文章编号:1000-5404(2014)09-0893-04

论著

高压氧预适应对离体培养大鼠脑星形胶质细胞的缺氧保护作用及机制

李雨泓,邹永杰,崔高宇 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经外科研究所,全军神经创伤防治重点实验室)

[摘要] **目的** 研究高压氧预适应(hyperbaric oxygen preconditioning,HBOP)对大鼠乳鼠脑星形胶质细胞的缺氧保护作用及对 $P2X_7$受体和 AQP4 表达的影响。**方法** 离体培养原代星形胶质细胞并纯化传代后,分为对照组、高压氧预适应组(HBOP)、单纯缺氧组(OGD)、高压氧预适应缺氧组(HBOP + OGD)。于预定时相点采用流式细胞仪检测细胞凋亡率,化学发光法检测细胞培养液中的 ATP 浓度,Western blot 检测 $P2X_7$受体和 AQP4 蛋白表达,实时荧光定量 PCR 检测(RT-qPCR)$P2X_7$受体和 AQP4 mRNA 的转录水平。**结果** HBOP 组细胞培养液内 ATP 浓度在各检测时相点远高于对照组($P<0.01$);HBOP + OGD 组细胞 24 h 及 48 h 凋亡率均低于 OGD 组($P<0.05$);HBOP 组细胞 AQP4 及 $P2X_7$受体蛋白表达高于对照组($P<0.05$);HBOP + OGD 组细胞 AQP4 及 $R2X_7$ 受体 mRNA 转录水平在缺氧 6 h 时低于 OGD 组($P<0.05$)。**结论** HBOP 可以提高大鼠脑星形胶质细胞线粒体产生 ATP 的能力,提高细胞对缺氧缺糖的耐受力,减少细胞凋亡,具有明确的细胞保护作用。其保护机制可能与降低了 OGD 后损伤细胞内 $P2X_7$受体及 AQP4 的 mRNA 转录水平有关。

[关键词] 高压氧预适应;氧糖剥夺;细胞保护;AQP4;$P2X_7$受体
[中图法分类号] R322.81; R364.4; R459.6 [文献标志码] A

Hyperbaric oxygen preconditioning protects rat brain astrocytes from hypoxia by down-regulating AQP4 and $R2X_7$ receptor *in vitro*

Li Yuhong, Zou Yongjie, Cui Gaoyu (Department of Neurosurgery, Institute of Neurosurgery, Key Laboratory of Neurotrauma, Prevention and Treatment, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the protective effect of hyperbaric oxygen preconditioning (HBOP) on rat brain astrocytes against hypoxia and on the expression of $R2X_7$ receptor and AQP4. **Methods** Cultured primary astrocytes were isolated from neonatal SD rats, primarily cultured and identified by GFAP staining at passage 2. The astrocytes at passage 3 were divided into control group, HBOP group, oxygen glucose deprivation (OGD) group and HBOP + OGD group. The apoptotic rate was detected by flow cytometry at 24 and 48 h after OGD. The ATP concentration in the culture medium were measured by chemiluminescence detection. The protein expression of $R2X_7$ receptor and AQP4 was detected by Western blotting, and their mRNA levels were determined by RT-qPCR. **Results** The expression of AQP4 and $R2X_7$ receptor was enhanced in HBOP group than control group ($P<0.05$). The apoptotic rate was significantly lower in the HBOP + OGD group than the OGD group at 24 and 48 h ($P<0.05$). The protein level of AQP4 and $R2X_7$ receptor was obviously higher in the HBOP group than control group ($P<0.05$). The AQP4 and $R2X_7$ receptor mRNA transcription levels were inhibited in HBOP + OGD group when compared with those in OGD group at 6 h ($P<0.05$). **Conclusion** HBOP improves the mitochondrial ATP production by rat brain astrocytes exposure to hypoxia, promotes the cell tolerance to hypoxia and aglycemia, reduces cell apoptosis, and exerts absolutely cytoprotective effect. The underlying mechanism may be due to the down-regulation of AQP4 and $R2X_7$ receptor at mRNA levels after OGD.

