DOI:10.16016/j.1000-5404.201408067

论著

Sulfiredoxin-1 对大鼠星形胶质细胞缺血损伤的保护作用

喻姗姗,刘远玲,陈 曦,周云川,周 杨,巫静娴,赵 涌 (400016 重庆,重庆医科大学病理学教研室,重庆医科大学神经科学研究中心,重庆医科大学神经科学重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨小分子蛋白 Sulfiredoxin-1(Srxn1)对大鼠星形胶质细胞缺血损伤的保护作用以及 Srxn1 是否参与活化 NF-κB 炎症信号通路的分子机制。**方法** 通过 H_2O_2 处理、氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation followed by recovery,OGD/R)模型,模拟体内脑缺血再灌注损伤;通过慢病毒载体片段 Lenti-Srxn1-sh1 和 Lenti-Srxn1-sh2 干扰 Srxn1 的表达,采用 MTT 法检测两种损伤模型中细胞的存活率,采用双荧光免疫细胞化学法检测 NF-κB 入核情况,Western blot 检测 p-NFκB p65、MIF 的蛋白表达。**结果** 在 H_2O_2 和 OGD/R 模型中,两组慢病毒干扰片段均可以降低 Srxn1 蛋白的表达。与 Control 组比较,干扰 Srxn1 基因能够明显降低细胞存活率,增加 NF-κB p65 入核,使 p-NFκB p65 和巨噬细胞游走抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)蛋白表达显著增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Srxn1 作为体内重要的神经保护因子,可以减少大鼠星形胶质细胞缺血性损伤的作用机制之一可能是与其激活 NF-κB 信号通路相关。

[关键词] Sulfiredoxin-1;星形胶质细胞;神经保护;NF-κB;巨噬细胞游走抑制因子
[中图法分类号] R338; R341; R364.12 [文献标志码] A

Sulfiredoxin-1 protects rat astrocytes from ischemia-induced damage

Yu Shanshan, Liu Yuanling, Chen Xi, Zhou Yunchuan, Zhou Yang, Wu Jingxian, Zhao Yong (Department of Pathology, Institute of Neuroscience, Key Laboratory of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the protective effect of sulfiredoxin-1 (Srxn1) on cultured rat astrocytes after ischemic-induced injury and investigate whether the molecule takes part in the activation of NF-κB signaling pathway. **Methods** Hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxygen-glucose deprivation followed by recovery (OGD/R) were respectively used to mimic cerebral ischemia damage stress in freshly isolated astrocytes from newborn SD rats. Lentiviral vectors carrying 2 shRNAs for Srxn1, Lenti-Srxn1-sh1 and Lenti-Srxn1-sh2, were used to knockdown Srxn1 in the astrocytes under the 2 models of ischemia. Cell viability was tested by MTT assay. The nuclear translocation of NF-κB was detected by double fluorescent immunoassay. The protein expression of p-NFκB p65 and macrophage migration inhibitory factor (MIF) was determined by Western blotting. **Results** Both lentiviral vectors induced decreased protein level of Srxn1 in the rat astrocytes after either H_2O_2 or OGD/R treatment. Knockdown of Srxn1 resulted in obviously decreased cell viability, enhanced nuclear translocation of NF-κB p65, and up-regulated expression of p-NFκB p65 and MIF, when compared with the astrocytes without Srxn1 knowdown. **Conclusion** Srxn1, as an important neuroprotective factor, protects astrocytes from ischemia-induced injury, which might be due to its involving in the activation of NF-κB pathways.

