

细胞自噬相关蛋白在大鼠脾脏撞击伤后 12 小时内脾组织中的表达

欧阳骏¹, 牛玉林²

1. 安徽医科大学附属安庆医院小儿外科, 安徽 安庆 246000;

2. 贵州医科大学附属白云医院急诊外科, 贵州 贵阳 550014

摘要: **目的** 观察自噬基因相关蛋白在大鼠脾脏撞击伤后 12 h 内脾组织内的表达情况。**方法** 选用清洁级健康 SD 大鼠 20 只, 随机分为正常对照组(A 组)、创伤后 2 h 组(B 组)、创伤后 8 h 组(C 组)、创伤后 12 h 组(D 组), 每组 5 只。B、C、D 组利用生物撞击机建立脾脏撞击伤模型, A 组只麻醉不撞击, 麻醉后立即处死取出脾脏, B、C、D 组分别于撞击后相应时间取出脾脏, 评估脾脏出现损伤的程度。创伤脾组织标本进行 HE 染色, 显微镜下观察受损脾组织的特征。大体标本观察造模是否成功。采用免疫组织化学法及 Western blot 法检测各组脾组织酵母自噬相关基因 Atg6 的同源物(Beclin1)、酵母自噬相关基因 Atg8 的同源物微管相关蛋白 1 轻链蛋白 3(LC3)蛋白的表达。**结果** (1)脾脏撞击伤模型均造模成功。同一撞击力度下不同受伤时间模型组大鼠脾脏裂伤长度和深度基本一致(P 均 > 0.05)。(2)HE 染色显示模型组脾组织符合脾破裂征象。(3)免疫组织化学法及 Western blot 法检测显示, 模型大鼠随创伤后时间推移(2 h 组→8 h 组→12 h 组), 其脾组织 Beclin1、LC3 II 蛋白相对表达量递升(P 均 < 0.05), 且模型大鼠各时间组均高于对照组(P 均 < 0.05)。**结论** 脾脏撞击伤可导致脾组织自噬水平的上升; 脾脏撞击伤后 12 h 内脾组织自噬相关蛋白水平随时间的推移, 表达逐渐升高。

关键词: 脾脏撞击伤; 自噬; 酵母自噬相关基因 Atg6 的同源物; 酵母自噬相关基因 Atg8 的同源物微管相关蛋白 1 轻链蛋白 3

中图分类号: R 64 R-33 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2019)01-0018-05

Expressions of autophagy related proteins in spleen tissue within 12 hours after splenic impact injury in rats

OUYANG Jun-jun*, NIU Yu-lin

* Department of Pediatric Surgery, Anqing Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anqing, Anhui 246000, China

Corresponding author: NIU Yu-lin, E-mail: nndnyl@126.com

Abstract: Objective To observe the expressions of autophagy gene related-proteins in spleen tissues within 12 hours after splenic impact injury in rats. **Methods** Twenty clean grade healthy SD rats were randomly divided into four groups ($n=5$ each): control group (group A), 2 hours after trauma group (group B), 8 hours after trauma group (group C) and 12 hours after trauma group (group D). The splenic impact injury models were established by bio-impactor in rats of group B, C and D. The rats in group A were anesthetized only but not impacted and immediately executed after anesthesia, then the spleens were taken out. The rat spleens were taken out at the corresponding time after impact, and the extent of spleen injury was assessed in group B, C and D. Hematoxylin eosin (HE) staining of traumatic spleen was performed to observe the characteristics of injured spleen tissues under microscope. Gross specimens were observed to see if the molding was successful. Immunohistochemical method and Western blot method were used to detect the expressions of Beclin1 (a homologue of yeast autophagy related gene Atg6) and microtubule-associated protein 1 light chain3 (LC3, a homologue of yeast autophagy related gene Atg8 proteins). **Results** The models of splenic impact injury were established successfully. Gross specimens showed that splenic laceration length and depth under the same impact force and at different injured time in each modeling group were basically same (all $P > 0.05$). HE staining showed that splenic tissues conformed to signs of splenic rupture. Immunohistochemical method and Western blot method showed that the relative expression levels of Beclin1

and LC3 II proteins in spleen increased progressively with posttraumatic time going (2 h→8 h→12 h) in model group (all $P < 0.05$), and they in each time subgroup of model group were significantly higher than those in control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Spleen impact injury could lead to the rise of autophagy level in spleen tissues, and the autophagy related proteins levels within 12 hours after splenic impact injury increases progressively with time going.

