

基于 PTEN/mTOR/HIF-1 α 通路的血管素调控氧糖剥夺 PC12 细胞自噬机制研究

陈笑一, 彭南波, 田梦芝, 龙佳欣, 杜可*

湖南中医药大学, 长沙 410208

摘要: 探讨血管素(schisanlactone E, SE)通过磷酸酯酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)/缺氧诱导因子1亚基 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α)通路调节PC12细胞自噬抗氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)的机制研究。本研究构建OGD-PC12细胞体外模型,分为正常组(Con)、OGD组、SE组、PTEN抑制剂(bisperoxovanadium, Bpv)组、Bpv+SE组。通过噻唑蓝染色(MTT)法、流式细胞术、透射电镜法、单丹磺酰尸胺荧光染色(monodansylcadaverine, MDC)法、Western blot法检测相关指标。结果表明,与OGD组相比,SE组细胞存活率提高($P<0.01$),调亡率降低($P<0.01$),SE组和Bpv组细胞自噬小体和溶酶体数量均减少($P<0.01$),自噬小体的荧光强度均减弱($P<0.01$),整合体1(sequestosome1, p62)、磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)/mTOR蛋白表达量均升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$),微管相关蛋白轻链3-II/I(microtubule-associated protein1 light chain 3-II/I, LC3-II/LC3-I)、苜氯素1(recombinant beclin1, Beclin1)、PTEN、HIF-1 α 蛋白表达量均降低($P<0.01$);与Bpv组相比,Bpv+SE组细胞自噬小体及溶酶体数量减少($P<0.01$),自噬小体荧光强度减弱($P<0.01$),p62、p-mTOR/mTOR蛋白表达量升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$),LC3-II/LC3-I、Beclin1、PTEN、HIF-1 α 蛋白表达量降低($P<0.01$)。提示,SE在0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下能够达到抗神经元自噬损伤最佳效果,发挥抑制OGD-PC12细胞自噬损伤的作用;通过加入PTEN抑制,能够上调mTOR,继而下调HIF-1 α ,并且在SE与PTEN抑制剂联合用药后效果更为明显。本研究可为地方天然民族产物SE研发和其抗缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)缺血损伤的分子机制提供一定实验室依据,并对地方民族天然产物服务人类健康、促进地方经济发展累积经验。

关键词: 血管素; 氧糖剥夺; 细胞自噬; PTEN/mTOR/HIF-1 α ; PTEN 抑制剂

中图分类号: R932 文献标识码: A

Mechanism of schisanlactone E in regulating oxygen-glucose deprivation of autophagy in PC12 cells based on the PTEN/mTOR/HIF-1 α pathway

CHEN Xiao-yi, PENG Nan-bo, TIAN Meng-zhi, LONG Jia-xin, DU Ke*

Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: This study aims to investigate the mechanism of the regulation of oxygen-glucose deprivation (OGD) in PC12 cells by schisanlactone E (SE) via phosphatase and tensin homolog (PTEN)/mammalian target of rapamycin (mTOR)/hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) pathway. In this study, OGD-PC12 cells models were constructed *in vitro*, which were divided into control group (Con), OGD group, SE group, bisperoxovanadium (Bpv) group, and Bpv+SE group. Relevant indexes were detected by thiazolyl blue staining (MTT) method, flow cytometry, transmission electron microscopy, monodansylcadaverine (MDC), and western blot. The results indicate that, compared to the OGD group, the SE group exhibited a marked improvement in cell survival rate ($P < 0.01$) and a corresponding decrease in apoptosis rate ($P < 0.01$), both the SE and Bpv groups showed a reduction in the number of autophagosomes and lysosomes ($P < 0.01$), as well as a diminished fluorescence intensity of autophagosomes ($P < 0.01$), there was an elevation in the expression levels of sequestosome1 (p62) and p-mammalian target of rapamycin (p-mTOR)/mTOR proteins ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), the microtubule-associated protein1 light chain 3-II/I (LC3-II/LC3-I), recombinant beclin1(Beclin1), PTEN, and HIF-1 α protein levels were significantly decreased ($P < 0.01$). The Bpv+SE group showed a decrease in the number of autophagosomes and lysosomes compared to the Bpv group ($P < 0.01$), the fluorescence intensity of autophagosomes also decreased ($P < 0.01$), while the expression levels of p62 and p-mTOR/mTOR proteins increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Additionally, the expression levels of LC3-II/LC3-I, Beclin1, PTEN, and HIF-1 α proteins decreased ($P < 0.01$). At a concentration of 0.1 $\mu\text{mol/L}$, SE can achieve the optimal effect in protecting neurons from autophagic injury and exert an inhibitory effect on OGD-PC12 cell autophagic damage. By adding PTEN inhibitor, mTOR can be upregulated, leading to downregulation of HIF-1 α . The combined use of SE and PTEN inhibitor shows more significant effects. This study can provide a certain experimental basis for the research and development of local natural ethnic products SE and its molecular mechanism against ischemic stroke (IS) ischemic injury. It also accumulates experience in serving human health with local ethnic natural products and promoting local economic development.

