

组织型激肽释放酶通过诱导自噬 对缺血性脑卒中发挥保护作用

刘艳萍¹, 董强²

摘要 目的:通过在体实验研究组织型激肽释放酶(TK)对缺血性卒中的神经保护作用是否与诱导保护性自噬有关。**方法:**成年雄性SD大鼠随机分为假手术组、生理盐水(NS)组、TK组、3-MA组和3-MA+TK组,每组11只。假手术组和NS组分别于侧脑室注射NS,TK组和3-MA组分别于侧脑室注射TK和自噬抑制剂3-MA,3-MA+TK组先注射3-MA,30 min后再注射TK。各组完成侧脑室给药后,采用线栓法建立永久性大脑中动脉缺血模型(pMCAO)。在缺血后12 h,采用Longa评分法评估各组大鼠的神经功能。完成神经损伤评分后,TTC染色检测各组大鼠脑梗死体积,免疫印迹实验检测各组自噬相关蛋白LC3和p62的表达水平。**结果:**NS组大鼠缺血侧脑皮质LC3-II较假手术组表达升高,p62水平降低(均 $P<0.01$)。与NS组相比,TK组缺血侧脑皮质LC3-II表达增高,p62水平降低(均 $P<0.01$),大鼠神经功能损伤较轻、脑梗死体积明显缩小(均 $P<0.01$);与TK组比较,3-MA组缺血侧脑皮质LC3-II的表达降低和p62的水平水平较高,大鼠神经功能损伤较重、脑梗死体积较大(均 $P<0.01$);与TK组相比,3-MA+TK组大鼠神经损伤评分增加、脑梗死体积明显增加(均 $P<0.01$)。**结论:**TK对缺血性卒中大鼠具有神经保护作用,其机制与诱导自噬发生有关。

关键词 组织型激肽释放酶;自噬;永久性大脑中动脉缺血模型;脑梗死体积

中图分类号 R741;R741.02;R743 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20220994

Tissue Kallikrein Exerts a Protective Effect on Ischemic Stroke by Inducing Autophagy LIU Yan-ping¹, DONG Qiang². 1. Department of Neurology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. Department of Neurology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

Abstract Objective: To investigate whether the neuroprotective effect of tissue kallikrein (TK) on ischemic stroke is related to the induction of protective autophagy by *in vivo* experiments. **Methods:** Adult male SD rats were randomly divided into sham surgery group, normal saline (NS) group, TK group, 3-MA group and 3-MA+TK group, with 11 rats in each group. Rats in the sham group and the NS group were injected NS in the lateral ventricle, rats in the TK group and in the 3-MA group were injected TK and autophagy inhibitor 3-MA in the lateral ventricle respectively, and rats in the 3-MA+TK group were injected with 3-MA and then injected with TK 30 min later. Permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) model was established by thread embolism after the lateral ventricle administration was completed in each group. At 12 h post-ischemia, the neurological function of rats in each group was assessed by Longa score. After the completion of nerve injury assessment, the cerebral infarction volume of rats in each group was detected by TTC staining, and the expression levels of autophagy related proteins LC3 and p62 were detected by western blotting. **Results:** The expression of LC3-II in ischemic cortex of NS group was higher than that in sham group, and the expression of p62 was lower (both $P<0.01$). Compared with the NS group, the expression of LC3-II in the ischemic side cerebral cortex of the TK group was increased, the expression of p62 decreased, the neurological damage of rats was milder, and the volume of cerebral infarction was significantly reduced (all $P<0.01$). Compared with the TK group, the expression of ischemic cerebral cortex LC3-II and the expression level of p62 were higher in the 3-MA group, and the rats had more severe neurological damage and larger cerebral infarction volume (all $P<0.01$). Compared with the TK group, the score of nerve damage and the volume of cerebral infarction increased significantly in the 3-MA+TK group (all $P<0.01$). **Conclusion:** TK has a neuroprotective effect on ischemic stroke rats, and its mechanism is related to the induction of autophagy genesis.

