

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2018)26-03-0222-05

Wnt/ β -catenin 信号通路通过下调自噬改善 大鼠脑缺血再灌注损伤

耿武军^{1,2}, 陈成宇², 张民远², 莫云长², 唐红丽², 王均炉², 俞卫锋³

(1.苏州大学附属第三医院麻醉科,江苏省常州市 215006;2.温州医科大学附属第一医院麻醉科,浙江省温州市 325000;3.上海东方肝胆外科医院麻醉科,上海市 200438)

[关键词] Wnt/ β -catenin 信号通路; 脑缺血再灌注; 自噬; 皮层神经元; 脑保护

[摘要] **目的** 观察 Wnt/ β -catenin 信号通路通过调控大鼠皮层神经元细胞自噬水平对脑缺血再灌注(CIR)损伤的影响。**方法** 将 56 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组:假手术组(Sham 组)、CIR 组、Wnt/ β -catenin 激动剂氯化锂(LiCl)处理组(LiCl+CIR 组)、生理盐水(NS)处理组(NS+CIR 组),每组 14 只。采用大脑中动脉线栓阻塞法建立大鼠 CIR 损伤模型,缺血 2 h 后再灌注 24 h。采用 Garcia 神经功能缺陷评分评估各组大鼠神经行为学改变;氯化三苯基四氮唑染色测定脑梗死体积;Western blot 测定大鼠皮层 β -catenin、LC3-II 及 P62 蛋白表达。**结果** 再灌注 24 h 后,与 Sham 组相比,CIR 组神经行为学评分升高,脑梗死体积增加,皮层 β -catenin 表达降低,LC3-II 表达升高,P62 蛋白表达水平下降($P<0.05$);与 CIR 组相比,LiCl+CIR 组神经行为学评分降低,脑梗死体积减少,皮层 β -catenin 表达增加,LC3-II 表达降低,P62 蛋白表达水平增加($P<0.05$)。**结论** Wnt/ β -catenin 信号通路通过调控自噬改善大鼠 CIR 的神经损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Wnt/ β -catenin signaling pathway improves cerebral ischemia-reperfusion injury by down-regulation of autophagy in rats

GENG Wu-Jun^{1,2}, CHEN Cheng-Yu², ZHANG Min-Yuan², MO Yun-Chang², TANG Hong-Li², WANG Jun-Lu², YU Wei-Feng³

(1.Department of Anesthesiology, the Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou, Jiangsu 215006, China; 2.Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China; 3.Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

[KEY WORDS] Wnt/ β -catenin signaling pathway; Cerebral ischemia-reperfusion; Autophagy; Cortical neuron; Cerebral protection

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of Wnt/ β -catenin signaling pathway on cerebral ischemia-reperfusion (CIR) injury by regulating the autophagy level of rat cortical neurons. **Methods** 56 male SD rats were randomly divided into 4 groups: sham operation group (Sham group), CIR group, Wnt/ β -catenin agonist lithium chloride (LiCl) treatment group (LiCl+CIR group), normal saline (NS) treatment group (NS+CIR group), 14 rats in each group. Rat CIR damage model was established by middle cerebral artery occlusion with line embolus, with reperfusion 24 hours after ischemia 2 hours. Garcia neurological deficit score was used to evaluate the neurobehavioral changes of rats in each group. Cerebral infarction volume was measured by triphenyltetrazolium chloride staining. The expressions of β -catenin, LC3-II and P62 proteins in rat cortex was detected by Western blot. **Results** After reperfusion for 24 h, compared with Sham group, the neurobehavioral score increased, the cerebral infarction volume increased, the cortical expression of β -catenin decreased, the cortical expression of LC3-II increased, and the expression of P62 protein decreased in CIR group ($P<0.05$). Compared with CIR group, the neurobehavioral score decreased, the cerebral infarction volume decreased, the

