

文章编号: 1005-0957 (2024) 04-0464-09

· 综述 ·

基于自噬机制探讨电针预处理干预脑缺血再灌注损伤的研究进展

段飒飒^{1,2}, 韩林^{1,2}, 李盼^{1,2}, 侯婕^{1,2}

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193; 2. 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300193)

【摘要】 自噬是一条溶酶体代谢途径, 在饥饿、缺氧、营养缺乏等应激条件下被激活, 可以清除受损细胞内细胞器和错误折叠的蛋白质, 对细胞生存、分化、发育及内环境稳态至关重要。电针预处理主要通过调节自噬的相关通路和蛋白来改善缺血缺氧状态、抗氧化应激、清除线粒体损伤、抗内质网应激、减轻炎症反应, 从而干预脑缺血/再灌注损伤(cerebral ischemia/reperfusion injury, CI/RI)。该文回顾了 CI/RI 中激活自噬的病理因素及自噬对 CI/RI 的双向调节作用, 总结了电针预处理调节自噬干预 CI/RI 的国内外研究及电针预处理的相关参数, 以期临床推广运用电针预处理治疗缺血性脑卒中提供实验依据。

【关键词】 电针; 自噬; 脑缺血/再灌注损伤; 脑缺血; 卒中; 综述

【中图分类号】 R246.6 **【文献标志码】** A

DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2023.13.0037

缺血性脑卒中(cerebral ischemic stroke, CIS) 又称“脑梗死”, 是由脑血管病变、脑动脉阻塞或血流供应中断等原因引起局部脑组织缺氧、缺血性坏死, 继而导致机体神经功能紊乱的临床疾病^[1]。脑缺血/再灌注损伤(cerebral ischemia/reperfusion injury, CI/RI) 是临床治疗 CIS 的重点及难点, 即缺血至再次恢复血液供应后, 其组织损伤反而不能恢复, 还会出现不可逆的脑功能障碍, 致使脑细胞进一步死亡的病理过程^[2]。自噬机制作为细胞死亡机制被 CI/RI 激活后, 可与其他细胞死亡途径相互联系并互相影响, 为开发新的 CIS 临床治疗提供新靶点^[3]。近年来, 预防 CIS 的发生发展逐渐受到关注, 电针预处理诱导脑缺血耐受成为预防 CIS 的新思路, 体现出中医学“治未病”的特色理念^[4]。有报道^[5-7]显示, 电针预处理可通过调节自噬相关信号通路和蛋白干预脑缺血/再灌注损伤。笔者基于自噬机制, 对电针预处理干预 CI/RI 机制的研究进展进行综述, 旨在进一步明晰电针预处理治疗 CIS 的内在机制。

1 自噬与 CI/RI 的关系

1.1 CI/RI 激活自噬的病理因素

CI/RI 是指大脑缺血缺氧一段时间后血流再通, 体内的氧自由基等有害物质集聚所致的损伤^[4]。脑缺血后最先引起受损神经细胞的氧糖剥夺, 继而在 CI/RI 发展过程中导致了严重的应激反应和一系列代谢紊乱诱导的病理变化, 包括能量衰竭、钙离子(Ca^{2+}) 浓度增加、兴奋性毒性、细胞凋亡、氧化应激和神经炎症^[8-9]。兴奋性损伤是脑缺血后损伤神经细胞内最快发生的病理变化, 但目前无证据表明兴奋性损伤可直接影响自噬的激活^[10]。在脑缺血及之后的一段时间内, 损伤的神经细胞可通过线粒体及死亡受体依赖的途径发生凋亡, 激活自噬对损伤的线粒体进行清除, 减少神经细胞凋亡^[11-12]。线粒体大量损伤还会导致脑内氧化与抗氧化平衡失调, 继而引发氧化应激, 其中损伤线粒体琥珀酸脱氢酶是活性氧(reactive oxygen species, ROS) 的重要来源^[13]。氧化应激也被认为是激活自噬的关键因素之一, 可以通过多种机制诱导自噬活化^[14-15]。

基金项目: 天津市自然科学基金项目(18JCYBJC92300)

作者简介: 段飒飒(1997—), 女, 2021 级硕士生, Email: 18638398983@163.com

通信作者: 韩林(1981—), 男, 副主任医师, 硕士生导师, Email: tjhanlin@163.com

另外, CI/RI 引起神经炎症分泌炎症因子, 特定的炎症因子、炎症小体也可激活自噬^[10]。总之, 这些证据显示, 在脑缺血损伤的缺血/再灌注过程中, 多种病理因素都可激活自噬。

1.2 自噬对 CI/RI 的“双向”调节作用

近年来, 大量动物实验证明自噬参与了脑缺血病理损伤的过程。SHENG R 等^[16]使用自噬调节剂对脑缺血大鼠进行预处理, 通过观察脑梗死面积、脑水肿程度的变化, 证明自噬对缺血性脑损伤的神经细胞具有保护作用。YANG Y 等^[17]发现雷公藤甲素也是通过上调自噬水平而实现对局灶脑缺血大鼠的神经保护作用。

