

· 基础研究 ·

## Max 作用蛋白 1-0 在氧糖剥夺诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡中的作用

聂萍<sup>1</sup>, 胡圳圳<sup>2</sup>, 袁雅<sup>1</sup>, 吴伟玲<sup>1,3</sup>, 郑大同<sup>1,2,3\*</sup><sup>1</sup>南京医科大学第二临床医学院儿科, 江苏 南京 210011; <sup>2</sup>南京医科大学第二附属医院临床分子基因检测中心, <sup>3</sup>儿童医学中心, 江苏 南京 210003

**[摘要]** 目的:探讨 Max 作用蛋白 1-0(max action protein 1-0, Mxi1-0)在氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡中的作用。方法:利用 Western blot 检测 SH-SY5Y 细胞在 OGD 条件下 Mxi1-0 和线粒体自噬相关蛋白 LC3-II、p62、Tom20 的表达水平。Mxi1-0 siRNA 转染 SH-SY5Y 细胞,以 CCK-8 法和 Annexin V/PI 染色法检测 Mxi1-0 在 OGD 诱导细胞凋亡中的作用。结果:OGD 条件下,SH-SY5Y 细胞中 Mxi1-0 的表达先上升后下降。OGD 处理使线粒体自噬相关蛋白 LC3-II 表达升高,p62 和 Tom20 蛋白表达下降。OGD 条件下,Mxi1-0 沉默可抑制 OGD 诱导的线粒体自噬,增强 OGD 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡。结论:Mxi1-0 通过增强线粒体自噬拮抗 OGD 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡。

**[关键词]** Max 作用蛋白 1-0;氧糖剥夺;细胞凋亡;线粒体自噬;SH-SY5Y 细胞

**[中图分类号]** R320.54;R743.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)06-816-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200608

## Roles of Mxi1-0 in apoptosis of SH-SY5Y cells induced by oxygen and glucose deprivation

NIE Ping<sup>1</sup>, HU Zhenzhen<sup>2</sup>, YUAN Ya<sup>1</sup>, WU Weiling<sup>1,3</sup>, ZHENG Datong<sup>1,2,3\*</sup><sup>1</sup>Department of Pediatrics, the Second Clinical Medical School, Nanjing Medical University, Nanjing 210011; <sup>2</sup>Clinical Molecular Diagnostic Center, <sup>3</sup>Children's Medical Center, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210003, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to investigate the role of max action protein 1-0(Mxi1-0) in SH-SY5Y cell apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation(OGD). **Methods:** The expression levels of Mxi1-0 and mitophagy related proteins LC3-II, p62, Tom20 in SH-SY5Y cells under OGD conditions were detected by Western blot. Mxi1-0 siRNA was transfected into SH-SY5Y cells. The expression of Mxi1-0 and mitophagy related proteins (LC3-II, p62, Tom20) were detected in SH-SY5Y cells under OGD using Western blot. The role of Mxi1-0 in OGD-induced apoptosis was detected using CCK-8 method and Annexin V/PI staining. **Results:** The expression of Mxi1-0 increased firstly and then decreased in SH-SY5Y cells after OGD treatment. The expression of mitophagy related protein LC3-II increased and the expression of p62 and Tom20 proteins decreased after OGD treatment. Under OGD conditions, Mxi1-0 silence reduced mitophagy in SH-SY5Y induced by OGD, and increase the apoptosis of SH-SY5Y induced by OGD. **Conclusion:** Mxi1-0 antagonizes OGD induced apoptosis of SH-SY5Y cells by enhancing mitochondrial autophagy.

