文章编号:1000-5404(2012)20-2067-03

论著

# 载脂蛋白E对星形胶质细胞缺氧性损伤的保护作用

周 帅,蒋 理,程崇杰,殷 成,熊学华,唐 爽,孙晓川 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科)

[摘要] **目的** 探讨载脂蛋白E(apolipoprotein E,APOE)在星形胶质细胞缺氧性损伤中的作用及相关机制。**方法** ①原代培养APOE基因敲除鼠、APOE基因野生鼠的星形胶质细胞,并分别予以缺氧6 h,流式细胞仪分别检测两组细胞早期凋亡率情况;②将培养成熟的APOE基因野生鼠的星形胶质细胞分为常氧组、缺氧组和干预组(缺氧+ERK抑制剂),分别予以缺氧组和干预组缺氧6 h,干预组在缺氧之前向培养基中加入ERK信号通路抑制剂U0126,Western blot法分别检测检测3组细胞APOE蛋白表达变化情况。**结果** ①缺氧6 h后,APOE基因敲除鼠组星形胶质细胞早期凋亡率[(5.67±0.35)%]明显高于APOE基因野生鼠组[(2.77±0.24)%](P<0.05);②与常氧组、干预组相比较,缺氧组星形胶质细胞表达的APOE蛋白明显增加(P<0.05)。**结论** APOE对星形胶质细胞缺氧性损伤具有保护作用,缺氧后星形胶质细胞APOE蛋白水平上调与ERK信号通路有关。

[关键词] 载脂蛋白E;星形胶质细胞;缺氧
[中图法分类号] R322.81;R363;R364.4 [文献标志码] A

# Apolipoprotein E protects hypoxic injuried astrocytes *in vitro*

Zhou Shuai, Jiang Li, Cheng Chongjie, Yin Cheng, Xiong Xuehua, Tang Shuang, Sun Xiaochuan (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of apolipoprotein E (APOE) on the astrocytes after hypoxic injury. **Methods** Astrocytes were separated from wild type mice and APOE knockout mice. Hypoxic injury models were established by putting cells in the setting of hypoxia for 6 h. The early apoptosis rate of astrocytes was detected by flow cytometry. The astrocytes from wild type mice were divided into normoxia group, hypoxia group and hypoxia + ERK inhibitor U0126 group. The expression of APOE in the 3 groups of cells was detected by Western blotting. **Results** The early apoptosis of astrocytes from APOE knockout mice [(5.67 ± 0.35)%] was significantly higher than the cells from the wild type [(2.77 ± 0.24)%, $P<0.05$]. Compared to normoxia group and hypoxia + ERK inhibitor U0126 group, the expression of APOE was highest in hypoxia group. **Conclusion** APOE exerts a protective effect on hypoxic injury of astrocytes. Hypoxic injury triggers astrocytes to increasingly synthesize APOE, through the ERK signaling pathway.

[**Key words**] apolipoprotein E; astrocytes; hypoxia

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973087). Corresponding author: Sun Xiaochuan, Tel: 86-23-89011151, E-mail: sunxch1445@gmail.com

尽管目前国内外对创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)的病理机制进行了大量研究,但至今对继发性脑损伤的分子机制仍未完全阐明。近年来个体遗传因素如载脂蛋白E(apolipoprotein E,APOE)基因在脑损伤后继发性病理生理改变以及伤后转归中的作用,受到了国外学者的广泛关注[1],其编码的APOE蛋白目前不再认为仅仅只是一种负责脂类运输的载脂蛋白,它在神经生物学领域也发挥了极其重要的作用。TBI后缺血、缺氧是最常见的继发性脑损伤因素。本研究通过构建星形胶质细胞缺氧损伤模型,探讨APOE蛋白在此过程的作用及可能机制。

[基金项目] 国家自然科学基金(30973087)
[通信作者] 孙晓川,电话:(023)89011151,E-mail: sunxch1445@gmail.com

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

APOE基因敲除鼠(购自北京大学医学部)1 d内乳鼠(重庆医科大学实验动物中心)4只;APOE基因野生鼠1 d内乳鼠(C57乳鼠,重庆医科大学实验动物中心)4只。

### 1.2 主要试剂及仪器

一抗兔抗鼠GFAP多克隆抗体(博士德,中国);二抗羊抗兔FITC-IgG(博士德,中国);一抗兔抗小鼠APOE多克隆抗体(Santa Cruz,美国),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(碧云天,中国);U0126(碧云天,中国);Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(碧云天,中国);细胞缺氧培养箱(Thermo forma,美国);流式细胞仪(BD美国)。

