

自噬参与氧糖剥夺对 N2a 细胞的损伤

谌雯琦, 谢明*

(南华大学附属第一医院神经内科, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 自噬在脑缺血中的作用目前没有统一定论。本文主要是通过建立氧糖剥夺(OGD)模型来模拟脑缺血的过程从而探讨自噬在脑缺血中的作用。在小鼠神经母细胞瘤细胞(N2a)经过 OGD 处理后,检测处理前后自噬相关蛋白、细胞活力以及乳酸脱氢酶释放率的改变。结果发现在 OGD 处理后,N2a 细胞中微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、Beclin 1 及溶酶体相关膜蛋白 2(LAMP2) 蛋白表达量均增高,而细胞活力明显下降;与 OGD 组相比,使用 3-甲基腺嘌呤(3-MA)抑制自噬后,N2a 细胞乳酸脱氢酶释放率下降。本研究表明在脑缺血过程中自噬被激活,但自噬的激活可能对神经细胞是起损伤性作用的。

关键词: 自噬; 脑缺血; 氧糖剥夺

中图分类号:R363 文献标识码:A

Autophagy is involved in the damage of N2a cells by oxygen-glucose deprivation

CHEN Wenqi, XIE Ming

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

Abstract: There is no consensus on the role of autophagy in cerebral ischemia. This article was prompted to explore the effect of autophagy in the process of cerebral ischemia by using the oxygen-glucose deprivation model(OGD) on mouse neuroblastoma cells (N2a) to simulate the cerebral ischemia. Autophagy related proteins expressions, cell viability and cytotoxicity were determined after OGD treatment. Compared with the no-treatment control group, microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3), Beclin 1 and lysosome-associated membrane protein-2(LAMP2) expression were upregulated in OGD group. Cell viability was significantly decreased in OGD group. 3-methyladenine (3-MA) reduced the lactate dehydrogenase release, compared with OGD group. Taken together, the present results indicate that autophagy is activated during cerebral ischemia, and the activation of autophagy may have a damaging effect on the nerve cells.

Key words: autophagy; cerebral ischemia; oxygen-glucose deprivation

卒中是世界上常见死亡原因之一,并且是导致成人神经功能损伤的重要原因。有近 20% 卒中是出血性卒中,而有 80% 的卒中是缺血性脑卒中^[1]。研究表明卒中与痴呆^[2]、老年人癫痫^[3]以及老年人抑郁^[4]的发生密切相关。

自噬广泛存在于真核细胞中,它是一种由一系列基因调节的细胞成分自我消化的过程。自噬的功能是将细胞内可溶性大分子物质及衰老细胞器

等转运至溶酶体进行降解,实现其降解产物的再循环利用,从而参与细胞内稳态的维持^[5]。

已有研究表明,自噬参与脑缺血过程中。石瑶等^[6]研究发现白藜芦醇通过 Sirtuins1 通路促进自噬减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤,从而表明自噬在脑缺血中的激活是起保护性作用的。然而,耿武军等^[7]研究表明下调自噬能改善大鼠脑缺血再灌注损伤,提示自噬在脑缺血中可能起到损伤性作用。因此,目前自噬在脑缺血过程中的作用一直存在争议。

N2a 细胞是由 R.J.Klebe 和 F.H.Ruddle 经 A 株白鼠的自生肿瘤建立,细胞贴壁良好,多数成神经元样,具有轴突样结构,被广泛用于神经病理分子

收稿日期:2018-06-05;修回日期:2018-08-22

基金项目:湖南省科技计划项目经费资助项目(即湖南省自然科学基金项目)(No.2018JJ3473)。

* 通信作者,E-mail:1306330605@qq.com.

