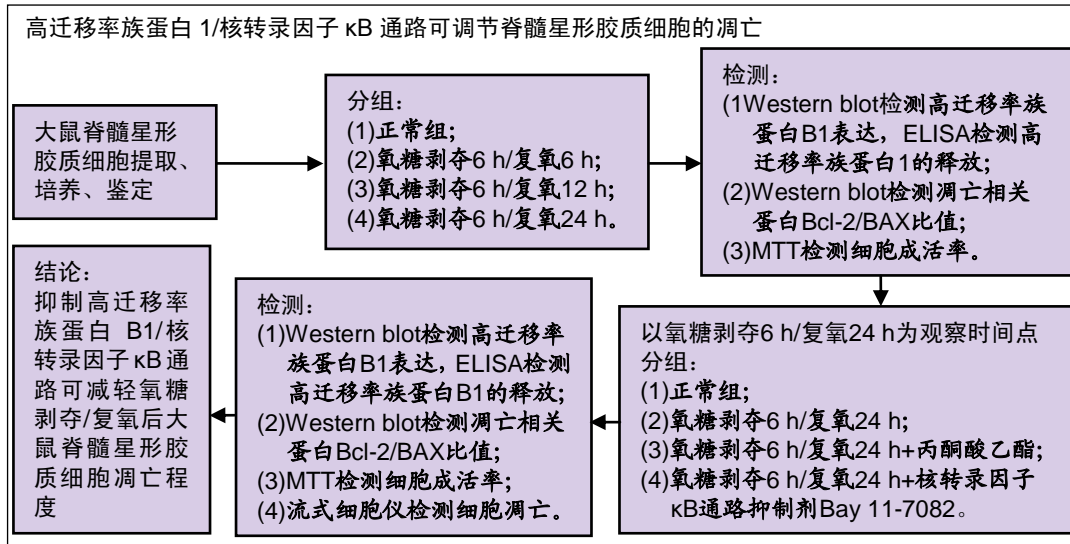


减少氧糖剥夺/复氧后脊髓星形胶质细胞凋亡：抑制高迁移率族蛋白B1/核转录因子κB通路的作用

吕 聪, 孙 麟, 冯皓宇, 马 迅, 贺亚军, 李季声(山西医科大学附属大医院骨科, 山西省太原市 030032)
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1811 ORCID: 0000-0001-7708-9494(吕聪)

文章快速阅读:



吕聪, 男, 1990 年生, 上海市人, 汉族, 2019 年山西医科大学毕业, 硕士, 主要从事脊髓脊柱损伤及疾病研究。

通讯作者: 孙麟, 副主任医师, 山西医科大学附属大医院骨科, 山西省太原市 030032

文献标识码: B
稿件接受: 2019-04-06



文题释义:

脊髓星形胶质细胞: 广泛分布在脊髓中枢神经系统中的各个区域, 在正常脊髓中发挥营养神经、保护血脑屏障、促进突触生长、维持中枢神经系统稳态等功能, 当脊髓损伤后其可发生水肿、活化后发生炎症反应、凋亡、坏死后释放大量细胞毒性因子等改变, 加重脊髓损伤。

高迁移率族蛋白 B1: 是一种普遍存在的核蛋白, 在核内稳定表达, 参与修复 DNA 和维持 DNA 稳定, 但是在缺氧和其他损伤时可由坏死细胞或者应激细胞被释放到细胞外, 诱发炎症反应。

核转录因子 κB: 普遍存在于各种动物细胞中, 受到细胞外的刺激后进入细胞核参与炎症与免疫反应。

摘要

背景: 脊髓损伤后, 星形胶质细胞核内高迁移率族蛋白 B1 被释放到细胞外, 通过与细胞膜表面受体结合激活核转录因子 κB 引起脊髓水肿或者炎症等一系列病理反应, 但有关高迁移率族蛋白 B1/核转录因子 κB 通路调节氧糖剥夺/复氧损伤后脊髓星形胶质细胞凋亡的研究尚少。

目的: 分析高迁移率族蛋白 B1/核转录因子 κB 通路对氧糖剥夺/复氧后脊髓星形胶质细胞凋亡的调节作用。

方法: 体外培养新生一、二天 SD 大鼠(山西医科大学动物中心提供)脊髓星形胶质细胞, 建立氧糖剥夺细胞损伤模型, 并分别复氧培养 6, 12, 24 h, ELISA 法检测培养基内高迁移率族蛋白 B1 质量浓度, Western blot 法检测细胞内高迁移率族蛋白 B1、Bcl-2、BAX 蛋白表达量, MTT 法检测细胞存活率, 以此筛选最佳复氧时间进行以下实验。取第 4 代脊髓星形胶质细胞, 分 4 组培养: 正常组、氧糖剥夺/复氧组、氧糖剥夺/复氧+丙酮酸乙酯组、氧糖剥夺/复氧+核转录因子 κB 抑制剂组, 复氧培养 24 h 后, ELISA 法检测培养基内高迁移率族蛋白 B1 质量浓度, Western blot 法检测细胞内高迁移率族蛋白 B1、核转录因子 κB、Bcl-2、BAX 蛋白表达量, MTT 法检测细胞存活率, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

结果与结论: ①各检测结果显示复氧培养 24 h 为最佳复氧时间, 用于后续实验; ②与正常组比较, 氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组高迁移率族蛋白 B1、核转录因子 κB 蛋白表达及细胞凋亡率升高($P < 0.05$), 细胞存活率、Bcl-2/BAX 比值降低($P < 0.05$); 与氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组比较, 氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h+丙酮酸乙酯组、氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h+核转录因子 κB 抑制剂组细胞存活率、Bcl-2/BAX 比值升高($P < 0.05$), 核转录因子 κB 蛋白表达、细胞凋亡率降低($P < 0.05$); ③结果表明, 高迁移率族蛋白 B1/核转录因子 κB 通路参与调节氧糖剥夺/复氧后脊髓星形胶质细胞的凋亡。

关键词:

脊髓损伤; 星形胶质细胞; 高迁移率族蛋白 B1; 核转录因子 κB; 细胞凋亡; 氧糖剥夺/复氧; Bcl-2; BAX
中图分类号: R459.9; R365; R651.2

基金资助:

国家自然科学基金(81870976), 项目负责人: 孙麟

缩略语:

高迁移率族蛋白 B1: high mobility group box 1, HMGB1

Lü Cong, Master,
Department of Orthopedics,
Shanxi Dayi Hospital
Affiliated to Shanxi Medical
University, Taiyuan 030032,
Shanxi Province, China

Corresponding author:
Sun Lin, Associate chief
physician, Department of
Orthopedics, Shanxi Dayi
Hospital Affiliated to Shanxi
Medical University, Taiyuan
030032, Shanxi Province,
China

Inhibition of high mobility group box 1/nuclear factor-kappa B pathway reduces apoptosis in spinal cord astrocytes after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation

Lü Cong, Sun Lin, Feng Haoyu, Ma Xun, He Yajun, Li Jisheng (Department of Orthopedics, Shanxi Dayi Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030032, Shanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Spinal cord injuries triggers the release of high mobility group box 1 (HMGB1) from nerve cells to activate the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) by binding to cell membrane surface receptor, thereby inducing a series of pathological reactions, such as spinal cord edema or inflammation. However, little is reported on whether inhibition of HMGB1/NF- κ B pathway could attenuate spinal cord astrocytes apoptosis after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R).

