· 基础研究 ·

成对关联刺激对脑梗死大鼠神经元自噬的影响

鲁银山[1,2]　张秀娟[1,3]　郭铁成[1]　胡艳[1,4]　张香玉[1,5]　张松[1]

[1]华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科, 武汉　430030; [2]武汉大学人民医院康复医学科, 武汉　430060; [3]成都市第二人民医院康复医学科,成都　610011; [4]武汉大学中南医院康复医学科,武汉　430071; [5]郑州大学第五附属医院康复医学科,郑州　470000

通信作者:郭铁成,Email:pmr@ tjh.tjmu.edu.cn

【摘要】 **目的**　观察成对关联刺激(PAS)对脑梗死大鼠神经功能损伤恢复的影响,并从神经元自噬的角度探讨其作用机制。**方法**　健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 60 只,随机选取 20 只纳入假手术组($n=20$),另 40 只大鼠采用经典线栓法制作右侧大脑中动脉栓塞(MCAO)模型,并按随机数字表法分为模型组和治疗组(各 20 只)。治疗组自术后 1 d 起进行为期 14 d 的 PAS 治疗,模型组和假手术组不给予任何干预。分别于术后第 1、7 和 14 天,对各组大鼠进行改良神经功能缺损程度量表(mNSS)评分和提尾试验(EBST)评分;于术后第 7 天和第 14 天的治疗结束后行脑组织取材, 以 Western blot 法检测缺血半暗带区 LC3Ⅰ、LC3Ⅱ、Beclin 1 和 Cathepsin B 蛋白含量;免疫荧光双重染色法观察缺血半暗带区 LC3 与 NeuN 的共表达情况。**结果**　①术后第 7 天和第 14 天,模型组和治疗组的 mNSS 和 EBST 评分均高于假手术组($P<0.05$),而治疗组 mNSS 和 EBST 评分均低于同时间点模型组($P<0.05$),且治疗组术后第 14 天的 mNSS 评分低于术后第 7 天($P<0.05$);②术后第 7 天和第 14 天,治疗组和模型组的 LC3Ⅱ/Ⅰ比值均较假手术组高($P<0.01$),且治疗组的 LC3Ⅱ/Ⅰ比值较同时间点模型组低($P<0.05$);模型组和治疗组的 Beclin 1 蛋白含量较假手术组高($P<0.01$),而治疗组 Beclin 1 蛋白含量在术后第 7 天和 14 天均较同时间点模型组低($P=0.229$,$P<0.01$);模型组 Cathepsin B 含量较假手术组高($P<0.05$),治疗组 Cathepsin B 含量亦较假手术组高(第 7 天时 $P<0.05$,第 14 天时 $P=0.059$);术后第 14 天治疗组的 Cathepsin B 含量较同时间点模型组低($P<0.01$);③模型组和治疗组缺血半暗带区的 LC3 阳性细胞数均较同时间点假手术组显著增加($P<0.01$),且治疗组较同时间点模型组减少($P<0.05$);模型组和治疗组 LC3 阳性表达的神经元数量与神经元总数量的比值均较同时间点假手术组显著增加($P<0.01$),且治疗组较同时间点模型组减少($P<0.05$)。**结论**　PAS 治疗可抑制脑梗死大鼠缺血半暗带区神经元的自噬活性,促进大鼠脑梗死后神经功能损伤的恢复。

【关键词】 脑梗死;　成对关联刺激;　神经元自噬

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81272156)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2020.02.003

Paired associative stimulation improves recovery of neurological function after cerebral infarction through modulating neuronal autophagy

Lu Yinshan[1,2], Zhang Xiujuan[1,3], Guo Tiecheng[1], Hu Yan[1,4], Zhang Xiangyu[1,5], Zhang Song[1]

[1]Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; [2]Department of Rehabilitation Medicine, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; [3]Department of Rehabilitation Medicine, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu 610011, China; [4]Department of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China; [5]Department of Rehabilitation Medicine, The 5th Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 470000, China

Corresponding author: Guo Tiecheng, Email: pmr@ tjh.tjmu.edu.cn

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the effect of paired associative stimulation (PAS) on the recovery of neurological function after cerebral infarction, and to explore whether any such effect is associated with autophagy in the ischemic penumbra. **Methods**　Sixty adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a sham operation group ($n=20$) and an experimental group ($n=40$). The rats of the experimental group underwent 90 minutes of right middle cerebral artery occlusion (MCAO), while the sham group received a sham operation. The experimental group was subsequently divided into a model group ($n=20$) and a PAS group ($n=20$). The PAS group received 14