### 1.3 小鼠原代星形胶质细胞培养、纯化及鉴定

参照本课题组前期实验方法[2],培养、纯化并鉴定原代培

养的星形胶质细胞。取出生1 d内APOE基因敲除鼠乳鼠4只,断头并取出脑组织,分离大脑皮质和海马,剥除脑膜及血管;剪碎至1 $mm^3$左右的碎块,加入0.25%胰蛋白酶,在37 ℃的细胞孵箱内消化20 min后终止消化,200目细胞筛过滤;将过滤后的细胞悬液接种至细胞培养瓶。通过差速贴壁法和恒温摇床振荡法纯化星形胶质细胞,并通过免疫细胞化学法鉴定其特异性标记物胶质纤维酸性蛋白(GFAP);按照以上相同方法原代培养、纯化并鉴定APOE基因野生鼠星形胶质细胞。

### 1.4 构建星形胶质细胞缺氧损伤模型

将常氧培养成熟的纯化星形胶质细胞[细胞计数(3~5)×$10^6$/ml]置于细胞缺氧培养箱,氧浓度调为1%,培养基更换为无糖、无血清培养基,余培养条件同常氧培养,予缺氧培养6 h。

### 1.5 流式细胞仪检测星形胶质细胞凋亡率

分别将完成缺氧的APOE基因敲除鼠和APOE基因野生鼠的星形胶质细胞制备成(2~3)×$10^6$/ml的细胞悬液,参照文献[3],对培养成熟纯化的星形胶质细胞缺氧6 h,采用Annexin V-FITC标记,流式细胞仪检测APOE基因敲除鼠和APOE基因野生鼠细胞早期凋亡率;分别取APOE基因敲除鼠和APOE基因野生鼠常氧培养细胞作为正常对照组。

### 1.6 Western blot检测星形胶质细胞APOE蛋白表达

将原代培养成熟的APOE基因野生鼠星形胶质细胞分为常氧组、缺氧组和干预组(缺氧+ERK抑制剂),分别予以缺氧组和干预组缺氧6 h,干预组在缺氧之前向培养基中加入ERK信号通路抑制剂U0126(10 μmol/L)。向完成缺氧的缺氧组、干预组以及常氧组星形胶质细胞培养瓶中滴加细胞裂解液,冰上裂解30 min后离心取上清;BCA法测定蛋白浓度;取20 μg上样进行SDS-PAGE电泳,转移至PVDF膜;5%脱脂牛奶TBST缓冲液37 ℃封闭1 h;一抗兔抗小鼠APOE多克隆抗体(1∶300)4 ℃过夜;二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(1∶2 000)37 ℃孵育1 h;加入ECL试剂显色;β-actin表达水平作为内参照。

### 1.7 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示行$t$检验。

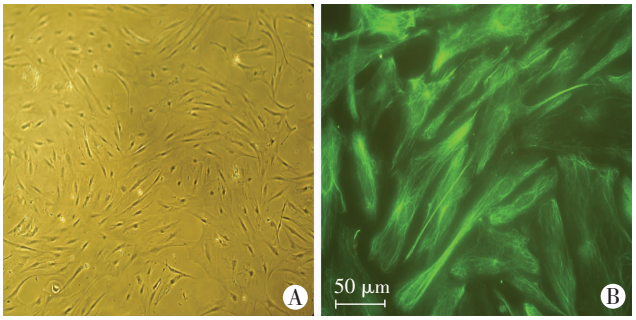
## 2 结果

### 2.1 星形胶质细胞培养鉴定

对培养成熟纯化的星形胶质细胞进行倒置显微镜形态学观察:细胞外观扁平,体积较大,贴壁细胞呈典型的"铺路石"样排列(图1A);GFAP免疫荧光染色示细胞质中明显的胶质丝,细胞核空染呈空泡状(图1B)。通过对每一观察视野内GFAP染色阳性细胞占总细胞数的比例统计,星形胶质细胞纯度几乎可达100%。

### 2.2 APOE蛋白对星形胶质细胞缺氧性损伤的保护作用

缺氧后APOE基因敲除鼠和APOE基因野生鼠星形胶质细胞早期凋亡率均明显高于相应的正常对照组($P<0.05$),APOE基因敲除鼠星形胶质细胞早期凋亡率显著高于APOE基因野生鼠($P<0.05$);两正常对照组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。




A:倒置显微镜(×100);B:荧光显微镜(免疫荧光)

