文章编号:1000-5404(2010)24-2595-04

论著

ATRA和9-cis-RA对缺氧缺糖损伤PC12细胞凋亡的影响

江 伟[1],温恩懿[2],龚 敏[1],瞿 平[1],毕 杨[1],张 赟[1],魏小平[1],刘友学[1],陈 洁[1],李廷玉[1] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿童营养中心,儿童发育疾病省部共建教育部重点实验室[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院儿科[2])

【摘要】 **目的** 探讨不同构型视黄酸[全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, ATRA);9-顺式视黄酸(9-cis-retinoic acid, 9-Cis-RA)]对缺氧缺糖损伤的PC12细胞凋亡的影响,且通过何种受体途径作用。**方法** 实验分组为:未刺激组(0 μmol/L RA);1、5、10 μmol/L,20 μmol/L ATRA;1、5、10、20 μmol/L 9-CisRA。倒置显微镜观察缺氧缺糖损伤前后细胞形态变化,流式细胞术研究经不同浓度ATRA和9-Cis-RA刺激的缺氧缺糖损伤PC12细胞凋亡水平。ELISA监测ATRA和9-Cis-RA处理4 h后PC12细胞的LDH释放水平以了解其细胞膜损伤水平的差异。**结果** ATRA组细胞凋亡率在1 μmol/L浓度时与未刺激组无显著差异($P>0.05$),从5 μmol/L起随着浓度的增高凋亡率显著增高($P<0.05$),在10、20 μmol/L浓度组均显著高于相同浓度的9-Cis-RA组($P<0.05$)和未刺激组($P<0.05$);而9-Cis-RA在20 μmol/L组凋亡率低于未刺激组,但无显著性差异($P>0.05$)。乳酸脱氢酶(LDH)释放水平在ATRA刺激组从5 μmol/L起随浓度的增高而显著性增高($P<0.01$),在5、10、20 μmol/L浓度均显著高于未刺激组和9-Cis-RA组($P<0.05$),而在各浓度9-Cis-RA组与未刺激组均无显著性差异($P>0.05$)。在RA信号系统中ATRA特异激活retinoic acid receptors (RARs),而9-Cis-RA同时激活RARs和retinoid X receptors (RXRs)。**结论** 在缺氧缺糖损伤的PC12细胞ATRA可通过激活RARs受体途径发挥促凋亡效应,但这种效应可以被激活RXRs受体途径而抑制。

【关键词】 全反式视黄酸;9-顺式视黄酸;视黄酸核受体;视黄醇X受体;PC12细胞;缺氧缺糖;凋亡
【中图法分类号】 R329.28;R361.3;R977.4 **【文献标志码】** A

Effect of all-trans retinoic acid and 9-cis-RA on apoptosis of PC12 cells after oxygen and glucose-deprivation injury

Jiang Wei[1], Wen Enyi[2], Gong Min[1], Qu Pin[1], Bi Yang[1], Zhang Yun[1], Wei Xiaoping[1], Liu Youxue[1], Chen Jie[1], Li Tingyu[1] ([1]Nutritional Research Center, Key Laboratory of Children's Development Diseases of Chongqing and Ministry of Education, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, [2]Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of different retinoic acid (RA) configurations, all-trans retinoic acid (ATRA) and 9-cis-RA on apoptosis of PC12 cells after oxygen and glucose-deprivation (OGD) injury, and explore the receptor pathway involved in. **Methods** Cell morphology before and after OGD injury was observed with inverted microscopy, and the apoptotic rate of PC12 cells treated with different concentrations of ATRA and 9-Cis-RA was studied by flow cytometr after OGD injuryy. Finally, LDH release from PC12 cells was measured by ELISA after 4 hours' RA treatment for degree of membrane damage. There were 9 groups: A (0 μmol/L RA); B (1 μmol/L ATRA); C (1 μmol/L 9-CisRA); D (5 μmol/L ATRA); E (5 μmol/L 9-CisRA); F (10 μmol/L ATRA); G (10 μmol/L 9-CisRA); H (20 μmol/L ATRA); I (20 μmol/L 9-CisRA). **Results** ATRA at a dose of 1 μmol/L had no effect on the apoptosis of PC12 cells after OGD injury, as the cells without RA treatment ($P>0.05$). But the apoptotic rate were significant increasing when the concentration of ATRA was elevated from 5 μmol/L to 20 μmol/L ($P<0.05$). The apoptotic rates in 10 and 20 μmol/L groups were significantly higher than those of the 9-Cis-RA groups with same stimulus concentration ($P<0.05$) and 0 μmol/L group ($P<0.05$). However, the apoptotic rate in 20 μmol/L 9-Cis-RA was lower than that of 0 μmol/L group ($P>0.05$), but was not significantly. The levels of LDH release of ATRA stimulation groups were significantly increasing from 5 μmol/L with the concentration rising ($P<0.01$),

