

DOI:10.19296/j.cnki.1008-2409.2023-04-005

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

低氧预适应对小鼠海马神经元细胞的保护作用及其相关基因^①

杨 静^{1ab②}, 侯 冰^{1ab}, 武文清^c, 闫学文^c, 郝爱玲^c, 庞一强^{2③}

(1. 内蒙古科技大学包头医学院 a. 研究生院, b. 基础医学与法医学院, c. 2018 级本科生, 内蒙古 包头 014040; 2. 包头市第四医院神经外科, 内蒙古 包头 014030)

摘要 目的: 探究低氧预适应(HPC)对氧糖剥夺/复糖复氧(OGD/R)小鼠海马神经元细胞的保护作用及其作用的相关基因。方法: 将小鼠海马神经元细胞系 HT22 细胞分为常氧组、OGD/R 组和 HPC+OGD/R 组。采用 MTS 法检测细胞活力, RT-qPCR 及蛋白免疫印迹技术检测 N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B 亚基(NR2B)及突触后密度蛋白 95(PSD95)基因的表达。结果: 与常氧组比较, OGD/R 组的细胞活力明显降低。HPC+OGD/R 组细胞活力高于 OGD/R 组, 细胞 NR2B 的表达低于 OGD/R 组, 细胞 PSD95 的表达高于 OGD/R 组。结论: HPC 对 OGD/R 的 HT22 细胞具有保护作用, 其作用可能与降低 NR2B 的表达, 升高 PSD95 的表达有关。

关键词: 低氧预适应; 氧糖剥夺/复糖复氧; N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B 亚基; 突触后密度蛋白 95

中图分类号: R338.1

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2023)04-0032-06

Protective effects of hypoxic preconditioning on hippocampal neurons in mice and its related genes^①

YANG Jing^{1ab②}, HOU Bing^{1ab}, WU Wenqing^c, YAN Xuewen^c, HAO Ailing^c, PANG Yiqiang^{2③}

(1. a. Graduate School, b. School of Basic Medicine and Forensic Medicine, c. Undergraduate of Grade 2018, Baotou Medical College of Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040; 2. Dept. of Neurosurgery, the Fourth Hospital of Baotou, Baotou 014030, China)

Abstract Objective: To investigate the protective effects of hypoxia preconditioning (HPC) on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced injury mouse hippocampal neuron cells (HT22 cells) and its relevant action genes. Methods: Mouse hippocampal neuron cell line HT22 cells were divided into 3 groups: normoxic group, OGD/R group and HPC+OGD/R group. The cell viability of each group was determined by MTS method, and the expressions of N-methyl-D-aspartic acid receptor 2B subunit (NR2B)

① 基金项目: 内蒙古自然科学基金项目(2020MS08063); 包头医学院花蕾计划项目(HL2020002); 包头医学院青苗计划项目(BYJJ-ZRQM 202013)。

② 第一作者简介: 杨静, 博士, 教授, 研究方向为低氧相关疾病的分子生物学机制。

③ 通信作者: 庞一强, E-mail: 16157221@qq.com。

and postsynaptic density protein 95 (PSD95) were determined by RT-qPCR and Western blot. Results: Compared with the normoxic group, the cell viability of OGD/R group was significantly reduced. The cell viability of the HPC + OGD/R group was significantly higher than that of the OGD/R group, and the expression of NR2B in HPC + OGD/R group was significantly lower than that in OGD/R group, and the expression of PSD95 in HPC + OGD/R group was significantly higher than that in OGD/R group. Conclusion: HPC may protect OGD/R-induced injury HT22 cells. The mechanism may be related to the reduced NR2B expression level, and the improved PSD95 expression.

