

精细化检测原代皮质神经元细胞氧糖剥夺再复氧后自噬流的变化

张磊^{1,2},戴朝²,韩延峰³,李阳¹,胡玉奇¹,陈富雷¹,赵冬¹

摘要 目的 用几种高度精细灵敏的方法检测氧糖剥夺再复氧(OGD/R)后神经元自噬流不同阶段的变化。方法 原代皮质神经元细胞经过 OGD/R 后将实验分为 OGD/R 组及 OGD/R + bafilomycin A1 (BafA1) 组,用 RFP-GFP 串联荧光标记 LC3 基因转染检测自噬小体和溶酶体的融合情况,透射电子显微镜(TEM)观察自噬的超微结构,SQSTM1/p62 结合 LC3 蛋白翻转实验检测 p62 与 LC3 蛋白的定量,p62 免疫染色观测其分布与含量。结果 荧光显微镜下 OGD/R 组自噬溶酶体与自噬小体比值明显增高;TEM 可观测到不同阶段的自噬结构变化;可溶性 p62 的比值结合 LC3 II/I 的比值共同反映了自噬流的活化;p62 荧光染色后在 BafA1 组中分布居多。结论 每种方法各有其优点,不同方法和指标能够精准地反映神经元 OGD/R 后自噬流在不同阶段的具体变化,掌握并应用好这些方法能有效从自噬角度探索中枢神经系统疾病。

关键词 皮质神经元细胞;自噬;自噬流;OGD/R;检测

中图分类号 R 331

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)02-0182-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.004

自噬关乎于人类健康并且涉及到多种疾病的多种层面^[1-2]。它被认为是一种动态结构性的溶酶体过程^[3-4],这些连续动态变化的过程被称为自噬流^[5],其中任一环节出现障碍,自噬将无法完成应有的生物学功能进而引发和罹患多种疾病。

目前自噬流研究领域的热点是从自噬角度去解释和治疗一些疾病^[6],为此建立高精细灵敏的检测自噬流方法必不可少。最近有报道^[3,7]用 LC3

ELISA 定量自噬流和用电子透射显微镜(TEM)观察线粒体自噬流,但它们只能测量自噬是否增加或减少而不能测量随时间变化的动力学;且每种方法对自噬流的不同阶段检测均存有差异。该研究在原代皮质神经元细胞氧糖剥夺再复氧(oxygen-glucose deprivation-reoxygenation, OGD/R)模型上,加或者不加 BafA1 干预后采用多种方法反复检测自噬流变化,掌握各种方法的优缺点后能在自噬发生的不同时期选择最合适的方法去研究自噬流。

1 材料与方法

1.1 大鼠皮质神经元的原代培养 原代皮质神经元来源于 24 h 内出生的健康 SD 乳鼠,购自新疆动物中心。将分离好的皮质神经元接种在提前包被好的多聚赖氨酸(0.1 mg/ml)(上海生工生物工程有限公司)的六孔板中,细胞种植密度为 2×10^6 个/孔,用含有 Neurobasal、2% B27、Glutamax、10% FBS(美国 Gibco 公司)和青链霉素(美国 Hyclone 公司)的完全培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,培养至第 7 天选用皮质神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)(美国 Abcam 公司)结合免疫荧光法检测皮质神经元纯度,定量阳性细胞比例证实纯度 >90% 可用于实验。

1.2 免疫荧光 将培养至第 7 天成熟的生长状态良好的皮质神经元,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,后用 0.1% Triton-x100 透化皮质神经元 20 min,用 PBS 清洗,5% 脱脂牛奶封闭缓冲液 30 min 后弃去封闭液,神经元鉴定实验中加入一抗 NSE(1:100),p62 免疫染色实验中加入一抗 p62(美国 Abcam 公司)(1:200),4 °C 孵育过夜,第 2 天用 PBS 清洗,后与 FITC 偶联的二抗(北京中杉金桥有限公司)孵育 2 h,细胞核用 PI(美国 Sigma 公司)染色,再用荧光显微镜(日本奥林巴斯公司)进行观察。

1.3 OGD/R 与药物治疗 皮质神经元共同剥夺 O₂ 和葡萄糖 1 h,模拟在体外的损伤模型^[8],去除原来的培养基后在六孔板内加入无糖培养基 DMEM

2021-11-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81960222);石河子大学国际科技合作促进计划(编号:GJHZ201704);兵团财政科技计划项目(编号:2020CB011)