也有学者通过实验研究证明, 自噬会加重脑缺血损伤。GAO L 等^[18]在大鼠缺血后适应模型中使用雷帕霉素诱导自噬, 发现雷帕霉素抑制了缺血后适应诱导的脑保护作用。ZHENG Y Q 等^[19]运用核糖核酸干扰技术(ribonucleic acid interference, RNAi), 采用侧脑室注射连接有 Beclin-1 干扰片段的慢病毒载体技术, 通过下调自噬相关分子 Beclin-1 表达起到改善大鼠脑缺血损伤。另外, 也有实验证明过度的自噬能诱导神经细胞死亡。CHEN Y 等^[20]发现, 如果自噬破坏细胞质或者细胞器超过一定的阈值, 自噬性细胞就会死亡。

自噬对脑缺血损伤的“双向”调节作用证明自噬是一把双刃剑, 能够通过对细胞内有害成分的清除及再利用来促进细胞存活; 又能够降低 CI/RI 的耐受性, 超过细胞适应能力的持续过度自噬甚至会导致细胞死亡^[21]。

2 电针预处理调节自噬改善脑缺血/再灌注损伤

2.1 调节自噬改善缺血缺氧状态

哺乳类动物体内唯一的雷帕霉素蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可分为直接接受细胞能量和营养状态的调节的 mTORC1 和不受细胞活力影响的 mTORC2, 前者负责调节自噬和蛋白质合成^[22]。在脑缺血发生后, 葡萄糖和生长因子的缺乏降低了磷酸肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway, PI3K/Akt)通路的活性, 进而抑制了下游 mTORC1 的活性, 诱导了自噬通路^[23]。连续电针预处理百会穴 5 d, 可上调 Akt 的磷酸化水平, 在缺血再灌注早期上调 PI3K/Akt 通路进而抑制自噬^[24], 防止进一步的损伤。

mTOR 蛋白激酶上游的 TSC1/TSC2 复合物能够抑制 mTOR 的活性。受损神经细胞的缺血缺氧的状态激活 Wnt β -连环蛋白(β -catenin)信号通路, 促进 TSC1/TSC2 复合物形成以减少 mTOR 的降解, 从而抑制自噬的发生^[25]。CHEN C 等^[26]发现, 在手术前 2 h 进行电针预处理百会穴 30 min 可抑制糖原合成酶激酶-3 β (glycogensynthasekinase-3 β , GSK3 β), 经 Wnt 通路抑制自噬, 从而诱导对脑缺血的耐受。

通过电针预处理“百会”可以调节自噬相关的 PI3K/Akt-mTORC1、Wnt-GSK3 β -TSC1/TSC2-mTOR 信号通路, 从而改善缺血缺氧状态。

2.2 调节自噬抗氧化应激

脑缺血再灌注损伤介导了氧化应激的发生, 而氧化应激也进一步加剧了脑缺血再灌注损伤。SIRT1-FOXO1 通路与脑缺血再灌注损伤后的氧化应激密切相关。在氧化应激条件下, 乙酰 FOXO1(Ac-FOXO1)在细胞质中的表达增加, 并与自噬必需分子基因 7(Atg7)相互作用, 以激活自噬^[27-28]。有研究表明连续电针预处理百会、曲池和足三里穴 5 d, 能够抑制中脑动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠脑内 Ac-FOXO1 和 Atg7 的表达水平, 减弱 Ac-FOXO1 和 Atg7 的相互作用, 提高 SIRT1 和 FOXO1 的水平, 激活 SIRT1-FOXO1 信号通路从而抑制自噬, 保护神经元细胞免受氧化应激加重的脑缺血再灌注损伤^[29]。

p53 是一种应激信号蛋白, 受到氧化应激刺激后被激活^[30], 可对自噬进行调节。研究显示, p53 在胞内的位置不同, 参与自噬的方式完全相反, 胞核 p53 可通过转录效应引起自噬, 而胞质 p53 是自噬的主要抑制因子^[31-32]。正常生理环境下 p53 位于细胞质^[33], 缺氧诱导的缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor, HIF-1 α)可以稳定 p53 蛋白, 激活自噬^[34]。李雪静等^[35]使用电针预处理百会穴, 每周 5 次, 2 周后制作脑缺血再灌注模型, 发现再灌注 2 h 时, 电针预处理组和模型组的 p53 蛋白水平无统计学差异, 这可能是因为此时不同位置的 p53 蛋白发挥的不同作用, 各自表达的程度也不同; 而再灌注 72 h 时, 电针预处理组 p53 蛋白水平较模型组降低、脑细胞凋亡数也明显降低, 从而表明电针预处理可通过下调 p53 蛋白的表达, 抑制自噬水平, 起到脑保护作用。

核因子 NF-E2 相关因子 2(nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2)是氧化应激转录调控蛋

白^[36]。生理状态下, Nrf2 在细胞质中表达量在较低水平, 活性氧或亲电性化合物等氧化应激刺激能够启动 Nrf2 诱导多个抗氧化酶表达, 增强细胞清除 ROS 的能力, 是抗氧化应激的关键防御机制之一^[37]。在应激状态下, 自噬蛋白 p62 可以在蛋白激酶的作用下发生磷酸化, 并解除 Nrf2 和其抑制剂 Keap1 结合, 激活 Nrf2 下游相关基因表达^[38]。免疫共沉淀和蛋白质谱证明自噬适配器蛋白 p62 与 Nrf2 可相互作用^[39], 进而调控自噬^[40]。动物实验研究证明, 在局灶性脑缺血再灌注模型中检测自噬以及 Nrf2 通路下游的标志物, 结果显示 p62 蛋白表达先升高后降低, 与 Nrf2 下游靶抗氧化基因 H0-1 的表达一致, 表明自噬和 Nrf2 途径的同步激活, 推测 p62 可以通过调节 Nrf2/H0-1 信号通路来改善脑缺血再灌注损伤^[41]。还有学者^[42]事先给予小鼠连续 5 d 电针百会, 结果发现脑缺血再灌注损伤后, 电针预处理组海马核蛋白 Nrf2 及 H0-1 表达上调, 电镜下观察海马组织间质水肿明显减轻, 神经元变性明显减轻, 且神经行为学评分降低。

