

低氧预适应对氧糖剥夺/复糖复氧损伤的BV2细胞的 保护作用及其NLRP3表达的影响

杨静^{1,2}, 陈宇^{1,2}, 庞一强³

- (1. 包头医学院基础医学与法医学院, 内蒙古 包头 014040;
2. 包头医学院研究生学院, 内蒙古 包头 014040;
3. 内蒙古包头市第四医院, 内蒙古 包头 014030)

摘要:目的 研究低氧预适应(HPC)对氧糖剥夺/复糖复氧(OGD/R)损伤的BV2细胞的保护作用及其NLRP3表达的影响。**方法** 将BV2细胞分为4组,分别为常氧组,HPC组,HPC+OGD/R组和OGD/R组,用MTS法测定细胞活力,蛋白免疫印迹测定BV2细胞中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3,NLRP3)蛋白的表达。**结果** 与常氧组相比,OGD/R组的细胞活力明显降低($P < 0.05$)。给予1%O₂低氧2h/复氧2h的低氧预适应后,HPC+OGD/R组细胞活力明显高于其它HPC条件及OGD/R组的细胞活力($P < 0.05$),且HPC+OGD/R组NLRP3蛋白的表达显著低于OGD/R组($P < 0.05$)。**结论** 低氧预适应可对氧糖剥夺/复糖复氧损伤的BV2细胞起到保护作用,其作用机制可能与其降低氧糖剥夺/复糖复氧损伤的BV2细胞NLRP3的表达水平有关。

关键词:低氧预适应;氧糖剥夺/复糖复氧;BV2;NLRP3

中图分类号:R743.3

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2020)02-0159-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.02.006

Protective function of hypoxia preconditioning on oxygen-glucose deprivation/ reoxygenation-induced BV2 cells injury and its effects on NLRP3 expression in BV2 cells

Yang Jing^{1,2}, Chen Yu^{1,2}, Pang Yiqiang³

- (1. Department of Basic Medicine and Forensic Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014040, Inner Mongolia, China;
2. Graduate School of Baotou Medical College, Baotou 014040, Inner Mongolia, China;
3. The Fourth Hospital of Baotou, Baotou 014030, Inner Mongolia, China)

Abstract: **Objective** To study the protective effects of hypoxia preconditioning (HPC) on the injured BV2 cells induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) and its effects on nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) expression. **Methods** BV2 cells were divided into 4 groups: normoxia group, HPC group, HPC+OGD/R group and OGD/R group, cell viability was determined by using MTS method, and the protein expression of NLRP3 in BV2 cells was determined by using Western

基金项目:内蒙古自治区卫生计生科研计划项目(201702138);内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY18189);包头市科技计划项目(2018C2007-4-10);包头市医药卫生科技计划项目(wsjj2019036)

第一作者简介:杨静(1981-),女,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:低氧预适应脑保护及纳米颗粒物的神经毒理学研究,E-mail:yangjing2569@126.com

通讯作者简介:庞一强(1978-),男,在读博士研究生,副主任医师,研究方向:神经损伤及修复机制研究,E-mail:pyq5417@sohu.com

Blot. **Results** Compared with the normoxia group, the cell viability of OGD/R group was significantly reduced ($P < 0.05$). After receiving hypoxia preconditioning of 1% O_2 hypoxia for 2 hours / reoxygenation for 2 hours, the cell viability of HPC+OGD/R group was significantly higher than that of other HPC conditions and OGD/R group ($P < 0.05$), and the protein expression of NLRP3 in HPC+OGD/R group was significantly lower than that in OGD/R group ($P < 0.05$). **Conclusion** HPC may protect OGD/R-induced BV2 cells injury. The mechanism may be related to reducing NLRP3 protein expression in the injured BV2 cells induced by OGD/R.

