

[文章编号] 1671-587X(2026)01-0116-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20260112

## 丰富环境通过转录因子 EB 介导自噬对缺血性脑卒中大鼠神经功能损伤的影响

朱慧艳, 陈敏, 李金贤, 李春丽

(新疆维吾尔自治区人民医院康复医学科, 新疆 乌鲁木齐 830001)

**[摘要]** **目的:** 探讨丰富环境 (EE) 对缺血性脑卒中 (IS) 损伤的影响, 初步阐明转录因子 EB (TFEB) 蛋白在这一过程中发挥的作用以及 EE 与炎症反应和氧化应激反应的关系。**方法:** 实验 I, 选取 48 只 SD 大鼠, 随机分为对照组、IS 组、IS+EE 组和 IS+EE+氯喹 (CQ) 组 (IS+EE+CQ 组), 每组 12 只。实验 II, 再取 16 只大鼠, 随机分为 IS+EE+sh-NC 组和 IS+EE+sh-TFEB 组, 每组 8 只。模型构建前, IS+EE+sh-TFEB 组大鼠脑室注射 TFEB shRNA 沉默脑组织中 TFEB 基因表达。除对照组外, 其余各组大鼠采用 Longa 线栓法构建 IS 模型。采用改良神经损伤严重程度评分 (mNSS) 法评估各组大鼠神经功能损伤程度, 氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色法检测各组大鼠脑梗死区面积百分率, 试剂盒检测各组大鼠炎症细胞因子和氧化应激因子水平, Western blotting 法检测各组大鼠自噬相关蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较, IS 组大鼠 mNSS 评分升高 ( $P<0.05$ ), 缺血半暗带区脑组织中白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和丙二醛 (MDA) 水平明显升高 ( $P<0.05$ ), 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性明显降低 ( $P<0.05$ ), TFEB 和 Beclin-1 蛋白表达水平以及微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) - II/LC3- I 比值明显降低 ( $P<0.05$ ); 与 IS 组比较, IS+EE 组大鼠 mNSS 评分和脑梗死面积百分率明显降低 ( $P<0.05$ ), 缺血半暗带区脑组织中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 MDA 水平明显降低 ( $P<0.05$ ), SOD 活性明显升高 ( $P<0.05$ ), TFEB 和 Beclin-1 蛋白表达水平以及 LC3- II/LC3- I 比值明显升高 ( $P<0.05$ )。与 IS+EE 组比较, IS+EE+CQ 组大鼠 mNSS 评分和脑梗死面积百分率明显升高 ( $P<0.05$ ), 缺血半暗带区脑组织中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 MDA 水平明显升高 ( $P<0.05$ ), SOD 活性明显降低 ( $P<0.05$ ), TFEB 和 Beclin-1 蛋白表达水平以及 LC3- II/LC3- I 比值明显降低 ( $P<0.05$ )。与 IS+EE+sh-NC 组比较, IS+EE+sh-TFEB 组大鼠 mNSS 评分降低 ( $P<0.05$ ), 脑梗死区面积百分率明显升高 ( $P<0.05$ ), 缺血半暗带区脑组织中 TFEB 和 Beclin-1 蛋白表达水平以及 LC3- II/LC3- I 比值明显降低 ( $P<0.05$ )。**结论:** EE 对 IS 大鼠神经功能损伤具有明显的改善作用, 其机制可能与 EE 通过升高 TFEB 蛋白表达诱导自噬、减轻脑缺血区神经炎症和氧化应激有关。

**[关键词]** 丰富环境; 炎症; 自噬; 转录因子 EB; 缺血性脑卒中

**[中图分类号]** R743 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2025-02-28 **[录用日期]** 2025-04-27

**[基金项目]** 新疆维吾尔自治区科技厅自然科学基金项目 (2022D01C125, 2024D01C72)

**[作者简介]** 朱慧艳 (1987-), 女, 河南省周口市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事脑卒中、脊髓损伤和骨关节疾病康复治疗及相关方面的研究。

**[通信作者]** 李春丽, 副主任医师 (E-mail: 874897249@qq.com)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

## Effect of enriched environment on neurofunctional damage in rats with ischemic stroke via transcription factor EB-mediated autophagy

