

缺氧预处理对颅脑外伤大鼠海马 GADD34 表达及神经元细胞凋亡的影响

刘光杰, 刘家传, 王金标, 杨艳艳, 张 星, 王春琳, 汤 宏, 徐 燊

摘要 目的 探讨缺氧预处理对颅脑外伤大鼠海马生长停滞与 DNA 损害可诱导基因 34(GADD34)表达及神经元细胞凋亡的影响。方法 208 只 SD 雄性大鼠,随机分为假手术(Con, $n=8$)组、缺氧预处理(HPC, $n=8$)组、颅脑外伤(TBI, $n=96$)组、缺氧预处理颅脑外伤(HPCT, $n=96$)组;TBI 和 HPCT 组再根据不同处死时间分为 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、3 d、7 d、14 d 八个亚组。大鼠颅脑外伤模型采用改良的自由落体装置制作,预先将大鼠在低压氧仓(-50.47 kPa)内处理 3 h/d,连续 3 d 制作缺氧预处理模型。采用改良 Sugrwar 法对大鼠伤后行为学评估;RT-PCR 和 Western blot 法检测海马组织中 GADD34 的表达变化,TUNEL 染色法检测凋亡神经元细胞。结果 海马中 GADD34 mRNA 和蛋白伤后 1 h 即有表达,3~12 h 呈上升趋势,伤后 24 h 达高峰,3~14 d 呈下降趋势,TBI 与 Con 组,HPCT 与 HPC 组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);伤后 24 h 各指标进行比较,Con 和 HPC 组比较,差异无统计学意义,其中 HPCT 组中伤后行为学评估得分及 GADD34 的表达较 TBI 组显著增高,细胞凋亡率显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 缺氧预处理可降低颅脑外伤大鼠海马行为学损伤,其机制可能是通过上调海马 GADD34 的表达,降低海马神经元细胞凋亡,从而发挥脑保护作用。

关键词 颅脑外伤;缺氧预处理;GADD34;内质网应激;细胞凋亡

中图分类号 R 651.15

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0032-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.007

颅脑外伤(trumatic brain injury, TBI)可继发机体一系列病理生理改变,海马是行为认知功能中枢具有较高的神经敏感性,颅脑外伤后可造成海马神经网络结构不同程度损伤,影响其神经电生理功能,

甚者伴有细胞的凋亡或坏死^[1];生长停滞与 DNA 损害可诱导基因 34(growth arrest and DNA damage-inducible protein 34, GADD34)是一种细胞周期蛋白,在内质网应激等条件下表达上调,是内质网应激中促进蛋白质合成恢复的重要分子^[2]。缺氧预处理(hypoxic preconditioning, HPC)已证实可增强脑组织对随后发生的缺氧、缺血的耐受力^[3-5],该实验通过成功复制缺氧预处理与颅脑外伤动物模型,对缺氧预处理后颅脑外伤大鼠行为学进行评估,以及检测海马中 GADD34 表达和神经元细胞的凋亡情况,进一步探讨缺氧预处理对颅脑外伤的脑保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组 208 只 SD 雄性大鼠,180~230 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,采用随机数字表法分为假手术(Con)组、缺氧预处理(HPC)组、颅脑外伤(TBI)组、缺氧预处理颅脑外伤(HPCT)组,TBI 和 HPCT 组又根据处死时间的不同分为 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、3 d、7 d、14 d 八个亚组。

1.2 主要试剂和仪器 GADD34 兔抗鼠多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);逆转录试剂盒(美国 ThermoFisher 公司);TUNEL 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);低压氧舱(上海减压厂);ZH-ZYQ 型自由落体脑损伤模型打击器(淮北正华生物仪器设备有限公司);VN-480 活塞式无油真空泵(昆山佑诚至信电器设备有限公司);微型小磨钻(上海晶杰医疗器械有限公司)。

1.3 模型制作和取材

1.3.1 缺氧预处理模型制作 分别将 HPC 和 HPCT 组大鼠置于低压氧舱内,适应后连接真空泵,缓慢匀速减至 -50.47 kPa(模拟 5 500 m 高原环境),恒压维持 3 h 后缓慢恢复正常,如此连续训练 3 d。

