

川芎嗪对脊髓缺血再灌注损伤自噬相关蛋白影响的实验研究

郑怀亮¹ 郭晓辉^{1△} 李艳侠¹ 夏祖辉¹ 李磊¹ 尚艳锋¹

[摘要] 目的:探讨川芎嗪对脊髓缺血再灌注自噬蛋白 Beclin1,LC3 及 P62 影响的机制。方法:48 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、川芎嗪组和 3-MA(自噬抑制剂)处理组,造模后,在缺血 3 h 及 6 h 后进行行为学评分并取材,免疫组化检测 Beclin1,LC3 及 P62 表达变化。结果:在缺血 3 h 及 6 h 后自噬相关蛋白 Beclin1,LC3 和 P62 等方面进行比较,模型组、川芎嗪组、3-MA 组与假手术组差异有统计学意义($P<0.05$),三种蛋白均表达上调,模型组尤其明显,透射电镜发现干预后显著抑制自噬现象,可以推测川芎嗪干预优于 3-MA,且 SCII 后行为学评分也与其一致。结论:川芎嗪可能会对细胞自噬进行双向调节,保护神经细胞。

[关键词] 川芎嗪;自噬;蛋白;脊髓缺血再灌注损伤

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)12-0005-04

Experimental Study on the Effect of Ligustrazine on Spinal Cord Ischemia-reperfusion Injury Autophagy Correlative Protein

ZHENG Huailiang¹ GUO Xiaohui^{1△} LI Yanxia¹ XIA Zuhui¹ LI lei¹ TANG Yanfeng¹

¹ Henan Luoyang Orthopaedic Hospital(Henan Orthopaedic Hospital),Luoyang 471002, Henan China.

Abstract Objective: To investigate the mechanism of ligustrazine on autophagic protein Beclin-1,LC3 and P62 in spinal cord ischemia-reperfusion injury(SCII). **Methods:** Forty-eight SD rats were randomly divided into 4 groups with sham operation group,model group,ligustrazine group and 3-MA(autophagy inhibitor)treatment group. The spinal cord ischemia-reperfusion injury model was built. Behavioral scores and samples were collected after 3 h and 6 h of ischemia. The expressions of Beclin-1,LC3 and P62 were detected by immunohistochemistry. **Results:** The expressions of autophagy-related proteins Beclin-1,LC3 and P62 were compared after ischemia for 3 h and 6 h. There was significant difference among model group,ligustrazine group,3-MA group and sham operation group($P<0.05$). The expression of all three proteins were up-regulated,especially in model group. Transmission electron microscopy showed that 3-MA intervention significantly inhibited the occurrence of autophagy. We can speculated that ligustrazine intervention was better than 3-MA,and the behavioral score after SCII was consistent with it. **Conclusion:** Ligustrazine may regulate the autophagy in both two directions to protect nerve cells.

Keywords: ligustrazine;autophagy;protein;spinal cord ischemia-reperfusion injury

脊髓缺血再灌注损伤(Spinal Cord Ischemia-reperfusion Injury, SCII)是指脊髓受压缺血,然后经过减压后血液重新回流,出现再灌注损伤,造成神经功能障碍加重的情况^[1]。SCII 的主要损伤因素在于再

灌注后的继发性损伤,决定了脊髓缺血再灌注损伤的预后。关于脊髓损伤后的细胞凋亡研究较多,细胞坏死则被认为是无序不受调控的被动细胞死亡,而有关脊髓损伤后细胞自噬的研究成为近来的研究热点。川芎为伞形科蒿木属植物川芎(Ligusticum Chuanxiong Hort)的根茎,川芎嗪是从川芎提取的主要活性物质,具有一定的抗缺血再灌注损伤作用,对心脏、脑、肾、肺、肝等部位发生的缺血再灌注损伤均有保护活性^[2]。

基金项目:河南省中医药科学研究专项课题(2015ZY02067)

