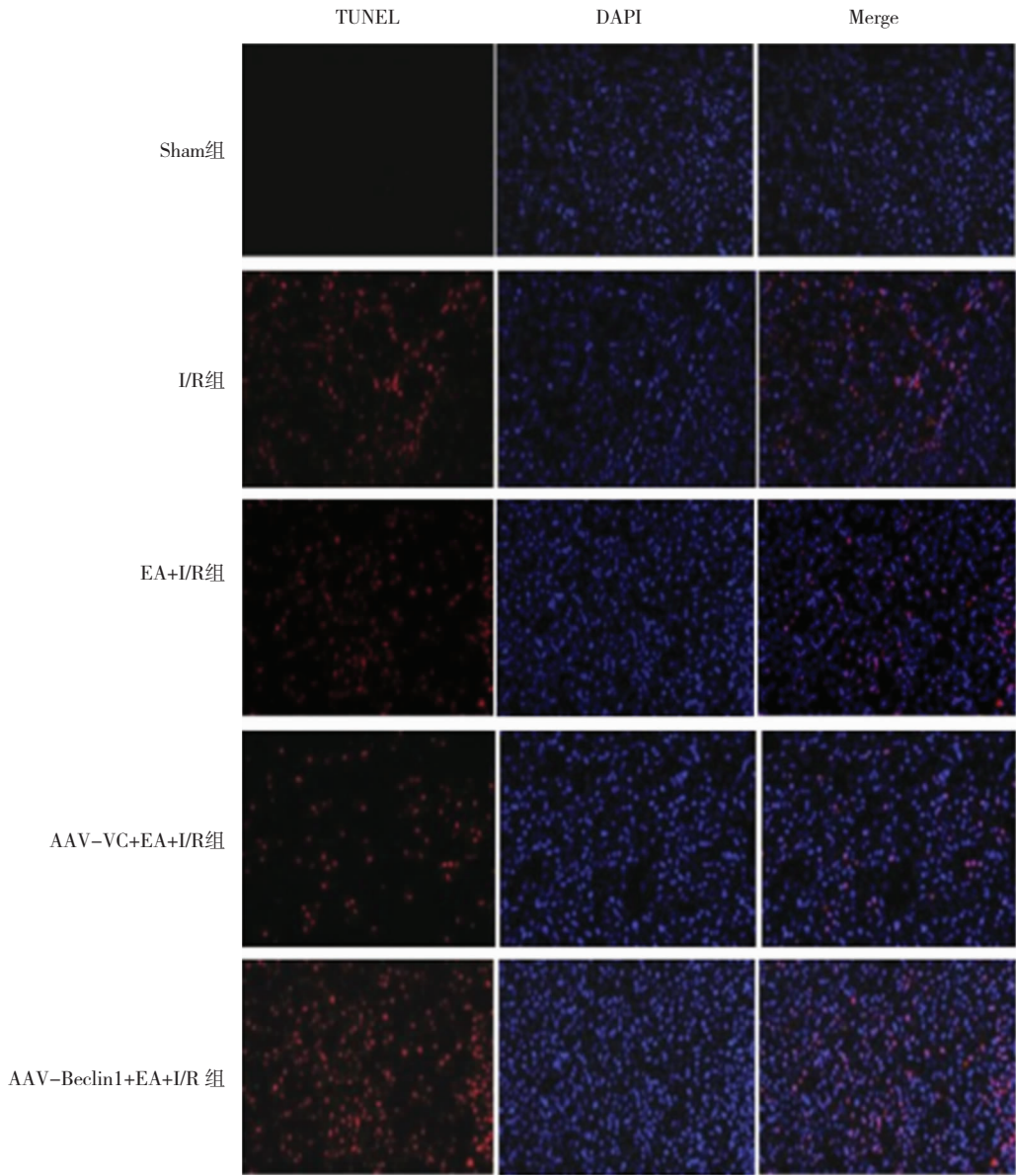


图 3 各组大鼠梗死侧半球脑水肿组织或 Sham 组同部位脑组织代表性 TUNEL 染色图片 (200 ×)

