

文章编号:1003-2754(2022)02-0100-04

doi:10.19845/j.cnki.zfysjbbz.2022.0023

NIM811 对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 引起小鼠 HT22 细胞 缺氧/复氧损伤的保护作用的研究

王 丹^{1,2}, 赵承军³, 陈桂生^{2,4}

摘要: 目的 探讨环孢素衍生物 NIM811 对连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)引起的小鼠海马神经元细胞(HT22)的缺氧/复氧损伤的保护作用及其机制。方法 以小鼠 HT22 培养细胞制备缺氧/复氧细胞模型,实验分组为正常对照组、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ + NIM811 组、NIM811 组。CCK-8 检测细胞生存率、流式细胞术检测细胞凋亡、JC-1 试剂检测线粒体膜电位、用钙离子指示剂 Rhod-2 AM 观察线粒体内钙离子水平、DCFH-DA 法检测细胞活性氧(ROS)水平。结果 与 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组比较,给予 NIM811 处理后:(1)细胞活性增高 38% ($P < 0.01$);(2)细胞凋亡减少 27% ($P < 0.01$);(3)线粒体膜电位上升 ($P < 0.01$);(4)线粒体内钙离子水平下降 ($P < 0.01$);(5)活性氧(ROS)水平降低 ($P < 0.01$)。结论 NIM811 对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 引起小鼠海马神经元细胞缺氧/复氧损伤有保护作用,其机制可能为 NIM811 维持线粒体动态平衡和抑制细胞凋亡有关,NIM811 对未临床治疗缺血性脑卒中具有潜力。

关键词: NIM811; 缺氧/复氧; 活性氧; 线粒体动力学; 细胞凋亡

中图分类号:R743

文献标识码:A

Protective effect of NIM811 on hypoxia/reoxygenation injury of hippocampal neurons in mice WANG Dan, ZHAO Chengjun, CHEN Guisheng. (Clinical College of Ning Xia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect and mechanism of the derivative NIM811 on hypoxia/reoxygenation injury of rat hippocampal neuron (HT22) induced by sodium disulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). **Methods** The hypoxia/reoxygenation cell model was prepared with mouse HT22 cultured cells. The experiment was divided into normal control group, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ group, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ + NIM811 group, and NIM811 group. Cell survival rate was detected by CCK-8, flow cytometry was used to detect apoptosis, mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 reagent, calcium ion level in mitochondria was observed by Rhod-2 AM, and reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA method. **Results** Compared with the $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ group, after NIM811 treatment: (1) Cell activity increased by 38% ($P < 0.01$); (2) Apoptosis decreased by 27% ($P < 0.01$); (3) Mitochondrial membrane potential increased ($P < 0.01$); (4) The level of calcium ions in the mitochondria decreased ($P < 0.01$); (5) The level of reactive oxygen species (ROS) decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** NIM811 has a protective effect on the hypoxia/reoxygenation injury of mouse hippocampal neurons caused by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. The mechanism may be related to the maintenance of mitochondrial homeostasis and inhibition of cell apoptosis. NIM811 has therapeutic potential for future clinical treatment of ischemic stroke.

Key words: NIM811; Anoxia/reoxygenation; Reactive oxygen species; Mitochondrial membrane potential; Calcium overload

脑缺血/再灌注损伤是缺血性脑卒中的重要的高级反应过程,多种机制作用下最终导致神经元等多种脑细胞凋亡、死亡^[1],它对脑组织的损伤比缺血本身造成的损害更严重^[2,3]。迄今为止,对于脑缺血/再灌注损伤仍无有效的治疗手段^[4]。甲基-4-异亮氨酸环孢菌素(NIM811)是一种新型非免疫抑制性环孢菌素衍生物,它是环孢素A的同类结构药物。前期实验表明 NIM811 具有降低谷氨酸诱导的神经损伤的治疗潜力^[5],但其在脑缺血再灌注中的研究未见报道。氧剥夺/复氧模型是一种常用的模拟体内脑缺血再灌注损伤的经典方法^[6],因此,我们建立体外 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 引起小鼠 HT22 神经元氧剥夺/复氧模型^[7],探讨 NIM811 是否对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 引起小鼠 HT22 神经元缺氧/复氧的神

经元具有保护作用,为研究治疗缺血性脑卒中和脑缺血再灌注损伤提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 HT22 小鼠海马神经元细胞由宁夏颅脑疾病重点实验室提供,二氧化碳培养箱

收稿日期:2021-10-09;修订日期:2021-11-30

基金项目:国家自然科学基金(81560209)

