

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.21.004

右美托咪定神经保护作用的自噬机制研究*

唐莹¹ 李新梅² 王雪¹ 张志杰¹ 陈华永¹ 王士雷^{3Δ}

(1 潍坊市益都中心医院麻醉科 山东 潍坊 262500;

2 潍坊市益都中心医院内镜室 山东 潍坊 262500;3 青岛大学附属医院麻醉科 山东 青岛 266000)

摘要 目的:探讨右美托咪定发挥神经保护作用的细胞自噬和线粒体自噬机制。**方法:**通过对 SH-SY5Y 细胞进行氧糖剥夺再灌注模拟全脑的缺血再灌注损伤,将细胞随机分为 7 组:(1)C 组:对照组;(2)OGD/R 组:氧糖剥夺再灌注损伤组;(3)DEX 组:右美托咪定组;(4)3MA 组:3-甲基腺嘌呤组;(5)D+3MA 组;(6)RAPA 组:雷帕霉素组;(7)D+RAPA 组。**结果:**与 OGD/R 组相比,DEX 组、3MA 组、D+3MA 组的细胞活性、电镜下完整线粒体的数量、自噬体数量明显好于 OGD/R 组($P<0.05$);RAPA 组与 OGD/R 组相比上述指标无明显差异($P>0.05$);而 RAPA 中加入右美托咪定以后,可以部分逆转 RAPA 的作用,细胞活性增加,完整线粒体数量增加,自噬体数量减少($P<0.05$)。免疫印迹结果显示,与 OGD/R 组相比,DEX 组、3MA 组、D+3MA 组 LC3II/LC3I、Beclin 1 表达减少,BCL-2、P62、TOM20 的表达增加,RAPA 组各种自噬蛋白的表达与 OGD/R 组相比没有统计学意义,当应用右美托咪定之后逆转了各种蛋白的表达($P<0.05$)。**结论:**右美托咪定通过减少过度的细胞自噬和线粒体自噬发挥神经保护作用。

关键词:右美托咪定;线粒体自噬;自噬;缺血再灌注损伤

中图分类号:R743;R-33;R614 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)21-4019-06

Research of Autophagy for Neuroprotection of Dexmedetomidine*

TANG Ying¹, LI Xin-mei², WANG Xue¹, ZHANG Zhi-jie¹, CHEN Hua-yong¹, WANG Shi-lei^{3Δ}

(1 Department of Anesthesiology, Weifang Yidu Central Hospital, Weifang, Shandong, 262500, China;

2 Department of Endoscopy, Weifang Yidu Central Hospital, Weifang, Shandong, 262500, China;

3 Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266000, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the mechanism of autophagy and mitophagy in which dexmedetomidine exerts neuroprotective effects. **Methods:** The SH-SY5Y cells suffering oxygen and glucose deprivation/reperfusion were used to simulate ischemia-reperfusion injury of the whole brain, and the cells were randomly divided into 7 groups: (1) Group C: control group; (2) OGD/R group: oxygen and glucose deprivation/reperfusion injury group; (3) DEX group: dexmedetomidine group; (4) 3MA group: 3-methyladenine group; (5) D+3MA group; (6) RAPA group: rapamycin group; (7) D+RAPA group. **Results:** Compared with the OGD/R group, the activity of cells, the number of intact mitochondria and autophagosomes of the DEX group, 3MA group, and D+3MA group were significantly better than those of OGD/R group ($P<0.05$); There is no significant difference between RAPA group and OGD/R group in the above indicators ($P>0.05$); While dexmedetomidine was added to RAPA, the effect of RAPA could be partially reversed including the addition of cell activity and the number of intact mitochondria, the decrease of the number of autophagosomes ($P<0.05$). Immunoblotting results showed that compared with the OGD/R group, the expression of LC3II/LC3I and Beclin 1 in the DEX group, 3MA group, DEX+3MA group reduced, the expression of BCL-2, P62, TOM20 increased. There was no statistical significance in the expression of various autophagy proteins in the RAPA group Compared with the OGD/R group. When dexmedetomidine was applied, the expression of various proteins was reversed ($P<0.05$). **Conclusion:** Dexmedetomidine exerts neuroprotective effects by reducing excessive autophagy and mitophagy.

Key words: Dexmedetomidine; Mitophagy; Autophagy; Ischemia/reperfusion injury

Chinese Library Classification (CLC): R743; R-33; R614 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2020)21-4019-06

前言

临床中,脑的缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/R)会造成神经细胞的严重受损,具有很高的致残致死率,因此研究者们致力于发现脑缺血再灌注损伤的病理机制和有效

的临床治疗手段。在各种临床治疗药物中,右美托咪定(dexmedetomidine)作为一种镇静镇痛药物,近年来被广泛关注。多项研究成果表明,右美托咪定能够在众多器官的缺血再灌注损伤中起到保护作用^[1-3],其中研究发现右美托咪定能够通过多种机制抑制细胞凋亡^[4,5],而细胞自噬(autophagy)被认为是

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81771415)

作者简介:唐莹(1982-),女,博士研究生,主要研究方向:麻醉与脏器保护, E-mail: 15965086059@163.com

Δ 通讯作者:王士雷(1967-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:麻醉与脏器保护, E-mail: wshlei@aliyun.com

(收稿日期:2020-06-29 接受日期:2020-07-23)

