

## · 实验研究 ·

## 内质网应激在高糖培养加重神经细胞缺氧-复氧损伤中的作用

林慕雅 陈立建 凌军 耿兴强 谢秀秀 都建

**【摘要】 目的** 研究内质网应激在高糖培养加重神经细胞缺氧-复氧损伤中的作用。**方法** 在含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养小鼠神经瘤母细胞 N2a, 按照接种密度每毫升  $10^5$  个将细胞接种于培养板中。采用随机数字分组法将细胞分为四组: 正常糖对照组(NC 组)、正常糖缺氧-复氧组(NH 组)、高糖对照组(HC 组)、高糖缺氧-复氧组(HH 组)。待细胞贴壁后, 将 DMEM/F12 培养基更换为高糖培养基, 孵育 48 h, 造高糖孵育模型。在缺氧小室中缺氧 3 h 后, 再转入正常氧孵育箱中复氧 2 h, 造缺氧-复氧损伤模型。NC 组未作处理; NH 组行缺氧-复氧处理; HC 组行高糖孵育处理; HH 组先行高糖孵育 48 h 后, 再作缺氧-复氧处理。采用 CCK-8 法检测细胞活力, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, Western blot 法检测细胞 GRP78、CHOP 蛋白含量。**结果** 与 NC 组和 HC 组比较, NH 组和 HH 组细胞活力明显减弱, 凋亡率明显升高, GRP78、CHOP 蛋白含量明显增多( $P < 0.01$ ); 与 NH 组比较, HH 组细胞活力明显减弱, 凋亡率明显升高, GRP78、CHOP 蛋白含量明显增多( $P < 0.05$ )。**结论** 高糖培养加重神经细胞缺氧-复氧损伤, 可能与内质网应激标志性蛋白 GRP78 蛋白含量增多和促凋亡转录因子 CHOP 介导的细胞凋亡相关。

**【关键词】** 高糖; 缺氧-复氧损伤; 内质网应激; 凋亡

**Effect of endoplasmic reticulum stress in high glucose aggravating hypoxia-reoxygenation injury in neuroblastoma cells** LIN Muya, CHEN Lijian, LING Jun, GENG Xingqiang, XIE Xiuxiu, DU Jian. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

Corresponding author: CHEN Lijian, Email: chenlijian77@126.com

**【Abstract】 Objective** To identify the effect of endoplasmic reticulum stress in high glucose aggravating hypoxia-reoxygenation injury in neuroblastoma cells. **Methods** Mouse neuroblastoma cells (N2a) were cultured in DMEM/F12 culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The cells were then divided into 4 groups using a random number table: normal glucose control group (group NC), normal glucose hypoxia-reoxygenation group (group NH), high glucose control group (group HC), high glucose hypoxia/reoxygenation group (group HH). The cells were incubated in high glucose culture medium (30.0 mmol/L) for 48 h to simulate high glucose damage model. To mimic the hypoxia-reoxygenation injury, the cells were incubated in a hypoxic chamber (under 95% nitrogen and 5%  $\text{CO}_2$ ) for 3 h, then transferred to a normoxic incubator (under 95% air and 5%  $\text{CO}_2$ ) for 2 h to reoxygenation. The cells in group NC were cultured without any treatment. The cells in group NH were subjected to hypoxia-reoxygenation injury only. The cells in group HC were cultured in high glucose medium. The cells in group HH were cultured with high glucose medium, and then subjected to hypoxia-reoxygenation injury. The cell viability was measured by CCK-8 assay, the cell apoptosis was detected by flow cytometry and the apoptosis rates were calculated. In addition, the contents of GRP78, CHOP were detected by Western blot. **Results** Compared with group NC and group HC respectively, the cell viability was significantly weakened, the cell apoptosis rates were significantly increased, and the contents of GRP78 and CHOP were significantly increased ( $P < 0.01$ ) in group NH and group HH. Compared with group NH, the cell viability was significantly weakened, the apoptosis rate was significantly increased, and the contents of GRP78 and CHOP were significantly increased in group HH ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** High glucose aggravates neuroblastoma cells hypoxia-reoxygenation injury, which is associated with endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and

DOI:10.12089/jca.2018.06.015

基金项目: 安徽省自然科学基金(1708085MH190)

作者单位: 230022 合肥市, 安徽医科大学第一附属医院麻醉科(林慕雅、陈立建、凌军、耿兴强、谢秀秀); 安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室(都建)

通信作者: 陈立建, Email: chenlijian77@126.com

proapoptotic transcription factor CHOP induction.