作者单位:(1. 宁夏医科大学临床学院,宁夏 银川 750004;2. 宁夏颅脑疾病重点实验室,宁夏 银川 750004;3. 宁夏医科大学医学科学技术研究中心,宁夏 银川 750004;4. 宁夏医科大学总医院神经内科,宁夏 银川 750004)

通讯作者:陈桂生, E-mail: chenguisheng1967@163.com; 赵承军, E-mail: 245542578@qq.com

[HF240,力新仪器(上海)有限公司];全波长酶标仪(PowerWave XS2,美国Bio-tek公司);倒置相差显微镜(07中地;CKX41,奥林巴斯);倒置荧光显微镜及图像采集(Ti-S,日本Nikon);流式细胞仪(AccuriTM C6 Flow Cytometry,美国BD公司);胎牛血清(BI,舜冉上海生物科技有限公司);CCK-8检测试剂盒(日本同仁,北京智杰方远科技有限公司); $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 粉(纯品,无锡市亚泰联合化工有限公司);NIM811(HY-P0025,MCE);Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(KGA107,江苏凯基生物技术有限公司);活性氧(ROS)检测试剂盒(S0033,上海碧云天生物技术研究所在所);线粒体膜电位检测试剂盒JC-1(C2006,上海碧云天生物技术研究所在所);Rhod-2 AM钙离子荧光试剂(ab142780,abcam)。

1.2 NIM811溶液的配制 将5 mg NIM811溶解于4.1576 ml DMSO中,配成1 mmol/L母液。再将1 mmol/L NIM811母液用DMEM培养基稀释成600 nmol/L的工作液,分装后冷冻于 -20°C 冰箱中。

1.3 细胞分组 将HT22细胞培养于含有10%胎牛血清、1%青链霉素的DMEM完全培养基中,置于 37°C ,5% CO_2 培养箱中培养,每2~3 d传代一次。细胞分组:正常对照组、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ + NIM811组、IM811组,正常对照组给予换液处理; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组给予含2 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的DMEM培养基进行缺氧1 h,然后更换为DMEM完全培养基继续培养24 h进行复氧; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ + NIM811组提前给予600 nmol/L NIM811预处理2 h,然后换为含有2 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 和600 nmol/L NIM811的DMEM培养基进行缺氧1 h后,最后给予含有600 nmol/L NIM811的DMEM完全培养基进行复氧24 h;NIM811组在培养24 h后,给予含有600 nmol/L NIM811的DMEM完全培养基继续培养24 h。

1.4 细胞活性检测 按前面分组,以 5×10^3 /孔的细胞密度接种96孔板,每组设6个复孔。在细胞培养24 h后,空白对照组给予换液处理,各实验组按1.3述方法进行处理。在实验结束前3 h,每孔加入10 μl CCK-8试剂,置于培养箱中培养3 h,用多功能酶标仪检测OD值计算细胞存活率。

1.5 细胞凋亡的检测 按前面分组以 1.5×10^5 /ml的细胞密度接种到6孔板,每组设3个复孔,每孔2.5 ml DMEM完全培养液,按照1.3的方法处理细胞后用胰酶消化、离心并收集细胞。进行V-FITC/PI染色,室温下避光孵育15 min后,置于冰浴,于1 h内在流式细胞仪上检测。

1.6 线粒体膜电位的检测 按前面分组以 1×10^5 /ml的细胞密度接种到6孔板,每组设3个复孔,每孔2.5 ml DMEM完全培养液,按照1.3的方法处理细

胞后用胰酶消化、离心并收集细胞。按照说明书进行JC-1染色,最后加入1 ml JC-1染色缓冲液($1 \times$)重悬细胞,置于冰浴,于1 h内在流式细胞仪上检测。

1.7 细胞内活性氧(ROS)检测 按前面分组以 2×10^5 /ml细胞密度接种在6孔板中,每组设3个复孔,每孔2.5 ml DMEM完全培养基,混匀,转移到 37°C 培养箱中,按照1.3处理各组细胞。待实验结束后,按DCFH-DA说明书进行染色,孵育结束后,置于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.8 线粒体内钙离子浓度的检测(Rhod-2) 以 2×10^5 /ml细胞密度接种在6孔板中,每组设3个复孔,每孔2.5 ml DMEM完全培养基,混匀,转移到 37°C 培养箱中,按照1.3处理各组细胞。待实验结束后,按照说明书进行Rhod-2 AM染色,孵育结束后,置于荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.9 统计学分析 采用SPSS进行统计学处理。数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较用LSD检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NIM811对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 引起的HT22细胞缺氧/复氧损伤后细胞活性的影响 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组的细胞活性下降约46%($P < 0.01$),在给予NIM811处理后,细胞活性有明显增高38%($P < 0.01$)(见图1)。