days of paired associative stimulation (PAS) beginning 24 hours after the operation. Neurological dysfunction was evaluated with a modified neurological severity scale (mNSS) and the elevated body swing test (EBST) on the 1st, 7th and 14th day after the MCAO. The rats were then euthanized and the expression of LC3Ⅰ, LC3Ⅱ, Beclin1, and Cathepsin B in the ischemic penumbra were detected using Western blotting, while the distribution of LC3 in neurons was detected using double immunofluorescent staining. **Results** Compared with the sham group, the average mNSS scores and EBST values of the model and PAS groups were both higher on the 7th and 14th day after the MCAO, with those of the PAS group significantly lower than those of the model group on those days. The average mNSS score on the 14th day was significantly lower than on the 7th day. Compared with the sham group, the average LC3Ⅱ/Ⅰ values, Beclin 1 and Cathepsin B levels of both the model group and the PAS group were significantly higher on the 7th and 14th day after the MCAO, with the LC3Ⅱ/Ⅰ values of the PAS group significantly lower than those of the model group at both time points. The PAS group also had significantly lower Beclin1 and Cathepsin B levels on day 14. On the 7th and 14th days after the MCAO, the average number of LC3-positive cells and the ratio of LC3-positive neurons to total neurons in the model and PAS groups were significantly greater than the those of sham group, with the PAS group′s values significantly lower than those of the model group at each time point. **Conclusion** PAS can significantly promote neurological recovery after stroke. The beneficial effects may involve inhibition of neuronal autophagy in the ischemic penumbra.

【Key words】 Cerebral infarction; Paired associative stimulation; Neuronal autophagy

Funding: Natural Science Foundation of China (81272156)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2020.02.003

脑卒中是一种高致残率的疾病,其遗留的各种功能障碍严重影响患者的生活质量和工作水平[1]。缺血性脑卒中(ischemic stroke)是主要的脑卒中类型之一[2]。研究表明,缺血所致神经细胞死亡的形式除凋亡(apoptosis)和坏死(necrosis)外,还有第三种类型的死亡,即自噬(autophagy),其在缺血性脑损伤中起着重要作用[3-4]。

自噬与神经元的存活密切相关。正常生理情况下,神经元的自噬维持在相对较低的水平,有利于维持内环境的稳态。脑缺血情况下,神经元自噬轻度激活,有助于促进蛋白质周转和能量的保留;而长时程、难以控制的高活性自噬会吞噬神经元胞质内的关键成分和生长因子,可加速神经元的死亡[4-6]。因此,调节神经元自噬水平,对于脑缺血性后神经元的存活以及神经功能康复具有重要意义。

近年来,成对关联刺激(paired associative stimulation, PAS)作为一种新兴的无创性脑卒中康复治疗手段受到了关注,其临床疗效亦较为肯定[7-9]。但其作用机制尚未明了。本课题组前期研究发现,PAS 可促进缺血性脑卒中大鼠缺血半暗带区脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)在基因水平的表达,增加神经生长因子的表达,减少细胞的凋亡,改善神经功能缺损[10-12];而 Smith 等[13]的研究表明,BDNF 可通过调节细胞的自噬活性以促进细胞的存活。据此,PAS 可能通过调节脑缺血后神经元的自噬水平发挥神经保护作用。

本研究以脑梗死大鼠为研究对象,观察 PAS 对脑梗死大鼠神经功能损伤恢复的影响,并检测 PAS 对大脑缺血半暗带区神经元自噬活性的影响,从神经元自噬的角度进一步探索 PAS 治疗脑卒中的作用机制。

材料与方法

一、实验动物及分组

健康雄性成年 Sprague-Dawley(SD)大鼠 60 只,体重 200~250 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,分笼饲养于华中科技大学同济医学院附属同济医院实验动物中心无特定病原体级环境,每天给予适量的食物和水。随机选取 20 只大鼠纳入假手术组($n=20$),另 40 只大鼠行右侧大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)制作脑缺血模型,并按随机数字表法分为模型组和治疗组,每组各 20 只。

二、主要仪器和材料

磁场刺激仪(CCY-Ⅳ型,武汉依瑞德医疗设备有限公司)、大鼠柔软型固定器(原上草医疗科技有限公司)、激光共聚焦显微镜(日本, Olympus, FV1000)、兔抗轻链 3(light chain 3, LC3)一抗(Abcam, ab48394; Proteintech, 14600-1-AP)、兔抗 Beclin1一抗(Abcam, ab207612)、兔抗组织蛋白酶 B 抗体(Cathepsin B)一抗(Bioss, bs-1500R)、小鼠抗 NeuN一抗(Abcam, ab104224)、小鼠单抗 β-actin(武汉博士德生物工程有限公司, BM0627)、驴抗兔二抗 Alexa Fluor 594(Proteintech, SA00006-8)、驴抗小鼠二抗异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)(Proteintech, SA00003-9)、Hoechst 3258

(Sigma, 17520)。

三、大鼠脑梗死模型的建立

参照 1989 年 Longa 等[14]提出的方法,用线栓阻塞大鼠右侧大脑中动脉以阻断脑组织血流供应,制作大鼠缺血性脑卒中模型,而假手术组除线栓不插入右侧颈总动脉外,其余手术操作与模型制作动物相同。MCAO 模型制作方法简述如下:10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射以麻醉大鼠,线栓插入、阻断大鼠右侧大脑中动脉 90 min 后缓慢拔出。手术完成后,将大鼠放入无菌鼠笼中,密切观察其状态。待各组大鼠完全苏醒后,对其进行 Longa 评分[14]以判断模型的制作是否成功。Longa 评分 1~3 分者纳入实验。剔除有蛛网膜下腔出血者或未到观察时间点死亡者。由上述因素导致的各实验组动物样本量不足预定数量者,根据随机抽样原则补齐样本量。

