文章编号:1000-5404(2007)08-0681-04

论著

低氧预适应对离体星形胶质细胞缺氧/复氧耐受性的影响

周 烜,邬力祥,刘发益,张海福,杨丽娟,贺 芳,黄柏胜 (中南大学湘雅医学院生理学系,长沙 410078)

提 要:目的 研究低氧预适应对体外培养的鼠脑星型胶质细胞缺氧/复氧损伤的影响。**方法** 通过检测细胞MTT代谢活性、细胞凋亡率以及超微结构变化探讨低氧预适应对于神经胶质细胞缺氧/复氧损伤的影响;细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)等检测初步研究可能机制。**结果** 低氧预适应后48、72 h给予缺氧/复氧细胞产生了一定程度耐受,与缺氧/复氧损伤组比较,细胞代谢活性有所上升。以低氧预适应后48 h给予缺氧/复氧刺激进行后续实验,与缺氧/复氧损伤组比较,凋亡率下降,SOD活性增高,MDA值较低,透射电镜下细胞结构正常细胞较多。**结论** 低氧预适应能够提高鼠脑星形胶质细胞缺氧/复氧耐受性,可能与SOD活性增高对抗缺氧/复氧过程中产生的氧自由基对细胞的损伤有关。

关键词: 低氧预适应;星形胶质细胞;缺氧/复氧;凋亡
中图法分类号: R329.24;R338.1;R364.4 **文献标识码:** A

Effects of hypoxic preconditioning on hypoxia/reoxygenation tolerance of astrocytes *in vitro*

ZHOU Xuan, WU Li-xiang, LIU Fa-yi, ZHANG Hai-fu, YANG Li-juan, HE Fang, HUANG Bo-sheng (Department of Physiology, Basic Medical School, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: Objective To explore the effects of hypoxic preconditioning on hypoxia/reoxygenation of cultured cerebral astrocytes. Methods The cerebral astrocytes isolated from neonatal SD rats were divided into three groups: normal control, HP groups (receiving hypoxic preconditioning respectively for 24, 48, 72, 96 h, then hypoxia/reoxygenation) H/R group (receiving no hypoxic preconditioning but hypoxia/reoxygenation). MTT metabolic activity of the astrocytes by MTT reduction assay, their apoptotic ratio by flow cytometry were examined and their ultrastructure were observed under transmission electron microscope. SOD activities and MDA were detected. Results Hypoxic preconditioning could improve the tolerance of astrocytes to hypoxia/reoxygenation. MTT metabolic activity of the astrocytes in HP48 and HP72 groups was increased as compared with H/R group. The apoptotic ratio of HP48 group was decreased significantly as compared with H/R group. SOD activity was also increased and MDA was decreased. More cells of normal ultrastructure in HP48 group were observed than in H/R group. Conclusion Hypoxic preconditioning can improve astrocytes' tolerance to hypoxia/reoxygenation by increasing SOD activity to inhibit oxygen free radicals.

Key words: hypoxic preconditioning; astrocytes; hypoxia/reoxygenation; apoptosis

低氧预适应(hypoxic preconditioning, HP)是指1次或多次短暂、非致命性低氧刺激后,机体、组织或细胞能对其后一段时间内严重甚至致命性缺血或缺氧损伤产生一定程度耐受的现象。首先在心脏发现预适应现象,后来在其他一些重要器官如肝脏、肾脏和大脑等也出现类似现象。大脑长时间缺血缺氧会导致神经元死亡,引起脑功能障碍。Schurr等[1]在1986年用离体的成年大鼠海马脑片首次证明了成年脑组织经一定时间低氧处理后能对进一步的严重低氧条件产生明显的抵抗能力。国外学者对混合培养的神经元和神经胶质细胞低氧预适应保护作用进行了研究[2-4],他们认为低氧预适应的保护作用机制可能与多种因素有关,如内源性SOD、血管内皮细胞生长因子、Bcl-2和HSP70等均参与了细胞保护作用。我们前期研究发现缺氧等应激能够改变星形胶质细胞的基因表达[5],国外学者研究发现[6]缺氧损伤能够上调星形胶质细胞IL-β,星