[**Key words**] sulfiredoxin-1; astrocytes; neuroprotection; NF-κB; macrophage migration inhibitory factor

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271460) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81301125). Corresponding author: Zhao Yong, E-mail:blys01@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271460);国家自然科学基金青年项目(81301125)
[通信作者] 赵 涌,E-mail:blys01@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140918.0832.003.html(2014-09-18)

Sulfiredoxin-1（Srxn1）是真核生物中通过进化选择的内源性小分子蛋白之一。近年来，人们发现Srxn1依靠其良好的抗氧化、抗凋亡作用在促进神经细胞存活方面发挥重要功能。本课题组前期的研究也证实，Srxn1能够保护PC12细胞免受H_2O_2诱导的氧化应激损伤，且这种保护作用与Peroxiredoxins（Prdxs）家族的活性有关[1]。新近报道发现，Srxn1参与了LPS/γ-IFN刺激下的小鼠原代巨噬细胞的免疫防御作用，减少细胞内活性氧（reactive oxygen species，ROS）的产生[2]。进一步基因功能研究发现，Srxn1表达缺失可以加快一些重要的炎症反应因子的激活，引起细胞的损伤[3]。因此，Srxn1有可能作为机体氧化应激和固有免疫交叉反应的核心作用因子，影响脑缺血再灌注后期的炎症反应，其具体的神经保护机制还需要进一步阐明。

目前，星形胶质在脑缺血再灌注炎症反应中的地位日渐重视，有可能在脑卒中时神经元、小胶质细胞的炎症反应中起到重要的调控作用[4-5]。并且，与神经元相比较，Srxn1在星形胶质细胞中的诱导水平较高[2,6]。因此，本研究通过H_2O_2处理、氧糖剥夺/复氧（oxygen-glucose deprivation followed by recovery，OGD/R）模型，模拟体内脑缺血再灌注损伤，通过慢病毒载体干扰Srxn1的表达，观察Srxn1对大鼠星形胶质细胞缺血损伤的保护作用，进一步阐明Srxn1的神经保护机制。

1 材料与方法

1.1 大鼠原代星形胶质细胞培养

取清洁级出生1～2 d的健康SD乳大鼠共120只，雌雄不拘，由重庆医科大学实验动物中心提供。参照Park等[7]报道的步骤，分离双侧大脑皮质，用胰酶消化成单个细胞，用含10%血清的DMEM/F12（Gibco公司）作为细胞培养液，通过差速贴壁、震荡、传代的方法去除神经元及小胶质细胞，得到纯度较高的星形胶质细胞。通过形态学、免疫细胞化学（胶质细胞纤维酸性蛋白GFAP染色），鉴定得到纯化率约为95%的大鼠原代星形胶质细胞用于后续实验。

1.2 Srxn1基因干扰

将大鼠原代星形胶质细胞分为未处理（Normal）组、阴性对照（Control）组和2组Srxn1基因干扰组（Lenti-Srxn1-sh1组和Lenti-Srxn1-sh2组），分别使用上海吉玛制药技术有限公司设计包装的慢病毒载体，将阴性对照和Srxn1-shRNA转染入星形胶质细胞。Control组序列为：5′-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3′，Lenti-Srxn1-sh1组干扰序列为：5′-CGTGCCAATCGCCGTGCTCAT-3′，Lenti-Srxn1-sh2组干扰序列为：5′-CATCCACACCAGACTTGCAGT-3′。操作步骤按说明书进行，转染72 h后，检测转染率及后续实验。

1.3 H_2O_2模型的建立

参照我们课题组前期报道的方法建立H_2O_2模型[1]：将Sigma公司购得的H_2O_2配制成工作液加入各组细胞的培养液中，使得H_2O_2的最终浓度为100 μmol/L，并移入37℃、5% CO_2孵箱，培养6 h后进行后续实验。

1.4 氧糖剥夺/复氧模型（OGD/R）的建立

参照本课题组前期报道的方法建立OGD/R模型[8]：用无糖DMEM培养液（Gibco公司）洗涤2遍后，将培养基更换为无糖DMEM，快速放入Forma model 3131三气培养箱（94% N_2、1% O_2、5% CO_2，37 ℃），6 h后换回原来培养基，放入37 ℃、5% CO_2孵箱继续培养24 h模拟再灌注损伤。