四、PAS 治疗方案

治疗组于造模后第 1 天开始接受 PAS 治疗(方案同参考文献[11-12,15]),共治疗 14 d;假手术组和模型组不给予任何干预。

1. 周围神经电刺激(peripheral nerve electrical stimulation, PNS):刺激左侧胫神经,采用环状电极,置于左后肢踝部,阴极与阳极间隔约 0.5 cm,电流强度为 6 mA,波形为方波,波宽 200 μs。

2. 经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation, TMS):采用磁场刺激仪,8 字形刺激线圈,直径 7 cm,最大输出强度为 6.0 T。刺激线圈中心部位置于最佳刺激点,即可以最小的刺激强度诱导出最大波幅的左侧腓肠肌运动诱发电位(motor evoked potential, MEP)的位点,约位于前囟右旁开 0.5 cm,同时线圈应与大鼠头皮呈切线位,即与矢状面呈 45°角。磁刺激强度为磁刺激仪最大输出强度的 42%,PNS 与 TMS 间的时间间隔(inter-stimulus interval, ISI)设置为 15 ms[15]。采用 2000 年 Stefan 提出的刺激频率和脉冲数[16],即刺激频率为 0.05 Hz,每次治疗共 90 个脉冲对,共 30 min。

五、神经功能评分

1.改良神经功能缺损程度量表(modified neurological severity scale, mNSS)评分:各组随机选取 10 只大鼠,分别于造模后第 1、7 和 14 天对各组大鼠进行 mNSS 评分,综合评估各组大鼠的运动功能、感觉功能、平衡功能、神经功能相关反射等[17]。

2.提尾试验(elevated body swing test, EBST):各组随机选取 10 只大鼠,分别于造模前 1 天及造模后第 1、7 和 14 天对各组大鼠进行提尾实验,该行为学评估反映脑损伤的单侧化(非对称性运动表现)[18]。具体评估方法:在距离鼠尾根部 1 cm 处将其提起,与一垂直轴平行,观察大鼠头部向左侧还是向右侧偏转(每次记录 30 s 内偏离垂直线 10°的偏离方向),共记录 10 次偏转,评分结果记为向左侧偏转的次数/总偏转次数×100%。

六、组织取材

1. 蛋白含量检测样本的取材:各组于术后第 7 天和第 14 天分别选取 5 只大鼠,于治疗结束 24 h 后行脑组织取材,腹腔注射 10%水合氯醛,麻醉后断头取脑,分离出右侧大脑前囟后 1~4 mm 处的梗死灶周边脑皮质,储存在-80 ℃冰箱里备用。

2. 免疫荧光检测样本的取材:各组于术后第 7 天和第 14 天分别选取 5 只大鼠,于治疗结束 24 h 后行脑组织取材,放入 4%多聚甲醛中进行后固定,根据大鼠脑部解剖图谱,切取前囟后 1~4 mm 处的脑组织,梯度脱水后进行包埋、切片,切片厚度为 20 μm,置于-20 ℃冰箱备用。

七、Western blot 检测

将冰箱中保存的新鲜冰冻脑组织与 RIPA 裂解液混合后进行匀浆、离心、提取总蛋白液、测定蛋白浓度,各样品取 40 μg 蛋白量上样行电泳分离,各蛋白转膜条件为 LC3(200 mA, 50 min)、Beclin1(200 mA, 120 min)、β-actin 和 Cathepsin B(200 mA,90 min),使用含有 5%脱脂奶粉的洗膜缓冲液(tris buffered saline tween, TBST)浸泡聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,室温摇床封闭 2 h 后,加入一抗 LC3(1∶1000)、Beclin1(1∶2000)、β-actin(1∶200)、Cathepsin B(1∶300),4 ℃孵育过夜后用 TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5~6 次,每次 5 min,加入相应的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(1∶50000),于 37 ℃孵育 2 h,TBST 充分洗涤 5~6 次,每次 5 min 后,行显色曝光,用凝胶分析软件(BandScan)分析胶片灰度值。

八、免疫荧光染色

取出已切好的脑片,每只大鼠随机选取一张脑片,用 0.01 M 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)(PH=7.4)漂洗 3 次,每次 10 min,用封闭液室温封闭 1 h 后,吸除封闭液,加一抗 LC3(1∶100)和一抗 NeuN(1∶100),4 ℃孵育过夜,PBS 漂洗后加二抗驴抗兔 Alexa Fluor 594(1∶50)和驴抗小鼠 FITC(1∶50),室温孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次,15 min/次,加 Hoechst(1∶1000)室温孵育 5 min 后漂洗 1 次后铺片、封片,激光共聚焦显微镜拍照;于 100 倍、200 倍和 400 倍下采集梗死灶周边的图像,分别采集 1 个、1 个和 3 个视野。用 Image ProPlus 6.0 对 400 倍图像中的 LC3 和 NeuN 阳性表达细胞进行计数。