Keywords: hypoxic preconditioning; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; N-methyl-D-aspartic acid receptor 2B subunit; post-synaptic density protein 95

缺血性脑卒中是临床常见的脑血管疾病,也是疾病致残的首要原因^[1]。研究数据显示,2016年心脑血管疾病造成全球1760余万人死亡,是全球首位死亡病因,其中脑血管病造成550余万人死亡^[2]。低氧/缺血预适应(hypoxic/ischemia preconditioning, H/IPC)是指一种亚致死性的低氧/缺血损伤,可增加器官、细胞对随后缺氧损伤中的抵抗力,广泛存在于心、肾、脑等器官中,是机体的一种内源性保护机制^[3]。近年来,许多研究表明,低氧/缺血预适应可以增加大脑对缺氧的抵抗力。N-甲基-D-天冬氨酸受体2B亚基(NMDA receptor 2B subunit, NR2B)在脑缺血性损伤的作用被广泛研究,大脑缺血再灌注损伤时,分布在突触外的NR2B被过度激活,最终导致神经元死亡^[4]。而突触后密度蛋白95(post-synaptic density protein 95, PSD95)作为一种突触支架分子,是突触后膜稳定和转运N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDARs)和AMPA受体的主要调节因子^[5]。很多情况下, NR2B亚基都要与PSD95结合后才能间接与下游信号分子结合从而将NMDA受体接受的信息传递给下游信号分子^[6],且二者的DNA均可以通过甲基化进行调控。因此,本研究利用体外构建低氧预适应(hypoxic precondition, HPC)和氧糖剥夺/复糖复氧(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)细胞模型,观察HPC对OGD/R的HT22细胞中NR2B及PSD95的表达影响,探讨HPC对脑卒中的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与细胞

实验用的细胞系为小鼠海马神经元细胞系

HT22,由包头医学院低氧转化医学重点实验室惠赠。细胞用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基(含青霉素和链霉素),置于5%CO₂的37℃二氧化碳培养箱进行培养。MTS试剂盒购自美国Promega公司;cDNA反转录试剂盒购自瑞士Roche公司;RT-qPCR试剂盒购自中国CWBIO公司;PSD95和NR2B抗体购于美国CST公司; β -actin抗体购于美国Santa cruz公司。本研究经内蒙古科技大学包头医学院医学伦理委员会审核、批准。PCR引物购于上海生物工程技术有限公司,引物序列见表1。

表1 RT-qPCR检测基因的引物序列

基因名	正向引物	反向引物
β -actin	5'-GGCTGTATTCCCC TCCATCG-3'	5'-CCAGTTGGTAACA ATGCCATGT-3'
NR2B	5'-CTGTTCATGCTCAA CATCATGGA-3'	5'-GCGGATCTTGTTT ACGAAGTC-3'
PSD95	5'-CTCCGATGAAGTC AGAGCCC-3'	5'-CCCCTTCACATAT CCTGGGG-3'

1.2 MTS检测细胞活力

1.2.1 OGD/R细胞活力检测 状态良好的HT22细胞消化后,接种适量细胞于96孔板中,适应性培养12h,将细胞分为4组:常氧培养组;OGD 1h/R 24h组(氧糖剥夺培养条件为细胞加入无糖无血清的DMEM培养基,并置于含有1%O₂、5%CO₂和94%N₂的37℃二氧化碳培养箱中培养1h;复糖复氧培养条件为细胞加入含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基,置于5%CO₂、常氧和37℃的二氧化碳培养箱中培养24h);OGD 2h/R 24h组;OGD 3h/R

24 h 组。不同 OGD/R 条件培养结束后,每孔加 20 μl MTS,轻轻混匀后,立即放入通有 5% CO_2 的常氧 37 $^\circ\text{C}$ 二氧化碳培养箱中避光孵育 3 h,然后,选择波长 570 nm,测定光密度(OD)值,并计算细胞活力。选择细胞活力最低的一组作为 OGD/R 实验条件。

