

干细胞因子抑制糖氧剥夺诱导的人脑微血管内皮细胞内质网应激性凋亡的研究

陈思莹 饶杰 卢晔芬 陈建军 程伟进 郑丽云

【摘要】目的 探讨干细胞因子(SCF)抑制糖氧剥夺(OGD)诱导的人脑微血管内皮细胞(h-BMEC)内质网应激性凋亡的机制。**方法** 将 h-BMEC 分为对照组、OGD 组、SCF+OGD 组(简称 SCF 组)、SCF+Compound C+OGD 组(简称 Comp C 组)和 SCF+AICAR+OGD 组(简称 AICAR 组);培养 48h 后,采用噻唑蓝法检测细胞存活率,膜联蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V/PI)双染法检测细胞凋亡率,水溶性四唑盐-WST-8 法检测超氧化物歧化酶(SOD)活性,硫代巴比妥酸(TBA)法检测丙二醛(MDA)含量,Western blot 法检测腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)、磷酸化 AMPK(p-AMPK)、蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)、C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白(CHOP)、断裂半胱氨酸蛋白酶-12(cleaved Caspase-12)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)表达。**结果** 与 OGD 组比较,SCF 组细胞存活率、SOD 活性、Bcl-2 表达均降低(均 $P < 0.05$),MDA 含量、细胞凋亡率、Bax 表达、Bax/Bcl-2 以及 PERK、CHOP、cleaved Caspase-12、p-AMPK 表达均增高(均 $P < 0.05$);与 SCF 组比较,AICAR 组细胞存活率、SOD 活性、Bcl-2 表达均降低(均 $P < 0.05$),MDA 含量、细胞凋亡率、Bax 表达、Bax/Bcl-2 以及 PERK、CHOP、cleaved Caspase-12、p-AMPK 表达均增高(均 $P < 0.05$);Comp C 组 AICAR 组细胞存活率、SOD 活性、MDA 含量、细胞凋亡率、Bax/Bcl-2 比例、Bax、Bcl-2、PERK、CHOP、cleaved Caspase-12、p-AMPK 表达差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。**结论** SCF 对 OGD 诱导的 h-BMEC 损伤具有抑制作用,其分子机制与抑制 AMPK 介导的内质网应激性凋亡有关。

【关键词】 干细胞因子 腺苷酸激活蛋白激酶 内质网应激 细胞凋亡 糖氧剥夺

Stem cell factor inhibits endoplasmic reticulum stress related-apoptosis induced by glucose and oxygen deprivation in human brain microvascular endothelial cells CHEN Siying, RAO Jie, LU Yefen, et al. Department of Neurology, the Fifth Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Lishui 323000, China

【Abstract】Objective To investigate the protective effect and mechanism of stem cell factor (SCF) in glucose and oxygen deprivation (OGD)-induced endoplasmic reticulum (ER) stress related-apoptosis in human brain microvascular endothelial cells (h-BMECs). **Methods** h-BMECs were divided into control group, OGD group, SCF+OGD group (SCF group), SCF+Compound C+OGD group (Comp C) group and SCF+AICAR+OGD group (AICAR group). MTT was used to detect cell viability. Annexin V/PI was applied to analyze the apoptosis cells. The SOD activity and MDA content were detected in a microplate reader. The expression of AMPK, p-AMPK, PERK, CHOP, cleaved Caspase-12, Bax and Bcl-2 were detected by Western blot. **Results** Compared with OGD group, the cell viability and SOD activity in SCF group increased, while the apoptosis rate, Bax/Bcl-2 ratio, MDA content and the expression of PERK, CHOP, Cleaved caspase12 were decreased. Compared with SCF group, the cell viability and SOD activity decreased, but the apoptosis rate, Bax/Bcl-2 ratio, MDA content and the expression of PERK, CHOP, cleaved Caspase-12 were increased significantly in AICAR group but not in Comp C group. **Conclusion** SCF reduces ER stress related-apoptosis via inhibiting AMPK activation in OGD h-BMECs.