2.2 NIM811对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 引起的HT22细胞缺氧/复氧损伤后细胞凋亡率的影响 右上角为中晚期凋亡的细胞,右下角为早期凋亡的细胞,可以通过计算早期和中晚期细胞凋亡的总数来计算细胞凋亡率。在对照组中,仍存在部分细胞凋亡,与对照组相比2 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组的细胞凋亡率明显增高43%($P < 0.01$);给予NIM811处理细胞后,细胞凋亡率明显减少27%($P < 0.01$)(见图2)。

2.3 NIM811对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 引起的HT22细胞缺氧/复氧损伤后线粒体膜电位的影响 JC-1在正常细胞中,产生红色荧光;在细胞凋亡时,产生绿色荧光。图中右上角代表红色荧光所占百分比,右下角代表绿色荧光所占百分比,计算各组红色荧光/绿色荧光的比值来比较各组膜电位的变化。结果显示,与对照组相比, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组细胞凋亡明显增多,而给予NIM811处理后,红色荧光明显增多,凋亡减少,与 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组比较,差异有统计学意义(见图3)。

2.4 NIM811对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 引起的HT22细胞缺氧/复氧损伤后活性氧的影响 利用荧光探针DCFH-DA进行活性氧检测。对照组中,有个别细胞荧光增强,说明在正常状态下有部分细胞活性氧水平较高; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组细胞荧光强度明显增强,说明细胞给予缺氧/复氧损伤后细胞活性氧水平明显增高; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ +

NIM811 组中有个别细胞荧光增强,说明细胞经缺氧/复氧损伤并给予 NIM811 干预后,细胞活性氧水平明显好转,而 NIM811 组细胞荧光不明显;给予 NIM811 处理后,Na₂S₂O₄ + NIM811 组细胞荧光强度较 Na₂S₂O₄ 组降低($P < 0.01$),差异有统计学意义,说明 NIM811 可以降低细胞的活性氧水平(见图 4)。

2.5 NIM811 对 Na₂S₂O₄ 引起的 HT22 细胞缺氧/复氧损伤后钙离子浓度的影响 Rhod-2AM 染色后观察各组细胞的钙离子荧光强度。结果显示,对照组有部分细胞荧光略强,与对照组比较,Na₂S₂O₄ 组线粒体钙离子荧光强度增高,说明经 Na₂S₂O₄ 损伤后,细胞内钙离子水平增高。在给予 NIM811 干预后,Na₂S₂O₄ + NIM811 组细胞钙离子荧光强度比 Na₂S₂O₄ 组低($P < 0.01$),差异有统计学意义,说明 NIM811 可以降低因 Na₂S₂O₄ 损伤引起的钙超载水平(见图 5)。

