

· 基础研究

清脑滴丸下调 HIF-1 α /BNIP3 表达拮抗氧糖剥夺/复氧诱导 C6 胶质细胞凋亡何 芳¹ 曾子修¹ 张昕洋¹ 梁 晓¹ 王凤丽² 刘雪梅²

摘要 目的 研究清脑滴丸对氧糖剥夺诱导 C6 胶质细胞损伤的 HIF-1 α /BNIP3 以及细胞凋亡的影响及机制。**方法** 采用氧糖剥夺/复氧方法建立 C6 胶质细胞损伤模型。细胞分为正常组、模型组、清脑滴丸组。采用 Western Blot 法检测各组 HIF-1 α 、BNIP3、Cleaved Caspase-3 蛋白表达,免疫荧光染色法观察各组 HIF-1 α 、Cleaved Caspase-3 的表达,流式细胞术检测细胞凋亡率。**结果** 与正常组比较,模型组细胞活力降低($P < 0.01$),HIF-1 α 、BNIP3、Cleaved Caspase-3 表达增加($P < 0.01$, $P < 0.05$),细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,清脑滴丸 1.25 g/L 组细胞活力升高($P < 0.05$),HIF-1 α 、BNIP3、Cleaved Caspase-3 表达和细胞凋亡率均降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 清脑滴丸抑制 C6 胶质细胞凋亡的作用机制可能与通过下调 HIF-1 α 和 BNIP3 过表达,降低 Cleaved Caspase-3 表达有关。

关键词 清脑滴丸;细胞凋亡;缺氧诱导因子-1 α ;胶质细胞;氧糖剥夺

Qingnao Dripping Pills Antagonise Apoptosis of C6 Glial Cells Induced by Oxygen-glucose Deprivation and Reoxygenation via Down-regulating HIF-1 α /BNIP3 Expression HE Fang¹, ZENG Zi-xiu¹, ZHANG Xin-yang¹, LIANG Xiao¹, WANG Feng-li², and LIU Xue-mei² 1 Graduate School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 2 Experimental Center, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078)

ABSTRACT Objective To study the effect of Qingnao Dripping Pills (QNDP) on HIF-1 α /BNIP3 expression and apoptosis of C6 glial cell induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation. **Methods** C6 glial cells were exposed to oxygen-glucose deprivation and reoxygenation (OGD/R) stress. The cells were randomly divided into 3 groups: control group, OGD/R 6 h group, QNDP group. The protein expression of HIF-1 α , BNIP3, Cleaved Caspase-3 were detected by Western Blot. The expression of HIF-1 α , BNIP3 and Cleaved Caspase-3 were detected by immunofluorescence staining. Apoptosis was detected by flow cytometry. **Results** Compared with the control group, cell viability decreased obviously in the OGD/R 6 h group ($P < 0.01$), expressions of HIF-1 α , BNIP3 and Cleaved Caspase-3 increased in the OGD/R 6 h group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the OGD/R 6 h group, cell viability increased obviously in the QNDP (1.25 g/L) group, expression of HIF-1 α , BNIP3, Cleaved Caspase-3 and apoptosis decreased in the QNDP group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusions** QNDP could reduce the apoptosis of C6 glial cells exposed to OGD/R. The protective effect of QNDP might be related to decrease Cleaved Caspase-3 expression via down-regulating HIF-1 α /BNIP3 expression.

KEYWORDS Qingnao Dripping Pills; apoptosis; hypoxia inducible factor-1 α ; glial cells; oxygen-glucose deprivation and reoxygenation

基金项目: 国家国际科技合作专项项目 (No. 2015DFA31130); 国家自然科学基金资助项目 (No. 81202683); 北京市自然科学基金资助项目 (No. 7182099)

作者单位: 1. 北京中医药大学研究生院 (北京 100029); 2. 北京中医药大学东方医院实验中心 (北京 100078)

通讯作者: 刘雪梅, Tel: 010-67689634, E-mail: liuxuemei04@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180623.181

