

# 低氧诱导因子-1 $\alpha$ 对SH-SY5Y细胞兴奋性 毒性损伤的调节作用

李永金 杨开勇 阚美佳 黄贺 张谊 陈月芳 端礼荣 黄晓佳\*

(江苏大学医学院, 镇江 212013)

**摘要** 探讨低氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )在喹啉酸诱导人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞损伤中的作用。将体外培养的人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞分为对照组、喹啉酸低、中、高剂量组及HIF-1 $\alpha$ 抑制剂二甲氧基雌二醇(2-methoxyestradiol, 2ME2)预处理喹啉酸高剂量组, 采用噻唑蓝还原法和乳酸脱氢酶漏出率检测法测定细胞损伤程度, Hoechst 33342单荧光染色法观察细胞凋亡, 免疫荧光染色法检测HIF-1 $\alpha$ 在细胞内的表达, 免疫印迹法检测细胞HIF-1 $\alpha$ 、蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)、磷酸化Akt(p-Akt)、Bcl-2和Bax的表达。结果显示, 喹啉酸可剂量、时间依赖性地诱导SH-SY5Y细胞损伤, 导致细胞凋亡。同时, 喹啉酸可使SH-SY5Y细胞HIF-1 $\alpha$ 表达上调并发生核转位、p-Akt表达增加及Bax/Bcl-2表达比例增加, 而2ME2可抑制喹啉酸诱导的SH-SY5Y细胞损伤及降低HIF-1 $\alpha$ 、p-Akt和Bax/Bcl-2的表达。由此说明, HIF-1 $\alpha$ /Akt通路介导了喹啉酸诱导SH-SY5Y的细胞凋亡。HIF-1 $\alpha$ 抑制剂(2ME2)能够减轻喹啉酸致SH-SY5Y细胞损伤程度, 减少细胞凋亡。

**关键词** 喹啉酸; SH-SY5Y细胞; 细胞损伤; 细胞凋亡; HIF-1 $\alpha$ ; 信号通路

## Regulatory Role of HIF-1 $\alpha$ in the SH-SY5Y Cells Excitotoxic Injury

Li Yongjin, Yang Kaiyong, Kan Meijia, Huang He, Zhang Yi, Chen Yuefang, Duan Lirong, Huang Xiaojia\*

(School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract** To investigate the role of HIF-1 $\alpha$  in SH-SY5Y cell injury induced by quinolinic acid, SH-SY5Y cells were divided into control group, quinolinic acid low, medium and high dosage groups and HIF-1 $\alpha$  inhibitor (2ME2) pretreated group; the cell viability was determined by MTT reduction assay and LDH assay; cell apoptosis was determined by Hoechst 33342 staining; the intracellular distribution of HIF-1 $\alpha$  was examined by HIF-1 $\alpha$  immunostaining and the expressions of HIF-1 $\alpha$ , Akt, p-Akt, Bcl-2 and Bax were determined by Western blot. The results showed that quinolinic acid induced SH-SY5Y cell damage in a dosage- and time-dependent manner, leading to apoptosis. In addition, quinolinic acid enhanced HIF-1 $\alpha$  expression and nuclear translocation. The p-Akt expression and Bax/Bcl-2 ratio were increased by quinolinc acid in SH-SY5Y cells, and 2ME2 inhibited quinolinic-acid induced SH-SY5Y cells damage and reduced the expression of HIF-1 $\alpha$ , p-Akt and Bax/Bcl-2. These results indicated that HIF-1 $\alpha$ /Akt pathway mediates quinolinic acid induced cell apoptosis in SH-SY5Y cells, and HIF-1 $\alpha$  inhibitor (2ME2) can lower the degree of SH-SY5Y cells damage induced by quinolinic acid, reducing apoptosis.

**Keywords** quinolinic acid; SH-SY5Y cells; cell injury; cell apoptosis; HIF-1 $\alpha$ ; signaling pathway

收稿日期: 2015-01-16 接受日期: 2015-02-09

国家自然科学基金(批准号: 81300059)和江苏大学高级人才基金(批准号: 08JDG005、11JDG092)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0511-88791201, E-mail: harold1980@163.com

Received: January 16, 2015 Accepted: February 9, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81300059) and Senior Talent Foundation of Jiangsu University (Grant No.08JDG005, 11JDG092)

\*Corresponding author. Tel: +86-511-88791201, E-mail: harold1980@163.com

网络出版时间: 2015-04-28 11:07 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150428.1107.002.html>

谷氨酸是哺乳动物中枢神经系统中最重要的兴奋性神经递质,参与中枢兴奋性突触传递,其介导的信号转导构成记忆和认知的基础,与突触可塑性、神经元生长与存活、长时程增强等重要生理过程有关。然而,谷氨酸受体在过度激活时会导致神经元的死亡,即兴奋性神经毒性<sup>[1]</sup>。谷氨酸受体过度兴奋所介导的神经细胞迟发性损伤存在于许多慢性神经退行性病变,如阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病等的发病机制中,兴奋性毒性可能是造成神经元死亡的最后共同通路<sup>[2]</sup>,医学研究正越来越注重对兴奋性毒性的探讨。喹啉酸(quinolinic acid, QA)是谷氨酸(glutamate acid, Glu)的类似物,又是脑内潜在的内源性兴奋性毒素。过量的QA激活谷氨酸的受体亚型N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)受体,不仅兴奋神经细胞使突触后去极化,又可刺激Glu的释放,形成恶性循环,加重兴奋性神经毒性<sup>[3]</sup>。因此,用喹啉酸模拟神经系统兴奋性神经毒性模型具有重要的临床意义。

