



Effects of Electroacupuncture on FUNDC1-LC3 Signaling Pathway in Rats Cerebral Ischemia-reperfusion Injury

Zhou Li^{1*}, Cun Yongdan¹, Zhang Chengcai¹, Kittiphum Ruangravevat², Zhang Pengyue^{1#}

¹ Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Yunnan Province 650500, CHINA

² Mae Fah Luang University, School of Integrative Medicine, Chiangrai 57100, THAILAND

Received June 30th, 2022

Accepted July 11th, 2022

Published July 21st, 2022

*Conference presenter:

Zhou Li

#Corresponding author:

Zhang Pengyue, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 1076 Yuhua Road, Chenggong District, Kunming City, Yunnan Province 650500, China

E-mail: zpy19802000@163.com

© 2022, Li, Z., et al.

This is an Open Access article published under a Creative Commons (CC BY-NC-ND 0.4) license.



ABSTRACT

Objective: To observe the effect of electrotherapy on the FundC1-LC3 signaling pathway in cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI) rats and to explore the mechanism of its intervention on CIRI from the perspective of mitochondrial autophagy.

Methods: 24 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and electroacupuncture group. In the electroacupuncture group, electroacupuncture treatment was started 24h after modeling for 30min and lasted for 3 days. The neurological function of the rats was scored before sampling. TTC staining was used to calculate the volume of cerebral ischemia infarction in rats. Western blot was used to detect LC3B and FUNDC1 protein expression in cortical region.

Results: Compared with the sham operation group, the neurological function score of the model group was significantly higher, and the neurological function deficit was serious. LC3B protein expression was increased in cortex, and the differences were statistically significant. Compared with the model group, the neurological function score of the electroacupuncture group was significantly lower, and the neurological function defect was improved. LC3B and FUNDC1 protein expressions were increased in cortical area, and the differences were statistically significant.

Conclusion: Electroacupuncture may promote the FUNDC1-LC3 signaling pathway to up-regulate mitochondrial autophagy and alleviate neurological impairment in rats, thus playing a neuroprotective role.

Keywords: electric acupuncture; cerebral ischemia-reperfusion injury; FUNDC1 - LC3 pathways; autophagy; mitochondrial autophagy

Introduction

脑中风是一种由于脑梗塞或脑出血引起的突发性脑血液循环障碍，是以脑组织损伤及相应的神经功能缺陷为主要临床表现的急性脑血管病。中风可分为两类：缺血性中风（占人口的 87%）和出血性中风（占人口的 23%），缺血性中风是最为常见的中风类型，有较高的死亡率和致残率 [1]。根据最新的全国流行病学数据，中国面临着世界上最大的中风挑战。我国脑血管病死亡率为 149.49/10 万人，2018 年死亡人数为 157 万人，位列恶性肿瘤和心脏病之后的第三大死因 [2]。

线粒体作为真核细胞中一种重要的细胞器，对维持代谢平衡、钙稳态起着重要作用；且有向组织细胞提供三磷酸腺苷（Adenosine triphosphate, ATP）、调节病理过程中的氧化代谢

以及中风后凋亡细胞死亡的作用 [3]。然而，在再灌注阶段，线粒体 Ca^{2+} 超载、线粒体通透性转换孔打开和活性氧（reactive oxygen species, ROS）过度产生，氧气和营养物质的再供应会引起线粒体损伤 [4]。失调或受损的线粒体会产生大量的 ROS 介导氧化应激并导致神经细胞死亡 [5]。

缺血缺氧状态下，线粒体蛋白 FUN14 结构域蛋白 1（FUN14 domain-containing protein1, FUNDC1）通过介导介导线粒体自噬，选择性清除受损线粒体，从而起到神经保护作用 [6]。因此，本研究通过建立 CIRI 大鼠模型，以受体 FUNDC1 介导的线粒体自噬微切入点，从线粒体自噬角度探讨电针干预 CIRI 的作用机制。

Methodology

1. 材料和方法：

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只，250-280g，环境温度 22-25℃，分笼、标准饲料饲养。

