

柴胡皂苷 A 对脑外伤大鼠海马神经元自噬及 AMPK-mTORC1 通路的影响

高亮¹, 陈瑞¹, 孙志华¹, 杨扬^{1*}, 马丙祥²

1. 驻马店市中心医院 儿童重症医学科, 河南 驻马店 463000

2. 河南中医药大学第一附属医院 儿科, 河南 郑州 450046

摘要: **目的** 探讨柴胡皂苷 A 对脑外伤大鼠腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) - 雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mTORC1) 信号通路及海马神经元自噬的影响。**方法** 60 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组及柴胡皂苷 A 低剂量 (5 mg/kg)、中剂量 (10 mg/kg)、高剂量 (20 mg/kg) 组, 和阳性对照 (自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤, 15 mg/kg) 组, 每组 10 只。除假手术组外, 其余各组大鼠均采用皮质撞击法构建脑外伤大鼠模型, 造模成功后, 柴胡皂苷 A 各剂量组、阳性对照组 ip 相应药物, 假手术组和模型组 ip 等量生理盐水, 持续 14 d。采用 Morris 水迷宫测定大鼠的认知功能, 以苏木精-伊红染色检测各组大鼠海马组织病理变化, 采用酶联免疫吸附试剂盒检测大鼠海马组织脑源性神经生长因子 (BDNF)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF- α) 水平。透射电镜观察海马组织自噬情况, 采用蛋白免疫印迹法检测海马组织中微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3)、Beclin-1 及 AMPK-mTORC1 相关通路蛋白表达。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠的潜伏期显著延长, 穿台次数显著降低, 海马组织神经细胞损坏严重, 呈现细胞破裂、细胞核固缩等状态, 海马组织 BDNF 含量显著降低, IL-6、TNF- α 表达显著升高, 海马组织自噬小泡、LC3 II/LC3 I、Beclin-1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平显著升高, p-mTORC1/mTORC1 表达水平显著下降。与模型组相比, 柴胡皂苷 A 各剂量组的潜伏期呈现逐渐缩短的趋势, 穿台次数呈现逐渐升高的趋势, BDNF 含量显著升高, IL-6、TNF- α 表达显著降低, 海马组织自噬小泡、LC3 II/LC3 I、Beclin-1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平显著降低, p-mTORC1/mTORC1 表达水平显著升高, 且均呈现一定的剂量相关性。**结论** 柴胡皂苷 A 可调节脑外伤大鼠海马神经元自噬情况, 可能通过抑制 AMPK, 促进 mTORC1 表达实现。

关键词: 柴胡皂苷 A; 脑外伤; 自噬; 腺苷酸活化蛋白激酶; 雷帕霉素靶蛋白复合物 1; 脑源性神经生长因子

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)01-0011-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.01.002

Effects of saikosaponin A on autophagy and AMPK-mTORC1 pathway in hippocampal neurons of rats with traumatic brain injury

GAO Liang¹, CHEN Rui¹, SUN Zhi-hua¹, YANG Yang¹, MA Bing-xiang²

1. Department of Children Intensive Medicine, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

2. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To investigate the effects of saikosaponin A on the signal pathway of AMPK-mTORC1, and autophagy of hippocampal neurons in rats with traumatic brain injury. **Methods** A total of 60 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, saikosaponin A low-dose group (5 mg/kg), medium-dose group (10 mg/kg), and high-dose group (20 mg/kg), positive control group (autophagy inhibitor 3-methyladenine, 15 mg/kg), with 10 rats in each group. Except for the sham operation group, the rats in other groups were established with cortical impact method, and after successful modeling, saikosaponin A groups and positive control group were intraperitoneally injected with corresponding drugs, while the sham operation group and model group were injected with the same amount of normal saline for 14 d. Morris water maze was used to measure the cognitive function of rats, hematoxylin-eosin staining was used to detect the pathological changes of hippocampus, enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of BDNF, IL-6, and TNF- α . Observation of autophagy of hippocampus by transmission electron microscopy,

收稿日期: 2021-06-17

基金项目: 河南省科技发展计划项目 (1821023111069)