作者单位:¹石河子大学第一附属医院神经外科,石河子 832000

²新疆生产建设兵团第十师北屯医院外科,北屯 836000

³新疆生产建设兵团第十师疾病预防控制中心,北屯 836000

作者简介:张磊,男,主治医师,硕士生;

赵冬,男,博士,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail:shzhaodong112@163.com

(武汉普诺赛生命科技有限公司),将盛有细胞的六孔板置于缺氧小室(美国比卢普斯罗森堡公司)中,在95% N₂和5% CO₂的饱和气体中,氧浓度维持在1%以内,温度控制在37℃,OGD损伤后,更换为最初的完全培养基,放入37℃,5% CO₂的细胞培养箱中常规培养24 h。其中OGD/R组不做处理;BafA1组在OGD/R组的基础上将BafA1(100 nmol/L)(美国Selleck公司)注入六孔板内处理细胞4 h,所有分组在相同条件下共同再灌注24 h。

1.4 RFP-GFP 串联荧光标记 LC3 基因转染细胞

应用LC3双荧光腺病毒转染原代皮质神经元细胞(上海吉凯公司),细胞在24孔板内以 2.5×10^5 个/孔的密度培养7 d,将此类腺病毒按照课题组计算好的标准加入各分组试验感染细胞后处理,感染皮质神经元细胞24 h后用荧光显微镜(日本奥林巴斯公司)观察,人工计数黄色和红色LC3点,每组随机抽取至少有50个细胞进行定量。

1.5 TEM 观察自噬超微结构变化

培养7 d生长状态良好的成熟皮质神经元进行OGD/R实验处理24 h后,加入0.25%的胰酶进行细胞消化4℃离心机1 000 r/min离心5 min,弃去上清液后加入500 μ l 2.5%戊二醛固定液4℃固定后采用JEM 1200EX(日本JEOL公司)电子显微镜观察自噬体、溶酶体、自噬溶酶体的超微结构。

1.6 Western blot

将OGD/R组的细胞培养液吸出,细胞裂解产物用含有蛋白酶抑制剂的RIPA在冰上裂解细胞30 min,收集标本,在4℃以下12 000 r/min离心15 min,5%脱脂牛奶在室温下进行封闭1h,用8%~10%的SDS-PAGE实施分离蛋白,随即转移到PVDF膜上,之后与抗LC3(美国Abcam公司)(1:1 000),抗p62(美国Abcam公司)(1:1 000)的抗体,4℃孵育过夜,用增强型化学发光法(electrochemiluminescence, ECL)观察免疫印迹,对蛋白条带进行密度分析。在SQSTM1/p62结合LC3蛋白翻转实验中,用两组间可溶性p62的比值,不可溶性p62的比值(常规细胞经裂解离心后在离心沉淀中加入高浓度的尿素,从而获得了不可

溶性p62)同时结合LC3 II/I的比值评价自噬流,并将其归一化为 β -actin。Western blot结果用ImageJ软件进行定量。

1.7 统计学处理

所有统计计算均使用SPSS22.0进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 皮质神经元的鉴定

成功培养7 d后的皮质神经元细胞进行免疫荧光鉴定,神经元的轴突和胞质经NSE染色后发绿色荧光,细胞核经PI染色后发红色荧光,两种免疫荧光的共存表明皮质神经元占所培养细胞总数的95%以上(图1)。

2.2 皮质神经元在 OGD/R 模型成功建立后自噬流的活化

RFP-GFP-LC3B串联荧光标记LC3基因转染神经元细胞后荧光显微镜下观察红色/绿色共定位的点状聚集,当RFP和GFP图像叠加时,荧光下黄点(RFP和GFP共存)代表自噬小体,红色荧光点表示自噬溶酶体,红色和黄色的比值用来测量自噬流。在OGD/R组中红点的总体数量明显多于黄点的总体数量且红点和黄点的比值明显偏高,而在BafA1组显示无论红点还是黄点的总数量均出现明显减少且红点几乎难以被检测到(图2A),综上所述,在荧光显微镜下观察到的红色/绿色共定位点状聚集时OGD/R组红点和黄点的比值明显高于BafA1组($t = 20.37, P < 0.001$)(图2B)。