**[Key words]** max interacting protein1-0; oxygen-glucose deprivation; apoptosis; mitophagy; SH-SY5Y cells

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(06): 816-820]

新生儿缺血缺氧性脑病是围产期窒息造成的严重脑损伤,是新生儿致残的主要原因之一,也是儿童院外心跳呼吸骤停死亡的最常见原因之一<sup>[1]</sup>。神经细胞的糖氧剥夺(oxygen-glucose deprivation,

**[基金项目]** 江苏省妇幼健康科研项目(F201711)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: dtzheng@gmail.com

OGD)模型常用于模拟缺血缺氧性脑病的病理生理过程<sup>[2]</sup>,研究发现神经细胞凋亡是缺血缺氧性脑病的主要原因。线粒体自噬是细胞利用自噬机制选择性清除受损或多余线粒体的过程,可以拮抗细胞凋亡,对在缺血缺氧条件下维持细胞存活及内环境稳态非常重要<sup>[3-4]</sup>。

既往研究发现 Max 作用蛋白 1-0(max action protein 1-0, Mxi1-0)主要位于细胞质<sup>[5]</sup>,本课题组前期研究发现, Mxi1-0 主要位于细胞质线粒体中<sup>[6]</sup>,是缺氧条件下调节细胞凋亡的关键因子<sup>[6-7]</sup>,但其在缺血缺氧诱导的神经细胞凋亡中的作用及机制尚不清楚。本研究通过对体外培养的SH-SY5Y细胞行 OGD 处理,进而在体外模拟神经元缺血缺氧,观察 Mxi1-0 表达变化及对线粒体自噬和细胞凋亡的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SH-SY5Y 细胞(中国科学院上海细胞生物学研究所)、DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司,美国)、PI/Annexin V 凋亡检测试剂盒(南京凯基生物公司)、Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国)、小鼠抗β-肌动蛋白单克隆抗体(Sigma 公司,美国)、小鼠抗 p62、TOM20、LC3-II 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国)、CCK-8 试剂(Roche 公司,德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

SH-SY5Y 细胞株在含 10% 胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 μg/mL)的 DMEM 培养基中,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 浓度下培养,每 3 d 更换 1 次培养基。

#### 1.2.2 OGD 实验模型建立

将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞接种于 60 mm 培养皿或 96 孔板中,于第 2 天将已贴壁细胞更换为无糖无血清培养基并置于缺氧装置中(37℃、5% CO<sub>2</sub>、1% O<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>),按照实验需求作用不同时间后用于随后的实验。

#### 1.2.3 CCK-8 检测细胞活性

将对数期生长的 SH-SY5Y 细胞按 1×10<sup>4</sup> 个/孔接种于 96 孔板中,实验分 3 组:空白对照组、阴性对照组(NC 组)和 Mxi1-0-siRNA 组(siMxi1-0 组),每组设 5 个复孔。转染相应 siRNA 24 h 后于 OGD 条件下培养 4 h,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,继续孵育 1.5 h。酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值。

#### 1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

胰酶消化、收集各组细胞,预冷 PBS 洗涤后调整细胞密度 1×10<sup>7</sup> 个/mL,取 100 μL 细胞悬液于流式管中,加入 200 μL 结合缓冲液、5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,混匀后室温避光放置 15 min,上机检测。

#### 1.2.5 Western blot 检测蛋白表达

收集各组细胞,蛋白提取及 Western blot 检测参

照既往文献的方法进行<sup>[8]</sup>,一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次后加入二抗室温孵育 1.5 h, TBST 洗膜 3 次后 ECL 曝光。

#### 1.2.6 小干扰 RNA 转染 SH-SY5Y 细胞

将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞接种到 6 孔板中培养 24 h,使转染当天细胞汇合率处于 50%~60%。转染步骤按 Lipofectamine 2000 操作说明进行。转染 48 h 后将细胞置于 OGD 条件下培养 4 h, Western blot 检测干扰效率。

### 1.3 统计学方法

所有实验重复 3 次,用 SPSS13.0 统计软件分析数据,符合正态分布的数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

