

[文章编号] 1671-587X(2024)05-1297-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240513

## 肌肽通过 AMPK/mTOR 信号通路抑制自噬对氧糖剥夺/复糖 复氧诱导星形胶质细胞损伤的保护作用

王宇彤, 冉睿黎, 边疆, 姜晓涵, 宋俊秋, 王德威, 杨菁  
(锦州医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 辽宁 锦州 121001)

**[摘要]** **目的:** 探讨肌肽 (CAR) 对氧糖剥夺/再灌注 (OGD/R) 诱导的星形胶质细胞 (AS) 损伤的改善作用, 并阐明其可能的作用机制。**方法:** 将 AS 分为对照组、模型组 (OGD/R 组)、OGD/R+CAR 组 (CAR 组) 和 OGD/R+CAR+腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 激活剂 AICAR 组 (CAR+AICAR 组)。MTT 法和绿菁染色检测各组 AS 存活率和绿菁染色阳性细胞率, Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测各组 AS 凋亡率, Western blotting 法检测各组 AS 中 AMPK、磷酸化 AMPK (p-AMPK)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、磷酸化 mTOR (p-mTOR)、微管相关蛋白轻链 3B (LC3B)、Beclin-1 和 P62 蛋白表达水平, 免疫荧光染色法观察各组 AS 中 LC3B 阳性荧光强度。**结果:** 与对照组比较, OGD/R 组 AS 存活率和绿菁染色阳性细胞率明显降低 ( $P < 0.01$ ), AS 凋亡率明显升高 ( $P < 0.01$ ), AS 中 p-AMPK/AMPK 和 LC3B II/LC3B I 比值及 Beclin-1 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), p-mTOR/mTOR 比值及 P62 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。与 OGD/R 组比较, CAR 组 AS 存活率和绿菁染色阳性细胞率明显升高 ( $P < 0.01$ ), AS 凋亡率明显降低 ( $P < 0.01$ ), AS 中 p-AMPK/AMPK 和 LC3B II/LC3B I 比值及 Beclin-1 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), p-mTOR/mTOR 比值和 p62 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ )。与 CAR 组比较, CAR+AICAR 组 AS 存活率和绿菁染色阳性细胞率明显降低 ( $P < 0.01$ ), AS 凋亡率升高 ( $P < 0.01$ )、AS 中 p-AMPK/AMPK 和 LC3B II/LC3B I 比值及 Beclin-1 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), p-mTOR/mTOR 比值和 P62 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。LC3B 免疫荧光染色结果与 Western blotting 法检测结果趋势一致。**结论:** CAR 对 OGD/R 所致 AS 损伤具有保护作用, 其作用机制可能与抑制 AMPK/mTOR 信号途径, 进而抑制细胞自噬有关。

**[关键词]** 肌肽; 自噬; 星形胶质细胞; 腺苷酸活化蛋白激酶; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

**[中图分类号]** R963;R742 **[文献标志码]** A

## Protective effect of carnosine against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced astrocyte injury through inhibition of autophagy by AMPK/mTOR signaling pathway

WANG Yutong, RAN Ruili, BIAN Jiang, JIANG Xiaohan, SONG Junqiu, WANG Dewei, YANG Jing  
(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical  
University, Jinzhou 121001, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the protective effect of carnosine (CAR) against oxygen-glucose

**[收稿日期]** 2023-09-23

**[基金项目]** 辽宁省教育厅面上项目 (2021LJKZ0823)

**[作者简介]** 王宇彤 (1996-), 女, 辽宁省沈阳市人, 在读硕士研究生, 主要从事生化药物方面的研究。

**[通信作者]** 杨菁, 教授, 硕士研究生导师 (E-mail: yangjing@jzmu.edu.cn)

deprivation/reoxygenation(OGD/R)-induced astrocyte(AS) injury, and to clarify its possible mechanism.

**Methods:** The AS were divided into control group, model group (OGD/R group), OGD/R+CAR group (CAR group), and OGD/R+CAR+AMP-activated protein kinase (AMPK) activator AICAR group (CAR+AICAR group). MTT assay and green cyanine staining method were used to detect the survival rates and green cyanine staining positive rates of the AS in various groups; Annexin V-FITC/PI method and flow cytometry were used to detect the apoptotic rates of the AS in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of AMPK, phosphorylated AMPK (p-AMPK), mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphorylated mTOR (p-mTOR), microtubule-associated protein light chain 3B(LC3B), Beclin-1, and P62 proteins in the AS in various groups; immunofluorescence staining was used to observe the LC3B positive fluorescence intensities in the AS in various groups.