¹ 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)(河南 洛阳,471002)

△通信作者 E-mail:gxh2005055@126.com

本研究将川芎嗪与目前研究的热点相结合,对SCII后自噬发生的机制进行相关分析。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级2个月龄大鼠(SD)48只,雌雄各半,购于山西医科大学实验动物中心,许可证号SCXK(晋)20150001,体质量230~250 g,分笼喂养。室温20~22℃,相对湿度45%~50%,12 h光暗循环,喂食纯净水和营养饲料。48只大鼠采用完全随机数字法分组,随机分为假手术组、模型组、川芎嗪组和3-MA组,每组12只。每组在缺血再灌注后3 h及6 h相应分为2组,每组6只。

1.2 动物造模及干预

按照大鼠的质量,腹腔内注射配置好的氯胺酮注射液(配置标准为10 mg/kg)。按照公认的Zivin法复制模型^[3,4]进行造模:腹部正中切开,逐层切开,到达腹腔后,把肠管拉向右侧,温盐水敷料覆盖,找到左肾动脉与腹主动脉,在左肾动脉下约1 cm处用动脉夹闭腹主动脉。计时40 min后,开放腹主动脉。再灌注时间以松夹瞬间开始计算。假手术组:分离出腹主动脉后,根据余组夹闭时间确定腹腔内注射0.9%的生理盐水1 mL。模型组:分离腹主动脉后,完全夹闭腹主动脉40 min,然后放开。放开的时候立即腹腔内注射0.9%的生理盐水1 mL。川芎嗪组:腹腔内注射按照0.16 mg/kg比例配置的川芎嗪注射液,然后完全夹闭腹主动脉,夹闭腹主动脉40 min开放。3-MA组:腹腔注射按照剂量为15 μg/g比例配置的3-MA注射液,然后完全夹闭腹主动脉,夹闭腹主动脉40 min开放。

1.3 取材

缺血再灌注3 h及6 h后观察各组大鼠活动,然后进行行为学评分,再进行腹腔注射麻醉(同前)。麻醉成功后切开胸腔,在升主动脉内置管,先灌注生理盐水,等到右心房剪开后有清亮液体流出时,换用10%的甲醛再次灌注,待大鼠僵硬后,俯卧位固定。背部正中切开,分离椎旁肌,显露出棘突及椎板,然后用小型咬骨钳咬除,暴露出硬膜囊。用锋利刀片先将脊神经切断,然后分离出L₂~L₅段脊髓,迅速将两端切断,分为两部分。一部分浸泡于10%福尔马林溶液内,另一部分存放于-80℃冰箱。

1.4 大鼠脊髓损伤后行为学评价

在缺血再灌注3 h及6 h后进行改良Tarlov行为学评分^[5]:后肢完全瘫痪,无可察觉的后肢活动,0分;

后肢轻微移动,但无法对抗重力,1分;后肢可运动,但无法对抗重力,2分;能行走或跳跃,但有明显共济失调,3分;后肢步态正常,能正常跳跃,4分。

免疫组化检测各组脊髓组织中蛋白Beclin1,LC3及P62的表达情况,透射电镜观察自噬小体情况。

1.5 统计学方法

应用SPSS 18.0统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 来表达。每组均数比较应用单因素方差分析,各组比较若方差齐性,采用最小显著差法(LSD);组间比较若方差不齐,采用Dnnett法。设置检验水准为0.05。

