

缺血预处理通过增强自噬水平及抑制自噬性细胞死亡保护脊髓神经

顾 军^{1,2}, 殷 建², 殷照阳³, 江 涛², 杨海源², 黄 瑶², 恽 波², 凡 进^{2*}

(¹无锡市锡山区人民医院骨科, 江苏 无锡 214194; ²南京医科大学第一附属医院骨科, 江苏 南京 210029; ³连云港市第一人民医院骨科, 江苏 连云港 222000)

[摘要] 目的: 探讨缺血预处理保护脊髓神经的具体机制。方法: 50 只成年 SD 大鼠随机分为假手术组(A 组 5 只)、缺血再灌注组(B 组 20 只)、缺血预处理组(C 组 5 只)、缺血预处理+缺血再灌注组(D 组 20 只)。A 组动物麻醉后仅切开腹腔后关腹; B 组和 D 组采用左肾下方 0.5 cm 处腹主动脉夹闭法夹闭 0.5 h 后松开, 再灌注 3、6、12、24 h, 其中 D 组在缺血再灌注损伤前行缺血 5 min、再灌注 5 min 缺血预处理, 共 3 次; C 组仅行 3 次缺血预处理。造模成功后, 利用 HE 染色和免疫组化评估各组神经元的存活率, 透射电镜观察自噬活性, 免疫组化和蛋白印迹分析自噬标志物 LC3-II 和自噬相关蛋白 Beclin-1 的表达情况。结果: 缺血再灌注组中, LC3-II 蛋白在再灌注 3 h 后显著升高达到峰值后明显下降, 24 h 后几乎无表达; Beclin-1 蛋白于再灌注后 3 h 开始升高且在 24 h 达到峰值; 再灌注 24 h 后实验动物表现出明显的脊髓损伤症状, 脊髓神经细胞存活率明显降低。缺血预处理+缺血再灌注组中, LC3-II 蛋白表达从再灌注 3 h 开始升高并持续至再灌注 24 h; Beclin-1 蛋白在再灌注 24 h 后才开始升高; 与缺血再灌注组相比, 缺血预处理+缺血再灌注组脊髓神经元死亡率明显降低。结论: 缺血预处理通过维持缺血再灌注后神经细胞自噬水平并抑制自噬性细胞死亡从而保护脊髓神经细胞。

[关键词] 脊髓; 缺血再灌注; 缺血预处理; LC3; Beclin-1; Bcl-2

[中图分类号] R744

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)11-1504-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20151102

Ischemic preconditioning improves autophagy and suppresses autophagic cell death in rat spinal cord following ischemia-reperfusion

Gu Jun^{1,2}, Yin Jian², Yin Zhaoyang³, Jiang Tao², Yang Haiyuan², Huang Yao², Yun Bo², Fan Jin^{2*}

(¹Department of Orthopaedics, Xi Shan People's Hospital, WuXi 214194; ²Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Orthopaedics, Lianyungang First People's Hospital, Lianyungang 222000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the neuroprotective mechanism of ischemic preconditioning in spinal core ischemia. **Methods:** Fifty adults rats were randomly assigned to 4 groups: the sham group receiving anesthesia and surgical preparation (group A, n=5), the ischemia/reperfusion(I/R) group administered to 0.5 h ischemia followed by 3, 6, 12, or 24 h reperfusion (group B, n=20), the IPC group receiving three cycles of 5 min ischemia followed by 5 min of reperfusion (group C, n=5), and the IPC+ I/R group (group D, n=20). HE and immunohistochemical staining were used to evaluate the spinal neuron. Autophagic activity was investigated by electron microscopy and immunohistochemistry. The autophagosome marker LC3-II and the autophagy-associated protein Beclin-1 were detected by Western blot. **Results:** In the I/R group, LC3-II was significantly elevated after 3 h of reperfusion, but declined significantly by 24 h. At 24 h, rats in the I/R group exhibited extensive spinal damage and decreased neuronal survival. In the IPC+ I/R group, neuronal death was reduced and expression of LC3-II sustained throughout the 24 h reperfusion period. **Conclusion:** Ischemic preconditioning can sustain the beneficial effects of autophagic lysosomal degradation during I/R by inhibiting autophagic cell death.

