

· 论著 ·

急性脑梗死患者外周血单核细胞自噬相关蛋白表达特点*

邱宗和* 陈进铭 叶小平 张海江 孙盛同
南方医科大学南方医院白云分院急诊科 (广东 广州 518120)

【摘要】目的 探讨急性脑梗死患者外周血单核细胞自噬相关蛋白表达特点及其与线粒体功能变化的相关性。**方法** 随机纳入我院2020年1月至2021年5月80例急性脑梗死患者, 依照发病时间将患者分为<4.5h组、4.5~6h组和>6h组3组; 使用改良Rankin量表评估预后, 纳入同期40例健康人为对照组, 比较不同组患者单核细胞自噬相关蛋白表达的差异及与患者线粒体功能指标CF6水平的相关性。**结果** <4.5h组、4.5~6h组和>6h组MAP1-LC3、Beclin 1、Atg5-Atg12等单核细胞自噬相关蛋白水平呈明显升高趋势, 在>6h组中最高, 上述指标亦随着NIHSS评分的升高而升高, 在溶栓治疗后单核细胞自噬相关蛋白表达明显下降, 在预后不良组上述指标明显高于预后良好组($P<0.05$), MAP1-LC3、Beclin 1、Atg5-Atg12均与线粒体功能指标变化存在相关性($P<0.05$)。**结论** 急性脑梗死患者单核细胞自噬相关蛋白表达显著升高, 随着发病时间延长和病变严重程度的加重, 其表达水平进一步升高, 自噬可能介导急性脑梗死的发病、病情进展和预后不良。

【关键词】 急性脑梗死; 单核细胞; 细胞自噬; 发病时间

【中图分类号】 R446.1

【文献标识码】 A

【基金项目】 广州市白云区科技计划项目 (202102330124)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2022.10.007

Characteristics of Autophagy-related Protein Expression in Peripheral Blood Monocytes of Patients with Acute Cerebral Infarction*

KUANG Zong-he*, CHEN Jin-ming, YE Xiao-ping, ZHANG Hai-jiang, SUN Sheng-tong.

Department of Emergency, Baiyun Branch of Nanfang Hospital, The Southern Medical University, Guangzhou 518120, Guangdong Province, China

Abstract: Objective To investigate the expression characteristics of autophagy related proteins in peripheral blood monocytes of patients with acute cerebral infarction and its correlation with mitochondrial function. **Methods** 80 patients with acute cerebral infarction in our hospital from January 2020 to May 2021 were randomly enrolled and divided into <4.5h group, 4.5-6h group and >6h group according to onset time. The improved Rankin scale was used to evaluate the prognosis, and 40 healthy subjects were included in the control group during the same period. The expression of monocyte autophagy related proteins in different groups and its correlation with the level of mitochondrial function indicator CF6 were compared. **Results** The levels of MAP1-LC3, Beclin 1, Atg5-Atg12 and other monocyte autophagy related proteins in <4.5h, 4.5-6h and >6h groups were significantly increased, and were the highest in >6h group. The above indexes also increased with the increase of NIHSS score. After thrombolytic therapy, the expression of autophagy-related proteins in monocytes decreased significantly, and the above indexes in the poor prognosis group were significantly higher than those in the good prognosis group ($P<0.05$). MAP1-LC3, Beclin 1, Atg5-Atg12 were correlated with the changes of mitochondrial function indexes ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of autophagy-related proteins in monocytes in patients with acute cerebral infarction is significantly increased, and the expression level is further increased with the prolongation of onset time and the aggravation of disease severity. Autophagy may mediate the onset, progression and poor prognosis of acute cerebral infarction.