作者简介: 高亮 (1979—), 男, 硕士, 副主任中医师, 从事中医儿科相关研究。E-mail: gli70j@163.com

*通信作者: 杨扬 (1980—), 男, 博士, 副主任医师, 研究方向为干细胞治疗脑外伤的机制研究。

and LC3, Beclin-1, and AMPK-mTORC1 related pathway proteins in hippocampus were detected by Western blotting. **Results** Compared with sham operation group, the latency of rats in the model group was significantly extended, the times of crossing the platform was significantly lower, hippocampal neurons were seriously damaged, showing cell rupture and nuclear pyknosis, the content of BDNF in hippocampus was significantly decreased, the expression of IL-6 and TNF- α was significantly increased, autophagic vesicles and the protein expression levels of LC3 II/LC3 I, Beclin-1, and p-AMPK/AMPK in hippocampus were significantly increased, but the expression level of p-mTORC1/mTORC1 was significantly decreased. Compared with those in the model group, the latency of rats in saikosaponin A groups decreased gradually, the times of crossing the platform gradually increased, the content of BDNF in hippocampus increased gradually, the expression of IL-6 and TNF- α decreased gradually, autophagic vesicles and the protein expression levels of LC3 II/LC3 I, Beclin-1 and p-AMPK/AMPK in hippocampus decreased gradually, the expression level of p-mTORC1/mTORC1 increased gradually, and there was a dose-dependent manner. **Conclusion** Saikosaponin A can regulate the autophagy of hippocampal neurons in rats with traumatic brain injury, which may be achieved by inhibiting AMPK and promoting the expression of mTORC1.

Key words: saikosaponin A; traumatic brain injury; autophagy; AMPK; mTORC1; BDNF

脑外伤是指由外物造成的肉眼可见的头部损伤,是神经外科常见的疾病,致死率及致残率较高。研究发现,脑外伤患者会出现不同程度的神经功能损伤,如昏迷、认知功能障碍、语言、运动功能损害等。其中认知功能障碍不仅是脑外伤患者主要后遗症之一,也是临床治疗的重难点^[1-2]。了解脑外伤的发展进程,预防和减轻其并发症对于降低患者死亡率、提高生活质量具有重要意义。目前关于脑外伤的研究主要集中于脑内炎症反应及神经元细胞凋亡等方面^[3-4],近年来,海马神经元自噬引起各国学者的重视,研究发现自噬是细胞的正常生理反应^[5],脑部损伤所引起的氧化应激、缺氧、线粒体功能异常、炎症反应等因素均能引起自噬紊乱,自噬紊乱对于维持神经系统功能、免疫系统功能等的稳态产生不利影响^[6],脑组织机械性损伤会引起神经元凋亡,影响突触的可塑性和记忆形成,造成认知功能损伤。研究报道,通过调控自噬相关通路,可以减轻颅脑损伤改善认知功能障碍^[7]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)/雷帕霉素靶蛋白复合物 1(mammalian target of rapamycin complex1, mTORC1)通路是调控自噬的经典途径,研究发现活化的 mTOR 具有抑制细胞自噬的作用,而 AMPK 高表达具有抑制 mTOR 活性的作用,与 mTOR 呈现负向调节关系^[8]。柴胡皂苷 A 是从柴胡根茎中提取的一种活性成分,具有调节细胞自噬、抗炎、抗病毒等作用,能改善脑损伤后大鼠的神经功能及认知功能^[9],但关于其对脑外伤大鼠海马神经元自噬的研究较少,本研究通过建立脑外伤大鼠模型,探讨柴胡皂苷 A 对神经元自噬及 AMPK-mTORC1 通路的影响。

1 材料

1.1 动物

健康 SPF 级 SD 雄性大鼠,购自北京生命科学研究动物实验中心,60 只,约 3 月龄,体质量 175~220 g,生产许可证号:SYXK(京)2015-0002。所有实验大鼠于医院动物房中饲养,相对湿度 55%,温度 25 °C,自然光照,自由进食、进水,每周清洁 1 次鼠笼、保持动物房环境通风、整洁、每天更新食物及饮用水,适应性喂养 1 周。本研究经动物伦理委员会批准同意(批号 DL2019081067)。

1.2 主要试剂及仪器

柴胡皂苷 A(质量分数 \geq 98%,货号 S8946)购于美国 Sigma 公司;自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(货号 A8780)购于北京索莱宝有限公司;脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 检测试剂盒(货号 ER0008、ml064292、ml002360)购自武汉菲恩生物科技有限公司;苏木精-伊红染色试剂盒(货号 E607218-0200)购自上海生工公司;兔抗鼠微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)自噬研究抗体、Beclin-1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗、羊抗兔二抗(货号 ab51520、5072100、AAO1034a、AAT-11540)购于艾美捷科技;AMPK、p-AMPK、mTORC1(货号 ATA24596、IC153948、abx030789)购于上海钰博生物科技有限公司;蛋白提取试剂盒、BCA 试剂盒(货号 P0027、P0011)购于上海碧云天公司。

SR-AM 大鼠脑固定仪购于北京普莱克松科技有限公司;PCI-3000-1 精密颅脑损伤撞击器购于武

汉一泓科技有限公司; PUZS-300 全自动生化分析仪购于上海帝博思生物科技有限公司; RM2125RTS 手动轮转式切片机购于德国 Leica 公司; SMZ745 光学显微镜购于日本尼康公司; XE1x800 酶标仪购于美国 Perkin Elmer 公司; 1659001 型蛋白电泳仪、Trans-Blot SD 半干转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司; GIS-500 凝胶成像仪购自 Miulab 公司。