**Results:** Compared with control group, the survival rate and green cyanine staining positive rate of the AS in OGD/R group were decreased ( $P<0.01$ ), the apoptotic rate of the AS was increased ( $P<0.01$ ), the ratios of p-AMPK/AMPK and LC3B II/LC3B I and the expression level of Beclin-1 protein were increased ( $P<0.01$ ), and the ratio of p-mTOR/mTOR and the expression level of P62 protein were decreased ( $P<0.01$ ). Compared with OGD/R group, the survival rate and green cyanine staining positive rate of the AS in CAR group were increased ( $P<0.01$ ), the apoptotic rate of the AS was decreased ( $P<0.01$ ), the ratios of p-AMPK/AMPK and LC3B II/LC3B I and the expression level of Beclin-1 protein were decreased ( $P<0.01$ ), and the ratio of p-mTOR/mTOR and the expression level of P62 protein were increased ( $P<0.01$ ). Compared with CAR group, the survival rate and green cyanine staining positive rate of the AS in CAR+AICAR group were decreased ( $P<0.01$ ), the apoptotic rate of the AS was increased ( $P<0.01$ ), the ratios of p-AMPK/AMPK and LC3B II/LC3B I and the expression level of Beclin-1 protein were increased ( $P<0.01$ ), and the ratio of p-mTOR/mTOR and the expression level of P62 protein were decreased ( $P<0.01$ ). The LC3B immunofluorescence staining results were consistent with the Western blotting results. **Conclusion:** CAR has the protective effect on injury of the AS induced by OGD/R, and its molecular mechanism may be related to the inhibition of the AMPK/mTOR signaling pathway, thereby inhibiting autophagy.

**KEYWORDS** Carnosine; Autophagy; Astrocyte; Adenosine monophosphate activated protein kinase; Mammalian target of rapamycin

肌肽(carnosine, CAR)是一种由 $\beta$ -丙氨酸和L-组氨酸组成的内源性二肽,在动物大脑和肌肉等组织中广泛存在,具有抗氧化、抗糖基化、金属螯合和pH缓冲等作用<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2-4]</sup>显示:CAR对脑缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, IRI)具有保护作用。星形胶质细胞(astrocyte, AS)是中枢神经系统含量最丰富的胶质细胞,在正常生理活动和疾病状态中发挥调节作用。自噬是一种进化上保守的细胞内溶酶体降解途径,主要对细胞质中聚集的大分子和受损细胞器进行降解,通过氨基酸和葡萄糖的再循环保持能量平衡。AS自噬参与了脑IRI的发生发展过程,其调控机制涉及多个复杂的信号传导途径,故调节AS的自噬是治疗脑IRI有效策略之一<sup>[5-8]</sup>。CAR可通过对自噬调节来减轻糖尿病脑病和肌肉组织的IRI<sup>[9-10]</sup>。深入研究CAR与中枢神经系统疾病的内在关系可以为CAR

的开发利用提供实验依据。本实验采用体外培养AS进行氧糖剥夺/再灌注(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)模拟脑IRI,从细胞自噬角度探讨CAR在减轻OGD/R诱导的AS损伤中的作用。

## 1 材料与方 法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** 大鼠脑AS购自上海中科院细胞库。CAR由苏州富士莱医药股份有限公司惠赠,批号:2104282,纯度 $\geq 99.9\%$ 。5-氨基咪唑-4-羧基酰胺核糖核苷(5-amin-omimidazole-4-carboxamide 1- $\beta$ -D-ribofuranoside, AICAR)购自美国MedChemExpress公司,腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)、磷酸化AMPK(phosphorylated, p-AMPK)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian

target of rapamycin, mTOR)、磷酸化 mTOR (phosphorylated-mTOR, p-mTOR)、Beclin-1、微管相关蛋白轻链 3B (microtubule-associated protein light chain 3B, LC3B)、P62 和  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 一抗购自武汉 ABclonal 生物科技有限公司, 杜氏改良 eagle 培养基/F12 营养混合液 (Dulbecco's modified eagle's medium/nutrient mixture F-12, DMEM/F12) 无糖基础培养液、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 胰酶细胞消化液 (0.25% 胰酶)、青-链霉素溶液、噻唑蓝溴化四唑 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、Western blotting 及 IP 细胞裂解液、苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 和特超敏增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。CO<sub>2</sub> 培养箱和三气低氧培养箱购自中国赛默飞世尔科技有限公司, 倒置生物显微镜购自美国 ZEISS 公司, 流式细胞仪购自美国 BD 公司, 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司, 凝胶成像仪购自上海天能科技有限公司。

**1.2 细胞培养、OGD/R 处理和细胞分组** 将大鼠脑 AS 置于含 10% 的胎牛血清和青霉素-链霉素 DMEM/F12 完全培养液中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。基础培养液饥饿 12 h 后将细胞随机分为对照组、模型组 (OGD/R 组)、OGD/R+CAR 组 (CAR 组) 和 OGD/R+CAR+AICAR 组 (CAR+AICAR 组), 在血清饥饿结束前 2 h CAR 组培养液中加入终浓度为 9.0 mmol·L<sup>-1</sup> CAR; 在血清饥饿结束前 2 h, CAR+AICAR 组培养液中加入终浓度为 9.0 mmol·L<sup>-1</sup> CAR 和 1 mmol·L<sup>-1</sup> AICAR<sup>[11]</sup>。血清饥饿结束后, OGD/R 组、CAR 组和 CAR+AICAR 组分别加入无血清无糖培养液, 并保持培养液中 CAR 和 AICAR 浓度与前期相同, 立刻置于气体环境为 95% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 温度为 37 °C 三气低氧培养箱中培养 6 h 后, 各组更换为含有相应 CAR 和 AICAR 的完全培养液常规培养 24 h。对照组加入完全培养液培养 30 h。

