

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.10.009

RUNX1 对氧糖剥夺诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用研究

秦彦昌 贾 栋 于庆伟 孙树凯 张百平

(第四军医大学唐都医院神经外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:研究 RUNX1 在 PC12 细胞氧糖剥夺模型中的表达及其对 PC12 细胞的保护作用,并探讨其相关机制。**方法:**体外培养 PC12 细胞并构建氧糖剥夺模型,将细胞分为对照组、氧糖剥夺组、RUNX1 siRNA 处理组、siRNA 对照处理组(sicontrol)、pcDNA3.1-RUNX1 处理组(pcRUNX1)和 pcDNA3.1 对照处理组(pcDNA 3.1)。qRT-PCR 和 western blot 检测 RUNX1、磷酸化 Akt(p-Akt)和总 Akt(t-Akt)表达水平;MTT 法检测细胞存活率;Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡。**结果:**与对照组比较,RUNX1 在 PC12 细胞氧糖剥夺模型中表达水平显著升高;沉默 RUNX1 可下调 PC12 细胞的存活率,促进细胞的凋亡,有效抑制 p-Akt 蛋白表达,而过表达 RUNX1 显著提高细胞存活率,抑制细胞凋亡,并上调 p-Akt 蛋白表达;此外,PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 明显抑制 RUNX1 过表达对细胞存活率的促进作用和对细胞凋亡的抑制作用。**结论:**RUNX1 可通过 PI3K/Akt 信号通路保护 OGD 对 PC12 细胞的损伤作用。

关键词:RUNX1;氧糖剥夺;细胞凋亡;PI3K/Akt

中图分类号:R-33; R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)10-1838-05

Protective Effects of RUNX1 on Oxygen-glucose Deprivation Induced Apoptosis in PC12 Cells

QIN Yan-chang, JIA Dong, YU Qing-wei, SUN Shu-kai, ZHANG Bai-ping

(The Department of Neurosurgery, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To estimate the expression of RUNX1 in oxygen-glucose deprivation injured PC12 cells and investigate the protective effect and mechanisms of RUNX1 on apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation in PC12 cells. **Methods:** The oxygen-glucose deprivation (OGD) model was built using PC12 cells, and cells were divided into control group, OGD group, RUNX1 siRNA group, control siRNA group, pcDNA3.1-RUNX1 group and pcDNA3.1 group. The expression of RUNX1, phosphorylated Akt (p-Akt) and total Akt (t-Akt) were measured using qRT-PCR and western blot assay. Cell viability was estimated using MTT assay and cell apoptosis was detected using Annexin V-FITC/PI assay. **Results:** Compared with control, RUNX1 expression was significantly higher in OGD model. Silence RUNX1 by RUNX1 siRNA remarkably inhibited cell viability, promoted apoptosis and down-regulated p-Akt protein expression, while RUNX1 overexpression showed a contrary effect. Besides, LY294002, the inhibitor of PI3K/Akt, markedly impeded the the role of RUNX1 overexpression in promoting cell viability and inhibiting apoptosis. **Conclusion:** RUNX1 protected PC12 cells against oxygen-glucose deprivation injury through PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: RUNX1; Oxygen-glucose deprivation; Cell apoptosis; PI3K/Akt

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)10-1838-05

前言

缺血性脑血管病是全世界导致死亡最常见和重要的原因之一^[1]。脑缺血会导致细胞能源需求氧气和营养物质(葡萄糖)的剥夺,进而造成缺血性中风^[2]。脑缺血/再灌注引起的神经元损伤是一个复杂的过程,主要与兴奋性中毒、氧化应激、细胞凋亡、基因表达以及酶活性的表达等多种机制有关^[3,4]。尽管缺血引起脑损伤的相关机制还不甚完善,但神经元凋亡被认为是缺血引起的主要表现形式^[5]。因此,对神经细胞凋亡机制的深入研究对于脑缺血疾病的治疗具有十分重要的作用。

RUNX1 (Runt-related transcription factor 1, RUNX1), 又称为 AML1, 是 RUNX 转录因子蛋白家族的成员之一。研究发现 RUNX1 在小鼠胚胎的中枢和周围神经系统中均可表达,并且对神经系统的发展具有十分重要的作用^[6-8]。本研究应用 PC12 细胞建立氧糖剥夺(OGD)体外模型模拟脑缺血再灌注过程,研究在 OGD 条件下 RUNX1 的表达水平及其在氧糖剥夺模型中的相关作用与潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