在神经元损伤的过程中,有多种转录因子,如低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)参与了细胞的死亡过程。HIF-1是一种能感受细胞氧分压的调控蛋白,能激活100多种与缺氧条件下细胞存活相关的基因转录。HIF-1是由 $\alpha$ 和 $\beta$ 两个亚基组成的异源二聚体,其中HIF-1 $\alpha$ 是决定其活性的功能性亚基<sup>[4]</sup>。有研究表明,磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号通路参与了HIF-1 $\alpha$ 的表达<sup>[5-7]</sup>。但在神经细胞兴奋性损伤中是否有HIF-1 $\alpha$ 的参与,若有, HIF-1 $\alpha$ 是促进损伤还是参与保护以及是否接受PI3K/Akt信号通路的调节,目前均不明确。

人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞是一种较好的神经元模型,被广泛应用于神经毒理学和神经药理学等的研究<sup>[8]</sup>。因此,本实验以喹啉酸损伤SH-SY5Y细胞模拟谷氨酸兴奋性神经毒性模型,探讨HIF-1 $\alpha$ 在SH-SY5Y细胞兴奋性毒性损伤中的作用及其信号通路,为证实HIF-1 $\alpha$ 及其信号通路参与神经元兴奋性损伤提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞株来自于中国科学院上海细胞库;DMEM培养基和胰蛋白酶均购

自美国Gibco公司;新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。QA购自美国Sigma公司;2-甲氧基雌二醇购自美国Selleck公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒购自海门市碧云天生物技术研究。噻唑蓝(MTT)购自美国Amresco公司;Hoechst 33342购自美国Sigma公司。兔抗Bcl-2单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;兔抗HIF-1 $\alpha$ 、蛋白激酶B(Akt)、磷酸化Akt(p-Akt)、Bax多克隆抗体均购自美国ImmunoWay公司;鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体购自上海康城生物有限公司;辣根过氧化物酶或荧光基团标记的二抗均购自北京康为世纪公司;底物化学发光试剂购自美国Millipore公司。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 细胞培养及实验分组

将人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞用含10%新生牛血清、 $1 \times 10^5$  U/L青霉素、100 mg/L链霉素的高糖DMEM培养基,置于含5% CO<sub>2</sub>的37 °C培养箱中培养,每2 d换液1次,4 d传代1次,取对数生长期细胞进行实验。

将SH-SY5Y细胞以 $5 \times 10^4$ /mL密度接种于96孔或24孔板,置于培养箱中培养24 h后,加入不同浓度的QA分别处理24 h(筛选出QA低、中、高的浓度分别为2.25, 4.5, 9 mmol/L。故将实验分为对照组、QA低剂量组(2.25 mmol/L)、中剂量组(4.5 mmol/L)、高剂量组(9 mmol/L)及HIF-1 $\alpha$ 抑制剂2ME2(20  $\mu$ mol/L)+QA高剂量组(9 mmol/L),其中2ME2预处理30 min。对照组细胞中加入相同体积PBS。

### 1.3 QA高剂量组作用不同时间SH-SY5Y细胞HIF-1 $\alpha$ 蛋白检测

采用免疫蛋白印迹法检测9 mmol/L QA作用不同时间SH-SY5Y细胞内HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达。收集9 mmol/L QA处理不同时间(0, 0.5, 1, 6, 12, 24, 48, 72 h)的细胞,提取总蛋白并测定蛋白浓度。将30  $\mu$ g蛋白进行SDS-PAGE电泳、转膜并封闭后,加入HIF-1 $\alpha$ (1:1 000)和GAPDH(1:7 000)抗体于4 °C反应过夜。洗涤后,将膜和相应二抗(1:5 000)在室温下反应1 h,以底物化学发光试剂显色后并用凝胶成像系统(ChampGel 5000,北京赛智创业科技有限公司)进行扫描,Image J软件分析各条带灰度值。以GAPDH条带灰度值作参照进行半定量分析。

#### 1.4 细胞活力检测

以MTT还原法检测细胞存活率。五组药物处理结束后, 培养板每孔中加入MTT(终浓度为0.5 mg/mL), 37 °C反应4 h, 吸去上清后, 每孔加入100  $\mu$ L二甲基亚砷, 振荡5 min, 置酶标仪上于490 nm处测定各孔吸光度值。

此外, 采用细胞LDH漏出率检测法检测细胞死亡率, 按照LDH试剂盒说明书进行操作, 并计算各组细胞内LDH的含量。

#### 1.5 细胞形态学检测

将SH-SY5Y细胞按照1.2中的分组处理24 h后, 于普通光学倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。

#### 1.6 细胞内HIF-1 $\alpha$ 的表达定位检测

将SH-SY5Y细胞接种于玻璃片上, 按照1.2中的分组经药物处理后固定细胞, 以0.3% Triton X-100透化10 min, 羊血清封闭30 min后, 滴加抗HIF-1 $\alpha$ 抗体(1:300), 4 °C反应过夜; PBS洗涤后加入Cy3标记的二抗(1:200)室温下避光反应1 h, 加入Hoechst 33342染色液室温下反应5 min染细胞核, 用50%甘油封片, 置荧光显微镜下观察。

#### 1.7 细胞凋亡检测

将SH-SY5Y细胞接种于玻璃片上, 按照1.2中的分组经药物处理24 h后弃去培养液, PBS洗涤, 用冰甲醇固定细胞10 min。吸去固定液, 用PBS洗涤后加入Hoechst 33342染色液(终浓度为10  $\mu$ g/mL)于室温下反应5 min, 在荧光显微镜下观察并拍照。

#### 1.8 细胞HIF-1 $\alpha$ 、Akt、p-Akt、Bax、Bcl-2蛋白的表达检测

细胞按照1.2中的分组处理24 h后, 收集细胞, 提取总蛋白并测定蛋白浓度。加入一抗的稀释比例为: HIF-1 $\alpha$ (1:1 000)、Akt(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)、Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)。按照1.3的步骤进行。

