

缺血后处理对 PC12 细胞缺血再灌注损伤致细胞凋亡的作用及其机制研究

郭晓洁 毛善平 董慧敏 刘宝辉 腊琼 王舜 方聪聪

【摘要】 目的 探讨缺血后处理对 PC12 细胞缺血再灌注损伤引起的细胞凋亡的作用及其作用机制。**方法** 将 PC12 细胞分为 3 组:正常组、缺血再灌注组、缺血后处理组。缺血再灌注组予以糖氧剥夺 12 h 后正常培养,缺血后处理组经糖氧剥夺 12 h 后予以 3 个循环的正常培养(10 min)→糖氧剥夺(10 min),再正常培养 12 h 后通过 Hoechst 染色检测各组细胞的凋亡情况,应用 Western blot 检测各组细胞 Caspase-3 活化蛋白及磷酸化 NF- κ B/p65 蛋白表达水平,采用 RT-PCR 检测各组细胞 NF- κ B 及 Caspase-3 mRNA 表达水平。**结果** Hoechst 染色显示缺血后处理可降低缺血再灌注引起的细胞凋亡;与对照组相比,缺血再灌注组磷酸化 NF- κ B/p65 和 Cleaved caspase-3 的蛋白表达水平高;缺血后处理组磷酸化 NF- κ B/p65 和 Cleaved caspase-3 的蛋白表达水平明显低于缺血再灌注组;NF- κ B 和 Caspase-3 的 mRNA 表达趋势与蛋白表达基本一致。**结论** 缺血后处理可以减轻缺血再灌注损伤引起的 PC12 细胞凋亡,这可能与 NF- κ B/p65 信号通路有关。

【关键词】 缺血后处理 PC12 细胞 NF- κ B/p65 凋亡

【中图分类号】 R743 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)02-0075-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.02.001

The effect and mechanism of ischemic postconditioning on PC12 cell apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury Guo Xiaojie, Mao Shanping, Dong Huimin, et al. Department of Neurology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060

【Abstract】 Objective To investigate the effect and the probable mechanism of ischemic postconditioning on PC12 cell apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury. **Methods** The PC12 cells were divided into 3 groups: the control group, the ischemia/reperfusion group, and the ischemic postconditioning group. The ischemia/reperfusion group was subjected to a 12-hour oxygenglucose deprivation. The ischemic postconditioning group was given three cycles of 10 minutes of normal cultivation after a 12-hour oxygenglucose deprivation, and then 10 minutes of oxygenglucose deprivation. The PC12 cells were cultivated normally. Afterward the apoptosis of PC12 cells were evaluated by fluorescence microscope. Western blot was used to detect the protein level of cleaved caspase-3 and phosphorylated p65. Reverse transcription-PCR(RT-PCR) was used to observe the mRNA level of NF- κ B and Caspase-3. **Results** Hoechst staining showed ischemic postconditioning can reduce cell apoptosis caused by ischemia and reperfusion injury. Compared with the control group, the expression of Caspase-3 and NF- κ B/p65 increased in the PC12 cells treated with ischemia/reperfusion procedure. The level of NF- κ B/p65 and Caspase-3 significantly reduced in ischemia postconditioning group. **Conclusion** NF- κ B/p65 signal pathway may be involved in the protection of ischemic postconditioning against apoptosis of PC12 cells induced by ischemia/reperfusion injury.

【Key words】 Ischemic postconditioning PC12 cells NF- κ B/p65 Apoptosis

缺血性脑卒中是一种严重的急性脑血管疾病,它的发病特点是大脑血液流动的中断导致快速的神

经损伤^[1]。缺血性脑卒中治疗的目的是使闭塞的脑血管再通,恢复缺血组织的血液供应,减少梗死灶体积,而再灌注过程往往加重组织细胞功能代谢障碍及结构破坏,这种损伤称为再灌注损伤^[2],因此寻找有效的方法减轻缺血再灌注引起的损伤是急需解决的问题。缺血后处理是指在缺血发生后长时间的再

基金项目:武汉市科技攻关计划项目(项目编号为 2013060602010270)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科[郭晓洁 毛善平(通信作者) 董慧敏 腊琼 王舜 方聪聪],神经外科[刘宝辉]

