

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00144

去铁敏预处理对大鼠星型胶质细胞缺氧性损伤的保护作用

李云霞^{1,2}, 丁素菊^{1*}, 詹青², 肖林³, 郭卫³

1. 第二军医大学长海医院神经内科, 上海 200433
2. 同济大学附属同济医院神经内科, 上海 200065
3. 第二军医大学基础部神经生物研究所, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨去铁敏预处理对星型胶质细胞(AS)缺氧损伤的保护作用及可能机制。**方法** 体外培养 AS, 建立去铁敏糖氧剥夺(OGD)模型, 细胞分为: 正常培养组、去铁敏预处理组(先给予去铁敏预处理, 再给予去铁敏 OGD)、OGD 组(给予去铁敏 OGD)。采用细胞活力测定、细胞核固缩比率、形态学改变评价去铁敏预处理后的保护效应。用免疫荧光染色检测去铁敏预处理后 AS 的缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和促红细胞生成素(EPO)蛋白表达情况, RT-PCR 检测 HIF-1 α 和 EPO 的 mRNA 变化情况。**结果** 去铁敏预处理组细胞形态保持良好, AS 活力下降减轻为 58%(OGD 组 25%, $P < 0.05$), 细胞核固缩百分比为 38%(OGD 组 30%, $P < 0.05$)。免疫荧光染色发现, 体外培养的 AS 在预处理后出现 HIF-1 α 和 EPO 蛋白表达。RT-PCR 发现去铁敏化学缺氧能上调 HIF-1 α 及 EPO mRNA 表达。**结论** 去铁敏预处理有确切有效的抗缺氧损伤作用, 这种效应与保护 AS 有关, 其机制可能是去铁敏诱导了 HIF-1 α 和 EPO 表达增加。

[关键词] 去铁敏; 缺血预处理; 缺氧诱导因子 1 α ; 红细胞生成素

[中图分类号] R 743.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)02-0144-04

Deferoxamine preconditioning protects against hypoxia injury in astrocytes

LI Yun-xia^{1,2}, DING Su-ju^{1*}, ZHAN Qing², XIAO Lin³, GUO Wei³

1. Department of Neurology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China
3. Institute of Neurology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of deferoxamine preconditioning against hypoxia injury in astrocytes and the underlying mechanisms. **Methods** Astrocytes were cultured under ischemia stress, which was mimicked by oxygen and glucose deprivation (OGD) with deferoxamine. Astrocytes were divided into three groups: normally cultured group; Deferoxamine pretreated group; astrocytes were pretreated with Deferoxamine and then treated with Deferoxamine OGD; and OGD group; astrocytes were treated with Deferoxamine OGD. The cell viability examination, the ratio of condensed nuclei, and the morphological changes were used to assess the protective effect of deferoxamine. The expression of HIF-1 α and EPO protein and mRNA in astrocytes was examined by immunofluorescence staining and RT-PCR, respectively. **Results** The morphology of AS in the deferoxamine pretreated group kept intact. AS viability in deferoxamine pretreated group was 58% of the normally cultured group, and that in the OGD group was 25% of the normally cultured group ($P < 0.05$). The ratio of condensed nuclei in deferoxamine pretreated group was 38% and that in OGD group was 30% ($P < 0.05$). Immunofluorescence staining found that expression HIF-1 α , and EPO protein appeared in cultured astrocytes after deferoxamine pretreatment. RT-PCR confirmed that mRNA of HIF-1 α and EPO was up-regulated after deferoxamine pretreatment. **Conclusion** Deferoxamine preconditioning can protect the astrocytes from hypoxia damage, which is related to deferoxamine-induced increase of HIF-1 α and EPO expression.

[Key words] deferoxamine; ischemic preconditioning; hypoxia-inducible factor 1 alpha; erythropoietin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(2):144-147]

星型胶质细胞(astrocytes, AS)是脑内除神经元外的另一大类细胞,并在颅内各种疾病的病理生理变化中起着非常重要的作用。AS在缺血预适应中的作用人们研究不多。我们在体外培养 AS,通过去

[收稿日期] 2009-07-20 **[接受日期]** 2009-09-09

[基金项目] 国家自然科学基金(30170340). Supported by National Natural Science Foundation of China(30170340).

