

缺血性脑血管病自噬与颈动脉斑块的相关性

任 博¹, 李 琳², 唐延军³

(山东省莱芜市新汶矿业集团莱芜中心医院 1. 神经内分泌二科, 2. 护理部, 3. 骨科, 山东省莱芜市 271103)

[关键词] 缺血性脑血管病; 颈动脉斑块; 自噬; 颈动脉狭窄

[摘 要] **目的** 分析缺血性脑血管病自噬水平与颈动脉斑块的相关性, 为完善其病理机制提供数据支撑。**方法** 根据颈动脉斑块分级将 127 例缺血性脑血管病患者分为三组 (I 级、II 级、III 级), 采用数字减影血管造影检查颈动脉狭窄支数和程度。并抽取空腹肘静脉血, 分离单个核细胞, 丹酰戊二胺染色观察自噬体; 同时提取外周血总蛋白, 采用免疫印迹实验测定自噬相关因子 LC-III/LC-I 及 Beclin-1 水平。**结果** 不同斑块分级的颈动脉内膜中膜厚度、血管狭窄数及狭窄程度分级均有统计学差异, II 级和 III 级相关指标明显高于 I 级, 且 III 级明显高于 II 级 ($P < 0.05$)。在缺血性脑血管病患者外周血单个核细胞的超薄切片中, 可见双层膜延伸包裹的自噬体和自噬性凋亡细胞; 丹酰戊二胺染色后激光共聚焦荧光显微镜下可见显绿色荧光的自噬体。不同斑块分级的 LC-III/LC-I 和 Beclin-1 蛋白表达水平有统计学差异, II 级和 III 级明显高于 I 级, 且 III 级明显高于 II 级 ($P < 0.05$)。经相关性分析, LC-III/LC-I 和 Beclin-1 蛋白表达水平与颈动脉内膜中膜厚度呈正相关性 ($R^2 = 0.75$ 和 0.79)。**结论** 自噬能够影响缺血性脑血管病患者的颈动脉斑块分级情况, 可能为其介导该病发病和进展的重要机制之一。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Relevant Research of Autophagy and Carotid Plaque of Ischemic Cerebrovascular Disease

REN Bo¹, LI Lin², and TANG Yan-Jun³

(1. Second Department of Neuroendocrine; 2. Department of Nursing; 3. Department of Orthopaedics, Laiwu Center Hospital of Xinwen Mining Industry Group, Laiwu, Shandong 271103, China)

[KEY WORDS] Ischemic Cerebrovascular Disease; Carotid Plaque; Autophagy; Intracranial Arterial Stenosis

[ABSTRACT] **Aim** To analyze the correlation of autophagy level and carotid plaque of ischemic cerebrovascular disease, so as to provide data evidence to its pathomechanism. **Methods** 127 patients with ischemic cerebrovascular disease were divided into 3 groups according to carotid plaque scores. The count and degree of cranial artery stenosis were observed with digital subtraction angiography. The fasting venous blood of patients was extracted to separate mononuclear cells and detect autophagosome by Dan acyl glutaric amine dyeing. At the same time, total protein of the fasting venous blood was extracted to detect autophagy related factor levels LC-III/LC-I and Beclin-1. **Results** There was difference in intima-media thickness, vascular stenosis number and degrees between different patches prioritization, and the Grade II and III were both higher than Grade I, Grade III was higher than Grade II ($P < 0.05$). There were autophagy and autophagic apoptotic cells in the ultrathin section of peripheral blood mononuclear cells, and autophagy with green fluorescence was also observed in the leica microsystems after Dan acyl glutaric amine. There was difference in LC-III/LC-I and Beclin-1 levels between different patches prioritization, and the Grade II and III were both higher than Grade I, Grade III was higher than Grade II ($P < 0.05$). We found that LC-III/LC-I and Beclin-1 protein expression level was positively correlated with intima-media thickness ($R^2 = 0.75, 0.79$). **Conclusion** Autophagy can affect the carotid artery plaque of ischemic cerebrovascular disease, which may be the one of the important mechanisms.