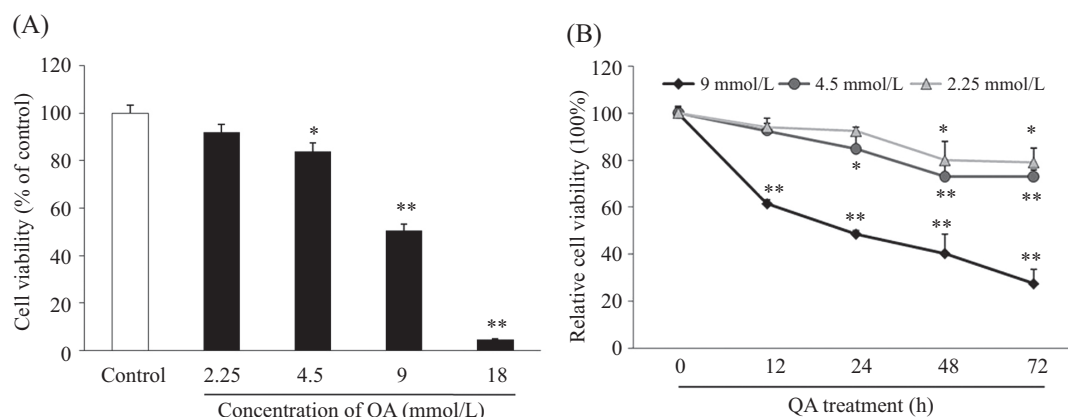
#### 1.9 统计学处理

数据均以mean $\pm$ S.D.表示, 应用SPSS 16.0统计软件进行分析, 多组间均数采用单因素方差分析, 两组间比较用Bonferroni检验法,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 QA对SH-SY5Y细胞活力的影响

MTT还原法检测实验结果表明, SH-SY5Y细胞经不同浓度QA(2.25~18 mmol/L)处理24 h, 细胞存活率逐渐降低, 4.5 mmol/L QA即可引起细胞出现明显损伤。经下述方法计算, 各药物浓度组的生长抑制率(%)=(1-实验孔平均D值/对照孔平均D值) $\times$ 100%。 $IC_{50} = \lg^{-1}[X_m - i(\Sigma P - 0.5)]$ , 重复4次, 取平均值。X<sub>m</sub>: 最大浓度的对数值; i: 浓度倍比的对数值;  $\Sigma P$ : 各组生长抑制率之和; 0.5: 经验常数。得出QA引起SH-SY5Y细胞损伤的50%抑制浓度( $IC_{50}$ )为9 mmol/L。SH-SY5Y细胞经不同浓度QA(2.25~9 mmol/L)分别处理0, 12, 24, 48, 72 h, 细胞存活率逐渐降低, 且呈时间依赖性, 9 mmol/L QA在6 h即可引起细胞出现明显损伤(图1)。



A: 不同浓度QA处理SH-SY5Y细胞24 h后用MTT法检测细胞存活率的变化。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较; B: 不同浓度QA处理后SH-SY5Y细胞存活率的变化。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与0 h组比较。

A: SH-SY5Y cells were treated with various concentrations of QA for 24 h. The cell viability was assessed by MTT reduction assay. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group; B: the cells were treated with QA for different time, and the cell viability was determined as well. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with 0 h group.

图1 QA呈浓度和时间依赖性地降低SH-SY5Y细胞存活率

Fig.1 Treatment with QA decreased the viability of SH-SY5Y cells in a time- and concentration-dependent manner

## 2.2 QA高剂量组SH-SY5Y细胞内HIF-1 $\alpha$ 蛋白检测

Western blot检测结果表明, 9 mmol/L QA处理SH-SY5Y细胞0~72 h, 细胞内HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达先增高后降低, 于12~48 h持续高表达, 24 h时达峰值(图2)。

## 2.3 2ME2对损伤模型组SH-SY5Y细胞活力的影响

MTT还原法检测实验结果表明, SH-SY5Y细胞经不同浓度QA(2.25~9 mmol/L)处理24 h, 细胞存活率逐渐降低, 4.5 mmol/L QA即可引起细胞出现明显损伤, 20  $\mu$ mol/L 2ME2+9 mmol/L QA组细胞较9 mmol/L QA组细胞存活率明显增高。此外, LDH漏出率实验结果也表明, QA(2.25~9 mmol/L)可剂量依赖性引起SH-SY5Y细胞损伤, 且20  $\mu$ mol/L 2ME2预处理组与损伤对照组比较, SH-SY5Y细胞损

