文章编号:1000-5404(2013)09-0841-05

论著

# 大鼠脊髓损伤后自噬相关蛋白LC3和BNIP3的表达

于大堂[1],李茗芳[2],倪 兵[3],张正丰[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科[1];400038 重庆,第三军医大学:西南医院皮肤科[2],基础医学部全军免疫学研究所[3])

[摘要] **目的** 检测大鼠脊髓损伤后神经元自噬以及相关蛋白的表达。**方法** 24只雄性SD大鼠,按随机数字表法分为假手术组,损伤后6、12、24、48、72 h组,每组4只。假手术组仅作T10椎板切除,Allen's法建立损伤模型。透射电镜观测损伤组织的超微结构,Western blot检测LC3、BNIP3的表达变化,免疫荧光检测LC3、BNIP3的表达及定位。**结果** 透射电镜下脊髓损伤48 h后观测到自噬小体;Western blot检测显示LC3-Ⅱ表达量48 h后明显升高($P<0.01$),BNIP3损伤后12 h明显升高($P<0.05$);免疫荧光显示LC3、BNIP3在损伤区域的神经元中高表达。**结论** 大鼠脊髓损伤后激活神经元自噬以及相关蛋白表达。

[关键词] 脊髓损伤;自噬;LC3;BNIP3
[中图法分类号] R341; R394.2; R651.2 [文献标志码] A

# Expression of autophagy related proteins LC3 and BNIP3 after acute spinal cord injury in rats

Yu Datang[1], Li Mingfang[2], Ni Bing[3], Zhang Zhengfeng[1] ([1]Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Dermatology, Southwest Hospital, [3]Institute of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the activity of autophagy in neurons and the expression of autophagy related proteins in rats after spinal cord injury (SCI). **Methods** Twenty-four male SD rats were randomly divided into 6 groups, that is, sham-operation, and 6, 12, 24, 48, and 72 h after injury groups ($n=4$ for each group). The rats from the first group were given resection of T10 vertebral plate, while those of other groups were subjected to spinal contusion using an Allen's injury process. Transmission electron microscopy (TEM) was employed to observe the ultrastructure of the injured region and the formation of autophagic vacuoles. Immunofluorescence staining and Western blotting were used to detect the location and expression of LC3 and BNIP3 after SCI at different time points. **Results** Neuron autophagy was activated in injured spinal cord in 48 h after injury. Western blotting demonstrated that the expression of LC3-Ⅱ was significantly increased in 48 h after injury ($P<0.01$), and that of BNIP3 was up-regulated in 12 h ($P<0.05$). LC3 and BNIP3 positive neurons were accumulated in the lesions. **Conclusion** SCI activates neuron autophagy and autophagy markers LC3 and BNIP3 in the damaged neural tissue.

[**Key words**] spinal cord injury; autophagy; LC3; BNIP3

Support by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81070980). Corresponding author: Zhang Zhengfeng, E-mail: zhangz68@yahoo.cn

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)按病理、生理学机制可分为原发性和继发性损伤。两者均能引起神经的功能丧失,但因原发性损伤不可逆,目前研究的焦点主要是继发性脊髓损伤。继发性脊髓损伤的原因主要包括局部缺血、兴奋毒性、氧化应激、炎症、神经细胞营养不良等[1]。神经元继发性死亡的方式分为坏死和凋亡[2]。自噬是在营养缺乏和氧化应激时,细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程,在维持细胞内环境的稳定方面发挥重大作用[3]。透射电镜下可见自噬的全过程,是检测自噬体的金标准。

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81070980)
[通信作者] 张正丰,E-mail:zhangz68@yahoo.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130227.1337.006.html(2013-02-27)

此外,自噬体膜上的标志性蛋白微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3,LC3)也被作为检测标准。基因bcl-2/腺病毒E1B19000相互作用蛋白(bcl-2/E1B-19K-interacting protein,BNIP3)属于bcl2家族成员,含有bcl2家族BH3相似的区域,BNIP3在肿瘤细胞和心肌缺氧模型中发现介导自噬[4]。目前,针对脊髓损伤后神经元的自噬研究不多[5-6]。本研究利用透射电镜、Western blot和免疫荧光技术,进一步探讨自噬在脊髓损伤继发性神经元死亡的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 24只雄性SD大鼠(体质量200~220 g,第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),按照随机数字表法分为6组,每组4只。动物实验均通过第三军医大学实验动物管理委员会的批准。

