

HO-1 对氧糖剥夺海马神经元线粒体运动调节蛋白的影响

邵建林, 彭沛华, 周银燕, 衡新华

(昆明医学院第一附属医院麻醉手术科, 云南 昆明 650032)

[摘要] **目的** 研究 HO-1 对氧糖剥夺海马神经元线粒体运动调节蛋白的影响. **方法** 将培养 7 d 的大鼠海马神经元随机分为 4 组: 正常培养组 (C 组)、正常培养 + 血晶素组 (C+H 组)、氧糖剥夺组 (D 组)、氧糖剥夺 + 血晶素组 (D+H 组). C 组正常培养方法培养. C+H 组在正常培养的神经元培养液中加入血晶素使其终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 后按正常培养 24 h. D 组神经元进行缺糖、缺氧后复糖、复氧处理. D+H 组神经元用 10 $\mu\text{mol/L}$ 血晶素处理 24 h 后进行缺糖、缺氧后复糖、复氧处理. 进行神经元纯度鉴定, 细胞存活率, HO-1-mRNA 表达, HO-1、Miro1、Miro2 和 Milton 蛋白表达, 神经元凋亡的检测. **结果** C+H 组神经元 HO-1-mRNA 和 HO-1 表达高于 C 组 ($P < 0.01$), Miro1、Miro2 和 Milton 蛋白表达高于 C 组 ($P < 0.01$), 神经元存活率和神经元凋亡率变化无统计学差异 ($P > 0.05$); D 组神经元 HO-1-mRNA 和 HO-1 表达高于 C 组 ($P < 0.01$), Miro1、Miro2 和 Milton 蛋白高于 C 组 ($P < 0.01$), 神经元存活率低于 C 组 ($P < 0.01$), 神经元凋亡率高于 C 组 ($P < 0.01$); D+H 组神经元 HO-1-mRNA 和 HO-1 表达高于 D 组 ($P < 0.01$), Miro1、Miro2 和 Milton 蛋白高于 D 组 ($P < 0.01$), 神经元存活率高于 D 组 ($P < 0.01$), 神经元凋亡率低于 D 组 ($P < 0.01$). **结论** HO-1 增加海马神经元线粒体运动调节蛋白 Miro1、Miro2 和 Milton 的表达, 抑制神经元的凋亡.

[关键词] 线粒体运动调节蛋白; HO-1; 神经元; 保护; 机制

[中图分类号] R971.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 04 - 0004 - 04

Effects of Hemeoxygenase-1 on Oxygen-Glucose Deprived Hippocampus Neuron Mitochondrial Movement Protein Expression

SHAO Jian - lin, PENG Pei - hua, ZHOU Yin - yan, HENG Xin - hua

(Dept. of Anesthesiology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University,
Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of hemeoxygenase-1 (HO-1) on mitochondrial movement protein expression in primary cultured rat hippocampus neurons after oxygen glucose deprivation. **Methods** Primary rat hippocampus neurons cultured for 7 days were dividend into four groups. Experimental group cells were respectively carried out 10 $\mu\text{mol/L}$ Heme precondition (group C+H), OGD (group D), 10 $\mu\text{mol/L}$ Heme precondition + OGD (group D+H), Control cells were cultured normally (group C). Compound remained present throughout the duration of the experiment until analysis 24 h later. Neuron viability and apoptosis were weasured. The expression of HO-1, Miro1, Miro2, Milton protein and HO-1-mRNA were detected. **Results** The protein and mRNA expression levels of HO-1 in group C+H were higher than group C ($P < 0.01$), the protein expression levels of Miro1, Miro2 and Milton were higher than group C ($P < 0.01$). The neuron viability and apoptosis had no significant difference between group C+H and group C ($P > 0.05$). The protein and mRNA expression levels of HO-1 in group D were higher than group C ($P < 0.01$), the protein expression levels of Miro1, Miro2 and Milton

[基金项目] 云南省科技厅面上基金资助项目 (2008CD120); 昆明医学院第一附属医院博士科研启动基金资助项目 (2007bs10)

