DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.10.020

黄芪甲苷通过调控AMPK/MTOR/ULK通路介导的自噬保护视网膜神经节细胞损伤

孙武[1,2],周剑[3],夏燕婷[3],税小丁[2],王妍[2],罗钰[2],廖良[3]
(1.中国中医科学院西苑医院,北京 100091;2.北京中医药大学,北京 100029;
3.北京中医药大学东方医院,北京 100078)

摘要:目的 自噬参与了创伤性视神经病变(Traumatic optic neuropathy,TON)的病理改变,AMPK-mTOR-ULK通路介导的自噬调控是一种潜在的治疗途径。黄芪甲苷(Astragaloside Ⅳ,AS-Ⅳ)可调节自噬,在多种疾病中发挥治疗作用。研究旨在观察黄芪甲苷对TON的治疗作用以及AMPK-mTOR-ULK通路介导的自噬在此过程中的作用。方法 将大鼠分为假手术组,模型组,AS-Ⅳ低、中、高剂量组,雷帕霉素组,AMPK抑制剂组(AS-Ⅳ+compound C)。相应药物干预7 d后进行相关检测。结果 造模7 d后,TON模型鼠视网膜组织AMPK、mTOR、ULK蛋白磷酸化水平发生显著变化,AS-Ⅳ可提高TON模型大鼠LC3 mRNA和蛋白水平,增加了模型鼠视网膜组织p-AMPK、p-ULK水平,并降低了p-mTOR水平。此外,AS-Ⅳ提高了视网膜神经节细胞(Retinal ganglion cells,RGCs)的存活率,改善了闪烁视觉诱发电位(flash-visual evoked potential,F-VEP)的P2峰潜伏期。上述作用被AMPK抑制剂compound C逆转。结论 AS-Ⅳ可提高RGCs的生存率,改善TON后的视觉功能,其作用机制可能与通过调节AMPK-MTOR-ULK通路改善自噬有关。AMPK-MTOR-ULK通路可能是一种潜在的治疗TON的途径。

关键词:外伤性视神经病变;黄芪甲苷;自噬;AMPK-MTOR-ULK;视网膜神经节细胞
中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2025)10-0096-09

Astragaloside Ⅳ Protects Injured Retinal Ganglion Cells by Modulating Autophagy Meditated by AMPK-MTOR-ULK Pathway

SUN Wu[1,2],ZHOU Jian[3],XIA Yanting[3],SHUI Xiaoding[2],WANG Yan[2],LUO Yu[2],LIAO Liang[3]
(1.Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences,Beijing 100091,China;
2.Beijing University of Chinese Medicine,Beijing 100029,China;
3.Dongfang Hospital,Beijing University of Chinese Medicine,Beijing 100078,China)

Abstract:*Objective* Autophagy is involved in the pathological changes of traumatic optic neuropathy(TON),and the regulation of autophagy mediated by the adenosine monophosphate activated kinase(AMPK)-mammalian target of rapamycin(mTOR)-ULK pathway is a potential therapeutic approach. Astragaloside Ⅳ(AS-Ⅳ) can regulate autophagy and plays a therapeutic role in a variety of diseases. This study aimed to observe the therapeutic effect of AS-Ⅳ on TON and the role of AMPK-mTOR-ULK pathway-mediated autophagy in this process. *Methods* The rats were divided into seven groups:sham operation group,model group,AS-Ⅳ low,medium and high dose groups,rapamycin group,AMPK inhibitor group(AS-Ⅳ+compound C). Correlation tests were performed after 7 days of the corresponding drug intervention. *Results* After 7 days,the phosphorylation levels of AMPK,mTOR and ULK proteins in retinal tissue changed significantly after TON. AS-Ⅳ was found to increase LC3 mRNA and protein levels in TON model rats in the study. In addition,it increased the levels of p-AMPK and p-ULK and reduced p-mTOR level. Moreover,AS-Ⅳ increased the survival rate of retinal ganglion cells(RGCs) and improved the P2 peak latency time of flash-visual evoked potential(F-VEP). The above effects were reversed by the AMPK inhibitor compound C. *Conclusion* AS-Ⅳ can increase the survival rate of RGCs and improve visual function after TON,which is related to the improvement of autophagy by regulating the AMPK-mTOR-ULK pathway. The AMPK-mTOR-ULK pathway may be a

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81973909)
作者简介:孙武(1992-),男,安徽凤台人,主治医师,博士,研究方向:视神经及视网膜疾病。
通讯作者:廖良(1982-),男,湖南武冈人,主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:视神经疾病。E-mail:58273677@qq.com。

potential therapeutic approach for TON.

Keywords: traumatic optic neuropathy; astragaloside Ⅳ; autophagy; AMPK - mTOR - ULK; retinal ganglion cell

外伤性视神经病变(Traumatic optic neuropathy,TON)是一类急性视神经损伤,通常由眶、眼或头面部外伤引起,可导致严重的不可逆视力丧失[1]。直接外力引起的原发性损伤可导致视神经鞘破坏、视神经部分或完全横断,以及视神经中枢供血受损。继发性损伤可引发一系列生化级联反应,导致视神经缺血缺氧,进而引起炎症、免疫反应、兴奋性毒性、氧化损伤,最终由轴突脱髓鞘和视网膜神经节细胞(Retinal ganglion cells,RGCs)凋亡引起少突胶质细胞凋亡[2]。现有证据表明,与保守观察相比,激素治疗和视神经管减压对患者没有额外收益[3]。探索视神经损伤后 RGC 存活机制,提高 RGC 存活是治疗 TON 的重要研究策略[4]。

许多报道描述了自噬参与 TON 后 RGCs 死亡[4-7]。玻璃体内注射自噬抑制剂 3 - 甲基腺嘌呤后,大鼠视网膜内微管相关蛋白 1 轻链 3 - Ⅱ (Microtubule - associated protein 1 light chain 3 - Ⅱ,LC3 - Ⅱ)阳性自噬体数量减少,视神经夹持伤后轴突变性急性期明显延迟[8]。视神经损伤后 3 ~ 10 d 内的轴浆运输功能障碍最终导致 RGCs 凋亡和视神经萎缩。在此期间,自噬标志蛋白 LC3 - Ⅱ显著升高,自噬激活剂的干预提高了 RGCs 的存活率[9]。此外,缺乏自噬基因的 $Atg4B^{-/-}$ 小鼠的视网膜 LC3 - Ⅱ水平低于野生型小鼠。在正常生理条件下,视网膜功能与野生型小鼠无明显差异,但创伤后视网膜功能损伤程度较野生型小鼠严重[9-10]。以上研究证实自噬参与了 RGCs 死亡和 TON 修复过程,调节自噬反应可能成为提高 TON 后 RGCs 存活率的潜在治疗方法[11-13]。