[Key words] spinal cord; ischemic reperfusion; ischemic preconditioning; LC3; Beclin-1; Bcl-2

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(11): 1504-1510]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81401807); 无锡市科技立项课题(MD201304)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fanjin@njmu.edu.cn

自噬是普遍存在的、真核细胞特有的生命现象,是一种进化保守的生物学活动,在细胞的生长发育和老化的过程中清除多余或损伤细胞器、维持细胞内环境稳态具有重要作用。外部刺激可诱发自噬,而且这种自噬通过清除受损细胞器和增加必要的营养物质起细胞保护作用^[1-3]。微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)分为 LC3 I/II 两种形式。LC3 定位于自噬体分隔膜(未和 PE 结合)、内外膜及自噬溶酶体膜(和 PE 结合)上,与酵母 Apg7/8 同源。LC3 前体形成后被加工成胞浆可溶性 LC3- I (18 kDa),然后与自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺结合成膜结合形式 LC3- II (16 kDa)。LC3- II 定位于前自噬体和自噬体,是自噬体的标志性分子,其含量的多少与自噬泡的数量呈正比,常被用来判断细胞的自噬状态。当自噬体与溶酶体融合,自噬体内的 LC3- II 即被溶酶体内的水解酶降解。自噬相关蛋白(Beclin-1)是首个被定义的哺乳动物中正向调节自噬的特异性蛋白,属于酵母 APG6/Vps30 基因的同源表达物,被认为是自噬的特异性蛋白之一。

脊髓缺血再灌注损伤 (spinal cord ischemia-reperfusion injury, SCII) 可导致神经元变性和截瘫,而缺血预处理(ischemia preconditioning, IPC)可诱发非损伤性缺血再灌注,从而增加组织对更加严重缺血刺激的耐受^[4]。缺血预处理是一种有效保护缺血再灌注损伤的方法,但目前其保护机制尚未清晰,特别是自噬在其中的作用机制。目前众多学者公认的是由缺血再灌注诱发的自噬具有两面性,起损伤或者保护作用取决于不同的组织和刺激的性质。目前尚无有关自噬在脊髓缺血再灌注损伤中作用机制的报道,本研究主要阐明自噬是否在缺血预处理中起保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级 SD 大鼠 50 只,重 280~350 g,南京医科大学动物实验中心提供,雌雄不限。大鼠分笼喂养,自由摄取食水。房间温度设定在(25 ± 3)℃,昼夜各 12 h 循环。手术麻醉之前没有发现神经系统异常。50 只成年 SD 大鼠随机分为 4 个组:假手术组(A 组 5 只),缺血再灌注组(B 组 20 只),仅缺血预处理组(C 组 5 只),缺血预处理+缺血再灌注组(D 组 20 只)。

全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物),磷酸盐缓冲液(PBS,赛默飞公司,美国),兔抗鼠 Beclin-1、兔抗鼠

LC3(Cell Signaling 公司,美国),GAPDH(Kangchen 公司,美国),Western blot 发光试剂盒(Millipore 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 SCII 和缺血预处理模型的建立

SCII 模型采取目前最常用的左肾动脉下 0.5 cm 处腹主动脉夹闭法^[5]。术前禁食水 12 h,腹腔注射戊巴比妥 40 mg/kg 麻醉大鼠,术中使用加热灯维持直肠温度在 35.5~37.5℃。将实验动物仰卧位摆放在试验台上,A 组仅行腹腔切开后缝合;B 组在无菌条件下找到腹主动脉,在左肾动脉下 0.5 cm 处用动脉夹夹闭腹主动脉,完全阻断血流 1 h 后松开动脉夹,关闭腹腔再灌注至预定时间;C 组仅行缺血 5 min,再灌注 5 min,共 3 个周期,关闭腹腔至预先设定的时间点;D 组在再灌注前 30 min 行 3 次短暂的缺血预处理(同 C 组)后,左肾动脉下 0.5 cm 处动脉夹夹闭腹主动脉 1 h 后松开,关闭腹腔再灌注至预定时间点。术后每天行膀胱按摩直至能自行排尿。

1.2.2 脊髓组织 HE 染色

在预定的再灌注时间点,过量麻醉药物处死实验动物,分别用生理盐水和 4%多聚甲醛灌注 0.5 h,取出腰段脊髓放置 4%多聚甲醛中过夜,梯度酒精脱水后石蜡包埋,4 μm 切片固定于多聚赖氨酸包被的载玻片上,行 HE 染色,在显微镜下观察脊髓组织的形态。

1.2.3 脊髓组织电镜观察

在预定的再灌注时间点,过量麻醉药物处死实验动物,取出腰段脊髓浸泡于 5%戊二醛中过夜,切成 0.5 mm 3 小块,PBS 漂洗 4 次,每次 15 min;1%锇酸 4℃固定 2 h,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min;2%醋酸铀水溶液染色 2 h;4℃下 50%、70%、90%、100%丙酮依次脱水 15 min;依次使用 100%丙酮:包埋剂(1:1)室温 1.5 h、100%丙酮:包埋剂(1:2)室温 1.5 h,纯包埋剂 37℃浸渍 3 h;包埋后 60℃恒温聚合 36 h,超薄切片进行透射电镜观察。每份标本取 5 张切片,每张切片电镜下随机选取 10 个视野观察。

