

## LPA2 在 PC12 细胞缺血再灌注损伤致细胞凋亡中的作用\*

陈志洪, 蔡雪平, 周小梅

(广东省人民医院南海医院检验中心, 广东佛山 528200)

**摘要:**目的 探讨溶血磷脂酸(LPA)2受体在PC12细胞缺血再灌注损伤致细胞凋亡中的作用。方法 以实验方法完成研究,通过建立PC12细胞缺血再灌注受损细胞模型,分别于缺氧环境中培养0、3、6、9、12、15 h以进行糖氧剥夺,之后再将其放入高糖培养基中再次复氧培养24 h,然后利用MTT来检测细胞存活率,并对其进行分组,分为正常组、缺血再灌注组(A组)、缺血再灌注+溶剂对照组(B组)、缺血再灌注+LPA2激动剂组(C组)、缺血再灌注+LPA2抑制剂组(D组)。先进行缺氧培养一定时间后再复氧培养24 h,并采用MTT检测细胞存活率,同时,检测LPA2受体与P-akt蛋白的表达情况。结果 经糖氧剥夺培养6 h后,缺血再灌注的细胞存活率较正常组明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且缺血再灌注损伤糖氧剥脱处理最适时间为12 h。A组LPA2表达水平明显低于B组;C组与B组相比较,LPA2表达水平显著增高,且P-akt表达水平显著增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 LPA2受体在PC12细胞缺血再灌注损伤致细胞凋亡中起着重要的保护作用,且升高LPA2受体表达水平有助于提高细胞生存率。

**关键词:**溶血磷脂酸2受体; 缺血再灌注; 细胞凋亡; PC12细胞

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.13.008

**中图法分类号:**R446.1,R743.3

**文章编号:**1673-4130(2019)13-1566-04

**文献标识码:**A

## Role of LPA2 in apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury in PC12 cells\*

CHEN Zhihong, CAI Xueping, ZHOU Xiaomei

(Laboratory Center, Nanhai Hospital of Guangdong People's Hospital, Foshan, Guangdong 528200, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role of LPA2 receptor in apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury in PC12 cells. **Methods** This study was completed by experimental method. PC12 cells were cultured in hypoxic environment for 0, 3, 6, 9, 12 and 15 hours to deprive of oxygen and glucose respectively. Then they were re-cultured in high-sugar medium for 24 hours. Then MTT was used to detect the cell survival rate and divided into normal group, ischemia reperfusion group (group A), ischemia reperfusion+solvent control group (group B), ischemia reperfusion+LPA2 agonist group (group C), ischemia reperfusion+LPA2 inhibitor group (group D). The cells were cultured under hypoxia for a certain period of time and then reoxygenated for 24 hours. MTT was used to detect the cell survival rate. Meanwhile, the expression of LPA2 receptor and P-akt protein was detected. **Results** After 6 hours of glucose and oxygen deprivation culture, the survival rate in ischemia-reperfusion cells decreased significantly than in the normal group ( $P < 0.05$ ), and the optimal time of glucose and oxygen stripping treatment for ischemia-reperfusion injury was 12 hours. The expression level of LPA2 in group A was significantly lower than that in group B. Compared with group B, the expression level of LPA2 in group C was significantly higher, and the expression level of P-akt was significantly higher ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** LPA2 receptor plays an important role in protecting PC12 cells from apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury, and increasing the expression level of LPA2 receptor is helpful to improve the survival rate of PC12 cells.

**Key words:** LPA2 receptor; ischemia-reperfusion; apoptosis; PC12 cells

\* 基金项目:广东省医学科研基金项目(A2016413)。

作者简介:陈志洪,男,检验技师,主要从事分子生物学检验研究。

本文引用格式:陈志洪,蔡雪平,周小梅. LPA2在PC12细胞缺血再灌注损伤致细胞凋亡中的作用[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(13):