【Key words】 Stem cell factor AMPK Endoplasmic reticulum stress Apoptosis Glucose and oxygen deprivation

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.18.2019-468

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2017KY170)

作者单位:323000 丽水市中心医院(温州医科大学附属第五医院)神经内科

通信作者:郑丽云, E-mail: cslc2019@163.com

据统计,脑卒中发病率高达 1 287.3/10 万,死亡率为 126.4/10 万,严重威胁人们的健康^[1]。在脑缺血、缺氧条件下,脑血管内皮细胞易发生损伤或坏死,再灌注损伤后往往导致脑缺血后二次损伤^[2-3]。如何防治脑血管再灌注损伤是当前脑卒中的研究热点和难点^[4]。干细

胞因子(stem cell factor, SCF)与其酪氨酸激酶受体(c-Kit)构成 SCF/c-Kit 通路,参与细胞活性功能调节,对缺血、缺氧组织具有保护作用^[5]。然而,目前关于脑血管缺血再灌注损伤的保护作用及其分子机制尚未完全明确。本研究就 SCF 对脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制制作一探讨,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)抑制剂 Compound C(S7306)、激活剂阿卡地新(AICAR)(S1802)购自美国塞莱克公司,SCF(S7901-10UG, ≥97.0%)、噻唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司,超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒及凋亡试剂盒购自中国上海碧云天生物技术有限公司;AMPK、磷酸化 AMPK (p-AMPK)、蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)、C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白(CHOP)、断裂半胱氨酸蛋白酶-12(cleaved Caspase-12)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和 β-肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体购自美国细胞信号技术(CST)公司。人脑微血管内皮细胞(h-BMEC)购自美国 Scien Cell 研究实验室。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 h-BMEC 置于含 10%FBS 的杜尔伯科改良伊格尔培养基(DMEM, 100U/ml 青霉素+100μg/ml 链霉素),在 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,每 2~3d 更换新鲜培养基,待细胞融合 80%时进行传代培养。

1.2.2 分组与建模 采用随机数字表法,将 h-BMEC 分为对照组、糖氧剥夺(OGD)组、SCF+OGD 组(简称 SCF 组)、SCF+Compound C+OGD 组(简称 Comp C 组)和 SCF+AICAR+OGD 组(简称 AICAR 组)。依据文献^[6]的方法,建立细胞糖氧剥夺模型。待细胞融合达 80%以上时,用 PBS 洗涤 1 次,加入无糖培养基,并将培养器皿置入 OGD 培养装置中,向内冲入混合气体(95%N₂+5%CO₂),持续 6h;更换含 20% FBS 的高糖培养基。SCF 组、Comp C 组、AICAR 组分别予 300μmol/ml SCF、1μmol/L Compound C、1mmol/L AICAR 处理 OGD 细胞;对照组在常规条件下置培养箱中培养。将各组置入 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中继续培养 24h。

1.2.3 细胞存活率检测 采用 MTT 法。调整 h-BMEC 密度为 2×10⁴ 个/ml,接种于 96 孔培养板,待细胞融合达 80%左右时,按上述分组方法进行实验,并设置调零孔,每组设置 6 个复孔。24h 后,加入 20μl MTT,37℃恒温箱

孵育 1~2h,弃培养基,加入二甲亚砜;以调零孔光密度值调零校准,使用酶联免疫检测仪在 492nm 波长处检测各孔吸光度值,计算细胞存活率。

1.2.4 细胞内 SOD 活性和 MDA 含量检测 分别采用水溶性四唑盐-8(WST-8)、硫代巴比妥酸(TBA)法进行检测。调整 h-BMEC 密度为 2×10⁵ 个/ml,接种于 6 孔板中,按上述分组方法进行实验。按照 SOD 活性检测试剂盒、MDA 检测试剂盒说明书进行操作。上机检测,使用酶标仪分析细胞内 SOD 活性和 MDA 含量。

1.2.5 细胞凋亡率检测 采用膜联蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V/PI) 双染法。0.25%胰酶消化并收集细胞, PBS 洗涤细胞 2 次,使用 500μl 上样缓冲液重悬,依次加入 5μl Annexin V、5μl PI,室温下避光孵育 15min,上机检测,使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.6 蛋白表达检测 采用 Western blot 法。调整 h-BMEC 密度为 2×10⁵ 个/ml,接种于 6 孔板中,按上述分组方法进行实验。24h 后,加入放射免疫沉淀分析(RIPA)细胞裂解液冰上裂解 15min,12 000r/min 离心 15min,吸取上清液,收集总蛋白。采用二喹啉甲酸(BCA)法定量后,取 20μg 总蛋白用 6%~10%聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离,电转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,10%脱脂牛奶封闭 10min。加入适当稀释度的一抗(AMPK、p-AMPK、PERK、CHOP、Caspase-12、Bax、Bcl-2、β-actin),4℃孵育,过夜;磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗体,在室温下孵育 1~2h, PBST 洗涤;经化学发光试剂发光、显影和定影后,使用 Image J 软件分析条带的灰度值,即相对表达量。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 h-BMEC 细胞存活率比较 OGD 组、SCF 组、Comp C 组、AICAR 组、对照组细胞存活率分别为(51.26±9.37)%、(88.23±6.68)%、(93.61±7.40)%、(55.11±8.65)%、(97.15±4.18)%。与对照组比较,OGD 组、AICAR 组细胞存活率均降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与 OGD 组比较,SCF 组、Comp C 组细胞存活率均升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与 SCF 组比较, AICAR 组细胞存活率降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 Comp C 组细胞存活率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组 h-BMEC 细胞内 SOD 活性和 MDA 含量比

