

葛根素调节 AMPK-mTOR 信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究

黄亚光¹, 王金凤², 杜利鹏¹, 张 微^{3*}, 梅志刚^{1,3*}

1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002

2. 三峡大学第三临床医学院 国药葛洲坝中心医院, 湖北 宜昌 443002

3. 三峡大学中医医院宜昌市中医医院, 湖北 宜昌 443000

摘要:目的 探讨葛根素通过腺苷一磷酸活化蛋白激酶 (AMPK)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)-Unc-51 样激酶 1 (Ulk1) 通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤的作用。方法 40 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组, 即假手术组、模型组及葛根素低、高剂量 (50、100 mg/kg) 组。各组大鼠连续给药 7 d, 末次给药 30 min 后, 采用线栓法制备大鼠大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型, 缺血 1.5 h 再灌注 24 h 后, 进行神经功能评分, TTC 染色观察脑梗死体积, 电镜观察自噬小体的形成, Western blotting 法检测海马组织中微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3)、p62、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、Ulk1、pS757-Ulk1 蛋白表达水平。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能评分显著增加, 脑梗死体积明显增大, 自噬小体增多, LC3-II/LC3-I 显著增加, p62 蛋白表达水平显著降低, p-AMPK 表达水平显著升高, p-mTOR 和 pS757-Ulk1 蛋白表达水平显著降低。与模型组比较, 葛根素各组大鼠的神经功能损伤明显改善, 脑梗死体积减小, 自噬小体减少, LC3-II/LC3-I 显著降低, p62 蛋白表达水平显著升高, p-AMPK 蛋白表达水平显著降低, p-mTOR 和 pS757-Ulk1 蛋白表达水平显著升高。结论 葛根素可能通过调控 AMPK-mTOR-Ulk1 信号通路抑制自噬的过度发生, 从而减轻脑缺血再灌注损伤的发生。

关键词: 葛根素; 脑缺血再灌注; 自噬; AMPK-mTOR-Ulk1 信号通路; 微管相关蛋白 1 轻链 3; p62

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)13-3127-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.019

Effect of puerarin on regulation of AMPK-mTOR signaling pathway to inhibit autophagy and alleviate focal cerebral ischemia reperfusion injury

HUANG Ya-guang¹, WANG Jin-feng², DU Li-peng¹, ZHANG Wei³, MEI Zhi-gang^{1,3}

1. Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China

2. The Third Clinical Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China

3. Yichang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Three Gorges University Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yichang 443000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of puerarin on the regulation of AMPK-mTOR signaling pathway to inhibit autophagy and alleviate focal cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** Forty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups: Sham group, model group, puerarin low-dose (50 mg/kg) group and puerarin high-dose (100 mg/kg) group. Pretreatment with puerarin for 7 d, then the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established 0.5 h after the last administration according to Longa's method. After 1.5 h of ischemia and 24 h of reperfusion, the neurological deficit scores were assessed, the infarct volume was calculated by TTC staining. The formation of autophagosome was observed by electron microscopy. The expression levels of LC3, p62, AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, Ulk1, and pS757-Ulk1 were detected by Western blotting. **Results** Compared with the Sham group, the neurological deficit scores and infarct volume in model group were significantly increased, the numbers of autophagosome increased, and the rate of LC3-II/LC3-I significantly increased, the expression level of p62 gradually decreased. The

收稿日期: 2019-04-02

基金项目: 湖北省宜昌市科技计划项目 (A18-301-25)

作者简介: 黄亚光 (1988—), 男, 湖北宜昌人, 在读硕士研究生, 研究方向为中医药防治脑病机制研究。E-mail: huyagu@163.com

*通信作者 张 微 (1966—), 男, 学士, 主任中医师, 研究方向为中医药防治脑病基础与临床研究。E-mail: zw.1966@163.com

梅志刚 (1977—), 男, 博士, 教授, 主要从事中医药防治脑病机制研究工作。E-mail: meizhigang@ctgu.edu.cn

expression of p-AMPK was markedly up-regulated, while the expression of p-mTOR and pS757-Ulk1 was significantly down-regulated. Compared with the model group, the neurological deficit scores and infarct volume were significantly reduced, the number of autophagosome and the rate of LC3-II/LC3-I decreased, the expression of p62 was significantly up-regulated, the expression of p-AMPK was markedly down-regulated, the levels of p-mTOR and pS757-Ulk1 were significantly up-regulated.

Conclusion Puerarin alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury may through suppressing autophagy via the AMPK-mTOR-Ulk1 signaling pathway.