单一选穴百会穴或百会穴配伍曲池和足三里穴进行电针预处理, 均可在氧化应激时调节自噬相关的 p53 蛋白或 SIRT1-FOXO1 信号通路保护神经元, 减轻脑缺血再灌注损伤。目前已经证明电针预处理可以调节氧化应激的 Nrf2/H0-1 信号通路, 在未来需要与自噬指标 p62 蛋白一起进行验证。

2.3 调节自噬清除线粒体损伤

脑缺血再灌注损伤导致显著的线粒体损伤, 线粒体受损时, 自行裂变形成无损和受损 2 个线粒体, 无损线粒体与其他无损线粒体正常融合, 受损线粒体不能与其他线粒体融合进而自噬系统选择性清除, 即线粒体自噬^[43-44]。

Beclin1 是自噬启动的标志物, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 与 Beclin1 的 BH3 结构域结合形成复合物^[45]。Bcl-2/Beclin1 复合物能够保证自噬水平维持在生理稳态范围内, 防止过度自噬导致的细胞死亡^[46]。BNIP3(Bcl2/腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3, 19kDa) 也具有 BH3 结构域^[47]。脑缺血再灌注损伤后大量线粒体受损, HIF-1 上调 BNIP3, BNIP3 从 Bcl-2/Beclin1 复合物中置换 Beclin1, 增加游离 Beclin-1 的水平, 从而启动线粒体自噬^[48-49]。有研究^[50]表明, 以 1 mA 强度、2 Hz/15 Hz 频率电针预处理百会可明显上调 Bcl-2 蛋白的表达, 增强 Bcl-2/Beclin1 相互作用, 抑制 Beclin1 诱发自噬,

从而发挥神经功能保护作用。

Beclin1 与不同蛋白形成的复合物对自噬具有不同的调控作用, 其中 Bcl-2 家族成员与 Beclin1 的相互作用可以抑制自噬活性, 而 Vps34 与 Beclin1 的相互作用可以增强自噬^[51]。单磷酸腺苷活化蛋白激酶 [adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK] 为细胞内重要的代谢和应激感受器, 是自噬的关键调控蛋白, 通过直接或间接方式调控下游的信号通路来维持氧化还原平衡, 其对细胞的自噬、增殖、凋亡、极化等有调节作用^[52]。线粒体损伤导致能量缺乏的时候, 单磷酸腺苷与三磷酸腺苷的比值增高, AMPK 被激活^[53]。实验研究^[6]证明, 选用百会穴以 0.5 mA 强度、3/15 Hz 频率电针预处理后的脑缺血再灌注大鼠, 脑梗死面积明显降低, 且脑水肿区的脑组织的 p-AMPK、Beclin1 蛋白表达较模型组低, Beclin1 与 Vps34 的相互作用较模型组减少, 提示电针预处理可通过抑制 AMPK-Beclin1/Vps34 通路以减少自噬激活, 从而发挥神经保护作用。

另外, AMPK 作为 mTOR 的上游标志物, 能够磷酸化 unc-51 样激酶 1 (UNC-51-like kinase 1, ULK1) 来启动自噬^[54-55]。当细胞处于饥饿条件下, ULK1 除发生自身磷酸化外, 还可进一步磷酸化 FIP200 及 mAtg13 的激活性磷酸化位点, 使其再反馈激活 ULK1, 从而促进自噬^[56-57]。含有 FUN14 结构域包含蛋白 1 (FUN14 domain containing 1, FUNDC1) 在缺氧诱导的线粒体自噬中也发挥了重要作用^[58]。目前研究结果提示, FUNDC1 介导的线粒体自噬可能通过清除损伤线粒体, 从而减轻缺血损伤^[59]。电针预处理可改善脑缺血再灌注损伤诱导的线粒体结构异常, 恢复线粒体的正常膜电位。相关研究^[60]结果显示, 相对于模型组, 电针预处理组 2 Hz/50 Hz 百会穴联合水沟穴可下调 p-ULK1、FUNDC1 的蛋白表达, 同时上调 p-mTORC1 的蛋白表达, 表明电针预处理通过激活 mTORC1 来抑制 mTOR-ULK1/FUNDC1 通路, 从而启动线粒体自噬。

电针预处理作为干预手段, 可针对同一穴位调整不同的电针强度、频率, 来达到对线粒体自噬相关的 Bcl-2/Beclin1 复合物、AMPK-Beclin1/Vps34 信号通路、AMPK-mTOR-ULK1 的调节, 从而抗脑缺血再灌注损伤。