灌注之前对脏器进行数次短暂的再灌注/缺血循环处理的方法^[3-4]。已证实缺血后处理可以减轻缺血再灌注损伤,是一种有效的内源性保护机制。目前国际上关于缺血后处理在脑缺血再灌注中的作用的研究主要侧重于抑制炎症反应和自由基生成,对细胞凋亡的作用及相关机制的报道相对较少。本研究利用 PC12 细胞建立脑缺血模型,观察细胞凋亡情况及凋亡蛋白 Caspase-3 活化蛋白的表达水平,初步探讨其作用机制,为进一步深入研究其在缺血性脑血管疾病中的作用提供方向。

1 材料与方法

1.1 材料及主要仪器

PC12 细胞(褐家鼠肾上腺嗜铬瘤细胞)购于武汉大学生物典藏中心;RPMI-1640 培养基、马血清购于 Gibco 公司;胎牛血清购于杭州四季青公司,RIPA 裂解液(强)试剂、BCA 蛋白水平测定试剂盒、Hoechst 33342 试剂均购于碧云天生物技术研究;Trizol (Invitrogen),逆转录试剂盒(Thermo),PCRMix(天根),琼脂糖(Agarose);一抗 phosphory-NF- κ B/p65、Cleaved caspase-3、GAPDH 购自 Cell signaling Technology 公司;荧光二抗来自美国 LICOR 公司,NF- κ B、Caspase-3 及 GAPDH 引物由上海生物工程公司合成,PVDF 膜(Millipore)。三气培养箱(长沙华曦电子科技有限公司),酶标仪(Perkin Elmer),凝胶成像系统(Perkin Elmer),紫外分光光度计(上海精科),正置荧光显微镜(日本奥林巴斯),奥德赛红外荧光扫描成像系统(Licor Biosciences)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

PC12 细胞用 1640 培养基(10%马血清、5%胎牛血清、100 U/ml 青霉素及 100 mg/ml 链霉素,2 mmol/L 谷氨酰胺)于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养;每 2 d 换液 1 次,3~4 d 传代 1 次,传代时用 0.25%胰酶室温消化 1 min,倒置显微镜观察细胞生长情况,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 细胞模型的构建

将对数生长期的 PC12 细胞以 1.5×10^5 /孔接种于直径为 35 mm 的培养皿中,待细胞贴壁后弃培养基,PBS 洗 2 次,分为 3 组:正常组、缺血再灌注组、缺血后处理组(图 1)。正常组予以正常培养基于 37℃、5% CO₂ 培养箱中正常培养,缺血再灌注组和缺血后处理组于 37℃、0.5% O₂、5% CO₂ 培养箱

中进行糖氧剥夺 12 h,依据 Pignataro 等^[3]的方法并加以改进,缺血后处理组细胞经糖氧剥夺 12 h 后予以 3 个循环正常培养 10 min/糖氧剥夺 10 min,再予以正常培养 12 h,分别用 Hoechst 染色于正置荧光显微镜下观察细胞的凋亡情况、Western blot 法检测 Caspase-3 活化蛋白和 NF- κ B/p65 蛋白表达水平、RT-PCR 检测 Caspase-3 和 NF- κ B 的 mRNA 表达水平。

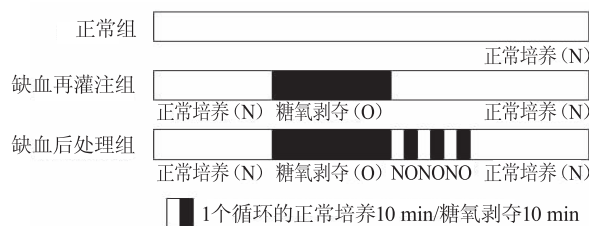


图 1 实验细胞分组情况

1.2.3 Hoechst 染色观察细胞凋亡情况 取对数生长期的 PC12 细胞以 1.5×10^5 /孔接种于直径为 35 mm 的培养皿中的洁净盖玻片上,待细胞贴壁后弃培养基处理细胞;细胞经缺血处理后弃培养液加入 0.5 mL 固定液,室温固定 10 min,然后弃固定液,PBS 洗 2 次,每次 5 min,吸尽液体后加入 0.5 mL Hoechst 33342 染色液,完全覆盖细胞,室温放置 10 min,吸尽 Hoechst 染色液,PBS 洗 2 次,每次 5 min,随后滴 1 滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,在正置荧光显微镜下观察细胞的凋亡情况。

