糖氧剥离对海马神经元 Furin、BDNF 表达水平的影响

陈燕　张兆辉　张琦　王翠芳

【摘要】 **目的** 探讨海马神经元在糖氧剥离时原蛋白转化酶 Furin 是否介导了脑源性神经营养因子(BDNF)表达水平的变化。**方法** 通过 OGD 模拟缺血缺氧诱导海马神经元,采用免疫印迹观察 OGD 诱导后不同时间点 BDNF、Furin 动态表达水平变化。**结果** 海马神经元经 OGD 诱导后再灌注 12 h 内 BDNF 表达水平下调约 30%($P<0.01$);再灌注 24 h BDNF 表达水平下调 50%($P<0.01$);再灌注 48 h 其下降约 70%,72 h 下调 70%;与对照组比较有明显差异($P<0.001$)。Furin 表达水平呈进行性升高,即再灌注 12 h 内 Furin 表达水平上调约1.3倍($P>0.05$);再灌注 24 h 时 Furin 表达水平上调2.1倍($P<0.001$);再灌注 48 h 其上调2.5倍,72 h 上调3.14倍;与对照组比较有明显差异($P<0.001$)。**结论** 经 OGD 诱导的海马神经元 BDNF 表达水平随再灌注时间呈进行性下降而 Furin 表达水平呈逐步上调。这一现象提示糖氧剥离时 Furin 未介导海马神经元内 BDNF 的细胞内分泌过程,在缺血缺氧时 BDNF 复杂的酶切过程有待进一步研究证实。

【关键词】 糖氧剥离　海马神经元　原蛋白转化酶　脑源性神经营养因子

【中图分类号】 R742 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2018)05-0501-03

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2018.05.003

The effect of oxygen-glucose deprivation on Furin and BNDF expression levels of hippocampus neuron

Chen Yan, Zhang Zhaohui, Zhang Qi, et al. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

【**Abstract**】 **Objective** To explore the effect of oxygen-glucose deprivation on Furin and BDNF expression levels of hippocampus neuron. **Methods** In vitro primary culture was conducted on the neurons in hippocampus area of newborn SD rats within 24 hours. The cultured neuron was induced by oxygen—glucose deprivation(OGD). Protein was extracted in 0 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h after OGD, and Western Blotting was used to test mBDNF and Furin expression levels at different time points. **Results** Compared with the control group, mBDNF gradually decreased, 30% in 12 h, 50% in 24 h, 70% in 48 h and 70% in 72 h; while furin gradually increased, in 1.3 fold in 12 h, 2.1 fold in 24 h, 2.5 fold in 48 h and 3.14 fold in 72 h after OGD. **Conclusion** With the injury of hippocampal neuron, OGD could result in the change of the mBDNF and Furin expression levels and Furin didn't mediate the change of the BDNF expression level. The mechanism of the down-regulation of BDNF would be explored further.

【**Key words**】 Oxygen-glucose deprivation　Hippocampus neuron　Proprotein convertases　Brain-derived neurotrophic factor

Furin 在神经系统有丰富的表达并参与脑源性神经营养因子(BDNF)、血管生长因子(VEGF)的成熟过程[1]。在 BDNF 的成熟过程中 Furin 的切割在调控形成具有生物活性的 BDNF 过程中起关键作用[2]。并且我们的前期研究发现 Furin 在急性缺血缺氧病理过程中介导了星形细胞 BDNF 细胞内的分泌成熟过程[3]。BDNF 广泛分布于中枢神经系统,在大脑皮层、海马等部位含量较丰富,对神经元的存活、分化、生长发育起着重要作用。研究已经发现在很多病理状态下神经元分泌的 BDNF 的表达水平发生变化。本实验进一步观察在海马神经元糖氧剥离后不同时间点 Furin、BDNF 的表达水平变化以明确 Fuirn 是否介导的 BDNF 的表达水平变化过程。

1　材料与方法

1.1　材料　新生 SD 大鼠 1～2 d 龄,由武汉大学实验动物中心提供。Furin、BDNF 抗体及 GFAP 抗体

基金项目:国家自然科学基金项目(NO81501053)

作者单位:430060　武汉大学人民医院神经内科

(abcam),多聚赖氨酸(sigma),Neurobasal 培养基、B27 及 D-Hank,s 液(Gibco 公司)。

1.2　原代神经元培养　将新生 24～48 h 的 SD 乳鼠浸入 75%冰浴乙醇消毒,取出全脑,在解剖显微镜下在小脑端轻轻拨开大脑皮层露出新月形海马,去软脑膜、血管网后将海马组织剪成小组织块,静止 2 min 后去上清,然后加入0.125%胰蛋白酶消化 5 min,胎牛血清终止消化,细胞筛过滤,收集细胞悬液;离心后加种植培养基(90% DMEM-F12 + 10%FBS)重悬,细胞计数,接种于培养皿;24 h 后将种植培养基全量换成维持培养基(97% Neruobasal 1%B27 + 1% l-谷氨酰胺),以后每 3d 维持培养基半量换液。