Keywords tissue kallikrein; autophagy; permanent middle cerebral artery occlusion; cerebral infarction volume

作者单位

1. 武汉大学中南医院神经内科

武汉 430071

2. 复旦大学附属华山医院神经内科

上海 200040

基金项目

国家自然科学基金

(No. 82101541); 中央高校基本科研

业务费专项资金

(No. 2042017kf00

95)

收稿日期

2022-12-11

通讯作者

董强

qiang_dong163

@163.com

自噬是真核生物中一种高度保守的对细胞内物质降解和再循环的过程。在自噬诱导因子的刺激下,内质网膜部分脱落形成吞噬泡,吞噬泡包裹胞浆内受损的细胞器、

异常蛋白质及部分细胞质,进一步延伸形成具有完整双层膜结构的自噬体,自噬体通过细胞骨架微管系统运输到溶酶体被降解。在吞噬泡的延伸过程中,胞浆内的自噬

相关蛋白 LC3- I 被其它自噬相关分子脂化形成 LC3- II ,LC3- II 逐渐结合到吞噬泡的双层膜上,随着吞噬泡延伸形成自噬体。自噬体膜上 LC3- II 逐渐增加,是自噬发生的一个标志。SQSTM1/p62 蛋白含有一个 LC3 结合膜体及泛素化蛋白结合域,p62 蛋白本身及其结合的泛素化蛋白可通过 p62 与 LC3 的结合进入到自噬体和自噬溶酶体中,最终被溶酶体酶降解。因此 p62 含量变化是反映自噬降解过程的标志之一^[1-3]。

反应性氧自由基、缺氧、营养物质剥夺及能量缺乏等因素均能诱导细胞自噬的发生^[1,3]。作为细胞的一种修复机制,自噬的激活可清除受损的蛋白质和细胞器,产生代谢底物,从而维持细胞稳态和能量需求。但自噬的过度激活会导致细胞关键成份和存活因子的降解,引起细胞死亡^[4,5]。近年来,随着细胞自噬在脑缺血中作用研究的深入,维持细胞正常的自噬过程以及调节细胞的自噬水平为卒中神经保护药物的研究供了新思路^[5,6]。

组织型激肽释放酶(tissue kallikrein, TK)是一种存在于多数组织和体液中的丝氨酸蛋白酶,可裂解激肽原释放具有活性的激肽,后者与缓激肽 B1 受体或缓激肽 B2 受体结合,发挥一系列生理作用^[7]。外源性 TK 可通过抗凋亡、抑制炎症反应、促进血管新生、诱导神经再生等机制对脑缺血发挥保护作用^[8,9]。本研究通过建立脑缺血损伤的在体模型,观察抑制自噬对缺血脑组织产生的效应,同时探讨细胞自噬作为一种普遍的应答反应,是否介导 TK 诱导的神经保护效应,进一步阐明 TK 发挥神经保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与要材料

清洁级成年雄性 Sprague Dawley (SD)大鼠购自上海西普尔必凯公司,体质量(250±10)g。永久性大脑中动脉闭塞(permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO)模型栓线购自北京西浓科技有限公司(货号 2634 A5),栓线直径 0.26 mm,头端包被硅胶,头端直径(0.34±0.02)mm。TK 药物原液由广州天普公司赠送。氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC)染料、自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine, 3-MA)购自 Sigma-Aldrich 公司;LC3A/B、 α -tubulin 单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology 公司;p62 单克隆抗体购自 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 SD 大鼠随机分为假手术组、生理盐水(normal saline, NS)组、TK 组、3-MA 组和 3-MA+TK

组,每组 11 只。

1.2.2 大鼠侧脑室立体定位注射 10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠(0.5 mL/100 g 体质量)后,将大鼠头部固定于立体定位仪。根据大鼠脑定位图谱,于前囟后 1.0 mm、中线向左侧旁开 1.5 mm 处钻孔开骨窗,微量注射器自脑表面向深部垂直缓慢进针 3.7 mm。假手术组和 NS 组分别于侧脑室注射 NS 9 μ L, TK 组和 3-MA 组分别于侧脑室注射 TK 10 μ g(NS 稀释至 9 μ L)和 3-MA 600 nmoL(NS 稀释至 9 μ L), 3-MA+TK 组先注射 3-MA 600 nmoL(NS 稀释至 9 μ L), 30 min 后再注射 TK 10 μ g(NS 稀释至 9 μ L)。

1.2.3 pMCAO 模型制备 上述侧脑室给药后的各组大鼠,仰卧位固定,作颈部正中切口,钝性分离皮下组织,暴露左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉。结扎左侧颈外动脉,用微动脉夹暂时夹闭左侧颈总动脉,在颈外动脉结扎部位的近心端剪一小口,用眼科镊将线栓由该小口插入并沿颈内动脉方向轻轻推送入颅内,感到轻微阻力时停止,线栓插入深度至颈总动脉分叉处的距离约为 18 mm,然后用丝线扎紧颈外动脉,松开微动脉夹,缝合切口。假手术组仅暴露血管后缝合,不插入线栓。