九、统计学方法

使用 SPSS 23.0 版统计软件进行实验数据的统计学分析,计量资料用($\bar{x}\pm s$)表示,行为学数据采用重复测量方差分析(repeated measurement of variance analysis);多组间比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance,ANOVA),多组间一一对比采用最小显著差异法(least significant difference,LSD)。$P<0.05$为差异有统计学意义。

结　　果

一、PAS 治疗对脑梗死大鼠神经功能损伤恢复的影响

重复测量方差分析结果显示,时间与分组之间存在交互作用($F=229.8$,$P<0.01$),说明随着时间变化,神经功能有一定自然恢复的趋势。假手术组大鼠各时间点的神经功能表现均正常(表 1);术后第 1 天,模型组和治疗组的 mNSS 评分均显著高于假手术组($P<0.01$),模型组和治疗组之间差异无统计学意义($P=0.666$),说明 2 组间具有可比性;术后第 7 天和第 14 天,治疗组大鼠的 mNSS 评分显著低于模型组($P<0.05$);治疗组 MCAO 大鼠的组内术后各时间点神经功能损伤情况比较,第 7 天和第 14 天时的神经损伤程度明显低于术后第 1 天($P<0.05$),且术后第 14 天时比术后第 7 天时神经功能损伤恢复更佳($P<0.05$),如表 1 所示。

表 1　干预后不同时间点各组大鼠 mNSS 评分比较(分,$\bar{x}\pm s$)

组别	只数	术后 1 天时	术后 7 天时	术后 14 天时
假手术组	10	0	0	0
模型组	10	7.50±2.92[a]	7.20±2.15[a]	5.90±1.91[a]
治疗组	10	7.00±2.11[a]	4.90±1.91[abc]	3.10±1.10[abcd]

注:与假手术组同时间点比较,[a]$P<0.01$;与模型组同时间点比较,[b]$P<0.05$;与治疗组术后第 1 天比较,[c]$P<0.05$;与治疗组术后第 7 天比较,[d]$P<0.05$

重复测量方差分析结果显示,时间和分组之间存在交互作用($F=4352.739$,$P<0.01$)。术前各组间 EBST 评分差异均无统计学意义($P>0.05$);术后第 1 天,模型组和治疗组的 EBST 评分显著高于假手术组($P<0.01$),模型组和治疗组之间差异无统计学意义($P>0.05$);术后第 7 天和第 14 天,治疗组大鼠的 EBST 评分显著低于模型组($P<0.05$),治疗组组内各时间点比较,第 7 天和第 14 天时评分明显低于术后第 1 天($P<0.05$),如表 2 所示。

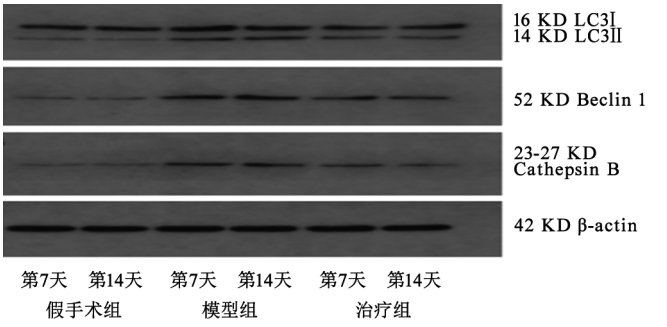
二、PAS 治疗对脑梗死大鼠缺血半暗带区自噬相关蛋白表达水平的影响

各组大鼠不同时间点缺血半暗带区自噬相关蛋白表达情况如图 1 所示。

表 2　干预前、后不同时间点各组大鼠 EBST 评分比较(%,$\bar{x}\pm s$)

组别	只数	术前	术后 1 天	术后 7 天	术后 14 天
假手术组	10	51.00±3.80	52.00±1.35	58.00±3.25	50.00±3.64
模型组	10	52.00±3.80	96.00±1.34[ab]	96.00±3.24[ab]	89.00±3.64[ab]
治疗组	10	55.00±3.80	99.00±1.35[ab]	75.00±3.25[abcd]	69.00±3.64[abcd]

注:与组内术前比较,[a]$P<0.01$;与假手术组同时间点比较,[b]$P<0.05$;与模型组同时间点比较,[c]$P<0.05$;与治疗组术后 1 天比较,[d]$P<0.05$