在参与自噬的多种信号通路中,AMPK - mTOR - ULK 备受关注[14]。TON 后严重轴突损伤导致 RGCs 轴浆血流阻塞,可导致 RGCs 能量供应改变,而能量受体 mTOR 和 AMPK 因此被激活。AMPK 和 mTOR 激酶都可以催化或抑制 ULK(UNC51 - like)的磷酸化,分别起到促进或抑制自噬的作用[14-16]。AMPK - mTOR - ULK 通路介导的自噬可能是影响 RGCs 存活的关键病理生理机制。

黄芪甲苷(Astragaloside Ⅳ,AS - Ⅳ)是中药黄芪的主要活性成分,具有清除氧自由基、抗炎、增强免疫力、改善心血管功能等多种功能[17]。近年来多项研究表明 AS - Ⅳ可以通过调节自噬来对多种疾病发挥保护作用[18-21]。本研究旨在基于 TON 模型探讨 AS - Ⅳ对 AMPK - mTOR - ULK 自噬通路的调控及其对 RGCs 存活率的影响。

1 材料与方法

1.1 *伦理声明* 动物护理和实验获得北京中医药大学东方医院生物伦理委员会批准(编号:202007)。本实验严格按照美国国立卫生研究院动物护理和使用指南和 ARVO 眼科和视觉研究动物使用声明中的规定进行。

1.2 *材料* 本研究采购的材料如下:AS - Ⅳ(上海源叶生物科技有限公司,B20564,上海,中国),雷帕霉素(Abcam,ab146591,剑桥,英国),compound C(dorsomorphin,Abcam,ab120843,剑桥,英国),LC3B (E5Q2K)小鼠单抗(CST,83506S,马萨诸塞州,美国),AMPKα (D63G4)兔单抗(CST,40308ES20,马萨诸塞州,美国),mTOR (7C10)兔单抗(CST,2983S,马萨诸塞州,美国),ULK1 (D8H5)兔单抗(CST,8054S,马萨诸塞州,美国),抗磷酸化 AMPKα (Thr172)兔单抗(CST,50081S,马萨诸塞州,美国),磷酸化 mTOR (Ser2448)(D9C2)XP 兔单抗(CST,5536S,马萨诸塞州,美国),Phospho - ULK1 (Ser555)(D7O6U)兔单抗(CST,14202S,MA,美国),抗 brn3a 抗体(Abcam,ab245230,剑桥,英国),TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(YEASEN,40308ES20,上海,中国),山羊抗小鼠 IgG - HRP (Abcam,ab6789,剑桥,英国),山羊抗兔 IgG - HRP (Abcam,ab205718,剑桥,英国)。

1.3 *实验动物* 选用 SPF 级雄性 Wistar 雄性大鼠,体质量(180 ± 20) g,置于温湿度控制、自由饮食、光照/暗环境循环 12 h 的环境中饲养。适应期 1 周后进行建模实验。140 只大鼠随机分为 7 组(n = 20):低剂量 AS - Ⅳ组(AL)、中剂量 AS - Ⅳ组(AM)、高剂量 AS - Ⅳ组(AH)、假手术组(SH)、模型组(MO)、雷帕霉素(mTORC1 复合物抑制剂)组(RA)、compound C(AMPK 抑制剂)组(CC)。低、中、高剂量 AS - Ⅳ组分别以 10、20、40 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 的剂量腹腔注射 AS - Ⅳ(载药成分:10% DMSO、40% PEG300、5% 吐温 - 80 和 45% 的 0.9% 生理盐水)。RA 组腹腔注射自噬激活剂雷帕霉素,剂量为 2 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$(载体成分:10% DMSO、40% PEG300、5% 吐温 - 80 和 45% 生理盐水)[22],CC 组腹腔注射 AS - Ⅳ(20 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) + compound C (1 mg)(载体成分:10% DMSO、40% PEG300、5% 吐温 - 80 和 45% 生理盐水)[23]。SH 组和 MO 组以 1 mL/100 g 剂量的药物载体进行腹腔注射。所有组每天治疗 1 次,持续 1 周,然后安乐死以作进一步分析。

1.4 *TON 模型的建立* 术前用检眼镜直接检查大鼠眼底视网膜和血管。大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥(60 mg/kg)麻醉,术后眼涂卡波姆凝胶。碘伏消毒后,在体视显微镜下沿右眼颞眶缘切开皮肤,切开眶筋膜,露出眶骨边缘。清除眶上结缔组织,分离直斜肌,朝向眶尖,直至显露视神经鞘。仔细分离视神经鞘以暴露视神经,然后在眼球后 2 mm 处用 6 - 0 聚酯缝线包裹并打结。缝线一端固定,另一端连接横向张力计。然后以 0.3 N 的张力垂直于视神经牵拉缝线 20 s[24]。术后缝合皮肤,手术眼涂红霉素眼膏,将大鼠置于 37 ℃电加热垫上恢复。

在 SH 组中,切开神经鞘暴露视神经而不牵拉。实验大鼠均以右眼为手术眼,左眼为对照眼。

1.5 *免疫印迹* 从 - 82 ℃冰箱中取出视网膜组织,每个样品在冰上加入 150 μL RIPA 裂解缓冲液 30 min 进行裂解。裂解液在 4 ℃下以 12 000 r/min 离心 15 min,使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。等量的蛋白质被装入 10% 的 SDS - PAGE 凝胶并分离。将蛋白转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,室温封闭 2 h,与相应的一抗(小鼠抗 lc3b、兔抗 AMPK、兔抗 mTOR、兔

抗 ULK1、兔抗 p－AMPK、兔抗 p－mTOR、兔抗 p－ULK1）在 4 ℃下孵育过夜。然后，将膜与相应的山根过氧化物酶偶联二抗（抗小鼠 IgG，1∶1000；抗兔 IgG，1∶1000）在摇床中 37 ℃孵育 2 h。使用增强化学发光检测免疫反应蛋白，使用自动化学发光分析仪进行曝光、拍照和数据分析。

1.6 实时荧光定量 PCR 从－82 ℃冰箱中取出视网膜组织，用 TRIzol 试剂（TransGen Biotech Co. Ltd，北京，中国）提取 RNA，使用 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒进行 cDNA 第一链合成。根据实时荧光定量 PCR 试剂盒（TransGen Biotech Co. Ltd，北京，中国）的说明书，两步法扩增。LC3B 和 GAPDH 的正向/反向引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计：LC3B：AAGACCTTCAAACAGCGCC/GCAGGCGCCTTCTAATTC，GAPDH：GATGACATCAAGAAGGTGGTG/ACCCTGTTGCTGTAGCCATATTC。扩增产物琼脂糖凝胶电泳，实时荧光定量 PCR 仪分析 mRNA 表达水平。