胶质细胞是神经系统内的一大类细胞,约占中枢神经系统细胞总数的 90%。在急性脑缺血发生时,星形胶质细胞最先受到损伤^[1]。受损的胶质细胞会杀死邻近的神经元,并且受损的星形胶质细胞会发生凋亡,导致神经元的二次损伤,最终使脑梗死面积扩大^[2]。缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)广泛表达于脑组织,包括神经元,神经胶质细胞及血管内皮细胞等,其对脑缺血具有双重作用。当轻度缺血缺氧时,HIF-1 α 可激活其下游基因,通过增加血管生成、调节糖酵解等方式减少细胞凋亡;严重缺血缺氧状态下,HIF-1 α 可诱导 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(B-cell leukemia/lymphoma 2, Bcl2)家族中的凋亡前基因(Bcl2/adenovirus E1B 19 kD interacting protein 3, BNIP3)表达,BNIP3 通过促进 H⁺内流或细胞色素 C 的释放等方式促进凋亡等途径诱导细胞凋亡^[3,4]。

临床发现清脑滴丸能够有效治疗中风之风火上扰兼血瘀证患者,明显改善患者的神经功能缺损程度,尤其治疗“善忘迟钝、头痛、眩晕、口苦咽干、大便秘结、舌苔黄”等火热、血瘀的症状效果显著^[5,6]。本课题组实验研究证实清脑滴丸能够有效抑制急性脑梗死大鼠的炎症反应,减轻脑损伤^[7]。本研究以 HIF-1 α 在胶质细胞的作用为切入点,研究清脑滴丸对缺血再灌注损伤的干预效应机制。

材料与方法

1 细胞与药物 大鼠 C6 脑胶质细胞株购自北京协和细胞资源中心(货号:3111C0001CCC000131)。清脑滴丸由中国北京同仁堂有限公司科学研究所提供(组成:栀子、三七、冰片,0.038 g/丸,批号:2008L11182)。

2 主要试剂与仪器 CCK-8 检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司,C0038);HIF-1 α 兔多克隆抗体(Novus Biologicals, NB100-479, 美国);Cleaved Caspase-3 兔单克隆抗体(Cell Signaling Technology, 9664, 美国);BNIP3 兔单克隆抗体(Abcam, ab109362, 英国);GAPDH (Immunoway Biotechnology, YM3029, 美国);山羊抗兔 IgG-HRP 抗体(Sigma, F0382, 德国);DAPI(北京索莱宝科技有限公司, C0060, 中国)。倒置荧光显微镜(Olympus, IX71, 日本);缺氧装置(Billups-rothenberg Inc., MIC-101, 美国);酶标仪(Biotek Instruments, Inc., ELX800, 美国);垂直电泳系统(Thermo Fisher Scientific Inc., 121201-0899, 美国);转膜系统(Bio-

rad, 153BR65818, 美国)。

3 细胞培养 将细胞接种于 25 cm²培养瓶中,用含 2.5% 胎牛血清和 15% 马血清的 F10 培养基于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内培养。每 24 h 换液 1 次,当细胞生长接近 80%~90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,传代。实验用传 6 代以内的细胞。

4 氧糖剥夺/复氧模型制备 按照文献的方法进行模型制备^[8],调整细胞密度至终密度为 0.7 × 10⁵/mL,接种至 96 孔板,设 9 个复孔,换成无糖 Krebs's 液后置于缺氧装置内,向进气口通入预混的 95% N₂、5% CO₂ 混合气,持续通气约 10 min,夹闭进出气口;随后将装置连同细胞放入 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育 24 h。缺氧 24 h 结束后,吸弃无糖 Krebs's 液,PBS 缓冲液漂洗,换成常规培养基,37 ℃、5% CO₂ 培养。

5 检测指标及方法

5.1 CCK-8 法测定细胞活力 向待测的 96 孔板细胞中加入 CCK-8 溶液,每孔 10 μ L,避光 37 ℃ 孵育 2 h,酶标仪 450 nm 波长测定各孔吸光度值(OD 值)。调零孔与各实验组平行但不含细胞,加入与实验孔等体积的完全培养基,其余操作均与实验孔相同。