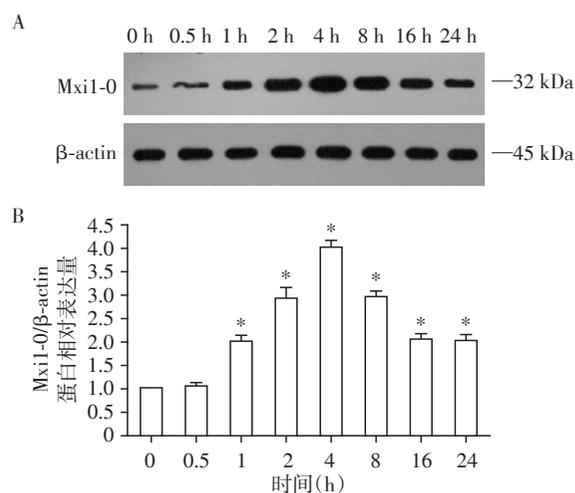
## 2 结果

### 2.1 OGD 条件下 SH-SY5Y 细胞中 Mxi1-0 的表达

SH-SY5Y 细胞经 OGD 处理不同时间后,利用 Western blot 方法检测细胞中 Mxi1-0 蛋白表达的变化,结果(图 1)显示, Mxi1-0 表达在 OGD 1 h 后呈时间依赖性增加( $P < 0.01$ ),4 h 后呈时间依赖性下降( $P < 0.01$ )。

### 2.2 OGD 条件下 SH-SY5Y 细胞中线粒体自噬水平升高

Western blot 检测结果(图 2)显示,与对照组正常细胞相比, OGD 组细胞中线粒体自噬相关蛋白



A: Western blot 检测 OGD 处理不同时间后,细胞中 Mxi1-0 蛋白的表达; B: OGD 处理不同时间后,定量分析细胞中 Mxi1-0 蛋白的相对表达量。与 0 h 组相比, \* $P < 0.01$  ( $n=3$ )。

图 1 OGD 条件下 SH-SY5Y 细胞中 Mxi1-0 表达

Figure 1 The expression of Mxi1-0 in SH-SY5Y cells under OGD condition

LC3- II 表达水平显著升高( $P < 0.01$ ), p62( $P < 0.01$ )及Tom20( $P < 0.01$ )表达水平显著降低。

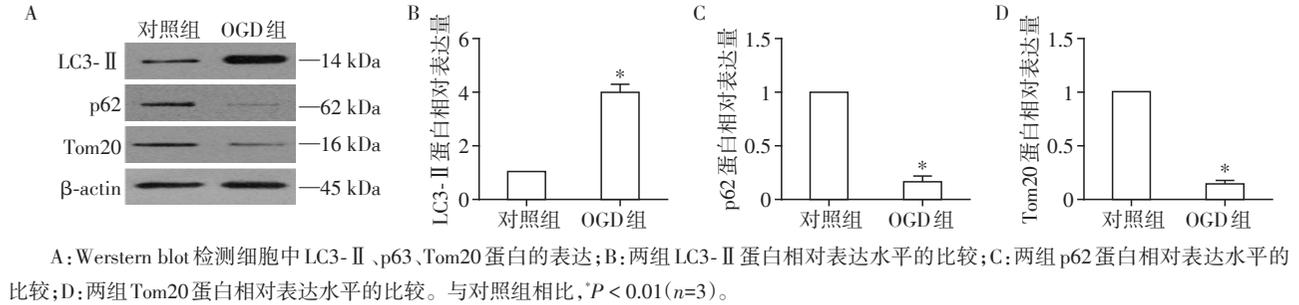
### 2.3 Mxi1-0 影响 OGD 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡

Western blot 检测结果(图 3A、B)显示,在 OGD 条件下,与 NC 组和空白对照组相比,siMxi1-0 组 Mxi1-0 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.01$ )。CCK-8 检测结果(图 3C)显示,在 OGD 条件下,siMxi1-0 组