基金项目:教育部科学技术研究重点项目(02147)
Supported by the Key Project of Sci & Tech Research by Ministry of Education of China(02147)
作者简介:周 烜(1978-),男,湖南省常德市人,硕士研究生,主要从事神经保护方面的研究。电话:(0731)4804413
通讯作者:邬力祥,电话:(0731)8836821,E-mail:ywlx@mail.csu.edu.cn
收稿日期:2006-05-22;修回日期:2007-01-18

形胶质细胞通过旁分泌促红细胞生成素作用于神经元产生保护作用[7]，低氧预适应能够激活星形胶质细胞HIF-1上调其下游基因表达[8,9]，然而目前对神经系统低氧预处理后神经元、神经胶质细胞相互关系的研究还有待深入探讨，尤其是神经胶质细胞的功能研究还需更深入。

神经胶质细胞对缺氧复氧损伤的耐受性优于神经元，人们已经充分认识到，脑功能的恢复不仅仅取决于神经元本身功能的恢复，而且还与星形胶质细胞的功能状态密切相关。本研究将对我们实验室建立的星形胶质细胞低氧预适应模型及其对缺氧/复氧损伤的影响进行初步探讨，以期丰富对神经胶质细胞的理解，为临床防治缺血缺氧性脑病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM(Hyclone公司)，新生牛血清(杭州四季青)，胰蛋白酶、MTT以及DMSO(美国Ameresco)。其他分析醇均为国产。D-Hanks、PBS和Earle平衡盐溶液以及鼠尾胶原自制，高压蒸汽灭菌后使用。N_2(标准级)和CO_2(标准级)由长沙曙光电子厂气体分公司提供。

1.2 细胞培养

在文献[10]的基础上加以改良进行，初生SD大鼠3只(本校动物学部提供)，雌雄不拘，取出大脑皮层小心去除脑膜和血管，剪碎后加入适量DMEM培养液吹打成细胞悬液，加入终体积为20%的新生小牛血清混匀放入37 ℃、5% CO_2饱和湿度培养箱孵育30 min，翻转培养瓶并吸出细胞悬液调整细胞密度为5.0×10^5/ml左右接种至预先以鼠尾胶原包被的培养瓶继续培养。每隔2~3天换液并逐渐调整血清浓度为10%，培养9~12 d细胞铺满瓶底后胰蛋白酶消化法传代，传至第3或第4代细胞经抗胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein，GFAP)染色鉴定95%以上为阳性，取第3代或第4代细胞进行实验。

1.3 细胞缺氧/复氧模型

DMEM培养液换成Earle平衡盐溶液，置于37 ℃的密闭缺氧仓内并通以缺氧混合气体(95% N_2和5% CO_2，流量1.8~2.0 L/min)，30 min后停止通气并封闭缺氧仓继续37 ℃饱和湿度培养，开始计缺氧损伤时间。缺氧完毕回复正常条件培养开始计时复氧时间。根据本实验室前期工作取缺氧4 h复氧12 h，记为H4/R12组。

1.4 低氧预适应模型

参考文献[11]并进行改良，通以缺氧混合气体(95% N_2和5% CO_2，流量1.8~2.0 L/min)30 min后回复正常条件下继续培养，12 h后重复1次，共进行2次处理。

1.5 实验分组

①对照组，Earle平衡盐溶液代替DMEM培养液，不给缺氧/复氧损伤刺激；②低氧预适应组，换液同对照组，预适应24、48、72、96 h后进行缺氧/复氧，分别简记为HP24、HP48、HP72和HP96组；③缺氧/复氧损伤组，换液同对照组，缺氧4 h复氧12 h，计为H4/R12组。

1.6 MTT代谢活性检测

种植在96孔板的细胞按分组给予不同处理。实验结束后加入浓度为5 mg/ml的MTT使之终浓度为0.5 mg/ml，孵育4 h后弃上清并加入100 μl DMSO振荡，20 min后在酶标仪490 nm处测定吸光度，参比波长630 nm。吸光度值越高表明细胞代谢MTT活性越强。

1.7 流式细胞术

实验结束后收集细胞，-20 ℃预冷的70%乙醇固定细胞24 h。PBS洗3次然后重悬于含RNase A的PI染液中，37 ℃孵育30 min，上流式细胞仪检测凋亡细胞。