1.3　OGD 模型建立　神经元培养到第 7 d,去培养基加不含血清的无糖 DMEM,将细胞培养板移入潮湿密闭容器,持续泵入 95%N_2 和 5%CO_2 混合气体,37 恒温处理 3 h,低氧诱导后的海马神经元在再灌注 0,12,24、48、72 h 五个时间点收集细胞总蛋白。

1.4　蛋白免疫印迹检测 Furin、BDNF 蛋白表达水平　以再灌注 0 h 为对照组,将已收集的低氧诱导后的海马神经元总蛋白进行蛋白定量(BAC assay,按试剂盒说明操作),用 12% SDS-PAGE 分离目的蛋白 Furin、BDNF,以管家蛋白 GAPDH 校正上样量;将需检测蛋白标本上样,电泳,转膜,封闭,孵抗体。其中各抗体稀释度依次为抗 Furin 抗体,抗 BDNF 多克隆抗体(1∶1 000),二抗(1∶3 000),内参 GAPDH(1∶5 000);ECL 发光试剂发光、显影、定影,Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像;检测重复 3 次。

1.5　统计学处理

采用 SPSS 软件(版本 11),统计图表采用 Graph-Pad 10.0绘制。Furin,BDNF 蛋白表达水平变化采用以对照组为基数 1 计算变化倍数,然后根据 3 次独立试验的倍数均数和标准差($\bar{x} \pm s$)进行 t 检验。以 $P<0.05$认为差异具有统计学意义。

2　结　果

以氧糖剥离再灌注 0 h 为基数 1,对不同再灌注时间点 BDNF、Furin 总蛋白的灰度值比值进行标准化比较。从图 1 中可见 BDFN 的表达水平随着再灌注时间的延长而逐渐下降。在最初 12 h 的再灌注时间内 BNDF 的表达水平下降约 30%,再灌注 24 h 下调约 50%,48 h 下调约 70%,72 h 下调约 70%,与对照组比较有明显差异(12 h,$P = 0.04$;24 h,$P = 0.04$;48 h,$P = 0.003$;72 h,$P = 0.001$)。从图 2 中可见 Furin 的表达水平随着再灌注时间的延长而逐渐升高。在最初 12 h 的再灌注时间内 Furin 的表达水平上调约1.3倍,与对照组比较无明显差异(12 h,$P = 0.08$),再灌注 24 h 上调约2.1倍,再灌注 48 h 上调约 2.5倍,再灌注 72 h 上调约3.14倍,与对照组比较有明显差异(24 h,$P = 0.005$;48 h,$P = 0.004$;72 h,$P = 0.004$)。

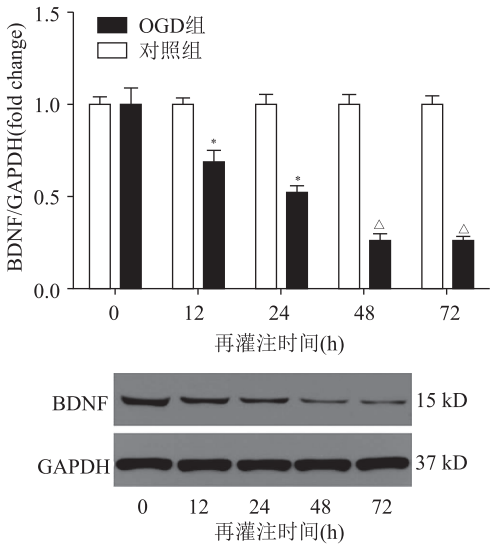

图 1　OGD 诱导 3h 再灌注 0,12,24,48,72 h 五个时间点 BDNF 蛋白表达水平变化　随着再灌注时间延长 BDNF 表达水平逐渐下降(与对照组再灌注注不同时间点比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$)

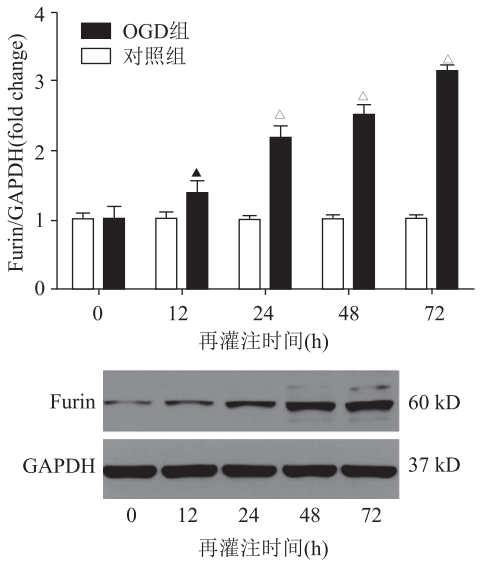

图 2　OGD 诱导 3 h 再灌注 0,12,24,48,72 h 五个时间点 Furin 蛋白的表达水平变化　随着再灌注时间延长 Furin 表达逐渐上调(再灌注 12h 与对照组比较无明显差异,$P>0.05$;再灌注 24,48,72 h 与对照组比较有明显差异,$P<0.01$)

