

• 论 著 •

羽扇豆醇调节 MAPK/ERK/mTOR 信号通路对 OGD/R 诱导的神经元自噬的影响

张君 李森 张倩楠

【摘要】 目的 探讨羽扇豆醇调节有丝分裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)/细胞外信号调节激酶(Extracellular signal-regulated kinase, ERK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路对氧糖剥夺/复氧(Oxygen-glucose deprivation/Reoxygenation, OGD/R)诱导的神经元自噬的影响。**方法** 原代培养海马神经元,建立 OGD/R 损伤模型;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]法检测不同水平羽扇豆醇(0、1、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)干预的 OGD/R 海马神经元存活率;将大鼠海马神经元随机分为对照(CON)组(常规培养)、OGD/R 组(氧糖剥夺 90 min 后复氧复糖 24 h)、羽扇豆醇组(OGD/R + 10 $\mu\text{mol/L}$ 羽扇豆醇)、叔丁基对苯二酚(Tert-butylhydroquinone, TBHQ)组(OGD/R + 10 $\mu\text{mol/L}$ 羽扇豆醇 + 50 $\mu\text{mol/L}$ MAPK 激活剂 TBHQ);试剂盒检测神经元乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)及还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)水平;2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-Dichloro-2-hydroxyfluorescein diacetate, DCFH-DA)探针法检测神经元活性氧(Reactive oxygen species, ROS)水平;钙荧光探针(Fluo-3 acetoxymethyl ester, Fluo-3/AM)法检测神经元 Ca^{2+} 水平;流式细胞术检测神经元凋亡情况;透射电镜观察神经元自噬情况;自噬双标记腺病毒(Red fluorescent protein-green fluorescent protein-microtubule-associated protein 1 light chain 3, mRFP-GFP-LC3B)检测神经元自噬流;Western blot 检测神经元微管相关蛋白 1 轻链 3 II / I (Microtubule-associated protein 1 light chain 3 II / I, LC3 II / I)、p62, Beclin 1, ERK1/2、磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(Phosphorylated extracellular signal-regulated kinases 1/2, p-ERK1/2)、mTOR 和磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Phosphorylated mammalian target of rapamycin, p-mTOR)蛋白表达水平。**结果** 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 羽扇豆醇均能提高神经元存活率($P < 0.05$),但 10 $\mu\text{mol/L}$ 羽扇豆醇时神经元存活率最高;与 CON 组比较,OGD/R 组神经元存活率、SOD、GSH 以及 p62 和 p-mTOR 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),LDH、MDA、ROS 水平、 Ca^{2+} 平均荧光强度、自噬小体个数、黄色荧光颗粒、红色荧光颗粒以及 LC3-II / I, Beclin 1 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平显著上升($P < 0.05$);与 OGD/R 组比较,羽扇豆醇组 SOD、GSH 以及 p62 和 p-mTOR 蛋白表达水平显著升高,LDH、MDA、ROS 水平、 Ca^{2+} 平均荧光强度、自噬小体个数、黄色荧光颗粒、红色荧光颗粒以及 LC3-II / I, Beclin 1 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);MAPK 激活剂 TBHQ 逆转了羽扇豆醇对 OGD/R 海马神经元的损伤改善作用。**结论** 羽扇豆醇通过调节 MAPK/ERK/mTOR 信号通路来抑制 OGD/R 诱导的神经元自噬,起到保护大鼠海马神经元效果。

【关键词】 羽扇豆醇 神经元 有丝分裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路 氧糖剥夺/复氧 自噬

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2023)03-0235-07

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2023.03.001

Lupinol inhibits OGD/R-induced neuronal autophagy by modulating MAPK/ERK/mTOR signaling pathway
Zhang Jun*, Li Miao, Zhang Qianman*. * Department of Neurology, the Second Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116000

【Abstract】 Objective To investigate the influence of lupinol on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced neuronal autophagy by regulating the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Meth-**