1.5 MTT法检测细胞存活率

用96孔板培养细胞，加入MTT（Sigma公司），20 μL/孔，放入37 ℃孵箱继续培养，4 h后小心吸弃各孔内的培养液，加入150 μL DMSO，振荡15 min，用酶标仪在490 nm波长处检测各孔光密度值[D(490)]。

1.6 双荧光免疫细胞化学法检测NF-κB入核情况

将接种培养在爬片上的细胞用预冷4%多聚甲醛固定20 min，0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次；滴加封闭血清，37 ℃孵育20 min，倾去血清，滴加一抗NF-κB p65（1∶50，Bioworld公司），4 ℃湿盒过夜，0.01 mol/L PBS漂洗10 min×3次。红色荧光二抗（1∶200），37 ℃孵育20 min，避光。滴加DAPI（碧云天公司），标记所有细胞核，室温孵育30 min，0.01 mol/L PBS漂洗10 min×3次。甘油封片，荧光显微镜下观察。

1.7 Western blot检测Srxn1、p-NFκB p65、巨噬细胞游走抑制因子（macrophage migration inhibitory factor，MIF）的蛋白表达

细胞裂解液提取各组蛋白，用Bradiford法测定蛋白浓度。采用Western blot标准步骤进行电泳、转膜、封闭。一抗稀释浓度分别为：anti-Srxn1（1∶400，Proteintech公司）；p-NFκB p65（1∶500，Bioworld公司）；MIF（1∶500，Bioworld公司）。用Quantity One软件测定条带的灰度值，以β-actin灰度值作为内参照，以目的条带与内参条带的光密度比值表示蛋白表达量。

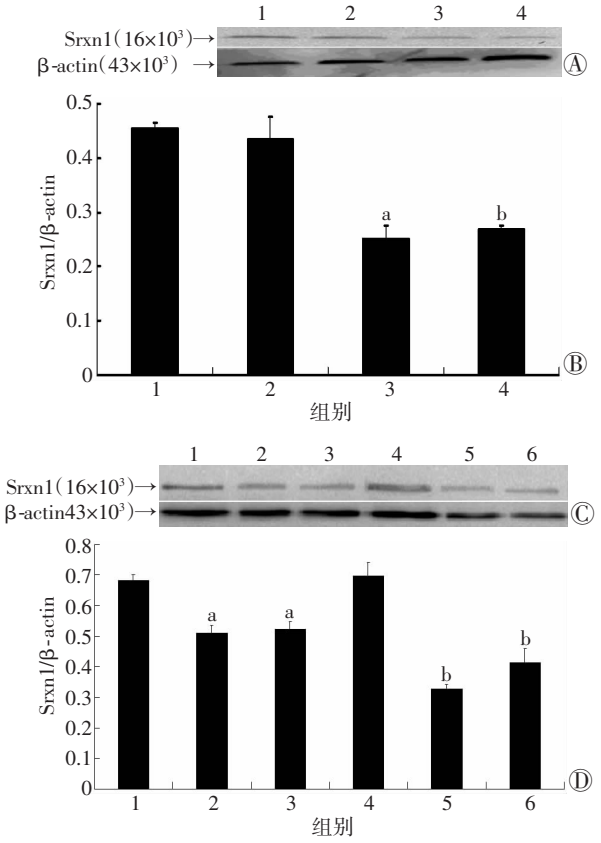
1.8 统计学分析

实验数据以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 17.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 Srxn1 干扰效率的检测