1.2.4 Western blot 检测 LC3、Beclin-1 的表达情况

脊髓组织以适当的比例(1:4)溶于组织裂解液中,4℃14 000 r/min 离心 15 min 后取上清,Bradford 法检测蛋白浓度调整后分装,-80℃冻存。取脊髓蛋白裂解液,以等量蛋白上样后进行 SDS 凝胶电泳并转膜;PBST 漂洗 3 次,每次 10 min;5%脱脂奶粉室温下封闭 1 h;一抗(anti-Beclin-1 1:1 000;anti-LC3 1:1 000)4℃孵育过夜,PBST 漂洗 3 次,每次 10 min;

二抗 37℃ 孵育 1 h, PBST 漂洗 3 次, 每次 10 min; 室温下 1 mL 发光液孵育 PVDF 膜, 暗室中曝光、显影、定影, 应用 Gel-ProAnalyzer 软件(UVP 公司, 美国)测定条带灰度值。

1.2.5 免疫组织化学染色

固定于 4% 多聚甲醛的脊髓标本石蜡包埋, 以 5 μm 厚度切片固定于多聚赖氨酸处理的玻片上; 常规脱蜡后, 3% H₂O₂ 去离子水孵育 15 min 以消除内源性过氧化物酶活性; 蒸馏水冲洗后 PBS 浸泡 5 min, 微波修复抗原; 山羊血清室温孵育 15 min 封闭非特异性抗原; 滴加适当浓度的一抗(anti-NenN 1:100; anti-LC3 1:200; anti-Beclin-1 1:200) 4℃ 过夜, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴加生物素化二抗 37℃ 孵育 15 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液 37℃ 孵育 15 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; DAB 显色后封片, 显微镜下观察。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 进行统计学分析, 测定值以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, Student-Newman-Keuls 法比较实验组与对照组各时间点蛋白表达量的差异, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

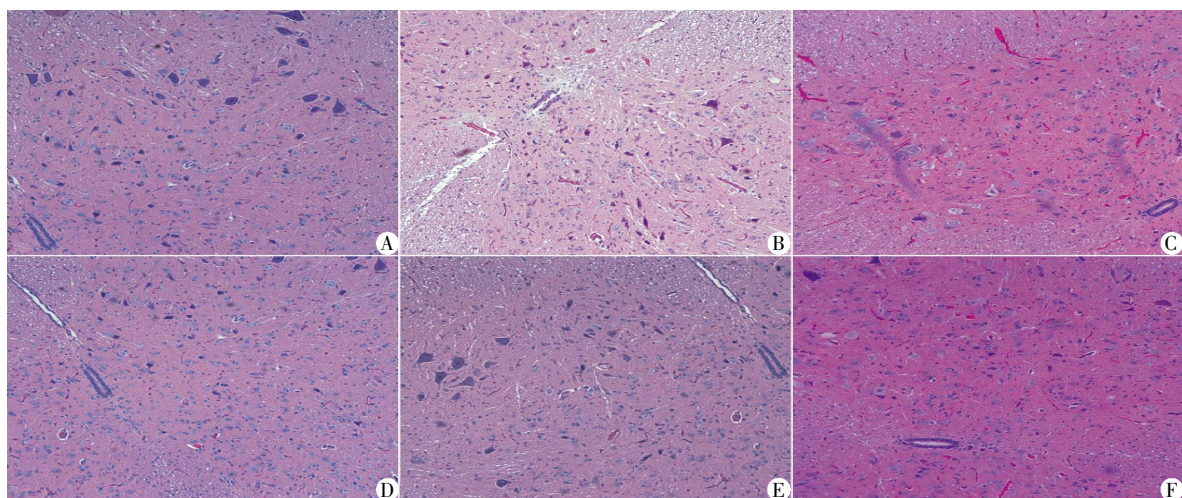
2.1 缺血预处理减轻脊髓缺血再灌注损伤

通过脊髓 HE 染色比较不同组别脊髓神经元的形态和微观结构(图 1)。结果显示在假手术组脊髓灰质和白质边界清晰, 未见神经细胞充血、水肿或

者死亡, 血管和中央导管形态正常。缺血再灌注组脊髓在再灌注期间出现水肿、出血和细胞核的肿胀、变形, 提示可能有坏死和凋亡。再灌注 3 h 后脊髓切片发现有 46.7%(7/15) 出血, 60%(9/15) 充血, 约 45% 出现核溶解。随着再灌注时间的延长(6~24 h), 灰质和白质均出现出血, 且边界模糊。另外细胞核血管间的间距增大。再灌注 24 h 后, 86.7%(13/15) 的脊髓组织出现明显的出血和充血, 50% 以上的神经元出现核溶解。与缺血再灌注组相比, 缺血预处理组和缺血预处理+缺血再灌注组脊髓出血减少。大多数神经元形态正常, 但 HE 切片与假手术组相比还是有亚细胞结构的改变。再灌注 24 h 后, 缺血预处理+缺血再灌注组脊髓出血仅有 46.7%(7/15), 53.3%(8/15) 出现充血, 不到 50% 的神经元出现核溶解。以上结果显示缺血预处理可以减轻脊髓缺血再灌注损伤。