[收稿日期] 2018-01-16

[修回日期] 2018-02-02

[基金项目] 国家自然科学基金(81774109,81603685)

[作者简介] 耿武军,硕士,副主任医师,副教授,研究方向为器官保护,E-mail 为 gengwujun@126.com。通讯作者俞卫锋,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向为器官保护,E-mail 为 yuweifeng@renji.com。

cortical expression of β -catenin increased, the cortical expression of LC3-II decreased, and the expression of P62 protein increased in LiCl+CIR group ($P<0.05$). **Conclusion** Wnt/ β -catenin signaling pathway can improve the nerve injury by regulating autophagy in CIR rats.

脑卒中是目前世界范围内致死率和致残率最高的疾病之一,具有发病率高、死亡率高、致残率高的特点^[1]。脑缺血再灌注(cerebral ischemia-reperfusion, CIR)会触发一系列的生理变化并导致不可逆的神经功能损伤。目前认为缺血再灌注损伤与氧化应激、细胞内钙超载、线粒体功能紊乱、细胞炎症、细胞凋亡、自噬等诸多细胞和分子生物机制相关,其中,自噬(autophagy)在 CIR 过程中发挥着重要的作用^[2]。已有研究表明通过抑制自噬可以明显减少缺血再灌注海马 CA1 区神经元死亡和 TUNEL 阳性细胞数量,达到保护损伤神经元的作用^[3]。Wnt 信号通路作为一条多环节、多作用位点的开放通路,在细胞增殖、分化和凋亡过程中起着重要的作用。已有研究表明,Wnt 信号通路的激活可增加哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)表达,从而抑制自噬^[4]。但是在 CIR 模型中,Wnt 信号通路是否通过调控自噬实现脑保护尚无相关报道。本研究建立了 SD 大鼠的 CIR 模型,探究 Wnt 信号通路调控大鼠皮层神经元细胞自噬水平对缺血再灌注损伤的影响。

1 材料和方法

1.1 实验分组及处理

温州医科大学实验动物中心提供的 56 只 SD 大鼠,体重 280~320 g,雄性,清洁级。实验前在实验室动物笼中饲养 1 周,自由饮食、饮水,控制实验室温度在 $21\pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度 60%~70%。大鼠随机分为 4 组,每组 14 只,分别为:假手术组(Sham 组)、CIR 组、氯化锂(lithium chloride, LiCl)+CIR 组(LiCl+CIR 组)、生理盐水(normal saline, NS)+CIR 组(NS+CIR 组)。CIR 组采用线栓法行大脑中动脉阻塞,缺血 2 h 后退出线栓再灌注 24 h;Sham 组操作同 CIR 组,但仅分离动脉不阻断血流;LiCl+CIR 组于缺血前以 LiCl(L4408, Sigma-aldrich) 1 mEq/(kg·d)行腹腔内注射,连续 7 天;NS+CIR 组腹腔内注射相同剂量的生理盐水。再灌注 24 h 后,对每组大鼠进行神经行为学评分,然后取 6 只进行氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色,剩余 8 只以 Western blot 测定大脑皮层 β -catenin、LC3-II、P62 蛋白表达。

1.2 模型制备

以 10%水合氯醛行 SD 大鼠腹腔内注射,剂量为 350 mg/kg。麻醉后以 1 L/min 氧流量行面罩通气。缺血 2 h 后,退出线栓,再行灌注。实验过程中,维持大鼠体温在 $37\sim 37.5^{\circ}\text{C}$ 直至麻醉苏醒^[5]。

1.3 神经行为学评分

再灌注 24 h 后,由 1 名对分组情况不知情的实验员对实验动物进行神经行为学评分,评分标准采用 Garcia 18 点评分表^[6],评分内容包括自主活动、对称的四肢运动、前爪伸展、攀爬、本体感觉等。具体为:0 分:无功能障碍,1 分:不能完全伸展左侧前肢,2 分:向左旋转,3 分:躯体向左侧倾倒,4 分:无自主活动,伴意识障碍。