Key words: puerarin; cerebral ischemia-reperfusion; autophagy; AMPK-mTOR-Ulk1 signal pathway; LC3; p62

脑血管疾病已成为世界公认的第 2 大死亡原因^[1],同时也是我国的主要死亡病因^[2]。缺血性脑病是最常见的脑血管疾病,尤其是缺血性脑卒中,占全部脑血管性疾病的 60%~80%^[3-4]。目前,缺血性脑病的主要治疗手段是溶栓治疗,然而在溶栓过程中,血流再次灌注可能给受损组织带来二次伤害,即脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI),其涉及氧化应激、炎症、自噬、凋亡、内质网应激等一系列病理改变^[5-7]。其中,自噬已被证实在 CIRI 中发挥着越来越重要的作用。葛根素是从葛根中提取的一种异黄酮类单体化合物,已被广泛应用于缺血性脑病的临床治疗中,且具有良好的疗效。大量的研究证实,葛根素可以通过发挥抗炎^[8]、抗细胞凋亡^[9]、改善微循环^[10]、抑制自噬^[11]等作用减轻 CIRI,然而其具体作用机制尚不清楚。

腺苷一磷酸活化蛋白激酶(AMPK)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是维持代谢稳态的关键能量传感器,已被证实可诱导自噬的激活。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是 AMPK 下游重要的信号分子,在自噬调控中发挥着负向调节作用^[12-13]。研究表明,AMPK 和 mTOR 通过调节 Unc-51 样激酶 1(Ulk1)的协同磷酸化,调控脑缺血诱导的自噬,脑缺血时 AMPK 被激活,进而抑制 mTOR 的磷酸化,致使 mTOR 与 Ulk1 的 Ser757 位点结合减少而增加 Ulk1-AMPK 的相互作用,使 Ulk1 活化,诱导自噬的发生^[14-15]。因此,本研究从 AMPK-mTOR-Ulk1 信号通路探讨葛根素干预调节自噬、防治缺血性脑卒中的潜在机制,为其临床推广应用提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

健康雄性 SD 成年大鼠 40 只,SPF 级,体质量 250~280 g,三峡大学医学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK(鄂)2011-0012。

1.2 药物

葛根素注射液(批号 FALT150901,规格 0.2 g/

支)购自华北制药集团有限责任公司,使用前用生理盐水稀释至所需浓度。

1.3 试剂

2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)试剂购自美国 Sigma 公司;山羊抗兔 GAPDH 购自武汉博士德生物有限公司;兔多抗微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)购自美国 Abcam 公司;兔多抗 p62、兔单抗 AMPK、兔单抗 p-AMPK、兔单抗 mTOR、兔单抗 Ulk1、兔单抗 pS757-Ulk1 均购自英国 Cell Singling 公司;10%水合氯醛均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.4 仪器

DYY-7C 电泳仪及 DYCZ-40 电转仪,北京六一仪器厂;TS-1 水平摇床,江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司;LD25-2 型低速离心机,北京京立离心机有限公司;H-7500 透射电子显微镜,日本日立公司;倒置荧光显微镜,德国 Leica 公司。

2 方法

2.1 分组及给药

将 40 只大鼠随机分为假手术组、模型组及葛根素低、高剂量(50、100 mg/kg)组,每组各 10 只。适应性喂养 3 d 后进行预处理,葛根素各剂量组大鼠每天分别 ip 葛根素 50、100 mg/kg,共给药 7 d。假手术组与模型组大鼠 ip 给予相应的生理盐水 5 mL/kg。

2.2 脑缺血再灌注损伤模型的制备

参照 Longa 等^[16]的方法,应用线栓法制备大鼠右侧大脑中动脉栓塞(MCAO)模型。大鼠末次给药 30 min 后,ip 10%水合氯醛(3.5 mL/kg)麻醉。待麻醉成功后,将大鼠仰卧固定于操作板上,去除颈部细毛,酒精消毒颈部皮肤,沿颈正中中线切一小口,钝性分离颈前肌群,暴露出右侧颈总、颈外及颈内动脉。结扎颈总动脉近心端和颈外动脉,动脉夹夹住颈总动脉远心端(避开迷走神经和气管)。在距颈总和颈内、外动脉分叉 5 mm 处剪 1 个“V”型小口,将线栓从开口处插入颈内动脉,插入深度 18~20 mm(有阻力感觉),结扎颈内和颈总动脉远

