

过氧化物酶体增植物激活受体- γ 辅激活因子-1 α 对氧-糖剥夺神经元存活率及活性氧水平影响

韩 勇¹, 沙杜鹃², 顾双双¹, 王路娜¹, 李 瑾², 李启明², 张 均^{1,2*}

(¹南京医科大学鼓楼临床医学院急诊科,²南京大学附属南京鼓楼医院急诊科,江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:探讨过氧化物酶体增植物激活受体- γ 辅激活因子-1 α (PGC-1 α)对氧糖剥夺神经元的保护作用及机制。方法:原代培养胚胎小鼠大脑皮层神经元 7 d,细胞随机分为 4 组:正常组、氧糖剥夺组(OGD 组)、OGD+PGC-1 α 过表达质粒组(过表达组)、OGD+空载质粒组(空载组)。过表达组与空载组分别于 OGD 处理前予以 PGC-1 α 过表达质粒和空载质粒预处理。采用蛋白印迹技术检测 PGC-1 α 表达,噻唑蓝比色分析(MTT)法检测神经细胞存活率,流式细胞仪检测活性氧(ROS)含量。结果:OGD 组较正常组神经元存活率明显下降($P < 0.01$);予以 PGC-1 α 过表达质粒预处理后,PGC-1 α 蛋白水平明显上调,其神经元存活率升高,与 OGD 组及空载组比较具有显著差异性($P < 0.01$)。OGD 组神经元 ROS 含量明显高于正常组($P < 0.01$);过表达组 ROS 水平降低,与 OGD 组及空载组 ROS 含量比较其差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结论:PGC-1 α 明显降低氧糖剥夺损伤神经元 ROS 含量,提高其生存率,发挥其神经保护作用。

[关键词] 过氧化物酶体增植物激活受体- γ ;辅激活因子-1 α ;神经元;氧化应激;氧糖剥夺

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)03-323-04

doi:10.7655/NYDXBNS20130307

Effect of PGC-1 α on the survival rate and reactive oxygen species of injured neurons induced by oxygen-glucose deprivation

Han Yong¹, Sha Dajuan², Gu Shuangshuang¹, Wang Luna¹, Li Jin², Li Qiming², Zhang Jun^{1,2*}

(¹Department of Emergency, Affiliated Drum Tower Hospital of NJMU; ² Department of Emergency, Drum Tower Hospital, Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effects and mechanism of Peroxisome proliferative activated receptor- γ activation of auxiliary factor 1 Alpha (PGC-1 α) on injured neurons induced by oxygen-glucose deprivation (OGD) in embryonic mice. **Methods:** Cortical neurons cultured for 7 days were randomly divided into four groups: normal control group, oxygen-glucose deprivation group (OGD); OGD + PGC-1 α overexpression plasmid group (overexpression group) and OGD+no-load plasmid group (no-load group). Overexpression group and the no-load group pretreatment with PGC-1 α overexpression plasmid and no-load plasmid respectively before OGD treatment. 24 hours after OGD, cell survival rate was detected by MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide), observe the expression of PGC-1 α was using Western blot technology, and the flow cytometry was used to monitor the content of Reactive Oxygen Species (ROS). **Results:** Compared with the normal control group, the cell survival rate in OGD group decreased ($P < 0.01$), the survival rate was increased in overexpression group due to pretreatment of PGC-1 α overexpression plasmid, which was compared with OGD group and no-load group with a significant difference ($P < 0.01$). The ROS of OGD groups were significantly higher than that of the normal group ($P < 0.01$); the content of ROS was decreased in overexpression group, and was significantly lower than that of the OGD group and no-load group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The study indicated that PGC-1 α can significantly reduce the ROS content of oxygen-glucose deprivation neurons and improve its survival rate, to protect the neurons.

[Key words] PPAR-r; PGC-1 α ; neurons; oxidative stress; OGD

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(3):323-326]

[基金项目] 南京市医学科技发展项目(YKK11090)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: gljunzhang@yahoo.com.cn

缺血性脑损伤机制复杂,氧化应激是其中的重要病理机制之一^[1],也是缺血性脑卒中后诱导神经元凋亡的重要触发因素。过氧化物酶体增殖活性受体- γ 辅助活化因子-1 α (PGC-1 α)是过氧化物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)的转录辅助活化因子,具有强大的转录功能^[2-3],与多种脑功能有关,包括能量代谢和神经保护。PGC-1 α 基因敲除小鼠缺血神经元的损伤显著^[4],增加的 PGC-1 α 表达可使培养的神经细胞免受氧化应激介导的细胞死亡^[5]。PGC-1 α 被证实可在血管内皮细胞可诱导活性氧解毒蛋白的产生,抑制氧化应激,减少细胞损伤^[6]。本实验拟通过体外培养神经元,建立氧糖剥夺神经元模型,探讨过表达 PGC-1 α 对神经元存活率和活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量的影响,进一步阐明 PGC-1 α 对氧糖剥夺神经元的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

