

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001821

抑制大鼠脑缺血再灌注损伤中 GSK-3 β 活性对自噬的影响及可能机制

汪悦婷¹, 张鑫², 赵敬¹

(1. 重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学第二附属医院全科, 重庆 400010)

【摘要】目的:探讨大鼠脑缺血再灌注损伤中抑制糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)后对自噬的影响及如何通过酵母自噬启动 ATG1 激酶同源蛋白(Unc-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1)影响自噬的机制。**方法:**实验选取 SD 大鼠为研究对象,分为假手术组(Sham 组,仅结扎颈内动脉)、缺血再灌注组(MCAO 组,大鼠中动脉栓塞术制备局灶性脑缺血再灌注模型)、GSK-3 β 干扰片段组(siGSK-3 β 组,建模前 24 h 注射 GSK-3 β 干扰片段)、GSK-3 β 无意义序列组(ConsiGSK-3 β 组,建模前 24 h 注射无意义序列)、GSK-3 β 抑制剂组(SB216763 组,建模前 6 h 注射抑制剂 SB216763),每组 5 只。免疫印迹检测大鼠皮质酪氨酸 216 号位点磷酸化 GSK-3 β [GSK-3 β (P-tyr216)],自噬相关蛋白轻链 3 抗体 I/II (autophagy microtubule-associated protein light chain 3 antibody I/II, LC3B I/II)、泛素结合蛋白(sequestosome 1, P62)、磷酸化 ULK1 (phosphorylated ULK1, P-ULK1)、乙酰化 ULK1 (acetylated ULK1, AcK)的表达,电镜显示自噬体数量。**结果:**与 Sham 组比较,MCAO 组中 GSK-3 β (P-tyr216)增高($P=0.000$)。siGSK-3 β 、SB216763 组相较 MCAO 组,LC3B II/LC3B I 升高($P=0.000$)、P62 表达下降($P=0.000$)、P-ULK1 表达增高($P=0.000$)、AcK 表达下降(SB216763: $P<0.05$; siGSK-3 β : $P<0.01$),电镜可见自噬小体。**结论:**在脑缺血再灌注损伤中,GSK-3 β 活性抑制后可通过磷酸化 ULK1 增强细胞自噬。

【关键词】自噬;糖原合成酶激酶-3 β ;酵母自噬启动 ATG1 激酶同源蛋白;脑缺血再灌注损伤

【中图分类号】R741.02

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-04-20

Influence of glycogen synthase kinase-3 β inhibition on autophagy in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury and possible mechanism

Wang Yueting¹, Zhang Xin², Zhao Jing¹

(1. Teaching and Research Section of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of General Medicine, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the influence of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) inhibition on autophagy in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury and the mechanism of affecting autophagy via Unc-51 like autophagy activating kinase 1(ULK1).

Methods: Sprague-Dawley rats were divided into sham-operation group(Sham group, ligation of the internal carotid artery alone), middle cerebral artery occlusion(MCAO) group(MCAO was performed to establish a model of focal cerebral ischemia/reperfusion), GSK-3 β interference fragment group(siGSK-3 β group; the GSK-3 β interference fragment was injected at 24 hours before model establishment), GSK-3 β non-significant sequence group(ConsiGSK-3 β group; non-significant sequence was injected at 24 hours before model establishment), and GSK-3 β inhibitor group(SB216763 group; the inhibitor SB216763 was injected at 6 hours before model establishment), with 5 rats in each group. Western blotting was used to measure the expression of tyrosine-216-phosphorylated GSK-3 β [GSK-3 β (P-tyr216)], autophagy microtubule-associated protein light chain 3 antibody I/II (LC3B I/II), sequestosome 1 (P62), phosphorylated ULK1 (P-ULK1), and acetylated ULK1 (AcK) in the cerebral cortex. An electron microscope was used to measure the number of autophagosomes. **Results:** Compared with the Sham group, the MCAO group had a significant increase in the expression of GSK-3 β (P-tyr216) ($P=0.000$). Compared with the MCAO group, the siGSK-3 β group and the SB216763 group had significant increases in the expression of LC3B I/II and P-ULK1 ($P=0.000$) and significant reductions in the expression of P62 ($P=$

0.000) and AcK (SB216763 group: $P<0.05$; siGSK-3 β group: $P<0.01$), and autophagosomes were observed under the electron microscope. **Conclusion:** GSK-3 β inhibition can enhance autophagy via phosphorylated ULK1 in cerebral ischemia/reperfusion injury.