1.4 脑梗死体积测定

再灌注后 24 h,10%水合氯醛麻醉大鼠,生理盐水灌注,断头取脑, -20°C 速冻 20 min,用脑模具切成 6 片冠状切片,层厚 2 mm,置于 2%TTC 溶液中, 37°C 温箱 20 min,正常组织成红色,梗死区域呈苍白色。用扫描仪将照片扫入 LU ZEX-F 型图像分析仪内分析,观察结果,计算切片间隔、面积,得到梗死灶体积,计算出梗死灶占全脑体积的百分比。

1.5 Western blot 测定皮层 β -catenin、LC3-II、P62 蛋白表达

缺血同侧皮层组织匀浆提取总蛋白,上样 30 μg , SDS-PAGE 电泳,湿法转膜封闭,加入抗 β -catenin(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、抗 β -actin、抗 LC3-II/LC-I、抗 P62(Cell Signaling, USA)一抗 4°C 过夜,二抗孵育,自动曝光机曝光。使用 Quantity One 软件分析条带的吸光度。

1.6 统计学分析

数据采用 SPSS 15.0 软件分析。Garcia 神经行为学评分以中位数表示,行 Kruskal-Wallis H 检验,之后行 Nemenyi 检验;各组数据以单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较采用 LSD-t 检验。其他实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LiCl 改善 CIR 大鼠神经功能

再灌注 24 h 后,对每组大鼠进行神经行为学评分。与 Sham 组相比,CIR 组神经行为学评分升高

($P<0.05$);与 CIR 组相比,LiCl+CIR 组神经行为学评分降低($P<0.05$);而与 CIR 组相比,NS+CIR 组神经行为学评分差异无统计学意义($P>0.05$)(表 1)。

表 1. 各组神经行为学评分比较($n=14$,只)
Table 1. Comparison of neurobehavioral score in each group ($n=14$, case)

分 组	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	中位数
Sham 组	14	0	0	0	0	0
CIR 组	0	1	1	10	2	3 ^a
LiCl+CIR 组	1	2	9	2	0	2 ^b
NS+CIR 组	0	4	7	3	0	3

a 为 $P<0.05$,与 Sham 组相比;b 为 $P<0.05$,与 CIR 组相比。

2.2 LiCl 对 CIR 大鼠脑梗死体积的影响

再灌注 24 h 后,每组 6 只 SD 大鼠处死进行 TTC 染色。剩余 8 只以 Western blot 测定皮层 β -catenin、LC3-II、P62 蛋白表达。与 Sham 组相比,CIR 组梗死体积明显增加($P<0.05$);与 CIR 组相比,LiCl+CIR 组脑梗死体积显著减少($P<0.05$);与 CIR 组相比,NS+CIR 组脑梗死体积差异无统计学意义($P>0.05$)(图 1、表 2)。

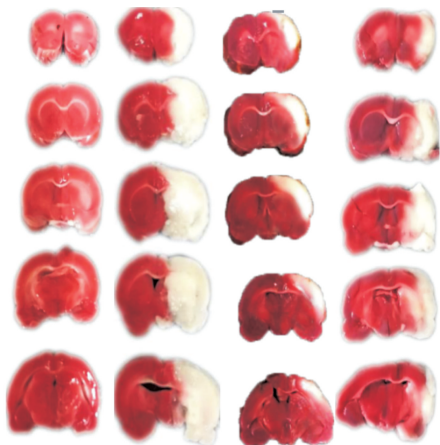


图 1. 各组大鼠 CIR 24 h 脑梗死体积比较 从左到右,第 1 列为 Sham 组,第 2 列为 CIR 组,第 3 列为 LiCl+CIR 组,第 4 列为 NS+CIR 组。