2 结果

2.1 SCII后行为学评分

假手术组在缺血3 h后与其余组比较,行为学评分差异有统计学意义($P < 0.05$),模型组、川芎嗪组、3-MA组均存在后侧肢体功能障碍,模型组最重,而川芎嗪组与3-MA组差异无统计学意义($P > 0.05$)。在缺血6 h后,假手术组与模型组、3-MA组比较,行为学评分差异有统计学意义($P < 0.05$),模型组、3-MA组仍存在后侧肢体功能障碍,但有所改善。而假手术组与川芎嗪组、川芎嗪组与3-MA组比较,两者差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 各组大鼠脊髓损伤后行为学评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	缺血3 h	缺血6 h
假手术组	12	4	4
模型组	12	0.67±0.58 ¹⁾	1.33±0.58 ⁴⁾
川芎嗪组	12	2.33±0.58 ¹⁾²⁾	3.33±0.58 ⁵⁾
3-MA组	12	2.00±0.00 ¹⁾²⁾³⁾	3.00±0.00 ⁵⁾⁶⁾

注:缺血3 h各组比较, $F=33.833$,1)假手术组与其他组比较, $P < 0.05$;2)模型组与川芎嗪组、3-MA组比较, $P < 0.05$;3)川芎嗪组与3-MA组比较, $P > 0.05$ 。缺血6 h各组比较, $F=23.167$,4)假手术组与模型组、3-MA组比较, $P < 0.05$;假手术组与川芎嗪组比较, $P > 0.05$;5)模型组与川芎嗪组、3-MA组比较, $P < 0.05$;6)川芎嗪组与3-MA组比较, $P > 0.05$ 。

2.2 免疫组化检测各组脊髓组织中蛋白Beclin1,LC3及P62的表达变化

各组在缺血3 h后三种蛋白进行比较,假手术组和其余组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),模型组与川芎嗪组、3-MA组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。川芎嗪组和3-MA组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

各组在缺血6 h后3种蛋白进行比较,假手术组和其余组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),模型组与川芎嗪组、3-MA组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。川芎嗪组和3-MA组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表 2 各组在缺血 3 h 后免疫组化积分光密度值(IOD) 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Beclin 1	LC3	P62
假手术组	12	$1.57 \times 10^6 \pm 654.10$	$2.69 \times 10^6 \pm 500.14$	$1.20 \times 10^6 \pm 2\,633.37$
模型组	12	$6.59 \times 10^6 \pm 1\,130.50^{1)}$	$6.86 \times 10^6 \pm 3\,330.70^{4)}$	$8.30 \times 10^6 \pm 4\,837.91^{7)}$
川芎嗪组	12	$3.48 \times 10^6 \pm 2\,725.73^{1)2)}$	$3.57 \times 10^6 \pm 4\,846.62^{4)5)}$	$3.57 \times 10^6 \pm 4\,846.32^{7)8)}$
3-MA 组	12	$2.83 \times 10^6 \pm 7\,911.22^{1)2)3)}$	$3.49 \times 10^6 \pm 5\,538.93^{4)5)6)}$	$2.91 \times 10^6 \pm 7\,376.39^{7)8)9)}$

注: Beclin 1, $F=76.182$, 1) 假手术组与其他组比较, $P<0.05$; 2) 模型组与川芎嗪组、3-MA 组比较, $P<0.05$; 3) 川芎嗪组与 3-MA 组比较, $P>0.05$. LC3, $F=62.390$, 4) 假手术组与其他组比较, $P<0.05$; 5) 模型组与川芎嗪组、3-MA 组比较, $P<0.05$; 6) 川芎嗪组与 3-MA 组比较, $P>0.05$. P62, $F=103.271$, 7) 假手术组与其他组比较, $P<0.05$; 8) 模型组与川芎嗪组、3-MA 组比较, $P<0.05$; 9) 川芎嗪组与 3-MA 组比较, $P<0.05$.