近年来,脑血管疾病成为威胁人类健康的主要疾病,其中较为常见的脑血管疾病为脑卒中,是致患者死亡和残疾的主要因素,给社会和家庭带来极大压力和负担<sup>[1]</sup>。缺血性脑卒中主要是由于患者出现血栓或栓塞致大脑相关动脉闭塞,已知的原因有兴奋性毒性、细胞稳态丧失及血脑屏障破坏等,可能导致患者神经元死亡<sup>[2]</sup>。利用细胞分子学对缺血性脑卒中患者发病过程进行研究可较直观地反映患处缺血、缺氧环境下各种因素对患者神经元的影响。溶血磷脂酸(LPA)是一种结构最为简单的甘油磷脂酸酯,主要来源于被激活的血小板,神经系统是LAP受体表达的主要部位,且人体大脑中LAP处较高浓度状态<sup>[3]</sup>。相关研究发现,人类发生脑卒中后,其脑组织中LAP等浓度将显著升高,且升高LAP可致患者脑组织损伤加重<sup>[4]</sup>。PI3K/Akt途径可通过阻断人体细胞凋亡来有效保护人体细胞受损。PC12细胞主要来源于人体神经嵴,可分泌儿茶酚胺类递质<sup>[5]</sup>。本研究主要探讨LPA2在PC12细胞缺血再灌注损伤致细胞凋亡中的作用,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** PC12细胞购自武汉大学基础医学院。所需仪器:低温离心机(美国 Thermo 公司, FRESCO17)、干湿恒温器(杭州奥盛仪器有限公司, MK2000-1)、电子天平(上海越平科学仪器有限公司)、-80℃及-20℃低温冰箱(青岛海尔股份有限公司)、三气及普通培养箱(长沙华曦电子科技有限公司)、酶标仪(Penn Elmer)、磁力搅拌器(常州国华电气有限公司)、成像系统(日本 Nikon DS-U3)等。

**1.2 方法** 配置剥脱液,6.25 mL 1.0 mol/L Tris-氯化氢(pH=6.8)+73 mL 蒸馏水+20 mL 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)+10%β-巯基乙醇,1.0 mol/L 的浓缩胶缓冲液(pH=6.8)。称取 12.11 g Tris 碱溶于 80 mL 蒸馏水中,然后采用 10.0 mol/L HCL 溶液将 pH 调至 6.8,然后再定容至 100 mL、1.5 mol/L 分离胶缓冲液(pH=8.8),称取 18.17 g Tris 碱溶于 80 mL 蒸馏水中,然后采用 10.0 mol/L HCL 溶液将 pH 调至 8.8,然后再定容至 100 mL、10×电转缓冲液、10%四甲基乙二胺,30.30 g Tris-base+144 g 甘氨酸加蒸馏水定容至 1 000 mL,电转时现配成 1×电转液中 200 mL 甲醇。10×电泳缓冲液,30.20 g Tris 碱+144 g 甘氨酸+10 g SDS,然后加蒸馏水,于 60℃水浴锅中加热溶解,定容至 1 000 mL,电泳时再现配。10%AP,1 g+蒸馏水溶解后定容至 10 mL、10×TBST,24.20 Tris 碱+80 g 氯化钠,然后加蒸馏水定容至 1 000 mL,最后再稀释配制成 1×TBST,最后再

加入总体积 0.1%的 Tween-20、H2L5186303,5 mg H2L5196303 粉末+20 μL 二甲基亚砜(美国 Amresco 公司)配制成 25 mg/mL H2L5186303,然后再从混合液中取出 10 mL,并加入 990 μL 生理盐水及氢氧化钠、10×PBS 缓冲液,1.20 g 磷酸二氢钠+14.40 g 磷酸氢二钠+40 g 氯化钠+1 g 氯化钾,加 400 mL 蒸馏水,搅拌后溶解,再调至 pH=7.4,定容至 500 mL 等。向高糖培养基中加入 10%胎牛血清(杭州四季青公司)和 1%双抗以制作 DMEM 高糖培养基;其中 DMEM 无糖培养基则不做处理。

首先,从液氮容器中将冻存时间<3个月的冻存管取出,然后立即将其放置于 37℃温水中,并摇动以使其融化;待其融化后将其取出并放置于超净工作台上将盖子打开,吸出 PC12 细胞悬液并放置于离心管中,然后再加入适量高糖培养基,封口。以转速 500 r/min 进行离心处理,时间为 10 min。之后采用吸管将上清液吸取弃掉,并再次加入高糖培养基,并轻轻吹打成悬液,再利用计数板进行计数,将其接种于培养皿,然后放置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。待 24 h 后对细胞形态进行观察,如细胞贴壁且呈长梭状、突起明显则说明细胞复苏良好,并再次更换培养液以继续培养。

PC12 细胞传代:工作前 30 min 将紫外灯打开消毒,培养基和 PBS 缓冲液等放置于温度为 37℃的水浴中预热 30 min;当 PC12 细胞密度在 70%~80%时可进行传代,并采用 PBS 缓冲液清洗 1 次细胞,然后再次加入适量消化液,待肉眼可见白雾状且显微镜下可见细胞间隙变大则可吸出消化液。加入适量高糖培养基,轻轻吹打以使其脱壁,并将其制作成细胞悬液,然后将其沿着盖玻片边缘滴于细胞计数板内。显微镜下观察提示 PC12 细胞状态较好,且密度为 70%~80%时可开始细胞冻存。