Figure 1. Comparison of cerebral infarction volume after CIR 24 h in each group

2.3 LiCl 增加 CIR 大鼠皮层 β -catenin 蛋白表达

再灌注 24 h 后,与 Sham 组相比,CIR 组皮层 β -catenin 表达显著降低($P<0.05$);与 CIR 组相比,LiCl+CIR 组 β -catenin 表达增加($P<0.05$);与 CIR 组相比,NS+CIR 组 β -catenin 表达差异无统计学意义($P>0.05$)(图 2)。

表 2. 各组大鼠 CIR 24 h 脑梗死体积百分比
Table 2. Percentage of cerebral infarction volume after CIR 24 h in each group

分 组	<i>n</i>	脑梗死体积(%)
Sham 组	6	0.0±0.0
CIR 组	6	65.1±9.1 ^a
LiCl+CIR 组	6	32.4±6.7 ^b
NS+CIR 组	6	59.3±9.4

a 为 $P<0.05$,与 Sham 组相比;b 为 $P<0.05$,与 CIR 组相比。

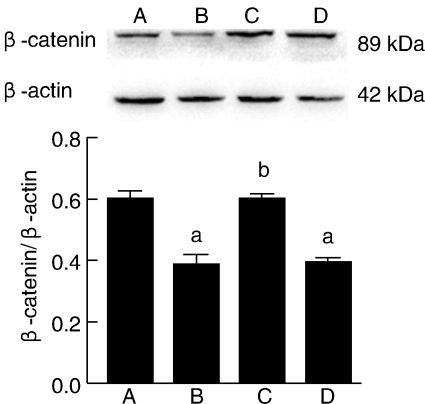


图 2. 各组大鼠大脑皮层的 β -catenin 表达($n=8$) A 为 Sham 组,B 为 CIR 组,C 为 LiCl+CIR 组,D 为 NS+CIR 组。a 为 $P<0.05$,与 Sham 组相比;b 为 $P<0.05$,与 CIR 组相比。

Figure 2. Expression of β -catenin in the cerebral cortex of rats in each group($n=8$)

2.4 LiCl 下调 CIR 大鼠大脑皮层自噬指标 LC3-II、P62

再灌注 24 h 后,与 Sham 组相比,CIR 组大脑皮层 LC3-II 表达显著升高($P<0.05$);与 CIR 组相比,LiCl+CIR 组 LC3-II 表达降低($P<0.05$);与 CIR 组相比,NS+CIR 组 LC3-II 表达差异无统计学意义($P>0.05$)(图 3)。

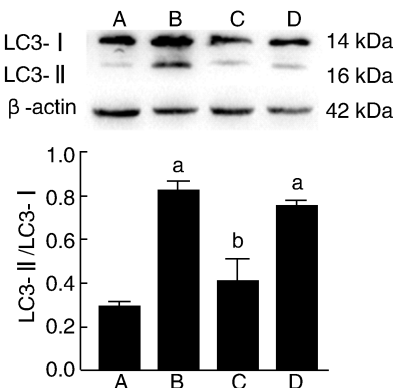


图 3. 各组大鼠 LC3-II/LC3-I 比值比较($n=8$) A 为 Sham 组,B 为 CIR 组,C 为 LiCl+CIR 组,D 为 NS+CIR 组。a 为 $P<0.05$,与 Sham 组相比;b 为 $P<0.05$,与 CIR 组相比。

Figure 3. Comparison of LC3-II/LC3-I ratio in rats of each group($n=8$)

再灌注 24 h 后,与 Sham 组相比,CIR 组 P62 表达明显下降($P<0.05$);与 CIR 组相比,LiCl+CIR 组 P62 表达升高($P<0.05$);CIR 组、NS+CIR 组 P62 表达差异无统计学意义($P>0.05$)(图 4)。