细胞增殖率显著低于 NC 组和空白对照组( $P < 0.01$ )。流式细胞术检测结果(图 3D、E)显示,在 OGD 条件下,siMxi1-0 组细胞凋亡率显著高于 NC 组和空白对照组( $P < 0.01$ )。

### 2.4 Mxi1-0 影响 OGD 诱导的线粒体自噬

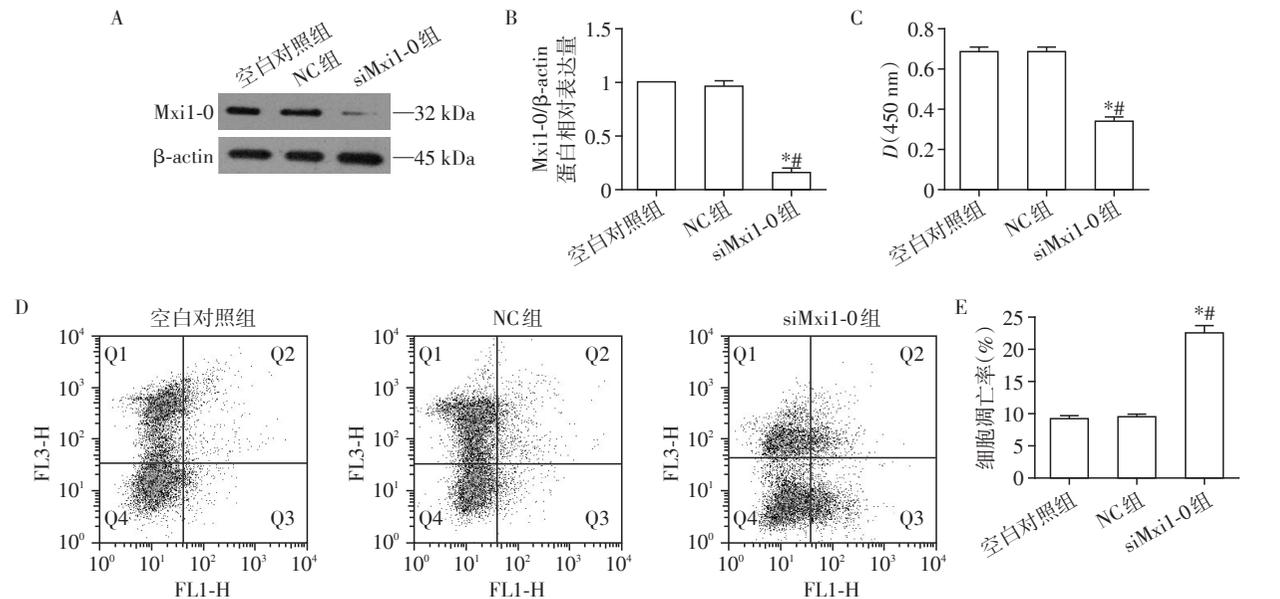
Western blot 检测结果(图 4)显示,在 OGD 条件下,与 NC 组相比,siMxi1-0 组细胞中 LC3- II 蛋白表



A: Western blot 检测细胞中 LC3- II、p62、Tom20 蛋白的表达;B:两组 LC3- II 蛋白相对表达水平的比较;C:两组 p62 蛋白相对表达水平的比较;D:两组 Tom20 蛋白相对表达水平的比较。与对照组相比,\* $P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图2 OGD条件下SH-SY5Y细胞中线粒体自噬相关蛋白的表达

Figure 2 The expression of mitophagy related proteins in SH-SY5Y cells under OGD conditions



A: Western blot 检测 Mxi1-0 蛋白的表达;B:各组 Mxi1-0 蛋白表达定量分析;C:CCK-8 检测细胞增殖率;D:流式细胞术检测细胞凋亡率;E:各组凋亡率定量分析。与空白对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与 NC 组比较,# $P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图3 Mxi1-0 沉默对 OGD 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力及凋亡的影响

