

LPA₂对 PC12 细胞缺血再灌注损伤致细胞凋亡的作用

谷艳霞 王超 陈钜涛 李婷婷 王俐婷 张杰 曹来伟 张兆辉 万芪

【摘要】 目的 探讨 LPA₂ 在 PC12 细胞缺血再灌注损伤致细胞凋亡中发挥的作用。**方法** 测最适缺氧时间:将 PC12 细胞分为 6 组,分别在三气培养箱中糖氧剥夺 0、3、6、9、12、15 h。换高糖培养基普通培养箱中复氧 24 h,MTT 测细胞存活率;将 PC12 细胞分为 5 组:正常组、缺血再灌注组(OGD 组)、缺血再灌注 + 溶剂对照组(OGD + DMSO 组)、缺血再灌注 + LPA₂ 激动剂(Dodecylphosphate)组(OGD + 激动剂组)、缺血再灌注 + LPA₂ 抑制剂(H2L5186303)组(OGD + 抑制剂组),缺氧最适时间后再复氧 24 h,MTT 测细胞存活率,Western Blotting 检测 LPA₂ 及 p-akt 蛋白表达水平。**结果** 缺氧处理 12 h 是模拟缺血再灌注损伤的最适时间;缺血再灌注组与正常组比较 LPA₂ 表达水平降低;激动剂组与溶剂对照组比较 LPA₂ 表达水平增高,p-akt 表达水平增高。**结论** 升高 LPA₂ 表达水平可提高细胞的存活率,LPA₂ 在缺血再灌注损伤中发挥保护作用。

【关键词】 缺血再灌注 糖氧剥夺 溶血磷脂酸受体 2 PC12 细胞

【中图分类号】 R743.32 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)03-0177-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.03.002

The effect of LPA₂ on PC12 cell apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury Gu Yanxia, Wang Chao, Chen Jutao, et al. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

【Abstract】 Objective To investigate the effect of LPA₂ on PC12 cell apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury. **Methods** To detect the suitable time of the oxygen glucose deprivation, the PC12 cells were divided into 6 groups, which were deprived of oxygen for 0, 3, 6, 9, 12 and 15 h in tri-gas incubators. The cell viability was measured by MTT after 24 h of reoxygenation in a normal incubator. Then, the PC12 cells were divided into 5 groups; the normal culture group; ischemia/reperfusion group, ischemia/reperfusion group + solvent control (DMSO) group, Ischemia/reperfusion + LPA₂ antagonist (H2L5186303) group, ischemia/reperfusion + LPA₂ agonist (Dodecylphosphate) group. The cell viability was measured by MTT assay and the protein expression of LPA₂ and p-akt were detected by western blotting. **Results** The oxygen glucose deprivation for 12 hours might be the suitable time for inducing neuron injury. The expression of LPA₂ receptor in OGD groups were lower than that in normal group and the expression of p-akt in the OGD group was lower than that in the normal control group. The expression of LPA₂ receptor and p-akt in the agonist group were higher than that in the solvent control group. **Conclusion** Increasing the expression of LPA₂ could improve the survival rate of cells, LPA₂ played a protective role in PC12 cell apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury

【Key words】 Ischemia/reperfusion Oxygen glucose deprivation Lysophosphatidic acid receptor 2 PC12 cell

目前脑血管病已成为危害人类健康和生命最重要的疾病之一,全球疾病中排名第二死亡原因^[1]。其中缺血性脑血管病占脑卒中总数的 70%~80%,

具有较高发病率、致死率和致残率的特点^[2],尤其在 我国发病率呈现逐年上升趋势,严重影响患者生活质量,带来严重的家庭和社会负担。然而,缺血性脑血管病神经损伤机制尚未明确,临床上对该病的治疗主要采用血管内介入及静脉溶栓治疗,但再灌注损伤再次诱发神经元凋亡,加重梗死面积。因此,保护脑缺血后神经细胞成为脑梗死治疗的方法之一。

溶血磷脂酸(Lysophosphatidic acid, LPA)是生

基金项目:武汉大学医学部创新种子基金项目

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科[谷艳霞(在读硕士研究生) 王超 陈钜涛 李婷婷 王俐婷 张杰 曹来伟 张兆辉(通信作者)];武汉大学基础医学院生理系(万芪)