PC12 细胞株购自美国 ATCC 公司;马血清、胎牛血清、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;青霉素/链霉素、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Sigma 公司;RUNX1 siRNA 购自美

作者简介:秦彦昌(1974-),本科,研究方向:颅脑外伤,颅脑及脊髓肿瘤,电话:029-84717850, E-mail: aienlifz@163.com

(收稿日期:2016-05-31 接受日期:2016-06-29)

国 Santa Cruz(sc-37677);pcDNA3.1-RUNX1;Trizol 总 RNA 提取试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 逆转录试剂盒、TransStarts Green qPCR SuperMix PCR 试剂盒购自中国 Transgen 公司;RIPA 裂解液、ECL 化学发光试剂购自中国碧云天生物技术公司;RUNX1 单克隆抗体(ERR3099)、兔抗 p-Akt(ab8805)、兔抗 Akt(ab81283)单克隆抗体以及辣根过氧化物标记的羊抗兔二抗(ab6727)购自美国 abcam。

1.2 常用仪器

CO₂ 培养箱(美国 Thermo);酶标仪(美国 Bio Tek);流式细胞仪(美国 BD Bioscience);PCR 仪(美国 BIO-RAD)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养(NGF) 鼠 PC12 细胞(ATCC)用含 10 % 马血清、5 % 胎牛血清和 1 % 青霉素 / 链霉素的 DMEM 培养基在 5 % CO₂, 37 °C 的培养箱中进行培养。每两天进行一次传代,取第二代对数生长期细胞进行 NGF(50 ng/mL)处理 8-10 d, 以促使 PC12 细胞的分化。

1.3.2 细胞分组与处理 将细胞分为对照组(control):将 PC12 细胞在正常培养基中置于含 95 % 空气和 5 % CO₂ 的培养箱中进行培养;氧糖剥夺组(OGD):PC12 细胞在无糖 DMEM 培养基中置于含 95 % N₂ 和 5 % CO₂ 的培养箱中进行培养;RUNX1 siRNA 处理组 (siRUNX1 组): 将转染 RUNX1 siRNA 的 PC12 细胞置于无糖 DEME 培养基于含 95 % N₂ 和 5 % CO₂ 的培养箱中进行培养;siRNA 对照处理组(sicontrol 组):将转染非特异性 siRNA 的 PC12 细胞置于无糖 DEME 培养基于含 95 % N₂ 和 5 % CO₂ 的培养箱中进行培养;pcDNA3.1-RUNX1 (pcRUNX1)处理组:将转染 pcDNA3.1-RUNX1 的 PC12 细胞置于无糖 DEME 培养基于含 95 % N₂ 和 5 % CO₂ 的培养箱中进行培养;pcDNA3.1 对照处理组(pcDNA 3.1):将转染 pcDNA3.1 空载体的 PC12 细胞置于无糖 DEME 培养基于含 95 % N₂ 和 5 % CO₂ 的培养箱中进行培养。

1.3.3 氧糖剥夺模型的制备 氧糖剥夺模型的制备参照 Qi et al.^[9]的方法。将 PC12 细胞培养于无糖 DMEM 培养基,并置于含 95 % N₂ 和 5 % CO₂ 的 37 °C 培养箱中,4 h 后,将细胞培养基换为正常培养基并转移至含 95 % 空气和 5 % CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养 24 h。

1.3.4 siRNA 和质粒转染 参照 Lipofectamine 2000 转染试剂

盒说明书将 RUNX1 siRNA 和非特异性 siRNA^[10] 以及 pcDNA3.1-RUNX1 和 pcDNA3.1 空载体^[11]转染至 PC12 细胞,以未转染细胞为对照组。将转染细胞培养 24 h 后,收集细胞,测定 RUNX1 表达水平。

1.3.5 qRT-PCR 法测定 RUNX1 mRNA 表达 用 Trizol 试剂提取总 RNA,并采用逆转录试剂盒将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA。随后参照 TransStarts Green qPCR SuperMix 试剂盒进行 PCR 反应。PCR 反应体系为 20 L, 反应条件为:94 °C 预热 10 min;94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s 共 40 个循环。