[**Key words**] hyperbaric oxygen preconditioning; oxygen glucose deprivation, cytoprotective; AQP4; $R2X_7$ receptor

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30973100) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81000532). Corresponding author: Cui Gaoyu, E-mail:cgaoyu@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973100);国家自然科学基金青年科学基金(81000532)
[通信作者] 崔高宇,E-mail:cgaoyu@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140225.0924.009.html(2014-02-25)

缺血缺氧性脑水肿是脑外科术后常见并发症,发生率极高且严重影响手术疗效及预后,目前尚无有效的术前预防性手段和措施。预适应是近年研究热点,研究表明,短暂缺血、高热、缺氧等都具有一定的神经

保护作用,但上述预适应条件均为损伤因素,临床应用受限[1]。高压氧预适应(hyperbaric oxygen preconditioning,HBOP)具有明显的安全性和伦理学优势,在临床已得到广泛应用。有研究发现,反复的HBOP处理对脑缺血具有明显的保护作用,能缩小局灶性的脑缺血梗死体积并减轻脑水肿程度[2-4]。$P2X_7$受体在神经损伤中位于信号调节上游[5],而AQP4作为脑水肿发生、发展过程中的关键水通道蛋白,也成为研究焦点。因此,本实验利用离体培养的新生大鼠脑星形胶质细胞,制作氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation,OGD)模型,观察HBOP对星形胶质细胞的缺氧保护作用,检测$P2X_7$受体和AQP4的表达变化,并对HBOP的缺氧保护机制进行初步探讨,旨在为脑水肿的预适应研究奠定基础。

1 实验材料与方法

1.1 原代星形胶质细胞的培养及鉴定

出生3 d以内SD乳鼠,雌雄不拘,体质量9~11 g(由第三军医大学实验动物中心提供),碎冰冷冻麻醉后,酒精消毒,断头处死,取两侧大脑半球,剪除嗅球,仔细剥去软脑膜,将脑组织反复切碎成乳糜状,转移至10 mL离心管内,以0.25%胰蛋白酶液消化约4~5 min,加入DMEM/F12培养基(HyClone公司,加入10%新生牛血清,购于杭州四季青公司)终止消化。吹打均匀后,以不锈钢网(孔径200 μm)过滤,滤液转移至10 mL离心管内,离心5 min(1 000 r/min),弃上清,重新加入培养基,反复吹打制成初细胞悬液,置于37 ℃、5% CO_2培养箱中差速黏附处理60 min,以除去大部分黏附较快的成纤维细胞。翻转培养瓶,吸取细胞悬液,离心5 min(1 000 r/min),弃上清,重新加入培养基,吹打均匀,制成次细胞悬液,接种于培养瓶内,置于37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养。次日换液,去除未贴壁、活力差及死亡细胞,继续培养7~9 d,期间定期观察细胞生长情况,2~3 d更换1次培养基,每次换液时以PBS清洗1遍,稍加震荡。当细胞融合成单层且开始出现分层生长时进行消化传代,消化传代前加入PBS漂洗2遍,每次均轻轻拍打培养瓶,使上层的杂质细胞脱落。取2代细胞进行GFAP染色鉴定,星形胶质细胞纯化度在95%以上(图1),使用第3代细胞进行后续试验。

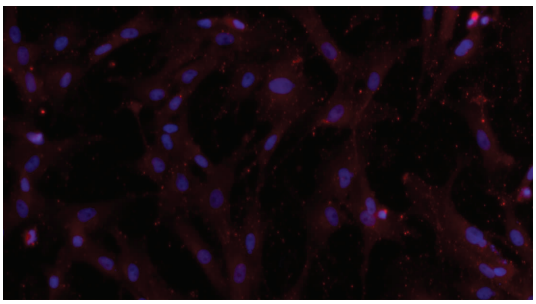


图1 分离纯化的原代星形胶质细胞进行GFAP染色鉴定(DAPI染核)(荧光显微镜 ×100)

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 纯化后的星形胶质细胞接种至培养瓶内,培养3~4 d即可铺满瓶底,分为4组:对照组、高压氧预适应组(HBOP)、单纯缺氧组(OGD)、高压氧预适应缺氧组(HBOP+OGD)。

1.2.2 高压氧预适应方法 HBOP采用动物试验氧舱(烟台冰轮氧舱厂生产),传代2次后的星形胶质细胞培养3 d后即放入高压氧舱内,舱内温度25~28 ℃,拧松培养瓶口,虚掩舱门,纯氧洗舱10 min(输入氧流量5 L/min),使舱内氧浓度>98%,关闭舱门,调整进气流量,于15 min内缓慢加压至0.15 MPa,稳压1 h后,匀速减压20 min降至常压,1次/12 h,共4次。对照组及OGD组仅将细胞置于高压氧舱内1 h而不进行加压,1次/12 h,共4次。