表 3 各组在缺血 6 h 后免疫组化积分光密度值(IOD) 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Beclin 1	LC3	P62
假手术组	12	$1.32 \times 10^6 \pm 2\,667.58$	$2.36 \times 10^6 \pm 4\,095.21$	$1.49 \times 10^6 \pm 1\,958.24$
模型组	12	$5.57 \times 10^6 \pm 2\,587.77^{1)}$	$6.73 \times 10^6 \pm 2\,209.48$	$5.91 \times 10^6 \pm 3\,562.15$
川芎嗪组	12	$3.83 \times 10^6 \pm 1\,908.12^{1)2)}$	$3.34 \times 10^6 \pm 5\,084.70^{4)5)}$	$3.15 \times 10^6 \pm 1\,247.28^{7)8)}$
3-MA 组	12	$4.50 \times 10^6 \pm 6\,626.48^{1)2)3)}$	$5.35 \times 10^6 \pm 2\,151.59^{4)5)6)}$	$4.68 \times 10^6 \pm 2\,589.89^{7)8)9)}$

注: Beclin 1, $F=60.537$, 1) 假手术组与其他组比较, $P<0.05$; 2) 模型组与川芎嗪组、3-MA 组比较, $P<0.05$; 3) 川芎嗪组与 3-MA 组比较, $P<0.05$. LC3, $F=89.234$, 4) 假手术组与其他组比较, $P<0.05$; 5) 模型组与川芎嗪组、3-MA 组比较, $P<0.05$; 6) 川芎嗪组与 3-MA 组比较, $P<0.05$. P62, $F=103.271$, 7) 假手术组与其他组比较, $P<0.05$; 8) 模型组与川芎嗪组、3-MA 组比较, $P<0.05$; 9) 川芎嗪组与 3-MA 组比较, $P<0.05$.

2.3 透射电镜超微结构结果

假手术组大鼠脊髓组织神经元组织结构基本正常,核型规则为圆形或椭圆形,核膜完整,核内染色质均匀,核仁明显。胞质中细胞器形态分布及数目正常,髓鞘围绕轴索呈同心圆排列,轴索内有微丝和微管,排列规则,未见轴浆变性及颗粒状崩解(见图 1A,B)。模型组 3 h 及 6 h 后可见脊髓组织神经元胞浆广泛水肿,线粒体肿胀、空泡化,粗面内质网松散,游离核糖体增多,溶酶体形态不规则,细胞中有大量由单层膜组成的自噬囊泡出现,其中有高电子密度的吞噬颗粒(即自噬小体)(见图 1C,D)。川芎嗪组 3 h 后髓鞘水肿明

显,髓鞘板层围绕轴索呈同心圆排列,轴索内有微丝和微管,排列较紊乱,但未见轴浆变性及颗粒状崩解,线粒体肿胀、空泡化,可见部分自噬小体。川芎嗪组 6 h 后髓鞘水肿明显减退,神经元组织结构基本正常,核型规则为圆形或椭圆形,核膜完整,核内染色质均匀,核仁明显,髓鞘板层围绕轴索呈同心圆排列,轴索内有微丝和微管,排列规则,自噬小体减少(见图 1E,F)。3-MA 组 3 h 及 6 h 后髓鞘板层围绕轴索呈同心圆排列,轴索内有微丝和微管,排列较紊乱,但未见轴浆变性及颗粒状崩解,未见明显自噬小体,线粒体肿胀、空泡化(见图 1G,H)。