1.3.6 MTT 法检测细胞存活率 细胞存活率的检测采用 MTT 法进行。将 PC12 细胞以 6 × 10³ 个 / 孔的密度接种于 96 孔培养板中。进行 1.3.3 细胞培养后,每孔加入 20 L MTT (5 mg/mL)并继续培养 4 h。弃培养基并加入 150 L DMSO 混合均匀。在酶标仪上读取 490 nm 处的吸光值。

1.3.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 细胞凋亡的检测采用 Annexin V-FITC/PI 双染法进行。收集细胞,并将细胞与 FITC 标记的 Annexin V 和 PI 染色液共孵育,于 FACS 流式细胞仪上对细胞凋亡进行检测。

1.3.8 Western blot 测定 RUNX1、p-Akt 和 t-Akt 蛋白表达 将细胞溶解于 RIPA 裂解液中提取总蛋白。将提取的蛋白经 10 % 聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳电泳分离后转至消化纤维素膜,经脱脂奶粉封闭 2 h 后,将膜与兔抗 RUNX1 单克隆抗体、兔抗 p-Akt 以及兔抗 Akt 单克隆抗体以及辣根过氧化物标记的羊抗兔二抗进行孵育。随后,采用增强化学发光法(ECL)对条带进行显色,Kodak 数字成像系统和 Carestream 分子成像软件对条带进行扫描和灰度值分析。以β-actin 为内参。

1.3.9 统计学方法 SPSS 18.0 统计学软件对数据进行计算分析,结果以均值 ± SD 表示。各组间差异比较采用单因素 ANOVA 进行,以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RUNX1 在氧糖剥夺 PC12 细胞中表达上调

qRT-PCR 结果显示,在氧糖剥夺 PC12 细胞模型中,RUNX1 mRNA 显著高于对照组 (P < 0.05, 图 1A)。进一步对 RUNX1 蛋白检测的结果也发现,OGD 使 PC12 细胞 RUNX1 蛋白表达水平显著上调(P < 0.05, 图 1B)。

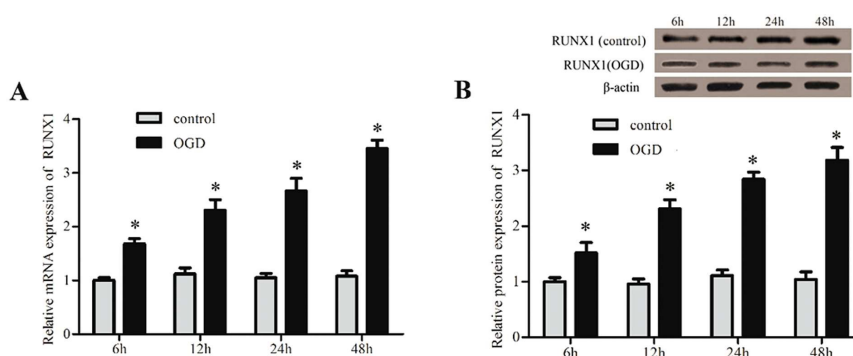


图 1 RUNX1 在 PC12 氧糖剥夺体外模型中的表达水平

Fig.1 The expression of RUNX1 in PC12 cells under OGD condition

A: mRNA expression level; B: protein expression level

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=6. *P < 0.05 vs. control

2.2 RUNX1 促进氧糖剥夺 PC12 细胞的存活

为进一步研究上调的 RUNX1 在氧糖剥夺 PC12 细胞的作用, 我们分别用 RUNX1 siRNA 和 pcDNA3.1 RUNX1 转染 PC12 细胞, 使 RUNX1 沉默或过表达($P<0.05$, 图 2A), 并对

PC12 细胞的存活进行了检测。结果发现, RUNX1 siRNA 显著促进了 OGD 诱导的 PC12 细胞损伤, 而 pcDNA3.1 RUNX1 对 OGD 导致的 PC12 细胞损伤具有显著的抑制作用 ($P<0.05$, 图 2B)。