ods A model of OGD/R injury was established by primary culture of hippocampal neurons; MTT method was applied to detect the survival rate of OGD/R hippocampal neurons in different concentrations of lupinol (0, 1, 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$). The rat hippocampal neurons were randomly separated into the CON group (conventional culture), OGD/R group (24 h reoxygenation and glucose recovery after oxygen-glucose deprivation for 90 min), lupinol group (OGD/R + 10 $\mu\text{mol/L}$ lupinol), and TBHQ group (OGD/R + 10 $\mu\text{mol/L}$ lupinol + 50 $\mu\text{mol/L}$ MAPK activator TBHQ). The kits were applied to detect neuronal LDH, MDA, SOD and GSH contents. The DCFH-DA probe method was applied to detect neuronal ROS content. The Fluo-3/AM probe method was applied to detect neuronal Ca^{2+} concentration. Flow cytometry was used to detect neuronal apoptosis; transmission electron microscopy was applied to observe neuronal autophagy. Western blots of mRFP-GFP-LC3B were applied to detect neuronal autophagic flux. Western blotting was applied to detect the levels of neuronal LC3-II/I, p62, Beclin 1, ERK1/2, p-ERK1/2, mTOR and p-mTOR. **Results** Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$, 5, 10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$ lupinol improved the neuron survival rate ($P < 0.05$). However, the neuron survival rate was the highest at 10 $\mu\text{mol/L}$ lupinol. Based on the comprehensive results, the concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ lupinol was selected for subsequent experiments. Compared with the CON group, the neuronal survival rate, SOD, GSH, and the protein expression of p62 and p-mTOR in the OGD/R group were greatly decreased ($P < 0.05$). The contents of LDH, MDA, ROS, and Ca^{2+} mean fluorescence intensity, the number of autophagosomes, yellow fluorescent particles, and red fluorescent particles, and the levels of LC3-II/I, Beclin 1, and p-ERK1/2 were greatly increased ($P < 0.05$). Compared with the OGD/R group, SOD, GSH, and the levels of p62 and p-mTOR in the lupinol group were greatly increased; the LDH, MDA, ROS, Ca^{2+} mean fluorescence intensity, the number of autophagosomes, yellow fluorescent particles, red fluorescent particles, and levels of LC3-II/I, Beclin 1 and p-ERK1/2 were greatly decreased ($P < 0.05$). The MAPK activator TBHQ reversed the negative effects of lupinol on OGD/R hippocampal neurons. **Conclusion** Lupinol inhibits OGD/R-induced neuronal autophagy by regulating the MAPK/ERK/mTOR signaling pathway and protects rat hippocampal neurons.

【Key words】 Lupinol Neurons MAPK/ERK/mTOR signaling pathway OGD/R Autophagy

脑卒中又称中风,是由血液突然阻塞或血管破裂引起的临床常见及多发病,可分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中占主导^[1]。脑缺血再灌注损伤(Cerebral ischemia-reperfusion, CIR)是一种缺血性脑卒中后的氧化应激相关的损伤,可能导致衰弱后遗症包括失语、偏瘫和痴呆^[2-3]。为制定有效的缺血性脑卒中预防、治疗和预后策略,需要确定安全有效的药物或天然物质,并充分了解CIR的病理机制。羽扇豆醇是一种在羽扇豆中发现的三萜类化合物,具有抗炎、心脏保护、抗肿瘤以及抗脑血管疾病的作用^[4]。Zhang等^[5]建立大鼠大脑中动脉栓塞/再灌注(Middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)模型,发现羽扇豆醇治疗可显著减少MCAO/R模型大鼠的脑梗死体积和含水量,并通过下调氧化应激和炎症因子的表达对脑组织发挥保护作用。据报道,自噬与缺血性脑损伤密切相关^[6]。朱波等^[7]研究发现,丹参酮II A可通过抑制自噬来改善大鼠缺血缺氧脑损伤。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是自噬的核心调节因

子,受有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路的调控,MAPK/ERK信号通路激活mTOR可以抑制过度自噬^[8]。然而,对羽扇豆醇是否能通过调节MAPK/ERK/mTOR信号通路来影响氧糖剥夺/复氧(OGD/R)诱导的神经元自噬尚未了解,因此本研究建立体外OGD/R神经元损伤模型,探讨羽扇豆醇调节MAPK/ERK/mTOR信号通路对OGD/R诱导的神经元自噬的影响。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

羽扇豆醇(PB1171)和钙离子荧光探针 Fluo-3 AM(PC0973)购自北京普非生物科技有限公司;杜氏改良 Eagle 培养基:营养培养基 F-12(Dulbecco's modified eagle medium; Nutrient mixture F12)(PM150312B)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS, 10099141)购自GIBCO公司;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(A020-2-2)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(A003-1-2)、超氧化

物歧化酶(SOD)测定试剂盒(A001-3-2)、还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒(A005-1-2)购自南京建成生物工程研究所;DCFH-DA 活性氧(ROS)荧光探针(D6470)、连接素 V-异硫氰酸酯荧光素/碘化丙啶(ANNEXIN V-fluorescein isothiocyanate/Propidium iodide, ANNEXIN V-FITC/PI)双染凋亡检测试剂盒(CA1020)和 MTT(M8180)购自北京索莱宝科技有限公司;抗体 LC3- I / II (ab128025), Beclin 1(ab207612)、选择性自噬接头蛋白 1(Sequestosome-1/SQSTM1, p62) (ab109012)、细胞外信号调节激酶 1/2(Extracellular signal-regulated kinases 1/2, ERK1/2) (ab184699)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR) (ab109268)、三磷酸-甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (ab8245)和二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔(ab288151)购自 ABCAM 公司;抗体 p-ERK1/2 (PA5-118516)和 p-mTOR(44-1125G)购自 Thermo Fisher 公司。