【基金项目】 国家自然科学基金重点项目(30830106)
【通信作者】 李廷玉,电话:(023) 63623604,E-mail:tyli@top.sina.com

and were significantly higher than that of control and 9-Cis-RA stimulation groups ($P<0.05$). There was no significant difference in LDH release between 0 μmol/L group, and each 9-Cis-RA group ($P>0.05$). **Conclusion** ATRA improves the apoptosis of PC12 cells after OGD injury through activating retinoic acid receptors (RAR), while this effect might be inhibited by 9-Cis-RA *via* retinoid X receptors (RXRs).

[Key words] all-trans retinoic acid; 9-cis-retinoic acid; retinoic acid receptor; retinoic acid X receptor; PC12 cell; oxygen and glucose-deprivation; apoptosis

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (30830106). Corresponding author: Li Tingyu, Tel: 86-23-63623604, E-mail: tyli@top.sina.com

视黄酸(retinoid acid, RA)是一种重要的生物活性物质,与其受体结合后激活RA信号途径影响细胞增殖、分化和凋亡[1]。RA在生后神经发育过程可促进神经细胞分化,突触形成等[2],但在缺氧缺血脑损伤的病损变化中扮演何种角色尚少见报道。RA可促进肿瘤细胞凋亡[3],但对缺氧缺血损伤下的神经细胞凋亡的影响目前少有研究,而且在这一过程中RA的各类受体发挥的作用存在争论。体外缺氧缺糖损伤(oxygen and glucose-deprivation, OGD)是目前最有效反映体内缺血缺氧损伤病损变化的体外实验方案。本研究通过不同浓度的全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, ATRA)和9顺式视黄酸(9-cis-retinoic acid, 9-Cis-RA)分别刺激OGD损伤下的PC12细胞,分析其凋亡水平和细胞膜破坏程度的变化,进而了解其对凋亡的影响及其相关受体的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂耗材

PC12细胞(中科院上海细胞所);干预的RA采用ATRA, 9-cis-RA两种不同构型单体(Sigma, USA);完全培养基由DMEM/F12(1:1)加5%胎牛血清(FCS)和5%马血清(HS)配制(Gibco, USA),再予1%的双抗青链霉素(Gibco, USA);缺糖采用EBSS无糖培养基(116 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 0.8 mmol/L $MgSO_4$, 10 mmol/L NaH_2PO_4, 26.2 mmol/L $NaHCO_3$, 1.8 mmol/L $CaCl_2$, 10 mg/L phenol red, pH 7.4)(Hyclone, USA)。消化液采用胰酶替代物Triple(Gibco, USA)。细胞清洗液采用自配D-Hanks液。Annexin V-PI双染凋亡试剂盒(Bestbio, China)检测细胞凋亡水平。乳酸脱氢酶(LDH)释放实验采用大鼠LDH-ELISA试剂盒(R&D GenWay, USA)。细胞接种均于6孔板(Cosmo, USA)和25 cm^2细胞培养瓶(Corning, USA)。细胞离心采用15 ml离心管(BD, USA)。

