

# 自噬对氧化应激引起的脊髓神经元细胞损伤的作用及其机制

贺靖澜\* 王冉 申娜 董晓辉 李宗虎 付治安

(河北工程大学附属医院, 邯郸 056002)

**摘要** 氧化应激是脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后脊髓神经元细胞继发性损伤的重要机制, 但是如何缓解氧化应激目前仍然不明确。该文培养SD(Sprague Dawley)大鼠原代脊髓神经元细胞, 使用不同浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用于神经元细胞12 h后, Western blot检测LC3-II、Beclin-1和P62蛋白质水平变化, 分析自噬水平, 电镜和绿色荧光蛋白标的记微管相关蛋白轻链3(green fluorescent protein-microtubule-associated protein 1 light chain 3, GFP-LC3)转染观察自噬的数量。ATG5 siRNA转染抑制自噬和雷帕霉素(rapamycin)促进细胞自噬, 并使用CCK-8和TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling)染色分析自噬对氧化应激下神经元细胞的作用。结果显示, 随着H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度增加, LC3-II和Beclin-1蛋白质水平显著升高, 而P62蛋白质水平显著下降( $P<0.05$ )。透射电镜和共聚焦观察发现, 10、50  $\mu\text{mol/L}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可以增加神经元细胞中自噬体的数量。与对照组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>明显抑制神经元细胞的活力( $P<0.05$ ), ATG5 siRNA抑制自噬水平后, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用下的细胞活力进一步下降, 而雷帕霉素促进自噬后却可以提高细胞的活力( $P<0.05$ )。TUNEL和膜联蛋白V/PI(annexin V/PI)染色结果发现, 雷帕霉素可以抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起的神经元细胞凋亡( $P<0.05$ )。该研究结果提示, 脊髓神经元细胞处于氧化应激状态下时, 自噬代偿性激活并保护神经元细胞。

**关键词** 脊髓神经元细胞; 氧化应激; 自噬; 凋亡

## The Effect of Autophagy on the Injury of Primary Spinal Cord Neurons Induced by the Oxidative Stress

He Jinglan\*, Wang Ran, Shen Na, Dong Xiaohui, Li Zonghu, Fu Zhian

(Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan 056002, China)

**Abstract** Oxidative stress is the important secondary damage to spinal cord neurons after spinal cord injury (SCI). However, how to alleviate the damage remains unclear. In the present study, primary spinal cord neurons of Sprague Dawley (SD) rats were cultured and treated with different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12 h. The protein levels of LC3-II, Beclin-1 and P62 determined by Western blot were used to reflect the level of autophagy in the neurons. Transmission electron microscopy (TEM) and GFP-LC3 transfection were used to analyze the number of autophagosomes. The effect of autophagy on cellular viability and apoptosis was detected by CCK-8 assay and TUNEL, after the inhibition and activation of autophagy by ATG5 siRNA and rapamycin treatment. An dose-dependent increase in the levels of LC3-II, Beclin-1 and P62 was observed in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated neurons ( $P<0.05$ ).

收稿日期: 2016-12-14 接受日期: 2017-02-07

邯郸市科技局计划内项目(批准号: 1523108076—21)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0310-8572228, E-mail: hejinglan1999@163.com

Received: December 14, 2016 Accepted: February 7, 2017

This work was supported by the Program from Handan Municipal Science and Technology Bureau (Grant No.1523108076—21)

\*Corresponding author. Tel: +86-310-8572228, E-mail: hejinglan1999@163.com

网络出版时间: 2017-03-21 15:40:13 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170321.1540.004.html>

Autophagosome number was increased by 10 and 50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  detected by TEM and confocal microscopy. Compared with the control group,  $\text{H}_2\text{O}_2$  inhibited cellular viability significantly ( $P<0.05$ ), however the inhibition was exacerbated by the ATG5 siRNA and attenuated by the rapamycin ( $P<0.05$ ). In addition, rapamycin could inhibited the apoptosis induced by the  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $P<0.05$ ). These results indicated that autophagy was activated in spinal cord neurons adaptively, and autophagy protected neurons from apoptosis induced by oxidative stress.