3 讨 论

Furin 是原蛋白转化酶家族成员之一，其切割底物广泛。研究表明 Furin 是 BDNF 细胞内分泌通路上的关键性切割酶。BDNF 前体蛋白经 Fuirn 的切割后形成具有生物活性成熟的 BDNF。并且研究表明神经营养因子蛋白前体与成熟的神经因子具有绝然相反的生物学效应，即蛋白前体诱导神经元死亡，而成熟的神经营养因子促进神经元生存，参与突触可塑性调节。由此可见 Furin 在决定神经营养因子生物效应中起关键性作用。来源于癌细胞的研究结果表明 Furin 在低氧条件下表达水平上调。

BDNF 最初以 pro-BDNF 的形态在内质网内合成，pro-BDNF 在细胞内通过 Furin 切割后形成成熟的 mBDNF，在病理状态下 BDNF 的表达水平发生变化，即在癫痫模型中发现 BDNF 表达水平上调，并且发现原蛋白转化酶 PC1 介导了 BDNF 的表达水平上调过程[4]；在神经退行性疾病中如 AD 患者中皮质和海马分泌的 BDNF 表达水平下调，BDNFmRNA 表达水平下调[5]；在精神心理性疾病如抑郁海马分泌的 BDNF 的表达水平也是下调[6]。在各种病理状态下 BDNF 表达水平变化的细胞内机制不同，并且大多数情况下其具体的细胞内分泌通路调控并不十分清楚。另外，在不同的细胞类型中 BDNF 的细胞内调节通路可能也不一样。

对缺血缺氧这一病理状态下我们的前期研究发现 Furin 介导了 OGD 诱导激活的星形细胞的 BDNF 表达水平的上调过程，这一过程可能参与急性脑缺血时星形细胞的内源性神经保护机制[3]。为进一步明确在缺血缺氧的神经元内是否同样 Furin 也参与的 BDNF 的表达水平变化过程。本研究利用 OGD 诱导模型模拟急性脑缺血时海马神经元观察其细胞内 BDNF 的表达水平变化。在 OGD 诱导再灌注后海马神经元 BDNF 的表达水平随再灌注时间延长呈逐渐下调而 Furin 的表达呈逐渐上调。从初步研究结果分析 Furin 没有参与 OGD 时海马神经元内 BDNF 的表达水平变化过程。其原因可能在于原蛋白酶家族其他成员参与了这一条调控过程。原蛋白转化酶家族成员共有 7 个，分别为 Furin，PACE4，PC5/6，PC1/PC3，PC4，PACE4，LPC/PC7，其切割底物存在交叉。另外，研究发现在坐骨神经损伤时 PC1，PC5，Furin 和 PC7 均参与雪旺氏细胞的 BDNF 表达水平上调过程[7]。在后续的研究中我们将进一步研究海马神经元内的 BDNF 的细胞内分泌过程的酶切调节机制。

参 考 文 献

[1] Marcinkiewicz MG，M. Chretien，implications of the subtilisin/kexin-like precursor convertases in the development and function of nervous tissues[J]. Acta Neurobiol Exp (Wars)，1996，56(1)：287-298.

[2] Seidah NG，Benjannet S，Pareek S，et al. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases[J]. FEBS Lett，1996，379(3)：247-250.

[3] Chen YZ，M. Deng，furin mediates brain-derived neurotrophic factor upregulation in cultured rat astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation[J]. J Neurosci Res，2015，93(1)：189-194.

[4] Marcinkiewicz M，Nagao T，Day R，et al. Pilocarpine-induced seizures are accompanied by a transient elevation in the messenger RNA expression of the prohormone convertase PC1 in rat hippocampus：comparison with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor expression[J]. Neuroscience，1997，76(2)：425-439.

[5] Hock C，Heese K，Hulette C，et al. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease：decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas[J]. Arch Neurol，2000，57(6)：846-851.

[6] Lee BH，Kim YK. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment[J]. Psychiatry Investig，2010，7(4)：231-235.

[7] Marcinkiewicz MS，J. Marcinkiewicz，the pro-protein convertase PC1 is induced in the transected sciatic nerve and is present in cultured schwann cells：comparison with PC5，furin and PC7，implication in pro-BDNF processing[J]. Brain Res Mol Brain Res，1998，59(2)：229-246.

(2018-04-28 收稿)