OBJECTIVE: To investigate the effect of HMGB1/NF- κ B pathway on spinal cord astrocytes apoptosis after OGD/R.

METHODS: Spinal cord astrocytes of newborn Sprague-Dawley rats (provided by the Laboratory Animal Center of Shanxi Medical University, China) were cultured *in vitro* and an OGD/R model was established. Spinal cord astrocytes were subjected to reoxygenation 6, 12, and 24 hours. Release of HMGB1 in the culture medium was detected by ELISA. The expression of HMGB1, Bcl-2 and Bax were detected by western blot and the cell survival rate was determined by MTT. The optimal reoxygenation time was then selected for the following experiments. Spinal cord astrocytes at passage 4 were divided into normal group, OGD6h/R24h group, OGD6h/R24h+ethyl pyruvate group, OGD6h/R24h+Bay 11-7082 group. After 24 hours of reoxygenation, the release of HMGB1 was detected by ELISA, the expression of HMGB1, NF- κ B, Bcl-2 and BAX was analyzed by western blot, the survival rate of astrocytes was determined by MTT, and the apoptosis of astrocytes was measured by flow cytometry.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The results showed that the best reoxygenation time was 24 hours, which was used for subsequent experiments. (2) Compared with the normal group, the release and expression of HMGB1 and NF- κ B as well as the apoptotic rate of astrocytes were obviously increased in the OGD6h/R24h group ($P < 0.05$), while the survival rate of astrocytes and the ratio of Bcl-2/Bax were obviously declined in the OGD6h/R24h group ($P < 0.05$). Compared with the OGD6h/R24h group, the astrocyte survival rate and the ratio of Bcl-2/Bax were significantly raised ($P < 0.05$), while the expression of NF- κ B and the apoptosis rate of astrocytes were remarkably decreased ($P < 0.05$) in the OGD6h/R24h+ethyl pyruvate and OGD6h/R24h+Bay 11-7082 groups. To conclude, the HMGB1/NF- κ B signal pathway is involved in the regulation of apoptosis in spinal cord astrocytes after OGD/R.

Key words: spinal cord injury; astrocytes; high mobility group box B1; nuclear factor kappa B; apoptosis; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; Bcl-2; Bax

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81870976 (to SL)

0 引言 Introduction

脊髓损伤是一种由外在机械力造成的脊髓损伤,破坏性极大,可引发严重的神经功能障碍^[1]。脊髓损伤可分为原发性损伤和继发性损伤,原发性损伤是直接外力损伤,损伤不可逆转,继发性损伤在原发性损伤后出现,引起脊髓水肿、缺血坏死、炎症反应、氧化应激、细胞凋亡等一系列病理反应,扩大脊髓损伤后脊髓损伤范围,加重脊髓神经功能损伤,通过对继发性损伤的抑制与逆转可改善脊髓损伤范围及神经功能^[2-4]。

在继发性损伤的研究中发现,脊髓损伤后细胞凋亡可导致脊髓损伤节段神经功能和感觉功能的部分丧失,有效的干预细胞凋亡途径对脊髓损伤后神经功能的恢复与治疗有着重要意义^[5]。细胞凋亡是一种程序性死亡,线粒体能接收到细胞凋亡的各种信号,释放出多种凋亡诱导因子^[6],而Bcl-2家族蛋白在调控线粒体功能中通过发生磷酸化、异二聚化、蛋白水解等生物学效应,调节抗凋亡蛋白Bcl-2与促凋亡蛋白BAX,影响Bcl-2/BAX蛋白表达的比率,从而改变线粒体外膜的通透性,继而决定细胞的生存^[7-8]。因此通过调节Bcl-2与BAX可有效控制脊髓损伤后的细胞凋亡程度。

脊髓星形胶质细胞广泛分布在脊髓中枢神经系统中的各个区域,在正常脊髓中发挥营养神经、保护血脑屏障、促进突触生长、维持中枢神经系统稳态等功能^[9-10]。当脊髓损伤后,星形胶质细胞可发生水肿、活化、炎症反应、凋亡、坏死后释放大量细胞毒性因子等改变,加重脊髓损伤。

既往脊髓损伤研究表明,通过抑制脊髓损伤后BAX的表达来减少脊髓中细胞的凋亡,有利于脊髓神经功能的恢复^[11]。但大部分研究着重于脊髓神经元或者整体脊髓的凋亡水平,而少有对脊髓星形胶质细胞的研究。因此,研究损伤后脊髓星形胶质细胞的凋亡对于保护脊髓中枢神经系统免于进一步受损有着重要意义^[12-13]。

高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1, HMGB1)是一种普遍存在的细胞核蛋白,在核内稳定表达,参与修复和维持DNA稳定,但在缺氧和其他损伤时可由坏死细胞或者应激细胞被释放到细胞外,诱发炎症反应,破坏细胞正常功能^[14-15]。核转录因子 κ B普遍存在于各种动物细胞中,受到细胞外的刺激后进入细胞核,参与炎症与免疫反应^[16]。有报道脊髓损伤后HMGB1从核内释放与细胞膜上的受体结合,激活炎症通路核转录因子 κ B的核转位,具有极强的促炎作用^[17-19]。甘草甜素通过抑制HMGB1能够改善线粒体通路引起的肝细胞凋亡^[20]。在中枢神经系统的研究中发现,有效抑制HMGB1对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤诱导的炎症、氧化应激和凋亡具有保护作用^[21-22]。然而释放出的HMGB1是否能与脊髓星形胶质细胞结合,激活细胞内核转录因子 κ B引起细胞的凋亡,还未见大量报道。

