论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1010-03

氯化钴预处理在培养分化的人神经母细胞瘤细胞株缺氧损伤中的保护作用

孙 胜,高文祥,蒋春华,高钰琪 (第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 探讨氧化钴($CoCl_2$)对体外培养分化的人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞株的缺氧损伤保护作用及缺氧诱导因子1、2和其调节基因产物血管内皮生长因子在其中的作用。**方法** 分化的SH-SY5Y细胞分为对照组、化学缺氧预处理组(细胞用50 μmol/L $CoCl_2$预处理3 h,换液后常氧培养1 h,然后在2%的低氧孵箱内缺氧28 h)、缺氧组(无$CoCl_2$预处理过程,其余同化学缺氧预处理组)。用Western blotting法测细胞HIF-1α、HIF-2α和VEGF的蛋白表达,通过乳酸脱氢酶释放率测定、MTT细胞活力测定判断细胞损伤程度。**结果** 化学缺氧预处理组细胞HIF-2α和VEGF的蛋白表达显著高于缺氧组($P<0.01$),HIF-1α蛋白表达在两组之间没有显著性差异($P>0.05$),化学缺氧预处理组细胞较缺氧组细胞存活率高、乳酸脱氢酶释放率减少($P<0.01$)。**结论** $CoCl_2$化学预缺氧可保护分化的SH-SY5Y细胞对缺氧产生耐受,缺氧预处理可能通过HIF-2促进VEGF的表达而产生保护作用。

关键词: 化学缺氧预处理;缺氧诱导因子1;缺氧诱导因子2;血管内皮生长因子;人神经母细胞瘤

中图法分类号: R329.24; R364.4; R453 **文献标识码**: A

Preconditioning with $CoCl_2$ protects against hypoxia injury in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells

SUN Sheng, GAO Wen-xiang, JIANG Chun-hua, GAO Yu-qi (Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of chemical hypoxia preconditioning on hypoxia-induced cell injury, and the roles of HIF-1α, HIF-2α and their target gene product VEGF in chemical hypoxia preconditioning in differentiated SH-SY5Y cells. **Methods** Differentiated SH-SY5Y cells were randomly divided into control group, chemical hypoxic preconditioning group (50 μmol/L $CoCl_2$ for 3 h, then normal culture for 1 h, and 2% O_2 culture for 28 h) and hypoxia group (the same procedures but without $CoCl_2$ preconditioning). Western blotting was used to examine the expression of HIF-1α, HIF-2α and VEGF proteins. Cell viability was evaluated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release and MTT assay to determine the protective effects of chemical hypoxia preconditioning. **Results** The expression of HIF-2α and VEGF proteins increased in the preconditioning group as compared with those in the hypoxia group ($P<0.01$); whereas the expression of HIF-1α protein had no difference between the two gropes. The preconditioned cells had a higher survival rate and a lower lactate dehydrogenase leakage. **Conclusion** $CoCl_2$ preconditioning can protect differentiated SH-SY5Y cells from hypoxia injury. The enhanced VEGF protein level that is mediated, at least in part, by HIF-2α, might be involved in the observed preconditioning effects.

Key words: chemical hypoxia preconditioning; hypoxia inducible factor-1; hypoxia inducible factor-2; vascular endothelial growth factor; human neuroblastoma SH-SY5Y cells

缺氧预处理(hypoxia preconditioning)是指适度的缺氧可触发机体的内源性保护机制,使机体对后继发生的严重缺氧或其他致死性应激产生防御和抵抗作用。HIF-1和HIF-2是参与缺氧调节最重要的两种缺氧诱导因子[1]。有研究显示,HIF-1α的表达增加在缺氧预处理中可能具有非常重要的作用。然而,亦有文献报道缺氧预处理通过抑制HIF-1α活性产生保护作

基金项目:国家自然科学基金重大项目(30393131)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China(30393131)

作者简介:孙 胜(1971-),女,辽宁省抚顺市人,博士研究生,助教,主要从事缺氧病理生理学方面的研究。电话:(023)68752340-8211,E-mail: sunshengss@163.com

通讯作者:高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail: gaoy66@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-11-17;修回日期:2007-01-31