通过建立 PC12 细胞缺血再灌注受损细胞模型,分别于缺氧环境中培养 0、3、6、9、12、15 h 以进行糖氧剥夺,之后再将其放入至高糖培养基中再次复氧培养 24 h,然后利用 MTT 来检测细胞存活率,并对其进行分组,分为正常组、缺血再灌注组(A组)、缺血再灌注+溶剂对照组(B组)、缺血再灌注+LPA2 激动剂组(C组)、缺血再灌注+LPA2 抑制剂组(D组)。先进行缺氧培养一定时间后再复氧培养 24 h,并采用 MTT(美国 Amresco 公司)检测细胞存活率,同时采用 BCA 法检测 LPA2 受体与 P-akt 蛋白的表达情况。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS22.0 软件进行统计学处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验,计数资料以率(%)表示,采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统

计学意义。

## 2 结 果

**2.1 PC12 细胞缺氧存活率** 缺氧 0、3、6、9、12、15 h 时的细胞存活率分布为 100.0%、94.1%、81.2%、55.2%、49.2%、42.1%。随着缺氧时间的增加,PC12 细胞存活率呈下降趋势,且缺氧后再复氧进行培养,结果显示细胞存活率显著下降( $P < 0.05$ )。

**2.2 各组细胞 P-akt 与 LPA2 受体表达情况** A 组 LPA2 表达水平明显低于 B 组;C 组与 B 组相比较,LPA2 表达水平显著增高,且 P-akt 表达水平显著增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 1、2。

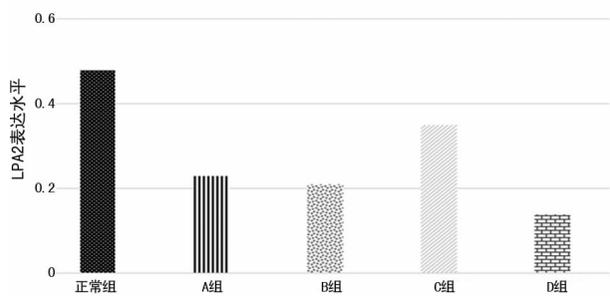


图 1 各组 LPA2 表达水平比较

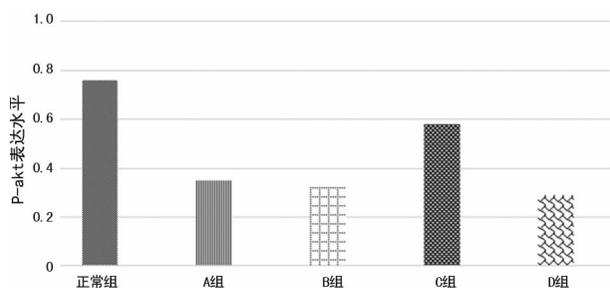


图 2 各组 P-akt 表达水平比较

**2.3 各组细胞存活率比较** 正常组、A 组、B 组、C 组、D 组细胞存活率依次为 100.0%、48.6%、44.1%、69.8%、43.1%。经糖氧剥夺后,细胞存活率明显下降,然加入激动剂后,细胞存活率明显提高( $P < 0.05$ )。

## 3 讨 论

缺血性脑卒中是一种发病率较高的脑血管疾病,具有较高病死率和致残率,给人类生存质量造成极大影响<sup>[6-7]</sup>。在缺血性脑卒中患者发病早期阶段,患者局部脑缺血将形成中心坏死区和周围缺血半暗带区,其中坏死区域中神经元将会逐渐死亡,而半暗带区因存在侧支循环而有大量神经元存活<sup>[8]</sup>。因此,如可在短时间内恢复患者半暗带区血流供应,此时患者神经元仍可恢复功能;然而对于中心区域坏死区,即便恢复血供也会发生再灌注损伤,从而导致患者脑损伤,所以针对坏死区域已无法再挽救,只能进行有效保护,加强神经营养等。所以,缺血性脑卒中患者早期