【Key words】autophagy; glycogen synthase kinase-3 β ; Unc-51 like autophagy activating kinase 1; cerebral ischemia/reperfusion injury

作者简介:汪悦婷, Email: 470529716@qq.com,

研究方向:脑缺血疾病基础研究。

通信作者:赵敬, Email: zjbingsheng@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81671158, 81771261);

国家自然科学基金青年基金资助项目(编号:81701165)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180929.1044.006.html>

(2018-09-30)

自噬是一个在真核生物中高度保守的过程,发生在细胞质中,可以吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被进入囊泡,与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物^[1]。越来越多的证据表明,自噬参与调节脑缺血再灌注损伤并对神经元损伤起保护作用^[2-3]。糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,其失活已被认为是促进神经元存活的机制之一。已有研究表明在其他疾病模型中,GSK-3 β 可以通过酵母自噬启动 ATG1 激酶同源蛋白(Unc-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1)调节自噬从而影响疾病进程^[4]。然而,在脑缺血再灌注损伤中抑制 GSK-3 β 活性对于自噬的影响及其机制尚不清楚。本课题拟探讨在大鼠脑缺血再灌注损伤中 GSK-3 β 是否影响自噬相关蛋白的表达、自噬小体的产生以及 GSK-3 β 活性降低后是如何通过调节 ULK1 来影响自噬。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SD 大鼠,雄性,240~300 g(重庆医科大学实验动物中心);GSK-3 β 化学合成 siRNA 片段(上海吉玛公司);SB216763 (Sigma 公司);兔抗 GSK-3 β (phospho Y216)(Abcam 公司);兔抗 P-ULK1(磷酸化 ULK1)、AcK(乙酰化 ULK1)(Cell Signaling Technology);兔抗 LC-3B、P62(Proteintech);鼠抗 β -actin、兔二抗、鼠二抗(武汉 ABclonal);Marker、PVDF 膜(碧云天公司);ECL 免疫印迹化学发光试剂(赛默飞)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 假手术组(Sham 组,仅结扎颈内动脉)、缺血再灌注组(MCAO 组,大脑中动脉栓塞术制备局灶性缺血再灌注模型)、GSK-3 β 干扰片段组(siGSK-3 β 组,建模前 24 h 注射 GSK-3 β 干扰片段)、GSK-3 β 无意义序列组(ConsiGSK-3 β 组,建模前 24 h 注射无意义序列)、GSK-3 β 抑制剂组(SB216763 组,建模前 6 h 注射抑制剂 SB216763),共 5 组,每组 5 只。

1.2.2 模型制备及鉴定 所有组采用 3.5%水合氯醛(1 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠后,除 Sham 组外其余组麻醉后采用大脑中动脉栓塞法(middle cerebral artery occluding, MCAO)制备局灶性缺血模型。插于线栓 1 h 后缓慢将插线拔出,制成再灌注模型。Sham 组操作步骤除不插入线栓外其余均同其他各组。再灌注 24 h 后采用 Longa 的 5 分制方法对大鼠进行神经功能缺损鉴定^[5]。

1.2.3 免疫印迹检测及分析 各组大鼠麻醉后,采用生理盐水自心脏灌注,直至肝脏呈灰白色后迅速断头取出左侧梗死灶周围大脑皮质,匀浆。常规免疫印迹检测,上样,电泳,转膜,转印。5%脱脂奶粉室温封闭 1~2 h 后。分别滴加各蛋白一抗(稀释度为 1:1 000)4 °C 孵育过夜, TBST 缓冲液漂洗 3