物体内普遍存在的、对多种细胞具有不同生物活性的磷脂介质^[3]。前期研究表明 LPA 是血栓形成前的一种释放物,可作为早期脑梗死形成的标志物^[4]。在缺血性脑血管病发生部位 LPA 水平增高,高水平的 LPA 可引起神经细胞坏死^[5],此作用是通过激活细胞膜上 6 种 G 蛋白偶联受体(GPCRs)(LPA₁-LPA₆)^[6]。然而,在此过程中各个受体所发挥的作用及其机制尚未明确。有动物实验表明在 6 种受体中 LPA₂有抗凋亡作用^[7]。本研究利用 PC12 细胞糖氧剥夺建立体外脑缺血再灌注模型,观察 LPA₂变化 PC12 细胞的存活率的影响,并初步探讨 LPA₂对于缺血再灌注损伤中的细胞发挥何种作用。

1 材料与方法

1.1 材料及主要仪器

PC12 细胞(褐家鼠肾上腺嗜络细胞瘤)购于武汉大学生物典藏中心;DMEM-高糖培养基、DMEM-无糖培养基购于 Gibco 公司;胎牛血清购于杭州四季青公司;RIPA 裂解液购于北京普利莱公司;BCA 蛋白水平测定试剂盒购于美国 Thermo 公司;MTT、二甲基亚砜(DMSO)购于美国 Amresco 公司;Akt 一抗、Phospho-Akt 一抗、GAPDH 购于美国 Cell Signaling 公司;LPA₂一抗购于 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY;三气培养箱(长沙华曦电子科技有限公司),酶标仪(Pemn E1mer)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

PC12 细胞用 DMEM 高糖培养基(含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素及 100 mg/ml 链霉素)于 37℃、5% CO₂培养箱中培养,2~3 d 传代 1 次;传代用 0.25%胰酶室温消化 1 min,倒置显微镜下观察细胞生长情况,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT 测最适缺氧时间

将对数生长期的 PC12 细胞以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板,并将细胞分为 6 组:正常组、缺氧 3、6、9、12、15 h 组,待细胞贴壁后弃培养基,PBS 洗 2 次,正常组加入高糖培养基在普通培养箱中正常培养 24 h;缺氧组加入无糖无血清培养基放于 37℃、1%O₂、5%CO₂、94%N₂培养箱中分别培养 3、6、9、12、15 h,至观察时间点将细胞取出,换回原培养基,置于普通培养箱复氧 24 h;正常组正常培养 24 h 后及缺氧组复氧 24 h 后取出细胞,加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L 放置普通培养箱中避光孵育 4 h

后,弃上清,每孔加入 DMSO 100 μ L,置于摇床上震荡 15 min,使结晶充分溶解后于 570 nm 处检测各孔的吸光度值;每组样本取 3 个复孔的平均值,每组设置空白组:加入 DMSO;对照组:正常组。细胞存活率=(测试组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.2.3 细胞模型的构建

取对数生长期的 PC12 细胞以 1.5×10^5 /孔接种于直径为 35 mm 的培养皿中,以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板;置于普通培养箱中培养,待细胞贴壁后弃培养基,PBS 洗涤 2 次,分为 5 组:正常组、缺血再灌注组(OGD 组)、缺血再灌注+溶剂对照组(OGD+DMSO 组);缺血再灌注+LPA₂受体激动剂组(OGD+激动剂组)、缺血再灌注+LPA₂受体抑制剂组(OGD+抑制剂组)。正常组予以高糖培养基置于普通培养箱中正常培养;缺血再灌注组换无糖无血清培养基置于 37℃、1%O₂、5%CO₂、94%N₂三气培养箱中糖氧剥夺,缺氧至最佳时间,取出细胞,换回普通培养基;OGD 组不做处理;OGD+DMSO 组加入 DMSO(浓度为与配制 H2L5186303 时 DMSO 稀释的最终浓度);OGD+激动剂组加入激动剂 Dodecylphosphate(终浓度为 100 nm);OGD+抑制剂组加入抑制剂 H2L5186303(终浓度为 100 nm);放入普通培养箱复氧 24 h 后 96 孔板做 MTT 测细胞存活率;培养皿提取蛋白做 western blotting。