1.2.4 Western blot 法测定 Cleaved caspase-3 及 p-p65 的蛋白表达水平

各组 PC12 细胞处理后弃培养基,预冷的 PBS 洗 3 次,加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min 左右,用干净的刮棒收集细胞于 1.5 mL EPP 管中,4℃ 12000 r/min 离心 5 min,收集上清液,BCA 法测蛋白水平。取 50 ug 蛋白以 12% SDS-PAGE 电泳分离,聚偏二氟乙烯膜(PVDF)转膜,使用 TBS 清洗 PVDF 膜后室温下 5%脱脂奶粉封闭 1 h,TBS 清洗后置膜于稀释的兔抗鼠一抗中(p-NF- κ B/p65, 1:1000; Cleaved caspase-3, 1:1000; GAPDH, 1:1000),4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜后置膜于羊抗兔荧光二抗(1:15000)室温孵育 2 h,PBST 洗膜 3 次,每遍 5 min,Odyssey Infrared Imaging System 扫描。

1.2.5 RT-PCR 检测 NF- κ B 及 Caspase-3 的 mRNA 表达水平

TRIZOL 法提取各组细胞总 RNA,采用紫外分光光度计测量各组 RNA 纯度及水平,两步法 RT-PCR 反应(参照 Thermo 逆转录试剂盒及天根 PCRmix 说明书),取 2 μ g 总 RNA 进行逆转录合成 cDNA,PCR 扩增目的基因(PCR 反应参数: 94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共进行 35 个循环); 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离基因片段(100 V,30 min),用凝胶成像系统分析 PCR 产物电泳条带密度值。引物序列如下,NF- κ B: 上游引物 5'-TTC-CCTGAAGTGGAGCTAGGA-3', 下游引物 5'-CATGTCGAGGAAGACACTGGA-3'; Caspase-3: 上游引物 5'-GGACCTGTGGACCTGAAAAA-3', 下游引物 5'-GCATGCCATATCATCGTCAG-3'; GAPDH: 上游引物 5'-ACAGCAACAGGGTGGT-GGAC-3', 下游引物 5'-TTTGAGGGTG-CAGCGAACTT-3'。

1.2.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺血后处理可以减轻缺血再灌注引起的 PC12 细胞凋亡

如图 2 所示,PC12 细胞经 Hoechst 染色后在正置荧光显微镜下观察可见,正常组细胞胞核呈淡蓝色,缺血再灌注组较多的细胞胞核致密浓染呈亮蓝色或呈碎块状致密浓染;缺血后处理组致密浓染的细胞核较缺血再灌注组明显减少。与正常组相比,缺血再灌注组 PC12 细胞 Cleaved caspase-3 蛋白表达水平增加($P < 0.01$);缺血后处理组 Cleaved caspase-3 蛋白表达水平与缺血再灌注组比较,明显减少($P < 0.01$)(图 3)。