此次研究通过体外培养大鼠脊髓星形胶质细胞,建立氧糖剥夺/复氧模型^[3, 23-24],模拟脊髓损伤后脊髓星形胶质细胞缺血再灌注损伤的病理过程,观察损伤后星形胶质细胞内HMGB1的表达与释放水平及凋亡蛋白Bcl-2和BAX的变化,其次通过利用丙酮酸乙酯抑制HMGB1的表达^[25],应

用Bay 11-7082抑制核转录因子 κ B的表达^[26],研究HMGB1/核转录因子 κ B通路对脊髓星形胶质细胞凋亡的调节作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年5至12月在山西医科大学转化医学中心实验室完成。

1.3 材料 DMEM高糖培养基、胎牛血清、DMEM无糖培养基(美国Gibco公司); HMGB1抑制剂丙酮酸乙酯、核转录因子 κ B抑制剂Bay 11-7082(美国sigma公司); 小鼠抗大鼠S100 β 抗体(中国武汉博士德公司); 兔抗大鼠HMGB1抗体、兔抗大鼠Bcl-2(英国Abcam公司); 兔抗大鼠BAX、小鼠抗大鼠核转录因子 κ B抗体(美国CST公司)、小鼠抗大鼠GAPDH抗体、小鼠抗大鼠Histon抗体、MTT细胞增殖-毒性试剂盒(中国碧云天生物公司); 异硫氰酸荧光素(FITC, 中国中杉金桥公司), HMGB1 ELISA试剂盒(中国上海西唐生物公司); Hoechst/PI试剂盒(中国索莱宝生物公司); 显影仪(上海勤翔科学仪器有限公司)。

实验动物: 新生一二天SD大鼠, 由山西医科大学动物中心提供, 许可证号: SCXK(晋)2015-0001。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠星形胶质细胞的分离与培养 取新生SD大鼠(提取一次原代星形胶质细胞需要4只, 实验共使用12只), 消毒后迅速断头处死, 剪开脊髓背部皮肤暴露脊柱, 将剪刀伸入胸腔沿脊柱剪下脊柱, 剪开腹侧椎管, 取脊髓。仔细剥离脊髓表面脊膜和血管, 之后将脊髓剪碎, 随后用0.125%胰酶37℃消化30 min。终止消化后使用低速离心机离心(1 000 r/min离心5 min), 弃上清后加入含体积分数10%胎牛血清的高糖培养基吹打均匀, 并使用200目筛网过滤, 种入细胞培养瓶内, 于含体积分数5%CO₂的37℃培养箱内培养。每3 d半量换液, 七八天待细胞融合90%后传代。使用第4代大鼠脊髓星形胶质细胞进行实验。利用星形胶质细胞特异性蛋白S100 β 进行免疫荧光染色用于细胞纯化鉴定^[27]。

细胞免疫荧光: 将细胞接种于预先放好盖玻片的24孔板内, 接种细胞浓度为 1×10^5 L⁻¹, 24 h后用40 g/L多聚甲醛固定, PBS冲洗3遍, 体积分数5%山羊血清37℃孵育, 加入一抗S100 β 4℃过夜12 h。之后洗去一抗, 使用含FITC二抗避光37℃孵育1.5 h。DAPI染色细胞核10 min后使用防淬灭剂封固, 荧光显微镜下观察。

1.4.2 体外氧糖剥夺/复氧模型建立 首先建立氧糖剥夺模型, 将原有星形胶质细胞培养瓶内含血清DMEM培养基去除, PBS冲洗后加入无糖DMEM培养基, 于37℃、体积分数1%O₂、体积分数5%CO₂、体积分数94%N₂的三气培养箱中培养6 h; 之后再换回含体积分数10%胎牛血清高糖DMEM, 于体积分数5%CO₂的37℃培养箱内分别复氧培养6, 12, 24 h。

1.4.3 实验分组 ①首先观察氧糖剥夺/复氧后, 大鼠脊髓星形胶质细胞内HMGB1表达与释放及细胞凋亡情况, 将星形胶质细胞分为正常组、氧糖剥夺6 h/复氧6 h、氧糖剥夺

6 h/复氧12 h、氧糖剥夺6 h/复氧24 h(n=3)。选出早期损伤, 氧糖剥夺6 h后复氧最佳时间的氧糖剥夺/复氧组进行下一步实验; ②随后, 观察使用丙酮酸乙酯及核转录因子 κ B抑制剂Bay 11-7082后, 大鼠脊髓HMGB1表达与释放、核内核转录因子 κ B表达及星形胶质细胞的凋亡情况, 将星形胶质细胞分为正常组、氧糖剥夺6 h/复氧24 h组、氧糖剥夺6 h/复氧24 h+丙酮酸乙酯(12 μ mol/L^[26], 复氧时加入)组、氧糖剥夺6 h/复氧24 h+Bay 11-7082(5 μ mol/L^[26], 复氧时加入)组(n=3)。单次实验每组3个样本, 每个实验重复不少于3次。

1.4.4 MTT检测细胞存活率 将细胞接种于96孔板中, 培养48 h后分组处理, 而空白组不接种细胞, 仅加入培养基。之后将50 μ L的MTT溶液加入各组细胞中, 37℃孵育4 h后去除原有培养基, 加入DMSO溶液, 于摇床振荡30 min, 于酶标仪570 nm光波长下测吸光度值, 各组细胞成活率利用公式(实验组-空白组)/(正常组-空白组) \times 100%计算出。

1.4.5 ELISA检测HMGB1分泌 收集各组大鼠脊髓星形胶质细胞的培养基上清液, 以备检测。按HMGB1 ELISA试剂盒说明书稀释制备标准品制作标准曲线, 质量浓度分别为20, 10, 5.0, 2.5, 1.25 μ g/L。将标准品与待测样本加入孔板内, 并设置无任何试剂的空白孔, 每孔50 μ L, 37℃孵育30 min。洗涤后加入酶标试剂50 μ L。洗涤后加入A、B显色液, 37℃孵育30 min, 之后终止显色, 于酶标仪450 nm光波长下测吸光度值, 计算各组培养基中HMGB1质量浓度。

1.4.6 Western blot检测相关蛋白表达 将不同处理组细胞收集后, 使用核浆膜试剂盒分别提取细胞的膜浆蛋白与核蛋白, 膜浆蛋白用于检测HMGB1、Bcl-2和BAX的表达, 其内参为GAPDH; 核蛋白用于检测核转录因子 κ Bp65的表达, 其内参为Histon H3。BCA法测量各组蛋白浓度。用12% SDS-PAGE凝胶进行电泳, 之后转于PVDF膜, 5%脱脂奶粉封闭2 h后, 加一抗HMGB1(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、BAX(1:1 000)、核转录因子 κ B(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)、Histon(1:1 000) 4℃过夜孵育12 h。次日洗去一抗, 加入对应种属辣根过氧化物酶标记的二抗37℃孵育2 h, 洗涤后使用ECL发光液于显影仪进行显影, 运用Image Pro Plus软件进行分析。

