

铁皮石斛多糖对缺氧/复氧诱导星形胶质细胞 AMPK/ULK1 通路相关自噬的影响

韩宏, 刘文洁, 陈芳, 李娜(山东大学第二医院药品调剂科, 济南 250031)

摘要: 目的 探讨铁皮石斛多糖对缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)诱导星形胶质细胞腺苷酸激活蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/UNC-51 类似自噬激活激酶 1(UNC-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1)通路相关自噬的影响。方法 体外培养人星形胶质细胞, 分为对照组、H/R 组(H/R 建模)、低浓度铁皮石斛多糖组(H/R 建模+100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 铁皮石斛多糖)、中浓度铁皮石斛多糖组(H/R 建模+200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 铁皮石斛多糖)和高浓度铁皮石斛多糖组(H/R 建模+400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 铁皮石斛多糖)。MTT 法检测细胞增殖情况; 流式细胞仪检测细胞凋亡情况; 试剂盒测定细胞中丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平; Western blotting 检测细胞中 p-AMPK、AMPK、p-ULK1、ULK1、Beclin1、微管相关蛋白 1 轻链 3(light chain 3, LC3) I、LC3 II 蛋白表达情况。结果 与对照组相比, H/R 组星形胶质细胞存活率、细胞中 SOD 水平及 LC3 I/LC3 II 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$), 细胞凋亡率、细胞中 MDA 水平及 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1、Beclin1 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$); 随着铁皮石斛多糖的处理及处理浓度的升高, 星形胶质细胞存活率、细胞中 SOD 水平及 LC3 I/LC3 II 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$), 细胞凋亡率、细胞中 MDA 水平及 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1、Beclin1 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。结论 铁皮石斛多糖对 H/R 诱导的星形胶质细胞 AMPK/ULK1 通路激活及自噬具有抑制作用, 可促进细胞存活并减少细胞凋亡。

关键词: 铁皮石斛多糖; 缺氧/复氧; 星形胶质细胞; AMPK/ULK1 通路; 自噬

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)17-2110-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.17.010

引用本文: 韩宏, 刘文洁, 陈芳, 等. 铁皮石斛多糖对缺氧/复氧诱导星形胶质细胞 AMPK/ULK1 通路相关自噬的影响[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(17): 2110-2115.

Effect of *Dendrobium officinale* Polysaccharides on Autophagy Related to AMPK/ULK1 Pathway Induced by Hypoxia/Reoxygenation in Astrocytes

HAN Hong, LIU Wenjie, CHEN Fang, LI Na(Department of Pharmacology, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250031, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect of *Dendrobium officinale* polysaccharides on autophagy related to adenosine monophosphate-activated protein kinase(AMPK)/UNC-51 like autophagy activating kinase 1 pathway(ULK1) pathway induced by hypoxia/reoxygenation(H/R) in astrocytes. **METHODS** Human astrocytes were cultured *in vitro* and divided into control group, H/R group(H/R modeling), low concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group(H/R modeling+100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *Dendrobium officinale* polysaccharide), medium concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group(H/R modeling+200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *Dendrobium officinale* polysaccharide) and high concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group(H/R modeling+400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *Dendrobium officinale* polysaccharide). MTT assay was used to detect cell proliferation. Flow cytometry was used to detect apoptosis. The kit was used to determine the levels of malondialdehyde(MDA) and superoxide dismutase(SOD) in cells. Western blotting was used to detect the expression of p-AMPK, AMPK, p-ULK1, ULK1, Beclin1, microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3) I and LC3 II proteins. **RESULTS** Compared with control group, the survival rate of astrocytes, the level of SOD and the protein expression level of LC3 I/LC3 II were significantly lower in H/R group($P<0.05$), the apoptosis rate, the level of MDA and the protein expression levels of p-AMPK/AMPK, p-ULK1/ULK1 and Beclin1 were significantly higher($P<0.05$); with the treatment of *Dendrobium officinale* polysaccharide and the increase of its concentration, the survival rate of astrocytes, the level of SOD and the protein expression level of LC3 I/LC3 II were significantly increased($P<0.05$), the apoptosis rate, the level of MDA and the protein expression levels of p-AMPK/AMPK, p-ULK1/ULK1 and Beclin1 were significantly decreased($P<0.05$). **CONCLUSION** *Dendrobium officinale* polysaccharides can inhibit the activation of AMPK/ULK1 pathway and autophagy of astrocytes induced by H/R, which can promote cell survival and reduce cell apoptosis.