细胞凋亡前的一个步骤,并显著影响着神经细胞的结局。细胞凋亡和自噬可以通过关键的信号分子和信号通路相互影响、相互作用。研究发现,适度的细胞自噬能够清除大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)和凋亡因子等,避免凋亡级联反应的发生^[6],而过度的细胞自噬,可能会通过消耗关键的细胞成分而引发自噬性细胞死亡。线粒体自噬(mitophagy)是一种选择性自噬^[7]。在神经细胞这类终末分化的细胞中,能量代谢高,线粒体数量多,因此及时清除受损的线粒体^[8],维持线粒体的稳态就至关重要,而这一清除过程主要由线粒体自噬来执行^[9,10]。因此,细胞自噬和线粒体自噬是影响神经细胞存活的关键因素^[6,8],但是右美托咪定减轻脑缺血再灌注损伤机制中对神经细胞自噬和线粒体自噬相关研究较少,因此,本研究将采用经典的神经细胞氧糖剥夺再灌注损伤(oxygen and glucose deprivation/reperfusion injury, OGD/R)模型,来探讨细胞自噬和线粒体自噬在右美托咪定减轻脑缺血再灌注损伤中的作用,为右美托咪定脏器保护机制提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验采用 SH-SY5Y 细胞,该细胞购自中国科学院上海细胞所。MEM/EBSS 培养基、F-12/HAM'S 培养基、无糖 EBSS 培养基、0.25%胰蛋白酶均购自美国 HyClone 公司;10%胎牛血清,1%青霉素链霉素均购自美国 Gibco 公司;丙酮酸钠、3-甲基腺嘌呤、雷帕霉素均购自美国 Sigma 公司,右美托咪定(恒瑞制药公司,中国),CCK-8 试剂盒(七海复泰生物科技有限公司,中国),BCA 蛋白检测试剂盒(碧云天公司,中国),免疫印迹检测中使用的一抗:鼠抗 TOM20(Millipore 公司,美国),兔抗 Beclin 1、Bcl-2、LC3II/LC3IB、P62、GAPDH 均购自美国 Abcam 公司,上述兔和鼠的二抗均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。实验器材:细胞培养箱(三洋,日本),酶标仪(BIO-RAD,美国),JEM-1200EXV 透射电子显微镜(JEOL 公司,日本),ECL 化学发光系统(VILBER Fusion FX5 Spectra,法国)。

1.2 方法

1.2.1 SH-SY5Y 细胞氧糖剥夺再灌注损伤模型的建立 参照本课题组既往的实验方法^[11],构建模型方式如下:选择长势良好,铺满培养皿或孔板 70%-80%的细胞,吸净培养基后,用 PBS 冲洗两遍,动作轻柔,培养基替代为 EBSS 培养基(无糖),放入三气培养箱中,此时三气培养箱设定为 0.5%O₂,5%CO₂,94.5%N₂,模拟脑缺氧状态,在此无糖缺氧状态下 37℃ 培养 4 h;4 小时后从三气培养箱中取出细胞,更换 EBSS 为普通培养基,放入正常的细胞培养箱中,继续培养 18 h,模拟脑缺血后再灌注状态,再灌注 18 h 后细胞开始分组处理。

1.2.2 实验分组 随机数字表法将细胞随机分为 7 组:(1)C 组:对照组,正常培养细胞,不经过任何处理;(2)OGD/R 组:氧糖剥夺再灌注组,细胞氧糖剥夺 4 h,恢复正常培养条件孵育 18 h;(3)DEX 组:右美托咪定组,细胞恢复正常培养期间,与含有 1 μM^[12,13]右美托咪定的培养基共同孵育 18 h;(4)3MA 组:3-甲基腺嘌呤组,细胞恢复正常培养期间,与含有 1 mM^[14]3MA 的培养基共同孵育 18 h;(5)D+3MA 组:右美托咪定+3-甲基腺嘌呤组,细胞恢复正常培养期间,与含有 1 μM 右美托咪定

和 1 mM 3MA 的培养基共同孵育 18 h;(6)RAPA 组:雷帕霉素组,细胞恢复正常培养期间,与含有 10 nM^[15]RAPA 的培养基共同孵育 18 h;(7)D+RAPA 组:右美托咪定+雷帕霉素组,细胞恢复正常培养期间,与含有 1 μM 右美托咪定和 10 nM RAPA 的培养基共同孵育 18 h。

1.2.3 细胞活力检测 使用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力,每个实验重复三次。根据试剂盒说明书严格操作,现将细胞以每孔 1.5×10⁴ 个细胞的密度接种在 96 孔板中,每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液,在含 5%CO₂ 的潮湿培养箱中 37℃ 恒温培养 2 小时,最后使用酶标仪 450nm 下测定吸光度。使用不含细胞的培养基作为空白对照组,每组的吸光度数值均为测定值减去空白对照组的数值,细胞活力为相对于对照组的吸光度百分比。

1.2.4 电镜下细胞超微结构的检测 透射电子显微镜(Transmission electron microscope, TEM)用于观察神经元在经过氧糖剥夺再灌注损伤之后,细胞中自噬体的形成和细胞器超微结构的变化。首先离心收集细胞,条件为 1000 r/min,5 分钟,然后将细胞分别放入戊二醛和 1%的四氧化锇溶液中进行固定,脱水后放入纯丙酮-EPON812 包埋剂中进行包埋。最后,切割 50 nm 厚的超薄切片,并在 JEM-1200EXV 透射电子显微镜下观察。

1.2.5 免疫印迹检测相关蛋白的表达 具体方法参见本课题组发表文献^[11]。使用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白质的浓度。每孔的蛋白上样量为 30 μg,并通过电泳、转膜将蛋白转移到 PVDF 膜上,使用 5%的脱脂奶粉封闭 1 h, PBST 清洗 3 遍后,分别加入各种蛋白的一抗 4℃ 过夜,我们使用的一抗有:鼠抗 TOM20(1:1000),兔抗 Beclin 1(1:2000)、兔抗 Bcl-2(1:1000)、兔抗 LC3II/LC3IB(1:2000)、兔抗 P62(1:1000)、兔抗 GAPDH(1:2000)。次日,使用 PBST 洗膜 3 次后,分别加入鼠和兔的二抗(1:5000),PBST 清洗后,使用 ECL 化学发光系统显像。图像采用 Image J 定量和分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 和 Graphpad prism7 软件系统进行统计学数据分析,每个实验至少重复三次,数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,三组或更多组比较时采用单因素方差分析,两组比较时采用 t 检验, $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 右美托咪定可以增加神经细胞活性