2.4 电针预处理对大鼠 MCAO 脑损伤的保护作用与抑制自噬形成有关

为进一步研究自噬是否参与电针预处理对脑损伤起保护作用,本研究对自噬小体形成的标志物 LC3-I 和 LC3-II 形成进行检测。LC3-II 的形成增多即自噬形成的标记物^[19]。取 I/R 组和 EA+I/R 组大鼠梗死区侧脑水肿组织或 Sham 组同部位脑组织进行 Western blot 检测,结果如图 4A 所示:与 Sham 组相比,在给予 MCAO 手术后,LC3-II 形成明显增加($P=0.000$);LC3-II 与 LC3-I 比例也明显增加($P=0.000$);与 I/R 组相比,EA+I/R 组 LC3-II 形成明显降低($P=0.000$);LC3-II 与 LC3-I 比例也明显减少($P=0.000$)(表3)。结果提示,电针预处理对大鼠 MCAO 脑损伤的保护作用可能与抑制自噬形成有关。为探讨电针预处理对自噬形成抑制作用的相关机制,本研究对 I/R 组和 EA+I/R 组大鼠梗死区侧脑水肿组织或 Sham 组同部分脑组织中自噬调控蛋白 p-AMPK 与 Beclin1 的表达进行分析。结果如图 4B 所示:与 Sham 组相比, MCAO 手术后 p-AMPK ($P=0.000$)与 Beclin1 ($P=0.000$)的表

达均明显增加;与 I/R 组相比,EA+I/R 组 p-AMPK ($P=0.000$)与 Beclin1 ($P=0.000$)明显降低(表 3)。本研究进一步采用免疫共沉淀法对 Beclin1 与 Vps34 的相互作用进行检测,结果如图 4C 所示,与 I/R 组相比,给予电针预处理后,Beclin1 与 Vps34 结合减弱。提示电针预处理对神经保护作用可能是通过抑制 AMPK-Beclin1 信号通路减少自噬来实现的。

2.5 大鼠脑纹状体注射 AAV-Beclin1 可促进 Beclin1 与 LC3-II 表达

为进一步证明电针预处理通过抑制 AMPK-Beclin1 信号通路介导的自噬,本研究利用腺病毒为载体在大鼠脑纹状体进行过表达 Beclin1。如图 5A 所示,Beclin1 在 AAV-VC+EA+I/R 组、AAV-Beclin1+EA+I/R 组相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 和 6.27 ± 1.03 ,两者相比差异有统计学意义($t=21.374, P=0.000$)。如图 5B 所示,LC3-II 在 AAV-VC+EA+I/R 组、AAV-Beclin1+EA+I/R 组相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 和 8.43 ± 1.32 ,两者相比差异有统计学意义($t=35.413, P=0.000$)。

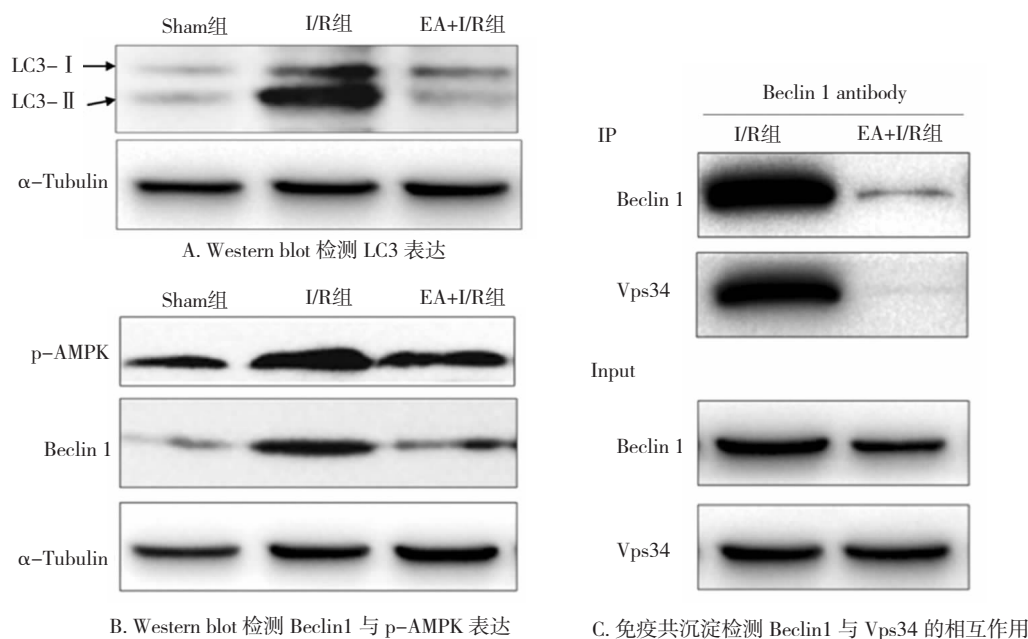
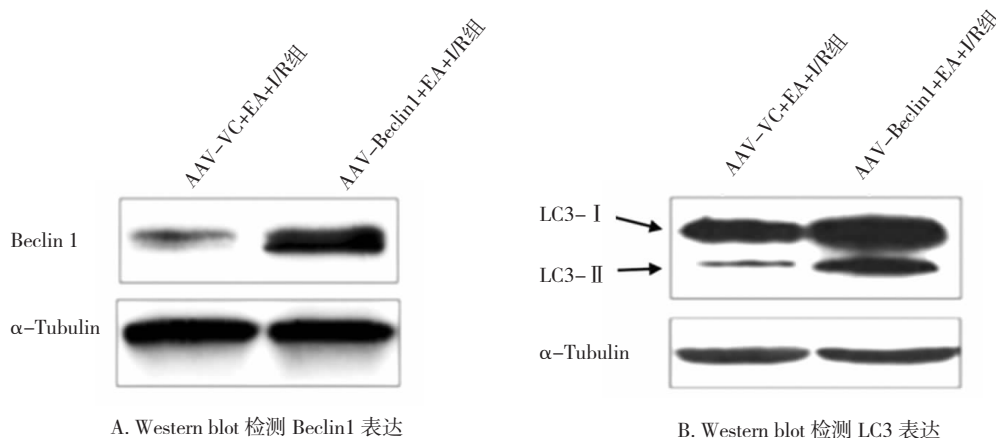