5.1.1 OGD/R 不同时间对细胞活力的影响 实验分为 6 组:正常组(Con)0 h、3 h、6 h,模型组(OGD/R)0 h、3 h、6 h。正常组细胞加入完全培养基,37 ℃、5% CO₂ 中培养,其他操作均与模型组相同。CCK-8 法测 OD 值,代表细胞活力值。

5.1.2 清脑滴丸对 OGD/R 细胞活力的影响 实验分为 5 组:正常组(Con)、模型组(OGD/R 6 h)、清脑滴丸(QNDP)0.625 g/L、1.25 g/L、2.5 g/L 组。正常组不进行任何处理。OGD/R 6 h 组与 QNDP 各浓度组均用无糖 Krebs's 溶液稀释,进行 OGD/R 6 h 损伤。结束后,OGD/R 6 h 组换成常规培养基,QNDP 各组分别换成含对应不同浓度的清脑滴丸的常规培养基,37 ℃、5% CO₂ 孵育 6 h。CCK-8 法测 OD 值。

5.2 Western Blot 法检测 HIF-1 α 、BNIP3、Cleaved Caspase-3 蛋白表达 实验分为 3 组:正常组(Con)、模型组(OGD/R 6 h)、清脑滴丸(QNDP)1.25 g/L 组。每组 3 个复孔,分别收集各组细胞,加入 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。余蛋白加入适量样品还原剂、4 × 上样缓冲液,95 ℃ 金属浴 5 min 蛋白变性,-80 ℃ 保存或直接进行实验。使用 SDS-PAGE 分离,转移至 PVDF 膜

上,5%脱脂奶粉封闭 1 h。加入用 5%脱脂奶粉配制的一抗,HIF-1 α 兔多克隆抗体(1:4 000),BNIP3 兔单克隆抗体(1:2 000),Cleaved Caspase-3 兔单克隆抗体(1:1 000),GAPDH 鼠单克隆抗体(1:20 000)。4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBST 漂洗,5 min $\times$ 3 次,加入二抗,山羊抗兔 IgG-HRP(1:2 000),山羊抗鼠 IgG-HRP(1:2 000),室温摇床孵育 1 h。PBST 洗膜,ECL 显影曝光。实验重复 3 次。ImageJ 软件分析蛋白电泳条带的光密度值。

5.3 免疫荧光染色法检测 HIF-1 α 、Cleaved Caspase-3 表达 实验分组同 5.2。细胞采用 4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 漂洗 3 min $\times$ 3 次;3% Triton X-100 透膜 20 min,PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次;5%山羊血清进行封闭,室温孵育 30 min;分别加入 HIF-1 α (1:200)、Caspase-3 一抗(1:200),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次;滴加二抗,羊抗兔 IgG cy3 荧光二抗(1:2 000)、羊抗兔 IgG FITC 荧光二抗(1:2 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次;DAPI 染细胞核,室温孵育 15 min;荧光显微镜拍照,观察细胞染色数量。

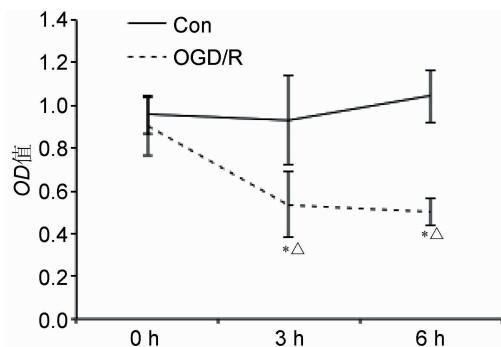
5.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 实验分组同 5.2。细胞加入不含 EDTA 的胰酶 1 mL,消化细胞,加入含 10%胎牛血清的培养基终止消化,1 000 r/min 离心 5 min 弃上清;PBS 漂洗 1 min 洗涤 $\times$ 2;重新悬浮细胞,调节其浓度为 1×10^6 /mL;取 100 μ L 细胞悬液,加入 5 μ L Annexin/FITC 和 1 μ L 100 μ g/mL 的 PI 溶液,再加入 400 μ L 结合缓冲液;激发波长为 488 nm,发射波长分别为 530 nm 和 575 nm,流式细胞仪检测分析数据。