1.2 主要试剂

RIPA 裂解液，货号为 P0013B，上海碧云天生物技术有限公司；苯甲基磺酰氟（PMSF），货号为 P0100 北京索莱宝科技有限公司；BCA 蛋白定量试剂盒，货号 BL521A，白鲨致科研有限公司；LC3B、FUNDC1、山羊抗兔 IgG，货号分别为 ab192890、ab224722、ab6721，英国 Abcam 公司。

1.3 造模、分组、治疗

24 只大鼠随机分为假手术组（Sham）、模型组（MCAO）、电针组（EA），每组 8 只。采用线栓法[7]制备大鼠左侧大脑中动脉缺血再灌注模型（MCAO），实验步骤简述如下：大鼠进行异氟烷麻醉后（瑞沃德小动物麻醉机），正中切开颈部皮肤，钝性分离颈部肌肉暴露颈总、颈外和颈内动脉，于颈外动脉远端结扎，颈外动脉切开一小口插入栓头包被硅胶 4-0 尼龙线栓，线栓经颈内动脉进入颅底达到大脑中动脉处造成相应脑区缺血，60 分钟后拔出线栓实施再灌。造模过程中控制直肠温度处于 37±0.5℃。假手术组动物除不插入和拔出线栓，其余各步骤均相同。术后 24 小时通过神经功能缺失评分，大于 2 分的大鼠纳入实验（假手术组除外）。EA 组每天 14:00-15:00 麻醉后选取百会、大椎、曲池、内关进行电针治疗 30min（电流 2mA，1 寸华佗牌针灸针），假手术组和模型组做同样时长的麻醉，但不进行电针治疗。

1.4 神经功能评分

取材前采用 7 分制[8]测试动物整体神经功能缺失状况，用于评估神经功能恢复情况。具体评分标准为：轻提大鼠尾巴，观察前肢弯曲状况，双前肢伸向地面且无其它神经病学特征者评为 0 分；提大鼠尾时其对侧前肢持续弯曲而无其他异常者评为 1 分；将鼠置于软塑封纸上，在其肩膀后轻轻侧推直至前肢侧滑数英寸，重复数次，抵抗推力的能力下降者被评为 2 分；在地面上活动时略向上拉其尾，如向瘫痪侧旋转者评为 3 分；自行行走时即向瘫痪侧旋转者评为 4 分；不能自行行走者评为 5 分；无自发活动评为 6 分；死亡评为 7 分。

1.5 TTC 染色

再灌注 1 天便开始电针治疗，持续 3 天后，用 10% 水合氯醛（0.35ml/100g）腹腔注射麻醉大鼠，断头取脑并置于大脑切片模具中，用手术刀片进行 2mm 连续切片，置于 0.1%TTC 中，恒温箱中 37℃ 孵育 15-30min。

1.6 Western blot 检测

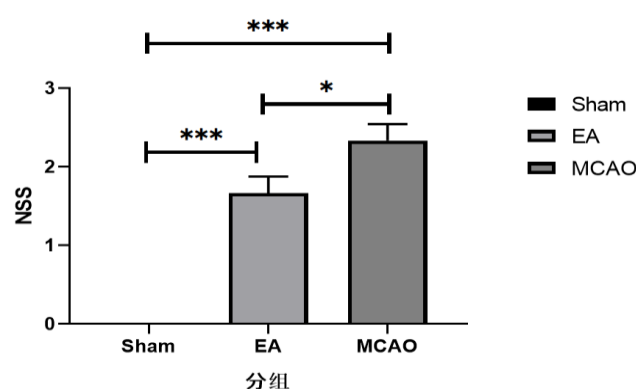
取皮层区域脑组织置于冰上，加入裂解液（RIPA 裂解液：PMSF=99:1），高速低温组织研