1.1.2 主要试剂和仪器 T-PER® 组织蛋白提取试剂(Pierce, Rockford,美国),BCA蛋白浓度测定试剂盒(Beyotime biotechnology,中国),4%~12% NuPAGE凝胶(Invitrogen,美国),封闭液(Pierce, Rockford,美国),兔抗LC3多克隆抗体(Abcam,美国),兔抗BNIP3多克隆抗体(Abcam, 美国),小鼠抗β-action单克隆抗体(Santa Cruz,美国),HRP标记山羊抗兔IgG抗体(Santa Cruz,美国),HRP标记山羊抗小鼠的IgG抗体(Santa Cruz,美国),小鼠抗NeuN单克隆抗体(Millipore,美国),Cy3标记山羊抗兔IgG抗体(Beyotime biotechnology,中国),FITC标记山羊抗小鼠IgG抗体(Beyotime biotechnology,中国),化学发光液(Millipore, 美国),低温高速离心机(Eppendorf,美国),Western blot电泳仪、转膜仪(Invitrogen,美国),酶标仪(Beckman Coulter, 美国),冰冻切片机(Microm HM550,德国),激光共聚焦显微镜(Leica SP5,德国),超微切片机(LKB-V,瑞典),透射电镜(PHILIPS TECNAI-10,荷兰)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg),切除T10椎板,暴露硬脊膜,自制Allen's打击器,15 g打击棒(直径3 mm),自20 mm的高度自由落体击打暴露的脊髓,造成脊髓冲击伤。假手术组没有冲击伤,仅切除椎板。术后给予人工排尿3次/d,直至膀胱反射恢复。

1.2.2 Western blot检测 在脊髓损伤后不同时间点,大鼠过量麻醉后,迅速取出长约10 mm包括损伤区域的脊髓组织,T-PER® 组织蛋白提取试剂提取脊髓总蛋白,BCA蛋白浓度测定试剂盒定量蛋白浓度,相同质量的样品(40 μg),4%~12% NuPAGE凝胶恒压分离,湿转到PVDF膜上,封闭液室温封闭1 h,兔抗LC3多克隆抗体(1∶500),兔抗BNIP3多克隆抗体(1∶200)和小鼠抗β-action单克隆抗体(1∶500) 4 ℃孵育过夜,分别加入HRP标记山羊抗兔和HRP标记山羊抗小鼠的二抗(1∶5 000),室温孵育1 h,化学发光液显影。

1.2.3 免疫荧光检测 损伤24、48 h的大鼠,过量麻醉后,自左心室灌注生理盐水,4%多聚甲醛灌注固定,取出损伤组织长约10 mm,20%蔗糖4度脱水过夜,冰冻切片机连续横切片(片厚20 μm),10%山羊血清封闭1 h,兔抗LC3多克隆抗体(1∶200),兔抗BNIP3多克隆抗体(1∶200)和小鼠抗NeuN单克隆抗体(1∶200) 4 ℃孵育过夜,Cy3标记山羊抗兔IgG(1∶50)抗体和FITC标记山羊抗小鼠IgG抗体(1∶100)37 ℃湿盒孵育1 h,DAPI染色,抗荧光淬灭封片液封片,激光共聚焦显微镜下观测。

1.2.4 透射电镜观察 损伤48 h的大鼠,过量麻醉后,自左心室灌注生理盐水,4%多聚甲醛-2.5%戊二醛灌注固定,损伤脊髓后角取约1 $mm^3$的组织,PBS漂洗,1%锇酸后固定1 h,酒精、丙酮逐级脱水,环氧树脂618包埋,甲苯胺蓝染色后定位,超薄切片(70 nm),醋酸铀、柠檬酸铅分别染色,透射电镜下观测。

### 1.3 统计学分析

Western blot检测结果通过Image J软件收集灰度值,目的条带灰度值与内参灰度值之比作为相对表达量,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用GraphPad Prism 5单因素方差分析。