图 4 电针预处理的神经保护作用与抑制自噬激活有关

表 3 Sham 组、I/R 组和 EA+I/R 组 LC3、Beclin1 与 p-AMPK 相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	LC3-II/α-Tubulin	LC3-II/LC3-I	p-AMPK/α-Tubulin	Beclin1/α-Tubulin
Sham组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
I/R组	5.25 ± 0.79^a	3.12 ± 0.44^c	2.38 ± 0.35^e	4.86 ± 0.59^g
EA+I/R组	1.42 ± 0.26^b	1.12 ± 0.29^d	1.48 ± 0.21^f	1.65 ± 0.31^h
F 值	59.743	43.256	34.165	51.985
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 Sham 相比,a: $P=0.000$,c: $P=0.000$,e: $P=0.000$,g: $P=0.000$;与 I/R 组相比,b: $P=0.000$,d: $P=0.000$,f: $P=0.003$,h: $P=0.000$

图 5 大鼠脑内注射 AAV-Beclin1 可促进 Beclin1 与 LC3-II 表达 ($n=6$)

3 讨论

在啮齿类动物(大鼠和小鼠)以及非人灵长类动物脑缺血模型上发现,电针是一种有效且安全的治疗策略^[7,9-12]。其作用机制包括抑制小胶质细胞介导的神经炎症反应,减少活性氧族自由基的产生,促进细胞存活通路蛋白表达以抑制细胞凋亡等^[7,9-12]。目前已有研究者把电针用于缺血性脑卒中治疗,发现电针能改善老年缺血性脑卒中患者的生活质量^[8]。为进一步丰富电针治疗脑缺血的机制,本研究采用 MCAO 大鼠模型发现,电针预处理可通过抑制脑神经元自噬性凋亡从而发挥神经保护作用,这不仅丰富了其作用机制,同时也为电针应用进一步进入临床研究提供了参考资料。

本研究发现,大鼠脑缺血再灌注后,在发生脑水肿区的脑皮质和脑纹状体区域脑组织普遍存在大面积梗死灶。已有研究表明,脑纹状体是大脑基底神经节之一,在脑缺血再灌注后,主要影响记忆、运动、情绪等,也是脑缺血再灌注影响最紧密的区域^[20-21]。本研究进一步研究发现,发生脑水肿区域的脑组织 p-AMPK、Beclin1、LC3-II 表达增加,且 TUNEL 阳性细胞数百分比增加。这一结果提示脑缺血再灌注可能通过激活 AMPK-Beclin1 通路,进而导致脑神经元发生自噬性凋亡。而给予电针预处理的大鼠,脑梗死面积明显降低,且脑水肿区的脑组织的 p-AMPK、Beclin1、LC3-II 表达和 TUNEL 阳性

细胞数百分比同时减少。因此,本课题组推测电针预处理可能是通过减轻脑皮质和脑纹状体区域脑神经元自噬性凋亡而发挥抵抗脑缺血再灌注损伤。而自噬是一个在进化过程中比较保守的事件,主要负责一些寿命较长的蛋白质和受损细胞器的降解和重吸收^[22]。为证明电针预处理可能通过减轻脑皮质和脑纹状体区域脑神经元自噬性凋亡而发挥抵抗脑缺血再灌注损伤,本研究采用对大鼠脑纹状体区域感染 AAV-Beclin1,以过表达 Beclin1。结果发现,过表达 Beclin1 后,相对于电针预处理大鼠,脑水肿区脑组织自噬性凋亡增加,脑损伤加重。而在自噬事件中,以 Beclin1 为核心的蛋白质之间的相互作用是一个重要的调控因素,且是一个动态平衡过程。Beclin1 与不同蛋白形成的复合物对自噬具有不同的调控作用。比如,Bcl-2 家族成员与 Beclin1 的相互作用可以抑制自噬活性;而 Vps34 或 UVRAG 与 Beclin1 的相互作用可以增加自噬性凋亡,Vps34 或 UVRAG 可以被 Bcl-2 家族成员置换^[23]。为进一步验证 Beclin1 参与电针预处理减轻脑缺血再灌注损伤的机制,本研究通过免疫共沉淀发现,电针预处理可以使得 Beclin1 与 Vps34 的相互作用减少,但是这个过程是由于两者直接作用减少还是由于 Beclin1 与 Bcl-2 家族成员相互作用增加所致需要进一步研究。