心端以固定线栓。逐层缝合切口，碘伏消毒。术后将大鼠置于加热垫上，缺血 90 min 后拔出线栓，再灌注 24 h。假手术组大鼠只分离血管，不插栓线，其他操作相同。

2.3 检测指标

2.3.1 神经功能评分 参照 Longa 等^[16]法进行神经功能障碍评分。0 分：无神经功能活动障碍；1 分：提尾时缺血侧前肢不能伸展；2 分：大鼠不能直行，向左侧转圈；3 分：行走困难，行走时向左侧转圈、倾倒；4 分：严重意识障碍，无法行走或陷入昏迷。神经功能评分在 0~3 分的大鼠表明造模成功，纳入下一步实验，评分为 4 分的剔除实验。

2.3.2 TTC 染色测定梗死体积 各组大鼠在缺血再灌注 24 h 后，每组随机选 3 只 ip 10%水合氯醛 1.5 mL 麻醉，断头取大脑，去嗅球、小脑和低位脑干，-20 ℃下冷冻 20 min 后沿冠状面将大脑切成厚度基本相同的 5 份，置于以 0.1 mol/L PBS 配制的 0.2% TTC 染色液中，37 ℃避光孵育 30 min 后置于 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h，取出切片吸干，拍照。采用 Image-pro plus 6.0 图像分析软件计算大鼠的脑梗死体积，计算梗死组织百分比（梗死脑组织百分比=梗死区体积/大脑体积）。

2.3.3 透射电镜检测自噬小体 再灌注 24 h 后，每组随机选 2 只大鼠 ip 10%水合氯醛 1.5 mL 进行麻醉，用生理盐水灌注至大鼠肝脏及前肢变白后继续灌注 4%多聚甲醛-2.5%戊二醛溶液，灌注成功后断头取脑，分离出脑组织，于缺血侧海马靠近 CA1 区取一块体积约为 1 mm³ 的脑组织块，放置于 2.5%戊二醛溶液保存以固定。用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗脑组织块 3 次后置于 1%锇酸固定液中，在 4 ℃条件下固定 1 h。然后将组织块在梯度乙醇溶液中脱水并包埋在环氧树脂中，并在 -80 ℃下聚合 24 h。用超薄切片机将组织块制作成 60~70 nm 厚的超薄切片，然后用 3%柠檬酸铅染色，随后使用透射电子显微镜观察自噬小体的形成情况。

2.3.4 Western blotting 法检测 LC3、p62、AMPK、p-AMPK、mTOR、Ulk1 及 pS757-Ulk1 蛋白的表达 再灌注 24 h 后，每组随机选 3 只大鼠，麻醉后断头取脑，称取 0.25 g 海马组织进行样品制备，用 BCA 法测定蛋白浓度，取 40 μg 样品，以 10% SDS-PAGE 电泳进行分离，将分离的蛋白转移到 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉封闭 1 h，加入一抗后 4 ℃孵育过夜，TBST 充分洗膜 3 次（10 min/次）。将 PVDF 膜封入

二抗稀释液中，室温摇床孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次（10 min/次）。配制发光液，将发光液均匀滴在 PVDF 膜上，放入凝胶成像仪器内显影。以 GAPDH 为内参照，重复 3 次，用 Image J 软件进行灰度值分析。

2.4 统计学分析

所有实验数据均采用 SPSS 19.0 统计软件处理，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组数据比较采用单因素方差分析和 LSD 法。

3 结果

3.1 葛根素对 MCAO 大鼠神经功能缺损的影响

结果如表 1 所示，与假手术组比较，模型组大鼠均表现出严重的神经功能损伤情况（ $P < 0.01$ ）。与模型组比较，葛根素低、高剂量组大鼠的神经功能评分均显著降低（ $P < 0.05$ 、 0.01 ）。

3.2 葛根素对 MCAO 大鼠脑组织梗死体积的影响

染色结果如图 1 所示，白色部分表示脑梗死区域，红色部分表示非梗死区域。统计结果如表 2 所

表 1 脑缺血再灌注 24 h 后各组大鼠的神经功能评分（ $\bar{x} \pm s, n = 10$ ）

Table 1 Changes of neurological scores in rats after 24 h of reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	神经功能评分
假手术	—	0
模型	—	2.40 ± 0.16**
葛根素	50	1.90 ± 0.23 [#]
	100	1.70 ± 0.15 ^{##}

与假手术组比较：** $P < 0.01$ ；与模型组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ，表 2、3 同