2.3 TEM 观测神经元 OGD/R 后自噬超微结构变化

在TEM下观察到OGD/R组与BafA1组自噬小体和溶酶体的超微结构状态。OGD/R组自噬小体(双层膜结构清晰)、溶酶体(染色质深较聚集)、自噬溶酶体增多(图3A、B)。在BafA1组中观察到很少的自噬小体(膜已破坏结构不清)和降解的溶酶体,几乎未见到自噬溶酶体(图3C、D)。TEM下观察OGD/R组时自噬超微结构清晰典型,而在BafA1处理组中观察到的结构模糊缺乏典型特征。

2.4 SQSTM1/p62 结合 LC3B 蛋白翻转实验共同评定自噬流变化

课题组同时观察了可溶性p62蛋

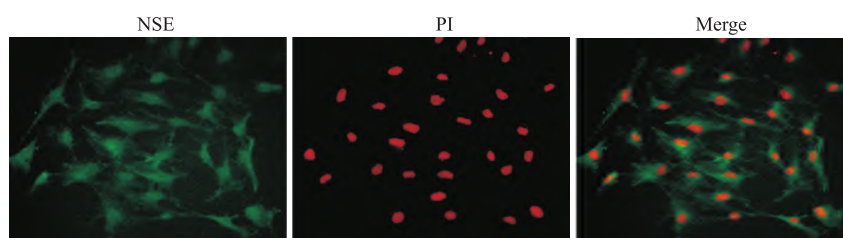


图1 NSE和PI双重免疫荧光染色的代表性显微图片 400

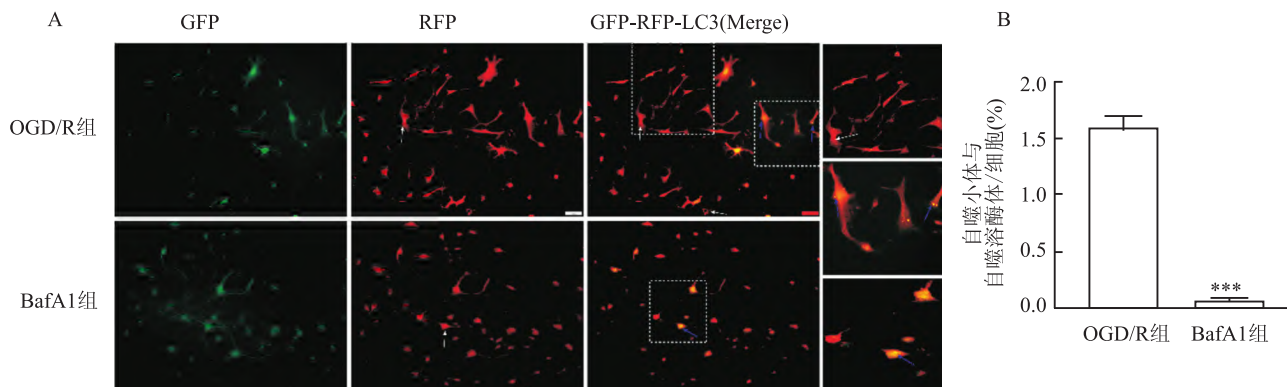


图2 RFP-GFP-LC3 串联荧光检测自噬流(×200)

A: 转染皮质神经元细胞后的活细胞图像; B: 不同组的 LC3 的数量; 与 OGD/R 组比较; *** $P < 0.001$

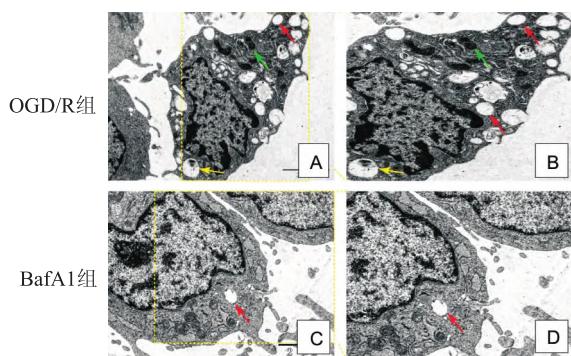


图3 TEM 下观察自噬超微结构的变化 ×5 000

A: OGD/R 组中自噬小体(红色箭头)溶酶体(绿色箭头)和自噬溶酶体(黄色箭头)的代表性透射电镜照片; B: OGD/R 组具有典型特征的放大示例图; C: BafA1 组具有代表性的透射电镜照片; D: BafA1 组具有典型特征的放大示例图