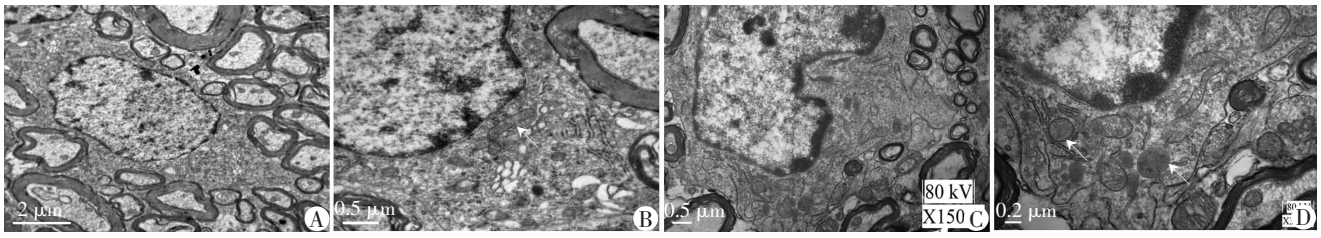
## 2 结果

### 2.1 透射电镜观测神经元自噬

透射电镜结果显示,假手术组神经元有明亮的细胞核、粗面内质网和线粒体,并没有发现自噬小体(图1A、B)。脊髓损伤48 h后,可以看到线粒体肿胀、自噬小体以及溶酶体,高倍镜下可以看到双层膜的自噬小体包裹着损伤的线粒体以及细胞器碎片(图1C、D)。

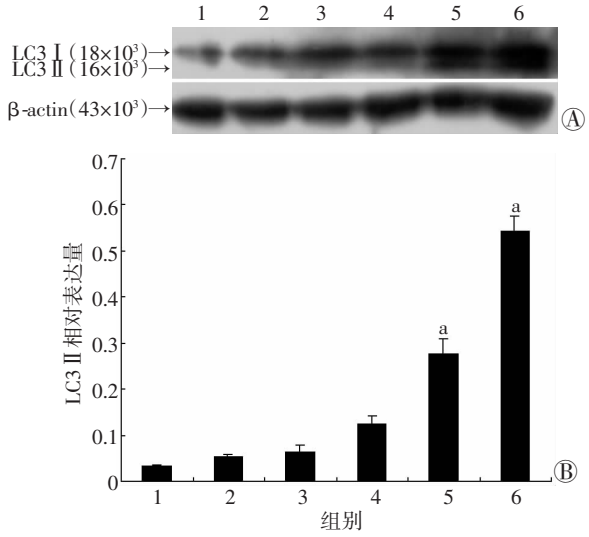
### 2.2 Western blot检测LC3表达增高

自噬激活后,LC3-Ⅰ转换成磷脂酰乙醇胺结合的LC3-Ⅱ。LC3-Ⅰ($18 \times 10^3$)表达量在损伤后各时间点与假手术组比并没有发生明显变化,而LC3-Ⅱ($16 \times 10^3$)的表达量在损伤后48 h却有明显的升高($P<0.01$,图2)。




A:假手术组;B:高倍镜下假手术组 箭头示正常的线粒体;C:损伤组48 h;D:高倍镜下损伤组48 h 箭头示双层膜的自噬小体包裹着细胞碎片

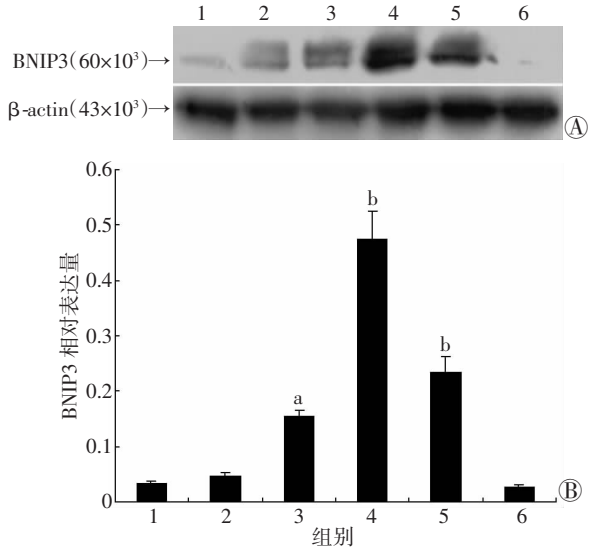
**图1 透射电镜观察假手术组和损伤组(48 h)神经元的超微结构**




1:假手术组;2~6:损伤后 6、12、24、48、72 h 组

A:Western blot 检测结果;B:半定量分析($n=4$) a:$P<0.01$,与假手术组比较

**图 2 Western blot 检测 LC3 不同损伤时间点的表达**




1:假手术组;2~6:损伤后 6、12、24、48、72 h 组

A:Western blot 检测结果;B:半定量分析($n=4$) a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与假手术组比较