2.4 调节自噬抗内质网应激

多项研究表明, 内质网应激有助于激活自噬^[61]。脑

缺血再灌注损伤可引起 ER 应激, 激活未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR)。错误折叠的蛋白可被降解, 未折叠的蛋白主要由自噬途径进行清理^[62]。UPR 一个主要途径是通过蛋白激酶 r 样内质网激酶 [protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum (ER) kinase, PERK] 使真核翻译起始因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α) 磷酸化, 随后上调激活自噬转录因子 4 的翻译, 间接参与自噬调控^[21, 63]。据 FENG D 等^[64]研究显示, 通过抑制 ER 应激-自噬轴, 可改善缺血性脑卒中引起的急性神经元损伤。电针预处理百会穴能够抑制小鼠海马 PERK 表达, 减轻内质网 (ER) 应激, 从而减轻小鼠脑缺血再灌注损伤^[65]。

在脑缺血再灌注损伤导致 ER 应激的条件下, Ca^{2+} 可以通过内质网钙通道中的肌醇 1, 4, 5-三磷酸受体释放^[66]。大量 Ca^{2+} 从内质网释放会刺激 AMPK 磷酸化然后抑制 mTOR, 从而诱导细胞自噬^[67]。使用钙影像检测细胞内相对 Ca^{2+} 浓度发现, 电针预处理百会和大椎穴可明显降低细胞内 Ca^{2+} 浓度^[68]。有研究^[69]认为电针预处理百会发挥与 AMPK 激活剂相同的作用, 可促进脑缺血再灌注小鼠脑内 AMPK 的表达, 降低小鼠全脑缺血再灌注损伤, 具有脑保护的作用。

可保护脑缺血再灌注损伤的自噬机制与内质网应激有交互作用的部分, 如 PERK-eIF2 α 信号通路、caMKK-AMPK-mTOR 信号通路。电针预处理百会可以调节这些相关通路和蛋白, 目前还缺少与自噬标志物一起验证的实验研究。

2.5 调节自噬减轻炎性级联反应

脑缺血再灌注损伤后产生炎性级联反应, 在炎症反应过程中涉及多条信号通路及通路上下游信号分子蛋白。现有研究证明抑炎因子白细胞介素 (interleukin, IL)-10 和炎症小体 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 可能通过激活自噬从而保护脑缺血再灌注损伤。IL-10 通过抑制 PI3K/Akt-mTOR 途径来激活自噬, 还需要使用 mTOR 抑制剂进一步来证实^[70]。

NLRP3 主要在脑内皮细胞和小胶质细胞中表达^[71], NLRP3 炎症小体可以以 MAPK 依赖性方式在脑内皮中激活, 随后释放活性 IL-1 β 细胞因子^[72]。在最新研究中, 王卓等^[73]使用 NLRP3 基因敲除型小鼠, 采用 MCAO 方式

制造脑缺血再灌注损伤模型, 结果显示 NLRP3 敲除型造模组与野生型造模组相比神经功能评分明显降低, 脑血流灌注明显增加, 脑梗死体积明显减少; 与 NLRP3 敲除型假手术组相比, NLRP3、Beclin1、IL-1 β 表达上调。该研究证明 NLRP3 敲除可通过抑制自噬从而减轻脑缺血再灌注损伤。何宇航等^[74]研究显示经过电针预处理的大鼠脑梗死体积减小, 脑组织神经元 NLRP3 和 IL-1 β 的表达下调, 证明了电针预处理百会能够通过下调神经元 NLRP3 的表达, 从而减轻大鼠脑缺血再灌注损伤。

目前已知自噬与炎性级联反应中的 IL-10 抑炎因子、NLRP3 炎症小体能够相互影响, 起到抗脑缺血再灌注损伤的作用, 但缺少以电针预处理为干预方式、同时验证自噬标志物和炎症指标的相关实验研究。

2.6 调节自噬流

微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 是酵母自噬相关基因 Atg8 的哺乳动物同源类似物, 存在两种可以互相转换的形式, 分别为 LC3-II 和 LC3-I^[75]。LC3-II 被认为是自噬体形成的标志, 与自噬体的形成有着密切的关系。随着自噬体膜的不断增多, LC3-II 的数目和 LC3-II/I 的比例与自噬体的数量呈正比, 在一定程度上反应了自噬的活性^[76]。p62 是一种自噬多功能的泛素结合蛋白底物, 与 LC3 相互作用被整合到完整的自噬小体中, 并在自噬溶酶体中降解, 因此可作为自噬降解的指标^[77]。黄亚光等^[7]最先表示既检测 LC3 又检测 p62 才能体现自噬的完全性, 电针预处理大鼠神经功能缺损评分明显降低且脑梗死体积显著减小, 皮层缺血区 LC3-II/LC3-I 显著降低, p62 的表达显著上调。最新研究^[78]表明, 检测 Beclin1、LC3-II/LC3-I 及 p62 表达水平能更加完整地评价自噬流。

关于自噬流的定义正在不断地完善, 逐步完整的揭示自噬的发展过程有利于实验研究的深入。

3 电针预处理 CI/RI 的选穴规律及参数

3.1 选穴规律

对腧穴的选择与配伍是电针预处理发挥抗 CI/RI 作用的关键。选取电针预处理防治 CI/RI 的 54 篇动物实验研究论文中, 高达 38 篇文献选用单一腧穴 (百会穴), 其余选用相关配穴。陈怀龙等^[79-80]研究选择百会穴联合大椎穴, 在模型建立前连续 5 d 电针刺激, 于再