1.7 免疫荧光染色及成像 石蜡切片去蜡后置于含有柠檬酸抗原修复缓冲液（pH 6.0）的修复盒中，在微波炉中进行抗原回收。PBS 冲洗切片后，加入相应的一抗（小鼠抗 LC3B 和兔抗 brn3a），将切片平放于湿盒中，4 ℃孵育过夜。用相应的二抗覆盖组织，室温暗光孵育 50 min。PBS 冲洗后，用 DAPI 染色液反染细胞核，25 ℃暗室孵育 10 min。切片用抗荧光猝灭密封剂密封，然后在倒置荧光显微镜下观察。

1.8 末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 缺口末端标记（Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling，TUNEL） 使用 One Step TUNEL 凋亡检测试剂盒对视网膜组织进行碎片 DNA TUNEL 染色。固定液浸泡后，用 30% 蔗糖脱水，冷冻后切片，厚度为 12 μm。切片用 PBS 冲洗 3 次，然后在含有 0.5% TritonX－100 的 PBS 中室温孵育 5 min。PBS 冲洗 3 次后，将 TUNEL 测定液（由 50 μL 末端脱氧核苷酸转移酶和 450 μL 荧光标记液组成的 500 μL 测定液）加入组织中，室温孵育 60 min。用 PBS 冲洗切片，用 DAPI 在 25 ℃下孵育 10 min，最后在荧光显微镜下观察。

1.9 透射电子显微镜（Transmission electron microscope，TEM）分析样品的制备 新鲜视网膜组织修剪至约 1 mm^3，用 2.5% 戊二醛在 4 ℃下固定。在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中浸泡后，用 1% 四氧化锇固定液固定组织，再用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤。组织在 4 ℃的冰箱中用乙醇梯度脱水，然后包埋在环氧树脂 Epon 812 中，最后在烤箱中固化（37 ℃过夜，45 ℃ 12 h，60 ℃ 48 h）。随后，用 Leica EM UC7 冷冻超薄切片机切片，厚度为 70 nm，2% 醋酸铀醯－柠檬酸铅双染色。采用 HT7800（80 kV）透射电镜进行观察和拍摄。

1.10 闪烁视觉诱发电位（flash－visual evoked potential，F－VEP） 干预 7 d 后进行 F－VEP 测试。暗适应 12 h 后，大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥（50 mg/kg）全麻醉。用复方托品酰胺（Santen Pharmaceutical Co.，Ltd，Tokyo，Japan）扩大瞳孔，然后用电生理测试仪（Roland Electronics Co.，Ltd，KELTERN，Germany）记录 F－VEP。使用丝状银－氯化银电极作为 VEP 作用电极，并将其放置在耳根连接中点处皮下。参比电极置于口腔内，接地电极置于尾部皮下。当一只眼睛被记录时，另一只眼睛用不透明眼罩覆盖。电生理测试仪的参数设置为光强 3.0 CD·s·m^2，刺激频率 1.0 Hz，波形分析时间 250 ms，带通放大器记录频带 1～100 Hz。波形叠加数为 100。将波形的第一个负峰定义为 N1 波，将 N1 波之后的正峰定义为 P1 波，将 P1 波之后的负峰和正峰分别定义为 N2 波和 P2 波。按 ISCEV 标准比较各组大鼠 P2 波潜伏期（ms）和振幅（μv），评价视觉功能[25]。

1.11 统计学方法 所有数据采用 Prism 8.0（Prism®，GraphPad）进行分析，计量数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。两两比较采用独立样本 T 检验。采用单因素方差分析（ANOVA）进行多组比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 自噬发生在视神经牵拉损伤模型的视网膜组织中 TCE 观察视网膜组织，我们发现 SH 组大鼠视网膜组织中几乎没有双层自噬体，而模型大鼠视网膜组织中自噬体数量增加（插页Ⅻ图 1）。上述结果提示，自噬在模型大鼠视网膜组织中被激活。

2.2 AS－Ⅳ能提高模型大鼠 RGCs 的数量 采用免疫荧光染色法评估造模后 7 d 大鼠视网膜 brn3a 标记 RGCs 的数量[26]。如插页Ⅻ图 2 所示，与 SH 组相比，MO 组 brn3a 阳性细胞数量明显减少。此外，我们观察到 AM、AH 和 RA 组中 brn3a 阳性细胞数量较 MO 组显著增加（均 $P<0.05$），而 AL 组与 MO 组之间差异无统计学意义。不同剂量 AS－Ⅳ之间 RGCs 数量的差异无统计学意义。此外，与 AM 组相比，CC 组 RGCs 数量明显减少。

2.3 AS－Ⅳ通过自噬减少 TON 模型鼠 GCL 层细胞凋亡 TUNEL 染色检测了 GCL 中 RGC 的凋亡。如插页Ⅻ图 3 所示，MO 组 GCL 中凋亡细胞数量明显高于除 CC 组外的其他各组。AL 组高于 AM 和 AH 组。此外，CC 组 GCL 中凋亡细胞数量明显高于 AM 组。

2.4 AS－Ⅳ通过调节 AMPK、mTOR 和 ULK 蛋白的磷酸化促进模型大鼠视网膜组织自噬 Western blot 观察了 AS－Ⅳ对 TON 模型鼠视网膜组织 LC3B 表达的影响（插页ⅫⅣ图 4）。与 MO 组相比，所有 AS－Ⅳ组均增加了视网膜中 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ的水平。此外，与 AL 组相比，AH 组视网膜组织中的 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ水平增加，而 AH 组和 AM 组之间以及 AM 组和 AL 组之间的差异没有统计学意义（插页ⅫⅣ图 4A）。RT－qPCR 检测显示，与 MO 组相比，AS－Ⅳ可以促进 LC3mRNA 的表达；并且与 AM 和 AL 组相比，AH 组的 LC3mRNA 表达水平显著升高。此外，AM 组和 AL 组之间的差异也具有统计学意义（插页ⅫⅣ图 4B）。LC3 免疫荧光染色进一步显示，AS－Ⅳ组的 GCL 中 LC3 表达水平显著高于 MO 组。阳性对照 RA 组大鼠视网膜组织中 LC3 的蛋白质和 mRNA 水平以及 LC3 标记细胞的数量高于 MO 组（插页ⅫⅣ图 4C）。

为了进一步证实 AMPK 是否在 AS－Ⅳ中的自噬调节中发挥作用，在 AM 组中使用 AMPK 抑制剂（compound C）。结果显示，compound C 干预后，LC3 蛋白和 mRNA 水平显著低于 AM 组（插页ⅫⅣ图 4A－B），免疫荧光染色中 LC3 表达水平也降低（插页ⅫⅣ图 4C）。上述结果表明，AS－Ⅳ可以提高模型大鼠视