ZHU Huiyan, CHEN Min, LI Jinxian, LI Chunli

(Department of Rehabilitation Medicine, People's Hospital, Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the impact of an enriched environment (EE) on ischemic stroke (IS) injury, and to preliminarily clarify the role of transcription factor EB (TFEB) protein in this process as well as the relationship between EE and inflammatory response and oxidative stress response. **Methods:** Forty-eight SD rats were randomly divided into control group, cerebral ischemia (IS) group, IS+EE group, and IS+EE+chloroquine (CQ) group (IS+EE+CQ group), with 12 rats in each group in experiment I. Another 16 rats were randomly divided into IS+EE+sh-NC group and IS+EE+sh-TFEB group, with 8 rats in each group in experiment II. Before model establishment, the rats in IS+EE+sh-TFEB group were injected with TFEB shRNA into the cerebral ventricle to silence TFEB expression in brain tissue. Except for control group, the IS model was established in the rats in the other groups using the Longa suture-occlusion method. The modified neurological severity score (mNSS) was used to evaluate the neurological function injury of the rats in various groups; triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was used to detect the percentages of cerebral infarction area of the rats in various groups; kits were used to detect the levels of inflammatory cytokines and oxidative stress factors of the rats in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of autophagy-related proteins of the rats in various groups. **Results:** Compared with control group, the mNSS score of the rats in IS group was increased ( $P<0.05$ ), the levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and malondialdehyde (MDA) in the brain tissue in ischemic penumbra region were increased ( $P<0.05$ ), the activity of superoxide dismutase (SOD) was decreased ( $P<0.05$ ), and the expression levels of TFEB and Beclin-1 proteins and the ratio of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-II / LC3-I were decreased ( $P<0.05$ ). Compared with IS group, the mNSS score and the percentage of cerebral infarction area of the rats in IS+EE group were decreased ( $P<0.05$ ), the levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and MDA in the brain tissue in ischemic penumbra region were decreased ( $P<0.05$ ), the activity of SOD was increased ( $P<0.05$ ), and the expression levels of TFEB and Beclin-1 proteins and the ratio of LC3-II / LC3-I were increased ( $P<0.05$ ). Compared with IS+EE group, the mNSS score and the percentage of cerebral infarction area of the rats in IS+EE+CQ group were increased ( $P<0.05$ ), the levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and MDA in the brain tissue in ischemic penumbra region were increased ( $P<0.05$ ), the activity of SOD was decreased ( $P<0.05$ ), and the expression levels of TFEB and Beclin-1 proteins and the ratio of LC3-II / LC3-I were decreased ( $P<0.05$ ). Compared with IS+EE+sh-NC group, the mNSS score of the rats in IS+EE+sh-TFEB group was decreased ( $P<0.05$ ), the percentage of cerebral infarction area was increased ( $P<0.05$ ), and the expression levels of TFEB and Beclin-1 proteins and the ratio of LC3-II / LC3-I in the brain tissue in ischemic penumbra region were decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** EE has a significant ameliorative effect on neurological function injury in the IS rats, and its mechanism may be related to EE inducing autophagy by increasing TFEB protein expression, thereby alleviating neuroinflammation and oxidative stress in the ischemic brain region.

**KEYWORDS** Enriched environment; Inflammation; Autophagy; Transcription factor EB;

## Ischemic stroke

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是全球心脑血管疾病第二大死因<sup>[1]</sup>,神经炎症和氧化应激在其发病机制中扮演关键作用。神经炎症涉及胶质细胞激活、外周血白细胞浸润及促炎性介质释放,同时伴随反应性自由基释放,导致神经毒性作用,加重IS损伤<sup>[2]</sup>。因此,抑制神经炎症和氧化应激有望改善IS患者预后。自噬是细胞经自噬体-溶酶体系统降解损伤细胞器或多余细胞质物质的过程。研究<sup>[3]</sup>显示:自噬缺陷会导致活性氧片段超载和线粒体损伤,引发氧化应激、神经炎症和神经元死亡。恢复正常自噬对细胞保护至关重要。因此,IS病理进展与自噬异常密切相关。丰富环境(enriched environment, EE)是一种多感官刺激、运动和社会互动的生活模式,属于非生物与社会刺激结合治疗手段,对多种中枢神经系统疾病表现出明显治疗作用<sup>[4-5]</sup>。其作用机制涉及调节核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)信号通路以抑制神经炎症和氧化应激,降低小胶质细胞活化,恢复脑白质结构,促进血管再生并诱导神经发生<sup>[6]</sup>。转录因子EB(transcription factor EB, TFEB)可能是EE调控自噬的关键靶点。研究<sup>[7]</sup>表明:运动或环境刺激可通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路解除对TFEB的磷酸化抑制,促进其核转位。在IS大鼠模型中,二甲双胍通过激活AMPK/TFEB信号通路显著改善自噬流,降低梗死体积<sup>[8]</sup>。骨髓间充质干细胞外泌体通过抑制mTOR促进TFEB核转位,恢复溶酶体功能,减轻缺血性损伤<sup>[9]</sup>。上述研究提示:EE可能通过自噬相关机制增强TFEB活性,从而改善自噬功能。本研究探讨EE对IS后自噬、神经炎症和氧化应激的影响,阐明其作用机制,为进一步深入研究EE的神经保护作用提供基础,为IS的治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、主要试剂和仪器** 64只SD大鼠,雄性,SPF级别,7~8周龄,体质量180~200 g,由新疆医科大学动物实验中心提供,动物生产许可