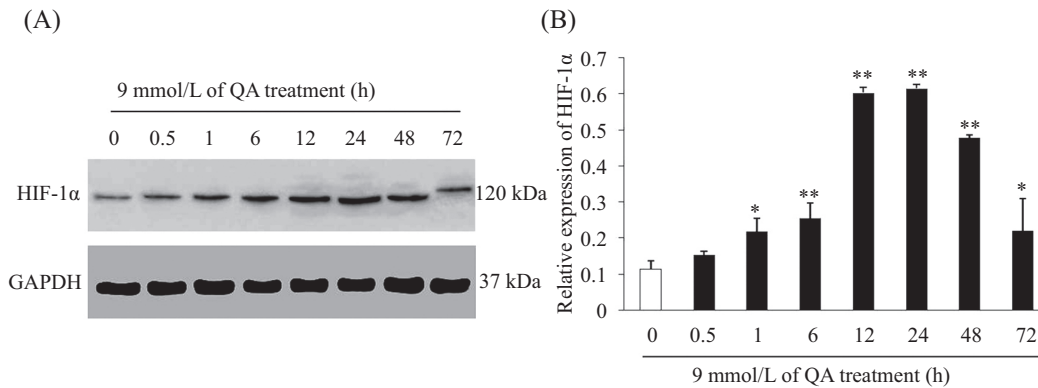
伤程度明显减轻(图3)。

## 2.4 不同实验组SH-SY5Y细胞的形态学变化

对照组SH-SY5Y细胞形态完整, 胞体饱满, 立体感强, 周围有光晕, 突起明显。经4.5 mmol/L QA损伤24 h后, SH-SY5Y细胞突起明显减少并出现死亡; 9 mmol/L QA可引起细胞透光率下降, 胞体明显皱缩, 轴突变短变少, 并导致大量细胞死亡; 20  $\mu$ mol/L 2ME2+9 mmol/L QA组与9 mmol/L QA组相比, SH-SY5Y细胞突起明显增多, 死亡细胞明显减少。2.25 mmol/L QA对SH-SY5Y细胞形态无明显作用(图4)。

## 2.5 QA对SH-SY5Y细胞内HIF-1 $\alpha$ 核转位的影响及2ME2的干预作用

在细胞处于不同状态下, HIF-1 $\alpha$ 的表达位置和

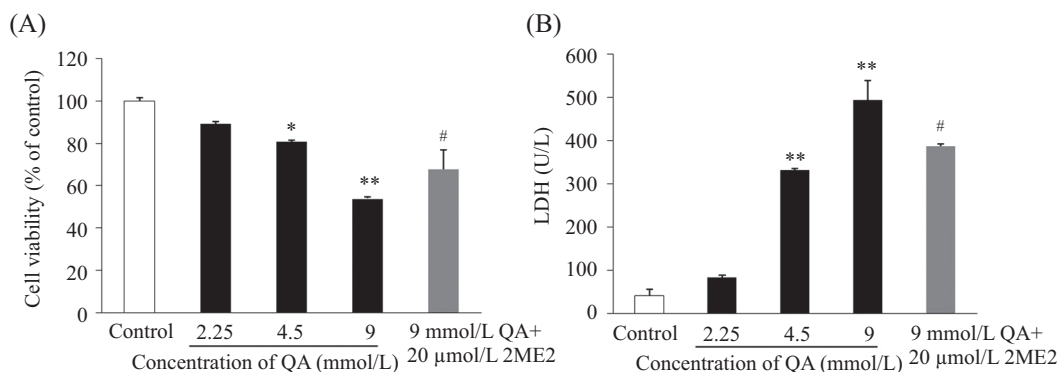


A: 9 mmol/L QA处理SH-SY5Y细胞0~72 h后, Western blot检测细胞内HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达的变化; B: HIF-1 $\alpha$ 条带与相应内参GAPDH灰度值比值的统计学分析。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, 与0 h组比较( $n$ =5)。

A: the expression of HIF-1 $\alpha$  was detected by Western blot after incubation with 9 mmol/L of QA in SH-SY5Y cells for 0~72 h; B: statistical analysis of gray value ratio of HIF-1 $\alpha$ /GAPDH. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 compared with 0 h group ( $n$ =5).

图2 9 mmol/L QA处理SH-SY5Y细胞不同时间后胞内HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达变化

Fig.2 The expression of HIF-1 $\alpha$  in intracellular after incubation with 9 mmol/L of QA for different time in SH-SY5Y cells

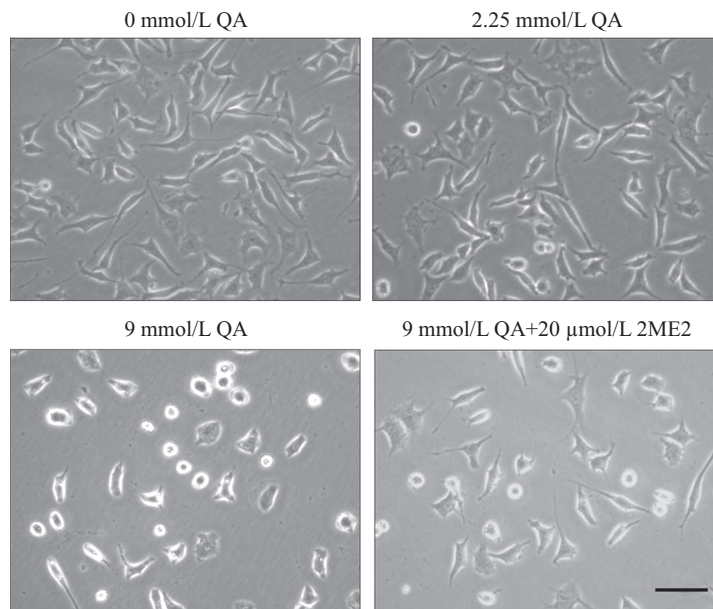


A: 不同实验组处理SH-SY5Y细胞24 h后, MTT法检测细胞存活率的变化; B: 不同实验组处理SH-SY5Y细胞24 h后, LDH检测试剂盒检测LDH漏出率的变化。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, 与对照组比较; # $P$ <0.05, 与9 mmol/L QA组比较( $n$ =5)。

A: MTT method was used to detect the survival of SH-SY5Y cells treated with 20  $\mu$ mol/L of 2ME2 and different concentrations of QA for 24 h; B: LDH assay was applied to measure the leakage rate of SH-SY5Y cells treated with 20  $\mu$ mol/L of 2ME2 and different concentrations of QA for 24 h. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 compared with control group; # $P$ <0.05 compared with 9 mmol/L of QA group ( $n$ =5).