1.3.2 颅脑外伤模型制作 经腹腔注射 10% 水合氯醛将大鼠麻醉,麻醉满意后固定于自由落体装置,剪毛、消毒,沿头皮中线做矢状位切开,剥离骨膜,暴

2016-08-15 接收

基金项目:全军医学科学技术研究“十二五”科研项目(面上)(编号:CWS11J262);南京军区医学科技创新重点课题(编号:09Z009)

作者单位:安徽医科大学解放军临床学院(解放军第 105 医院)神经外科,合肥 230031

作者简介:刘光杰,男,硕士研究生;

刘家传,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:ljc571017@sina.com

露左侧颅骨;用微型小磨钻定位于前囟门后 3 mm 中线左侧旁开 3 mm 处钻开一圆形骨窗(直径约 5 mm)。将 50 g 砵码置于 25 cm 垂直高度打击骨窗,打击完毕后用骨蜡封闭骨窗,立即清创缝合头皮。对 TBI 和 HPCT 组进行打击处理,Con 组仅做头皮切开和清创缝合处理,HPCT 组不处理。

1.3.3 取材 模型制作完毕后于相应时间点处死大鼠并取材。6 只大鼠以 4% (质量/体积, m/V) 多聚甲醛心脏灌注固定后断头取脑,经 10% 甲醛固定 24 h,石蜡包埋并切片,行免疫组化染色。其余 6 只大鼠直接断头取脑,剥离脑组织置于 -80 ℃ 液氮罐中速冻保存,用于 RT-PCR 和 Western blot 实验。

1.4 实验方法

1.4.1 行为学评估 将 Sugrwar 法^[6]进行改良后,对各处理组大鼠行为学进行评估,共 6 大部分,自主活动、肢体运动、前肢伸展、自主爬笼、腋下和鼻毛触摸反应、翻正反射。① 自主运动,1 分:少有运动;2 分:能运动,但不能到笼边;3 分:灵活运动。② 肢体运动,1 分:很少移动肢体;2 分:能移动所有肢体,但移动缓慢;3 分:肢体移动正常。③ 前肢伸展,1 分:提鼠尾前肢不伸展;2 分:伸展,但受限;3 分:自主伸展。④ 自主爬笼,1 分:不能爬;2 分:能爬笼,但无力;3 分:自主爬笼。⑤ 腋下和鼻毛触摸反应,1 分:无反应;2 分:微弱反应;3 分:反应正常。⑥ 翻正反射,1 分:无法翻转;2 分:能翻转,但较慢;3 分:正常。各部分 1~3 分,共 18 分。评分过程中遵循盲法原则,整个评分过程约 5 min。

1.4.2 免疫组化染色 切片常规脱蜡至水,用浓度为 0.01 mmol/L 的枸橼酸缓冲溶液(pH 约 6.0)行抗原修复,3% H₂O₂ 室温 20 min,10% 羊血清封闭室温 20 min,加兔抗鼠 GADD34(1:100)4 ℃ 过夜,PBS 漂洗,严格按照试剂盒说明书进行操作,切片制作完成后,在高倍显微镜(×400)下随机选取海马 CA1 区 5 个不同视野,以染色呈棕褐色为阳性细胞,利用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析光密度。

1.4.3 细胞凋亡的检测 应用 TUNEL 法标记 DNA 脱氧核苷酸链末端,严格按照试剂盒说明书操作进行,常规制备切片,在高倍镜视野(×400)下观察,随机取海马 CA1 区 5 个不同视野,计数凋亡细胞与总细胞数,以凋亡细胞数/总细胞数计算凋亡率(%)。

1.4.4 RT-PCR 分析 GADD34 mRNA 表达 操作严格按照试剂盒说明书操作进行,引物根据查阅 GenBank 提供的模板,由上海生工有限公司合成。

GADD34(256 bp)上游引物序列:5'-GCAGAGTCAC-CCTTGTTTCAG-3',下游:5'-ATCCCAATCACCGT-CATCT-3';β-actin 上游引物序列:5'-GGGCTCTCT-GCTCCTCCCTGT-3',下游:5'-ACGGCCAAATCCGT-TCACACC-3';PCR 反应条件为:95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 45 s,退火 45 s,72 ℃ 延伸 50 s,共循环 40 次。72 ℃ 最后延伸 10 min,扩增片段长度为 108 bp。GADD34 和 β-actin 的退火温度均为 52 ℃。扩增结束后进行电泳,电泳图像经 Image Pro Plus 6.0 软件分析平均光密度值,内参为 β-actin,以目的基因与 β-actin 平均光密度比值表示目的基因的相对表达水平。