**1.3 MTT 法检测各组 AS 存活率** 将 AS 以每孔 5×10<sup>3</sup> 个的密度接种于 96 孔细胞培养板, 将其置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 24 h 后按照“1.2”中方法处理细胞, 另设不接种细胞只加培养液的空白组, 其他实验步骤与其余组保持一致, 每组设定 3 复

孔。实验结束后每孔加入 5 g·L<sup>-1</sup> MTT 溶液 20  $\mu$ L, 将其置入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4 h, 随后吸弃 MTT 溶液每孔加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砜, 在多功能酶标仪上自动震板后检测 490 nm 处吸光度 (A) 值, 每组设置至少 3 个复孔, 实验重复 3 次, 最终结果取其平均值。细胞存活率 = (实验组 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值) × 100%。

**1.4 绿菁染色检测各组绿菁染色阳性细胞率** 将细胞接种于 12 孔细胞培养板中, 按照“1.2”中方法处理细胞后, 吸弃原溶液, 将绿菁染液按照 1:1 000 比例采用完全培养液稀释, 每孔加入 500  $\mu$ L 稀释后的绿菁染液, 之后将其置入 37 °C 培养箱中避光孵育 10 min, 采用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 将 Hoechst 33342 按照 1:1 000 比例稀释后, 每孔加入 500  $\mu$ L 稀释后染液, 置于 37 °C 培养箱中避光孵育 10 min, 采用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 置于荧光显微镜下避光观察并进行拍照。绿菁只染色死亡细胞核, 死亡细胞在荧光显微镜下观察呈绿色荧光, 正常细胞则不被染色, Hoechst 33342 可以穿透细胞膜染细胞核, 镜下观察呈蓝色荧光, 用来表示细胞总数。随机选取 6 处不同视野下细胞计数细胞死亡数和总细胞数, 计算绿菁染色阳性细胞率。绿菁染色阳性细胞率 = (Hoechst 33342 细胞数 - 绿菁染色阳性细胞数) / Hoechst 33342 细胞数 × 100%。

**1.5 流式细胞术检测各组 AS 凋亡率** 取 AS, 以密度为每孔 2×10<sup>5</sup> 个接种于 6 孔细胞培养板内, 按照“1.2”中方法处理后, 将 6 孔细胞培养板中的培养液收集到离心管中, 细胞消化后, 采用收集的原培养液终止消化, 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清, PBS 缓冲液冲悬细胞后, 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 加入 1×结合缓冲液, 调节细胞浓度为 (1~5) × 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>, 取 100  $\mu$ L 细胞溶液于流式管中加 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 室温避光孵育 5 min, 加入 10  $\mu$ L PI (20  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>) 和 400  $\mu$ L PBS 缓冲液, 立刻上机检测。细胞凋亡率 = (早期细胞凋亡数 + 晚期细胞凋亡数) / 细胞总数 × 100%。

**1.6 Western blotting 法检测各组 AS 中 AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、Beclin-1、LC3B 和 P62 蛋白表达水平** 按照“1.2”中方法处理细胞后加入裂解液 (浓度比例为 PMSF:RIPA=1:100) 在冰上进行裂解, 收集各组蛋白样本, 采用 Lowry 法检测细胞蛋白浓度, 采用常规 Western blotting 法检测蛋白表达水平。抗体 AMPK、p-AMPK、

mTOR、p-mTOR、Beclin-1、LC3B和P62的稀释倍数分别为1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:500和1:1 000,以 $\beta$ -actin蛋白作为内参,采用凝胶成像仪显影,采用Image J软件进行灰度分析,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/ $\beta$ -actin蛋白条带灰度值。

**1.7 免疫荧光染色检测各组AS中LC3B阳性荧光强度** 取对数生长期的AS接种于24孔细胞培养板,细胞密度为每孔 $1 \times 10^4$ 个,按照“1.2”中方法处理细胞后,吸弃原培养液,PBS缓冲液洗涤3次,每次5 min。每孔加入4%多聚甲醛于室温下固定半小时,PBS缓冲液洗涤3次,每次5 min,加入0.5% Triton X-100通透液,置于冰上通透15 min,吸弃通透液,加入3% BSA封闭液,于室温下封闭半小时,吸弃封闭液,加入由封闭液稀释的一抗LC3B(1:100),置于4℃环境中过夜,封闭液洗涤4次,每次5 min,加入封闭液稀释的Cy3 IgG 抗兔二抗(1:50),室温下避光孵育3 h,采用封闭液洗涤3次,每次5 min,在室温条件下Hoechst 33342染核10 min,PBS缓冲液洗涤3次,每次5 min,在免疫荧光显微镜下观察染色效果并拍照。采用Image J图像分析软件分析LC3B阳性荧光强度。