1.2 方法

1.2.1 细胞接种培养及分组 复苏冻存的PC12细胞,接种于25 cm^2细胞培养瓶,常规完全培养基培养,每2天换液,待细胞融合达90%时细胞数量达1×10^6,1 ml Triple液消化细胞,稀释细胞以5×10^4/ml接种于数个6孔板中,24 h后细胞融合度可达90%左右。6孔板中每2个孔设定为1组,分为RA 0 μmol/L未刺激组,ATRA 1 μmol/L组、ATRA 5 μmol/L组、ATRA 10 μmol/L组、ATRA 20 μmol/L组,9-CisRA 1 μmol/L组、9-CisRA 5 μmol/L组、9-CisRA 10 μmol/L组、9-CisRA 20 μmol/L组。

1.2.2 细胞缺氧缺糖损伤(oxygen- and glucose-deprivation, OGD) 给予37 ℃,三气恒温细胞培养箱(Thermo, USA)持续通以流速2 L/min的5% O_2 + 95% N_2混合气,使培养箱内O_2浓度达5%。将每孔PC12细胞用D-Hanks缓冲液清洗3遍,洗掉杂质和已凋亡的细胞,保证各组损伤前背景一致。按照分组分别给予每孔含相应RA浓度的EBSS无糖培养基2 ml,将所有6孔板置于三气孵箱中持续通以混合气以OGD损伤[4]。本实验OGD建模3批次细胞。

1.2.3 细胞形态学观察 倒置显微镜观察光镜下细胞形态,于OGD损伤前D-Hanks缓冲液清洗后观察正常细胞形态,OGD 4 h后观察损伤后的细胞形态。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 OGD 4 h后取出细胞分别每孔对应一离心管收集每孔EBSS液,予每孔D-Hanks液清洗2遍,准备另一离心管分别收集每孔的D-Hanks液。每孔0.5 ml Triple液消化细胞1 min至细胞绝大部分消化完全,吸管轻柔吹打,移入以上2对应离心管中,低温离心机4 ℃,1 000 r/min离心5 min。倾去每管中液体,将离心细胞按照Annexin V-PI凋亡检测试剂盒操作指南给予细胞Annexin V、PI双标,上流式细胞仪(BD FACSAria, USA)检测。

1.2.5 ELISA检测LDH释放水平 将从每孔收集来的EBSS液1 000 r/min离心5 min,沉淀物回收同上一起流式检测凋亡。取上清100 μl加入96孔板中每孔中,未培养过的EBSS作为未刺激组,双复孔,按照试剂盒指南操作。在酶联检测仪(Thermo, USA)上测定各孔的光密度值[D(492)],检测波长492 nm,参考波长650 nm。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SAS 8.1统计软件进行两样本单因素方差分析和多组间方差分析。

2 结果

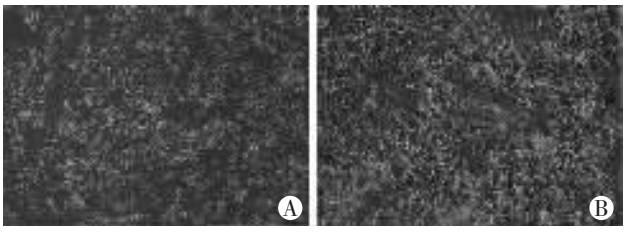
2.1 OGD损伤前后细胞形态的变化

在100倍光镜下OGD损伤前细胞:细胞体清晰,立体感强,漂浮细胞不多;损伤后细胞:部分细胞体浑浊,立体感丢失,部分细胞聚集成团形态不清,有部分漂浮细胞,400倍下可见细胞体破溃(图1)。提示OGD建模成功。