[作者简介] 李云霞, 博士, 主治医师. E-mail: pretty9203@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81878517, E-mail: dingsuju@hotmail.com

铁敏建立化学性糖氧剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)后复氧、复糖的细胞模型以模拟脑“缺血再灌注”,观察去铁敏预处理对AS的化学缺氧损伤的保护作用,同时观察去铁敏预处理后AS的缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α)及促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)蛋白和mRNA表达。

1 材料和方法

1.1 实验动物 清洁级新生1~3 d Sprague-Dawley(SD)大鼠,由第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 去铁敏、Hoechst33342(Sigma公司),CCK-8试剂盒(上海同仁化学研究所),GFAP单克隆抗体、HIF-1 α 多抗及EPO多抗(武汉博士德公司),TRIzol RNA提取液(Invitrogen公司),RT-PCR试剂盒(捷瑞生物公司)。

1.3 AS的培养 将新生大鼠乙醇消毒后断头取脑,放入含解剖液的培养皿中。在解剖镜下,去除血管、脑膜后,用虹膜剪剪碎。加入解剖溶液和胰蛋白酶,摇匀后置于37 $^{\circ}$ C培养箱内消化。移入离心管中,用吸管吹打。离心弃去上清制备细胞悬液;调整细胞密度为 2×10^5 /ml。将细胞接种在培养瓶中。培养瓶移入37 $^{\circ}$ C的5%CO₂培养箱,每3 d换液1次。待细胞铺满瓶底后将培养瓶拧紧瓶盖,封口膜封口,置摇床,37 $^{\circ}$ C以260 r/min的速度摇荡过夜。加入胰蛋白酶37 $^{\circ}$ C温育5 min,将细胞悬液离心,弃去上清,将细胞密度稀释成 1.5×10^6 /ml,种入75 cm²的培养瓶中,每隔3 d换液1次。细胞传4~5代后可将细胞种入培养板中。细胞分组:正常培养组,细胞无任何特殊处理;去铁敏预处理组,先给予去铁敏预处理(加入300 μ mol/L去铁敏的无糖细胞培养液作用12 h后,换正常培养液培养12 h),再给予去铁敏OGD(加入600 μ mol/L去铁敏的无糖细胞培养液作用8 h后,换正常培养液培养12 h);OGD组,直接给予去铁敏OGD。

1.4 CCK-8法测定AS生存率 接种100 μ l细胞悬液(5 000个细胞/孔)于96孔板内。置于培养箱内培养24 h。每组细胞给予不同处理。每个孔内加入10 μ l的CCK-8试剂,在培养箱内培养1~4 h。在450 nm波长处测定光密度(D)值,参比波长为600 nm。细胞生存率按检测D值/对照组D值 $\times 100\%$ 计算。

1.5 Hoechst33342染色检测细胞凋亡的形态学改变 将种植在玻片上的AS用PBS进行冲洗,加4%多聚甲醛室温固定30 min,1 \times PBS洗涤5 min \times 3次,5% Triton X-100室温作用20 min,1 \times PBS洗涤5 min \times 3次,血清封闭液室温作用30 min,玻片滴加

1 μ g/ml的Hoechst 33342室温作用10 min,1 \times PBS充分洗涤后,50%甘油封片,荧光显微镜下观察、拍照。结果评判:细胞核的染色质固缩或细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体。

1.6 免疫荧光法检测AS的HIF-1 α 及EPO表达 种植在玻片上的AS;用无糖300 μ mol/L去铁敏培养液预处理12 h,复氧复糖12 h后行免疫组化,正常培养组为对照。PBS冲洗后,加4%多聚甲醛室温固定30 min。1 \times PBS洗涤5 min \times 3次。0.5% Triton X-100室温作用20 min。1 \times PBS洗涤5 min \times 3次。血清封闭液室温作用30 min。切片分别滴加抗GFAP(1:100)+抗HIF-1 α (1:50)或抗GFAP(1:100)+抗EPO(1:50),置于湿盒中4 $^{\circ}$ C条件下孵育24 h。1 \times PBS洗涤5 min \times 3次。切片分别滴加羊抗兔IgG-FITC+羊抗鼠IgG-CY3。1 \times PBS洗涤5 min \times 3次。以上切片均滴加1 μ g/ml的Hoechst33342室温作用10 min。1 \times PBS充分洗涤后,50%甘油封片。荧光显微镜下观察、拍照、计数。