Key words: Spleen impact injury; Autophagy; Homologue of yeast autophagy related gene Atg6; Homologue of yeast autophagy related gene Atg8

Fund program: Science and Technology Cooperation Project of Guizhou Province (LH [2015] 7399)

统计数据表明,每年中国道路交通事故造成的人员伤亡居世界首位,交通伤致腹部受撞击损害并不少见,腹部闭合性损伤中脾破裂最常见^[1]。脾脏是人体最大的淋巴器官,在机体免疫、造血、滤血等方面发挥着极其重要的作用,近年来由于对脾脏功能研究的深入,无辜性脾切除已深受质疑,在不威胁生命情况下尽可能保脾已在外科学界达成共识。肝脾破裂者在创伤发生后若能早期及时救治,可明显降低创伤后脓毒症和感染发生率,提高患者生存率,减少并发症,反之,死亡率将极大上升^[2],因此在创伤早期寻求一种促进可非手术治疗的挫裂伤脾脏及保脾术后脾脏愈合的新治疗方法具有重要的意义。

细胞自噬属于生物体内的一种分解代谢过程,其中巨自噬是最常见的类型,与人类的疾病和健康联系也最为紧密,它主要是将功能受损或紊乱的胞质成分运送至溶酶体降解及循环,在某种程度上是一种细胞内源性保护机制^[3-6]。自噬相关基因调控着细胞自噬发生发展的各个阶段,其中酵母自噬相关基因 Atg6 的同源物(Beclin1)和酵母自噬相关基因 Atg8 的同源物(微管相关蛋白 1 轻链蛋白 3, LC3)均是参与自噬体形成的重要基因,可分为 LC3 I 与 LC3 II,其中 LC3 II 与自噬水平呈正相关。目前研究表明 Beclin1 是自噬特异性基因及必需基因,而 LC3 是自噬标志性基因,是自噬特异的诊断指标之一^[7-9], Beclin1 和 LC3 常被作为检测自噬的指标。自噬在组织器官创伤方面的研究近年来主要集中在颅脑、脊髓、心肌、肺部等方向,腹部创伤尤其脾脏创伤方面自噬研究国内外鲜有报道,本研究检测伤后 12 h 内模型大鼠脾组织内 Beclin1 及 LC3 自噬相关蛋白的表达,初步探讨在撞击伤脾组织中的自噬水平及其意义,以为脾脏创伤的临床治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 健康清洁级 SD 大鼠 20 只,8 周龄,雄性,体重(250 ± 20)g,购于贵州医科大学动物实验中心[动物批号 SCXK(黔)2012-000]。兔抗大鼠 LC3 一抗(美国 CST 公司),兔抗大鼠 Beclin1 一抗(美国

CST 公司),兔抗大鼠 β -actin 一抗(美国 Abbkine 公司),山羊抗兔二抗辣根过氧化物酶(HRP)(武汉博士德生物公司),Clix ChemiScope5000 一体式化学发光仪(上海勤翔科学仪器有限公司),BIM-V 型生物撞击机(第三军医大学大坪野战外科研究所)

1.2 动物分组与模型构建 实验 SD 大鼠随机分为正常对照组(A组)、创伤后 2 h 组(B组)、创伤后 8 h 组(C组)、创伤后 12 h 组(D组),每组 5 只。大鼠称重后用 4% 水合氯醛(1 ml/100 g)腹腔麻醉,固定于 BIM-V 型生物撞击机底座上,将撞击机撞头对准大鼠左季肋区,撞头距离左季肋区 5 cm,调整驱动压力为 400 kPa 实施撞击。A 组只麻醉不撞击直接处死取出脾脏;B、C、D 组分别选择撞击造模后 2、8、12 h 处死取出脾脏,评估脾脏出现损伤的程度(大体或病理)。一部分创伤脾组织用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,另一部分组织于 -80 °C 保存。

1.3 创伤后脾组织 HE 染色 将蜡块切成 3 ~ 4 μ m 薄片,60 °C 烤箱内烤片 60 min 后冷却至常温,分别经二甲苯梯度脱蜡,酒精梯度水化后用 HE 染色,最后再经酒精梯度脱水、二甲苯透明后,中性树胶封片,37 °C 烘干,显微镜下观察受损脾组织的特征。