证号:SCXK(新)2023-0001。动物入组后饲养于SPF级动物房中,检疫合格后用于实验研究。本研究动物实验均经本院伦理委员会审核批准,伦理审批号:IACUC-202406153。IS线栓(上海佳妍生物科技有限公司),氯喹(chloroquine, CQ)(美国MCE公司),氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)试剂盒(北京索莱宝生物技术有限公司),白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)试剂盒、白细胞介素1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )试剂盒、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(联科生物技术有限公司),微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)-I、LC3-II、TFEB、Beclin-1和 $\beta$ -actin蛋白抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。电泳仪(型号:Mini-PROTEAN,美国Biorad公司),转膜仪(型号:VE-186)和化学发光成像仪(型号:Tanon 6600)(上海天能科技有限公司),酶标仪(型号:Fc,美国Thermo公司)。

**1.2 实验动物分组和处理** 本研究整体分为两部分实验。第1部分实验动物分组和处理:48只大鼠随机分为对照组、IS组、IS+EE组和IS+EE+CQ组,每组12只。除对照组外,其余各组大鼠采用Longa线栓法<sup>[10]</sup>构建IS模型。将对照组和IS组大鼠放入常规环境中饲养7 d,IS+EE组和IS+EE+CQ组大鼠放入EE中饲养7 d。期间,取IS+EE+CQ组大鼠腹腔注射CQ溶液( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )<sup>[11]</sup>,其余各组腹腔注射等体积生理盐水。第2部分实验动物分组和处理:16只大鼠随机分为IS+EE+sh-NC组和IS+EE+sh-TFEB组,每组8只。IS+EE+sh-TFEB组大鼠脑室注射TFEB shRNA沉默脑组织中TFEB基因表达<sup>[12]</sup>。IS+EE+sh-NC组大鼠脑室注射sh-NC。所有动物经Longa线栓法构建IS模型,放入EE中饲养7 d。此两部分实验中,动物模型构建后第1、3和7天,参考改良神经损伤严重程度评分(modified neurological severity score, mNSS)法<sup>[13]</sup>评估各组大鼠神经功能。第7天将各组大鼠处死,每组取3只大鼠,收集完整脑组织用于TTC染色,评估梗死区面积。剩余大鼠收集缺血半暗带区脑组织,经试剂盒检测各组大鼠缺血半

暗带区脑组织匀浆中IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和MDA水平及SOD活性, Western blotting法检测各组大鼠缺血半暗带区脑组织中TFEB蛋白和自噬相关蛋白表达水平。

**1.3 IS模型的制备** 取IS组、IS+EE组、IS+EE+CQ组、IS+EE+sh-NC组和IS+EE+sh-TFEB组大鼠, 以戊巴比妥钠(50 mg·kg<sup>-1</sup>)麻醉, 以美洛昔康(2 mg·kg<sup>-1</sup>)镇痛, 青霉素消炎。大鼠仰卧位固定于手术台上, 颈部皮肤备皮、碘伏消毒, 正中开口, 分离出右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉。沿颈外动脉插入线栓, 前进至颈内动脉、中动脉阻塞血流。1 h后, 取出线栓, 止血, 缝合颈部皮肤。术后连续3 d以美洛昔康(2 mg·kg<sup>-1</sup>)镇痛, 注射青霉素(每只10 000 U)消炎。对照组大鼠进行镇痛、消炎和麻醉, 颈部皮肤打开后分离出右侧动脉后缝合皮肤<sup>[10]</sup>。

**1.4 EE和常规环境的构成** EE是在扩大的饲养容器(40 cm×30 cm×60 cm)中增设跑轮、秋千、遮蔽物、透明管道、迷宫、高低架和塑料玩具等设备。每3 d更换1次玩具, 以保持大鼠新鲜感。每个EE中放入不超过5只大鼠, 以保障充足的空间和丰富的社会互动。常规环境为标准的塑料笼子, 玉米芯垫料, 每笼不超过4只大鼠。2种环境均为温度22℃~26℃、湿度30%~70%的SPF级大鼠房。

### 1.5 mNSS法评估各组大鼠神经功能损伤程度

mNSS法评估项目包括运动功能、感觉功能、反射缺乏和平衡功能。根据要求对每项功能检测结果进行评分归一化统计, 每项评分得分为0~6分, 总分共计18分。分数越高代表大鼠神经功能损伤越严重。平衡功能检测中, 选用长度100 cm、宽度4 cm, 离地高度40 cm的平衡木, 以40 r·min<sup>-1</sup>转速旋转。大鼠放在平衡木上, 观察4 min, 记录大鼠自平衡木上掉下的时间, 记为平衡时间。

### 1.6 TTC染色法检测各组大鼠脑梗死区面积百分率

所有大鼠过量麻醉后处死, 完整取出脑组织样本, 放入-80℃冰箱中冷冻至坚, 沿冠状切片切成6片, 将脑组织切片放入2% TTC溶液中染色, 37℃水浴30 min。将充分染色的脑组织切片取出, 按冠状切片顺序排列, 拍摄照片, 经计算机软件分析, 计算脑梗死区面积百分率。脑梗死区面积百分率=白色梗死区面积/(白色梗死区面积+红色梗死区面积)×100%。