Western blot 结果显示，在正常情况下（未进行 H_2O_2 和 OGD/R 处理），与慢病毒 Control 组比较，Lenti-Srxn1-sh1 组和 Lenti-Srxn1-sh2 组 Srxn1 的表达明显降低（$P<0.01$，$P<0.05$，图 1A、B）。用 100 μmol/L H_2O_2 处理 6 h 后，与慢病毒 Control 组比较，Lenti-Srxn1-sh1 组和 Lenti-Srxn1-sh2 组 Srxn1 蛋白水平均明显降低（$P<0.01$）。同样，在 OGD/R 模型中，与慢病毒 Control 组相比较，Lenti-Srxn1-sh1 组和 Lenti-Srxn1-sh2 组 Srxn1/β-actin 比值也分别减少至 0.33 ± 0.01 和 0.42 ± 0.04（$P<0.01$，图 1C、D）。表明 Lenti-Srxn1-sh1 和 Lenti-Srxn1-sh2 两组干扰片段均可以明显减少 Srxn1 的表达。



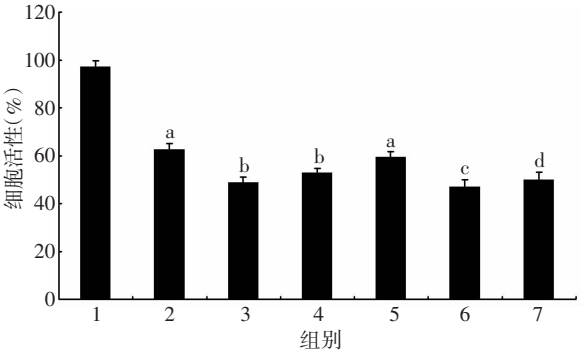
A、B：正常情况　1：Normal 组；2：Control 组；3：Lenti-Srxn1-sh1 组；4：Lenti-Srxn1-sh2 组；a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与 Control 组比较

C、D：H_2O_2 和 OGD/R 模型　1：Control + H_2O_2 组；2：Lenti-Srxn1-sh1 + H_2O_2 组；3：Lenti-Srxn1-sh2 + H_2O_2 组；4：Control + OGD/R 组；5：Lenti-Srxn1-sh1 + OGD/R 组；6：Lenti-Srxn1-sh2 + OGD/R 组；a：$P<0.01$，与 Control + H_2O_2 组比较；b：$P<0.01$，与 Control + OGD/R 组比较

图 1　Western blot 检测两种慢病毒干扰片段对 Srxn1 蛋白表达的影响

2.2 Srxn1 干扰降低细胞存活率

MTT 结果显示，用 H_2O_2 和 OGD/R 两种模型，均可以导致大鼠原代星形胶质细胞明显损伤。与 Control 组比较，两种 Srxn1 基因干扰组（Lenti-Srxn1-sh1 组和 Lenti-Srxn1-sh2 组）均可以明显减少细胞存活率（图 2）。



1：Normal 组；2：Control + H_2O_2 组；：3：Lenti-Srxn1-sh1 + H_2O_2 组；4：Lenti-Srxn1-sh2 + H_2O_2 组；5：Control + OGD/R 组；6：Lenti-Srxn1-sh1 + OGD/R 组；7：Lenti-Srxn1-sh2 + OGD/R 组；a：$P<0.01$，与 Normal 组比较；b：$P<0.01$，与 Control + H_2O_2 组比较；c：$P<0.01$，d：$P<0.05$，与 Control + OGD/R 组比较