Key words: schisanlactone E; oxygen-glucose deprivation; cellular autophagy; PTEN/mTOR/HIF-1 α ; PTEN inhibitor

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 是由脑血管血供氧不足引起的神经系统疾病, 世界中风组织最新报道, 每年新增IS病例超过950万例, 几乎60%的新病例发生在70岁以下的人群, 已成为世界范围内的第二大死亡原因^[1,2]。目前治疗方案主要集中在改善脑血循环和神经保护这两方面, 而唯一获准用于治疗溶栓的药物只有组织纤维溶酶原激活剂, 由于其治疗时间窗窄, 禁忌证限制, 并发症危险, 仅少数患者能够获益, 尚无药物能够很好地改善IS

引起的神经损伤^[3,4]。

氧糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 是常用于体外模拟缺氧/缺血的模型^[5]。PC12细胞具有神经元特性, 广泛用于模拟神经元损伤病理过程^[6]。自噬对于维持细胞稳态至关重要, 并且参与IS的发生发展^[7]。通过抑制自噬可缓解OGD诱导的细胞损伤, 从而发挥保护作用^[8]。磷酸酯酶与张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 可以通过抑制丝氨酸/苏氨酸激酶 (protein kinase B, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路来调控自噬^[9]。有研究表明^[10], AKT/mTOR/缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) 通路也可以调控自噬。以上提示, PTEN/mTOR/HIF-1 α 信号通路可能参与了细胞自噬的调控。

土家族医药植物根于土家族地区, 血筒是我国湘北土家族常用的药用植物, 其主要成分包括三萜、木脂素、倍半萜等, 具有活血化瘀、行气补血功效^[11]。据药理学研究, 从血筒中提取出的天然产物具有神经保护等药理活性^[12]。血筒素 (schisanlactone E, SE) (结构见图1) 是从药用部位藤茎中分离提取的天然产物, 其毒性低, 具有一定神经保护作用^[13,14]。但有关SE如何调控影响神经元自噬, 发挥抗OGD损伤保护作用的具体机制尚未见报道。

本研究构建OGD-PC12细胞模型进行体外实验研究, 通过噻唑蓝染色 (MTT) 法、流式细胞术、透射电镜法、单丹磺酰尸胺荧光染色 (monodansylcadaverine, MDC) 法、Western blot法检测相关指标。从而探明SE调控PTEN/mTOR/HIF-1 α 通路影响神经元自噬作用的潜在分子机制, 为SE防治IS机制累积理论依据, 为土家民族药二次研发积累一定的实验室数据。

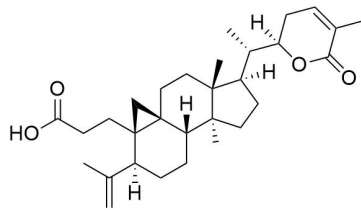


图1 SE 结构式

Fig. 1 Structure diagram of SE

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 (高分化) PC12细胞, 购自中国科学院细胞库。

1.1.2 药品与试剂

SE (纯度>98.0%, 自制^[15,16]); PTEN抑制剂 (bisperoxovanadium, Bpv) (批号: 98953,

上海MCE公司)；胎牛血清(批号: SA240119)、DMEM高糖培养基(批号: WHB824X231)、DMEM无糖培养基(批号: WH1023K241)、青霉素-链霉素溶液(批号: WH2622F081)、胰酶(批号: WHAB23K011)、磷酸盐缓冲液(PBS)(批号: WHB823U281)(武汉普诺赛有限公司)；吐温-20(批号: 223Y011)、蛋白Marker(批号: 20231106)、二甲基亚砷(批号: 401Q0313)、细胞自噬MDC试剂盒(批号: 20220601)(北京索莱宝有限公司)；通用型抗体稀释液(批号: 20221110, 苏州新赛美有限公司)；30%烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺(批号: 23107998, 安徽兰杰柯有限公司)；浓缩胶(批号: 01415/13322)、分离胶(批号: 01413/31222)、上样缓冲液(批号: 01411/13123)(江苏康为世纪公司)；微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3)(批号: 00136661)、苜氯素1(recombinant beclin1, Beclin1)(批号: 100008909)、磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mammalian target of rapamycin, p-mTOR)(批号: 10028462)、mTOR(批号: 10024437)、 β -肌动蛋白(β -actin)(批号: 10025459)(武汉三鹰生物有限公司)；HIF-1 α (批号: GR3368586-26, 英国Abcam公司)；整合体1(sequestosome1, p62)(批号: 3522050721, 武汉爱博泰克有限公司)。

1.1.3 仪器

CCL-170B-8型二氧化碳培养箱(新加坡CelCulture公司)；150i型三气培养箱(美国Thermo公司)；Trans-Biot Turbo System型转膜仪(美国BIO-RAD公司)；JY300E型电泳装置(北京君意电泳设备公司)；7A-23B型电动吸引器(上海鱼跃公司)；MS105DU型电子天平(瑞士METTLER TOLEDO公司)；JC-1型高通量细胞检测系统、PO Box998型微孔板分光光度计(美国BioTek Instruments公司)；K2 Image Cytometer型双荧光细胞分析仪(美国Cellometer公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