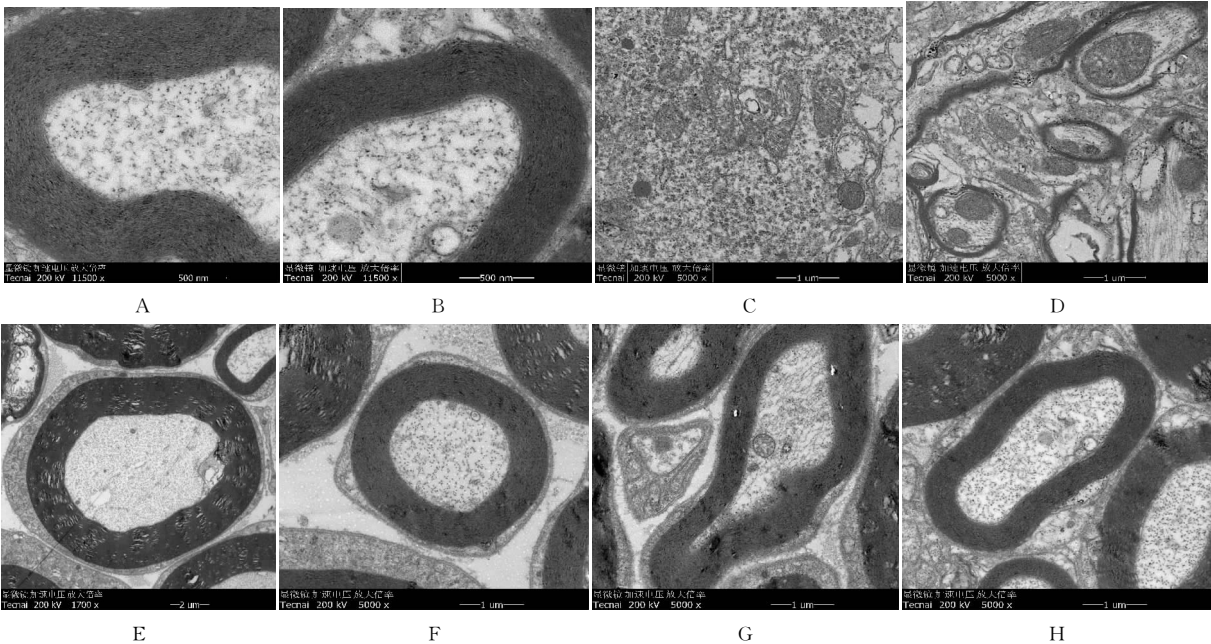


图 1 透射电镜超微结构(5 000×)

3 讨论

自噬相关蛋白 Beclin1, LC3 和 P62 反映了自噬过程中自噬的发生和强度。Beclin1 是自噬过程中的核心蛋白, 在自噬过程中发挥重要作用, 同时也是自噬体形成的最初阶段^[6]。LC3 是酵母自噬相关基因 Atg8 的哺乳动物同源类似物, 存在两种可以互相转换的形式, 分别为 LC3-II 和 LC3-I^[7], LC3-II 被认为是自噬体形成的标志, 与自噬体的形成有着密切的关系, 与自噬体的数量呈正比, 在一定程度上反映了自噬的活性^[8]。P62 蛋白是一种支架蛋白, 作为一种自噬特异性底物, 偶联于 LC3, 通过自噬小体与溶酶体完成蛋白的降解自噬发生时, P62 水平下降, 即其表达水平和自噬水平负相关^[9,10]。本研究中, 在缺血 3 h 及 6 h 后免疫组化检测自噬相关蛋白 Beclin1, LC3 和 P62 等方面进行比较, 模型组、川芎嗪组、3-MA 组与假手术组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 三种蛋白均表达上调, 模型组尤其明显, 且 SCII 后行为学评分也与其一致(见表 1)。但川芎嗪组、3-MA 组与模型组比较, Beclin1, LC3 和 P62 三种蛋白表达减低, 模型组三种蛋白表达显著上调, 说明川芎嗪与自噬抑制剂 3-MA 可能对神经细胞自噬有抑制或调节作用。

透视电镜下观察到自噬发生时的超微结构, 是检测自噬存在的金标准^[11]。模型组 3 h 及 6 h 后透视电镜发现脊髓组织神经元水肿、破坏, 细胞中有大量由单层膜组成的自噬小体, 说明脊髓缺血再灌注损伤后明显发生了自噬现象, 且较为严重。但经过川芎嗪与自噬抑制剂的干预后, 川芎嗪组透视电镜发现 3 h 后自噬小体较多, 但随着时间的推移, 自噬小体数量减少, 3-MA 组则未发现自噬小体的出现, 可见脊髓缺血再灌注损伤后经过川芎嗪的调节作用, 干扰了自噬现象, 使自噬现象发生了改变, 而使用自噬抑制剂后则明显抑制了自噬现象的发生。