### 1.7 采用试剂盒检测各组大鼠缺血半暗带区脑组织匀浆中IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和MDA水平及SOD活性

大鼠过量麻醉后处死, 取出脑组织缺血半暗带区组织, 加入磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)匀浆, 静置后离心, 收集上清液。根据试剂盒说明书要求添加标准品、样品和试剂, 根据流程孵育, 在波长450 nm下检测各个样品孔吸光度(A)值, 根据标准曲线计算出各个样品中各检测因子水平或活性。

### 1.8 Western blotting法检测各组大鼠缺血半暗带区脑组织中TFEB、LC3-I、LC3-II和Beclin-1蛋白表达水平

大鼠过量麻醉后处死, 取出脑组织缺血半暗带区组织, 加入RIPA裂解液匀浆, 静置裂解, 离心后收集上清液, 检测上清液中蛋白水平。各样本上清液中加入上样缓冲液, 沸水浴中加热, 制成待测样品。取上样凝胶, 各孔中上样(每孔20  $\mu$ g), 开启凝胶电泳, 条件恒压90 V、30 min, 120 V、90 min。待上样缓冲液达到凝胶底部, 结束电泳, 通过湿法将凝胶上蛋白转移至蛋白膜上, 封闭后放入目的蛋白一抗溶液中孵育过夜。取出蛋白膜, 清洗后加入二抗溶液孵育2 h。最后取蛋白膜清洗, 滴加化学发光液, 显影仪中显影获得目的蛋白条带。采用Image J 7.0软件分析蛋白条带灰度值, 以 $\beta$ -actin为内参, 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/内参蛋白条带灰度值。

### 1.9 统计学分析

采用SPSS 28.0软件进行统计学分析。各组大鼠mNSS评分, 运动功能中平衡时间, 各组大鼠缺血半暗带区脑组织匀浆中IL-6、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 水平及SOD活性符合正态分布, 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Dunnett's检验; 各组大鼠脑梗死区面积百分率、MDA水平、TFEB和Beclin-1蛋白表达水平及LC3-II/LC3-I比值不符合正态分布, 组间比较采用Kruskal-Wallis H检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠mNSS评分和平衡时间

模型构建后各个时间点, 与对照组比较, IS组大鼠均出现了神经功能损伤, mNSS评分升高( $P<0.05$ ), 平衡时间降低( $P<0.05$ )。IS组大鼠mNSS评分逐渐降低, 平衡时间可见升高趋势。第1天时, 与IS组比较, IS+EE组大鼠mNSS评分和平衡时间均未

见明显变化, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 第3天时, 与IS组比较, IS+EE组大鼠mNSS评分明显降低 ( $P<0.05$ ), 但平衡时间未见明显变化, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 第7天时, 与IS组比较, IS+EE组大鼠mNSS评分明显降低 ( $P<$

$0.05$ ), 平衡时间明显升高 ( $P<0.05$ )。第3天时, 与IS+EE组比较, IS+EE+CQ组大鼠mNSS评分明显升高 ( $P<0.05$ ); 第7天时, 与IS+EE组比较, IS+EE+CQ组大鼠mNSS评分明显升高 ( $P<0.05$ ), 平衡时间明显降低 ( $P<0.05$ )。见表1。

表1 各组大鼠mNSS评分和运动功能中平衡时间

Tab. 1 mNSS scores and balance duration in motor function of rats in various groups ( $n=12, \bar{x}\pm s$ )

Group	Neurological function score			Balance duration in motor function (t/s)		
	1st day	3rd day	7th day	1st day	3rd day	7th day
Control	0.17±0.39	0.08±0.29	0.00±0.00	142.00±26.78	147.67±22.01	138.33±25.70
IS	10.17±2.69*	8.33±2.19*	7.92±2.87*	16.67±11.88*	21.83±15.75*	24.00±16.81*
IS+EE	9.83±1.95	6.25±1.42 <sup>△</sup>	5.08±1.88 <sup>△</sup>	17.83±15.47	36.25±19.47	55.83±28.84 <sup>△</sup>
IS+EE+CQ	9.67±2.42	9.08±1.38 <sup>#</sup>	8.92±1.93 <sup>#</sup>	20.67±14.92	19.33±12.60	22.33±13.25 <sup>#</sup>

\* $P<0.05$  vs control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  vs IS group; <sup>#</sup> $P<0.05$  vs IS+EE group.

