

· 实验研究 ·

转化生长因子 β 激活激酶 1 介导的细胞自噬
在小鼠脑缺血-再灌注损伤中的作用

谢凡 樊友凌 杨明明 聂颖 周俊

【摘要】 目的 评价转化生长因子 β 激活激酶 1 (TGF β -activated kinase-1, TAK1) 介导的细胞自噬在小鼠脑缺血-再灌注 (ischemia-reperfusion, IR) 损伤中的作用。**方法** 雄性昆明小鼠 72 只, 8 周龄, 体重 (25.0 $\pm$ 3.5) g, 采用随机数字表法分为六组: 空白对照组 (C 组)、假手术组 (S 组)、IR 组、TAK1 短发夹 RNA (shRNA) 慢病毒组 (T 组)、阴性对照慢病毒组 (Y 组) 和生理盐水组 (NS 组), 每组 12 只。T 组、Y 组和 NS 组分别以 1 μ l/min 侧脑室注射 TAK1 shRNA 慢病毒、阴性对照慢病毒和等量生理盐水 10 μ l。2 周后 IR 组、T 组、Y 组和 NS 组制备脑 IR 损伤模型, 缺血 2 h 后恢复灌注; S 组分离颈总动脉但不夹闭, 其余手术步骤同 IR 组。再灌注 24 h 后进行神经功能缺陷评分 (neurological severity scores, NSS); NSS 评分完成后处死小鼠, 取脑组织测定脑梗死体积; Western blot 法检测小鼠脑组织 TAK1、LC3 II / LC3 I、Beclin1 和 p62 蛋白含量。**结果** IR 组、T 组、Y 组和 NS 组 NSS 评分和脑梗死体积百分比明显高于 C 组 ($P < 0.05$); T 组 NSS 评分和脑梗死体积百分比明显低于 IR 组 ($P < 0.05$)。IR 组、Y 组和 NS 组脑组织 TAK1 蛋白含量明显高于 C 组 ($P < 0.05$); T 组脑组织 TAK1 蛋白含量明显低于 IR 组 ($P < 0.05$)。IR 组、T 组、Y 组和 NS 组 LC3 II / LC3 I 比值、Beclin1 蛋白含量明显高于 C 组 ($P < 0.05$), p62 蛋白含量明显低于 C 组 ($P < 0.05$); T 组脑组织 LC3 II / LC3 I 比值、Beclin1 蛋白含量明显低于 IR 组, p62 蛋白含量明显高于 IR 组 ($P < 0.05$)。**结论** TAK1 介导的细胞自噬参与小鼠脑缺血-再灌注损伤机制。

【关键词】 转化生长因子 β 激活激酶 1; 自噬; 缺血-再灌注损伤; 脑

Role of TAK1 mediated cell autophagy after global cerebral ischemia-reperfusion in rats XIE Fan, FAN Youling, YANG Mingming, NIE Ying, ZHOU Jun. Department of Anesthesiology, Guangdong 999 Brain Hospital, Guangzhou 510510, China
Corresponding author: ZHOU Jun, Email: zhoujun7843@126.com

【Abstract】 Objective To study the effects of TGF β -activated kinase-1 (TAK1) mediated cell autophagy after global cerebral ischemia-reperfusion (IR) in rats. **Methods** Seventy-two male Kunming rats were randomly divided into six groups: control group (group C), sham operation group (group S), ischemia-reperfusion group (group IR), TAK1 shRNA lentivirus group (group T), negative lentivirus group (group Y) and normal saline group (group NS) ($n = 12$ each). The rats in groups T, Y and NS received cerebral ventricles injection of TAK1 shRNA lentivirus, negative lentivirus and normal saline 10 μ l two weeks before preparing animal model. Using thread embolism of the right middle cerebral artery occlusion (MCAO) to cause focal ischemia for 2 h and released for 24 h for reperfusion in groups IR, T, Y and NS. The common carotid arteries were separated but not ligated in group S, the rest of the procedure as the same as group IR. The rats of each group were evaluated by neurological severity scores (NSS) 24 h after reperfusion, the cerebral infarct volume was measured with the method of TTC and the expression of TAK1, LC3 II / LC3 I, Beclin1 and p62 protein in rat hippocampus were determined by using Western blot. **Results** The infarct volume and NSS in groups IR, T, Y and NS were significantly higher than those in group C ($P < 0.05$). The infarct volume and NSS in group T were significantly lower than those in group IR ($P < 0.05$). TAK1 protein of hippocampus in groups IR, Y and NS was significantly higher than that in group C ($P < 0.05$). TAK1 protein of hippocampus in group T were significantly lower than that in group IR ($P < 0.05$). LC3 II / LC3 I and Beclin1 protein of hippocampus in groups IR, T, Y and NS were significantly higher than those in group C, and the p62 protein of hippocampus in groups IR, T, Y and NS was significantly lower than that in group C ($P < 0.05$). The LC3 II / LC3 I and Beclin1 in group T