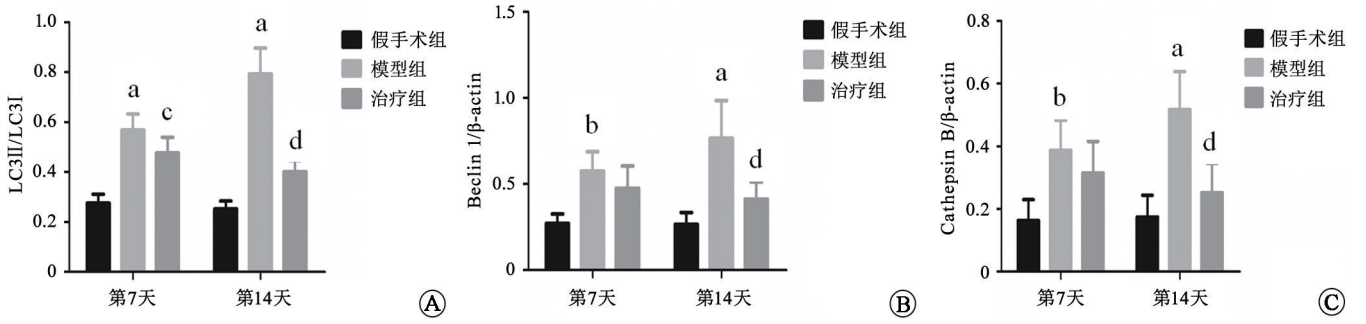
注:缺血半暗带区 LC3Ⅰ、LC3Ⅱ、Beclin 1、Cathepsin B 蛋白表达的代表条带

图 1　各组大鼠不同时间点缺血半暗带区自噬相关蛋白表达

术后第 7 天和第 14 天时,各组大鼠缺血半暗带区,LC3Ⅱ与 LC3Ⅰ含量比值(LC3Ⅱ/LC3Ⅰ)的比较,模型组和治疗组均较同时间点假手术组高($P<0.01$),且治疗组较同时间点模型组低,差异有统计学意义($P<0.05$),如图 2A 所示。术后第 7 天时,Beclin 1蛋白表达的相对含量比较,模型组和治疗组均较假手术组高($P<0.05$),且治疗组较同时间点模型组低,差异无统计学意义($P=0.229$);术后第 14 天时,治疗组较同时间点模型组低,且组间差异有统计学意义($P<0.01$),如图 2B 所示。术后第 7 天和第 14 天时,各组大鼠缺血半暗带区 Cathepsin B 蛋白表达的相对含量比较,模型组各时间点 Cathepsin B 含量均较假手术组高($P<0.05$),治疗组术后第 7 天和第 14 天时亦较假手术组高(第 7 天时$P<0.05$;第 14 天时 $P=0.059$);术后第 7 天时,治疗组的 Cathepsin B 含量较同时间点模型组低,差异无统计学意义($P=0.059$),但至术后第 14 天时,治疗组明显低于同时间点模型组,且差异有统计学意义($P<0.01$),如图 2C 所示。