用[2]。与 HIF-1 的广泛研究相比,对 HIF-2 生物功能的研究处于刚刚起步阶段,对 HIF-2 在缺氧预处理中的作用研究几乎更是一片空白。因而,HIF 在缺氧预处理中的作用需要进一步的研究和证明。$CoCl_2$ 是常用的缺氧模拟化合物,$CoCl_2$ 预处理可产生与缺氧预处理相似的神经保护作用。本研究通过分化的 SH-SY5Y 细胞建立 $CoCl_2$ 预处理的细胞保护模型,并对 $CoCl_2$ 预处理的细胞保护作用及其作用机制进行了初步的探讨。

1　材料与方法

1.1　材料

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株购自中科院上海细胞所。MEM 培养基及 F12 培养基、维甲酸、胰蛋白酶、$CoCl_2$、MTT(四甲基偶氮唑盐)购自美国 Sigma 公司。胎牛血清购自 Gibco 公司。Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、预染蛋白质分子量标准购自碧云天公司。HIF-1α、HIF-2α 和 VEGF 特异性一抗分别为 R&D、Novus、Santa Cruz 公司产品,二抗购自北京中杉公司。LDH 试剂盒由南京建成生物工程所提供。

1.2　细胞培养及分化

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 常规培养于含 15% 胎牛血清的 MEM/F12(1∶1体积比) 培养液,10 μmol/L 维甲酸诱导细胞分化 7 d 后用于实验[3]。

1.3　细胞化学缺氧预处理实验模型和分组

将分化的 SH-SY5Y 细胞分为对照组(常氧培养);化学缺氧预处理组(细胞先用 50 μmol/L $CoCl_2$ 预处理 3 h,换液后常氧培养 1 h,然后在 2% 的低氧孵箱缺氧 28 h);缺氧组(无 $CoCl_2$ 预处理过程,其余同化学缺氧预处理组)。

1.4　LDH 释放率的检测

细胞以 5×10^4/孔浓度接种于 24 孔培养板,每组 3 复孔,接种 24 h 后,用 10 μmol/L 维甲酸诱导细胞分化 3 d 后用于实验,按南京建成生物工程所 LDH 试剂盒说明书进行 LDH 活性测定,以 LDH 释放率的高低反映细胞损伤程度,LDH 释放率(%) = [上清液 LDH 活性/上清液 LDH 活性 + 细胞 LDH 活性] × 100%[4]。

1.5　细胞活力的测定

细胞以 1×10^4/孔浓度接种于 96 孔培养板,每组 5 复孔,接种 24 h 后,用 10 μmol/L 维甲酸诱导细胞分化 3 d 后用于实验,利用 MTT 比色法检测细胞活力。每孔细胞加 MTT 贮存液 20 μl,作用 4 h 后终止培养,小心吸弃上清液。加 DMSO 200 μl /孔,振荡 10 min 溶解结晶。酶标仪 550 nm 波长测定吸光度值[D(550)],以 D(550)高低表示细胞活力的高低。

1.6　Western blotting 法测细胞 HIF-1α、HIF-2α 和 VEGF 的蛋白表达

细胞总蛋白提取及蛋白质定量操作步骤,按照 Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒使用说明书进行。HepG2 低氧(2% O_2)培养 24 h 细胞,用于 Western blotting 法测分化 SH-SY5Y 细胞 HIF-1α 蛋白表达的阳性对照,电泳时两种细胞之间间隔 1 个空白孔,电泳分离蛋白后,电转法将目的蛋白条带从凝胶转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭液中封闭 2 h,TBST 洗膜 3 次,分别加一抗过夜 (HIF-1α、HIF-2α 抗体 1∶500稀释,VEGF 抗体 1∶100 稀释),TBST 洗膜 3 次,加二抗室温孵育 2 h (1∶5 000 稀释), TBST 洗膜 3 次后化学发光显色,照相,采用 Quantity One 分析软件对蛋白条带的积分光密度进行分析。

1.7　统计学处理

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　化学缺氧预处理对分化 SH-SY5Y 细胞 LDH 释放率的影响