网膜组织中的自噬水平，而抑制 AMPK 可以逆转这种作用。

Western blot 进一步检测各组大鼠视网膜中 AMPK、mTOR、ULK 的蛋白表达及磷酸化水平（插页Ⅻ图 4A）。结果显示，各组大鼠视网膜组织中 AMPK、mTOR 和 ULK 蛋白表达水平无显著差异，而 AMPK、mTOR 和 ULK 磷酸化水平差异明显。与 MO 组比较，AS－Ⅳ各剂量组视网膜组织中 p－AMPK、p－ULK 水平升高，p－mTOR 水平降低。此外，与低剂量 AS－Ⅳ相比，高剂量 AS－Ⅳ显著增加了 p－AMPK 和 p－ULK 水平，降低了 p－mTOR 水平，而 AH 组与 AM 组之间以及 AM 组与 AL 组之间的差异无统计学意义（$P>0.05$）。此外，AM 组腹腔注射 compound C 1 周后，视网膜组织中 p－AMPK 和 p－ULK 水平下降，而 p－mTOR 水平明显高于 AM 组。RA 组视网膜组织中 p－mTOR 水平明显降低，p－AMPK 和 p－ULK 水平明显升高（插页Ⅻ图 4A）。

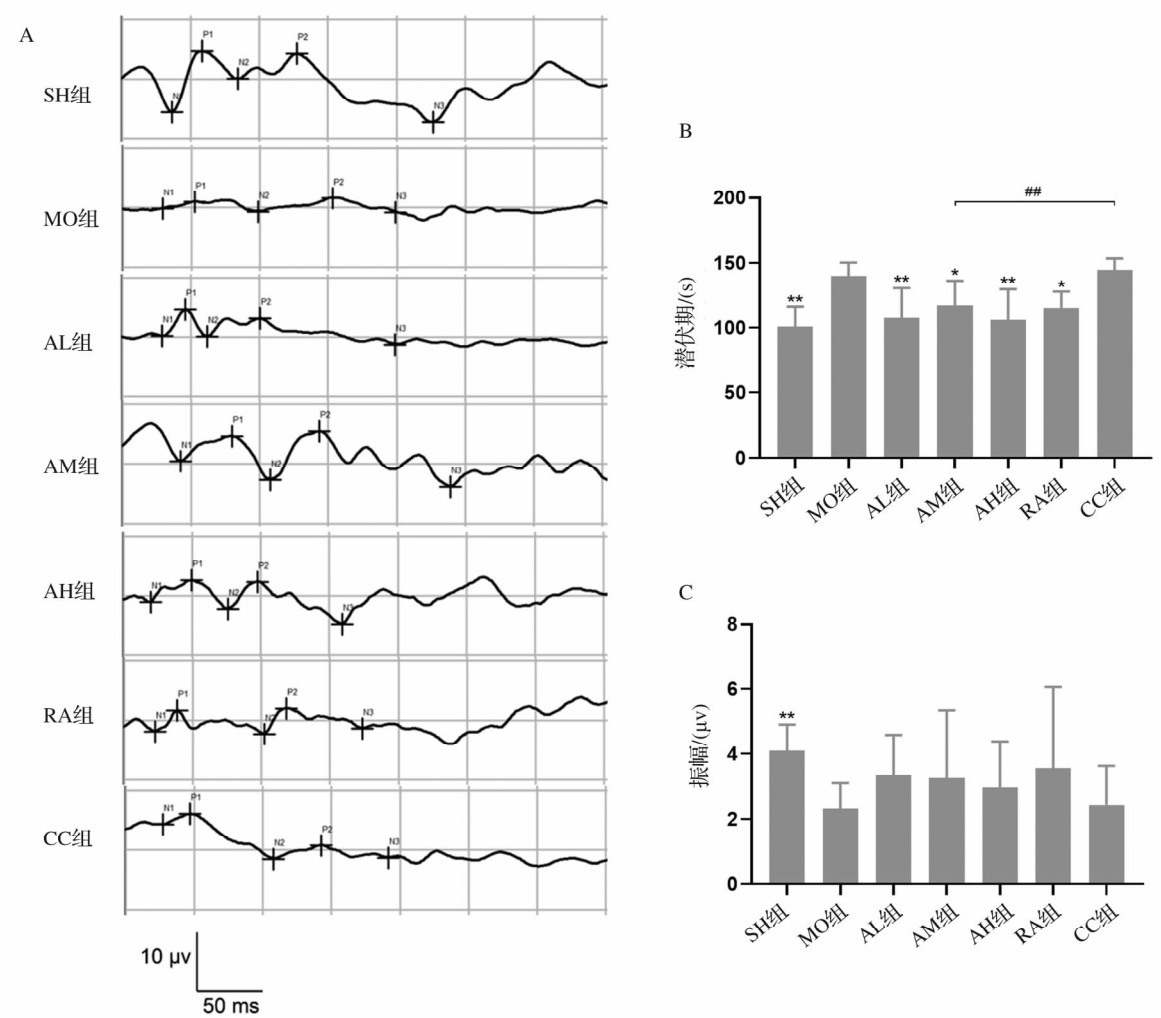
2.5 AS－Ⅳ对 TON 模型大鼠视觉功能有改善作用 采用 F－VEP 检测干预 7 d 后各组大鼠眼电生理变化，并通过 P2 峰潜伏期和振幅评价大鼠视觉功能[25]。如图 5 所示，MO 组 P2 峰的潜伏期明显长于 SH 组。此外，AS－Ⅳ各剂量组和 RA 组的 P2 峰潜伏期较 MO 组缩短（图 5B）。而 CC 组的 P2 潜伏期明显长于 AM 组。AS－Ⅳ各剂量组和 RA 组各组之间 P2 潜伏期差异无统计学意义（$P>0.05$）。

N2P2 波的振幅方面，MO 组与 SH 组相比有明显下降，而 AS－Ⅳ各剂量组与 MO 组之间无明显差异（图 5C）。此外，AM 组和 CC 组之间 N2P2 振幅无显著差异。

3 讨论

本研究发现 AMPK－mTOR－ULK 信号通路参与了 TON 的损伤修复过程，AS－Ⅳ可以通过调节 AMPK－mTOR－ULK 通路增加的自噬来提高 RGC 的存活。此外，AS－Ⅳ还能通过 AMPK 蛋白改善 TON 模型大鼠的视觉功能。

既往研究发现，血清饥饿后视神经横断模型大鼠 RGCs 中自噬被激活[8－9]。在本研究中，造模后第 7 天视网膜组织中出现明显增多的自噬体形成，提示视神经外侧牵引模型视网膜中发生了自噬。AS－Ⅳ调节细胞自噬，在多种疾病中发挥保护作用[17－20]。此外，AS－Ⅳ的神经保护作用也有报道[26－28]，包括提高周围神经传导速度[29]，通过上调生长相关蛋白 43 的表达促进坐骨神经的修复[30]。因此，AS－Ⅳ可能对视神经损伤



注：A. 各组大鼠 F－VEP 典型图；B. 每组大鼠（$n=9$）F－VEP 的 P2 潜伏期的图形显示；C. 每组大鼠（$n=9$）F－VEP 的 N2P2 振幅的图形显示。＊与 MO 组比较，$P<0.05$；＊＊与 MO 组比较，$P<0.01$；药物组之间比较，##$P<0.01$。