1.2.3 OGD模型的制备 HBOP完成后24 h,将OGD组及HBOP+OGD组细胞以PBS漂洗2遍,更换为无糖培养基(Gibco公司,不添加新生牛血清),入缺氧孵箱培养(37 ℃,1% O_2,5% CO_2,94% N_2),并在预定时相点将细胞取出,进行后续检测。

1.2.4 细胞培养液ATP含量测定 对照组及HBOP组细胞于接种后的第4天同时更换新鲜培养基,对照组细胞入高压氧舱不进行加压处理,HBOP组细胞放入高压氧舱行HBOP处理1 h后置入常规培养孵箱,于HBOP完成后的0、6、12、24 h,取2组细胞的培养液,离心取上清,按照碧云天ATP检测试剂盒说明进行细胞培养液的ATP含量测定。

1.2.5 细胞凋亡率检测 缺氧处理24、48 h,将OGD组及HBOP+OGD组细胞取出,按照北京宝赛生物技术有限公司提供的Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒说明进行操作,简单流程如下:收集培养液内脱落坏死细胞、贴壁细胞用胰酶消化→细胞悬液离心,4 ℃,1 000 r/min,10 min,弃上清→加入1 mL预冷PBS,轻轻震荡使细胞悬浮→4 ℃,1 000 r/min,10 min,弃上清(此步骤重复两次以彻底清除胰酶)→200 μL Binding Buffer重悬细胞后加入10 μL Annexin V-FITC轻轻混匀,避光室温反应15 min→加入300 μL Binding Buffer及5 μL PI混匀,于1 h内以流式细胞仪检测,检测前用200 μm筛网过滤。

1.2.6 Western blot检测$P2X_7$受体及AQP4的蛋白表达水平 于HBOP完成后的24 h,取对照组及HBOP组细胞进行Western blot检测$P2X_7$受体及AQP4的蛋白表达,β-actin为内参。简单流程如下:提取细胞总蛋白→蛋白浓度测定→SDS-PAGE电泳→转膜→PVDF膜漂洗、封闭→一抗4 ℃孵育过夜(β-actin 1∶1 000,$P2X_7$受体1∶1 000,AQP4 1∶1 000)→TBST洗膜→室温孵育二抗2 h→TBST洗膜→滴加发光试剂,在凝胶成像分析系统中扫描成像,将同次电泳所得$P2X_7$受体、AQP4和β-actin条带灰度值相比,得到各组样本相对光密度的灰度比值,进行下步分析。

1.2.7 实时荧光定量PCR检测(RT-qPCR)检测$P2X_7$受体及AQP4的mRNA转录 于缺氧处理的6、12、24 h,收集OGD及HBOP+OGD组细胞,检测$P2X_7$受体及AQP4的mRNA表达水平。根据GenBank上所查AQP4、$P2X_7$受体序列,采用软件设计引物,AQP4上游引物:5′-CCCCGTGCCAACTGCTAATGC-3′,下游引物:5′-GGCGGAAGGCAAAGCAGTATG-3′,扩增产物片段大小为213 bp;$P2X_7$受体上游引物:5′-CCGCCTCTGTGCCTTTAACGTCC-3′,下游引物:5′-CGCTCTTCCCCTCTCTTTT-TCTCTA-3′,扩增产物片段大小为127 bp;β-actin作为内参,上游引物:5′-ACCCCGTGCTGCTGACCGAG-3′,下游引物:5′-TCC-CGGCCAGCCAGGTCCA-3′,扩增产物片段大小为249 bp。20 μL的反应扩增体系:cDNA 2.0 μL,$P2X_7$受体及AQP4的上下游引物分别各0.3 μL,2×SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μL,H_2O 7.4 μL。反应程序:94 ℃预变性5 min→94 ℃变性30 s→57 ℃退火30 s→72 ℃延伸30 s(共32个循环)→72 ℃延

伸 10 min。每个样品各平行 3 次,数据经 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 处理后进行相对表达量分析。