**图 3 Western blot 检测 BNIP3 不同损伤时间点的表达**

### 2.3 Western blot 检测 BNIP3 表达增高

BNIP3($60\times10^3$)在假手术组几乎不表达,脊髓损伤后 12 h 明显升高($P<0.05$),24 h 后达到高峰($P<0.01$),72 h 后又下降至假手术组的水平(图 3)。

### 2.4 免疫荧光检测 LC3 在神经元表达增高

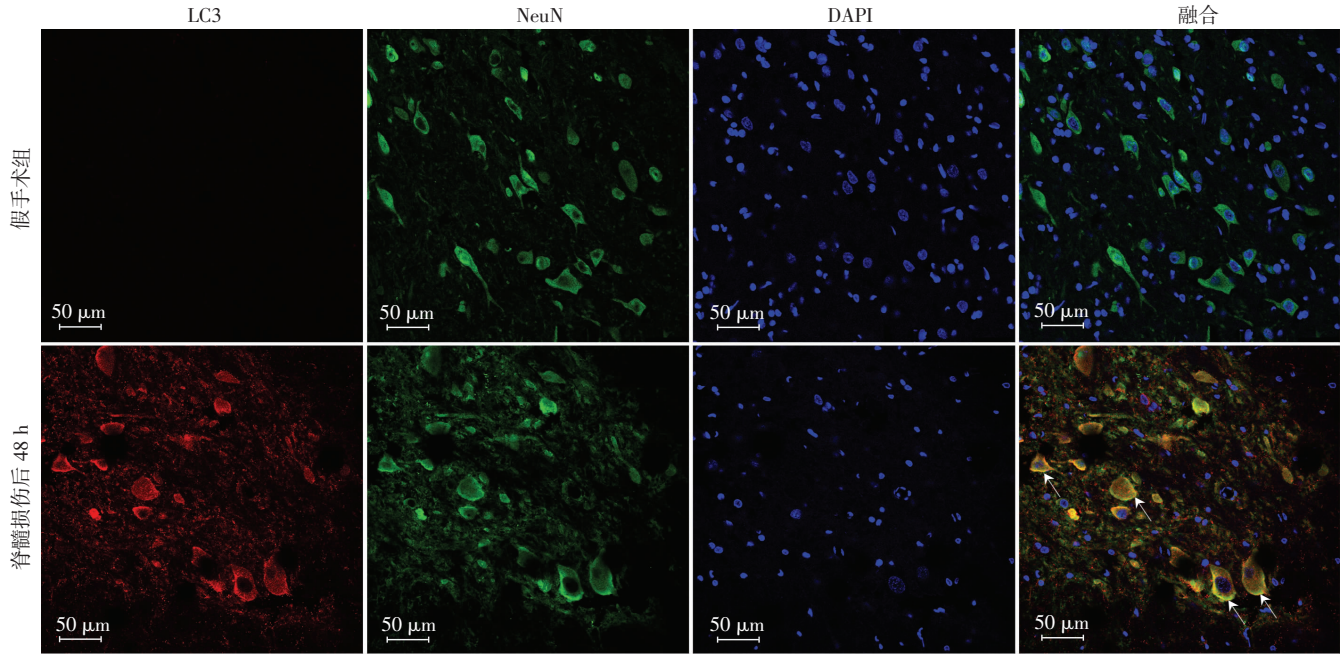
LC3 和 NeuN 双标发现,LC3 在损伤组织的神经元中高表达。在假手术组的神经元中,并没有发现 LC3 的表达(图 4)。