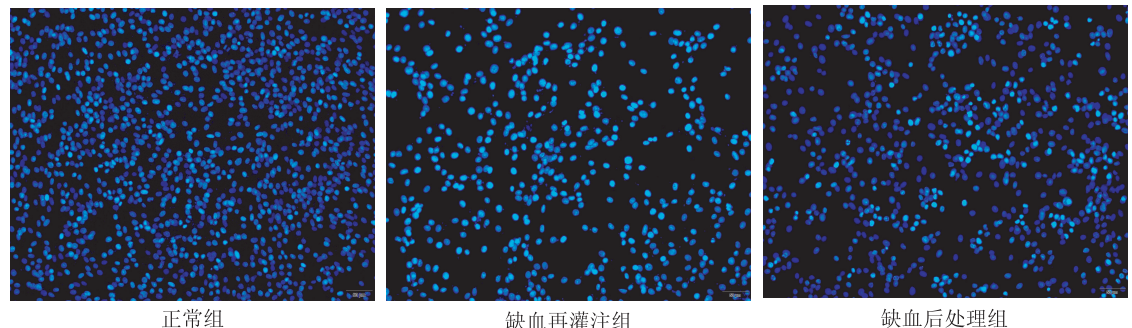


图 2 荧光显微镜下观察各组细胞 Hoechst 染色情况

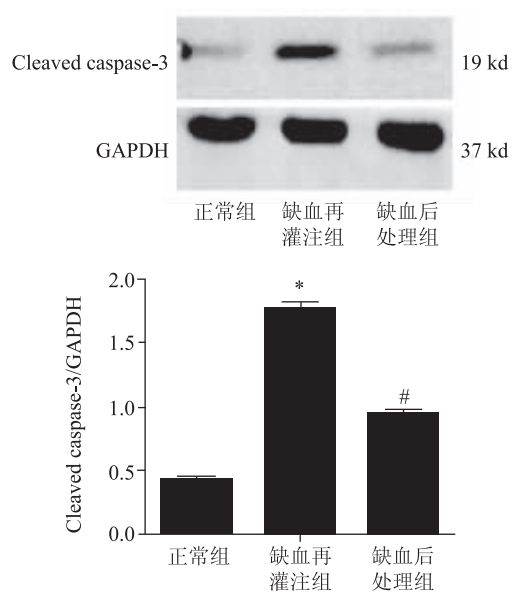


图 3 Western Blot 检测各组细胞 Cleaved caspase-3 的蛋白表达水平 缺血再灌注组与正常组比较,* $P < 0.01$;缺血后处理组与缺血再灌注组比较,# $P < 0.01$ 。

2.2 各组磷酸化 NF- κ B/p65 蛋白表达水平

缺血再灌注组 PC12 细胞 p-p65 蛋白表达水平较正常组增加($P < 0.01$);与缺血再灌注组相比,缺血后处理组 p-p65 蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$)(图 4)。

2.3 各组 NF- κ B 及 Caspase-3 mRNA 表达水平

与正常组相比,缺血再灌注组 PC12 细胞 NF- κ B 及 Caspase-3 的 mRNA 表达水平升高($P < 0.05$);而缺血后处理组 NF- κ B 及 Caspase-3 的 mRNA 表达水平明显低于缺血再灌注组($P < 0.05$)(图 5)。

3 讨论

缺血性脑卒中是一种全球范围内常见的、危及生命的脑血管疾病,其发病率和病死率较高。血栓或栓塞造成血管突然闭塞引起的缺血性脑卒中占所

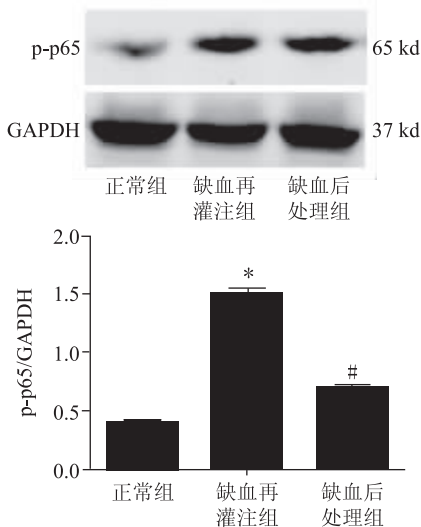


图4 Western Blot 检测各组细胞 p-p65 的蛋白表达水平 缺血再灌注组与正常组比较, * $P < 0.01$;缺血后处理组与缺血再灌注组比较, # $P < 0.01$ 。