Keywords: Acute Cerebral Infarction; Monocytes; Autophagy; Come On Time

急性脑梗死(acute cerebral infarction, ACI), 又称缺血性脑卒中, 是指由于动脉粥样硬化或血栓形成导致血管狭窄或闭塞而引起的脑供血突然不足导致脑组织坏死的急性脑血管疾病^[1]。急性脑梗死发病率高, 是死亡率最高的疾病, 并且常伴有难以治愈的并发症所以一直以来备受关注。为了更好地治疗急性脑梗死, 人们一直致力于急性脑梗死发病机制的研究, 目前认为缺血再灌注损伤, 钙离子内流, 神经细胞凋亡等与梗死部位脑组织不可逆损伤有关, 在众多机制中神经细胞凋亡处于较为重要的地位^[2]。自噬是细胞程序性死亡的一种方式, 适当的自噬可以使真核生物内的物质循环利用, 并降解自身代谢废物及异常的细胞器等, 但是自噬的过度激活溶酶体会降解细胞的正常营养物质和损伤正常的细胞结构, 反而会造成过量的能量消耗和自身损伤^[3]。对于心肌细胞, 神经细胞等不可再生细胞而言自噬在维持细胞的正常生理结构, 生命活动发挥着重要的作用。国内外研究已经发现在心肌梗死患者的心肌中存在自噬现象, 在大鼠等脑梗死动物模型种中也发现自噬现象的存在, 但是在人类急性脑梗死种是否存在自噬现象尚未明确^[4]。本研究探讨急性脑梗死时的单核细胞自噬蛋白表达的特点, 以期临床治疗做出参考, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 随机纳入我院2020年1月至2021年5月80例急性脑梗死患者, 患者年龄 49~72岁, 平均 63.47 ± 8.35 岁, 采用4种分组方法即: 根据发病时间将急性脑梗死患者分为<4.5h组、4.5~6h组和>6h组3组; 根据治疗情况分为溶栓治疗前、治疗后2组; 根据NIHSS评分标准分成三组: 轻度(NIHSS评分0~6分)、中度(NIHSS评分7~15分)、重度(NIHSS评分>16分); 使用改良Rankin量表(mRS)评估预后, 根据评分结果分成2组: 预后不良组(mRS评分>2分), 预后良好组(mRS评分≤2分), 纳入同期40例健康人作为对照组, 患者年龄 51~70岁, 平均 60.52 ± 7.83 岁。

纳入标准: 首次发病并且在72小时内入院; 症状, 体征, 影像学检查结果等满足急性缺血性脑卒中的诊断标准; NIHSS评分为4-20分; 患者及其家属签署知情同意书。排除标准: 脑CT提示存在脑出血; 既往有脑梗死病史且遗留神经功能缺损者; 有严重心功能不全、慢性肝肾疾病者; 1个月内存在怀孕、分娩、哺乳等情况者; 血小板 $<100 \times 10^9/L$ 或血小板 $>300 \times 10^9/L$ 和重度以上贫血者; 24小时内接受ACEI治疗; 年龄>85周岁。同期选择健康对照组40例。对照组纳入标准: 研究对象半年内未出现脑缺

【第一作者】邱宗和, 男, 主治医师, 主要研究方向: 急性脑血管病等神经重症患者诊治。E-mail: kuangzonghe2000@126.com

【通讯作者】邱宗和

血性疾病, 无冠心病、高血压等心血管疾病, 无糖尿病、甲亢等内分泌性疾病。

1.2 实验方法

1.2.1 外周血单核细胞的分离 入院的第1天、第14天抽取外周静脉血10mL, 使用肝素抗凝, 之后立即放置于4℃冰箱降温保存, 从而抑制外周血中单核细胞的活性。冰箱中保存30min 后, 取5mL血液用3 000r/min的速度进行离心10min, 血清标本置与-80℃的冰箱中冷存; 密度梯度离心剩余的5mL静脉血, 按照单核细胞的贴壁特性, 分离出单核细胞。

1.2.2 Western blot 检测单核细胞中的MAP1-LC3、Beclin-1 及Atg5-Atg12含量 将单核细胞使用 RIPA 裂解液裂解, 提取总蛋白, 在每个泳道中加入总蛋白40μg。用BCA 法测各组蛋白浓度。使用15% SDS-PAGE进行90V/120V 恒压电泳, 湿转(200mA, 50min) 到 PVDF 膜上, 5%脱脂牛奶室温封存2h, 并且加入MAP1-LC3 兔抗人多克隆抗体、Beclin-1 兔抗人多克隆抗体、Atg5 兔抗人多克隆抗体(1:1000 稀释) 和β-actin 鼠抗人单克隆抗体(1:1000 稀释), 加入之后4℃孵育, TBST洗涤, β-actin 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG(1:5000 稀释), MAP1-LC3 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG(1:5000 稀释), 两者均于室温孵育 90min, TBST 洗涤后, ECL 化学发光试剂显影。

1.2.3 线粒体偶联因子6(CF6)入院时及第14天空腹抽取肘静脉血10mL, 置于含促凝剂的采血管中, 将采血管在2800转/分钟, 4℃环境下, 离心30分钟并获取上层血清, -2℃保存备用。CF6的浓度使用ELISA方法检测。