选用健康清洁级 KM 小鼠孕鼠,孕 16~17 d,由南京市鼓楼医院动物实验中心提供 [合格证书号 SYXK(苏)2004-0013]。

1.2 方法

1.2.1 质粒提取及转染预处理

挑取含 pcDNA3.1-PGC-1 α plasmid、pcDNA3.1 plasmid(美国 Addgene 公司,编号 1026)甘油菌和 3~5 ml LB 培养基(含抗生素),混合于试管,37℃震荡培养过夜(16 h),可见浑浊的液体。按质粒提取试剂盒(Invitrogen 公司,美国),美国步骤提取质粒,置于-20℃冰箱保存备用。在无血清培养基中稀释 DNA(4.0 μ g/250 μ l),并轻轻混匀。Lipofectamine™ 2000(Invitrogen 公司,美国)稀释在无血清培养基中(10 μ l/250 μ l),室温下静置 5 min。Lipofectamine™ 2000 和 DNA 的稀释液轻轻混匀并在室温下静置 20 min。6 孔细胞板的每个孔中加混合液 500 μ l,96 孔细胞板加混合液 50 μ l,混匀,4~6 h 后更换培养基。

1.2.2 原代神经元培养及分组

取孕 16~17 d 的 KM 小鼠孕鼠胚胎,分离大脑皮质,胰酶消化,吹打分离细胞,含 B27+25 μ mol/L 谷氨酰胺 Neurobasal(Gibco 公司,美国)培养液调至(2~4) $\times 10^8$ /ml 细胞密度,接种于经 0.1%多聚赖氨酸(Sigma 公司,美国)浸泡过夜的 96 孔及 6 孔细胞板中,37℃恒温 CO₂ 孵箱内(SANYO 公司,日本)(5% CO₂、湿度 85%~98%)培养。贴壁 24 h 后换全液,以

后每隔 2 d 换半液,培养 7 d。第 7 天将细胞培养板随机分为 4 组:正常组、氧糖剥夺(OGD)组(OGD 组)、OGD+PGC-1 α 质粒过表达组(过表达组)、OGD+空载质粒组(空载组),过表达组与空载组分别于 OGD 处理前 24 h 予以 PGC-1 α 过表达质粒和空载质粒预处理。

1.2.3 氧糖剥夺模型制备

除正常组,余 3 组于原代神经元培养第 8 天制备 OGD 模型,换 OGD 培养基(120 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl₂, 25 mmol/L Tris-HCl, pH=7.4),将培养板置于缺氧罩内(充入 5% CO₂, 95% N₂, 13.98 kPa)15 min 后关闭阀门,37℃恒温 CO₂ 孵箱内(5% CO₂、湿度 85%~98%)培养 2 h 换正常培养基,37℃恒温 CO₂ 孵箱内(5% CO₂、湿度 85%~98%)培养过夜,24 h 后行各项检测。

1.2.4 神经元存活率检测

各组培养的神经元加入新鲜配置噻唑蓝(MTT)(南京凯基)0.5 mg/ml,37℃ 3 h,再加入 100 μ l 二甲基亚砷(DMSO)10 min,并用微量振荡器振荡使结晶溶解完全,用全自动酶标仪(Bio-tek)在 570 nm 测吸光度值。

1.2.5 各组 ROS 含量检测

采用细胞内氧化应激活性氧(ROS)高质荧光测定试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司)检测。收集待检的神经元,加入 GENMED 染色工作液(GENMED 染色液与 GENMED 稀释液以 1:199 比例混合),轻柔吹打混匀,放入 37℃恒温水槽避光孵育 20 min,1 000 r/min 离心 5 min,抽去上清,加入 GENMED 保存液,轻柔混匀细胞,用流式细胞仪(Becton Dickinson, San Jose, CA)分析,波长 488 nm 氩离子激光观察。

1.2.6 Western blot 检测

各组处理同前,根据细胞蛋白提取试剂盒(美国 Biovision)方法,提取细胞总蛋白,并测定各组蛋白浓度取等量样品进行 SDS-PAGE 电泳并转导硝酸纤维素膜上,用 5%脱脂奶粉封闭液室温摇床封闭 1 h;加入一抗(PGC-1 α 抗体,美国 Biovision),4℃摇床孵育过夜;加入 HRP 标记的抗兔二抗室温摇床孵育 1 h;洗膜后加入适量化学发光剂(0.125 ml/cm²),暗室中用 X 线片曝光,冲洗,晾干。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件行统计学处理,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法, $P \leq 0.05$ 为差异