1.4.7 流式细胞仪Hoechst/PI双染法检测细胞凋亡 收集各组细胞, 用染色缓冲液重悬, 分别加入5 μ L Hoechst和PI染液避光冰浴孵育20 min, 随后进行流式细胞仪检测红色和蓝色荧光。正常细胞为弱红色和弱蓝色荧光(P3), 凋亡细胞为弱红色和强蓝色荧光(P4)。

1.5 主要观察指标 ①ELISA法检测细胞上清液中HMGB1质量浓度; ②Western blot法检测细胞浆与膜中HMGB1、Bcl-2、BAX表达量及细胞核中核转录因子 κ B的表达量; ③MTT法检测细胞活性; ④流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.6 统计学分析 采用SPSS 18.0进行数据分析, 所有实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用单因素方差分析, 两两比较应用Dunnett's分析。P < 0.05则认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 星形胶质细胞鉴定结果 取第3代细胞, 用星形胶质细胞特定表达蛋白S100 β 对细胞进行免疫荧光染色, 染色结果为星形胶质细胞纯度为95%, 见图1。

2.2 氧糖剥夺/复氧后星形胶质细胞HMGB1的表达与释放及细胞活性与凋亡程度

HMGB1表达与释放: Western blot与ELISA检测显示与正常组相比, 氧糖剥夺6 h/复氧6, 12, 24 h组HMGB1蛋白表达与释放明显增多, 且氧糖剥夺6 h/复氧24 h组中HMGB1表达与释放最多的($P < 0.05$), 见图2A, B。

凋亡蛋白表达: 与正常组相比, 氧糖剥夺6 h/复氧6, 12, 24 h组Bcl-2与BAX表达均增多, 但Bcl-2随复氧时间增长表达逐渐减少, BAX表达随复氧时间延长表达增加, 因此Bcl-2/BAX比值随时间增长降低, 在复氧24 h时Bcl-2/BAX比值达到最低($P < 0.05$), 见图2C。

细胞存活率: 与正常组相比, 氧糖剥夺6 h/复氧, 12, 24 h组星形胶质细胞活性随时间的增加减弱, 复氧24 h时脊髓星形胶质细胞存活率最低($P < 0.05$), 见图2D。因此选择复氧24 h作为后续实验的时间点。

2.3 抑制HMGB1与核转录因子 κ B表达后氧糖剥夺6 h/复氧24 h星形胶质细胞的凋亡程度与成活率

HMGB1表达与释放: Western blot及ELISA结果显示与氧糖剥夺6 h/复氧24 h组比, 氧糖剥夺6 h/复氧24 h+丙酮酸乙酯组星形胶质细胞内HMGB1的表达与释放减少($P < 0.05$), 见图3A, B。

核转录因子 κ B蛋白表达: Western blot结果显示与氧糖剥夺6 h/复氧24 h组比较, 氧糖剥夺6 h/复氧24 h+Bay 11-7082组核转录因子 κ B表达明显减少($P < 0.05$), 见图3C。

凋亡蛋白表达: Western blot结果显示与氧糖剥夺6 h/复氧24 h组比较, 氧糖剥夺6 h/复氧24 h+丙酮酸乙酯组与氧糖剥夺6 h/复氧24 h+Bay 11-7082组Bcl-2/BAX比值明显升高($P < 0.05$), 见图3D。

细胞存活率: MTT结果表明与氧糖剥夺6 h/复氧24 h组比较, 氧糖剥夺6 h/复氧24 h+丙酮酸乙酯组与氧糖剥夺6 h/复氧24 h+Bay 11-7082组星形胶质细胞活性明显增强($P < 0.05$), 见图3E。

细胞凋亡: 与氧糖剥夺6 h/复氧24 h组相比, 氧糖剥夺6 h/复氧24 h+丙酮酸乙酯组与氧糖剥夺6 h/复氧24 h+Bay 11-7082组星形胶质细胞凋亡率明显减少($P < 0.05$), 见图3F。

丙酮酸乙酯有效抑制HMGB1的表达, Bay 11-7082有效抑制了核转录因子 κ B的表达, 两者分别降低了大鼠脊髓星形胶质细胞的凋亡程度, 提高了星形胶质细胞的成活率。

3 讨论 Discussion

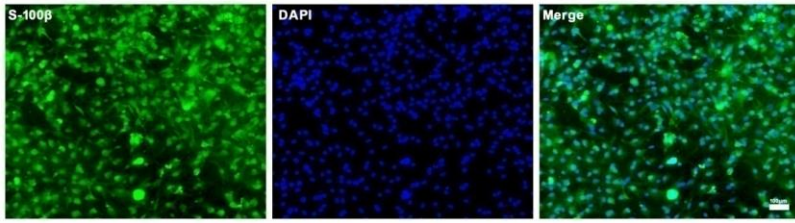
此次研究结果表明, 氧糖剥夺/复氧后体外培养大鼠脊髓星形胶质细胞活性降低, 凋亡程度加重, 同时释放出HMGB1增多。使用丙酮酸乙酯与Bay 11-7082分别抑制了HMGB1与核转录因子 κ B后, 星形胶质细胞所表达的HMGB1与核内活化核转录因子 κ B均减少, 同时细胞活性