1.4.5 Western blot 实验 取出液氮罐中海马标本,冰上研磨并加入 RIPA 细胞裂解液 100 μl,继续研磨至液态,12 000 r/min 离心 10 min,留取上清,提取总蛋白,进行蛋白浓度测定,再经电泳、转膜、室温封闭 2 h,滴加一抗、二抗孵育,化学发光显影,定影、拍照等步骤,严格参照抗体说明书进行稀释和操作,采用 Gel pro 软件进行处理,以 GADD34 与 β-actin 条带灰度值之比表示蛋白相对表达量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间进行比较采用 one way-ANOVA 检验,进一步两两比较采用 SNK-q 检验,不同组间两样本比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学评估结果 伤后 24 h 各处理组评分结果,Con 和 HPCT 组得分无差异,TBI 组得分明显低于 Con 组,HPCT 组得分明显低于 HPCT 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明 TBI 和 HPCT 组大鼠行为学均有不同程度损伤;而 HPCT 组得分明显高于 TBI 组,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 HPCT 组大鼠颅脑外伤后行为学损伤较 TBI 组减轻,见图 1、表 1。

2.2 免疫组化染色 正常海马神经元细胞中 GADD34 有少量表达,颅脑外伤后 1 h 可见少量 GADD34 染色的阳性细胞,伤后 3~12 h 胞质染色逐渐加深,部分胞核着色,伤后 24 h,胞质和胞核着色最深,随着伤后时间推移,阳性细胞数逐渐减少同时染色逐渐变淡。HPCT 与 TBI 组伤后 GADD34 染色变化趋势相似,而伤后 3 h~7 d 两组光密度值比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);伤后 1 h、14 d、Con 与 HPCT 组之间,差异均无统计学意义;见图

2、表 1。

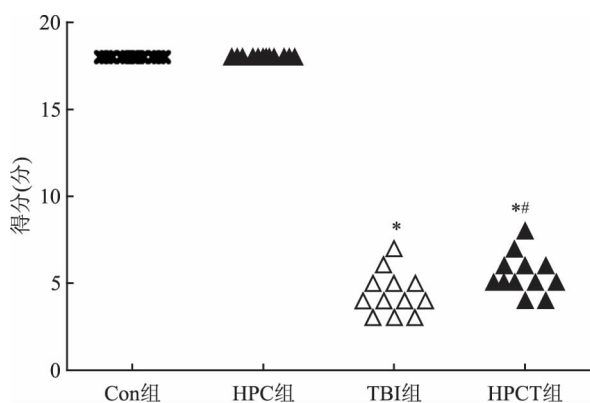


图 1 各组大鼠伤后 24 h 行为学评估得分
与 Con 组、HPC 组比较, * $P < 0.05$; 与 TBI 组比较, # $P < 0.05$

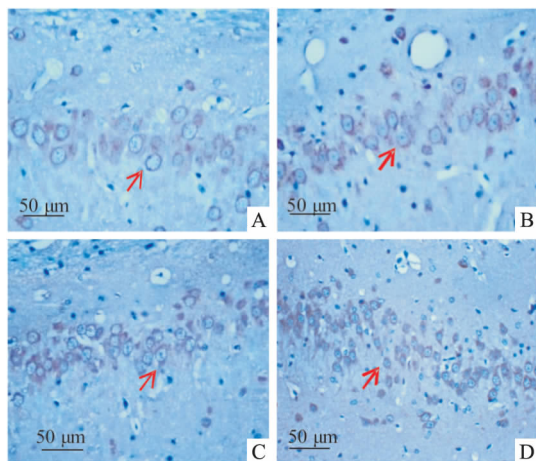


图 2 各组大鼠伤后 24 h 海马 GADD34 免疫组化染色 DAB $\times 400$
A: Con 组; B: HPC 组; C: TBI 组; D: HPCT 组