图3 2ME2抑制QA所降低的SH-SY5Y细胞活力

Fig.3 2ME2 inhibited the decrease of SH-SY5Y cell viability induced by QA



普通倒置相差显微镜下观察不同实验组处理SH-SY5Y细胞24 h后, 细胞形态学变化。标尺=20  $\mu\text{m}$ 。

After treating SH-SY5Y cells with 20  $\mu\text{mol/L}$  of 2ME2 and different concentrations of QA for 24 h, the morphological changes were observed by the inverted phase contrast microscope. Scale bar=20  $\mu\text{m}$ .

图4 2ME2抑制QA导致的SH-SY5Y细胞突起和透光率减少

Fig.4 2ME2 inhibited the decrease of SH-SY5Y cell protuberance and transmittance induced by QA

表达量也出现变化, 进而导致其功能的变化。本实验采用荧光免疫组化实验检测HIF-1 $\alpha$ 在细胞内的表达定位。在对照组细胞中, HIF-1 $\alpha$ 几乎不表达; 2.25 mmol/L QA处理24 h后, SH-SY5Y细胞HIF-1 $\alpha$ 出现低表达; 4.5 mmol/L QA可明显诱导细胞核内HIF-1 $\alpha$ 高表达; 9 mmol/L QA处理使细胞核内HIF-1 $\alpha$ 表达明显提高; 20  $\mu\text{mol/L}$  2ME2+9 mmol/L QA处理明显抑制细胞内HIF-1 $\alpha$ 发生核转位(图5)。

## 2.6 QA对SH-SY5Y细胞凋亡的影响及2ME2的干预作用

荧光染料Hoechst 33342能少许透过正常细胞膜, 使正常细胞产生低强度蓝色荧光; 而凋亡细胞由于膜通透性增强, 进入细胞内的染料比正常细胞多, 故荧光强度明显增加。经不同浓度QA(2.25~9 mmol/L)处理24 h后, 对照组细胞细胞核呈现均匀弥散荧光, 9 mmol/L QA使细胞呈现细胞核浓缩碎裂, 出现大量细胞凋亡; 20  $\mu\text{mol/L}$  2ME2预处理后可减少细胞凋亡(图6)。

## 2.7 不同实验组中SH-SY5Y细胞HIF-1 $\alpha$ 、p-Akt、Akt、Bcl-2、Bax蛋白表达的变化

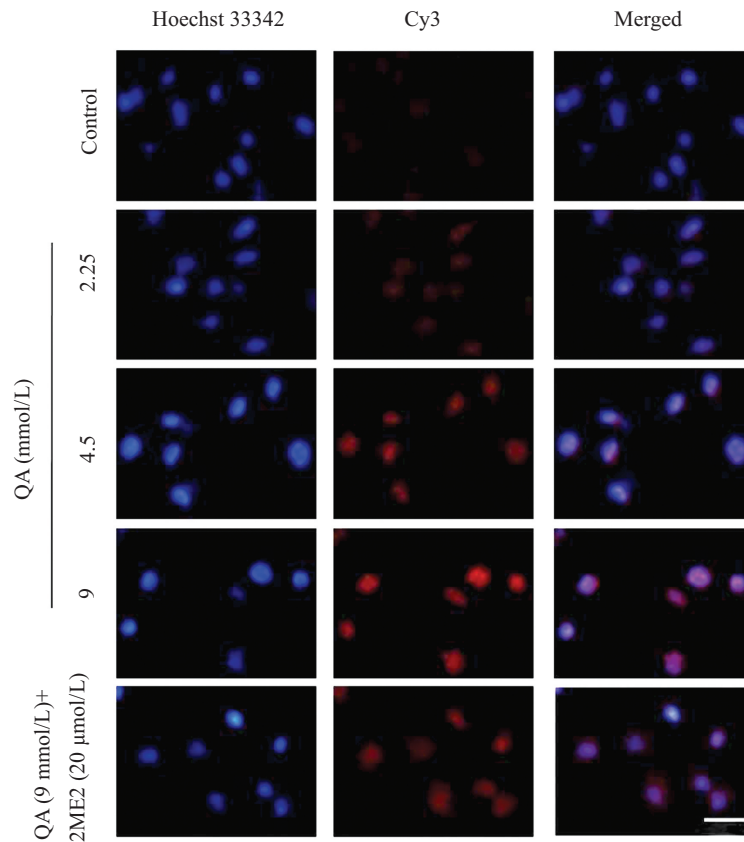
在细胞出现损伤过程中, Akt发挥了重要作用, 其被激活(磷酸化)后会启动细胞凋亡途径<sup>[9]</sup>, 造成细胞凋

亡相关蛋白Bax/Bcl-2表达比例出现增高, 进而导致细胞凋亡。在本实验中, 我们通过Western blot方法检测HIF-1 $\alpha$ 、p-Akt、Bax、Bcl-2蛋白质的表达变化。与正常对照组比较, 经不同浓度QA(2.25~9 mmol/L)处理24 h后, SH-SY5Y细胞p-Akt表达明显增加, 而Akt表达无明显变化。同时, QA(2.25~9 mmol/L)可引起Bax和Bcl-2表达出现变化, 导致Bax/Bcl-2表达比值明显增加。而给予HIF-1 $\alpha$ 抑制剂2ME2(20  $\mu\text{mol/L}$ )预处理后, HIF-1 $\alpha$ 、p-Akt表达明显降低, 且Bax/Bcl-2表达比值明显下降(图7)。

## 3 讨论

成熟神经元对兴奋性神经毒性损伤较未成熟神经元更为敏感<sup>[10]</sup>。而许多人类神经退行性病变, 如阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病等也呈现出年龄依赖性趋势, 所以对此进行深入研究有重要意义<sup>[11-12]</sup>。本研究旨在体外模拟谷氨酸兴奋性毒性损伤模型, 探讨其损伤机制与HIF-1 $\alpha$ /Akt通路的关系。