6 统计学方法 数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

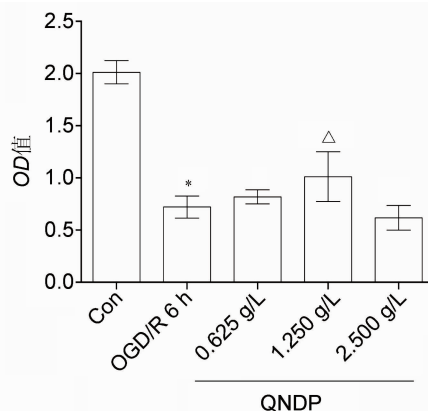
1 两组各时间点细胞活力表(图 1) 与 Con 组比较,OGD/R 3 h 组和 6 h 组细胞活力降低($P < 0.01$);随着复氧时间延长,OGD/R 6 h 组细胞活力降低($P < 0.01$),细胞损伤最明显。故选择 OGD/R 6 h 时间点进行下一步实验。

2 各组细胞活力比较(图 2) 与 Con 组比较,OGD/R 6 h 组细胞活力下降($P < 0.01$);与 OGD/R 6 h 组比较,QNDP 1.25 g/L 组细胞活力升高($P < 0.05$)。选取 QNDP 1.25 g/L 浓度进行后续实验。



注:与 Con 组比较,* $P < 0.01$;与 OGD/R 0 h 组比较, $\Delta P < 0.01$

图 1 两组各时间点细胞活力比较



注:与 Con 组比较,* $P < 0.01$;与 OGD/R 6 h 组比较, $\Delta P < 0.05$

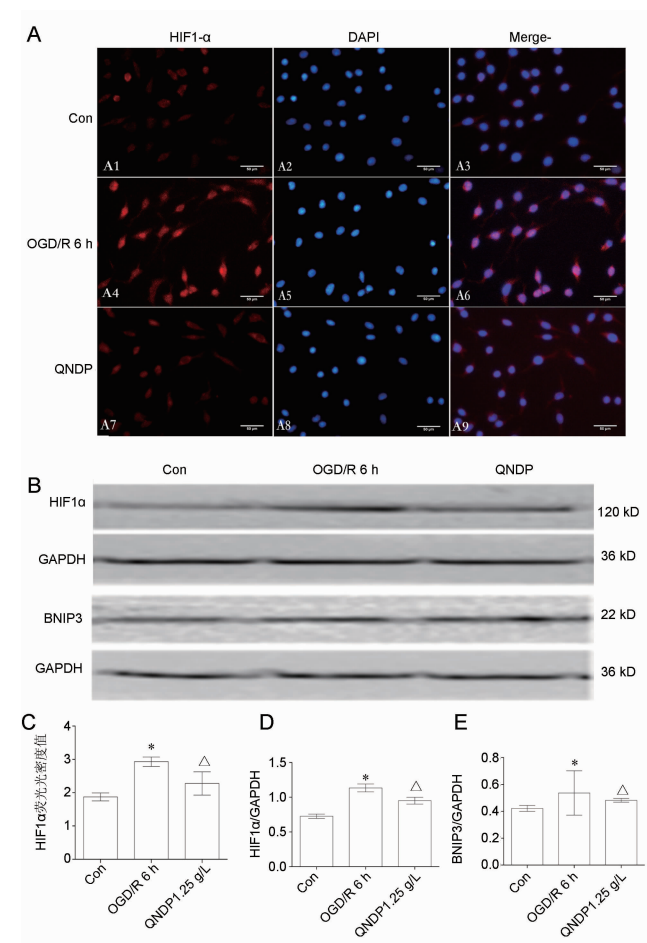
图 2 各组细胞活力比较

3 各组 HIF-1 α 和 BNIP3 表达比较(图 3) 与 Con 组比较,OGD/R 6 h 组 HIF-1 α 阳性细胞表达增多,HIF-1 α 和 BNIP3 蛋白表达升高($P < 0.05$)。与 OGD/R 6 h 组比较,QNDP 组 HIF-1 α 阳性细胞表达明显降低,HIF-1 α 和 BNIP3 蛋白表达降低($P < 0.05$)。

