

分类号：
学 号：20212014080

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



Neuritin 通过 cGAS-STING 通路调控蛛网膜下 腔出血后自噬流的研究

学 位 申 请 人	张昊
指 导 教 师	赵冬教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	外科学
研 究 方 向	神经外科
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子
2024年5月

分类号：
学 号：20212014080

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



Neuritin 通过 cGAS-STING 通路调控蛛网膜下 腔出血后自噬流的研究

学 位 申 请 人	张昊
指 导 教 师	赵冬教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	外科学
研 究 方 向	神经外科
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子
2024年5月

**Neuritin regulates autophagic flux through the cGAS-STING pathway
after subarachnoid hemorrhage**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Hao Zhang

(Surgery)

Dissertation Supervisor:

Dong Zhao

May, 2024

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：张昊 时间2024年5月14日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：张昊 时间：2024年5月14日
导师签名：张昊 时间：2024年5月14日

摘要

目的：本研究旨在探究蛛网膜下腔出血（Subarachnoid hemorrhage, SAH）后 cGAS-STING 通路在 Neuritin 调控自噬流中的作用。

方法：（1）对雄性 SD 大鼠进行血管内穿孔建立 SAH 模型，并进行 SAH 程度分级和 H&E 染色模型鉴定。（2）根据实验设计，大鼠随机分为 Sham 组，Sham + AAV9-NC 组，Sham + AAV9-Nrn1 组，SAH 组，SAH + Vehicle 组，SAH + C-176 组，SAH + CMA 组，SAH + AAV9-NC 组，SAH + AAV9-Nrn1 组，SAH + AAV9-Nrn1 + Vehicle 组，SAH + AAV9-Nrn1 + CMA 组。（3）改良 Garcia 评分评估神经行为学，Evans 蓝检测血脑屏障通透性，干湿重法评估脑水肿程度。（4）ELISA 实验检测自噬标志蛋白 LC3II/LC3I 比值。（5）免疫荧光检测 Neuritin 和 STING 与小胶质细胞标记蛋白 Iba1 共表达，以及与神经元标记蛋白 NeuN 共表达的溶酶体标记蛋白 LAMP1 的表达变化。（6）Western blot 技术检测 Neuritin、自噬相关蛋白 LC3II、LC3I、P62 和 cGAS-STING 通路相关蛋白 STING、P-STING、TBK1、P-TBK1 分子表达变化。（7）透射电镜观察细胞内自噬相关的细胞器超微结构变化。

结果：（1）肉眼观和 H&E 染色鉴定证明成功建立 SAH 大鼠模型。

（2）Sham 组的 SAH 等级为 0。SAH 程度分级低于 9 分的低程度 SAH 大鼠被排除本实验。所有 SAH 组的 SAH 程度分级得分无统计学差异。

（3）Western blot 检测证明相比 SAH + AAV9-NC 组，SAH + AAV9-Nrn1 组 Neuritin 蛋白表达明显增高 ($P < 0.01$)。

（4）免疫荧光检测分别证明 Neuritin 和 STING 与小胶质细胞标记蛋白 Iba1 共表达。

（5）SAH 后大鼠神经行为学评分降低，脑含水量和 Evans 蓝外渗增加 ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)；相比 SAH + AAV9-NC 组，SAH + AAV9-Nrn1 组神经行为学评分增加，脑含水量和 Evans 蓝外渗减少 ($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。

（6）SAH 后大鼠大脑皮层内 LC3II/I 比值增高，P62 和神经元中的 LAMP1 表达增加 ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)；Neuritin 干预后 LC3II/I 比值进一步增高，P62 和神经元中的 LAMP1 表达减少 ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)。

（7）SAH 后 STING、P-STING 和 P-TBK1 表达升高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)；C-176 降低 STING、P-STING 和 P-TBK1 表达 ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$)，并且使 LC3II/I 比值降低的同时 P62 和 LAMP1 表达减少 ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)；CMA 增加 STING、P-STING 和 P-TBK1 表达 ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$)，并且使 LC3II/I 比值增高的同时 P62 和 LAMP1 表达增多 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。

（8）Neuritin 降低 SAH 后增高的 STING、P-STING 和 P-TBK1 表达 ($P < 0.01$, $P < 0.01$,

$P<0.001$)。与 SAH + AAV9-Nrn1 + Vehicle 组相比, SAH + AAV9-Nrn1 + CMA 组的行为学评分减低, 脑含水量和 Evans 蓝外渗增加 ($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.05$); STING、P-STING、P-TBK1 升高 ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.001$), LC3II/I 比值升高的同时 P62 和 LAMP1 表达增加 ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.01$)。