2 方法

2.1 动物分组、模型制备及给药

将 60 只大鼠按照随机数字表法分为假手术组 (10 只)、脑外伤模型组 (50 只), 采用控制性皮质撞击法^[10]制备脑外伤大鼠模型, 禁食不禁水 8 h 后 ip 1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 将大鼠麻醉, 俯卧于动物脑固定仪上, 剃去大鼠额顶部毛发并做消毒处理, 在头部正中做长约 3 cm 的切口, 钝性分离骨外膜及软组织, 使颅骨暴露, 在人字缝及前卤中线旁约 3.5 mm 处用磨钻开出约 2 mm² 的骨窗, 采用颅脑损伤撞击器进行脑部损伤, 撞击速度设为 3.5 m/s, 撞击深度设为 4 mm, 接触时间设为 80 ms, 大鼠损伤后用骨蜡封闭骨窗, 缝合头皮, 假手术组不做撞击处理, 其余操作均一致。本实验中所有动物均存活且造模成功。

造模成功后将脑外伤模型组分为模型组、柴胡皂苷 A 低剂量 (5 mg/kg)、中剂量 (10 mg/kg)、高剂量 (20 mg/kg) 组^[11]和阳性对照 (自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 15 mg/kg) 组^[12], 每组 10 只, 按照药物设定剂量 ip 给药, 假手术组及模型组 ip 等量生理盐水, 持续 14 d, 处理时间为每天上午 7:00 至 9:00。

2.2 大鼠认知功能行为学测定

参考文献方法^[13]采用 Morris 水迷宫测定大鼠的认知功能, 包括定位航行试验和空间探索试验。在脑部创伤前 6 d 对所有大鼠进行水迷宫训练, 每天 4 次, 持续训练 5 d, 水温 25 °C 左右, 将水池等分为 I、II、III、IV 4 个象限, 平台低于水面 2 cm 并置于第 I 象限中央, 将大鼠在每天同一时间从不同象限 (II、III、IV) 放入水中, 记录其找到水中平台的时间, 记为潜伏期 (最大值为 90 s, 若在 90 s 后仍未找到平台记为 90 s), 用来反映大鼠的学习能力, 该值越短说明大鼠的学习能力越强; 随后撤去平台, 记录大鼠 120 s 内穿过原平台位置的次数, 用来反映大鼠的记忆能力, 该值越高, 说明大鼠的记忆能力越强。于药物干预后第 3、7 天分别进行以

上测试, 并做相应记录。

2.3 大鼠海马组织 BDNF 水平及相关炎症因子检测

大鼠进行末次水迷宫试验后进行麻醉处死, 每组取 5 只大鼠断头取脑, 低温下分离大鼠海马组织, 去除血管、脑膜后用生理盐水清洗, 匀浆后加入 RIPA 裂解液离心得到上清液, 以 ELISA 试剂盒检测其中 BDNF、IL-6、TNF- α 水平, 具体操作按说明书进行。

2.4 大鼠海马组织病理切片观察

每组取 5 只大鼠海马组织, 于 4% 甲醛溶液固定后, 经低到高浓度梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后进行切片处理, 得到常规病理切片, 以二甲苯脱蜡、高浓度到低浓度梯度酒精处理后, 使用苏木精-伊红试剂盒染色, 具体操作步骤参照各自说明书进行, 经再次脱水、透明后封片, 使用普通光学显微镜观察大鼠海马组织形态, 任选 5 个视野拍照, 分析海马组织的损伤情况。

2.5 透射电镜检测大鼠海马组织自噬情况

参考文献方法^[14]对大鼠海马组织 CA1 区自噬情况进行观察, 将大鼠麻醉后行生理盐水灌注、多聚甲醛-戊二醛灌注至四肢变硬, 低温下取大鼠海马组织 CA1 区组织, 置于 2.5% 戊二醛溶液中固定 24 h, 经 PBS 冲洗 3 次、1% 锇酸溶液固定 1 h、梯度乙醇脱水、丙酮置换、环氧树脂包埋后, 将组织切成超薄切片, 用饱和醋酸双氧铀水溶液染色, 水洗烘干后再用柠檬酸铅染色后水洗烘干, 经透射电镜观察并拍照。

2.6 大鼠海马组织神经元自噬相关蛋白及大鼠海马组织 AMPK/mTORC1 相关蛋白表达检测

采用蛋白提取试剂盒提取各组大鼠海马组织中的总蛋白, 参照 BCA 试剂盒说明书的要求测定蛋白浓度, 8% 分离胶及 5% 浓缩胶进行电泳, 湿转法转移至 PDVF 膜上, 脱脂奶粉 (5%) 室温封闭 2 h 后添加 LC3 II、LC3 I、Beclin-1、p-AMPK、AMPK、p-mTORC1、mTORC1 兔抗鼠一抗、内参 GAPDH (均为 1:1000), 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 洗涤后添加羊抗兔 IgG 二抗 (1:5000), 室温孵育 2 h。采用蛋白成像凝胶仪对 LC3 II、LC3 I、Beclin-1、p-AMPK、AMPK、p-mTORC1、mTORC1 蛋白水平进行定量分析。

