

## rhEPO对缺糖缺氧大鼠星形胶质细胞的保护 作用及其DNA甲基转移酶的影响<sup>①</sup>

杨静<sup>1</sup>, 贾建新<sup>1</sup>, 庞一强<sup>2②</sup>

(1. 包头医学院基础医学与法医学院, 内蒙古 包头 014040

E-mail: yangjing2569@126.com;

2. 内蒙古包头市第四医院, 内蒙古 包头 014040)

**摘要:** **目的** 研究重组人促红细胞生成素(rhEPO)对氧糖剥夺(OGD)条件下大鼠星形胶质细胞DNA甲基转移酶(DNMT)水平的影响。**方法** 用不同浓度rhEPO与星形胶质细胞在OGD条件下共培养6h,用台盼蓝拒染法测定细胞损伤程度,RT-PCR测定DNMT1、DNMT3A/3B mRNA的表达变化。**结果** 在缺糖缺氧培养组,星形胶质细胞在OGD培养后1h出现死亡并持续加重,至5~6h时死亡率达到高峰;20 U/ml rhEPO组和100 U/ml rhEPO组细胞死亡率,星形胶质细胞DNMT1、DNMT3A/3B mRNA水平均低于OGD对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.001$ ),但不同浓度rhEPO对DNMT3A/3B影响差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** rhEPO可以对缺糖缺氧培养大鼠星形胶质细胞起到保护作用,其作用机制可能与其改变DNMT1、DNMT3A/3B mRNA水平有关。

**关键词:** 重组人促红细胞生成素;星形胶质细胞;DNA甲基转移酶;缺糖缺氧

**中图分类号:** R742.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2016)06-0570-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.06.005

### Protective function of rhEPO and the effects of rhEPO on DNMT in astrocytes of rats cultured by oxygen-glucose deprivation

Yang Jing<sup>1</sup>, Jia Jianxin<sup>1</sup>, Pang Yiqiang<sup>2</sup>

(1. School of Basic Medicine and Forensic Medicine, Baotou Medical College,  
Baotou 014060, Inner Mongolia E-mail: yangjing2569@126.com;

2. The Fourth Hospital of Baotou, Baotou 014060, Inner Mongolia)

**Abstract:** **Objective** To study the effects of recombinant human erythropoietin (rhEPO) on the levels of DNA methyltransferase (DNMT) in astrocytes of rats cultured under the condition of oxygen-glucose deprivation (OGD). **Methods** Different concentrations of rhEPO and astrocytes were cultured for 6 hours under the condition of OGD, the trypan blue staining method was used to detect the injured degree of astrocyte, and a real-time PCR technique was used to detect the expression changes of DNMT1, DNMT3A/3B mRNA. **Results**

In OGD group, astrocytes started to die after 1-hour culture and the cell mortality continued to increase and reached to the peak at 5 to 6 h; the cell mortality was significantly lower in the groups of 20 U/ml rhEPO and 100 U/ml rhEPO than that in the OGD control group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.001$ ). In comparison with OGD control group, levels of astrocyte DNMT1, DNMT3A/3B mRNA were found to be decreased in the groups of 20 U/ml rhEPO and 100 U/ml rhEPO ( $P < 0.05$ ), but the changes of DNMT3A/3B between 20 U/ml rhEPO

① 基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2013MS1111);包头市医药卫生科技计划项目(Wsjj2015016)

② 通信作者,E-mail:pyq5417@sohu.com

and 100 U/ml rhEPO were not obvious ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** RhEPO plays a protective role of rats astrocytes cultured under the condition of OGD, its mechanism may be related to that rhEPO regulates the expressions of DNMT1, DNMT3A/3B mRNA.

