

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00949

甘氨酸对氧糖剥夺诱导大鼠神经元损伤的抗凋亡作用

林莉莉¹, 赵 蕾^{2*}, 姚 雯¹, 邹浩军¹

1. 无锡卫生高等职业技术学校药理学教研室, 无锡 214028

2. 第二军医大学研究生院, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨甘氨酸对氧糖剥夺诱导神经元损伤的作用及机制。**方法** 采用体外培养的大鼠原代神经元建立氧糖剥夺模型, 随机分为正常对照组、氧糖剥夺组和甘氨酸处理组, 应用 MTT、流式细胞术等方法检测甘氨酸对神经元活性、生存率、细胞凋亡的影响; 应用蛋白质印迹测定甘氨酸对凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-x_L、Bad、Bax 的影响。**结果** 甘氨酸能够提高大鼠原代神经元活力和存活率, 减少细胞凋亡, 并且能够增加抗凋亡因子 Bcl-2, 降低促凋亡因子 Bax 的表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 甘氨酸对氧糖剥夺神经元有明显的保护作用, 该作用可能与促进抗凋亡因子、抑制促凋亡因子释放有关。

[关键词] 甘氨酸; 神经元; 氧糖剥夺; 细胞凋亡

[中图分类号] R 743.3

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)09-0949-05

Anti-apoptotic effects of glycine against neuron injury induced by oxygen glucose deprivation

LIN Li-li¹, ZHAO Lei^{2*}, YAO Wen¹, ZOU Hao-jun¹

1. Department of Pharmacology, Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028, Jiangsu, China

2. Postgraduate College, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of glycine on neuron injury induced by oxygen glucose deprivation (OGD) and the underlying mechanisms. **Methods** *In vitro* OGD model was established with cultured rat primary neurons. The study was randomly divided into normal control group, OGD group and glycine treatment group. The influences of glycine on cell activity and survival rate were detected by MTT, and cell apoptosis was detected by flow cytometry. Western blotting analysis was used to examine the effect of glycine on expression of apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-x_L, Bad, and Bax. **Results** Glycine could improve the activity and survival of primary neurons of rats and decrease neuron apoptosis. Glycine also significantly increased anti-apoptotic proteins Bcl-2 expression and significantly decreased pro-apoptotic proteins Bax expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Glycine can notably alleviate neuron injury induced by OGD, which is probably through up-regulation of anti-apoptotic factors and down-regulation of pro-apoptotic factors.

[Key words] glycine; neurons; oxygen glucose deprivation; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(9):949-953]

脑卒中是目前人类的第一大死亡原因, 以缺血性脑卒中多见, 具有发病率高、死亡率高、致残率高等特点, 且发病率仍呈上升趋势^[1-3]。随着我国人口的老龄化, 脑卒中的问题将日益严重, 社会经济将不堪重负。脑缺血后导致能量代谢障碍、细胞内钙超载、中枢神经递质紊乱等变化, 神经元发生复杂的病理生理过程而凋亡^[4-6]。神经递质紊乱是引起脑卒

中的重要因素, 而脑卒中后又进一步引起神经递质紊乱^[7], 引起恶性循环。

甘氨酸(glycine, Gly)是脑内重要的神经递质, 在缺血再灌注、器官移植、内毒素损伤等病理状况下具有抗炎、抗凋亡、免疫调节等作用^[8]。但甘氨酸对原代神经元细胞的影响鲜有报道。因此, 本研究利用原代神经元低糖低氧模型, 探讨甘氨酸对神经细

[收稿日期] 2013-04-08

[接受日期] 2013-08-20

[基金项目] 江苏省教育厅高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师基金, 无锡市医院管理中心医学重点人才“导师制”基金。Supported by “Qing Lan” Project for Excellent Teachers of Education Department of Jiangsu Province and Wuxi Hospital Management Center “Medical Talents” Special Fund.