2.2 缺血预处理减少脊髓缺血再灌注导致的细胞死亡

通过免疫组化 NeuN 染色来评估缺血预处理的保护程度(图 2)。假手术组脊髓前角神经元每个视野下存活神经元即 NeuN 阳性细胞数为 375 ± 16 , 缺血再灌注组再灌注 3、6、12、24 h 时分别是 209 ± 6 、 164 ± 4 、 112 ± 3 和 75 ± 2 (与假手术组相比, 每个时间点均是 $P < 0.001$), 且随再灌注时间延长每个时间点的 NeuN 阳性细胞数有降低趋势 ($P < 0.05$), 而缺血预处理+缺血再灌注组再灌注 3、6、12、24 h 时 NeuN 阳性细胞数分别是 356 ± 11 、 348 ± 12 、 344 ± 11 和 337 ± 10 , 仅在再灌注 24 h 时比假手术组低 ($P < 0.001$), 在每个时间点明显比缺血



A: 假手术组; B: 缺血再灌注组再灌注 3 h; C: 缺血再灌注组再灌注 24 h; D: 缺血预处理组; E: 缺血预处理+缺血再灌注组再灌注 3 h; F: 缺血预处理+缺血再灌注组再灌注 24 h。

图 1 脊髓神经元 HE 染色($\times 200$)

Figure 1 HE staining of spinal cord neurons ($\times 200$)

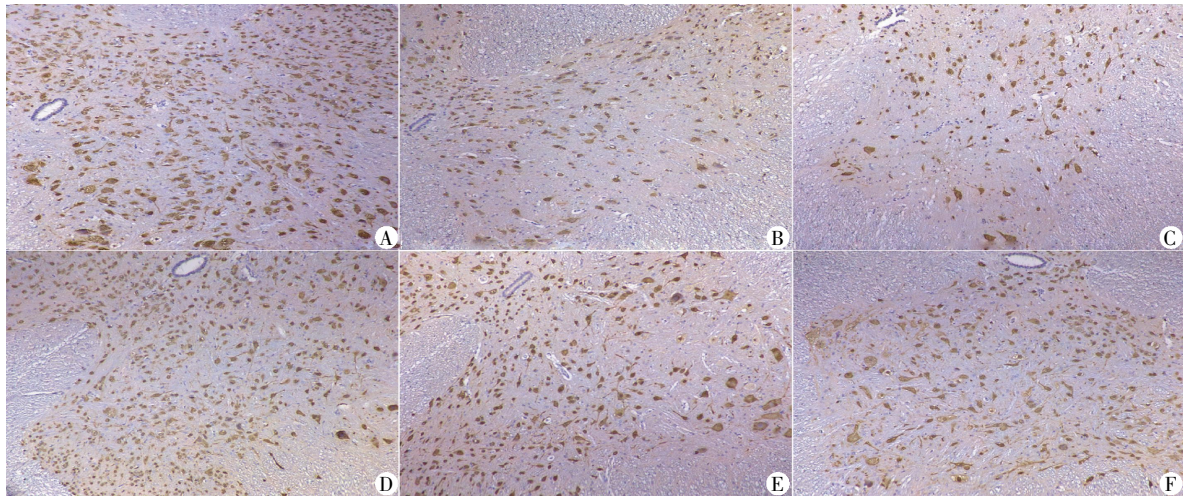
再灌注组高($P < 0.001$),且随再灌注时间延长每个时间点的 NeuN 阳性细胞数未有降低趋势($P > 0.05$)。缺血预处理组 NeuN 阳性细胞数是 370 ± 13 , 与假手术组无明显差异。以上结果显示缺血预处理可明显增加缺血再灌注脊髓神经元的存活率。

2.3 缺血预处理可增加和延长自噬的形态标志

投射电镜是监测自噬过程的最好方法(图 3)。假手术组脊髓神经元可见正常形态的胞核,大量的线粒体和内质网,但很少见自噬体小泡。相比之下,缺血再灌注组可见大量双层膜结构的自噬泡包裹膜性结构或者细胞器碎片,以及在不同消化阶段的次级溶酶体。在神经细胞中可以见到许多囊泡样结