我们采用 CCK-8 试剂盒来检验不同组之间细胞的活性,结果如图 1 所示。与 C 组相比,OGD/R 组细胞活性明显降低;与 OGD/R 组相比,DEX 组、3MA 组、D+3MA 组的细胞活性增高($P < 0.05$),而 RAPA 组的细胞活性与 OGD/R 组相比没有显著性差异($P > 0.05$);与 DEX 组相比,D+RAPA 组的细胞活性明显低于 DEX 组($P < 0.05$);而 D+RAPA 组的细胞活性明显好于 RAPA 组($P < 0.05$)。提示 DEX 组、3MA 组、D+3MA 组都可以增强细胞活性,而 RAPA 降低了细胞活性,当 RAPA 中加入右美托咪定后,恢复了部分细胞活性。

2.2 右美托咪定可以抑制氧糖剥夺再灌注损伤引起的细胞自噬和线粒体自噬

电镜观察到自噬体是自噬现象发生的金标准^[16]。神经细胞

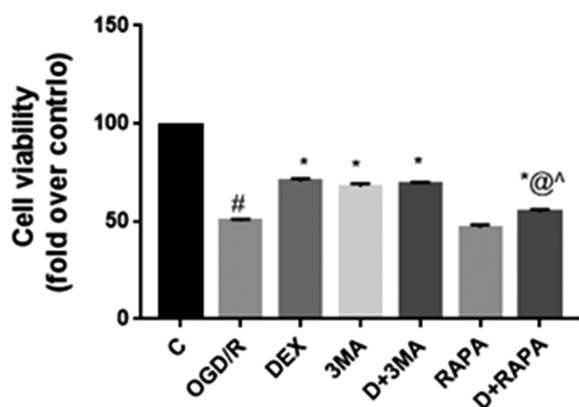


图1 7组 SH-SY5Y 细胞的活性变化

Fig.1 Comparison of cell viability among 7 groups SH-SY5Y cells

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm s$, $n=3$. # $P<0.05$, OGD/R group compared with C group; * $P<0.05$, compared with OGD/R group; @ $P<0.05$, D+RAPA group compared with DEX group; ^ $P<0.05$, D+RAPA group compared with RAPA group.

经过氧糖剥夺再灌注损伤后,超微结构发生了变化,电镜下明确观察到细胞自噬和线粒体自噬,如下图2所示,C组细胞核周围分布有较多线粒体,正常线粒体大多呈椭圆形,可观察到线粒体双层膜结构,线粒体内膜向内形成的线粒体嵴清晰可见(黑色箭头所指为线粒体)。OGD/R组细胞经过氧糖剥夺再灌注损伤以后,细胞内正常线粒体数量减少,细胞内可见空泡形成,线粒体肿胀,线粒体内也部分空泡化,严重肿胀的线粒体内

部线粒体嵴消失,可观察到自噬体(白色箭头所指),为双层膜结构包裹着的细胞器或者线粒体。DEX组,3MA组,和D+3MA组,部分受损的线粒体变圆,肿胀,线粒体内可出现空泡化,出现自噬体,但是大多数线粒体结构完整,线粒体嵴仍可见。RAPA组与OGD/R组类似,线粒体数量减少,完整线粒体较少,部分肿胀崩解,内部结构不清,较多自噬体形成。最后一张图Mitophagy中黑色箭头所指双层膜结构"隔离囊泡"正在包裹线粒体,形成自噬体,说明正在发生线粒体自噬。根据图3和图4的数据分析,与C组相比,OGD/R组完整线粒体数量明显减少、自噬体数量显著增多($P<0.05$),提示氧糖剥夺再灌注损伤诱导了明显的自噬和线粒体自噬;与OGD/R组相比,DEX组,3MA组,D+3MA组完整线粒体数量显著多于OGD/R组,自噬体数量明显少于OGD/R组($P<0.05$);RAPA组完整线粒体和自噬体数量与OGD/R组相比,无明显差异($P>0.05$);DEX组,3MA组,D+3MA组在两个检测指标中差异没有统计学意义,提示右美托咪定对自噬和线粒体自噬是抑制作用,而且抑制自噬强度与3MA组类似,但右美托咪定中加入3MA后,抑制自噬的作用没有进一步增强;D+RAPA组完整线粒体数量多于RAPA组少于DEX组,自噬体数量少于RAPA组却多于DEX组($P<0.05$)。说明右美托咪定能够抑制RAPA诱导的细胞自噬和线粒体自噬,但不能完全抑制。