1.2 实验材料

无特定病原菌(Specific pathogen free, SPF)级大鼠,体重(200 ± 20)g,雌雄各 3 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号为 SYXK(京)2017-0033;将大鼠饲养在 12 h 昼夜循环,室温(22 ± 2)℃干净动物房中,雌雄大鼠交配,观察孕鼠阴栓计算胎龄。该研究得到了动物伦理委员会的批准。

当胎龄为(18 ± 0.5)d 时处死怀孕大鼠,分离胎鼠,断头取脑并立即置于无菌含有平衡盐溶液的培养皿中,去除脑干和小脑,剥离脑膜,分离海马组织,胰蛋白酶消化 10 min 后终止消化,离心,使用含 10%胎牛血清、1%谷氨酰胺及双抗的 DMEM/F12 培养液重悬,培养于多聚赖氨酸包被的培养皿中,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养;24 h 后使用含 2% B27、1%谷氨酰胺以及 1%双抗的细胞维持液培养,再加入 40 μmol/L 5-氟-2'-脱氧尿嘧啶核苷,每 3 d 换培养液 1/3,待神经元基本发育成熟后实验。

1.3 神经元造模

将发育成熟的原代海马神经元使用无糖无血清的 DMEM 培养基培养,并置于 37℃、5% CO₂ 和 95% N₂ 的缺氧培养箱中 90 min,随后将培养基换成完全培养液,37℃细胞培养箱中正常培养进行复氧复糖 24 h,以建立神经元 OGD/R 损伤模型^[9]。

1.4 MTT 检测神经元的存活率

以正常培养的神经元作为 CON 组,构建 OGD/R模型的细胞进行糖氧剥夺 90 min 后换成完全培养液并添加不同水平的羽扇豆醇^[10](0、1、5、10、20、40、80 μmol/L),37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h,随后加入 20 μL MTT(5 mg/mL)溶液,37℃孵育 4 h,小心吸出上清液,加入 150 μL 二甲亚砜(Dimethylsulfoxide, DMSO),震荡 10 min 充分溶解结晶,酶标仪于 490 nm 检测吸光度(Optical density, OD)值,神经元存活率(%) = $(OD_{\text{实验}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.5 分组

将神经元随机分为 CON 组(常规培养)、OGD/R 组、羽扇豆醇组(OGD/R + 10 μmol/L 羽扇豆醇干预神经元 24 h)、TBHQ 组^[11](OGD/R + 10 μmol/L 羽扇豆醇 + 50 μmol/L MAPK 激活剂 TBHQ 共同干预 24 h)。

1.6 试剂盒法检测 LDH,MDA,SOD 及 GSH 水平

收集各组神经元培养上清液和神经元,严格按照说明书操作步骤检测神经元培养上清液中 LDH 水平以及神经元 MDA,SOD 及 GSH 水平。

1.7 DCFH-DA 探针法检测 ROS 水平

收集各组神经元,使用无血清的培养液稀释 DCFH-DA 探针使其终水平为 10 μmol/L,向各组神经元中加入稀释后的探针避光 37℃孵育 30 min,磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS)洗涤后流式细胞仪检测 ROS 水平。

1.8 Fluo-3/AM 探针法检测 Ca²⁺ 水平

收集各组神经元,加入 5 μmol/L 的聚氧乙烯-聚氧丙烯醚嵌段共聚物(Pluronic F-127, PF-127)及 Fluo-3/AM 荧光探针在 37℃条件下孵育 50 min,激光共聚焦显微镜观察,并检测荧光强度。

1.9 流式细胞术检测神经元凋亡情况

收集各组神经元,PBS 洗涤后重悬神经元,加入 5 μL Annexin V-FITC 室温避光孵育 5 min 后加入 5 μL PI 染液室温避光孵育 10 min,加入 PBS 至 500 μL,立刻使用流式细胞仪检测,分析神经元凋亡率。

1.10 透射电镜观察神经元自噬情况

收集各组神经元,在 4℃下使用 2.5%戊二醛固定 2 h,洗涤后使用梯度浓度乙醇脱水,脱水后的神经元使用环氧树脂包埋、切片,然后使用 2%的乙酸双氧铀复染 20 min,使用透射显微镜观察自噬小体

数量并拍照。

1.11 自噬双标记腺病毒(Red fluorescent protein-green fluorescent protein-microtubule-associated protein 1 light chain 3,mRFP-GFP-LC3B)检测神经元自噬流

