基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001082

# Apelin-13对兔创伤性脑损伤后大脑皮质细胞自噬影响的研究

罗　飞[1],余　斌[2],许红旗[1]

（1. 安阳市人民医院神经外科,安阳　455000;2. 郑州大学第一附属医院神经外科,郑州　450000）

【摘　要】**目的**:探讨 Apelin-13 对兔脑外伤创伤性脑损伤后大脑皮质细胞自噬的影响。**方法**:选取健康雄性大兔 30 只,依据随机数表法分为无创伤组、创伤+Apelin-13 组、单纯创伤组,每组 10 只,比较 3 组大兔脑皮质自噬相关蛋白的表达及脑体积缺损比。**结果**:创伤+Apelin-13 组兔 Beclin-1、Lc3 明显高于无创伤组,且低于单纯创伤组,bcl-2、p62 明显低于无创伤组,但高于单纯创伤组,无创伤组兔 p-mTOR 高于单纯创伤组,创伤+Apelin-13 组兔 p-mTOR 高于无创伤组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。无创伤组、创伤+Apelin-13 组、单纯创伤组兔脑外伤后大脑皮质 Lc3-Ⅱ/Lc3-Ⅰ分别为(0.19±0.05)、(0.23±0.07)、(0.36±0.08),Beclin-1/bcl-2 分别为(0.43±0.09)、(0.78±0.12)、(1.61±0.35)。无创伤组、创伤+Apelin-13 组、单纯创伤组兔脑外伤后脑体积缺损比分别为 0%、(15.31±3.21)%、(26.74±4.85)%。创伤+Apelin-13 组兔脑体积缺损比高于无创伤组,但明显低于单纯创伤组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论**:Apelin-13 能够抑制兔脑外伤后大脑皮质细胞自噬,可能与 Beclin-1、p-mTO 等自噬相关蛋白表达有关。

【关键词】Apelin-13;兔脑外伤;大脑皮质;细胞自噬

【中图分类号】R365　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-08-30

# Apelin-13 autophagy affects the brain cortex cells of the rabbit brain trauma

*Luo Fei*[1], *Yu Bin*[2], *Xu Hongqi*[1]

(*1.Department of Neurosurgery, the People's Hospital of Anyang City in Henan; 2. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate Apelin-13 on traumatic brain injury in rabbits cerebral cortical cells autophagy. ***Methods***: A total of 30 healthy male rabbits were selected and divided into non trauma group, trauma +Apelin-13 group, trauma + physiological saline group, with 10 rats in each group rabbits, according to the random number table method. Rat cerebral cortex autophagy related protein expression and loss of cerebral volume ratio was compared among three groups. ***Results***: The levels of Beclin-1 and Lc3 in traumatic + Apelin-13 group were significantly higher than those in non-traumatic group, and the levels of bcl-2 and p62 were significantly lower than those in non-traumatic group. P-mTOR in traumatic + Apelin-13 group was significantly higher than that in non-traumatic group($P<0.05$). Lc3-Ⅱ/ Lc3-Ⅰ were (0.19 ± 0.05), (0.23 ± 0.07), (0.36 ± 0.08), and Beclin-1/bcl-2 were (0.43 ± 0.09), (0.78 ± 0.12), (1.61 ± 0.35), respectively in non trauma group, traumatic + Apelin-13 group and trauma + physiological saline group. The ratios of trauma were 0%, (15.31 ± 3.21)% and (26.74 ± 4.85)% in non trauma group, traumatic + Apelin-13 group and trauma + physiological saline group; the ratio in traumatic + Apelin-13 group was significantly higher than that in non trauma group, but lower in trauma + physiological saline group($P<0.05$). ***Conclusion***: Apelin-13 can inhibit the cerebral cortex after traumatic brain injury in rabbits autophagy, mainly by adjusting the Beclin-1, p-mTO and other autophagy-related protein levels.

【Key words】apelin-13; eabbit brain trauma; cerebral cortex; autophagy

细胞自噬是一种细胞内物质周转活动,细胞自噬过程中,损坏的细胞器及蛋白被自噬小泡包裹,并通过溶酶体进行降解[1-2]。细胞自噬与细胞凋亡和衰老一样,直接参与机体的生长和发育,是维持生理结构和功能稳态的重要活动。病理状态下,机体内细胞自噬活性明显提高,以对抗细胞缺血和凋亡。Apelin-13 基因定位于人 X 染色体 q25-26.1。Apelin-13 广泛分布于人体内,主要通过自分泌和旁分泌途径发挥作用[3]。目前,有关 Apelin-13 的研究主要集中于与心力衰竭、高血压、冠状动脉粥样硬