表 1　OGD 损伤 PC12 细胞在不同浓度的 ATRA 和 9-Cis-RA 刺激下的凋亡率和细胞存活率（$n=6$,%,$\bar{x}\pm s$）

组别	OGD + ATRA 组			OGD + 9-CisRA 组		
	存活率	早期凋亡率	晚期凋亡率	存活率	早期凋亡率	晚期凋亡率
OGD + 0 μmol/L 未刺激组	86.17 ± 6.51	6.54 ± 1.15	7.29 ± 1.42	86.17 ± 6.51	6.54 ± 1.15	7.29 ± 1.42
1 μmol/L 组	84.28 ± 6.13	6.77 ± 1.07	8.95 ± 1.37	84.01 ± 6.52	4.43 ± 1.44	11.55 ± 2.75
5 μmol/L 组	83.21 ± 7.35	7.08 ± 1.02	9.71 ± 1.53	85.99 ± 5.27	6.32 ± 1.23	7.69 ± 1.33
10 μmol/L 组	77.11 ± 4.63^{ac}	7.32 ± 1.17	15.57 ± 2.36^{b}	84.72 ± 7.44	3.71 ± 0.52	11.57 ± 2.83
20 μmol/L 组	73.99 ± 4.18^{ac}	6.32 ± 1.22	19.78 ± 2.36^{b}	87.12 ± 7.85	4.98 ± 0.63	7.90 ± 1.24

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 OGD + 0 μmol/L 未刺激组比较；c：$P<0.05$，与 OGD + 9-Cis-RA 组比较

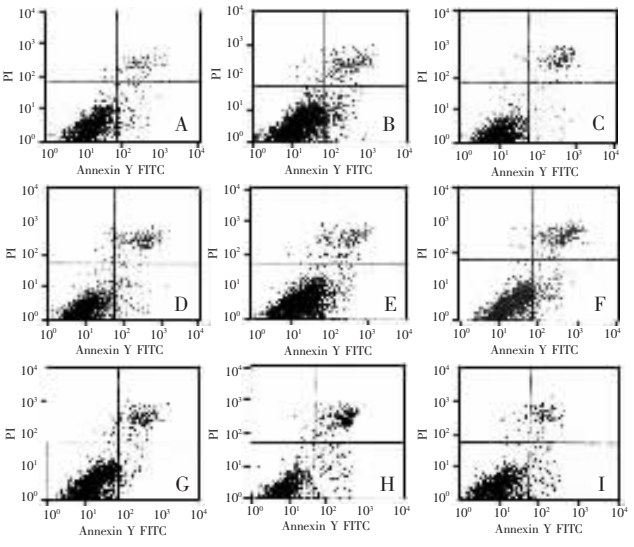


A：损伤前　B：损伤后

图 1　OGD 损伤前后 PC12 细胞形态学观察（倒置相差显微镜 ×200）

2.2　OGD 损伤 PC12 细胞在不同浓度的 ATRA 和 9-Cis-RA 刺激下的凋亡水平

细胞凋亡率 ATRA 组在 1 μmol/L 浓度与未刺激组无显著差异（$P>0.05$），5 μmol/L 起随 ATRA 浓度的增高凋亡率也显著增高（$P<0.05$），显示剂量依赖性。在 ATRA 10、20 μmol/L 浓度组细胞凋亡率均显著高于相同浓度 9-Cis-RA 组（$P<0.05$）和未刺激组（$P<0.05$），提示 ATRA 促进了 PC12 细胞的凋亡。在最高浓度 20 μmol/L 9-Cis-RA 组凋亡率低于未刺激组，但无显著性差异（$P>0.05$），提示 9-Cis-RA 可能抑制 PC12 细胞的凋亡。凋亡率的细分比较中，ATRA 组较未刺激组凋亡率增高部分主要集中于晚期凋亡率，5 ~ 20 μmol/L 组晚期凋亡率均显著高于未刺激组（$P<0.01$）。每组每批流式检测有 2 孔，检测 3 批细胞（$n=6$）。见图 2，表 1。



A：0 μmol/L RA 未刺激组；B：1 μmol/L ATRA；C：1 μmol/L 9-CisRA；D：5 μmol/L ATRA；E：5 μmol/L 9-CisRA；F：10 μmol/L ATRA；G：10 μmol/L 9-CisRA；H：20μmol/L ATRA；I：20 μmol/L 9-CisRA

图 2　不同类型 RA 在不同浓度下对 OGD 损伤 PC12 细胞凋亡水平流式检测结果

2.3　OGD 损伤 PC12 细胞在不同浓度的 ATRA 和 9-Cis-RA 刺激下的 LDH 释放水平

5 ~ 20 μmol/L ATRA 组 LDH 释放水平显著高于未刺激组（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.01$）和 9-Cis-RA 组（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.01$），且 ATRA 组随浓度增高 LDH 释放水平显著性增高（$P<0.01$），与细胞凋亡率变化趋势一致，提示 ATRA 的促凋亡作用。而 9-Cis-RA 各浓度组与未刺激组 LDH 释放水平均无显著性差异（$P>0.05$），提示 9-Cis-RA 对细胞凋亡无作用。见表 2。