**Key words:** recombinant human erythropoietin; astrocyte; DNA methyltransferase; oxygen-glucose deprivation

星形胶质细胞是中枢神经系统内数量最多的一种胶质细胞,可通过多种途径如分泌多种神经营养因子或细胞因子,起到支持、保护和营养神经元,维持中枢神经系统稳态的作用。脑缺血损伤时,星形胶质细胞可以通过改变其膜上谷氨酸转运体的表达,减少过多的兴奋性氨基酸以及其他有害物质如自由基等的迅速堆积,还可以释放营养因子营养和修复神经元,以缓解缺血给神经元带来的伤害,对保护缺血引起的神经元损伤有着十分重要的作用<sup>[1-3]</sup>。

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)在临床中是一种成熟有效的贫血治疗药物,前期的诸多实验证实了EPO可以通过多条途径对缺血性脑损伤起到保护作用,其中包括在缺血过程中对星形胶质细胞的保护作用<sup>[4-6]</sup>。DNA甲基化作为表观遗传学的主要修饰形式,是目前表观遗传学中研究最多、最深入的领域。周成江等<sup>[7]</sup>通过实验发现DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)3A和3B水平及DNMT活力的变化可能与低氧预适应小鼠获得脑保护的关系密切。本研究则是利用不同浓度的重组人促红细胞生成素(rhEPO)与大鼠星形胶质细胞在氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)条件下共培养,研究rhEPO在缺糖缺氧过程中对星形胶质细胞的作用及其对DNMT表达的影响,进一步探讨rhEPO在OGD条件下对星形胶质细胞发挥保护作用的机制。

## 1 材料与方法

1.1 材料 大鼠星形胶质细胞(ATCC CRL-2006);DMEM(高糖)培养液(Hyclone);DMEM(无糖)培养液(Neuronbc);连二亚硫酸钠(阿拉丁);rhEPO(上海凯茂生物医药有限公司);0.4%台盼蓝(Gibco);总RNA提取试剂盒(Biosharp);反转录试剂盒(Thermo);SYBR Premix EX Taq (TakaRa);其余试剂均为国产试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠星形胶质细胞的 OGD 培养 常规复苏大鼠星形胶质细胞,用DMEM(高糖)培养液培养至细胞基本融合并铺满瓶底80%~90%后,将原培养液倒

出,用PBS清洗细胞3次,然后在细胞中加入含10 mmol/L连二亚硫酸钠的DMEM无糖培养液<sup>[8-9]</sup>并一同转移至厌氧培养箱中(培养箱中充入95%的氮气和5%二氧化碳的混合气),进行OGD培养并计时,分别进行OGD培养0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h,然后用台盼蓝拒染法检测不同时间点的星形胶质细胞死亡率。

1.2.2 rhEPO对大鼠星形胶质细胞 OGD 培养细胞死亡率的影响 将星形胶质细胞接种于6孔细胞培养板中,分为四个组,每组三个复孔,分别是OGD对照组(只给予OGD 6 h处理,不加药物),rhEPO两个剂量组(OGD处理6 h,同时加入rhEPO使其终浓度分别为20 U/ml、100 U/ml)和1个正常对照组(不加药物及不进行OGD)。rhEPO在OGD时给药,并与OGD作用时间相同。OGD培养时间结束后,用台盼蓝拒染法检测细胞死亡率。

1.2.3 实时定量PCR检测rhEPO对大鼠星形胶质细胞 OGD 培养后细胞中DNMT1、DNMT3A/3B水平的影响 将星形胶质细胞接种于6孔细胞培养板中,分为四个组,每组三个复孔,分别是OGD对照组(给予OGD 6 h处理),rhEPO两个剂量组(终浓度分别为20 U/ml、100 U/ml)和1个正常对照组。取出不同组3个孔的细胞,参照李炳秋等<sup>[10]</sup>方法用胰酶消化细胞,用PBS洗脱,1700 r/min离心5 min,去上清,收集细胞。使用TRIzol Reagent试剂盒抽提细胞的总RNA,并用DEPC水定量至0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。使用PrimeScript One Step RT-PCR Kit将总RNA逆转录成cDNA,并定量。以表1中引物进行实时定量PCR,以GAPDH为内参,使用SYBR Green荧光定量PCR试剂盒和伯乐的IQ5 PCR系统扩增cDNA中的DNMT1、DNMT3A/3B基因片段和GAPDH基因片段,每个样本设3个复孔。反应条件设置为:第一阶段:95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min,第二阶段(40 cycles):95  $^{\circ}\text{C}$ ,15 s;60  $^{\circ}\text{C}$ ,30 s;72  $^{\circ}\text{C}$ ,1 min。计算每个样品DNMT和GAPDH的 $\Delta\text{Ct}$ ,并采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算每个样品中DNMT的mRNA转录倍数。