1.2.4 神经损伤评分 在缺血后 12 h,采用 Longa 评分法评估各组大鼠的神经功能:0 分,正常;1 分,轻度神经功能缺损(提尾时右侧前肢不能完全伸展);2 分,中度神经功能缺损(向右侧转圈);3 分,重度神经功能缺损(行走时向右侧倾倒);4 分,不能自发行走,或有意识障碍^[10]。

1.2.5 TTC 染色 完成神经损伤评分后,深度麻醉大鼠后迅速断头取脑,将鼠脑冷冻至适度后放在预冷的模具脑槽内,按照从前向后的顺序将鼠脑切成厚度均匀的 2 mm 冠状切片。取出脑片,放在提前配置好的 2% TTC 染液中,室温避光孵育 15 min,每 5 分钟翻面 1 次,染色结束后可见脑片上出现界限清晰的白色梗死灶。去掉 TTC 染液,加入 4%多聚甲醛固定 24 h,采用扫描仪对脑片进行扫描。采用 Image J 图像分析软件,计算每层脑片的梗死面积,梗死体积=各层梗死面积之和×层厚。

1.2.6 免疫印迹实验 完成神经损伤评分后,深度麻醉大鼠后迅速断头取脑,分离半暗带皮质组织,超声破碎后常规提取组织蛋白质,BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白上样于 10%或 15%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,电泳后转印蛋白于 PVDF 膜。转印后剪取 PVDF 膜于 5%脱脂奶粉中室温封闭 1 h,加入相应一抗 4℃孵育

过夜, TBST洗膜 5 min×4 次, 然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, TBST洗膜 5 min×4 次。按照 ECL 试剂盒 (Immobilon) 说明书进行显影。以 α -tubulin 作为内参, 采用 Image J 软件分析条带灰度值, 计算目的条带与内参条带的灰度比值。

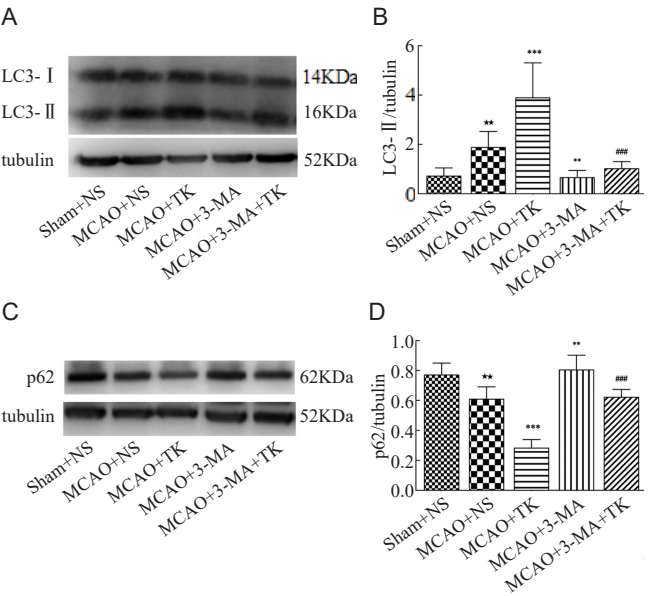
1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.0 软件处理数据。符合正态分布以及方差齐性的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑缺血诱导自噬的发生, TK 促进缺血脑皮质自噬水平的增加

免疫印迹检测结果显示, NS 组大鼠缺血侧脑皮质 LC3- II 较假手术组表达升高, p62 水平降低 (均 $P < 0.01$); TK 组缺血侧脑皮质 LC3- II 表达高于 NS 组, p62 低于 NS 组 (均 $P < 0.01$), 即 TK 预处理进一步增加 LC3- I 向 LC3- II 的转换, 促进了 p62 的降解; 3-MA 组缺血侧脑皮质 LC3- II 表达低于 TK 组, p62 高于 TK 组 (均 $P < 0.01$), 即 3-MA 预处理抑制了 LC3- I 向 LC3- II 的转换和 p62 的降解; 3-MA+TK 组缺血侧脑皮质 LC3- II 低于 TK 组, p62 高于 TK 组 (均 $P < 0.01$), 即 3-MA 可降低 TK 对 LC3- I 及 p62 表达水平的影响; 见图 1。



