

· 论 著 ·

P2X7 受体在 OPCs 缺氧缺血性损伤中作用的初步研究*

王丽雁¹, 蔡文琴^{2△}, 陈鹏慧²

(第三军医大学:1. 新桥医院儿科, 重庆 400037; 2. 基础部神经生物学教研室, 重庆 400038)

摘要:目的 了解 P2X7 受体在离体培养的少突胶质前体细胞(OPCs)缺氧缺血性损伤中的作用。方法 建立离体 OPCs 培养模型,通过乳酸脱氢酶(LDH)释放百分比评估细胞死亡;Western blot 分析缺氧缺血前后 OPCs P2X7 受体表达变化。结果 (1) 缺氧缺血(OGD)后 2 h,近 40% OPCs 死亡。OGD 前预先给予 P2X7 受体拮抗剂 BBG 起到部分保护作用;OGD 条件下, P2X7 受体激动剂 BzATP 加重 OPCs 缺氧缺血性损伤,并且这种增强的毒性作用不能被 BBG 拮抗。(2) Western blot 显示,OGD 后 2 h, P2X7 受体蛋白表达迅速下调。结论 P2X7 受体可能参与了 OPCs 缺氧缺血性损伤过程。

关键词: P2X7 受体; 缺氧缺血; 少突胶质前体细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.018

中图分类号: R714.21; R338

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)21-2895-03

Preliminary study on role of P2X7 receptor in hypoxic-ischemic damage to oligodendrocyte precursor cells*

WANG Li-yan¹, CAI Wen-qin^{2△}, CHEN Peng-hui²

(1. Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, China;

2. Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the role of P2X7 receptor in hypoxic-ischemic damage to oligodendrocyte precursor cells (OPCs) in vitro. **Methods** To cultivate, retrieve and purify oligodendrocyte progenitor cells(OPCs) from neonatal rats. LDH released in the culture was used to assess the cell death quantitatively; Western blot was used to measure the change of P2X7 receptor expression. **Results** (1) LDH release assays showed that 2 h oxygen-glucose deprivation(OGD) exposure killed near 40% of the cells by 2 h. P2X7 receptor antagonist, BBG applied before OGD partially protected OPCs from OGD-induced cell death. Furthermore, P2X7R agonist BzATP exacerbated OGD induced OPCs injury, and the enhancement in toxicity could not be prevented by BBG. (2) Immunoblots revealed that P2X7R protein was significantly decreased in OPCs cultures compared with controls at 2 h after OGD. **Conclusion** P2X7R involves in the process of hypoxic-ischemic white matter injury.

Key words: P2X7 receptor; hypoxia-ischemia; oligodendrocyte precursor cells

脑白质损害是早产儿脑损伤的主要形式,胎龄越小,发病概率越高。其病理改变包括脑室周围白质软化(periventricular leukomalacia, PVL)和弥散性脑室周围白质损伤(periventricular white matter injury, PWMI)。后者发生率为前者的 10 倍,以髓鞘减少或髓鞘形成延迟为主要病理特征。近年研究表明,少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)损伤是 PWMI 形成的主要原因和中心环节。OPCs 是中枢神经系统中一类干细胞或干细胞样细胞,具有不断增殖,并分化为少突胶质细胞、星形胶质细胞和神经元的特性。未成熟脑白质中对缺氧缺血高度敏感的 OPCs 的大量死亡以及分化发育障碍是 PWMI 形成的关键。迄今为止,对 OPCs 缺氧缺血性脑损伤机制所知有限,可能与谷氨酸兴奋毒性、炎症介质、氧化应激、细胞内 Ca²⁺ 超载等多种因素有关。然而针对这些机制的干预措施并未转化为临床有效的治疗成果^[1]。

ATP 是一种重要的神经递质,通过激活嘌呤能受体 P2X 和 P2Y 发挥多种作用。P2X7 受体(P2X7R)是嘌呤能受体 P2X 家族中非常独特的一个亚类,为双功能受体,低浓度激动

剂短暂刺激可引起非选择性内向阳离子流;较高浓度激动剂长时间或反复应用可形成质膜孔道(pore-forming),能通透相对分子质量达 900 D 的分子和离子。现有的研究表明,P2X7R 可能处于神经胶质信号过程中相当上游的调节位点,通过调节递质释放、炎症反应、细胞凋亡和增殖,在胶质变性及随后的修复过程中起重要作用。Wang 等^[2]报道选择性 P2X7 拮抗剂(oxATP)能抑制大鼠急性脊髓损伤后 OPCs 凋亡;另一种选择性 P2X7 拮抗剂(BBG)能减轻 EAE 模型的脱髓鞘病变^[3],提示 P2X7R 在少突胶质系细胞损伤过程中可能具有重要作用。