图 5 AS－Ⅳ改善 TON 模型大鼠的视觉功能

有保护作用。在本研究中,通过 brn3a 免疫荧光染色法(插页Ⅻ图 2)和 TUNEL 染色法(插页Ⅻ图 3),发现 AS – Ⅳ可以提高 TON 模型大鼠 RGCs 的存活率。此外,实验证实 AS – Ⅳ可以提高 TON 模型大鼠视网膜中 LC3 的蛋白和 mRNA 水平(插页ⅩⅣ图 4)。

AMPK 是调节能量的关键蛋白。视神经损伤后,RGC 的能量供应受到影响,AMPK 蛋白的表达发生改变。本研究观察到 AMPK 蛋白磷酸化水平在模型大鼠视网膜组织中升高(插页ⅩⅣ图 4)。p – AMPK 水平升高可促进自噬[14-15]。本研究发现 AS – Ⅳ进一步增加了 p – AMPK 的水平,并显著增加了自噬水平。AMPK 可以通过磷酸化 mTORC1 的 raptor 蛋白来抑制 mTORC1 的活性,从而诱导自噬[14-15,31]。当细胞受到饥饿刺激时,AMPK 磷酸化 ULK1/2 中的 Ser555 位点,或 ULK1/2 自磷酸化并磷酸化 Atg13 和 FIP200 以激活自噬[14,32]。为了进一步验证 AS – Ⅳ与 AMPK – mTOR – ULK 通路的调控关系,本研究在 AM 组联合进行了 compound C 的腹腔注射。结果显示,与未接受 compound C 干预的 AM 组相比,CC 组视网膜中 AMPK、mTOR 和 ULK 蛋白水平变化不明显,而 p – AMPK 和 p – ULK 水平下降,p – mTOR 水平升高(插页ⅩⅣ图 4)。p – AMPK 和 p – ULK 水平下降,p – mTOR 水平显著升高,均可抑制自噬[14-15]。如预期的那样,与 MO 组相比,compound C 干预 7 d 后,视网膜组织中的 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ水平显著降低,并且免疫荧光测定中 LC3 水平显著降低(插页ⅩⅣ图 4)。上述结果表明,AS – Ⅳ通过调节 AMPK、ULK 和 mTOR 的磷酸化来介导 TON 后的自噬,并且这种作用可以被 compound C 逆转。自噬提高了 TON 后 RGC 的存活率[5,7,9],这在我们的研究中得到了证实:RA 组的 RGC 存活率高于 MO 组。更重要的是,我们观察到 CC 组 RGC 的存活率显著低于 AM 组(插页ⅩⅣ图 4),这表明 AS – Ⅳ通过 AMPK 增强了自噬,从而提高了 RGC 的生存率。

相关研究发现,轴突损伤后,RGCs 中的活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平随着线粒体损伤而升高,自噬可能参与了清除受损线粒体,从而降低 ROS 水平,保护 RGCs[9]。最近的研究进一步证明,AS – Ⅳ可以通过促进线粒体吞噬来减少受损线粒体的积累和线粒体 ROS 的产生[28]。因此,AS – Ⅳ可能通过增强 TON 后线粒体自噬来保护 RGCs。此外,自噬还可能通过去除轴突片段或重塑细胞骨架参与其他细胞保护功能[33-34]。

用 F – VEP 评价视觉传导功能,反映视网膜到视觉皮层的功能状态活动。据报道,F – VEP 振幅反映了功能性视神经纤维的数量[35-36]。然而,本研究没有观察到 AS – Ⅳ对 N2P2 振幅的改善作用。F – VEP 检测幅度的变异性可能会掩盖效果[37-38],尽管本研究通过几种方式控制这种变异性:控制黑暗适应、麻醉深度、植入位置和测试电极深度,重复 100 次外部刺激以最小化电图噪声[39],并且只纳入了误差波形小于 10 次的图形。本研究发现了 AS – Ⅳ在 F – VEP 检测中具有改善 P2 潜伏期的作用。通过 VEP 记录评估视觉信号电导率是评估视觉通路脱髓鞘程度的可靠工具[36]。既往研究表明,VEP 潜伏期的延长与视觉通路中脱髓鞘的数量相对应[36,40],自噬可以促进髓鞘再生,减少神经元变性[41-42]。因此,AS – Ⅳ可能通过介导自噬促进视神经髓鞘的再生,从而改善视神经的传导功能。模型大鼠经雷帕霉素干预后 P2 潜伏期明显缩短,进一步验证了自噬参与了 TON 后视觉功能修复的过程(图 5)。然而,本研究没有进行视神经髓鞘的相关变化观察,AS – Ⅳ对髓鞘的作用尚不清楚。视神经髓鞘在 TON 后的病理变化及自噬对视神经髓鞘的影响值得进一步研究。

综上所述,本研究发现 AS – Ⅳ可以提高 TON 模型鼠 RGCs 的存活率,恢复 TON 模型大鼠的视觉功能,这可能与 AS – Ⅳ通过调节 AMPK – mTOR – ULK 信号通路增加自噬有关。AMPK – mTOR – ULK 可能是一条治疗 TON 的潜在途径。

参考文献

[1] CHEN B, ZHANG H S, ZHAI Q, et al. Traumatic optic neuropathy: a review of current studies [J]. Neurosurg Rev, 2022, 45(3): 1895 – 1913.

[2] KARIMI S, ARABI A, ANSARI I, et al. A systematic literature review on traumatic optic neuropathy [J]. J Ophthalmol, 2021, 2021: 5553885.

[3] YUWAIMAN P, GRIFFITHS P G. Steroids for traumatic optic neuropathy[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2013(6): CD006032.

[4] LI H J, SUN Z L, YANG X T, et al. Exploring optic nerve axon regeneration[J]. Curr Neuropharmacol, 2017, 15(6): 861 – 873.

[5] LI Y J, CHEN Y Y. AMPK and autophagy[M]//Autophagy: Biology and Diseases. Singapore: Springer Singapore, 2019: 85 – 108.

[6] BOYA P, ESTEBAN – MARTÍNEZ L, SERRANO – PUEBLA A, et al. Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging [J]. Prog Retin Eye Res, 2016, 55: 206 – 245.

[7] WEN Y T, ZHANG J R, KAPUPARA K, et al. mTORC2 activation protects retinal ganglion cells *via* Akt signaling after autophagy induction in traumatic optic nerve injury[J]. Exp Mol Med, 2019, 51(8): 1 – 11.

[8] KIM S H, MUNEMASA Y, KWONG J M, et al. Activation of autophagy in retinal ganglion cells[J]. J Neurosci Res, 2008, 86(13): 2943 – 2951.

[9] RODRÍGUEZ – MUELA N, GERMAIN F, MARIÑO G, et al. Autophagy promotes survival of retinal ganglion cells after optic nerve axotomy in mice[J]. Cell Death Differ, 2012, 19(1): 162 – 169.