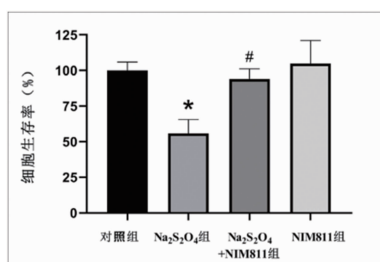


图1 NIM811 对 Na₂S₂O₄ 引起的 HT22 细胞损伤后细胞活性的影响

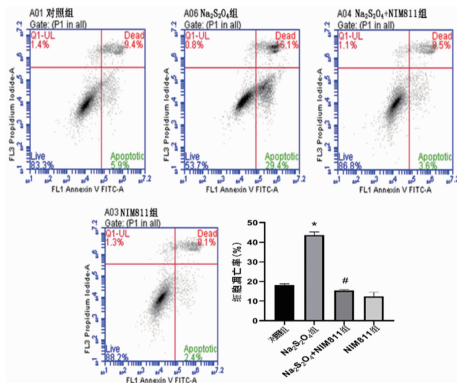


图2 NIM811 对 Na₂S₂O₄ 引起的 HT22 细胞凋亡率的影响

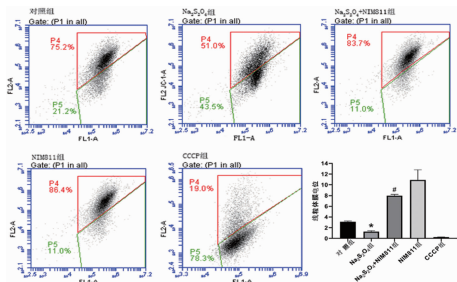


图3 NIM811 对 Na₂S₂O₄ 引起的 HT22 细胞损伤后线粒体膜电位的影响

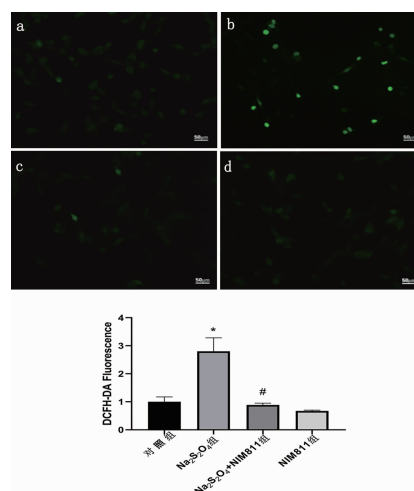


图4 NIM811 对 Na₂S₂O₄ 引起的 HT22 细胞损伤后活性氧的影响

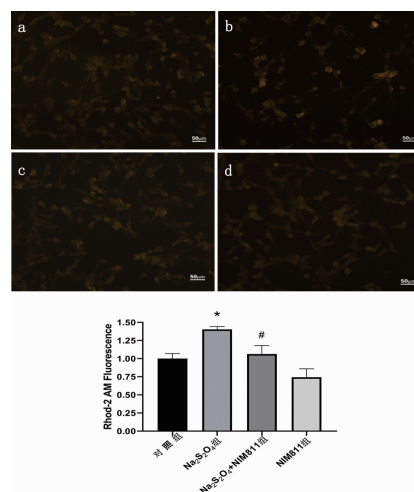


图5 NIM811 对 Na₂S₂O₄ 引起的 HT22 细胞损伤后钙离子水平的影响

3 讨论

目前已有研究证实 NIM811 可以减轻脑缺血后神经损伤^[8]。NIM811 是否可以改善脑缺血再灌注损伤还没有明确定论。本研究发现在给予 NIM811 处理前,Na₂S₂O₄ 引起的 HT22 细胞缺氧/复氧损伤后细胞活性下降约 46% ($P < 0.01$);给予 NIM811 处理后,细胞活性增高 38% ($P < 0.01$),说明 NIM811 对 Na₂S₂O₄ 引起的 HT22 细胞缺氧/复氧损伤后细胞活性有保护作用。即 NIM811 不仅可以减轻脑缺血后神经损伤。并且 NIM811 没有环孢素 A 的免疫抑制作用和毒性作用,其优点是能透过血脑屏障^[9]。

研究表明脑缺血再灌注损伤是一系列因素相互影响的结果,主要与钙离子的负荷、线粒体结构破坏与功能障碍、氧自由基理论、细胞凋亡、炎症等有关^[10~13]。在脑组织缺血期,以细胞坏死为主要表现形式,而在脑缺血再灌注过程中以细胞凋亡为

主^[14~16]。研究表明,线粒体对细胞调亡的调控发挥重要的作用^[17,18],主要是由于线粒体膜上的线粒体膜通透转换孔(MPTP)的开放,释放炎性介质及氧自由基,诱导细胞调亡的发生。同时,线粒体缺氧后还会产生过量的活性氧(ROS),并导致钙离子内流,使得线粒体膜电位去极化^[19]。这些事件的发生最终会进一步诱发细胞调亡,从而加重脑组织损伤。目前认为,脑缺血再灌注损伤后,细胞内钙超载可以破坏线粒体的结构与功能^[20,21]。本研究观察到,在Na₂S₂O₄引起的HT22细胞缺氧/复氧损伤后的细胞调亡率明显增高43%($P < 0.01$),说明在Na₂S₂O₄引起的HT22细胞缺氧/复氧时存在细胞调亡的现象;给予NIM811处理细胞后,细胞调亡率明显减少27%($P < 0.01$),说明NIM811可以改善因Na₂S₂O₄引起的HT22细胞缺氧/复氧损伤后的细胞调亡,尤其是抑制细胞早期调亡。同时本实验观察在Na₂S₂O₄引起的HT22细胞缺氧/复氧时引起线粒体膜电位变化,活性氧增多,钙超载现象。给予NIM811处理后,观察到NIM811减轻了Na₂S₂O₄引起的HT22细胞缺氧/复氧损伤后引起线粒体膜电位超极化,抑制活性氧增多,减少钙超载。证明NIM811可以提高Na₂S₂O₄引起HT22细胞缺氧/复氧损伤后细胞活性,推测在脑缺血再灌注时,NIM811可能与线粒体通透性转换孔上的亲环蛋白D结合,阻断线粒体通透性转换孔MTPT的开放,保护受损的线粒体,抑制细胞调亡,从而减轻神经元的损伤。即对再灌注后神经损伤也有保护作用。