2.3 TUNEL 法检测凋亡的神经元细胞 采用 TUNEL 法检测伤后不同时间点各组大鼠海马中凋亡细胞, Con 与 HPC 组中凋亡细胞数目接近, 细胞凋亡率无明显差别, TBI 组、HPCT 组与对照组比较, 海马神经元细胞凋亡率明显增高, 其中 HPCT 组与 TBI 组比较, 凋亡率明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3、表 1。

2.4 GADD34 mRNA 的表达变化 GADD34 mRNA 在伤后 1 h 可见表达, 3 ~ 12 h 表达逐渐上调, 24 h 达到高峰, 3 ~ 14 d 表达逐渐下调。Con 组与 HPC 组比较, 差异无统计学意义; 伤后 1 h 和 14 d, TBI 组与 Con 组、HPCT 组与 HPC 组分别比较, 差异均无统计学意义; 伤后 3 h ~ 12 h 和 1 ~ 7 d, TBI 组与 Con 组、HPCT 组与 HPC 组分别比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 其中 HPCT 组与 TBI 组比较, 伤后 3 ~ 12 h 和 1 ~ 7 d GADD34 mRNA 表达显著上调, 差

异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 伤后 1 h 和 14 d 两组比较, 差异均无统计学意义, 见图 4、表 1。

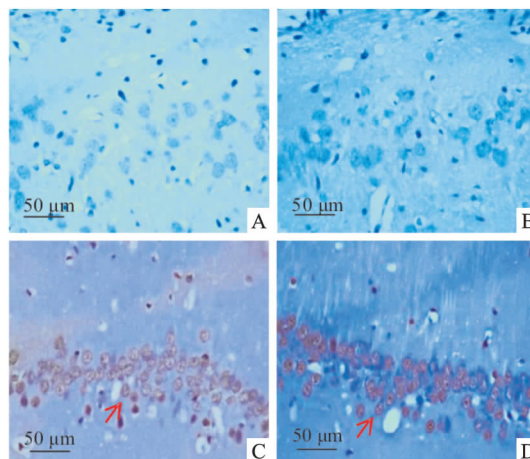


图 3 各组大鼠伤后 24 h
海马神经元细胞凋亡情况 TUNEL 染色 $\times 400$
A: Con 组; B: HPC 组; C: TBI 组; D: HPCT 组

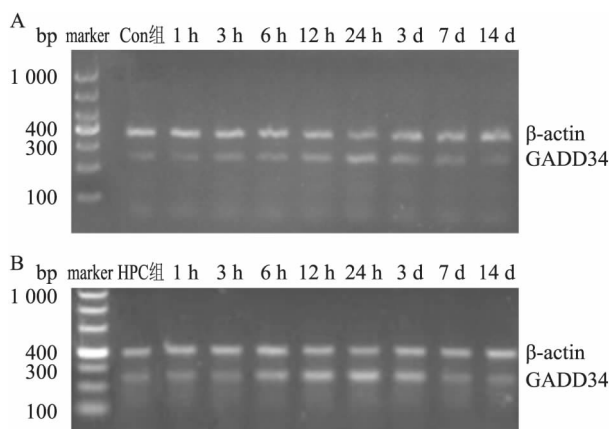


图 4 TBI 组和 HPCT 组大鼠海马 GADD34 mRNA 的表达
A: TBI 组; B: HPCT 组

2.5 GADD34 蛋白表达变化 GADD34 蛋白伤后 1 h 开始表达, 3 ~ 12 h 表达逐渐上调, 24 h 达高峰, 3 ~ 14 d 表达逐渐下调。Con 组与 HPC 组比较, 差异无统计学意义; 伤后 1 h 和 14 d, TBI 组与 Con 组、HPCT 组与 HPC 组分别比较, 差异均无统计学意义; 伤后 3 ~ 12 h 和 1 ~ 7 d, TBI 组与 Con 组、HPCT 组与 HPC 组分别比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 其中 HPCT 组与 TBI 组比较, 伤后 3 h ~ 7 d GADD34 蛋白表达显著上调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 伤后 1 h 和 14 d 两组比较, 差异均无统计学意义, 见图 5、图 6、表 1。