1.7 半定量RT-PCR分析HIF-1 α 及EPO的表达 无糖300 μ mol/L去铁敏培养液处理AS,在给药后不同时间点(3、6、8、12、24、48、72 h)收集细胞,正常培养为对照。TRIzol提取细胞总RNA。行RNA定性及定量后取2 μ g进行半定量RT-PCR检测目的基因,同时扩增 β -actin作为内参照。引物序列如下所述: β -actin cDNA序列,使用Primer premier 5.0软件设计引物序列。引物序列如下:HIF-1 α 上游引物5'-GTA GTG CTG ACC CTG CAC TCA A-3',下游引物5'-TCC ATC GGA AGG ACT AGG TGT C-3',扩增产物长度520 bp;EPO上游引物5'-TCT ATG CCT GGA AGA GGA TGG AGG TCG-3',下游引物5'-TGC GGA AAG TGT CAG CAG TGA TTG TTC-3',扩增产物长度240 bp; β -actin上游引物5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3',下游引物5'-GGG CCG GAC TCG TCA TAC-3',扩增产物长度249 bp。按照RT-PCR试剂盒说明书以 β -actin为内参照,与HIF-1 α 及EPO同时进行逆转录及PCR扩增。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性5 min,94 $^{\circ}$ C变性1 min,55 $^{\circ}$ C退火1 min,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,共30个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。将实验组和内参照的RT-PCR产物(10 μ l)与DNA Marker DL 2000一起在1.5%琼脂糖凝胶上电泳分离,电泳缓冲液为1 \times TAE,电泳条件为80 V电泳30 min。对电泳结果进行图像分析(FR-980A生物电泳图像分析系统),记录每条谱带的光密度值,以HIF-1 α 及EPO与 β -actin的比值分别作为各样品的HIF-1 α 及EPO表达的相对值。

1.8 统计学处理 所有的实验数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件包进行统计学处理,两样本间比较采用 *t* 检验,多组数据比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AS 化学性 OGD 及复糖、复氧模型的建立 正常 AS 为扁平梭形或星形,有细长突起,胞质丰富,胞核较大,境界清楚,有 1~2 个核仁,位于核中央。化学缺氧 8 h(去铁敏 600 $\mu\text{mol/L}$), AS 的突起回缩,部分细胞圆缩肿胀。随着缺氧时间的延长,AS 突起回缩变细更为明显,细胞间的间隙增大。缺氧(去铁敏 600 $\mu\text{mol/L}$)12 h 后可见部分细胞胞体及突起崩解断裂。随着去铁敏剂量增大、化学缺氧时间延长,细胞活力进行性受到抑制,根据 3 次独立实验结果显示:300 $\mu\text{mol/L}$ 去铁敏 OGD 12 h,复氧 12 h,细胞相对生存率降至 75%左右,将此时间点作为

以后实验的预处理干预点。600 $\mu\text{mol/L}$ 去铁敏 OGD 8 h,复氧 12 h,细胞相对生存率降至 25%左右,将此时间点作为以后实验的缺氧损伤刺激干预点。Hoechst33342 染色发现随着化学缺氧时间的延长,细胞核数量明显减少,部分细胞的细胞核染色质固缩或细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体。

2.2 去铁敏预处理对 AS 缺氧损伤的保护作用 经过 4~5 次传代后 AS 细胞形态较为均匀,胞体较大为多边形,向各个方向伸出短而粗的突起。无预处理组 AS 的胞体回缩,突起变细,细胞间出现明显的空隙。细胞活力降至 25%,核固缩细胞百分比为 30%。预处理组 AS 形态出现类似的变化,与对照组相比略小,但不够明显。细胞活力下降减轻为 58% ($P < 0.05$),核固缩细胞百分比为 25% ($P < 0.05$)。结果(图 1)提示预处理具有明显的保护细胞形态,增强细胞对损伤刺激的耐受,并具有抗细胞核固缩、凋亡的效应。