[作者简介] 林莉莉, 硕士, 副教授。E-mail: lyly567@sina.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870842, E-mail: zl_8009@163.com

胞凋亡的影响及可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 甘氨酸、土的宁、MTT、阿糖胞苷、多聚赖氨酸购自 Sigma 公司; Bcl-2、Bcl-x_L、Bad、Bax 抗体购自美国 Cell Signaling 公司。NeuN 抗体、生物素标记二抗 IgG 等购自美国 Rockland 公司。Neurobasal、B27、DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司。

1.2 原代皮质神经元的培养及鉴定 SD 孕鼠购自上海斯莱克动物实验中心,清洁级,动物合格证号: SCXK(沪)2007-0005。取怀孕 15~16 d 孕鼠,颈椎脱臼处死,75%乙醇消毒腹部,打开腹腔,取出胎鼠,解剖显微镜下分离并剪碎脑组织,0.25%胰蛋白酶 37℃水浴消化 10 min, FBS 终止消化反应。离心后彻底洗净胰酶,加入接种培养基,200 目不锈钢滤器过滤,以 $2.5 \times 10^6/cm^3$ 密度种板。24 h 更换 Neurobasal 生长培养基,第 5 天全量换液,于第 7 天半量换液后用于实验。用 NSE 抗体进行免疫细胞化学染色,计数阳性神经元达 95%以上,符合实验要求。

1.3 氧糖剥夺(OGD)模型的建立 将培养 7 d 的神经元随机分为 3 组:正常对照组培养基不变,在正常条件下培养; OGD 模型组直接进行 OGD 处理 6 h; 实验组采用不同浓度(10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} mol/L)甘氨酸预处理后行 OGD 处理 6 h。OGD 模型的建立:将培养液换为无糖 DMEM 培养基,厌氧培养条件为体积分数为 94% N₂、体积分数为 5% CO₂,置 37℃恒温缺氧箱中。

1.4 MTT 法检测细胞增殖 取细胞密度为 $2 \times 10^5/mL$ 对数生长期细胞,每孔 100 μL 接种至 96 孔培养板中,每组 6 复孔,24 h 后实验组进行 OGD 处理,并加入终浓度为 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} mol/L 的甘氨酸,模型组加入等体积溶媒,同时设立阴性对照。进行 MTT 细胞活力检测,加入 MTT 溶液 20 μL (5 mg/mL),置 CO₂ 培养箱孵育 4 h 后,吸去上清,每孔加入 DMSO 150 μL,室温避光震荡 10 min,使紫蓝色结晶充分溶解,在酶标仪上检测各孔光密度 (D_{570}) 值,重复 3 次。按以下公式计算细胞存活率:细胞存活率(%) = 实验组 D 值/对照组 D 值 $\times 100\%$ 。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 胰酶消化,吹打,细胞悬浮后胎牛血清终止消化,PBS 洗涤 2 次。

并收集细胞,取 $10^6/mm^3$ 重悬细胞,按 Annexin V/PI 染色试剂盒说明书操作后,流式细胞仪检测、分析凋亡细胞百分率,实验重复 3 次。

1.6 蛋白质印迹分析 蛋白提取物经定量后,各组取等量蛋白加入上样缓冲液并变性,行 SDS-PAGE 垂直电泳、转膜、牛奶封闭,分别加一抗 Bcl-2、Bcl-x_L、Bad、Bax 抗体(内参照为 Actin 和 GAPDH 抗体),4℃孵育过夜,二抗孵育,奥德赛红外扫描仪扫描定量。