Key words: hypoxia preconditioning; oxygen-glucose deprivation/ reoxygenation; BV2; nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3

近年来,我国卒中疾病负担日趋加重,统计数据显示,2014 年我国脑卒中死亡率达 153.61/10 万人,我国卒中死亡人数占全球的 29.4%。脑卒中分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中最为多见^[1]。目前救治急性缺血性脑卒中患者最有效的手段是尽早通过血管内介入取栓或药物溶栓,使阻塞血管再通,恢复脑组织血液循环,但部分患者随着血管再通却引起了缺血区的二次损伤即脑缺血再灌注(Ischemia/Reperfusion,I/R)损伤^[2]。I/R 脑损伤是多因素参与的极其复杂的机制,近年来越来越多的研究表明,炎症反应与 I/R 脑损伤密切相关^[3-5],小胶质细胞作为中枢神经系统的常驻免疫细胞,约占健康哺乳动物大脑细胞总数的 10%,作为单核-巨噬细胞家族的成员,是神经炎症的主要效应细胞之一,具有识别和清除死亡细胞、病原体和一些内源性化合物和外源化合物的作用^[6]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3,NLRP3)炎症体作为研究最广泛的炎症体,存在于中枢神经系统的小胶质细胞和星形胶质细胞中^[7]。最近的研究结果表明,NLRP3 炎症小体介导的炎症反应在缺血性缺血再灌注损伤中发挥着重要的作用,抑制 NLRP3 炎症小体可对缺血性脑卒中缺血再灌注损伤发挥保护作用^[8],因此,NLRP3 炎症信号可能是缺血性脑卒中治疗的一个潜在的治疗靶点。低氧预适应(Hypoxia preconditioning,HPC)是指生物体、系统、器官、组织或细胞暴露于亚致死性低氧/缺血中,导致对随后发生的严重缺氧/缺血的抵抗力增强的现象^[9]。有研究表明^[10],低氧预适应可以明显减小缺血性脑卒中的梗塞面积,对缺血性脑卒中起到神经保护作用。本文则利用小鼠小胶质细胞系 BV2 细胞,利用体外氧糖剥夺/复糖复氧(OGD/R)培养,模拟体内缺血性脑卒中缺血再灌注损伤过程,观察低氧预适应是否可以缺血性脑卒中缺血再灌注损伤起到保护作用,并观察低氧预适应对其 NLRP3 蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 BV2 细胞(小鼠小胶质细胞系,上海拜力

生物公司);DMEM(高糖)培养基(美国 Gibco 公司);DMEM(无糖)培养液基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);青链霉素(美国 Gibco 公司);MTS 活细胞数量检测试剂盒(美国 Promega 公司);RIPA 裂解液(中国 Beyotime 公司);BCA 法蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司);兔源抗 NLRP3 抗体(美国 CST 公司);鼠源抗 β -actin 单克隆抗体(美国 Santa cruz 公司);驴抗兔 HRP 结合二抗(中国 Bioss 公司),山羊抗鼠 HRP 结合二抗(中国中杉金桥公司);超敏 ECL 化学发光试剂(中国 Applygen 公司)。其余试剂均为国产试剂。

1.2 方法

1.2.1 BV2 细胞的 OGD/R 培养 常规复苏 BV2 细胞,用含 10%胎牛血清的 DMEM(高糖)培养基培养至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,BV2 细胞按一定密度接种于 96 孔板中,用含 10%胎牛血清的 DMEM(高糖)培养基培养 24 h 后,弃培养基,用无糖、无血清的 DMEM 培养基更换,置于含 37℃,1% O_2 、94% N_2 、5% CO_2 的三气培养箱中培养。分别进行低氧培养 1 h、2 h、3 h、4 h,然后进行复氧,即将细胞置于二氧化碳培养箱中常规培养(37℃,95%空气,5% CO_2)2 h,应用 MTS 法测定细胞活力,选择细胞活力最低的一组作为 OGD/R 模型。

1.2.2 HPC 对 BV2 细胞 OGD/R 培养细胞活力的影响 BV2 细胞按一定密度接种于 96 孔板中,用含 10%胎牛血清的 DMEM(高糖)培养基培养 24 h 后,进行低氧预适应处理,低氧预适应条件为:A:1% O_2 低氧 30 min/复氧 30 min \times 4 次;B:1% O_2 低氧 2 h/复氧 2 h;C:1% O_2 低氧 30 min/复氧 30 min \times 2 次;D:1% O_2 低氧 1 h/复氧 1 h;之后立即进行 OGD/R,应用 MTS 法测定细胞活力,选择细胞活力最高的一组作为 HPC+OGD/R 模型。