【Key words】 High glucose; Hypoxia-reoxygenation injury; Endoplasmic reticulum stress; Apoptosis

糖尿病高血糖是脑血管疾病的独立危险因素,与脑梗死关系密切。在麻醉和手术过程中,糖尿病患者发生脑血管意外的风险远高于非糖尿病患者<sup>[1]</sup>。在急性脑梗死患者中,糖尿病患者脑梗死面积更大,临床预后更差,死亡率也更高<sup>[2]</sup>,其具体机制尚未完全清楚。内质网应激介导的凋亡是糖尿病和其并发症的病理形成过程中的重要参与者<sup>[3]</sup>,也是脑缺血-再灌注损伤的重要机制<sup>[4]</sup>。此前有研究发现,抑制内质网应激可以减少脑梗死面积,提高脑神经功能评分<sup>[5]</sup>。本研究拟探讨内质网应激在高糖培养加重神经细胞缺氧-复氧损伤中的作用。

### 材料与方法

**实验材料与分组** 小鼠神经瘤母细胞 N2a 在含 10% 胎牛血清(20161010)的 DMEM/F12 完全培养基中培养(37℃、5% CO<sub>2</sub>),传代后接种于 96 孔(每孔 100 μl)、12 孔(每孔 1 ml)或 6 孔(每孔 2 ml)细胞培养板中,接种密度为每毫升 10<sup>5</sup> 个。采用随机数字表法将细胞分为四组:正常糖对照组(NC 组)、正常糖缺氧-复氧组(NH 组)、高糖对照组(HC 组)、高糖缺氧-复氧组(HH 组)。

**高糖与缺氧-复氧损伤模型** 待细胞贴壁后,弃掉 DMEM/F12 完全培养基,换用高糖 DMEM 培养基(30.0 mmol/L)孵育 48 h。将培养板中的完全培养基替换为无糖无血清培养基后,置于 95% N<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> 缺氧培养罐中孵育 3 h 后,再更换为相应糖浓度的完全培养基,并转移到正常氧孵育箱中孵育 2 h。NC 组不作处理;NH 组行缺氧-复氧处理;HC 组行高糖孵育 48 h;HH 组先行高糖处理 48 h 后,再作缺氧-复氧处理。

**细胞活力检测** 每组取 6 孔细胞,每孔加入 10% CCK-8 溶液孵育 2 h,采用 Infinite M200 Pro 酶标仪于波长 450 nm 处测定吸光度值,重复测定 3 次,取平均值反映细胞活力。

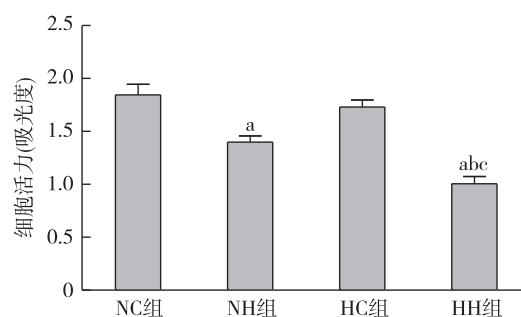
**细胞凋亡率检测** 每组取 3 孔细胞,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,离心后弃上清,预冷 PBS 洗 2 次,收集约 1×10<sup>5</sup> 个细胞,加入 100 μl 的 1× Binding Buffer 悬浮细胞,随后加入 5 μl PE Annexin V 和 5 μl 7-AAD 溶液,室温避光孵育 15 min,再加入 400 μl 1× Binding Buffer 后,立即上流式细胞仪检测。采用 FSC Express 4 软件进行分析,绘制二维散点图,统计四组凋亡率。

**GRP78、CHOP 蛋白含量检测** 每组取 3 孔细胞,采用 Western blot 法测定。提取总蛋白,测定蛋白浓度。取蛋白样品 40 μg,在 12% SDS-PAGE 凝胶上电泳,然后电转至硝酸纤维素滤膜上,5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 2 h, TBST 洗膜 10 min,重复 3 次后,加入兔抗 GRP78 抗体(1:1 000)、兔抗 CHOP 抗体(1:1 000)、鼠抗 GAPDH(1:1 000),4℃ 封闭过夜。TBST 洗膜 10 min,重复 3 次,分别加入相对应的辣根过氧化物酶标记的抗体(1:8 000),常温摇床孵育 1 h,洗膜 ECL 显影。采用 ImageJ 凝胶定量分析软件测定条带灰度值,以 GRP78、CHOP 条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值反映 GRP78、CHOP 蛋白含量。

**统计分析** 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

**细胞活力** NH 组和 HH 组细胞活力明显弱于 NC 组( $P < 0.05$ );HH 组细胞活力明显弱于 NH 组( $P < 0.05$ );NC 组和 HC 组细胞活力差异无统计学意义(图 1)。

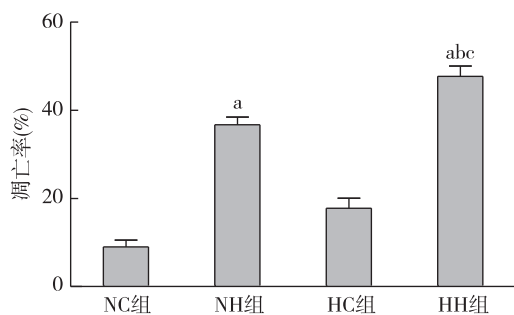


注:与 NC 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 HC 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与 NH 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