作者单位: 510510 广州市, 广东三九脑科医院麻醉科 (谢凡、杨明明、聂颖); 广州市番禺区中心医院麻醉科 (樊友凌); 中山大学附属佛山医院麻醉科 (周俊)

通信作者: 周俊, Email: zhoujun7843@126.com

were significantly lower than those in group IR, and the p62 protein of hippocampus in group T was significantly higher than that in group C ($P < 0.05$). **Conclusion** TAK1 mediated cell autophagy takes part in the mechanism of brain ischemia-reperfusion injury in rats.

【Key words】 TGF β -activated kinase-1; Autophagy; Ischemic-reperfusion injury; Brain

缺血性脑血管疾病是当今世界上主要的致死、致残疾病之一。脑缺血-再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤病理生理过程复杂,包括炎症反应、细胞内钙失稳态和自由基生成等多种作用机制,目前仍未完全阐明,其机制研究对临床有重要意义。转化生长因子 β 激活激酶 1(TGF β -activated kinase-1, TAK1)属于丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs),在生理病理状态下调控细胞的生长、分化、凋亡和自噬等^[1,2]。在脑缺血性病理过程中,TAK1 通路激活 NF- κ B 和 MAPK 等信号通路导致细胞死亡^[3,4],但 TAK1 介导的细胞自噬是否在脑 IR 损伤中发挥作用,目前尚无研究。本研究拟通过基因干扰技术,评价 TAK1 介导的细胞自噬在小鼠脑 IR 损伤机制中的作用。

材料与方法

实验动物及分组 健康雄性昆明小鼠 72 只,8 周龄,体重(25.0 ± 3.5)g,由中山大学动物实验中心提供。采用随机数字表法分为六组:空白对照组(C 组)、假手术组(S 组)、IR 组、TAK1 短发夹 RNA(shRNA)慢病毒组(T 组)、阴性对照慢病毒组(Y 组)和生理盐水组(NS 组),每组 12 只。

侧脑室注射 腹腔注射 10%水合氯醛 300 mg/kg 麻醉下,沿头部正中中线做一约 0.5 cm 切口,暴露 Bregma 点,在该点后侧 1.5 mm、右侧偏外 1 mm 处,用微量进样器垂直颅骨刺入,深度 3 mm。T 组、Y 组和 NS 组分别以 1 μ l/min 侧脑室注射 TAK1 shRNA 慢病毒(sc-36607-V)、阴性对照慢病毒和等量生理盐水 10 μ l,留针 5 min 后拔针并缝合皮肤。

IR 模型制备 2 周后 IR 组、T 组、Y 组和 NS 组制备脑 IR 损伤模型^[6],缺血 2 h 后恢复灌注;S 组分离颈总动脉但不夹闭,其余手术步骤同 IR 组。术前禁食 12 h,自由饮水。腹腔注射 10%水合氯醛 300 mg/kg 麻醉下,于颈部正中做一切口,分离右侧颈总动脉和颈外动脉,结扎颈外动脉分支,于近心端结扎颈总动脉,血管夹夹闭颈总动脉远端,在颈总动脉分叉处剪一小口,将直径 0.3 mm、长 50 mm 的尼龙鱼线置入颈内动脉,直至有轻微阻力为止,

深度 18~20 mm;缺血 2 h 后,拔出线栓恢复灌注。术中保留自主呼吸,维持直肠温度 37~38℃。S 组仅分离并结扎右侧颈总动脉和颈外动脉,但不置入线栓。