作者介绍:罗　飞,Email:luofei123789@163.com,
研究方向:神经外科。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161215.1145.030.html
(2016-12-15)

表 1 Apelin-13 对兔脑外伤后大脑皮质细胞自噬蛋白表达的影响

Tab.1 Apelin-13 of rabbit cerebral cortex cell autophagy protein expression after traumatic brain injury

| 分组 | Beclin-1 | Lc3 | p-mTOR | bcl-2 | p62 |
|---|---|---|---|---|---|
| 无创伤组 | 0.38 ± 0.04 | 0.47 ± 0.08 | 0.23 ± 0.07 | 0.89 ± 0.14 | 0.86 ± 0.23 |
| 创伤 + Apelin-13 组 | 0.62 ± 0.15[a] | 0.82 ± 0.18[a] | 0.48 ± 0.13[a] | 0.81 ± 0.10[a] | 0.79 ± 0.20[a] |
| 单纯创伤组 | 1.03 ± 0.27[ab] | 2.17 ± 0.59[ab] | 0.21 ± 0.05[b] | 0.68 ± 0.09[ab] | 0.64 ± 0.17[ab] |
| *F* 值 | 2.093 | 2.396 | 1.993 | 2.198 | 2.306 |
| *P* 值 | 0.038 | 0.017 | 0.047 | 0.031 | 0.021 |

注：a，与无创伤组比较，$P<0.05$；b：与创伤 + Apelin-13 组比较，$P<0.05$

化及免疫系统的关系，而在 Apelin-13 对创伤性脑损伤后细胞自噬影响方面的研究尚不多见。近年来，临床研究发现 Apelin-13 在保护大脑再灌注损伤、缩减脑缺血体积方面具有明显效果，对脑外伤患者给予 Apelin-13 治疗后病情得到有效控制，但该药物的具体作用机制尚不十分明确。刘继新等[4]的研究数据显示，Apelin-13 能够抑制脑外伤后兔大脑皮质细胞自噬活性，初步确认 Apelin-13 与细胞自噬存在一定相关关系。本研究通过建立兔脑外伤模型，并对无创伤兔、创伤+Apelin-13 兔及单纯创伤兔相关指标进行对比性分析，旨在明确Apelin-13 对兔脑外伤后大脑皮质细胞自噬的影响，现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 实验动物分组

选取健康雄性大兔 30 只，体质量 2 300~2 800 g，由山西医科大学提供，依据随机数表法分为无创伤组、创伤+Apelin-13 组、单纯创伤组，每组 10 只。

### 1.2 兔脑外伤模型制备及药物注射

所有大兔均给予腹腔麻醉，于头部正中作 2 cm 切口，暴露硬脑膜。创伤+Apelin-13 组在创伤打击前 10 min 接受 Apelin-13 脑室注射（脑创伤同侧），0.3 μg/g，单纯创伤组注射等量生理盐水。采用自由落体法对创伤+Apelin-13 组、单纯创伤组大兔进行皮质撞击，砝码质量为 30 g，无创伤组不给予脑皮质打击。

### 1.3 自噬相关蛋白检测

脑皮质打击后 48 h，开颅取出 3 组兔打击侧脑皮质组织（无创伤组取同侧脑皮质组织），提取蛋白质，采用凝胶电泳法分离蛋白质。采用 Western blot 法进行蛋白质转膜。转膜成功后，使用脱脂奶粉溶液进行封闭处理，加入一抗（Beclin-1 1:1 000、Lc3 1:5 000、p-mTOR 1:1 000、bcl-2 1:1 000、p62 1:8 000），4 ℃温度下孵育过夜。加入 IgG 二抗 1:1 000，4℃温度下孵育 1 h，然后加入酶标记亲和素 1:1 000，4℃温度下孵育 1 h。使用超敏发光液进行处理，暗室曝光后收集 X 线定影，分析 Beclin-1（参与自噬体形成，调节自噬活性）、Lc3（参与自噬体形成，反映自噬程度）、p-mTOR（参与自噬反应的负调控）、bcl-2（调控细胞凋亡）、p62（参与多种细胞信号转导和自噬）蛋白带吸光度值。采用苏木素染色法处理兔脑标本，使用图像处理软件计算 3 组大兔的脑缺损体积比。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间计量资料比较用单因素方差分析，其组间两两比较采用 LSD-*t* 法，检验水准 $\alpha$=0.05。

