

星形胶质细胞缺氧缺糖后 PKC PKA PKG CaMK II 表达的变化及对 AQP4 的影响

范秉林, 韦俊杰, 李燕华, 陈志, 韦旋, 李吕力

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:81560210); 广西自然科学基金项目(编号:2016GXNSFAA380165)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院神经内科

作者简介: 范秉林(1978-), 男, 医学硕士, 副主任医师, 研究方向: 脑血管病、神经重症和癫痫的诊治。E-mail: fbl_1180@163.com

通讯作者: 李燕华(1969-), 女, 医学博士, 主任医师, 研究方向: 脑血管病、神经重症的诊治。E-mail: lyhuaqq@163.com

[摘要] **目的** 探讨星形胶质细胞在缺氧、缺糖情况下蛋白激酶C(PKC)、蛋白激酶A(PKA)、蛋白激酶G(PKG)及钙/钙调素依赖性蛋白激酶II(CaMK II)的表达变化情况。**方法** 取2 d龄新生SD大鼠的大脑皮层进行星形胶质细胞的纯化与培养,通过缺氧、缺糖处理建立缺血细胞模型。以实验处理方式的不同分为对照组和模型组,通过RT-PCR法检测星形胶质细胞水通道蛋白4(AQP4)表达的变化,采用Western blot法检测星形胶质细胞PKC、PKA、PKG和CaMK II的表达情况。比较两组各项指标的差异。**结果** 模型组的AQP4表达水平显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组的PKC表达水平低于对照组,CaMK II表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PKA、PKG的表达水平在两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 缺氧、缺糖导致的星形胶质细胞的PKC表达水平下降及CaMK II表达水平升高,可能与星形胶质细胞水肿有关。

[关键词] 星形胶质细胞; 缺氧; 缺糖

[中图分类号] R 363 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2019)12-1276-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2019.12.05

Changes of PKC, PKA, PKG and CaMK II expressions in astrocytes after oxygen and glucose deprivation and their effects on AQP4 FAN Bing-lin, WEI Jun-jie, LI Yan-hua, et al. Department of Neurology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To explore the expression changes of protein kinase C(PKC), protein kinase A(PKA), protein kinase G(PKG) and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II(CaMK II) in cerebral astrocytes under oxygen and glucose deprivation. **Methods** The cerebral cortex of 2-day-old newborn SD rats was purified and cultured for astrocytes, and the ischemic cell model was established by oxygen and glucose deprivation. The control group and the model group were grouped according to different experimental methods. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) was used to detect the expressions of aquaporin-4(AQP4), and Western blot was used to detect the expressions of PKC, PKA, PKG and CaMK II in astrocytes. The differences in the indicators were compared between the two groups. **Results** The expression of AQP4 in the model group was significantly higher than that in the control group($P < 0.05$). The expression of PKC in the model group was significantly lower than that in the control group($P < 0.05$). The expression of CaMK II in the model group was significantly higher than that in the control group($P < 0.05$). The expressions of PKA and PKG were not significantly different between the two groups($P > 0.05$). **Conclusion** Decreased PKC expression and increased CaMK II expression in astrocytes caused by oxygen and glucose deprivation may be related to edema of astrocytes.

[Key words] Astrocytes; Oxygen deprivation; Glucose deprivation

脑水肿和脑细胞死亡是缺血性脑血管病的主要的病理过程,其中脑水肿不仅是导致脑功能障碍的

重要原因,而且还是造成颅内高压、脑疝形成的关键因素。有文献^[1]报道,水通道蛋白4(aquaporin-4,AQP4)