[作者简介] 邵建林 (1972~), 男, 云南武定县人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事临床麻醉工作.

were higher than group C ($P < 0.01$), the neuron viability rate was lower and neuron apoptosis rate was higher than group C ($P < 0.01$). The protein and mRNA expression levels of HO-1 in group D+H were higher than group D ($P < 0.01$), the protein expression levels of Miro1, Miro2 and Milton were higher than group D ($P < 0.01$), the neuron viability rate was higher and neuron apoptosis rate was lower than group D ($P < 0.01$). **Conclusion** HO-1 can inhibit the apoptosis of hippocampus neurons induced by oxygen glucose deprivation through increasing mitochondrial movement proteins expression.

[**Key words**] Mitochondrial movement protein; HO-1; Neuron; Protection; Mechanism

神经元线粒体运动调节蛋白 (Mitochondrial movement protein) 的主要功能是调节线粒体在神经元中的移动, 保证线粒体的正确分布以应对病理损伤^[1]. 但目前对线粒体运动调节蛋白的诱导机制尚未阐明. 脑内血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是目前已知最易受诱导的酶, HO-1 是脑内最重要的内源性保护体系之一, 被激活的 HO-1 能参与调节其他基因的表达^[2,3]. 但 HO-1 能否影响线粒体运动调节蛋白未见报道. 因此, 本研究旨在观察 HO-1 的变化和对神经元线粒体运动调节蛋白的影响.

1 材料与方法

1.1 实验动物

新生 (出生 48 h 内) Wistar 大鼠, 由昆明医学院实验动物中心提供.

1.2 主要仪器及试剂

HERA CELL 150 型 CO₂ 培养箱 (GmbH 公司, 德国), 缺氧箱 (Biotech, 英国), 高糖型 (4.5 g/L) DMEM 培养液 (Hylone, 美国), 无糖、无氧 DMEM 液 (Hylone, 美国), PCR 扩增仪 (Biometra 公司, 德国), RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本), Tunnel 试剂盒、即用型 SABC 免疫组化试剂盒、NSE 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司), HO-1、Miro1、Miro2、Milton 抗体 (Calbiochem, 英国), Heme (Sigma, 美国).

1.3 海马神经元原代培养

按文献^[4,5]进行海马神经元培养. 收集所得细胞悬液, 在显微镜下用血细胞计数板计数并算出细胞的密度, 用接种液将细胞密度调至 1×10^6 mL, 然后分别接种于预先经多聚赖氨酸处理的 6 孔 (2 mL/孔) 和 96 孔 (100 μ L/孔) 培养板内, 放入 37 $^{\circ}$ C、5%的 CO₂ 和 95% 空气培养箱中培养, 24 h 后换培养液, 以后每周换上述培养液 2 次, 每次换半量. 培养第 4 天加入阿糖胞苷 (终浓度 10 μ mol/L) 抑制胶质细胞的过度生长. 共培

养 7 d.

1.4 神经元缺糖、缺氧后复糖、复氧模型^[6]

取培养 7 d 的海马神经元, 吸去原培养液后用无糖平衡盐液冲洗 3 遍, 此后吸掉平衡盐液, 加入事先用 5% CO₂、95% N₂ 饱和的无糖、无氧 DMEM 液. 将培养板置于缺氧培养箱, 以 10 L/min 的流量向缺氧培养箱内通入 5% CO₂、95% N₂, 45 min 后将培养板取出换回原来的培养液后放置于 37 $^{\circ}$ C、5%的 CO₂ 和 95% 空气的培养箱培养 24 h.

1.5 实验分组及处置

正常培养组 (C 组)、正常培养 + 血晶素组 (C+H 组)、氧糖剥夺组 (D 组)、氧糖剥夺 + 血晶素组 (D+H 组). C 组按正常培养方法培养; C+H 组在正常培养的神经元培养液中加入血晶素使其终浓度为 10 μ mol/L 后按正常培养 24 h; D 组神经元进行缺糖、缺氧后复糖、复氧处理; D+H 组神经元用 10 μ mol/L 血晶素处理 24 h 后进行缺糖、缺氧后复糖、复氧处理.