自噬又称 II 型程序性细胞死亡, 与细胞凋亡 (I 型程序性细胞死亡) 并称为生物体细胞主动和

[收稿日期] 2015-05-22

[修回日期] 2015-09-08

[作者简介] 任博, 主治医师, 研究方向为神经内科, E-mail 为 drrenbo1976@163.com。李琳, 主管护师, 研究方向为康复医学, E-mail 为 drrenbo1976@163.com。通讯作者唐延军, 副主任医师, 研究方向为创伤骨科。

被动死亡的两大主要机制^[1]。简言之,自噬指细胞对生物大分子的降解功能,即细胞自身形成自噬囊泡,吞噬胞浆内受损细胞器、外源性病原体及长周期蛋白等,通过微管相关蛋白转运至溶酶体进行降解。正常生理条件下,自噬是存在于真核细胞的一种自我稳定机制,在缺血、外伤等病理条件下,可能引起自噬性细胞死亡,即受损细胞自我损毁的平衡性失控,导致大量健康细胞死亡。实验动物学研究已证实^[2-3],缺血性脑梗死大鼠神经细胞过量死亡,伴随着大量自噬泡的形成和自噬基因与相关蛋白的高表达。目前,国内关于自噬和缺血性脑血管病(ischemic cerebrovascular disease, ICVD)的临床研究较为匮乏,本研究重点分析缺血性脑血管病临床患者自噬水平与颈动脉斑块的相关性,为完善其病理机制和治疗靶点提供数据支撑。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取本院 2011 年 1 月至 2014 年 7 月收治的 ICVD 患者 127 例;其中男 61 例,女 66 例;年龄 45~75 岁,平均 61.30 ± 5.84 岁。纳入标准:①符合全国第四届脑血管病学术会议修订的脑梗死或短暂性脑缺血诊断标准;②患者对本研究内容知悉并签署知情同意书;③患者配合研究全程。排除标准:①脑出血合并症;②近 3 个月内溶栓治疗或服用抗凝药物;③脑肿瘤或癌症;④颅内有明显感染症状;⑤神经、精神类疾病;⑥糖尿病、甲亢、自身免疫病等能引发全身炎症反应或自噬、凋亡反应的疾病。

1.2 斑块分级

采用经颅多普勒超声仪(C8,广州索诺星科技医疗有限公司)测定颈动脉内膜中膜厚度(intima-media thickness, IMT),探头频率为 5~10 MHz。IMT 测定方法:患者仰卧位,取颈总动脉分叉处近端后壁 1.5 cm 处测量,测双侧,取平均值。斑块分级:血管纵行及横断面扫描均可见同一位置存在突入管腔的回声结构或血流异常缺损,或局部 $IMT > 1.3$ mm 定义为斑块。测量斑块内径,参照颈动脉粥样硬化斑块超声分级标准分为 I 级(双侧斑块均 < 2 mm)、II 级(左右两侧仅一侧 < 2 mm)、III 级(左右两侧均 ≥ 2 mm)。

1.3 颅内动脉狭窄情况

采用数字减影血管造影(Allura Xper FD20,飞利浦)检查颅内动脉狭窄支数和狭窄率,进行狭窄度分级。血管狭窄率=(未狭窄处管腔内径-狭窄处

管腔内径)/未狭窄处管腔内径 $\times 100\%$ 。狭窄度分级:根据血管狭窄率,单支血管病变分为轻度($< 50\%$)、中度($50\% \sim 69\%$)、重度三级($\geq 70\%$),双支及以上血管病变均归入重度。

1.4 自噬体观察

抽取患者清晨空腹肘静脉血,采用梯度离心法分离单个核细胞,进行丹酰戊二胺(MDC)染色实验。基本步骤:①细胞培养:梯度离心获得的单个核细胞置于离心管,加入 5 倍以上的 D-hank's 液,洗涤并离心两次,离心力 300 g、离心 10 min;以 3×10^6 个细胞水平接种于培养皿, 7°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养 120~150 min。②切片制备和电镜观察:培养所得单个核细胞以胰酶消化游离,离心弃上清,离心力 300 g、2 次 $\times 5$ min。戊二醛(2.5%)与锇酸(1%)固定,梯度丙酮脱水,树脂包埋后作 1 μm 超薄切片,枸橼酸铅染色,透射电镜观察自噬体。③MDC 染色:将分离单个核细胞以 PBS 重悬,加入自噬小体特异性荧光标记物 MDC(0.05 mmol/L),4%多聚甲醛固定,激光共聚焦荧光显微镜观察自噬小体。