1.7 实验分组及统计学处理 MTT 和流式细胞检测分为正常对照组、OGD 组、OGD+甘氨酸组(加入终浓度为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} mol/L 甘氨酸预处理后再行 OGD 处理 6 h); 甘氨酸受体阻断剂对 OGD 神经元凋亡的影响实验分组为:正常对照组、OGD 组、OGD+甘氨酸组、OGD+土的宁组、OGD+甘氨酸(10^{-5} mol/L)+土的宁组; 蛋白质印迹测定分为正常组、模型组及甘氨酸(10^{-5} mol/L)组。数据处理采用 SPSS 16.0 软件包进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间多样本均数比较用单因素方差分析,两两均数比较用 SNK- q 检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 甘氨酸促进 OGD 神经元的增殖 结果(表 1)表明:与正常对照组相比,OGD 使原代神经元增殖能力下降($P < 0.05$),细胞存活率下降;同一作用时间下,不同浓度甘氨酸干预组与 OGD 组比较, 10^{-5} mol/L 的甘氨酸促进原代神经元增殖,存活率提高($P < 0.05$);但 10^{-4} mol/L 的甘氨酸对原代神经元的增殖力无明显影响,可能与药物浓度增加对神经元带来毒性损伤有关。

表 1 甘氨酸对 OGD 神经元生存率的影响

Tab 1 Effect of glycine on survival rate of OGD neurons

<i>n</i> = 6, $\bar{x} \pm s$		
Group	D_{570}	Survival rate (%)
Control	0.671 ± 0.017	100.00
OGD	0.225 ± 0.032*	33.57
OGD+Gly 10^{-6} mol/L	0.212 ± 0.022	31.63
OGD+Gly 10^{-5} mol/L	0.269 ± 0.023 Δ	40.02
OGD+Gly 10^{-4} mol/L	0.213 ± 0.029	31.80

Gly: Glycine; OGD: Oxygen glucose deprivation. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs OGD group

2.2 甘氨酸抑制 OGD 神经元凋亡 结果(图 1)表明:正常对照组神经元凋亡细胞极少,为(12.03 ± 1.56)%; OGD 组凋亡细胞增多,为(42.52 ± 3.63)%,与正常对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与 OGD 组相比,10⁻⁵ mol/L 甘氨酸使 OGD 神经元的凋亡率降低约 50%,为(21.47 ± 3.73)%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

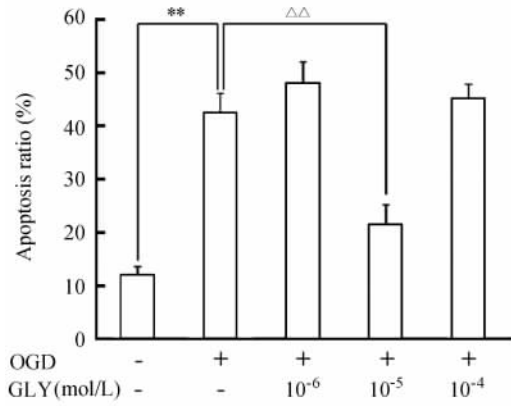


图 1 甘氨酸对 OGD 神经元凋亡的影响

Fig 1 Effect of glycine on apoptosis in OGD neurons

GLY: Glycine; OGD: Oxygen glucose deprivation. ** $P < 0.01$ vs control group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs OGD group; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.3 甘氨酸受体阻断剂阻断了甘氨酸的抗凋亡作用 结果(图 2)表明:与 OGD 组相比,甘氨酸受体阻断剂士的宁在 10⁻⁶ mol/L 并不影响 OGD 神经元的凋亡率[(39.47 ± 5.82)% vs (42.52 ± 3.63)%],但是它阻断了 10⁻⁵ mol/L 甘氨酸对 OGD 神经元的保护作用[(40.74 ± 2.21)% vs (21.75 ± 0.49)%], $P < 0.01$ 。

2.4 甘氨酸对凋亡相关蛋白 Bcl-x_L、Bcl-2、Bad、Bax 表达的影响 蛋白质印迹法检测结果(图 3)显示:与正常对照组相比,Bcl-x_L 和 Bcl-2 蛋白在 OGD 神经元表达减少,而在 10⁻⁵ mol/L 甘氨酸作用下,两者表达上调,其中 Bcl-2 的改变具有统计学意义($P < 0.05$); Bad 和 Bax 蛋白在 OGD 神经元表达增多,而在 10⁻⁵ mol/L 甘氨酸作用下,两者表达下降,其中甘氨酸对 OGD 损伤神经元后 Bax 的降低作用具有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