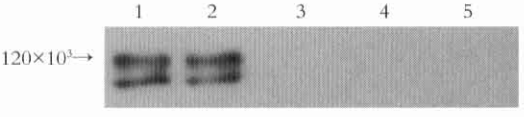
化学缺氧预处理组细胞 LDH 释放率[(56.9 ± 2.27)%]较缺氧组[(71.60 ± 2.77)%]降低 25.81%,差异显著($P<0.01$),显示缺氧预处理可减轻化学缺氧诱导的细胞损伤。

2.2　化学缺氧预处理对细胞活力的影响

通过 MTT 比色分析,HP 组细胞活力(0.757 ± 0.066)较 H 组细胞活力(0.604 ± 0.063)增高了 25.2%,差异显著($P<0.01$),提示化学缺氧预处理可抑制缺氧引起的细胞损伤。

2.3　化学缺氧预处理对 HIF-1α 表达的影响

50 μmol/L $CoCl_2$ 预处理 3 h 并不影响 HIF-1α 的蛋白表达,化学缺氧预处理组与对照组都不产生明显的条带,而同条件下的阳性对照组可在相对分子质量为 120×10^3 处显示明显的条带,见图 1。

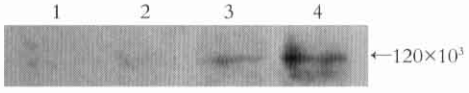


1,2: 阳性对照组; 3: 空白孔; 4: 对照组; 5: 化学缺氧预处理组

图 1　化学缺氧预处理对分化 SH-SY5Y 细胞 HIF-1α 表达的影响

2.4　化学缺氧预处理对 HIF-2α 表达的影响

50 μmol/L $CoCl_2$ 预处理 3 h 可上调 HIF-2α 的蛋白表达,预缺氧组 HIF-2α 的蛋白含量(2.791 ± 0.026 2)显著高于对照组(1.152 ± 0.073)($P<0.01$)。见图 2。



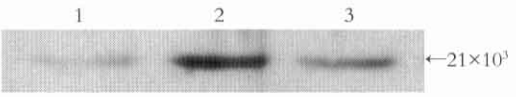
1,2: 对照组; 3,4: 化学缺氧预处理组

图 2　化学缺氧预处理对分化 SH-SY5Y 细胞 HIF -2α 表达的影响($n=4$)

2.5　化学缺氧预处理对 VEGF 表达的影响

缺氧组和化学缺氧预处理组细胞 VEGF 的蛋白含量显著高于对照组[分别为(2 934 ± 1 245)、(4 328 ± 1 262)、(1 519 ± 1 305),$P<0.01$],预缺氧组 VEGF 的蛋白含量显著高于缺氧

组($P<0.01$)。结果表明,缺氧可促进 VEGF 蛋白表达,预缺氧组的 VEGF 蛋白含量比缺氧组进一步增加。见图3。



1:对照组;2:化学缺氧预处理组;3:缺氧组

图3 化学缺氧预处理对分化 SH-SY5Y 细胞 VEGF 表达的影响($n=5$)

3 讨论

缺氧预处理具有明确而广泛的内源性保护作用,不仅可对经典的缺血、缺氧、缺血-缺氧、缺血-再灌注等损伤产生耐受,对氧化应激、热应激、血清或钾离子等营养成分剥夺、紫外线、化学药物等引起的伤害也产生抵抗作用。进一步明确缺氧预处理的分子机制,针对其保护机制对临床各类相关疾病进行干预,将为这些疾病的临床防治提供新的思路和方法,我们采用 $CoCl_2$ 进行化学药物缺氧预处理,有更好的临床应用前景。

能否建立一个稳定的细胞预缺氧模型,对预缺氧保护机制的研究具有重要的意义。人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞经维甲酸诱导分化后停止增殖,其形态、生化特征和生理功能等也发生改变,与成熟神经元非常相似,是广泛应用于神经生长、分化、损伤、保护等研究的神经细胞替代模型[5,6]。与原代培养神经细胞相比,SH-SY5Y 细胞均一、容易培养和获得,更有利于通过导入 cDNAs、反义 RNA、重组蛋白质和干扰肽等,改变特定细胞信号传导通路上的关键环节,进一步对其细胞及分子机制进行深入研究。