2.7 统计学分析

以 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较进行单因素方差分

析, 进一步两组间比较行 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 柴胡皂苷 A 对大鼠认知功能的影响

脑部损伤创伤前各组大鼠的水迷宫测试潜伏期及穿台次数比较无统计学意义; 脑部损伤术后, 与假手术组相比, 各组大鼠的潜伏期显著延长, 穿台次数显著下降 ($P < 0.05$); 给药后, 与模型组相比, 柴胡皂苷 A 各剂量组的潜伏期呈现逐渐缩短的趋势, 穿台次数呈现逐渐升高的趋势 ($P < 0.05$),

且呈现一定的剂量相关性, 其中柴胡皂苷 A 高剂量组与阳性对照组比较无统计学意义, 见表 1。

3.2 柴胡皂苷 A 对大鼠海马组织 BDNF 含量及相关炎症因子的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠海马组织 BDNF 含量显著降低, IL-6、TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 柴胡皂苷 A 各剂量组 BDNF 含量依次升高, IL-6、TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性, 其中高剂量组与阳性对照组比较无统计学意义, 见表 2。

表 1 各组大鼠水迷宫测试比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Comparison of water maze test rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg kg ⁻¹)	潜伏期/s			穿台次数/次		
		创伤前	给药后 3 d	给药后 7 d	创伤前	给药后 3 d	给药后 7 d
假手术	—	37.84 ± 7.56	30.91 ± 7.18	30.11 ± 6.02	14.91 ± 2.98	14.88 ± 2.77	15.68 ± 1.90
模型	—	38.13 ± 7.62	81.34 ± 12.26*	72.31 ± 12.46*	14.76 ± 1.95	6.63 ± 1.21*	6.62 ± 1.22*
柴胡皂苷 A	5	38.01 ± 7.60	81.10 ± 10.02*	63.04 ± 10.60*#	15.06 ± 2.01	5.91 ± 1.05*	8.28 ± 1.65*#
	10	37.93 ± 7.58	81.09 ± 11.21*	52.19 ± 8.43*#&	15.03 ± 2.00	6.06 ± 1.11*	10.84 ± 1.71*#&
	20	38.20 ± 7.64	80.34 ± 11.06*	43.06 ± 6.61*#&@	14.97 ± 1.99	6.42 ± 1.13*	12.64 ± 1.75*#&@
3-甲基腺嘌呤	15	38.44 ± 7.71	80.27 ± 11.15*	40.84 ± 6.24*#&@	15.08 ± 1.91	6.35 ± 1.14*	13.92 ± 1.74*#&@

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与柴胡皂苷 A 5 mg kg⁻¹ 组比较: & $P < 0.05$; 与柴胡皂苷 A 10 mg kg⁻¹ 组比较: @ $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs sham-operated group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs saikosaponin A 5 mg kg⁻¹ group; @ $P < 0.05$ vs saikosaponin A 10 mg kg⁻¹ group

表 2 各组大鼠海马组织 BDNF 含量及相关炎症因子比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Comparison of BDNF content and related inflammatory factors in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	BDNF/(ng mL ⁻¹)	IL-6/(pg g ⁻¹)	TNF- α /(pg g ⁻¹)
假手术	—	0.729 ± 0.09	44.06 ± 2.34	55.91 ± 2.81
模型	—	0.303 ± 0.04*	83.93 ± 6.98*	93.64 ± 7.06*
柴胡皂苷 A	5	0.411 ± 0.04*#	72.17 ± 6.02*#	82.38 ± 8.72*#
	10	0.501 ± 0.05*#&	65.09 ± 4.84*#&	71.39 ± 6.56*#&
	20	0.590 ± 0.06*#&@	57.31 ± 2.71*#&@	63.06 ± 5.01*#&@
3-甲基腺嘌呤	15	0.610 ± 0.07*#&@	54.66 ± 2.03*#&@	61.87 ± 4.92*#&@

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与柴胡皂苷 A 5 mg kg⁻¹ 组比较: & $P < 0.05$; 与柴胡皂苷 A 10 mg kg⁻¹ 组比较: @ $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs sham-operated group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs saikosaponin A 5 mg kg⁻¹ group; @ $P < 0.05$ vs saikosaponin A 10 mg kg⁻¹ group

3.3 柴胡皂苷 A 对大鼠海马区组织损伤的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠海马组织神经细胞损坏严重, 呈现细胞破裂、细胞核固缩等状态; 与模型组相比, 经过柴胡皂苷 A 处理过的各组大鼠海马组织损伤得到一定的恢复, 见图 1。

3.4 柴胡皂苷 A 对大鼠海马组织自噬的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠出现海马神经元线粒体损伤、染色质固缩、自噬泡较多等现象, 海马组织 LC3 II/LC3 I、Beclin-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 柴胡皂苷 A 各剂量组的海马神经元结构得到恢复, 自噬体减少, 海马组织 LC3 II/LC3 I、Beclin-1 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$), 且呈现一定的剂量相关性, 其中