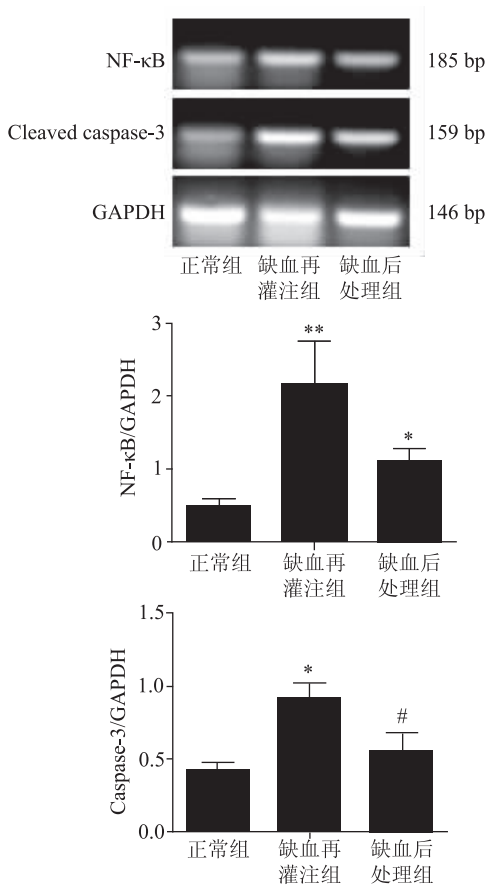


图5 RT-PCR 检测各组细胞 NF- κ B 及 Caspase-3 mRNA 水平 缺血再灌注组与正常组比较, * $P < 0.01$;缺血后处理组与缺血再灌注组比较, # $P < 0.01$ 。

有脑卒中事件的 87%^[4-5]。因此,快速的再灌注治疗对突发的脑缺血事件是至关重要的。但血管再通后的再灌注损伤是我们不可回避的一个问题。缺血

后处理能够减轻缺血再灌注损伤。与缺血预处理相比,缺血后处理应用于持续的缺血性事件后可控性强,具有更大的临床应用前景^[6]。目前研究者多采用动物或体外实验来模拟缺血后处理的发生,但体内研究受多种条件的限制,结果也容易受到干扰。体外培养神经元可以使实验结果免受很多因素的干扰,可信度高,但原代培养成功率低,神经元自然老化等原因无法保证持续传代。PC12 细胞来源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤,具有类似神经元的形态和生理生化特性,可以持续稳定传代,作为一种工具细胞广泛应用于神经系统疾病的体外研究。

脑缺血再灌注损伤是一个复杂的病理生理过程,但越来越多的证据表明其与炎症反应和细胞凋亡有关。研究发现,缺血再灌注后出现的神经损伤可能是通过氧化应激、炎症反应或线粒体功能障碍,最终激活凋亡级联反应^[7]。脑缺血性损伤的机制和心肌缺血性损伤有很多相似的方面,如炎症反应、自由基的生成、细胞凋亡和坏死,类似的细胞信号通路导致细胞死亡^[8-10]。本研究通过对 PC12 细胞进行糖氧剥夺后正常培养来模拟缺血再灌注现象,探讨缺血后处理对缺血再灌注损伤引起的细胞凋亡的作用及机制。细胞凋亡分为 Caspase 依赖性的与非依赖性两类。Caspase 家族介导了细胞的程序性死亡,是细胞凋亡过程中主要的终末剪切酶。当细胞受到刺激时凋亡多由其上游因子激活,导致效应分子作用于细胞中的一系列底物,最终引起细胞解体。本实验用 Hoechst 染色及蛋白免疫印迹实验检测各组细胞凋亡情况,结果显示缺血后处理组致密浓染的细胞核较缺血再灌注组明显减少,且缺血后处理组 Cleaved caspase-3 蛋白水平较缺血再灌注组明显降低,说明缺血后处理可以降低缺血再灌注损伤引起的细胞凋亡。

多条信号通路可以调节细胞凋亡,如 NF- κ B/p65 途径、蛋白激酶 C 途径、MAPK 途径等。核因子(NF- κ B)作为一种普遍存在的转录因子,是多种信号转导途径的汇聚点,NF- κ B 的典型代表是 p50/p65 异源二聚体,NF- κ B/p65 在缺血引起的程序性细胞死亡包括细胞凋亡和自噬死亡中起重要作用。在生理状态的静息细胞中 NF- κ B 与其抑制蛋白 I κ B (inhibitor of NF- κ B, I κ B α)形成复合物 I κ B-NF- κ B 主要存在于胞质中。当细胞受到外界因素缺血和缺氧等刺激时 NF- κ B 与 I κ B 解离被激活,并从细胞质迁移到细胞核中。人们已经发现,在各种应激对大