1.6 神经元纯度鉴定

采用免疫组化 SABC 法: 随机取培养 7 d 的神经元, 用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 30% H₂O₂ 室温封闭, 微波法抗原修复, 滴加 1:100 稀释的一抗, 37 $^{\circ}$ C 1 h, 滴加生物素化二抗 (神经元特异性烯醇化酶, NSE), 滴加试剂 SABC, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片. 阴性对照用 PBS 液代替一抗. Olympus 显微镜观察, 胞浆染色为棕黄色的即为阳性神经元, 显微镜下随机计数 8 个视野细胞, 计算 NSE 阳性细胞百分率.

1.7 神经元存活率的测定

细胞存活力测定采用的是 MTT 法. 96 孔培养板培养 7 d 的神经元每孔中加入四甲基偶氮唑盐 (MTT) 10 μ L (终浓度为 0.5 mg/mL), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱中继续培养 4 h, 然后倾去全部培养液, 向每孔中加入 100 μ L 二甲基亚砷 (DMSO), 在摇床上摇动 10 min, 至蓝紫色的结晶完全溶解, 在酶标计数仪上测定每组的光密度 (OD) 值, 检

测波长为 560 nm, 参考波长为 630 nm. 每板设不加细胞的空白孔为对照. 细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{各组 OD 值}}{\text{空白对照组 OD 值}} \times 100\%$$

1.8 神经元凋亡的检测

采用末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 介导的 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 法进行检测. 其步骤如下: 培养在玻片上的各组神经元, 经 4% 多聚甲醛室温固定 30 min 后, 用 3% H₂O₂ 处理 10 min, 加 TBS 1:200 新鲜稀释 Proteinase K 37 °C 消化 10 min, 然后用 TdT 缓冲液, 再加入 TdT/DIG-d-UTP 混合液, 加封闭液, 加生物素化地高辛抗体, DAB 染色. 阴性对照在加入 TdT/DIG-d-UTP 混合液时用 TdT 缓冲液替代. 显微镜下观察细胞核中有棕黄色 / 棕褐色颗粒为阳性细胞即凋亡细胞. 计数 25 个相邻视野中凋亡神经元所占百分率. 重复 3 次.

1.9 RT-PCR 检测 HO-1-mRNA 的表达

应用 Trizol 抽提待测培养海马神经元总 RNA, HO-1-mRNA 表达水平以 β-actin 为内对照, 逆转录参照 TaKaRa 公司试剂盒说明书进行, cDNA 的 PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成. HO-1 引物大小为 441bp, 上游引物: 5'-ACA GAA GAG GCT AAG ACC G-3'; 下游引物: 5'-CAG GC-A TCT CCT TCC ATT-3'. β-actin 引物大小 690bp, 上游引物: 5'-CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC-3'; 下游引物: 5'-CCA CAC AGA TGA CTT GCG CTC AGG-3'. 阴性对照用每个样本直接行 PCR, 不加引物和模板. 扩增产物经琼脂凝胶电泳, 紫外灯下照像, 在图像分析系统上进行密度扫描, 用 HO-1 基因扩增产物的密度与 β-actin 基因扩增产物的密度比值表示 HO-1 的基因表达水平.

1.10 Miro1、Miro2、Milton 和 HO-1 蛋白表达的检测

用 Western blot 法, 内参照为 GAPDH. 取 100 μg 蛋白样品进行电泳, 将蛋白转移到 NC 膜上, 用封闭液室温封闭 2 h, 将膜与溶于封闭液中的一抗 (兔抗大鼠 Miro1、Miro2、Milton 和 HO-1 单克隆抗体, 分别按 1:200、1:200、1:250 或 1:500 稀释) 室温孵育 2 h, 将膜与二抗稀释液中的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:3 000) 室温封闭 1 h, 酶法显色. Metamorph/BX41 图像分析系统测各

条带平均吸光度 (A) 值和条带的面积, 每一条带的蛋白含量用此条带的吸光度值乘以条带的面积与同一样本的 GAPDH 条带的吸光度值乘以条带的面积的比值表示.