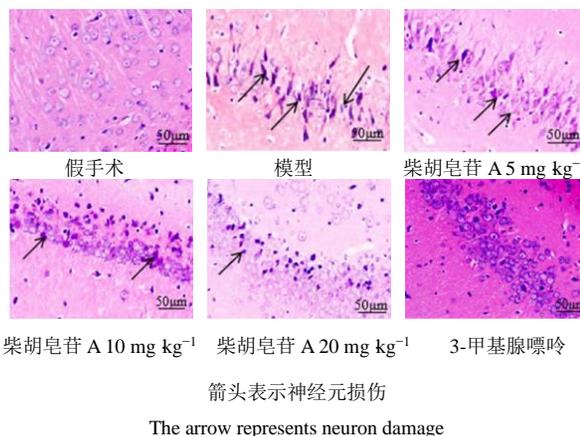


图 1 大鼠海马组织苏木精 - 伊红切片图 ($\times 200$)
Fig. 1 Section of hematoxylin-eosin in rat hippocampus ($\times 200$)

箭头表示神经元损伤
The arrow represents neuron damage

高剂量组与阳性对照组比较无统计学意义, 见图 2、3 和表 3。

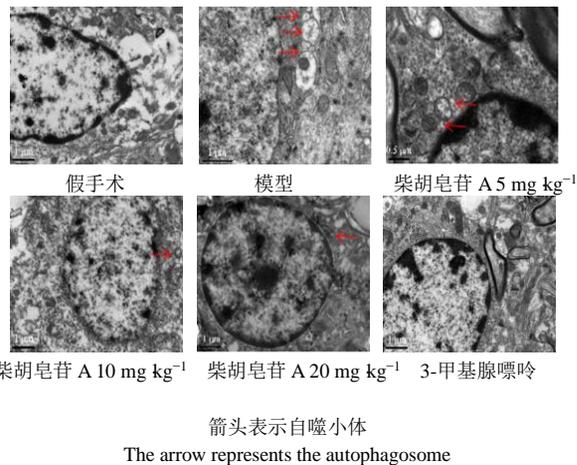


图 2 各组大鼠海马组织自噬情况 (×500)

Fig. 2 Hippocampal autophagy of rats in each group (×500)

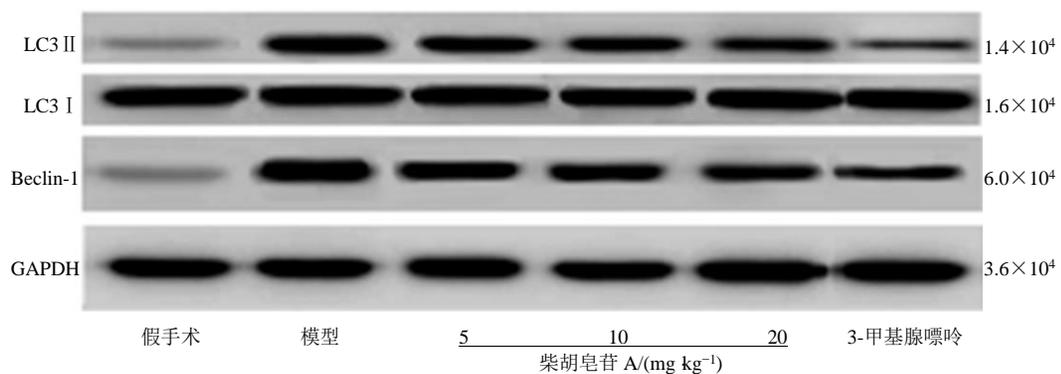


图 3 各组大鼠海马组织自噬相关蛋白表达水平比较

Fig. 3 Comparison of autophagy related protein expression levels in hippocampus of rats in each group

表 3 各组大鼠海马组织自噬相关蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Comparison of autophagy related protein expression levels in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	LC3 II/LC3 I	Beclin-1/GAPDH
假手术	—	0.17 ± 0.03	0.22 ± 0.03
模型	—	0.98 ± 0.16*	1.03 ± 0.10*
柴胡皂苷 A	5	0.73 ± 0.14*#	0.82 ± 0.16*#
	10	0.52 ± 0.10*#&	0.63 ± 0.07*#&
	20	0.30 ± 0.06*#&@	0.40 ± 0.06*#&@
3-甲基腺嘌呤	15	0.27 ± 0.05*#&@	0.36 ± 0.04*#&@

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与柴胡皂苷 A 5 mg kg⁻¹ 组比较: & $P < 0.05$; 与柴胡皂苷 A 10 mg kg⁻¹ 组比较: @ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham-operated group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs saikosaponin A 5 mg kg⁻¹ group; @ $P < 0.05$ vs saikosaponin A 10 mg kg⁻¹ group