与凋亡程度缓解, 表明HMGB1/核转录因子 κ B是调节脊髓星形胶质细胞凋亡的重要通路。

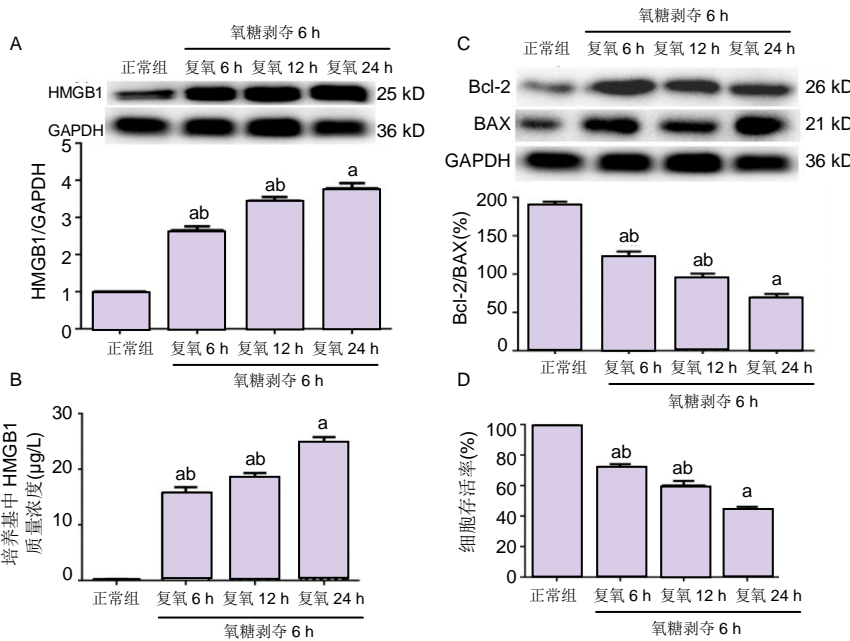
大量研究表明脊髓损伤后, 抑制神经元的凋亡有助于神经功能的恢复^[28-29], 目前大量研究着重于调节神经元自身功能的恢复、轴突再生及神经干细胞的增殖分化功能^[30-32], 忽略了脊髓星形胶质细胞在脊髓损伤后神经恢复中的作用。星形胶质细胞作为在脊髓中枢神经中数量最多的细胞, 它的活性与凋亡程度对脊髓损伤后神经功能的恢复有着重要作用^[33]。研究发现在脊髓损伤早期, 脊髓凋亡坏死释放细胞毒性物质刺激脊髓星形胶质细胞改变形态, 表现为细胞胞体肿大扩张并且重叠, 突起增多延长, 胶质纤维酸性蛋白表达反应性增强, 反应性脊髓星形胶质细胞活化增殖, 开始参与炎症反应分泌白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β , 进而加重微环境周围的免疫反应, 加重损伤^[34-36]。在损伤72 h后, 增生的脊髓星形胶质细胞形成胶质瘢痕, 抑制神经轴突生长^[37-38], 说明早期干预脊髓星形胶质细胞凋亡可抑制脊髓损伤后脊髓星形胶质细胞的活化, 改善炎症反应。同时脊髓损伤后脊髓星形胶质细胞凋亡, 失去释放营养物质的能力, 无法传递神经递质, 维持血脑屏障的能力受限, 减少神经细胞的营养与物质交换, 不利于神经功能的恢复^[39-40]。于是在此次实验中通过体外培养大鼠脊髓星形胶质细胞, 用氧糖剥夺/复氧模型模拟脊髓损伤, 观察早期损伤时脊髓星形胶质细胞的凋亡情况。实验发现在氧糖剥夺6 h复氧24 h内, 随着时间的延长, 正常脊髓星形胶质细胞的活性降低, 星形胶质细胞的凋亡程度加重。脊髓损伤后, 凋亡的脊髓星形胶质细胞通过自身代偿性的改变丧失营养支持功能, 转化为毒性反应, 形成恶性循环, 持续引起周围细胞凋亡坏死, 扩大损伤范围, 恶化损伤程度, 抑制周围神经细胞功能, 不利于脊髓中枢神经系统功能的恢复, 因此抑制早期脊髓星形胶质细胞凋亡可为改善脊髓损伤预后提供新的靶点。

线粒体途径引起的细胞凋亡为细胞凋亡过程中最主要的过程之一, Bcl-2家族蛋白在调节线粒体膜通透性的过程中发挥重要作用, 其中最为熟知的就是抗凋亡蛋白Bcl-2与促凋亡蛋白BAX^[41]。研究证明, 神经细胞与星形胶质细胞共培养时, 氧糖剥夺/复氧会引起Bcl-2/BAX比值减小, 促进细胞线粒体凋亡^[42]。Wei等^[28]在研究中发现, 阿司匹林通过抑制BAX蛋白的表达、促进Bcl-2的表达来抑制脊髓损伤后神经元的凋亡, 抑制炎症反应与星形胶质细胞的活化。此次研究中, 正常大鼠脊髓星形胶质细胞中Bcl-2与BAX表达量均不高, 但Bcl-2/BAX比例较高、也较为稳定。氧糖剥夺/复氧后的星形胶质细胞BAX表达明显升高, Bcl-2/BAX的比值减小, 提示大鼠脊髓氧糖剥夺/复氧后, 线粒体凋亡途径可能参与了脊髓星形胶质细胞凋亡过程, 因此通过调节Bcl-2、BAX表达可改善脊髓星形胶质细胞的凋亡程度。

在体外培养大鼠脊髓星形胶质细胞进行氧糖剥夺/复氧模型后, 发现在氧糖剥夺6 h复氧24 h内, 脊髓星形胶质细胞内和培养基内HMGB1表达水平明显增高, 大量HMGB1被释放出来, 且在氧糖剥夺6 h/复氧24 h时表达最高。大量研究证实HMGB1的释放是一种警报信号, 急性脊髓损伤患者1 d内血清HMGB1最大含量是正常人的9倍, 且