构,表明自噬增加。这些囊泡在再灌注 3 h 时相对较小,可能是新生的自噬小泡或者自噬体的早期吞噬阶段。新生的自噬泡膜可能来自于内质网、线粒体甚至是过氧化物酶体。本研究中观察到包涵线粒体和粗面内质网的大自噬体,也有一些是肿胀的线粒体和激活的溶酶体。同时本研究中也观察到了自噬体与溶酶体的融合过程。

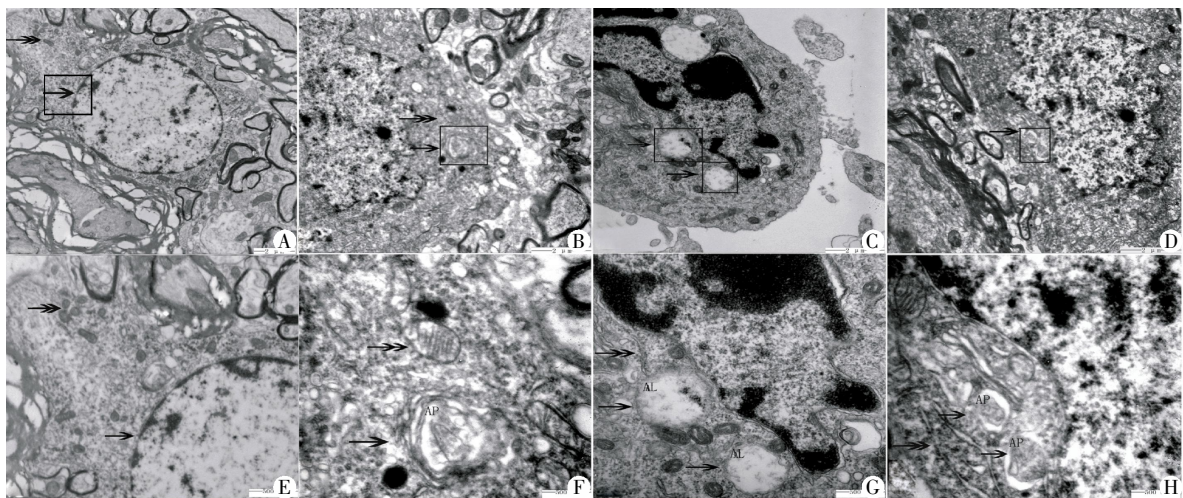
缺血再灌注组再灌注 6、12、24 h 很少检测到自噬体或自噬溶酶体,却越来越多地检测出溶酶体电位失衡这表明自噬是发生在再灌注的早期阶段。在缺血预处理+缺血再灌注组,再灌注 12 h 时仍可检测出大量的自噬泡和具有结构特异性的自噬体。



A:假手术组;B:缺血再灌注组再灌注 3 h;C:缺血再灌注组再灌注 24 h;D:缺血预处理组;E:缺血预处理+缺血再灌注组再灌注 3 h;F:缺血预处理+缺血再灌注组再灌注 24 h。

图 2 脊髓神经元免疫组化 NeuN 染色($\times 200$)

Figure 2 Immunohistochemistry of spinal cord neuron by NeuN antibody staining($\times 200$)



A、E:空白组,箭头指示正常的核膜及细胞器;B、F:缺血再灌注组再灌注 3 h;C、G:缺血再灌注组再灌注 24 h;D、H:缺血预处理+缺血再灌注组再灌注 24 h,箭头指示自噬体或自噬溶酶体(比例尺:A、B、C、D;2 μm ;E、F、G、H;500 nm);E、F、G、H 分别为 A、B、C、D 中矩形部分的高倍镜下。

图 3 脊髓神经元电镜观察

Figure 3 Spinal cord neuron images by electron microscopy

虽然电镜无法完全检测出溶酶体的降解,但仍可以通过不同再灌注时间的电镜照片检测自噬量,包括自噬体与溶酶体的融合。以上数据显示缺血预处理可以增加和延长再灌注后的细胞自噬。

2.4 缺血预处理延长缺血后 LC3 II 的表达时间

检测 LC3 蛋白的表达量是分析自噬强度最常用的方法(图 4)。用免疫印迹法检测各组 LC3-II 的表达量,免疫组化检测各组脊髓 LC3 阳性细胞数。假手术组中很少有细胞能检测到 LC3 的表达,在缺血再灌注组,LC3 蛋白量在再灌注 3 h 达到高峰,然后逐渐降低。在脊髓的灰质和白质中均可检测到 LC3 阳性细胞,且大多数位于胞质中。缺血预处理组 LC3 阳性细胞呈散在的点状分布,而缺血预处理+缺血再灌注组在再灌注 12 h 和 24 h 时,LC3 阳性细胞数明显少于缺血再灌注组。