** $P < 0.01$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group, same as tables 2 and 3

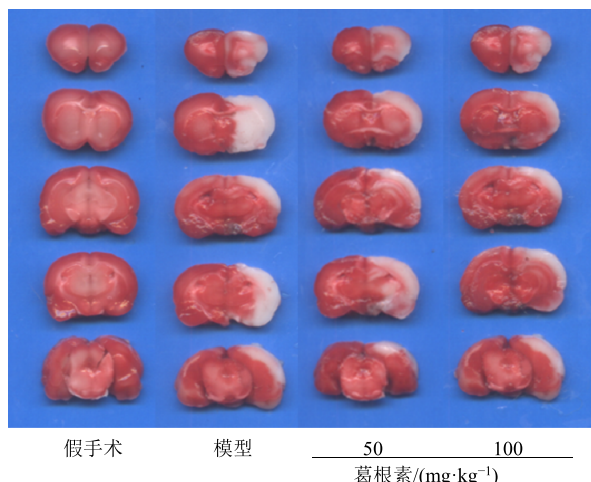


图 1 再灌注 24 h 后各组大鼠脑组织 TTC 染色结果

Fig. 1 TTC staining results in each group rats after 24 h of reperfusion

表 2 脑缺血再灌注 24 h 后各组大鼠脑梗死体积的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Changes of infarct volume in rats after 24 h of reperfusion ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	梗死体积/%
假手术	—	0
模型	—	19.14±0.85**
葛根素	50	16.33±0.88 [#]
	100	14.56±0.83 ^{##}

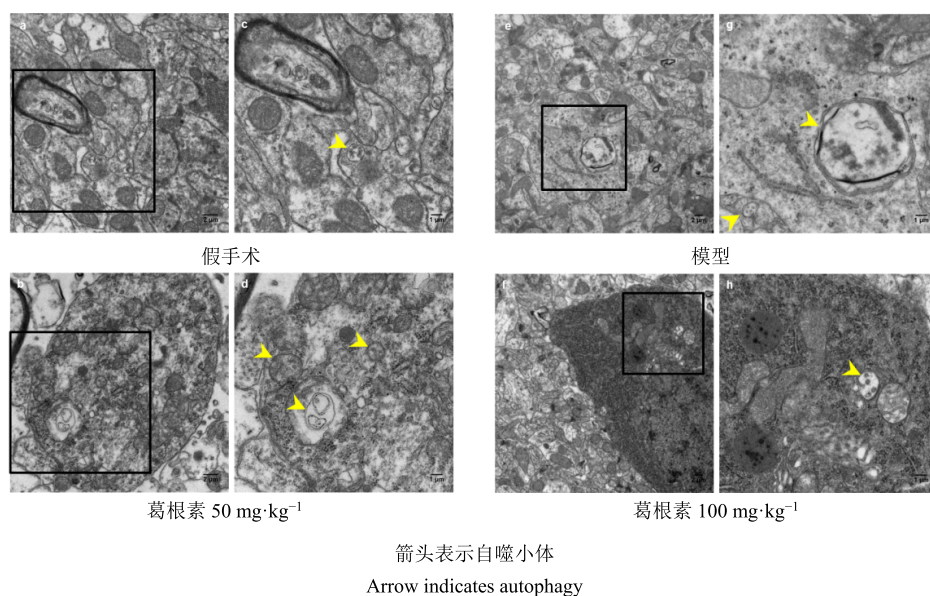


图 2 葛根素对 MCAO 大鼠脑组织缺血侧海马 CA1 区自噬小体形成的影响

Fig. 2 Effects of puerarin on formation of autophagosomes in CA1 area of ischemic hippocampus in MCAO rats

元相对正常,有较完整的细胞核、线粒体、溶酶体。而模型组大鼠脑组织缺血侧 CA1 区细胞形态破坏,神经元内出现较多空泡结构,并可见大量增加的溶酶体和自噬小体。与模型组比较,葛根素低、高剂量组大鼠 CA1 区自噬小体数量均减少,且细胞形态相对正常,可见相对完整的线粒体、溶酶体和内质网。

3.4 葛根素对 MCAO 大鼠脑组织缺血侧海马中 LC3 和 p62 蛋白表达的影响

结果如图 3 和表 3 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织缺血侧海马中 LC3-II/LC3-I 显著升高,而 p62 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$)。与模型组比较,葛根素低、高剂量组大鼠脑组织缺血侧海马中 LC3-II/LC3-I 显著降低, p62 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05, 0.01$)。