机制研究。且近年来 N2a 细胞的 OGD 模型被广泛使用作为细胞水平模拟脑缺血的临床过程^[8-9]。本研究利用 N2a 细胞体外脑缺血模型来探讨自噬在脑缺血过程中的作用,从而为后续研究自噬对脑缺血发生发展的影响以及相关机制提供基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 N2a 细胞由上海交通大学医学院附属仁济医院干细胞中心实验室馈赠。高糖 DMEM、无糖 DMEM、胎牛血清购于美国 Gibco 公司;RIPA Buffer、BCA protein Assay Kit 及 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate 为美国 Thermo Fisher 公司产品;兔多抗 Beclin 1 抗体为美国 Santa Cruz 公司产品;兔多抗 LC3B 抗体、兔抗 LAMP2、鼠单抗 β -actin、HRP 标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 以及 3-MA 购于美国 Sigma 公司;CCK8 试剂盒/Cell Counting Kit-8 为日本 Dojindo 公司产品;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒购于中国南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器 二氧化碳细胞培养箱购于美国 Thermo scientific 公司;多气体细胞培养箱为日本 SANYO 公司产品;多功能酶标仪为美国 Bio Tek 公司产品;ChemiDoc XRS 化学发光成像系统购于美国 BIO-RAD 公司;倒置荧光显微镜购于日本 Nikon 公司;StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪为美国 Applied Biosystems 公司产品。

1.3 方 法

1.3.1 N2a 细胞培养 N2a 细胞用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基,置于 37 °C、5%CO₂、95%空气的恒温培养箱中培养,每隔 48~72 h 传代一次。

1.3.2 OGD 模型的建立 N2a 细胞 OGD 模型建立参照文献^[10-11]并加以改进。选用生长良好的 N2a 细胞,置换成无糖无血清培养基后,置于 37 °C 多气体细胞培养箱(1%O₂、5%CO₂ 和 94%N₂)中分别培养 1 h、4 h、8 h 以及 12 h,然后选择最佳处理时间。

1.3.3 细胞生长曲线的测定 细胞增殖采用 CCK8 法来进行测定。将 N2a 细胞以 5×10^3 个/孔的密度种植在 96 孔板中,将细胞分为 Control、OGD 8h 及 OGD 12h 组,每组设置 3 个重复孔,经过 OGD 处理后,弃原培养基,然后每孔加入 90 μ L 新鲜高糖 DMEM 培养基及 10 μ L CCK8,37 °C 孵育 1 h 后在酶联检测仪上测定波长 450 nm 处的吸光度值。

1.3.4 细胞免疫荧光检测 取生长良好的 N2a 细胞种植于 6 cm 细胞培养皿中,待细胞生长融合到

70%~80%左右,将 N2a 细胞分为 Control、OGD 8 h 及 OGD 12 h 组,经过 OGD 处理后,用 PBS 清洗 3 次,4%多聚甲醛注射液固定 10 min 后 PBS 再次清洗 3 次。然后利用 0.5% Triton-X 100 对细胞进行透化处理 5 分钟且用 PBS 清洗后,置入含 5% BSA 液体中室温封闭 30 min,加入 1 : 200 稀释的 LC3 抗体 4 °C 孵育过夜。接下来 PBS 清洗 3 次,再加入 1 : 200 稀释的荧光二抗室温避光孵育 30 min, PBS 再次清洗 3 次。最后加入 DAPI 染色 10 min, PBS 清洗且封片后,置于倒置荧光显微镜下观察。

1.3.5 免疫印迹 将 N2a 细胞种植于 6 孔板中,待细胞生长融合到 70%~80%左右,将细胞分为 Control、OGD 8h 及 OGD 12h 组,各组经过相应处理后,使用裂解液裂解各组细胞,提取总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度后,每组各取 20 μ g 蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白转移至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶室温封闭处理 1h,然后加入 1 : 200 稀释的 Beclin 1、LAMP2, 1 : 500 稀释的 LC3 和 1 : 1 000 稀释的 β -actin 抗体 4 °C 反应过夜, TBST 洗膜 3 次,再加入 1 : 5 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 及羊抗鼠 IgG 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,显影。将显影所得的 Beclin 1、LAMP2、LC3 和 β -actin 条带通过 ImageJ 软件进行灰度值分析后,计算 Beclin 1、LAMP2、LC3 相对蛋白表达量。本组实验重复 3 次。