KEYWORDS: *Dendrobium officinale* polysaccharides; hypoxia/reoxygenation; astrocytes; AMPK/ULK1 pathway; autophagy

作者简介: 韩宏, 女, 药师 Tel: 17660085809 E-mail: s53fok@163.com

脑缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是一种复杂的病理生理过程, 常见于脑卒中等因供血中断导致的脑组织损伤疾病中^[1]。星形胶质细胞是脑组织中数量最多的细胞, 在创伤性脑损伤反应中起关键作用, 脑 I/R 损伤发生会导致其出现严重损伤^[2-3]。因此, 减轻星形胶质细胞 I/R 损伤是脑卒中等疾病研究的热点。自噬是细胞受到刺激后通过降解错误折叠的蛋白质及受损细胞器, 以实现细胞器及细胞本身的更新, 并维持正常细胞功能及稳态的重要途径^[4]。然而, 自噬过度会导致细胞裂解, 引起自噬性细胞死亡^[5]。有研究指出, 自噬可能促进星形胶质细胞活化、凋亡, 诱导星形胶质细胞缺血性损伤^[6]。腺苷酸激活蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)是应激反应触发自噬的主要调节因子, 可直接磷酸化 UNC-51 类似自噬激活激酶 1(UNC-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1)从而活化自噬^[7]。铁皮石斛多糖是铁皮石斛的主要化学成分, 具有提高免疫力、抗肿瘤、抗氧化等功效, 能通过降低氧化应激反应, 抑制刀豆蛋白 A 诱导的小鼠急性肝损伤^[8-9]。但铁皮石斛多糖对 I/R 过程中星形胶质细胞损伤的作用尚缺乏研究。本研究将建立体外缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)模型模拟 I/R 损伤^[10], 研究铁皮石斛多糖对 H/R 诱导星形胶质细胞损伤的影响, 并探讨其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人星形胶质细胞(science cell, 货号: 1840); 胎牛血清(AusGeneX, 货号: FBS500-S); DMEM 培养基(merck/sigma, 货号: KL-P0032); 铁皮石斛多糖(货号: SD9310, 纯度 $\geq 85\%$); RIPA 细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司, 货号: R0020); MTT 溶液(AMEKO, 货号: N/A-896); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(哈尔滨新海基因检测有限公司, 货号: S0185); 丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(上海群己生物科技有限公司, 货号: KA3736); 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(德国 PromoCell, 货号: PK-CA577-K335); p-AMPK 抗体、AMPK 抗体、p-ULK1 抗体、ULK1 抗体、Beclin1 抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)抗体、 β -actin 抗体、羊抗兔

IgG(货号分别为 ab133448, ab207442, ab131210, ab177472, ab207612, ab128025, ab245357, ab205718)均购自 Abcam 公司。

MIR-162-PC/MIR-262-PC 培养箱(日本松下公司); SynergyH 1 酶标仪(美国 BioTek 公司); Guavasoft 6L 流式细胞仪(美国 Millipore 公司); GelDocEZ 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 星形胶质细胞接种到含 10% 胎牛血清、青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中常规培养, 待细胞长满后, 用胰蛋白酶消化贴壁细胞, 传代 2 次后取对数期细胞用于以下实验。

1.2.2 H/R 模型建立及细胞分组 将星形胶质细胞用 5% CO₂、95% N₂ 混合气饱和 1 h 的无糖无血清的 DMEM 培养基(模拟缺氧液), 在 37 °C、5% CO₂、95% N₂ 的密闭培养箱中缺氧培养 4 h, 更换 5% CO₂、95% 空气饱和 1 h 的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(模拟复氧液), 置于 5% CO₂、95% 空气的密闭培养箱中复氧培养 4 h, 建立 H/R 模型。

将星形胶质细胞分为对照组、H/R 组、低浓度铁皮石斛多糖组、中浓度铁皮石斛多糖组和高浓度铁皮石斛多糖组, H/R 组和低、中、高浓度铁皮石斛多糖组均使用建立 H/R 模型的星形胶质细胞, 其中低、中、高浓度铁皮石斛多糖组加入终浓度分别为 100, 200, 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的铁皮石斛多糖^[11]。