**Keywords** spinal cord neurons; oxidative stress; autophagy; apoptosis

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一类患者进行性衰弱的严重疾病, SCI的主要临床表现主要是损伤截面及以下的神经功能障碍<sup>[1]</sup>。虽然这类疾病的致死率和致瘫痪率非常高, 但是目前尚无有效的治疗方法, 并且SCI的病理机制仍然不清楚<sup>[1]</sup>。SCI后的二次损伤被认为是脊髓损伤的重要机制, 主要包括脊髓神经元细胞(spinal cord neurons)的炎症、死亡、脱髓鞘、轴突的变性<sup>[2]</sup>。氧自由基(reactive oxygen species, ROS)以及氧化应激被认为是脊髓神经元细胞死亡以及SCI进展的重要机制<sup>[3]</sup>。过氧化氢(hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )是ROS中的一类, 并参与了SCI的病理过程<sup>[4]</sup>。因此, 缓解脊髓神经元细胞的氧化应激损伤对于缓解SCI的进展具有重要的意义。

自噬是细胞的一种自我保护的机制, 主要通过溶酶体融合降解错构的蛋白质和损伤的细胞器来维持细胞内的稳定<sup>[5]</sup>。在应激条件下, 适度激活的自噬对于神经元细胞的生存和适应具有重要的意义<sup>[6]</sup>。但是, 氧化应激对于脊髓神经元细胞自噬的作用以及自噬对神经元细胞的作用及其机制仍然不明确。本文拟将 $\text{H}_2\text{O}_2$ 作用于原代脊髓神经元细胞, 并检测自噬、凋亡和细胞活力等指标来了解氧化应激对神经元细胞自噬的影响以及自噬在其中所扮演的作用。

## 1 材料与方法

本研究中动物实验方案获得了河北工程大学附属医院动物伦理委员会批准。

### 1.1 试剂与抗体

LC3、Beclin-1、P62、ATG5和 $\beta$ -actin的一抗均购自Abcam公司。免疫荧光、Western blot、DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)和胞质的提取试剂均购自上海碧云天生物技术有限公司。细胞培养的试剂, 包括Neurobasal-A、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和0.25%胰蛋白酶, 均购自Thermo公司。CCK-8(Cell Counting Kit-8)购自东仁化学科技(上海)

股份有限公司。TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP-biotin nick end labeling)购自Roche公司。

### 1.2 原代脊髓神经元细胞的培养

原代脊髓神经元细胞的培养方法主要根据已发表的文献[7]进行。使用显微镜从SD(Sprague Dawley)大鼠的E16胚胎中分离出脊髓组织, 在无菌条件下将脊膜和背根神经节从脊髓上分离出去。PBS洗涤3次后, 在离心管中使用HBSS(Hank's balanced salt solution)配制的0.25%胰蛋白酶在37  $^{\circ}\text{C}$ 下消化30 min, 消化后将细胞悬液, 过滤200目的滤网。滤过的细胞接种在Neurobasal-A培养基上(Thermo公司), 在此培养基中加入2% B-27、2 mmol/L谷氨酰胺、1  $\mu\text{mol/L}$ 阿糖胞苷和50 ng/mL的神经生长因子(R&D公司), 每3 d换1次培养基。

### 1.3 实验设计

分析氧化应激对大鼠神经元细胞自噬的影响, 使用1、5、10、50、100  $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 作用于脊髓神经元细胞12 h, 后续实验使用10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 作用细胞。当分析沉默ATG5在自噬对于氧化应激下脊髓神经元细胞活力的作用时, 实验设置为Control siRNA、ATG5 siRNA、Control siRNA+ $\text{H}_2\text{O}_2$ 、ATG5 siRNA+ $\text{H}_2\text{O}_2$ 这4组。当分析雷帕霉素在自噬对于氧化应激下脊髓神经元细胞活力和凋亡的作用时, 实验设置为Control、Rapamycin、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ +rapamycin这4组。本文中细胞的处理时间均为12 h。

### 1.4 Western blot

提取细胞总蛋白使用碧云天公司推荐的含有1%的PMSF(phenylmethanesulfonyl fluoride)的RIPA(radio-immunoprecipitation assay), BCA方法来测定蛋白质浓度。细胞总蛋白进行SDS-PAGE(odium odecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)分离, 然后通过湿转的方法将蛋白转移到PVDF(polyvinylidene difluoride)膜上(Bio-Rad公司)。5%

表1 ATG5 siRNA的序列  
Table 1 Sequence of ATG5 siRNA

引物 Primer	方向 Direction	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
ATG5	Sense	GGC CUU UCA UUC AGA AGC UTT
	Antisense	AGC UUC UGA AUG AAA GGC CTT
Negative control	Sense	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT
	Antisense	ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT

脱脂牛奶封闭2 h后,使用LC3、Beclin-1、P62和ATG5一抗(1:1 000稀释)在4 °C冰箱中孵育过夜, TBST清洗3次后,使用辣根过氧化物酶标记的二抗在常温下孵育2 h后,使用ECL发光液(Thermo公司)在成像系统(PerkinElmer公司)上进行曝光。蛋白质条带的半定量分析使用AlphaEaseFC 4.0软件进行分析。