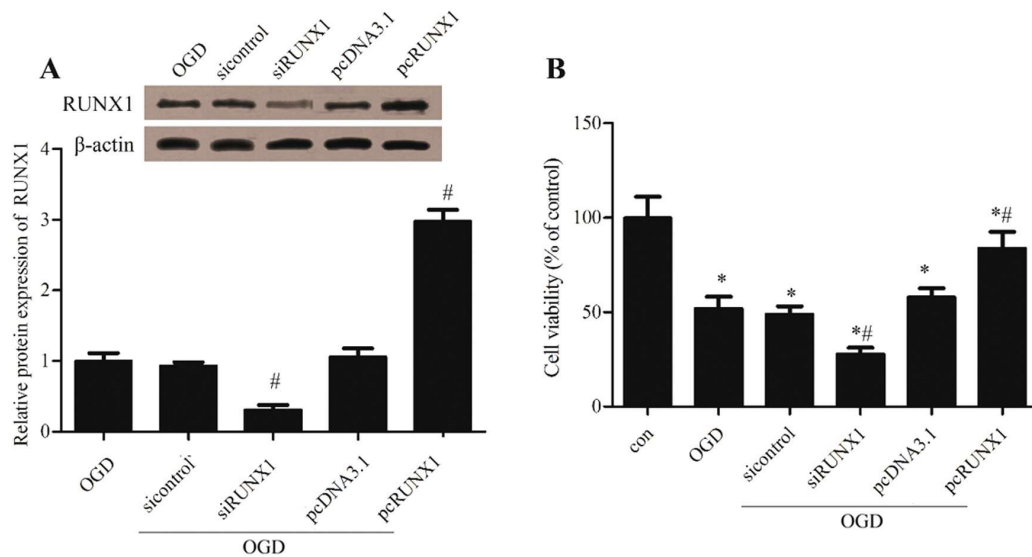


图 2 RUNX1 对 PC12 细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of RUNX1 on cell viability of PC12 cell

A: Transfection efficiency of RUNX1 siRNA and pcDNA 3.1 RUNX1; B: Cell viability

Note: Data were expressed as $\pm$ SD, n=6. * $P<0.05$ vs. control; # $P<0.05$ vs. OGD

2.3 RUNX1 抑制氧糖剥夺 PC12 细胞的凋亡

经 Annexin V FITC 双染法对细胞凋亡的检测发现, RUNX1 siRNA 转染 OGD 处理的 PC12 细胞 48 h 后, 凋亡的细

胞数目明显增多, 而 pcDNA3 RUNX1 转染显著抑制了 OGD 诱导的 PC12 细胞凋亡($P<0.05$, 图 3)。

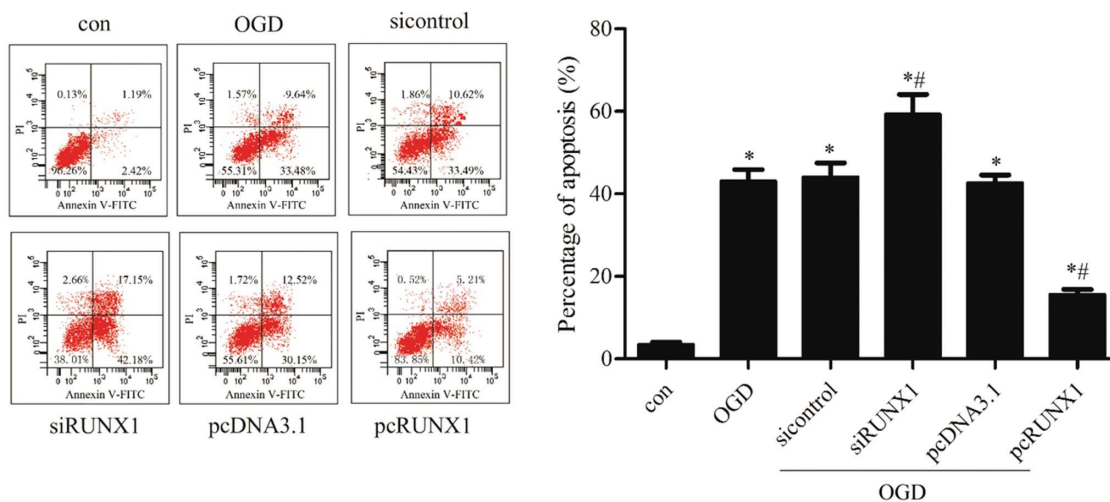


图 3 RUNX1 对氧糖剥夺诱导的 PC12 细胞凋亡的影响

Fig.3 Effect of RUNX1 on cell apoptosis induced by OGD in PC12 cell

Note: Data were expressed as $\pm$ SD, n=6. * $P<0.05$ vs. control; # $P<0.05$ vs. OGD