3.5 葛根素对 MCAO 大鼠脑组织缺血侧海马中 p-AMPK、p-mTOR 及 pS757-Ulk1 蛋白表达的影响

结果如图 4 和表 4 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织缺血侧海马中 p-AMPK 蛋白表达水

示,与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死体积显著增加 ($P<0.01$)。与模型组比较,葛根素低、高剂量组大鼠脑梗死体积均显著减少 ($P<0.05, 0.01$)。

3.3 葛根素对 MCAO 大鼠脑组织缺血侧海马 CA1 区自噬小体形成的影响

大鼠脑缺血再灌注 24 h 后,采用透射电镜法检测缺血侧海马 CA1 区的自噬小体形成情况,结果如图 2 所示,假手术组大鼠脑组织缺血侧 CA1 区神经

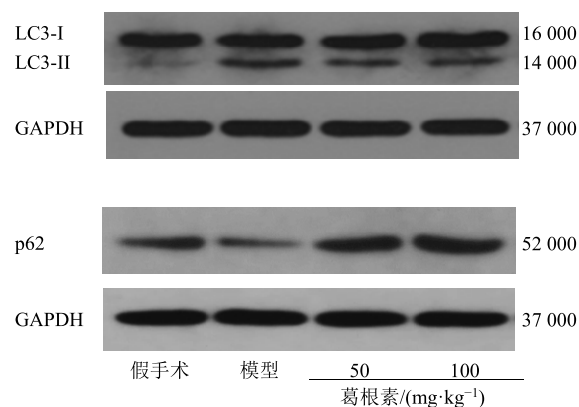


图 3 葛根素对 MCAO 大鼠脑组织缺血侧海马中 LC3 和 p62 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of puerarin on expression of LC3 and p62 in ischemic hippocampus of MCAO rats

平显著升高 ($P<0.01$), p-mTOR 和 pS757-Ulk1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05, 0.01$)。与模型组比较,葛根素低、高剂量组大鼠脑组织缺血侧海马

表 3 葛根素对 MCAO 大鼠脑组织缺血侧海马中 LC3 和 p62 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of puerarin on expression of LC3 and p62 in ischemic hippocampus of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量	
		LC3-II/LC3-I	p62
假手术	—	0.55±0.08	0.47±0.03
模型	—	1.24±0.20**	0.32±0.02**
葛根素	50	0.72±0.13 [#]	0.55±0.17 ^{##}
	100	0.53±0.14 ^{###}	0.68±0.03 ^{###}

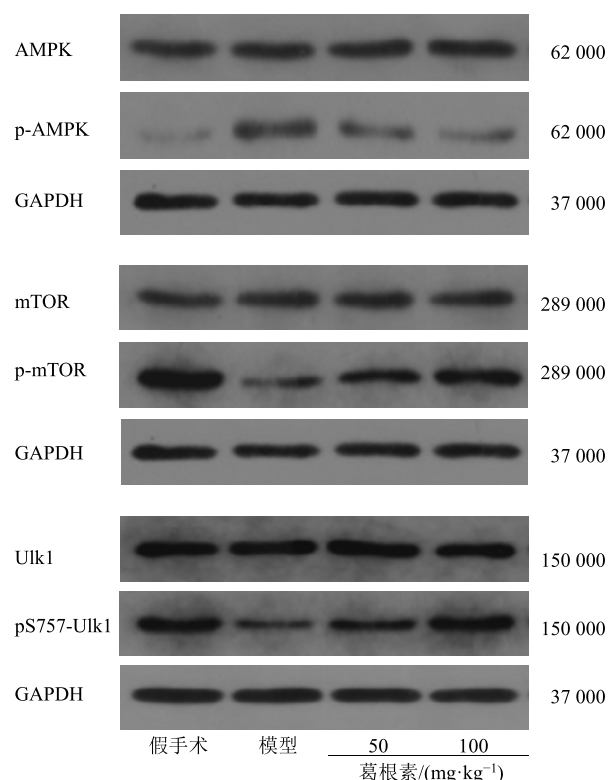


图 4 葛根素对 MCAO 大鼠脑组织缺血侧海马中 p-AMPK、p-mTOR 及 pS757-Ulk1 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of puerarin on expression of p-AMPK, p-mTOR, and pS757-Ulk1 in ischemic hippocampus of MCAO rats

p-AMPK 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)，葛根素高剂量组 p-mTOR 和 pS757-Ulk1 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.05$)，葛根素低剂量组 pS757-Ulk1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)，而 p-mTOR 蛋白表达水平有升高的趋势，但差异不显著。