1.8 透射电镜

收集细胞置离心管离心，800~1 000 r/min离心10 min；0.01 mol/L PBS 5 ml重悬细胞；细胞悬液吸入有琼脂空槽的离心管中；2 000 r/min离心15~20 min，小心吸去上清，加入2.5%戊二醛固定液；取出琼脂，仔细切下尖槽内含有细胞团的琼脂块，0.1 mol/L的PBS洗1次，1%锇酸后固定30~60 min。电镜下观察细胞超微结构变化，拍照记录。

1.9 超氧化物歧化酶活性检测

参照文献[12]进行，自氧化抑制率I=(对照管吸光度变化速率-样品管吸光度变化速率)/对照管吸光度变化速率×100%，规定抑制率达50%所需SOD酶量为1个活性单位，则SOD活性(U/ml)=I/50%×总体积/加样体积。

1.10 丙二醛检测

TBA法：按照南京建成生物研究所的MDA试剂盒说明书进行。

1.11 统计学处理

数据以$x\pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件，组间差异比较用方差分析，计数资料用χ^2检验。

2 结果

2.1 星形胶质细胞鉴定染色

星形胶质细胞具有特殊的胶质原纤维，由GFAP组成，纯化培养的星形胶质细胞经过GFAP免疫细胞化学染色，阳性细胞染色为棕黄色，阳性率95%以上，见图1。

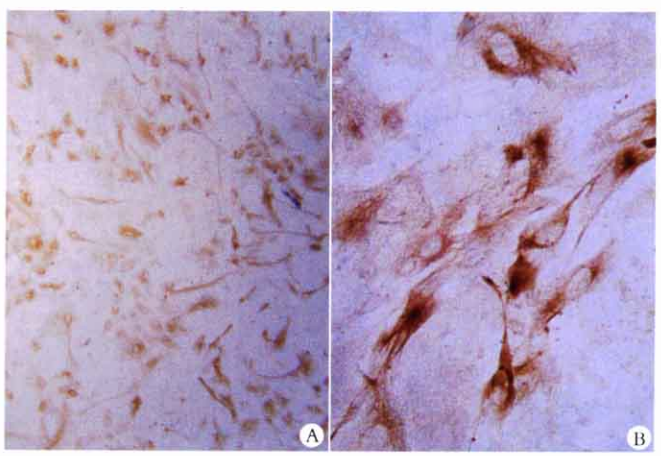
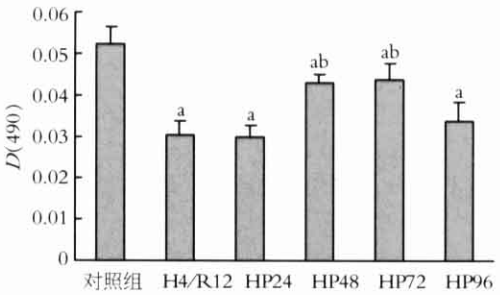


图1 星形胶质细胞GFAP染色 (A：×100；B：×400)