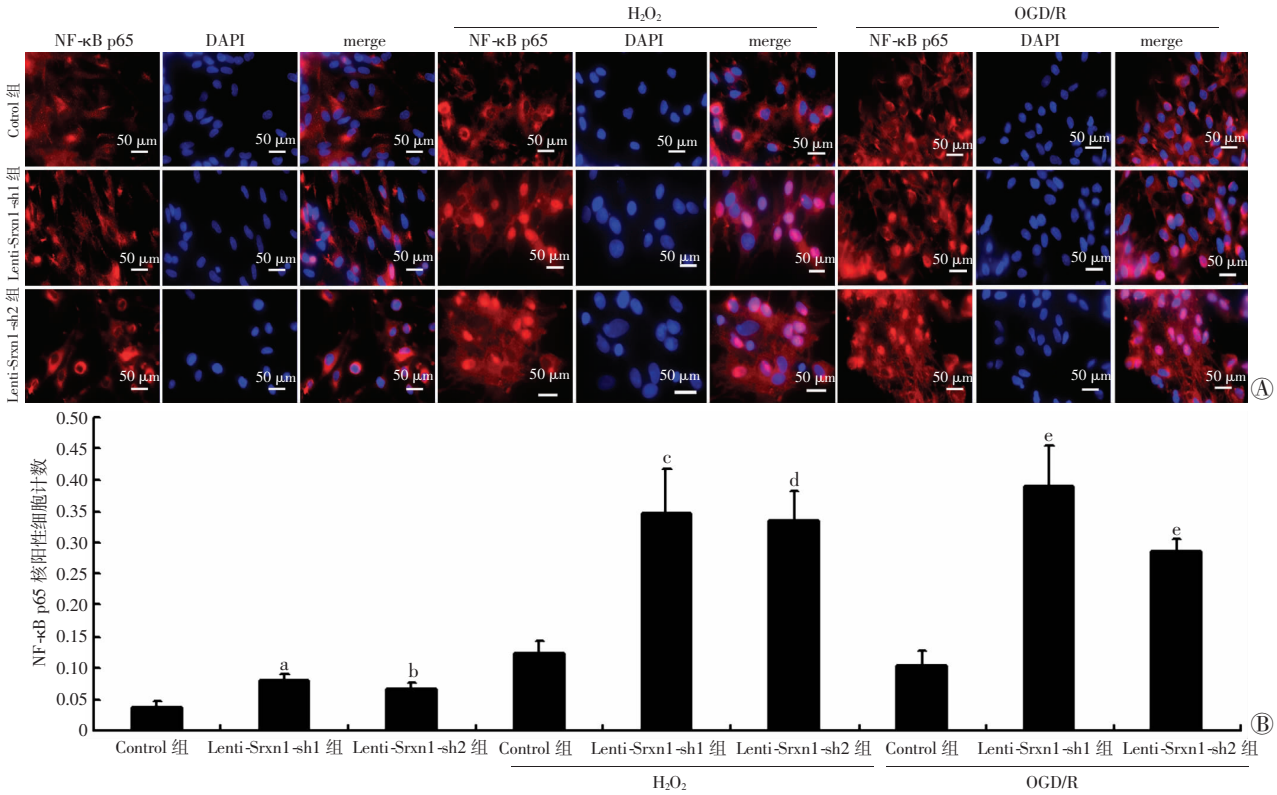
图 2　MTT 检测 Srxn1 干扰对大鼠原代星形胶质细胞存活率的影响

2.3 Srxn1 干扰增加 NF-κB p65 入核

双荧光免疫细胞化学结果显示，NF-κB p65 标记为红色荧光；DAPI 标记细胞核，为蓝色荧光；如果两者共同表达，则为紫色荧光。在正常情况下，与慢病毒 Control 组比较，Lenti-Srxn1-sh1 组和 Lenti-Srxn1-sh2 组可以增加 NF-κB p65 红色荧光在细胞核内的表达。在 H_2O_2 处理时，Control 组中红色荧光表达较强，但是主要位于细胞胞浆区，仅有部分进入蓝色细胞核区域；Lenti-Srxn1-sh1 组和 Lenti-Srxn1-sh2 组，红色荧光较多地进入蓝色细胞核区域，merge 后使细胞核区域显示紫色荧光。同样，OGD/R 处理时，双荧光免疫细胞化学结果与 H_2O_2 处理后基本一致（图 3）。