2.3 右美托咪定减少了 Western Blot 检测下自噬相关蛋白的表达

通过 Western Blot 半定量检测细胞自噬和线粒体自噬相关蛋白的表达变化,从蛋白水平揭示右美托咪定在氧糖剥夺再

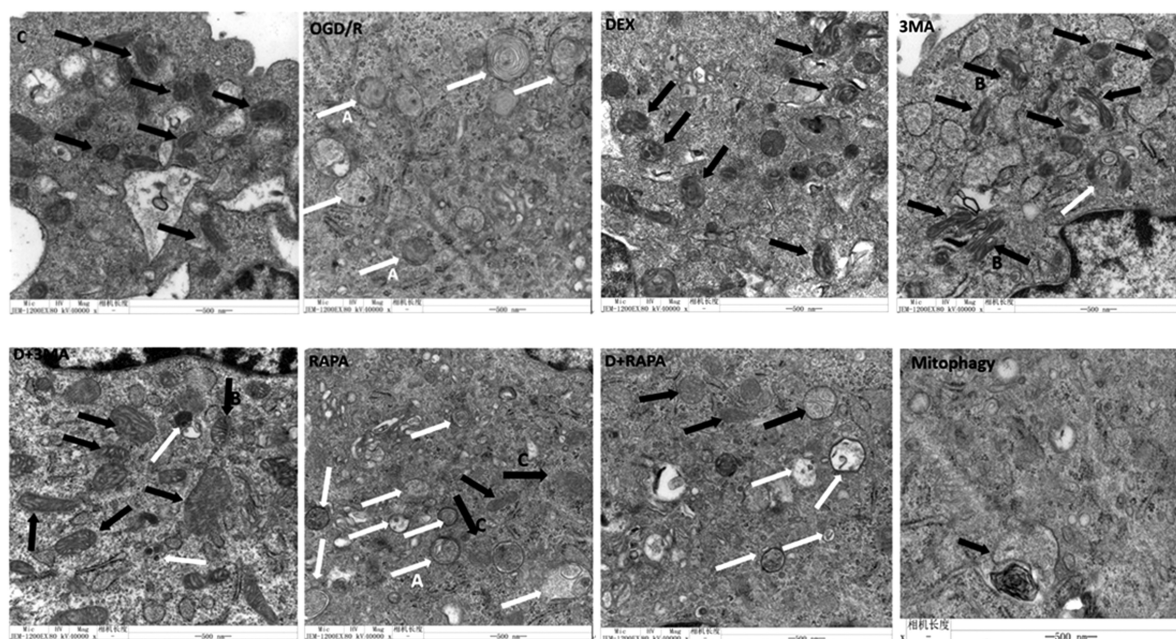


图2 电镜下细胞内超微结构的改变

Fig.2 Ultrastructural changes of cells under transmission electron microscope

注:图中黑色箭头所指为线粒体,白色箭头所指为自噬体。C组黑色箭头所指线粒体众多,线粒体形态清晰,胞膜完整,呈椭圆形或短棒状,线粒体嵴清晰可见。OGD/R组完整线粒体减少,可以观察到白色箭头所指双层膜结构的自噬体出现,自噬体内含有未消化的细胞器或者线粒体,带有A标志的自噬体为含有线粒体的自噬体,可观察到自噬体内含有未完全崩解的线粒体;DEX组,3MA组,D+3MA组,线粒体出现损伤,黑色箭头所指线粒体肿胀、变圆,线粒体嵴模糊,线粒体基质出现点状聚集,甚至出现空泡化(带有B的黑色箭头所指)。

RAPA组,氧糖剥夺再灌注损伤严重,线粒体数量减少,线粒体肿胀至球形,线粒体嵴消失,甚至轮廓消失,

线粒体崩解(带有C的黑色箭头所指),出现含有线粒体和细胞器的自噬体(白色箭头所指),

带有A标志的白色箭头所指即为含有受损线粒体的自噬体。最后一张 Mitophagy,黑色箭头所指为正在被双层膜结构吞噬的线粒体。

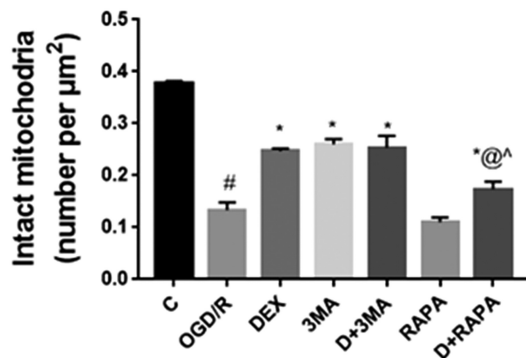


图3 电镜下细胞内完整线粒体数量(μm^2)的比较

Fig.3 Comparison of the number of intact mitochondria (μm^2) in cells under transmission electron microscope

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm s$, $n=3$. [#] $P<0.05$, OGD/R group compared with C group; ^{*} $P<0.05$, compared with OGD/R group; [@] $P<0.05$, D+RAPA group compared with DEX group; [^] $P<0.05$, D+RAPA group compared with RAPA group.

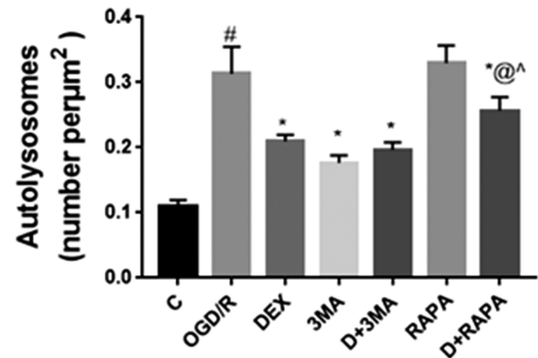
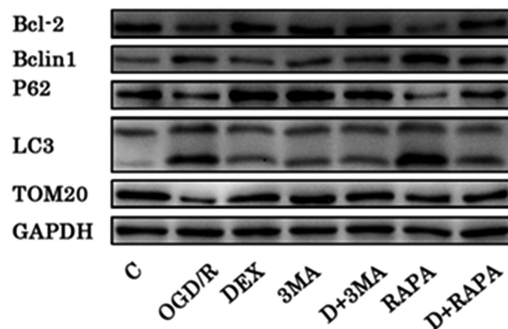


图4 电镜下细胞内自噬体数量(μm^2)的比较

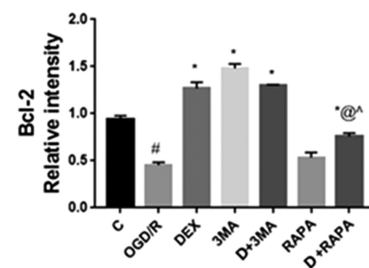
Fig.4 Comparison of intracellular autophagosome number (μm^2) under transmission electron microscope

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm s$, $n=3$. [#] $P<0.05$, OGD/R group compared with C group; ^{*} $P<0.05$, compared with OGD/R group; [@] $P<0.05$, D+RAPA group compared with DEX group; [^] $P<0.05$, D+RAPA group compared with RAPA group.