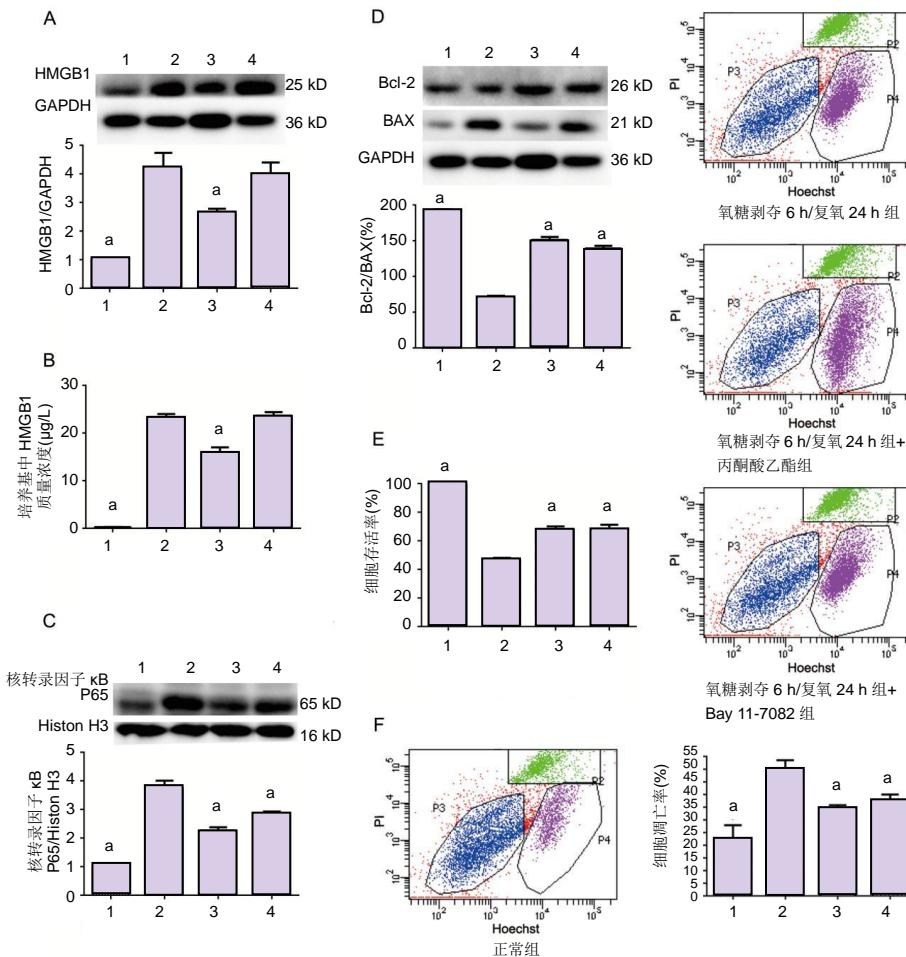


图注：图中绿色为脊髓星形胶质细胞特异性蛋白 S100β 染色，蓝色为 DAPI 核染色。结果显示星形胶质细胞纯度为 95%。
图 1 免疫荧光法鉴定体外培养脊髓星形胶质细胞 (x100)
Figure 1 Immunofluorescence identification of spinal cord astrocytes cultured *in vitro* (x100)



图注：图中 A 为 Western blot 检测星形胶质细胞内 HMGB1 蛋白表达；B 为星形胶质细胞培养基内 HMGB1 的释放；C 为 Western blot 检测星形胶质细胞内 Bcl-2、BAX 蛋白表达及 Bcl-2/BAX 比值；D 为 MTT 检测星形胶质细胞存活率。与正常组比较，^a $P < 0.05$ ；与氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组比较，^b $P < 0.05$ 。
图 2 氧糖剥夺/复氧不同时间后星形胶质细胞的凋亡、存活率及高迁移率蛋白 B1 (HMGB1) 检测结果
Figure 2 Expression and release of high mobility group box 1 in the spinal cord astrocytes, apoptosis and survival rate of astrocytes at different time after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation

Figure 2 Expression and release of high mobility group box 1 in the spinal cord astrocytes, apoptosis and survival rate of astrocytes at different time after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation



图注：图中 A 为 Western blot 检测 HMGB1 表达；B 为星形胶质细胞培养基内 HMGB1 的质量浓度；C 为 Western blot 检测核转录因子 κB 蛋白表达；D 为 Western blot 检测 Bcl-2、BAX 的表达及 Bcl-2/BAX 比值；E 为 MTT 检测星形胶质细胞存活率，F 为流式细胞仪检测星形胶质细胞凋亡；丙酮酸乙酯为 HMGB1 抑制剂，Bay 11-7082 为核转录因子 κB 抑制剂。与氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组比较，^a $P < 0.05$ 。1 为正常组；2 为氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组；3 为氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组+丙酮酸乙酯组；4 为氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组+Bay 11-7082 组。
图 3 抑制高迁移率蛋白 B1 (HMGB1) 与核转录因子 κB 后氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 的各组脊髓星形胶质细胞凋亡、存活率、HMGB1、核转录因子 κB 表达
Figure 3 Expression and release of high mobility group box 1 and nuclear factor-kappa B in the spinal cord astrocytes, apoptosis and survival rate of astrocytes receiving oxygen-glucose deprivation and 24 hours of reoxygenation after inhibiting high mobility group box 1 or nuclear factor-kappa B

与损伤严重程度相关^[19], HMGB1还参与细胞毒性反应,可引起脊髓水肿^[43],促进神经元凋亡^[44],引起神经元的丢失,激活核转录因子 κ B引起炎症级联反应等^[45],抑制了损伤后神经功能的恢复。于是此次实验选取氧糖剥夺6 h/复氧24 h作为研究时间点,通过抑制HMGB1的表达来研究HMGB1释放是否参与了早期大鼠脊髓星形胶质细胞的凋亡过程。在使用丙酮酸乙酯抑制HMGB1的表达后,发现脊髓星形胶质细胞中HMGB1表达显著减少,培养基中HMGB1水平也明显减少。Bhat等^[46]发现丙酮酸乙酯可靶向性抑制HMGB1/RAGE通路,减少有机尘引起的气道炎症。Soh等^[47]发现丙酮酸乙酯通过对HMGB1的抑制作用减轻高血糖加重的心肌缺血再灌注损伤。这些研究提示,丙酮酸乙酯可用来作为HMGB1的抑制剂,抑制HMGB1发挥作用。使用丙酮酸乙酯后,MTT检测发现细胞活性增强,Bcl-2表达增加,BAX表达减少,Bcl-2/BAX比值升高,流式细胞仪检测发现细胞凋亡程度明显缓解,这说明抑制HMGB1后大鼠脊髓星形胶质细胞的凋亡程度减轻,释放的HMGB1是大鼠脊髓星形胶质细胞损伤后促进自身凋亡的影响因子。Gwak等^[20]发现甘草甜素可抑制HMGB1通过线粒体途径引起的肝细胞凋亡。Wang等^[48]发现丹参酮IIA可抑制脑梗后HMGB1对神经系统中细胞凋亡的抑制。这些研究均提示,基质中的HMGB1可与周围细胞结合,激活细胞内凋亡通路,参与调节细胞凋亡。这与此次实验结果相似,但均未说明HMGB1在脊髓损伤中与脊髓星形胶质细胞凋亡的关系。此次实验结果说明,HMGB1在脊髓损伤后不仅可引起神经元的凋亡,还可通过改变线粒体膜上Bcl-2/BAX表达比值改变线粒体膜通透性,激活星形胶质细胞内凋亡信号来调节氧糖剥夺/复氧后脊髓星形胶质细胞的凋亡过程,抑制HMGB1释放可有效缓解脊髓星形胶质细胞的凋亡,改善脊髓星形胶质细胞活性。