缺血性脑卒中也称脑梗死,是指突然发生的脑组织局部供血减少或血流完全中断,停止供血、供

氧、供糖等,使局部脑组织崩解破坏。缺血性脑卒中导致神经递质紊乱,而神经递质紊乱又导致神经功能障碍,还可使脑血管痉挛,局部脑血流量进一步下降,加重脑局部病变^[7]。可见,脑缺血与神经递质关系错综复杂,这种相互作用对缺血性脑卒中的深入研究是一个挑战,同时也为治疗提供了机遇。神经元氧糖剥夺模型是研究缺血性脑卒中较好的细胞模型,本研究在该模型上进行探讨。

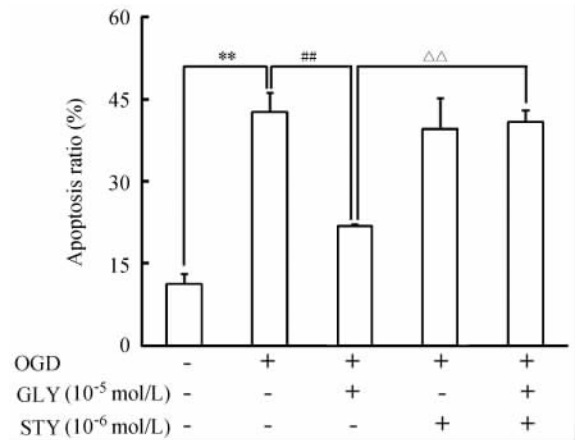


图 2 士的宁对各组神经元凋亡的影响

Fig 2 Effects of strychnine on apoptosis in OGD neurons in each group

OGD: Oxygen glucose deprivation; GLY: Glycine; STY: Strychnine. ** $P < 0.01$ vs control group, ## $P < 0.01$ vs OGD group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs GLY group; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

甘氨酸是人体内非必需氨基酸,它除了参与蛋白质代谢外,还是中枢神经系统重要的神经递质。不少文献报道甘氨酸在缺血性脑卒中的作用,然而,其结果存在很大争议。一些研究认为甘氨酸使脑缺血的损伤加重^[9-10],而另外的研究认为甘氨酸有神经保护作用^[11-12]。这些结果的差异可能与甘氨酸的剂量密切相关^[13]。本研究也表明不同剂量甘氨酸对缺血性脑卒中的作用不同,在 10⁻⁵ mol/L 时,甘氨酸可以减少神经元的凋亡,而在 10⁻⁴ mol/L 和 10⁻⁶ mol/L,甘氨酸则并不能减少神经元的凋亡。其原因可能是,甘氨酸的浓度太低时,并不能激活足够的甘氨酸受体,而当甘氨酸浓度过高时,甘氨酸可以结合 NMDA 受体,反而不利于减少神经元的凋亡。本研究发现甘氨酸受体阻断剂士的宁能阻断 10⁻⁵ mol/L 甘氨酸抗神经细胞凋亡的作用,说明适当浓度甘氨酸对神经细胞的保护作用是通过与甘氨酸受体结合而起效的,这与已有的报道结果^[13]是一致的。