鉴于 P2X7R 在神经细胞具有广泛多样的效应,对病理状态下多个信号通路具有关键的调节作用,作者推测 P2X7R 可能也参与了 OPCs 缺氧缺血性脑损伤过程。为初步探讨 P2X7R 在 OPCs 缺氧缺血性损伤中的作用,作者建立了高纯度 OPCs 离体培养及 OPCs 缺氧缺血(oxygen-glucose deprivation, OGD)模型,观察 P2X7R 激动剂(BzATP)、拮抗剂(BBG)对 OPCs 缺氧缺血性损伤的干预作用,以及 OGD 后 P2X7R 表达的变化,初步探讨其在 OPCs 损伤中的作用。

表 1 正常对照组和 OGD 各组 LDH 释放百分比($n=5, \bar{x} \pm s$)

指标	对照组	OGD 组	BBG+OGD 组	BzATP+OGD 组	BBG+BzATP+OGD 组
LDH 释放百分比(%)	5.1±0.2**	38.6±4.5	21.6±3.8*	65.7±8.3**	51.6±10.9

与 OGD 组比较, * : $P<0.05$, ** : $P<0.01$ 。

1 材料与与方法

1.1 材料 生后 1~3 d 的 SD 大鼠, 体质量为 7~10 g(雌雄不拘), 由本校实验动物中心提供。兔抗大鼠多克隆抗体 P2X7R、 β -actin(Chemicon), HRP 标记的羊抗兔二抗、DAB 显色试剂盒(中国北京中杉公司), LDH 试剂盒(南京建成)等。

1.2 实验方法

1.2.1 OPCs 的离体培养和纯化 采用原代混合胶质培养, 利用振荡法和差速贴壁法分离纯化 OPCs, 再用无血清化学条件培养基培养^[4]。

1.2.2 OPCs OGD 模型制备 OPCs 分离纯化培养 2~3 d 后随机分为 OGD 组和对照组。OGD 组: 以无糖培养液洗涤细胞 2 次, 换为无糖培养基孵育, 置于 37 °C 恒温通入 95% N₂、25% CO₂ 气体的自制缺氧仓中, 连续通气 2 h, 之后换为正常培养基, 培养 2 h 后, 进行相应检测。对照组正常培养, 不经过 OGD 处理。

1.2.3 乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)释放百分比

1.2.3.1 将 OPCs 接种于 6 孔板, 培养 2 d 后, 按照加入药物的不同, 随机分为 5 组: (1) 对照组加入 DMEM/F12 培养液; (2) OGD 组; (3) BBG(100 nM)+OGD 组; (4) BzATP(100 μ M)+OGD 组; (5) BBG(100 nM)+BzATP(100 μ M)+OGD 组。

1.2.3.2 用 DMEM/F12 培养液漂洗 3 次, 每次 5 min。

1.2.3.3 按照分组分别加入含 BzATP 或 BBG 培养液, 第 (3)、(5) 组予 BBG 预孵育 10 min, 再进行下一步操作。

1.2.3.4 向培养板中剩余细胞加入蒸馏水, 孵育 1 h, 待细胞溶解, 取上清液待测。

1.2.3.5 按照 LDH 测量试剂盒说明书操作, 测量培养基中 LDH 含量及细胞溶解释放的 LDH 量, 计算 LDH 释放百分比。公式: (培养基 LDH 含量/培养基 LDH 含量+细胞溶解 LDH 释放量)×100。

1.2.4 Western blot 检测 用组织细胞裂解液提取细胞总蛋白, 考马斯亮蓝 R250 染色法测总蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳, 转至 PVDF 膜, 室温 5% 脱脂奶粉封闭, 以 β -actin 为内参, 分别加入兔抗大鼠 P2X7R(1:1 000) 和兔抗大鼠 β -actin(1:500) 抗体, 4 °C 孵育过夜, 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000), 室温振荡孵育 1 h, DAB 显色。在凝胶成像分析系统中扫描成像并测量特异性条带积分光密度。分别将同次电泳所得的 P2X7R 和 β -actin 条带灰度值相比, 得到相对光密度。

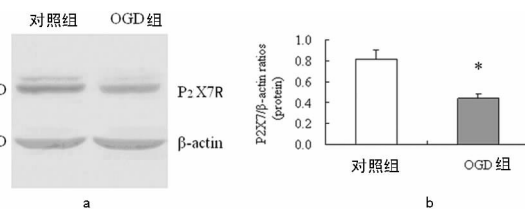
1.3 统计学方法 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。所有数据用 SPSS11.0 统计软件分析处理。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OGD 造成 OPCs 死亡 OPCs 对缺氧缺血敏感, BBG 可以部分阻滞此效应。为评估 P2X7R 在 OPCs 损伤中的作用,