1.2.4 western blotting 测蛋白表达水平

培养皿中的 PC12 细胞经糖氧剥夺后取出置冰上,弃培养基,预冷的 PBS 洗涤 3 次,加入细胞裂解液 120 μ L,用干净的刮棒收集细胞于 1.5 mL EP 管中,冰上裂解 15 min,4℃12000 r/min 离心 5 min,收集上清液,加入 1/3 体积的 4 \times loading buffer,100℃煮沸 10 min,取出在室温下冷却后 BCA 法测蛋白水平;样品中加入 1/20 体积的溴酚蓝和 β -巯基乙醇,100℃加热 10 min,复温;制备 SDS-PAGE 凝胶,每孔上样蛋白 20 μ g,根据 BCA 测得的蛋白水平确定上样体积,loading buffer 配平后电泳分离,聚偏二氟乙烯膜(PVDF)转膜 90 min,使用 TBST 清洗 PVDF 膜后 5%脱脂奶粉封闭,室温水平摇床 1 h,再次清洗后用稀释的兔抗鼠一抗中(LPA₂,1:500;p-akt,1:500;t-akt,1:1000;GAPDH,1:1000)封闭,放置于 4℃冰箱中孵育过夜;取出后复温 30 min,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;洗膜后用抗兔荧

光二抗(1:20000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;ECL 显影,ImageJ 软件进行条带分析。

1.2.5 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件,实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数间的比较采用单

因素方差分析;多个样本均数与对照组的比较采用 Dunnett-*t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 测缺氧 12 h 为最适合的缺氧时间

表 1 OGD 不同时间点细胞存活率比较(%)

指标	正常组(0 h)	3 h	6 h	9 h	12 h	15 h
存活率	100 ± 5.3	93.7 ± 3.8	80.8 ± 3.9*	55.3 ± 3.1*	48.8 ± 3.4*	43.4 ± 4.0*

注:与正常组比较,* $P<0.05$

如表 1 所示,随着缺氧时间延长,PC12 细胞的存活率逐渐下降。缺氧 6 h、9 h、12 h、15 h 后再复氧 24 h 的细胞与正常培养组相比,细胞存活率明显降低, ($P<0.05$),在缺氧 12 h 左右细胞的存活率在 50%左右。

2.2 western Blotting 测定各组细胞 p-akt 及 LPA₂蛋白表达水平

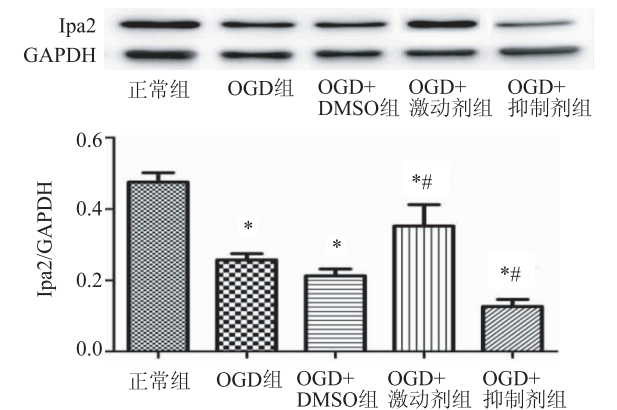


图 1 Western Blotting 检测各组细胞 LPA₂/GAPDH 蛋白表达水平 与正常组比较,* $P<0.05$;与 OGD + DMSO 组比较,* $P<0.05$

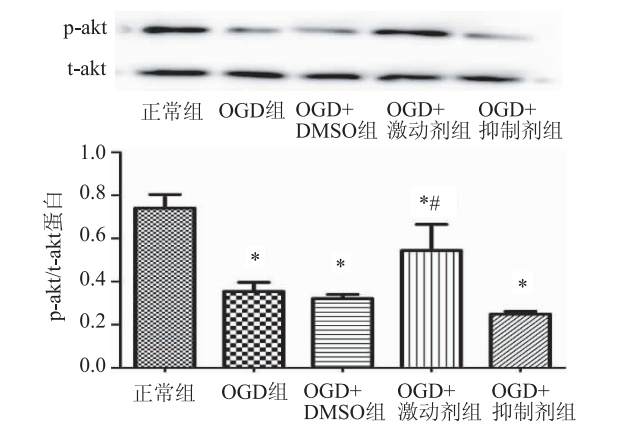


图 2 Western Blotting 检测各组细胞 p-akt/t-akt 蛋白表达水平 与正常组比较,* $P<0.05$;与 OGD + DMSO 组比较,* $P<0.05$

如图 1 所示,缺血再灌注组相比正常组 LPA₂ 表达显著降低($P<0.05$);溶剂对照组相比 OGD 组没有显著性差异;激动剂组相比 OGD 及溶剂对照组 LPA₂表达显著增高($P<0.05$);抑制剂组相比 OGD 及溶剂对照组 LPA₂ 表达显著降低($P<0.05$)。