1.5 自噬因子测定

抽取患者清晨空腹肘静脉血,以全血蛋白质抽提试剂盒(R6732-02,上海朗顿生物科技有限公司)提取总蛋白,免疫印迹实验检测自噬因子 LC-II/LC-I 及 Beclin-1 的蛋白水平。抗体均由 Abcam 提供,以 3.0%的脱脂牛奶为溶剂,LC-I、LC-II 及 Beclin-1 的使用浓度分别为 1:2000、1:3000、1:2000,相应二抗使用浓度均为 1:2500。

1.6 统计学方法

采用医学统计学软件 SPSS19.0 进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间的比较行单因素方差分析,有统计学差异者任意两组之间的比较行 LSD-t 检验;等级计数资料以百分比表示,行秩和检验;相关性考察采用简单线性回归; $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 颅内动脉狭窄情况

不同斑块分级的 IMT、血管狭窄数及狭窄程度分级均有统计学差异,II 级和 III 级 IMT、血管狭窄数及狭窄程度明显高于 I 级,且 III 级各指标也明显高于 II 级($P < 0.05$;表 1)。

2.2 自噬体观察

自噬泡为包绕细胞器的双层膜结构,成熟后被转运到溶酶体,外膜与溶酶体膜融合,形成自噬溶

酶体。在 ICVD 患者外周血单个核细胞的超薄切片中,可见双层膜延伸包裹的自噬体和自噬性凋亡细

胞(图 1)。另外,MDC 染色后激光共聚焦荧光显微镜下可见显绿色荧光的自噬体(图 2)。

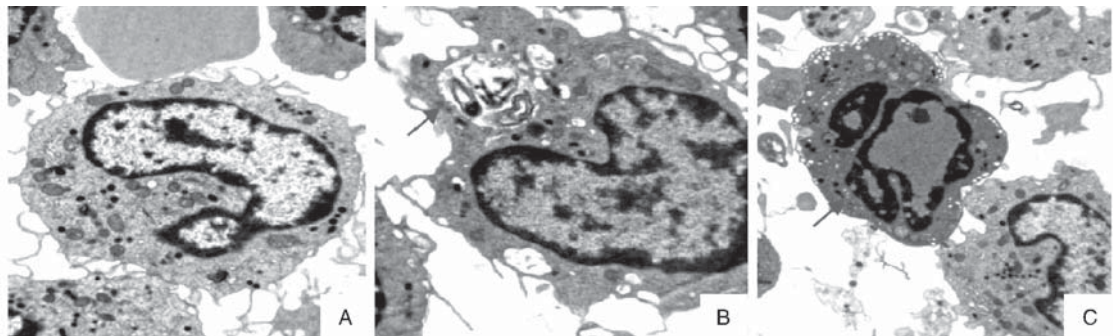


图 1. 电镜下观察超薄切片的自噬小体 A 为正常细胞,B 为细胞周围出现自噬泡,箭头标记处;C 为自噬性凋亡的细胞。
Figure 1. Autophagosome of ultrathin section observed in electron microscope

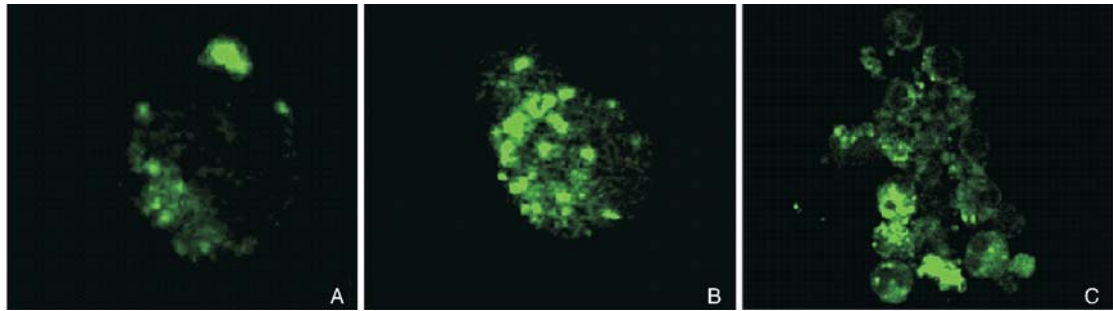


图 2. 激光共聚焦荧光显微镜下观察 MDC 染色样片 A 为 I 级斑块,B 为 II 级斑块,C 为 III 级斑块。
Figure 2. Dyeing samples of MDC assay observed in laser confocal fluorescence microscope