Figure 3 Effects of Mxi1-0 silence on OGD-induced SH-SY5Y cell activity and apoptosis

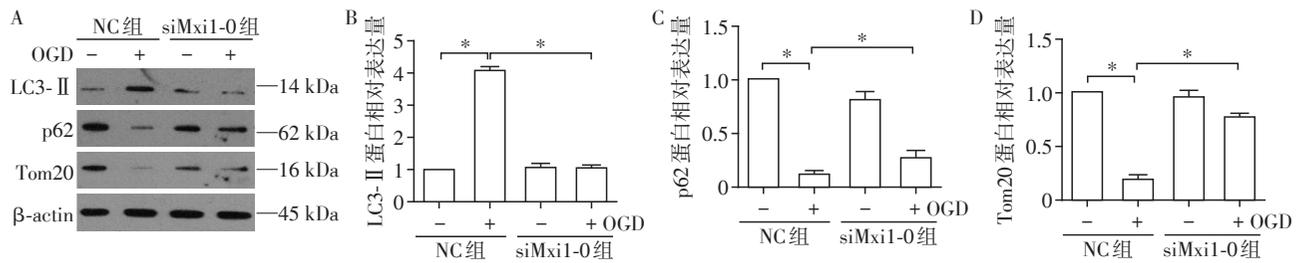
达水平显著降低( $P < 0.01$ ), p62 和 Tom20 蛋白表达水平都显著升高( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

缺氧缺血性脑病涉及复杂的病理生理过程,如氧化应激、能量衰竭、活性氧的过量产生及线粒体损害等,常导致严重的组织损伤,甚至细胞死亡<sup>[9]</sup>。

大量研究表明线粒体自噬可以通过拮抗缺氧缺血条件下诱导的神经细胞凋亡,减轻缺血缺氧性脑损伤<sup>[10-11]</sup>,且线粒体自噬功能障碍时,神经细胞凋亡常增多,缺血缺氧性脑损害加重<sup>[12-13]</sup>。均提示线粒体自噬在缺血缺氧性损害中发挥保护作用。

Löfstedt 等<sup>[14]</sup>在乳腺癌细胞中发现,急性缺氧诱导 Mxi1-0 的快速表达,而慢性缺氧诱导 Mxi1-0 的持



A: Western blot检测各组LC3- II、p62、Tom20蛋白的表达;B:各组LC3- II蛋白表达水平的比较;C:各组p62蛋白表达水平的比较;D:各组Tom20蛋白表达水平的比较。两组比较,\* $P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图4 沉默Mxi1-0对线粒体自噬相关蛋白的影响

Figure 4 Effects of Mxi1-0 silence on mitophagy related proteins

续表达,提示Mxi1-0对于适应缺氧条件至关重要。为了解Mxi1-0在缺氧缺血环境下对线粒体自噬和细胞凋亡的影响,本研究采用来源于人神经母细胞瘤的细胞株SH-SY5Y建立体外OGD模型模拟体内神经元缺氧缺血环境。SH-SY5Y细胞具有分化程度低、培养体系稳定、连续稳定传代等优势,其细胞形态、生理生化功能与神经细胞极为相似,是研究神经元凋亡机制最常用的细胞模型<sup>[15-16]</sup>。

本课题组前期研究表明在缺氧诱导人脐静脉内皮细胞凋亡过程中,Mxi1-0蛋白的表达在缺氧处理后呈先上升后下降趋势,抑制Mxi1-0蛋白的表达后,缺氧诱导的细胞凋亡下降<sup>[6]</sup>。本研究亦发现在OGD诱导SH-SY5Y细胞凋亡的过程中,Mxi1-0蛋白的表达在OGD处理后呈先上升后下降趋势,提示Mxi1-0亦可能参与了OGD诱导的SH-SY5Y细胞凋亡。为了确定Mxi1-0在OGD诱导SH-SY5Y细胞凋亡中的作用,本研究采用siRNA方法抑制OGD条件下Mxi1-0的表达。结果表明,在OGD条件下抑制Mxi1-0的表达后,SH-SY5Y细胞活力下降,凋亡升高,这表明在OGD条件下Mxi1-0发挥抗凋亡功能。本课题组前期研究发现在缺氧诱导的内皮细胞凋亡中,Mxi1-0发挥促凋亡功能。Mxi1-0在细胞凋亡中发挥不同功能可能是由细胞背景或细胞外界应激条件所决定的。

