

· 论 著 ·

15-脱氧前列腺素 J<sub>2</sub> 在大鼠缺氧性神经细胞损伤中的作用\*裴丽春<sup>1</sup>, 张一娜<sup>1</sup>, 张震环<sup>1</sup>, 刘美玲<sup>1</sup>, 韩晶<sup>1</sup>, 张艳桥<sup>2△</sup>

(哈尔滨医科大学:1. 附属第二临床医学院老年病科, 哈尔滨 150081;

2. 附属第三临床医学院内八科, 哈尔滨 150081)

**摘要:**目的 观察环氧合酶-2 的代谢产物 15-脱氧前列腺素 J<sub>2</sub>(15d-PGJ<sub>2</sub>)在原代培养的大鼠皮质神经细胞损伤中的作用。方法 原代培养大鼠皮质神经细胞,随机分为未处理组、缺氧再复氧组、不同浓度 15d-PGJ<sub>2</sub> 处理的缺氧再复氧组。用噻唑蓝(MTT)比色法测定神经细胞生存率,用 DNA 凝胶电泳法检测神经细胞凋亡情况。结果 15d-PGJ<sub>2</sub> 具有剂量依赖性保护神经细胞免于缺氧导致的死亡的作用,15d-PGJ<sub>2</sub> 在 10 μmmol/L 以上保护神经细胞,与未处理组比较差异有统计学意义(P<0.01);15d-PGJ<sub>2</sub> 预处理组皮质神经细胞凋亡的 DNA 所出现的梯形裂解条带比单纯缺氧再复氧组明显减轻。结论 环氧合酶-2 代谢产物 15d-PGJ<sub>2</sub> 参与了神经细胞死亡、凋亡的病理过程,减轻缺氧再复氧后神经细胞的损伤。

**关键词:**大鼠;缺氧损伤;原代神经元细胞;15 脱氧前列腺素 J<sub>2</sub>**中图分类号:**Q426;R338**文献标识码:**A**文章编号:**1671-8348(2010)14-1829-03

**Role of 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> in injury induced by hypoxia/reoxygenation in cultured rat cortical neurons\***

PEI Li-chun<sup>1</sup>, ZHANG Yi-na<sup>1</sup>, ZHANG Zhen-huan<sup>1</sup>, et al.

(1. Geriatrics of the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University;2. The Eighth Internal

Medical Department, the Third Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Heilongjiang 150081, China)

**Abstract: Objective** To observe the role of 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J<sub>2</sub>(15d-PGJ<sub>2</sub>) in injury induced by hypoxia/reoxygenation in cultured rat cortical neurons. **Methods** Primary rat cortical neuron cells were cultured. Experiments include control group, hypoxia/reoxygenation group, hypoxia/reoxygenation with different dose of 15d-PGJ<sub>2</sub>(1,5,10,25,50) μmmol/L group. Cell viability was surveyed by MTT assay. Apoptosis were measured by DNA agarose electrophoresis. **Results** 15d-PGJ<sub>2</sub> dose-dependently protected neuronal cell from death induced by hypoxia *in vitro* (P<0.01). Agarose electrophoresis of the extracted DNA showed that hypoxia induced obvious DNA fragmentation, a hallmark of apoptosis, compared the group of pre-treated with 15d-PGJ<sub>2</sub>. **Conclusion** 15d-PGJ<sub>2</sub> is involved in the pathogenesis of neuron death induced by hypoxia/reoxygenation.