额叶、小脑等多个组织损伤, 海马位于丘脑与内侧额叶之间, 是大脑中学习和记忆的重要区域, CA1 是海马组织易损区^[16]。有研究显示, 颅脑损伤后抑制海马区域神经细胞凋亡, 可有效改善认知障碍

3.5 柴胡皂苷 A 对大鼠海马组织 AMPK/mTORC1 通路相关蛋白表达的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠海马组织 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平明显升高, p-mTORC1/mTORC1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 柴胡皂苷 A 低、中、高剂量组大鼠海马组织 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平明显降低, p-mTORC1/mTORC1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性, 其中高剂量组与阳性对照组比较无统计学意义, 见图 4、表 4。

4 讨论

脑外伤是由头部受到冲击或颠簸引起的, 跌倒、机动车事故等均是导致脑外伤的主要原因, 常会引发暂时性、长期性神经功能障碍, 具有较高的死亡率和致残率^[15]。颅脑损伤会引起丘脑、海马、

建立脑外伤大鼠对于脑外伤相关机制、预防和治疗等方面的研究具有重要的意义, Gao 等^[18]通过控制性皮质撞击法建立大鼠脑外伤模型较接近临床脑外伤的表现, 模型构建成功率较高, 且模型

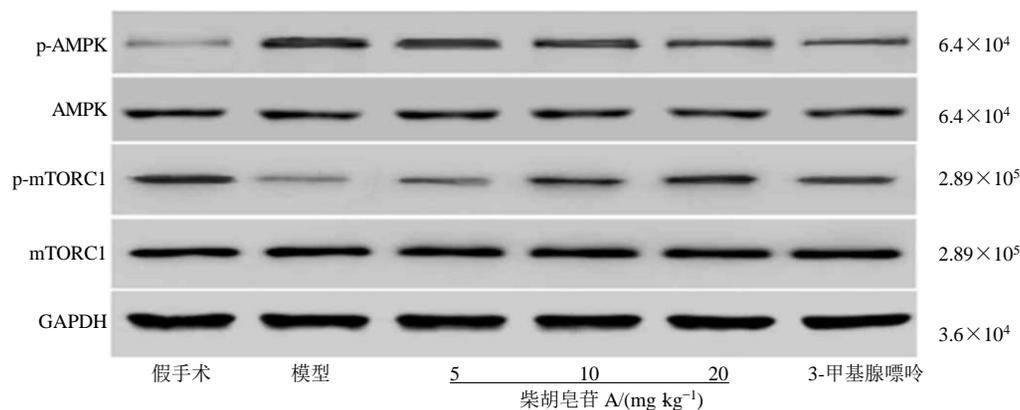


图 4 各组大鼠海马组织 AMPK/mTORC1 相关蛋白相对表达情况

Fig. 4 Relative expression of AMPK/mTORC1 related protein in hippocampus of rats in each group

表 4 各组大鼠海马组织 AMPK/mTORC1 相关蛋白相对表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Relative expression of AMPK/mTORC1 related protein in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	p-AMPK/AMPK	p-mTORC1/mTORC1
假手术	—	0.14 ± 0.08	1.03 ± 0.13
模型	—	1.12 ± 0.15*	0.18 ± 0.03*
柴胡皂苷 A	5	0.84 ± 0.08*#	0.27 ± 0.07*#
	10	0.67 ± 0.06*#&	0.49 ± 0.10*#&
	20	0.52 ± 0.05*#&@	0.71 ± 0.08*#&@
3-甲基腺嘌呤	15	0.46 ± 0.03*#&@	0.77 ± 0.09*#&@

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与柴胡皂苷 A 5 mg kg⁻¹ 组比较: & $P < 0.05$; 与柴胡皂苷 A 10 mg kg⁻¹ 组比较: @ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham-operated group; # $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs saikosaponin A 5 mg kg⁻¹ group; @ $P < 0.05$ vs saikosaponin A 10 mg kg⁻¹ group

组大鼠神经功能及认知受损严重。本研究采用此方法建立脑外伤大鼠模型,结果显示,与假手术组相比,脑损伤后各组大鼠的潜伏期显著升高,穿台次数显著降低,提示脑外伤会严重降低大鼠的学习能力及记忆能力;与假手术组相比,模型组大鼠海马组织 BDNF 含量显著降低,IL-6、TNF- α 水平显著升高,海马组织神经细胞损坏严重、呈现细胞破裂、细胞核固缩等状态,BDNF 是一类与神经系统可塑性相关的分泌性蛋白,IL-6、TNF- α 是由巨噬细胞等产生的促炎因子,在一定程度上可反映大鼠认知水平的损害程度^[19-20],提示脑外伤对大鼠神经功能、认知功能造成一定的损害,引发脑部炎症反应并损坏脑部海马组织。

近些年的研究发现脑部损伤与神经元自噬之间联系密切,细胞自噬是细胞对细胞内物质进行周转的一种生理活动,利用自噬体吞噬异物及受损的细胞器等,通过与溶酶体结合降解吞噬的物质供机体重复利用,自噬活动稳定有利于调节细胞内部稳