白、不可溶性 p62 蛋白和 LC3 I / II 的转化综合判断

自噬流的变化(图4)。在 OGD/R 组与 BafA1 组的实验中, OGD/R 组的可溶性 p62 明显低于 BafA1 组 (0.58 ± 0.02) ($t = 24.66, P < 0.05$), 而不可溶性 p62 蛋白两组之间比较几乎无明显变化; 其次, 清晰地观察到 OGD/R 组的 LC3 I 向 LC3 II 转化明显增加 (0.87 ± 0.02) ($t = 9.055, P < 0.05$) (图 4C、D), 最终结果显示 OGD/R 组细胞内的自噬流明显活跃于 BafA1 处理组。

2.5 免疫荧光细胞化学染色 p62 的分布观测自噬流 p62 蛋白经免疫荧光染色后分布在细胞质, 显微镜下观察到神经元细胞内 p62 不同形态的含量变化及在细胞内的定位, 与 OGD/R 组相比, 弥散型 p62 和聚集型 p62 的分布与含量在 BafA1 组中尤为显著(图5)。

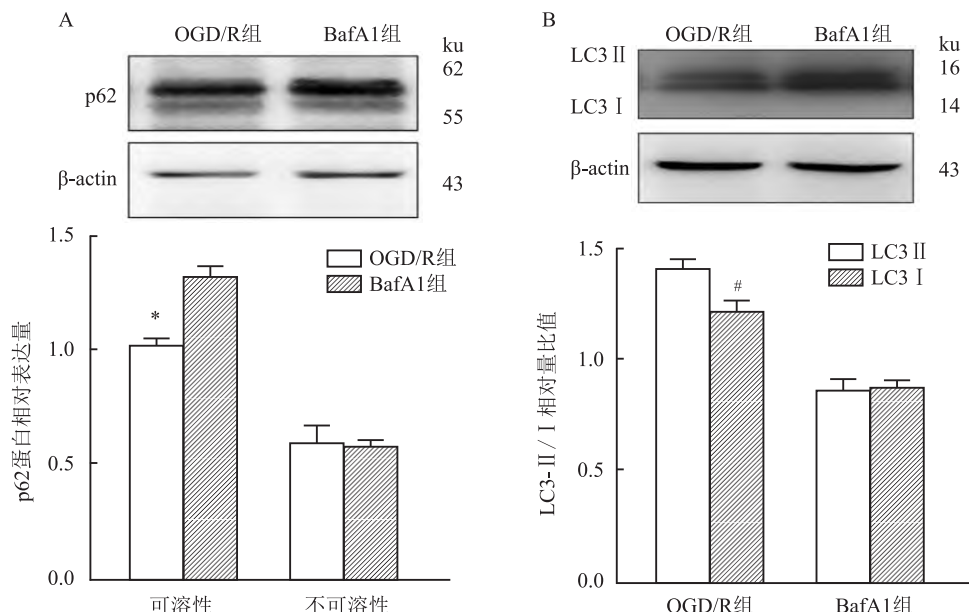


图4 SQSTM1 / p62 结合 LC3B- I 向 LC3B- II 转化实验分析细胞自噬流

A: Western blot 检测可溶性 p62 与不可溶性 p62 的蛋白表达; B: Western blot 检测 LC3B- I 与 LC3B- II 的蛋白表达; 与 BafA1 组比较; * $P < 0.05$; 与 LC3 II 比较; # $P < 0.05$