### 2.5 免疫荧光检测 BNIP3 在神经元中表达增高

BNIP3 在损伤组织的神经元中高表达。在假手术组的神经元中,并没有发 BNIP3 的表达(图 5)。

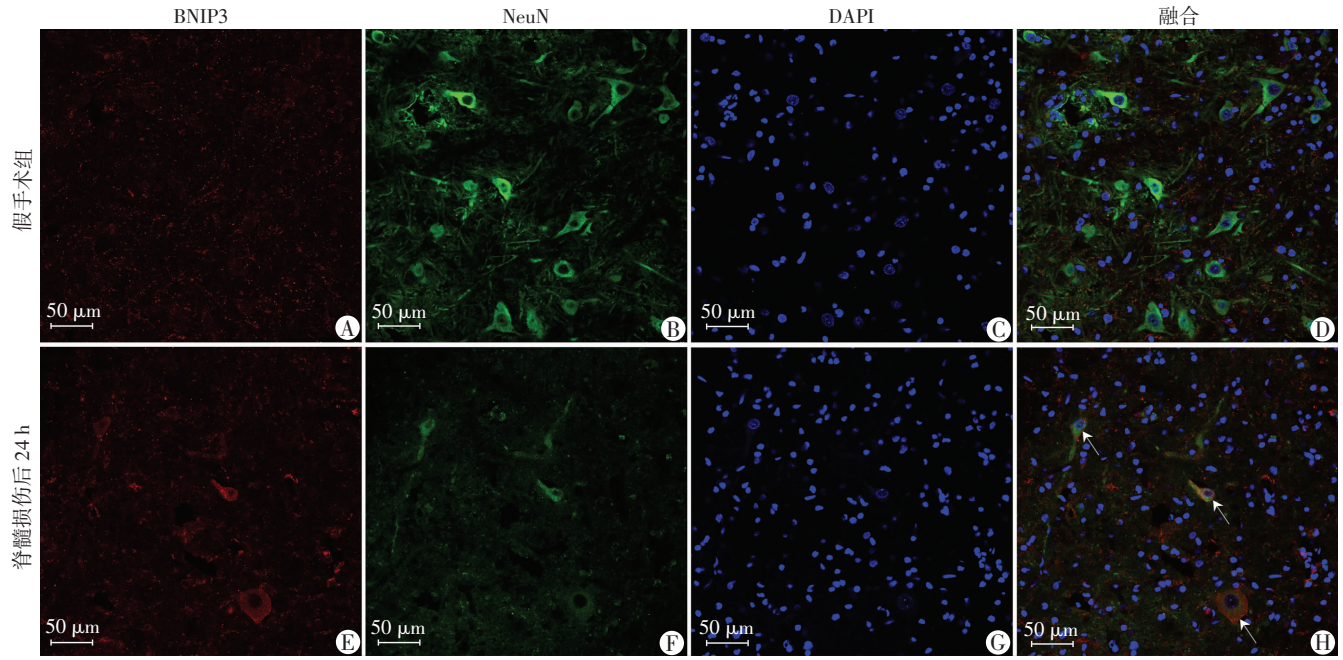
## 3 讨论

脊髓损伤后,神经元的死亡方式主要是坏死以及凋亡。新近文献报道脑外伤以及脊髓损伤后发现自噬




箭头示 LC3 与神经元共表达

**图 4 免疫荧光双标检测 LC3 与神经元的表达**




箭头示 BNIP3 与神经元共表达

**图5 免疫荧光双标检测 BNIP3 与神经元的表达**

以及自噬相关蛋白 LC3、Beclin-1 增高[5]。为检测脊髓损伤后是否出现自噬，我们通过透射电镜在损伤脊髓中发现神经元自噬小体；Western blot 检测 LC3 和 BNIP3 在损伤不同时间点的表达变化；免疫荧光观测 LC3 和 BNIP3 在损伤区域神经元高表达。较多文献通过电镜观测自噬小体，文献[5]报道脊髓损伤后 3 d 透射电镜下观测到自噬小体，本实验也在脊髓损伤后 2 d 发现神经元自噬小体，与文献报道基本相符，但 Kanno 等[5]的电镜图片分不清损伤细胞的类型以及基本结构，而我们的可以清楚地观察到细胞的超微结构。LC3 是检测自噬活性的一个标志性蛋白，Kanno 等[5]通过免疫荧光来观测 LC3 在 4 h 出现，3 d 后达到高峰。本研究 Western blot 检测结果与之基本相符。我们同时通过免疫荧光发现 LC3 主要在损伤区域的中心增高，并在神经元高表达，这与 Kanno 等[5]发现 LC3 在其他细胞类型中也表达不同。主要原因可能是动物模型、损伤的时间点以及抗体的种类不同。