2.4 RUNX1 通过 PI3K/Akt 信号通路保护 OGD 损伤的 PC12 细胞

为进一步探讨 RUNX1 对 OGD 处理 PC12 细胞的相关保护机制, 我们对 PI3K/Akt 信号通路进行了分析。结果发现,

RUNX1 siRNA 显著抑制 p-Akt 蛋白的表达水平, 且对总 Akt 蛋白水平无显著影响, 而 pcDNA3 RUNX1 对 p-Akt 蛋白的表达水平具有显著的上调作用($P<0.05$, 图 4A)。

因此, 我们推测 PI3K/Akt 信号通路可能在 RUNX1 调节

OGD 诱导的 PC12 细胞损伤过程中具有一定的作用。结果发现 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 LY294002 可显著抑制 pcDNA3.1

RUNX1 对细胞存活率的促进作用($P<0.05$,图 4B),并且逆转对 PC12 细胞凋亡的抑制作用($P<0.05$,图 4C)。

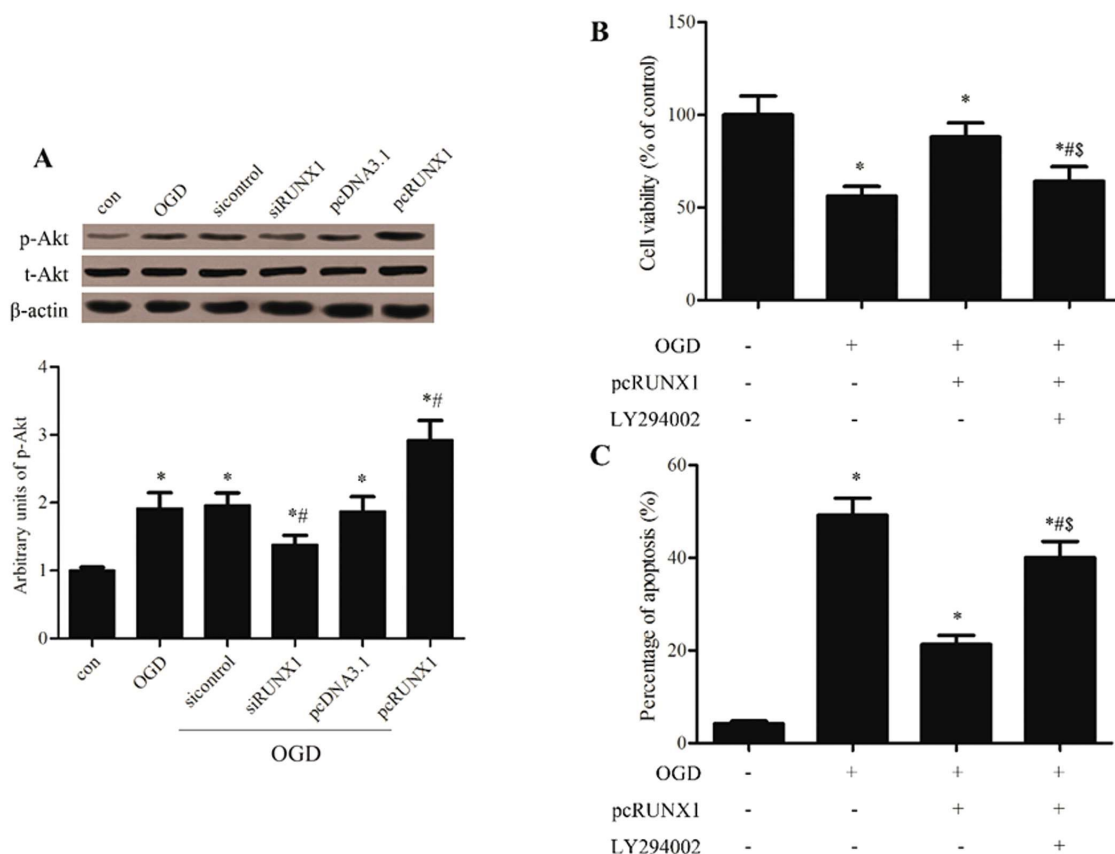


图 4 RUNX1 对 PC12 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响

Fig.4 Effect of RUNX1 on PI3K/Akt signaling pathway in PC12 cell

A: Protein expression of p-Akt and Akt; B: Cell viability; C: Cell apoptosis

Note: Data were expressed as $\pm$ SD, n=6. * $P<0.05$ vs. control; # $P<0.05$ vs. OGD; \$ $P<0.05$ vs. pcRUNX1