1.2.3 蛋白免疫印迹检测不同处理组 BV2 细胞 NLRP3 表达的变化 BV2 细胞分为 4 组,分别为常氧(Normoxia,N)组,HPC 组,HPC+OGD/R 组,OGD/

R 组,按一定密度接种于 100 mm 培养皿中,用含 10%胎牛血清的 DMEM(高糖)培养基培养至细胞铺满培养皿底 80%左右,常氧组继续置于二氧化碳培养箱中常规培养(37℃,95%空气,5% CO₂),其余三组按照各组条件进行培养,处理结束后收集各组培养皿中细胞,按照文献^[1]方法用加有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液辅助超声波破碎仪将细胞进行裂解提取全细胞裂解液,并用 BCA 法测定各组蛋白质含量,各组样品以 20 μg 进行蛋白免疫印迹实验,检测 NLRP3 表达的变化。

1.3 统计学方法 应用 IBM SPSS Statistics 20.0 软件进行数据处理,计量资料结果以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(One Way ANOVA)统计方法进行分析,若方差不齐,采用 Games-Howell 进行统计学分析。差异显著性水平为 $P < 0.05$,GraphPad Prism 5 绘图软件进行绘图处理。

2 结果

2.1 不同 OGD 培养时间后 OGD/R BV2 细胞的细胞活力 与常氧(N)组比较,OGD 1 h、2 h、3 h、4 h 后复氧 2 h,BV2 细胞活力逐渐降低,至 OGD 3 h/R 2 h 时,细胞活力降至最低($P < 0.05$),OGD 4 h/R 2 h 与 OGD 3 h/R 2 h 细胞活力比较差异不大($P > 0.05$),故实验选择 OGD 3h/R 2 h 作为体外模拟脑缺血再灌注(OGD/R)模型,见图 1。

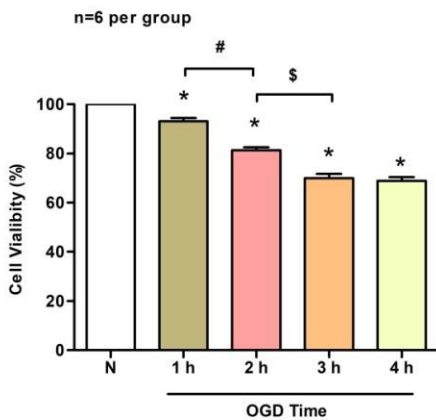


图 1 不同 OGD 时间对 OGD/R 培养 BV2 细胞活力的影响 注:与 N 组比较,* $P < 0.05$;OGD 1 h 与 OGD 2 h 比较,# $P < 0.05$;OGD 2 h 与 OGD 3 h 比较,\$ $P < 0.05$

2.2 不同 HPC 条件处理后进行 OGD 3 h/R 2 h 处理的 BV2 细胞活力 将 BV2 细胞分为 4 个不同 HPC 条件处理组,分别为 A:1%O₂ 低氧 30 min/复氧 30 min×4 次;B:1%O₂ 低氧 2 h/复氧 2 h;C:1%O₂ 低氧 30 min /复氧 30 min×2 次;D:1%O₂ 低氧 1 h/复氧 1 h。与对照组(OGD 3 h/R 2 h)比较,4 个 HPC 条

件中,1%O₂ 低氧 2 h/复氧 2 h+ OGD 3 h/R 2 h 细胞活力最高,故后续实验选择 1%O₂ 低氧 2 h/复氧 2 h+OGD 3 h/R 2 h 为体外 HPC+OGD/R 模型。见图 2。

