

网络出版时间:2022-08-30 13:34 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20220829.1639.014.html

低氧预适应对小鼠海马 HT22 细胞线粒体能量代谢的影响

齐瑞芳^{1,2}, 李娜^{1,2}, 王立军¹, 吕军¹, 石瑞丽¹, 马宝慧¹, 时静华¹, 郝肖琼¹, 邵国³

摘要 目的 探讨低氧预适应(HPC)对小鼠海马 HT22 细胞线粒体能量代谢的影响及其可能机制。方法 将小鼠海马神经细胞 HT22 分为对照组、低氧组、HPC 组,通过检测各组三磷酸腺苷(ATP)和活性氧(ROS)的水平,以观察 HPC 对细胞线粒体能量代谢的影响;采用 Western blot 法检测雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化 mTOR 蛋白和自噬底物 P62 蛋白的表达;细胞免疫荧光法检测磷酸化 mTOR, LysoTrackerTM 探针检测溶酶体,验证 HPC 引起细胞代谢改变是否与 mTOR/自噬通路有关。结果 与对照组相比,低氧组 ATP 明显下降,ROS 水平增加,HPC 处理后,ATP 水平增加,ROS 水平降低。与对照组相比,HPC 组磷酸化 mTOR 表达下调,自噬底物 P62 表达下调。结论 HPC 可能通过 mTOR/自噬信号通路影响 HT22 细胞能量代谢从而对 HT22 细胞发挥保护作用。

关键词 低氧预适应;线粒体代谢;mTOR;自噬;神经保护

中图分类号 R 339.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1585-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.014

氧气作为线粒体电子传递链的最终电子受体,在有氧呼吸和新陈代谢中起着关键作用。正常情况下,真核细胞需要足够浓度的氧气来维持各种生物活动并确保存活。当需氧量超过其供应量时,全身或局部组织中的氧含量降低(称为低氧),导致代谢危机,威胁生理功能和生存能力^[1]。主要涉及的疾病包括脑卒中、新生儿缺氧性疾病和各种神经退行性疾病等^[2]。

缺血/低氧预适应(ischemic/hypoxia preconditioning, I/HPC)通过预先暴露于亚致死性的缺血/低氧,增加对随后严重缺血/低氧的耐受,它是一种内源性细胞保护机制^[3-4]。该研究通过体外培养小鼠海马神经细胞 HT22,检测 HPC 对 HT22 细胞中三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平的影响,验证 HPC 对细胞能量代谢的影响,并检测可能涉及的机制—雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)/自噬通路,为 HPC 对缺血/低氧等疾病的诊疗提供有效的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 小鼠海马神经元 HT22 细胞系购自北京协和细胞所。

1.1.2 试剂与仪器 RIPA 裂解液、ATP 和 ROS 检测试剂盒购自杭州碧云天生物技术公司,兔抗 mTOR、磷酸化 mTOR (Ser2448) 多克隆抗体购自美国 CST 公司;驴抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Alexa FluorTM 594 山羊抗兔 IgG 购自美国 Invitrogen 公司;DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, LysoTrackerTM 探针购自美国 Invitrogen 公司。蛋白电泳和转膜设备购自美国 Bio Rad 公司,化学发光仪购自上海天能科技有限公司,激光共聚焦显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HT22 细胞培养 使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 HT22 细胞,培养条件为 37℃、5% CO₂。

1.2.2 细胞诱导分化及分组 培养 HT22 细胞,镜下观察细胞长至 40%~50% 的融合度后对细胞进行诱导分化。用含有诱导剂的培养基诱导分化培养 24 h。诱导剂的成分有:100 × N₂-添加剂、50 ng/ml β 神经生长因子、0.1 mol/L D0627 和 0.1 mol/L P1269 四种成分,7 ml 培养基中各成分的体积分别为:400、10、4、40 μl。完成后的 HT22 细胞分为对照组、低氧组和 HPC 组。

2022-08-12 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81660307、82060337);内蒙古自治区自然科学基金(编号:2019 MS03093);内蒙古自治区高等学校科学研究项目(编号:NJZY20171);包头医学院科学研究基金项目(编号:BYJJ-BSJJ-202003)

作者单位:¹ 内蒙古科技大学包头医学院基础医学与法医学院生理教研室,包头 014040

² 内蒙古低氧适应转化医学重点实验室,包头 014040

³ 广东省深圳市龙岗区第三人民医院转化医学中心,深圳 518172

作者简介:齐瑞芳,女,副教授;