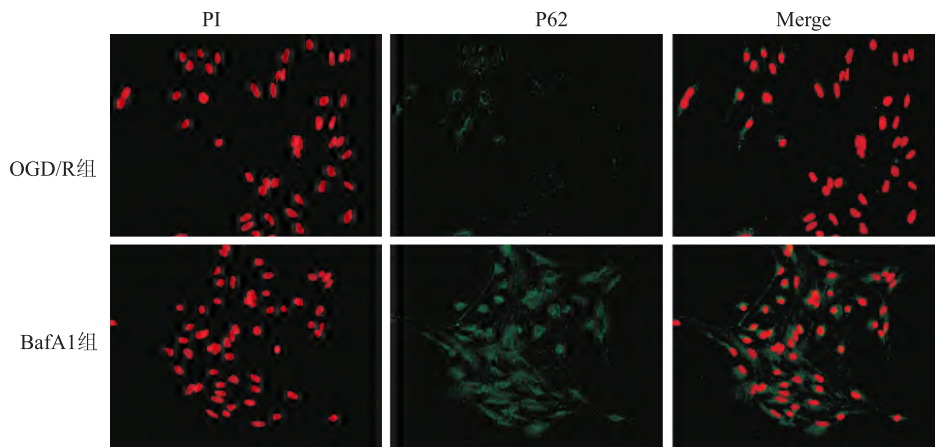


图5 免疫荧光染色分析神经元细胞中 p62 蛋白的变化判断自噬流 ×400

3 讨论

目前虽有多种方法用于检测自噬流,但是在自噬的不同阶段如何准确应用相应方法尚不明确,每种方法的优缺点也不详细。因此,精准检测自噬流已成为一种紧迫的需求和挑战。课题组用动态检测(RFP-GFP 串联荧光基因转染)和静态检测(TEM、p62 结合 LC3 蛋白翻转、p62 免疫荧光)方法观察神经元在 OGD/R 后的自噬流,在加或不加 BafA1 的情况下,自噬流显现了两种截然不同的趋势,OGD/R 后自噬流激活,加入 BafA1 后自噬流中断,且不同的方法检测了自噬过程的不同阶段。

RFP-GFP-LC3B 串联荧光转染细胞是研究自噬流不可或缺的利器,也是观察 RFP-GFP-LC3B 融合蛋白的最佳仪器^[9]。本实验用此技术后发现在 OGD/R 组中红点的数量明显多于黄点,提示自噬流激活,有学者用此方法得到了类似的效果^[10-11]。而加用自噬晚期抑制剂 BafA1 后黄点数量明显增多,说明自噬流中断。此实验最大的优势就是仅通过荧光强度的改变就可以观测自噬流的状态^[5]。但这种方法仅能检测到自噬的某一阶段,要想充分评价自噬流的变化需要用动态的方法去检测,比如在活细胞工作站下观测。

TEM 是检测自噬流最经典的方法^[7]。实验显示 OGD/R 组,自噬小体、溶酶体、自噬溶酶体结构清晰且数量较多,而加入 BafA1 后未见到完整的自噬小体,也未发现自噬溶酶体结构。TEM 在纳米分辨率下可视自噬体、溶酶体、自噬溶酶体等超微结构,以及它们所处细胞成份的确切位置,甚至还提供了自噬完整过程的快照及超微结构的变化^[12]。但是要想观察连续动态的图像需要和荧光传感器和免

疫方法耦合。

完整的自噬流是将 p62 与 LC3B 相结合同时进行检测,这是目前判断自噬流最为准确的方法^[5,13]。通常 LC3 I 向 LC3 II 转化,或 LC3 II 含量增多代表自噬流激活,LC3 II 含量减少意味着自噬流的终止。p62 被称为选择性自噬受体,它可与溶酶体融合形成自噬溶酶体而最终被清除。自噬流激活时 p62 水平降低,自噬流中断时 p62 水平升高^[11]。另外,若可溶性 p62 蛋白减少不可溶性 p62 蛋白无明显变化,且 LC3 I 向 LC3 II 转化意味着自噬流激活;若可溶性 p62 蛋白减少不可溶性 p62 蛋白明显增加,无论 LC3 I 是否向 LC3 II 转化都证明自噬流中断^[14]。实验显示 OGD/R 组的可溶性 p62 明显低于 BafA1 组,而不可溶性 p62 蛋白之间无差异;OGD/R 组的 LC3 I 向 LC3 II 转化,说明 OGD/R 后神经元细胞内的自噬流激活,加入 BafA1 后自噬流停滞。将 p62 结合 LC3B 同步检测自噬流观察的不仅有前期自噬小体形成过程还涉及到自噬流后期自噬溶酶体的降解,所以说是判断自噬流最为准确的方法^[15]。

然而,自噬流也会出现波动。当自噬流发生波动时,可溶性与不可溶性 p62 会滞后,为此通过 p62 免疫染色联合 Western blot 可更为合适的去判断自噬流^[15]。实验中加或不加 BafA1 观察到弥散型 p62 和聚集型 p62 的分布有明显差异,正好与 Western blot 的结果相匹配,此方法反映了自噬流的最后环节——自噬溶酶体的降解。

总之,为了检测神经元 OGD/R 后自噬流的变化,课题组采用多种方法综合评价,不同方法监测了自噬流的不同阶段,可以利用每种方法各自的优点去互补,根据自噬发生的不同时期选择最合适的方法