如图 2 所示,缺血再灌注组相比正常组 p-akt 表达均显著降低($P<0.05$);溶剂对照组相比 OGD 组没有显著性差异;激动剂组相比 OGD 及溶剂对照组 p-akt 表达显著增高($P<0.05$);抑制剂组相比 OGD 及溶剂对照组没有显著差异。

2.3 MTT 测定各组细胞存活率

如表 2 所示,缺血再灌注组细胞的存活率显著低于正常组;激动剂组细胞存活率相比 OGD 及溶剂对照组显著增高($P<0.05$)。

3 讨 论

脑卒中发病率高、病死率高、致残率高、复发率高,严重危害着人类的身体健康和生命,是目前导致人类死亡的第二位原因^[1]。大脑几乎无能量储备,因此脑组织对缺血缺氧性损伤十分敏感。全脑组织血供完全中断 5 分钟最易损的特定神经元出现不可逆损伤,10-20 分钟大脑皮质出现广泛的神经元坏死^[8]。近年来脑卒中的诊疗技术已有很大进展,但是脑卒中发生后患者的病理生理过程无法逆转,患者神经功能恢复并不理想。

在脑卒中发病早期,局部脑缺血形成了中心坏死去及周围的缺血半暗带区。坏死区中神经元死亡,半暗带区由于存在侧支循环,尚有大量存活神经元。如果在短时间内迅速恢复半暗带区的血流供应,该区神经元仍可以恢复功能。而中心坏死区即使很快恢复血供,会发生再灌注损伤继续造成脑损伤,针对坏死区已无法挽救,只能进行神经保护。因

表 2 MTT 测各组细胞存活率(%)

指标	正常组	OGD 组	OGD+ DMSO 组	OGD+ 激动剂组	OGD+ 抑制剂组
存活率	100 ± 3. 6	49. 1 ± 3. 9 *	46. 5 ± 3. 4 *	70. 4 ± 4. 7 * #	42. 6 ± 2. 9 *

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与 OGD+ DMSO 组比较,# $P<0.05$

此抢救缺血半暗带区是脑卒中早期治疗的主要目的^[9-11]。

LPA 是一种在生物体液中普遍存在的类似生长因子的磷脂^[12]。LPA 介导多种重要的生物反应,如生长、增殖、分化、免疫、血管生成及血小板聚集^[13]。目前已有 6 种 G 蛋白偶联受体被定义为 LPA 的受体,分别命名为 LPA₁-LPA₆。LPA₁/EDG2, LPA₂/EDG4 和 LPA₃/EDG7 属于内皮分化基因受体家族,和 S1P 家族有很高的同源性。LPA₄/P2Y9/GPR23, LPA₅/GPR94 和 LPA₆/P2Y5 属于 P2Y 受体家族^[14,15]。这些受体通过 4 种 G 蛋白 G_{i/o}, G_{q/11}, G_s, G_{12/13} 激活一系列下游信号通路^[15]。然而,不同的 LPA 受体管理广泛的细胞反应的分子机制尚不明确。在 6 种 LPA 受体中,动物实验表明 LPA₂ 有抗凋亡作用,在电离辐射引起的凋亡中,LPA₂ 基因缺失的老鼠凋亡率明显增加^[16]。细胞外的 LPA 刺激 LPA₂ 与 G_{i/o}, G_{q/11}, G_{12/13} 三种 G 蛋白结合介导细胞反应如 DNA 合成、MAP 激酶激活、AKT 激活、抑制 AC 作用、提高细胞内 Ca 浓度等^[17]。我们前期研究发现在做大脑中动脉栓塞模型大鼠的脑缺血半暗带区 LPA₂ mRNA 表达显著低于假手术组,因此我们提出设想,人为的改变 LPA₂ 的表达能否改变凋亡率。前期的动物实验提示 LPA₂ 对缺血半暗带区有神经保护作用。本实验利用 PC12 细胞进行糖氧剥夺后正常培养模拟生物体内的缺血再灌注现象。PC12 细胞系来源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株,具有类似神经元的形态和生理生化特性^[18]。糖氧剥夺模型模拟体内缺血缺氧,此过程中 O₂ 含量低于 1%;使用不含血清不含糖培养基。虽然此模型的制备参照 Hillion 的方法^[19],但考虑到缺氧时长受细胞及环境因素影响,因此先测定得到理想的模型所需缺氧时长。如图一,在缺氧 6h 之后与正常培养组相比较,细胞的存活率显著降低,12 h 存活率在 50%左右。此时显微镜下观察细胞内颗粒增多,细胞形态结构开始出现完整性的破坏,而缺氧 15 h,损伤程度加重,形态结构严重破坏。因此用缺氧 12h 细胞模拟缺血半暗带区,是拯救细胞存活的关键点。随后,将实验分成 5