核转录因子 κ B通路是HMGB1发挥炎症反应的重要通路。HMGB1通过激活胞质内核转录因子 κ B的核转位,促进炎症因子的释放,加重了细胞损伤后的毒性反应^[16-49]。此次实验发现大鼠脊髓星形胶质细胞受损后,核转录因子 κ B明显升高,抑制HMGB1表达后核转录因子 κ B明显减少,提示核转录因子 κ B可被HMGB1激活,进入脊髓星形胶质细胞核内参与调节脊髓星形胶质细胞的凋亡。Zhang等^[50]发现核转录因子 κ B通路在心脏缺血再灌注损伤后激活心肌细胞的凋亡,损伤心肌功能,说明核转录因子 κ B通路参与调节细胞凋亡。此次实验通过有效抑制核转录因子 κ B核转位的激活,抑制了核转录因子 κ B的活性,脊髓星形胶质细胞活性增强,Bcl-2表达增加,BAX表达降低,Bcl-2/BAX比值明显升高,流式细胞仪检测也表明细胞凋亡程度减轻。实验表明HMGB1/核转录因子 κ B是激活氧糖剥夺/复氧后大鼠脊髓星形胶质细胞线粒体途径凋亡的通路之一。

此次实验还存在着一些不足之处,对氧糖剥夺/复氧后脊髓星形胶质细胞凋亡时间的观察点尚少,仅探讨了早期氧糖剥夺/复氧后HMGB1及脊髓星形胶质细胞凋亡的情况,未能了解氧糖剥夺6 h/复氧24 h后星形胶质细胞凋亡与HMGB1的动态变化;另外,丙酮酸乙酯并非HMGB1特异

性结合抑制剂,对于HMGB1抑制机制的研究还不完善,但通过文献的查阅与此次实验的结合,发现丙酮酸乙酯对HMGB1的抑制能力还是有据可依的,为此次实验的进行提供了证据。

综上所述,研究脊髓星形胶质细胞的凋亡病理机制,对于脊髓损伤后脊髓损伤程度变化及神经功能的保护与恢复将会有更为重要的意义。此次实验阐明了氧糖剥夺/复氧后,抑制HMGB1/核转录因子 κ B通路可有效改善早期大鼠脊髓星形胶质细胞的凋亡过程,为治疗脊髓损伤预后提供了新的研究方向和治疗靶点。

作者贡献: 实验设计为吕聪、孙麟,细胞培养、模型制作、蛋白及上清的提取由吕聪、贺亚军、李季声完成,实验检测由吕聪、李季声、冯皓宇完成,实验资料收集、整理与统计由吕聪完成,文章书写与、修改、审阅由吕聪、孙麟、马迅完成。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81870976)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经山西医科大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该统计学方法已经山西医科大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Zhang W,Fang X,Zhang C,et al.Transplantation of embryonic spinal cord neurons to the injured distal nerve promotes axonal regeneration after delayed nerve repair. Eur J Neurosci.2017;45(6):750-762.
- [2] Scintu F,Scorciapino L,Carta M,et al.Human astrocytes can be induced to differentiate into cells with neuronal phenotype.Exp Cell Res. 2006; 312(12):2336-2346.
- [3] Zhao X,Zhou KS,Li ZH,et al.Knockdown of Ski decreased the reactive astrocytes proliferation in vitro induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation.J Cell Biochem.2018;119(6):4548-4558.
- [4] Chen J,Wang Q,Zhou W,et al.GPCR kinase 2-interacting protein-1 protects against ischemia-reperfusion injury of the spinal cord by modulating ASK1/JNK/p38 signaling.FASEB J. 2018;fj201800548.
- [5] Li H,Zhang X,Qi X,et al.Icariin Inhibits Endoplasmic Reticulum Stress-induced Neuronal Apoptosis after Spinal Cord Injury through Modulating the PI3K/AKT Signaling Pathway.Int J Biol Sci.2019;15(2): 277-286.
- [6] Jiang H,Fang J,Xing J,et al.Tiliarin mediates neuroprotection against ischemic injury by attenuating CaMKII-dependent mitochondrion-mediated apoptosis and MAPK/NF-kappaB signaling.Life Sci.2019; 216:233-245.
- [7] Brunelle JK,Letai A.Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family.J Cell Sci.2009;122(Pt 4):437-441.