3 讨论

颅脑外伤可继发脑功能和行为认知改变, 轻至

表1 伤后24 h 各组大鼠各指标的表达($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

项目	Con 组	HPC 组	TBI 组	HPCT 组	F 值	P 值
行为学评分	18.000 $\pm$ 0.000	18.000 $\pm$ 0.000	4.417 $\pm$ 1.240*	5.500 $\pm$ 1.168* [#]	155.90	0.01
免疫组化	0.154 $\pm$ 0.014	0.152 $\pm$ 0.018	0.177 $\pm$ 0.015*	0.204 $\pm$ 0.024* [#]	11.13	0.01
细胞凋亡率(%)	2.510 $\pm$ 0.056	2.510 $\pm$ 0.148	77.980 $\pm$ 0.583*	45.270 $\pm$ 5.185* [#]	584.60	0.01
GADD34 mRNA	175.220 $\pm$ 5.845	179.320 $\pm$ 4.800	162.030 $\pm$ 6.770*	144.070 $\pm$ 5.546* [#]	45.23	0.01
GADD34 蛋白	0.415 $\pm$ 0.049	0.401 $\pm$ 0.043	0.995 $\pm$ 0.033*	1.294 $\pm$ 0.076* [#]	812.00	0.01

与 Con 组和 HPC 组比较: * $P < 0.01$; 与 TBI 组比较: [#] $P < 0.01$

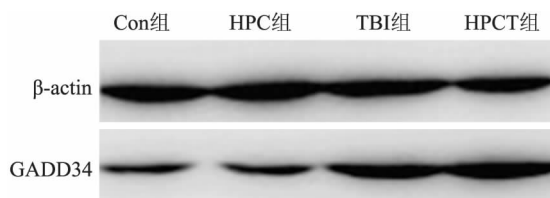


图5 各组大鼠伤后24 h 海马 GADD34 蛋白表达

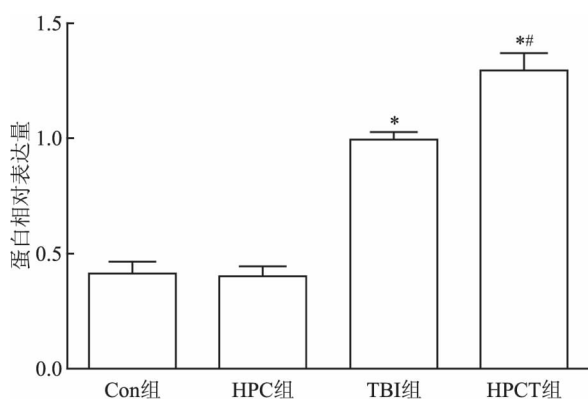


图6 各组大鼠伤后24 h 海马 GADD34 蛋白相对表达量

与 Con 组、HPC 组比较: * $P < 0.05$; 与 TBI 组比较: [#] $P < 0.05$

中度颅脑外伤后可造成行为认知功能不同程度损伤,这与伤后海马神经电生理功能被破坏密切相关^[7]。为保持正常神经电生理功能,细胞不仅面临避免走向凋亡,也面临代偿正常功能危机。有研究^[8]显示,缺氧预处理可通过上调海马 CA1 区抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,降低海马神经细胞凋亡。然而缺氧预处理对颅脑外伤大鼠早期行为认知功能损伤是否具有保护作用,这种作用与细胞凋亡是否有关,尚未见相关报道。

颅脑外伤后机体各种应激反应被激活,内质网应激是指在缺氧等条件下,内质网平衡状态被打破,大量未折叠或错误折叠蛋白质的堆积,而发生的一种适应性反应。然而过度应激对细胞是不利的,可诱导凋亡的发生^[9],导致颅脑外伤进一步加重。GADD34 是一种细胞周期蛋白,在内质网应激条件下表达上调,通过选择性抑制内质网应激蛋白 eIF2 α 的磷酸化,降低内质网应激相关凋亡的发生,