### 1.5 透射电镜观察

在培养瓶中进行不同组处理后,分别使用刮刀将细胞从培养瓶上刮下来,注意避免过分损伤细胞,防止细胞破碎。将细胞离心收集转移至EP管,加入2%戊二醛,4 °C固定过夜,PBS漂洗,使用1%锇酸4 °C固定2 h,4 °C醋酸铀染色。70%、80%、90%、100%丙酮梯度脱水,预包装,Epon812环氧树脂包埋,半薄切片及甲苯胺蓝染色进行细胞定位,LKB-V超薄切片(瑞典,LKB公司)制作超薄切片,透射电镜下观察脊髓神经元细胞。

### 1.6 GFP-LC3转染

在实验开始前,细胞培养于玻璃培养皿,培养过夜后细胞密度在50%~70%,培养基液量为2 mL。使用GFP-LC3腺病毒进行感染,感染复数(multiplicity of infection, MOI)值为100,腺病毒滴度为 $10^{10}$ /mL,腺病毒购自汉恒生物科技(上海)有限公司。根据厂商的实验操作手册,腺病毒使用1 mL的无血清培养基进行稀释,具体计算方式为,6孔板细胞数量为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ ,MOI值100,病毒数量为 $2 \times 10^8$ ,加入的腺病毒剂量为20  $\mu$ L。加入腺病毒前,将培养基换成无血清的培养基1 mL,把上述剂量的腺病毒溶解在无血清的培养基中。加入腺病毒后,在37 °C培养箱中孵育2 h后,将无血清的培养基更换成正常培养基,然后将脊髓神经元细胞转移至培养箱孵育过夜,在荧光显微镜下观察转染效果和转染效率。当绿色荧光的细胞数量占据大部分细胞的时,进行处理。处理后,细胞中的自噬体等使用激光共聚焦显微镜

进行观察(Leica公司)进行观察。

### 1.7 ATG5 siRNA的转染

ATG 5siRNA的设计参考文献[19],具体序列见表1,并由上海吉玛制药技术有限公司合成。神经元细胞消化后计数,在6孔板中每孔加入 $2 \times 10^5$ 的细胞,培养过夜。转染使用Invitrogen公司的Lipofectamine 2000进行转染,具体转染方法根据Invitrogen公司的操作手册。转染后48 h,根据实验设计中处理方法进行干预。非特异性的非靶向的siRNA作为对照RNA。转染后,提取细胞总蛋白行Western blot检测分析转染的效果。

### 1.8 Cell Counting Kit-8分析

96孔板每孔铺5 000个细胞,培养过夜后,予以不同组处理12 h后,将处理的液体更换成100  $\mu$ L新鲜的培养基,再在每个孔中加入10  $\mu$ L的CCK-8反应剂,在37 °C培养箱中孵育1 h,最后在酶标仪上使用450 nm波长测量并读取D值,所得值为相对于对照组的数值。

### 1.9 TUNEL染色

在24孔板中铺完 $2 \times 10^4$ 细胞培养过夜后,按照分组进行不同的处理后,使用10%多聚甲醛在4 °C冰箱中固定细胞30 min,PBS洗涤3次后,使用0.1% Triton X-100冰浴孵育2 min穿透细胞膜,最后按照Roche公司的TUNEL凋亡试剂盒的说明进行操作,在倒置的荧光显微镜下观察细胞。在200倍视野下,光镜下计数细胞总的数量,荧光下计数凋亡的细胞数目,重复取3个视野,取平均值,计算脊髓神经元细胞凋亡率=凋亡细胞数/视野下细胞总数。

### 1.10 膜联蛋白V/PI染色

在24孔板中铺完 $2 \times 10^4$ 细胞培养过夜后,按照分组进行不同的处理后,接下来根据膜联蛋白V/PI染色的说明书(碧云天)进行。使用0.25%胰蛋白酶消化脊髓神经元细胞后,使用1 000  $\times$ g离心5 min后,使用膜联蛋白V-FITC染液染色10 min,然后,再用PtdIns染液在20~25 °C的条件下染色10 min。最后,将神经元

细胞行流式细胞仪(BD公司)分析细胞的凋亡率。

### 1.11 统计学分析

不同组之间的差异使用方差分析ANOVA进行统计, 使用SPSS 15.0软件包。如果方差分析具有统计学意义, 使用LSD方法进行两两之间的分析。 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 氧化应激促进脊髓神经元细胞中自噬相关蛋白的改变