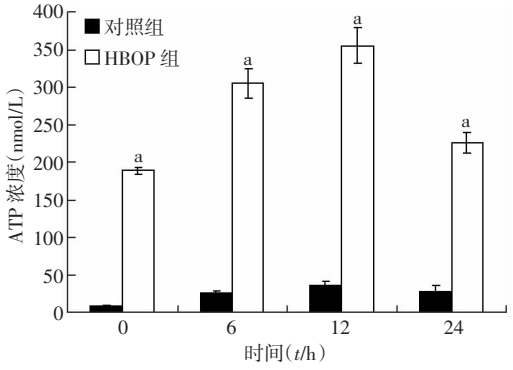
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 17.0 统计软件,组间差异行单因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞培养液 ATP 浓度

对照组及 HBOP 组细胞培养液内 ATP 浓度均在换液处理后的 12 h 达到峰值,此后呈下降趋势;HBOP 组细胞培养液 ATP 浓度在每个检测时相点均显著高于对照组($P < 0.01$,图 2),以上结果提示:HBOP 可以显著提高细胞线粒体产生 ATP 的能力。

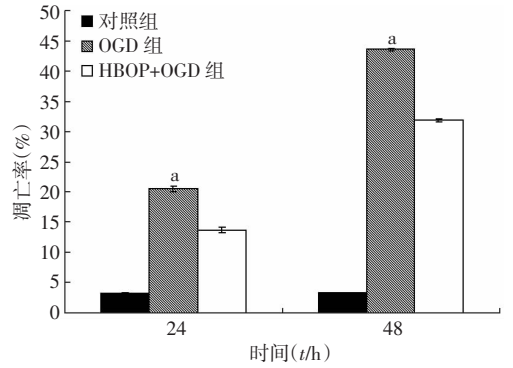


a:$P < 0.01$,与对照组比较

图 2　对照组及 HBOP 组细胞不同时相点细胞培养液 ATP 浓度

2.2 细胞凋亡率

与对照组相比较,OGD 组及 HBOP + OGD 组细胞在进行缺氧处理时,随着缺氧时间延长,细胞总凋亡率都逐渐上升,说明氧糖剥夺处理对星形胶质细胞有明显杀伤作用;而在每个检测时相点,OGD 组细胞的总凋亡率都高于 HBOP + OGD 组($P < 0.05$,图 3)。提示 HBOP 可以提高细胞对氧糖剥夺环境的耐受力,而且这种保护作用随着缺氧时间的延长也越加明显。



a:$P < 0.05$,与 HBOP + OGD 组比较

图 3　对照组、OGD 组和 HBOP + OGD 组细胞在不同时相点的细胞总凋亡率

2.3 Western blot 检测 $P2X_7$ 受体及 AQP4 的蛋白表达

在 HBOP 完成后 24 h,HBOP 组细胞蛋白表达水平已趋稳定。与对照组相比,HBOP 组细胞的 $P2X_7$ 受体及 AQP4 蛋白表达水平均明显升高($P < 0.05$,表 1),提示 HBOP 处理能显著提高星形胶质细胞 $P2X_7$ 受体及 AQP4 蛋白表达水平。

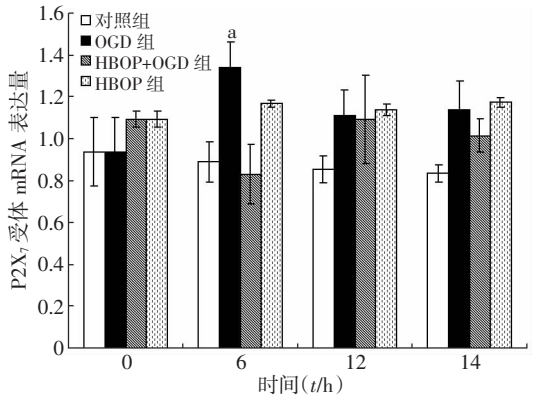
表 1　HBOP 组与对照组细胞 $P2X_7$ 受体及 AQP4 的蛋白表达水平

组别	AQP4	$P2X_7$ 受体
对照组	0.120 ± 0.004	0.180 ± 0.011
HBOP 组	0.200 ± 0.014[a]	0.240 ± 0.001[a]

a:$P < 0.05$,与对照组比较

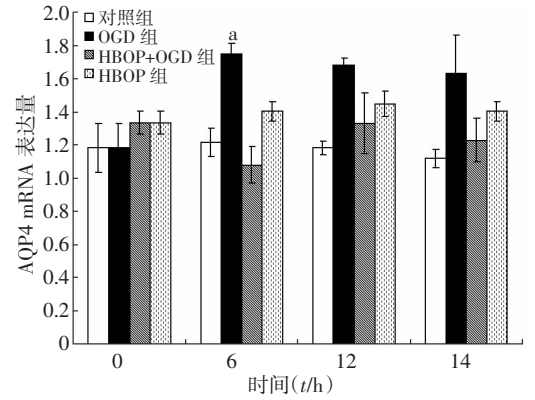
2.4 RT-qPCR 检测 $P2X_7$ 受体及 AQP4 的 mRNA 转录