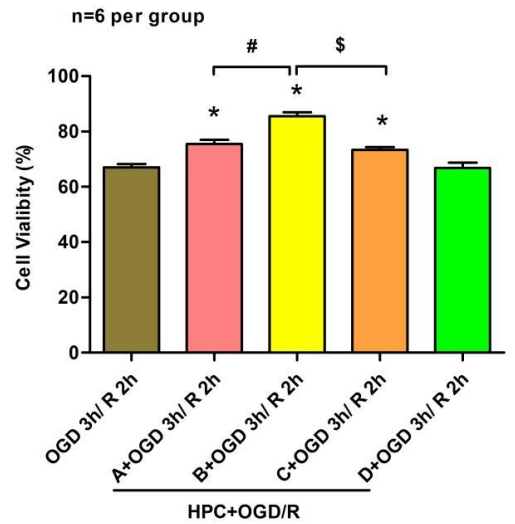


图 2 不同 HPC 条件对 OGD 3 h/R 2 h BV2 细胞活力的影响 注:与 OGD3 h/R 2 h 组比较,* $P < 0.05$;A+OGD 3 h/R 2 h 与 B+OGD 3 h/R 2 h 比较,# $P < 0.05$;B+OGD 3 h/R 2 h 与 C+OGD 3 h/R 2 h 比较,\$ $P < 0.05$ 。A:1%O₂ 低氧 30 min/复氧 30 min×4 次;B:1%O₂ 低氧 2 h/复氧 2 h;C:1%O₂ 低氧 30 min/复氧 30 min×2 次;D:1%O₂ 低氧 1 h/复氧 1 h

2.3 不同处理组间 NLRP3 蛋白表达的变化 与常氧组比较,HPC 组 NLRP3 表达有升高的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),HPC + OGD/R 组和 OGD/R 组 NLRP3 均高于常氧组和 HPC 组($P < 0.05$);但经低氧预适应处理后,HPC + OGD/R 组的 NLRP3 表达明显低于单纯 OGD/R 组($P < 0.05$),见图 3。

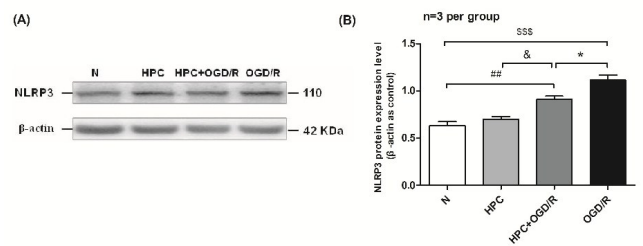


图 3 不同处理组 BV2 细胞 NLRP3 表达的变化 注:OGD/R 组与 HPC+OGD/R 组比较,* $P < 0.05$;OGD/R 组与 N 组比较,\$ \$ $P < 0.001$;HPC+OGD/R 组与 N 组比较,# # $P < 0.01$;HPC+OGD/R 组与 HPC 组比较,& $P < 0.05$

3 讨论

低氧预适应是机体耐受低氧过程中产生的内源性

保护机制,其具体机制到目前为止尚不十分明确。吕国蔚教授提出低氧耐受的组织和细胞机制可能是具有脑保护作用“好的基因”表达上调并使具有脑损伤作用“坏的基因”表达下调,例如,在已经报道的低氧预适应的分子机制中有血管内皮生长因子(VEGF)、红细胞生成素(EPO)和缺氧诱导因子(HIF)等这些神经保护介质上调^[9,12]。本研究则通过体外 OGD/R 实验模拟了缺血性脑卒中后的缺血再灌注损伤,并观察到低氧预适应可以增加 OGD/R 后的细胞活力,而之前有体内实验研究表明,低氧预适应可以对缺血性脑卒中引起的神经损伤起保护作用,其机制可能与对抗缺血性脑卒中的神经元凋亡有关^[10],提示低氧预适应不仅可以对缺血性脑卒中而且对缺血性脑卒中后引起的缺血再灌注损伤起到保护作用。