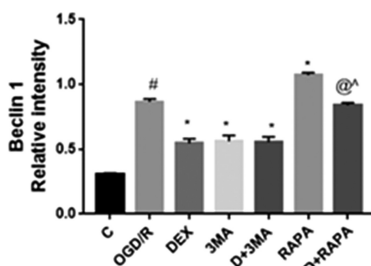
A:



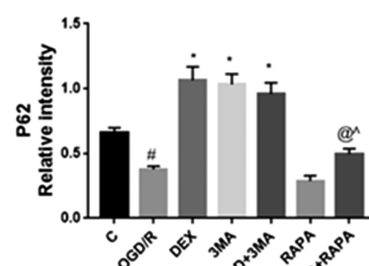
B:



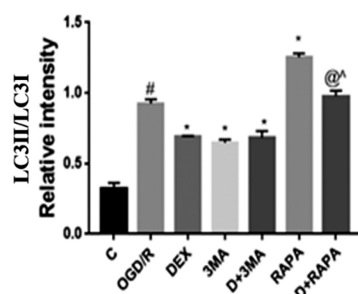
C:



D:



E:



F:

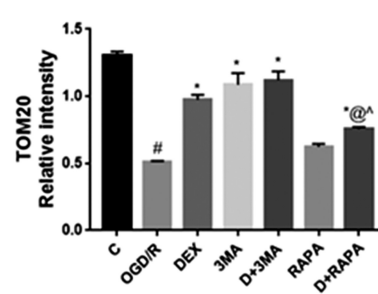


图5 通过 Western Blot 法检测 Bcl-2, Beclin 1, P62, LC3II/LC3I, TOM20 五种蛋白的表达。注: GAPDH 为内参。

Fig.5 The expression of Bcl-2, Beclin 1, P62, LC3II/LC3I and TOM20 by Western Blot. GAPDH is an internal reference.

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm s$, $n=3$. [#] $P<0.05$, OGD/R group compared with C group; ^{*} $P<0.05$, compared with OGD/R group; [@] $P<0.05$, D+RAPA group compared with DEX group; [^] $P<0.05$, D+RAPA group compared with RAPA group.

灌注损伤中对细胞自噬和线粒体自噬的作用。我们选取了 Bcl-2, Beclin 1, P62, LC3II/LC3I, TOM20 五种蛋白。通过图 5 免疫印迹相关数据的分析,我们发现细胞经过氧糖剥夺再灌注处理后,Bcl-2、P62、TOM20 蛋白表达与 C 组相比明显减少,LC3II/LC3I、Beclin 1 蛋白表达增加($P<0.05$)。与 OGD/R 组相比,DEX 组、3MA 组、D+3MA 组 LC3II/LC3I、Beclin 1 表达减少($P<0.05$),Bcl-2、P62、TOM20 的表达增加($P<0.05$),RAPA 组 Bcl-2、P62、TOM20 蛋白的表达均与 OGD/R 组相比没有显著性差异($P>0.05$),LC3II/LC3I、Beclin 1 的表达较 OGD/R 组增加($P<0.05$);当 RAPA 中加入右美托咪定后,与 DEX 相比,逆转了各种蛋白的表达,Bcl-2、P62、TOM20 表达减少,LC3II/LC3I、Beclin 1 表达增加($P<0.05$),而与 RAPA 相比,增加了 Bcl-2、P62、TOM20 的表达,减少了 LC3II/LC3I、Beclin 1 的表达($P<0.05$)。

3 讨论

脑中风是全球死亡和致残的主要原因之一^[17],是世界上第五大死亡原因,尽管对中风的研究众多,但其细胞内机制远未完全阐明,目前治疗中风的有效手段仍是机械再通或者药物溶栓恢复脑血流供应,因此改善脑组织损伤的治疗性干预研究成为积极探讨的领域^[18]。脑缺血再灌注损伤的机制非常复杂,与细胞内钙超载^[19]、氧化应激反应、炎症反应^[20]、兴奋性氨基酸的神经毒性^[21]、细胞凋亡、细胞自噬有关。自从发现自噬这个重要的生物行为之后,很多研究表明它在疾病的发病机理及疾病进展中有着至关重要的作用^[22]。线粒体是缺血再灌注损伤的主要靶标^[8],线粒体自噬是自噬的一种选择性形式,被认为是线粒体质量和数量控制的核心机制^[23]。在本研究中,通过对 SH-SY5Y 进行氧糖剥夺 4 h,再灌注 18 h,明确诱导出了细胞自噬和线粒体自噬,并且抑制 SH-SY5Y 的细胞自噬和线粒体自噬减少了神经细胞损伤。右美托咪定可以下调细胞自噬和线粒体自噬,且减少自噬的程度与 3MA 类似。右美托咪定减轻 SH-SY5Y 的氧糖剥夺再灌注损伤与减少细胞自噬和线粒体自噬有关,并且这个保护作用在同时应用 RAPA 之后被减弱,说明抑制神经细胞自噬和线粒体自噬是右美托咪定发挥神经保护作用的机制之一。

右美托咪定已经被证明在多种缺血再灌注损伤动物模型中都具有保护作用,包括肠、心脏、肺脏、肾脏和大脑^[24],右美托咪定可能为治疗涉及缺血再灌注损伤的人类疾病提供新颖的治疗方法和研究方向。自从 2016 年大隅良典教授发现了细胞自噬的过程以来,自噬现象就备受关注。自噬是一种将自身受损的细胞器、长寿蛋白和错误折叠的蛋白进行降解的分解代谢途径,实现自身蛋白的循环再利用,适当的自噬能够稳定细胞状态。另一方面,如果自噬持续活化,产生过度的细胞自噬和线粒体自噬,可能会通过损害蛋白质的回收过程和消耗关键的细胞成分而诱导致病状态,导致自噬性细胞死亡^[25]。