将 mRFP-GFP-LC3B 腺病毒转染至各组神经元 24 h 后使用荧光显微镜观察,并计数神经元中 GFP-LC3B 斑点。

1.12 Western blot 检测

取各组神经元加入 RIPA 裂解液(RIPA Lysis Buffer)提取神经元总蛋白,二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid,BCA)法检测总蛋白水平。各蛋白样品使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)电泳后转膜,5%脱脂牛奶室温孵育 2 h,洗涤 2 次后分别加入一抗 LC3- I / II 、p62、Beclin 1,ERK1/2,p-ERK1/2,mTOR,p-mTOR 和 GAPDH,在 4℃下孵育 12 h,洗涤后加入二抗室温孵育 1 h,再次洗涤后使用电化学发光(Electrochemiluminescence,ECL)法检测蛋白条带,Image J 软件评估蛋白的灰度值。

1.13 统计学处理

采用 SPSS 25.0;实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(ANOVA)进行多组间均数比较,2 组比较使用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 羽扇豆醇对 OGD/R 损伤大鼠神经元存活率的影响

与 CON 组比较,0 μmol/L 羽扇豆醇组神经元存活率显著降低($P < 0.05$);与 0 μmol/L 羽扇豆醇组比较,5、10、20、40 μmol/L 羽扇豆醇均能提高神经元存活率($P < 0.05$),但 10 μmol/L 羽扇豆醇组神经元存活率最高,故选取 10 μmol/L 羽扇豆醇水平进行后续实验(表 1)。

2.2 各组神经元培养上清液 LDH 水平及神经元中 MDA,SOD 及 GSH 水平

与 CON 组比较,OGD/R 组 LDH 和 MDA 水平显著上升($P < 0.05$),SOD 和 GSH 水平显著降低($P < 0.05$);与 OGD/R 组比较,羽扇豆醇组 LDH 和 MDA 水平显著降低($P < 0.05$),SOD 和 GSH 水平显著上升($P < 0.05$);与羽扇豆醇组比较,TBHQ

组 LDH 和 MDA 水平显著上升($P < 0.05$),SOD 和 GSH 水平显著降低($P < 0.05$)(表 2)。

表 1 羽扇豆醇对 OGD/R 损伤大鼠神经元存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6, \%$)

组别	神经元存活率
CON 组	99.11 ± 2.73
0 μmol/L 羽扇豆醇组	51.39 ± 2.12 [*]
1 μmol/L 羽扇豆醇组	54.22 ± 1.86
5 μmol/L 羽扇豆醇组	67.17 ± 2.36 [△] [#]
10 μmol/L 羽扇豆醇组	79.24 ± 2.55 [△] [▲]
20 μmol/L 羽扇豆醇组	73.99 ± 2.17 [△] [▲] [▽]
40 μmol/L 羽扇豆醇组	62.05 ± 1.69 [△] [▲] [▽] [▼]
80 μmol/L 羽扇豆醇组	53.27 ± 2.99 [△] [▲] [▽] [▼] [○]

注:与 CON 组比较,* $P < 0.05$;与 0 μmol/L 羽扇豆醇组比较,△ $P < 0.05$;与 1 μmol/L 羽扇豆醇组比较,[#] $P < 0.05$;与 5 μmol/L 羽扇豆醇组比较,▲ $P < 0.05$;与 10 μmol/L 羽扇豆醇组比较,▽ $P < 0.05$;与 20 μmol/L 羽扇豆醇组比较,▼ $P < 0.05$;与 40 μmol/L 羽扇豆醇组比较,○ $P < 0.05$

表 2 各组神经元培养上清液 LDH 水平及神经元中 MDA,SOD 及 GSH 水平($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	LDH(U/L)	MDA(nmol/mL)	SOD(U/mL)	GSH(U)
CON 组	82.43 ± 5.22	2.50 ± 0.21	39.76 ± 1.21	4.92 ± 0.19
OGD/R 组	167.26 ± 4.63 [*]	4.17 ± 0.13 [*]	15.11 ± 1.06 [*]	2.06 ± 0.11 [*]
羽扇豆醇组	101.33 ± 5.62 [△]	2.72 ± 0.13 [△]	33.92 ± 1.92 [△]	3.71 ± 0.22 [△]
TBHQ 组	130.57 ± 4.07 [#]	3.22 ± 0.29 [#]	22.14 ± 2.02 [#]	2.92 ± 0.13 [#]

注:与 CON 组比较,* $P < 0.05$;与 OGD/R 组比较,△ $P < 0.05$;与羽扇豆醇组比较,[#] $P < 0.05$

2.3 各组神经元 ROS 和 Ca²⁺ 水平

与 CON 组比较,OGD/R 组神经元 ROS 水平和 Ca²⁺ 平均荧光强度显著上升($P < 0.05$);与 OGD/R 组比较,羽扇豆醇组神经元 ROS 水平和 Ca²⁺ 平均荧光强度显著降低($P < 0.05$);与羽扇豆醇组比较,TBHQ 组神经元 ROS 水平和 Ca²⁺ 平均荧光强度显著上升($P < 0.05$)(图 1~2 和表 3)。