定、维持细胞正常生命活动,但炎症反应、神经系统损伤等引起的自噬紊乱常会对机体造成一定的损害^[21]。柴胡皂苷 A 是柴胡的主要活性成分,资料显示其具有一定的抗炎、抗病毒、抗惊厥、减轻脑损伤引起的脑水肿、神经功能障碍及认知功能障碍等作用,Cui 等^[22]研究发现柴胡皂苷 A 具有一定的调控细胞自噬的作用,可能与脑外伤引起的大鼠神经系统损害及海马神经元损伤具有一定的关系。LC3 II/LC3 I、Beclin-1 蛋白的测定可侧面反应细胞自噬程度^[23],本研究结果显示,与假手术组相比,模型组大鼠出现海马神经元线粒体损伤、染色质固缩、自噬泡较多等现象,海马组织 LC3 II/LC3 I、Beclin-1 蛋白表达水平显著升高,表明脑外伤会引发海马神经元自噬增加,可能是由于脑外伤后,神经元会出现细胞裂解、细胞肿胀等异常变化,大鼠脑损伤后神经细胞内溶酶体增多、自噬体生成较多,引发过度自噬,造成细胞代谢平衡被破坏、大量神经元死亡^[24]。本研究用柴胡皂苷 A 处理脑外伤

模型大鼠, 研究结果显示, 与模型组相比, 柴胡皂苷 A 各剂量组潜伏期呈现逐渐下降的趋势, 穿台次数呈现逐渐升高的趋势, BDNF 含量依次升高, IL-6、TNF- α 表达依次降低, 海马组织自噬情况及自噬相关蛋白表达水平显著降低, 且呈现一定的剂量效应关系, 与阳性对照组效果相当, 提示柴胡皂苷 A 有一定的降低炎症因子释放及调节大鼠海马神经元自噬作用, 对于脑外伤引起的认知功能障碍、神经系统损伤具有缓解作用, 可能通过抗炎、缓解神经元损伤、减少神经元死亡、维持细胞代谢平衡来发挥神经保护作用及神经元自噬调节作用。

资料显示 AMPK-mTOR 通路是细胞自噬调控通路之一, mTORC1 是 mTOR 的复合物形式之一, mTORC1 的激活可阻断自噬相关基因的表达, 进而抑制自噬的启动, 而 AMPK 的激活可抑制 mTORC1 活性, 因此推测柴胡皂苷 A 的神经元自噬调节作用可能与 AMPK-mTOR 通路存在某种关联^[25-26]。本研究结果显示, 与模型组相比, 柴胡皂苷 A 各剂量组大鼠海马组织 p-AMPK/AMPK 表达水平显著降低, p-mTORC1/mTORC1 蛋白表达水平显著升高, 且呈现一定的剂量相关性, 提示柴胡皂苷 A 可显著降低 AMPK 的磷酸化水平并提高 mTORC1 的表达水平, 资料显示 AMPK 磷酸化水平降低具有抑制自噬标志蛋白 LC3 I 向 LC3 II 转化及促进 mTORC1 激活的作用, 激活的 mTORC1 可抑制自噬起始分子 ULK1 的转录, 抑制自噬小泡的生成, 从而调节细胞自噬水平^[27], 表明柴胡皂苷 A 可能通过调节 AMPK-mTORC1 通路相关蛋白的表达来发挥神经元自噬调节作用。