同时我们通过免疫印迹法检测脊髓缺血再灌注损伤后各时间点 LC3-I (约 18 kDa)向 LC3-II (约 16 kDa)的转变来监测自噬的发生和发展。假手术组 LC3-II 的表达极低,缺血再灌注组 LC3-II 在再灌注 3 h 达到高峰,在之后的 21 h 内逐渐降低。缺血预处理组 LC3-II 的表达量明显高于假手术组。缺血预处理+缺血再灌注组 LC3-II 也于再灌注 3 h 时达到高峰,之后逐渐降低,但明显高于缺血再灌注组对应的时间点。免疫印迹结合电镜和免疫组化的结果表明,缺血预处理+缺血再灌注组自噬的强度明显高于缺血再灌注组。

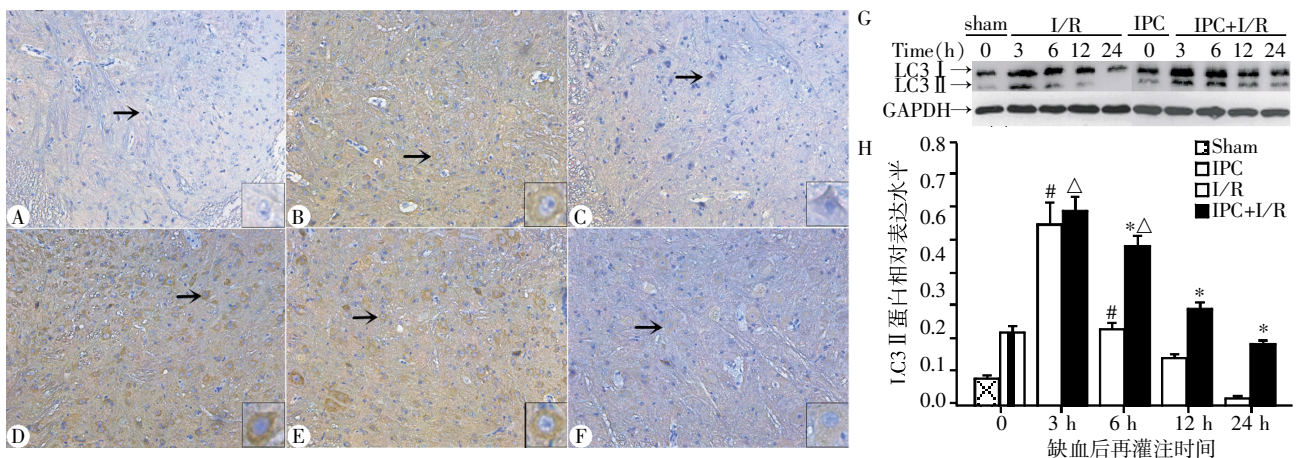
2.5 缺血预处理抑制再灌注后 Beclin-1 的表达

免疫组化显示,在假手术组中 Beclin-1 的表达极低。缺血再灌注组中胞浆的染色程度和 Beclin-1 的阳性细胞数都明显升高,再灌注 3 h 和 6 h 轻度升高,12 h 和 24 h 明显升高。再灌注 3 h、6 h 和 12 h 时缺血预处理+缺血再灌注组中 Beclin-1 的表达程度及阳性细胞数与假手术组相比,无明显变化,在 24 h 时明显升高。

免疫印迹结果与上述相吻合(图 5)。在假手术组和缺血预处理组,Beclin-1 的表达量极低。缺血再灌注组,再灌注 3 h 时 Beclin-1 明显升高,持续升高至 24 h。缺血预处理+缺血再灌注组 Beclin-1 的表达量明显低于缺血再灌注组对应的各个时间点,在 24 h 时明显高于假手术组。