**1.8 统计学分析** 采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。各组细胞存活率,AS绿菁染色阳性细胞率,AS凋亡率,AS中mTOR、AMPK、Beclin-1、P62和LC3B蛋白表达水平,LC3B阳性荧光强度均呈正态分布且方差齐性,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用最小显著性差异法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组AS存活率和绿菁染色阳性细胞率

MTT结果显示:与对照组比较,OGD/R组AS存活率降低( $P < 0.01$ );与OGD/R组比较,CAR组AS存活率升高( $P < 0.01$ );与CAR组比较,加入AMPK激活剂AICAR后的CAR+AICAR组AS存活率降低( $P < 0.01$ ) (表1)。绿菁染色法检测结果显示:与对照组比较,OGD/R组绿菁染色阳性细胞率降低( $P < 0.01$ ),细胞形态发生明显改变,提示OGD/R导致细胞明显损伤。与OGD/R组比较,CAR组绿菁染色阳性细胞率明显升高( $P < 0.01$ ),

细胞形态损伤程度改善;与CAR组比较,CAR+AICAR组绿菁染色阳性细胞率降低( $P < 0.01$ ),细胞形态受损加重。见表1和图1。

表1 AS存活率和各组绿菁染色阳性细胞率

Tab. 1 Survival rates and green cyanine staining positive rates of AS in various groups detected by MTT assay

( $n=9, \bar{x} \pm s, \eta/\%$ )

Group	Survival rate of AS	Malachite green positive rate of AS
Control	100.00 $\pm$ 4.81	99.45 $\pm$ 0.25
OGD/R	46.03 $\pm$ 1.97*	80.25 $\pm$ 1.19*
CAR	85.20 $\pm$ 5.04 <sup>△</sup>	95.82 $\pm$ 1.73 <sup>△</sup>
CAR+AICAR	55.99 $\pm$ 2.03 <sup>#</sup>	88.11 $\pm$ 1.38 <sup>#</sup>

\* $P < 0.01$  compared with control group; <sup>△</sup> $P < 0.01$  compared with OGD/R group; <sup>#</sup> $P < 0.01$  compared with CAR group.

**2.2 各组AS凋亡率** Annexin V-FITC PI双标记流式细胞仪检测结果显示:与对照组比较,OGD/R组AS凋亡率明显升高( $P < 0.01$ );与OGD/R组比较,CAR组AS凋亡率明显降低( $P < 0.01$ );与CAR组比较,CAR+AICAR组AS凋亡率明显升高( $P < 0.01$ )。见图2。

### 2.3 各组AS中AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、LC3B、P62和Beclin-1蛋白表达水平

与对照组比较,OGD/R组AS中p-AMPK/AMPK比值、LC3B II/LC3B I比值和Beclin-1蛋白表达水平明显升高( $P < 0.01$ ),p-mTOR/mTOR比值和P62蛋白表达水平明显降低( $P < 0.01$ );与OGD/R组比较,CAR组AS中p-AMPK/AMPK比值、LC3B II/LC3B I比值和Beclin-1蛋白表达水平明显降低( $P < 0.01$ ),p-mTOR/mTOR比值和P62蛋白表达水平明显升高( $P < 0.01$ );与CAR组比较,CAR+AICAR组AS中p-AMPK/AMPK比值、LC3B II/LC3B I比值和Beclin-1蛋白表达水平明显升高( $P < 0.01$ ),p-mTOR/mTOR比值和P62蛋白表达水平明显降低( $P < 0.01$ )。见图3。

**2.4 各组AS中LC3B阳性荧光强度** 与对照组(1.00 $\pm$ 0.08)比较,OGD/R组细胞质中荧光颗粒聚集,LC3B阳性荧光强度(3.10 $\pm$ 0.08)明显升高( $P < 0.01$ );与OGD/R组比较,CAR组AS细胞质中LC3B荧光颗粒聚集减少,LC3B阳性荧光强度(1.44 $\pm$ 0.10)明显降低( $P < 0.01$ );与