注: 与假手术组 (Sham) 组比较, ** $P < 0.01$; 与 NS 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 TK 组比较, *** $P < 0.001$; $n = 5$

图 1 不同药物干预对大鼠缺血脑皮质自噬相关分子表达的影响

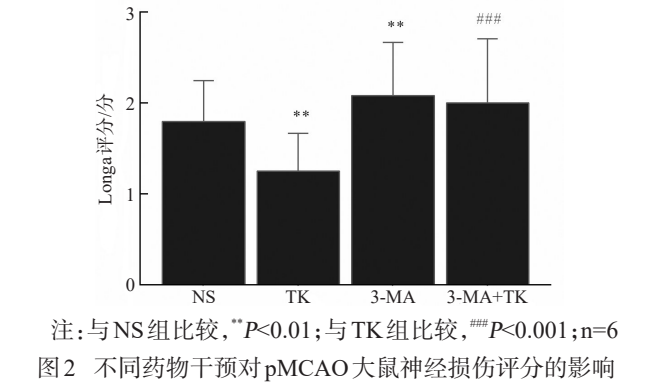
2.2 TK 促进 pMCAO 大鼠神经功能恢复

与 NS 组比较, TK 预处理能降低大鼠的 Longa 评分, 改善大鼠神经功能 ($P < 0.01$); 自噬抑制剂 3-MA 预

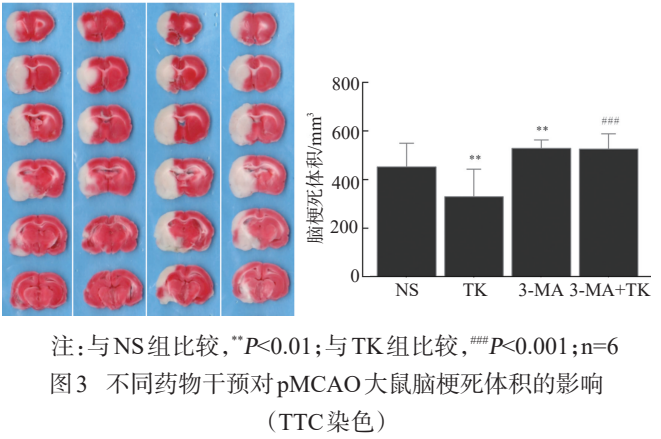
处理大鼠的 Longa 评分增加 ($P < 0.01$); 与 TK 组相比, 3-MA+TK 联合给药大鼠的 Longa 评分增加 ($P < 0.01$), 见图 2。

2.3 TK 减小 pMCAO 大鼠的梗死体积

与 NS 组比较, TK 组大鼠的脑梗死体积缩小 ($P < 0.01$), 3-MA 组大鼠的脑梗死体积增加 ($P < 0.01$); 与 TK 相比, 3-MA+TK 联合给药大鼠的脑梗死体积明显增加 ($P < 0.01$), 见图 3。



注: 与 NS 组比较, ** $P < 0.01$; 与 TK 组比较, *** $P < 0.001$; $n = 6$



3 讨论

本研究通过体内实验研究发现, TK 提高了 pMCAO 大鼠缺血脑皮质的自噬水平, 减轻了 pMCAO 大鼠的神经功能缺损、减小了大鼠脑梗死体积; 自噬抑制剂 3-MA 加重了 pMCAO 大鼠的神经功能缺损, 增加了脑梗死体积, 并削弱了 TK 对脑梗死的保护作用。本研究结果表明 TK 对缺血性卒中的神经保护作用与诱导保护性自噬有关。既往关于自噬在脑缺血中的作用存在争议。一项基于大鼠 pMCAO 模型的研究表明, 3-MA 预处理可减小梗死体积、减轻脑水肿, 改善运动功能^[11]。Zheng 等^[12]通过侧脑室注射 shRNA 慢病毒干扰 Beclin1 的表达, 发现在大脑中动脉短暂缺血 (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO) 造模后第 14 天, 大鼠脑梗死体积减小, 脑组织损伤和神