是内质网应激中恢复蛋白质合成的重要分子^[2,10]。

既往研究^[11]清热化痰方治疗后可提高脑缺血区周围 GADD34 表达,发挥神经保护作用;本研究结果显示:GADD34 mRNA 和蛋白伤后 1 h 可见表达 3 ~ 12 h 表达逐渐上调 24 h 达高峰 3 ~ 14 d 表达逐渐下调。伤后 24 h 各组进行比较,颅脑外伤后大鼠行为学评分,HPCT 组较 TBI 组明显增高。GADD34 mRNA 和蛋白的表达 Con 组和 HPC 组相似,提示单纯缺氧对正常海马组织中 GADD34 的表达无诱导作用,HPCT 组较 TBI 组明显上调,提示在遭受颅脑外伤性打击时,缺氧预处理可显著激活 GADD34 的表达;同时 TUNEL 染色还发现 HPCT 组较 TBI 组海马中神经元细胞凋亡率明显降低,提示缺氧预处理可通过上调海马 GADD34 的表达,后者可能通过降低神经元细胞的凋亡,发挥神经保护作用。

前期实验^[3,5]研究显示:缺氧预处理可通过上调颅脑外伤后大鼠脑组织 HIF-1 α 、VEGF、GLUT-1 表达,提高外伤后脑组织新生血管生成并提高能量供应,减轻脑组织缺氧状态,减少未折叠或错误折叠蛋白的产生。既往研究^[12]还显示在老年痴呆症等神经系统疾病中, A β 、tau 蛋白在海马的大量堆积是造成行为认知功能改变的主要原因。Li et al^[13]发现神经索受损时可诱发内质网应激,并且可通过降低内质网应激引起的蛋白堆积诱导细胞的再生。GADD34 通过降低 PERK/eIF2 α 通路中 eIF2 α 的磷酸化水平,降低内质网应激相关凋亡,恢复蛋白质合成,恢复神经再生功能^[2]。本实验结果提示:颅脑外伤后大鼠行为学有不同程度受损,这可能与外伤后发生内质网应激有关,缺氧预处理可显著降低神经元细胞凋亡,后者可能与上调海马中 GADD34 mRNA 和蛋白表达有关,减轻内质网应激性损伤,从而减轻行为学损伤,这与 Wu et al^[14]的研究缺氧预处理可降低血管内皮细胞内质网应激损伤相一致。

综上所述,缺氧预处理可早期选择性的抑制神经元细胞凋亡,其机制可能与上调颅脑外伤大鼠海

马中 GADD34 的表达恢复蛋白合成有着密切关系, 这对于早期恢复海马神经电生理功能、降低行为认知功能损伤有着重要意义, 也为进一步了解缺氧预处理的脑保护作用提供理论依据。

参考文献

- [1] Slemmer J E, Zhu C, Landshamer S, et al. Causal role of apoptosis-inducing factor for neuronal cell death following traumatic brain injury [J]. *Am J Pathol* 2008, 173(6):1795–805.
- [2] Moreno J A, Radford H, Peretti D, et al. Sustained translational repression by eIF2alpha-P mediates prion neurodegeneration [J]. *Nature* 2012, 485(7399):507–11.
- [3] 武孝刚, 刘家传, 杨艳艳, 等. 缺氧预处理诱导创伤性脑损伤大鼠皮层组织 HIF-1 α 及 GLUT-1 表达的影响 [J]. *中华神经医学杂志* 2014, 13(4):366–70.
- [4] Obrenovitch T P. Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia [J]. *Physiol Rev* 2008, 88(1):211–47.
- [5] 张磊, 刘家传, 杨艳艳, 等. 缺氧预处理对创伤性脑损伤大鼠脑组织 HIF-1 α 、VEGF 表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2014, 49(4):447–50.
- [6] Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, et al. A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model [J]. *Neurosci Methods* 2008, 167(2):327–34.
- [7] Kang W H, Cao W, Graudejus O, et al. Alterations in hippocampal network activity after in vitro traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma* 2015, 32(13):1011–9.
- [8] Vetrovi O V, Rybnikova T S, Samoilo V M O. Effect of hypoxic preconditioning on the expression of antiapoptotic protein Bcl-2 and neurotrophin BDNF in CA1 hippocampal field of rats surviving severe hypoxia [J]. *Morfologiya* 2014, 145(2):16–20.
- [9] Mei Y, Thompson M D T, Cohen R A, et al. Endoplasmic reticulum stress and related pathological processes [J]. *J Pharmacol Biomed Anal* 2013, 1(2):1000107.
- [10] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation [J]. *Science* 2011, 334(6059):1081–6.
- [11] 胡跃强, 唐农, 董少龙, 等. 清热化痰方对脑缺血预处理大鼠 GADD34 表达的影响 [J]. *中药新药与临床药理* 2012, 1(23):48–51.
- [12] Citron M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification [J]. *Nat Rev Drug Discov* 2010, 9(5):387–98.
- [13] Li S, Yang L, Selzer M E, et al. Neuronal endoplasmic reticulum stress in axon injury and neurodegeneration [J]. *ANN Neurol* 2013, 74(6):768–77.
- [14] Wu X D, Zhang Z Y, Sun S, et al. Hypoxic preconditioning protects microvascular endothelial cells against hypoxia/reoxygenation injury by attenuating endoplasmic reticulum stress [J]. *Apoptosis* 2013, 18(1):85–98.