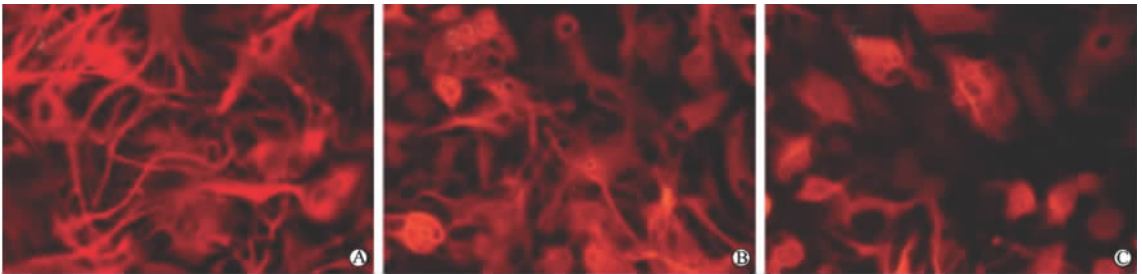


图 1 AS 不同处理后 GFAP 染色

Fig 1 Immunofluorescence staining of GFAP protein in rat primary astrocytes after different treatments

A: Normally cultured group; B: Deferoxamine pretreated group; C: OGD group. Original magnification: $\times 600$

2.3 免疫荧光双标法检测去铁敏处理后 HIF-1 α 及 EPO 的表达 免疫组化结果显示,300 $\mu\text{mol/L}$ (图

2)及 600 $\mu\text{mol/L}$ 去铁敏化学缺氧后 AS 均可以表达 HIF-1 α 及 EPO。

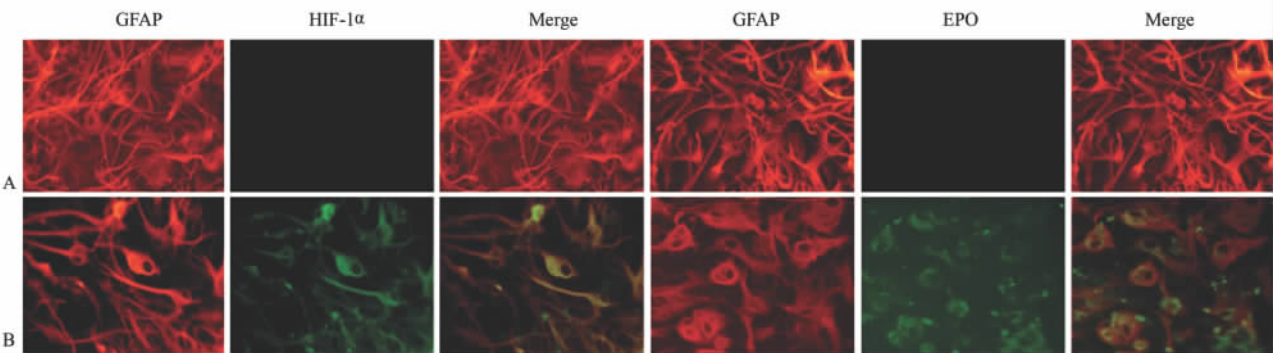


图 2 免疫荧光双标检测 HIF-1 α 、EPO 在体外培养 AS 的表达

Fig 2 Detection of HIF-1 α and EPO protein by immunocytochemistry in AS treated with deferoxamine

A: Normal control; B: Treated with 30 $\mu\text{mol/L}$ deferoxamine OGD. Original magnification: $\times 600$

2.4 300 $\mu\text{mol/L}$ 去铁敏处理后 HIF-1 α 及 EPO mRNA 的表达 RT-PCR 结果显示,300 $\mu\text{mol/L}$ 去铁敏处理后 3 h AS 开始表达 HIF-1 α mRNA,24 h

达高峰,之后 mRNA 表达量迅速下降,72 h 已接近基线水平。300 $\mu\text{mol/L}$ 去铁敏处理后 8 h EPO mRNA 表达量上升,12 h 达高峰,之后 mRNA 表达

量慢慢下降(图3)。

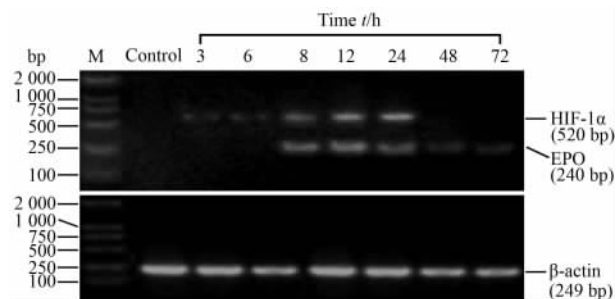


图3 AS去铁敏化学缺氧后HIF-1 α 及EPO mRNA的PCR扩增产物

Fig 3 Expression of HIF-1 α and EPO mRNA detected in AS treated with deferoxamine