1.11 统计学处理

SPSS 统计软件, 数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间采用单因素方差分析, 组间用 q 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 神经元纯度

培养 7 d 的海马神经元用神经元特异性的烯醇化酶进行检验后, 神经元所占比例达到 90%.

2.2 神经元 HO-1-mRNA 和 HO-1 蛋白的变化

C+H 组神经元 HO-1-mRNA 和 HO-1 表达高于 C 组 (P < 0.01); D 组神经元 HO-1-mRNA 和 HO-1 表达高于 C 组 (P < 0.01); D+H 组神经元 HO-1-mRNA 和 HO-1 表达高于 D 组 (P < 0.01), 见表 1.

2.3 Miro1、Miro2 和 Milton 蛋白的变化

C+H 组神经元 Miro1、Miro2 和 Milton 比 C 组高 (P < 0.01); D 组 Miro1、Miro2、Milton 高于 C 组 (P < 0.01); D+H 组神经元 Miro1、Miro2、Milton 高于 D 组 (P < 0.01), 见表 2.

2.4 神经元存活率和凋亡率的变化

C+H 组神经元存活率和凋亡率与 C 组比较无统计学差异 (P > 0.05); 与 C 组比较 D 组神经元存活率降低、凋亡率升高 (P < 0.01); 与 D 组比较 D+H 组神经元存活率升高、凋亡率降低 (P < 0.01), 见表 3.

表 1 各组神经元 HO-1-mRNA 和 HO-1 蛋白比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The comparison of HO-1-mRNA and HO-1 protein among different groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组 别 | HO-1-mRNA | HO-1 |
|-------|---------------------------|---------------------------|
| C 组 | 0.10 ± 0.01 | 0.12 ± 0.01 |
| C+H 组 | 1.68 ± 0.15* | 1.71 ± 0.17* |
| D 组 | 0.24 ± 0.02* | 0.23 ± 0.02* |
| D+H 组 | 2.03 ± 0.19 ^{▲▲} | 1.99 ± 0.17 ^{▲▲} |

与 C 组比较, *P < 0.05; 与 D 组比较, ^{▲▲}P < 0.01.

表2 各组神经元 Miro1、Miro2 和 Milton 的比较
($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The comparison of Miro1, Miro2 and Milton protein among different groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | Miro1 | Miro2 | Milton |
|------|---------------|---------------|---------------|
| C组 | 0.10 ± 0.01 | 0.10 ± 0.01 | 0.11 ± 0.01 |
| C+H组 | 0.77 ± 0.07** | 0.81 ± 0.06** | 0.72 ± 0.06** |
| D组 | 0.67 ± 0.05** | 0.70 ± 0.07** | 0.65 ± 0.05** |
| D+H组 | 1.33 ± 0.12▲▲ | 1.37 ± 0.13▲▲ | 1.29 ± 0.12▲▲ |

与C组比较, ** $P < 0.01$; 与D组比较, ▲▲ $P < 0.01$.

表3 各组神经元存活率和凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The comparison of neuron viability and apoptosis among different groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 神经元存活率 (%) | 神经元凋亡率 (%) |
|------|------------|------------|
| C组 | 96 ± 8 | 3 ± 1 |
| C+H组 | 97 ± 6 | 2 ± 1 |
| D组 | 45 ± 4** | 77 ± 7** |
| D+H组 | 86 ± 7▲▲ | 30 ± 2▲▲ |

与C组比较, ** $P < 0.01$; 与D组比较, ▲▲ $P < 0.01$.