我们通过建立 SH-SY5Y 的氧糖剥夺模型后,电镜观察到自噬标志性的结构“自噬体”的出现,肿胀的线粒体被双层膜结构吞噬,发生线粒体自噬,说明氧糖剥夺再灌注损伤明确诱导出了细胞自噬和线粒体自噬,当我们单独应用右美托咪定或者 3MA 以及两者联合应用时,电镜下发现自噬小体数目减少,

完整线粒体的数目增加,表明右美托咪定确实减少了细胞自噬和线粒体自噬;当 RAPA 中应用右美托咪定时,自噬小体数目减少,完整线粒体的数量增加,细胞和线粒体的完整性得到维护。实验证实右美托咪定确实抑制了 RAPA 和氧糖剥夺诱导的细胞自噬和线粒体自噬,并通过减少自噬有效的维护了细胞及线粒体结构和功能的完整。我们在这些微观结构发生变化的同时,也对 SH-SY5Y 细胞进行了细胞活性的检测,我们发现单独应用右美托咪定或者 3MA 以及两者联合应用时,细胞活性增高,证实右美托咪定确实保护了神经细胞,3MA 抑制自噬的产生,同样也起到了神经保护作用,而且右美托咪定与 3MA 起到的神经保护效果类似。一旦合用 RAPA,自噬受到活化,细胞活性开始降低,D+RAPA 组与 RAPA 组相比,活性增高原因可能为右美托咪定部分抑制了 RAPA 引起的自噬,进而促进了细胞存活,而 D+RAPA 组与 DEX 组相比,细胞活性减弱,差异具有显著性,说明加入右美托咪定后细胞活性并没有恢复到 DEX 组的水平,发生这种变化的原因,可能为右美托咪定不足以逆转 RAPA 或者 OGD/R 带来的自噬增加,亦或者是细胞自噬和线粒体自噬只是右美托咪定影响细胞活性的一部分原因,其他神经保护机制还有待于进一步研究。另外我们分析认为,SH-SY5Y 细胞在经历了 4h 氧糖剥夺后,再进行 18h 的再灌注,引起的自噬水平为过度的细胞自噬,过度的细胞自噬已经达到自噬水平的阈值,有可能引发了细胞凋亡和自噬性死亡程序,再应用 RAPA 后也无法引起自噬水平的明显增加,因此,我们观察到 RAPA 组细胞活性检测、电镜检测均与 OGD/R 组类似,差异没有显著性。

同时在蛋白水平,应用 Western blot 法检测自噬相关蛋白 Bcl-2、Beclin 1、P62、LC3II/LC3I 及 TOM20 的表达。众所周知,Bcl-2 家族蛋白在细胞死亡和存活的调节中起着至关重要的作用,控制自噬的关键机制之一是调节自噬蛋白 Beclin1 与抗凋亡蛋白 Bcl2 家族成员之间的相互作用^[26],Bcl-2/Beclin1 蛋白复合物是自噬的关键调节剂,因此可以通过各种方式调节该蛋白复合物以刺激或者抑制细胞自噬^[27]。在正常情况下,Beclin1 通过 BH3 结构域与 Bcl2 结合,Bcl-2 抑制 Beclin1,进而抑制自噬,在压力刺激的情况下,Beclin1 与 Bcl-2 分离,从而激活 Vps34 随后刺激自噬的发生^[28]。P62 是一种自噬选择性底物,可以与蛋白泛素化结合,特异性识别 LC3II/LC3I-II,并递呈与自噬体,参与自噬体的形成,继而将自噬体定位于溶酶体,最终在溶酶体中降解,它还可以调节蛋白质聚集体的形成^[29]。P62 作为自噬的底物蛋白或载体,最终会随着自噬体的形成,特异性的在溶酶体中进行降解,因此细胞的自噬水平与 P62 蛋白的表达水平呈反比。LC3II/LC3I 表达是哺乳动物细胞中自噬活化的可靠指标^[30]。TOM20 是线粒体 TOM20 复合体的组成成分,主要定位于线粒体外膜,TOM20 蛋白表达量的变化可以间接反映线粒体数量的变化,因此我们采用免疫印迹检测 TOM20,以此作为代表线粒体相对数量的指标^[31]。在本实验中我们发现与 OGD/R 组相比,应用右美托咪定或者 3MA 以及两者联合应用时,Bcl-2、P62、TOM20 表达明显增加,Beclin 1、LC3II/LC3I 蛋白的表达明显减少,差异具有显著性,而 RAPA 组与 OGD/R 组相比除了 Beclin 1、LC3II/LC3I 蛋白的表达增加,差异具有显著性,其他蛋白表达与 OGD/R 组表达无显著性差异。上述结果

提示我们右美托咪定和 3MA 均可引起自噬现象的减少,而 RAPA 与 OGD/R 组都可以增加自噬的发生。当 RAPA 中加入了右美托咪定之后,与 RAPA 组相比, Bcl-2、P62、TOM20 表达明显增加, Beclin 1、LC3II/LC3I 蛋白的表达明显减少,差异具有显著性,从蛋白层面显示右美托咪定部分抑制了自噬,引起自噬蛋白的相应变化,而 TOM20 增加表明线粒体数量增加。D+RAPA 组与 DEX 组相比,五种蛋白表达均与 DEX 组蛋白表达有显著性差异,说明右美托咪定不能完全恢复上述蛋白的表达,抑制自噬的作用有限。应用 Western blot 法检测细胞自噬和线粒体自噬相关蛋白的表达,与电镜以及细胞活性结论相统一,说明 OGD/R 能够明确诱导出细胞自噬和线粒体自噬,并且右美托咪定可以抑制细胞自噬和线粒体自噬,从而减轻 OGD/R 诱导的神经细胞损伤,细胞自噬和线粒体自噬是右美托咪定减轻 OGD/R 诱导的神经细胞损伤的可能机制,但不是全部机制。