3 讨论

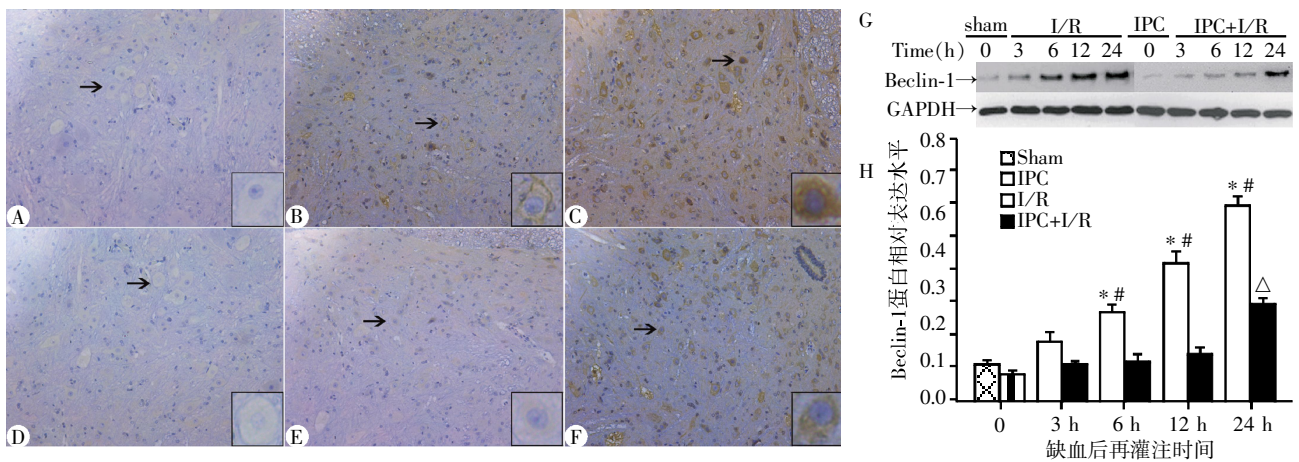
由于脊髓损伤的不可逆性及其带来的灾难性后果,目前有很多研究旨在了解脊髓损伤后病理进程和可能的保护方法。缺血再灌注时不仅缺血即刻对脊髓神经元造成损伤,同时组织及周围也会产生炎症反应、水肿、脂质过氧化、钙超载、兴奋毒性和凋亡等^[6]。有研究表明^[7],营养状态可以调节 Bcl-2 蛋白和 Beclin-1 蛋白之间的相互作用。营养剥夺可以使 Bcl-2 和 Beclin-1 结合降低,诱发自噬;营养过剩促进 Bcl-2 和 Beclin-1 之间的结合进而抑制自噬。也有研究表明^[8],营养剥夺刺激 Bcl-2 磷酸化,进而导致 Bcl-2/Beclin-1 复合体的解离,且其磷酸化位点发生在 Bcl-2 非结构性环状结构域中的 T69、S70



A:假手术组(×200);B:缺血再灌注组再灌注 3 h(×200);C:缺血再灌注组再灌注 24 h(×200);D:缺血预处理组(×200);E:缺血预处理+缺血再灌注组再灌注 3 h(×200);F:缺血预处理+缺血再灌注组再灌注 24 h(×200);小框中为箭头所指细胞的放大。G,H:脊髓神经元 LC3 免疫印迹测定(sham:假手术组;IPC:缺血预处理组;I/R:缺血再灌注组;IPC+I/R:缺血预处理+缺血再灌注组。I/R 组与 sham 组相比,[#]*P* < 0.05;IPC+I/R 组与 IPC 组相比,[△]*P* < 0.05;IPC+I/R 组与 I/R 组相比,^{*}*P* < 0.01)。

图 4 脊髓神经元 LC3 免疫组化染色及蛋白定量检测

Figure 4 Immunohistochemistry and Western blot results of LC3



A:假手术组($\times 200$);B:缺血再灌注组再灌注 3 h($\times 200$);C:缺血再灌注组再灌注 24 h($\times 200$);D:缺血预处理组($\times 200$);E:缺血预处理+缺血再灌注组再灌注 3 h($\times 200$);F:缺血预处理+缺血再灌注组再灌注 24 h($\times 200$);小框中为箭头所指细胞的放大。G、H:脊髓神经元 Beclin-1 免疫印迹测定(sham:假手术组;IPC:缺血预处理组;L/R:缺血再灌注组;IPC+L/R:缺血预处理+缺血再灌注组。L/R 组与 sham 组相比, $^*P < 0.05$;IPC+L/R 组与 IPC 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$;IPC+L/R 组与 L/R 组相比, $^{\#}P < 0.01$)。

图 5 脊髓神经元 Beclin-1 免疫组化染色及蛋白定量检测
Figure 5 Immunohistochemistry and Western blot results of Beclin-1

和 S84 3 个氨基酸残基上。在 SCII 中,谷氨酸介导的兴奋毒性、活性氧、氧化应激和炎症是造成再灌注阶段脊髓损伤的主要原因。本课题组既往的研究表明脊髓缺血再灌注时会有凋亡信号调节激酶 1(apoptosis signal-regulated kinase 1,ASK1)的激活和 Bcl-x1/Bcl-2 相关死亡启动子 (Bcl-x1/Bcl-2 associated death promoter,BAD)与 14-3-3 蛋白的分离^[9-10]。本研究可以证明脊髓缺血再灌注时可以发生自噬性细胞死亡,且这一过程可被缺血预处理抑制。