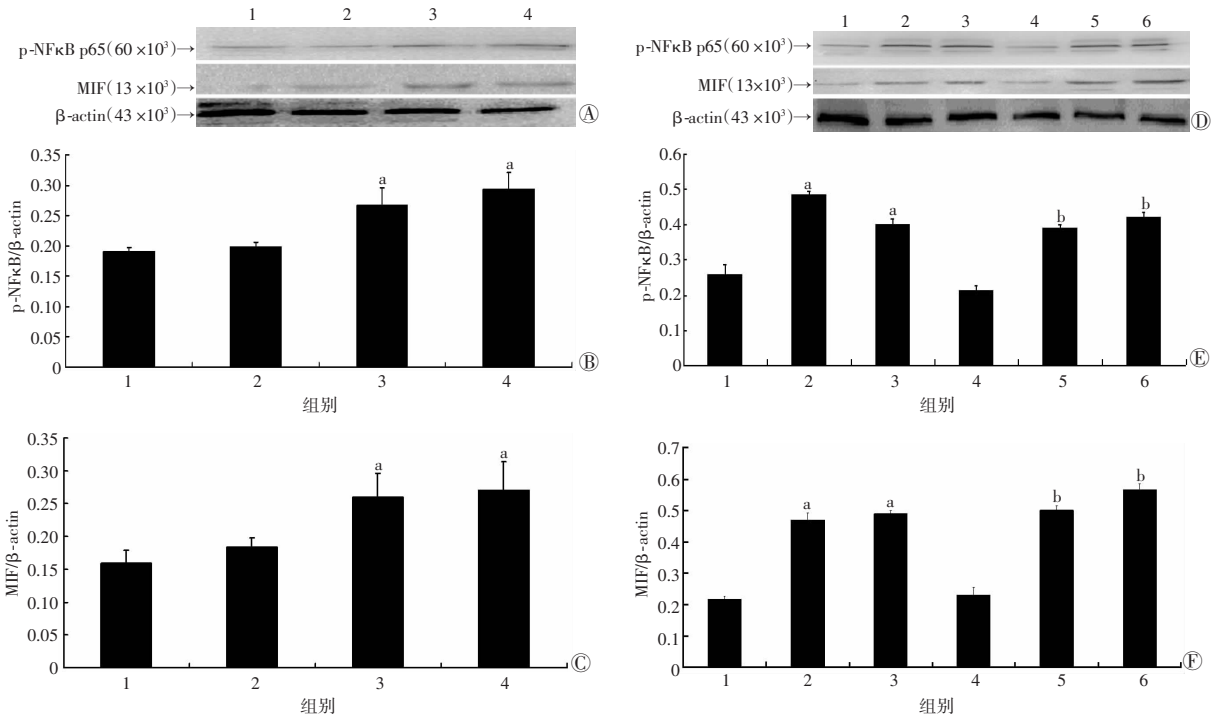
2.4 Srxn1 干扰增加 p-NFκB p65 的表达

Western blot 检测结果显示：在正常情况下，与慢病毒 Control 组比较，Lenti-Srxn1-sh1 组和 Lenti-Srxn1-sh2 组可以增加 p-NFκB p65 蛋白的表达（$P<0.05$，图 4A、B）。100 μmol/L H_2O_2 处理星形胶质细胞 6 h 后，Lenti-Srxn1-sh1 组 p-NFκB p65 的表达大约是 Control 组的 1.89 倍，Lenti-Srxn1-sh2 组的表达大约是 Control 组的 1.56 倍。OGD/R 处理 24 h 也得到类似的结果，与 Control 组比较，Lenti-Srxn1-sh1 组和 Lenti-Srxn1-sh2 组 p-NFκB p65 的表达均明显增加（$P<0.01$，图 4D、E）。



A：双荧光免疫细胞化学观察；B：NF-κB p65 核阳性细胞计数　a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与 Control 组比较；c：$P<0.01$，d：$P<0.05$，与 Control + H_2O_2 组比较；e：$P<0.01$，与 Control + OGD/R 组比较