表 2　OGD 损伤 PC12 细胞在不同浓度的 ATRA 和 9-Cis-RA 刺激下的 LDH 的释放水平（$n=8$,$\bar{x}\pm s$）

组别	OGD + ATRA 组	OGD + 9-CisRA 组
ODG + 0 μmol/L 未刺激组	101.91 ± 6.42	101.91 ± 6.42
1 μmol/L 组	106.38 ± 5.78	103.62 ± 7.11
5 μmol/L 组	113.47 ± 6.77^{a}	102.64 ± 6.17
10 μmol/L 组	157.36 ± 11.26^{bc}	103.28 ± 5.38
20 μmol/L 组	185.45 ± 12.18^{bc}	100.22 ± 4.57

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 OGD + 0 μmol/L 未刺激组比较；c：$P<0.01$，与 OGD + 9-Cis-RA 组比较

3　讨论

新生儿缺氧缺血脑损伤是新生儿期高发的中枢神经损伤性疾病，其损伤重，有效治疗手段有限，愈后不良率高。新生儿期同时也是生后脑发育的重要时期，大量研究已证明 RA 在这一生后发育过程中发挥着重要良性作用[5]。但在缺氧缺血损伤中，机体对 RA 作用是否依然是良性应答国内外罕有研究。RA 是维生素 A 在体内的最主要的活性代谢物，包括 ATRA、13-cis-RA 和 9-cis-RA 等构型，对生物个体发育及维持正常生理活动有重要作用，可介导对细胞的分化、增殖、凋亡等多种生物学功能[1]。RA 主要是通过细胞核膜上的视黄酸受体介导信号转导，调控下游基因的转录。其受体有两类：RARs（retinoic acid receptors）类和 RXRs（retinoic acid X receptors），ATRA 特异激活 RARs，而 9-cis-RA 能激活 RXR 和 RARs。RARs 与 RXRs 通常形成异二聚体，特异性与 RAR 顺式作用元件（RARE）结合，直接调控下游目的基因转录，RA 还可通过共价键结合参与蛋白翻译后修饰，影响多种凋

亡通路相关蛋白活性，如 PKC、JNK、c-jun[6]。PC12 细胞是一种来源于肾上腺髓质的嗜铬细胞瘤细胞，从发育学的角度来看，其发生与神经元细胞同源。OGD 损伤 PC12 可在体外模拟体内缺氧缺血对神经细胞损伤。

缺氧缺血损伤中的重要病理变化之一是细胞凋亡。过去主流观点认为 RA 具有促进细胞凋亡的作用，被用于部分肿瘤的治疗。APL 的发病机制也提示，癌蛋白 PML-RAR 结合 RXR 的高亲和力，抑制了 RAR 结合 RXR，因此可以抑制其它核受体的转录激活作用，从而抑制了白细胞的凋亡。研究提示 RA 在细胞凋亡及抗凋亡机制中可能扮演了双向调节功能[7-12]，本实验结果也显示 ATRA 通过激活 RARs 促进 PC12 细胞凋亡发生，而且呈明显的量效双增性；而 9-Cis-RA 同时激活 RXRs 和 RARs 后无促凋亡效应发生，且在 20 μmol/L 浓度显现一定的抗凋亡效应。提示 RXRs 的激活可抑制 RARs 激活后的促凋亡效应，且在高浓度配体激活 RXRs 时可能抗细胞凋亡。滕晓华等[13]研究也发现浓度大于 10 μmol/L 后 RA 诱导 PC12 细胞凋亡的作用明显增强，呈明显的剂量依赖效应。本实验显示 ATRA 组 PC12 细胞细胞膜损伤程度显著高于9-Cis-RA 组，且具有剂量依赖性，这也佐证了 RA 受体信号通路中，RARs 扮演着促凋亡作用，而 RXRs 可能起着抗凋亡作用。