自噬起保护作用还是引起自噬性细胞死亡 (autophagic cell death,ACD) 取决于不同的损伤条件。与凋亡和坏死相比,ACD 在 SCII 中的作用了解甚少,尽管如此,目前研究表明 ACD 在 SCII 中起重要作用。

Baliga^[11]认为短暂重复的缺血再灌注可以起到神经保护作用。我们通过 HE 染色和神经元计数也证明缺血预处理可以减轻 SCII。同时我们还认为自噬在缺血预处理介导的神经保护中起重要作用,这一观点与 Weerasinghe 等^[12]相似,他们认为自噬在缺血预处理介导的心肌保护中起重要作用。

本研究结果显示,缺血再灌注组 LC3 阳性细胞数在再灌注 3 h 时增多,随后逐渐降低,Western blot 也表明 LC3- II 蛋白只是短暂的表达。电镜结果显示自噬泡和自噬体的形成主要在再灌注后的早期。缺血预处理+缺血再灌注组 LC3 阳性细胞数和 LC3- II 蛋白的表达明显增加,且其降低的速度也慢于缺血再灌注组,即使在再灌注 24 h 后也可见大量的 LC3 阳性细胞和 LC3- II 的高表达。以上结果表明缺血预

处理可以延长再灌注后自噬的表达时间、增加自噬的强度,这一效应可起到神经细胞保护作用。

与心肌缺血再灌注损伤相似^[13],SCII 使 Beclin-1 的表达上调,这说明 ACD 可能是缺血再灌注共同的结果。Beclin-1 通过 BH3 结构域与抗凋亡蛋白家族 Bcl-2 家族成员结合,抑制了 Beclin-1 蛋白介导的自噬的发生,同时也抑制了 ACD^[14]。因此我们认为自噬是对缺血应激的一种保护作用。缺血预处理是通过维持再灌注阶段自噬的活性起保护作用,其机制可能是再灌注时 Bcl-2 的磷酸化使 Beclin-1/Bcl-2 复合体分离,从而导致 Beclin-1 介导的 ACD。而缺血预处理可以抑制上述过程,减轻损伤。Bcl-2 具有抗凋亡作用,同时也可能具有尚未被认知的抗 ACD 作用。因此 Beclin-1/Bcl-2 可能是连接凋亡和 ACD 的桥梁。

综上所述,本研究初步证明了在 SCII 中,缺血预处理通过维持自噬的强度和ación,抑制自噬性细胞死亡,从而起到神经保护的作用。我们认为缺血预处理为临床上治疗 SCII 提供了新的思路和方向。但是 SCII 是多种信号通路共同介导的病理过程,其确切机制还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Komatsu M, Waguri S, Ueno T, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice[J]. J Cell Biol, 2005, 169(3): 425-434
[2] Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature

- committee on cell death 2009 [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(1): 3–11
- [3] Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(7): 545–550
- [4] Mangan DF, Wahl SM, Sultzer BM, et al. Stimulation of human monocytes by endotoxin-associated protein: inhibition of programmed cell death (apoptosis) and potential significance in adjuvanticity [J]. *Infect Immun*, 1992, 60(4): 1684–1686
- [5] Yu L, Alva A, Su H, et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8 [J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1500–1502
- [6] Elsegood CL, Chang M, Jessup W, et al. Glucose metabolism is required for oxidized LDL-induced macrophage survival; role of PI3K and Bcl-2 family proteins [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(9): 1283–1289
- [7] Berry DL, Baehrecke EH. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila* [J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1137–1148
- [8] Paillas S, Causse A, Marzi L, et al. MAPK14/p38alpha confers irinotecan resistance to TP53-defective cells by inducing survival autophagy [J]. *Autophagy*, 2012, 8(7): 1098–1112
- [9] Oshima Y, Akiyama T, Hikita A, et al. Pivotal role of Bcl-2 family proteins in the regulation of chondrocyte apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(39): 26499–26508
- [10] Schlecht-Bauer D, Antier D, Machet MC, et al. Short- and long-term cardioprotective effect of darbepoetin-alpha: role of Bcl-2 family proteins [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 54(3): 223–231
- [11] Baliga BC, Kumar S. Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy [J]. *Hematol Oncol*, 2002, 20(2): 63–74
- [12] Weerasinghe P, Hallock S, Tang SC, et al. Role of Bcl-2 family proteins and caspase-3 in sanguinarine-induced bimodal cell death [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2001, 17(6): 371–381
- [13] Desai S, Liu Z, Yao J, et al. Heat shock factor 1 (HSF1) controls chemoresistance and autophagy through transcriptional regulation of autophagy-related protein 7 (ATG7) [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(13): 9165–9176
- [14] Espert L, Biard-Piechaczyk M. Autophagy in HIV-induced T cell death [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009, 335(1): 307–321

[收稿日期] 2015-06-17