表 3 各组神经元 ROS 和 Ca²⁺ 水平($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	ROS 水平(%)	Ca ²⁺ 平均荧光强度
CON 组	22.14 ± 2.22	13.33 ± 1.25
OGD/R 组	64.32 ± 4.09 [*]	42.50 ± 1.96 [*]
羽扇豆醇组	38.07 ± 3.19 [△]	24.17 ± 2.55 [△]
TBHQ 组	49.17 ± 2.32 [#]	32.50 ± 1.38 [#]

注:与 CON 组比较,* $P < 0.05$;与 OGD/R 组比较,△ $P < 0.05$;与羽扇豆醇组比较,[#] $P < 0.05$

2.4 各组神经元凋亡率

与 CON 组比较,OGD/R 组神经元凋亡率显著上升($P < 0.05$);与 OGD/R 组比较,羽扇豆醇组神经元凋亡率显著降低($P < 0.05$);与羽扇豆醇组比

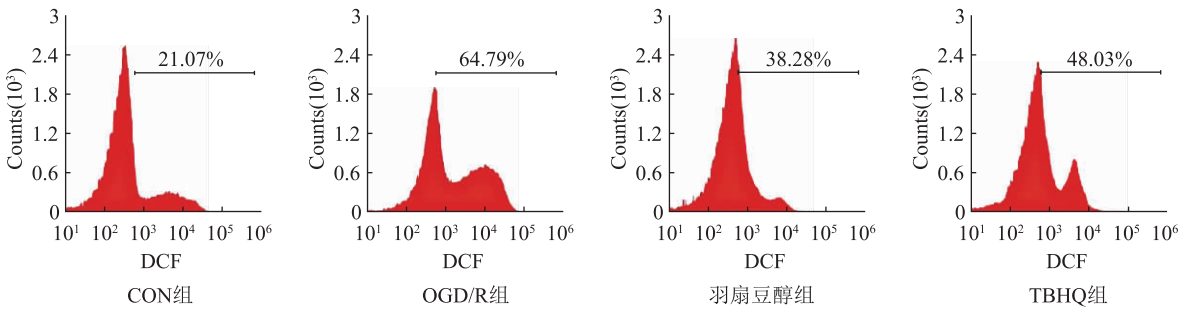


图 1 各组神经元 ROS 表达水平

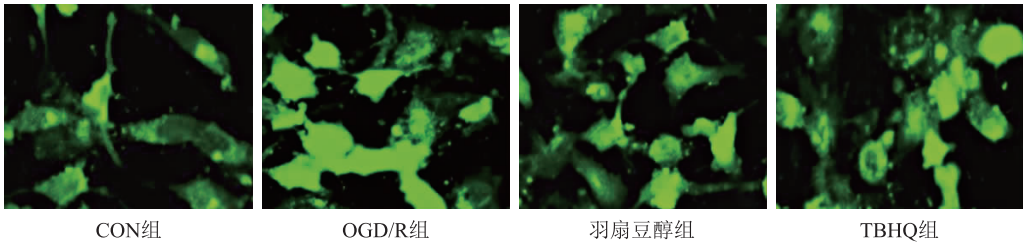


图 2 各组神经元 Ca²⁺ 表达水平(×1000 倍)

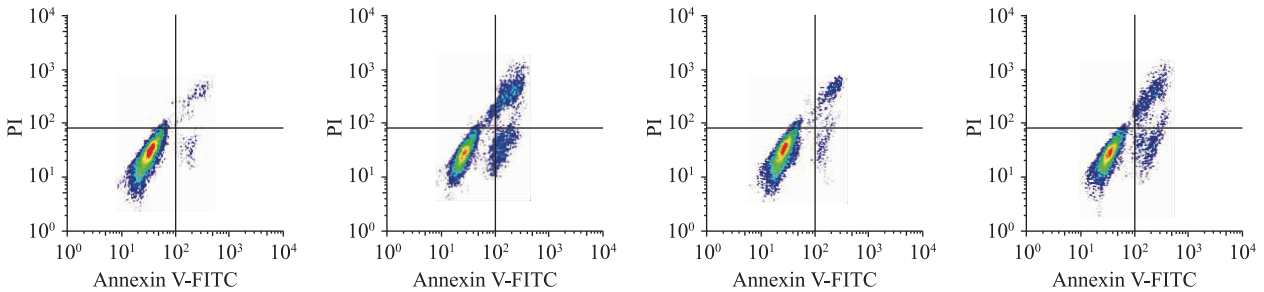


图 3 各组神经元凋亡率

较,TBHQ 组神经元凋亡率显著上升($P<0.05$)(图 3 和表 4)。

表 4 各组神经元凋亡率($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)	
组别	凋亡率
CON 组	4.17 ± 0.09
OGD/R 组	36.72 ± 1.95*
羽扇豆醇高剂量组	11.92 ± 1.22 Δ
TBHQ 组	24.75 ± 1.39 $\#$