邵国,男,教授,责任作者,E-mail:shao_guo_china@163.com

1.2.3 低氧预适应细胞模型建立方法 对照组细胞是 21% O₂ 常氧环境下培养。低氧组细胞先在 1% O₂ 的低氧环境下培养 13 h, 接着常氧环境下培养 6 h。而 HPC 组细胞是低氧环境下培养 30 min, 后换至常氧环境培养 30 min, 如此交替进行 4 个循环, 接着在低氧环境下继续培养 13 h, 复氧 6 h, 完成模型制备^[5]。

1.2.4 ATP 检测 按照 1.2.2 项和 1.2.3 项方法对细胞进行处理。采用 ATP 试剂盒检测 HT22 细胞的 ATP 水平。冰上每孔加入裂解缓冲液 200 μ l, 待细胞充分裂解后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min; ATP 检测试剂用 ATP 检测试剂稀释剂按 1 : 100 的比例稀释, 将 100 μ l ATP 检测试剂滴入检测孔中; 静置 3 ~ 5 min 后, 滴加待测试剂 20 μ l; 混合液体, 间隔 2 s 后进行测试。根据标准曲线计算样品中 ATP 的浓度。最后, ATP 浓度除以 BCA 法检测到的样品蛋白浓度即可。

1.2.5 ROS 水平检测 采用 ROS 试剂盒检测各组 HT22 细胞 ROS 水平。细胞诱导分化生长 24 h 后, HT22 细胞密度长至 70 % 左右时, 将细胞收集在 EP 管中, DCFH-DA 孵育 20 min, 用不含血清的 DMEM 洗涤细胞 3 次。用细胞计数器计数, 用 200 μ l PBS 悬浮, 最后用荧光酶标仪测定 DCF, 使用 488 nm 激发波长和 525 nm 发射波长检测。

1.2.6 Western blot 将模型制备完毕的样品中加入 100 μ l RIPA 裂解液, 并分别加入 1 μ l 蛋白酶及磷酸酶抑制剂常规进行超声辅助裂解, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液采用 BCA 法进行蛋白定量。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 上样浓度: 每孔 15 μ g 蛋白。电泳条件: 上层浓缩胶 10 mA, 恒流, 下层分离胶 15 mA, 恒流; 接着恒流 400 mA 转膜过夜, 将蛋白转移到 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 使用 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min; 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗 (1 : 1 000) 过夜。TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 室温孵育二抗 (1 : 1 000) 1 h; TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, ECL 发光, 采用 Image J 进行图像灰度值测定^[6]。

1.2.7 细胞免疫荧光 将 HT22 细胞按照每孔 5×10^3 个种至 24 孔板中, 每孔中放置 1 个玻片, 按照 1.2.2 项和 1.2.3 项方法对细胞进行处理; 24 h 后, PBS 清洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定。室温 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 用 0.2% Triton X-100 进行细胞通透, 室温孵育 15 min; 10% 山羊血清室温封闭 30 min; 孵育 P-mTOR 抗体 (1 : 300), 4 $^{\circ}$ C 过夜; 用 1%

BSA-PBS 洗涤, 60 r/min 漂洗 3 次, 每次 5 min; 孵育二抗 (1 : 500), 室温孵育 2 h, 注意避光; 用 1% BSA-PBS 清洗, 60 r/min 漂洗 2 次, 每次 5 min, 去离子水再清洗 1 次; 取出玻片, 并将有细胞的一面扣在滴有 DAPI (含防淬灭剂) 的载玻片上, 中性树胶封片, 激光共聚焦显微镜扫描拍照, NIS-Elements AR Analysis 软件检测并分析数据。

1.2.8 LysoTracker™ 探针检测溶酶体 按照 5×10^3 /孔的密度将 HT22 细胞接种至 24 孔板中, 每孔中放置一个玻片, 培养 24 h, 细胞生长密度至 60% 左右, 然后按照 1.2.3 项方法进行 HPC 和低氧实验模型。模型制备结束后, 吸出培养基, 用终浓度 50 nmol/L 的 LysoTracker™ 试剂孵育细胞 2 h, 加入培养基, 激光共聚焦扫描拍照, NIS-Elements AR Analysis 软件检测并分析数据。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用方差分析和独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPC 上调 ATP 水平 ATP 检测结果显示, 与对照组相比, 低氧组 ATP 水平明显降低, 而 HPC 组与对照组相比有所下降但要高于低氧组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05, n = 6$), 见图 1。