1.2.3 MTT 法检测 各组星形胶质细胞增殖情况 将星形胶质细胞调整为每毫升 2.0×10^5 个, 接种于 96 孔培养板, 按“1.2.2”项下方法分组处理, 培养 48 h, 加入 MTT 试剂培养 4 h, 弃上清液, 加 DMSO 震荡 10 min, 使用酶标仪检测 570 nm 处的吸光度(optical density, OD)值, 计算细胞存活率。细胞存活率 = $\frac{OD_{\text{实验组}}}{OD_{\text{对照组}}}\times 100\%$ 。

1.2.4 流式细胞仪检测 各组星形胶质细胞凋亡情况 将星形胶质细胞调整为每毫升 2.0×10^5 个, 接种于 6 孔培养板, 按“1.2.2”项下方法分组处理, 培养 48 h, 收集细胞, 用 1 $\times$ Annexin 结合缓冲液配制每毫升 1×10^6 个的细胞悬浮液, 取 100 μL , 加入 Annexin V-FITC 5 μL 、PI 5 μL , 室温下避光孵育 15 min, 使用流式细胞仪检测并分析结果, 统计细胞凋亡率。

1.2.5 试剂盒测定各组星形胶质细胞中MDA和SOD水平 将星形胶质细胞调整为每毫升 2.0×10^5 个,接种于6孔培养板,按“1.2.2”项下方法分组处理,培养48 h,收集细胞,匀浆处理,离心10 min,取上清液,按试剂盒操作说明书步骤,使用酶标仪于波长450 nm处测定SOD活性,于530 nm处测定MDA含量。

1.2.6 Western blotting检测各组星形胶质细胞中AMPK/ULK1通路相关蛋白表达情况 将星形胶质细胞调整为每毫升 2.0×10^5 个,接种于6孔培养板,按“1.2.2”项下方法分组处理,培养48 h,收集细胞,使用含蛋白酶抑制剂的RIPA细胞裂解液提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。取适量蛋白质样品,变性、SDS-PAGE凝胶电泳分离、转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭2 h,加入一抗(p-AMPK抗体、AMPK抗体、p-ULK1抗体、ULK1抗体、Beclin1抗体、LC3抗体、 β -actin抗体,1:1 000) 4°C 孵育过夜,TBST清洗,加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:2 000),室温孵育1 h,TBST清洗,加发光液发光,使用凝胶成像仪曝光拍照,以 β -actin为参照,根据条带灰度值计算目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK-q检验。数据处理采用SPSS 17.0软件,当 $P < 0.05$ 时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组星形胶质细胞增殖情况

与对照组相比,H/R组星形胶质细胞存活率显著降低($P < 0.05$);与H/R组相比,低、中、高浓度铁皮石斛多糖组星形胶质细胞存活率显著升高($P < 0.05$);随着铁皮石斛多糖浓度的升高,星形胶质细胞存活率逐次升高($P < 0.05$),结果见表1。

表1 各组星形胶质细胞存活率比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 1 Comparison of survival rate of astrocytes in each group($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	存活率/%
对照组	100.00 $\pm$ 0.00
H/R组	43.38 $\pm$ 2.56 ¹⁾
低浓度铁皮石斛多糖组	56.44 $\pm$ 2.85 ¹⁾²⁾
中浓度铁皮石斛多糖组	68.82 $\pm$ 3.66 ¹⁾²⁾³⁾
高浓度铁皮石斛多糖组	87.95 $\pm$ 3.59 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注:与对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与H/R组相比,²⁾ $P < 0.05$;与低浓度铁皮石斛多糖组相比,³⁾ $P < 0.05$;与中浓度铁皮石斛多糖组相比,⁴⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with H/R group, ²⁾ $P < 0.05$; compared with low concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group, ³⁾ $P < 0.05$; compared with medium concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group, ⁴⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 各组星形胶质细胞凋亡情况

与对照组相比,H/R组星形胶质细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$);与H/R组相比,低、中、高浓度铁皮石斛多糖组星形胶质细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$);随着铁皮石斛多糖浓度的升高,星形胶质细胞凋亡率逐次降低($P < 0.05$),结果见图1和表2。