灌注 6 h、12 h、24 h、48 h 处死大鼠,取脑海马组织进行蛋白质检测、苏木精-伊红染色及 TUNEL 染色,证明了电针预处理通过减轻大鼠海马区内质网应激有关,对缺血再灌注大鼠有显著的脑保护作用。陈思佳等^[81]选择同样的穴位,在造模前 2 h 对电针大鼠进行一次干预,结果显示电针预刺激使大鼠大脑皮层缺血半暗带 YAP 表达增加,而梗死面积、大脑皮层缺血半暗带凋亡指标及炎性指标水平均降低。预电针百会和大椎穴对脑保护作用可能是通过减轻内质网应激、细胞凋亡和炎性反应实现的。ZHANG B Y 等^[82]研究表明,预电针百会、内关和三阴交穴可改善脑缺血时产生最快且进展快到无法在脑缺血后干预的病理改变,即谷氨酸诱导的兴奋性毒性。电针预处理的神经保护作用可能不能通过调节胞外谷氨酸浓度实现。电针预处理可调节谷氨酸的促凋亡 GluN2B/m-钙蛋白酶/p38MAPK 途径,既可在最上游终止缺血诱导的神经元兴奋毒性,又能抑制神经元凋亡路径的下游。

选穴的方法及优势需要对比体现。在 LONG M 等^[83-84]的研究中,多次使用“标本配穴”法研究电针预处理对 CI/RI 模型的影响。选取百会穴为标,双侧肾俞和三阴交穴为本,且进行了电针组间比较^[85],证明了标本配穴组抗氧化损伤能力明显优于常规配穴组。郑仕平^[86]比较电针和艾灸预处理相同穴位百会、风府和大椎穴,与艾灸预处理组相比,电针预处理组 miRNA290、miRNA494 相对表达量显著提高,AQP4 相对表达量降低更明显。电针预处理诱导脑缺血耐受,减轻脑水肿,实现的脑保护作用比艾灸预处理的效果更佳。

3.2 选穴参数

目前电针预处理防治 CI/RI 模型的相关参数有一定趋势,其中波形、电针频率、强度大多集中在疏密波、2 Hz/15 Hz、1 mA^[7],而差异主要集中在单次电针时间、介入时程上。共有 46 篇研究选用单次连续电针 30 min 的方式,而全爱君等^[87]设计了有节律的电针方法,电针 10 min 停 5 min 为 1 组,每日连续 4 组。陈丽平^[88]设计 7 d 和 15 d 的两组不同预电针时程,电针大鼠百会、内关穴,频率 2 Hz/15 Hz,强度 1 mA,留针 30 min。结果表明电针预处理 7 d 和 15 d 均能降低可抑制血脑屏障 MMP-9 阳性细胞及 MMP-9mRNA、VEGF mRNA 的表达,以 15 d 电针预处理效果为佳。

4 讨论

近年来国内外对于自噬机制的研究主要从自噬的分类和自噬在心脑血管病中的作用为切入点,主要集中在两个大方面,适度自噬对心脑血管功能恢复具有重要作用,自噬与氧化应激、线粒体损伤、内质网应激、炎症等机制的交互作用。电针预处理作为一种用于治疗疾病的方式,其诱导的适度自噬对于治疗脑卒中疾病有重要意义,其内在机制也是研究的热点。电针预处理可以通过 PI3K/Akt-mTORC1、Wnt-GSK3 β -TSC1/TSC2-mTOR 信号通路改善缺血缺氧状态,SIRT1-FOXO1 信号通路、P53 蛋白保护细胞免受氧化应激反应的损伤,以及 Bcl-2/Bcl-1 复合物、AMPK-Bcl-1/Vps34 信号通路、AMPK-mTOR-ULK1 信号通路促进线粒体自噬。也有未完全验证的机制,如 Nrf2/HO-1-p62 信号通路、PERK-eIF2 α 信号通路、caMKK-AMPK-mTOR 信号通路、IL-10 抑炎因子、NLRP3 炎症小体。此外,关于自噬流的定义也在逐步完善中。

预防灸“治未病”历史悠久,可激发人体正气,增强抗病能力,防止疾病发生发展^[89]。电针预处理是缺血预适应措施中的一种,指在随后长期的或致命性的缺血损伤之前,事先对靶器官进行一次或多次短暂性缺血适应,从而增强机体对随后发生的长时间致死性缺血的耐受,包括大脑、心脏、肾脏等器官都可从中受益^[90]。与脑卒中后的针刺治疗相比,预电针在疾病发生的前、中、后均起到良好的影响作用,具有预防脑血管病、减轻缺血性脑损伤、延长治疗时间窗的优势。

当前阶段,动物实验研究已经证实,电针预处理诱导的适度自噬对于治疗脑卒中疾病有重要意义,但在临床研究及临床应用规范上仍有许多问题需要进一步解决。如电针预处理临床研究的纳入标准,是否可以联合现代预防医学设计相关评分标准,用于筛选预防脑卒中的重点人群;电针预处理干预的最佳时程和条件参数与延长治疗时间窗的关系等。未来的研究如果能够明确电针预处理诱导自噬的完整机制结构和确切的电针参数等问题,将会为脑卒中针刺预防和康复方案的制定提供重要的证据。

参考文献

- [1] KALLADKA D, SINDEN J, POLLOCK K, *et al.* Human neural stem cells in patients with chronic ischaemic stroke (PISCES): a phase 1, first-in-man study[J]. *Lancet*,