在脑组织水的运输和调节中起关键作用,其在星形胶质细胞中的高表达可能与脑水肿程度相关。脑缺血后,机体通过 AQP4 自身的开放促进水进入脑细胞而导致脑水肿,而 AQP4 的开关主要由磷酸化进行调控^[2]。研究^[3,4]发现,AQP4 具有多个潜在的激活位点,其中丝氨酸 111 位点及丝氨酸 180 位点是其最常见的激活位点;另外,丝氨酸 180 位点还可以激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)。PKC 的激活可降低 AQP4 的活性,下调 AQP4 的蛋白表达以减少脑水肿。丝氨酸 180 位点还是 PKC 和钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 的共同激活位点。蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG) 和蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 同样是调节 AQP4 磷酸化的重要酶。有研究^[5]在大鼠视神经少突胶质细胞中使用 PKG 抑制剂后发现 AQP4 表达减少,提示 PKG 的抑制可影响 AQP4 的活性。但是,PKA 及 PKG 在脑缺血后是否激活的相关报道较少。脑缺氧、缺糖是导致脑水肿的最常见的病因,为了进一步明确星形胶质细胞缺氧、缺糖后各种蛋白激酶的变化,本研究通过体外培养星形胶质细胞行缺氧、缺糖处理,建立脑缺血细胞模型,观察蛋白激酶的活性情况以及其与 AQP4 的关系,进而为缺血性脑水肿的早期防治提供新的思路和靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料 SD 大鼠乳鼠由广西医科大学实验动物中心提供。主要试剂:DMEM 和小牛血清均购自美国 Hyclone 公司,兔抗 PKA、CaMK II 一抗购自 Abcam 公司,兔抗 PKG、PKC 一抗购自 CST 公司,鼠抗 GAPDH 一抗购自 Santa Cruz 公司,相应的二抗购自 Santa Cruz 公司;SYBR Master Mixture 试剂盒购自日本 TAKARA 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 星形胶质细胞的培养与鉴定 取 2 d 龄新生 SD 大鼠,断头取大脑皮层组织,入冰冷的 D-hanks 液(美国 GIBCO 公司)中剥除脑膜和血管,反复轻柔吹打成细胞悬液,过滤,收集滤液,转入 70 ml 培养瓶中,培养箱中静置培养(37 °C, 5% CO₂)。用 6 ml 0.25% 胰酶液加入培养瓶,室温消化 15 min 左右即置入等量含 10% FBS 的 DMEM 培养基(完全培养基)停止消化,1 000 r/min 离心 5 min,再用 PBS 洗 2 遍后,重悬于完全培养基中,接种于培养瓶。将培养瓶置于细胞培养箱培养(37 °C, 5% CO₂) 1 d 后,再用 37 °C 恒温定轨摇床以 200 r/min 振摇 2 h;吸取上清液弃去(主要是为了排除一些小胶质细胞和部分少

突胶质细胞),贴壁细胞采用 0.25% 胰酶液室温消化后立即置入完全培养基停止消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,将沉淀细胞重悬于完全培养基,细胞计数后以 10⁶ cells/孔接种于 6 孔培养板中。培养的细胞用免疫细胞化学法检测 GFAP 相关抗原,证实为星形胶质细胞。模型组细胞于培养 1 周后进行缺氧、缺糖处理,对照组细胞不作特殊处理。本研究均使用培养第 2 代的星形胶质细胞进行实验。

1.2.2 缺血细胞模型的建立 将模型组细胞培养板置于特制的有机玻璃通气槽内,将完全培养基更换为无糖培养基(美国 GIBCO 公司),持续通入不含氧的混合气体(5% CO₂, 95% N₂)以模拟缺氧、缺糖环境,密封,将此槽置于 37 °C 温箱内,调节气流量至 5 L/min。经缺氧、缺糖处理 12 h 后转移至正常氧浓度,并更换完全培养基继续培养 2 h,模拟细胞缺血损伤的病理生理学过程。