2.3 自噬因子测定

蛋白印迹实验结果显示,不同斑块分级的 LC-3 II/LC-3 I 和 Beclin-1 蛋白表达水平差异有统计学意义,II 级和 III 级明显高于 I 级,且 III 级明显高于 II 级($P<0.05$;表 2 和图 3)。

表 1. 不同斑块分级患者颅内动脉狭窄情况
Table 1. Intracranial artery stenosis situation between patients with different patches prioritization

斑块分级	n	IMT(mm)	血管狭窄数	狭窄程度分级(例)		
				轻度	中度	重度
I 级	31	0.92±0.14	0.84±0.15	17	11	3
II 级	63	1.05±0.22	1.02±0.11	19	27	17
III 级	33	1.13±0.17	1.35±0.17	7	9	17
LSD- t_1/Z_1 , P_1		3.000,0.002	5.498,0.000	-2.538,0.011		
LSD- t_2/Z_2 , P_2		2.897,0.003	12.69,0.000	-3.105,0.002		
LSD- t_3/Z_3 , P_3		1.822,0.036	11.50,0.000	-2.019,0.043		

注:1: I 级 vs II 级;2: I 级 vs III 级;3: II 级 vs III 级。

表 2. 不同斑块分级患者自噬因子表达水平($\bar{x}\pm s$)
Table 2. Autophagy factor expression levels in patients with different patches prioritization ($\bar{x}\pm s$)

斑块分级	n	LC-3 II/LC-3 I	Beclin-1
I 级	31	0.107±0.027	0.185±0.033
II 级	63	0.434±0.086 ^a	0.217±0.043 ^a
III 级	33	0.703±0.097 ^{ab}	0.462±0.057 ^{ab}

a 为 $P<0.05$,与 I 级相比;b 为 $P<0.05$,与 II 级相比。

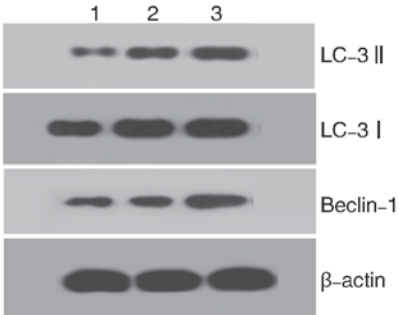


图 3. 自噬因子的免疫印迹结果 1 为 I 级斑块,2 为 II 级斑块,3 为 III 级斑块。
Figure 3. Autophagy factor images of western blot experiments

2.4 相关性分析

经相关性分析,LC-3 II/LC-3 I 比值与 IMT 呈正相关性($y = 1.36x - 0.58$, $R^2 = 0.75$, $P < 0.05$);同

样,Beclin-1 蛋白表达水平也与 IMT 呈正相关性($y = 0.81x - 0.34$, $R^2 = 0.79$, $P < 0.05$) (图 4)。

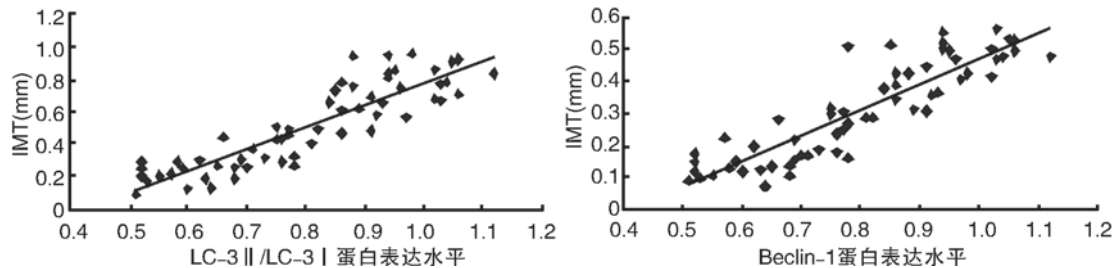


图 4. LC-3 II/LC-3 I 及 Beclin-1 蛋白表达水平与 IMT 的回归直线

Figure 4. Regression straight line between LC-3 II/LC-3 I or Beclin-1 protein expression level and IMT