提前将恒温水浴箱预热至37 °C，并在洁净操作台备好含完全培养基的EP管和培养瓶，将冻存的细胞于水浴箱迅速解冻，吸移至EP管中离心，弃上清，接种于培养瓶中，轻吹混匀后置于CO₂培养箱(37 °C、5%CO₂、95%湿空气)中培养，次日换液。

1.2.2 OGD模型制备

待细胞生长状况良好，取出细胞，电子显微镜下观察后置于细胞操作台，小心吸弃原有培养基，依据参考文献制备OGD模型^[17]，加入等量的无糖培养基，置于三气培养箱(94%N₂，5%CO₂，1%O₂)中培养6 h。

1.2.3 MTT法检测细胞存活率

待细胞处于对数生长期，细胞计数后，均匀接种于96孔板中。设置正常组（Con）、OGD组、SE（0.001、0.01、0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ ）组，置于CO₂培养箱中培养，待细胞贴壁，吸弃原有培养基，加入对应浓度的SE，培养24 h后，Con组更换完全培养基，其余组更换无糖培养基，分别置于CO₂培养箱和三气培养箱中培养6 h，采用MTT法在490 nm波长处检测吸光度（ A ），并计算细胞存活率（ R ）。

$$R=[(A_S-A_B)/(A_C-A_B)]\times 100\%$$

式中， A_S 、 A_B 和 A_C 分别代表实验组、空白组和正常组的吸光度。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

待细胞处于对数生长期，细胞计数后，均匀接种于6 cm培养皿中，按“1.2.3”项分组培养，取出细胞置于操作台，胰酶消化至EP管，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机1 000 r/min离心3 min，预冷PBS清洗重悬2次，按凋亡试剂盒说明染色后立即上机。

1.2.5 透射电镜法观察细胞自噬小体及溶酶体

待细胞处于对数生长期，细胞计数后，均匀接种于10 cm培养皿中，设置Con组、OGD组、SE组、Bpv组、Bpv+SE组。置于CO₂培养箱中培养24 h后，SE（0.1 $\mu\text{mol/L}$ ）进行干预，Bpv（5 $\mu\text{mol/L}$ ）分别在加SE前30 min加入，各组干预24 h后，Con组更换完全培养基，其余组更换无糖培养基，分别置于CO₂培养箱和三气培养箱中培养6 h后取出细胞，PBS清洗并吸干，胰酶消化，细胞收集至EP管中，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机1 000 r/min离心10 min，弃上清，延壁缓慢加入电镜固定液，置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。隔日取材、固定、脱水、浸泡、包埋、固化、切片、染色、拍片。

1.2.6 MDC荧光染色法观测细胞自噬小体荧光强度

待细胞处于对数生长期，细胞计数后，均匀接种于6孔板中，按“1.2.5”项分组培养，取出细胞，PBS清洗并吸干，加入MDC染液后，PBS清洗3遍，避光上机观测自噬小体荧光强度。

1.2.7 Western blot检测相关蛋白表达情况

待细胞处于对数生长期，细胞计数后，接种于10 cm培养皿中，按“1.2.5”项分组培养，取出细胞置于冰袋上，预冷PBS清洗3遍吸干，加入细胞裂解液，用细胞刮将细胞刮下，收集至EP管中，置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱裂解30 min，离心后取上清，定量，配样，点样，跑胶，转膜，封闭，置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育一抗过夜，隔日孵育二抗，TBST清洗3遍后上机显影。

1.2.8 统计学分析

采用Graphpad prism和SPSS软件分析并作图。数据用以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) 表示, 采用成组 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞存活率

OGD组的细胞存活率与Con组相比明显降低 ($P < 0.01$) ; SE 0.001、0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 的细胞存活率与OGD组相比均有明显的提高 ($P < 0.01$) , 而SE 10 $\mu\text{mol/L}$ 的细胞存活率无明显差别 ($P > 0.05$) , 结果见图2。

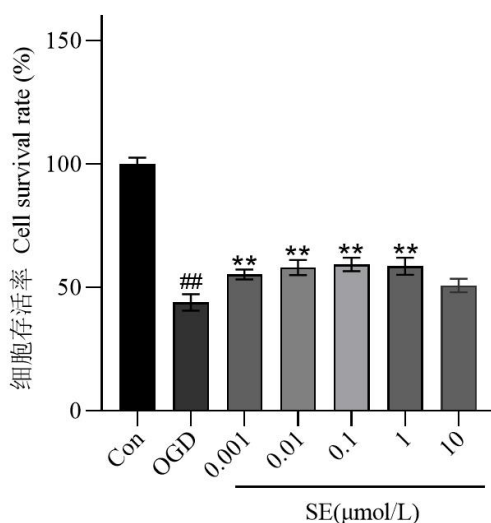


图2 不同浓度SE对OGD-PC12细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of different concentrations of SE on the survival rate of OGD-PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注: 与Con组相比, ## $P < 0.01$; 与OGD组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下同。

Note: Compared with Con group, ## $P < 0.01$; Compared with OGD group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the same below.