乳酸脱氢酶(LDH)释放率、MTT 法都是评价细胞存活、生长状态与损伤的常用检测指标。从我们的实验可看出,2% 氧浓度下缺氧 28 h 可诱导细胞损伤,而 50 μmol/L $CoCl_2$ 化学缺氧预处理 3 h 可抑制缺氧引起的 LDH 释放,提高细胞的活力。说明化学预缺氧能减少后期严重缺氧导致的细胞损伤,产生明显的细胞保护作用。本实验通过 LDH 释放率、MTT 法,分析和研究化学预缺氧对分化 SH-SY5Y 细胞的保护作用,建立了一个简便有效的细胞化学缺氧预处理实验模型,该实验模型的建立为进一步开展机制研究和临床治疗学等方面的研究有积极的意义。

HIF-1 和 HIF-2 是参与缺氧调节最重要的两种缺氧诱导因子,它们与机体许多生理和病理过程密切相关。在一些细胞和组织,HIF-2α 可能对缺氧更敏感,相对于 HIF-1α,HIF-2α 可被较高浓度的缺氧诱导[7]。$CoCl_2$ 同缺氧一样可诱导 HIF-1 和 HIF-2 的蛋白表达[8],在我们的实验条件下,3 h 的 $CoCl_2$ 预处理并不能促进 HIF-1α 的蛋白表达,但可上调 HIF-2α 的蛋白表达,缺氧(2% O_2)28 h,可使化学缺氧预处理组细胞 VEGF 的蛋白表达显著高于缺氧组,结合文献报道,HIF-2 似乎较 HIF-1 有更强的转录激活 VEGF 的能力[9],缺氧预处理可通过 VEGF/VEGFR-2 活化使小脑颗粒神经元(CGN)抵抗钾剥夺、谷氨酸盐、三硝基苯酚引起的细胞死亡[10]。由此我们可推测 $CoCl_2$ 预处理很可能通过 HIF-2 的激活,促进其下游靶基因产物 VEGF 的蛋白表达,从而产生抗缺氧损伤的细胞保护作用,进一步的工作目前正在研究中。

参考文献:

[1] Martin-Puig S, Temes E, Olmos G, *et al*. Role of iron (II)-2-oxoglutarate-dependent dioxygenases in the generation of hypoxia-induced phosphatidic acid through HIF-1/2 and von Hippel-Lindau-independent mechanisms[J]. J Biol Chem, 2004, 279(10): 9504-9511.

[2] Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, *et al*. Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons[J]. Neurosci Lett, 1998, 254(2): 117-120.

[3] Hasegawa T, Matsuzaki M, Takeda A, *et al*. Accelerated alpha-synuclein aggregation after differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. Brain Res, 2004, 1013(1): 51-59.

[4] Wu LY, Ding A S, Zhao T, *et al*. Involvement of increased stability of mitochondrial membrane potential and overexpression of Bcl-2 in enhanced anoxic tolerance induced by hypoxic preconditioning in cultured hypothalamic neurons[J]. Brain Res, 2004, 999(2): 149-154.

[5] Rios J C, Repetto G, Jos A, *et al*. Tribromophenol induces the differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells *in vitro*? [J]. Toxicol *In Vitro*, 2003, 17(5-6): 635-641.

[6] Zhu W, Bijur G N, Styles N A, *et al*. Regulation of FOXO3a by brain-derived neurotrophic factor in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004, 126(1): 45-56.

[7] Wiesener M S, Jurgensen J S, Rosenberger C, *et al*. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs[J]. FASEB J, 2003, 17(2): 271-273.

[8] Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, *et al*. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha[J]. J Biol Chem, 2003, 278(18): 15911-15916.

[9] Akeno N, Czyzyk-Krzeska M F, Gross T S, *et al*. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene transcription in human osteoblast-like cells through the hypoxia-inducible factor-2alpha[J]. Endocrinology, 2001, 142(2): 959-962.

[10] Wick A, Wick W, Waltenberger J, *et al*. Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt[J]. J Neurosci, 2002, 22(15): 6401-6407.

(编辑 王 红)