1.2.2 HPC+OGD/R 细胞活力检测 适量 HT22 细胞接种于 96 孔板中,适应性培养 12 h,并分为以下 5 组:OGD 3 h/R 24 h 组;HPC1+ OGD 3 h/R 24 h 组(HPC1 实验条件为:用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养细胞,并置于 1% O_2 、5% CO_2 和 94% N_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 二氧化碳培养箱培养 30 min,随后立即置于通有 5% CO_2 的常氧 37 $^\circ\text{C}$ 二氧化碳培养箱培养 30 min,此为一个低氧/复氧循环,进行 4 次循环);HPC2+OGD 3 h/R 24 h 组(HPC2 实验条件为:用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养细胞,并置于 1% O_2 、5% CO_2 和 94% N_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 二氧化碳培养箱培养 30 min,随后立即置于通有 5% CO_2 的常氧 37 $^\circ\text{C}$ 二氧化碳培养箱培养 30 min,此为一个低氧/复氧循环,进行 2 次循环);HPC3+ OGD 3 h/R 24 h 组(HPC3 实验条件为:用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养细胞,并置于 1% O_2 、5% CO_2 和 94% N_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 二氧化碳培养箱培养 60 min,随后立即置于通有 5% CO_2 的常氧 37 $^\circ\text{C}$ 二氧化碳培养箱培养 60 min,以此为一个低氧/复氧循环,进行 1 次循环);HPC4+ OGD 3 h/R 24 h 组(HPC4 实验条件为:用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养细胞,并置于 1% O_2 、5% CO_2 和 94% N_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 二氧化碳培养箱培养 120 min,随后立即置于通有 5% CO_2 的常氧 37 $^\circ\text{C}$ 二氧化碳培养箱培养 120 min,以此为一个低氧/复氧循环,进行 1 次循环),以上各组细胞的培养结束后,每孔加 20 μl MTS 试剂,放入通有 5% CO_2 的常氧 37 $^\circ\text{C}$ 二氧化碳培养箱中避光孵育 3 h,以波长 570 nm 测定各组 OD 值,并计算细胞活力。选择细胞活力最高组的实验条件用于后续实验。

1.3 RNA 提取及 RT-qPCR

将状态良好的 HT22 细胞分为 3 组,分别为常氧组,OGD 3 h/R 24 h 组,HPC+OGD 3 h/R 24 h 组。合适数量的 HT22 细胞接种于直径 100 mm 的培养皿中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基进行

常规培养,至细胞铺满培养皿底 80% 左右时,常氧组继续置于二氧化碳培养箱中常规培养(37 $^\circ\text{C}$,5% CO_2),其余两组按照各组培养条件进行培养。应用 Trizol 法提取各处理组 HT22 细胞中总 RNA,Nanodrop 2000 超微量紫外/可见分光光度计检测 RNA 纯度和含量。取 1 μg RNA 按照反转录试剂盒操作说明进行反转录 PCR,得到 20 μl cDNA 产物,-20 $^\circ\text{C}$ 保存。使用 ABI 96 孔板进行 PCR 反应,每孔依次加入 2 \times UltraSYBR Mixture 10 μl ,cDNA 2 μl ,上游和下游引物各 1 μl (引物序列见表 1),加双蒸水至 20 μl ,在 ABI 7900 real-time PCR 反应仪上反应,每个样本设 3 个复孔。PSD95 基因反应参数为:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,53 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s,共进行 40 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min 后,停止反应。NR2B 基因的退火温度为 56 $^\circ\text{C}$,其他反应参数均相同。RT-qPCR 实验中各目标基因 mRNA 表达的相对丰度值以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值表示。通过 RT-qPCR 仪分析软件导出各基因 Ct 值,以 β -actin 为内参,则各基因 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目标}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actin}}$,而 $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{目的基因实验组}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actin实验组}}) - (\text{Ct}_{\text{目的基因对照组}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actin对照组}})$ 。

1.4 蛋白的提取及蛋白免疫印迹

按照 1.3 中的分组及实验条件培养 HT22 细胞,收集各组细胞,按照说明书加入蛋白酶抑制剂、RIPA 裂解液,用超声破碎仪将细胞进行裂解,提取全细胞裂解液。以 BCA 法测定各组总蛋白质浓度,取 20 μg 进行蛋白免疫印迹实验,检测 NR2B 及 PSD95 蛋白表达。