2.2 各组大鼠脑梗死区面积百分率 对照组大鼠脑组织中未见梗死区域, 量化统计结果为0; IS组大鼠脑组织中可见明显的脑梗死区域; 与IS组 ( $26.37\%\pm 8.37\%$ ) 比较, IS+EE组大鼠脑梗死区面积百分率 ( $5.87\%\pm 2.45\%$ ) 明显降低 ( $P<0.05$ ); 与IS+EE组比较, IS+EE+CQ组大鼠脑梗死区面积百分率 ( $20.61\%\pm 6.61\%$ ) 明显升高 ( $P<0.05$ )。见图1。

2.3 各组大鼠缺血半暗带区脑组织匀浆中IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和MDA水平及SOD活性 与对照组比较, IS组大鼠缺血半暗带区脑组织匀浆中IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和MDA水平明显升高 ( $P<0.05$ ), SOD活性明显降低 ( $P<0.05$ ); 与IS组比较, IS+EE组大鼠缺血半暗带区脑组织匀浆中IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和MDA水平明显降低 ( $P<0.05$ ), SOD活性明显升高 ( $P<0.05$ ); 与IS+EE组比较, IS+EE+CQ组大鼠缺血半暗带区脑组织匀浆中IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和MDA水平明显升高 ( $P<$

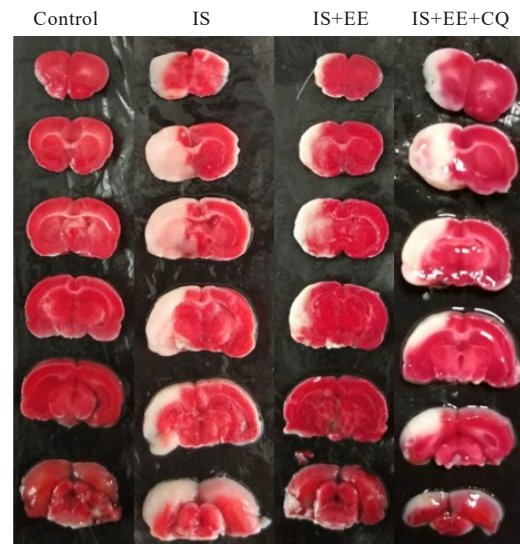


图1 各组大鼠脑梗死情况(TTC染色)

Fig. 1 Cerebral infarction of rats in various groups (TTC staining)

$0.05$ ), SOD活性明显降低 ( $P<0.05$ )。见表2。

表2 各组大鼠缺血半暗带区脑组织匀浆中IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和MDA水平及SOD活性

Tab. 2 Levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and MDA, and SOD activities in ischemic penumbra of rats in various groups

( $n=6, \bar{x}\pm s$ )

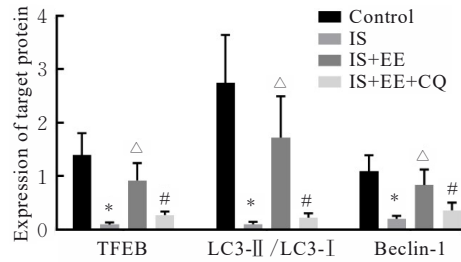
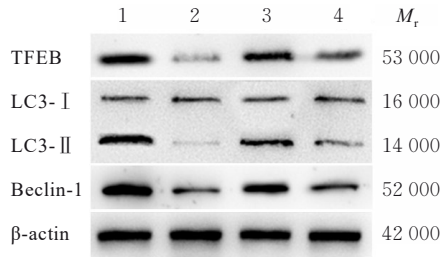
Group	IL-6 [ $w_b/(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$ ]	IL-1 $\beta$ [ $w_b/(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$ ]	TNF- $\alpha$ [ $w_b/(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$ ]	MDA [ $m_b/(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$ ]	SOD [ $\lambda_b/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$ ]
Control	22.21±6.06	21.84±7.84	35.82±10.32	2.51±0.91	162.99±27.96
IS	181.85±73.12*	173.30±85.38*	297.51±129.33*	52.86±18.40*	28.39±9.90*
IS+EE	55.71±19.47 <sup>△</sup>	32.11±7.38 <sup>△</sup>	55.29±16.91 <sup>△</sup>	10.05±2.22 <sup>△</sup>	102.24±14.95 <sup>△</sup>
IS+EE+CQ	154.50±40.35 <sup>#</sup>	190.62±63.93 <sup>#</sup>	290.34±112.11 <sup>#</sup>	45.24±14.03 <sup>#</sup>	27.61±10.88 <sup>#</sup>

\* $P<0.05$  vs control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  vs IS group; <sup>#</sup> $P<0.05$  vs IS+EE group.