我们发现也有其他研究与我们的发现并不一致^[32,33]。有学者认为不管是体外模型还是在体模型,自噬可以通过减少凋亡而减轻缺血再灌注损伤^[34]。有学者认为自噬流的减少可以增强神经元的活力并减少细胞凋亡^[35]。还有学者发现 Sirt3 可以通过 AMPK-mTOR 信号通路下调自噬水平来减少缺氧复氧损伤^[36]。因此,当神经细胞遭遇不同刺激时,线粒体自噬可能对细胞的存活产生不同的影响^[15]。线粒体自噬是我们的朋友还是敌人仍然是存有争议的^[2]。缺血再灌注损伤中线粒体自噬的作用和机制还有待于进一步研究。

我们的研究认为右美托咪定可以减少神经细胞由于氧糖剥夺再灌注带来的损伤,其作用机制为通过抑制过度的细胞自噬和线粒体自噬发挥对神经的保护作用。

参考文献(References)

- [1] Wang K, Zhu Y. Dexmedetomidine protects against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury-induced apoptosis via the p38 MAPK/ERK signalling pathway [J]. The Journal of international medical research, 2018, 46(2): 675-686
- [2] Kim E, Kim HC, Lee S, et al. Dexmedetomidine confers neuroprotection against transient global cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting inflammation through inactivation of the TLR-4/NF-kappaB pathway[J]. Neuroscience letters, 2017, 649: 20-27
- [3] Ren X, Ma H, Zuo Z. Dexmedetomidine Postconditioning Reduces Brain Injury after Brain Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rats [J]. Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology, 2016, 11(2): 238-247
- [4] Wu GJ, Chen JT, Tsai HC, et al. Protection of Dexmedetomidine Against Ischemia/Reperfusion-Induced Apoptotic Insults to Neuronal Cells Occurs Via an Intrinsic Mitochondria-Dependent Pathway[J]. Journal of cellular biochemistry, 2017, 118(9): 2635-2644
- [5] Cui J, Zhao H, Wang C, et al. Dexmedetomidine attenuates oxidative stress induced lung alveolar epithelial cell apoptosis in vitro [J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2015, 2015: 358396
- [6] Park J, Lee SB, Lee S, et al. Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin [J]. Nature, 2006, 441 (7097): 1157-1161
- [7] Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria [J]. Cell death and differentiation, 2013, 20(1): 31-42
- [8] Ham PB, Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging[J]. Progress in neurobiology, 2017, 157: 92-116
- [9] Kubli DA, Gustafsson Å B. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control[J]. Circulation research, 2012, 111(9): 1208-1221
- [10] Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance [J]. Current biology: CB, 2018, 28(4): R170-r185
- [11] Yu S, Zheng S, Leng J, et al. Inhibition of mitochondrial calcium uniporter protects neurocytes from ischemia/reperfusion injury via the inhibition of excessive mitophagy[J]. Neuroscience letters, 2016, 628: 24-29
- [12] Rodriguez-Gonzalez R, Sobrino T, Veiga S, et al. Neuroprotective effects of dexmedetomidine conditioning strategies: Evidences from an in vitro model of cerebral ischemia [J]. Life sciences, 2016, 144: 162-169
- [13] Dahmani S, Rouelle D, Gressens P, et al. Characterization of the postconditioning effect of dexmedetomidine in mouse organotypic hippocampal slice cultures exposed to oxygen and glucose deprivation[J]. Anesthesiology, 2010, 112(2): 373-383
- [14] Luo C, Ouyang MW, Fang YY, et al. Dexmedetomidine Protects Mouse Brain from Ischemia-Reperfusion Injury via Inhibiting Neuronal Autophagy through Up-Regulating HIF-1alpha[J]. Frontiers in cellular neuroscience, 2017, 11: 197
- [15] Wang P, Guan YF, Du H, et al. Induction of autophagy contributes to the neuroprotection of nicotinamide phosphoribosyltransferase in cerebral ischemia[J]. Autophagy, 2012, 8(1): 77-87
- [16] Buckley KM, Hess DL, Sazonova IY, et al. Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAL, and embolic MCAO, murine models of stroke[J]. Experimental & translational stroke medicine, 2014, 6: 8
- [17] Carloni S, Girelli S, Scopa C, et al. Activation of autophagy and Akt/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia [J]. Autophagy, 2010, 6(3): 366-377
- [18] Galkin A. Brain Ischemia/Reperfusion Injury and Mitochondrial Complex I Damage[J]. Biochemistry Biokhimiia, 2019, 84(11): 1411-1423
- [19] Hu S, Zhu P, Zhou H, et al. Melatonin-Induced Protective Effects on Cardiomyocytes Against Reperfusion Injury Partly Through Modulation of IP3R and SERCA2a Via Activation of ERK1 [J]. Arquivos brasileiros de cardiologia, 2018, 110(1): 44-51
- [20] Al-Salam S, Hashmi S. Myocardial Ischemia Reperfusion Injury: Apoptotic, Inflammatory and Oxidative Stress Role of Galectin-3[J]. Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2018, 50(3): 1123-1139
- [21] Dohmen C, Kumura E, Rosner G, et al. Extracellular correlates of glutamate toxicity in short-term cerebral ischemia and reperfusion: a direct in vivo comparison between white and gray matter [J]. Brain research, 2005, 1037(1-2): 43-51
- [22] Wang P, Shao BZ, Deng Z, et al. Autophagy in ischemic stroke[J]. Progress in neurobiology, 2018, 163-164: 98-117