Zuo等<sup>[17]</sup>在成年大鼠大脑缺血模型中发现在早期缺氧缺血应激条件下,线粒体自噬清除受损的线粒体,促进缺氧缺血条件下神经细胞的存活。Wu等<sup>[18]</sup>发现,氢通过调节PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬,减少细胞凋亡,对缺血再灌注的海马神经元细胞起保护作用。Li等<sup>[19]</sup>发现促进OGD诱导的线粒体自噬,可减少OGD再灌注后线粒体功能障碍及神经细胞凋亡。以上研究均证实了线粒体自噬在缺血缺氧的过程中起保护作用。本研究

还发现,OGD条件下SH-SY5Y细胞中线粒体自噬相关蛋白LC3- II表达水平显著升高,p62及Tom20表达水平显著降低。提示OGD处理可诱导SH-SY5Y细胞发生线粒体自噬。进一步实验发现,当Mxi1-0表达被抑制后,线粒体自噬相关蛋白LC3- II表达水平显著降低,p62及Tom20表达水平显著升高,提示线粒体自噬水平也随之下降,从而推测Mxi1-0可能通过调节线粒体自噬水平抵抗OGD诱导的SH-SY5Y细胞凋亡。

综上所述,本研究发现Mxi1-0对OGD诱导的SH-SY5Y细胞凋亡有一定抑制作用,且与线粒体自噬有关。在本研究基础上,通过动物实验验证Mxi1-0在缺氧缺血脑损伤中的抗凋亡作用并进一步研究其调控线粒体自噬的机制,对临床治疗缺氧缺血性脑损伤具有指导意义。

#### [参考文献]

- [1] KURINCZUK J J, WHITE-KONING M, BADAWI N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy[J]. *Early Hum Dev*, 2010, 86(6): 329-338
- [2] ZHU Q Z, ZHANG Y F, LIU Y L, et al. MLIF alleviates SH-SY5Y neuroblastoma injury induced by oxygen-glucose deprivation by targeting eukaryotic translation elongation factor 1 A2[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149965
- [3] TANG Y C, TIAN H X, YI T, et al. The critical roles of mitophagy in cerebral ischemia[J]. *Protein Cell*, 2016, 7(10): 699-713
- [4] 顾军,殷建,殷照阳,等. 缺血预处理通过增强自噬水平及抑制自噬性细胞死亡保护脊髓神经[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(11): 1504-1510
- [5] ENGSTROM L D, YOUKILIS A S, GORELICK J L, et al. Mxi1-0, an alternatively transcribed Mxi1 isoform, is overexpressed in glioblastomas[J]. *Neoplasia*, 2004, 6(5): 660-673
- [6] HU Z, WANG F, WU Z, et al. FOXO3a-dependent up-regu-