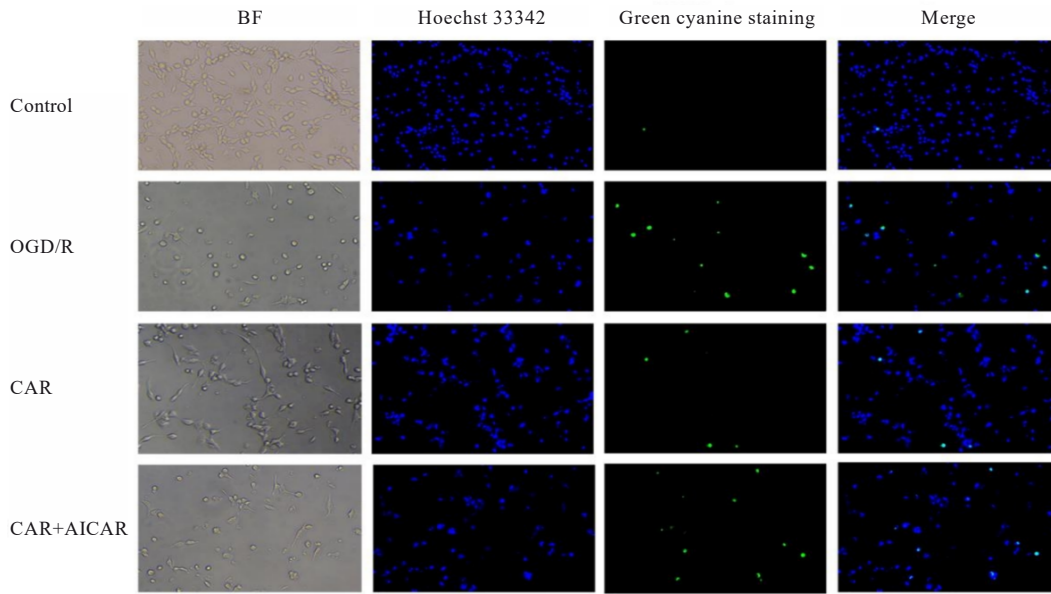
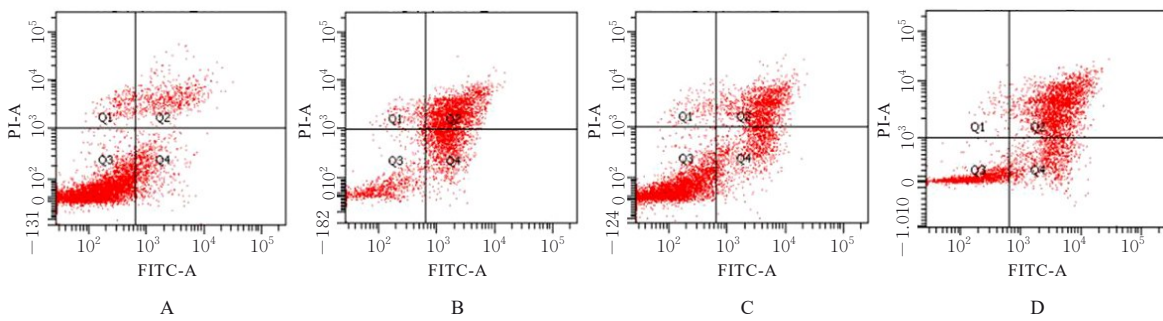


图1 绿菁染色法观察各组 AS 存活情况(×400)

Fig. 1 Survival of AS in various groups observed by green cyanine staining (×400)



A:Control group; B:OGD/R group; C:CAR group; D:CAR+AICAR group.

图2 流式细胞术检测各组 AS 凋亡率

Fig. 2 Apoptotic rates of AS in various groups detected by flow cytometry

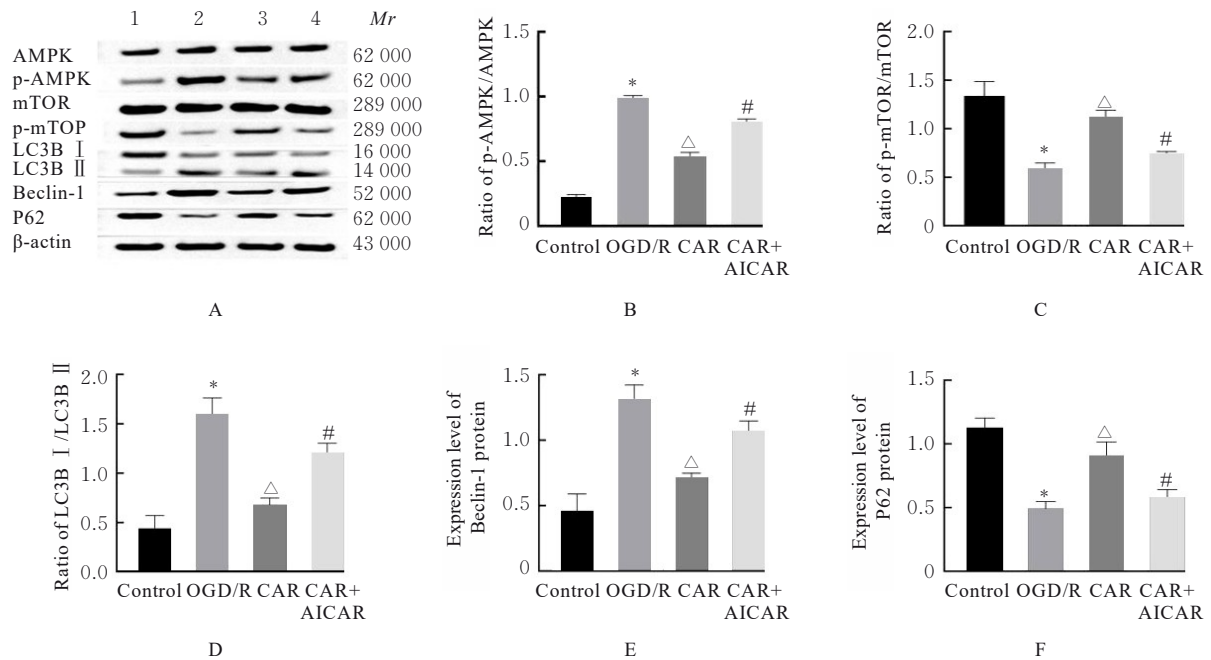
CAR 组比较, CAR+AICAR 组 AS 胞质中 LC3B 荧光颗粒聚集增加, LC3B 阳性荧光强度 ( $2.60 \pm 0.16$ ) 明显升高 ( $P < 0.01$ )。见图 4。