表 1 实验用引物

名称	正向引物	反向引物	产物大小 (bp)
GAPDH	F:5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3'	R:5'-CCTGCTCACCACCTTCTTG-3'	238
DNMT1	F:5'-CCATCACGTCTCACTCAAGG-3'	R:5'-TGCGTTTCTTATCCTGGTCTC-3'	220
DNMT3A	F:5'-CTGATGACGAGCCCGAGTAT-3'	R:5'-CTGTCATCCACCAAGACACAA-3'	157
DNMT3B	F:5'-GATGATCGACGCCATCAAG-3'	R:5'-CGAGCTTATCATTCTTTGAAGCTA-3'	287

1.2.4 统计学方法 结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行处理和分析,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 OGD 培养不同时间星形胶质细胞死亡率 随着缺氧缺氧培养时间的延长,星形胶质细胞死亡率逐渐增高,至 5~6 h 基本达到稳定,见表 2。

表 2 OGD 不同时间点大鼠星形胶质细胞死亡率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

OGD 时间(h)	0	1	2	3	4	5	6
星形细胞死亡率	0	8.33±3.51 <sup>a</sup>	21.33±4.04 <sup>a</sup>	45.67±4.04 <sup>b</sup>	70.00±6.24 <sup>b</sup>	84.67±2.52 <sup>a</sup>	86.67±8.50

注:与前一个时间点比较,a: $P < 0.05$ ,b: $P < 0.01$

2.2 不同浓度 rhEPO 对 OGD 大鼠星形胶质细胞死亡率的影响 不同浓度 rhEPO 均可显著降低 OGD 培养大鼠星形胶质细胞死亡率,差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.001$ )。且 rhEPO 浓度越高,细胞死亡率越低,20 U/ml rhEPO 处理组比 OGD 对照组细胞死亡率降低了 6.2 倍,100 U/ml rhEPO 处理组比 OGD 对照组细胞死亡率降低了 11.1 倍,见表 3。20 U/ml rhEPO 比 100 U/ml rhEPO 组星形胶质细胞死亡率高,两者比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表 3 不同浓度 rhEPO 处理 OGD 大鼠星形胶质细胞死亡率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	正常	OGD	20 U/ml	100 U/ml
	对照组	对照组	rhEPO 组	rhEPO 组
星形细胞死亡率	0	85.00±4.36	13.67±1.15 <sup>b</sup>	7.67±0.58 <sup>a</sup>

注:与 OGD 对照组比较,a: $P < 0.05$ ,b: $P < 0.001$

2.3 DNMT1、DNMT3A/3B mRNA 水平变化 OGD 对照组 DNMT1、DNMT3A/3B mRNA 水平明显高于正常对照组( $P < 0.05$ ),说明 OGD 培养后影响了 DNMT1、DNMT3A/3B mRNA 水平,20 U/ml rhEPO 组和 100 U/ml rhEPO 组的 DNMT1、DNMT3A/3B mRNA 水平显著低于 OGD 对照组( $P < 0.05$ ),100 U/ml rhEPO 组和 20 U/ml rhEPO 组组间 DNMT3A、DNMT3B 水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),说明使用 rhEPO 后降低了因 OGD 引起的 DNMT1、DNMT3A/3B mRNA 水平升高,见表 4。

表 4 不同浓度 rhEPO 处理组 OGD 星形胶质细胞 DNMT1、DNMT3A/3B mRNA 水平变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