为证明氧化应激是否可以促进脊髓神经元细胞发生自噬, 我们使用Western blot方法分析1、5、10、50、100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 作用脊髓神经元细胞12 h后LC3、Beclin-1和P62的蛋白质水平。1  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 并不能促进脊髓神经元细胞LC3-II水平升高, 但是5、10、50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 作用12 h后, LC3-II/ $\beta$ -actin水平相对于对照组明显升高( $P < 0.05$ , 图1A和图1B), 而100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 作用时, 促进蛋白质表达的作用反而下降。Beclin-1水平基本与LC3-II的变化相似( $P < 0.05$ , 图1A和图1C), 但是P62水平在随着 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度的增加而逐渐地下降, 这说明氧化应激促进脊髓神经元细胞中自噬的增加( $P < 0.05$ , 图1A和图1D)。

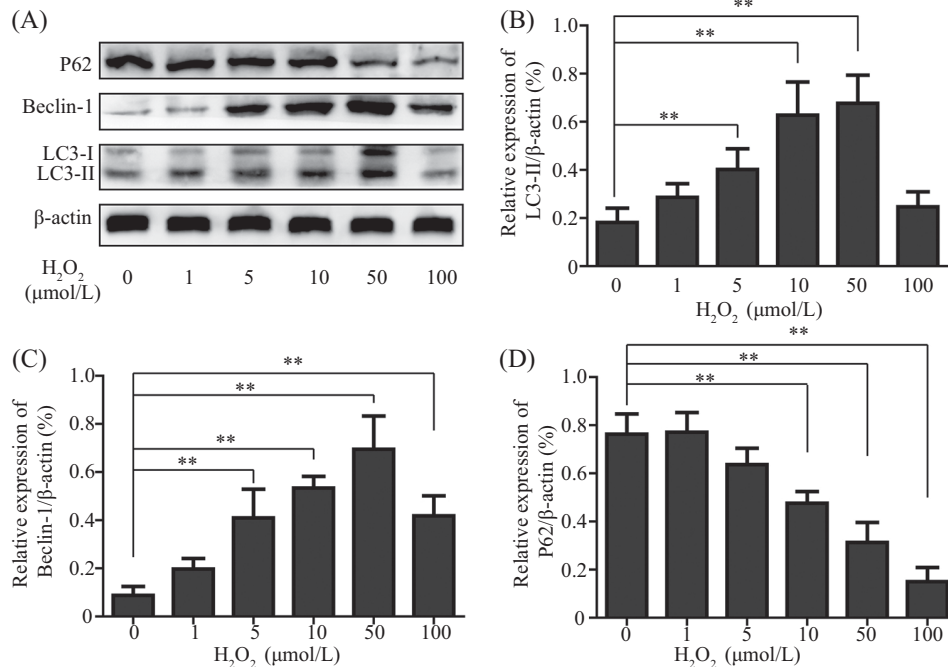
### 2.2 氧化应激促进脊髓神经元细胞中自噬体的增加

为进一步分析氧化应激对脊髓神经元细胞自噬体数量的影响, 我们使用10、50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 作用脊髓神经元细胞12 h, 并使用透射电镜和GFP-LC3转染观察脊髓神经元细胞中的自噬泡。对照情况下, 细胞中几乎没有自噬体或绿色的点状结构(图2), 但是10、50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 作用的神经元细胞胞质内可见大量囊泡状的双层膜结构的自噬体, 内含大量蛋白质和细胞器。同时, GFP-LC3转染的细胞在倒置共聚焦显微镜下可以观察到大量点状LC3阳性的神经元细胞( $P < 0.05$ , 图2A和图2B)。这进一步说明了氧化应激促进脊髓神经元细胞的自噬。

### 2.3 自噬对于氧化应激下脊髓神经元细胞活力的影响

由于ATG5是自噬形成过程中关键的分子, 经RNAi方法下调脊髓神经元细胞中的ATG5的表达, 以进一步研究自噬在氧化应激状态下脊髓神经元细胞中的作用。

细胞转染ATG5 siRNA 48 h后, Western blot发现, 相对于转染Control siRNA的细胞中, ATG5表达明显下降( $P < 0.05$ , 图3A和图3C), 使用10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$