治疗的目的是促进患者缺血半暗带区域神经元功能的恢复。

LPA 是一种类似生长因子的磷脂,广泛存在于中枢神经系统中,如脑膜、胚胎大脑及血管等,其以极低水平出现于人体脑脊液中,且在人体血液成分中表达显著,以血清清蛋白结合形式存在。LPA 主要来源于被激活的血小板,但某些内皮细胞和炎症细胞也可产生 LPA。神经系统是 LPA 受体表达的主要部位,且人体大脑中 LPA 以较高水平存在,LPA 与 LPA2 信号传递也会参与神经损伤反应。在脑梗死发病早期阶段,缺血脑组织部位 LPA 水平相对较高,LPA 参与到神经损伤过程中<sup>[9]</sup>。有研究发现,LPA2 具有抗凋亡的作用<sup>[10-11]</sup>。本研究通过对 PC12 细胞实施糖氧剥夺后再继续培养以模拟人体内糖氧剥夺现象,结果显示,当缺氧 6 h 后,细胞存活率明显下降,12 h 时的存活率为 49.2%,且此时细胞形态结构开始出现破坏,随着缺氧时间的延长,细胞形态结构破坏程度明显增加,甚至开始出现破裂等现象。通过研究发现,采用缺氧 12 h 时的细胞来模拟缺血半暗带区具有一定价值,也是拯救细胞存活的关键<sup>[12-13]</sup>。本文对缺氧 12 h 的 PC12 细胞再次进行分组研究,结果显示经糖氧剥夺后,LPA2 受体表达与 B 组无明显差异,由此可排除溶剂的影响。经使用激动剂后,LPA2 受体表达明显增加,但 D 组较 B 组 LPA2 受体表达明显下降,说明经实施糖氧剥夺后,LPA2 受体表达出现下降,且细胞存活率下降,但采用激动剂则可提高 LPA2 受体表达,同时增加细胞存活率<sup>[13-14]</sup>。

## 4 结 论

提高 LPA2 受体表达水平有利于避免细胞凋亡,对细胞起到一定保护作用,所以,利用溶栓早期治疗缺血性脑卒中具有较好的效果。随着 LPA2 受体的深入研究和应用,有望缺血性脑卒中患者神经功能恢复得到新的突破。

## 参考文献

- [1] 马琳娜,张晨丽,任志恒,等. 溶血磷脂酸受体 2 调控胃癌细胞 SGC-7901 侵袭迁移以及增殖凋亡[J]. 科学技术与工程,2018,18(19):26-32.
- [2] 田小军,郝洁,苏洲,等. 脉血康胶囊联合丁苯酞治疗老年缺血性脑卒中的疗效及对血清 BDNF, Hcy, LPA, Fg 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(9):1257-1260.
- [3] 杨洋,刘思凡,邓晓东,等. 新型溶血磷脂酸 2 受体激动剂的设计、合成及初步抗辐射活性评价[J]. 国际药学研究杂志,2017,44(9):878-883.
- [4] 谷艳霞,王超,陈钜涛,等. LPA2 对 PC(下转第 1573 页)