M: DL2000 marker

3 讨论

AS在脑缺血后异常活跃,能分泌多种调节因子,在脑缺血急性期起神经保护作用,慢性期则有修复损伤的神经元、促进轴突再生及诱导再生神经元的迁移等作用^[1]。研究表明AS在缺血预适应中发挥着非常重要的作用^[2]。AS也是近年来神经科学领域研究的热点之一。去铁敏是一种排铁络合剂,能阻断氧信号的转导,模拟低氧信号传给细胞,可以造成机体及细胞缺氧。我们研究发现去铁敏预处理后对体内及体外神经元的缺氧性损伤有保护作用^[3],但其对AS是否有作用,使用去铁敏化学缺氧后是否能诱导AS HIF-1 α 和EPO的表达均不明确。本研究证实通过建立AS去铁敏OGD模型,模拟脑缺血再灌注过程,可以对AS进行连续观察和施加各种干预措施。去铁敏预处理后,AS对随后的再次严重缺氧具有一定的抵抗能力,细胞形态保持良好,细胞活力维持在较好水平,细胞核固缩比率增加不明显。结果提示去铁敏预处理具有良好的抵抗AS化学缺氧损伤的作用。

有学者认为缺氧诱导因子在缺氧的保护和抗损伤机制中可能具有重要的地位,有关缺氧诱导因子及其调控基因/产物功能及作用的研究已经成为当前的热点和前沿^[4]。很多研究发现HIF-1 α 在缺氧条件下能激活多种低氧反应基因的表达发挥神经保护作用^[5]。EPO是HIF-1的重要靶基因之一,HIF-1 α 可以调节EPO的表达^[5]。EPO的神经营养及保护作用,已经被众多的研究证明。Freeman等^[6]

认为可以把HIF-1 α 作为中枢神经系统缺血性疾病干预的靶点。可以通过诱导刺激体内HIF-1 α 的表达,增加EPO的表达从而发挥脑保护作用。我们通过免疫荧光双标结果发现,在体外培养的AS,去铁敏预处理后可以诱导出AS的HIF-1 α 及EPO蛋白表达,其表达时间与预处理后AS受保护作用的时间是吻合的,提示HIF-1 α 及EPO蛋白表达与AS受到去铁敏预处理保护作用有关。RT-PCR的结果发现去铁敏化学缺氧后AS的HIF-1 α mRNA表达早于EPO,但消失也早于EPO,提示HIF-1 α 可能对EPO的表达有调控的作用。

但是,AS去铁敏预适应后HIF-1 α 、EPO蛋白及mRNA上调表达,其相互作用的强度、时限目前还不明确。我们研究还发现大鼠还有其他脑内细胞表达HIF-1 α 及EPO^[7],提示在体内存在有多种细胞的复杂作用方式,可能还有神经元、血管内皮细胞等的共同作用,有待更进一步的研究。相信随着对HIF-1研究的进一步深入,HIF-1及其靶基因的调控将成为脑缺血保护的一个新方向。

[参考文献]

- [1] Kato H, Kogure K, Araki T, Itoyama Y. Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance[J]. Brain Res, 1994, 664: 69-76.
- [2] Trendelenburg G, Dirnagl U. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning[J]. Glia, 2005, 50: 307-320.
- [3] 李云霞, 丁素菊, 詹青, 肖林, 郭卫. 去铁敏预处理对神经元缺氧性损伤的保护作用[J]. 中华神经科杂志, 2009, 42: 119-124.
- [4] Liu J, Narasimhan P, Yu F, Chan P H. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin[J]. Stroke, 2005, 36: 1264-1269.
- [5] Zhang L, Qu Y, Yang C, Tang J, Zhang X, Mao M, et al. Signaling pathway involved in hypoxia-inducible factor-1 α regulation in hypoxic-ischemic cortical neurons *in vitro*[J]. Neurosci Lett, 2009, 461: 1-6.
- [6] Freeman R S, Barone M C. Targeting hypoxia-inducible factor (HIF) as a therapeutic strategy for CNS disorders[J]. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2005, 4: 85-92.
- [7] Li Y X, Ding S J, Xiao L, Guo W, Zhan Q. Deferoxamine preconditioning protects against cerebral ischemia in rats by inducing expressions of hypoxia inducible factor 1 α and erythropoietin[J]. Neurosci Bull, 2008, 24: 89-95.

[本文编辑] 尹茶