**图1 星形胶质细胞的培养鉴定**

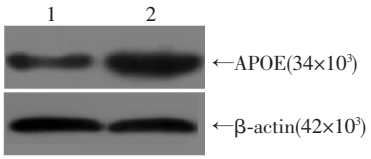
**表1 两组细胞缺氧前后早期凋亡情况比较**[$n=10$,%,$\bar{x}\pm s$]

| 组别 | APOE基因敲除鼠 | APOE基因野生鼠 |
|---|---|---|
| 正常对照组 | 1.02±0.20 | 0.98±0.19 |
| 缺氧组 | 5.67±0.35$^{ab}$ | 2.77±0.24$^{a}$ |

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与APOE基因野生鼠比较

### 2.3 缺氧对星形胶质细胞APOE蛋白表达的影响

缺氧6 h后,Western blot分别检测常氧组、缺氧组细胞APOE蛋白表达,结果显示,缺氧组表达的APOE蛋白(0.78±0.11)明显高于常氧组(0.39±0.09)($P<0.05$)。见图2。

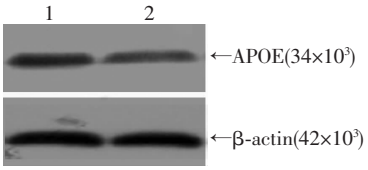



1:常氧组;2:缺氧组

**图2 Western blot检测缺氧6 h后常氧组、缺氧组细胞APOE蛋白的表达**

### 2.4 ERK信号通路对缺氧后星形胶质细胞APOE蛋白表达的影响

缺氧6 h后,Western blot分别检测缺氧组、干预组细胞APOE蛋白表达,结果显示,缺氧组APOE蛋白表达(0.69±0.12)明显高于干预组(0.42±0.09)($P<0.05$)。见图3。




1:缺氧组;2:干预组

**图3 Western blot检测缺氧6 h后缺氧组、干预组细胞APOE蛋白的表达**

## 3 讨论

APOE是脑内最主要的载脂蛋白,主要由星形胶质细胞产生,少部分由小胶质细胞产生,神经元在一定的条件下也可产生APOE[4]。近年来,APOE基因在脑损伤后继发性病理生理改变以及伤后转归中的作用越来越被更多的国内外学者所关注,普遍认为携带APOEε4等位基因的患者脑损伤易损性增加,并且可导致不良预后[5-7],但是相关机制目前仍不甚明了。

缺血、缺氧是TBI后的基本病理过程,也是继发性脑损伤的最常见因素。目前研究发现,星形胶质细胞不仅起支持和保护神经元作用,而且参与调节神经元轴突生长和突触形成等过程[8-9]。脑损伤导致星形胶质细胞结构和功能的变化,将影响急慢性损伤以及神经康复。脑损伤后,维持一定数量且具有正常活性的星形胶质细胞,并使其发挥正常的保护功能,对减轻继发性损伤对脑组织造成的损害是极其重要的。本研究以星形胶质细胞为研究对象,模拟脑损伤后脑组织缺血、缺氧这一病理生理改变,探讨了APOE在此过程中的作用,为APOE基因影响脑损伤后的伤情演变及预后的临床研究结果和临床干预继发性脑损伤提供新的实验依据。

国外研究显示,与APOE基因野生鼠相比,APOE基因敲除鼠的脑组织易损性明显增加[10];Lynch等[11]发现APOE基因敲除鼠脑损伤后脑组织水肿程度明显重于APOE基因野生鼠,并且认为这可能与APOE蛋白能够调节脑损伤后的炎症反应有关,这与我们课题组前期研究[12]结果是相一致的。本研究旨在探讨APOE蛋白在星形胶质细胞缺氧性损伤中的作用及分子机制,研究结果显示,缺氧后6 h,APOE基因敲除鼠组星形胶质细胞早期凋亡率显著高于APOE基因野生鼠组,这提示APOE蛋白对星形胶质细胞缺氧性损伤具有保护作用。细胞膜是细胞缺氧最早发生损伤的部位,主要表现为细胞膜离子泵功能障碍、膜通透性增加、膜流动性下降和膜受体功能障碍;另外缺氧还使溶酶体膜稳定性降低,通透性增高,由此释放的蛋白水解酶可以直接损伤细胞。APOE携带的脂质不仅是膜修复所需的原材料,同时APOE本身在细胞膜损伤后修复方面也发挥了重要作用[13]。因此,我们推测APOE对星形胶质细胞缺氧性损伤的保护作用主要与APOE维持细胞膜的稳定性有关。不仅如此,缺氧应激能够诱导星形胶质细胞合成更多的APOE,我们认为这种现象一方面与受损星形胶质细胞为了自身修复,APOE的需求增加有关外,还与星形胶质细胞能够提供更多的APOE给周围受损的神经元帮助其修复有关。