1.3 观察指标 外周血单核细胞中的 MAP1-LC3、Beclin-1 及Atg5-Atg12 含量, CF6浓度, 并将各组患者的自噬相关蛋白含量与各种临床参数进行相关分析, 将自噬相关蛋白含量与CF6浓度之间进行Logistac分析, 分析其相关性。

1.4 统计学方法 选择SPSS 17.0 统计软件分析数据。正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 比较选择t检验; 偏态分布的计量资料以四分位数间距M(QR)表示, 比较选择Mann-Whitney U 检验; 计数资料以率(%)表示, 比较运用 χ^2 检验。相关分析采用spearman相关分析。使用受试者工作特征(ROC)曲线评估急性脑梗死患者外周血单核细胞自噬水平对脑梗死患者预后的预测能力。以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的含量 <4.5h组、4.5~6h 组和>6h组均较健康对照组的MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的含量高, 且>6h组高于4.5~6h 组高于<4.5h组, 差异有统计学意义($P > 0.05$), 见表1。

表1 不同时间各组MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的相对丰度值

组别	例数	MAP1-LC3	Beclin-1	Atg5-Atg12
<4.5h 组	26	1.09±0.08	1.18±0.05	1.03±0.04
4.5~6h 组	25	1.34±0.04	1.64±0.07	1.46±0.03
>6h组	29	1.62±0.06	1.83±0.23	1.54±0.07
健康对照组	40	0.96±0.05	1.05±0.04	0.95±0.03

2.2 不同NHISS评分组MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的含量 轻度、中度、重度三组均较健康对照组的MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的含量高, 且重度组高于中度组高于轻度组, 差异具有统计学意义($P > 0.05$), 见表2。

表2 不同NHISS评分各组MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的相对丰度值

组别	例数	MAP1-LC3	Beclin-1	Atg5-Atg12
轻度	24	1.06±0.07	1.16±0.05	1.06±0.04
中度	25	1.32±0.03	1.62±0.06	1.48±0.06
重度	31	1.58±0.05	1.76±0.14	1.56±0.05
健康对照组	40	0.96±0.05	1.05±0.04	0.95±0.03

2.3 治疗前后MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的含量 治疗前, 治疗后2组均较健康对照组的MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的含量高, 治疗后组低于治疗前, 差异具有统计学意义($P > 0.05$), 见表3。

表3 治疗前后各组MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的相对丰度值

组别	例数	MAP1-LC3	Beclin-1	Atg5-Atg12
治疗前	80	1.48±0.12	1.52±0.16	1.58±0.13
治疗后	80	1.08±0.09	1.13±0.08	1.14±0.07
健康对照组	40	0.96±0.05	1.05±0.04	0.95±0.03

2.4 不同预后组MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的含量 预后不良组, 预后良好2组均较健康对照组的MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的含量高, 预后良好组低于预后不良组, 差异具有统计学意义($P > 0.05$), 见表4。

表4 不同预后各组MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的相对丰度值

组别	例数	MAP1-LC3	Beclin-1	Atg5-Atg12
预后不良组	39	1.52±0.14	1.47±0.10	1.56±0.21
预后良好组	41	1.23±0.08	1.24±0.07	1.26±0.05
健康对照组	40	0.96±0.05	1.05±0.04	0.95±0.03

2.5 MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的变化与线粒体偶联因子6(CF6)变化的相关性 根据Logistac分析各个患者的MAP1-LC3、Beclin-1 及 Atg5-Atg12的含量变化与线粒体偶联因子6(CF6)变化具有相关性。

3 讨论

除细胞凋亡之外人们还发现了第二种细胞程序性死亡方式——自噬, 是细胞通过溶酶体的作用降解各种细胞内异常的细胞器, 以及各种代谢废物的过程。已有大量研究表明自噬过程与心肌梗死过程存在密切联系, 自噬在脑梗死动物模型种的作用也有一定的研究^[5-6]。在脑梗死时由于血液供应不足造成大量细胞因缺血缺氧而出现结构和功能异常, 此时自噬过程就有可能启动吞噬各种代谢废物及功能异常的细胞器帮助细胞维持正常功能起到保护作用^[7], 但是在缺血再灌注期又有可能因自噬的过度激活造成细胞自噬正常的细胞结构而造成细胞损伤^[8]。自噬是把双刃剑, 自噬在急性脑梗死种到底起着怎样的作用, 在急性脑梗死的治疗种应该怎样处理自噬, 自噬的过度激活的机制, 适当的处理自噬在脑梗死的临床治疗中的意义等等都是目前亟待解决的问题^[9]。急性脑梗死目前虽然已经有明确的治疗指南, 但是治疗效果以及治疗后后遗症的处理任然需要进步, 自噬或许可以成为一把治疗的钥匙, 可以辅助超早期溶栓治疗提高疗效, 减少许多不可逆损伤^[10-12]。