作者进行细胞毒性测定。以 LDH 释放百分比作为细胞损伤的指标。如表 1 所示, OGD 组 LDH 释放百分比为 38.6%, 提示近 40% 的 OPCs 在缺氧缺糖后 2 h 死亡。缺氧缺糖前 10 min 给予 BBG 使得 LDH 释放百分比下降到 21.6%, 与 OGD 组比较差异有统计学意义($P<0.05$), 但未达到对照组水平。此外, OGD 条件下, BzATP 刺激使得 LDH 释放百分比 OGD 组明显上升, 差异有统计学意义($P<0.01$), 并且不能被 BBG 拮抗。结果显示, OPCs 对缺氧缺血十分敏感; P2X7R 特异性浓度的 BBG 对 OPCs 缺氧缺血性损伤具有部分保护效应。

2.2 OGD 后 OPCs P2X7R 表达下调 为确定受体表达变化, 在 OGD 后 2 h, 通过 Western blot 检测对照组及 OGD 组 P2X7R 蛋白表达情况, 结果显示, OGD 组 P2X7R 蛋白表达水平较对照组明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见图 1。



a: 各组 P2X7R 蛋白表达情况, β -actin 为内参; b: 定量分析结果, 以直方图表示, * : 与对照组比较, $P<0.05$ 。

图 1 离体培养 OPCs P2X7R 蛋白表达

3 讨论

本实验证明, OPCs 对 OGD 诱导的死亡高度易损, OGD 后 2 h, 近 40% 的细胞死亡。BzATP 是目前所知最有效的 P2X7R 激动剂, 激动强度比天然 P2X7R 激动剂(ATP)高 10~30 倍; BBG 为 P2X7R 非竞争性拮抗剂, 在 nM 浓度选择性拮抗 P2X7R(EC50: 10~15 nM), 达到 μ M 浓度时才能阻断其他 P2X 受体^[5]。予 100 nM BBG 预处理对 OGD 损伤具有部分保护效应, 提示 P2X7R 参与 OPCs 缺氧缺血性损伤。这一结果与 James 和 Butt^[6] 及 Matute 等^[3] 的实验结果一致, 他们发现 P2X7R 长期活化对离体培养和视神经中分离的成熟少突胶质细胞是致死性的。对于少突胶质系细胞缺氧缺血性损伤机制, 目前广泛接受的是谷氨酸兴奋毒性、自由基及炎症介质损害等^[7]。谷氨酸受体介导的少突胶质细胞毒性是由膜去极化以及 Ca²⁺ 离子内流引起的细胞内 Ca²⁺ 超载所致。P2X7R 对 Ca²⁺ 高度通透^[8]。由此推测, P2X7R 活化造成的 Ca²⁺ 内流可能是细胞内钙离子的重要来源。此外, 研究已证实, P2X7R 在脊髓介导谷氨酸释放并刺激海马 γ -氨基丁酸(GABA)和谷氨酸外流, 促使星形胶质细胞释放谷氨酸^[9], 那么, P2X7R 也可能通过诱导细胞外谷氨酸失衡启动兴奋毒性。本实验已观察到 BzATP 刺激使得 OPCs 细胞死亡, 并可以被小剂量 BBG 拮抗。加上近来研究证明的 P2X7R 在炎症、机械性损伤、缺血再灌注损伤和应激等病理条件下, 通过调节细胞内 Ca²⁺ 浓度, 白介素-1 β 合成释放和 caspases 活化参与神经退行性过程^[10], 提

示 P2X7R 可能通过多种机制参与 OPCs 缺氧缺血性损伤。

本研究的另一个发现是 BzATP 增强 OPCs 对 OGD 诱导毒性的易损性,并且此效应不能被 BBG 阻滞。提示 BzATP 也可以通过除 P2X7R 外的其他受体介导细胞毒性效应。总之,本研究中采用低浓度 BBG 对 OPCs 缺氧缺血性损伤具有部分保护效应,但未能减轻 BzATP 对 OGD 诱导 OPCs 损害的增强作用,提示 P2X7R 参与 OPCs 缺氧缺血性损伤,与此同时,还有其他受体机制参与。

本研究,第一次证明在 OGD 后早期,P2X7R 蛋白水平迅速下调。受体下调的机制不清,一个可能性是缘于表达 P2X7R 的 OPCs 大量死亡。从实验结果来看,缺氧缺血后 2 h,近 40% 的 OPCs 死亡,其比例与受体蛋白水平下降程度相符。另一方面,存活 OPCs 的 P2X7R 表达情况是否发生变化尚不清楚。P2 受体同其他离子型受体一样,通过网格蛋白(clathrin)和动力蛋白(dynamin)依赖的内化机制内化,并在细胞膜和细胞内成分之间循环。本实验仅仅从蛋白水平证明受体表达下调,而未能说明受体在细胞分布的变化,细胞膜表达是否相应下调? 在外界刺激条件下,也存在受体表达总体水平下调,而通过调节内化率等机制反而使细胞表面的受体表达及密度上调的可能性。正如新近的文献所报道的缺氧缺血通过增加受体插入或减少内化促进 P2X7R 整合入 HEK293 细胞膜^[11]。