组分别做 western blotting 和 MTT。Western 显示缺血再灌注的四组相比正常组 LPA₂ 表达显著降低,应用激动剂之后相比 DMSO 组 LPA₂ 表达显著增加,抑制剂组相比 DMSO 组显著降低。P-akt 是磷酸化的 Akt,介导复杂的抗凋亡信号通路。MTT 及 P-akt 蛋白表达均表明缺血再灌注组存活率下降,激动剂组相比 DMSO 组 p-akt 表达显著增高。应用抑制剂后 LPA₂ 的表达降低,Western Blotting 测得细胞存活率相比 DMSO 组有所降低,但没有统计学意义,其原因有待更深入研究。综合以上结果,缺血再灌注后 LPA₂ 表达降低,细胞存活率降低;应用激动剂提高 LPA₂ 的表达后细胞的存活率也增加。

因此,此实验可得出结论提高 LPA₂ 表达可减少细胞凋亡,LPA₂ 通过下游通路对细胞起保护作用。目前关于脑卒中的早期治疗,溶栓恢复血液供应已在临床广泛应用,而拯救更多的缺血半暗带区的细胞也是相伴的主要治疗手段,LPA 及其各个受体对神经细胞的作用及机制有望成为神经功能恢复的突破点。

参 考 文 献

[1] Feigin V L, Lawes C M, Bennett D A, et al. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review[J]. Lancet Neurol, 2009,8(4):355-369.

[2] Bennett D A, Krishnamurthi R V, Barker-Collo S, et al. The global burden of ischemic stroke: findings of the GBD 2010 study[J]. Glob Heart, 2014,9(1):107-112.

[3] Choi J W, Herr D R, Noguchi K, et al. LPA receptors: subtypes and biological actions[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010,50:157-186.

[4] Penz S, Reininger A J, Brandl R, et al. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI[J]. FASEB J, 2005,19(8):898-909.

[5] Holtsberg F W, Steiner M R, Keller J N, et al. Lysophosphatidic acid induces necrosis and apoptosis in hippocampal neurons[J]. J Neurochem, 1998,70(1):66-76.

[6] Noguchi K, Herr D, Mutoh T, et al. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors[J]. Curr Opin Pharmacol, 2009,9(1):15-23.

(上接第 180 页)

- [7] E S, Lai Y J, Tsukahara R, et al. Lysophosphatidic acid 2 receptor-mediated supramolecular complex formation regulates its antiapoptotic effect[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(21): 14558-14571.
- [8] Li Q, Khatibi N, Zhang J H. Vascular neural network: the importance of vein drainage in stroke[J]. *Transl Stroke Res*, 2014, 5(2):163-166.
- [9] Zhang J H, Badaut J, Tang J, et al. The vascular neural network—a new paradigm in stroke pathophysiology[J]. *Nat Rev Neurol*, 2012, 8(12):711-716.
- [10] Astrup J, Siesjo B K, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia—the ischemic penumbra[J]. *Stroke*, 1981, 12(6):723-725.
- [11] Lees K R, Bluhmki E, von Kummer R, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials[J]. *Lancet*, 2010, 375(9727):1695-1703.
- [12] Moolenaar W H, van Meeteren L A, Giepmans B N. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling[J]. *Bioessays*, 2004, 26(8):870-881.
- [13] Mills G B, Moolenaar W H. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(8):582-591.
- [14] Choi J W, Chun J. Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2013, 1831(1): 20-32.
- [15] Yung Y C, Stoddard N C, Chun J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology [J]. *The Journal of Lipid Research*, 2014, 55(7):1192-1214.
- [16] Deng W, Shuyu E, Tsukahara R, et al. The lysophosphatidic acid type 2 receptor is required for protection against radiation-induced intestinal injury[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(5): 1834-1851.
- [17] Lin F T, Lai Y J. Regulation of the LPA2 receptor signaling through the carboxyl-terminal tail-mediated protein-protein interactions[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1781(9): 558-562.
- [18] Vaudry D, Stork P J, Lazarovici P, et al. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections[J]. *Science*, 2002, 296(5573):1648-1649.
- [19] Hillion J A, Takahashi K, Maric D, et al. Development of an ischemic tolerance model in a PC12 cell line[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(2):154-162.

(2016-08-28 收稿)