1.2.3 RT-PCR 法检测 AQP4 的表达 采用 Trizol 试剂(上海吉凯生物公司)按说明书步骤提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 浓度合格, -80 °C 保存备用。采用 MMLV 逆转录试剂盒(上海吉凯生物公司)将总 RNA 中的 mRNA 逆转录成 cDNA;根据 Genbank 数据库和以往的研究^[6]设计合成 AQP4 和 β -actin 的引物,其中 β -actin 为内参(见表 1)。采用 SYBR Master Mixture 试剂盒,严格按照说明书进行 PCR 实验操作。每组设 6 个重复孔。运用 ABI StepOne Software v2.1 软件采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法对 RT-PCR 结果进行处理。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	方向	序列(5'~3')	扩增片段
AQP4	正向	GAGCGCGTGGGGTAAGTGT	214 bp
	反向	TCCAAGCAGAGGGAGATG	
β -actin	正向	TTCAACGGCACAGTCAAGG	114 bp
	反向	CTCAGCACCAGCATCACC	

1.2.4 Western blot 法检测目标蛋白的表达 收集细胞,去除培养液,用 PBS 清洗 2 次;用 200 μ l RIPA 细胞裂解缓冲液在冰浴条件下裂解细胞,10 min,以 10 000 r/min、4 °C 离心条件离心 10 min,取上清转移至洁净 EP 管。以 Bradford 法定量蛋白含量;以 5 μ g 蛋白量加样至 SDS 聚丙烯酰胺凝胶孔槽,电泳,确定目标蛋白的片段大小及位置后切胶,转印聚偏乙烯膜,加封闭液室温封闭 1 h,加入目标蛋白一抗,4 °C 孵育过夜,TBS 冲洗,二抗孵育 30 min,TBS 液冲洗,以化学发光法显现蛋白条带并照像。每个组设 3 个

重复孔。采用 Lab4.3 软件对条带进行密度分析,目的蛋白的半定量灰度值 = 目的条带灰度值 ÷ 内参灰度值。

1.3 统计学方法 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 AQP4 表达水平比较 RT-PCR 结果显示,对照组 AQP4 的相对表达量为(1.10 ± 0.04),模型组相对表达量为(1.44 ± 0.07),两组比较差异有统计学意义($t = 10.330, P = 0.000$)。提示细胞模型建立成功。

2.2 两组 PKA、PKC、PKG、CaMK II 表达水平比较 Western blot 检测结果显示,模型组的 PKC 表达水平低于对照组,而 CaMK II 表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PKA 和 PKG 的表达水平在两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2,图 1。

表 2 两组 PKA、PKC、PKG、CaMK II 表达水平比较

[($\bar{x} \pm s$), 半定量灰度值]

组别	PKA	PKG	PKC	CaMK II
模型组	1.53 ± 0.79	1.30 ± 0.69	0.41 ± 0.07	2.61 ± 0.39
对照组	1.28 ± 0.36	1.10 ± 0.21	1.74 ± 0.05	1.87 ± 0.14
<i>t</i>	0.499	0.480	26.779	3.093
<i>P</i>	0.644	0.656	0.000	0.037