经功能缺损减轻。也有学者认为,在缺血缺氧条件下,自噬对细胞的存活是有利的。自噬抑制剂 3-MA 可加剧新生鼠缺血缺氧所致神经元死亡,而自噬诱导剂雷帕霉素则可减轻脑损伤,具有神经保护作用^[13]。目前研究结论的差异可能与不同的给药方式、给药时期、实验模型及 3-MA 的非特异性效应有关。3-MA 通过抑制 III 型 PI3K 抑制自噬的发生,但 PI3K 的激活除了诱导自噬,还可产生多种生物学效应,包括凋亡和坏死^[14]。总体来讲,主流观点仍然认为自噬具有细胞保护作用^[2,6]。我们的前期研究也证实,TK 可通过诱导保护性自噬的发生减少氧糖剥夺处理后神经细胞的死亡,其分子机制与 AMPK 和 MEK/ERK 信号通路的激活有关^[15]。本研究通过体内实验进一步证明了自噬的激活是脑组织对缺血刺激的一种适应性应答。

虽然静脉溶栓和血管内治疗是缺血性卒中患者急性期有效的治疗手段,但其有效性随着治疗时间的推迟而下降,治疗时间窗限制、院前及院内延误、院内设施的缺乏及经济原因等因素导致部分患者无法及时获得血管再通治疗,且部分患者血管再通带来的再灌注损伤会加重半暗带的损伤、血脑屏障的破坏及症状性颅内出血的发生,因此神经保护药物在急性缺血性卒中的治疗措施中仍然具有重要地位^[16,17]。临床荟萃分析表明,激肽释放酶注射液可减轻急性缺血性卒中患者的神经功能缺损,改善远期预后^[18]。既往关于 TK 神经保护机制的研究主要集要在抑制细胞凋亡和炎症损伤等方面^[8,9]。本研究发现 TK 具有明确的自噬诱导效应,并且抑制自噬削弱了 TK 的神经保护效应,表明 TK 对缺血性卒中的神经保护作用与诱导自噬发生有关,TK 对于不具备溶栓和取栓条件的急性缺血性卒中患者增加了治疗方案的选择。

参考文献

- [1] Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19: 349-364.
- [2] Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)[J]. Autophagy, 2021, 17: 1-382.
- [3] Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14: 2201-2214.
- [4] Wang P, Shao BZ, Deng Z, et al. Autophagy in ischemic stroke[J]. Prog Neurobiol, 2018, 163-164: 98-117.
- [5] Lu X, Zhang J, Ding Y, et al. Novel therapeutic strategies for ischemic stroke: recent insights into autophagy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 3450207.
- [6] Wang X, Fang Y, Huang Q, et al. An updated review of autophagy in ischemic stroke: From mechanisms to therapies[J]. Exp Neurol, 2021, 340: 113684.
- [7] Waeckel L, Potier L, Richer C, et al. Pathophysiology of genetic deficiency in tissue kallikrein activity in mouse and man[J]. Thromb Haemost, 2013, 110: 476-83.
- [8] 陆征宇, 崔梅, 刘艳萍, 等. 脑缺血后激肽释放酶-激肽系统神经血管保护机制的研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2015, 4: 326-328.
- [9] Chao J, Shen B, Gao L, et al. Tissue kallikrein in cardiovascular, cerebrovascular and renal diseases and skin wound healing[J]. Biol Chem, 2010, 391: 345-355.
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible Middle Cerebral-Artery Occlusion without Craniectomy in Rats[J]. Stroke, 1989, 20: 84-91.
- [11] Wen YD, Sheng R, Zhang LS, et al. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways[J]. Autophagy, 2008, 4: 762-769.
- [12] Zheng YQ, Liu JX, Li XZ, et al. RNA interference-mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30: 919-927.
- [13] 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: 366-377.
- [14] Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway[J]. Biochem J, 2008, 415: 333-344.
- [15] Liu Y, Lu Z, Cui M, et al. Tissue kallikrein protects SH-SY5Y neuronal cells against oxygen and glucose deprivation-induced injury through bradykinin B2 receptor-dependent regulation of autophagy induction[J]. J Neurochem, 2016, 139: 208-220.
- [16] Bruce C V Campbell. Thrombolysis and thrombectomy for acute ischemic stroke: strengths and synergies[J]. Semin Thromb Hemost, 2017, 43: 185-190.
- [17] Patel RAG, McMullen PW. Neuroprotection in the treatment of acute ischemic stroke[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2017, 59: 542-548.
- [18] Huang Y, Wang B, Zhang Y, et al. Efficacy and safety of human urinary kallidinogenase for acute ischemic stroke: a meta-analysis[J]. J Int Med Res, 2020, 48: 300060520943452.

(本文编辑:唐颖馨)