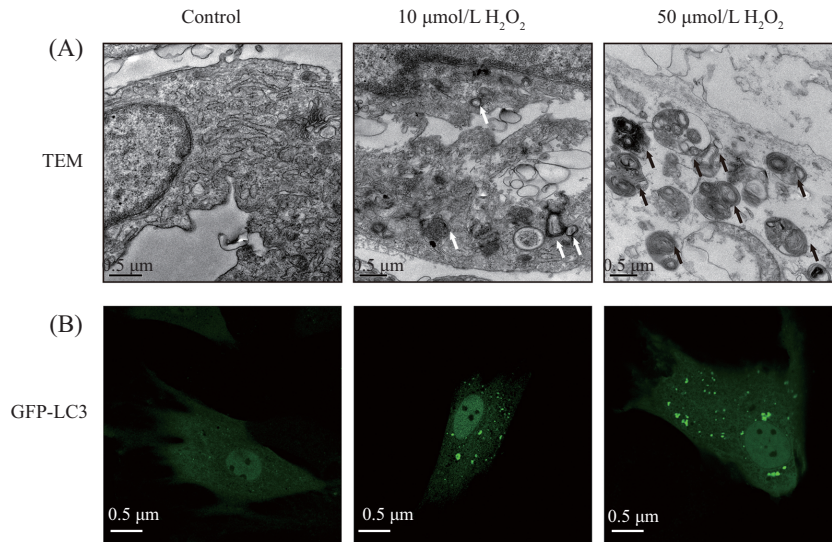


A: 自噬相关蛋白的Western blot结果; B: LC3-II的半定量分析; C: Beclin-1的半定量分析; D: P62的半定量分析。\*\* $P < 0.01$ 。

A: autophagy related protein in spinal cord neurons; B: semi-quantity analysis of LC3-II expression; C: semi-quantity analysis of Beclin-1; D: semi-quantity analysis of P62. \*\* $P < 0.01$ .

图1 氧化应激对脊髓神经元细胞中自噬相关蛋白的影响

Fig.1 The effect of the oxidative stress on autophagy related proteins in primary spinal cord neurons

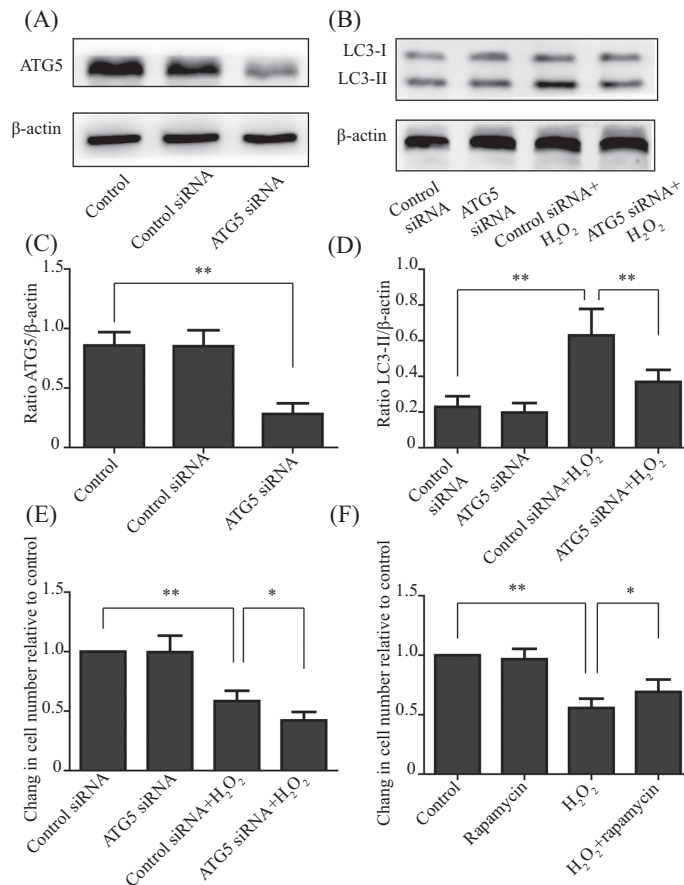


A: 透射电镜观察不同组的脊髓神经元细胞中的自噬体; B: GFP-LC3转染的细胞中自噬体的表达。

A: the autophagosome in primary spinal cord neurons under TEM; B: the autophagosome in primary spinal cord neurons transfected with GFP-LC3 under confocal microscopy.