自噬是一把“双刃剑”^[12], 一方面适度自噬可帮助细胞恢复内环境的稳态, 促进细胞自体修复, 从而对神经细胞损伤发挥保护作用; 另一方面过度自噬又可诱导自噬性细胞死亡、促进凋亡的发生与发展。目前研究发现, 在中枢神经系统损害或退变过程中, 自噬会对神经细胞有保护作用, 减少细胞死亡^[13]。有研究报道, 造模脑外伤动物模型后, 自噬系统激活, 在早期自噬可以保护神经细胞, 避免凋亡, 且这种保护作用持久存在^[14]。另有研究报道, 在脑缺血、缺氧的动物模型中, 敲除自噬基因 Atg7 后, 发现自噬系统没有被激活, 并且皮质中很多神经细胞出现死亡, 由此推断自噬的存在可以保护神经细胞, 避免死亡^[15]。自噬是细胞具有的应激与防御机制, 自噬可以消化、降解受损、衰老、失能的细胞, 给予细胞的再生、重建提供原料, 使细

胞实现新陈代谢, 保护细胞免受损害。另有研究报道, 在造模的脑损伤与脑缺血的动物模型中, 发现神经细胞出现自噬的情况较多, 并且使细胞诱导死亡^[16], 说明自噬可以使很多细胞发生死亡。在脊髓损伤的研究过程中, 认为自噬性细胞死亡参与了脊髓损伤后神经组织的损害^[17]。本研究结果可推测川芎嗪可能会对细胞自噬产生促进作用, 保护神经细胞, 另外对自噬引起神经细胞死亡也进行了抑制。本研究结果还提示, 川芎嗪与自噬抑制剂 3-MA ($P < 0.05$) 在缺血 6 h 后 Beclin1, LC3 和 P62 等方面差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 川芎嗪组三种自噬蛋白较 3-MA 组表达降低, 另外从透射电镜发现干预后则显著抑制了自噬现象的发生, 可以推测川芎嗪干预优于 3-MA, SCII 后行为学评分提示川芎嗪组优于 3-MA 组(见表 1)。从研究结果分析, 川芎嗪干预基本上达到了 3-MA 干预的效果, 甚至还优于 3-MA, 可能需进一步的实验研究证明。

通过研究细胞自噬的机制与规律, 给予有效的干预, 充分利用其有利的一面, 避免其不利的一面, 保护神经细胞免于凋亡, 为神经功能恢复创造良好的条件, 中药川芎嗪的干预可能就是一种有益的尝试。

参考文献

- [1] WYNN M M, ACHER C W. A modern theory of spinal cord ischemia/injury in thoracoabdominal aortic surgery and its implications for prevention of paralysis[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2014, 28(4): 1088-1099.
- [2] 姜宇懋, 王丹巧. 川芎嗪药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2016, 18(10): 1364-1370.
- [3] ZIVIN J A, DEGIROLAMI U. Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model[J]. Stroke, 1980, 11(2): 200-205.
- [4] LIU B, HUANG W, XIAO X, et al. Neuroprotective effect of ulinastatin on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015: 624819.
- [5] 杨成喜, 张蕾, 吴风雷, 等. 瘦素、雌激素及雌激素受体在肺癌组织中的表达及其相关性[J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40(6): 572-575.
- [6] JU L L, ZHAO C Y, YE K F, et al. Expression and clinical implication of Beclin1, HMGB1, p62, survivin, BRCAl and ERCC1 in epithelial ovarian tumor tissues[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(10): 1993-2003.
- [7] 张宏, 张慧. 多细胞生物自噬的分子机制和生理功能[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2018, 42(5): 105-114.
- [8] 李建荣, 蒋晓帆, 张磊, 等. 脑缺血模型中皮层 Sirt3 与自噬蛋白 LC3 表达的相关性[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2018, 17(5): 387-390.