- [J]. Can Respir J, 2007, 14(Suppl B): 5B-32B.
- [2] TOLEDO-PONS N, COSÍO B G, VELASCO M D, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in Non-Smokers [J]. Arch Bronconeumol, 2017, 53(2): 45-46.
- [3] ZHAO Y L, LI F, LIU Y W, et al. Adiponectin attenuates endoplasmic reticulum stress and alveolar epithelial apoptosis in COPD rats [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(21): 4999-5007.
- [4] YUAN T, ZHANG L, ZHI-BIAO H E, et al. The mechanism of AMPK regulate endoplasmic reticulum stress to resist the epithelial cell apoptosis in COPD rats [J]. Prog Mod Biomed, 2017, (17)23: 4401-4405.
- [5] CHEN L, YUAN X, ZOU L, et al. Effects of 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 on the prevention of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in rats exposed to air pollutant particles less than 2.5 micrometers in diameter (PM2.5) [J]. Med Sci Monit, 2018, 24(2): 356-362.
- [6] KHAN T N, WONG E B, SONI C, et al. Prolonged apoptotic cell accumulation in germinal centers of mer-deficient mice causes elevated B cell and CD4<sup>+</sup> Th cell responses leading to autoantibody production [J]. J Immunol, 2013, 190(4): 1433-1446.
- [7] 唐红梅, 赵丽娜, 贾长虹, 等. TAM 受体及其信号通路在免疫调节中作用的研究进展 [J]. 山东医药, 2016, 56(44): 105-107.
- [8] MARCOA R, RODRIGUES D M, DIAS M, et al. Classification of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) according to the new global initiative for chronic obstructive lung disease (Gold) 2017: comparison with gold 2011 [J]. COPD, 2018, 15(1): 21-26.
- [9] CHAN K Y, LI X, CHEN W, et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in China in 1990 and 2010 [J]. J Glob Health, 2017, 7(2): 020704.
- [10] MIRAVITLLES M, ALVAREZ-GUTIERREZ F J, CALLE M, et al. Algorithm for identification of asthma-COPD overlap: consensus between the spanish COPD and asthma guidelines [J]. Eur Respir J, 2017, 49(5): 1700068.
- [11] 周燕娟, 许姣, 庄志方. COPD 稳定期血清抗组织抗体与 BODE 指数及相关因素的关系 [J]. 新医学, 2017, 48(11): 808-811.
- [12] 唐红梅, 贾长虹, 李巍伟, 等. Axl 和 Mer 受体调控小鼠红细胞分化 [J]. 基础医学与临床, 2015, 35(12): 1628-1632.
- [13] 宋璟, 孙志佳. 培土生金法对慢性阻塞性肺疾病大鼠膈肌细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(3): 342-346.
- [14] 薛丹, 刘学军, 杜毓锋, 等. PM2.5 激活内质网应激诱导肺组织细胞凋亡对慢性阻塞性肺疾病大鼠的影响 [J]. 国际呼吸杂志, 2016, 36(12): 907-914.
- [15] 陈晓明, 张伟兵, 田晓彦, 等. 盐酸氨溴索对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织细胞凋亡和血清炎症因子的影响 [J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(3): 526-531.
- [16] 刘磊. 系统性红斑狼疮患者血清蛋白 S 与生长抑制特异性蛋白 6 水平变化及与疾病活动度的相关性研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2015, 14(24): 2052-2054.
- [17] 杨云娇, 张奉春. 原发性干燥综合征患者 IgG 亚类特点及临床特征相关性分析 [J]. 中华风湿病学杂志, 2013, 17(8): 533-536.
- [18] 吴俊, BJORN D, 马玉良, 等. 血浆可溶性受体酪氨酸激酶 Mer 和 Tyro3 与急性冠脉综合征的相关性研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(12): 1126-1130.

(收稿日期: 2019-01-08 修回日期: 2019-03-16)

(上接第 1568 页)

- 12 细胞缺血再灌注损伤致细胞凋亡的作用 [J]. 卒中与神经疾病, 2017, 24(3): 177-180.
- [5] 文贵斌. 丹参多酚酸盐治疗对缺血性脑卒中患者外周血 Bcl-2、BAX、Caspase-3 分子表达的影响及其与神经功能的相关性 [J]. 海南医学院学报, 2017, 23(9): 1279-1282.
- [6] 周琪, 张玉敏, 顾全, 等. 脂蛋白 a、N-末端脑钠肽前体和白细胞计数联合检测在脑卒中诊断中的应用价值 [J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(3): 267-270.
- [7] 张志丽, 张煦. 组织芯片检测溶血磷脂酸受体 2 蛋白在胃癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 湖北民族学院学报 (医学版), 2017, 34(1): 16-19.
- [8] 李艳琴, 张玉敏, 霍丽静, 等. 脂蛋白 a、同型半胱氨酸和胱抑素 C 联合检测在脑卒中诊断和预后判断中的应用价值 [J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(22): 3252-3254.
- [9] 沈珺, 吴丹红, 黄菲菲, 等. 急性脑卒中患者血清溶血磷脂酸和同型半胱氨酸水平变化及其与预后的关系 [J]. 疑难病杂志, 2016, 15(10): 1016-1019.
- [10] 吕燕妮, 钱贻崧, 付龙生, 等. 固有免疫信号分子 hsa-miR-146b 调控脑卒中关联信号分子的生物信息学分析与实验研究 [J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(2): 172-178.
- [11] 方建, 陈文武. 进展性缺血性脑卒中患者血清细胞黏附分子-1 和血管细胞黏附分子-1 水平变化及依达拉奉对其的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(21): 6246-6247.
- [12] 吕燕妮, 钱贻崧, 付龙生. 基于生物信息学方法预测 hsa-miR-181a 在脑卒中发病中的分子调控网络 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(8): 1042-1047.
- [13] 吕燕妮, 钱贻崧, 付龙生, 等. 固有免疫信号分子 hsa-miR-181a 调节脑卒中作用的生物信息学分析 [J]. 现代免疫学, 2015, 35(3): 214-219.
- [14] 李航. 血浆 LP-PLA2、GMP、LPA 及血小板活化指标与短暂性脑缺血发作的关系 [J]. 海南医学院学报, 2015, 21(8): 1134-1136.

(收稿日期: 2019-01-10 修回日期: 2019-03-18)