Chronological changes of GADD34 in rats hippocampus and neuronal cells apoptosis after traumatic brain injury and the influence of hypoxic preconditioning

Liu Guangjie¹, Liu Jiachuan¹, Wang Jinbiao², et al

(Dept of Neurosurgery, The Clinical College of PLA

Affiliated Anhui Medical University (The 105th Hospital of PLA), Hefei 230031)

Abstract Objective To investigate the effects of hypoxic preconditioning on appearance of rats hippocampus growth arrest and DNA damage-inducible protein 34 (GADD34) after traumatic brain injury and on neuronal cells apoptosis. **Methods** Two hundred and eight adult male Sprague Dawley rats were divided into the control group (Con, $n=8$), the hypoxic preconditioning group (HPC, $n=8$), the traumatic brain injury group (TBI, $n=96$) and the hypoxic preconditioning traumatic brain injury group (HPCT, $n=96$). Then, the group TBI and the group HPCT were divided into eight subgroups respectively according to different points of death time, as follows: 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 3 d, 7 d, 14 d. The traumatic brain injury models of rats were made by the improved equipment of free-fall, hypoxic preconditioned in hypobaric chamber for 3 days (-50.47 kPa, 3 h/d). Next, rats' behaviors after traumatic brain injury were evaluated by Sugawara's improved method; the expression of GADD34 in the hippocampus was detected by the methods of Western blot and RT-PCR; neuronal cells apoptosis was detected by method of TUNEL staining. **Results** The GADD34 mRNA and protein in hippocampus appeared in 1 h after traumatic brain injury, and the appearance trended to increase from 3 h to 12 h, then achieved its apex in 24 h and the trend decreased from 3 d to the 14 d. The differences of appearance between the TBI group and the Con group and between the HPCT group and the HPC group were significant ($P<0.05$), while the difference between the Con group and the HPC group was not significant. Compared with each index in rats at 24 h after injury of each group,