图 1 四组细胞活力的比较

**细胞凋亡率** NH 组和 HH 组细胞凋亡率明显高于 NC 组( $P < 0.05$ );HH 组细胞凋亡率明显高于 NH 组( $P < 0.05$ );NC 组和 HC 组细胞凋亡率差异无统计学意义(图 2)。

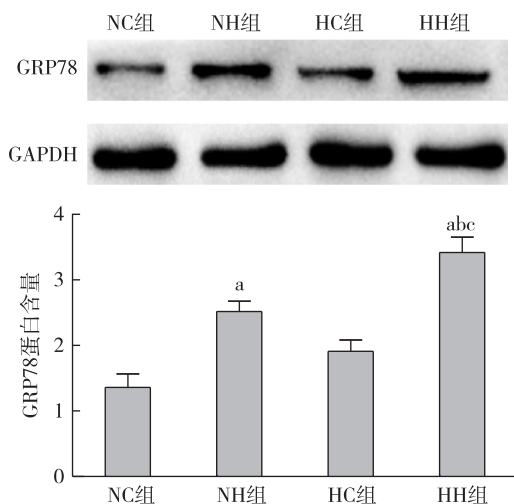
**GRP78、CHOP 蛋白含量** NH 组和 HH 组 GRP78、CHOP 蛋白含量明显多于 NC 组( $P < 0.05$ )。



注:与 NC 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 HC 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与 NH 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$

图 2 四组细胞凋亡率的比较

0.05);HH 组 GRP78、CHOP 蛋白含量明显多于 NH 组( $P < 0.05$ );NC 组与 HC 组蛋白含量差异无统计学意义(图 3,4)。

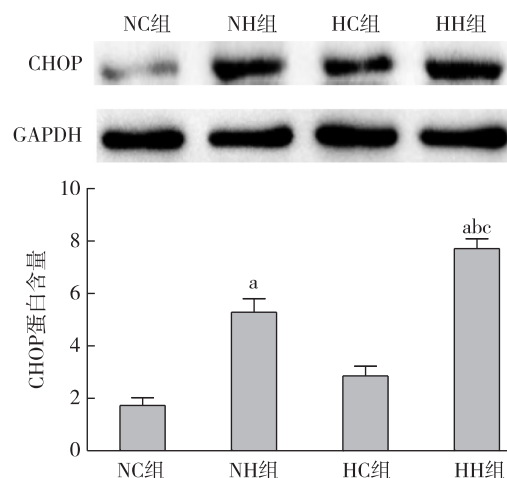


注:与 NC 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 HC 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与 NH 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$

图 3 四组细胞 GRP78 蛋白含量的比较

## 讨 论

脑缺血-再灌注损伤可导致能量耗竭、细胞内钙平衡紊乱和自由基蓄积等,从而激活内质网应激反应。在损伤的早期,内质网应激标志性分子蛋白 GRP78 与内质网跨膜受体发生解离,并与未折叠/错误折叠蛋白结合,促进错误折叠蛋白的降解,发生未折叠蛋白反应(UPR),减轻细胞内应激<sup>[6]</sup>。当细胞功能不能恢复时,UPR 启动促凋亡通路,通过激活内质网应激特异性蛋白 CHOP 介导的凋亡,最终导致细胞凋亡<sup>[7-8]</sup>。本研究结果显示,与对照组比较,缺氧-复氧组细胞活力明显减弱、细胞凋亡率明显增高以及内质网应激分子伴侣 GRP78 和



注:与 NC 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 HC 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与 NH 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$

图 4 四组细胞 CHOP 蛋白含量的比较

CHOP 蛋白含量明显增多,提示内质网应激在神经细胞缺氧-复氧损伤中的重要作用。

糖尿病高血糖是罹患脑中风的独立危险因素。在急性脑梗死研究的回顾性分析中发现,糖尿病患者脑梗死面积更大,临床预后更差,死亡率也增高<sup>[9]</sup>。动物研究表明,糖尿病大鼠脑缺血-再灌注后的脑神经功能评分更低,梗死面积更大,可能是内质网应激加重糖尿病鼠脑缺血-再灌注的损伤<sup>[10]</sup>。此外,有研究显示,2 型糖尿病鼠较正常鼠的心肌细胞缺氧-复氧损伤更为严重<sup>[11]</sup>,且糖尿病因素可取消舒芬太尼后处理对大鼠缺血后心肌的保护作用<sup>[12]</sup>。N2a 细胞株是一种鼠源性神经瘤母细胞,贴壁良好,多数成神经元样,具有轴突样结构,常作为体外病理研究的细胞模型。参照文献<sup>[13]</sup>,根据神经瘤细胞体外培养时的生长状态和预实验结果,本实验采用糖浓度 17.0 mmol/L 作为正常糖浓度,糖浓度 30.0 mmol/L 为高糖浓度。