**Key words:** rats; hypoxia; primary neurons; 15-Deoxy-delta12,14-prostaglandin J<sub>2</sub>

脑卒中是许多发达国家致死和致残的主要原因。在中国,脑血管疾病是第 3 位致死因素,其中缺血性脑梗死占 56.6%~80%,致残率占第 1 位。在以前的研究中发现环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)参与了缺氧性神经细胞损伤死亡的病理过程<sup>[1]</sup>,过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(PPAR-γ)参与了缺氧缺血后神经细胞损伤死亡的病理过程<sup>[2]</sup>。环氧合酶-2 的代谢产物 15-脱氧前列腺素 J<sub>2</sub>(15d-PGJ<sub>2</sub>)是 PPAR-γ 的天然配体<sup>[3]</sup>,本实验通过使用缺氧再复氧装置,处理原代培养的大鼠皮质神经细胞,旨在探讨 15d-PGJ<sub>2</sub> 在大鼠缺氧神经细胞损伤中的作用。

**1 材料与方****1.1 材料**

**1.1.1 实验动物及分组** 使用的原代培养的大鼠皮质神经细胞来自于新生 24 h 以内的 Sprague-Dawle 大鼠的乳鼠,所有实验动物均由哈尔滨医科大学附属第二临床医学院动物中心提供。实验分别设对照组(未处理组)、缺氧再复氧组、不同浓度 15d-PGJ<sub>2</sub> 处理的缺氧再复氧组。

**1.1.2 试剂** Neurobasal A、B<sub>27</sub> 购自 Life Technologies Inc (Rockville, MD), 15d-PGJ<sub>2</sub> 购自 Cayman Chemical Company。

**1.2 实验方法**

**1.2.1 大鼠皮质神经细胞的原代培养** 无菌条件下取出生 24 h 内的乳鼠放入 75% 的乙醇中消毒 1~2 min 后,用眼科剪刀迅速剪下鼠头部,用冰 D-Hank's 液冲洗,剪开颅腔,取出全脑,剥离皮层,仔细去除血管和脑膜。用手术剪刀将组织剪碎至 1~3 mm 大小。加入 3~5 倍体积的 0.25% 胰酶溶液,37℃ 水浴消化 30 min,加入 10% DMEM 培养液终止消化,800 r/min 离心 5 min,弃上清液。加入 10% DMEM 培养液,用吸管轻轻吹打成细胞悬液,静止后吸取上清液过 200 目不锈钢筛网。用 10% DMEM 培养液调细胞数为 5×10<sup>6</sup>/mL,接种至直径为 35 mm 培养皿中,每个培养皿 2 mL。37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养。24 h 后换维持含 Neurobasal A、B<sub>27</sub> 的培养液,以后每 3 天半量换液。接种 3 d 时加入终浓度为 5~10 μmol/L 的阿糖胞苷以抑制胶质细胞的生长。此方法培养的大鼠皮质神经细胞经鉴定证实 95% 为神经元。

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670728);黑龙江省科技计划-国际科技合作资助项目(WB06c03);黑龙江省卫生厅科研课题资助项目(2007-296);哈尔滨医科大学附属第二临床医学院青年基金资助项目(QN2007-11)。△ 通讯作者,E-mail:yanqiaozhang@163.com。

**1.2.2 神经细胞缺氧再复氧模型制备及分组** 取培养第 12 天的皮质神经细胞,随机分成 3 组,即空白对照组(未处理组)、二甲亚砜(DMSO)对照组、15d-PGJ<sub>2</sub>+缺氧再复氧组(缺氧前 30 min 分别加入 0、1、5、10、25、50  $\mu\text{mol/L}$  15d-PGJ<sub>2</sub>),然后置于缺氧罐(95% N<sub>2</sub>,5% CO<sub>2</sub>)内,37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育 2 h 后,将神经细胞返回到 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中再复氧 21 h。

**1.2.3 MTT 比色法测定神经细胞生存情况** 取培养第 12 天,生长在 96 孔培养皿中的原代培养的神经细胞,不同分组处理后,将 125 mg/mL 的噻唑蓝(MTT)40  $\mu\text{L}$  加入到每个孔中,37  $^{\circ}\text{C}$  避光培养 4 h 后,每孔中加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,振荡 10 min,置于酶标仪 492 nm 检测吸光度 A 值,结果以对照组生存率的百分比表示。