(9) 透射电子显微镜 (Transmission electron microscopy, TEM) 显示 SAH 后神经元细胞器严重水肿, 自噬溶酶体数量少; Neuritin 干预后细胞器水肿减轻, 自噬溶酶体数量增多。C-176 干预后细胞器水肿程度减轻, 自噬溶酶体增多; 而 CMA 干预后肿胀、破裂细胞器增多, 未见自噬溶酶体。与 SAH + AAV9-Nrn1 + Vehicle 组相比, SAH + AAV9-Nrn1 + CMA 组神经元中自噬溶酶体减少。

结论: Neuritin 通过促进 SAH 后神经元中阻滞的自噬流减轻早期脑损伤 (Early brain injury, EBI), 这种作用是通过调控 cGAS-STING 通路实现的。

关键词: 蛛网膜下腔出血; 早期脑损伤; 自噬流; cGAS-STING 通路; Neuritin

Abstract

Objective: To explore the role of the cGAS-STING pathway in the regulation of autophagy flux by Neuritin after SAH.

Methods: (1) Male SD rats were subjected to endovascular perforation to establish SAH model, and the severity of SAH was graded and confirmed by H&E staining. (2) According to the experimental design, the rats were randomly divided into the Sham group, Sham + AAV9-NC group, Sham + AAV-Nrn1 group, SAH group, SAH + Vehicle group, SAH + C-176 group, SAH + CMA group, SAH + AAV9-NC group, SAH + AAV9-Nrn1 group, SAH + AAV-Nrn1 + Vehicle group, and SAH + AAV-Nrn1 + CMA group. (3) Neurological behavior modified Garcia score, blood-brain barrier permeability was evaluated by the Evans blue extravasation test, and brain edema was evaluated by the wet-dry weight method. These three methods were used to evaluate the extent of brain injury. (4) The ratio of autophagy marker protein LC3II/LC3I was detected by ELISA experiment. (5) The co-expression of Neuritin and STING with the microglia marker protein Iba1, as well as the expression changes of the lysosomal marker protein LAMP1 co-expressed with the neuronal marker protein NeuN was detected by immunofluorescence staining technique. (6) The expression of Neuritin, autophagy-related proteins LC3II, LC3I, P62, and STING pathway-related proteins STING, P-STING, TBK1, and P-TBK1 were detected by Western blot analysis. (7) The ultrastructural changes in autophagy-related organelles were observed by TEM.

Results: (1) The successful establishment of the SAH model in rats was confirmed by macroscopic observation and H&E staining.

(2) The SAH grade in the Sham group was 0. Rats with a SAH grade less than 9 were excluded from this experiment. There was no significant difference in the SAH grades between all SAH groups.

(3) The successful overexpression of Neuritin protein in the cerebral cortex of rats was demonstrated by Western blot analysis ($P < 0.01$).

(4) The co-expression of Neuritin and STING with the microglia marker protein Iba1 was showed by immunofluorescence staining.

(5) The neurological behavioral scores of rats decreased, brain water content and Evans blue extravasation increased after SAH ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$). The neurological behavioral scores increased, brain water content and Evans blue extravasation decreased in the SAH + AAV9-Nrn1 group compared with the SAH + AAV9-NC group. ($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.01$).

(6) The ratio of LC3 II/I in the cerebral cortex of rats increased, and the expression of P62 and LAMP1 in neuronal cells increased after SAH ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$). The ratio of LC3 II/I further increased,

and the expression of P62 and LAMP1 in neuronal cells decreased after Neuritin treatment. ($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.001$).

(7) The expression of STING, P-STING, and P-TBK1 increased after SAH ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$). The expression of STING, P-STING, and P-TBK1 reduced ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.05$), and the ratio of LC3 II/I decreased, and the expression of P62 and LAMP1 reduced after C-176 treatment ($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$); the expression of STING, P-STING, and P-TBK1 increased ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.05$), and the ratio of LC3 II / I increased, and the expression of P62 and LAMP1 increased after CMA treatment ($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.01$).

(8) The expression of STING, P-STING, and P-TBK1 increased after SAH and then reduced after Neuritin treatment ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$). The neurological behavioral scores decreased while the brain water content and Evans blue extravasation increased in the SAH + AAV9-Nrn1 + CMA group compared with the SAH + AAV9-Nrn1 + Vehicle group ($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.05$). The expression of STING, P-STING, P-TBK1 increased ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.001$), and the expression of P62 and LAMP1, and the ratio of LC3 II/I increased ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.01$).