**2.4 各组大鼠缺血半暗带区脑组织中TFEB和Beclin-1蛋白表达水平及LC3-II/LC3-I比值** 与对照组比较, IS组大鼠缺血半暗带区脑组织中TFEB和Beclin-1蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), LC3-II/LC3-I比值明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与IS组比较, IS+EE组大鼠缺血半暗带区脑组织中TFEB和Beclin-1蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), LC3-II/LC3-I比值明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与IS+EE组比较, IS+EE+CQ组大鼠缺血半暗

带区脑组织中TFEB和Beclin-1蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), LC3-II/LC3-I比值明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图2。

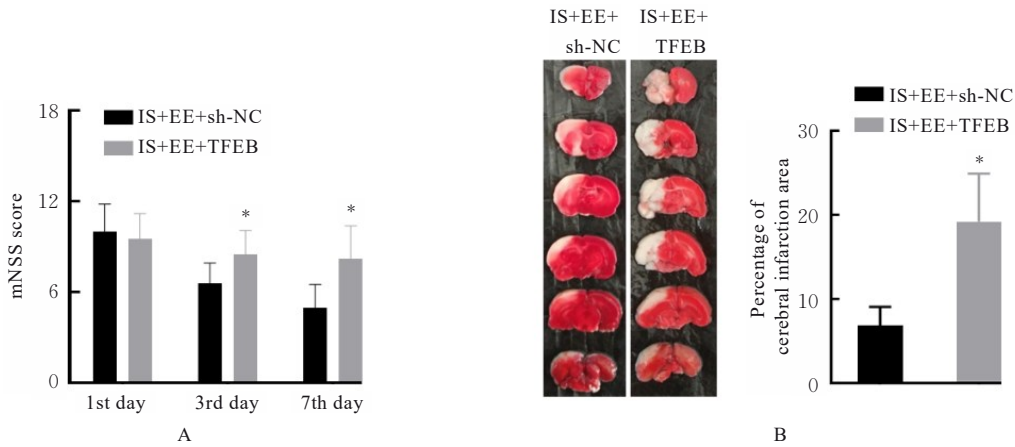
**2.5 沉默TFEB基因后各组大鼠mNSS评分和脑梗死面积百分率** 第3天和第7天, 与IS+EE+sh-NC组比较, IS+EE+sh-TFEB组大鼠mNSS评分升高 ( $P < 0.05$ ), 脑梗死区面积百分率升高 ( $P < 0.05$ )。见图3。



Lane 1: Control group; Lane 2: IS group; Lane 3: IS+EE group; Lane 4: IS+EE+CQ group. \* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs IS group; # $P < 0.05$  vs IS+EE group.

图2 各组大鼠缺血半暗带区脑组织中TFEB、LC3-I、LC3-II和Beclin-1蛋白表达电泳图(A)及直条图

Fig. 2 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of TFEB, LC3-I, LC3-II, and Beclin-1 proteins in ischemic penumbra brain tissue homogenate of rats in various groups



A: Neurological score ( $n=8$ ). B: Percentage of cerebral infarction area ( $n=4$ ). \* $P < 0.05$  compared with IS+EE+sh-NC group.

图3 沉默TFEB基因表达后2组大鼠mNSS评分和脑梗死面积百分率

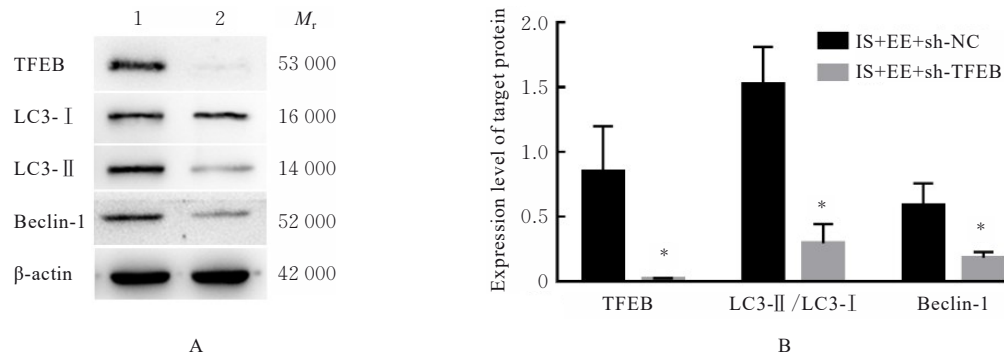
Fig. 3 mNSS scores and percentages of cerebral infarction areas of rats in two groups after silencing TFEB gene expression

**2.6 沉默TFEB基因后2组大鼠缺血半暗带区脑组织中TFEB和Beclin-1蛋白表达水平及LC3-II/LC3-I比值** 与IS+EE+sh-NC组比较, IS+EE+sh-TFEB组大鼠缺血半暗带区脑组织中TFEB蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), LC3-II/LC3-I

比值和Beclin-1蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图4。

### 3 讨论

本研究采用Longa线栓法构建IS大鼠模型,



Lane 1: IS+EE+sh-NC group; Lane 2: IS+EE+sh-TFEB group. \* $P < 0.05$  compared with IS+EE+sh-NC group.