1.4 免疫组织化学法检测各组脾组织 Beclin1、LC3 蛋白的表达 将各组蜡块切成 3 ~ 4 μ m 薄片置于 APES 玻片上,60 °C 烤箱内烤片约 60 min,分别经二甲苯梯度脱蜡,酒精梯度水化后用枸橼酸盐高温高压修复,滴加兔来源一抗 LC3 (1 : 500)、Beclin1 (1 : 100),4 °C 冰箱过夜;加上山羊抗兔 IgG 二抗,于 37 °C 温箱中放置 30 min, DAB 显色后使用苏木素复染,最后再经酒精梯度脱水、二甲苯透明后,中性树胶封片,37 °C 烘干,显微镜下观察脾组织的大体特征。光镜下观察棕黄色区域为阳性,每张切片随机选取 5 个视野($\times 400$)的照片,使用软件分析出平均光密度值以间接估计 Beclin1、LC3 蛋白表达量。

1.5 Western blot 法检测各组脾破裂组织中 Beclin1、LC3 蛋白相对表达水平 称取创伤脾组织标本约 100 mg,提取总蛋白,并进行蛋白定量,上样孔各样品蛋白总量定为 30 μ g,进行 SDS-PAGE 电泳后将目的

条带转印至 PVDF 膜上,用封闭液封闭后分别孵育 Beclin1 一抗(1:1 000),LC3 一抗(1:1 000),以及内参 β -actin(1:3 000) 4 °C 过夜,山羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,滴加工作液于 PVDF 膜上,自动曝光机检测各条带,使用软件计算光密度值,以目的条带灰度值与同一条带灰度值的比值表示相对灰度值,并作为目的蛋白 Beclin1 与 LC3 的相对表达水平。

1.6 统计学分析 运用 SPSS 19.0 统计软件。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较采用单因素方差分析,两两比较用 SNK-*q* 检验。 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 脾撞击伤组织大体标本的观察及损伤程度的判断 观察到创伤后 2、8 和 12 h 脾组织表面出现裂伤,脾门等其他部位结构完整,未发现其他脏器合并伤,参考人体脾脏损伤的分级方法,测量裂伤的长度及深度,经数据分析得知,创伤后 2、8 和 12 h 脾组织表面裂伤长度和裂伤深度差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。表明同一撞击力度下创伤后不同时间模型组大鼠脾脏受损程度基本一致。见表 1。

2.2 脾撞击伤组织 HE 染色结果 与正常对照组大鼠脾组织对照,用 400 kPa 实施撞击的模型组大鼠脾组织结构不完整,被膜下见裂隙,裂隙缘红细胞聚集,符合脾破裂征象。见图 1。

2.3 脾撞击伤组织免疫组织化学法检测结果 脾脏 Beclin1、LC3 表达细胞胞浆着色,阳性区域呈棕黄色,对照组有少量阳性表达。见图 2、图 3。模型大鼠随创伤后时间推移(2 h 组 \rightarrow 8 h 组 \rightarrow 12 h 组),其脾组织 Beclin1、LC3 II 蛋白表达平均光密度值递升(P 均 <0.05),且模型大鼠各时间组均高于对照组(P 均 <0.05)。见表 2。

2.4 脾撞击伤组织 Western blot 法检测结果 模型大鼠随创伤后时间推移(2 h 组 \rightarrow 8 h 组 \rightarrow 12 h 组),其脾组织 Beclin1、LC3 II 蛋白相对表达量递升(P 均 <0.05),且模型大鼠各时间组均高于对照组(P 均 <0.05)。见表 3、图 4。

3 讨论

目前国内外多位学者发现自噬可能在脊髓急性损伤后抑制由凋亡诱导的脊髓神经元细胞的死亡^[10-11],自噬的激活可能在脊髓损伤中起保护作用。也有研究表明在脑组织创伤早期和晚期自噬可抑制

表 1 模型组大鼠脾组织裂伤程度 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

分组	裂伤长度(mm)	裂伤深度(mm)
创伤后 2 h 组	6.20 \pm 0.4	2.33 \pm 0.15
创伤后 8 h 组	5.94 \pm 0.6	2.23 \pm 0.40
创伤后 12 h 组	6.43 \pm 0.3	2.36 \pm 0.11
F 值	2.26	1.79
P 值	0.09	0.12

表 2 免疫组化检测各组大鼠脾组织 Beclin1、LC3 II 蛋白表达光密度值比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