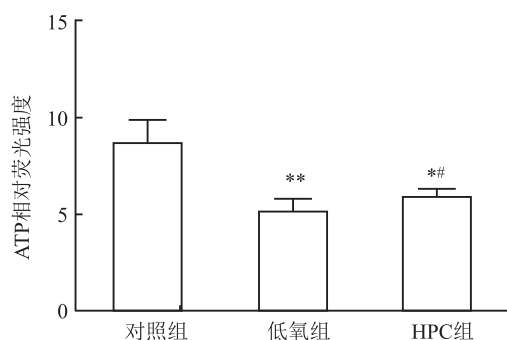


图1 HPC 增加 HT22 细胞中 ATP 浓度

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与低氧组比较: # $P < 0.05$

2.2 HPC 降低 ROS 水平 通过检测不同组别中 ROS 水平发现, 低氧组 ROS 水平高于对照组和 HPC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05, n = 6$), 见图 2。提示 HT22 细胞在急性低氧复氧刺激后, ROS 水平明显升高, 而 HPC 可以降低 ROS 的水平。

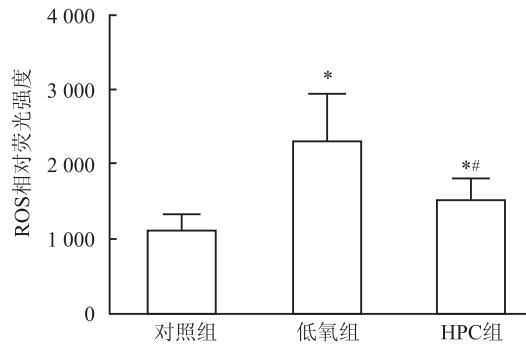


图2 HPC可下调ROS的水平

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与低氧组比较: # $P < 0.05$

2.3 HPC降低磷酸化mTOR蛋白表达 Western blot法检测HT22细胞中总mTOR和P-mTOR蛋白的表达,结果显示,HPC对总mTOR蛋白表达没有明显的影响,但可下调P-mTOR蛋白的表达($P < 0.01, n = 6$),HPC组比低氧组稍有增加($P < 0.05, n = 6$),见图3A、3B。P62蛋白作为自噬底物,HPC组明显少于对照组($P < 0.01, n = 6$),见图3A、3B。细胞免疫荧光染色法检测P-mTOR蛋白的结果与Western blot的结果一致,见图3C、3D。

2.4 HPC增加HT22细胞溶酶体染色 与对照组相比,HT22细胞暴露于低氧及HPC后溶酶体染色明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05, n = 6$),而与低氧组相比,HPC组溶酶体染色有所增多,差异有统计学意义($P < 0.05, n = 6$)。见图4。

3 讨论

哺乳动物对缺氧的反应有多种机制。急性低氧刺激颈动脉体化学感受器引发呼吸急剧增加,以及慢性一系列的变化,例如通过靶向促红细胞生成素和血管内皮生长的缺氧诱导因子诱导红细胞增殖和血管生成因子^[7]。线粒体占细胞耗氧量的大部分,产生ATP是需氧过程。低氧时,线粒体中的电子传递链和氧化磷酸化首先受到影响,从而破坏细胞呼吸的完整性。除此之外,线粒体电子传递链复合物是ROS产生的主要场所。线粒体可以通过产生ROS和代谢物来影响细胞信号传导^[8]。而HPC作为一种内源性神经保护机制可能涉及多个过程,如低氧信号通路的激活、抗炎、抗氧化应激和自噬诱导等^[9]。