次,每次 5 min;辣根酶标记的羊抗兔 IgG 抗体室温下继续孵育 2 h 左右, TBST 漂洗 3 次,每次 5 min;采用 ECL 发光显色。内参采用 β -actin 代替一抗。显色后采用图像分析软件分析各蛋白质电泳目的条带的灰度值。根据目的条带与内参条带灰度值的比值比较各组样本蛋白质含量的高低。

1.2.4 电镜 各组大鼠麻醉后,生理盐水灌注,待肝脏呈灰白色后迅速断头取左侧梗死灶周围大脑皮质约 1 mm³ 组织样品。并将它们放入 4%戊二醛固定溶液中储存,经处理后在电子显微镜下观察。

1.3 统计学分析

应用 GraphPad Prism 6.0 软件分析,所有数据均用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多样本均数比较采用单因素方差分析,两组间样本比较采用 Tukey 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 GSK-3 β (P-tyr216)的表达情况

免疫印迹结果显示,与 Sham 组相比,GSK-3 β (P-tyr216)在 MCAO 组与干扰对照 ConsiGSK-3 β 组表达明显升高,GSK-3 β 抑制剂及 GSK-3 β 干扰片段处理后表达下降(图 1,表 1)。此结果说明了在脑缺血 1 h 再灌注 24 h 后 GSK-3 β 的活性明显增高,其抑制剂及干扰片段处理后其活性受到抑制。

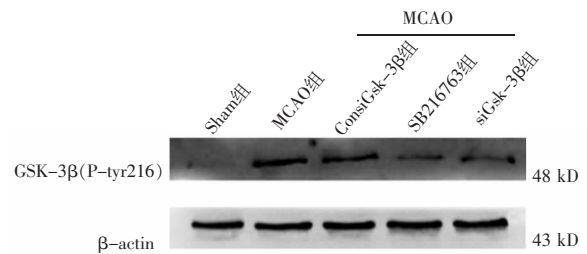


图 1 GSK-3 β (P-tyr216)在大鼠大脑皮质的表达($n=5$)

表 1 各组大鼠大脑皮质 GSK-3 β (P-tyr216)表达量比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	GSK-3 β (P-tyr216)/ β -actin 灰度值
Sham 组	0.220 2 \pm 0.061 0
MCAO 组	0.936 8 \pm 0.103 0 ^a
ConsiGSK-3 β 组	0.981 6 \pm 0.116 0 ^a
SB216763 组	0.271 6 \pm 0.078 0 ^b
siGSK-3 β 组	0.257 0 \pm 0.059 8 ^b
F 值	101.200
P 值	0.000

注:a,与 Sham 组比较, $P=0.000$;b,与 MCAO 组比较, $P=0.000$;c,与 ConsiGSK-3 β 组比较, $P=0.000$

2.2 自噬相关蛋白的表达情况

免疫印迹结果显示,相较于 MCAO 组和 ConsiGSK-3 β 组,GSK-3 β 抑制剂及 GSK-3 β 干扰片段处理后自噬蛋白 LC3B-II/LC3B-I 比值升高,P62 表达下降(图 2,表 2)。此结果提示在缺血再灌注损伤中 GSK-3 β 的活性下降可以激活自噬。

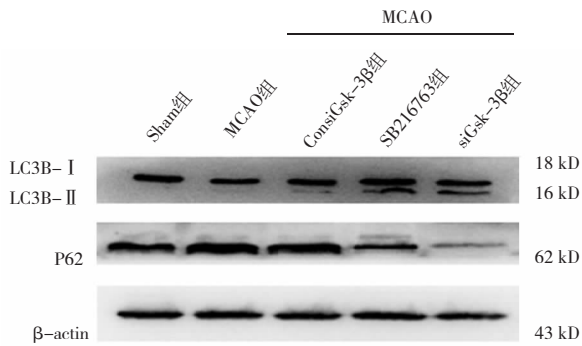


图 2 LC3B,P62 在大鼠脑皮质的表达 (n=5)