神经功能缺陷评分 麻醉苏醒后,将小鼠放回鼠笼,自由饮食。再灌注 24 h 后利用小鼠神经功能评分法(neurological severity scores, NSS)进行神经功能缺陷评分。运动测试:(1)提起鼠尾前肢屈曲或后肢屈曲或 30 s 内头移动偏离身体纵轴 10°以上均为 1 分;(2)将小鼠放在地上,可正常行走为 0 分;能直线行走为 1 分;朝瘫痪侧转圈为 2 分;倒向瘫痪侧为 3 分。平衡测试:稳健地保持平衡为 0 分;完全抓住平衡木的一端为 1 分;抱住平衡木,一侧肢体滑落为 2 分;抱住平衡木,两侧肢体均滑落或绕木旋转>60 s 为 3 分;40~60 s 跌落为 4 分;20~40 s 跌落为 5 分;20 s 内跌落为 6 分。反射消失和不正常运动:羽翼反射(动耳时摇头)、角膜反射(棉签触角膜闭眼)、惊恐反射(对声音有运动反应)消失或出现抽搐、肌阵挛、肌张力障碍均为 1 分。

脑梗死体积测定 NSS 评分完成后,每组取 6 只小鼠,腹腔注射 10%水合氯醛 0.35 ml/100 g 麻醉下迅速处死取脑组织,置于冰盐水中 10 min,取冠状面均匀切成 2 mm 厚的脑片,放入 37℃、20 g/L TTC 溶液中染色 30 min,然后用 100 g/L 甲醛缓冲液固定 24 h,数码相机拍照,输入计算机,采用 Adobe Photoshop 7.0 图像分析软件计算脑梗死体积:粉红色区为正常脑组织,白色区为梗死区。为校正脑水肿导致的梗死体积的偏差,用占对侧正常体积的比例表示梗死体积,计算公式:(对侧正常脑组织体积-同侧正常脑组织体积)÷对侧正常脑组织体积 $\times 100\%$ 。

蛋白定量分析 每组剩余 6 只小鼠用 10%水合氯醛深麻醉后,开胸暴露心脏,经左心室插管入升主动脉,剪开右心房,生理盐水冲洗灌注。取脑海马组织离心匀浆,测定蛋白浓度后,蛋白终浓度调整为 2 μ g/ μ l,-80℃保存备用。取蛋白 20 μ l 进行 10%SDS-PAGE 电泳,电泳完毕后,使用转移电泳装置湿转,4℃、400 mA 恒流条件下电转 120 min,将蛋白转移到 PVDF 膜上。随即用封闭液(含 5%脱脂牛奶的 TBST 溶液)室温封闭 PVDF 膜 1

h, 分别加 TAK1 兔多克隆一抗(ab111096, 1:500)、LC3B 兔多克隆一抗(ab48394, 1:1 000)、Beclin1 兔多克隆一抗(ab55878, 1:1 000)、p62 兔多克隆一抗(ab91526, 1:500)和内参 GAPDH(1:5 000)4℃过夜; TBST 洗膜, 加入相应辣根过氧化物酶偶联二抗(1:5 000), 室温下孵育 2 h, TBST 洗膜。采用 ECL 试剂盒进行显色反应后暗室内 X 片曝光显影。凝胶成像分析系统对条带进行密度扫描, 以 GAPDH 作为内参, 取蛋白积分光密度值与 GAPDH 积分光密度值的比值反映小鼠海马 TAK1、LC3 II/LC3 I、Beclin1 和 p62 蛋白含量。

统计分析 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析, 正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

IR 组、T 组、Y 组和 NS 组 NSS 评分和脑梗死体积百分比明显高于 C 组(P<0.05); T 组 NSS 评分和脑梗死体积百分比明显低于 IR 组(P<0.05); C 组与 S 组 NSS 评分和脑梗死体积百分比差异无统计学意义(图 1, 表 1)。