本研究通过体外培养小鼠海马神经细胞HT22,检测HPC对HT22细胞ATP和ROS水平的影响,观察HPC对HT22细胞能量代谢的影响。结果显示,

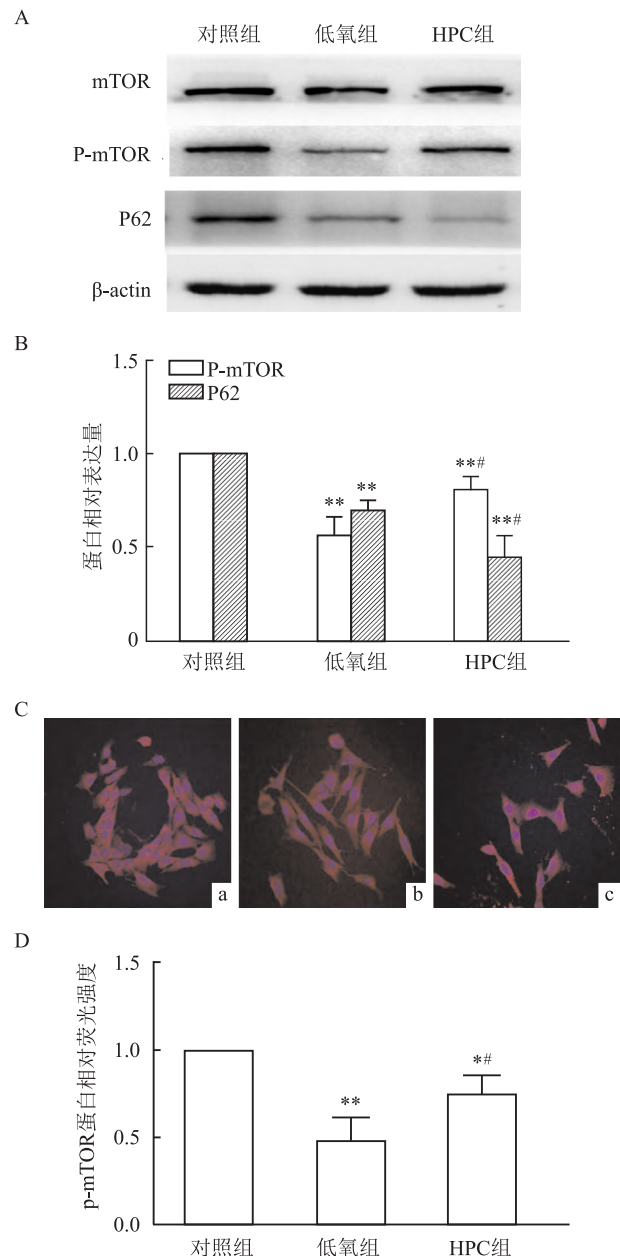


图3 HPC可下调P-mTOR蛋白的表达

A:不同组别中各蛋白的Western blot典型图片;B:不同组别中P-mTOR和P62蛋白相对表达量;C:不同组别中P-mTOR蛋白免疫荧光染色×400;D:不同组别中P-mTOR蛋白相对荧光强度;a:对照组;b:低氧组;c:HPC组;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与低氧组比较: # $P < 0.05$

HPC可上调HT22细胞ATP含量,降低ROS水平,并且可下调磷酸化mTOR蛋白表达,激活自噬,从而发挥保护作用。本课题组前期研究^[6]结果显示HPC可增加LC3 II/I的表达,为HPC可能通过激活自噬提供进一步实验数据。此外,本研究显示,HPC组磷酸化mTOR的表达高于低氧组,而P62在

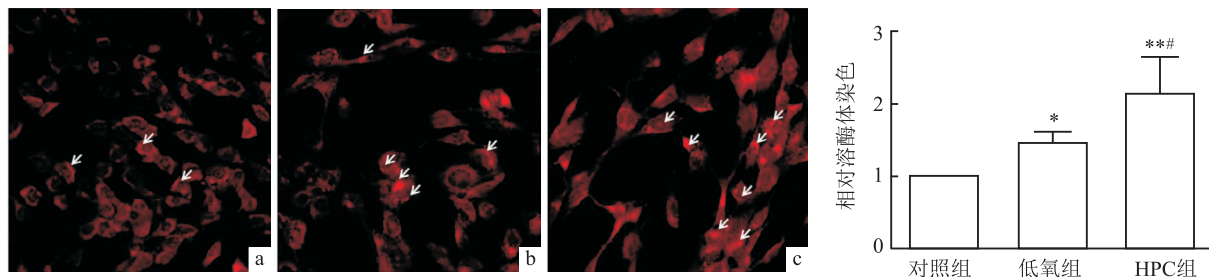


图4 HPC增加溶酶体染色 ×400

a:对照组; b:低氧组; c:HPC组;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与低氧组比较: # $P < 0.05$