4 各组 OGD/R 损伤细胞凋亡比较(图 4、5) 与 Con 组比较,OGD/R 6 h 组绿色荧光增强,细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$),Cleaved Caspase-3 蛋白表达增加($P < 0.01$);与 OGD/R 6 h 组比较,QNDP 组绿色荧光减弱,细胞凋亡率降低($P < 0.01$),Cleaved Caspase-3 蛋白表达降低($P < 0.05$)。

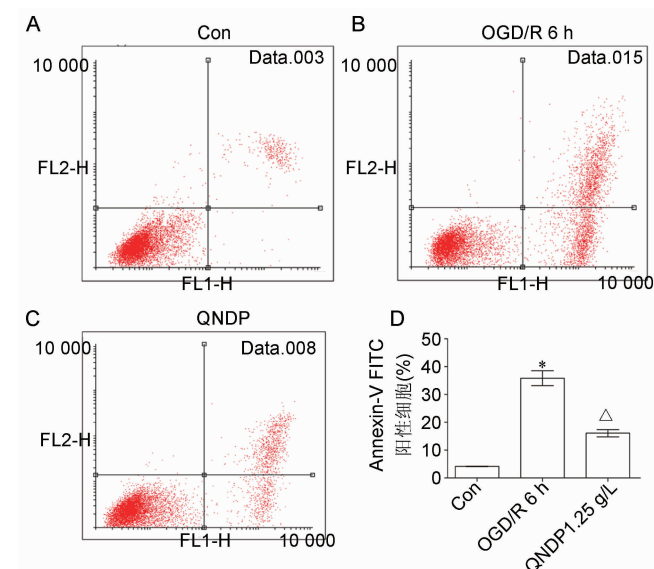
讨 论

近年来,国内外学者强调神经元、星形胶质细胞、平滑肌细胞、内皮细胞等在急性脑缺血病理过程中动态相互作用^[9]。胶质细胞除了具有支撑,提供营养及协助代谢等辅助作用,同时具有兴奋性,参与神经元的



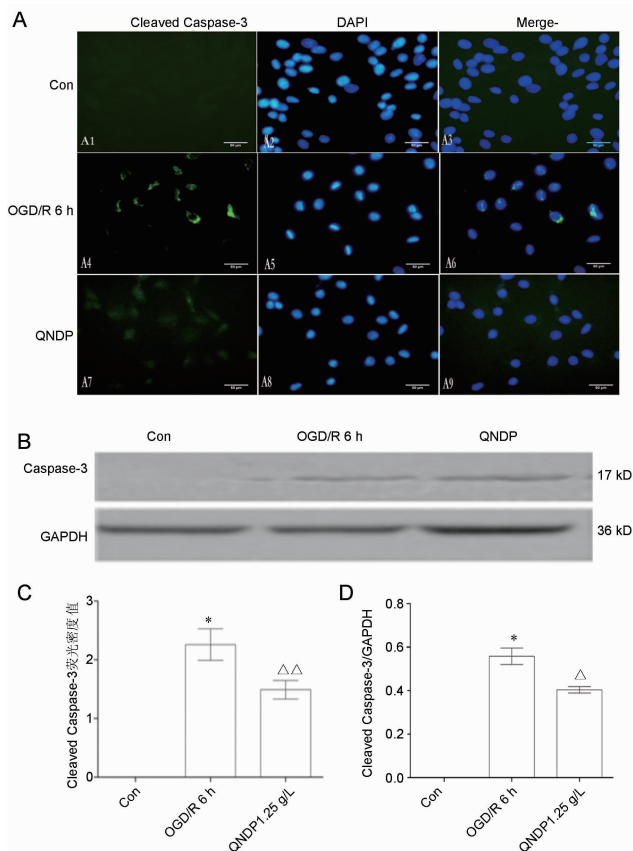
注:红色荧光为 HIF-1 α 阳性细胞;与 Con 组比较, * $P < 0.05$;与 OGD/R 6 h 组比较, $\Delta P < 0.05$