自噬性细胞死亡有别于凋亡（Ⅰ型程序性死亡），而被称为Ⅱ型程序性死亡。自噬过程的信号调控主要通过雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）信号途径和磷酸肌醇-3-激酶（PI3K）/Akt（PKB）途径[7]。活性氧（reactive oxygen species，ROS）[8]在肿瘤细胞缺氧模型中发现了介导自噬，这可能是 BNIP3 引起线粒体损伤后 ROS 蓄积，导致自噬的发生[4]。正常的神经元中不能检测到 BNIP3，但在缺血、缺氧时发现 BNIP3 表达增高，诱导非典型性凋亡[9]。另外，在谷氨酸引起神经元兴奋毒性死亡[10]和β-淀粉样蛋白引起神经元氧化应激性细胞毒性的体外实验中[11]，均发现 BNIP3 表达增高。脊髓损伤后，神经元缺氧后的兴奋毒性、氧化应激损伤是神经元继发性死亡的主要原因，这些体外发现提示 BNIP3 与脊髓损伤后继发性神经元死亡相关。本实验也证实脊髓损伤后 BNIP3 表达增高。新近有报道 LC3 与 BNIP3 二聚体上的 LC3 结合区域（LC3-interacting region，LIR）结合诱导自噬[12]。那么 BNIP3 是否也在脊髓损伤中与 LC3 相互作用诱导自噬，需要进一步研究。

大量研究报道自噬在多种疾病模型中诱导细胞死亡[13-14]，然而也有报道自噬具有细胞保护作用，减少细胞的死亡[15-16]。有关自噬在脊髓损伤中的作用报道较少。有研究报道，雷帕霉素抑制了 mTOR 增强自噬并减少了神经组织的损伤，促进了神经功能的恢复[17-18]。与此相反，Walker 等[19]研究发现激活 mTOR 信号通路减少自噬，增强了大鼠运动功能的恢复。因此，自噬在脊髓损伤细胞死亡中的作用非常复杂，这取决于实验条件的不同、损伤发展的不同阶段、外环境的变化等。

## 参考文献：

[1] Hall E D, Springer J E. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal[J]. NeuroRx, 2004, 1(1): 80-100.

[2] Rowland J W, Hawryluk G W, Kwon B, *et al*. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon[J]. Neurosurg Focus, 2008, 25(5): E2.

[3] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. Cell, 2008, 132(1): 27-42.

[4] Zhang J, Ney P A. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(7): 939-946.

[5] Kanno H, Ozawa H, Sekiguchi A, *et al*. Induction of autophagy and autophagic cell death in damaged neural tissue after acute spinal cord injury in mice[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(22): E1427 – E1434.
[6] Chen H C, Fong T H, Lee A W, *et al*. Autophagy is activated in injured neurons and inhibited by methylprednisolone after experimental spinal cord injury[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2012, 37(6): 470 – 475.
[7] Meijer A J, Codogno P. Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease[J]. Mol Aspects Med, 2006, 27(5/6): 411 – 425.
[8] Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, *et al*. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4 [J]. EMBO J, 2007, 26(7): 1749 – 1760.
[9] Zhang Z, Yang X, Zhang S, *et al*. BNIP3 upregulation and EndoG translocation in delayed neuronal death in stroke and in hypoxia[J]. Stroke, 2007, 38(5): 1606 – 1613.
[10] Zhang Z, Shi R, Weng J, *et al*. The proapoptotic member of the Bcl-2 family Bcl-2/E1B-19K-interacting protein 3 is a mediator of caspase-independent neuronal death in excitotoxicity[J]. FEBS J, 2011, 278(1): 134 – 142.
[11] Zhang S, Zhang Z, Sandhu G, *et al*. Evidence of oxidative stress-induced BNIP3 expression in amyloid beta neurotoxicity[J]. Brain Res, 2007, 1138: 221 – 230.
[12] Hanna R A, Quinsay M N, Orogo A M, *et al*. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria *via* autophagy[J]. J Biol Chem, 2012, 287(23): 19094 – 19104.
[13] Matsui Y, Kyoi S, Takagi H, *et al*. Molecular mechanisms and physiological significance of autophagy during myocardial ischemia and reperfusion[J]. Autophagy, 2008, 4(4): 409 – 415.
[14] Rami A, Langhagen A, Steiger S. Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death[J]. Neurobiol Dis, 2008, 29(1): 132 – 141.
[15] Carloni S, Buonocore G, Balduini W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury[J]. Neurobiol Dis, 2008, 32(3): 329 – 339.
[16] Sarkar S, Ravikumar B, Floto R A, *et al*. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(1): 46 – 56.
[17] Chen H C, Fong T H, Hsu P W, *et al*. Multifaceted effects of rapamycin on functional recovery after spinal cord injury in rats through autophagy promotion, anti-inflammation, and neuroprotection[J]. J Surg Res, 2013, 179(1): e203 – e210.
[18] Sekiguchi A, Kanno H, Ozawa H, *et al*. Rapamycin promotes autophagy and reduces neural tissue damage and locomotor impairment after spinal cord injury in mice[J]. J Neurotrauma, 2012, 29(5): 946 – 956.
[19] Walker C L, Walker M J, Liu N K, *et al*. Systemic bisperoxovanadium activates Akt/mTOR, reduces autophagy, and enhances recovery following cervical spinal cord injury[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30012.