有统计学意义。

2 结果

2.1 各组神经元生存率

与正常组比较,OGD 组神经元存活率明显下降($P < 0.01$); 予以 PGC-1 α 过表达质粒预处理后,PGC-1 α 表达明显被上调,其神经元存活率升高,与 OGD 组及空载组比较具有显著差异性($P < 0.01$,表 1)。

表 1 各组神经元生存率比较

Table 1 Comparison of neurons survival rate ($\bar{x} \pm s$)

组别	吸光度值
正常组	0.679 \pm 0.081
OGD 组	0.211 \pm 0.029*
过表达组	0.522 \pm 0.051 ^{#Δ}
空载组	0.205 \pm 0.035

与正常组比较,* $P < 0.01$;过表达组与 OGD 组比较,[#] $P < 0.01$;与空载组比较, ^{Δ} $P < 0.01$ 。

2.2 各组神经元 ROS 含量比较

结果显示 OGD 组神经元 ROS 含量明显高于正常组升高 ($P < 0.01$); 过表达组 ROS 水平降低,与 OGD 组及空载组 ROS 含量比较其差异具有统计学意义($P < 0.01$,表 2,图 1)。

3 讨论

PGC-1 α 是近年来备受关注的转录调控辅助激活因子,其能与许多不同的转录因子结合,在不同组

表 2 各组神经元 ROS 含量比较

Table 2 Comparison of neurons ROS content

组别	ROS 含量
正常组	265.00 \pm 57.61
OGD 组	1154.00 \pm 64.63*
过表达组	617.00 \pm 37.99 ^{#Δ}
空载组	1054.34 \pm 29.67

与正常组比较,* $P < 0.01$;与 OGD 组比较,[#] $P < 0.01$;过表达组与空载组比较, ^{Δ} $P < 0.01$ 。

织和生物反应过程中发挥很多的功能。PGC-1 α mRNA 在高能量需求且富含线粒体脑组织中有广泛表达。先期 Gutsaeva 等^[7]通过建立缺氧模型进行的研究发现,PGC-1 α mRNA 在鼠体内灶性缺血的大脑皮层中有表达;在神经退行性疾病,其能抑制神经元 ROS 的生成,增加 ROS 的清除^[5,8];过表达的 PGC-1 α 能保护氧化剂诱导损伤的牛主动脉内皮细胞和神经细胞^[9-10]。其还可以通过恢复氧化剂诱导的损伤线粒体和细胞功能,保护近端肾小管上皮细胞^[11]。这些结果表明 PGC-1 α 确实是一种改善缺血性损伤细胞功能的可行性潜在治疗靶点。本研究通过建立神经元体外氧糖剥夺模型,观察 PGC-1 α 对神经元保护作用,实验结果显示:OGD 组神经元存活率较正常组明显下降,予以 PGC-1 α 过表达质粒预处理神经元上调 PGC-1 α 水平后,其存活率升高,与 OGD 组及空载组比较具有显著差异性 ($P < 0.01$);与 Zhao 等^[12]的研究结果相似;进一步证实 PGC-1 α

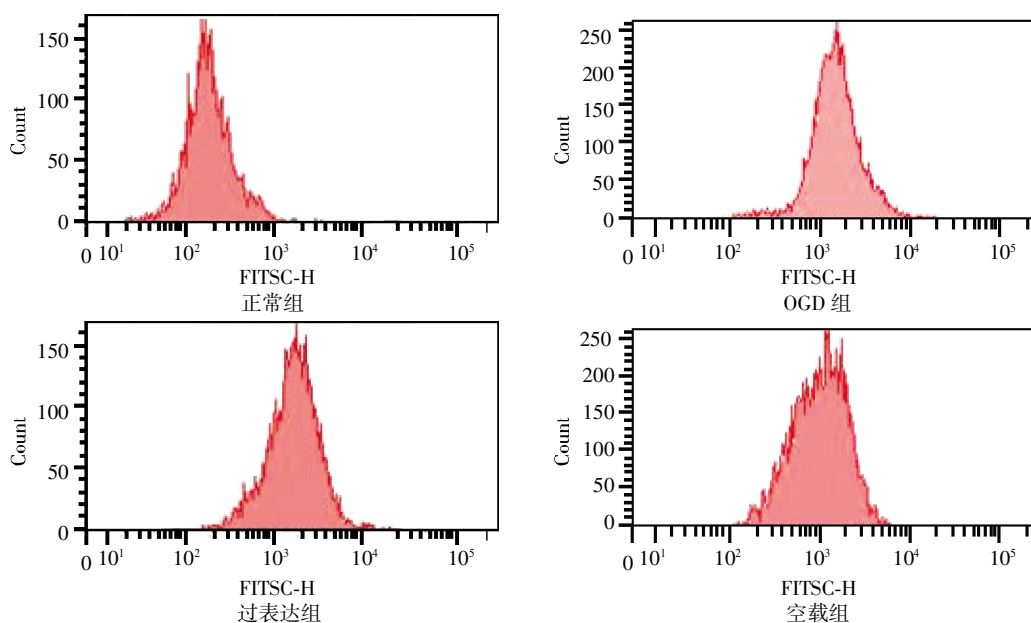


图 1 OGD 组及空载组 ROS 含量比较(流式分析结果图)