较 与对照组比较, OGD 组、AICAR 组 SOD 活性均降低, MDA 含量均增高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); SCF 组、Comp C 组 SOD 活性均增高, MDA 含量均降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与 SCF 组比较, AICAR 组 SOD 活性降低, MDA 含量增高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组 h-BMEC 细胞内 SOD 活性和 MDA 含量比较

组别	n	SOD 活性(U/mg)	MDA 含量(nmol/mg)
OGD 组	3	$78.17 \pm 8.68^*$	$3.14 \pm 0.21^*$
SCF 组	3	$113.12 \pm 11.23^\Delta$	$1.09 \pm 0.11^\Delta$
Comp C 组	3	$117.36 \pm 8.47^\Delta$	$1.01 \pm 0.12^\Delta$
AICAR 组	3	$71.92 \pm 9.44^{\Delta\Delta}$	$3.52 \pm 0.53^{\Delta\Delta}$
对照组	3	124.12 ± 9.72	0.93 ± 0.10
P 值		<0.05	<0.05

注: 与对照组比较, $^*P < 0.05$; 与 OGD 组比较, $^\Delta P < 0.05$; 与 SCF 组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$

2.3 各组 h-BMEC 细胞凋亡率及 Bax、Bcl-2 表达比较 与对照组比较, OGD 组、AICAR 组 Bcl-2 表达均降低, 细胞凋亡率、Bax 表达、Bax/Bcl-2 均增高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与 OGD 组比较, SCF 组、Comp C 组 Bcl-2 表达均增高, 细胞凋亡率、Bax 表达、Bax/Bcl-2 均降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与 SCF 组比较, AICAR 组 Bcl-2 表达降低, 细胞凋亡率、Bax 表达、Bax/Bcl-2 均增高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 见表 2 和图 1。

表 2 h-BMEC 细胞凋亡率及 Bax、Bcl-2 表达比较

组别	n	细胞凋亡率(%)	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2
OGD 组	3	$32.26 \pm 9.18^*$	$0.81 \pm 0.10^*$	$0.10 \pm 0.08^*$	$8.12 \pm 2.01^*$
SCF 组	3	$11.19 \pm 4.19^\Delta$	$0.18 \pm 0.13^\Delta$	$0.75 \pm 0.15^\Delta$	$0.25 \pm 0.08^\Delta$
Comp C 组	3	$10.31 \pm 3.25^\Delta$	$0.07 \pm 0.04^\Delta$	$0.68 \pm 0.10^\Delta$	$0.12 \pm 0.06^\Delta$
AICAR 组	3	$38.33 \pm 8.35^{\Delta\Delta}$	$0.72 \pm 0.12^{\Delta\Delta}$	$0.06 \pm 0.03^{\Delta\Delta}$	$12.10 \pm 3.57^{\Delta\Delta}$
对照组	3	6.12 ± 1.43	0.27 ± 0.10	0.91 ± 0.18	0.30 ± 0.10
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注: 与对照组比较, $^*P < 0.05$; 与 OGD 组比较, $^\Delta P < 0.05$; 与 SCF 组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$

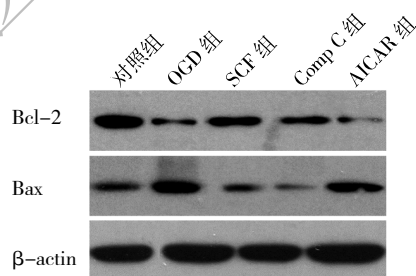


图 1 各组 h-BMEC 的 Bax、Bcl-2 表达的电泳图

2.4 各组 h-BMEC 内质网应激性凋亡相关蛋白表达比较 与对照组比较, OGD 组、AICAR 组 PERK、CHOP、cleaved Caspase-12 表达均增高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与 OGD 组比较, SCF 组、Comp C 组 PERK、CHOP、cleaved Caspase-12 表达均降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与 SCF 组比较, AICAR 组 PERK、CHOP、cleaved Caspase-12 表达均增高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 见表 3 和图 2。