4 讨论

缺血性脑病是由大脑血流供应中断引起的脑组织损伤或部分脑功能丧失的一类疾病。目前其治疗主要以溶栓为主，而溶栓可能会进一步加重或引起一系列新的病理改变^[17-18]，继而引起 CIRI，导致不

表 4 葛根素对 MCAO 大鼠脑组织缺血侧海马中 p-AMPK、p-mTOR 及 pS757-Ulk1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effects of puerarin on expression of p-AMPK, p-mTOR, and pS757-Ulk1 in ischemic hippocampus of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量		
		p-AMPK	p-mTOR	pS757-Ulk1
假手术	—	0.47±0.04	0.84±0.03	0.97±0.04
模型	—	0.82±0.05**	0.53±0.08**	0.49±0.02*
葛根素	50	0.58±0.06 [#]	0.71±0.04	0.67±0.06 [#]
	100	0.52±0.05 ^{###}	0.82±0.09 [#]	0.72±0.06 [#]

与假手术组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ；与模型组比较：[#] $P<0.05$

^{##} $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs Sham group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

可逆性脑损伤。因此，寻求防治 CIRI 发生的有效药物对缺血性脑病治疗和康复至关重要。葛根素是从葛根中提取的一种异黄酮类单体，在防治脑血管疾病方面疗效显著^[19-20]。本课题组前期针对葛根素防治缺血性脑卒中的一项 Meta 分析显示，葛根素注射液的疗效与对照组相比更加有效且安全^[21]。前期动物实验研究^[22]亦显示，葛根素注射液能显著降低白细胞介素-6 (IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等炎症因子的表达，提示葛根素防治 CIRI 的机制可能与胆碱能抗炎通路有关。此外，其他研究还显示葛根素在防治 CIRI 中优势明显，Wang 等^[20]研究发现，葛根素可通过减少星形胶质细胞的凋亡减轻 CIRI。Xu 等^[9]研究表明，葛根素能显著抑制 MCAO 模型大鼠 Caspase-3 活性，通过抗神经元细胞凋亡发挥神经保护作用。最新研究^[11]发现，葛根素能通过调控自噬防治 CIRI 的发生，然而其具体的作用机制尚不明晰。本研究探讨葛根素预处理对 CIRI 中的保护作用，并探明葛根素通过调控自噬发挥作用的潜在机制，结果显示，与模型组比较，葛根素预处理能显著改善缺血再灌注 24 h 后大鼠的神经功能缺损情况，减少脑梗死体积，提示葛根素预处理发挥了神经保护作用。

LC3 是自噬过程中最重要的蛋白分子，有 LC3-I 和 LC3-II 2 种存在形式，主要参与自噬体的形成^[23]。选择性自噬接头蛋白 p62 在泛素化蛋白和 LC3 之间起桥梁作用，在 C 端与泛素化蛋白结合，并通过 N 端与 LC3-II 结合从而参与自噬的降解^[24]。因此，同时检测 LC3 和 p62 可以反映自噬流的完整性。透射电镜结果显示，与模型组比较，葛根素预给药能明显抑制大鼠缺血侧海马 CA1 区自噬小体的形成。

Western blotting 结果显示,与模型组比较,葛根素预处理能显著逆转 LC3-II/LC3-I 的升高,同时上调 p62 蛋白的表达,故推测葛根素预处理可能通过抑制大鼠再灌注 24 h 后自噬的过度产生而发挥神经保护作用。目前,自噬在 CIRI 中的作用尚有争议,有研究^[25-26]认为缺血再灌注后自噬的激活有利于减轻 CIRI,然而也有研究^[27-28]显示,抑制缺血再灌注后的自噬能改善脑缺血引起的神经元的损伤。研究发现自噬的这种双重作用可能是由于再灌注的时间以及自噬的检测时间点不同造成的^[25]。目前已有的研究^[29]显示,自噬的峰值在 12~24 h,适度的自噬在脑缺血中可能发挥神经保护作用,而过度的自噬可能会诱导细胞死亡。基于上述理论,自噬的调节可能成为缺血性脑病潜在的治疗靶点。因此,深入探讨自噬在 CIRI 中的具体作用机制,可以为探讨缺血性脑病的发病机制及其用药提供新的思路。