HBOP 完成后 24 h,且未进行 OGD 处理(即 OGD 0 h)时,HBOP 组细胞 $P2X_7$ 受体及 AQP4 的 mRNA 相对转录水平高于对照组,但在进行 OGD 处理后,单纯 OGD 组的 $P2X_7$ 受体及 AQP4 的 mRNA 相对转录水平在缺氧 6 h 时即达到峰值,明显高于 HBOP + OGD 组($P < 0.05$,图 4、5),而 HBOP + OGD 组的 $P2X_7$ 受体及 AQP4 的 mRNA 相对转录水平则在缺氧 12 h 时才达到峰值。由此可见,HBOP 可以降低星形胶质细胞在缺氧环境下 $P2X_7$ 受体及 AQP4 的转录水平,且延迟二者 mRNA 的转录高峰。



a:$P < 0.05$,与 HBOP + OGD 6 h 比较

图 4　缺氧 0、6、12、24 h 时 4 组细胞的 $P2X_7$ 受体 mRNA 转录水平



a:$P < 0.05$,与 HBOP + OGD 6 h 比较

图 5　缺氧 0、6、12、24 h 时 4 组细胞的 AQP4 mRNA 转录水平

3 讨论

本课题组的动物实验部分研究结果已明确 HBOP 能明显减轻小鼠 MCAO 后的神经功能学损伤,缩小梗死体积,减少神经细胞的凋亡,具有明显的脑保护作用[6]。缺血性脑损伤早期主要表现为细胞源性脑水肿,后期出现血管源性脑水肿,水分子从血液进入脑实质需要透过血脑屏障(blood brain barrier, BBB),而 BBB 的内皮细胞、星形胶质细胞共同构成功能性

"units"。AQPs是膜水通道蛋白家族,其中AQP4在脑中的含量最高,主要分布在BBB的脑微血管周围和脑室管膜的星形胶质细胞足突以及血-脑脊液屏障的神经胶质界膜。由于内皮细胞和基膜缺失AQP4,水分子主要通过弥散和胞饮转运(量少速度慢),而在星形胶质细胞则主要通过其足突上的AQP4通道实现(量大速度快),因此,星形胶质细胞足突的功能对于维持BBB的通透性具有重要的作用[7]。研究发现,在脑缺血进程中,AQP4的表达随着缺血时间延长而逐渐增加[8],由此我们推测,脑缺血所致的细胞源性和血管源性脑水肿均与AQP4的活性相关。因此,星形胶质细胞及其AQP4的表达在脑水肿病理生理过程中有着极其重要的作用。

在本实验中,我们采用离体培养的大鼠乳鼠脑星形胶质细胞进行分组检测。结果表明,HBOP能明显提高星形胶质细胞对氧糖剥夺的耐受力,减少细胞凋亡率,具有明确的细胞保护作用。同时发现,OGD组细胞的AQP4 mRNA转录水平始终高于HBOP+OGD组,且在缺氧6 h即达到转录高峰;而HBOP+OGD组细胞的AQP4 mRNA转录水平在缺氧12 h才到达峰值。这说明HBOP对星形胶质细胞的缺氧保护作用可能与降低缺氧后星形胶质细胞AQP4的表达及延迟其表达高峰有关。

ATP是细胞内外重要的信号分子,在神经系统中发挥重要作用。在生理条件下,ATP通过核苷转运形式释放至突触间隙,选择性地作用于相应嘌呤受体发挥递质调节、突触修饰和神经营养等作用。嘌呤能受体按激动剂的选择性分为P1和P2两大类,其中P2受体分为P2X和P2Y受体。P2X受体属配体门控离子通道型受体,包括7个亚型,即$P2X_1$~$P2X_7$,研究发现$P2X_1$~$P2X_6$受体亚型分布在神经元上,$R2X_7$受体分布于小胶质细胞、神经元和星形胶质细胞。在生理条件下,$R2X_7$受体对K^+、Na^+、Ca^{2+}有选择性通透;在低浓度2价阳离子及高浓度ATP持续或反复刺激下,能形成可以透过相对分子质量达900的大分子质膜通道,可导致细胞坏死和凋亡[9]。研究发现HBOP可明显提高脑组织的ATP浓度,并有线粒体功能保护作用。其可能的机制为:烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide,NAD)的还原态NADH在HBO作用下氧化后将电子传送到电子转运链转化为NAD^+,NAD^+具有增进三羧酸循环的功能,从而增强了线粒体ATP的产生[10]。我们对HBOP组的细胞进行ATP检测,发现HBOP确能明显提高星形胶质细胞产生ATP的能力,进而上调星形胶质细胞$P2X_7$受体的表达水平。但在氧糖剥夺环境下,与OGD组相比较,HBOP+OGD组$P2X_7$受体mRNA的转录高峰延迟。