[10] RODRÍGUEZ – MUELA N, BOYA P. Axonal damage, autophagy and neuronal survival[J]. Autophagy, 2012, 8(2): 286 – 288.

[11] KOCH J C, LINGOR P. The role of autophagy in axonal degeneration of the optic nerve[J]. Exp Eye Res, 2016, 144: 81 – 89.

[12] LIN W, XU G. Autophagy: a role in the apoptosis, survival, inflammation, and development of the retina[J]. Ophthalmic Res, 2019, 61(2): 65 – 72.

[13] MUNEMASA Y, KITAOKA Y. Autophagy in axonal degeneration in

glaucomatous optic neuropathy[J]. Prog Retin Eye Res,2015,47:1-18.

[14] ALERS S, LÖFFLER A S, WESSELBORG S, et al. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks[J]. Mol Cell Biol,2012,32(1):2-11.

[15] HARDIE D G, ROSS F A, HAWLEY S A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2012,13(4):251-262.

[16] YAO A, VAN WIJNGAARDEN P. Metabolic pathways in context: mTOR signalling in the retina and optic nerve - A review[J]. Clin Exp Ophthalmol,2020,48(8):1072-1084.

[17] ZHANG J Q, WU C X, GAO L, et al. Chapter four astragaloside IV derived from *Astragalus membranaceus*: a research review on the pharmacological effects[J]. Adv Pharmacol,2020,87:89-112.

[18] LI H, ZHANG Y L, MIN J, et al. Astragaloside IV attenuates orbital inflammation in Graves' orbitopathy through suppression of autophagy[J]. Inflamm Res,2018,67(2):117-127.

[19] SONG Z H, WEI D N, CHEN Y, et al. Association of astragaloside IV-inhibited autophagy and mineralization in vascular smooth muscle cells with lncRNA H19 and DUSP5-mediated ERK signaling [J]. Toxicol Appl Pharmacol,2019,364:45-54.

[20] WANG X, GAO Y, TIAN N, et al. Astragaloside IV inhibits glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of podocytes through autophagy enhancement *via* the SIRT-NF-κB p65 axis [J]. Sci Rep,2019,9(1):323.

[21] WEI R, LIU H, CHEN R, et al. Astragaloside IV combating liver cirrhosis through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Exp Ther Med,2019,17(1):393-397.

[22] AGHAIE F, MORADIFAR F, HOSSEINI A. Rapamycin attenuates depression and anxiety-like behaviors through modulation of the NLRP3 pathway in pentylenetetrazole-kindled male Wistar rats [J]. Fundam Clin Pharmacol,2021,35(6):1045-1054.

[23] RASHTIANI S, GOUDARZI I, JAFARI A, et al. Adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) is essential for the memory improving effect of adiponectin[J]. Neurosci Lett,2021,749:135721.

[24] SUN W, CHAO G J, SHANG M Q, et al. Optic nerve injury models under varying forces[J]. Int Ophthalmol,2023,43(3):757-769.

[25] ODOM J V, BACH M, BRIGELL M, et al. ISCEV standard for clinical visual evoked potentials: (2016 update)[J]. Documenta Ophthalmol,2016,133(1):1-9.

[26] NADAL-NICOLÁS F M, JIMÉNEZ-LÓPEZ M, SOBRADO-CALVO P, et al. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(8):3860-3868.

[27] SHI Y H, ZHANG X L, YING P J, et al. Neuroprotective effect of astragaloside IV on cerebral ischemia/reperfusion injury rats through Sirt1/mapt pathway[J]. Front Pharmacol,2021,12:639898.

[28] XIA M L, XIE X H, DING J H, et al. Astragaloside IV inhibits astrocyte senescence: implication in Parkinson's disease[J]. J Neuroinflammation,2020,17(1):105.

[29] BEN Y, HAO J, ZHANG Z, et al. Astragaloside IV inhibits mitochondrial-dependent apoptosis of the dorsal root ganglion in diabetic peripheral neuropathy rats through modulation of the SIRT1/p53 signaling pathway[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2021, 14:1647-1661.

[30] ZHANG X, CHEN J. The mechanism of astragaloside IV promoting sciatic nerve regeneration[J]. Neural Regen Res, 2013, 8(24):2256-2265.

[31] FOSTER K G, ACOSTA-JAQUEZ H A, ROMEO Y, et al. Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by *Raptor* Ser863 and multisite phosphorylation[J]. J Biol Chem,2010,285(1):80-94.

[32] JUNG C H, JUN C B, RO S H, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery[J]. Mol Biol Cell,2009,20(7):1992-2003.

[33] BAERGA R, ZHANG Y, CHEN P H, et al. Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice[J]. Autophagy,2009,5(8):1118-1130.

[34] MELLÉN M A, DE LA ROSA E J, BOYA P. The autophagic machinery is necessary for removal of cell corpses from the developing retinal neuroepithelium[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(8):1279-1290.

[35] KLISTORNER A, ARVIND H, NGUYEN T, et al. Axonal loss and myelin in early ON loss in postacute optic neuritis[J]. Ann Neurol, 2008,64(3):325-331.

[36] YOU Y, KLISTORNER A, THIE J, et al. Latency delay of visual evoked potential is a real measurement of demyelination in a rat model of optic neuritis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2011,52(9):6911-6918.

[37] YOU Y Y, KLISTORNER A, THIE J, et al. Improving reproducibility of VEP recording in rats: electrodes, stimulus source and peak analysis[J]. Documenta Ophthalmol,2011,123(2):109-119.

[38] YOU Y, THIE J, KLISTORNER A, et al. Normalization of visual evoked potentials using underlying electroencephalogram levels improves amplitude reproducibility in rats[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2012,53(3):1473-1478.

[39] ROBSON A G, NILSSON J, LI S Y, et al. ISCEV guide to visual electrodiagnostic procedures[J]. Documenta Ophthalmol,2018,136(1):1-26.

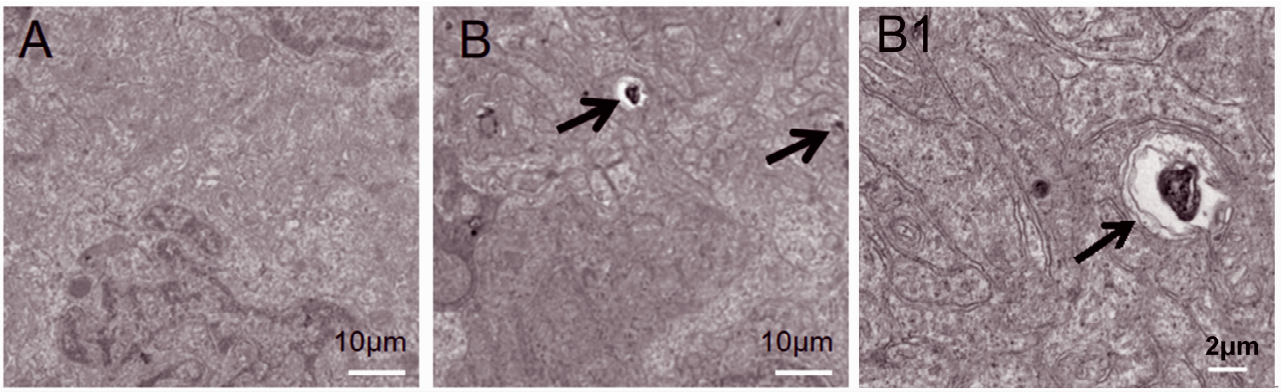
[40] EBRAHIM-TABAR F, NAZARI A, POURAMIR M, et al. Arbutin improves functional recovery and attenuates glial activation in lysolecethin-induced demyelination model in rat optic chiasm[J]. Mol Neurobiol,2020,57(7):3228-3242.