- [8] Lu Z, Miao Y, Muhammad I, et al. Colistin-induced autophagy and apoptosis involves the JNK-Bcl2-Bax signaling pathway and JNK-p53-ROS positive feedback loop in PC-12 cells. *Chem Biol Interact*. 2017;277:62-73.
- [9] Haas C, Fischer I. Human astrocytes derived from glial restricted progenitors support regeneration of the injured spinal cord. *J Neurotrauma*. 2013;30(12):1035-1052.
- [10] Lepore AC, O'Donnell J, Kim AS, et al. Reduction in expression of the astrocyte glutamate transporter, GLT1, worsens functional and histological outcomes following traumatic spinal cord injury. *Glia*. 2011;59(12):1996-2005.
- [11] Xu Z, Zhang K, Wang Q, et al. MicroRNA-124 improves functional recovery and suppresses Bax-dependent apoptosis in rats following spinal cord injury. *Mol Med Rep*. 2019;19(4):2551-2560.
- [12] Pillai R, Scintu F, Scorciapino L, et al. Human astrocytes can be induced to differentiate into cells with neuronal phenotype. *Exp Cell Res*. 2006;312(12):2336-2346.
- [13] Xu W, Gao L, Li T, et al. Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor (MANF) Protects Against Neuronal Apoptosis via Activation of Akt/MDM2/p53 Signaling Pathway in a Rat Model of Intracerebral Hemorrhage. *Front Molr Neurosci*. 2018;11:176.
- [14] Tran AP, Warren PM, Silver J. The Biology of Regeneration Failure and Success After Spinal Cord Injury. *Physiol Rev*. 2018;98(2):881-917.
- [15] Qiu J, Nishimura M, Wang Y, et al. Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(5):927-938.
- [16] Bi Y, Zhu Y, Zhang M, et al. Effect of Shikonin on Spinal Cord Injury in Rats Via Regulation of HMGB1/TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(2):481-491.
- [17] Kang N, Hai Y, Yang J, et al. Hyperbaric oxygen intervention reduces secondary spinal cord injury in rats via regulation of HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(2):1141-1153.
- [18] Kigerl KA, Lai W, Wallace LM, et al. High mobility group box-1 (HMGB1) is increased in injured mouse spinal cord and can elicit neurotoxic inflammation. *Brain Behav Immun*. 2018;72:22-33.
- [19] Papatheodorou A, Stein A, Bank M, et al. High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) Is Elevated Systemically in Persons with Acute or Chronic Traumatic Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*. 2017;34(3):746-754.
- [20] Gwak GY, Moon TG, Lee DH, et al. Glycyrrhizin attenuates HMGB1-induced hepatocyte apoptosis by inhibiting the p38-dependent mitochondrial pathway. *World J Gastroenterol*. 2012;18(7):679-684.
- [21] Gong G, Xiang L, Yuan L, et al. Protective effect of glycyrrhizin, a direct HMGB1 inhibitor, on focal cerebral ischemia/reperfusion-induced inflammation, oxidative stress, and apoptosis in rats. *PLoS One*. 2014;9(3):e89450.
- [22] Yang L, Wang F, Yang L, et al. HMGB1 a-Box Reverses Brain Edema and Deterioration of Neurological Function in a Traumatic Brain Injury Mouse Model. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(6):2532-2542.
- [23] Zhang M, Ma Y, Chai L, et al. Storax Protected Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation Induced Primary Astrocyte Injury by Inhibiting NF- κ B Activation in vitro. *Front Pharmacol*. 2018;9:1527.
- [24] Bao G, Li C, Qi L, et al. Tetrandrine protects against oxygen-glucose-serum deprivation/reoxygenation-induced injury via PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway in rat spinal cord astrocytes. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:925-930.
- [25] Shin JH, Kim ID, Kim SW, et al. Ethyl pyruvate inhibits HMGB1 phosphorylation and release by chelating calcium. *Mol Med*. 2015;20:649-657.
- [26] Sun L, Li M, Ma X, et al. Inhibition of HMGB1 reduces rat spinal cord astrocytic swelling and AQP4 expression after oxygen-glucose deprivation and reoxygenation via TLR4 and NF- κ B signaling in an IL-6-dependent manner. *J Neuroinflamm*. 2017;14(1):231.
- [27] Kerstetter A, Miller R. Isolation and culture of spinal cord astrocytes. *Methods Mol Biol*. 2012;814:93-104.
- [28] Wei W, Shurui C, Zipeng Z, et al. Aspirin suppresses neuronal apoptosis, reduces tissue inflammation, and restrains astrocyte activation by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Neuroreport*. 2018;29(7): 524-531.
- [29] Lu X, Xue P, Fu L, et al. HAX1 is associated with neuronal apoptosis and astrocyte proliferation after spinal cord injury. *Tissue Cell*. 2018;54:1-9.
- [30] Xu P, Yang X. The Efficacy and Safety of Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Spinal Cord Injury Patients: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Cell Transplant*. 2019;28(1):36-46.
- [31] Veneruso V, Rossi F, Villella A, et al. Stem cell paracrine effect and delivery strategies for spinal cord injury regeneration. *J Control Release*. 2019;300:141-153.
- [32] Obara K, Tohgi N, Shirai K, et al. Hair-Follicle-Associated Pluripotent (HAP) Stem Cells Encapsulated on Polyvinylidene Fluoride Membranes (PFM) Promote Functional Recovery from Spinal Cord Injury. *Stem Cell Rev*. 2019;15(1):59-66.
- [33] Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol*. 2004;72(2):111-127.
- [34] Zeug A, Muller FE, Anders S, et al. Control of astrocyte morphology by Rho GTPases. *Brain Res Bull*. 2018;136:44-53.
- [35] Kwan T, Floyd CL, Kim S, et al. RNA Binding Protein Human Antigen R Is Translocated in Astrocytes following Spinal Cord Injury and Promotes the Inflammatory Response. *J Neurotrauma*. 2017;34(6):1249-1259.
- [36] Anwar MA, Al Shehabi TS, Eid AH. Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:98.
- [37] Coulson-Thomas VJ, Lauer ME, Soleman S, et al. Tumor Necrosis Factor-stimulated Gene-6 (TSG-6) Is Constitutively Expressed in Adult Central Nervous System (CNS) and Associated with Astrocyte-mediated Glial Scar Formation following Spinal Cord Injury. *J Biol Chem*. 2016;291(38):19939-19952.
- [38] Shi Y, Kim S, Huff TB, et al. Effective repair of traumatically injured spinal cord by nanoscale block copolymer micelles. *Nat Nanotechnol*. 2010; 5(1):80-87.
- [39] Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett*. 2014;565:30-38.
- [40] Meneses CS, Muller HY, Herzberg DE, et al. Microglia and astrocyte activation in the spinal cord of lame horses. *Vet Anaesth Analg*. 2018; 45(1):92-102.
- [41] Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(9):647-656.
- [42] Liu D, Zhang M, Rong X, et al. Potassium 2-(1-hydroxypropyl)-benzoate attenuates neuronal apoptosis in neuron-astrocyte co-culture system through neurotrophin and neuroinflammation pathway. *Acta Pharm Sin B*. 2017;7(5):554-563.
- [43] Sun L, Li M, Ma X, et al. Inhibiting high mobility group box-1 reduces early spinal cord edema and attenuates astrocyte activation and aquaporin-4 expression after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 2019;36(3):421-435.
- [44] Kim SW, Lim CM, Kim JB, et al. Extracellular HMGB1 released by NMDA treatment confers neuronal apoptosis via RAGE-p38 MAPK/ERK signaling pathway. *Neurotox Res*. 2011;20(2):159-169.
- [45] Anton M, Alen F, Gomez de Heras R, et al. Oleylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration. *Addict Biol*. 2017;22(3):724-741.
- [46] Bhat SM, Massey N, Karriker LA, et al. Ethyl pyruvate reduces organic dust-induced airway inflammation by targeting HMGB1-RAGE signaling. *Respir Res*. 2019;20(1):27.
- [47] Soh S, Jun JH, Song JW, et al. Ethyl pyruvate attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury exacerbated by hyperglycemia via retained inhibitory effect on HMGB1. *Int J Cardiol*. 2018;252:156-162.
- [48] Wang JG, Bondy SC, Zhou L, et al. Protective effect of Tanshinone IIA against infarct size and increased HMGB1, NF- κ B, GFAP and apoptosis consequent to transient middle cerebral artery occlusion. *Neurochem Res*. 2014;39(2):295-304.
- [49] Deng G, Gao Y, Cen Z, et al. miR-136-5p Regulates the Inflammatory Response by Targeting the IKK β /NF- κ B/A20 Pathway After Spinal Cord Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50(2):512-524.
- [50] Zhang JR, Yu HL. Effect of NF- κ B signaling pathway mediated by miR-711 on the apoptosis of H9c2 cardiomyocytes in myocardial ischemia reperfusion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(24): 5781-5788.