图2 氧化应激促进脊髓神经元细胞自噬体的表达

Fig.2 Oxidative stress increased the number of autophagosome in primary spinal cord neurons

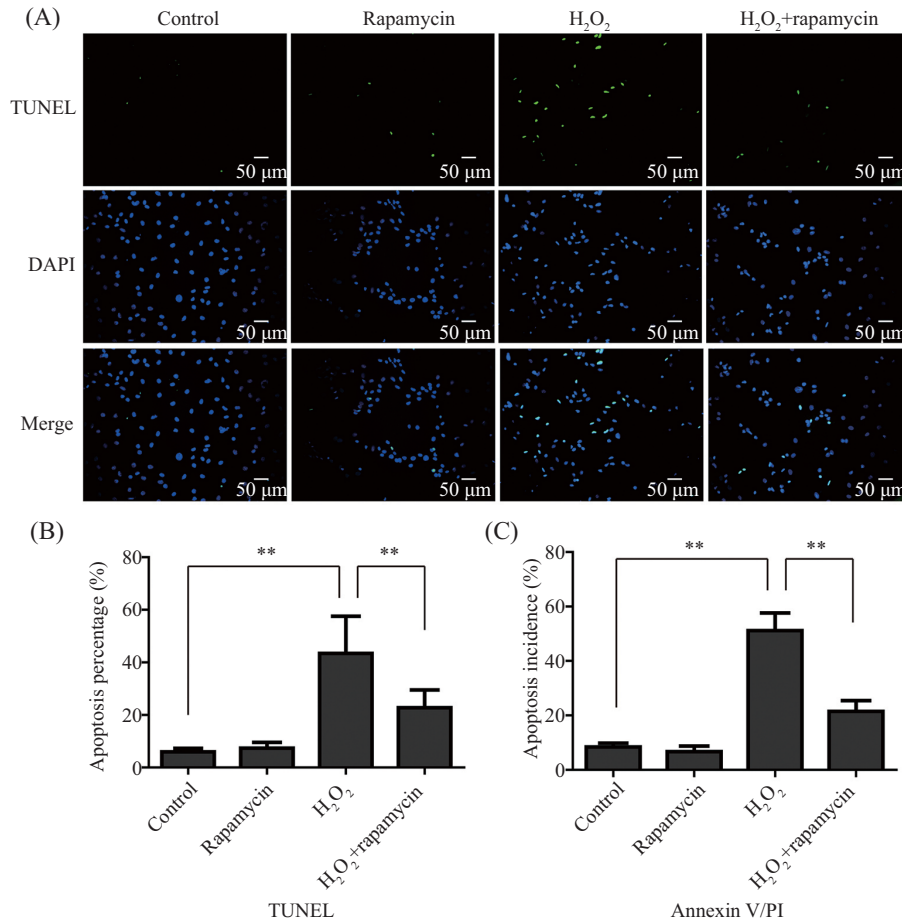


A: 脊髓神经元细胞中ATG5水平; B: 脊髓神经元细胞中LC3-II水平; C: 细胞ATG5条带的半定量分析; D: LC3-II条带的半定量分析; E: ATG5沉默对细胞活力的影响; F: 促进自噬对细胞活力的影响。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

A: ATG5 level in primary spinal cord neurons; B: LC3-II level; C: semi-quantity analysis of the ATG5 level; D: semi-quantity analysis of LC3-II level; E: cell viability after ARG5 silence; F: LC3-II level after LC3-II silence. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图3 调节自噬对细胞活力的影响

Fig.3 Effect of autophagic inhibition or activation on the cell viability



A: 脊髓神经元细胞TUNEL染色的结果; B: 根据TUNEL染色结果进行的凋亡率的半定量分析; C: 根据膜联蛋白V/PI染色结果进行凋亡率的半定量分析。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

A: TUNEL analysis of primary spinal cord neurons; B: semi-quantity analysis of apoptosis percentage; C: semi-quantity analysis of apoptosis percentage according to the Annexin V/PI staining. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

图4 促进自噬对细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of autophagic activation on the apoptosis

作用12 h。Western blot发现, 相对于转染Control siRNA的细胞核, LC3-II表达明显下降, 证实ATG5的沉默降低细胞中自噬水平( $P < 0.05$ , 图3B和图3D)。CCK-8分析发现, 10 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用12 h明显减少神经元细胞的数量, 但是沉默ATG5后进一步减少了细胞的数量, 而使用雷帕霉素作用细胞后, 细胞的数量相对于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用的细胞明显增加( $P < 0.05$ , 图3E和图3F)。这些结果均说明, 自噬对于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用的脊髓神经元细胞具有重要的调节作用。

#### 2.4 自噬对于氧化应激下脊髓神经元细胞凋亡的影响

进一步分析自噬对脊髓神经元细胞凋亡的影响。TUNEL染色发现, 使用10 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用12 h后, 细胞发生大量凋亡, 但是雷帕霉素作用下的细胞凋亡相对于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>却明显减少( $P < 0.05$ , 图4A和图4B),