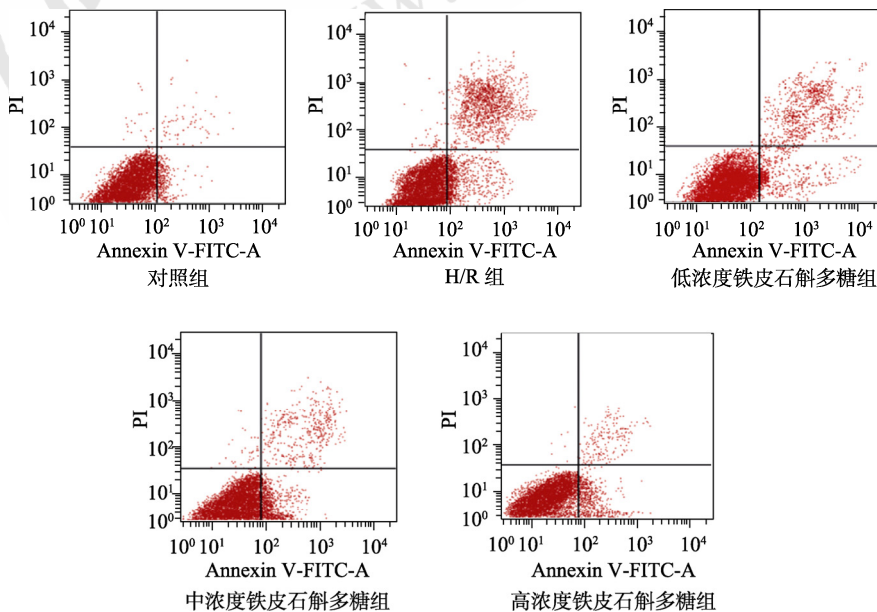


图1 各组星形胶质细胞凋亡情况

Fig. 1 Apoptosis of astrocytes in each group

表 2 各组星形胶质细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 2 Comparison of apoptosis rate of astrocytes in each group($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	凋亡率/%
对照组	9.95±0.83
H/R 组	31.86±2.69 ¹⁾
低浓度铁皮石斛多糖组	25.34±1.62 ¹⁾²⁾
中浓度铁皮石斛多糖组	20.07±1.55 ¹⁾²⁾³⁾
高浓度铁皮石斛多糖组	14.73±1.29 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与 H/R 组相比, ²⁾ $P<0.05$; 与低浓度铁皮石斛多糖组相比, ³⁾ $P<0.05$; 与中浓度铁皮石斛多糖组相比, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with H/R group, ²⁾ $P<0.05$; compared with low concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group, ³⁾ $P<0.05$; compared with medium concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group, ⁴⁾ $P<0.05$.

2.3 各组星形胶质细胞中 MDA 和 SOD 水平

与对照组相比, H/R 组星形胶质细胞中 MDA 水平显著升高($P<0.05$), SOD 水平显著降低($P<0.05$); 与 H/R 组相比, 低、中、高浓度铁皮石斛多糖组星形胶质细胞中 MDA 水平显著降低($P<0.05$), SOD 水平显著升高($P<0.05$); 随着铁皮石斛多糖浓度的升高, 星形胶质细胞中 MDA 水平逐次降低($P<0.05$), SOD 水平逐次升高($P<0.05$), 结果见表 3。

表 3 各组星形胶质细胞中 MDA、SOD 水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 3 Comparison of MDA and SOD levels of astrocytes in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
对照组	7.73±0.85	174.08±9.88
H/R 组	33.84±1.13 ¹⁾	55.46±9.10 ¹⁾
低浓度铁皮石斛多糖组	28.86±0.98 ¹⁾²⁾	92.67±10.22 ¹⁾²⁾
中浓度铁皮石斛多糖组	21.49±0.95 ¹⁾²⁾³⁾	128.84±10.17 ¹⁾²⁾³⁾
高浓度铁皮石斛多糖组	15.23±0.97 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	150.07±11.39 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与 H/R 组相比, ²⁾ $P<0.05$; 与低浓度铁皮石斛多糖组相比, ³⁾ $P<0.05$; 与中浓度铁皮石斛多糖组相比, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with H/R group, ²⁾ $P<0.05$; compared with low concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group, ³⁾ $P<0.05$; compared with medium concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group, ⁴⁾ $P<0.05$.