1.3.6 LDH 释放率的测定 本实验分为 Control 组和 3-MA 组, OGD 组和 OGD+3-MA 组,将 N2a 细胞分别种植于 2 块 6 孔板中,将 Control 组及加入含 5 mmol/L 3-MA 细胞培养基的 3-MA 组置于正常培养箱中培养,将分别加入无糖培养基及含 5 mmol/L 3-MA 无糖培养基的 OGD 组及 OGD+3-MA 组置于二氧化碳细胞培养箱中培养 8 h,然后收集上清及细胞裂解液,按南京建成检测试剂盒说明书加入如下试剂及样品:丙酮酸、标准品或样品、双蒸水、基质缓冲液、辅酶 I,混匀,37 °C 温育 15 min,加入 2,4 二硝基苯肼,混匀,37 °C 温育 15 min,再加入 0.4 mmol/L 碳酸氢钠溶液,混匀,室温放置 5 min,波长 450 nm,酶标仪测定吸光度。按照所给计算公式分别计算出各组上清及细胞裂解液中 LDH 浓度。LDH 释放率=上清 LDH 浓度/(上清+细胞裂解液 LDH 浓度),再分别以 Control 组和 OGD 组 LDH 释放率为 100%来计算 3-MA 组及 OGD+3-MA 组的相对 LDH 释放率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计学分析。实验数据采用均数 \pm 标准差表示,组间比较采用方差分析及 *t* 检验, *P* < 0.05 为差

异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫荧光检测 LC3 在 OGD 处理后 N2a 细胞中

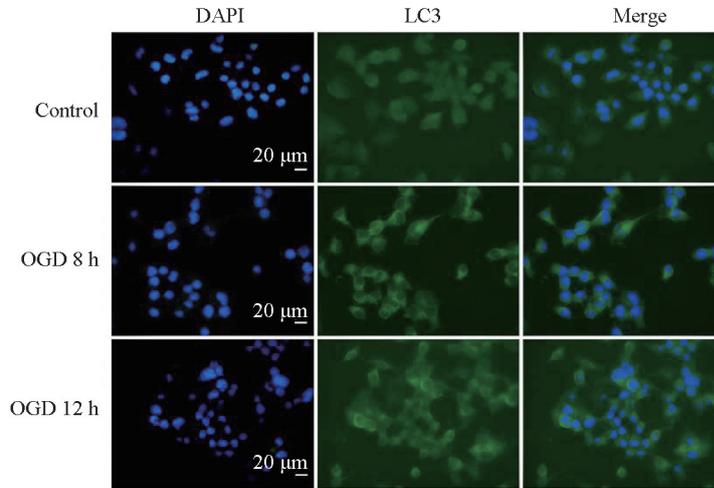


图 1 免疫荧光检测 LC3 在 OGD 处理后 N2a 细胞中的表达(400×)

2.2 免疫印迹法检测自噬相关蛋白在 OGD 处理后 N2a 细胞中的表达 免疫印迹分析结果显示,与对照组比较,OGD 8h 组及 OGD 12h 组,LC3II/I 蛋白表达量明显增加($P<0.05$),Beclin 1 与 LAMP2 蛋白表达量有增加趋势,但差异无显著性($P>0.05$),(图 2,3)。

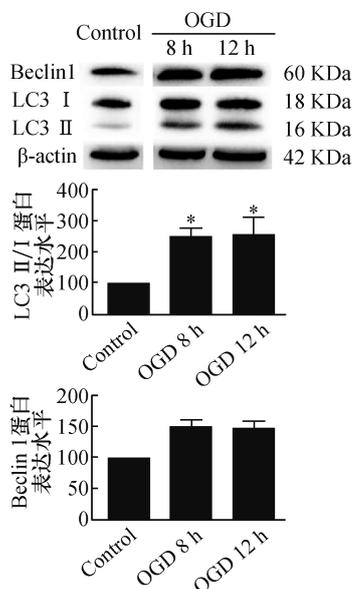


图 2 免疫印迹检测 LC3 及 Beclin 1 在 OGD 处理后 N2a 细胞中的表达

的表达 免疫荧光检查结果发现 OGD 处理 N2a 细胞 8 h 及 12 h 后,LC3 表达较对照组增高,且以 OGD 8 h 组 LC3 表达增高最显著(图 1)。

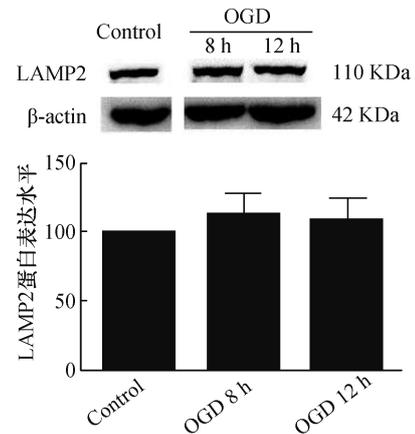


图 3 免疫印迹检测 LAMP2 在 OGD 处理后 N2a 细胞中的表达

2.3 CCK8 法检测 OGD 处理后 N2a 细胞活力 将 CCK8 法检测结果进行统计分析,结果显示 OGD 处理后,N2a 细胞活力较对照组明显下降,且随着 OGD 处理时间的延长,N2a 细胞活力下降更加明显($P<0.05$)(图 4)。