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.008.html

CSE 过表达保护低氧/无血清诱导骨髓间充质干细胞凋亡的机制

李从圣¹ 王爱玲² 杨静¹ 郝玉瑜¹ 郭增³

摘要 目的 探讨胱硫醚- γ -裂解酶(CSE)过表达保护低氧/无血清(H/SD)诱导骨髓间充质干细胞(MSCs)凋亡的机制。方法 体外分离培养大鼠 MSCs, 利用 H/SD 诱导 MSCs 凋亡, 构建 CSE 基因的慢病毒表达载体 pLV-ZsGreen-CSE lentivirus 及空载体 pLV-ZsGreen lentivirus 并感染 MSCs (分别记为^{CSE} MSCs、^{GFP} MSCs)。设立正常培养的 MSCs (^{Norm} MSCs 组)、^{CSE} MSCs 组、^{GFP} MSCs 组, PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blot 法检测 CSE、Bcl-2、Bax 及细胞色素 c (Cyt c) 蛋白的表达。结果 与^{Norm} MSCs 组及^{GFP} MSCs 组相比, ^{CSE} MSCs 组 CSE 蛋白表达显著增高 ($P < 0.01$), 在 H/SD 12 h 状态下, ^{CSE} MSCs 组凋亡率显著降低 ($P < 0.01$), ^{CSE} MSCs 组 Bcl-2 蛋白表达水平显著高于^{GFP} MSCs 组及^{Norm} MSCs 组 ($P < 0.01$), ^{CSE} MSCs 组 Bax 蛋白表达水平显著低于^{GFP} MSCs 组及^{Norm} MSCs 组 ($P < 0.01$); ^{CSE} MSCs 组线粒体 Cyt c 蛋白表达水平显著高于^{GFP} MSCs 组及^{Norm} MSCs 组 ($P < 0.01$), ^{CSE} MSCs 组胞质 Cyt c 蛋白表达水平显著低于^{GFP} MSCs 组及^{Norm} MSCs 组 ($P < 0.01$)。与^{Norm} MSCs 与^{GFP} MSCs 组上述指标比较, 差异均无统计学意义。结论 CSE 过表达保护 H/SD 诱导 MSCs 凋亡, 其机制与抑制线粒体凋亡途径有关。

关键词 骨髓间充质干细胞; 胱硫醚- γ -裂解酶; 凋亡; 机制
中图分类号 R 542.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0037-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.008

2016-11-04 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: kj2015Z024); 北京协和医学基金-睿 E(睿意)急诊医学研究专项基金(编号: R2015012); 安徽医科大学校基金(编号: 2015xkj062)

作者单位: ¹安徽医科大学第三附属医院(合肥市第一人民医院)急诊部, 合肥 230061

²安徽医科大学第一附属医院心内科, 合肥 230022

³安徽省第二人民医院重症医学科, 合肥 200041

作者简介: 李从圣, 男, 博士, 副主任医师;

杨静, 女, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yangjing168168@yeah.net

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)及其引起的心力衰竭是严重危害人类健康的心血管疾病^[1]。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植已成为治疗 AMI 最有潜力的方法之一^[2-3]。然而, MSCs 移植早期大量死亡问题严重制约了细胞移植的疗效^[4]。已有研究^[5]表明, 心肌缺血微环境诱导的 MSCs 凋亡是导致这一现象的主要原因。

硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是新发现的一种气体信号分子, 在哺乳动物中, 内源性 H₂S 主要由酶促反应、非酶促反应及细胞内储存硫释放 3 种途径生成, 在大多数细胞中胱硫醚- β -合酶(cystathionine- β -synthase, CBS)和胱硫醚- γ -裂解酶(cystathionine- γ -lyase, CSE)是内源性 H₂S 生成的关键酶, 其以 L-半胱氨酸为底物生成 H₂S^[6]。近年来, 越来越多的研究^[7-8]表明, H₂S 在体内发挥着调节细胞凋亡的重要生物学功能。课题组前期研究^[9]证实, 大鼠 MSCs 中存在内源性 H₂S 及其合成酶 CSE 蛋白表达, CSE 过表达显著抑制低氧/无血清(H/SD)诱导的 MSCs 凋亡。但是其具体机制目前尚不清楚。基于以上原因, 该研究以 H/SD 模拟心肌缺血微环境诱导 MSCs 凋亡, 采用慢病毒介导的 CSE 转染 MSCs, 探讨 CSE 过表达保护 H/SD 诱导 MSCs 凋亡的机制, 为体内实验提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 低糖-DMEM 培养基(L-DMEM)、胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司; 碘化丙啶(PI)、0.25% 胰酶购自美国 Sigma 公司; 缺氧试剂购自法国 BioMérieux sa 公司; β -actin、CSE 及 Cyt C 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; Bcl-2、Bax 抗体购自美

the value of behavior evaluation of the HPCT group and the appearance of GADD34 was significantly increased, and the rate of nerve cells apoptosis decreased dramatically ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypoxic preconditioning can decrease behavioral injury in rats hippocampus after traumatic brain injury, which might by up-regulate the appearance of the hippocampus GADD34 to down-regulate hippocampus neuronal cells apoptosis to protect brain.

Key words traumatic brain injury; hypoxic preconditioning; GADD34; ER stress; cells apoptosis