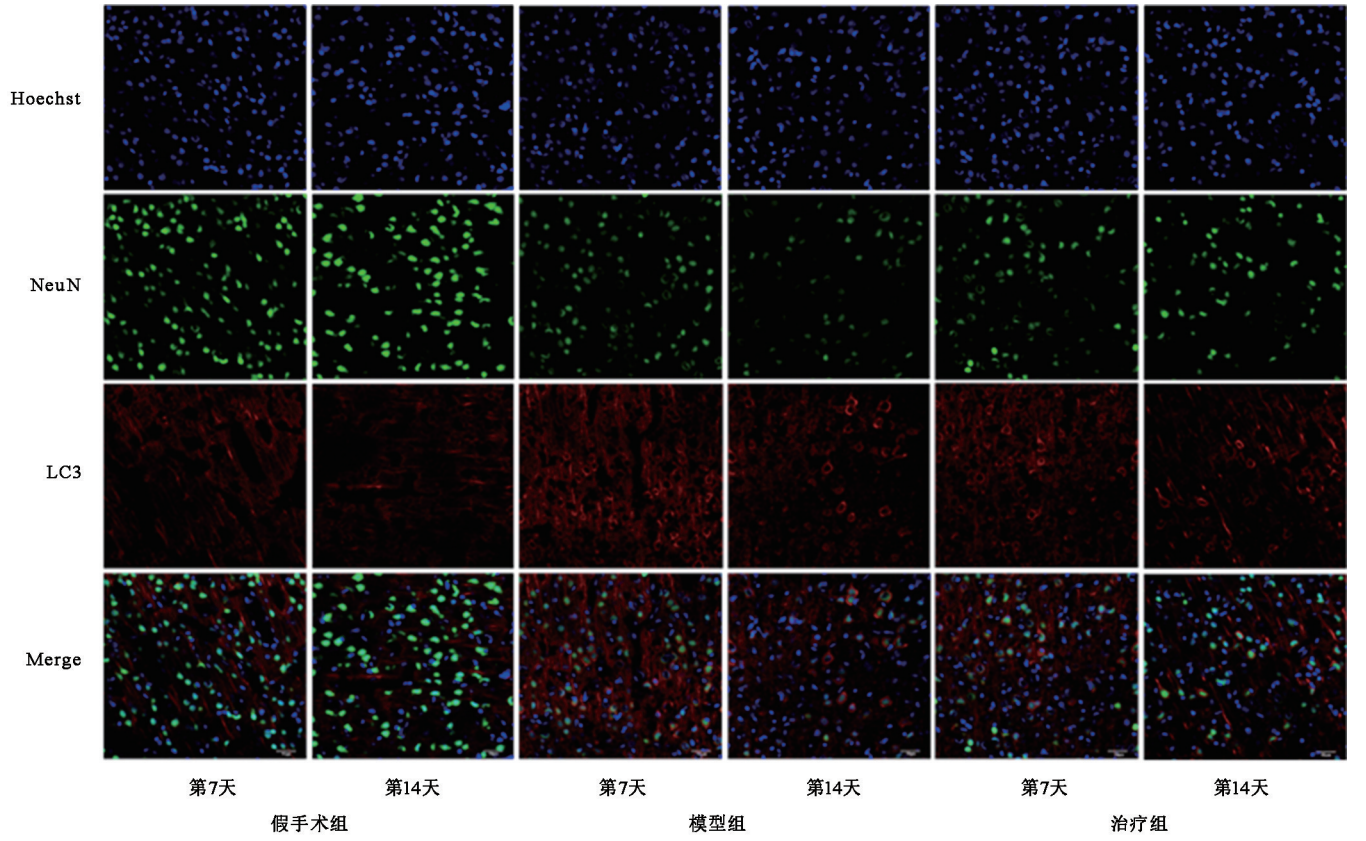
三、PAS 治疗对脑梗死大鼠缺血半暗带区神经元自噬水平的影响

采用 LC3 与 NeuN 免疫荧光双重染色的方法观察术后第 7 天和第 14 天各组大鼠脑组织缺血半暗带区神经元的自噬相关蛋白 LC3 的表达情况,即 LC3/NeuN/Hoechst 的共表达,代表图如图 3 所示。



注:图 A 为 LC3Ⅱ/Ⅰ比值的比较;图 B 为 Beclin 1 蛋白表达的相对含量比较;图 C 为 Cathepsin B 蛋白表达的相对含量比较;图中与假手术组同时间点比较,[a]$P<0.01$,[b]$P<0.05$;与模型组同时间点比较,[c]$P<0.05$,[d]$P<0.01$

图 2　各组大鼠不同时间点缺血半暗带区自噬相关蛋白表达



注:图中免疫荧光染色示 LC3 为红色荧光、NeuN 为绿色荧光、Hoechst 为蓝色荧光,Merge 为荧光合并

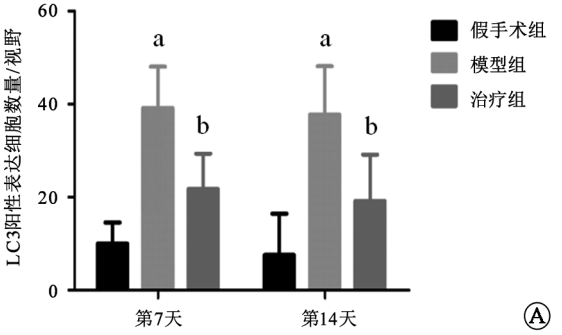
图 3　各组大鼠不同时间点缺血半暗带区 LC3/NeuN 免疫荧光双标染色代表图(×400)

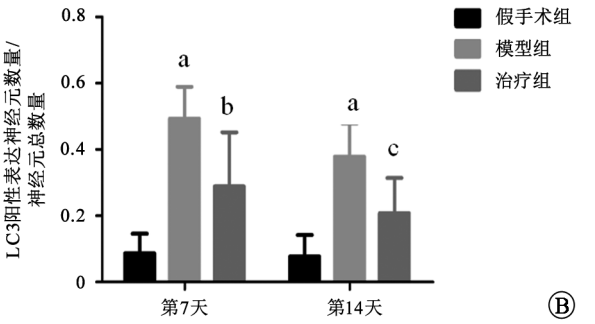
模型组和治疗组梗死灶周边皮质的 LC3 阳性细胞数均较同时间点假手术组显著增加($P<0.01$),且治疗组较同时间点模型组减少,差异有统计学意义($P<0.01$),如图 4A 所示;模型组和治疗组梗死灶周边皮质 LC3 阳性表达的神经元数量与神经元总数量的比值均较同时间点假手术组显著增加($P<0.01$),且治疗组均较同时间点模型组减少,差异有统计学意义(第 7 天时$P<0.01$;第 14 天时$P<0.05$),如图 4B 所示。

讨　论

本研究结果显示,PAS 对脑缺血性损伤后神经元的自噬活性具有调节作用,且有助于脑卒中后神经功能损伤的恢复。本研究中,采用的 PAS 干预参数与经典的临床研究保持一致[16],如此安排实验设计是期望使研究结果更加切合临床实际情况。