炎症小体是近年来发现的,由模式识别受体参与组装的多蛋白质复合体结构^[13],NLRP3 炎症小体是其中最受关注的炎症小体之一,也被认为是神经炎症发展的关键因素^[7]。实验性缺血性脑卒中后发现 NLRP3 蛋白表达增加^[14],伴有 IL-1b 和 IL-18 水平升高以及广泛的神经元和胶质细胞死亡^[15],而干预 NLRP3 激活可减少脑卒中梗死体积并降低神经血管损伤水平。由此可见,在缺血性脑卒中缺血再灌注损伤过程中,NLRP3 扮演了“坏的基因”,其介导的神经炎症在缺血/再灌注损伤中也起到十分重要的作用。而在本实验中,通过对 BV2 细胞进行 OGD/R 处理模拟体内缺血性脑卒中后的缺血再灌注损伤,观察到 NLRP3 表达的升高,而经过低氧预适应处理后,可以降低 NLRP3 的表达,提示低氧预适应可以通过降低 NLRP3 这一“坏的基因”对缺血性脑卒中缺血再灌注损伤起到保护作用,但具体调控 NLRP3 表达的分子机制还需进一步的实验研究加以明确。

参考文献:

- [1] 唐标. 线粒体自噬-NLRP3 炎症小体途径在脑缺血再灌注损伤中的作用及三七总皂苷和黄芪甲苷干预的研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2019.
- [2] Khatri R, Mckinney AM, Swenson B, et al. Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke [J]. *Neurology*, 2012, 79 (13 Suppl 1):S52-S55.
- [3] 张楠, 祁晓媛, 潘思培, 等. 香叶木素对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35 (24): 2996-3000, 3007.
- [4] Chunxia Chen, Wan Chen, Zhihuan Nong, et al. Hyperbaric oxygen alleviated cognitive impairments in mice induced by repeated cerebral ischemia-reperfusion injury via inhibition of autophagy [J]. *Life Sciences*, 2020, 241: 117170.
- [5] Ji Liang, Qiang Wang, Jun-Qi Li, et al. Long non-coding RNA MEG3 promotes cerebral ischemia-reperfusion injury through increasing pyroptosis by targeting miR-485/AIM2 axis [J]. *Experimental Neurology*, 2020, 325: 113139.
- [6] Von Bernhardt R, Heredia F, Salgado N, et al. Microglia Function in the Normal Brain [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2016, 949: 67-92.
- [7] Song L, Pei L, Yao S, et al. NLRP3 Inflammasome in Neurological Diseases, from Functions to Therapies [J]. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2017, 11: 63.
- [8] 陆云南. 米诺环素通过抑制 NLRP3 炎症小体激活保护缺血性脑损伤的作用研究[D]. 苏州:苏州大学, 2017.
- [9] Li S, Hafeez A, Noorulla F, et al. Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia [J]. *Progress in neurobiology*, 2017, 157: 79-91.
- [10] Zhao L, Liu X, Liang J, et al. Phosphorylation of p38 MAPK mediates hypoxic preconditioning-induced neuroprotection against cerebral ischemic injury via mitochondria translocation of Bcl-xL in mice [J]. *Brain research*, 2013, 1503: 78-88.
- [11] 高继光, 张莹, 何煜, 等. 氨氯地平对肺腺癌 A549 细胞生长及上皮间质转化的影响 [J]. *右江民族医学院学报*, 2018, 40(4): 319-323.
- [12] Lu GW. Progresses of prospects for hypoxic preconditioning [J]. *Sheng li ke xue jin zhan Progress in physiology*, 2007, 38(1): 32-36.
- [13] 郭莉群, 程艺, 袁银莉, 等. 小鼠 NLRP3 基因腺病毒干扰载体的构建及功能鉴定 [J]. *右江民族医学院学报*, 2019, 41(5): 478-481.
- [14] Bu J, Shi S, Wang HQ, et al. Acacetin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury via the NLRP3 signaling pathway [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(4): 605-612.
- [15] Lammerding L, Slowik A, Johann S, et al. Poststroke Inflammasome Expression and Regulation in the Peri-Infarct Area by Gonadal Steroids after Transient Focal Ischemia in the Rat Brain [J]. *Neuroendocrinology*, 2016, 103(5): 460-475.

收稿日期:2020-02-02;修回日期:2020-02-22