本研究的目的是探讨不同时间, 不同预后, 不同严重程度的急性脑梗死中外周血单核细胞中自噬相关蛋白的表达的变化情况, 及其与线粒体功能改变的相关性, 从而了解在急性脑梗死中是否存在自噬过程, 自噬的作用如何, 自噬作用发生的机制如何是否与线粒体功能有关。研究结果表明急性脑梗死的自噬相关蛋白表达水平高于健康对照组, 且随着患病时间的延长自噬相关蛋白表达逐渐升高, 随着严重程度的增加即NHISS评分的升高自噬相关蛋白表达逐渐升高, 治疗后自噬相关蛋白含量明显低于治疗前, 并且预后不良的患者的自噬相关蛋白含量明显高于预后良好的患者, 并且自噬相关蛋白表达的变化与线粒体功能变化指标CF6的改变具有良好的相关性。

综上所述, 急性脑梗死过程中确实存在着自噬过程, 并且自噬过程的强弱与急性脑梗死的时间和严重程度相关, 自噬过程与急性脑梗死的不良预后有相关性, 自噬过程在急性脑梗死的治疗即疗效评估中具有一定的临床意义, 并且自噬过程的过度激活可能与线粒体的损伤有关。

参考文献

- [1] 杨波. 依达拉奉对老年脑梗死患者血清TNF- α 和IL-8的影响及其疗效[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(3): 591-592
- [2] 唐凌雯, 胡佳. 急性脑梗死患者炎症标记物水平及其预后的相关性分析[J]. 罕少疾病杂志, 2020, 27(5): 1-4.
- [3] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease[J]. Cell, 2012, 149(2): 274-293
- [4] 刘强, 汤园园. 急性缺血性脑梗死CT和MRI的诊断比较[J]. 罕少疾病杂志, 2019, 26(5): 8-10.
- [5] 莫本成, 张自力, 刘振华, 等. 动态磁敏感对比MRI与磁敏感加权成像在急性脑缺血中的应用比较[J]. 中国CT和MRI杂志, 2017, 15(1): 23-25.
- [6] Mozaffarian D, Benjamin E J, Go AS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association[J]. Circulation, 2016, 133(4): 38-360
- [7] 苏方, 张培, 姜治伟, 等. 海马神经细胞缺血再灌注后自噬的表达及作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2011, 27(2): 187-191
- [8] Benjamin E J, Virani S S, Callaway C W, et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: A report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2018, 137(12): 67-492
- [9] 伍静, 赵勇, 师长宏, 等. 自噬的形态特征及分子调控[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(20): 3941-3944
- [10] Galluzzi L, Bravo-San PJM, Levine B, et al. Pharmacological modulation of autophagy: Therapeutic potential and persisting obstacles[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(7): 487-511
- [11] 张冰缘, 马丽丽, 朱琳, 等. 自噬在缺血再灌注损伤中的研究现状[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(26): 65-66+68
- [12] Zhong Y, Zhong P, He S, et al. Trimetazidine protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury by promoting AMP-activated protein kinase-dependent autophagic flux[J]. J Cardiovasc pharmacol, 2017, 69(6): 389-397.

(收稿日期: 2021-12-04)

(校对编辑: 阮 靖)

(上接第 12 页)