本实验结果显示, QA可呈时间和剂量性地降低细胞存活率, 增加细胞损伤, 说明QA可导致SH-SY5Y细胞损伤, 与文献报道相一致<sup>[13]</sup>。Western blot结果显示, 随着QA作用SH-SY5Y细胞时间的延长,

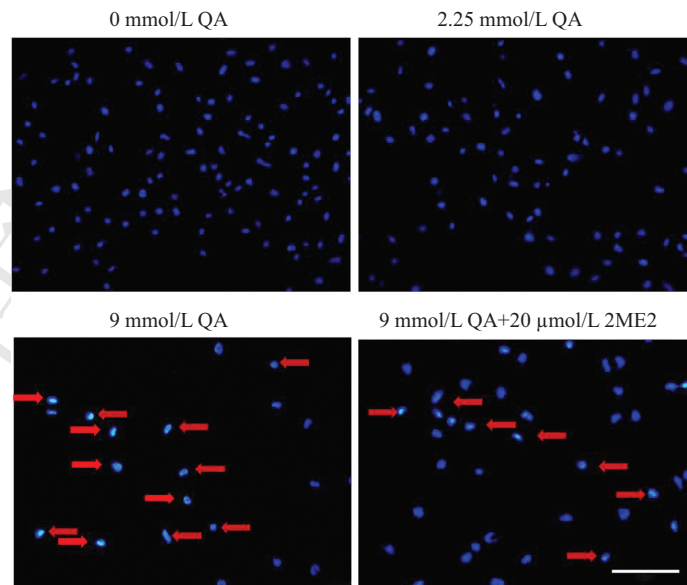


免疫荧光染色法观察不同实验组处理SH-SY5Y细胞24 h后, 胞内HIF-1 $\alpha$ 发生核转位的变化。标尺=20  $\mu$ m。

After incubating SH-SY5Y cells with 20  $\mu$ mol/L of 2ME2 and different concentrations of QA for 24 h, HIF-1 $\alpha$  nuclear translocation was observed by immunofluorescence staining. Scale bar=20  $\mu$ m.

图5 2ME2抑制QA诱导的SH-SY5Y细胞内HIF-1 $\alpha$ 核转位

Fig.5 2ME2 inhibited nuclear translocation of HIF-1 $\alpha$  in SH-SY5Y cells induced by QA

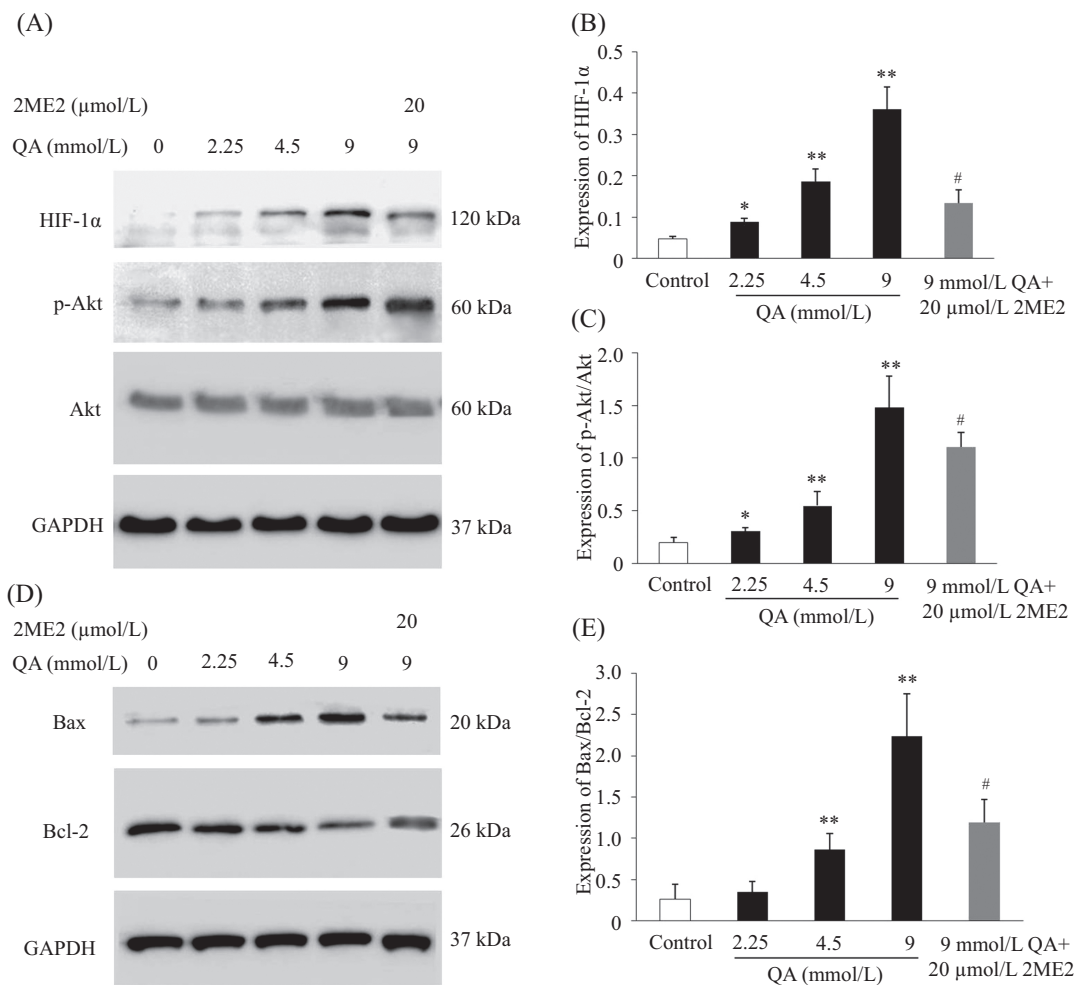


Hoechst 33342染色法观察到, SH-SY5Y细胞经QA处理24 h后出现大量细胞凋亡, 而此现象可被2ME2抑制(箭头表示凋亡阳性细胞核)。标尺=50  $\mu$ m。

After treating SH-SY5Y cells with QA for 24 h, A large number of apoptotic cells were observed by Hoechst 33342 staining, and this phenomenon could be inhibited by 2ME2. Scale bar=50  $\mu$ m.