[41] MISRIELAL C, MAUTHE M, REGGIORI F, et al. Autophagy in multiple sclerosis: two sides of the same coin[J]. Front Cell Neurosci,2020,14:603710.

[42] RANGARAJU S, VERRIER J D, MADORSKY I, et al. Rapamycin activates autophagy and improves myelination in explant cultures from neuropathic mice[J]. J Neurosci, 2010, 30(34):11388-11397.

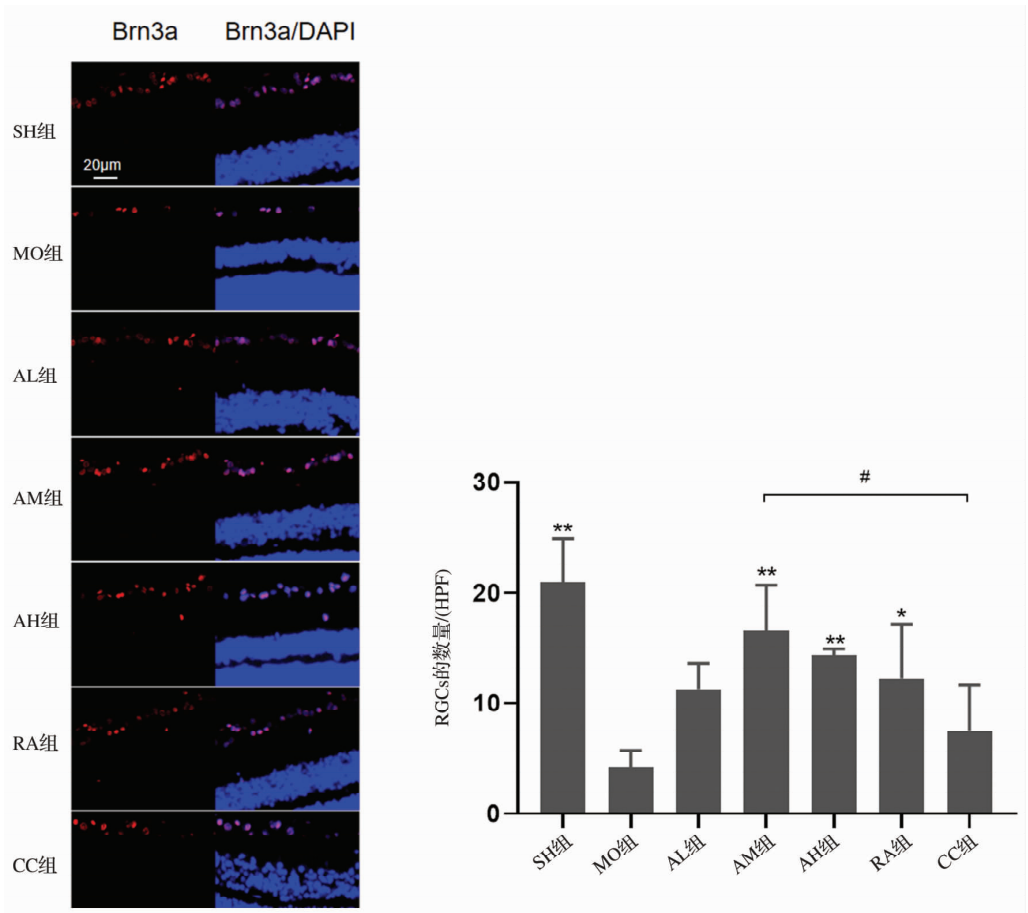
黄芪甲苷通过调控 AMPK/MTOR/ULK 通路介导的自噬保护视网膜神经节细胞损伤

(正文见 96 – 101 页)



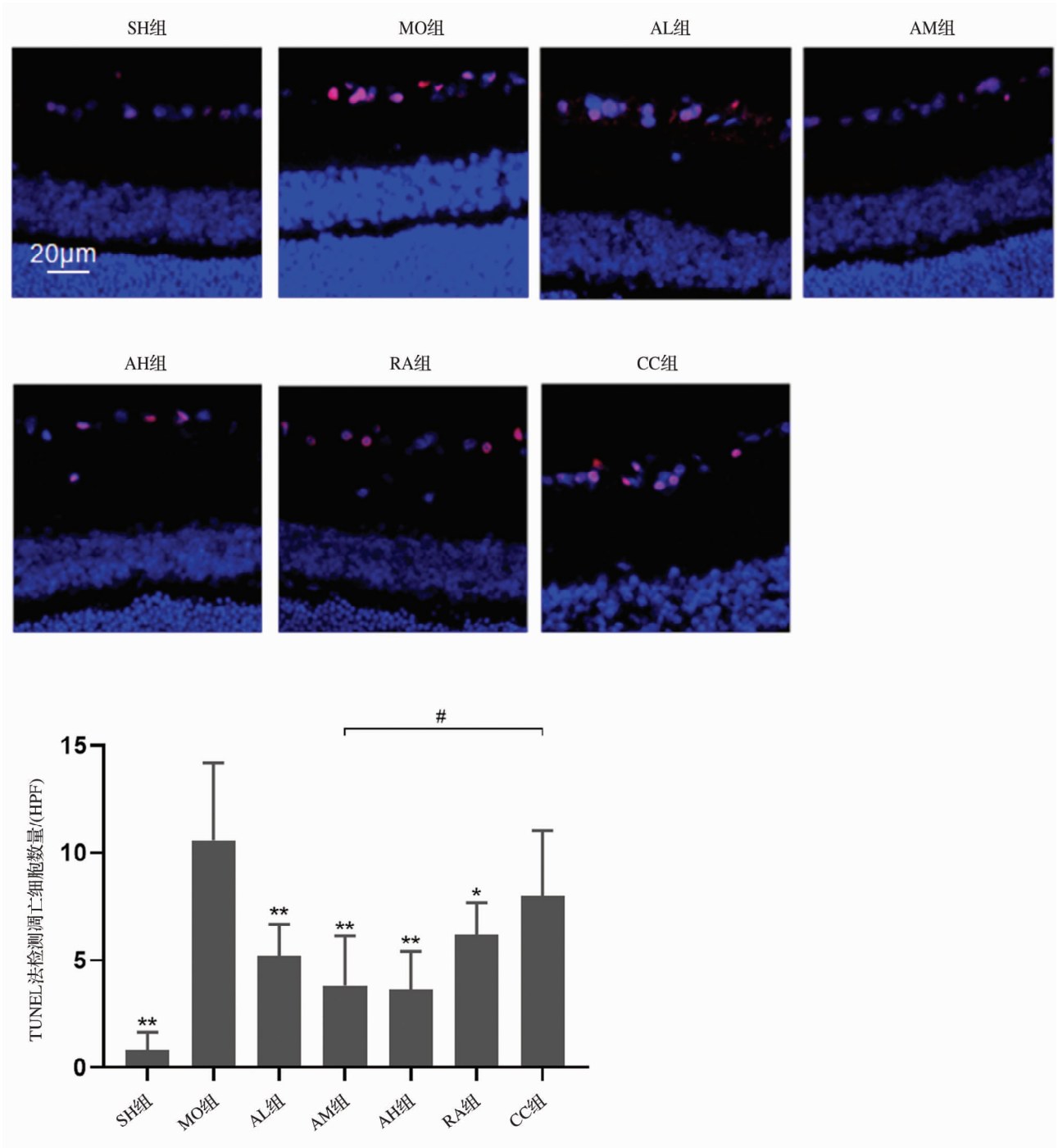
注:A. 正常视网膜超微结构(×2000);B. 模型组 7 d 后视网膜超微结构(×2000);B1. 图 B 自噬体部分放大图(×6000);箭头所指为自噬小体。