脑有损害的情况下 NF- κ B/p65 被激活,如短暂性脑缺血发作、蛛网膜下腔出血、创伤和癫痫^[11-14]。Nakai 等证明了 NF- κ B/p65 的激活促使癫痫引起的大鼠纹状体神经细胞凋亡^[11]。Zhang 等在研究短暂性脑缺血发作的实验中发现,NF- κ B/p65 激活与神经元损伤密切相关,且抑制 NF- κ B/p65 活化对神经细胞凋亡有保护作用^[14]。本实验蛋白免疫印迹及 RT-PCR 结果显示缺血后处理组 NF- κ B/p65 的表达水平较缺血再灌注损伤组明显降低,且 Caspase-3 的表达水平与其保持一致,提示缺血后处理的保护机制之一可能通过是抑制 NF- κ B/p65 信号通路来抑制 PC12 细胞的凋亡。

综上所述,本实验认为缺血后处理可以降低 PC12 细胞缺血再灌注损伤引起的细胞凋亡,这种降低细胞凋亡的作用可能与 NF- κ B/p65 信号通路有关。但缺血后处理是通过什么分子途径调控 NF- κ B/P65 信号通路的表达还需要进一步深入研究。作为一种新兴的、简单的脑保护方法,脑缺血后处理为临床上治疗缺血性脑卒中提供了新的思路,且 NF- κ B/p65 也可以为缺血性脑血管病的治疗提供一个新的靶点。

参 考 文 献

- [1] Heiss WD. The ischemic penumbra: correlates in imaging and implications for treatment of ischemic stroke[J]. Cerebrovasc Dis, 2011, 32(4): 307-320.
- [2] Hausenloy DJ, Yellon DM. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an updated [J]. Nat Rev Cardiol, 2011, 8(11): 619-629.
- [3] Pignataro G, Meller R, Inoue K, et al. In vivo and in vitro characterization of a novel neuroprotective strategy for stroke: ischemic postconditioning [J]. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2008, 28(2): 232-241.
- [4] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Heart disease and stroke statistics-2014 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2014, 129(3): e28-e292.

- [5] Jauch EC, Saver JL, Adams HJ, et al. American heart association stroke council; council on cardiovascular nursing; council on peripheral vascular disease; council on clinical cardiology [J]. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke, 2013, 44(3): 870-947.
- [6] Wu N, Zhang XW, Jia PY, et al. Hypercholesterolemia abrogates the protective effect of ischemic postconditioning by induction of apoptosis and impairment of activation of reperfusion injury salvage kinase pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 458(1): 148-153.
- [7] Jiang M, Li J, Peng Q, et al. Neuroprotective effects of bilobalide on cerebral ischemia and reperfusion injury are associated with inhibition of pro-inflammatory mediator production and down-regulation of JNK1/2 and p38 MAPK activation [Z], 2014; 167.
- [8] Merkle S, Frantz S, Schoen MP, et al. A role for caspase-1 in heart failure [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2007, 375(1): 61.
- [9] Zhao H, Wang JQ, Shimohata T, et al. Conditions of protection by hypothermia and effects on apoptotic pathways in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion [J]. J Neurosurg, 2007, 107(3): 636-641.
- [10] Zhao H, Yenari M, Cheng D, et al. Biphasic cytochrome c release after transient global ischemia and its inhibition by hypothermia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25(9): 1119-1129.
- [11] Nakai M, Qin ZH, Chen JF, et al. Kainic acid-induced apoptosis in rat striatum is associated with nuclear factor-kappaB activation [J]. J Neurochem, 2000, 74(2): 647-658.
- [12] You WC, Wang CX, Pan YX, et al. Activation of nuclear factor-kB in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage and its potential role in delayed brain injury [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e60290.
- [13] Chu W, Li M, Li F, et al. Immediate splenectomy downregulates the MAPK-NF-kB signaling pathway in rat brain after severe traumatic brain injury [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2013, 74(6): 1446-1453.
- [14] Zhang W, Petrovita I, Tarabin V, et al. Neuronal activation of NF-kappa B contributes to cell death in cerebral ischemia [J]. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2005, 25(1): 30-40.

(2015-12-11 收稿)

• 投稿要求 •

《卒中与神经疾病》对关键词的要求

论著需标引 3~8 个关键词。关键词尽量从美国 NLM 的 MeSH 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh>)中选取,其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用,建议排在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。有英文摘要的文章,应标注与中文对应的英文关键词。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称;每个英文关键词第一个单词首字母大写,各词汇之间用空格分隔。