3 讨 论

自噬是细胞适应外界恶劣环境的重要生存机制之一,通过分解受损细胞器制造 ATP,保障代谢循环。研究表明^[4],健康细胞的自噬水平极低,呈微表达或不表达状态。电镜下观察自噬小体是鉴别细胞自噬主要形态学依据,本研究通过电镜和 MDC 染色观察到 ICVD 患者外周血单个核细胞有自噬体形成,说明细胞自噬在 ICVD 发病过程中得到了激活。动物模型和体外细胞实验表明^[5-6],在 ICVD 的发病初期,自噬对神经细胞起保护作用。随着缺血时间的延长或严重程度的升级,自噬可能引发 II 型程序性细胞死亡,加重神经功能损伤,因此,自噬可能介导了 ICVD 恶性进展的过程。

颈动脉斑块脱落并阻塞血管是造成 ICVD 发病和进展的一个重要原因,临床上对颈动脉斑块的准确判断对 ICVD 的诊断、防治及预后评估均有重要意义^[7-8]。本研究发现不同斑块分级的 IMT、血管狭窄数及狭窄程度分级均有统计学差异,II 级和 III 级相关指标明显高于 I 级,且 III 级明显高于 II 级。该结果与国内学者方乐等^[9]报道一致,均证实了斑块分级情况对颅内供血举足轻重。因此本研究以颈动脉斑块分级为界限,分析不同斑块分级患者自噬水平的差异。结果发现不同斑块分级的 LC-3 II/LC-3 I 和 Beclin-1 蛋白表达水平有统计学差异,II 级和 III 级明显高于 I 级,III 级明显高于 II 级。

实质上,自噬小体由自噬相关蛋白构成,又称核心 Atg 蛋白,可划分为 Atg1/ULK 复合物、Atg8/LC3 与 Atg12、III 型磷脂酰肌醇三磷酸激酶复合物、Atg9/mAtg9 与 VMP1 蛋白四个子群。各个子群各司其职,最终完成自噬因子的募集、自噬小体的形

成及自噬过程的发生、解体与再循环过程。LC3 是两个泛素样蛋白系统之一,与 ATG8 同源,是细胞自噬的通用标记物^[10]。在自噬发生过程中,LC3 首先在 Atg12 同源物的催化下发生氨基酸脱羧基反应,生成 LC3-I^[11]。此时的 LC3-I 无直接活性,在泛素化激酶 E1 和 E2 的相互作用下,与自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺结合生成活性态的 LC3-II 才能发挥作用,诸多研究指出 LC3-II/LC3-I 的含量和自噬的发生程度成正比^[12]。Beclin-1 是 III 型磷脂酰肌醇三磷酸激酶复合物的重要组成部分,主要作用于自噬的起始阶段,激活后可促进自噬发生,也是细胞自噬的经典自噬标记物^[13]。本研究结果说明自噬水平的高低与斑块分级密切相关。且进一步的线性考察结果显示 LC-3 II/LC-3 I 和 Beclin-1 蛋白表达水平与 IMT 呈正相关性。本研究认为,细胞自噬性死亡的激活可能产生大量坏死细胞,促进血管内容物的沉积和斑块形成,从而增厚 IMT,加重血管阻塞情况,可能为其介导 ICVD 的重要机制之一。

综上所述,本研究通过 ICVD 患者外周血自噬小体的定性和自噬因子的定量研究发现细胞自噬能够影响 ICVD 患者的颈动脉斑块分级情况,可能为其介导 ICVD 发病和进展的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] 曹贝贝,范亮亮,项荣.动脉粥样硬化中自噬与凋亡在内质网的交叉对话[J].生物物理学报,2013,30(12):911-918.
- [2] Lavandero S, Chiong M, Rothermel BA, et al. Autophagy in cardiovascular biology [J]. J Clin Invest, 2015, 125(1): 55-64.