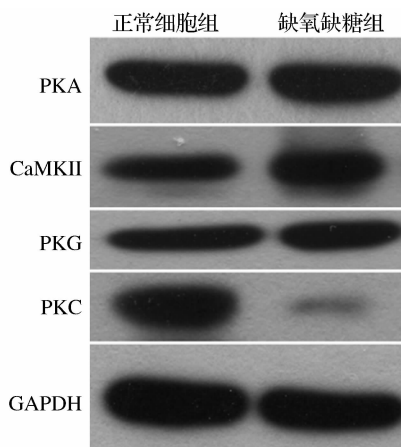


图 1 Western blot 检测结果图

3 讨论

3.1 AQP4 是脑内重要的跨膜水转运通道蛋白,在全脑细胞内均有分布,尤其集中在星形胶质细胞和神经胶质细胞^[7]。AQP4 在液体分泌、细胞迁移、新

陈代谢和维护细胞稳态等方面起重要作用^[8]。另外,AQP4 与许多大脑相关疾病的病理过程相关,包括外伤性脑损伤、脑缺血、血管源性和细胞毒性脑水肿和脑积水^[9-11]。AQP4 在细胞毒性脑水肿的形成中发挥了重要的作用,其可加速水分进入细胞,也可清除水肿细胞中的水分^[12]。已有研究^[2]表明,脑缺血后,机体通过 AQP4 的开放和关闭来控制水进出细胞,从而调节脑水肿。AQP4 的开关主要通过蛋白质磷酸化进行调控。AQP4 具有多个潜在激活位点,其中丝氨酸 111 位点及丝氨酸 180 位点是 AQP4 最常见的激活位点。丝氨酸 180 的激活与 PKC 介导的 AQP4 活性通路有关,PKC 激活可下调 AQP4 的活性,使细胞水通透性下降,降低脑水肿程度^[13]。同时,延长 PKC 激活时间也可导致 AQP4 内化^[14]。PKC 介导的 AQP4 单通道渗透性和内化可引起星形胶质细胞通透性下降,减缓脑水肿^[3,4]。有动物实验发现,CaMK II 磷酸化可以促进脑水肿发生及 AQP4 表达^[15]。也有研究^[5]发现在大鼠视神经少突胶质细胞中使用 PKG 抑制剂后 AQP4 表达减少。但是关于 PKA 及 PKG 在脑缺血后是否激活的研究报道较少。

3.2 本研究通过体外培养星形胶质细胞建立了脑缺血细胞模型,研究结果显示,星形胶质细胞经缺氧缺糖诱导后,AQP4 和 CaMK II 的表达水平显著升高,而 PKC 的表达水平显著下降;另外,PKA 和 PKG 的表达情况与未经特殊处理的对照组比较差异无统计学意义,提示 AQP4 的活性变化可能是通过丝氨酸 180 磷酸化,经 PKC 和 CaMK II 介导实现的,推测 PKC 活化可能与触发 AQP4 介导的细胞膜通透性下降有关,而 CaMK II 活化则可能增加 AQP4 介导的细胞膜通透性。PKA、PKG 在脑水肿中的作用有待进一步探讨。

综上所述,在经缺氧、缺糖处理后,星形胶质细胞的 AQP4 表达水平提高,这可能与 PKC 的表达水平下降及 CaMK II 的表达水平升高有关。这为临床对于缺血性脑水肿的防治研究提供新的依据。

参考文献

- Ikeshima-Kataoka H. Neuroimmunological implications of AQP4 in astrocytes[J]. Int J Mol Sci, 2016,17(8): E1306.
- Gunnarson E, Zelenina M, Aperia A. Regulation of brain aquaporins [J]. Neuroscience, 2004, 129(4): 947-955.
- Wei X, Zhang B, Cheng L, et al. Hydrogen sulfide induces neuroprotection against experimental stroke in rats by down-regulation of AQP4 via activating PKC[J]. Brain Res, 2015,1622:292-299.