2.2　低氧预适应对细胞缺氧/复氧后活力的影响

与对照组相比，其他各组细胞活力均下降（$P<0.01$），而与 H4/R12 组比较，HP48 和 HP72 组细胞活力有所上升（$P<0.01$）。见图 2。



a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 H4/R12 组比较

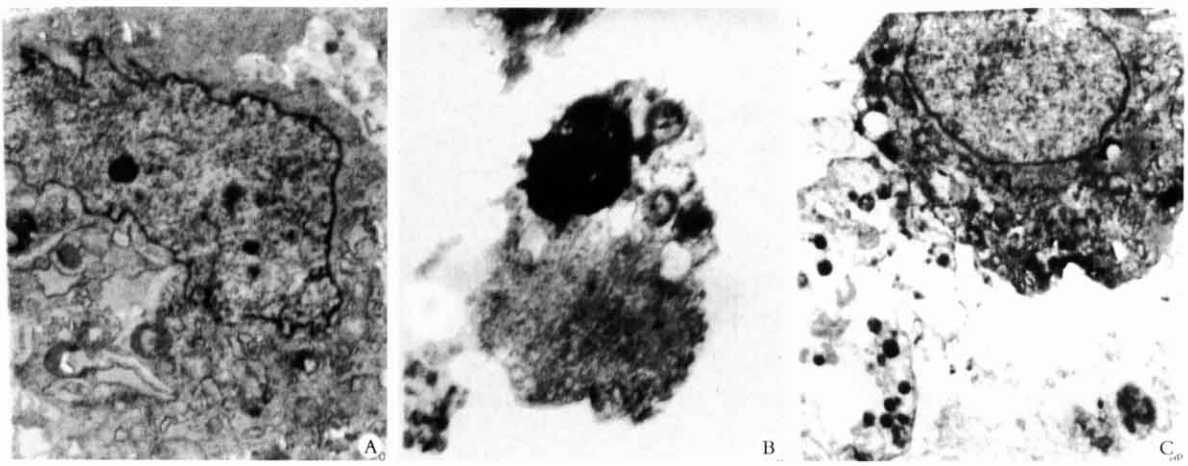
图 2　低氧预适应对缺氧/复氧损伤后对 MTT 代谢活性影响

2.3　低氧预适应对于神经胶质细胞缺氧损伤后凋亡率的影响

按照 MTT 实验结果，取 HP48 作为有保护作用的低氧预适应组，流式细胞术检测细胞的凋亡率，对照组细胞凋亡率为 15.63%，H4/R12 组细胞凋亡率为 67.73%，2 组比较差异具有统计学意义（$P<0.01$），HP48 组细胞凋亡率为 18.77%，与对照组差异不大，但是显著低于 H4/R12 组（$P<0.01$）。

2.4　形态学变化

透射电镜下见 H4/R12 组细胞大多数体积缩小，细胞核浓缩边集，核仁消失，细胞质内细胞器退变，细胞膜上出现小泡但连续性完整，有凋亡小体，呈现凋亡细胞特征；对照组细胞大多处于正常生活状态，核大均染，电镜下核仁清晰可见，细胞质内细胞器丰富。HP48 组细胞正常超微结构的细胞数较多，少数线粒体水肿，部分细胞也呈现凋亡特征。见图 3。



A：对照组；B：缺氧/复氧损伤组；C：低氧预适应组

图 3　电镜下各组微观结构改变　（TEM ×8 000）

2.5　SOD、MDA 与细胞凋亡相关分析

与对照相比，H4/R12 组和 HP48 组 SOD 活性均升高，而后者升高更加显著，差异具有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）；与对照相比，H4/R12 组 MDA 明显增多，差异具有统计学意义（$P<0.05$），HP48 组变化不大（表 1）。

表 1　SOD 活性变化和 MDA 检测（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

组别	SOD（U/ml）	MDA（nmol/ml）
对照组	9.552 ± 2.7	2.799 ± 0.716
H4/R12 组	30.44 ± 2.569[a]	4.358 ± 0.317[b]
HP48 组	60.569 ± 2.419[a]	2.827 ± 0.629

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与对照组比较

3　讨论

我们利用 MTT 代谢检测筛选出有保护作用的预适应组，然后观察了低氧预适应对细胞凋亡率和细胞微观形态学的影响。碱性条件下邻苯三酚能够自氧化转变成红色的菊酚，而 SOD 能够一定程度抑制这种自氧化作用。为了与 SOD 活性测定相互配合，MDA 检测间接反应细胞受自由基攻击的严重程度。通过这 2 个指标检测初步探讨星形胶质细胞低氧预适应的保护机制。结果显示 SOD 活性在低氧预适应后有较大程度提高，而 MDA 则没有明显变化。

预适应能够保护缺氧/复氧的心肌细胞[13,14]、神经细胞等。研究显示心肌细胞上的低氧预适应与此过程中线粒体产生的活性氧（ROS）相关[15]，包括 H_2O_2、氧自由基等。在体实验表明，低氧预适应或者缺血预适应对动物缺氧/复氧损伤或者缺血/再灌损伤的保护作用和预适应与损伤之间的时间间隔有关，提示低氧预适应对于缺氧/复氧损伤的保护作用也存在时间窗。我们的实验与之刚好吻合：HP48 和 HP72 组保护作用明显，而其他 2 组则不显著。与单纯缺氧损伤有所不

同,缺氧/复氧会使细胞损伤程度加大是因为大量氧自由基释放,缺氧时 ATP 分解为 AMP→腺苷→次黄嘌呤,次黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶作用下与复氧时的 O_2 生成黄嘌呤和大量氧自由基。氧自由基可能通过对细胞生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid,PUFA)引发自由基链式反应,形成生物膜脂质过氧化从而影响细胞代谢和功能;氧自由基还能直接损伤 DNA 以及使蛋白质和酶等失活导致细胞凋亡。这在我们的实验结果中也有体现。