图6 2ME2抑制QA诱导的SH-SY5Y细胞凋亡

Fig.6 2ME2 inhibited the apoptosis of SH-SY5Y cells induced by QA



A: Western blot检测不同实验组处理SH-SY5Y细胞24 h后, HIF-1 $\alpha$ 、p-Akt及Akt表达的变化; B: HIF-1 $\alpha$ 条带与内参GAPDH灰度值比值的统计学分析; C: 条带p-Akt与Akt灰度值比值的统计学分析; D: Western blot法检测不同实验组处理SH-SY5Y细胞24 h后, Bax和Bcl-2的表达变化; E: 条带Bax与Bcl-2灰度值比值的统计学分析; \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, 与对照组比较; # $P$ <0.05, 与损伤对照组(9 mmol/L QA组)比较( $n$ =5)。

A: after the incubation with 20  $\mu\text{mol/L}$  of 2ME2 and different concentrations of QA in SH-SY5Y cells for 24 h, the expressions of HIF-1 $\alpha$ , Akt and p-Akt were analyzed by Western blot; B: statistical analysis of gray value ratio of HIF-1 $\alpha$ /GAPDH; C: statistical analysis of gray value ratio of p-Akt/Akt; D: after treating SH-SY5Y cells with 20  $\mu\text{mol/L}$  of 2ME2 and different concentrations of QA for 24 h, the expressions of Bcl-2 and Bax were analyzed by Western blot; E: statistical analysis of gray value ratio of Bax/Bcl-2. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 compared with control group; # $P$ <0.05 compared with 9 mmol/L of QA group ( $n$ =5).

图7 2ME2抑制QA所诱导的SH-SY5Y细胞HIF-1 $\alpha$ 、p-Akt和Bax/Bcl-2表达上调

Fig.7 2ME2 inhibited the expressions of HIF-1 $\alpha$ , p-Akt and Bax/Bcl-2 ratio in SH-SY5Y cells induced by QA

HIF-1 $\alpha$ 表达水平逐渐升高。与正常对照组相比, QA作用6 h后其表达量显著提高, 24 h达到高峰。因此, 在24 h处用HIF-1 $\alpha$ 抑制剂2ME2作用于QA损伤的SH-SY5Y细胞, 观察其能否减轻QA所致的细胞活性受损, 从而判断HIF-1 $\alpha$ 在QA诱导SH-SY5Y细胞损伤中的作用。结果表明, 与损伤对照组相比, 2ME2可促进细胞存活, 减少细胞损伤, 减轻细胞膜的破坏, 细胞透光率增强, 胞体皱缩明显减少, 轴突变长并使细胞死亡减少, 说明抑制HIF-1 $\alpha$ 的表达对损伤细胞具有保护作用。

在谷氨酸受体介导的神经兴奋性毒性中, 神经

元的死亡途径显示了其多样性, 既有一些坏死的形态学特征, 也呈现出许多凋亡的生化特征, 且与HIF-1 $\alpha$ 介导的凋亡信号通路密切相关<sup>[14-15]</sup>。2ME2是HIF-1 $\alpha$ 的抑制剂, 可抑制HIF-1 $\alpha$ 的表达, 从而阻断HIF-1 $\alpha$ 通路的信号转导。因此, 进一步给予2ME2预处理后, 观察QA所导致的SH-SY5Y细胞内HIF-1 $\alpha$ 核转位的发生和细胞凋亡的影响。结果显示, QA诱导SH-SY5Y细胞内HIF-1 $\alpha$ 发生核转位, 从而导致大量细胞凋亡, 给予HIF-1 $\alpha$ 抑制剂2ME2后, 发现抑制HIF-1 $\alpha$ 的激活和核转移可以部分阻断兴奋性毒性所致的凋亡的发生。因此, 我们认为HIF-1 $\alpha$ 的激活促进了神

经元死亡进程的发生。

以上表明,在神经细胞损伤过程中,HIF-1 $\alpha$ 及其信号通路具有重要作用。但目前关于HIF-1 $\alpha$ 在神经细胞损伤过程中的具体调节作用颇有争议。在动物缺血性脑损伤和撞击性脑外伤模型中,脑组织HIF-1 $\alpha$ 表达上调,HIF-1 $\alpha$ 抑制剂如2-甲氧雌甾二醇具有明显的保护作用<sup>[16-17]</sup>,表明HIF-1 $\alpha$ 可能参与了神经损伤。但在神经元特异性HIF-1 $\alpha$ 基因敲除小鼠缺氧模型中,与野生型小鼠相比,神经细胞对缺氧更加敏感,损伤更为严重<sup>[18]</sup>,表明HIF-1 $\alpha$ 参与了神经细胞对损伤的适应过程。这些不一致的实验结果提示,在神经细胞损伤过程中,HIF-1 $\alpha$ 可能具有双向适应性调节作用。本实验结果显示,QA诱导HIF-1 $\alpha$ 的高表达、Akt的磷酸化及Bax/Bcl-2比值增加,提示HIF-1 $\alpha$ /Akt信号通路通过调节凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2进而引起细胞损伤。虽然,目前多数研究倾向于PI3K/Akt信号通路具有促存活、抗凋亡的功能;但也有不少研究报道,在细胞重度损伤的情况下,Akt过度磷酸化可促进细胞凋亡<sup>[9]</sup>。为了进一步验证p-Akt与细胞损伤的关系及HIF-1 $\alpha$ 是否可调节Akt,本实验使用HIF-1 $\alpha$ 的抑制剂2ME2,观察Akt磷酸化的变化。结果显示,经HIF-1 $\alpha$ 抑制剂2ME2预处理后,p-Akt在SH-SY5Y细胞中的表达明显降低,与HIF-1 $\alpha$ 表达变化呈正相关;同时,Bax的表达明显降低,Bcl-2的表达明显升高,Bax/Bcl-2比值降低。表明Akt受HIF-1 $\alpha$ 的调节,提示抑制HIF-1 $\alpha$ /Akt信号通路的激活可使Bax/Bcl-2蛋白表达比率下调,从而发挥抗凋亡作用。