而对照和单纯雷帕霉素组却几乎没有发生凋亡。膜联蛋白V/PI染色也得到同样的结果(图4C), 这说明促进自噬可以减少氧化应激下神经元细胞凋亡。

### 3 讨论

SCI是一种高致死率和高瘫痪率的严重神经损伤, 在美国大约有250万患者有脊髓损伤, 而且每年新增的SCI患者大约有13万<sup>[8]</sup>。虽然目前大量的研究着眼于如何缓解SCI, 但是SCI的机制仍然不明确, 缺乏可靠有效的药物。脊髓损伤的病理生理机制主要包括初始的机械性损伤和继发的一系列血管和细胞损伤。继发性损伤主要包括神经元细胞的一些生化反应, 包括炎症、氧化应激、细胞凋亡、坏死和自噬<sup>[9-10]</sup>, 因此, 减少继发性损伤被认为是治疗SCI的重要方法。本文使用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>来诱导脊髓神经元细胞发

生氧化应激并引起细胞坏死和凋亡,证实氧化应激可以激活神经元细胞自噬,并且自噬对于氧化应激引起的细胞凋亡具有一定的保护作用。因此,激活自噬可能成为缓解SCI继发性损伤的重要方法。

自噬是细胞自我稳定的一种保护程序,在正常情况以及应激情况下,对于维持神经元细胞内的平衡具有重要的作用<sup>[6]</sup>。自噬与SCI密切相关,在小鼠脊髓损伤后,脊髓以及神经元细胞中的自噬标志物Beclin-1和LC3-II/LC3-I显著升高,同时,电镜下可以观察到增多的自噬体<sup>[11]</sup>。相似地,Hou等<sup>[12]</sup>在大鼠的SCI模型中也观察到了脊髓中自噬升高的现象。在脊髓神经元细胞损伤的体外模型中也观察到了细胞中自噬水平的升高<sup>[13]</sup>。SCI后脊髓神经元细胞会由于缺氧和慢性应激而产生大量的ROS,当ROS清除障碍时,会发生氧化应激<sup>[3]</sup>。因此,SCI损伤后自噬的升高与神经元细胞中的氧化应激相关。本文发现,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可以激活脊髓神经元细胞中的自噬,而H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是ROS中的重要一员,更是诱导神经元细胞氧化应激常用的药物,这进一步在脊髓神经元细胞中证实了氧化应激对于自噬的促进作用。与神经元细胞相似,在软骨细胞、心肌细胞和肿瘤细胞中均可以观察到氧化应激与自噬的关系<sup>[6]</sup>。

氧化应激是由于细胞内活性氧和活性氮的产生和清除的失衡引起,与神经元细胞的炎症、凋亡和衰老等密切相关。SCI时,缺氧引起的脊髓神经元细胞的氧化应激是急性SCI继发性损伤的主要原因<sup>[4]</sup>。已有研究报道,发生SCI时,脊髓神经元细胞程序性死亡中有50%是由于细胞中产生的大量ROS而引起的<sup>[14]</sup>,程序性死亡包括凋亡和自噬。大量的ROS可以氧化细胞的组成成分,比如脂质、蛋白质和DNA,对细胞的完整性和活力产生了严重的影响<sup>[15]</sup>。目前,ROS引起的线粒体功能的障碍和细胞胞质中蛋白质的改变被认为是氧化应激引起神经元细胞坏死和凋亡的重要机制<sup>[15]</sup>。本文发现,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>导致大鼠脊髓神经元细胞数量和活力相对于正常组明显下降,并且发生大量的凋亡,这也说明凋亡在氧化应激引起的神经元细胞的死亡中具有重要的作用。

脊髓神经元细胞处于氧化应激状态下时,细胞中会产生不同的防御机制来保护细胞免于氧化应激的伤害<sup>[16]</sup>。本研究发现,自噬在神经元细胞中代偿性地升高,更重要的是,促进自噬可以缓解细胞凋亡并维持细胞的数量,而抑制自噬则会加重上述的现

象。这说明,自噬是神经元细胞在氧化应激下保护性的代偿反应。自噬对SCI的恢复具有重要的作用。在自噬缺陷的SCI的大鼠中,神经功能的恢复相对于野生型大鼠更慢<sup>[17]</sup>。研究报道,自噬对于神经元细胞损伤的保护作用主要是通过抑制细胞的凋亡来实现的。多种药物被发现可以通过促进自噬来抑制氧化应激引起的凋亡,如唾液素4(exendin 4)和二甲双胍等<sup>[18]</sup>。但是,自噬往往是一把双刃剑,有研究报道,过度的自噬会导致神经元细胞的死亡<sup>[19]</sup>。自噬的过度激活会导致神经元细胞出现自噬性应激,甚至会在神经系统中出现缺血性损伤<sup>[20]</sup>。因此,控制自噬的激活程度显的尤为重要。