- 2016, 388(10046):787-796.
- [2] 王宇, 包烨华, 王哲, 等. 眼针干预脑缺血再灌注损伤的分子机制研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(8): 245-249.
- [3] 石晓花, 莽靖, 徐忠信. 脑缺血再灌注损伤细胞死亡模式的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 48(6):1635-1643.
- [4] 赵婧. 缺血预处理提高脑缺血耐受的研究进展[J]. 老年医学研究, 2020, 1(2):51-53.
- [5] 姚书琦, 易玮, 刘荣, 等. 近 5 年电针预处理及电针治疗脑缺血大鼠的机制研究进展[J]. 针刺研究, 2019, 44(5):383-387.
- [6] 冯刚, 封蔚彬, 青云, 等. 电针预处理通过抑制 AMPK-Beclin1/Vps34 通路介导的细胞自噬减轻脑缺血再灌注损伤[J]. 重庆医科大学学报, 2020, 45(12):1762-1769.
- [7] 黄亚光, 杨松柏, 杜利鹏, 等. 电针预处理通过调控皮层区自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. 针刺研究, 2019, 44(12):867-872.
- [8] STANZIONE R, COTUGNO M, BIANCHI F, *et al.* Pathogenesis of ischemic stroke: role of epigenetic mechanisms[J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(1):89.
- [9] KURIAKOSE D, XIAO Z. Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20):7609.
- [10] 李玥, 郑婉晴, 潘玲, 等. 自噬在缺血性脑卒中过程中的作用及其调节机制研究进展[J]. 中国科学:生命科学, 2023, 53(1):19-29.
- [11] SONG M, ZHOU Y, FAN X. Mitochondrial quality and quantity control: mitophagy is a potential therapeutic target for ischemic stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(5):3110-3123.
- [12] SHEN Z, ZHENG Y, WU J, *et al.* PARK2-dependent mitophagy induced by acidic postconditioning protects against focal cerebral ischemia and extends the reperfusion window[J]. *Autophagy*, 2017, 13(3):473-485.
- [13] CHOUGHANI E T, PELL V R, GAUDE E, *et al.* Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS[J]. *Nature*, 2014, 515(7527):431-435.
- [14] 高婷, 王子旭, 陈祝茗, 等. ROS 介导的氧化应激与自噬[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(3):656-662.
- [15] FILOMENI G, DE ZIO D, CECCONI F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs[J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(3):377-388.
- [16] SHENG R, ZHANG L S, HAN R, *et al.* Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning[J]. *Autophagy*, 2010, 6(4):482-494.
- [17] YANG Y, GAO K, HU Z, *et al.* Autophagy upregulation and apoptosis downregulation in DAHP and triptolide treated cerebral ischemia[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015:120198.
- [18] GAO L, JIANG T, GUO J, *et al.* Inhibition of autophagy contributes to ischemic postconditioning-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia in rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):E46092.
- [19] ZHENG Y Q, LIU J X, LI X Z, *et al.* RNA interference-mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(7):919-927.
- [20] CHEN Y, KLIONSKY D J. The regulation of autophagy-unanswered questions[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 2):161-170.
- [21] WANG P, SHAO B Z, DENG Z, *et al.* Autophagy in ischemic stroke[J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 163-164:98-117.
- [22] 张新颖, 毛景东, 杨晓燕, 等. AMPK/mTOR 信号通路的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(3):109-116.
- [23] PEREZ-ALVAREZ M J, VILLA G M, BENITO-CUESTA I, *et al.* Role of mTORC1 controlling proteostasis after brain ischemia[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12:60.
- [24] 何二涛, 张霞婧, 马磊, 等. PI3K/Akt 通路在电针预处理诱导脑缺血耐受中的机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(7):1215-1218.
- [25] 谢明. 雷帕霉素在大鼠脑缺血再灌注损伤后调控自噬与 Wnt/ β -catenin 信号通路发挥神经保护作用机理的研究[D]. 贵阳:贵州医科大学, 2021.
- [26] CHEN C, YU Q, XU K, *et al.* Electroacupuncture pretreatment prevents ischemic stroke and inhibits Wnt