图 3 各组细胞 HIF1 α 和 BNIP3 比较



注:A~C 为流式细胞图,右下象限代表细胞凋亡率;与 Con 组比较, * $P < 0.01$;与 OGD/R 6 h 组比较, $\Delta P < 0.01$

图 4 各组细胞凋亡率比较



注:绿色荧光为 Cleaved Caspase-3 阳性细胞;与 Con 组比较, * $P < 0.01$;与 OGD/R 6 h 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 5 各组细胞 Cleaved Caspase-3 比较

通讯并促进突触形成和神经再生等功能。胶质细胞是脑内炎症反应的主要的效应细胞^[10]。脑缺血发生后胶质细胞比神经元更易受损,在缺血后的不同阶段其损伤程度也不同:(1)轻微缺血时,胶质细胞比神经元更能耐受缺血性损害,故神经元受损而胶质细胞几乎不受影响。(2)较大面积的缺血会引起严重的神经元损害,胶质细胞受损,而且胶质细胞功能的丧失会引起选择性的神经元损害或死亡。(3)严重的脑缺血会导致梗死区中神经元和胶质细胞均发生死亡^[11]。

急性脑缺血早期和晚期 HIF-1 α 激活的效应不同,其差异可能取决于缺氧的持续时间和严重程度^[12]。低氧预处理诱导 HIF-1 α 在大鼠脑组织中表达具有神经保护作用^[13],而缺血缺氧脑损伤研究提示上调表达的 HIF-1 α 可通过其靶基因介导神经元凋亡^[12]。BNIP3 属于“BH3-only”促凋亡蛋白亚类,正常生理条件下 BNIP3 在心、肝、肾、脑等多种人类正常组织中均有表达,但表达量很低^[13,14]。但组织细胞的缺氧缺血可以明显上调 BNIP3 的表达。Burton TR 等^[15]证实正常脑组织细胞 BNIP3 的表达亦定位于细胞核,诱导

缺氧后,正常脑细胞中 BNIP3 的表达将由核转位至胞质而行使其促凋亡功能。Schmidt-Kastner R 等^[16]在缺氧早期的大鼠海马神经元细胞中发现 BNIP3 的核表达,随着缺氧时间的延长,神经元细胞会因 BNIP3 表达转位到胞质而损伤。然而在缺氧损伤的胶质细胞中 HIF-1 α 和 BNIP3 表达如何,尚需进一步研究。本研究发现,OGD/R 6 h 能够造成 C6 胶质细胞损伤,诱导 HIF-1 α 和 BNIP3 过表达,导致细胞大量凋亡,这可能与缺氧复氧时间较长造成中重度缺氧损伤有关。

栀子味苦,性寒,清热泻火,主要针对由火热致毒,是解火热之毒的主要药物,在方中为君药,三七味甘辛,气微寒,长于活血化瘀之功效,与君药配伍起到清热活血之作用,冰片味苦,性微寒,作为佐使药,香窜善走,清热泻火,醒脑开窍。三药合用共奏清热泻火、活血宣窍之功效。本研究证实清脑滴丸可下调 HIF-1 α 、BNIP3 表达,降低 Cleaved Caspase-3 过表达,从而降低细胞凋亡率,其作用机制可能是通过 HIF-1 α /BNIP3 抑制细胞凋亡从而保护胶质细胞。本研究着重观察胶质细胞,而不仅仅局限于神经元,扩展到神经血管单元,能更全面阐释清脑滴丸对神经保护作用,本课题组将进一步原代培养星形胶质细胞、小胶质细胞,细化研究各类胶质细胞在 OGD/R 损伤下的变化,采用清脑滴丸进行干预,明确其究竟调控哪一类胶质细胞。另外,本研究将选取 HIF-1 α 的激动剂和阻断剂,观察细胞核内 HIF-1 α 的表达,评价清脑滴丸调控其信号通路。