### 3 讨论

前期研究<sup>[12]</sup>显示:  $9.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  CAR 对 OGD/R 诱导的 AS 损伤具有较好保护作用, 进一步升高 CAR 浓度, 效果提高并不明显, 因此本研究选定该浓度进行实验。缺血性卒中是致残和死亡的主要原因之一, 常采用血管内溶栓进行治疗, 但脑组织恢复血流后常发生 IRI<sup>[13]</sup>。寻找切实有效的 IRI 保护药物一直是缺血性卒中研究领域的重要方向<sup>[14-15]</sup>。AS 是中枢神经系统数量最多的细胞, 具有为神经元提供能量、产生神经递质、抑制氧化和

分泌神经保护因子等作用<sup>[16]</sup>。探讨 OGD/R 条件下药物对 AS 的保护作用及其机制对于 IRI 研究十分必要<sup>[17]</sup>。本研究结果显示: 与对照组比较, OGD/R 组细胞存活率明显降低, 细胞凋亡率和细胞死亡率明显升高, 细胞形态明显改变, 说明 OGD 6 h 和再灌注 24 h 对 AS 产生明显损伤, 模型制备成功; 与 OGD/R 组比较, CAR 组细胞存活率明显升高, 细胞凋亡率明显降低, 细胞死亡率明显降低, 细胞形态趋于好转, 说明 CAR 对 OGD/R 损伤具有保护作用; 加入 AMPK 激活剂 AICAR 后, CAR 的保护作用被明显抑制。

发生 OGD/R 时, 能量供应不足导致腺苷单磷酸 (adenosine monophosphate, AMP) /腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 比值升高, 激



A: Electrophoregram (Lane 1: Control group; Lane 2: OGD/R group; Lane 3: CAR group; Lane 4: CAR+AICAR group); B-F: Histograms; B: Ratio of p-AMPK/AMPK; C: Ratio of p-mTOR/mTOR; D: Ratio of LC3B II/LC3B I; E: Expression level of Beclin-1 protein; F: Expression level of P62 protein. \* $P < 0.01$  compared with control group;  $\Delta P < 0.01$  compared with OGD/R group; # $P < 0.01$  compared with CAR group.

图3 Western blotting法检测各组AS中AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、LC3B、Beclin-1和P62蛋白表达电泳图和直条图

Fig. 3 Electrophoregram and histograms of expressions of AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, LC3B, Beclin-1, and P62 proteins in AS in various groups detected by Western blotting method

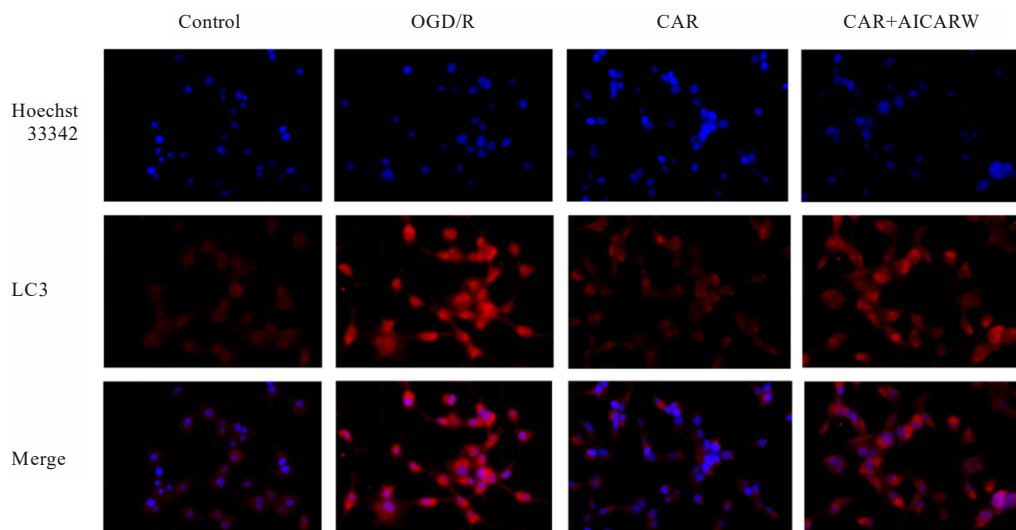


图4 荧光显微镜下观察各组AS中LC3B阳性荧光强度( $\times 400$ )