磨仪充分研磨，提取总蛋白，BCA 测定蛋白浓度，各组取 10ug 蛋白上样、经电泳、转膜、奶粉封闭，加 LC3B（1:3000）或 FUNDC1（1:2000）4℃ 一抗孵育过夜、二抗孵育 1h 后经化学发光成像系统分析并计算蛋白灰度值，用目的蛋白与内参的灰度值来表示蛋白相对表达量。

Results

1. 神经功能评分

假手术组无神经功能缺损，与假手术组比较，模型组大鼠神经功能评分明显升高，神经功能缺损严重，差异有统计学意义（ $P<0.001$ ）；与模型组比较，电针组大鼠神经功能缺损降低，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。见图一

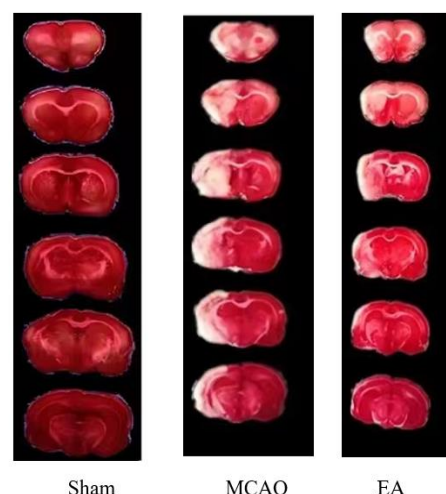


图一：神经功能评分

注：*** $P<0.001$ ；** $P<0.01$ ；* $P<0.05$

2. TTC 染色

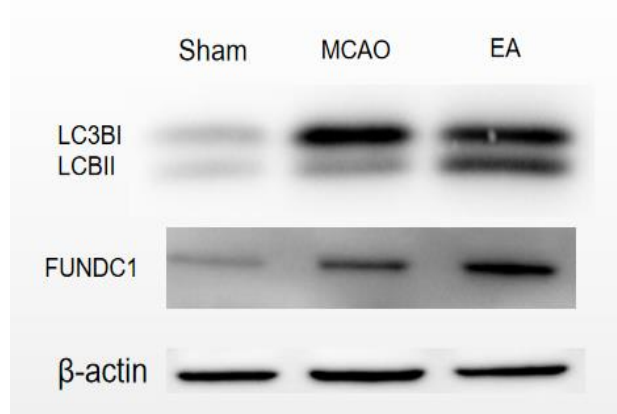
见图二



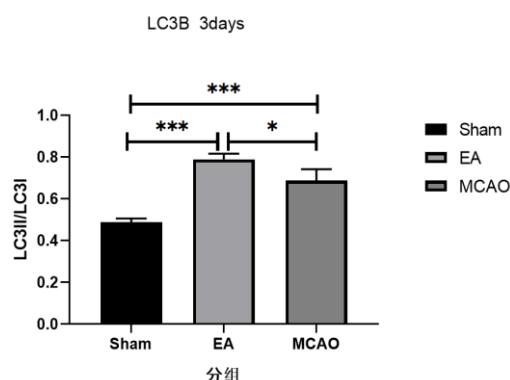
图二：TTC 染色

3.电针对 CIRI 大鼠皮质区 LC3B、FUNDCl 蛋白表达的影响

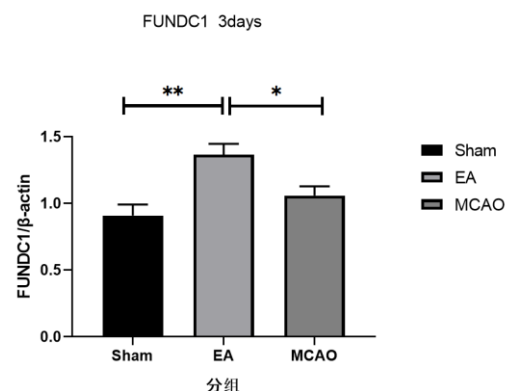
Western blot 结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠皮质区 LC3B 表达升高,差异有统计学意义 ($P<0.001$) ;与模型组比较,电针组大鼠皮质区 LC3B、FUNDCl 蛋白表达升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图三、四、五。