- 4 Li H, Zhu L, Feng J, et al. Hydrogen Sulfide Decreases Blood-Brain Barrier Damage via Regulating Protein Kinase C and Tight Junction After Cardiac Arrest in Rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47 (3):994-1006.
- 5 Oku H, Morishita S, Horie T, et al. Nitric Oxide Increases the Expression of Aquaporin-4 Protein in Rat Optic Nerve Astrocytes through the Cyclic Guanosine Monophosphate/Protein Kinase G Pathway [J]. *Ophthalmic Res*, 2015, 54 (4):212-221.
- 6 Promeneur D, Lunde LK, Amiry-Moghaddam M, et al. Protective role of brainwater channel AQP4 in murine cerebral malaria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 (3):1035-1040.
- 7 Song Y, Gunnarson E. Potassium dependent regulation of astrocyte water permeability is mediated by cAMP signaling [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (4): e34936.
- 8 Mostafavi H, Khaksarian M, Joghataei MT, et al. Fluoxetine Upregulates Connexin 43 expression in astrocyte [J]. *Basic Clin Neurosci*. 2014, 5 (1):74-79.
- 9 Hsu Y, Tran M, Linninger AA. Dynamic regulation of aquaporin-4 water channels in neurological disorders [J]. *Croat Med J*, 2015, 56 (5):401-421.
- 10 Verkman AS, Anderson MO, Papadopoulos MC. Aquaporins: important but elusive drug targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13 (4):259-277.
- 11 Qi LL, Fang SH, Shi WZ, et al. CysLT2 receptor-mediated AQP4 up-regulation is involved in ischemic-like injury through activation of ERK and p38 MAPK in rat astrocytes [J]. *Life Sci*, 2011, 88 (1-2):50-56.
- 12 徐鑫森, 金勇君, 郭伟, 等. 胍丁胺对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障通透性水通道蛋白4和基质金属蛋白酶9的影响 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2015, 24 (3):204-207.
- 13 McCoy ES, Haas BR, Sontheimer H. Water permeability through aquaporin-4 is regulated by protein kinase C and becomes rate-limiting for glioma invasion [J]. *Neuroscience*, 2010, 168 (4):971-981.
- 14 Moeller HB, Fenton RA, Zeuthen T, et al. Vasopressin-dependent short-term regulation of aquaporin 4 expressed in *Xenopus* oocytes [J]. *Neuroscience*, 2009, 164 (4):1674-1684.
- 15 Zhu MX, Lu C, Xia CM, et al. Simvastatin pretreatment protects cerebrum from neuronal injury by decreasing the expressions of phospho-camkii and aqp4 in ischemic stroke rats [J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 54 (4):591-601.

[收稿日期 2019-05-09][本文编辑 余军 吕文娟]

课题研究·论著

MTHFR 基因多态性与河南中部地区汉族人群急性冠脉综合征发生的关联性研究

张云飞, 徐炳欣, 吴帆, 杨琼琼

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(编号:182102310214); 许昌市重大科技专项项目(编号:20180113031)

作者单位: 461000 河南, 河南科技大学附属许昌市中心医院心血管内科(张云飞, 吴帆, 杨琼琼), 药学部(徐炳欣); 461000 河南, 许昌市中心血管药物临床研究重点实验室(张云飞, 徐炳欣, 吴帆)

作者简介: 张云飞(1983-), 男, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 心血管疾病的诊治。E-mail: zyf3597@163.com

通讯作者: 徐炳欣(1984-), 男, 理学硕士, 主管药师, 研究方向: 分子医学与个体化给药。E-mail: xin4891@126.com

[摘要] **目的** 探讨5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因多态性与河南中部地区汉族人群急性冠脉综合征(ACS)发生的关联性。**方法** 招募河南中部地区汉族ACS患者280例作为观察组,选取同期行健康体检的河南中部地区汉族健康受试者286名作为对照组。采用荧光染色原位杂交技术检测两组MTHFR基因C677T、A1298C位点基因型,比较两组受试者各基因型及等位基因分布的差异,采用二元Logistic回归分析MTHFR基因多态性与ACS发生的关联性。**结果** 两组各基因型分布频率均符合Hardy-Weinberg平衡($P > 0.05$)。对照组MTHFR C677T位点CC、CT、TT型分布频率分别为31.82%、47.90%、20.28%,MTHFR A1298C位点AA、AC、CC型分布频率分别为73.78%、21.68%、4.54%;观察组MTHFR C677T位点CC、CT、TT型分布频率分别为16.43%、40.71%、42.86%,MTHFR A1298C位点AA、AC、CC型分布频率分别为69.29%、27.14%、3.57%。两组受试者MTHFR C677T各基因型分布频率及等位基因频率比较差异有统计学意义($P < 0.05$),而MTHFR A1298C各基因型分布频率及等位基因频率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。二元Logistic回归