综上所述,本研究结果表明,HBOP对缺血缺氧性脑损伤的保护作用是比较明确的。相关研究表明,$P2X_7$受体可能处于神经信号较上游的调节位点,通过递质释放、活化胶质细胞、调节炎性反应、影响细胞周期及凋亡等功能活动对神经损害及修复起重要作用[11-12]。由此,我们提出了HBOP-ATP-$R2X_7$-AQP4这一可能的调控机制。但$P2X_7$受体-AQP4这一调控机制是否成立、二者表达变化是否具有相关性、抑或是HBOP本身通过其他调节途径或者直接对AQP4的表达进行调控,这一系列问题还需在以后的实验中进一步探讨。HBOP对脑水肿的保护作用毋庸置疑,在临床应用有明显的优势,但存在需要大量资金投入的缺点,从而对其应用的推广产生一定的限制,如果本课题所提出的理论得到证实,则有可能对将来通过药物对$R2X_7$受体-AQP4途径干预达到预适应抗脑水肿的效果,可为脑水肿的临床治疗研究提供参考。

参考文献:

[1] Koch S. Preconditioning the human brain: practical considerations for proving cerebral protection[J]. Transl Stroke Res, 2010, 1(3): 161-169.

[2] Jadhav V, Ostrowski R P, Tong W, *et al*. Hyperbaric oxygen preconditioning reduces postoperative brain edema and improves neurological outcomes after surgical brain injury[J]. Brain Neurochir Suppl, 2010, 106: 217-220.

[3] Yan W, Zhang H, Bai X, *et al*. Autophagy activation is involved in neuroprotection induced by hyperbaric oxygen preconditioning against focal cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res, 2011, 1402: 109-121.

[4] Cheng O, Ostrowski R P, Wu B, *et al*. Cyclooxygenase-2 mediates hyperbaric oxygen preconditioning in the rat model of transient global cerebral ischemia[J]. Stroke, 2011, 42(2): 484-490.

[5] Zou J, Vetreno R P, Crews F T. ATP-$P2X_7$ receptor signaling controls basal and TNFα-stimulated glial cell proliferation[J]. Glia, 2012, 60(4): 661-673.

[6] 邹永杰, 黄宇星, 李雨泓, 等. 高压氧预适应的小鼠缺血脑保护作用及对P2X7受体表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(10): 977-980.

[7] Zelenina M. Regulation of brain aquaporins[J]. Neurochem Int, 2010, 57(4): 468-488.

[8] Koyama Y, Tanaka K. Decreases in rat brain aquaporin-4 expression following intracerebroventricular administration of an endothelin ET B receptor agonist[J]. Neurosci Lett, 2010, 469(3): 343-347.

[9] Y Chu Y X, Zhang Y, Zhang Y Q, *et al*. Involvement of microglial $P2X_7$ receptors and downstream signaling pathways in long-term potentiation of spinal nociceptive responses[J]. Brain Behav Immun, 2010, 24(7): 1176-1189.

[10] Ying W. NAD^+ and NADH in ischemic brain injury[J]. Front Biosci, 2008, 13: 1141-1151.

[11] Weisman G A, Camden J M, Peterson T S, *et al*. P2 recetors for extracellular nucleotides in the central nervous system: role of $P2X_7$ and $P2Y_2$ receptors interactions in neuroinflammation[J]. Mol Neurobiol, 2012, 46(1): 96-113.

[12] Illes P, Verkhratsky A, Burnstock G, *et al*. P2X receptors and their roles in astroglia in the central and peripheral nervous system[J]. Neuroscientist, 2012, 18(5): 422-438.

(收稿:2013-12-08;修回:2014-01-21)

(编辑 王小寒)