## 2 结 果

### 2.1 Apelin-13 对兔脑外伤后大脑皮质细胞自噬蛋白表达的影响

创伤+Apelin-13 组兔 Beclin-1、Lc3 明显高于无创伤组，且低于单纯创伤组，bcl-2、p62 显著低于无创伤组，但高于单纯创伤组，无创伤组兔 p-mTOR 高于单纯创伤组，创伤+Apelin-13 组兔 p-mTOR 高于无创伤组，差异具有统计学意义（$P<0.05$），见表 1。

### 2.2 Apelin-13 对兔脑外伤后大脑皮质 Lc3-Ⅱ/ Lc3-Ⅰ、Beclin-1/ bcl-2 比值的影响

创伤+Apelin-13 组兔 Lc3-Ⅱ/ Lc3-Ⅰ、Beclin-1/bcl-2 高于无创伤组，但明显低于单纯创伤组，差异具有统计学意义（$P<0.05$），见表 2。

表 2 Apelin-13 对兔脑外伤后大脑皮质 Lc3-Ⅱ/ Lc3-Ⅰ、Beclin-1/ bcl-2 比值的影响

Tab.2 Effect of Apelin-13 on Lc3-Ⅱ/Lc3-Ⅰ, Beclin 1/BCL-2 ratios of the cerebral cortex after traumatic brain injury in rabbits

| 无创伤组 | Lc3-Ⅱ/ Lc3-Ⅰ | Beclin-1/ bcl-2 |
|---|---|---|
| 无创伤组 | 0.19 ± 0.05 | 0.43 ± 0.09 |
| 创伤 +Apelin-13 组 | 0.23 ± 0.07[a] | 0.78 ± 0.12[a] |
| 单纯创伤组 | 0.36 ± 0.08[ab] | 1.61 ± 0.35[ab] |
| *F* 值 | 2.215 | 2.583 |
| *P* 值 | 0.027 | 0.010 |

注：a，与无创伤组比较，$P<0.05$；b：与创伤 +Apelin-13 组比较，$P<0.05$

### 2.3 Apelin-13 对兔脑外伤后脑体积缺损比的影响

无创伤组、创伤+Apelin-13 组、单纯创伤组兔脑外伤后脑体积缺损比分别为 0%、(15.31 ± 3.21)%、(26.74 ± 4.85)%，差异有统计学意义（$F$=3.300，$P$=0.001）。创伤+Apelin-13 组兔脑体积缺损比高于无创伤组，但明显低于单纯创伤组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

## 3 讨 论

细胞自噬是机体受到刺激后，通过吞噬细胞质或细胞器并加以降解的过程，细胞自噬的生物功能主要包括以下几个方面：①细胞自噬活动在机体营养缺乏时开始增强，通过降解非关键成分释放营养成分，以确保细胞在饥饿环境下仍能存活；②当机体受到感染时，细胞可通过自噬活动发挥防御功能；③心肌和骨骼肌的细胞自噬过程能够促进细胞质成分更新，以维持细胞稳态；④通过降解受损细胞器、细胞膜及蛋白清除受损细胞，从而延长寿命[5-6]。脑外伤是一种常见的临床损伤，脑损伤后可继发脑缺血、缺氧，严重时可损伤脑神经组织，是临床治疗的重点和难点。蒯锦霞等[7]在对小兔脑外伤自噬的研究中提到，LC3、Bcl-2 等自噬相关蛋白是参与细胞自噬的主要蛋白质，在脑外伤后的细胞损伤过程中扮演重要角色。本研究通过动物实验对 Apelin-13 的作用机制进行了初步探讨，结果如下。