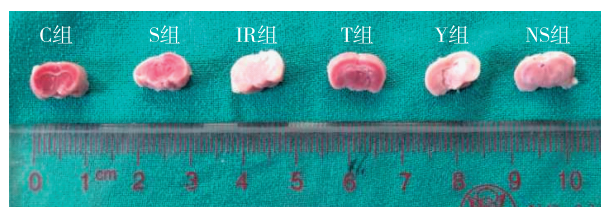


图 1 六组小鼠脑梗死情况

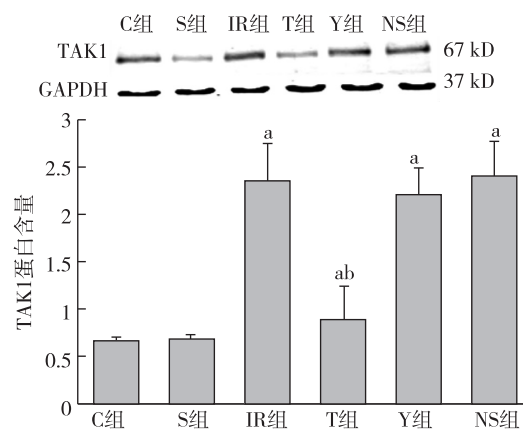
表 1 六组小鼠 NSS 评分和脑梗死体积百分比的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NSS 评分 (分)	脑梗死体积百分比 (%)
C 组	6	0	0.31±0.09
S 组	6	0	0.33±0.11
IR 组	6	8.7±1.9 ^a	13.35±2.03 ^a
T 组	6	3.9±1.2 ^{ab}	6.64±2.31 ^{ab}
Y 组	6	8.5±1.6 ^a	13.77±1.96 ^a
NS 组	6	9.1±1.6 ^a	13.86±2.12 ^a

注:与 C 组比较,^aP<0.05;与 IR 组比较,^bP<0.05

IR 组、Y 组和 NS 组脑组织 TAK1 蛋白含量明

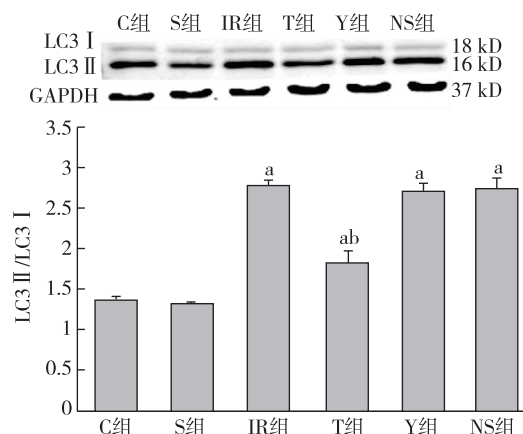
显高于 C 组(P<0.05); T 组脑组织 TAK1 蛋白含量明显低于 IR 组(P<0.05)(图 2)。



注:与 C 组比较,^aP<0.05;与 IR 组比较,^bP<0.05

图 2 六组小鼠脑组织 TAK1 蛋白含量的比较

IR 组、T 组、Y 组和 NS 组脑组织 LC3 II/LC3 I 明显高于 C 组(P<0.05); T 组脑组织 LC3 II/LC3 I 明显低于 IR 组(P<0.05)(图 3)。



注:与 C 组比较,^aP<0.05;与 IR 组比较,^bP<0.05

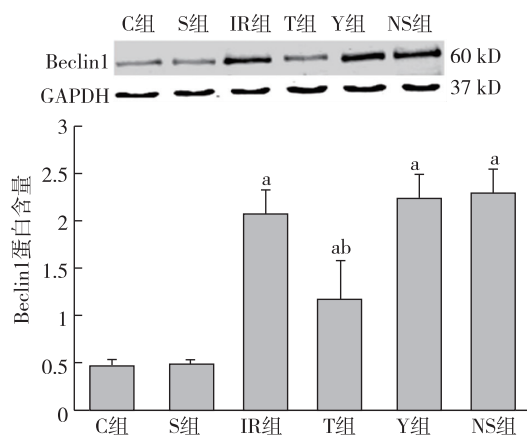
图 3 六组小鼠脑组织 LC3 II/LC3 I 的比较

IR 组、T 组、Y 组和 NS 组 Beclin1 蛋白含量明显高于 C 组(P<0.05); T 组 Beclin1 蛋白含量明显低于 IR 组(P<0.05)(图 4)。

