

锂剂促进自噬保护受损神经细胞的研究

张舵¹, 寨旭², 王放³, 李晓会⁴, 贺西京³

(1.首都医科大学附属北京天坛医院骨科, 北京 100050; 2.西安交通大学第二附属医院急诊科, 陕西 西安 710004; 3.西安交通大学第二附属医院骨二科, 陕西 西安 710004; 4.西安交通大学第二附属医院影像科, 陕西 西安 710004)

【摘要】 目的:研究锂剂能否通过促进细胞自噬发挥神经细胞保护作用。方法:将 SH-SY5Y 神经细胞分为 4 组,包括对照组(正常换液),模型组(培养液含有 200 μmol/L H₂O₂ 的培养液),锂剂组(培养液含 200 μmol/L H₂O₂ 及 1.0 mmol/L LiCl 的培养液),3-MA 干预组(培养液含 200 μmol/L H₂O₂、1.0 mmol/L LiCl 及 5 mmol/L 3-MA 的培养液)。培养 6 h 后进行 MTT 检测及 Beclin 1、LC3b 免疫组化染色,评估细胞存活情况及自噬水平。**结果:**3-MA 干预组细胞存活率较模型组降低($P<0.05$),锂剂组细胞存活率较模型组提高($P<0.05$)。经过 3-MA 干预后,细胞存活率较对照组、模型组及锂剂组均有所降低($P<0.05$)。经过 H₂O₂ 处理后,细胞 Beclin 1、LC3b 染色面积增大,染色加深。经锂剂处理后细胞 Beclin 1、LC3b 染色面积进一步增大,染色更深。3-MA 干预组细胞 Beclin 1、LC3b 染色面积较对照组大、染色深,但细胞染色面积较模型组和锂剂组均小,且染色更为浅淡。**结论:**锂剂能够促进受损神经细胞存活,促进自噬作用是锂剂发挥神经保护作用的机制之一。

【关键词】 神经损伤; 锂剂; 神经细胞; 自噬; SH-SY5Y 细胞

中图分类号:R392

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2019.10.016

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study of the neural protective effect of lithium on enhancement of autophagy in vitro ZHANG Duo, ZHAI Xu, WANG Fang, LI Xiao-hui, and HE Xi-jing. *Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi, China

ABSTRACT Objective: To investigate whether lithium can exert neuroprotective effects by promoting autophagy. **Methods:** SH-SY5Y cells were divided into 4 groups, including control group (handled with normal culture solution), model group (handled with 200 μmol/L H₂O₂), lithium group (handled with 200 μmol/L H₂O₂ and 1.0 mmol/L LiCl medium), 3-MA group (handled with 200 μmol/L H₂O₂, 1.0 mmol/L LiCl and 5 mmol/L 3-MA). After 6 hours of culture, MTT assay and immunohistochemical staining of Beclin 1 and LC3b were performed to evaluate cell survival and autophagy. **Results:** The cell survival rate of lithium group was significantly high than that of the model group ($P<0.05$), while the 3-MA group was lower ($P<0.05$). After 3-MA intervention, the cell survival rate was lower than that of control group, model group and lithium group ($P<0.05$). After H₂O₂ treatment, the staining area of Beclin 1 and LC3b was increased and the staining was deeper, and after LiCl handling, the staining area of Beclin 1 and LC3b was further increased and the staining was more deeper. The staining area of Beclin 1 and LC3b in 3-MA group was larger than that in control group, but was smaller than that in model group and lithium group, and the staining was lighter. **Conclusion:** Lithium can promote the survival of damaged nerve cells, and inducing autophagy is probably one of the neuroprotective mechanisms of lithium.

KEYWORDS Neurological damage; Lithium; Neural cells; Autophagy; SH-SY5Y cells

随着社会进步,中枢神经系统损伤逐年增多,其发病较急,常造成功能障碍,甚至危及生命,目前缺乏行之有效的治疗手段^[1]。锂剂是较强的神经保护

剂,可以通过多种机制阻止神经元凋亡^[2-3]。然而,锂剂发挥神经保护作用的机制仍不完全清楚。有研究发现,锂剂与细胞自噬通路可能存在一定联系^[4]。本实验以 H₂O₂ 处理 SH-SY5Y 细胞建立神经细胞损伤模型,观察神经细胞存活及自噬水平变化,探讨自噬与锂剂发挥神经保护作用的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SH-SY5Y 细胞,购自中国科学院上海细胞库。DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(浙江

基金项目:北京市优秀人才培养资助项目(编号:2017000021469G215);首都医科大学自然科学基金(编号:PYZ2017082);北京天坛医院青年科研基金(编号:2016-YQN-14)

Fund program:Beijing Excellent Talents Training Project (No. 20170000 21469G215)

通讯作者:贺西京 E-mail:xijing_h@vip.tom.com

Corresponding author:HE Xi-jing E-mail:xijing_h@vip.tom.com

天杭生物科技有限公司),青链霉素双抗(HyClone 公司),MTT(碧云天生物技术公司),LiCl(天津市科密欧化学试剂有限公司),3-MA (Sigma-Aldrich 公司),小鼠抗大鼠 Beclin 1 抗体(Santa Cruz 公司),小鼠抗大鼠 LC3b 抗体(Santa Cruz 公司),辣根过氧化物酶标记二抗(碧云天生物技术公司),SP 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养液配制 含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,双抗(青霉素、链霉素)浓度为 1%。细胞培养箱的条件:培养箱 CO₂ 浓度为 5%,温度 37℃,培养箱底部及时添加无菌蒸馏水保持合适湿度。定时在显微镜下观察细胞生长情况,当细胞在培养瓶中长成致密的单层后,需要对其进行传代培养。胰酶处理后,获得细胞悬液,每个 25 cm² 细胞培养瓶加入细胞悬液 5 ml,放入细胞培养箱内培养。