注:与 CON 组比较,* $P<0.05$;与 OGD/R 组比较, $\Delta P<0.05$;与羽扇豆醇组比较, $\# P<0.05$

2.5 各组神经元自噬情况

与 CON 组比较,OGD/R 组神经元自噬小体个数、黄色荧光颗粒和红色荧光颗粒显著上升($P<0.05$);与 OGD/R 组比较,羽扇豆醇组神经元自噬小体个数、黄色荧光颗粒和红色荧光颗粒显著降低($P<0.05$);与羽扇豆醇组比较,TBHQ 组神经元自噬小体个数、黄色荧光颗粒和红色荧光颗粒显著上升($P<0.05$)(图 4~5 和表 5)。

表 5 各组神经元自噬情况($\bar{x} \pm s, n=6, \text{个}$)			
组别	自噬小体	黄色荧光颗粒	红色荧光颗粒
CON 组	26.67 ± 2.12	13.33 ± 1.06	36.33 ± 2.52
OGD/R 组	54.17 ± 2.75*	28.33 ± 1.67*	59.17 ± 2.69*
羽扇豆醇组	34.17 ± 2.03 Δ	15.67 ± 1.03 Δ	41.83 ± 2.09 Δ
TBHQ 组	45.33 ± 2.22 $\#$	22.17 ± 1.22 $\#$	50.67 ± 1.66 $\#$

注:与 CON 组比较,* $P<0.05$;与 OGD/R 组比较, $\Delta P<0.05$;与羽扇豆醇组比较, $\# P<0.05$

2.6 各组神经元 LC3-II / I ,p62、Beclin 1,ERK1/2,p-ERK1/2,mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达水平

与 CON 组比较,OGD/R 组神经元 LC3-II/I,Bec- lin 1,p-ERK1/2 表达水平显著上升($P<0.05$),p62 和 p-mTOR 表达水平显著下降($P<0.05$);与 OGD/ R 组比较,羽扇豆醇组神经元 LC3-II/I,Beclin 1,p- ERK1/2 表达水平显著降低($P<0.05$),p62 和 p- mTOR 表达水平显著升高($P<0.05$);与羽扇豆醇组 比较,TBHQ 组神经元 LC3-II/I,Beclin 1,p-ERK1/2 表达水平显著上升($P<0.05$),p62 和 p-mTOR 表达 水平显著下降($P<0.05$)(图 6 和表 6)。

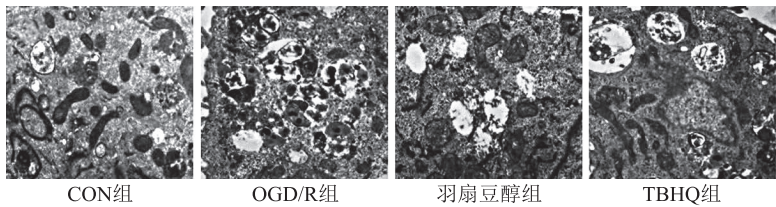


图4 各组神经元自噬小体情况(×8000 倍)

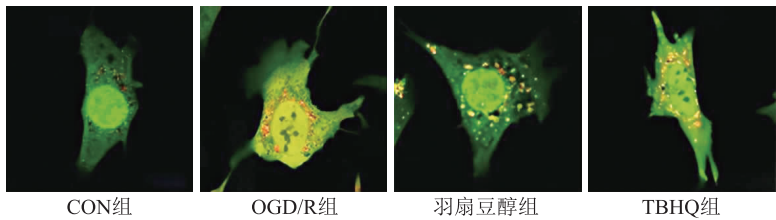


图5 各组神经元自噬流情况(×1000 倍)

表6 各组神经元 LC3-Ⅱ / Ⅰ ,p62,Beclin 1,ERK1/2, p-ERK1/2,mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	LC3-Ⅱ / Ⅰ	p62/GAPDH	Beclin 1 / GAPDH	p-ERK1/2 / ERK1/2	p-mTOR / mTOR
A	0.32 ± 0.04	1.41 ± 0.12	0.48 ± 0.05	0.35 ± 0.02	0.89 ± 0.07
B	0.79 ± 0.09*	0.72 ± 0.06*	1.29 ± 0.13*	0.92 ± 0.06*	0.44 ± 0.01*
C	0.55 ± 0.02△	1.31 ± 0.11△	0.65 ± 0.06△	0.42 ± 0.04△	0.72 ± 0.06△
D	0.67 ± 0.03#	1.06 ± 0.10#	0.92 ± 0.05#	0.65 ± 0.07#	0.59 ± 0.08#

注:A为CON组;B为OGD/R组;C为羽扇豆醇组;D为TBHQ组;与CON组比较,* $P < 0.05$;与OGD/R组比较,△ $P < 0.05$;与羽扇豆醇组比较,# $P < 0.05$