(**收稿**:2012-12-17;**修回**:2013-01-07)
(编辑 龙 亮)

(上接 836 页)

脏自身的重力作用,直接压迫在右季肋部,起到体位压迫预防出血的目的。患者右侧卧位 2 h 后可将床头抬高 30°卧床休息:患者双上肢放于躯体两侧,双下肢伸直或屈曲,将枕头放于膝关节下使腿屈曲,或两腿原样伸展,成自由放置于舒适体位。此体位对循环、呼吸影响小,而且患者也感舒适。

1.3.3 病情观察 术后 24 h 重点观察穿刺点出血、疼痛、排尿困难、腰背酸痛等。指导患者可在床上适当活动双下肢或按摩,但不可坐起,尽量避免体位改变幅度过大及频繁改变体位,24 h 后可下床活动,针对性宣教,保持患者心情舒畅。

## 2 结果

173 例患者穿刺成功率为 100%,均取得理想肝组织标本。术后无 1 例出血和发热,无其他如肝包膜下出血、胆汁性腹膜炎、血气胸等严重并发症。肝穿后疼痛是最常见并发症,发生率由于评价标准的不同而异。本组 3 例感疼痛较剧,同时感胸闷、心悸,给予吸氧、变换体位等处理后逐渐缓解;其余局部疼痛感较轻,未预特殊处理。2 例有轻微恶心感,未予特殊处理后均逐渐缓解。

## 3 讨论

肝活检术后出血是最危险的并发症,如何预防出血是肝活检过程中必须解决的关键问题。引起肝活检术后出血的原因多与穿刺者的操作技术有关,如动作粗暴、穿刺过深等、也与患者心情紧张,配合欠佳、穿刺过程中身体移位或穿刺局部有肝硬化结节、肿瘤等因素有关。在护理方面,频繁改变体位、剧烈运动、过早下床活动等均为引发出血的重要因素。传统的肝活检术护理常规为术后 24 h 绝对卧床,沙袋局部压迫 6 h,腹带包扎 24 h,此方法部分限制了患者的活动,使患者不适,且易出现穿刺点疼痛、腰背酸痛、排尿困难等情况。右侧卧位可以使肝脏穿刺点利用肝脏自身的重力作用,直接压迫在右季肋部,起到体位压迫预防出血的目的[4]。本组通过对 173 例采用体位压迫肝活检患者的观察,无 1 例有术后出血等并发症的发生,表明体位压迫有益于肝活检术后出血的预防,并通过体位压迫替代沙袋、腹带的作用,更有利于及时发现病情变化。良好的体位不仅可使患者感到舒适,还可缓解患者的症状。体位压迫护理较肝活检术后传统的护理方法更加简便、易行,减轻患者痛苦,值得临床推广应用。

## 参考文献:

[1] Howlett D C, Drinkwater K J, Lawrence D, *et al*. Findings of the UK national audit evaluating image-guided or image-assisted liver biopsy. Part II. Minor and major complications and procedure-related mortality [J]. Radiology, 2013, 266(1): 226 – 235.
[2] Perrault J, McGill D B, Ott B J, *et al*. Liver biopsy: complications in 1000 inpatients and outpatients[J]. Gastroenterology, 1978, 74(1): 103 – 106.
[3] 范平,江军,冯晓峰,等.500 例经皮肝穿刺活检并发症分析[J].中华消化杂志, 2004, 24(7): 426.
[4] 陈艳丽,王筱红,鲁碧飞,等. 肝穿刺活检术后体位压迫预防出血[J]. 护理学杂志, 2011, 26(4): 89.

(**收稿**:2013-03-11;**修回**:2013-03-25)
(编辑 张 维)