法去研究自噬流。

参考文献

- [1] Mei Q, Zeng Y, Huang C, et al. Rapamycin alleviates hypertriglyceridemia - related acute pancreatitis *via* restoring autophagy flux and inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. *Inflammation*, 2020, 43(4): 1510 - 23.
- [2] Jiang X S, Xiang X Y, Chen X M, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates renal tubular mitochondrial dysfunction and ER stress by restoring autophagic flux in diabetic nephropathy [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5): 385.
- [3] Oh S H, Choi Y B, Kim J H, et al. Quantification of autophagy flux using LC3 ELISA [J]. *Anal Biochem*, 2017, 530: 57 - 67.
- [4] 冉 艳, 卢明珊, 曾德亮, 等. 七氟烷通过诱导 SIRT1 依赖型自噬减轻大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(1): 103 - 9.
- [5] Wang J L, Li Y Z, Tao T Q, et al. Postconditioning with calreticulin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury and improves autophagic flux [J]. *Shock*, 2020, 53(3): 363 - 72.
- [6] Klinosky D J, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12(1): 1 - 222.
- [7] Chakraborty J, Caicci F, Roy M, et al. Investigating mitochondrial autophagy by routine transmission electron microscopy: Seeing is believing? [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160:105097.
- [8] Sun X, Dai L, Zhang H, et al. Neuritin attenuates neuronal apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress *in vitro* [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(7): 1383 - 91.
- [9] Loos B, Toit A D, Hofmeyr J H S. Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality [J]. *Autophagy*, 2014, 10(11): 2087 - 96.
- [10] Zeng X J, Li P, Ning Y L, et al. A2AR inhibition in alleviating spatial recognition memory impairment after TBI is associated with improvement in autophagic flux in RSC [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(12): 7000 - 14.
- [11] 胡景春, 唐 虹, 薛 威, 等. 牡荆素调节自噬与自噬流介导缺氧复氧大鼠原代心肌细胞的保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(8): 1174 - 9.
- [12] Zhang X, Chen S, Lu K, et al. Verapamil ameliorates motor neuron degeneration and improves lifespan in the SOD1 (G93A) mouse model of ALS by enhancing autophagic flux [J]. *Aging Dis*, 2019, 10(6): 1159 - 73.
- [13] Huang Q, Lou T, Wang M, et al. Compound K inhibits autophagy-mediated apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation/reperfusion *via* regulating AMPK-mTOR pathway in neurons [J]. *Life Sci*, 2020, 254:117793.
- [14] Zhang Y, Mun S R, Linares J F, et al. Mechanistic insight into the regulation of SQSTM1/p62 [J]. *Autophagy*, 2019, 15(4): 735 - 7.
- [15] 余 州, 王 哲, 宋雅娟, 等. 细胞自噬的研究方法进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2019, 35(9): 849 - 53.

The changes of autophagic flux in primary cortical neurons after oxygen and glucose deprivation reoxygenation were detected

Zhang Lei^{1,2}, Dai Chao², Han Yanfeng³, Li Yang¹, Hu Yuqi¹, Chen Fulei¹, Zhao Dong¹

(¹Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832000;

²Dept of Neurosurgery, Xinjiang Production and Construction Corps Tenth Division Beitun Hospital, Beitun 836000;

³Xinjiang Production and Construction Corps Tenth Division Disease Prevention and Control Center, Beitun 836000)

Abstract Objective To detect the changes of autophagic flux at different stages after oxygen-glucose deprivation-reoxygenation (OGD/R) with several highly sensitive methods. **Methods** Primary cortical neurons after oxygen deprivation of sugar after reoxygenation (OGD/R) were divided into the experimental OGD/R group and OGD/R + bafilomycinA1 (BafA1) group, using an RFP-GFP series fluorescent tags LC3 gene transfection detection cytolysosome and fusion of lysosomes, transmission electron microscope (TEM) observation the ultrastructure of autophagy, p62/SQSTM1 combining LC3 protein to flip the experimental testing p62 and LC3 protein quantitative, p62 immune staining observing the distribution and content. **Results** Under fluorescence microscope, the ratio of autophagy lysosome to autophagosome increased significantly in OGD/R group, and the changes of autophagy structure in different stages could be observed in TEM. The ratio of soluble p62 and LC3 II / I reflected the activation of autophagic flux, and p62 was mainly distributed in BafA1 group after fluorescence staining. **Conclusion** Each method has its own advantages, and different methods and indicators can accurately reflect the specific changes of autophagic flux in different stages after neuronal OGD/R. Mastering and applying these methods can effectively explore central nervous system diseases from the perspective of autophagy.

Key words cortical neuron cells; autophagy; autophagic flux; OGD/R; detect