表 4 各组星形胶质细胞中 AMPK/ULK1 通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 4 Comparison of AMPK/ULK1 pathway related protein expression levels of astrocytes in each group($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	p-AMPK/AMPK	p-ULK1/ULK1	Beclin1/ β -actin	LC3 I/LC3 II
对照组	0.16±0.03	0.23±0.04	0.32±0.05	1.97±0.12
H/R 组	0.84±0.06 ¹⁾	0.91±0.07 ¹⁾	0.86±0.06 ¹⁾	0.48±0.07 ¹⁾
低浓度铁皮石斛多糖组	0.59±0.04 ¹⁾²⁾	0.64±0.07 ¹⁾²⁾	0.70±0.05 ¹⁾²⁾	0.74±0.09 ¹⁾²⁾
中浓度铁皮石斛多糖组	0.42±0.04 ¹⁾²⁾³⁾	0.52±0.05 ¹⁾²⁾³⁾	0.55±0.05 ¹⁾²⁾³⁾	1.13±0.09 ¹⁾²⁾³⁾
高浓度铁皮石斛多糖组	0.28±0.03 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.37±0.03 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.43±0.04 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	1.56±0.09 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与 H/R 组相比, ²⁾ $P<0.05$; 与低浓度铁皮石斛多糖组相比, ³⁾ $P<0.05$; 与中浓度铁皮石斛多糖组相比, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with H/R group, ²⁾ $P<0.05$; compared with low concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group, ³⁾ $P<0.05$; compared with medium concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group, ⁴⁾ $P<0.05$.

2.4 各组星形胶质细胞中 AMPK/ULK1 通路相关蛋白表达情况

与对照组相比, H/R 组星形胶质细胞中 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1、Beclin1 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$), LC3 I/LC3 II 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$); 与 H/R 组相比, 低、中、高浓度铁皮石斛多糖组星形胶质细胞中 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1、Beclin1 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$), LC3 I/LC3 II 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$); 随着铁皮石斛多糖浓度的升高, 星形胶质细胞中 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1、Beclin1 蛋白表达水平逐次降低($P<0.05$), LC3 I/LC3 II 蛋白表达水平逐次升高($P<0.05$), 结果见图 2, 表 4。

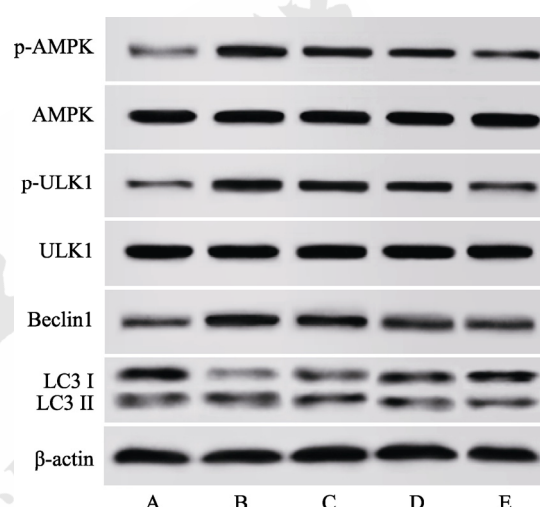


图 2 各组星形胶质细胞中 AMPK/ULK1 通路相关蛋白表达情况

A—对照组; B—H/R 组; C—低浓度铁皮石斛多糖组; D—中浓度铁皮石斛多糖组; E—高浓度铁皮石斛多糖组。

Fig. 2 Expression of AMPK/ULK1 pathway related proteins of astrocytes in each group

A—control group; B—H/R group; C—low concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group; D—medium concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group; E—high concentration *Dendrobium officinale* polysaccharide group.

3 讨论

脑卒中是常见的脑血管疾病,利用手术、药物快速有效地恢复血流是其治疗的主要方法,但脑血管恢复血流灌注的同时会因严重的氧化应激反应等造成脑 I/R 损伤,使得脑损伤进一步加重^[12]。星形胶质细胞是脑组织中最丰富的神经胶质细胞,参与电解质稳态维持、脑血流调节、血脑屏障维持、神经可塑性调节以及神经营养、保护因子分泌等过程,支持并调节大脑正常功能的维持,对缺血大脑也具有一定的保护作用^[13]。本研究采用 H/R 诱导星形胶质细胞,结果显示,星形胶质细胞存活率显著降低,凋亡率显著升高,同时细胞中氧化应激生物标志物 MDA 水平显著升高,抗氧化酶 SOD 水平显著降低,提示 H/R 诱导导致星形胶质细胞中氧化应激反应激烈,并影响细胞的增殖、凋亡,可在一定程度上模拟星形胶质细胞 I/R 损伤。