表 3 各组 h-BMEC 内质网应激性凋亡相关蛋白表达比较

组别	n	PERK	CHOP	cleaved Caspase-12
OGD 组	3	$0.46 \pm 0.15^*$	$0.53 \pm 0.18^*$	$0.64 \pm 0.14^*$
SCF 组	3	$0.09 \pm 0.06^\Delta$	$0.13 \pm 0.08^\Delta$	$0.20 \pm 0.11^\Delta$
Comp C 组	3	$0.06 \pm 0.04^\Delta$	$0.10 \pm 0.07^\Delta$	$0.08 \pm 0.06^\Delta$
AICAR 组	3	$0.93 \pm 0.20^{\Delta\Delta}$	$0.58 \pm 0.16^{\Delta\Delta}$	$0.73 \pm 0.22^{\Delta\Delta}$
对照组	3	0.12 ± 0.10	0.16 ± 0.09	0.21 ± 0.12
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注: 与对照组比较, $^*P < 0.05$; 与 OGD 组比较, $^\Delta P < 0.05$; 与 SCF 组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$

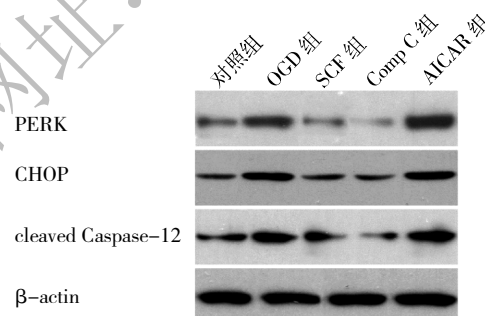


图 2 各组 h-BMEC 内质网应激性凋亡相关蛋白表达的电泳图

2.5 各组 h-BMEC 的 p-AMPK、AMPK 表达比较 与对照组比较, OGD 组、AICAR 组 p-AMPK 表达均增高, SCF 组、Comp C 组均降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与 OGD 组比较, SCF 组、Comp C 组 p-AMPK 表达均降低, AICAR 组增高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与 SCF 组比较, AICAR 组 p-AMPK 表达增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 4 和图 3。

表 4 各组 h-BMEC 的 p-AMPK、AMPK 表达比较

组别	n	p-AMPK	AMPK
OGD 组	3	$0.53 \pm 0.16^*$	0.96 ± 0.19
SCF 组	3	$0.04 \pm 0.03^{\Delta\Delta}$	0.98 ± 0.15
Comp C 组	3	$0.02 \pm 0.01^{\Delta\Delta}$	0.97 ± 0.18
AICAR 组	3	$0.89 \pm 0.18^{\Delta\Delta}$	0.98 ± 0.17
对照组	3	0.11 ± 0.08	0.99 ± 0.20
P 值		<0.05	>0.05

注: 与对照组比较, $^*P < 0.05$; 与 OGD 组比较, $^\Delta P < 0.05$; 与 SCF 组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$

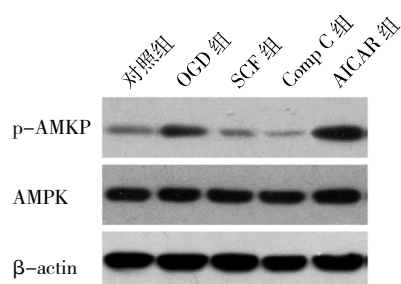


图3 各组 h-BMEC 的 p-AMKP、AMPK 表达的电泳图

3 讨论

SCF 与其 c-Kit 广泛分布于中枢神经系统,参与脑组织的发育和功能调节。SCF/c-Kit 通过对中枢神经系统具有重要的保护作用。Dhandapani 等^[7]发现 SCF 可抑制谷氨酸神经毒性反应。Sun 等^[8]证实 SCF 可促进脑损伤局域神经修复。罗云等^[9]证实缺血性损伤可增加 SCF 表达,降低脑细胞损害,提示 SCF/c-Kit 通路与缺血性损伤修复密切相关。本研究结果发现,与 OGD 组比较,SCF 组细胞存活率明显增高,细胞凋亡率明显下降,Bax 表达降低,Bcl-2 表达增高,Bax/Bcl-2 下降,而 SOD 活性增高,MDA 含量降低;这说明 SCF 具有抑制 OGD 诱导 h-BMEC 损伤作用。本研究还发现,OGD 细胞内 CHOP、PERK、cleaved Caspase-12 表达明显增高;这说明在 OGD 条件下,细胞启动了内质网应激性凋亡。与 OGD 组比较,SCF 组 CHOP、PERK、cleaved Caspase-12 表达明显降低,这说明 SCF 具有抑制 OGD 诱导内质网应激性凋亡的作用。