2.2 细胞凋亡率

Con组的细胞凋亡率极少; OGD组的细胞凋亡率与Con组相比明显提高 ($P < 0.01$) ; SE 0.001、0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞凋亡率与OGD组相比均有明显的降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) , 而SE 10 $\mu\text{mol/L}$ 的细胞凋亡率并无明显差别 ($P > 0.05$) , 结果见图3。

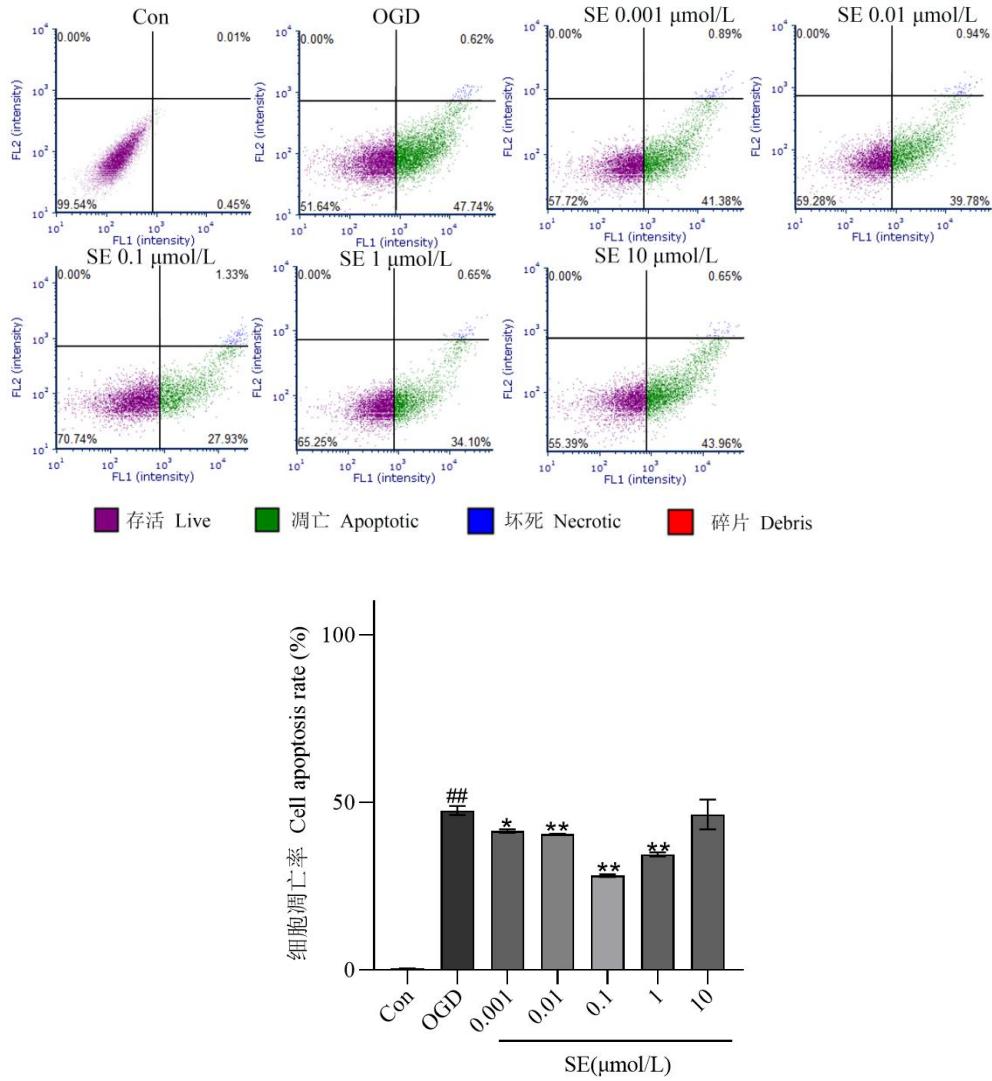


图3 不同浓度SE对OGD-PC12细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of different concentrations of SE on apoptosis rate of OGD-PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.3 自噬小体与溶酶体个数

Con组几乎无自噬小体、自噬溶酶体和自噬空泡；OGD组的自噬小体、自噬溶酶体和自噬空泡数量与Con组相比明显增加 ($P < 0.01$)；SE组和Bpv组的自噬小体、自噬溶酶体和自噬空泡数量与OGD组相比均减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；Bpv+SE组的自噬小体、自噬溶酶体和自噬空泡数量与Bpv组相比均减少 ($P < 0.05$)，结果见图4。