利益冲突:本文在个人、商业、学术、财务等各方面不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Gliem M, Krammes K, Liaw L, et al. Macrophage-derived osteopontin induces reactive astrocyte polarization and promotes re-establishment of the blood brain barrier after ischemic stroke[J]. *Glia*, 2015, 63(12): 2198–2207.
- [2] Wu X, Liu Y, Chen X, et al. Involvement of TREK-1 activity in astrocyte function and neuroprotection under simulated ischemia conditions[J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 49(3): 499–506.
- [3] Wei Y, Hong H, Zhang X, et al. Salidroside inhibits inflammation through PI3K/Akt/HIF signaling after focal cerebral ischemia in rats[J]. *Inflammation*, 2017, 40(4): 1297–1309.
- [4] Bartczek P, Li L, Ernst AS, et al. Neuronal HIF-1 α and HIF-2 α deficiency improves neuronal sur-

vival and sensorimotor function in the early acute phase after ischemic stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(1): 291–306.

- [5] 韩振蕴,张允岭,石任兵,等.清脑滴丸治疗腔隙性脑梗死的临床观察[J].*北京中医药大学学报*, 2004, 27(2): 83–86.
- [6] 韩振蕴,张允岭,石任兵,等.清脑宣窍滴丸治疗急性期腔隙性脑梗死 66 例临床观察[J].*辽宁中医杂志*, 2007, 34(4): 433–435.
- [7] 何芳,王新祥,王凤丽,等.清脑滴丸对急性脑缺血再灌注大鼠 JNK 蛋白与细胞凋亡的影响[J].*北京中医药*, 2016, 35(7): 624–628.
- [8] Zhang L, Qu Y, Yang C, et al. Signaling pathway involved in hypoxia-inducible factor-1 α regulation in hypoxic-ischemic cortical neurons *in vitro* [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 461(1): 1–6.
- [9] Hu X, De Silva TM, Chen J, et al. Cerebral vascular disease and neurovascular injury in ischemic stroke[J]. *Circ Res*, 2017, 120(3): 449–471.
- [10] Barakat R, Redzic Z. The neurovascular unit during cerebral ischemia: Is the jury still out? [J]. *Med Princ Pract*, 2016, 25: 3–14.
- [11] Panickar KS, Norenberg MD. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations [J]. *Glia*, 2005, 50(4): 287–298.
- [12] Guo Y. Role of HIF-1 α in regulating autophagic cell survival during cerebral ischemia reperfusion in rats[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(58): 98482–98494.
- [13] Kubli DA, Quinsay MN, Huang C, et al. BNIP3 functions as a mitochondrial sensor of oxidative stress during myocardial ischemia and reperfusion[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(5): H2025–H2031.
- [14] Liu S, Ai Q, Feng K, et al. The cardioprotective effect of dihydromyricetin prevents ischemia-reperfusion-induced apoptosis *in vivo* and *in vitro* via the PI3K/Akt and HIF-1 α signaling pathways [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(12): 1366–1385.
- [15] Burton TR, Henson ES, Baijal P, et al. The pro-cell death Bcl-2 family member, BNIP3, is localized to the nucleus of human glial cells: implications for glioblastoma multiforme tumor cell survival under hypoxia[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(7): 1660–1669.
- [16] Schmidt-Kastner R, Aguirre-Chen C, Kietzmann T, et al. Nuclear localization of the hypoxia-regulated pro-apoptotic protein BNIP3 after global brain ischemia in the rat hippocampus[J]. *Brain Res*, 2004, 1001(1–2): 133–142.

(收稿: 2017–10–14 在线: 2018–07–27)

责任编辑: 赵芳芳