铁皮石斛是传统的名贵中药材,具有独特的药用价值,药理学、植物化学成分分析均表明,多糖类化合物是铁皮石斛中主要的生物活性物质,含量较高^[14]。翟旭峰等^[8]研究表明,铁皮石斛可发挥抗氧化作用,保护 I/R 诱导的心律失常。董昕等^[11]研究表明,铁皮石斛多糖作为铁皮石斛中主要活性成分,可通过抗氧化作用抑制 MPP⁺诱导的神经细胞损伤。Li 等^[15]研究显示,铁皮石斛多糖对高糖诱导的角膜上皮细胞损伤具有保护和修复作用。沈鸿涛等^[16]研究表明,铁皮石斛多糖对 TNF- α 引起的小鼠海马神经元 HT22 细胞凋亡具有抑制作用。本研究使用不同浓度的铁皮石斛多糖处理 H/R 诱导星形胶质细胞,结果显示,星形胶质细胞存活率显著升高,凋亡率显著降低,同时细胞中 MDA 水平显著降低, SOD 水平显著升高,提示铁皮石斛多糖能降低 H/R 诱导星形胶质细胞中的氧化应激水平,促进细胞存活并减少凋亡发生。

自噬是指细胞受到刺激后,降解自身错误折叠的蛋白质或损伤细胞器并提供自身所需能量的过程^[17]。一方面自噬可抵抗能量不足,促进细胞存活并维持细胞正常功能,另一方面,过度自噬会加速应激条件下细胞凋亡,即“自噬性死亡”^[18]。AMPK/ULK1 通路是参与调节细胞自噬的重要通路,其中,AMPK 被认为是一种“细胞能量感受器”,正常情况下处于无活性的去磷酸化状态,能量缺乏后被活化并激活下游通路^[19]。研究发现,

活化的 AMPK 可以将调节自噬的关键性分子 ULK1 磷酸化,进而提高 FUN14 结构域包含蛋白-1 与 LC3 的结合效率,促进自噬发生^[20]。Beclin1、LC3 均为自噬标志蛋白,Beclin1 与自噬体形成有关,而 LC3 在自噬形成过程中由 LC3 I 向 LC3 II 转变^[21]。本研究结果显示,建立 H/R 模型后,星形胶质细胞中磷酸化 AMPK、磷酸化 ULK1、Beclin1 蛋白水平显著升高,LC3 I/LC3 II 蛋白水平显著降低,提示星形胶质细胞在 H/R 诱导时发生自噬,且 AMPK/ULK1 通路参与这一过程。Zhang 等^[22]研究发现,铁皮石斛多糖能触发结肠癌细胞中的自噬、氧化应激和 AMPK 信号传导,从而抑制结肠癌细胞生长。本研究发现,铁皮石斛多糖处理 H/R 诱导星形胶质细胞后,星形胶质细胞中磷酸化 AMPK、磷酸化 ULK1、Beclin1 蛋白水平显著降低,LC3 I/LC3 II 蛋白水平显著升高,且呈浓度依赖性变化,提示铁皮石斛多糖降低氧化应激水平,抑制应激引起的 AMPK/ULK1 通路激活及 LC3 I/LC3 II 转化,降低 Beclin1 表达,进而减轻 H/R 诱导的星形胶质细胞自噬,减少细胞凋亡,并促进细胞存活。

综上所述,铁皮石斛多糖可以抑制 H/R 诱导星形胶质细胞 AMPK/ULK1 通路相关自噬反应,进而减少细胞凋亡并促进细胞存活。下一步可通过动物实验验证结果,为临床减轻 I/R 损伤提供参考。

REFERENCES

- [1] WANG J Z, LI Z, ZHANG H S, et al. Effects of progesterone on magnetic resonance spectroscopy and ATP-P2X7R signaling pathways in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(9): 1040-1045.
- [2] MAGAMI S, MIYAMOTO N, UENO Y, et al. The effects of astrocyte and oligodendrocyte lineage cell interaction on white matter injury under chronic cerebral hypoperfusion[J]. Neuroscience, 2019(406): 167-175.
- [3] GUO X X, JIANG Q, TUCCITTO A, et al. The AMPK-PGC-1 α signaling axis regulates the astrocyte glutathione system to protect against oxidative and metabolic injury[J]. Neurobiol Dis, 2018(113): 59-69.
- [4] FUJIKAKE N, SHIN M, SHIMIZU S. Association between autophagy and neurodegenerative diseases[J]. Front Neurosci, 2018(12): 255. Doi: 10.3389/fnins.2018.00255.
- [5] CHUNG H, CHOI J, PARK S. Ghrelin protects adult rat hippocampal neural stem cells from excessive autophagy during oxygen-glucose deprivation[J]. Endocr J, 2018, 65(1): 63-73.