图三



图四



图五

Discussion

脑缺血再灌注损伤后,线粒体三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 生成障碍、 Ca^{2+} 超载,进一步诱导谷氨酸兴奋毒性,引发一系列级联反应从而诱导细胞凋亡发生[9]。在脑血流再通后,复氧促使线粒体产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS),从而导致氧化应激损伤、诱导细胞凋亡[10]。此外,ROS 过度释放及 Ca^{2+} 超载等因素可促进促炎因子的释放,从而导致脑组织炎症反应[11]。脑中风后线粒体自噬可以清除受损或功能障碍的线粒体来抑制氧化和凋亡级联反应,激活适度的线粒体自噬可能是脑中风后的治疗重要靶点。

研究表明电针在自噬的整个过程中起着关键作用,其中包括自噬的启动、囊泡成核、自噬体的扩张和成熟以及自噬溶酶体的融合和降解[12]。如:Wang 等利用大鼠 MCAO 模型也证实了电针可以调控线粒体自噬水平进而保护神经细胞免受 ROS 氧化应激损伤[13]。以上表明电针具有调控线粒体自噬保护神经细胞的作用,但其作用机制尚不完全清楚。因此,阐明电针调控线粒体自噬的作用机制对脑中风的的基础研究和临床治疗具有重要意义。LC3 是自噬标志蛋白,包括 LC3I 和 LC3II,两者可以相互转化。FUNDCl 是位于线粒体膜上的受体蛋白,缺氧情况下可介导线粒体自噬。该研究表明,电针可上调 LC3B、FUNDCl 蛋白表达水平,激活线粒体自噬。

Conclusion

综上,电针可能通过促进受体 FUNDCl 介导的线粒体自噬通路,改善 CIRI 神经功能症状,为阐明电针减轻 CIRI 损伤的机制提供实验依据。

References

- [1] 高长玉, 吴成翰, 赵建国, et al. 中国脑梗死中西医结合诊治指南(2017)[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(02): 136-144.
- [2] Wang Y J, Li Z X, Gu H Q, et al. China Stroke Statistics 2019: A Report From the National Center for Healthcare Quality Management in Neurological Diseases, China National Clinical Research Center for Neurological Diseases, the Chinese Stroke Association, National Center for Chronic and Non-communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention and Institute for Global Neuroscience and Stroke Collaborations[J]. Stroke Vasc Neurol, 2020, 5(3): 211-239.
- [3] Watts L T, Lloyd R, Garling R J, et al. Stroke neuroprotection: targeting mitochondria[J]. Brain Sci, 2013, 3(2): 540-60.

- [4] Guan R, Zou W, Dai X, et al. Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke[J]. J Biomed Sci, 2018, 25(1): 87.
- [5] Shin T H, Lee D Y, Basith S, et al. Metabolome Changes in Cerebral Ischemia[J]. Cells, 2020, 9(7).
- [6] Singh A, Kukreti R, Saso L, et al. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases[J]. Molecules, 2019, 24(8).
- [7] 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.
- [8] Rogers D C, Campbell C A, Stretton J L, et al. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. Stroke, 1997, 28(10): 2060-5; discussion 2066.
- [9] Raefsky S M, Mattson M P. Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 102: 203-216.
- [10] Yang J L, Mukda S, Chen S D. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke[J]. Redox Biol, 2018, 16: 263-275.
- [11] Shao Z, Dou S, Zhu J, et al. The Role of Mitophagy in Ischemic Stroke[J]. Front Neurol, 2020, 11: 608610.
- [12] Huang Y G, Tao W, Yang S B, et al. autophagy: novel insights into therapeutic target of electroacupuncture against cerebral ischemia/ reperfusion injury[J]. Neural Regen Res, 2019, 14(6): 954-961.
- [13] Wang H, Chen S, Zhang Y, et al. Electroacupuncture ameliorates neuronal injury by Pink1/Parkin-mediated mitophagy clearance in cerebral ischemia-reperfusion[J]. Nitric Oxide, 2019, 91: 23-34.