图3　双荧光免疫细胞化学检测 H_2O_2 和 OGD/R 模型中 Srxn1 干扰增加 NF-κB p65 进入细胞核内



A～C：正常情况 Western blot 结果和 p-NFκB p65、MIF 蛋白表达半定量分析　1：Normal 组；2：Control 组；3：Lenti-Srxn1-sh1 组；4：Lenti-Srxn1-sh2 组；a：$P<0.05$，与 Control 组比较

D～F：H_2O_2 和 OGD/R 模型 Western blot 结果和 p-NFκB p65、MIF 蛋白表达半定量分析结果　1：Control + H_2O_2 组；2：Lenti-Srxn1-sh1 + H_2O_2 组；3：Lenti-Srxn1-sh2 + H_2O_2 组；4：Control + OGD/R 组；5：Lenti-Srxn1-sh1 + OGD/R 组；6：Lenti-Srxn1-sh2 + OGD/R 组；a：$P<0.01$，与 Control + H_2O_2 组比较；b：$P<0.01$，与 Control + OGD/R 组比较

图4　Western blot 检测 Srxn1 干扰增加 p-NFκB p65 和 MIF 蛋白的表达

2.5 Srxn1 干扰增加 MIF 的表达

Western blot 检测结果显示:在正常情况下,与慢病毒 Control 组比较,Lenti-Srxn1-sh1 组和 Lenti-Srxn1-sh2 组可以增加 MIF 的表达($P<0.05$), Lenti-Srxn1-sh1 组 MIF 的表达大约是 Control 组 MIF 的 1.41 倍, Lenti-Srxn1-sh2 组 MIF 的表达大约是 Control 组 MIF 的 1.47 倍(图 4A、C)。分别用 H_2O_2 和 OGD/R 两种模型处理大鼠原代星形胶质细胞后,Srxn1 干扰组 MIF 蛋白表达水平均高于 Control 组,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 4D、F)。

3 讨论

在脑缺血再灌注后期,由于自由基刺激细胞因子和黏附分子的表达,介导炎症和免疫反应,加重脑组织再灌注损伤。研究表明,一些小分子蛋白有可能在脑组织的该炎症反应过程中发挥重要作用[9]。Srxn1,是机体中具有神经保护作用的重要内源性小分子蛋白之一,既往对其的功能及机制研究大多都局限在其抗氧化及抗凋亡的作用上面[1,6],目前,对 Srxn1 在脑缺血炎性损伤方面的功能及机制尚不清楚。在课题组前期研究的基础之上,本研究以大鼠原代星形胶质细胞为研究对象,采用经典的 H_2O_2、OGD/R 模型,模拟体内脑缺血再灌注损伤,通过两组慢病毒干扰片段降低 Srxn1 的表达,结果显示,在 H_2O_2 和 OGD/R 模型中,干扰 Srxn1 基因均能够使细胞存活率明显下降,提示抑制 Srxn1 的表达,能够加重 H_2O_2 和 OGD/R 处理后星形胶质细胞的损伤。

在星形胶质细胞中,Srxn1 是否参与活化 NF-κB 炎症通路及下游靶基因,目前尚不清楚。核转录因子 NF-κB 的过度活化(包括 NF-κB p65 入核表达及 p-NFκB p65 水平增加)是 NF-κB 信号通路激活的关键[10-11]。本研究双标免疫细胞化学结果提示,用 100 μmol/L H_2O_2 处理后,Lenti-Srxn1-sh1 组和 Lenti-Srxn1-sh2 组均可见标记 NF-κB p65 的红色荧光抗体由细胞胞浆区域大量进入蓝色的细胞核区域。在 OGD/R 模型中也得到了相同的结果。Western blot 结果显示,在蛋白水平上,Srxn1 干扰组能够使细胞 p-NFκB p65 的表达增高,以上结果均证实干扰 Srxn1 基因能够诱导 NF-κB 的活化。