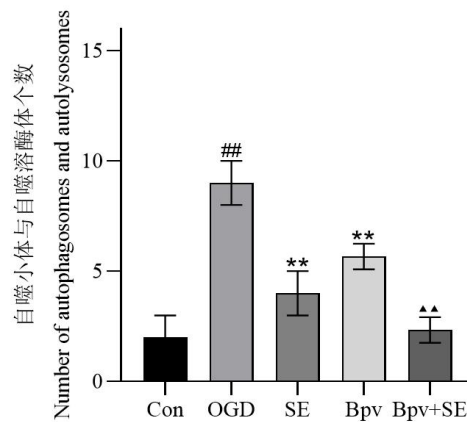
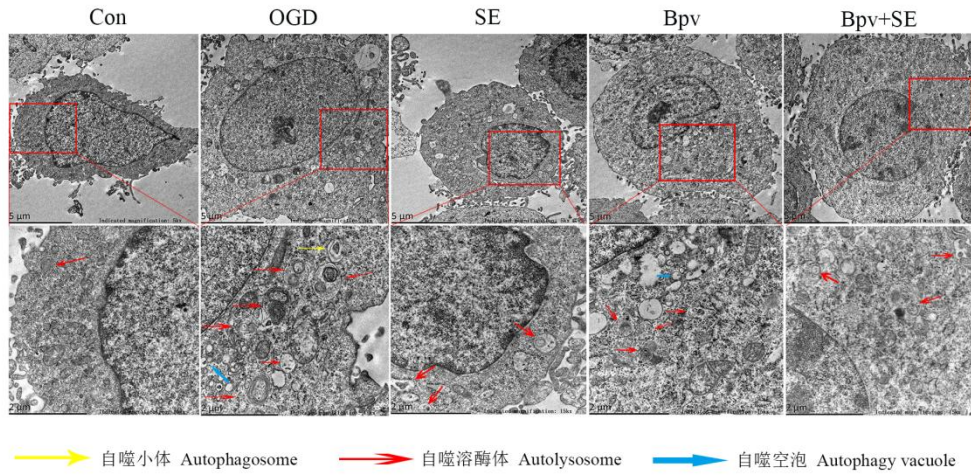


图 4 SE 和 Bpv 对 OGD-PC12 细胞中自噬小体与自噬溶酶体数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of SE and Bpv on the number of autophagosomes and autolysosomes in OGD-PC12 cells

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注：与 Bpv 组相比，▲ $P < 0.05$ ，▲▲ $P < 0.01$ ，下同。

Note: Compared with Bpv group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$, the same below.

2.4 细胞自噬小体荧光强度

Con组的绿色荧光斑点极少；OGD组的绿色荧光斑数量及强度与Con组相比明显增加 ($P < 0.01$)；SE组和Bpv组的绿色荧光斑点数量及强度与OGD组相比有所减少 ($P < 0.01$)；Bpv+SE组的绿色荧光斑数量及强度与Bpv组相比明显减少 ($P < 0.01$)，结果见图5和表1。

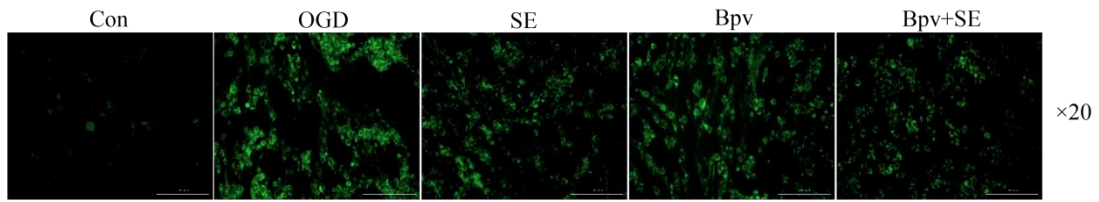


图 5 SE 和 Bpv 对 OGD-PC12 细胞中自噬小体荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of SE and Bpv on the fluorescence intensity of autophagosomes in OGD-PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 1 OGD-PC12 细胞中自噬小体荧光强度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 The fluorescence intensity of autophagosomes in OGD-PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	荧光强度
Group	Fluorescence intensity (FIU)
Con	12.28±1.03
OGD	122.66±0.79 ^{##}
SE	73.96±0.62 ^{**}
Bpv	106.70±0.77 ^{**}
Bpv+SE	76.10±0.45 ^{▲▲}

2.5 细胞自噬相关蛋白表达比较

OGD组细胞中p62、p-mTOR/mTOR蛋白表达量与Con组相比明显降低 ($P < 0.01$), 而微管相关蛋白轻链3-II/I (microtubule-associated protein1 light chain 3-II/I, LC3-II/LC3-I)、Beclin1、PTEN、HIF-1 α 蛋白表达量则升高 ($P < 0.01$); SE组和Bpv组细胞中p62、p-mTOR/mTOR蛋白的表达量与OGD组相比明显升高 ($P < 0.01$), 而LC3-II/LC3-I、Beclin1、PTEN、HIF-1 α 蛋白表达量则降低 ($P < 0.01$); Bpv+SE组细胞中p62、p-mTOR/mTOR蛋白的表达量与Bpv组相比明显升高 ($P < 0.01$), 而LC3-II/LC3-I、Beclin1、PTEN、HIF-1 α 蛋白表达量则降低 ($P < 0.01$), 结果见图6。