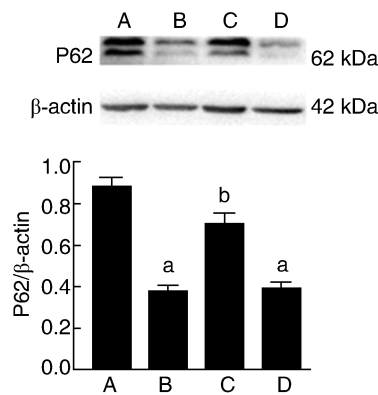


图 4. 各组大鼠 P62 蛋白表达水平($n=8$) A 为 Sham 组,B 为 CIR 组,C 为 LiCl+CIR 组,D 为 NS+CIR 组。a 为 $P<0.05$,与 Sham 组相比;b 为 $P<0.05$,与 CIR 组相比。

Figure 4. Expression level of P62 protein in rats of each group($n=8$)

3 讨论

重建缺血性脑卒中血流或者增加缺血区的血流供应是脑组织缺血后损伤修复的重要条件。但是,灌注恢复后缺血性损伤却进一步加重,如何减轻神经细胞的缺血再灌注损伤成为治疗关键。研究表明药物干预可通过信号通路及某些免疫炎症细胞参与缺血再灌注损伤^[7-8]。我们在前期工作中发现,Wnt/ β -catenin 信号通路在缺血再灌注损伤后的神经保护中发挥了重要作用^[5]。

在以往观念中,缺血后的神经元死亡主要有坏死和凋亡,其中坏死主要在缺血中心区,凋亡则主要发生在半暗带区。目前已经证实神经元死亡还存在其他的程序性死亡形式,即自噬^[9]。自噬广泛存在于真核细胞中,当细胞在分化、发育、饥饿等状态下时可以自主死亡。不同理化因素对组织细胞的伤害,可以增加自噬溶酶体的产生,保护机体细胞。然而,溶酶体过度激活却会损伤细胞。目前自噬与疾病关系的研究正在成为一个新的热点,动物模型研究中已观察到脑缺血损伤后自噬激活,但其机制尚不清楚。

多个信号通路及自噬相关基因调节细胞自噬的过程,包括 TSC/mTOR 信号通路、核因子 κ B 信号通路、未折叠蛋白反应信号通路和活性氧信号转导途径^[10]。mTOR 信号通路是缺血缺氧后自噬的重

要信号转导途径,它抑制细胞自噬并促进细胞增殖^[11]。缺血再灌注损伤中不同阶段涉及不同的信号转导途径,在缺血阶段,腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate active protein kinase, AMPK)、mTOR 对自噬起重要作用,敲除 AMPK 的小鼠自噬会显著减弱^[12];再灌注阶段,引发自噬的机制与增加自噬关键蛋白 Beclin-1 的表达、氧化应激损伤、线粒体通透性转换和线粒体损伤等有关^[13]。而中枢神经系统也可因为自噬相关基因敲除,而在脑缺血缺氧模型中失去自噬活性,避免神经细胞的死亡^[14]。本研究通过建立大鼠 CIR 模型,发现 CIR 大鼠皮层内的自噬相关蛋白 LC3-II 明显增加及 P62 蛋白表达明显降低,表明发生 CIR 损伤时,大鼠脑内皮质的自噬水平明显增加。

Wnt 信号通路是细胞自噬重要信号转导通路。Inoki 等^[15]揭示了 Wnt 通路与细胞自噬的相关性,研究表明激活 Wnt 信号可以磷酸化糖原合成酶激酶 3 β ,促进 TSC1/TSC2 复合物形成,以减少 mTOR 的降解,从而抑制自噬的发生^[15]。同时,自噬也通过与 LC3 蛋白的相互作用,降解蓬乱蛋白 2 来抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路^[16];当过度的自噬受到抑制,可保护细胞在 48~72 h 免受破坏^[17]。