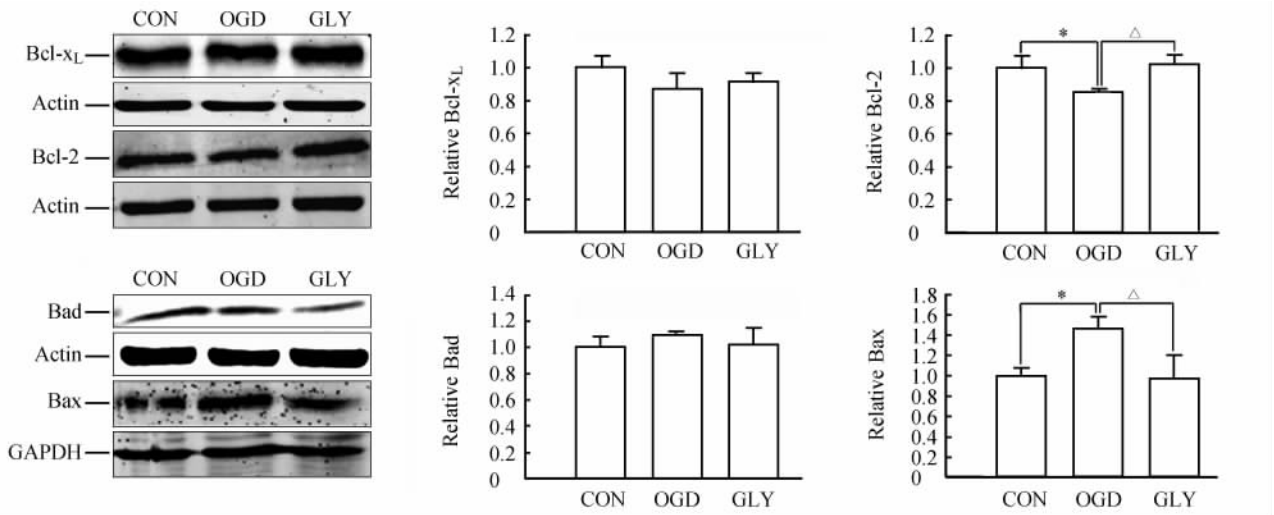


图3 甘氨酸对凋亡相关蛋白 Bcl-x_L、Bcl-2、Bad 和 Bax 的影响

Fig 3 Effect of glycine on expression of apoptotic protein Bcl-2, Bcl-x_L, Bad, and Bax

CON: Control group; OGD: Oxygen glucose deprivation group; GLY: Glycine (10⁻⁵ mol/L) group. * *P* < 0.05 vs control group, ^Δ *P* < 0.05 vs OGD group; *n* = 6, $\bar{x} \pm s$

缺血缺氧时产生大量氧自由基、钙超载、细胞色素 C 释放^[4-6],引起神经细胞凋亡。本研究表明,甘氨酸能够促进 OGD 神经元的活力,明显减轻缺血所致神经细胞凋亡。这可能与其抗自由基作用有关^[14]。实验结果同时表明甘氨酸可提高神经细胞存活率和抗凋亡作用,但提高存活率作用不太明显,而抗凋亡作用比较明显。细胞的死亡方式有多种,除了坏死之外,主要是凋亡。本研究主要检测了神经元的凋亡,但是并没有检测甘氨酸对神经元坏死的作用。

Bcl 家族是一个极其重要的凋亡调节系统。研究发现,Bcl-2、Bcl-x_L 表达上调和 Bax、Bad 表达下调能明显减少细胞凋亡^[15]。本研究用蛋白质印迹法检测发现 OGD 神经元 Bcl-2、Bcl-x_L 表达减少,Bax、Bad 表达增高,与文献报道结果^[16]一致。甘氨酸干预可上调 Bcl-2、Bcl-x_L,下调 Bax、Bad,减少神经元凋亡。