1.5 统计学方法

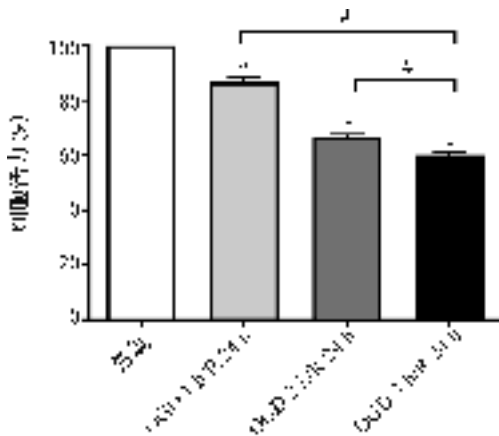
应用 SPSS 20.0 软件进行数据处理,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,用 GraphPad Prism 5 绘图软件进行绘图,采用单因素方差分析或 Wilcoxon 秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活力

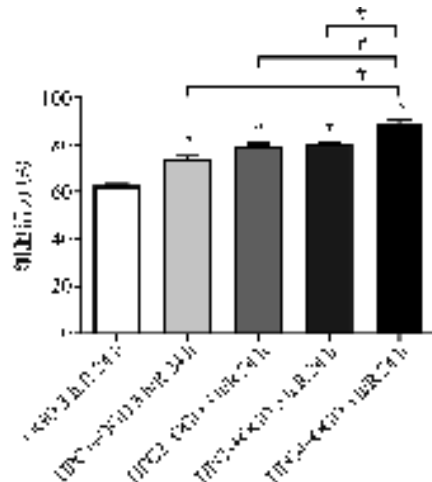
与常氧组比较,OGD 1 h、2 h、3 h 后复氧 24 h,HT22 细胞的活力逐渐降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。故实验选择 OGD 3 h/R 24 h 作为体