综上所述,QA呈剂量性地诱导SH-SY5Y细胞HIF-1 $\alpha$ 的过度表达、Akt磷酸化以及Bax/Bcl-2表达比值增高,导致细胞出现凋亡性死亡,而给予HIF-1 $\alpha$ 抑制剂2ME2后,可抑制上述现象的发生,表明HIF-1 $\alpha$ /Akt信号通路参与了QA激活的NMDA受体介导的神经兴奋性毒性所致的神经细胞损伤。该结果提示,抑制HIF-1 $\alpha$ 及其下游分子的表达或阻断HIF-1 $\alpha$ /Akt信号通路对兴奋性毒性所致的神经细胞损伤具有保护作用。

### 参考文献 (References)

- 1 Reis HJ, Guatimosim C, Paquet M, Santos M, Ribeiro FM, Kummer A, *et al.* Neuro-transmitters in the central nervous system & their implication in learning and memory processes. *Curr Med Chem* 2009; 16(7): 796-840.
- 2 Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: Implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11(10): 682-96.
- 3 Pérez-De La Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaria A. Quinolinic acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. *Int J Tryptophan Res* 2012; 5: 1-8.
- 4 Lee JW, Bae SH, Jeong J W, Se HK, Kyu WK. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)  $\alpha$ : Its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004; 36(1): 1-12.
- 5 Liu BN, Han BX, Liu F. Neuroprotective effect of pAkt and HIF-1 $\alpha$  on ischemia rats. *Asian Pac J Trop Med* 2014; 7(3): 221-5.
- 6 Zhao L, Yang YF, Gao YB, Wang SM, Wang LF, Zuo HY, *et al.* Upregulation of HIF-1 $\alpha$  via activation of ERK and PI3K pathway mediated protective response to microwave-induced mitochondrial injury in neuron-like cells. *Mol Neurobiol* 2014; 50(3): 1024-34.
- 7 Lu DY, Liou HC, Tang CH, Fu WM. Hypoxia-induced iNOS expression in microglia is regulated by the P13-Kinase/Akt/Mtor signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1 alpha. *Biochem Pharmacol* 2006; 72(8): 992-1000.
- 8 Xie H, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *In vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)* 2010; 123(8): 1086-92.
- 9 Pan J, Chang Q, Wang X, Son Y, Zhang Z, Chen G, *et al.* Reactive oxygen species-activated Akt/ASK1/p38 signaling pathway in nickel compound-induced apoptosis in BEAS 2B cells. *Chem Res Toxicol* 2010; 23(3): 568-77.
- 10 Reveron ME, Monks TJ, Duvauchelle CL. Age-dependent (+)MDMA-mediated neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology* 2005; 26(6): 1031-40.
- 11 Saura CA, Choi SY, Beglopoulos V, Malkani S, Zhang D, Rao BS, *et al.* Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* 2004; 42(1): 23-36.
- 12 Cantuti-Castelvetri I, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Dopamine neurotoxicity: Age-dependent behavioral and histological effects. *Neurobiol Aging* 2003; 24(5): 697-706.
- 13 Gao SM, Wang L, Shi YX, Ju CX, Zhang F, Li FX. Protective effects of total epimedii flavonoids against QA-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Zhong Yao Cai* 2013; 36(12): 1978-82.
- 14 Yang X, Wang Y, Luo J, Liu S, Yang, Z. Protective effects of YC-1 against glutamate induced PC12 cell apoptosis. *Cell Mol Neurobiol* 2011; 31(2): 303-11.
- 15 Chen MH, Ren QX, Yang WF, Chen XL, Lu C, Sun J. Influences of HIF-1 $\alpha$  on Bax/Bcl-2 and VEGF expressions in rats with spinal cord injury. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(11): 2312-22.
- 16 Cheng YL, Park JS, Manzanero S, Choi Y, Baik SH, Okun E, *et al.* Evidence that collaboration between HIF-1 $\alpha$  and Notch-1 promotes neuronal cell death in ischemic stroke. *Neurobiol Dis* 2014; 62: 286-95.
- 17 Schaible EV, Windschugl J, Bobkiewicz W, Kaburov Y, Dangel L, Krämer T, *et al.* 2-Methoxyestradiol confers neuroprotection and inhibits a maladaptive HIF-1 $\alpha$  response after traumatic brain injury in mice. *J Neurochem* 2014; 129(6): 940-54.
- 18 Sheldon RA, Osredkar D, Lee CL, Jiang X, Mu D, Ferriero DM. HIF-1 alpha-deficient mice have increased brain injury after neonatal hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci* 2009; 31(5): 452-8.