IR 组、T 组、Y 组和 NS 组脑组织 p62 蛋白含量明显低于 C 组(P<0.05); T 组 p62 蛋白含量明显高于 IR 组(P<0.05)(图 5)。

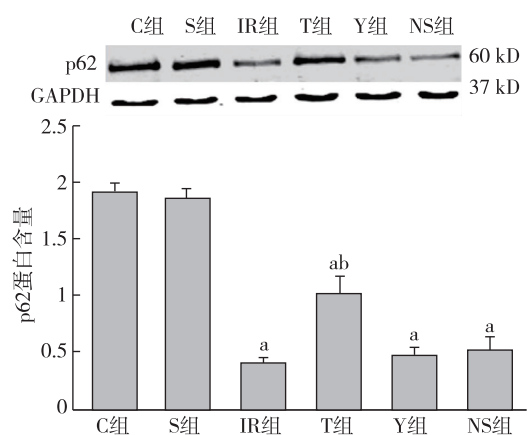
讨 论

小鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)的缺血模型大脑中动脉栓塞模型是目前研究局灶性脑 IR 损伤使用最为广泛的理



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$

图 4 六组小鼠脑组织 Beclin1 蛋白含量的比较



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$

图 5 六组小鼠脑组织 p62 蛋白含量的比较

想模型。本研究结果显示,IR 组、T 组、Y 组和 NS 组 NSS 评分和脑梗死体积百分比明显升高,提示 MCAO 造模成功。本研究采用的 shRNA 慢病毒是目前基因沉默的常用实验工具,无论是在体还是离体实验,均有较高的基因沉默转染效率和较长的作用时效,是性价比较高的基因沉默实验工具。本研究结果中 T 组 TAK1 蛋白含量明显低于 IR 组,提示采用的 TAK1 shRNA 慢病毒可以明确达到下调 TAK1 表达的作用。

TAK1 是一种 MAPK 激酶,可激活下游通路 IKK 复合体和 MAPK 家族(细胞外信号调节激酶 ERK、JNK 和 p38)参与脑 IR 损伤的发病机制^[3,4,7~9]。因此本研究通过 shRNA 慢病毒下调小鼠海马 TAK1 表达后,观察小鼠在脑 IR 损伤模型中的脑损伤严重程度。结果显示小鼠脑 IR 损伤后 TAK1 表达明显增加,而下调小鼠脑 TAK1 基因表

达后,小鼠脑 IR 损伤程度明显减轻,提示 TAK1 在小鼠脑 IR 损伤的病理机制中发挥重要作用。

TAK1 作为信号通路的上游激酶,不仅通过凋亡机制参与 IR 的病理过程,而且与自噬密切相关^[2]。自噬是一种保守的细胞自我降解方式,是将受损细胞器及大分子物质通过溶酶体降解再利用的过程。基础水平的自噬是维持细胞稳态所必需的,同时自噬参与急慢性损伤、肿瘤等多种疾病的病理生理过程^[10,11],在脑 IR 损伤中也发挥重要作用^[12,13]。Beclin1、LC3 和 p62 是参与自噬过程的三个主要蛋白,Beclin1 在自噬的启动阶段发挥了重要作用^[14]。在 Atg4 作用下,LC3 前体被加工为可溶性 LC3 I,后者在 Atg7 和 Atg3 作用下与磷脂酰乙醇胺连接成为脂溶性的 LC3 II-PE,参与自噬溶酶体形成^[15],因此 LC3 II/LC3 I 代表细胞自噬的水平。而 p62 蛋白在自噬的过程中会被不断消耗^[16],这三个蛋白是目前检测自噬水平的经典指标。本研究结果显示,小鼠脑 IR 损伤后 LC3 II/LC3 I、Beclin1 明显增加,而 p62 明显降低,提示细胞自噬增加;而 TAK1 基因沉默后,IR 损伤引起的细胞自噬明显降低,提示 TAK1 介导的细胞自噬参与小鼠脑 IR 损伤的病理生理机制。