(下转第 269 页)

志物的变化及其与血脂变化的相关性存在分歧,可能与他汀类药物种类、研究人群种族、样本数量及指标的测定方法等有关,或许他汀类药物降脂疗效除了受胆固醇合成和吸收状况的影响外,还受其他许多因素的影响,因此,在大样本人群中进行进一步探讨具有非常重要的意义。

[参考文献]

- [1] Nissinen MJ, Miettinen TE, Gylling H, et al. Applicability of non-cholesterol sterols in predicting response in cholesterol metabolism to simvastatin and fluvastatin treatment among hypercholesterolemic men [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2010, 20(5): 308-316.
- [2] Wu WF, Wang QH, Zhang T, et al. Gas chromatography analysis of serum cholesterol synthesis and absorption markers used to predict the efficacy of simvastatin in patients with coronary heart disease [J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(12): 993-998.
- [3] Grundy SM, Cleeman JI, Merz CNB, et al. Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program and Endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute, American College of Cardiology Foundation, and A-

merican Heart Association [J]. *Circulation*, 2004, 110(2): 227-229.

- [4] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南 [J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(5): 390-419.
- [5] Miettinen TA, Strandberg TE, Gylling H. Noncholesterol sterols and cholesterol lowering by long-term simvastatin treatment in coronary patients: relation to basal serum cholesterol [J]. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(5): 1340-346.
- [6] Miettinen TA, Gylling H, Lindholm N, et al. Serum non-cholesterol sterols during inhibition of cholesterol synthesis by statins [J]. *J Lab Clin Med*, 2003, 141(2): 131-137.
- [7] Miettinen TA, Gylling H. Synthesis and absorption markers of cholesterol in serum and lipoproteins during a large dose statin treatment [J]. *Eur J Clin Med*, 2003, 33(11): 976-982.
- [8] Miettinen TA, Gylling H. Ineffective decrease of serum cholesterol by simvastatin in a subgroup of hypercholesterolemic coronary patients [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 164(1): 147-152.

(此文编辑 曾学清)

(上接第 264 页)

- [3] Swaminathan B, Goikuria H, Vega R, et al. Autophagic marker MAP1LC3B expression levels are associated with carotid atherosclerosis symptomatology [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): 115-126.
- [4] 郭强, 韦强, 边心超, 等. 细胞自噬和缺血性脑卒中 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(4): 886-888.
- [5] 孙李晴, 张智博. 细胞自噬与缺血性脑血管病 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2015, 18(2): 137-138.
- [6] 乔赵娜, 黄传江, 韩玉亮, 等. 细胞自噬在缺血性脑血管病中的作用研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(16): 4093-095.
- [7] 吴小兵, 孙建华, 陈玮, 等. 炎症指标和颈动脉斑块稳定性与缺血性脑血管病的相关性研究 [J]. *心脑血管病防治*, 2010, 10(2): 125-127.
- [8] 佟丽媛, 王田蔚, 方乐, 等. 缺血性脑血管病与颈动脉动脉硬化斑块的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(9): 2137-138.
- [9] 方乐, 王田蔚, 佟丽媛, 等. 颈动脉粥样斑块与缺血性脑血管病的相关性 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2013, 30(6): 528-530.

- [10] Wang J, Hou J, Lin C, et al. Shuangshen Ningxin capsule, a traditional Chinese medicinal preparation, alleviates myocardial ischemia through autophagy regulation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 58(12): 60-71.
- [11] Peng W, DU T, Zhang Z, et al. Knockdown of autophagy-related gene LC3 enhances the sensitivity of HepG2 cells to epirubicin [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(4): 1271-276.
- [12] Sun YP, Liu JP. Blockade of emodin on amyloid- β 25-35-induced neurotoxicity in A β PP/PS1 mice and PC12 cells through activation of the class III phosphatidylinositol 3-kinase/Beclin-1/B-cell lymphoma 2 pathway [J]. *Planta Med*, 2015, 81(2): 108-115.
- [13] Qi Z, Dong W, Shi W, et al. Bcl-2 phosphorylation triggers autophagy switch and reduces mitochondrial damage in limb remote ischemic conditioned rats after ischemic stroke [J]. *Transl Stroke Res*, 2015, 6(3): 198-206.

(此文编辑 许雪梅)