图 1 透射电镜观察大鼠视网膜组织



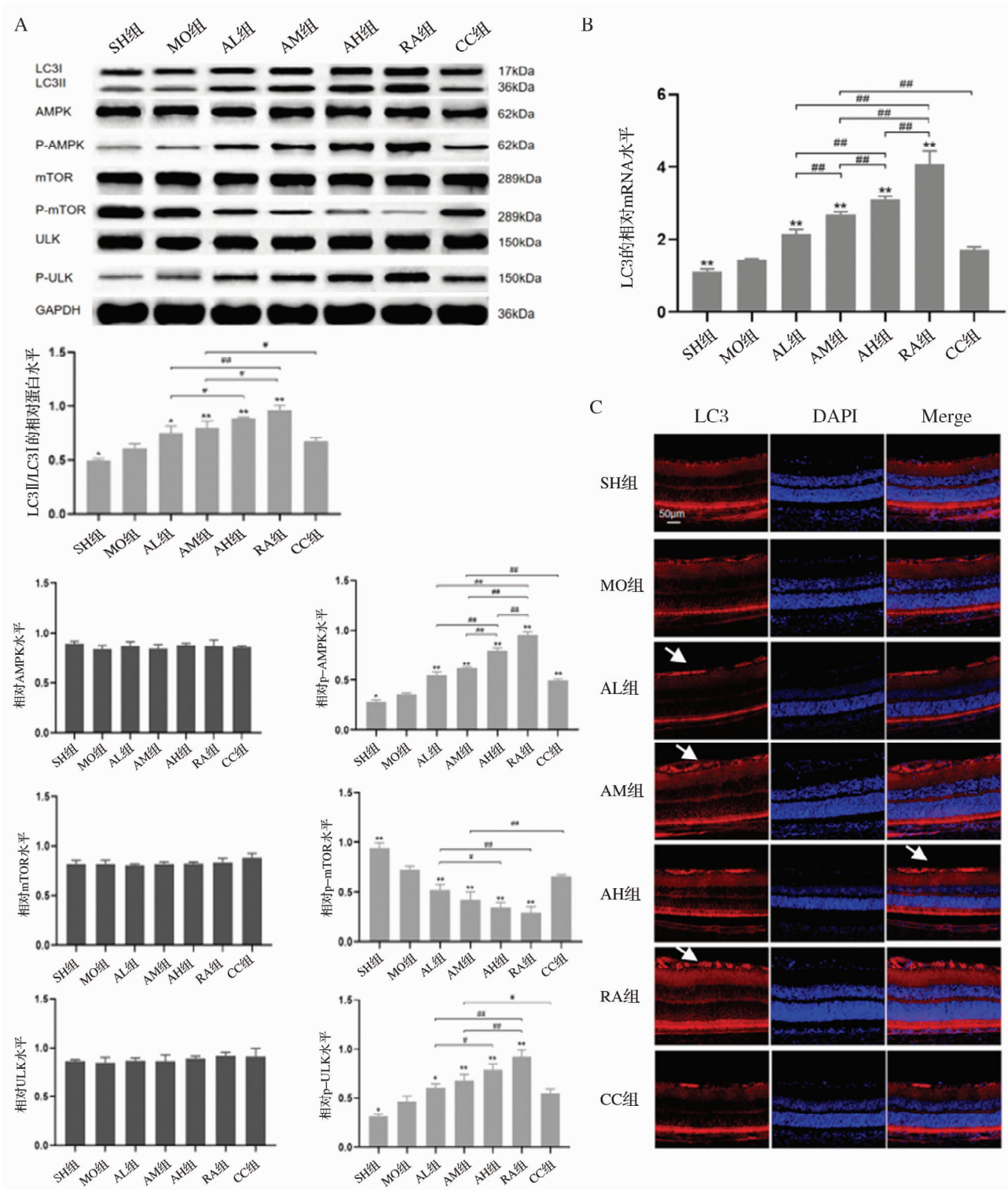
注:* 与 MO 组比较,$P<0.05$;* * 与 MO 组比较,$P<0.01$;药物组之间比较,#$P<0.05$。

图 2 Brn3a 免疫荧光检测各组大鼠视网膜 RGCs 数量(×100)



注：＊与 MO 组比较，$P<0.05$；＊＊与 MO 组比较，$P<0.01$；药物组之间比较，#$P<0.05$。

图 3 TUNEL 法检测各组大鼠视网膜神经纤维层凋亡细胞数量（×400）



注：A. 采用蛋白质印迹法测定各大鼠视网膜组织中 LC3 蛋白水平，AMPK、mTOR 和 ULK 蛋白及磷酸化水平；B. 采用 RT－qPCR 检测各组大鼠视网膜组织中的 LC3 mRNA 表达水平（$n=3$）；C. 各组大鼠视网膜组织的 LC3 免疫荧光检测（×100），可见 AS－Ⅳ各剂量组和 RA 组的神经纤维层的 LC3 荧光明显增强（箭头）。＊与 MO 组比较，$P<0.05$；＊＊与 MO 组比较，$P<0.01$；#$P<0.05$；##$P<0.01$。

图4 AS－Ⅳ通过调节 AMPK、mTOR 和 ULK 的磷酸化来增强自噬