**1.2.4 DNA 凝胶电泳法检测神经细胞凋亡情况** 培养第 12 天,生长在 100 mm 培养皿中的原代培养的神经细胞,经不同分组处理后,细胞用预冷的磷酸盐缓冲液洗涤 1 次,置于含有 10 mmol/L Tris-盐酸(pH=7.4),10 mmol/L EDTA 及 0.5% TritonX-100 裂解液中裂解,超速离心,使用碘化钠及乙醇在上清液中沉淀 DNA,提取出的 DNA 在含 1%~2% 溴乙啶的 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳,DNA 被溴乙啶着色,最后在紫外线灯下摄影,观察凋亡的 DNA 在琼脂糖凝胶电泳中所出现的梯形裂解条带情况。

**1.3 统计学方法** 所有影像用 Scion Image 软件量化处理,统计学分析使用 Statview 软件的单因素方差分析(One-way ANOVA),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 神经细胞的原代培养** 培养的皮质神经细胞接种 1 h 内开始贴壁,绝大多数是单个分散的细胞。3~5 h 细胞开始变平,并且长出突起。3 d 后细胞胞体清晰明亮、丰满、呈现锥体或星形;经细胞突起生长并形成网络。培养 1 周后,神经细胞胞体进一步增大,突起增粗并出现分支,此时神经细胞已接近成熟,成熟神经细胞边界清楚,在倒置显微镜下可见明显晕光(图 1)。培养 2 周后,神经细胞网络连接紧密,形态更加饱满,可以应用于实验研究(图 2)。

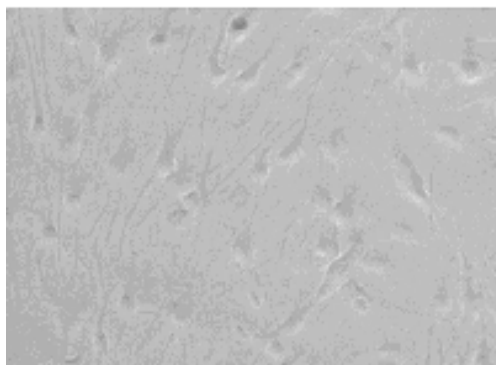


图 1 皮质神经元细胞(培养 1 周,  $\times 100$ )

**2.2 神经细胞特性鉴定** 应用抗神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体对原代培养 10 d 的神经细胞进行免疫 FRTIC 标记荧光实验,每个样本随机选择 3 个视野,分别计数 200 个细胞,判定原代培养神经细胞中神经元细胞和神经胶质细胞所占的比率。NSE 抗体在培养的皮质神经细胞中的表达情况(图

3),其中在荧光显微镜下观察呈现红色荧光的即为 NSE 阳性细胞,即神经元细胞。结果为培养的皮质细胞中 NSE 阳性细胞(即神经元细胞)占细胞总数的 98.9%,提示原代培养的神经细胞中所含的神经元细胞数量完全能满足实验的需要。

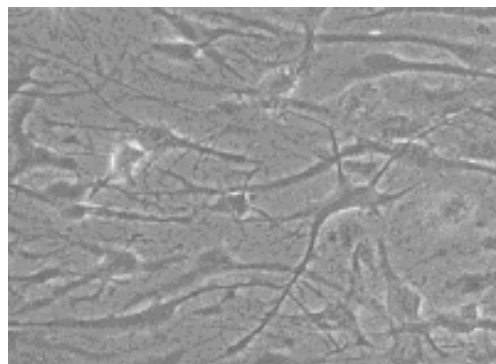


图 2 皮质神经元细胞(培养 2 周,  $\times 100$ )

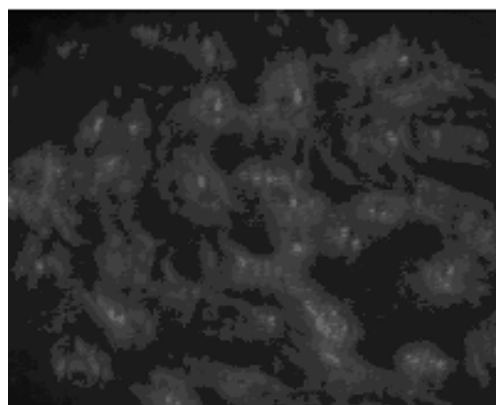
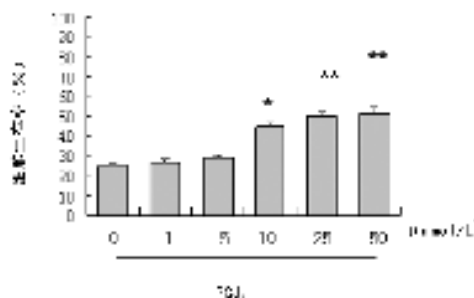