综上所述,NIM811对于HT22细胞缺氧/复氧损伤后维护线粒体动力学平衡和抑制细胞调亡有重要的意义,这对未来研究治疗缺血性脑卒中和脑缺血再灌注损伤的药物时,NIM811作为一种候选药物提供了实验室依据。

[参考文献]

- [1] Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, et al. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke[J]. *Neurol Sci*, 2017, 38(7): 1167-1186.
- [2] Hokari M, Kuroda S, Iwasaki Y. Pretreatment with the cyclosporin derivative NIM811 reduces delayed neuronal death in the hippocampus after transient forebrain ischaemia[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62(4): 485-490.
- [3] Zheng YQ, Yao MJ, Liu JX, et al. Effect and mechanism of huatuo zaizao extractum on focal cerebral ischemia/reperfusion-induced blood-brain barrier injury in rats[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2013, 38(4): 585.
- [4] Reis C, Wilkinson M, Reis H, et al. A look into stem cell therapy: exploring the options for treatment of ischemic stroke[J]. *Stem Cells International*, 2017, 1-14.
- [5] 元琪, 陈桂生. 环孢素A对谷氨酸诱导的小鼠海马神经元损伤的保护作用及其机制[J]. *宁夏医科大学学报*, 2019, 41(8): 763-766.
- [6] Ma Y, Zhao P, Zhu JQ, et al. Naioxintong protects primary neurons from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation induced injury through PI3K-Akt signaling pathway[J]. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine Ecam*, 2016, 11: 5815946.
- [7] 王丹, 田春艳, 陈桂生, 等. 连二亚硫酸钠 HT22 细胞缺氧复氧模型的制备[J]. *宁夏医科大学学报*, 2020, 42(10): 983-985
- [8] Pain T, Yang XM, Critz SD, et al. Opening of mitochondrial (ATP) channel triggers the preconditioned state by generating free radicals[J]. *Circ Res*, 2000, 87(6): 460-466.
- [9] Li PA, Uchino H, Elmér E, et al. Amelioration by cyclosporin A of brain damage following 5 or 10 min of ischemia in rats subjected to preischemic hyperglycemia[J]. *Brain Res*, 1997, 753(1): 133-140.
- [10] Zhang N, Wang S, Li Y, et al. A selective inhibitor of Drp1, mdivi-1, acts against cerebral ischemia/reperfusion injury via an anti-apoptotic pathway in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2013, 535(2): 104-109.
- [11] Zhao L, Li S, Wang S, et al. The effect of mitochondrial calcium uniporter on mitochondrial fission in hippocampus cells ischemia/reperfusion injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 461(3): 537-542.
- [12] Sirko S, Behrendt G, Johansson PA, et al. Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(4): 25 426-439.
- [13] Wesibord SD, Mor MK, Sevic MA, et al. Associations of depressive symptoms and pain with dialysis adherence, health resource utilization, and mortality in patients receiving chronic hemodialysis[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2014, 9(9): 1594-1602.
- [14] Adhami F, Liao G, Morozov YM, et al. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy[J]. *The American Journal of Pathology*, 2006, 169(2): 566-583.
- [15] Gustaf Sson AB, Goieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart[J]. *Am J Physiol Gen Physiol*, 2007, 292(1): C45-51.
- [16] De Pablo Y, Nilsson M, Pekna M, et al. Intermediate filaments are important for astrocyte response to oxidative stress induced by oxygen-glucose deprivation and reperfusion[J]. *Histochem Cell Biol*, 2013, 140(1): 81-91.
- [17] Brouns R, Deyn PPD. The complexity of neurobiological lprocesses in acute ischemic stroke[J]. *Clin Neurol Neurosur*, 2009, 111(6): 483-495.
- [18] 张腾, 魏鹤翔, 张永, 等. 经线粒体途径相关信号通路对成骨细胞的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(8): 1226-1230.
- [19] Eisner DA, Caldwell, Kistamfis K, et al. Calcium and excitation-contraction coupling in the heart[J]. *Cir Res*, 2017, 121(2): 181-195.
- [20] Qu YZ, Zhao YL, Li M, et al. Protective effect of astragaloside IV on blood-brain barrier and expression of occluding protein after cerebral ischemia and reperfusion[J]. *Stroke and Nervous Diseases*, 2010, 17(2): 292-296.
- [21] Pain T, Yang XM, Critz SD, et al. Opening of mitochondrial (ATP) channel triggers the preconditioned state by generating free radicals[J]. *Circ Res*, 2000, 87(6): 460-466.