指标	正常	OGD	20 U/ml	100 U/ml
	对照组	对照组	rhEPO 组	rhEPO 组
DNMT 1	0.74±0.37 <sup>a</sup>	170.85±6.64	1.09±0.20 <sup>a</sup>	0.57±0.02 <sup>a</sup>
DNMT 3A	1.01±0.03 <sup>a</sup>	362.52±36.19	1.44±1.30 <sup>a</sup>	1.30±0.18 <sup>a</sup>
DNMT 3B	0.80±0.28 <sup>a</sup>	512.66±38.44	0.36±0.42 <sup>a</sup>	0.34±0.16 <sup>a</sup>

注:与 OGD 对照组比较,a: $P < 0.05$ 。本表数据采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算,以 GAPDH 为内参

## 3 讨论

DNA 甲基化是最早被发现,机体内关键的表观遗传修饰之一<sup>[11]</sup>,其过程是在 DNMT 的催化下,利用 S-腺苷甲硫氨酸提供甲基,转移到胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸(CpG)中胞嘧啶的第 5 位碳原子上,使之转化为 5-甲基胞嘧啶(5 methyl cytosine,5mC)的过程。DNA 甲基转移酶主要有三种,分别为 DNMT1、DNMT3A/3B。DNMT1 作用于已经发生甲基化的 DNA 双链中的另一条链,使其完全甲基化;DNMT3A/3B 可以从头使 CpG 岛发生甲基化,使其半甲基化,继而使其全甲基化<sup>[12-13]</sup>。在脑组织发生缺血缺氧时甲基化水平和 DNMTs 的变化研究结果并不相同,Lee JC 等<sup>[3]</sup>对沙鼠进行脑缺血处理,发现 DNMT1 在海马 CA1 区的免疫活性及表达下降,他们认为缺血诱导的 DNA 甲基化可能在 DNA 损伤或修复过程中影响到神经元 DNMTs 活性。但也有研究报道,甲基化参与了缺血性脑损伤,缺血再灌注能使大鼠甲基化增加 3~4 倍<sup>[14]</sup>。本实验发现了 OGD 培养的大鼠星形胶质细胞中三种甲基化转移酶 mRNA 转录水平的升高,不仅与杨清麟

等<sup>[15]</sup>的结果一致,更进一步证实了缺氧可以通过改变 DNMT 表达水平进而改变星形胶质细胞 DNA 甲基化状态。

EPO 是一种酸性糖蛋白,通过与其靶细胞表面的 EPO 受体(EPOR)结合发挥作用。研究发现,EPOR 在体内多种组织及细胞均有表达,包括中枢神经系统中的神经元及胶质细胞<sup>[16-17]</sup>,并且在缺氧缺血性脑损伤及外伤性脑损伤等多种中枢神经系统疾病中发挥着神经保护作用。如 Wang L 等<sup>[18]</sup>研究发现,rhEPO 通过改善内皮祖细胞的动员和随后的血管生成促进大鼠 TBI 后的神经功能的恢复;Ren Q 等<sup>[19]</sup>发现在早产新生鼠的缺血缺氧脑损伤模型中,应用 EPO 治疗可以减轻白质损伤。陈勤玲等<sup>[5]</sup>则发现 EPO 可以上调因缺氧缺血导致的海马组织、大脑皮层中谷氨酸转运体 EAAT1 和 EAAT2 表达量的降低。实验中,我们发现 rhEPO 可以提高缺糖缺氧培养星形胶质细胞的存活率,说明 rhEPO 对 OGD 培养星形胶质细胞起到保护作用,并降低了缺糖缺氧培养星形胶质细胞的 DNMT 的 mRNA 水平,而 DNMT 又与细胞内 DNA 甲基化状态密切相关,说明 rhEPO 对 OGD 培养星形胶质细胞的保护作用很可能与改变其细胞内 DNA 甲基化状态有关,具体其影响了下游哪些基因的甲基化状态还需我们今后深入研究。

#### 参考文献:

[1] 孙莉,赵燕,陈诚,等. 盐酸法舒地尔对体外培养星形胶质细胞氧糖剥夺损伤的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2015,29(3):385-390.