分组	Beclin1	LC3 II
正常对照组	0.14 \pm 0.03	0.15 \pm 0.03
创伤后 2 h 组	0.22 \pm 0.06 *	0.19 \pm 0.05 *
创伤后 8 h 组	0.23 \pm 0.06 *	0.21 \pm 0.07 *
创伤后 12 h 组	0.25 \pm 0.07 *	0.26 \pm 0.07 *
F 值	3.894	3.819
P 值	0.029	0.031

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$ 。

表 3 Western blot 法检测各组大鼠脾组织 Beclin1、LC3 II 的蛋白相对表达量 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

分组	Beclin1/ β -actin	LC3 II/ β -actin
正常对照组	0.93 \pm 0.43	0.21 \pm 0.11
创伤后 2 h 组	1.29 \pm 0.51 *	0.55 \pm 0.36 *
创伤后 8 h 组	1.47 \pm 0.48 *	0.70 \pm 0.29 *
创伤后 12 h 组	1.65 \pm 0.46 *	0.89 \pm 0.39 *
F 值	4.337	4.426
P 值	0.023	0.019

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$ 。

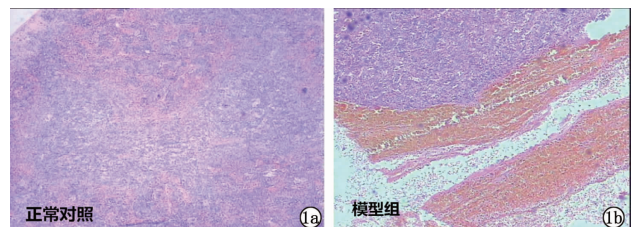


图 1 大鼠脾组织 HE 染色结果($\times 100$)

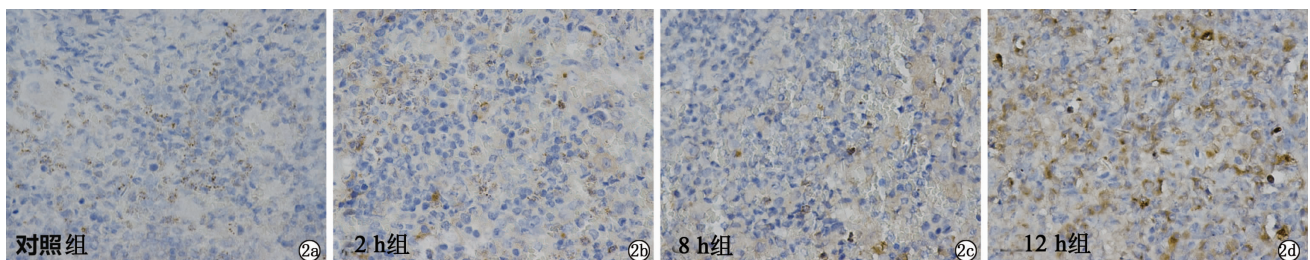


图 2 各组大鼠脾组织 Beclin1 的蛋白表达(免疫组化, $\times 400$)

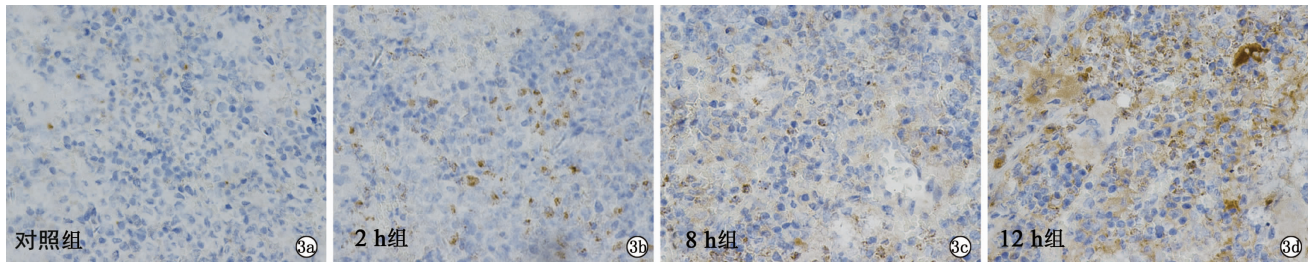


图3 各组大鼠脾组织 LC3 的蛋白表达(免疫组化, $\times 400$)