图 3 NSE 抗体在神经细胞中表达( $\times 100$ )

**2.3 15d-PGJ<sub>2</sub> 对神经细胞生存率影响的剂量反应曲线** 培养第 12 天的皮质神经细胞,给予不同浓度 15d-PGJ<sub>2</sub> 处理 30 min,给予缺氧 2 h 再复氧 21 h 处理,使用 MTT 测定法测定神经细胞生存率。结果可见,外源性 15d-PGJ<sub>2</sub> 在 1~5  $\mu\text{mol/L}$  (低剂量)没有明显的保护神经细胞的作用,而 10  $\mu\text{mol/L}$  (高剂量)以上则具有剂量依赖性保护神经细胞的作用,神经细胞生存率的上升情况在 15d-PGJ<sub>2</sub> 处理组与未处理组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )(图 4)。

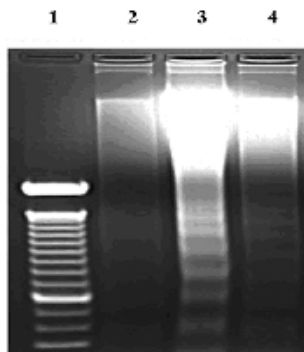


MTT 测定法测定神经细胞的生存率,与对照组(未处理组)相比,\*: $P < 0.05$ ,\*\*: $P < 0.01$ , $n=3$ 。

图 4 外源性 15d-PGJ<sub>2</sub> 对神经细胞生存率影响的剂量反应曲线

**2.4 15d-PGJ<sub>2</sub> 对神经细胞损伤作用研究结果** 给予培养第 12 天的原代皮质神经细胞缺氧 2 h 再复氧 21 h 处理,以及

15d-PGJ2 预处理 30 min,再予以缺氧 2 h 再复氧 21 h 处理,用 DNA 凝胶电泳法检测 DNA 核小体间断裂情况。结果显示,缺氧再复氧处理组皮质神经细胞出现典型的 DNA 梯形裂解条带,而 15d-PGJ2 预处理组皮质神经细胞 DNA 的断裂情况明显减轻(图 5)。



1:分子量标准;2:对照组(未处理组);3:缺氧再给氧组;4:15d-PGJ2 预处理+缺氧再给氧组。

图 5 DNA 凝胶电泳法检测神经细胞凋亡情况

### 3 讨 论

脑血管疾病特别是缺血性卒中占长期致残疾病的第 1 位,严重威胁人类健康。对缺血性神经细胞损伤的研究,一直以来是学术界研究的热点。本研究在体外原代培养大鼠神经细胞中使用缺氧再复氧模型,模拟体内缺血再灌注损伤,并应用 15d-PGJ2 进行干预。实验结果表明,15d-PGJ2 在高剂量时具有剂量依赖性的保护神经细胞的作用,且 15d-PGJ2 预处理组皮质神经细胞 DNA 的断裂情况明显减轻。提示 15d-PGJ2 对神经细胞缺血性损伤起保护作用。