研究显示,AMPK-mTOR-Ulk1 信号通路在调控自噬防治缺血性脑病中发挥着重要作用^[30-31]。AMPK 活化后激活磷酸化结节性硬化复合体(TSC1/2),进而抑制小 GTP 酶 Rheb,负向调控 mTOR^[32]。AMPK 通过磷酸化联接蛋白 raptor,阻碍 raptor 与 mTOR 或 mTOR 与底物的结合,同样可以抑制 mTOR 的活化^[33]。此外,AMPK 还可以直接磷酸化 mTOR 并导致自身磷酸化水平下降^[34]。目前,越来越多的研究证实,当细胞处于异常状态时,活化的 AMPK 能够抑制 mTOR 的活性,导致 mTOR 与 Ulk1 Ser757 位点的复合体解离,从而使 Ulk1 的激活,促进自噬的发生^[15,35-37]。本研究结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠 p-AMPK 的表达上调而 p-mTOR 的表达下调,证实 AMPK 与 mTOR 在自噬的调节中确实发挥着相反的作用。同时 pS757-Ulk1 的表达下降,与 p-mTOR 的表达趋势一致,提示在脑缺血再灌注 24 h 后,磷酸化的 AMPK 能够降低 mTOR 的磷酸化,抑制 mTOR 与 Ulk1 Ser757 位点的相互作用,进而促进自噬的发生。此外,本研究中,葛根素预处理能显著降低 p-AMPK 蛋白的表达水平,提高 p-mTOR 和 pS757-Ulk1 蛋白的表达水平,提示葛根素预处理可能通过抑制 AMPK 的活化促进 mTOR 的磷酸化,进而促进 Ser757-Ulk1 的磷酸化,增加 mTOR 与 Ser757 位点的结合,从而抑制自噬的过度发生来改善脑缺血再灌注损伤。

综上所述,本研究显示,葛根素预处理可能通过抑制 AMPK-mTOR-Ulk1 信号通路,进而抑制大

脑海马区的过度自噬,进而发挥对 CIRI 的保护作用。然而葛根素是否通过其他的信号通路调控自噬发挥作用仍有待进一步探索。明确其在 CIRI 中的具体作用机制,将为葛根素的临床应用提供理论依据,也为临床缺血性脑病的治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Benjamin E J, Virani S S, Callaway C W, *et al.* Heart disease and stroke statistics-2018 Update: A report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2018, 137(12): e67-e492.
- [2] Chen Z, Jiang B, Ru X, *et al.* Mortality of stroke and its subtypes in China: Results from a nationwide population-based survey [J]. *Neuroepidemiology*, 2017, 48(3/4): 95-102.
- [3] Chang L, Zhang J, Liu L, *et al.* Fatty acid binding protein 4 is associated with stroke risk and severity in patients with acute ischemic stroke [J]. *J Neuroimmunol*, 2017, doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.07.011.
- [4] 中国卒中学会,中国卒中学会神经介入分会,中华预防医学会卒中预防与控制专业委员会介入学组. 急性缺血性卒中血管内治疗中国指南 2018 [J]. 中国卒中杂志, 2018, 13(7): 706-729.
- [5] Xin Q, Ji B, Cheng B, *et al.* Endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia [J]. *Neurochem Int*, 2014, doi: 10.1016/j.neuint.2014.02.001.
- [6] Wu J, Chen Y, Yu S, *et al.* Neuroprotective effects of sulfiredoxin-1 during cerebral ischemia/reperfusion oxidative stress injury in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2017, doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.05.012.
- [7] He Q, Li Z, Wang Y, *et al.* Resveratrol alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through Sirt1-dependent autophagy induction [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, doi: 10.1016/j.intimp.2017.06.029.
- [8] Zhou F, Wang L, Liu P, *et al.* Puerarin protects brain tissue against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting the inflammatory response [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(23): 2074-2080.
- [9] Xu X, Zhang S, Zhang L, *et al.* The Neuroprotection of puerarin against cerebral ischemia is associated with the prevention of apoptosis in rats [J]. *Planta Med*, 2005, 71(7): 585-591.
- [10] 马鹏鹏,韩 硕,赵淑敏,等. 葛根素预处理对脑缺血再灌注大鼠皮质微血管和血脑屏障的预防性保护作用 [J]. 解剖学杂志, 2015, 38(6): 694-697.
- [11] Hongyun H, Tao G, Pengyue Z, *et al.* Puerarin provides a neuroprotection against transient cerebral ischemia by attenuating autophagy at the ischemic penumbra in