- signaling-mediated autophagy through the regulation of GSK-3 β phosphorylation[J]. *Brain Res Bull*, 2020, 158:90–98.
- [27] SHEN M, CAO Y, JIANG Y, *et al.* Melatonin protects mouse granulosa cells against oxidative damage by inhibiting FOXO1-mediated autophagy: implication of an antioxidation-independent mechanism[J]. *Redox Biol*, 2018, 18:138–157.
- [28] HE W, ZHANG A, QI L, *et al.* FOXO1, a potential therapeutic target, regulates autophagic flux, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in human cholangiocarcinoma QBC939 cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45 (4) :1506–1514.
- [29] MEI Z G, HUANG Y G, FENG Z T, *et al.* Electroacupuncture ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the SIRT1-FOXO1 signaling pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (13) :13187–13205.
- [30] LAVIN M F, GUEVEN N. The complexity of p53 stabilization and activation[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13 (6) :941–950.
- [31] MORSELLI E, TASDEMIR E, MAIURI M C, *et al.* Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7 (19) :3056–3061.
- [32] TASDEMIR E, CHIARA M M, MORSELLI E, *et al.* A dual role of p53 in the control of autophagy[J]. *Autophagy*, 2008, 4 (6) :810–814.
- [33] PARK A, KOH H C. NF-kappaB/mTOR-mediated autophagy can regulate diquat-induced apoptosis[J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93 (5) :1239–1253.
- [34] NAVES T, JAWHARI S, JAUBERTEAU M O, *et al.* Autophagy takes place in mutated p53 neuroblastoma cells in response to hypoxia mimetic CoCl₂(2)[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85 (8) :1153–1161.
- [35] 李雪静, 唐强, 叶涛, 等. p53 蛋白在电针预处理改善急性脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能中的作用[J]. *中国康复理论与实践*, 2018, 24 (2) :141–147.
- [36] HU Y, LUO Y, ZHENG Y. Nrf2 pathway and autophagy crosstalk: new insights into therapeutic strategies for ischemic cerebral vascular diseases[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11 (9) :1747.
- [37] YU J, WANG W N, MATEI N, *et al.* Ezetimibe attenuates oxidative stress and neuroinflammation via the AMPK/Nrf2/TXNIP pathway after MCAO in rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:4717258.
- [38] ICHIMURA Y, WAGURI S, SOU Y S, *et al.* Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy[J]. *Mol Cell*, 2013, 51 (5) :618–631.
- [39] 王娇, 张莉, 李颖, 等. 自噬受体蛋白 p62 的表达及功能研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38 (6) :715–719.
- [40] JIANG T, HARDER B, ROJO D L V M, *et al.* p62 links autophagy and Nrf2 signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 88 (PT B) :199–204.
- [41] WANG W, KANG J, LI H, *et al.* Regulation of endoplasmic reticulum stress in rat cortex by p62/ZIP through the Keap1-Nrf2-ARE signalling pathway after transient focal cerebral ischaemia[J]. *Brain Inj*, 2013, 27 (7–8) :924–933.
- [42] 孙晓鹏, 张春光, 王彬, 等. 电针预处理对小鼠脑缺血再灌注时海马 Nrf2/HO-1 信号通路的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2019, 39 (12) :1445–1446.
- [43] LI S, LE W. An insight review of autophagy biology and neurodegenerative diseases: machinery, mechanisms and regulation[J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60 (12) :1457–1459.
- [44] CHEN C, ERLICH A T, CRILLY M J, *et al.* Parkin is required for exercise-induced mitophagy in muscle: impact of aging[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018, 315 (3) :E404–E415.
- [45] PATTINGRE S, TASSA A, QU X, *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy[J]. *Cell*, 2005, 122 (6) :927–939.
- [46] 彭拥军, 乔玉, 李忠仁, 等. 细胞自噬与脑缺血[J]. *中国医药导报*, 2019, 16 (22) :46–49.
- [47] SHENG R, QIN Z H. The divergent roles of autophagy in ischemia and preconditioning[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36 (4) :411–420.
- [48] BELLOT G, GARCIA-MEDINA R, GOUNON P, *et al.* Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29 (10) :2570–2581.

- [49] ZHANG H, BOSCH-MARCE M, SHIMODA L A, *et al.* Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(16):10892-10903.
- [50] 王丽, 陈怀龙, 张云甫, 等. 电针预处理对脑缺血再灌注损伤小鼠海马神经元自噬的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(8):935-938.
- [51] MORRIS D H, YIP C K, SHI Y, *et al.* Beclin 1-VPS34 complex architecture: understanding the nuts and bolts of therapeutic targets[J]. *Front Biol (Beijing)*, 2015, 10(5):398-426.
- [52] 付乐. AMPK-mTOR 信号通路对自噬的影响在小鼠局灶性脑缺血损伤中的作用[D]. 南昌:南昌大学, 2015.
- [53] CHUN Y, KIM J. AMPK-mTOR signaling and cellular adaptations in hypoxia[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18):9765.
- [54] GWINN D M, SHACKELFORD D B, EGAN D F, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint[J]. *Mol Cell*, 2008, 30(2):214-226.
- [55] EGAN D F, SHACKELFORD D B, MIHAYLOVA M M, *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy[J]. *Science*, 2011, 331(6016):456-461.
- [56] GANLEY I G, LAM D H, WANG J, *et al.* ULK1. ATG13. FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(18):12297-12305.
- [57] SUN L, ZHAO M, LIU A, *et al.* Shear stress induces phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells via AMPK/mTOR/ULK1-Mediated autophagy[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(2):541-548.
- [58] LIM Y, RUBIO-PENA K, SOBRASKE P J, *et al.* Fndc-1 contributes to paternal mitochondria elimination in *C. elegans*[J]. *Dev Biol*, 2019, 454(1):15-20.
- [59] CAI Y, YANG E, YAO X, *et al.* FUNDC1-dependent mitophagy induced by tPA protects neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Redox Biol*, 2021, 38:101792.
- [60] TIAN W, ZHU M, ZHOU Y, *et al.* Electroacupuncture pretreatment alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating mitophagy via mTOR-ULK1/FUNDC1 axis in rats[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2022, 31(1):106202.
- [61] FUJITA E, KOUROKU Y, ISOAI A, *et al.* Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II)[J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(6):618-629.
- [62] SEKERDAG E, SOLAROGLU I, GURSOY-OZDEMIR Y. Cell death mechanisms in stroke and novel molecular and cellular treatment options[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2018, 16(9):1396-1415.
- [63] HAN Y, YUAN M, GUO Y S, *et al.* Mechanism of endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia[J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15:704334.
- [64] FENG D, WANG B, WANG L, *et al.* Pre-ischemia melatonin treatment alleviated acute neuronal injury after ischemic stroke by inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent autophagy via PERK and IRE1 signalings[J]. *J Pineal Res*, 2017, 62(3):E12395.
- [65] 陈怀龙, 于媛媛, 张倩, 等. 电针预处理对小鼠脑缺血再灌注时海马蛋白激酶 R 样内质网激酶表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39(1):48-51.
- [66] SU Y, LI F. Endoplasmic reticulum stress in brain ischemia[J]. *Int J Neurosci*, 2016, 126(8):681-691.
- [67] JIANG L B, CAO L, YIN X F, *et al.* Activation of autophagy via Ca^{2+} -dependent AMPK/mTOR pathway in rat notochordal cells is a cellular adaptation under hyperosmotic stress[J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(6):867-879.
- [68] 墙建军, 王林华. 电针预处理对脑缺血再灌注大鼠皮质神经元 TRPC6 表达的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2017, 19(2):8-11.
- [69] 蔚海霞. AKPK 在电针预处理脑缺血/再灌注中的作用[D]. 青岛:青岛大学, 2015.
- [70] MAITI P, PERUZZARO S, KOLLI N, *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 induces autophagy response and promotes neuroprotection in a rat model of TBI[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8):5211-5224.
- [71] YANG F, WANG Z, WEI X, *et al.* NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental

- ischemic stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34(4):660-667.
- [72] PULEO M G, MICELI S, DI CHIARA T, *et al*. Molecular mechanisms of inflammasome in ischemic stroke pathogenesis[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(10):1168.
- [73] 王卓, 张静, 王慧娟, 等. NLRP3 在脑缺血再灌注损伤中的作用及其与自噬的关系[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2022, 43(3):360-365.
- [74] 何宇航, 王强, 江涛, 等. 电针预处理对大鼠脑缺血再灌注时神经元 NLRP3 表达的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2016, 36(3):358-361.
- [75] 张宏, 张慧. 多细胞生物自噬的分子机制和生理功能[J]. *安徽大学学报(自然科学版)*, 2018, 42(5):105-114.
- [76] 李建荣, 蒋晓帆, 张磊, 等. 脑缺血模型中皮层 Sirt3 与自噬蛋白 LC3 表达的相关性[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2018, 17(5):387-390.
- [77] KOMATSU M, ICHIMURA Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(7):1374-1378.
- [78] 刘芙蓉, 张新昌, 蔡笋韵, 等. 针刺调控自噬流拮抗大鼠脑缺血损伤[J]. *针刺研究*, 2022, 47(11):999-1004.
- [79] 陈怀龙, 齐慧, 刘孝洁, 等. 电针预处理对全脑缺血/再灌注损伤大鼠海马葡萄糖调节蛋白 78 表达的影响[J]. *中国针灸*, 2014, 34(9):889-893.
- [80] 陈怀龙, 齐慧, 刘孝洁, 等. 电针预处理对全脑缺血再灌注损伤大鼠海马葡萄糖调节蛋白 78 和生长停滞及 DNA 损伤基因 153 表达的影响[J]. *针刺研究*, 2014, 39(6):431-436.
- [81] 陈思佳, 张安琪, 戴勤学, 等. YAP 在电针预处理改善大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用研究[J]. *中国针灸*, 2021, 41(6):651-656.
- [82] ZHANG B Y, WANG G R, NING W H, *et al*. Electroacupuncture pretreatment elicits tolerance to cerebral ischemia/reperfusion through inhibition of the GluN2B/m-calpain/p38 MAPK proapoptotic pathway[J]. *Neural Plast*, 2020, 2020:8840675.
- [83] LONG M, WANG Z, ZHENG D, *et al*. Electroacupuncture pretreatment elicits neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats associated with transient receptor potential vanilloid 1-mediated antioxidant stress and anti-inflammation[J]. *Inflammation*, 2019, 42(5):1777-1787.
- [84] LONG M, WANG Z, SHAO L, *et al*. Electroacupuncture pretreatment attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through transient receptor potential vanilloid 1-mediated anti-apoptosis via inhibiting NF-kappaB signaling pathway[J]. *Neuroscience*, 2022, 482:100-115.
- [85] 李丹, 陈泽斌, 殷妮娜, 等. “标本配穴”电针预处理抗脑缺血再灌注损伤的效应研究[J]. *湖北中医药大学学报*, 2019, 21(1):14-18.
- [86] 郑仕平. 通督调神针灸预处理对脑缺血再灌注大鼠相关 MIRNAS 调控机制研究[D]. 合肥:安徽中医药大学, 2014.
- [87] 全爱君, 魏巍, 张师伟, 等. 基于 PI3K/AKT 通路探讨电针预处理对脑缺血再灌注损伤的保护作用机制[J]. *针灸临床杂志*, 2021, 37(6):79-83.
- [88] 陈丽平. 百会、水沟穴不同时程电针预处理对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障 MMP-9、VEGF 的影响[D]. 杭州:浙江中医药大学, 2013.
- [89] 章薇. 针灸:在中医“治未病”的引领作用中占主导地位[J]. *中国针灸*, 2018, 38(11):1218.
- [90] LUO C, LI Q, GAO Y, *et al*. Poloxamer 188 attenuates cerebral hypoxia/ischemia injury in parallel with preventing mitochondrial membrane permeabilization and autophagic activation[J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(4):988-998.

收稿日期2023-07-03