NF-κB 活化后,MIF 表达升高,从而可以诱导下游一系列炎症因子的释放[12-13]。我们课题组前期报道发现,NF-κB/MIF 通路在大鼠脑缺血再灌注炎症损伤起到重要作用,是中药丹参酮ⅡA 发挥神经保护作用的重要信号转导途径之一[14]。本研究 Western blot 结果显示,在两种细胞损伤模型(H_2O_2、OGD/R 模型)中, Srxn1 干扰组 NF-κB 靶基因 MIF 蛋白表达水平均高于对照组。以上结果提示,干扰 Srxn1 基因能使 NF-κB 及其下游信号分子的表达升高。

综上所述,Srxn1 作为体内重要的神经保护因子,可以减少 H_2O_2、OGD/R 对大鼠星形胶质细胞的损伤,并且这种保护功能可能与其对细胞重要的核转录因子 NF-κB 及下游信号通路的激活密切相关。

参考文献:

[1] Li Q, Yu S, Wu J, *et al*. Sulfiredoxin-1 protects PC12 cells against oxidative stress induced by hydrogen peroxide[J]. J Neurosci Res, 2013, 91(6): 861-870.

[2] Abbas K, Breton J, Planson A G, *et al*. Nitric oxide activates an Nrf2/sulfiredoxin antioxidant pathway in macrophages [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51(1): 107-114

[3] Planson A G, Palais G, Abbas K, *et al*. Sulfiredoxin protects mice from lipopolysaccharide-induced endotoxic shock[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(11): 2071-2080.

[4] Findlay V J, Tapiero H, Townsend D M. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? [J]. Biomed Pharmacother, 2005, 59(7): 374-379.

[5] Bell K F, Al-Mubarak B, Fowler J H, *et al*. Mild oxidative stress activates Nrf2 in astrocytes, which contributes to neuroprotective ischemic preconditioning[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(1): E1-E2.

[6] Baek J Y, Han S H, Sung S H, *et al*. Sulfiredoxin protein is critical for redox balance and survival of cells exposed to low steady-state levels of H_2O_2[J]. J Biol Chem, 2012, 287(1): 81-89.

[7] Park S J, Kim H Y, Kim H, *et al*. Oxidative stress induces lipid-raft-mediated activation of Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 2 in astrocytes[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 46(12): 1694-1702.

[8] Yu S, Zhao J, Wang X, *et al*. 4-Hydroxybenzyl alcohol confers neuroprotection through up-regulation of antioxidant protein expression[J]. Neurochem Res, 2013, 38(7): 1501-1516.

[9] Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, *et al*. Post-ischemic inflammation in the brain[J]. Front Immunol, 2012, 3: 132.

[10] Hu F, Yang S, Zhao D, *et al*. Moderate extracellular acidification inhibits capsaicin-induced cell death through regulating calcium mobilization, NF-κB translocation and ROS production in synoviocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 424(1): 196-200.

[11] Zhuang X, Pang X, Zhang W, *et al*. Effects of zinc and manganese on advanced glycation end products (AGEs) formation and AGEs-mediated endothelial cell dysfunction[J]. Life Sci, 2012, 90(3/4): 131-139.

[12] Xu Z, Lin S, Wu W, *et al*. Ghrelin prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through TNF-alpha/NF-kappaB pathways and mitochondrial protective mechanisms[J]. Toxicology, 2008, 247(2/3): 133-138.

[13] Amin M A, Haas C S, Zhu K, *et al*. Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 *via* Src, PI3 kinase, and NFkappaB[J]. Blood, 2006, 107(6): 2252-2261.

[14] Chen Y, Wu X, Yu S, *et al*. Neuroprotection of tanshinone IIA against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibition of macrophage migration inhibitory factor in rats[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e40165.

(**收稿**:2014-08-11;**修回**:2014-09-21)

(编辑 汪勤俭)