本研究采用 mNSS 和 EBST 对各实验组大鼠进行神经功能损伤评估,其可信度被普遍认可[17-18]。本研





注:图 A 为各组 LC3 免疫阳性表达细胞数量的比较(即 LC3/Hoechst 共阳性表达的细胞数量的比较);图 B 为各组 LC3 阳性表达的神经元数量与神经元总数量比值的比较(即 LC3/NeuN/Hoechst 与 NeuN/Hoechst 比值的比较);与同时间点假手术组比较,$^{a}P<0.01$;与同时间点模型组比较,$^{b}P<0.01$,$^{c}P<0.05$

图 4　各组大鼠不同时间点缺血半暗带区 LC3/NeuN 免疫荧光双标染色

究结果显示,治疗组大鼠的 mNSS 和 EBST 评分于术后第 7 天和第 14 天时均较模型组低,且治疗组第 14 天时较第 7 天时神经功能恢复更佳,这说明 PAS 的疗效有时间累积效应。上述结果再次验证了 PAS 干预对缺血性脑卒中后的神经功能损伤恢复有明显的促进作用。

脑缺血性损伤后,缺血区脑组织的自噬活性显著增强,调节自噬的活性是缺血性脑卒中治疗的一个新靶点[3,4,19]。目前,微管相关蛋白 LC3Ⅱ与 LC3Ⅰ是自噬评价和测定的公认指标,而自噬相关基因 Beclin 1 是自噬体形成的必需分子之一[20]。因此,本研究对各组大鼠皮质缺血半暗带区主要自噬相关蛋白 LC3Ⅰ、LC3Ⅱ、Beclin 1 的表达进行了检测。结果显示模型组较假手术组 LC3Ⅱ/Ⅰ比值和 Beclin 1 表达量明显增加,而 PAS 治疗明显降低了 LC3Ⅱ/Ⅰ比值、减少了 Beclin 1 的表达。该研究结果一方面再次证实了脑缺血性损伤可增加缺血脑组织的自噬水平,另一方面提示 PAS 干预可抑制缺血性脑卒中皮质缺血半暗带区的自噬激活。

然而,自噬水平的增加不能仅凭 LC3Ⅱ/Ⅰ、Beclin 1 的增加来断定,因为这两者的增加有可能是溶酶体活性降低导致的自噬体清除减慢、或者溶酶体-自噬体融合障碍造成的[3]。因此,本研究检测了各组大鼠缺血半暗带区溶酶体活性关键相关蛋白 Cathepsin B 的含量,结果显示模型组和治疗组第 7 天和第 14 天时缺血半暗带区的 Cathepsin B 含量均较假手术组明显增加,由此排除了溶酶体活性降低的可能。本研究还显示,第 14 天时治疗组的 Cathepsin B 含量较模型组低。鉴于有研究表明,抑制缺血性脑损伤后 Cathepsin B 的表达对脑损伤的恢复有一定的益处[21],因此抑制缺血性脑卒中后溶酶体的活性可能也是 PAS 治疗脑卒中的作用机制之一。

研究表明,脑缺血后,神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞等的自噬活性均会增强[22-23],而运动训练[24-25]、电针治疗[26]等均可通过抑制缺血性脑卒中后的自噬改善损伤个体的神经功能障碍。本研究主要探讨了 PAS 治疗对缺血性损伤后神经元自噬活性的影响。根据免疫染色结果,发现 PAS 治疗明显降低了缺血半暗带区神经元的自噬水平。因此,抑制缺血半暗带区神经元的自噬可能是 PAS 改善缺血性脑卒中后功能障碍的重要作用机制之一。

综上所述,PAS 干预可能通过抑制神经元的自噬活性发挥神经保护作用。至于 PAS 干预调节神经元自噬活性的作用机制,尚有待进一步探索。

参　考　文　献

[1] Wang W, Jiang B, Sun H, et al. Prevalence, incidence and mortality of stroke in China: results from a nationwide population-based survey of 480687 adults[J]. Circulation, 2017, 135(8): 759-771. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025250.

[2] Katan M, Luft A. Global burden of stroke[J]. Semin Neuro, 2018, 38(2): 208-211. DOI: 10.1055/s-0038-1649503.

[3] Sheng R, Qin ZH. The divergent roles of autophagy in ischemia and preconditioning[J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36(4): 411-420. DOI: 10.1038/aps.2014.151.

[4] Gabryel B, Kost A, Kasprowska D. Neuronal autophagy in cerebral ischemia--a potential target for neuroprotective strategies[J]. Pharmacol Rep, 2012, 64(1): 1-15. DOI: 10.1016/S1734-1140(12)70725-9.

[5] Yue Z, Wang QJ, Komatsu M. Neuronal autophagy: going the distance to the axon[J]. Autophagy, 2008, 4(1): 94-96. DOI: 10.4161/auto.5202.

[6] Wei K, Wang P, Miao CY. A double-edged sword with therapeutic potential: an updated role of autophagy in ischemic cerebral injury[J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(11): 879-886. DOI: 10.1111/cns.12005.