低氧组表达较低,提示自噬的增加除了 mTOR 参与之外可能还涉及了其他分子机制,需要进一步研究。

在正常情况下,人体具有有效的内源性抗氧化防御系统。氧化应激是体内氧化与抗氧化失衡的一种状态,可由 ROS 产生过多或清除 ROS 的能力下降引起。L/HPC 可以降低 ROS 的水平并增加抗氧化酶的水平,以防止神经元损伤^[9]。Tan et al^[10]报道 HPC 可防止 SH-SY5Y 细胞中的氧化应激,其保护机制可能涉及由 HPC 产生的 ROS 诱导的自噬激活引起的。Wu et al^[11]报道 HPC 改善了星形胶质细胞线粒体功能并减少了氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)诱导的氧化应激,是通过下调神经元凋亡和 ROS 水平。本研究结果与上述研究结果是一致的, HPC 可通过减少 ROS 的产生从而减轻 HT22 细胞氧化应激损伤。

mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,是细胞生长和代谢的中枢调节剂,可整合各种生长抑制信号,如葡萄糖、ATP 和氧气的消耗^[12]。同时, mTOR 信号通路也是蛋白质合成和细胞代谢的中央调节器,以响应能量、营养和自噬的变化^[13]。自噬是一种进化上保守且依赖溶酶体的过程,用于降解和回收细胞成分。当自噬激活时,溶酶体活动可能也会加快。Lu et al^[14]报道,在 SY5Y 细胞中, HPC 通过 Hif-1 α /Beclin1 通路介导的自噬保护神经细胞免受 OGD 损伤。TSC1 (hamartin)通过诱导自噬赋予对缺血的神保护^[15]。本研究结果与上述结果也一致,说明自噬可能被 HPC 诱导,发挥保护作用。但并不是所有的自噬都是保护作用,只有适度的自噬才能发挥保护作用,而过度的自噬可能促进细胞的死亡。

参考文献

- [1] Yeo E J. Hypoxia and aging[J]. Exp Mol Med, 2019, 51(6): 1-15.
- [2] Shin T H, Lee D Y, Basith S, et al. Metabolome changes in cerebral ischemia[J]. Cells, 2020, 9(7): 1630.

- [3] 刘中,产进中,黄俊,等. 缺血预处理诱导的外泌体对心肌细胞低氧/复氧损伤及 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(2): 197-202.
- [4] 齐瑞芳,张晓璐,邵国. 氧气的适应性机制及低氧预适应研究进展[J]. 科技导报, 2020, 38(2): 86-91.
- [5] Liu N, Zhang X L, Jiang S Y, et al. Neuroprotective mechanisms of DNA methyltransferase in a mouse hippocampal neuronal cell line after hypoxic preconditioning[J]. Neural Regen Res, 2020, 12(15): 2362-8.
- [6] 赵志军,曹茵,刘宇通,等. 低氧预适应对 HT22 细胞自噬的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2021, 37(1): 79-83.
- [7] Simon F, Oberhuber A, Floros N, et al. Acute limb ischemia-much more than just a lack of oxygen[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 374.
- [8] McElroy G S, Chandel N S. Mitochondria control acute and chronic responses to hypoxia[J]. Exp Cell Res, 2017, 356(2): 217-22.
- [9] Liu J, Gu Y, Guo M, et al. Neuroprotective effects and mechanisms of ischemic/hypoxic preconditioning on neurological diseases[J]. CNS Neurosci Ther, 2021, 27(8): 869-82.
- [10] Tan X, Azad S, Ji X. Hypoxic preconditioning protects SH-SY5Y cell against oxidative stress through activation of autophagy[J]. Cell Transplant, 2018, 27(12): 1753-62.
- [11] Wu Y, Gu C, Huang L U, et al. Hypoxia preconditioning improves structure and function of astrocytes mitochondria via PGC-1 α /HIF signal[J]. J Biosci, 2021, 46: 7.
- [12] Barialai L, Strecker M I, Luger A L, et al. AMPK activation protects astrocytes from hypoxia induced cell death[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(5): 1385-96.
- [13] Ding M, Van der Kwast T H, Vellanki R N, et al. The mTOR targets 4E-BP1/2 restrain tumor growth and promote hypoxia tolerance in PTEN-driven prostate cancer[J]. Mol Cancer Res, 2018, 16(4): 682-95.
- [14] Lu N, Li X, Tan R, et al. HIF-1 α /Beclin1-mediated autophagy is involved in neuroprotection induced by hypoxic preconditioning[J]. J Mol Neurosci, 2018, 66(2): 238-50.
- [15] Papadakis M, Hadley G, Xilouri M, et al. Tsc1 (hamartin) confers neuroprotection against ischemia by inducing autophagy[J]. Nat Med, 2013, 19(3): 351-7.