图4 沉默 *TFEB* 基因表达后2组大鼠缺血半暗带区脑组织中TFEB、LC3-I、LC3-II和Beclin-1蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 4 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of TFEB, LC3-I, LC3-II, and Beclin-1 proteins in ischemic penumbra brain tissue homogenate of rats in two groups after silencing *TFEB* gene expression

与参考文献 [10] 报道的模型相比,本研究将大鼠缺血持续时间缩短至1 h。原因在于EE治疗策略属于运动康复治疗范畴,本课题组预实验结果表明:2 h缺血造成的神经损伤难以通过该疗法有效逆转。1 h缺血时间既能保证模型的稳定性,又符合康复治疗的干预窗口。模型评价方面,成功建模大鼠均表现出典型的神经功能缺损症状和明确的脑梗死病灶,与既往研究 [14] 结果一致。上述特征与临床IS患者表现高度吻合 [15],提示本研究建立的1 h IS模型具有良好的可操作性和临床相关性,适用于抗脑卒中损伤药物的药效学评价。

自噬是细胞内一种高度保守的降解机制,通过形成双层膜结构的自噬小体将受损细胞器和错误折叠蛋白等胞质成分靶向运送至溶酶体进行降解,这一过程对维持细胞稳态具有关键作用 [3]。在IS病理过程中,自噬活动呈现动态变化,其调控机制复杂且具有重要的病理生理意义。研究 [16] 表明:在缺血早期(6~12 h),为应对缺氧和能量代谢障碍,细胞通过激活自噬流来清除受损线粒体和异常蛋白聚集体,发挥神经保护作用。然而,随着缺血时间延长(24 h后),过度激活的自噬会导致自噬小体-溶酶体融合障碍和溶酶体功能衰竭,最终引发“自噬耗竭”这一病理状态 [17]。本研究结果显示:IS组大鼠脑组织中自噬标志蛋白LC3-II/LC3-I比值及Beclin-1蛋白表达水平明显降低,这一结果证实了自噬耗竭现象的存在。在此状态下,受损细胞器和过量活性氧无法被及时清除,进而通过激活NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3, NLRP3)

炎症小体通路,促进IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 等促炎因子释放,诱发氧化应激级联反应,导致脂质过氧化和DNA损伤。

运动康复属于IS辅助康复治疗,其神经保护作用与自噬调控密切相关 [18-20]。不同形式的康复干预可通过特异性激活自噬通路发挥神经保护作用。ZHAO等 [18] 研究显示:跑步训练通过激活TFEB蛋白,双向调控AMPK-mTOR和AMPK-叉头框蛋白O3a(forkhead box O3a, FOXO3a)-S期激酶相关蛋白2(S-phase kinase-associated protein 2, SKP2)-辅激活蛋白关联的精氨酸甲基转移酶1(coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CARM1)信号网络,显著增强自噬活性,进而减轻神经炎症和氧化应激损伤;ZHANG等 [19] 研究显示:头部针灸通过精细调节自噬-凋亡平衡,有效维持血脑屏障完整性,为临床溶栓治疗提供了更宽的时间窗。本研究采用EE干预,通过激发实验大鼠的自主探索行为,不仅可促进星形胶质细胞分泌白细胞介素17A(interleukin-17A, IL-17A)以刺激血管新生,更能显著改善IS后的长期认知功能。本研究结果进一步揭示:EE干预显著提升大鼠缺血脑组织中LC3-II/LC3-I比值及Beclin-1等自噬标志蛋白表达,同步抑制促炎因子释放和氧化应激产物积累。CQ通过升高溶酶体pH值阻断自噬体降解 [20]。本研究使用自噬抑制剂CQ后,EE的神经保护效应被显著逆转,证实EE发挥抗IS作用与自噬信号通路相关。上述发现为理解EE发挥神经保护作用的分子机制提供了新的实验依据,也为临床康复方案的优化提供了理论支持。

TFEB是调控自噬-溶酶体通路的核心转录因子,通过协调自噬体形成和溶酶体生成维持细胞内稳态<sup>[19]</sup>。为阐明EE通过TFEB依赖的途径激活自噬,本研究采用shRNA技术特异性沉默TFEB基因表达。已有研究<sup>[21]</sup>表明:在神经元中过表达TFEB可通过增强溶酶体功能显著改善永久性缺血性卒中模型(即使缺血持续48h)的神经损伤。运动预处理可以通过促进TFEB核转位,增强自噬活性,进而减轻神经炎症和氧化应激<sup>[17]</sup>。上述研究提示:EE诱导的TFEB活化可能成为IS损伤治疗的新靶点。本研究结果显示:IS+EE+sh-TFEB组大鼠脑缺血组织中Beclin-1蛋白表达水平和LC3-II/LC3-I比值较IS+EE+sh-NC组明显降低,并完全逆转EE对神经功能的改善作用。上述结果进一步证实:TFEB介导的自噬激活是EE发挥神经保护作用的关键分子机制。

综上所述,在本研究条件下,EE对IS大鼠存在明显的改善作用,其作用机制主要通过提高TFEB蛋白表达,发挥自噬激活作用,达到减轻炎症反应和氧化应激反应,实现抗IS损伤作用。