[7] Suppa A, Quartarone A, Siebner H, et al. The associative brain at work: evidence from paired associative stimulation studies in humans[J]. Clin Neurophysiol, 2017, 128(11): 2140-2164. DOI: 10.1016/j.clinph.2017.08.003.

[8] 随燕芳,宋振华,童良前,等.成对关联刺激对脑卒中患者上肢运

动功能恢复的影响及其与运动皮质兴奋性改变之间的相关性分析[J]. 中华物理医学与康复杂志,2013,35(9):703-707. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.09.008.

[9] Castel-Lacanal E, Marque P, Tardy J, et al. Induction of cortical plastic changes in wrist muscles by paired associative stimulation in the recovery phase of stroke patients[J]. Neurorehabil Neural Repair, 2009,23(4):366-372. DOI:10.1177/154596 8308322841.

[10] 张香玉,胡艳,郭铁成,等.成对关联刺激对脑梗死大鼠突触可塑性和神经元凋亡及脑源性神经营养因子的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2019,41(11):812-817. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.11.003.

[11] 胡艳,张香玉,鲁银山,等.成对关联刺激对脑缺血再灌注大鼠感觉运动功能和 MAP-2、GAP-43 表达的影响[J].中华物理医学与康复杂志,2018,40(10):733-739. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2018.10.003.

[12] 鲁银山,王杰,胡婷,等. 胫神经-M1 区成对关联刺激对缺血性脑卒中大鼠前肢功能障碍恢复的影响及其机制研究[J].中华物理医学与康复杂志,2018,40(11):801-808. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2018.11.001.

[13] Smith ED, Prieto GA, Tong L, et al. Rapamycin and interleukin-1β impair brain-derived neurotrophic factor-dependent neuron survival by modulating autophagy[J]. J Biol Chem, 2014, 289(30): 20615-20629. DOI:10.1074/jbc.M114.568659.

[14] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84-91. DOI:10.1161/01.STR.20.1.84.

[15] Zhang XY, Sui YF, Guo TC, et al. Effect of paired associative stimulation on motor cortex excitability in rats[J]. Curr Med Sci,2018,38(5):903-909. DOI:10.1007/s11596-018-1960-8.

[16] Stefan K, Kunesch E, Cohen LG, et al. Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation[J]. Brain, 2000,123(Pt 3):572-584. DOI:10.1093/brain/123.3.572.

[17] Ye R, Yang Q, Kong X, et al. Sevoflurane preconditioning improves mitochondrial function and long-term neurologic sequelae after transient cerebral ischemia[J]. Crit Care Med,2012,40(9):2685-2693. DOI:10.1097/CCM.0b013e318258fb90.

[18] Borlongan CV, Cahill DW, Sanberg PR. Locomotor and passive avoidance deficits following occlusion of the middle cerebral artery[J]. Physiol Behav, 1995, 58(5): 909-917. DOI: 10.1016/0031-9384(95)00103-P.

[19] Yang H, Li L, Zhou K, et al. Shengmai injection attenuates the cerebral ischemia/reperfusion induced autophagy via modulation of the AMPK, mTOR and JNK pathways[J]. Pharm Biol,2016,54(10): 2288-2297. DOI:10.3109/13880209.2016.1155625.

[20] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd ed)[J]. Autophagy, 2016, 12(1): 1-222. DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356.

[21] Zhang ZB, Li ZG. Cathepsin B and phospo-JNK in relation to ongoing apoptosis after transient focal cerebral ischemia in the rat[J]. Neurochem Res,2012,37(5):948-957. DOI:10.1007/s11064-011-0687-8.

[22] Pamenter ME,Perkins GA,McGinness AK,et al. Autophagy and apoptosis are differentially induced in neurons and astrocytes treated with an invitro mimic of the ischemic penumbra[J]. PLoS One,2012,7(12):e51469. DOI:10.1371/journal.pone.0051469.

[23] Yang Z, Zhao TZ,Zou YJ, et al. Hypoxia induces autophagic cell death through hypoxia-inducible factor 1a in microglia[J]. PLoS One, 2014,9(5):e96509. DOI:10.13 71/journal.pone.0096509.

[24] Zhang L, Niu W, He Z, et al. Autophagy suppression by exercise pretreatment and p38 inhibition is neuroprotective in cerebral ischemia[J]. Brain Res,2014,1587(1):127-132. DOI:10.1016/j.brainres.2014.08.067.

[25] Zhang L,Hu X,Luo J,et al. Physical exercise improves functional recovery through mitigation of autophagy, attenuation of apoptosis and enhancement of neurogenesis after MCAO in rats[J]. BMC Neurosci, 2013,14(1):46-49. DOI:10.1186/1471-2202-14-46.

[26] Liu W, Shang G, Yang S, et al. Electroacupuncture protects against ischemic stroke by reducing autophagosome formation and inhibiting autophagy through the mTORC1-ULK1 complex-Beclin1 pathway[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(2): 309-318. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2425.

(修回日期:2019-12-05)
(本文编辑:汪　玲)