外 HT22 细胞模拟脑缺血再灌注(OGD/R)模型。



与常氧组比较, * $P < 0.05$; 与 OGD 3 h/R 24 h 比较, # $P < 0.05$

图 1 OGD/R 培养对 HT22 细胞活力的影响



与 OGD 3 h/R 24 h 组比较, * $P < 0.05$; 与 HPC4 + OGD 3 h/R 24 h 组比较, # $P < 0.05$

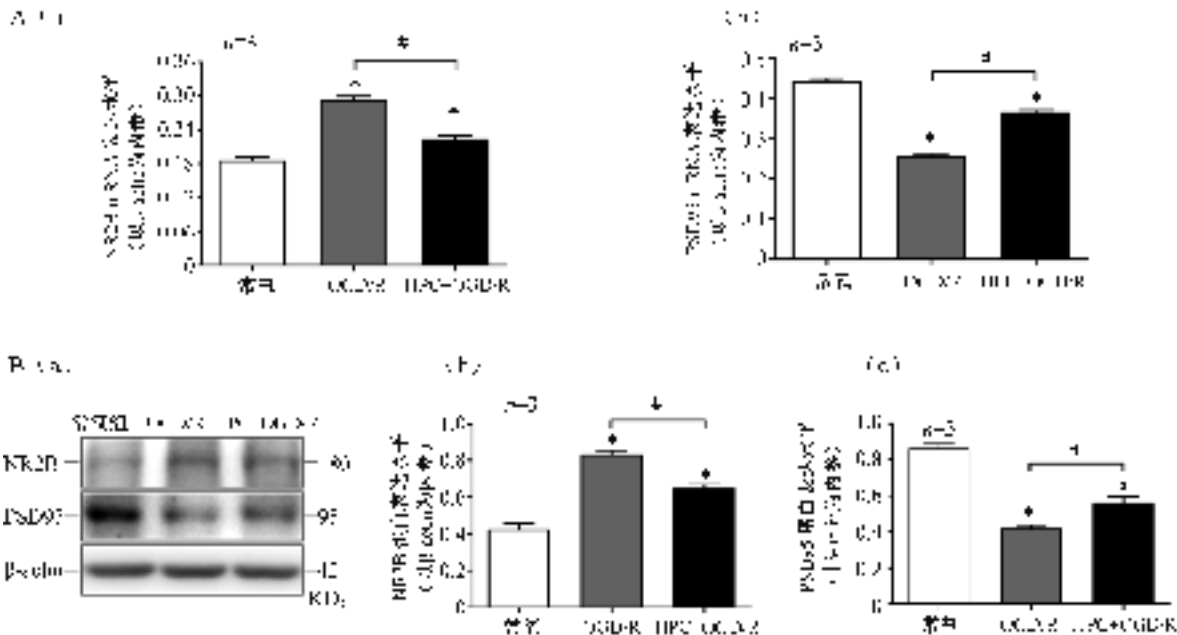
图 2 HPC 对 OGD 3 h/R 24 h HT22 细胞活力的影响

2.2 HPC 对 OGD 3 h/R 24 h HT22 细胞活力的影响

与对照组(OGD 3 h/R 24 h)比较,HPC 时间越长,细胞活力越高($P < 0.05$),低氧培养 120 min,随后立即恢复常氧培养 120 min 的 HPC 条件下,HT22 细胞活力最大,见图 2。

2.3 HPC 对 OGD/R HT22 细胞 NR2B、PSD95 表达的影响

与常氧组比较,不管是 mRNA 还是蛋白质表达,OGD/R 组及 HPC + OGD/R 组 HT22 细胞 NR2B、PSD95 表达均明显发生改变,OGD/R 组 NR2B 表达高于 HPC+OGD/R 组($P < 0.05$),而 PSD95 表达低于 HPC+OGD/R 组($P < 0.05$),见图 3。



A. HPC 对 OGD/R HT22 细胞 NR2B、PSD95 mRNA 表达的影响;a. NR2B mRNA 的表达,b. PSD95 mRNA 的表达,* $P < 0.05$ 。B. HPC 对 OGD/R HT22 细胞 NR2B、PSD95 蛋白表达的影响;a. 蛋白免疫印迹图片,b. NR2B 蛋白的表达变化,c. PSD95 蛋白的表达变化。HPC+OGD/R 组与常氧组比较,* $P < 0.05$;OGD/R 组与 HPC+OGD/R 组比较,# $P < 0.05$

图 3 HPC 对 OGD/R HT22 细胞 NR2B、PSD95 表达的影响

3 讨论

低氧/缺血预适应是指机体、器官、组织或细胞暴露于亚致死性缺氧/缺血环境中,从而增加对随后发生的致死性刺激的耐受,是机体的一种内源性保护机制,其具体机制尚不完全清楚^[7-8]。Lu等^[8]提出低氧耐受应该有组织和细胞机制参与,这种组织和细胞在极端条件下做出的面临生死的基因表达改变,可能是脑保护作用基因的表达上调,并使脑损伤作用基因的表达下调^[9]。NMDARs是大脑中由谷氨酸门控的阳离子通道。NMDARs就像一把双刃剑,在神经元保护和神经元死亡中都发挥着重要的作用^[10]。突触外包含 NR2B 亚基的 NMDARs 刺激促进神经元细胞死亡,DAPK1 可以直接与 NR2B 亚基结合,进而使谷氨酸受体过度激活,导致细胞内钙超载,产生兴奋性毒性,并最终导致神经元死亡^[11-12]。本研究也观察到,经 OGD/R 后,HT22 细胞活力下降,说明 OGD/R 后细胞受到损伤,且 NR2B 表达升高,提示 NR2B 在 OGD/R 引起的 HT22 细胞损伤中扮演“坏”基因的角色,而经过 HPC 处理后,不仅提高了 OGD/R 损伤后 HT22 细胞活力,且 HT22 细胞 NR2B 在经过 HPC 处理后表达降低,提示低氧预适应可能通过下调 OGD/R 导致的 NR2B 的表达增加而发挥对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞的保护作用。

PSD95 是支架蛋白 DLG 家族的一员,是一类膜相关鸟苷酸激酶,在细胞间黏附、受体功能和聚集的调节中起重要作用,NR2B 亚基与下游信号分子结合,将 NMDARs 接受的信息向膜内传递^[13]。有研究表明,新生大鼠的低氧缺血性脑损伤导致脑组织 PSD95 表达下降,而 GSK-3 β 抑制剂(或氯化锂)则通过激活 mTORC 1 信号使 PSD95 表达增加,恢复突触完整性,神经传递和神经元生存能力^[14]。PSD95、PSD93 和 SAP-102 的联合敲低,突触后 AMPA 受体和 NMDA 受体介导的突触传播效率降低,PSD 下调^[15],PSD95 水平下降也被认为是大脑中动脉闭塞诱导的体外兴奋性毒性,短暂脑缺血是导致神经元死亡的病因^[13],以上结果均提示 PSD95 在低氧缺血性脑损伤中可能起到保护作用。本研究观察到,OGD/R 引起的 HT22 细胞损伤时,PSD95 的表达降低,而给予 HPC 处理后,PSD95 的表达升高,提示低