- [6] DAN Y, LI C. Activation, injury, apoptosis and autophagy of astrocytes under OGD/R[J]. *Shandong Med J(山东医药)*, 2020, 60(8): 48-51.
- [7] ZANINELLO M, PALIKARAS K, NAON D, et al. Inhibition of autophagy curtails visual loss in a model of autosomal dominant optic atrophy[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4029. Doi: 10.1038/s41467-020-17821-1.
- [8] ZHAI X F, WANG J, ZHENG S, et al. Protective effects of *Dendrobium candidum* on ischemia reperfusion-induced arrhythmia[J]. *Mod Food Sci Technol(现代食品科技)*, 2017, 33(7): 1-8.
- [9] YU J, DUAN B W, ZHAO P, et al. Protective effects and the mechanism of *Dendrobium officinale* on concanavalin A-induced acute liver injury in mice[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床)*, 2019, 35(1): 82-87.
- [10] LI Y C, WANG L, LUO D, et al. Protective effect of sulforaphane on cardiac myocyte injured by ischemia-reperfusion through the JAK2/STAT3 signal transduction[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2018, 35(4): 552-555.
- [11] DONG X, LIAO H Y, LU S Q, et al. Inhibitory effect of polysaccharides from candidum *Dendrobium* on the injury induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in PC12 cells[J]. *Med Sci J Central South China(中南医学科学杂志)*, 2015, 43(4): 379-382.
- [12] DAI Y Y, ZHANG H J, ZHANG J P, et al. Isoquercetin attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis after ischemia/reperfusion injury via Nrf2-mediated inhibition of the NOX4/ROS/NF- κ B pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2018(284): 32-40.
- [13] ZHAO F Y, QU Y, WANG H Q, et al. The effect of miR-30d on apoptosis and autophagy in cultured astrocytes under oxygen-glucose deprivation[J]. *Brain Res*, 2017(1671): 67-76.
- [14] LIU Y, CHANG G W, LIU G Y, et al. Advances in pharmacology of *Dendrobium officinale* polysaccharides[J]. *Sugarcane Canesugar(甘蔗糖业)*, 2017(6): 44-48.
- [15] LI Q X, CHEN J, LI Y J, et al. Effect of polysaccharide of *Dendrobium candidum* on proliferation and apoptosis of human corneal epithelial cells in high glucose[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(32): e7773. Doi: 10.1097/MD.00000000000007773.
- [16] SHEN H T, LIU X, WU T T, et al. Study on the inhibitory effect of *Dendrobium* polysaccharide on neuron apoptosis[J]. *Acta Univ Med Anhui(安徽医科大学学报)*, 2020, 55(8): 1214-1220.
- [17] SEO S U, WOO S M, LEE H S, et al. mTORC1/2 inhibitor and curcumin induce apoptosis through lysosomal membrane permeabilization-mediated autophagy[J]. *Oncogene*, 2018, 37(38): 5205-5220.
- [18] HWANG S H, HAN B I, LEE M. Knockout of ATG5 leads to malignant cell transformation and resistance to Src family kinase inhibitor PP2[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1): 506-515.
- [19] WANG L M, LI X, YANG Z H, et al. Time-effect on alterations of autophagy and related pathways in human bronchial epithelial cells BEAS-2B exposed to crotonaldehyde[J]. *Tob Sci Technol(烟草科技)*, 2017, 50(10): 35-41.
- [20] GU H, TANG T, LI Y, et al. Effect of tanshinone II A on AMPK/ULK1 pathway in rat renal tissue of ischemia-reperfusion[J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志)*, 2020, 29(2): 120-123, 162.
- [21] LU N, LI X X, TAN R L, et al. HIF-1 α /Beclin1-mediated autophagy is involved in neuroprotection induced by hypoxic preconditioning[J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 66(2): 238-250.
- [22] ZHANG K, ZHOU X T, WANG J Q, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharide triggers mitochondrial disorder to induce colon cancer cell death via ROS-AMPK-autophagy pathway[J]. *Carbohydr Polym*, 2021(264): 118018. Doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118018.

收稿日期: 2021-01-26

(本文责编: 陈怡心)