但是胆总管探查术中需要摆放头高脚低和右侧偏高的胆囊手术体位, 再加上气腹的建立, 严重影响了CVP测量的准确性, 如该例患者麻醉前基础CVP为7cmH₂O, 摆放手术体位和建立气腹后直接下降至0cmH₂O, 术后又恢复至10~12cmH₂O(见图3)。这时候如果仍然使用CVP作术中液体治疗的靶目标, 就会导致液体负荷过高。SVV是单位时间内每搏量的变异程度, 以此预测心血管系统对液体负荷的反应, 进而能够更准确地判断循环系统的前负荷状态。Hofer等研究发现, SVV作为液体管理靶目标, 其曲线下面积、灵敏度和特度明显要高于CVP、PPV(脉压变异率)和GEDV(全心舒张末容积)^[6]。有研究报道扩容反应在SVV 8%~13%时达最佳状态, SVV>13%提示容量欠缺, 故该例患者我们将其目标值设为小于13%^[7-8]。但SVV仅适用于使用机械通气的患者, 且潮气量需大于8mL/kg, 自主呼吸时其数值与前负荷相关性较差^[9]。如图1所示, 该例患者手术结束恢复自主呼吸后, SVV迅速从8%上升至15-20%以上, 甚至更高, 但此时CVP值为10~12cmH₂O。另外若患者异位搏动超过FloTrac滤过功能(每分钟21次), SVV计算值即会出现明显误差, 同时机器也会提示报警。本例患者术前并发阵发性房颤, 房颤发作时SVV值不适用于指导液体治疗, 诱导后改用多巴胺强心, 术中基本维持窦性心律。

老年心脏传导系统中的起搏细胞和传导细胞随着增龄而衰退减少, 故老年患者容易出现心动过缓甚至病态窦房结综合征。该患者尽管术中未发生严重心动过缓和心脏停搏, 但术前若能完善24小时动态心电图明确病窦的诊断, 应放置临时起搏器或准备体外起搏除颤仪, 以预防术中猝死风险。低体温会减缓麻醉药物的代谢和对患者预后产生不良影响, 老年患者因其体温调节能力下降, 术中更容易出现体温过低, 本例患者术中未能动态监测体温及施行有效的保温治疗, 也是我们这例麻醉缺陷之一^[10]。

综上所述, 超高龄患者因其心脑血管储备功能较差, 行全身麻醉时循环波动极大, 可以使用BIS指数和FloTrac系统动态监测麻醉

深度和血流动力学指标, 指导术中全身麻醉药物、血管活性药物的精确使用和施行目标导向液体治疗, 有利于减少全身麻醉药物的使用和术后快速康复, 降低围术期心脑血管并发症发生概率。

参考文献

- [1] 中华医学会麻醉学分会老年人麻醉与围术期管理学组, 国家老年病临床医学研究中心, 国家老年麻醉联盟. 中国老年患者围术期麻醉管理指导意见(2020版)(一)[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(31): 2404-2415.
- [2] 邢英皓, 潘柏言, 吴秀英. 目标导向液体治疗在胰十二指肠切除术中的临床应用[J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(3): 79-82.
- [3] 陈大勇, 焦学昌. 腹腔镜胆囊切除术后切口局部浸润麻醉的镇痛效果观察[J]. 罕少疾病杂志, 2021, 28(1): 44-45, 57.
- [4] 沈岑, 姚巧林. 不同麻醉深度下老年患者术后认知障碍发生情况及颅脑MRI改变分析[J]. 中国CT和MRI杂志, 2021, 19(2): 3.
- [5] Button D, Weibel L, Reuthebuch O M, et al. Clinical evaluation of the FloTrac/FloTrac/VigileoTM system and two established continuous cardiac output monitoring devices in patients undergoing cardiac surgery[J]. Br J Anaesth, 2007, 99(3): 329-336.
- [6] Hofer C, Senn A L, Zollinger A. Assessment of stroke volume variation for prediction of fluid responsiveness using the modified FloTrac and PiCCOplus system[J]. Critical Care, 2008, 12(3): R82.
- [7] Challand C, Struthers R, Sneyd JR, et al. Randomized controlled trial of intraoperative goal-directed fluid therapy in aerobically fit and unfit patients having major colorectal surgery[J]. British J Anaesthesia, 2012, 108(1): 53.
- [8] 赵国良, 周银燕, 彭沛华, 等. 目标导向液体治疗对胃肠道肿瘤手术老年患者术后康复的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(4): 453-456.
- [9] Liu X, Fu Q, Mi W, et al. Pulse pressure variation and stroke volume variation predict fluid responsiveness in mechanically ventilated patients experiencing intra-abdominal hypertension[J]. Bioscience Trends, 2013, 7(2): 101-108.
- [10] Bindu B, Bindra A, Rath G. Temperature management under general anesthesia: Compulsion or option[J]. Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology, 2017, 33(3): 306.

(收稿日期: 2021-11-05)

(校对编辑: 阮 靖)