- lation of Mxi1-0 promotes hypoxia-induced apoptosis in endothelial cells[J]. *Cell Signal*, 2018, 51: 233-242
- [7] HU Z, DONG N, LU D, et al. A positive feedback loop between ROS and Mxi1-0 promotes hypoxia-induced VEGF expression in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cell Signal*, 2017, 31: 79-86
- [8] ZHENG D, WU W, DONG N, et al. Mxd1 mediates hypoxia-induced cisplatin resistance in osteosarcoma cells by repression of the PTEN tumor suppressor gene[J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(10): 2234-2244
- [9] QIN X, CHENG J, ZHONG Y, et al. Mechanism and treatment related to oxidative stress in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12: 88
- [10] 李明熹, 屈 艺, 母得志. 线粒体自噬对新生大鼠缺氧缺血脑损伤的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(2): 242-249
- [11] LI Q, ZHANG T, WANG J, et al. Rapamycin attenuates mitochondrial dysfunction via activation of mitophagy in experimental ischemic stroke [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 444(2): 182-188
- [12] CUI D, SUN D, WANG X, et al. Impaired autophagosome clearance contributes to neuronal death in a piglet model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(7): e2919
- [13] SHEN Z, ZHENG Y, WU J, et al. PARK2-dependent mitophagy induced by acidic postconditioning protects against focal cerebral ischemia and extends the reperfusion window[J]. *Autophagy*, 2017, 13(3): 473-485
- [14] LÖFSTEDT T, FREDLUND E, NOGUERA R, et al. HIF-1 $\alpha$  induces MXI1 by alternate promoter usage in human neuroblastoma cells [J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(11): 1924-36
- [15] LI L, LI L, ZHOU X, et al. Silver nanoparticles induce protective autophagy via Ca/CaMKK $\beta$ /AMPK/mTOR pathway in SH-SY5Y cells and rat brains[J]. *Nanotoxicology*, 2019, 13(3): 369-391
- [16] ZHANG HT, MI L, WANG T, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy play a protective role in manganese induced apoptosis in SH-SY5Y cells [J]. *Toxicol in Vitro*, 2016, 34: 212-219
- [17] ZUO W, ZHANG S, XIA C Y, et al. Mitochondria autophagy is induced after hypoxic/ischemic stress in a Drp1 dependent manner: the role of inhibition of Drp1 in ischemic brain damage [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 86: 103-115
- [18] WU X, LI X, LIU Y, et al. Hydrogen exerts neuroprotective effects on OGD/R damaged neurons in rat hippocampal by protecting mitochondrial function via regulating mitophagy mediated by PINK1/Parkin signaling pathway [J]. *Brain Res*, 2018, 1698: 89-98
- [19] LI F, TAN J, ZHOU F, et al. Heat shock protein B8 (HSPB8) reduces oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury via the induction of mitophagy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(4): 1492-1504

[收稿日期] 2019-09-28

(上接第 795 页)

- [2] 重庆医科大学附属儿童医院新型冠状病毒感染诊治专家组, 许红梅, 罗征秀, 等. 儿童新型冠状病毒感染诊疗方案(重庆医科大学附属儿童医院试行第二版)[J]. *儿科药学杂志*, 2020, 26(4): 10-14
- [3] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)[J]. *中国感染控制杂志*, 2020, 19(2): 192-195
- [4] HUANG C, WANG Y, LI X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506
- [5] 赵东赤, 金润铭, 刘智胜, 等. 湖北省儿童新型冠状病毒感染诊疗建议(试行第一版)[J]. *中国当代儿科杂志*, 2020, 22(2): 96-99
- [6] NIDETZ N F, MCGEE M C, TSE L V, et al. Adeno-associated viral vector-mediated immune responses: understanding barriers to gene delivery [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 207: 107453
- [7] CHEN N, ZHOU M, DONG X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 507-513
- [8] 蔡兴龙, 刘 璇, 黄 玲, 等. 南京地区 91 例新型冠状病毒肺炎患者首次入院相关实验室检查结果分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(4): 478-484
- [9] CHANNAPPANAVAR R, ZHAO J, PERLMAN S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses [J]. *Immunol Res*, 2014, 59(1-3): 118-128
- [10] ZHAO J, ZHAO J, MANGALAM A K, et al. Airway memory CD4 (+) T cells mediate protective immunity against emerging respiratory coronaviruses [J]. *Immunity*, 2016, 44(6): 1379-1391

[收稿日期] 2020-04-16