内质网应激性凋亡是指在应激状态持续或强化条件下,通过级联活化凋亡信号通路,促使细胞凋亡,其中 CHOP 是最经典的凋亡通路。CHOP 接受 PERK、质网核信号转导蛋白 α1(IRE1)、活化转录因子 6(ATF6)、活化转录因子 4(ATF4)等分子激活后,转而促进 Caspase-12 活化或 Bcl-2 降解,从而启动细胞凋亡。有学者报道,内质网应激性凋亡途径受 AMPK 通路调控^[10-11]。Yang 等^[10]证实,钼通过激活 AMPK 依赖的内质网应激诱导胰岛 β 细胞功能紊乱和凋亡。本研究结果发现,OGD 组细胞内 p-AMKP 表达明显增高,而 SCF 组较 OGD 组明显降低;这说明 SCF 对 AMPK 的活化具有明显抑制作用。与 SCF 组比较,AICAR 组细胞存活率差异无统计学意义,凋亡比例明显增高,Bax 表达增高,Bcl-2 表达降低,Bax/Bcl-2 增高,SOD 活性降低,MDA 含量增高,CHOP、PERK、cleaved Caspase-12 表达明显降低;Comp C 组细胞存活率、细胞凋亡率以及 CHOP、PERK、cleaved

Caspase-12 表达差异均无统计学意义。以上结果说明 OGD 细胞中 AMPK 被活化,且 AMPK 介导 SCF 抵抗 OGD 诱导内质网应激性细胞凋亡作用。

综上所述,SCF 对 OGD 诱导的 h-BMEC 损伤具有抑制作用,其分子机制与抑制 AMPK 介导的内质网应激性凋亡有关。

4 参考文献

- [1] Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2019, 139(10):e56–e528. DOI:10.1161/CIR.0000000000000659.
- [2] Cui YH, Zhang XQ, Wang ND, et al. Vitexin protects against ischemia/reperfusion-induced brain endothelial permeability[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 853: 210–219. DOI:10.1016/j.ejphar.2019.03.015.
- [3] Gong P, Zhang Z, Zou C, et al. Hippo/YAP signaling pathway mitigates blood–brain barrier disruption after cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Behav Brain Res*, 2019, 356: 8–17. DOI: 10.1016/j.bbr.2018.08.003.
- [4] Catanese L, Tarsia J, Fisher M. Acute Ischemic Stroke Therapy Overview[J]. *Circ Res*, 2017, 120(3): 541–558. DOI:10.1161/CIRC-RESAHA.116.309278.
- [5] Hernandez DR, Artilles A, Duque JC, et al. Loss of c-Kit function impairs arteriogenesis in a mouse model of hindlimb ischemia[J]. *Surgery*, 2018, 163(4): 877–882. DOI:10.1016/j.surg.2017.10.052.
- [6] Yang H, Xi X, Zhao B, et al. KLF4 protects brain microvascular endothelial cells from ischemic stroke induced apoptosis by transcriptionally activating MALAT1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(3):2376–2382. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.11.205.
- [7] Dhandapani KM, Wade FM, Wakade C, et al. Neuroprotection by stem cell factor in rat cortical neurons involves AKT and NFκB[J]. *J Neurochem*, 2005, 95(1): 9–19. DOI:10.1111/j.1471-1471.2005.03319.x.
- [8] Sun L, Lee J, Fine HA. Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(9):1364–1374. DOI:10.1172/JCI20001.
- [9] 罗云, 朱文静, 徐运. 脑缺血再灌注后干细胞因子和 KIT 受体的变化及意义[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(4): 734–737. DOI:10.3321/j.issn:1000-4718.2009.04.022.
- [10] Yang TY, Yen CC, Lee KI, et al. Molybdenum induces pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis via interdependent of JNK and AMPK activation-regulated mitochondria-dependent and ER stress-triggered pathways[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 294: 54–64. DOI:10.1016/j.taap.2016.01.013.
- [11] Leclerc GM, Leclerc GJ, Kuznetsov JN, et al. Metformin induces apoptosis through AMPK-dependent inhibition of UPR signaling in ALL lymphoblasts[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e74420. DOI: 10.1371/journal.pone.0074420.

(收稿日期:2019-02-15)

(本文编辑:陈丹)