#### 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:

朱慧艳参与实验操作和论文撰写,陈敏参与数据收集和分析,李金贤参与实验操作和数据收集,李春丽参与研究设计和论文审核。

#### [参考文献]

- [1] LI M X, LIU Y, CHEN J P, et al. Platelet bio-nanobubbles as microvascular recanalization nanoformulation for acute ischemic stroke lesion theranostics[J]. *Theranostics*, 2018, 8(18):4870-4883.
- [2] FRANKE M, BIEBER M, KRAFT P, et al. The NLRP3 inflammasome drives inflammation in ischemia/reperfusion injury after transient middle cerebral artery occlusion in mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 92: 223-233.
- [3] HE T T, LI W L, SONG Y Y, et al. Sestrin2 regulates microglia polarization through mTOR-mediated autophagic flux to attenuate inflammation during experimental brain ischemia[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):329.
- [4] ZHENG X Y, LIN W J, JIANG Y M, et al. Electroacupuncture ameliorates beta-amyloid pathology and cognitive impairment in Alzheimer disease via a novel mechanism involving activation of TFEB (transcription factor EB)[J]. *Autophagy*, 2021, 17(11):3833-3847.
- [5] IYASWAMY A, WANG X L, KRISHNAMOORTHIS, et al. Theranostic F-SLOH mitigates Alzheimer's disease pathology involving TFEB and ameliorates cognitive functions in Alzheimer's disease models[J]. *Redox Biol*, 2022, 51:102280.
- [6] JIA P J, WANG J M, REN X H, et al. An enriched environment improves long-term functional outcomes in mice after intracerebral hemorrhage by mechanisms that involve the Nrf2/BDNF/glutaminase pathway[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2023, 43(5):694-711.
- [7] GEBRIE A. Transcription factor EB as a key molecular factor in human health and its implication in diseases[J]. *SAGE Open Med*, 2023, 11: 20503121231157209.
- [8] FANG L M, LI B, GUAN J J, et al. Transcription factor EB is involved in autophagy-mediated chemoresistance to doxorubicin in human cancer cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(9): 1305-1316.
- [9] XIA Q, ZHENG H F, LI Y, et al. SMURF1 controls the PPP3/calcineurin complex and TFEB at a regulatory node for lysosomal biogenesis[J]. *Autophagy*, 2024, 20(4): 735-751.
- [10] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [11] BUCKLEY K M, HESS D L, SAZONOVA I Y, et al. Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAO, and embolic MCAO, murine models of stroke[J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2014, 6: 8.
- [12] ZHAO Y, YING X W, PANG X X, et al. Exercise-induced Sesn2 mediates autophagic flux to alleviate neural damage after ischemic stroke in mice[J]. *Exp Neurol*, 2025, 386: 115174.
- [13] 朱东亚. 卒中治疗药物或治疗方法临床前评价的动物模型[J]. *中国卒中杂志*, 2017, 12(8): 735-741.
- [14] TANG J Z, LU L N, YUAN J B, et al. Exercise-induced activation of SIRT1/BDNF/mTORC1 signaling pathway: a novel mechanism to reduce neuroinflammation and improve post-stroke depression[J]. *Actas Esp Psiquiatr*, 2025, 53(2): 366-378.
- [15] 宋心雨, 孙正, 李跃华. 比较基于CT图像的纹理分析与临床评分在预测急性缺血性脑卒中出血性转化中的价值[J]. *介入放射学杂志*, 2024, 33(3): 230-235.
- [16] PAN J, CHAI X, LI C, et al. *Eucommia ulmoides* oliv.

- bark extracts alleviate MCAO/reperfusion-induced neurological dysfunction by suppressing microglial inflammation in the gray matter[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(4): 1572.
- [17] LU X C, ZHANG J, DING Y, et al. Novel therapeutic strategies for ischemic stroke: recent insights into autophagy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3450207.
- [18] ZHAO Y, HONG Z Q, LIN Y, et al. Exercise pretreatment alleviates neuroinflammation and oxidative stress by TFEB-mediated autophagic flux in mice with ischemic stroke[J]. *Exp Neurol*, 2023, 364:114380.
- [19] ZHANG Z H, LU T L, LI S S, et al. Acupuncture extended the thrombolysis window by suppressing blood-brain barrier disruption and regulating autophagy-apoptosis balance after ischemic stroke[J]. *Brain Sci*, 2024, 14(4):399.
- [20] WANG Y Q, ZHANG S S, NI H L, et al. Autophagy is involved in the neuroprotective effect of nicotiflorin[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 278:114279.
- [21] LIU Y Y, XUE X, ZHANG H T, et al. Neuronal-targeted TFEB rescues dysfunction of the autophagy-lysosomal pathway and alleviates ischemic injury in permanent cerebral ischemia[J]. *Autophagy*, 2019, 15(3):493-509.