本课题组的最新研究表明,机械损伤神经元后,能够刺激星形胶质细胞通过ERK信号通路合成和分泌更多的APOE蛋白[14]。本研究亦发现,在星形胶质细胞培养基中加入ERK信号通路的特异性抑制剂U0126,也能阻断缺氧诱导的APOE蛋白表达上调,这从另外1个方面更加证实了ERK信号通路在调控APOE表达过程中发挥了重要作用。目前认为,APOEε4等位基因是脑损伤后多种不良预后的危险因素[6,15],APOE4蛋白在病理条件下的过度表达可能与轴突生长受损[16]、神经细胞线粒体功能障碍[17]等负性效应有关,因此,适度抑制ERK信号通路,下调APOE4蛋白的表达,将可能减少APOE4蛋白在病理情况下的负性作用。当然脑损伤后必将启动全身应激反应,APOE蛋白的表达必然受到多种信号途径的调控,我们将在进一步实验中予以证实。

## 参考文献:

[1] McAllister T W. Genetic factors modulating outcome after neurotrauma [J]. PM R, 2010, 2(12 Suppl 2): S241-S252.
[2] 武明明, 孙晓川, 吴海涛, 等. 载脂蛋白E基因多态性与星形胶质细胞损伤后兴奋性氨基酸变化的关系[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(9): 928-931.
[3] 吴建勇, 赵德璋. 流式细胞仪检测细胞凋亡的几种方法的比较[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(9): 1386-1389.
[4] Xu Q, Bernardo A, Walker D, *et al*. Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus [J]. J Neurosci, 2006, 26(19): 4985-4994.
[5] Isoniemi H, Tenovuo O, Portin R, *et al*. Outcome of traumatic brain injury after three decades--relationship to ApoE genotype[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(11): 1600-1608.
[6] Muller K, Ingebrigtsen T, Wilsgaard T, *et al*. Prediction of time trends in recovery of cognitive function after mild head injury[J]. Neurosurgery, 2009, 64(4): 698-704.
[7] Jiang L, Yin X, Yin C, *et al*. Different quantitative EEG alterations induced by TBI among patients with different APOE genotypes[J]. Neurosci Lett, 2011, 505(2): 160-164.
[8] Ma D K, Ming G L, Song H. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis[J]. Curr Opin Neurobiol, 2005, 15(5): 514-520.
[9] Givogri M I, de-Planell M, Galbiati F, *et al*. Notch signaling in astrocytes and neuroblasts of the adult subventricular zone in health and after cortical injury[J]. Dev Neurosci, 2006, 28(1/2): 81-91.
[10] Rotstein M, Bassan H, Kariv N, *et al*. NAP enhances neurodevelopment of newborn apolipoprotein E-deficient mice subjected to hypoxia [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 319(1): 332-339.
[11] Lynch J R, Pineda J A, Morgan D, *et al*. Apolipoprotein E affects the central nervous system response to injury and the development of cerebral edema[J]. Ann Neurol, 2002, 51(1): 113-117.
[12] 吴海涛, 江涌, 张晓东, 等. 载脂蛋白E基因多态性影响星形胶质细胞损伤后早期NF-κB表达的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(2): 103-106.
[13] Hauser P S, Narayanaswami V, Ryan R O. Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology[J]. Prog Lipid Res, 2011, 50(1): 62-74.
[14] Yin C, Zhou S, Jiang L, *et al*. Mechanical injured neurons stimulate astrocytes to express apolipoprotein E through ERK pathway[J]. Neurosci Lett, 2012, 515(1): 77-81.
[15] Wu H T, Ruan J, Zhang X D, *et al*. Association of promoter polymorphism of apolipoprotein E gene with cerebral vasospasm after spontaneous SAH[J]. Brain Res, 2010, 1362: 112-116.
[16] Chen H K, Liu Z, Meyer-Franke A, *et al*. Small molecule structure correctors abolish detrimental effects of apolipoprotein E4 in cultured neurons[J]. J Biol Chem, 2012, 287(8): 5253-5266.
[17] Brodbeck J, McGuire J, Liu Z, *et al*. Structure-dependent impairment of intracellular apolipoprotein E4 trafficking and its detrimental effects are rescued by small-molecule structure correctors[J]. J Biol Chem, 2011, 286(19): 17217-17226.

(**收稿**:2012-05-12;**修回**:2012-06-25)
(编辑 王小寒)