另一方面,缺氧缺血条件下受体的功能特性是否发生改变,也是需要进一步探讨的问题。有研究显示,P2X7R 活化除与 ATP 浓度有关外,受体在细胞膜的表达、与激动剂的亲和力及活化效应还受胞外离子浓度、共激活剂或启动刺激的影响。在巨噬细胞和周围血单核细胞,正常条件下许多 P2X7R 蛋白表达于细胞内,而在胞外高 K^+ 、低 Na^+ 、低 Cl^- 时,P2X7 mRNA 无变化,表达于细胞膜的 P2X7R 量增加 10 倍。胞外低 Na^+ 、低 Cl^- 时,原不能形成质膜孔道的单核细胞在较低浓度 ATP 刺激下形成了质膜孔道^[12-13]。BzATP 作用于正常培养条件下的星形胶质细胞,仅使胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 轻微增加,无质膜孔道形成,而 IL-1 β 与 BzATP 共刺激时 P2X7R 表达上调,胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 明显升高并形成质膜孔道^[14]。以上研究提示,胞外离子浓度的改变、IL-1 β 等共激活剂的存在,可以明显增强 P2X7R 表达、与 ATP 亲和力及受体活化效应。因而有学者认为,生理状况下的 P2X7R 可能处于构象受限状态,不易与 ATP 结合,而病理条件下胞外离子浓度的改变可能通过对受体的别构效应增加与 ATP 的亲和力,同时,激动剂刺激通过调节受体内化率上调受体在细胞表面的表达及密度,从而进一步增强受体活化效应。已经知道在缺氧缺血条件下,细胞外 ATP 浓度大幅度升高,细胞膜内外的离子梯度破坏,胞外 K^+ 浓度升高,而 Na^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 浓度下降,IL-1 β 等炎性介质明显增加。有理由推测,在缺氧缺血条件下 OPCs 的 P2X7R 表达模式及功能特性很可能发生变化,并参与缺氧缺血性损害。

参考文献:

[1] Back SA. Perinatal white matter injury the changing spec-

trum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms [J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2006,12(2):129.

- [2] Wang X, Arcuino G, Takano T, et al. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury [J]. Nat Med, 2004, 10(8):821.
- [3] Matute C, Torre I, Pérez-Cerdá F, et al. P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Neurosci, 2007, 27(35):9525.
- [4] 王丽雁,蔡文琴,陈鹏慧. 新生大鼠少突胶质前体细胞的培养与鉴定 [J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(6):489.
- [5] 王丽雁,蔡文琴. P2X7 受体在神经系统表达及功能的研究进展 [J]. 解剖学杂志, 2007, 30(6):813.
- [6] James G, Butt AM. P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca^{2+} signalling in glial cell pathology in the central nervous system [J]. Eur J Pharmacol, 2002, 447:247.
- [7] Matute C. P2X7 receptors in oligodendrocytes: a novel target for neuroprotection [J]. Mol Neurobiol, 2008, 38(2):123.
- [8] Sperlagh B, Vizi B, Wirkner K, et al. P2X7 receptors in the nervous system [J]. Prog Neurobiol, 2006, 78(6):327.
- [9] Duan SM, Anderson CM, Keung EC, et al. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes [J]. J Neurosci, 2003, 23(4):1320.
- [10] Feuvre RL, Brough D, Rothwell N. Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration [J]. Eur J Pharmacol, 2002, 447(2-3):261.
- [11] Milius D, Gröger-Arndt H, Stanchev D, et al. Oxygen/glucose deprivation increases the integration of recombinant P2X7 receptors into the plasma membrane of HEK293 cells [J]. Toxicology, 2007, 238(1):60.
- [12] Narcisse L, Scemes E, Zhao Y, et al. The cytokine IL-1 β transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes [J]. Glia, 2005, 49(2):245.
- [13] Verhoef PA, Kertesz SB, Lundberg K, et al. Inhibitory effects of chloride on the activation of caspase-1, IL-1 β secretion, and cytolysis by the P2X7 receptor [J]. J Immunol, 2005, 175(11):7623.
- [14] Suadicani SO, Brosnan CF, Scemes E. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca^{2+} signaling [J]. J Neurosci, 2006, 26(5):1378.

(收稿日期:2010-05-25)