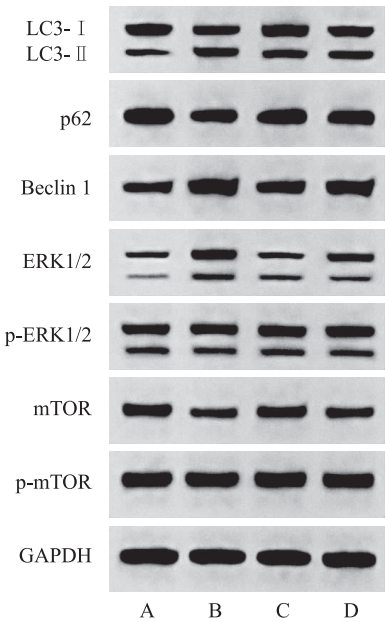


图6 各组神经元 LC3-Ⅱ / Ⅰ ,p62,Beclin 1,ERK1/2, p-ERK1/2,mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达水平 A 为 CON 组;B 为 OGD/R 组;C 为羽扇豆醇组;D 为 TBHQ 组

3 讨论

缺血性脑卒中作为一种急性脑血管疾病,由于

大脑的动脉血液供应减少或完全阻塞导致氧气和葡萄糖被剥夺,引起脑缺血而导致某些特定脆弱区域(例如海马体)神经元死亡^[12]。缺血性脑卒中标准治疗是梗死后短时间内恢复缺血区域的血液灌注。脑缺血后的再灌注阶段容易产生自由基、氧化应激、兴奋性氨基酸毒性和神经元内钙超载等造成神经元损伤和死亡,这种现象被称为 CIR^[13]。本研究通过建立 OGD/R 损伤模型,发现 OGD/R 组神经元存活率、SOD 水平、GSH 水平以及 p62 蛋白水平较 CON 组明显下降,而 LDH,MDA 水平、ROS 水平、Ca²⁺ 平均荧光强度、凋亡率、自噬小体个数以及 LC3-Ⅱ / Ⅰ ,Beclin 1, p-ERK1/2, p-mTOR 蛋白表达水平均明显升高,表明 OGD/R 建模成功。

羽扇豆醇是羽扇豆烷型五环三萜之一,具有广泛的生物活性如抗氧化、抗炎、抗血管疾病、抗诱变等^[14]。Wang 等^[15]也研究发现羽扇豆醇可显著增加大鼠脑缺血再灌注后的脑血流量,减少脑含水量和梗死面积,并降低神经功能评分;可通过 PI3K/Akt 信号通路来减轻大鼠脑缺血再灌注后的神经元损伤,具有显著的神经保护作用。本研究结果发现羽扇豆醇可升高 OGD/R 模型大鼠海马神经元存活率、SOD,GSH 水平,降低神经元 LDH,MDA,ROS 水平、Ca²⁺ 平均荧光强度、凋亡率,表明羽扇豆醇可改善 OGD/R 诱导的大鼠海马神经元损伤。

自噬是所有真核生物中高度保守的神经元降解和回收过程。有研究表明,在再灌注后期会发生过度自噬而使功能正常的神经元细胞器和蛋白质过度降解,最终导致自噬性神经元死亡和继发性损伤^[16]。已有研究表明,CIR 可激活自噬相关蛋白 LC3 来诱导

自噬体形成^[17]。还有研究表明,敲低 Beclin-1 或 LC3-II 可显著抑制自噬。此外,LC3-II 还通过与 p62 的 C 端结合参与自噬^[18]。Li 等^[18]建立 PC12 神经元 OGD/R 模型和大鼠 CIR 模型,结果发现成熟的神经生长因子可通过调节 PI3K/Akt/mTOR 和 ERK 通路来抑制体内外自噬和神经元凋亡。本研究结果显示,用羽扇豆醇处理减少了大鼠海马神经元自噬以及 LC3-II/I 和 Beclin 1 的表达,升高 p62 的表达水平,表明羽扇豆醇处理对 OGD/R 诱导的大鼠海马神经元自噬具有抑制作用。mTOR 的抑制是已知的激活自噬最典型的信号通路,MAPK/ERK/mTOR 通路已被确定参与自噬调节^[19]。mTOR 在上游信号 MAPK 激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MEK)/ERK 刺激后调节自噬和神经元活动,ERK 激活促进 mTOR 复合物分解,进而增强神经元自噬^[20]。Xu 等^[21]建立大鼠 OGD/R 模型和 MCAO 模型,发现食欲素 A (Orexin A) 通过调节 MAPK/ERK/mTOR 通路来抑制过度激活的自噬,减少神经元凋亡,在体内外发挥神经保护作用。本研究结果表明羽扇豆醇可以通过降低大鼠海马神经元 p-ERK1/2 蛋白的表达水平,升高 p-mTOR 蛋白表达来抑制 OGD/R 诱导的大鼠海马神经元的自噬作用。MAPK 激动剂 TBHQ 逆转了羽扇豆醇对 OGD/R 诱导的大鼠海马神经元的自噬抑制作用。