2.4 OGD 处理对 N2a 细胞 LDH 释放率的影响 综合上述实验结果,发现 N2a 细胞经过 OGD 8 h 处理后,自噬相关蛋白增加更为明显,因此采用经过 OGD 处理 8 h 的 N2a 细胞来检测使用自噬抑制剂 3-MA 后 N2a 细胞 LDH 释放率的变化。在未经 OGD 处理的 N2a 细胞中,3-MA 组的 N2a 细胞 LDH 释放率相对对

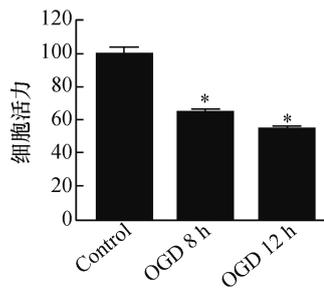


图4 CCK8法检测 OGD 处理后 N2a 细胞活力

照组无明显变化(图 5A);而在经过 OGD 处理的 N2a 细胞中,OGD+3-MA 组 N2a 细胞的 LDH 释放率相比 OGD 组降低($P>0.05$)(图 5B)。

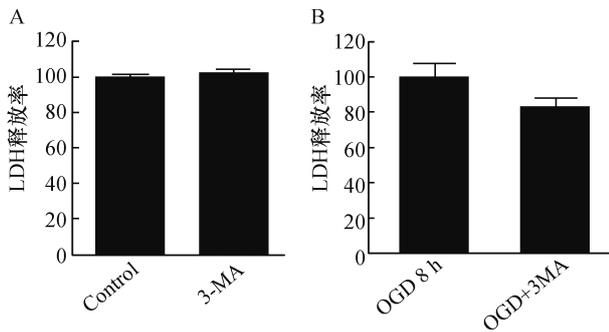


图5 OGD 处理对 N2a 细胞 LDH 释放率的影响

3 讨 论

自噬是指在自噬相关基因 (autophagy-related gene, Atg) 的调控下,细胞吞噬自身受损的细胞器和蛋白质,从而维持细胞内环境稳定的一种溶酶体依赖的降解途径^[12]。目前的研究发现,自噬参与胰腺癌^[13]、神经退行性疾病^[14-15]、心肌缺血再灌注损伤^[16]、慢性阻塞性肺疾病^[17]的发生与发展过程中。脑缺血性疾病是危害人类身体健康的重要疾病之一^[18]。近年来,越来越多的研究发现在脑缺血过程中也有自噬参与。但对于自噬在脑缺血中是否激活以及自噬的作用,目前尚未有统一的结论。

为了探讨自噬在脑缺血中是否激活,本研究采用 N2a 细胞 OGD 模型来模拟体外脑缺血过程。LC3 分为 LC3 I 和 LC3 II 两种蛋白形式,前者作为细胞质性的 LC3,主要分布在细胞质中,而后者作为膜型 LC3 则定位于自噬体膜上。因此 LC3 通常被作为自噬标志物来检测自噬活性^[19]。研究中发现, N2a 细胞经过 OGD 处理以后,自噬标记性蛋白 LC3 免疫荧光表达较对照组明显增加,表明在 OGD 过程中,自噬活性增加。接下来,检测了自噬相关蛋白

LC3 及 Beclin 1 蛋白表达量。结果发现 OGD 8h 及 12h 后, N2a 细胞 LC3II/I 比值显著增加,而 Beclin 1 蛋白也有增加的趋势,但尚未达到统计学意义。这可能与实验样本重复一致性欠佳,从而导致统计学未有阳性结果。但是,上述研究结果基本上证实 OGD 过程中自噬蛋白表达增加。