综上所述,本研究表明电针预处理可能通过抑制 AMPK-Beclin1/Vps34 通路减少自噬发生,从而发挥神经保护作用,为电针治疗缺血性脑卒中提供

更为丰富和多元化的临床前研究证据。

参 考 文 献

- [1] Algra A, Wermer MJ. Stroke in 2016; stroke is treatable, but prevention is the key[J]. Nat Rev Neurol, 2017, 13(2): 78–79.
- [2] Radak D, Katsiki N, Resanovic I, et al. Apoptosis and acute brain ischemia in ischemic stroke[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2017, 15(2): 115–122.
- [3] Wang H, Naghavi M, Allen C, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015[J]. Lancet, 2016, 388(10053): 1459–1544.
- [4] Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation[J]. Lancet Neurol, 2016, 15(8): 869–881.
- [5] Gardener H, Wright CB, Rundek T, et al. Brain health and shared risk factors for dementia and stroke[J]. Nat Rev Neurol, 2015, 11(11): 651–657.
- [6] Crispo JAG, Thibault DP, Fortin Y, et al. Association between medication-related adverse events and non-elective readmission in acute ischemic stroke[J]. BMC Neurol, 2018, 18(1): 192.
- [7] Wang SJ, Omori N, Li F, et al. Potentiation of Akt and suppression of caspase-9 activations by electroacupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Neurosci Lett, 2002, 331(2): 115–118.
- [8] 杨加顺, 高 潇, 孙 茹, 等. 电芒针疗法对脑梗死患者上肢运动功能障碍的影响[J]. 针刺研究, 2015, 40(6): 489–492.
- [9] Lin R, Lin Y, Tao J, et al. Electroacupuncture ameliorates learning and memory in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and promoting p-CREB expression in the hippocampus[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(5): 6807–6814.
- [10] Sun N, Zou X, Shi J, et al. Electroacupuncture regulates NMDA receptor NR1 subunit expression via PI3K pathway in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion[J]. Brain Res, 2005, 1064(1–2): 98–107.
- [11] Siu FK, Lo SC, Leung MC. Electroacupuncture reduces the extent of lipid peroxidation by increasing superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in ischemic-reperfused rat brains[J]. Neurosci Lett, 2004, 354(2): 158–162.
- [12] Zhao P, Huang ZN, Chen G, et al. Electro-acupuncture attenuates nitric oxide release from rat striatum after transient middle cerebral artery occlusion[J]. Acupunct Electrother Res, 2000, 25(2): 101–107.
- [13] Wen YD, Sheng R, Zhang LS, et al. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways[J]. Autophagy, 2008, 4(6): 762–769.
- [14] Ma X, Liu H, Foyil SR, et al. Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury[J]. Circulation, 2012, 125(25): 3170–3181.
- [15] Huang C, Andres AM, Ratliff EP, et al. Preconditioning involves selective mitophagy mediated by Parkin and p62/SQSTM1[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20975.
- [16] Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, et al. Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(5): 902–913.
- [17] Li Y, Lu B, Sheng L, et al. Hexokinase 2-dependent hyperglycolysis driving microglial activation contributes to ischemic brain injury[J]. J Neurochem, 2018, 144(2): 186–200.
- [18] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2001, 32(4): 1005–1011.
- [19] Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 13): 2805–2812.
- [20] Zhao Z, Lu Z, Sun X, et al. Global transcriptomic profiling of cortex and striatum: cerebral injury after ischemia/reperfusion in a mouse model[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2017, 26(7): 1622–1634.
- [21] Jin G, He XR, Chen LP. The protective effect of *Ginkgo biloba* leaves injection on the brain dopamine in the rat model of cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Afr Health Sci, 2014, 14(3): 725–728.
- [22] Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z. The Beclin 1-VPS34 complex at the crossroads of autophagy and beyond[J]. Trends Cell Biol, 2010, 20(6): 355–362.
- [23] Morris DH, Yip CK, Shi Y, et al. Beclin 1-Vps34 complex architecture: understanding the nuts and bolts of therapeutic targets[J]. Front Biol(Beijing), 2015, 10(5): 398–426.

(责任编辑: 冉明会)