本研究数据显示，创伤+Apelin-13 组兔 Beclin-1、Lc3 明显高于无创伤组，且低于单纯创伤组，bcl-2、p62 显著低于无创伤组，但高于单纯创伤组，无创伤组兔 p-mTOR 高于单纯创伤组，创伤+Apelin-13 组兔 p-mTOR 高于无创伤组，提示Apelin-13 的使用能够抑制 Beclin-1、Lc3 的过度表达，同时能够控制 bcl-2、p62 水平过低。Beclin-1 基因是哺乳动物细胞自噬的特异性基因，Beclin-1 与凋亡抑制因子 bcl-2 结合能够抑制细胞自噬，阻碍神经系统凋亡[8-9]。当机体受到损伤时，Beclin-1 与 bcl-2 的结合率明显降低，更多的 Beclin-1 通过自身作用诱导细胞自噬。Lc3 蛋白是参与自噬体形成的重要分子，正常情况下，细胞内的 Lc3 主要以 Lc3-Ⅰ的形式表达，具有胞质可溶性[10]。当细胞自噬启动后，Lc3-Ⅰ能够与磷脂酰乙醇胺结合，形成 Lc3-Ⅱ。因此，Lc3-Ⅱ的水平反映细胞自噬程度。mTOR 基因定位于 1 号染色体，能够整合氨基酸及生长因子激发的信号通路，调控细胞的生长和繁殖。mTOR 被激活后，将会以 p-mTOR 的形式表达，通过去磷酸化反应对细胞自噬产生负调控作用。与注射生理盐水的大兔相比，注射 Apelin-13 的大兔大脑皮质细胞内p-mTOR 的表达明显增加，提示 Apelin-13 能够通过刺激 p-mTOR 表达抑制细胞自噬。p62 作为溶酶体和自噬泡的衔接蛋白，能够与 Lc3 结合，形成复合物，从而促使蛋白被溶酶体降解[11-12]。细胞自噬活动开始后，蛋白质逐渐降解，p62 水平随之降低。创伤+Apelin-13组兔 p62 水平较单纯创伤组兔更高，表明 Apelin-13能够有效抑制大脑皮质细胞自噬，降低脑损伤严重程度。进一步研究结果显示，无创伤组、创伤+Apelin-13 组和单纯创伤组兔的 Lc3-Ⅱ/Lc3-Ⅰ、Beclin-1/bcl-2 值存在统计学差异，表明 Apelin-13 与 Lc3、Beclin-1、bcl-2 等自噬相关蛋白表达具有一定相关性。此外，研究中发现，创伤+Apelin-13 组兔脑体积缺损比高于无创伤组，但明显低于单纯创伤组，提示 Apelin-13 的应用能够有效控制脑损伤病情的发展，值得临床推广。

综上所述，Apelin-13 能够抑制兔脑外伤后大脑皮质细胞自噬，主要通过调节 Beclin-1、p-mTO等自噬相关蛋白水平发挥作用。值得提醒的是，脑外伤后大脑皮质细胞的自噬是一个复杂的生理过程，Apelin-13 对细胞自噬的影响主要通过调控相关蛋白的表达进行，但该过程所依赖的信号通路尚待更深入的研究加以证实。

## 参 考 文 献


[1] Chu LW, Huang YL, Lee JH, et al. Single-virus tracking approach to reveal the interaction of dengue virus with autophagy during the early stage of infection[J]. J Biomed Opt, 2014, 19(1): 011018.

[2] 徐春晓，刘 靖，康曼德，等. 转染突变型 α-半乳糖苷酶 A 基因诱导细胞自噬异常及其作用机制探讨[J]. 中华神经科杂志，2015，48(7)：551-555.

[3] 闫晓鸽，丁良才，王春梅，等. Apelin-13 对脑缺血再灌注大鼠行为学及脑内 YAP 蛋白表达的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志，2015，24(10)：882-884.

[4] 刘继新，依斯哈尔·巴拉提，王志丹，等. Apelin-13 对兔脑外伤模型中自噬相关蛋白表达中的影响及其机制 [J]. 中华实验外科杂志，2016，33(2)：400-403.

[5] 何 丛，谢 川，吕农华，等. 幽门螺杆菌感染对细胞自噬调控的研究进展[J]. 中华医学杂志，2014，94(24)：1915-1917.

[6] Joshi SK, Kim HT, Feeley BT, et al. Differential ubiquitin-proteasome and autophagy signaling following rotator cuff tears and suprascapular nerve injury[J]. J Orthop Res, 2014, 32(1): 138-144.

[7] 蒯锦霞，包海军，王英元. 小鼠脑外伤后 Apelin-13 对自噬相关蛋白表达的影响[J]. 中国法医学杂志，2014，29(4)：322-325.

[8] 仇志富，吴晓光，祖炳学，等. 补阳还五汤对脑出血模型大鼠脑组织 CXCR4-PI3K 自噬信号传导通路及 Beclin-1 的影响[J]. 中国组织工程研究，2016，20(27)：3992-3998.

[9] 汪 鑫，刘天助，郭洪波，等. 恶性胶质瘤耐药细胞通过 Beclin1 上调自噬抵抗替莫唑胺化疗[J]. 中华神经医学杂志，2013，12(8)：757-762.

[10] 薛学义，郭树平，许 宁，等. 白藜芦醇对前列腺癌 PC-3 细胞自噬的影响[J]. 中华实验外科杂志，2013，30(9)：1930-1932.

[11] 石书明，徐 昉，张 华. 自噬调节白介素-33 的表达与子痫前期发病机制的关系[J]. 重庆医科大学学报，2016，41(7)：663-668.

[12] 汪玉姮，穆欣艺，苏 燕，等. 自噬相关蛋白 Atg5 及 P62 在 DEHP 引起新生鼠卵泡发育异常过程中的作用[J]. 重庆医科大学学报，2016，41(3)：223-227.


（责任编辑：冉明会）