综上所述,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用于脊髓神经元细胞激活自噬,通过沉默ATG5表达抑制自噬后加重H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起的细胞活力下降,而雷帕霉素促进自噬却提高神经元的活力,并抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起的细胞凋亡。因此,自噬是脊髓神经元细胞在氧化应激状态下自我保护性的反应,对细胞的活力和凋亡具有重要的作用,适当地促进自噬可能恢复脊髓损伤具有一定的作用。

## 参考文献 (References)

- 1 Chen HC, Fong TH, Lee AW, Chiu WT. Autophagy is activated in injured neurons and inhibited by methylprednisolone after experimental spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2012; 37(6): 470-5.
- 2 Wang JF, Li Y, Song JN, Pang HG. Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury. *Neurochem Int* 2014; 64: 37-47.
- 3 Jia Z, Zhu H, Li J, Wang X, Misra H, Li Y. Oxidative stress in spinal cord injury and antioxidant-based intervention. *Spinal Cord* 2012; 50(4): 264-74.
- 4 Liu D, Liu J, Sun D, Wen J. The time course of hydroxyl radical formation following spinal cord injury: the possible role of the iron-catalyzed Haber-Weiss reaction. *J Neurotrauma* 2004; 21(6): 805-16.
- 5 Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451(7182): 1069-75.
- 6 Steiger-Barraissoul S, Rami A. Serum deprivation induced autophagy and predominantly an AIF-dependent apoptosis in hippocampal HT22 neurons. *Apoptosis* 2009; 14(11): 1274-88.
- 7 Anderson KN, Potter AC, Piccenna LG, Quah AK, Davies KE, Cheema SS. Isolation and culture of motor neurons from the newborn mouse spinal cord. *Brain Res Brain Res Protoc* 2004; 12(3): 132-6.
- 8 Thuret S, Moon LD, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(8): 628-43.
- 9 Simon CM, Sharif S, Tan RP, LaPlaca MC. Spinal cord contusion causes acute plasma membrane damage. *J Neurotrauma* 2009; 26(4): 563-74.
- 10 Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal

- cord injury: A nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2011; 71(2): 281-99.
- 11 Kanno H, Ozawa H, Sekiguchi A, Itoi E. Spinal cord injury induces upregulation of Beclin 1 and promotes autophagic cell death. *Neurobiol Dis* 2009; 33(2): 143-8.
- 12 Hou H, Zhang L, Zhang L, Liu D, Mao Z, Du H, *et al.* Acute spinal cord injury in rats induces autophagy activation. *Turk Neurosurgery* 2014; 24(3): 369-73.
- 13 Wang ZY, Lin JH, Muharram A, Liu WG. Beclin-1-mediated autophagy protects spinal cord neurons against mechanical injury-induced apoptosis. *Apoptosis* 2014; 19(6): 933-45.
- 14 Sanchez-Carbente MR, Castro-Obregon S, Covarrubias L, Narvaez V. Motoneuronal death during spinal cord development is mediated by oxidative stress. *Cell Death Differ* 2005; 12(3): 279-91.
- 15 Mendez-Armenta M, Nava-Ruiz C, Juarez-Rebollar D, Rodriguez-Martinez E, Gomez PY. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 293689.
- 16 Jing L, He MT, Chang Y, Mehta SL, He QP, Zhang JZ, *et al.* Coenzyme Q10 protects astrocytes from ROS-induced damage through inhibition of mitochondria-mediated cell death pathway. *Int J Biol Sci* 2015; 11(1): 59-66.
- 17 Viscomi MT, D'Amelio M, Cavallucci V, Latini L, Bisicchia E, Nazio F, *et al.* Stimulation of autophagy by rapamycin protects neurons from remote degeneration after acute focal brain damage. *Autophagy* 2012; 8(2): 222-35.
- 18 Li HT, Zhao XZ, Zhang XR, Li G, Jia ZQ, Sun P, *et al.* Exendin-4 enhances motor function recovery via promotion of autophagy and inhibition of neuronal apoptosis after spinal cord injury in rats. *Mol Neurobiol* 2016; 53(6): 4073-82.
- 19 Shi R, Weng J, Zhao L, Li XM, Gao TM, Kong J. Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia. *CNS Neurosci Ther* 2012; 18(3): 250-60.
- 20 Rami A, Langhagen A, Steiger S. Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiol Dis* 2008; 29(1): 132-41.