3 讨论

线粒体是神经细胞中非常重要的细胞器, 它们给神经细胞提供能量, 支持神经细胞活动. 线粒体能够产生 ATP 维持神经细胞的正常运转, 当大脑处在缺氧状态下时, 线粒体的功能受到限制, 无法给细胞提供足够的能量. 当损伤达到一定程度, 脑细胞就会不可避免地死亡. 由于神经细胞具有非常特殊的形状——有很多长而突出的树突和轴突, 线粒体由于其大小和功能的局限性, 往往需要从细胞内较远的地方迁移到另一个位置来完成某些功能, 因此需要完善的调节机制来保证神经元中线粒体的正常分布, 以支持正常的细胞功能. 近年, 科学家们通过研究给这些能调节神经元线粒体移动和分布的物质定义为“线粒体运动调节器(或蛋白)”, 该蛋白的主要功能是保证细胞内线粒体的正确分布, 保证病理状态下线粒体在细胞中占领正确的位置, 以应对病理损伤. 如果细胞缺失这种蛋白, 那么神经元中大量的线粒体就离开它们正常的位置而回到胞体周围, 只留下一些空洞和没有线粒体支持的树突和轴突. 目前研究^[1]发现 Miro 蛋白(Miro1 和 Miro2) 和 Milton 蛋白能够调节线粒体的运动, 但对线粒体运动调节蛋白的诱导机制以及它们与其他相关蛋白

分子的相互作用尚未阐明.

HO-1 是目前已知脑内最易受诱导的酶. 提示 HO-1 是脑细胞对抗氧化应激反应的重要组成部分. 研究提示 HO 可能有信号传递的作用^[7]. 另有研究表明 HO-1 可能参与其他基因表达的调节^[8].

实验中发现血晶素能诱导海马神经元 HO-1 的表达, HO-1-mRNA 和 HO-1 蛋白显著的增加. 随着 HO-1 的表达的增加, 线粒体运动调节蛋白 Miro1、Miro2 和 Milton 的表达也增加, 同时氧糖剥夺神经元存活率增加、凋亡率降低. 研究结果表明 HO-1 能够影响神经元线粒体运动调节蛋白 Miro1、Miro2 和 Milton 的表达, 提示 HO-1 对神经元的保护作用与诱导线粒体运动调节蛋白表达有关.

综上所述, 海马神经元 HO-1 的表达, 上调神经元线粒体运动调节蛋白 Miro1、Miro2 和 Milton 的表达, 保护了神经元. 但其机制有待进一步的研究.

[参考文献]

- [1] LI Y, LIM S, HOFFMAN D, et al. HIF-1 inducible protein, alters mitochondrial distribution and transport[J]. J Cell Biol, 2009, 185: 1065 - 1081.
- [2] BHARUCHA A E, KULKARNI A, CHOI K M, et al. First in human study demonstrating pharmacological Activation of heme oxygenase-1 in Humans[J]. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2010, 87: 187 - 190.
- [3] KEEL S B, DOTY R T, YANG Z T, et al. A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis[J]. Science, 2008, 319: 825 - 828.
- [4] 王英, 车宇, 苗建亭, 等. 新生大鼠海马神经元原代培养方法的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(2): 197 - 199.
- [5] HOWARD S, BOTTINO C, BROOKE S, et al. Neuroprotective effects of bcl-2 overexpression in hippocampal cultures: interactions with pathways of oxidative damage[J]. Neurochem, 2002, 83: 914 - 923.
- [6] RAY A M, BENHAM C D, ROBERTS J C, et al. Capsazepine protects against neuronal injury caused by oxygen glucose deprivation by inhibiting I_h [J]. Neurosci, 2003, 23(31): 10146 - 10153.
- [7] MAINES M D. The heme oxygenase system and its functions in the brain[J]. Cell Mol Biol, 2000, 46: 573 - 585.
- [8] ELIBERT K K, BONKOVSKY H L. Heme oxygenase-1: Recent advances in understanding its regulation and role[J]. Proc Assoc Am Physicians, 1999, 111: 438 - 447.

(2012 - 02 - 03 收稿)