RA 作用不同类型细胞所致的不同凋亡效应，可能由于不同类型细胞存在 RA 受体类型的分布不同，这种差异性导致 RA 激活其不同受体信号途径从而发挥促凋亡或抗凋亡作用。体外很多类型细胞均表达 RARs 和 RXRs，RA 信号的实现就需要 RARs 和 RXRs 协同作用，这就存在 RARs 和 RXRs 的信号的动态平衡，细胞或机体可通过这种平衡的变化所产生的双向效应来适应各种生理活动或病损修复。在 PC12 细胞应对缺氧缺糖损伤，ATRA 特异激活 RARs 导致 RARs 信号为主导而致促凋亡，9-cis-RA 与 RXRs 结合可竞争性抑制了 9-cis-RA 与 RARs 的结合，抑制 RARs 同 RXRs 的异源二聚体化，弱化其同 RARE 的特异结合后的下游相关促凋亡基因的转录，抑制了 RARs 激活所致的促凋亡作用。高浓度 9-cis-RA 刺激可能激活相关抗凋亡基因如 BMP，Bcl-2 等转录从而发挥抗凋亡效应。本研究尚未深入探讨此内容，需进一步实验来阐明。

综上所述，RA 在 OGD 损伤的 PC12 细胞中可发挥着促凋亡和抑制凋亡的双重效应，效应的区别可能是由于不同构型 RA 激活不同 RA 受体所致，这也解释了 RA 对不同类型细胞凋亡作用不一致的现象。本研究提示对于缺氧缺血损伤的机体给予 RARs 选择性拮抗剂可能具有抑制细胞凋亡作用。

参考文献：

[1] Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system[J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8(10): 755-765.

[2] Lane M A, Bailey S J. Role of retinoid signalling in the adult brain[J]. Prog Neurobiol, 2005, 75(4): 275-293.

[3] Simoni D, Tolomeo M. Retinoids, apoptosis and cancer[J]. Curr Pharm Des, 2001, 7(17): 1823-1837.

[4] De-Cristobal J, Cardenas A, Lizasoain I, *et al*. Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation[J]. Stroke, 2002, 33(1): 261-267.

[5] Maden M. Retinoid signalling in the development of the central nervous system[J]. Nat Rev Neurosci, 2002, 3(11): 843-853.

[6] Mark M, Ghyselinck N B, Chambon P, *et al*. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006, 46: 451-480.

[7] Luo P, Lin M, Lin M, *et al*. Function of retinoid acid receptor alpha and p21 in all-trans-retinoic acid-induced acute T-lymphoblastic leukemia apoptosis[J]. Leuk Lymphoma, 2009, 50(7): 1183-1189.

[8] Manna S K, Aggarwal B B. All-trans-retinoic acid upregulates TNF receptors and potentiates TNF-induced activation of nuclear factors-kappaB, activated protein-1 and apoptosis in human lung cancer cells[J]. Oncogene, 2000, 19(17): 2110-2119.

[9] 方建林，郑传胜，冯敢生，等. 全反式维甲酸对 Walker-256 肝癌细胞分化及凋亡的诱导作用[J]. 世界华人消化杂志，2008，16(26)：2929-2934.

[10] Shen H, Luo Y, Kuo C C, *et al*. 9-Cis-retinoic acid reduces ischemic brain injury in rodents via bone morphogenetic protein[J]. J Neurosci Res, 2009, 87(2): 545-555.

[11] Shinozaki Y, Sato Y, Koizumi S, *et al*. Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of c-jun-N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Neuroscience, 2007, 147(1): 153-163.

[12] Altucci L, Rossin A, Raffelsberger W, *et al*. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL[J]. Nat Med, 2001, 7(6): 680-686.

[13] 滕晓华，黄其林，张可成. 全反式维甲酸对 PC12 细胞 AchE 和 ChAT 活性的影响[J]. 第三军医大学学报，2003，25(24)：2173-2176.

（收稿：2010-06-09 修回：2010-09-10）

（编辑 龙 亮）