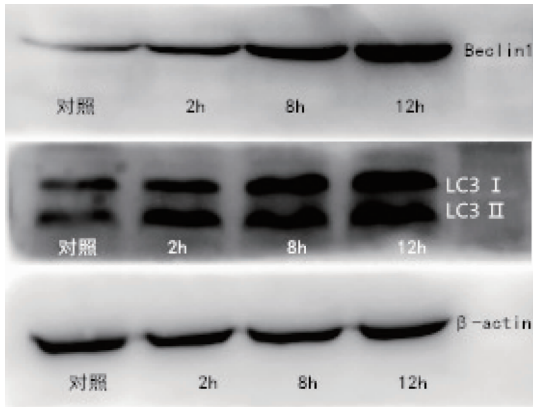


图4 Western blot 法检测各组大鼠脾组织 Beclin1、LC3 I、II 蛋白表达

海马细胞的变性^[12]。Xiao 等^[13]在烧伤后患者心肌自噬的研究中表明,烧伤后的 6 h 内,自噬具有维护心肌细胞的稳定性、保护心肌的作用;6 h 后,心肌细胞则出现自噬性细胞死亡、凋亡及坏死。

自噬的确切生理学意义及其与临床疾病的发生、发展的相关性仍未完全明确,自噬是否参与腹部创伤尤其脾脏创伤的发生、发展过程,国内外至今尚未见报道,故笔者选择其进行研究。脾脏撞击伤导致脾组织自噬水平上升的原因则可能是创伤应激所致。目前发现的自噬信号通路有多种,其中常见的有腺苷酸活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(AMPK/mTOR)信号通路以及磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/mTOR(PI3K/Akt/mTOR)信号通路^[14],创伤应激后的机体处于高代谢低合成的“饥饿”环境中,当细胞能量缺乏时,导致单磷酸腺苷/三磷酸腺苷(AMP/ATP)比值升高后活化 AMPK,随后活化的 AMPK 调节代谢以恢复细胞能量,同时可抑制下游信号分子 mTOR 的活性而增加细胞自噬水平^[15]。信号转导分子 PI3K 下游有多种效应分子,当机体能量充足时,PI3K 始动的生物信息由该通路的中心环节 Akt 传导,作用于其下游的 mTOR 等多个靶点^[16],Akt 中丝氨酸及苏氨酸的残基发生磷酸化后进入胞质和胞核,并通过结节性硬化复合体激活 mTOR^[17];反之,机体能量不足时,mTOR 则会被抑制,mTOR 随后与自噬相关基因 1/unc-51-样激酶(Atg1/ULK)复合物解离,ULK1 和 Atg13 因无法被磷酸化而与哺乳动物中

Atg17 的同系物 200(FIP200)相互作用,从而诱导自噬^[18]。

自噬在脾组织受撞击伤后的短时间内呈逐渐活跃的趋势,其可能在脾组织早期损伤的过程中发挥着保护的作用。因为当机体处于创伤等应激情况或在其他损伤因素作用下线粒体膜上通透性转换孔开放,线粒体膜电位发生去极化使膜电位下降,线粒体通透性被改变,使细胞色素 C 等从线粒体内释放,最终引起细胞损伤,并导致相关脏器的功能障碍^[19]。而自噬可调控线粒体等多种细胞器的更新,清除或降解细胞内损伤的细胞器和其他大分子物质,降解产物将被用于提供能量和细胞结构的重建,最终维持代谢的平衡以及内环境的稳定^[20]。

综上所述,本研究结果提示,脾脏撞击伤导致的脾组织自噬水平改变或可为临床上早期救治脾损伤提供新的诊疗思路。目前创伤等应激后机体自噬变化的研究结论尚存在部分争议,脾脏受撞击伤后更长时间内自噬水平变化及自噬的出现对脾脏损伤所起到的作用仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Massimo T, Maria IA, Gianpaolo C. Atraumatic splenic rupture, an underrated cause of acute abdomen[J]. Insights Into Imaging, 2016, 7(4): 641-646.
- [2] 刘永利,吕碧锋,林春旺,等.急诊绿色通道救治肝脾破裂患者体验[J].中国全科医学,2011,14(33):3845-3847.
- [3] Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation[J]. Nature, 2011, 469(7330): 323-335.
- [4] Sciarretta S, Volpe M, Sadoshima J. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease[J]. Circ Res, 2014, 114(3): 549-564.
- [5] Ouyang C, You J, Xie Z. The interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 71(3): 71-80.
- [6] 王蓓芸,李京波.巨噬细胞自噬与老年常见疾病研究进展[J].中国临床研究,2017,30(9):1272-1275.
- [7] Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress[J]. Autophagy, 2007, 3(1): 28-31.
- [8] Jiang H, Cheng D, Liu W, et al. Protein kinase C inhibits autophagy and phosphorylates LC3[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010,

395(4):471-476.