Fig. 4 Positive fluorescence intensities of LC3B in AS in various groups observed by fluorescence microscope( $\times 400$ )

活AMPK可抑制mTOR激活<sup>[18]</sup>。mTOR是机体的感受器,能够检测到机体能量、氨基酸和激素等水平的变化,在细胞生长过程中起重要调节作用。

mTOR作为自噬的负调控分子,不仅抑制自噬的发生,还充当自噬“守门员”的角色<sup>[19]</sup>。CAR可以提高OGD/R处理的AS中ATP含量<sup>[20]</sup>,进而降

低 AMP/ATP 比值。结合本实验结果推测: CAR 可能是通过抑制 AMPK 的过度激活, 进而调节 mTOR 活性来发挥保护作用。

自噬是降解细胞内成分和受损细胞器以维持细胞内稳态的机制<sup>[21]</sup>, 具有维持细胞完整及正常代谢的重要功能, 可对细胞内环境进行监控, 维持内环境稳定。自噬也是一把“双刃剑”, 适度自噬会起到神经保护作用, 过度自噬则会加重细胞损害<sup>[22-23]</sup>。mTOR 是自噬发生过程中的经典信号分子, 可抑制自噬激活<sup>[24-25]</sup>。Beclin-1 是促进自噬启动的主要基因, 参与自噬的起始阶段<sup>[26]</sup>。细胞质中 LC3B I 与磷脂酰乙醇胺结合形成 LC3B II。LC3B II 可以作为特异性标记定位于吞噬细胞膜, 诱导自噬体的形成, LC3B II 表达水平增高被认为是自噬的标志<sup>[27]</sup>。自噬在系统中的发生程度主要取决于 LC3B II/LC3B I 比值<sup>[28-29]</sup>。P62 是一种多功能蛋白, 在自噬中发挥重要作用, 是自噬过程中的蛋白水解底物, 细胞中 P62 蛋白表达水平也会随着自噬反应程度的升高而降低<sup>[30-31]</sup>。本研究结果显示: 与对照组比较, OGD/R 组 AS 中 Beclin-1 水平和 LC3B II/LC3B I 比值升高、P62 蛋白表达水平降低; CAR 可以抑制 Beclin-1 水平和 LC3B II/LC3B I 比值升高, 同时升高 P62 蛋白表达水平, 说明 OGD/R 引起细胞自噬, 而 CAR 对自噬具有一定抑制作用, 加入 AMPK 激活剂 AICAR 可使 CAR 的自噬抑制能力减弱, 推断 CAR 可能是通过抑制过度自噬来发挥其保护作用。

综上所述, CAR 可有效降低 OGD/R 造成的 AS 损伤, 其作用机制可能是通过抑制 AMPK/mTOR 通路诱导的自噬发挥其保护作用。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

杨菁参与论文整体设计, 王宇彤、边疆、姜晓涵、宋俊秋和王德威参与实验操作, 王宇彤和冉睿黎参与论文撰写。

#### [参考文献]

[1] BEREZHNOY D S, STVOLINSKY S L, LOPACHEV A V, et al. Carnosine as an effective neuroprotector in brain pathology and potential neuromodulator in normal conditions[J]. *Amino Acids*, 2019, 51(1): 139-150.

[2] KIM E H, KIM E S, SHIN D, et al. Carnosine protects

against cerebral ischemic injury by inhibiting matrix-metalloproteinases[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7495.