3 讨论

局灶性脑缺血或者中风是世界上导致死亡和长期残疾的主要原因之一,尽管已初步确定其分子机制主要是缺氧缺血造成的神经元损伤,但目前对于脑缺血引起神经元损伤的机制还不完善。PC12 细胞的氧糖剥夺模型被广泛用于研究缺血导致神经细胞死亡的机制以及潜在神经保护药物的体外研究^[12]。因此,本研究以 PC12 细胞氧糖剥夺模型为研究对象,模拟体内脑缺血状态,探讨 RUNX1 对氧糖剥夺 PC12 细胞的相关作用。

RUNX1 是对于人类造血功能至关重要的调控因子,并参与白血病的发生。研究发现 RUNX1 在造血细胞和成骨细胞增殖和分化过程中均具有十分重要的作用^[13,14],此外,近期也有研究表明 RUNX1 可促进成年小鼠神经元的增殖和分化^[8,15]。本研究发现,RUNX1 在 PC12 氧糖剥夺模型中表达水平显著上调,且进一步发现 RUNX1 过表达可有效改善氧糖剥夺诱导的 PC12 损伤和凋亡率增加。在大脑正常发育过程中,过剩的神经元通过细胞凋亡来消除,这对于神经网络的形成是一个重要的生理过程,然而,当大脑受到缺氧缺血损伤,这样的凋亡模式会导致神经元的过度流失^[16-18]。本研究结果表明 RUNX1 对氧糖

剥夺损伤的 PC12 细胞具有一定的保护作用。

PI3K/Akt 通路可在各种刺激条件下被激活,进而发挥抗凋亡的作用^[19]。PI3K/Akt 信号通路参与神经元的存活和轴突的生长^[20,21]。研究表明,缺氧缺血处理可使 PI3K/Akt 信号通路在 PC12 细胞激活^[22]。本研究也发现氧糖剥夺激活了 PI3K/Akt 信号通路。PI3K/Akt 通常可以通过抑制细胞凋亡保护细胞免受损伤,因此,我们对 PI3K/Akt 在 RUNX1 对 PC12 细胞保护效应中的作用进行了研究,结果发现 PI3K/Akt 信号通路抑制剂可显著阻断 RUNX1 对 PC12 细胞存活率的促进作用和细胞凋亡的抑制作用。表明 RUNX1 通过 PI3K/Akt 发挥对 OGD 损伤的 PC12 细胞的保护效应。

综上所述,本研究结果表明 OGD 处理使 PC12 细胞中 RUNX1 表达上调,且上调的 RUNX1 可通过 PI3K/Akt 保护 OGD 处理对 PC12 细胞的损伤。本研究初步揭示了 RUNX1 在 OGD 损伤 PC12 细胞中的保护作用及其可能机制,为缺血性脑疾病的治疗提供了新的理论基础和治疗研究靶点。

参考文献(References)

- [1] T Shinotsuka, M Yasui, M Nuriya. Astrocytic gap junctional networks suppress cellular damage in an in vitro model of ischemia[J].Biochem Biophys Res Commun, 2014, 444(2): 171-176