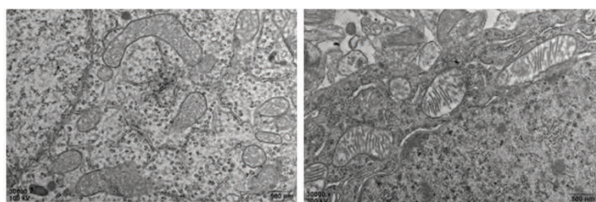
表 2 各组大鼠大脑皮质 LC3B and P62 表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	LC3B-II/LC3B-I 灰度值	P62/ β -actin 灰度值
Sham组	0.072 8 \pm 0.018 3	1.085 0 \pm 0.078 4
MCAO组	0.106 1 \pm 0.020 4	2.235 0 \pm 0.150 6
ConsiGSK-3 β 组	0.108 6 \pm 0.020 6	2.121 0 \pm 0.266 7
SB216763 组	0.518 0 \pm 0.036 2 ^{ab}	0.814 5 \pm 0.096 7 ^{ab}
siGSK-3 β 组	0.517 1 \pm 0.029 8 ^{ab}	0.303 0 \pm 0.075 0 ^{ab}
F 值	396.200	153.500
P 值	0.000	0.000

注:a,与 MCAO 组比较,P=0.000;b:与 ConsiGSK-3 β 组比较,P=0.000

2.3 电镜显示自噬小体的结果

与 Sham 相比,MCAO 组与 ConsiGSK-3 β 组可见明显的线粒体肿胀,结构紊乱(图 3B、C);相较于 MCAO 组,GSK-3 β 抑制剂及 GSK-3 β 干扰片段处理后除可观察到受损线粒体外,还可明显观察到自噬小体(图 3D、E)。此结果反映 GSK-3 β 活性抑制后自噬活动增强,产生自噬小体吞噬受损细胞器。



A. Sham 组

B. MCAO组

C. ConsiGSK-3 β 组

D. SB21673组

E. siGSK-3 β 组

红色箭头所示为自噬小体

图 3 大鼠皮质自噬小体的电镜观察

2.4 ULK1 磷酸化与乙酰化的表达情况

免疫印迹结果显示,与 MCAO 组相比,GSK-3 β 抑制剂及 GSK-3 β 干扰片段处理后自噬调节蛋白 P-ULK1 表达增强,AcK 表达下降(图 4,表 4)。此结果提示在脑缺血再灌注损伤后 GSK-3 β 活性下降可使磷酸化 ULK1 水平升高,乙酰化水平下降。GSK-3 β 可能是通过影响 ULK1 的磷酸化水平来作用自噬。

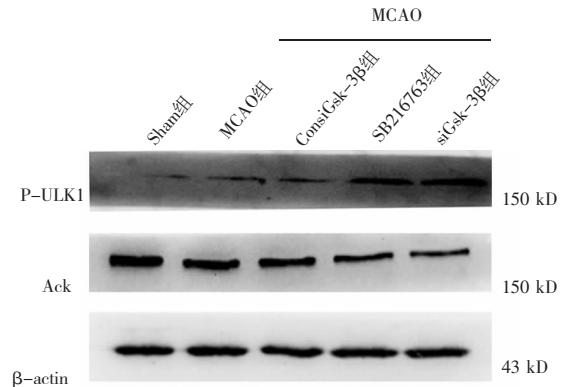


图 4 P-ULK1,AcK 在大鼠皮质的表达 (n=5)

表 3 各组大鼠大脑皮质 P-ULK1,AcK 表达量比较 (n=5)