目前发现环氧合酶(cyclooxygenase, COX)有 2 种亚型:COX-1 和 COX-2。COX-2 是花生四烯酸代谢中的关键限速酶,将花生四烯酸转变为前列腺素  $H_2$  (PGH<sub>2</sub>)<sup>[4-5]</sup>,随后在不同酶的作用下分别生成 PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub> 和 TXA<sub>2</sub> 等。15d-PGJ2 是由前列腺素 D2 (PGD<sub>2</sub>) 在体内迅速通过脱水产生的具有生物活性的 J2 类的前列腺素。有资料表明 15d-PGJ2 对脑缺血具有保护作用<sup>[6]</sup>。15d-PGJ2 能明显减少细胞凋亡,减少由于脑出血引起的炎症、行为障碍、神经元的丢失,促进过氧化氢酶的表达<sup>[7]</sup>。15d-PGJ2 保护脑组织免于缺血再灌注损伤<sup>[8]</sup>。15d-PGJ2 对脊髓损伤起保护作用<sup>[9]</sup>。血清 15d-PGJ2 浓度的升高使近期与远期的神经功能缺损相对轻于浓度低者,且梗死面积相对较小,15d-PGJ2 对卒中患者起保护作用<sup>[1]</sup>。本实验在体外建立的神经细胞缺氧再复氧模型上验证了 15d-PGJ2 具有剂量依赖性保护神经细胞免于缺氧导致的死亡的作用,而且能减轻神经细胞凋亡。因此,推断 15d-PGJ2 参与了神经细胞死亡的病理过程。

但有关 15d-PGJ2 是通过何种机制达到保护神经细胞的作用机制迄今仍不清楚,有实验表明,15d-PGJ2 能与 PPAR- $\gamma$  结合而影响着许多基因的转录而作用细胞周期<sup>[11]</sup>。但也有实验表明 15d-PGJ2 可能通过非 PPAR- $\gamma$  途径对卒中起保护作用<sup>[12]</sup>。另有实验表明 15d-PGJ2 可能通过阻止小神经胶质细胞活化和炎性细胞因子的表达起到神经保护作用<sup>[13]</sup>。对 15d-PGJ2 是通过何种机制达到保护神经细胞的相关研究有待进一步深入。

### 参考文献:

- [1] 张艳桥,陈仁武,徐长庆,等.环加氧酶-2 在大鼠原代皮质神经细胞缺氧损伤中的作用[J].中国病理生理杂志,2004,20(12):2280.
- [2] 张艳桥,张一娜,吴江,等.过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  在缺氧缺血性神经细胞死亡中的作用[J].中华医学杂志,2005,85(10):684.
- [3] Ricote M, Li AC, Willson TM, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation[J]. Nature, 1998, 391(6662):79.
- [4] 向银洲,魏莲枝.环氧合酶-2 及其抑制剂与头颈肿瘤研究进展[J].重庆医学,2007,36(4):350.
- [5] 张祖列,闵苏.环氧化酶-2 特异性抑制剂在心血管疾病中的应用及研究进展[J].重庆医学,2005,34(11):1742.
- [6] Ou Z, Zhao X, Labiche LA, et al. Neuronal expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and 15d-prostaglandin J2-mediated protection of brain after experimental cerebral ischemia in rat[J]. Brain Res, 2006, 1096(1):196.
- [7] Zhao X, Zhang Y, Strong R, et al. 15d-Prostaglandin J2 activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, promotes expression of catalase, and reduces inflammation, behavioral dysfunction, and neuronal loss after intracerebral hemorrhage in rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(6):811.
- [8] Lin TN, Cheung WM, Wu JS, et al. 15d-prostaglandin J2 protects brain from ischemia-reperfusion injury[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(3):481.
- [9] Kerr BJ, Girolami EI, Ghasemlou N, et al. The protective effects of 15-deoxy-delta-(12,14)-prostaglandin J2 in spinal cord injury[J]. Glia, 2008, 56(4):436.
- [10] Blanco M, Moro MA, Dávalos A, et al. Increased plasma levels of 15-deoxyDelta prostaglandin J2 are associated with good outcome in acute atherothrombotic ischemic stroke[J]. Stroke, 2005, 36(6):1189.
- [11] Kondo M. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2: the endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(11):7367.
- [12] Pereira MP, Hurtado O, Cárdenas A, et al. Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 cause potent neuroprotection after experimental stroke through non-completely overlapping mechanisms[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(2):218.
- [13] Kapadia R, Yi JH, Vemuganti R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists[J]. Front Biosci, 2008, 13:1813.