综上所述,转化生长因子 β 激活激酶 1 介导的细胞自噬参与小鼠脑缺血-再灌注损伤机制。

参 考 文 献

- [1] Lamothe B, Lai Y, Xie M, et al. TAK1 is essential for osteoclast differentiation and is an important modulator of cell death by apoptosis and necroptosis. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(3): 582-595.
- [2] Takaesu G, Kobayashi T, Yoshimura A. TGF β -activated kinase 1 (TAK1)-binding proteins (TAB) 2 and 3 negatively regulate autophagy. *J Biochem*, 2012, 151(2): 157-166.
- [3] White BJ, Tarabishy S, Venna VR, et al. Protection from cerebral ischemia by inhibition of TGF β -activated kinase. *Exp Neurol*, 2012, 237(1): 238-245.
- [4] Zhang D, Yan H, Li H, et al. TGF β -activated kinase 1 (TAK1) inhibition by 5Z-7-Oxozeaenol attenuates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Biol Chem*, 2015, 290(32): 19900-19909.
- [5] Jun H, Susumu T, Hidetaka N, et al. Sevoflurane stimulates MAP kinase signal transduction through the activation of PKC alpha and betaII in fetal rat cerebral cortex cultured neuron. *Acta Histochem Cytochem*, 2006, 39(6): 163-172.
- [6] Kawaguchi M, Kimbro JR, Drummond JC, et al. Isoflurane delays but does not prevent cerebral infarction in rats subjected to focal ischemia. *Anesthesiology*, 2000, 92(5): 1011-1018.

- 1335-1342.
- [7] Li H, Zhou S, Wu L, et al. The role of p38MAPK signal pathway in the neuroprotective mechanism of limb postconditioning against rat cerebral ischemia/reperfusion injury. *J Neurol Sci*, 2015, 357(1-2): 270-275.
- [8] Lee KF, Chen JH, Teng CC, et al. Protective effects of *Hericium erinaceus* mycelium and its isolated erinacine A against ischemia-injury-induced neuronal cell death via the inhibition of iNOS/p38 MAPK and nitrotyrosine. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9): 15073-15089.
- [9] Zhao YN, Li JM, Chen CX, et al. Hypertension-mediated enhancement of JNK activation in association with endoplasmic reticulum stress in rat model hippocampus with cerebral ischemia-reperfusion. *Genet Mol Res*, 2015, 14(3): 10980-10990.
- [10] Ryter SW, Cloonan SM, Choi AM. Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol Cells*, 2013, 36(1): 7-16.
- [11] Jing K, Lim K. Why is autophagy important in human diseases? *Exp Mol Med*, 2012, 44(2): 69-72.
- [12] Zhao M, Liang F, Xu H, et al. Methylene blue exerts a neuroprotective effect against traumatic brain injury by promoting autophagy and inhibiting microglial activation. *Mol Med Rep*, 2016, 13(1): 13-20.
- [13] Yu J, Bao C, Dong Y, et al. Activation of autophagy in rat brain cells following focal cerebral ischemia reperfusion through enhanced expression of Atg1/pULK and LC3. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 3339-3344.
- [14] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4): 571-580.
- [15] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J*, 2000, 19(21): 5720-5728.
- [16] Masuda GO, Yashiro M, Kitayama K, et al. Clinicopathological correlations of autophagy-related proteins LC3, Beclin 1 and p62 in gastric cancer. *Anticancer Res*, 2016, 36(1): 129-136.

(收稿日期:2016-06-22)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》关于一稿两投问题的声明

为维护学术刊物的严肃性和科学性,也为了维护作者的名誉和向广大读者负责,本刊编辑部重申坚决反对一稿两投并采取以下措施:(1)作者和单位对来稿的真实性和科学性均应自行负责。刊出前需第一作者在校样首页亲笔签名,临床研究和实验研究来稿的通信作者也需亲笔签名。(2)来稿需附单位推荐信,应注明稿件无一稿两投,署名无争议,并加盖公章。(3)凡接到编辑部收稿回执后3个月内未接到退稿通知,系稿件仍在审阅中,作者欲投他刊,或将在他刊上发表,请先与编辑部联系撤稿,切勿一稿两投。(4)编辑部认为来稿有一稿两投嫌疑时,在认真收集有关资料和仔细核对后通知作者,并由作者就此问题作出解释。(5)一稿两用一经证实,将择期在杂志上刊出其作者单位和姓名以及撤销该文的通知;向作者所在单位和同类杂志通报;2年内拒绝发表该作者为第一作者所撰写的任何来稿。