组别	P-ULK1/ β -actin 灰度值	AcK/ β -actin 灰度值
Sham组	0.175 8 \pm 0.055 5	1.057 0 \pm 0.106 3
MCAO组	0.426 4 \pm 0.064 7	0.600 0 \pm 0.072 9
ConsiGSK-3 β 组	0.417 2 \pm 0.072 0	0.654 5 \pm 0.062 0
SB216763 组	0.971 6 \pm 0.113 8 ^{ab}	0.391 8 \pm 0.102 0 ^d
siGSK-3 β 组	0.976 6 \pm 0.118 3 ^{ab}	0.345 5 \pm 0.116 1 ^d
F 值	83.050	45.060
P 值	0.000	0.000

注:a,与 MCAO 组比较,P=0.000;b:与 ConsiGSK-3 β 组比较,P=0.000;c:与 MCAO 组比较,P<0.05;d:与 ConsiGSK-3 β 组比较,P<0.01;e:与 MCAO 组比较,P<0.01;f:与 ConsiGSK-3 β 组比较,P=0.000

3 讨论

自噬可通过溶酶体降解途径对错误折叠或聚集的蛋白质、受损细胞器以及病原体进行清除^[6-8]。LC3(微管相关蛋白-1 轻链-3)和 SQSTM1/p62 是自噬体的 2 个重要组成部分^[9]。在自噬过程中,p62 与 LC3 结合并募集错误折叠或聚集的蛋白质进入自噬体降解。LC3B 从 LC3B-I(18 kD)转换为 LC3B-II (16 kD)的水平可提示自噬活性升高,而 p62 积累表明自噬过程受抑制^[10-12]。ULK1 是酵母蛋白激酶 Atg1,自噬的关键调节剂。研究表明在内质网应激过程中,乙酰化 ULK1(AcK)可以诱导自噬^[4]。另外,磷

酸化 ULK1(P-ULK1)也可激活自噬^[13]。自噬可参与脑缺血再灌注损伤并对神经元损伤起保护作用^[2-3]。GSK-3 β 是丝氨酸/苏氨酸激酶,其活性的调节依赖于酪氨酸 216 位点的磷酸化^[14-16]。GSK-3 β 的失活对促进轴突生长以及对神经毒素诱导的细胞死亡的抗性具有重要作用^[17]。先前研究表明,GSK-3 β 可通过 TIP60 乙酰化 ULK1 来调节自噬^[4];另外研究显示,GSK-3 β 可以抑制 AMPK 的活化^[18],活化的 AMPK 可以磷酸化并激活 ULK1^[19]。因此,推测 GSK-3 β 可能是通过 ULK1 影响自噬对神经细胞发挥作用。

为了探查在缺血再灌注损伤中活化的 GSK-3 β 表达以及验证 GSK-3 β 抑制剂与干扰片段的对其活性的抑制效果。本课题组检测 GSK-3 β (P-tyr216),其表达增高表示 GSK-3 β 活性增强。结果显示,相对于 Sham 组,MCAO 组 GSK-3 β (P-tyr216) 含量明显升高,表明在脑缺血再灌注损伤中 GSK-3 β 的活性增强,在抑制剂组与干扰片段组 GSK-3 β 活性明显受抑制。为了说明在缺血再灌注损伤后,抑制 GSK-3 β 活性后会影响到自噬。检测 LC3B-I、LC3B-II、p62 的表达以及电镜观察自噬小体的数量。结果显示抑制剂组与干扰片段组 LC3B-II/LC3B-I 的比值相较于 MCAO 组明显增高,而 P62 的含量明显降低,电镜可观察到抑制剂组与干扰片段组自噬小体,说明 GSK-3 β 活性的降低可促进自噬。最后为了探究在缺血再灌注损伤中,GSK-3 β 通过影响 ULK1 的磷酸化还是乙酰化来调节自噬,检测磷酸化 ULK1、乙酰化 ULK1 的蛋白表达。与 MCAO 组比较,GSK-3 β 抑制剂与干扰片段组,ULK1 磷酸化增高,乙酰化降低。提示在缺血再灌注损伤中,GSK-3 β 活性被抑制可促进 ULK1 的磷酸化从而增强自噬。