- [9] Chen HC, Fong TH, Hsu PW, 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.
- [10] Wang ZY, Lin JH, Muharram A, et al. Beclin-1-mediated autophagy protects spinal cord neurons against mechanical injury-induced apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2014, 19(6):933-945.
- [11] Tang P, Hou H, Zhang L, et al. Autophagy reduces neuronal damage and promotes locomotor recovery via inhibition of apoptosis after spinal cord injury in rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 49:276-287.
- [12] Zhang YB, Li SX, Chen XP, et al. Autophagy is activated and might protect neurons from degeneration after traumatic brain injury [J]. *Neurosci Bull*, 2008, 24(3):143-149.
- [13] Xiao R, Teng M, Zhang Q, et al. Myocardial autophagy after severe burn in rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):e39488.
- [14] Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009, 335:1-32.

- [15] 丁亦含, 李玉峰. mTOR 信号通路与自噬、凋亡之间的相互关系 [J]. *现代医学*, 2015, 43(6):801-804.
- [16] Zhu Y, Pereira RO, O'Neill BT, et al. Cardiac PI3K-Akt impairs insulin-stimulated glucose uptake independent of mTORC1 and GLUT4 translocation [J]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(1):172-184.
- [17] Kong X, Wang X, Yin Y, et al. Putrescine stimulates the mTOR signaling pathway and protein synthesis in porcine trophectoderm cells [J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(5):106.
- [18] Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, et al. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex [J]. *J Cell Biol*, 2000, 150(6):1507-1513.
- [19] 王洁. 心肌细胞自噬在创伤后迟发性心脏损伤中的作用研究 [D]. 太原:山西医科大学, 2012.
- [20] Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11):931-937.

收稿日期:2018-05-20 修回日期:2018-06-29 编辑:王国品

(上接第 17 页)

- [11] 李晶晶, 吕婷, 王宏伟, 等. 氨基酮戊酸光动力疗法治疗 SKH-1 小鼠皮肤鳞状细胞癌作用机制研究 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2014, 47(3):181-185.
- [12] 吴英鹰, 黄光武, 张哲. 光动力学治疗诱导舌癌裸鼠肿瘤模型中活性氧离子发生特性及其与抗肿瘤效应的相关性 [J]. *中国临床研究*, 2017, 30(5):600-605.
- [13] 张宏毅, 刘明辉, 李颖, 等. T 肽增强顺铂肿瘤杀伤作用的研究及机制探讨 [J]. *中国肺癌杂志*, 2017, 20(2):73-79.
- [14] 林珏龙, 陈春桂, 沈志忠, 等. 顺铂靶向食管癌细胞周期 Cx43 表达的研究 [J]. *激光生物学报*, 2017, 26(5):432-437.
- [15] 银瑞, 董新伟, 王铮. 顺铂诱导食管癌 EC9706 耐药细胞中 Bcl-2 的表达 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(3):562-564.
- [16] 古春萍, 阙富昌, 李亦蕾, 等. 顺铂通过激活 p53 信号通路抑制人食管癌细胞的生存 [J]. *中国药科大学学报*, 2016, 47(1):90-94.
- [17] Rodríguez-Vázquez N, García-Fandiño R, Aldegunde MJ, et al. cis-

Platinum Complex Encapsulated in Self-Assembling Cyclic Peptide Dimers [J]. *Org Lett*, 2017, 19(10):2560-2563.

- [18] 罗丽, 于廷和, 白定群, 等. MPPa 光动力疗法诱导人肺癌顺铂耐药细胞凋亡 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2016, 33(4):729-734.
- [19] 黄川, 袁铿. JNK、p38MAPK 信号通路与肿瘤细胞凋亡 [J]. *实验与检验医学*, 2012, 30(5):447-452.
- [20] 赵凯, 谭群亚, 杨翀, 等. 干扰 ERK/p-38 MAPK 信号通路对乳腺癌骨转移的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(2):311.
- [21] Yang T, Shi R, Chang L, et al. Huachansu suppresses human bladder cancer cell growth through the Fas/FasL and TNF-alpha/TNFR1 pathway in vitro and in vivo [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34:21.
- [22] 孟燕, 魏娟, 曹风军. 缺氧对人肝癌 HepG2 细胞凋亡及 p38MAPK 通路的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(23):3700-3703.

收稿日期:2018-07-12 修回日期:2018-09-10 编辑:王国品