综上所述, 柴胡皂苷 A 具有缓解脑外伤引起的认知功能障碍、炎症反应、海马组织损伤等作用, 具有一定的调节脑部海马神经元自噬的作用, 可能通过抑制 AMPK、激活 mTORC1 通路来发挥调节作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Siig Hausted H, Nielsen J F, Odgaard L. Epilepsy after severe traumatic brain injury: frequency and injury severity [J]. *Brain Inj*, 2020, 34(7): 889-894.
- [2] Gorgoraptis N, Zaw-Linn J, Feeney C, et al. Cognitive impairment and health-related quality of life following traumatic brain injury [J]. *NeuroRehabilitation*, 2019, 44(3): 321-331.
- [3] Yürüker V, Nazıroğlu M, Şenol N. Reduction in traumatic brain injury-induced oxidative stress, apoptosis, and calcium entry in rat hippocampus by melatonin: Possible involvement of TRPM2 channels [J]. *Metab Brain Dis*, 2015, 30(1): 223-231.
- [4] Zhang L, Ding K, Wang H, et al. Traumatic brain injury-induced neuronal apoptosis is reduced through modulation of PI3K and autophagy pathways in mouse by FTY720 [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(1): 131-142.
- [5] Xu K, Wu F, Xu K, et al. NaHS restores mitochondrial function and inhibits autophagy by activating the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway to improve functional recovery after traumatic brain injury [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 286: 96-105.
- [6] Sun L, Zhao M, Wang Y, et al. Neuroprotective effects of miR-27a against traumatic brain injury via suppressing FoxO3a-mediated neuronal autophagy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 1141-1147.
- [7] 杨伟科, 孙林林, 李小亮. 姜黄素通过 PI3K/AKT 信号通路激活细胞自噬对大鼠颅脑损伤的神经保护作用 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2020, 25(9): 613-617.
- [8] Ma R D, Zhou G J, Qu M, et al. Corticosterone induces neurotoxicity in PC12 cells via disrupting autophagy flux mediated by AMPK/mTOR signaling [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2020, 26(2): 167-176.
- [9] 张列亮, 徐国海, 华福洲, 等. 柴胡皂苷 A 对脑创伤大鼠认知功能的改善及其机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(1): 107-110.
- [10] 刘剑, 韩梦琪, 谭荣. 控制性皮质撞击法建立大鼠脑外伤模型的昏迷及认知障碍观察 [J]. *中国康复理论与实践*, 2015, 21(10): 1124-1127.
- [11] 侯蕊, 曹俊杰, 王义围, 等. 柴胡皂苷 A 对脑损伤大鼠认知功能的干预及机理研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(22): 2628-2630.
- [12] 刘娜娜, 贾学昭, 王荃, 等. 艾灸对慢性心力衰竭大鼠心肌细胞自噬功能的影响 [J]. *针刺研究*, 2019, 44(1): 25-30.
- [13] Blose M, Pickens L. The effect of adolescent nicotine exposure on Morris water maze spatial learning and retention in the adult male Long-Evans rat: A pilot study [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2015, 49: 134.
- [14] 刘仁超, 黄金, 刘仁飞, 等. 电针神庭百会对脑缺血再灌注后认知障碍大鼠海马区自噬的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(6): 1345-1348.
- [15] Gardner R C, Dams-O'Connor K, Morrissey M R, et al. Geriatric traumatic brain injury: Epidemiology, outcomes, knowledge gaps, and future directions [J]. *J Neurotrauma*, 2018, 35(7): 889-906.

- [16] Broussard J I, Redell J B, Zhao J, *et al.* Mild traumatic brain injury decreases spatial information content and reduces place field stability of hippocampal CA1 neurons [J]. *J Neurotrauma*, 2020, 37(2): 227-235.
- [17] 陈坤黄寓, 王东, 杨欢, 等. 电针对颅脑损伤大鼠海马 CA1 区细胞凋亡的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2019, 35(7): 61-64.
- [18] Gao Y Y, Li J, Wu L Y, *et al.* Tetrahydrocurcumin provides neuroprotection in rats after traumatic brain injury: autophagy and the PI3K/AKT pathways as a potential mechanism [J]. *J Surg Res*, 2016, 206(1): 67-76.
- [19] 孙新亭, 迟茜茜, 孙晓静. 通窍活血汤对脑外伤大鼠认知功能障碍的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2015, 21(12): 1379-1384.
- [20] 徐旭, 李志伟, 郭雅琼, 等. 重症颅脑损伤后 TNF- α 及 IL-6 在急性心肌功能损害中的作用 [J]. 重庆医学, 2015, 44(6): 793-794.
- [21] Liu J, Zhu Z K, Wang L B, *et al.* Functional suppression of Ripk1 blocks the NF- κ B signaling pathway and induces neuron autophagy after traumatic brain injury [J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 472(1/2): 105-114.
- [22] Cui L H, Li C X, Zhuo Y Z, *et al.* Saikosaponin A inhibits the activation of pancreatic stellate cells by suppressing autophagy and the NLRP3 inflammasome via the AMPK/mTOR pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110216.
- [23] 刘俊杰, 李建民, 赵雅宁, 等. PI3K-mTOR 信号通路对蛛网膜下腔出血大鼠海马区神经细胞自噬的调控作用 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2017, 38(2): 188-192.
- [24] Zhang N, Zhi X Y, Zhao J, *et al.* Mesoporous silica induces hippocampal neurons cell autophagy through AMPK/mTOR/P70S6K signaling pathway [J]. *Environ Toxicol*, 2020, 35(2): 176-187.
- [25] Wang G Y, Wang T Z, Zhang Y Y, *et al.* Schizandrin protects against OGD/R-induced neuronal injury by suppressing autophagy: involvement of the AMPK/mTOR pathway [J]. *Molecules*, 2019, 24(19): E3624.
- [26] Sun B, Ou H, Ren F, *et al.* Propofol inhibited autophagy through Ca²⁺/CaMKK β /AMPK/mTOR pathway in OGD/R-induced neuron injury [J]. *Mol Med*, 2018, 24(1): 58.
- [27] 刘颖, 苏杰, 王林洪. 自噬在视网膜母细胞瘤 Y79 细胞顺铂耐药中的作用及其机制 [J]. 肿瘤防治研究, 2018, 45(8): 517-522.

[责任编辑 高源]