- [2] A Brassai, RG Suvanjev, EG Ban, et al. Role of synaptic and nonsynaptic glutamate receptors in ischaemia induced neurotoxicity [J]. Brain Res Bull, 2015, 112: 1-6
- [3] 王光胜, 耿德勤. 脑缺血 / 再灌注损伤机制研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17(24): 3753-3756
Wang Guang-sheng, Geng De-qin. Recent studies on mechanisms of cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Medical Recapitulate, 2011, 17(24): 3753-3756
- [4] MA Osuna-Zazueta, JA Ponce-Gomez, I Perez-Neri. Neuroprotective mechanisms of cannabinoids in brain ischemia and neurodegenerative disorders[J]. Invest Clin, 2015, 56(2): 188-200
- [5] 宋修云, 胡金凤, 陈乃宏. 神经细胞凋亡与脑缺血疾病[J]. 中国药理学通报, 2012, 3(28): 307-310
Song Xiu-yun, Hu Jin-feng, Chen Nai-hong. Neurons apoptosis and cerebral ischemia[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2012, 3(28): 307-310
- [6] K Inoue, T Shiga, Y Ito. Runx transcription factors in neuronal development[J]. Neural Dev, 2008, 3: 20
- [7] K Inoue, T Shiga, Y Ito. Runx transcription factors in neuronal development[J]. Neural Dev, 2008, 3: 1-6
- [8] TT Logan, M Rusnak, AJ Symes. Runx1 promotes proliferation and neuronal differentiation in adult mouse neurosphere cultures[J]. Stem Cell Res, 2015, 15(3): 554-564
- [9] H Qi, Y Han, J Rong. Potential roles of PI3K/Akt and Nrf2-Keap1 pathways in regulating hormesis of Z-ligustilide in PC12 cells against oxygen and glucose deprivation [J]. Neuropharmacology, 2012, 62(4): 1659-1670
- [10] ZK Bai, DD Li, CH Guo, et al. Differential expression and regulation of Runx1 in mouse uterus during the peri-implantation period[J]. Cell Tissue Res, 2015, 362(1): 231-240
- [11] X Wang, Y Zhao, H Qian, et al. The miR-101/RUNX1 feedback regulatory loop modulates chemo-sensitivity and invasion in human lung cancer[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9): 15030-15042
- [12] S Abu Raya, V Trembovler, E Shohami, et al. A tissue culture ischemic device to study eicosanoid release by pheochromocytoma PC12 cultures[J]. J Neurosci Methods, 1993, 50(2): 197-203
- [13] 罗春红, 张红宾, 秦波, 等. SDF/RUNX1 融合蛋白介导的间充质干细胞对造血干细胞增殖和趋化作用的研究[J]. 重庆医学, 2012, 41(30): 3129-3131
Luo Chun-hong, Zhang Hong-bin, Qin Bo, et al. MSCs mediated by SDF-1/RUNX1 fusion protein induce the proliferation and chemotaxis of HSCs[J]. Chongqing Medicines, 2012, 41(30): 3129-3131
- [14] 王祎萍. RUNX1 及其共转录因子 cbf β 在成骨细胞分化及骨发育中作用的研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2014
Wang Yi-ping. Role of Runx1 and its co-transcription factor CBF in osteoblast differentiation and bone development [D]. Zhe Jiang: Zhe Jiang University, 2014
- [15] M Murthy, S Bocking, F Verginelli, et al. Transcription factor Runx1 inhibits proliferation and promotes developmental maturation in a selected population of inner olfactory nerve layer olfactory ensheathing cells[J]. Gene, 2014, 540(2): 191-200
- [16] MH Singh, SM Brooke, I Zemlyak, et al. Evidence for caspase effects on release of cytochrome c and AIF in a model of ischemia in cortical neurons[J]. Neurosci Lett, 2010, 469(2): 179-183
- [17] YT An, P Zhu, Y Zhong, et al. A neuroprotective mechanism of YGY-E in cerebral ischemic injury in rats [J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(1): 14-20
- [18] XJ Ma, JW Cheng, J Zhang, et al. E-selectin deficiency attenuates brain ischemia in mice[J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(11): 903-908
- [19] TO Chan, SE Rittenhouse, PN Tschlis. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation[J]. Annu Rev Biochem, 1999, 68: 965-1014
- [20] SK Jha, NK Jha, R Kar, et al. p38 MAPK and PI3K/AKT Signalling Cascades in Parkinson's Disease [J]. Int J Mol Cell Med, 2015, 4(2): 67-86
- [21] D Heras-Sandoval, JM Perez-Rojas, J Hernandez-Damian, et al. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration [J]. Cell Signal, 2014, 26(12): 2694-2701
- [22] 张鸿, 贾春红, 赵丹阳, 等. ATP 敏感性钾通道开放剂通过 PI3K/Akt 信号通路对缺血缺氧诱导 PC12 细胞凋亡发挥保护作用[J]. 解剖学进展, 2011, 17(1): 27-32
Zhang Hong, Jia Chun-hong, Zhao Dan-yang, et al. ATP-sensitive potassium channel opener protects PC12 cells against ischemia/hypoxia-induced apoptosis through PI3K/Akt signaling pathway [J]. Progress of Anatomical Sciences, 2011, 17(1): 27-32