- neurons but not in astrocytes [J]. *Neurosci Lett*, 2017, doi: 10.1016/j.neulet.2017.02.009.
- [12] Fu L, Huang L, Cao C, *et al.* Inhibition of AMP-activated protein kinase alleviates focal cerebral ischemia injury in mice: Interference with mTOR and autophagy [J]. *Brain Res*, 2016, doi: 10.1016/j.brainres.2016.08.035.
- [13] Shen P, Hou S, Zhu M, *et al.* Cortical spreading depression preconditioning mediates neuroprotection against ischemic stroke by inducing AMP-activated protein kinase-dependent autophagy in a rat cerebral ischemic/reperfusion injury model [J]. *J Neurochem*, 2017, 140(5): 799-813.
- [14] Alers S, Löffler A S, Wesselborg S, *et al.* Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: Cross talk, shortcuts, and feedbacks [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(1): 2-11.
- [15] Kim J, Kundu M, Viollet B, *et al.* AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(2): 132-141.
- [16] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [17] Pan R, Cai J, Zhan L, *et al.* Buyang Huanwu decoction facilitates neurorehabilitation through an improvement of synaptic plasticity in cerebral ischemic rats [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2017, doi: 10.1186/s12906-017-1680-9.
- [18] 谭凌霄, 王金凤, 梅志刚. 沉默信息调节因子 1 信号通路在脑缺血一再灌注损伤中的保护作用 [J]. *中国脑血管病杂志*, 2016, 13(8): 442-445.
- [19] 郝春华, 孙双勇, 徐向伟, 等. 葛根素预处理对大鼠血栓栓塞性脑缺血急性期的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(6): 11-14.
- [20] Wang N, Zhang Y, Wu L, *et al.* Puerarin protected the brain from cerebral ischemia injury via astrocyte apoptosis inhibition [J]. *Neuropharmacology*, 2014, doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.004.
- [21] Zheng Q H, Li X L, Mei Z G, *et al.* Efficacy and safety of puerarin injection in curing acute ischemic stroke: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(1): e5803.
- [22] Liu X, Mei Z, Qian J, *et al.* Puerarin partly counteracts the inflammatory response after cerebral ischemia/reperfusion via activating the cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(34): 3203-3215.
- [23] Kuma A, Matsui M, Mizushima N. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: Caution in the interpretation of LC3 localization [J]. *Autophagy*, 2007, 3(4): 323-328.
- [24] Lin X, Li S, Zhao Y, *et al.* Interaction domains of p62: A bridge between p62 and selective autophagy [J]. *DNA Cell Biol*, 2013, 32(5): 220-227.
- [25] Buckley K M, Hess D L, Sazonova I Y, *et al.* Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAO, and embolic MCAO, murine models of stroke [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2014, doi: 10.1186/2040-7378-6-8.
- [26] Sun Y, Zhang T, Zhang Y, *et al.* Ischemic postconditioning alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury through activating autophagy during early reperfusion in rats [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(9): 1826-1840.
- [27] Jiang W W, Huang B S, Han Y, *et al.* Sodium hydrosulfide attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing overactivated autophagy in rats [J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7(11): 1686-1695.
- [28] Dong F, Yao R, Yu H, *et al.* Neuroprotection of Ro25-6981 against ischemia/reperfusion-induced brain injury via inhibition of autophagy [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(4): 743-752.
- [29] Tian F, Deguchi K, Yamashita T, *et al.* *In vivo* imaging of autophagy in a mouse stroke model [J]. *Autophagy*, 2010, 6(8): 1107-1114.
- [30] 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.
- [31] Xue T F, Ding X, Ji J, *et al.* PD149163 induces hypothermia to protect against brain injury in acute cerebral ischemic rats [J]. *J Pharmacol Sci*, 2017, 135(3): 105-113.
- [32] Wataya-Kaneda M. Mammalian target of rapamycin and tuberous sclerosis complex [J]. *J Dermatol Sci*, 2015, 79(2): 93-100.
- [33] Gwinn D M, Shackelford D B, Egan D F, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(2): 214-226.
- [34] Tao R, Gong J, Luo X, *et al.* AMPK exerts dual regulatory effects on the PI3K pathway [J]. *J Mol Signal*, 2010, doi: 10.1186/1750-2187-5-1.
- [35] Hwang J Y, Gertner M, Pontarelli F, *et al.* Global ischemia induces lysosomal-mediated degradation of mTOR and activation of autophagy in hippocampal neurons destined to die [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(2): 317-329.
- [36] Russell R C, Tian Y, Yuan H, *et al.* ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(7): 741-750.
- [37] Tian W, Li W, Chen Y, *et al.* Phosphorylation of ULK1 by AMPK regulates translocation of ULK1 to mitochondria and mitophagy [J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(15): 1847-1854.