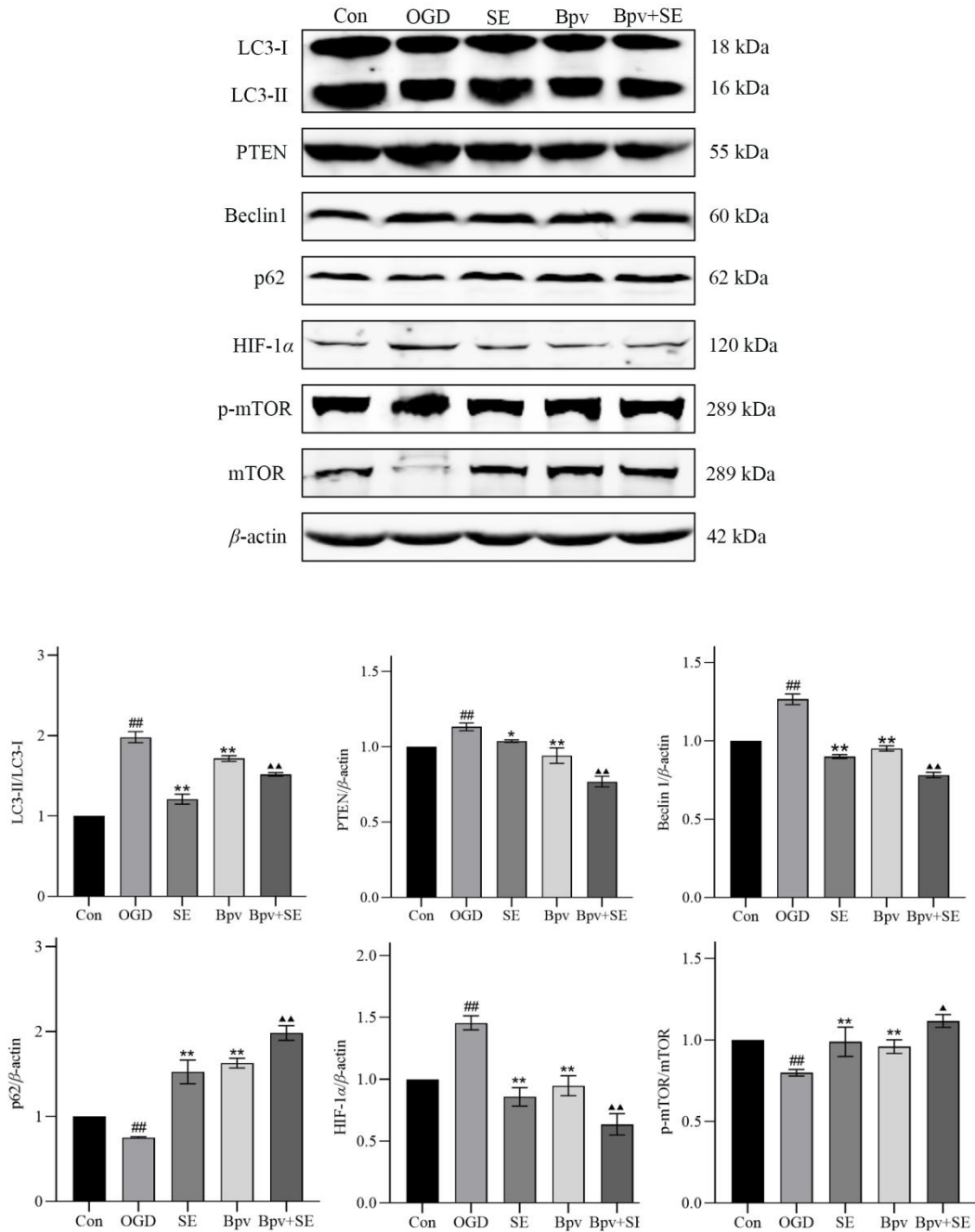


图 6 SE 和 Bpv 对 OGD-PC12 细胞自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of SE and Bpv on autophagy-related protein expression in OGD-PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论与结论

IS在世界范围内造成了巨大的健康负担，其患病率和死亡率很高^[18]。IS最终病理变化是神经元死亡，神经元是人体中最易缺血的细胞，在完全缺氧后几分钟内就会发生不可逆的细胞损伤和细胞死亡^[19]。自噬是降解功能失调的细胞器和蛋白质聚集体的主要细胞途径，在神经元中尤其重要^[20]。研究表明^[21]，适当的自噬可能是神经退行性疾病中一种很好的神经保护策略，而自噬水平不足或过量会促进细胞死亡。