(9) Severe organelle swelling and the number of autolysosomes did not increase significantly after SAH by transmission electron microscopy; organelle swelling reduced and autolysosomes numbers increased after Neuritin treatment. Organelle swelling reduced and autolysosomes numbers increased after C-176 treatment, while cell swelling increased, ruptured organelles, and no autolysosomes were observed after CMA treatment. Fewer autolysosomes were observed in the SAH + AAV9-Nrn1 + CMA group compared with the SAH + AAV9-Nrn1 + Vehicle group.

Conclusion: Neuritin alleviates EBI by repairing damaged autophagy flux after SAH, which is achieved by regulating the cGAS-STING pathway.

Key words: Subarachnoid hemorrhage; Early brain injury; Autophagy flux; cGAS-STING pathway; Neuritin

英文缩略词简表

(List of Abbreviations)

英文缩写	英文全称	中文全称
BBB	Blood Brain Barrier	血脑屏障
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CBF	Cerebral Blood Flow	脑血流量
cGAS	Circular GMP-AMP Synthetase	环状 GMP-AMP 合成酶
CMA	Cridanimod	N-乙酸吡啶酮
CPP	Cerebral Perfussion Pressure	脑灌注压
EBI	Early Brain Injury	早期脑损伤
ECL	Enhanced chemiluminescence	增强型化学发光试剂
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
H&E	hematoxylin-eosin	苏木精-伊红
HEPES	hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid	4-羟乙基哌嗪乙磺酸
ICP	Intracranial Pressure	颅内压
LAMP1	Lysosomal-associated Membrane Protein 1	溶酶体相关膜蛋白 1
LC3 (MAP1LC3)	Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3	微管相关蛋白 1 轻链 3
PBS	Phosphate Buffer solution	磷酸盐缓冲液
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
SAH	Subarachnoid Hemorrhage	蛛网膜下腔出血
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺
STING	Stimulator of Interferon Genes	干扰素基因刺激因子
TBK1	TANK-binding Kinase 1	TANK 结合激酶 1
TBS	Tris Buffered Saline	三乙醇胺缓冲盐水溶液
TEM	Transmission Electron Microscope	透射电子显微镜
WB	Western blot	蛋白质免疫印迹

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
英文缩略词简表.....	V
第 1 章 前言.....	1
第 2 章 材料与方法.....	4
2.1 材料.....	4
2.1.1 实验动物.....	4
2.1.2 实验试剂及耗材.....	4
2.1.3 主要实验仪器.....	6
2.1.4 主要实验试剂配制.....	7
2.1.5 腺相关病毒基因序列.....	8
2.2 实验方法.....	9
2.2.1 SAH 模型建立.....	9
2.2.2 灌注取材.....	9
2.2.3 实验设计.....	10
2.2.4 药物注射.....	10
2.2.5 侧脑室立体定向注射.....	10
2.2.6 SAH 程度分级.....	11
2.2.7 大鼠神经功能评分.....	11
2.2.8 苏木精-伊红染色.....	11
2.2.9 脑含水量测定.....	12
2.2.10 组织分级分离.....	12
2.2.11 夹心 ELISA 检测.....	12
2.2.12 Evans 蓝染色.....	13
2.2.13 免疫荧光染色.....	13
2.2.14 蛋白质印迹分析 (Western blot).....	14
2.2.15 透射电镜 (TEM).....	16
2.2.16 统计分析.....	17
第 3 章 实验结果.....	18
3.1 SAH 模型及鉴定.....	18
3.2 大鼠死亡率和 SAH 严重程度分级.....	18

3.3 腺相关病毒转染效果	20
3.4 Neuritin 和 STING 与小胶质细胞共定位	20
3.5 SAH 后 24 小时大鼠出现 EBI, Neuritin 减轻脑损伤	21
3.6 SAH 后 24 小时自噬流受损, Neuritin 恢复自噬流	21
3.7 SAH 后 cGAS-STING 通路过表达损害自噬流	23
3.8 Neuritin 降低 cGAS-STING 通路表达, CMA 减弱 Neuritin 的促进自噬流和脑保护作用	24
3.9 TEM 观察自噬相关细胞器超微结构	27
第 4 章 讨论	29
第 5 章 结论	33
第 6 章 文献综述	34
参考文献	42
致谢	54
作者简介	55
导师评阅表	56