本实验在细胞水平上,发现高糖缺氧-复氧组较正常糖缺氧-复氧组细胞活力明显减弱、细胞凋亡率明显升高以及内质网应激明显增强。由此可见,高糖培养加重的神经细胞缺氧-复氧损伤,其机制可能与内质网分子伴侣 GRP78 蛋白含量增多和 CHOP 介导的细胞凋亡有关。而正常糖对照组和高糖对照组差异无统计学意义,这可能是本实验选择的高糖浓度不足以产生强烈的内质网应激,还可能与细胞自身适应性调节缓解高糖应激有关,导致细胞活性、细胞凋亡率、GRP78 和 CHOP 蛋白含量仅有轻微的变化。

综上所述,高糖培养加重神经细胞缺氧-复氧损伤,其机制可能与内质网分子伴侣 GRP78 蛋白含量增多和促凋亡转录因子 CHOP 介导的细胞凋亡有关。阐明内质网应激在糖尿病高血糖加剧脑缺血-再灌注损伤中的具体作用机制,可能为缺血性脑卒中的防治提供新的理论依据。

#### 参 考 文 献

- [1] Ergul A, Kelly-Cobbs A, Abdalla M, et al. Cerebrovascular complications of diabetes: focus on stroke. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2012, 12(2): 148-158.
- [2] Els T, Klisch J, Orszagh M, et al. Hyperglycemia in patients with focal cerebral ischemia after intravenous thrombolysis: influence on clinical outcome and infarct size. *Cerebrovasc Dis*, 2002, 13(2): 89-94.
- [3] Balasubramanyam M, Singh LP, Rangasamy S. Molecular intricacies and the role of ER stress in diabetes. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 958169.
- [4] Xin Q, Ji B, Cheng B, et al. Endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia. *Neurochem Int*, 2014, 68: 18-27.
- [5] Wu CX, Liu R, Gao M, et al. Pinocembrin protects brain against ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress induced apoptosis. *Neurosci Lett*, 2013, 546: 57-62.
- [6] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 2011, 334(6059): 1081-1086.
- [7] Ye Z, Wang N, Xia P, et al. Parecoxib suppresses CHOP and Foxo1 nuclear translocation, but increases GRP78 levels in a rat model of focal ischemia. *Neurochem Res*, 2013, 38(4): 686-693.
- [8] Avila MF, Cabezas R, Torrente D, et al. Novel interactions of GRP78: UPR and estrogen responses in the brain. *Cell Biol Int*, 2013, 37(6): 521-532.
- [9] Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospectivestudies. *Lancet*, 2010, 375(9733): 2215-2222.
- [10] Srinivasan K, Sharma SS. Augmentation of endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia/reperfusion injury associated with comorbid type 2 diabetes. *Neurol Res*, 2011, 33(8): 858-865.
- [11] 杨雪, 隋海静, 李冬梅, 等. 丙泊酚对 2 型糖尿病大鼠心肌缺血-再灌注损伤时凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 的影响. *临床麻醉学杂志*, 2014, 30(4): 385-388.
- [12] 章雨雯, 顾尔伟, 张雷, 等. 糖尿病因素取消舒芬太尼后处理对大鼠缺血后心肌保护炎症机制的影响. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(9): 891-895.
- [13] Yerra VG, Kumar A. Adenosine monophosphate-activated protein kinase abates hyperglycaemia-induced neuronal injury in experimental models of diabetic neuropathy: effects on mitochondrial biogenesis, autophagy and neuroinflammation. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(3): 2301-2312.

(收稿日期: 2017-10-11)

## · 读者·作者·编者 ·

### 《临床麻醉学杂志》关于学术不端行为的声明

为维护学术期刊的严肃性和科学性,并向广大读者负责,本刊编辑部重申坚决反对抄袭、剽窃、一稿两投、一稿两用等学术不端行为,并采取以下预防和惩处措施:(1)稿件刊出前所有作者须在校样首页亲笔签名,并加盖公章;稿件文责自负。(2)投稿后 3 个月内未收到稿件处理意见,稿件可能仍在审阅中;作者欲投他刊,请先与编辑部联系撤稿,切勿一稿两投。(3)来稿如有学术不端行为嫌疑时,编辑部在认真收集有关资料和仔细核对后将通知第一作者,作者须对此作出解释。(4)如稿件被证实系一稿两用,本刊将在杂志和网站上刊登撤销该文的声明,并向作者所在单位通报;2 年内拒绝发表该作者的任何来稿。