PTEN是染色体10号上缺失的磷酸酶与张力蛋白同源物基因,具有磷酸酯酶的活性,在中枢神经系统中广泛表达^[9],且与IS密切相关^[22]。PTEN是mTOR的上游负调节因子,已被证明参与自噬的发生发展过程^[23]。mTOR是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,在调节自噬中起着至关重要的作用。mTOR由mTORC1和mTORC2组成,mTORC1是自噬诱导的关键蛋白质复合物^[24]。有研究表明,通过调控mTOR通路可抑制OGD诱导的细胞自噬^[25]。细胞自噬的功能转化与mTOR和HIF-1 α 通路之间密切相关^[26]。HIF-1 α 是氧稳态的敏感调节剂,在缺氧/缺血后迅速诱导其表达,它在IS的病理生理学中发挥着广泛的作用^[27]。研究表明^[28],HIF-1 α 介导的自噬参与了缺氧预处理诱导的神经保护作用。以上提示,PTEN/mTOR/HIF-1 α 信号通路可能参与了细胞自噬的调控。

土家乃国家之重医,国学亦华民之良法。血筒是我国湘北土家药,药用部位为南五味子 *Kadsura heteroclita*(Roxb) Craib 藤茎,在3 kg藤茎粉末中可提取分离出1 080 mg的SE^[16],分子式为C₃₀H₄₄O₄,分子量为468.67,具有神经保护作用,目前国内对SE的研究大多集中在抗炎方面,其在IS中自噬方面的研究较少、具体作用通路及靶点研究尚不明确。

Bpv是一种有效的PTEN抑制剂。研究报道,神经元损伤后自噬被激活,PTEN抑制剂可以抑制自噬,从而促进损伤神经元的修复^[29]。PTEN抑制剂能够抑制PTEN和激活磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/AKT/mTOR信号通路,从而减少体外原发性脊髓神经元损伤模型中的细胞死亡,发挥神经元保护的作用^[30]。同样也有研究表明,PTEN/mTOR对于控制缺血性脑损伤后的神经元细胞死亡至关重要,在大鼠大脑中动脉栓塞模型中PTEN抑制剂可以通过激活mTOR通路减少缺血性脑损伤诱导的神经元细胞的死亡,显著减少梗死体积^[22]。

本研究结果显示,PC12细胞与OGD组相比,在SE(0.001、0.01、0.1、1 μ mol/L)的干预下,细胞存活率提高、凋亡率降低,并且在0.1 μ mol/L浓度下能够发挥抗神经元自噬损伤最佳效果。OGD组与Con组相比,自噬小体及溶酶体增多,自噬荧光增强,LC3-II/LC3-I、Beclin1、PTEN、HIF-1 α 蛋白表达量增加,p62、p-mTOR/mTOR蛋白表达量减少。由此可见,PC12细胞在OGD后自噬增强、PTEN蛋白表达上升。通过加入PTEN抑制剂进一步验证PTEN在OGD-PC12细胞中的作用及其与细胞自噬关系。结果表明,抑制PTEN后能够减少OGD-PC12细胞自噬,降低LC3-II/LC3-I、Beclin1、HIF-1 α 蛋白表达量,增加p62、p-mTOR/mTOR蛋白表达量。说明通过抑制PTEN,继而上调mTOR,下调HIF-1 α 。SE药物干预后,与PTEN抑制剂联合用药效果更为明显。

综上所述,IS最终病理变化将导致神经元细胞缺氧缺血死亡,而自噬在IS后的神经保护

中发挥非常重要作用，通过抑制自噬可缓解OGD诱导的细胞损伤。而自噬在IS中需要启动一系列信号分子通路来完成，大量研究提示自噬与IS的发生、发展密切相关，但具体机制尚不明确。本研究天然产物SE可通过PTEN/mTOR/HIF-1 α 信号通路抗OGD细胞自噬损伤，发挥细胞保护作用。未来可为挖掘地方天然民族药物，展开IS防治有效天然产物探究及分子机制的新篇章，随着研究的深入，自噬在IS中的作用机制将逐渐明晰，这对IS的临床治疗具有重要意义。

参考文献

- 1 Zhang L,Bai XY,Sun KY,et al.A new perspective in the treatment of ischemic stroke:ferroptosis[J].Neurochem Res,2024,49:815-833.
- 2 Feigin VL,Brainin M,Norrving B,et al.World Stroke Organization(WSO):global stroke fact sheet 2022[J].Int J Stroke,2022,17:18-29.
- 3 Campbell BCV,Khatri P.Stroke[J].Lancet,2020,396:129-142.
- 4 Paul S,Candelario-Jalil E.Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke:an overview of clinical and preclinical studies[J].Exp Neurol,2021,335:113518.
- 5 Jiang S,Xu Y.Annexin a2 upregulation protects human retinal endothelial cells from oxygen-glucose deprivation injury by activating autophagy[J].Exp Ther Med,2019,18:2901-2908.
- 6 Xie D,Deng T,Zhai Z,et al.The cellular model for Alzheimer's disease research:pc12 cells[J].Front Mol Neurosci,2022,15:1016559.
- 7 Peng Z,Ji D,Qiao L,et al.Autophagy inhibition by ATG3 knockdown remits oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury and inflammation in brain microvascular endothelial cells[J].Neurochem Res,2021,46:3200-3212.
- 8 Liu D,Tang W,Zhang H,et al.Icariin protects rabbit BMSCs against OGD-induced apoptosis by inhibiting ERs-mediated autophagy via MAPK signaling pathway[J].Life Sci,2020,253:117730.
- 9 Tao Z,Feng C,Mao C,et al.Mir-4465 directly targets PTEN to inhibit AKT/mTOR pathway-mediated autophagy[J].Cell Stress Chaperones,2019,24:105-113.
- 10 Wang Y,Mang X,Li D,et al.Piezoelectric cold atmospheric plasma induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through blocking glycolysis and AKT/mTOR/HIF-1 α pathway[J].Free Radic Biol Med,2023,208:134-152.
- 11 Yu HH.Effect and mechanism of Tujia drug Xuotong against rheumatoid arthritis[D].Hunan:Hunan University of Chinese Medicine(湖南中医药大学),2017.