综上所述,羽扇豆醇可以通过调节 MAPK/ERK/mTOR 通路来抑制 OGD/R 诱导的大鼠海马神经元自噬,从而起到神经元保护作用。但本研究仅仅从体外神经元层面探讨羽扇豆醇对海马神经元损伤的保护作用,后续将从体内实验进行更深层次的研究。

参 考 文 献

- [1] Li JX, Bu YJ, Li B, et al. Calenduloid E alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by preserving mitochondrial function[J]. *J Mol Histol*, 2022, 53(4): 713-727.
- [2] Wang MM, Yu JY, Yang Q, et al. Beta-Boswellic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury via the protein kinase C epsilon/nuclear factor erythroid 2-like 2/Heme oxygenase-1 pathway[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(7): 4242-4256.
- [3] Sun X, Li X, Ma S, et al. MicroRNA-98-5p ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation(OGD/R)-induced neuronal injury by inhibiting Bach1 and promoting Nrf2/ARE signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 507(1/4): 114-121.
- [4] Fontana G, Badalamenti N, Bruno M, et al. Synthesis, in vitro and in silico analysis of new oleanolic acid and lupeol derivatives against leukemia cell lines; involvement of the NF- κ B pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6594.
- [5] Zhang ZY, Xu CF, Hao JH, et al. Beneficial Consequences of lupeol on middle cerebral artery-induced cerebral ischemia in

- the rat involves Nrf2 and P38 MAPK modulation[J]. *Metab Brain Dis*, 2020, 35(5): 841-848.
- [6] Hua Y, Zhai Y, Wang G, et al. Tong-Qiao-Huo-Xue decoction activates PI3K/Akt/mTOR pathway to reduce BMECs autophagy after cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 31: 115585.
- [7] 朱波,杨艳,苏仁意,等.丹参酮 II A 注射液对缺血缺氧性脑损伤新生大鼠皮质神经元自噬及 Akt-mTOR 通路的影响[J]. *中国中医急症*, 2019, 28(2): 204-208.
- [8] Ba L, Gao J, Chen Y, et al. Allicin attenuates pathological cardiac hypertrophy by inhibiting autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK/mTOR signaling pathways[J]. *Phytomedicine*, 2019, 58: 152765.
- [9] 王佳楠,黄春霞,胡宪文.七氟烷后处理对原代海马神经元氧糖剥夺/复氧损伤及自噬的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(5): 673-678.
- [10] Saha S, Profumo E, Togna AR, et al. Lupeol counteracts the proinflammatory signalling triggered in macrophages by 7-ke-to-cholesterol: new perspectives in the therapy of atherosclerosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 1232816.
- [11] Hu H, Dong Z, Wang X, et al. Dehydrocorydaline inhibits cell proliferation, migration and invasion via suppressing MEK1/2-ERK1/2 cascade in melanoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 5163-5175.
- [12] Cao Y, Zhang L, Sun S, et al. Neuroprotective effects of syringic acid against OGD/R-induced injury in cultured hippocampal neuronal cells[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(2): 567-573.
- [13] Rao J, Wu Y, Fan X, et al. Facilitating mitophagy via pink1/parkin2 signaling is essential for the neuroprotective effect of β -Caryophyllene against CIR-Induced neuronal injury[J]. *Brain Sci*, 2022, 12(7): 868.
- [14] Ha LE, Kim MJ. Alleviating effects of lupeol on postprandial hyperglycemia in diabetic mice [J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2021, 10(3): 495-500.
- [15] Wang Z, Han Y, Tian S, et al. Lupeol Alleviates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Correlation with Modulation of PI3K/Akt Pathway[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 16: 1381-1390.
- [16] Mei ZG, Huang YG, Feng ZT, et al. Electroacupuncture ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the SIRT1-FOXO1 signaling pathway[J]. *Ag-ing (Albany NY)*, 2020, 12(13): 13187-13205.
- [17] 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[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 3339-3344.
- [18] Li Y, Wu F, Zhou M, et al. ProNGF/NGF modulates autophagy and apoptosis through PI3K/Akt/mTOR and ERK signaling pathways following cerebral ischemia-reperfusion in Rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 6098191.
- [19] Ni Y, Wu S, Wang X, et al. Cucurbitacin I induces pro-death autophagy in A549 cells via the ERK-mTOR-STAT3 signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7): 6104-6112.
- [20] Wang Y, Ni Q, Ye Q, et al. Tanshinone IIA activates autophagy to reduce liver ischemia-reperfusion injury by MEK/ERK/mTOR pathway[J]. *Pharmazie*, 2018, 73(7): 396-401.
- [21] Xu D, Kong T, Zhang S, et al. Orexin-A protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy through OX1R-mediated MAPK/ERK/mTOR pathway [J]. *Cell Signal*, 2021, 9: 109839.