- [3] VIRDI J K, BHANOT A, JAGGI A S, et al. Investigation on beneficial role of l-carnosine in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice: possible role of histidine histamine pathway[J]. *Int J Neurosci*, 2020, 130(10): 983-998.
- [4] 杨文强, 何鑫, 白雪, 等. 肌肽对血管性认知障碍大鼠氧化应激及NF- $\kappa$ B信号途径的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2020, 46(2): 329-334, 434.
- [5] HOU K, XU D, LI F Y, et al. The progress of neuronal autophagy in cerebral ischemia stroke: mechanisms, roles and research methods[J]. *J Neurol Sci*, 2019, 400: 72-82.
- [6] SU P W, ZHAI Z, WANG T, et al. Research progress on astrocyte autophagy in ischemic stroke [J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 951536.
- [7] YANG B, LI Y Q, MA Y M, et al. Selenium attenuates ischemia/reperfusion injury-induced damage to the blood-brain barrier in hyperglycemia through PI3K/AKT/mTOR pathway-mediated autophagy inhibition[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(3): 178.
- [8] ZHANG D M, ZHANG T, WANG M M, et al. TIGAR alleviates ischemia/reperfusion-induced autophagy and ischemic brain injury[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 137: 13-23.
- [9] NDOLO R O, YU L, ZHAO Y, et al. Carnosine-based reversal of diabetes-associated cognitive decline via activation of the akt/mTOR pathway and modulation of autophagy in a rat model of type 2 diabetes mellitus[J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2023, 52(3): 156-168.
- [10] AGRAWAL A, RATHOR R, KUMAR R, et al. Endogenous dipeptide-carnosine supplementation ameliorates hypobaric hypoxia-induced skeletal muscle loss via attenuating endoplasmic reticulum stress response and maintaining proteostasis[J]. *IUBMB Life*, 2022, 74(1): 101-116.
- [11] GIRI S, KHAN M, NATH N, et al. The role of AMPK in psychosine mediated effects on oligodendrocytes and astrocytes: implication for Krabbe disease[J]. *J Neurochem*, 2008, 105(5): 1820-1833.
- [12] 于露, 罗杰斯, 任毅, 等. 肌肽通过激活Nrf2/ARE信号通路改善OGD/R诱导星形胶质细胞损伤[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2023, 41(3): 310-317, 323.
- [13] 吴川杰, 宋海庆. 《2018ASA/AHA急性缺血性脑卒中患者早期管理指南》更新解读[J]. *中国全科医学*, 2018, 21(14): 1639-1644.

- [14] ZHANG Q, JIA M, WANG Y F, et al. Cell death mechanisms in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(12): 3525-3542.
- [15] LIM S, KIM T J, KIM Y J, et al. Senolytic therapy for cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11967.
- [16] ZHOU B, ZUO Y X, JIANG R T. Astrocyte morphology: diversity, plasticity, and role in neurological diseases[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(6): 665-673.
- [17] LIU X, TIAN F F, WANG S Q, et al. Astrocyte autophagy flux protects neurons against oxygen-glucose deprivation and ischemic/reperfusion injury [J]. *Rejuvenation Res*, 2018, 21(5): 405-415.
- [18] GUO H R, OUYANG Y J, YIN H, et al. Induction of autophagy via the ROS-dependent AMPK-mTOR pathway protects copper-induced spermatogenesis disorder[J]. *Redox Biol*, 2022, 49: 102227.
- [19] KONDO Y, KANZAWA T, SAWAYA R, et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(9): 726-734.
- [20] SHEN Y, TIAN Y Y, YANG J B, et al. Dual effects of carnosine on energy metabolism of cultured cortical astrocytes under normal and ischemic conditions [J]. *Regul Pept*, 2014, 192/193: 45-52.
- [21] SUN B, OU H, REN F, et al. Propofol inhibited autophagy through  $Ca^{2+}$ /CaMKK $\beta$ /AMPK/mTOR pathway in OGD/R-induced neuron injury [J]. *Mol Med*, 2018, 24(1): 58.
- [22] D'ARCY M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(6): 582-592.
- [23] HSIEH S L, LI J H, DONG C D, et al. Carnosine suppresses human colorectal cancer cell proliferation by inducing necroptosis and autophagy and reducing angiogenesis[J]. *Oncol Lett*, 2022, 23(2): 44.
- [24] PATTINGRE S, ESPERT L, BIARD-PIECHACZYK M, et al. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes[J]. *Biochimie*, 2008, 90(2): 313-323.
- [25] SHI B H, MA M Q, ZHENG Y T, et al. mTOR and Beclin1: two key autophagy-related molecules and their roles in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12562-12568.
- [26] FANG Y K, XING C H, WANG X Y, et al. Activation of the ROS/HO-1/NQO1 signaling pathway contributes to the copper-induced oxidative stress and autophagy in duck renal tubular epithelial cells [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 757: 143753.
- [27] WU Z M, WANG H G, FANG S Y, et al. Roles of endoplasmic reticulum stress and autophagy on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress injury in HepG2 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(5): 4163-4174.
- [28] SEKERDAG E, SOLAROGLU I, GURSOY-OZDEMIR Y. Cell death mechanisms in stroke and novel molecular and cellular treatment options [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16(9): 1396-1415.
- [29] TUO Q Z, ZHANG S T, LEI P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications[J]. *Med Res Rev*, 2022, 42(1): 259-305.
- [30] SHIN W H, PARK J H, CHUNG K C. The central regulator p62 between ubiquitin proteasome system and autophagy and its role in the mitophagy and Parkinson's disease [J]. *BMB Rep*, 2020, 53(1): 56-63.
- [31] 段正昊, 刘永超, 冯娟. 自身免疫性胶质纤维酸性蛋白星形胶质细胞病研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2023, 43(4): 336-339.