近几年来越来越多研究者提出“自噬通量”的概念,认为仅仅自噬相关蛋白如 LC3、Beclin 1 的表达增加,甚至电镜下自噬体数目增加都不一定代表自噬活性增加,也有可能是因为自噬体数目增加,而溶酶体活性并没有增加,导致自噬相关蛋白聚集而没有得到有效的降解。自噬是自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体后,使自噬体内包裹的物质被有效降解的过程。LAMP2 是一种定位于溶酶体膜上的重要溶酶体膜蛋白^[20],经常被使用作为一种溶酶体的标志物^[21-22]。因此,进一步检测了 LAMP2 蛋白的表达,结果发现 OGD 8 h 及 12 h 后, N2a 细胞中 LAMP2 蛋白的表达较对照组尽管没有显著增加,但仍有增加趋势。猜测可能与 OGD 处理时间点 (OGD 8 h, OGD 12 h) 有关,可以适当增加 OGD 处理时间点的范围,从而找出最适宜的 OGD 处理时间,或者增加其他溶酶体标志物如 Cathepsin B 来进一步验证溶酶体活性。综合上述实验结果,认为 OGD 后自噬活性是增加的。

本实验发现, N2a 细胞经过 OGD 处理后细胞活性逐渐下降,且有显著意义。而前一部分实验也初步证实 OGD 后 N2a 细胞自噬活性增加,因此 OGD 后自噬活性的增加对 N2a 细胞是起损伤性作用的。3-MA 是一种通过调节 III 型 PI3K 形成来阻断自噬体的形成的自噬抑制剂^[23-24]。为了进一步证实本文的推测,使用 3-MA 抑制自噬,且通过检测乳酸脱氢酶释放率来进行细胞毒性检测。实验结果发现在未经 OGD 处理的 Control 组与 3-MA 组两组 N2a 细胞的乳酸脱氢酶释放率无差异,而在 OGD 处理后,使用 3-MA 处理的 N2a 细胞的乳酸脱氢酶释放率较 OGD 组下降。尽管差异未达到统计学意义 ($P>0.05$),但是后续试验加大样本量及增加重复次数可能获得阳性结果。这部分结果提示 3-MA 可能减轻了 OGD 对 N2a 的细胞损伤。

总之,本实验结果表明 OGD 后 N2a 细胞自噬途径被激活,而自噬活性被 3-MA 抑制后减轻了 OGD 后 N2a 细胞的损伤。本实验目前初步证实 OGD 诱导的自噬对 N2a 细胞是起损伤作用的,至于自噬的具体作用机制以及信号途径,有待后续试验进一步探讨。

参考文献:

- [1] MARKUS H. Stroke: causes and clinical features[J]. *Medicine*, 2012,40(9):484-9.
- [2] DOYLE K P, BUCKWALTER M S. Does B lymphocyte-mediated autoimmunity contribute to post-stroke dementia? [J]. *Brain Behav Immun*,2017,64:1-8.
- [3] TOMARI S, TANAKA T, IHARA M, et al. Risk factors for post-stroke seizure recurrence after the first episode[J]. *Seizure*,2017, 52:22-6.
- [4] JORGENSEN T S, WIUM-ANDERSEN I K, WIUM-ANDERSEN M K, et al. Incidence of depression after stroke, and associated risk factors and mortality outcomes, in a large cohort of danish patients[J]. *JAMA Psychiatry*,2016,73(10):1032-40.
- [5] LI Z Y, WU Y F, XU X C, et al. Autophagy as a double-edged sword in pulmonary epithelial injury: a review and perspective[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2017,313(2):L207-17.
- [6] 石瑶, 郭倩, 周也涵, 等. 白藜芦醇通过 Sirtuins 1 通路促进自噬减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤[J]. *基础医学与临床*,2015, 35(4):496-501.
- [7] 耿武军, 陈成宇, 张民远, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路通过下调自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018,26(3):222-6.
- [8] XIE C J, GU A P, CAI J, et al. Curcumin protects neural cells against ischemic injury in N2a cells and mouse brain with ischemic stroke[J]. *Brain and Behavior*,2018,8(2):e00921.
- [9] SUN H, ZHONG D, WANG C, et al. MiR-298 exacerbates ischemia/reperfusion injury following ischemic stroke by targeting act1 [J]. *Cell Physiol Biochem*,2018,48(2):528-39.
- [10] WANG P, LIANG J, LI Y, et al. Down-regulation of miRNA-30a alleviates cerebral ischemic injury through enhancing beclin 1-mediated autophagy[J]. *Neurochem Res*,2014,39(7):1279-91.
- [11] YU S, ZHAO J, WANG X, et al. 4-Hydroxybenzyl alcohol confers neuroprotection through up-regulation of antioxidant protein expression[J]. *Neurochem Res*,2013,38(7):1501-16.
- [12] DENTON D, XU T, KUMAR S. Autophagy as a pro-death pathway[J]. *Immunol Cell Biol*,2015,93(1):35-42.
- [13] GONG J, MUNOZ A R, CHAN D, et al. STAT3 down regulates LC3 to inhibit autophagy and pancreatic cancer cell growth[J]. *Oncotarget*,2014,5(9):2529-41.
- [14] BUDINI M, BURATTI E, MORSELLI E, et al. Autophagy and its impact on neurodegenerative diseases; new roles for TDP-43 and C9orf72[J]. *Front Mol Neurosci*,2017,10:170.
- [15] ZHANG Z, MIAH M, CULBRETH M, et al. Autophagy in neurodegenerative diseases and metal neurotoxicity[J]. *Neurochem Res*,2016,41(1-2):409-22.
- [16] MA S, WANG Y, CHEN Y, et al. The role of the autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Biochim Biophys Acta*,2015,1852(2):271-6.
- [17] KUWANO K, ARAYA J, HARA H, et al. Cellular senescence and autophagy in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. *Respir Investig*,2016,54(6):397-406.
- [18] 廖梓恒, 陈慧. 丁苯酞在大鼠脑缺血—再灌注损伤中的神经保护机制的研究[J]. *中南医学科学杂志*,2016,44(3):275-8.
- [19] DAFRE A L, SCHMITZ A E, MAHER P. Methylglyoxal-induced AMPK activation leads to autophagic degradation of thioredoxin 1 and glyoxalase 2 in HT22 nerve cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017,108:270-9.
- [20] CHHABRA R, GRABRUCKER A M, VERATTI P, et al. Characterization of lysosome-destabilizing DOPE/PLGA nanoparticles designed for cytoplasmic drug release[J]. *Int J Pharm*,2014,471(1-2):349-57.
- [21] HOUCK S A, REN H Y, MADDEN V J, et al. Quality control autophagy degrades soluble ERAD-resistant conformers of the misfolded membrane protein GnRHR[J]. *Mol Cell*,2014,54(1):166-79.
- [22] BERTH S, CAICEDO H H, SARMA T, et al. Internalization and axonal transport of the HIV glycoprotein gp120[J]. *ASN Neuro*, 2015,7(1).
- [23] TRAN A T, RAMALINGA M, KEDIR H, et al. Autophagy inhibitor 3-methyladenine potentiates apoptosis induced by dietary tocotrienols in breast cancer cells[J]. *Eur J Nutr*,2015,54(2):265-72.
- [24] SHENG Y, SUN B, GUO W T, et al. 3-Methyladenine induces cell death and its interaction with chemotherapeutic drugs is independent of autophagy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2013, 432(1):5-9.

(本文编辑:蒋湘莲)

(上接第 472 页)

- [16] CHUNG YL, PAN CH, LIOU WH, et al. NSC746364, a G-quadruplex-stabilizing agent, suppresses cell growth of A549 human lung cancer cells through activation of the ATR/Chk1-dependent pathway [J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 124(1):7-17.
- [17] SHI L, CHEN J, WANG YY, et al. Gossypin induces G2/M arrest in human malignant glioma U251 cells by the activation of Chk1/Cdc25C pathway [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32(2):289-96.
- [18] HUANG WW, KO SW, TSAI HY, et al. Cantharidin induces G2/M phase arrest and apoptosis in human colorectal cancer colo 205 cells through inhibition of CDK1 activity and caspase-dependent signaling pathways [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(4):1067-73.
- [19] KAMAL A, SURESH P, RAMAIAH MJ, et al. Synthesis and biological evaluation of 4 β -sulphonamido and 4 β -[(4'-sulphonamido)benzamide]podophyllotoxins as DNA topoisomerase-II α and apoptosis inducing agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20(6):2054-66.
- [20] HABARTOVA K, HAVELEK R, SEIFRTOVA M, et al. Scoulerine affects microtubule structure, inhibits proliferation, arrests cell cycle and thus culminates in the apoptotic death of cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):4829.
- [21] LING H, LU LF, HE J, et al. Diallyl disulfide selectively causes Checkpoint kinase-1 mediated G2/M arrest in human MGC803 gastric cancer cell line [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(5):2274-82.

(本文编辑:蒋湘莲)