(下转第 1594 页)

ACTL6A group and siRNA-NC group. CCK-8, cell apoptosis experiment, Wound healing and Transwell assay were used to determine the effects of ACTL6A knockdown on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of SW1990 cells. GSEA predicted a possible pathway regulated by ACTL6A in pancreatic cancer. T-test was used between the two groups. **Results** The expression of ACTL6A in pancreatic cancer tissues was higher than that in normal pancreatic tissues ($P < 0.05$). The results of CCK-8 assay showed that the absorbance of siRNA-ACTL6A group at 24 and 48 h were lower than those in the siRNA-NC group, and the difference was statistically significant ($t = 5.840, 8.454, P < 0.01$). The results of Wound healing assay and Transwell assay showed that the healing rate and the number of invasive cells in siRNA-ACTL6A group were both lower than those in the siRNA-NC group. The difference was statistically significant ($t = 3.960, 4.464, P < 0.05$), but the apoptosis rate of siRNA-ACTL6A group was significantly higher than that of the siRNA-NC group, and the difference was statistically significant ($t = 12.192, P < 0.001$). GSEA results showed that the group with high expression of ACTL6A mRNA was up-regulated in cell cycle, nucleotide excision repair, base excision repair, DNA replication, pathways in cancer, NOTCH signaling pathway and other related gene sets ($P < 0.05$). These pathways were activated when the expression of ACTL6A was up-regulated. **Conclusion** ACTL6A is highly expressed in pancreatic cancer tissues. ACTL6A knockdown promotes the cell apoptosis of SW1990 cells, and inhibits proliferation, invasion and migration of SW1990 cells. The mechanism of the occurrence and development of ACTL6A in pancreatic cancer is attributed to the activation of cell cycle, nucleotide excision repair, base excision repair, DNA replication, pathways in cancer, NOTCH signaling pathway.

Key words actin like 6A; pancreatic cancer; knockdown; proliferation; apoptosis; migration; invasion

(上接第 1588 页)

Effects of hypoxic preconditioning on energy metabolism of mitochondria in mouse hippocampal HT22 cells

Qi Ruifang^{1,2}, Li Na^{1,2}, Wang Lijun¹, Lv Jun¹, Shi Ruili¹, Ma Baohui¹,
Shi Jinghua¹, Hao Xiaoqiong¹, Shao Guo³

(¹Dept of Physiology, College of Basic Medicine and Forensic Medicine, Baotou Medical College of Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040; ²Key Laboratory of Hypoxic Translational Medicine of Inner Mongolia, Baotou 014040; ³Translational Medicine Center of The Third People's Hospital of Longgang District, Shenzhen City of Guangdong Province, Shenzhen 518172)

Abstract Objective To investigate the effect of hypoxic preconditioning (HPC) on mitochondrial energy metabolism in mouse hippocampal HT22 cells and its possible mechanism. **Methods** In this paper, mouse hippocampal nerve cells HT22 were divided into control group, hypoxia group, HPC group, and the levels of adenosine triphosphate (ATP) and reactive oxygen species (ROS) in each group were measured for observing the effect of HPC on cell mitochondrial metabolism. Western blot was used to detect the expression of target of rapamycin (mTOR), phosphorylated mTOR protein and autophagy substrate P62 protein; cellular immunofluorescence was used to detect phosphorylated mTOR, and LysoTrackerTM probe was used to detect lysosomes. **Results** Compared with the control group, the ATP level was significantly decreased and the ROS level was increased in the hypoxia group. Exposed to HPC, the ATP level was increased and the ROS level was decreased. Compared with the control group, the expression of phosphorylated mTOR was down-regulated and the expression of autophagy substrate P62 was down-regulated in the HPC group. **Conclusion** HPC may affect the energy metabolism of HT22 cells through the mTOR/autophagy signaling pathway, thereby exerting a protective effect on the HT22 cells.

Key words hypoxic preconditioning; mitochondrial metabolism; mTOR; autophagy; neuroprotection