- 12 Cao L,Shehla N,Li B,et al.Schinortriterpenoids from Tujia ethnomedicine Xuetong-the stems of *Kadsura heteroclita*[J].Phytochemistry,2020,169:112178.
- 13 Yu H,Fan J,Shehla N,et al.Biomimetic hybrid membrane-coated Xuetongsu assisted withlaser irradiation for efficient rheumatoid arthritis therapy[J].ACS Nano,2022,16:502-521.
- 14 Su W.Study on chemical constituents and biological activities of chloroform parts of Xuetong[D].Hunan:Hunan University of Chinese Medicine(湖南中医药大学),2016.
- 15 Wang W,Liu JZ,Ma XC,et al.Three new cyclolanostane triterpenoids from the ethanol extract of the stems of *Kadsura heteroclita*[J].Helv Chim Acta,2006,89:1888-1893.
- 16 Wang W,Liu J,Han J,et al.New triterpenoids from *Kadsura heteroclita* and their cytotoxic activity[J].Planta Med,2006,72:450-457.
- 17 Tian MZ,Long JX,Chen XY,et al.Effect of β -nicotinamide mononucleotide on autophagy in oxyglucose-deprived PC12 cells[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2024,36:260-267.
- 18 Zong P,Lin Q,Feng J,et al.A systemic review of the integral role of TRPM2 in ischemic stroke:from upstream risk factors to ultimate neuronal death[J].Cells,2022,11:491.
- 19 Lipton P.Ischemic cell death in brain neurons[J].Physiol Rev,1999,79:1431-1568.
- 20 Stavoe AKH,Holzbaur ELF.Autophagy in neurons[J].Annu Rev Cell Dev Biol,2019,35:477-500.
- 21 Chen W,Sun Y,Liu K,et al.Autophagy:a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia[J].Neural Regen Res,2014,9:1210-1216.
- 22 Shi GD,OuYang YP,et al.PTEN deletion prevents ischemic brain injury by activating the mTOR signaling pathway[J].Biochem Bioph Res Co,2011,404:941-945.
- 23 Xu W,Zhang M,Li Y,et al.YAP manipulates proliferation via PTEN/AKT/mTOR-mediated autophagy in lung adenocarcinomas[J].Cancer Cell Int,2021,21:30.
- 24 Deleyto-Seldas N,Efeyan A.The mTOR-autophagy axis and the control of metabolism[J].Front Cell Dev Biol,2021,9:655731.
- 25 Yu X,Wu H,Han L,et al.Wenyang-Yiqi Granule inhibits OGD-induced autophagy by activating mTOR pathway[J].Faseb J,2019,33:471.28.
- 26 Chen G,Zhang W,Li YP,et al.Hypoxia-induced autophagy in endothelial cells:a double-edged sword in the progression of infantile haemangioma?[J].Cardiovasc Res,2013,98:437-448.
- 27 He Q,Ma Y,Liu J,et al.Biological functions and regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor-1 α in ischemic stroke[J].Front Immunol,2021,12:801985.

- 28 Lu N,Li X,Tan R,et al.HIF-1 α /Beclin1-mediated autophagy is involved in neuroprotection induced by hypoxic preconditioning[J].J Mol Neurosci,2018,66:238-250.
- 29 Yu H,Shao J,Huang R,et al.Targeting PTEN to regulate autophagy and promote the repair of injured neurons[J].Brain Res Bull,2020,165:161-168.
- 30 Walker CL,Wu X,Liu NK,et al.Bispermoxovanadium mediates neuronal protection through inhibition of PTEN and activation of PI3K/AKT-mTOR signaling after traumatic spinal injuries[J].J Neurotraum,2019,36:2676-2687.

收稿日期: 2024-06-26

接受日期:

项目基金: 湖南省自然科学基金项目(2020JJ9050); 湖南省普通高等学校教学改革研究项目(HNJG-2022-0134); 研究生创新创业训练计划(CX20230828); 大学生创新创业训练计划(S202310541068)

*通信作者 E-mail: DKKTZTG@163.com