[2] 庞一强,杨静,吴刚,等. rhEPO 对缺糖缺氧大鼠星形胶质细胞 GLT-1, GLAST 表达的影响[J]. 动物医学进展,2016,37(10):81-84.

[3] Lee JC, Park JH, Yan BC, et al. Effects of transient cerebral ischemia on the expression of DNA methyltransferase 1 in the gerbil hippocampal CA1 region[J]. Neurochem Res,2013,38(1):74-81.

[4] 赵德福,宁显忠. 促红细胞生成素对脑缺血再灌注炎症损伤的抑制作用[J]. 辽宁医学院学报,2016,37(2):6-8.

[5] 陈勤玲,蒋辉英,杨梅,等. 促红细胞生成素对缺氧缺血性脑损伤保护作用机制的研究[J]. 中国儿童保健杂志,2016,24(8):825-828.

[6] 张晶,黄蕊,郝玲,等. 促红细胞生成素对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织 Fas/FasL 表达的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2015,31(12):1146-1149.

[7] 周成江,张妹,姜树原,等. DNA 甲基转移酶 1、3A 和 3B 在低氧预适应小鼠大脑表达的变化[J]. 基础医学与临床,2014,34(2):151-154.

[8] 黄鹤鸣. 大鼠星形胶质细胞糖氧剥夺后 AQP4 表达变化及 1,5-DCQA 干预作用[D]. 广州:暨南大学,2013.

[9] 石瑞丽,胡金凤,孔令雷,等. 瓜子金皂苷对连二亚硫酸钠致氧糖剥夺/复供诱导 PC12 细胞凋亡的抑制作用[J]. 中国药理学通报,2013,29(3):333-336.

[10] 李炳秋,张玉祥. Notch1 和 Notch2 对胰腺癌 HPAC 细胞中 Hes 家族靶基因的不同调控作用[J]. 首都医科大学学报,2015,36(2):244-250.

[11] 肖小晶,唐含林,姬晨,等. DNA 甲基化在中枢神经系统发育中的研究进展[J]. 生理科学进展,2014,45(5):399-401.

[12] 刘健楠. 乳腺浸润性导管癌中 GCS 的表达及甲基化研究[D]. 济南:山东大学,2014.

[13] 韦连登,庞雅琴,农碧燕,等. 环境化学污染与 DNA 甲基化[J]. 右江民族医学院学报,2014,36(1):78-80.

[14] 张妹. 低氧预适应小鼠海马中 DNA 甲基化转移酶、Reelin 和蛋白磷酸酶-1 的表达[D]. 包头:内蒙古科技大学包头医学院,2013.

[15] 杨清麟,李良. 缺氧对星形胶质细胞 DNA 甲基化及组蛋白乙酰化相关酶的表达影响[J]. 中国比较医学杂志,2014,24(1):26-30.

[16] 张晶,黄蕊,郝玲,等. 促红细胞生成素对缺氧缺血性脑损伤大鼠的脑保护作用及机制[J]. 山东医药,2015,55(17):13-16.

[17] 汤茜,胡智盛. 重组人促红细胞生成素对新生儿缺氧缺血性脑病疗效分析[J]. 右江民族医学院学报,2014,36(1):46-47.

[18] Wang L, Wang X, Su H, et al. Recombinant human erythropoietin improves the neurofunctional recovery of rats following traumatic brain injury via an increase in circulating endothelial progenitor cells [J]. Transl Stroke Res,2015, 6(1):50-59.

[19] Ren Q, Zhang XF, Yang JY. Erythropoietin reduces white matter damage in two-day-old rats exposed to hypoxic/ischemia injury[J]. Neurol Res,2016,8:1-7.

收稿日期:2016-11-08;修回日期:2016-11-25