Figure 1 Comparment of ROS in OGD and no-load plasmid group

对氧糖剥夺神经元有保护作用。PGC-1 α 的神经保护作用机制尚不明确,有研究发现其神经保护作用机制可能与其促进线粒体合成^[6]、抑制氧化应激^[13]、促进血管增生^[14]、抑制炎症反应^[15]等相关。

缺血性脑血管病的病理过程极为复杂,主要涉及能量代谢紊乱、钙超载、炎症反应、自由基损伤、细胞凋亡、兴奋性氨基酸毒性等多个环节。其中氧化应激是缺血性脑血管病的关键病理生理变化,是神经细胞不可逆损伤的重要机制^[16]。过量的自由基可损伤细胞内脂质、蛋白质和核酸等重要物质,通过坏死或凋亡的方式引起细胞最终死亡。减少或消除ROS过量生成是有效抑制缺血后氧化应激损伤的关键。PGC-1 α 是细胞内抗氧化防御体系的调节因子,St-Pierre等^[5]的研究证明PGC-1 α 对ROS的产生具有抑制作用,从而降低ROS诱导的细胞死亡。本实验研究发现OGD组神经元ROS含量明显高于正常组($P < 0.01$),经PGC-1 α 过表达质粒预处理的过表达组ROS水平较OGD组明显降低($P < 0.01$),表明PGC-1 α 具有降低氧糖剥夺神经元ROS水平,从而抑制氧糖剥夺氧化应激神经元损伤,降低神经元死亡率,提高其存活率。

PGC-1 α 抑制ROS生成机制不明确。目前认为解偶联蛋白2(UCP-2)、超氧化物歧化酶(SOD)是ROS形成的重要调节酶。Wu等^[6]发现PGC-1 α 能通过诱导骨骼肌UCP2的表达刺激线粒体发生和呼吸链功能。PGC-1 α 是否是通过上调氧糖剥夺神经元UCP2表达降低ROS生成,尚有待进一步研究证实。综上所述,PGC-1 α 提高氧糖剥夺神经元的存活率,通过抑制氧糖剥夺神经元的氧化应激水平发挥神经保护作用。本研究仅从活性氧水平方面观察了PGC-1 α 抑制氧糖剥夺神经元的保护作用,其抑制氧化应激的确切机制尚在进一步深入研究中。

[参考文献]

- [1] Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38(11):1433-1444
- [2] Knutti D, Kaul A, Kralli A. A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(7):2411-2422
- [3] Lin J, Puigserver P, Donovan J, et al. Peroxisome proliferator-activated, receptor coactivator 1 β (PGC-1 β), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(3):1645-1648
- [4] Lin J, Wu PH, Tarry PT, et al. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice[J]. *Cell*, 2004, 119(1):121-135
- [5] St-Pierre J, Drori S, Uldry M, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators[J]. *Cell*, 2006, 127(2):397-408
- [6] Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1[J]. *Cell*, 1999, 98(1):115-124
- [7] Gutsaeva DR, Carraway MS, Suliman HB, et al. Transient hypoxia stimulates mitochondrial biogenesis in brain sub-cortex by a neuronal nitric oxide synthase-dependent mechanism[J]. *Neurosci*, 2008, 28(9):2015-2024
- [8] Borniquel S, Valle I, Cadenas S, et al. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1 α [J]. *FASEB J*, 2006, 20(11):1889-1891
- [9] Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates[J]. *PNAS*, 2000, 97(6):2826-2831
- [10] Wright DC, Han DH, Garcia-Roves PM, et al. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1 α expression[J]. *The Journal of Biol Chem*, 2007, 282(1):194-199
- [11] Wu H, Kanatous S B, Thurmond F A, et al. Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK[J]. *Science*, 2002, 296(5566):349-352
- [12] Zhao J, Li L, Pei Z, et al. Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- γ co-activator 1- α and hypoxia induced factor-1 α mediate neuro- and vascular protection by hypoxic preconditioning *in vitro*[J]. *Brain Res*, 2012, 1447(1):1-8
- [13] Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, et al. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 66(3):562-573
- [14] Arany Z, Foo SY, Ma Y, et al. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1[J]. *Nature*, 2008, 451(7181):1008-1012
- [15] Kressler D, Schreiber SN, Knutti D, et al. The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(16):13918-13925
- [16] Alien CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2009, 40(6):461-470

[收稿日期] 2012-10-29