- [J]. 中国心血管病研究, 2017, 15(8): 673-676
- [15] 张立新. 护士在抑郁症管理中的重要角色和作用 -- 访中华医学会儿科学分会主任委员于欣教授[J]. 中国护理管理, 2016, 16(1): 3-4
- [16] Zhang Y, Lv X, Jiang W, et al. Effectiveness of a telephone-delivered psycho-behavioural intervention on depression in elderly with chronic heart failure: rationale and design of a randomized controlled trial[J]. BMC Psychiatry, 2019, 19(1): 161
- [17] Chizinga M, Fares WH. Chronic Right Heart Failure: Expanding Prevalence and Challenges in Outpatient Management [J]. Heart Fail Clin, 2018, 14(3): 413-423
- [18] Brennan EJ. Chronic heart failure nursing: integrated multidisciplinary care[J]. Br J Nurs, 2018, 27(12): 681-688
- [19] Zweerink A, van der Lingen ACJ, Handoko ML, et al. Chronotropic Incompetence in Chronic Heart Failure [J]. Circ Heart Fail, 2018, 11(8): e004969
- [20] Chen TY, Kao CW, Cheng SM, et al. Uncertainty and depressive symptoms as mediators of quality of life in patients with heart failure [J]. PLoS One, 2018, 13(11): e0205953
- [21] Jiang W, Whellan DJ, Adams KF, et al. Long-Chain Omega-3 Fatty Acid Supplements in Depressed Heart Failure Patients: Results of the OCEAN Trial[J]. JACC Heart Fail, 2018, 6(10): 833-843
- [22] Dellafore F, Chung ML, Alvaro R, et al. The Association Between Mutuality, Anxiety, and Depression in Heart Failure Patient-Caregiver Dyads: An Actor-Partner Interdependence Model Analysis [J]. J Cardiovasc Nurs, 2019, 34(6): 465-473
- [23] 周娜. 中医子午流注五音护理方案对老年慢性心力衰竭患者焦虑抑郁情绪及生活质量的影响 [J]. 国际护理学杂志, 2020, 39(12): 2270-2273
- [24] 田水林, 施琳, 施卫兵. 逍遥散联合恩替卡韦治疗肝郁脾虚型慢性乙型肝炎疗效研究[J]. 陕西中医, 2020, 41(6): 754-757
- [25] 景小莉, 刘爱菊, 裴巧玲, 等. 逍遥散联合枣安胶囊治疗失眠伴焦虑抑郁状态临床研究[J]. 河南中医, 2019, 39(4): 591-594
- [26] Jia Y, Liu L, Sheng C, et al. Increased Serum Levels of Cortisol and Inflammatory Cytokines in People With Depression [J]. J Nerv Ment Dis, 2019, 207(4): 271-276
- [27] Ng A, Tam WW, Zhang MW, et al. IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP in Elderly Patients with Depression or Alzheimer's disease: Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 12050
- [28] Shao T, Zhang Y, Tang R, et al. Effects of milrinone on serum IL-6, TNF- α , Cys-C and cardiac functions of patients with chronic heart failure[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(5): 4162-4166
- [29] 高耀, 许腾, 吴丹, 等. 基于中医药整合药理学研究平台研究逍遥散治疗抑郁症的能量代谢机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(7): 481-491
- [30] Li XJ, Ma QY, Jiang YM, et al. Xiaoyaosan exerts anxiolytic-like effects by down-regulating the TNF- α /JAK2-STAT3 pathway in the rat hippocampus[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 353

(上接第 4024 页)

- [23] Onphachanh X, Lee HJ, Lim JR, et al. Enhancement of high glucose-induced PINK1 expression by melatonin stimulates neuronal cell survival: Involvement of MT2 /Akt/NF-kappaB pathway [J]. Journal of pineal research, 2017, 63(2)
- [24] Cai Y, Xu H, Yan J, et al. Molecular targets and mechanism of action of dexmedetomidine in treatment of ischemia/reperfusion injury [J]. Molecular medicine reports, 2014, 9(5): 1542-1550
- [25] Luo J. Autophagy and ethanol neurotoxicity [J]. Autophagy, 2014, 10(12): 2099-2108
- [26] Bauer TM, Murphy E. Role of Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition Pore in Regulating Cell Death[J]. Circulation research, 2020, 126(2): 280-293
- [27] Chiang WC, Wei Y, Kuo YC, et al. High-Throughput Screens To Identify Autophagy Inducers That Function by Disrupting Beclin 1/Bcl-2 Binding[J]. ACS chemical biology, 2018, 13(8): 2247-2260
- [28] Shi M, Cheng L, Zhang Z, et al. Ferroferric oxide nanoparticles induce prosurvival autophagy in human blood cells by modulating the Beclin 1/Bcl-2/VPS34 complex [J]. International journal of nanomedicine, 2015, 10: 207-216
- [29] Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm [J]. Essays in biochemistry, 2017, 61(6): 609-624
- [30] Wu Q, Luo CL, Tao LY. Dynamin-related protein 1 (Drp1) mediating mitophagy contributes to the pathophysiology of nervous system diseases and brain injury [J]. Histology and histopathology, 2017, 32(6): 551-559
- [31] Zhang C, Wang R, Liu Z, et al. The plant triterpenoid celastrol blocks PINK1-dependent mitophagy by disrupting PINK1's association with the mitochondrial protein TOM20 [J]. The Journal of biological chemistry, 2019, 294(18): 7472-7487
- [32] Puyal J, Vaslin A, Mottier V, et al. Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy [J]. Annals of neurology, 2009, 66(3): 378-389
- [33] Shi R, Weng J, Zhao L, et al. Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia [J]. CNS neuroscience & therapeutics, 2012, 18(3): 250-260
- [34] Wu B, Luo H, Zhou X, et al. Succinate-induced neuronal mitochondrial fission and hexokinase II malfunction in ischemic stroke: Therapeutic effects of kaempferol [J]. Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease, 2017, 1863(9): 2307-2318
- [35] Dai SH, Chen T, Li X, et al. Sirt3 confers protection against neuronal ischemia by inducing autophagy: Involvement of the AMPK-mTOR pathway[J]. Free radical biology & medicine, 2017, 108: 345-353
- [36] Liu X, Tian F, Wang S, et al. Astrocyte Autophagy Flux Protects Neurons Against Oxygen-Glucose Deprivation and Ischemic/Reperfusion Injury[J]. Rejuvenation research, 2018, 21(5): 405-415