以上结果说明缺血再灌注损伤中,抑制 GSK-3 β 活性可使 ULK1 磷酸化升高而增强自噬。该研究在一定程度上为脑缺血再灌注损伤提供了新的靶点,但 GSK-3 β 、自噬与该疾病的关系仍需要更深入的研究与探讨。

参 考 文 献

[1] 陈科,程汉华,周荣家. 自噬与泛素化蛋白降解途径的分子机制及其功能[J]. 遗传, 2012, 34(1): 7-20.
 [2] Wang P, Liang J, Li Y, et al. Down-regulation of miRNA-30a alleviates cerebral ischemic injury through enhancing beclin 1-mediated autophagy[J]. Neurochem Res, 2014, 39(7): 1279-1291.
 [3] Yun Q, Jiang M, Wang J, et al. Overexpression Bax interacting factor-1 protects cortical neurons against cerebral ischemia-reperfusion

injury through regulation of ERK1/2 pathway[J]. J Neurol Sci, 2015, 357(1-2): 183-191.
 [4] Nie T, Yang S, Ma H, et al. Regulation of ER stress-induced autophagy by GSK3 β -TIP60-ULK1 pathway[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(12): e2563.
 [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
 [6] Randhawa R, Sehgal M, Singh TR, et al. Unc-51 like kinase 1 (ULK1) in silico analysis for biomarker identification: a vital component of autophagy[J]. Gene, 2015, 562(1): 40-49.
 [7] Hu J, Wu H, Wang D, et al. Weicao capsule ameliorates renal injury through increasing autophagy and NLRP3 degradation in UAN rats[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2018, 96: 1-8.
 [8] Zhao Y, Guo Q, Zhao K, et al. Small molecule GL-V9 protects against colitis-associated colorectal cancer by limiting NLRP3 inflammasome through autophagy[J]. Oncoimmunology, 2017, 7(1): e1375640.
 [9] Klionsky DJ, Codogno P, Cuervo AM, et al. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes[J]. Autophagy, 2010, 6(4): 438-448.
 [10] Kim JH, Hong SK, Wu PK, et al. Raf/MEK/ERK can regulate cellular levels of LC3B and SQSTM1/p62 at expression levels[J]. Exp Cell Res, 2014, 327(2): 340-352.
 [11] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. Cell, 2011, 147(4): 728-741.
 [12] He Q, Li Z, Wang Y, et al. Resveratrol alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through Sirt1-dependent autophagy induction[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 50: 208-215.
 [13] Egan DF, Chun MG, Vamos M, et al. Small molecule inhibition of the autophagy kinase ULK1 and identification of ULK1 substrates[J]. Moll Cell, 2015, 59(2): 285-297.
 [14] Chien T, Weng YT, Chang SY, et al. GSK3 β negatively regulates TRAX, a scaffold protein implicated in mental disorders, for NHEJ-mediated DNA repair in neurons[J]. Mol Psychiatry, 2018[Epub ahead of print].
 [15] Chen X, Liu Y, Zhu J, et al. GSK-3 β downregulates Nrf2 in cultured cortical neurons and in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion[J]. Sci Rep, 2016, 6: 20196.
 [16] Zhou X, Zhou J, Li X, et al. GSK-3 β inhibitors suppressed neuroinflammation in rat cortex by activating autophagy in ischemic brain injury[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 411(2): 271-275.
 [17] Li B, Ren J, Yang L, et al. Lithium inhibits GSK3 β activity via two different signaling pathways in neurons after spinal cord injury[J]. Neurochem Res, 2018, 43(4): 848-856.
 [18] Zhou H, Wang H, Ni M, et al. Glycogen synthase kinase 3 β promotes liver innate immune activation by restraining AMP-activated protein kinase activation[J]. J Hepatol, 2018[Epub ahead of print].
 [19] Mao K, Klionsky DJ. AMPK activates autophagy by phosphorylating ULK1[J]. Circ Res, 2011, 108(7): 787-788.