氧预适应可能通过上调 OGD/R 导致的 PSD95 表达降低而发挥对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞的保护作用。体内实验研究结果表明,HPC 可以对缺血性脑卒中引起的神经损伤起保护作用^[16]。本实验则通过 HT22 细胞体外构建 OGD/R 模型,模拟体内缺血性脑卒中情况,进一步证实了 HPC 对 OGD/R 损伤 HT22 细胞的保护作用,而这种保护作用可能与 NR2B 和 PSD95 的表达有关。

参考文献:

- [1] CAMPBELL B C V, KHATRI P. Stroke[J]. Lancet, 2020, 396(10244):129-142.
- [2] 王陇德,刘建民,杨弋,等.《中国脑卒中防治报告 2017》概要[J].中国脑血管病杂志,2018,15(11):611-617.
- [3] WU X G, WANG C L, WANG J B, et al. Hypoxia preconditioning protects neuronal cells against traumatic brain injury through stimulation of glucose transport mediated by HIF-1 α /GLUTs signaling pathway in rat [J]. Neurosurg Rev, 2021,44(1):411-422.
- [4] TANG X L, XIE S S, WANG H J, et al. The combination of Astragalus membranaceus and ligustrazine mitigates cerebral ischemia-reperfusion injury via regulating NR2B-ERK/CREB signaling[J]. Brain Behav, 2023,13(2):e2867.
- [5] COLEY A A, GAO W J. PSD95: a synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2018,82:187-194.
- [6] BRAITHWAITE S P, ADKISSON M, LEUNG J, et al. Regulation of NMDA receptor trafficking and function by striatal-enriched tyrosine phosphatase (STEP) [J]. Eur J Neurosci, 2006,23(11):2847-2856.
- [7] LIU J, GU Y K, GUO M Y, et al. Neuroprotective effects and mechanisms of ischemic/hypoxic preconditioning on neurological diseases[J]. CNS Neurosci Ther, 2021,27(8):869-882.
- [8] LU G W, SHAO G. Hypoxic preconditioning: effect, mechanism and clinical implication (Part 1) [J]. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi, 2014,30(6):489-501.
- [9] ENDRES M, MEISEL A, BINISZKIEWICZ D, et al. DNA methyltransferase contributes to delayed ischemic brain injury[J]. J Neurosci,2000,20(9):3175-3181.
- [10] WANG S, SHI X D, LI H, et al. DAPK1 signaling pathways in stroke: from mechanisms to therapies [J]. Mol

- Neurobiol, 2017,54(6):4716-4722.
- [11] PETRALIA R S, WANG Y X, HUA F, et al. Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations [J]. Neuroscience, 2010,167(1):68-87.
- [12] TU W H, XU X, PENG L S, et al. DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke [J]. Cell, 2010,140(2):222-234.
- [13] UGALDE-TRIVIÑO L, DÍAZ-GUERRA M. PSD-95: an effective target for stroke therapy using neuroprotective peptides [J]. Int J Mol Sci, 2021,22(22):12585.
- [14] XIONG T, QU Y, WANG H Q, et al. GSK-3 β /mTORC1 couples synaptogenesis and axonal repair to reduce hypoxia ischemia-mediated brain injury in neonatal rats [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2018,77(5):383-394.
- [15] CHEN X B, LEVY J M, HOU A, et al. PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015,112(50):E6983-E6992.
- [16] ZHAO L, LIU X, LIANG J, et al. Phosphorylation of p38 MAPK mediates hypoxic preconditioning-induced neuroprotection against cerebral ischemic injury via mitochondria translocation of Bcl-xL in mice [J]. Brain Res, 2013,1503:78-88.
- [收稿日期:2023-01-11]
[责任编辑:涂 剑,向 秋 英文编辑:阳雨君]