组织细胞中广泛存在能清除超氧阴离子自由基的超氧化物歧化酶。低氧预适应在 SOD 敲除大鼠的神经元上没有细胞保护作用[16],LPS 预处理引起的 SOD 活性增高能提高神经元耐受缺血能力[17],而通过转基因高表达 SOD 的大鼠神经元能够一定程度耐受缺血、缺血再灌注[18],在其他细胞上也发现,SOD 活性提高能够抑制缺氧/复氧引起的细胞凋亡[19]。

我们前期实验显示,H_2O_2 模拟缺氧/复氧损伤会影响星形胶质细胞活力,H_2O_2 浓度越大,细胞活力下降更明显。在我们这次实验中显示产生保护作用的低氧预适应组 SOD 活性增高显著,而间接反映生物膜脂质过氧化损伤程度的 MDA 变化不大,提示在星形胶质细胞,低氧预适应通过提高 SOD 活性抑制氧自由基对细胞的损伤,阻断自由基链式反应而保护细胞。然而,保护作用到底从哪个或哪些关键物质开始启动,通过哪个或哪些信号途径传递信息,都还没有实验证实,这也是我们下一步的研究方向。

参考文献:

[1] Schurr A, Reid K H, Tseng M T, *et al*. Adaptation of adult brain tissne to anoxia and hypoxia *in vitro*[J]. Brain Res, 1986, 374(2): 244-248.

[2] Wu L Y, 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.

[3] 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.

[4] Griffin S, Clark J B, Canevari L. Astrocyte-neurone communication following oxygen-glucose deprivation[J]. J Neurochem, 2005, 95(4): 1015-1022.

[5] 邬力祥, 王绮如, 刘发益, 等. 缺氧处理后鼠脑星形胶质细胞基因表达谱的初步分析[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(18): 19-23.

[6] Zhang W, Petrovic J M, Callaghan D, *et al*. Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1beta (IL-1beta) in astrocyte cultures[J]. J Neuroimmunol, 2006, 174(1-2): 63-73.

[7] Ruscher K, Freyer D, Karsch M, *et al*. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an *in vitro* model[J]. J Neurosci, 2002, 22(23): 10291-10301.

[8] Jones N M, Bergeron M. Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(9): 1105-1114.

[9] Bernaudin M, Nedelec A S, Divoux D, *et al*. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(4): 393-403.

[10] 邬力祥, 刘发益, 曹 莉, 等. 低(无)糖、缺氧和缺氧/复氧对培养鼠脑胶质细胞活力及致损的影响[J]. 湖南医科大学学报, 2003, 28(5): 463-468.

[11] Arthur P G, Lim S C, Meloni B P, *et al*. The protective effect of hypoxic preconditioning on cortical neuronal cultures is associated with increases in the activity of several antioxidant enzymes[J]. Brain Res, 2004, 1017(1-2): 146-154.

[12] 赵云斌, 刘 敏, 余忠谊. 邻苯三酚自氧化法测定血中超氧化物歧化酶的活性[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(4): 387-388.

[13] 陈 日, 陈胜喜. 缺氧预处理对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2004, 29(2): 204-207.

[14] 秦 川,肖颖彬,钟前进,等. NF-κB 在 EPO 预处理对培养心肌细胞缺氧/复氧损伤保护效应中作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(22): 2223-2225.

[15] Vanden-Hoek T L, Becker L B, Shao Z, *et al*. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes[J]. J Biol Chem, 1998, 273(29): 18092-18098.

[16] Bordet R, Deplanque D, Maboudou P, *et al*. Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(8): 1190-1196.

[17] Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, *et al*. The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice[J]. J Neurosci, 2000, 20(8): 2817-2824.

[18] Sugawara T, Noshita N, Lewen A, *et al*. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation[J]. J Neurosci, 2002, 22(1): 209-217.

[19] Terui K, Enosawa S, Haga S, *et al*. Stat3 confers resistance against hypoxia/reoxygenation-induced oxidative injury in hepatocytes through upregulation of Mn-SOD[J]. J Hepatol, 2004, 41(6): 957-965.

(编辑 薛国文)