综上所述,甘氨酸能增强大鼠原代神经元细胞活力,减轻凋亡,其作用可能是与甘氨酸受体结合,上调抗凋亡 Bcl-2、Bcl-x_L 蛋白和下调促凋亡 Bad、Bax 蛋白表达有关。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Feigin V L, Lawes C M, Bennett D A, Barker-Collo S L, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies; a systematic review[J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8: 355-369.
- [2] World Health Organization. World Health Statistics 2008[EB/OL]. World Health Organization, Geneva, 2008.
- [3] Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world[J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6: 182-187.
- [4] Hurtado O, De Cristóbal J, Sánchez V. Inhibition of glutamate release by delaying ATP fall accounts for neuroprotective effects of antioxidants in experimental stroke[J]. *FASEB J*, 2003, 17: 2082-2084.
- [5] Tuttolomondo A, Di Sciacca R, Di Raimondo D. Neuron protection as a therapeutic target in acute ischemic stroke[J]. *Curr Top Med Chem*, 2009, 14: 1317-1334.
- [6] Mdzinarishvili A, Sumbria R, Lang D, Klein J. Ginkgo extract Egb761 confers neuroprotection by reduction of glutamate release in ischemic brain[J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2012, 15: 94-102.
- [7] Yang M, Wang S, Hao F. NMR analysis of the rat neurochemical changes induced by middle cerebral artery occlusion[J]. *Talanta*, 2012, 88: 136-144.
- [8] Zhong Z, Wheeler M D, Li X, Froh M, Schemmer P, Yin

- M, et al. L-Glycine; a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003, 2: 229-240.
- [9] Katsuki H, Watanabe Y, Fujimoto S, Kume T, Akaike A. Contribution of endogenous glycine and d-serine to excitotoxic and ischemic cell death in rat cerebrocortical slice cultures [J]. *Life Sci*, 2007, 81: 740-749.
- [10] Oda M, Kure S, Sugawara T, Yamaguchi S, Kojima K, Shinka T, et al. Direct correlation between ischemic injury and extracellular glycine concentration in mice with genetically altered activities of the glycine cleavage multienzyme system [J]. *Stroke*, 2007, 38: 2157-2164.
- [11] Zhao P, Qian H, Xia Y. GABA and glycine are protective to mature but toxic to immature rat cortical neurons under hypoxia [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 22: 289-300.
- [12] Tanabe M, Nitta A, Ono H. Neuroprotection via strychnine-sensitive glycine receptors during post-ischemic recovery of excitatory synaptic transmission in the hippocampus [J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 113: 378-386.
- [13] Yao W, Ji F, Chen Z, Zhang N, Ren S Q, Zhang X Y, et al. Glycine exerts dual roles in ischemic injury through distinct mechanisms [J]. *Stroke*, 2012, 43: 2212-2220.
- [14] 周 琼, 陆大祥, 付咏梅. 甘氨酸对小鼠心肌缺血性损伤的防治作用研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18: 360-362.
- [15] Xie Z, Koyama T, Suzuki J, Fujii Y, Togashi H, Sawa H, et al. Coronary reperfusion following ischemia different expression of Bcl-2 and Bax proteins, and cardiomyocyte apoptosis [J]. *Jpn Heart J*, 2001, 42: 759-770.
- [16] Wang S, Chong Z Z, Shang Y C, Maiese K. Wnt1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1) blocks neurodegeneration through phosphoinositide 3 kinase/Akt1 and apoptotic mitochondrial signaling involving Bad, Bax, Bim, and Bcl-x_L [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2012, 9: 20-31.

[本文编辑] 贾泽军

· 书 讯 ·

《系统解剖学学习纲要(第2版)》已出版

《系统解剖学学习纲要(第2版)》由秦毅、何仲义、武建军主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0608-1,定价29.80元。

该书根据系统解剖学中的难点和重点,进行比较、选择、归纳、概括,将繁杂的解剖学内容与名词提炼成规律性强、重点和特点突出、趣味性大、易学易记的条目。旨在通过本书的学习培养学生对本学科的兴趣,充分调动学生学习的主动性和创造性,提高发现问题、分析问题和解决问题的能力。本书包括3部分内容,分别是学习方法、各章内容和附录。每章包括目的要求、实习内容和复习思考题。实习内容为大量便于记忆的纲要、图、表和歌诀。附录包括习题、试卷、英汉名词对照的解剖学名词和实习作业。

该书既可用作医药院校教学用书,又可作为医药卫生工作者的参考书,对学生预习、复习和考试以及执业医师资格考试、研究生入学考试均有帮助。

该书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通信地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.cn>