本实验中,我们观察到自噬在缺血再灌注后 24 h 过度激活对细胞产生了损伤作用。CIR 24 h 后,皮层自噬标记蛋白 LC3-II 表达含量增高, β -catenin 表达含量降低,同时皮层内存活的神经元细胞数减少,而给予 Wnt/ β -catenin 激动剂 LiCl 后,可降低自噬标记分子 LC3-II,改善 CIR 大鼠的神经行为学评分,并减少脑梗死体积,说明 LiCl 具有神经保护作用。LiCl 是 Wnt/ β -catenin 信号通路激动剂^[18],同时也是自噬的诱导剂;我们采用的给药方法是 1 mEq/(kg·d)并连续 7 天的慢性给药方式,不会诱导自噬激活。实验结果表明 LiCl 的慢性给药方式激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,减少了 LC3-II 的表达,抑制自噬。

综上所述,我们在之前研究^[19]基础上建立了可靠的 CIR 动物模型,证明了 CIR 24 h 后,自噬的过度激活抑制了 Wnt/ β -catenin 通路,对皮层神经元细胞造成损伤。外源性 Wnt/ β -catenin 激动剂 LiCl 可显著上调 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制自噬的过度激活,对 CIR 损伤产生保护作用。

[参考文献]

[1] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Executive summary: Heart disease and stroke statistics--2014 update: A re-

- port from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2014, 129(3): 399-410.
- [2] Thapalia BA, Zhou Z, Lin X, et al. Autophagy, a process within reperfusion injury: an update[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(12): 8 322-341.
- [3] Chen W, Sun Y, Liu K, et al. Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia[J]. *NRR*, 2014, 9(12): 1 210-216.
- [4] Lambert C, Cisternas P, Inestrosa NC. Role of Wnt signaling in central nervous system injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(4): 2 297-311.
- [5] He X, Mo Y, Geng W, et al. Role of Wnt/ β -catenin in the tolerance to focal cerebral ischemia induced by electroacupuncture pretreatment[J]. *Neurochem Int*, 2016, 97: 124-132.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [7] 张莉峰, 滕军放, 袁学谦, 等. 白藜芦醇通过抑制 TNF- α 表达保护大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(1): 32-36.
- [8] 鲁华荣, 宋胜文, 韩琨元, 等. 腺苷 A1 受体介导参麦注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠脑保护作用的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(9): 1 109-112.
- [9] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [10] Miallet-Perez J, Vindis C. Autophagy in health and disease: focus on the cardiovascular system[J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 721-732.
- [11] 陈波, 兰青. 脑缺血后自噬的信号转导通路[J]. *国际脑血管病杂志*, 2016, 24(5): 463-467.
- [12] Sciarretta S, Yee D, Shenoy V, et al. The importance of autophagy in cardioprotection[J]. *High Blood Press Cardiovasc Prev*, 2014, 21(1): 21-28.
- [13] Ma X, Godar RJ, Liu H, et al. Enhancing lysosome biogenesis attenuates BNIP3-induced cardiomyocyte death[J]. *Autophagy*, 2012, 8(3): 297-309.
- [14] Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, et al. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(2): 454-469.
- [15] Inoki K, Ouyang H, Zhu T, et al. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth[J]. *Cell*, 2006, 126(5): 955-968.
- [16] Gao C, Cao W, Bao L, et al. Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting dishevelled degradation[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(8): 781-790.
- [17] Ginot V, Spiehlmann A, Rummel C, et al. Involvement of autophagy in hypoxic-excitotoxic neuronal death[J]. *Autophagy*, 2014, 10(5): 846-860.
- [18] 夏婕妤, 李静, 张岩岩, 等. 氯化锂激活 Wnt/ β -catenin 信号通路致小鼠造血干/祖细胞衰老及其机制[J]. *解剖学报*, 2016, 47(1): 34-41.
- [19] Dai QX, Geng WJ, Zhuang XX, et al. Electroacupuncture-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia in the rat is mediated by adenosine A1 receptors[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(2): 228-234.

(此文编辑 曾学清)