1.2.2 建立细胞损伤模型 按上述方法将 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板中,分为 7 组,每组设 6 个复孔。其中 1 组为调零组,即不含细胞,仅含有等体积 DMEM/F12 培养液,其余 6 组加入 100 μl 细胞液后放入培养箱中培养 12 h,吸弃上清液,用 1× PBS 将细胞洗 1 遍。分别加入 100 μl 的 H₂O₂ 终浓度为 0、50、100、200、300、400 μmol/L 的不含胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,继续培养 6 h 后,MTT 测定检测。取 6 孔吸光度的平均值与对照组的比值作为细胞存活率。选用使存活率下降 50% 左右的 H₂O₂ 浓度作为本实验建立细胞损伤模型的工作浓度。

1.2.3 细胞分组及干预 以上述结果中使细胞存活率下降 50% 的 H₂O₂ 浓度建立细胞损伤模型后,将细胞分为 4 组。正常对照组:含有细胞,不做其他处理;模型组:仅建立 H₂O₂ 损伤模型;锂剂组:建立 H₂O₂ 损伤模型,并使用锂剂干预;3-MA 干预组:处理同锂剂组,同时加入 3-MA 使终浓度为 5 mmol/L。干预处理后细胞继续培养 6 h 后进行 MTT 检测。

1.2.4 MTT 检测 每孔加入 20 μl MTT 溶液,继续培养 4 h。吸弃孔内培养液后,每孔加入 150 μl 二甲基亚砜,在摇床上低速震荡 10 min,用酶标仪检测各孔 490 nm 处的 OD 值。计算合适的 H₂O₂ 浓度值。调零孔含培养液、MTT 和二甲基亚砜;对照孔含细胞、培养液、MTT 和二甲基亚砜。

1.2.5 免疫组化染色 将细胞用圆形盖玻片放入酸缸清洁剂中浸泡 24 h。取出后用蒸馏水洗 10 遍,放入无水乙醇中浸泡 6 h。取出后自然晾干,用纱布轻轻包裹后放入铝盒中高压灭菌。铝盒放入烘箱 2~3 h 后,盖玻片即可用于细胞爬片。细胞接种于放有

玻片的 24 孔板中,分为 4 组,37℃ 培养箱中培养 12 h。正常对照组:正常换液;模型组:换为含有 200 μmol/L H₂O₂ 的培养液;锂剂组:换为含 200 μmol/L H₂O₂ 及 1.0 mmol/L LiCl 的培养液;3-MA 干预组:换为含 200 μmol/L H₂O₂、1.0 mmol/L LiCl 及 5 mmol/L 3-MA 的培养液。培养 6 h 后,弃去上清液,进行免疫组化染色。加入 1 ml 4% PFA 固定,PBS 清洗 3 遍,0.3% Triton X-100 室温作用 15 min,PBS 清洗 3 遍,3% H₂O₂ 室温孵育 15 min,PBS 清洗 3 遍。滴加正常山羊血清进行封闭,弃去血清后,分别滴加山羊抗小鼠 Beclin 1 抗体(1:250)和山羊抗小鼠 LC3b 抗体(1:250),37℃ 孵育 1 h 后移入 4℃ 冰箱过夜。弃去一抗,PBS 清洗 3 遍。滴加生物素标记的二抗,37℃ 孵育 30~40 min,PBS 清洗 3 遍。滴加辣根酶标记的链霉卵白素,37℃ 孵育 40 min,PBS 清洗 3 遍,DAB 显色液显色,镜下观察,适时终止反应。自来水充分冲洗后,滴加苏木素复染,乙醇脱水后,用中性树胶封片。

1.3 观察项目与方法

1.3.1 细胞损伤模型建立与干预 显微镜下观察 SH-SY5Y 细胞生长情况。以各组与对照组的吸光度比值作为细胞存活率,记录使细胞存活率下降至 50% 左右时 H₂O₂ 的浓度,并以此作为工作浓度,记录经过锂剂和 3-MA 处理后细胞存活率。

1.3.2 自噬标志蛋白免疫组化染色 分别在 4、20、40 倍镜下观察细胞爬片 LC3b 和 Beclin-1 免疫组化染色。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,各组与对照组吸光度比值以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(One Way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SH-SY5Y 细胞损伤模型建立

SH-SY5Y 细胞经过传代培养,生长良好,细胞形态统一(图 1)。SH-SY5Y 细胞有较小的细胞核和较大的胞体,与正常神经元细胞形态相近。

使用 MTT 法检测经过不同浓度 H₂O₂ 处理后细胞的存活数量结果显示:随着 H₂O₂ 浓度的增加,细胞的存活数量在逐渐下降($P < 0.05$)见图 2。H₂O₂ 浓度为 0、50、100、200、300、400 μmol/L 的细胞存活率分别为 100%、(81.5±7.66)%、(68.17±5.44)%、(53.12±4.23)%、(45.38±4.37)%、(37.80±3.38)%。笔者选用使存活率下降 50% 左右的 H₂O₂ 浓度作为本实验建立细胞损伤模型的工作浓度,此时 H₂O₂ 浓度为 200 μmol/L,细胞存活率为 (53.12±4.23)%。

2.2 锂剂及 3-MA 干预后细胞存活情况

结果显示, 锂剂组细胞存活率为 (70.67 ± 5.07)%, 显著高于模型组 ($P < 0.001$)。经过 3-MA 干预后, 细胞存活率为 (47.43 ± 2.71)%, 显著低于锂剂组 ($P < 0.001$) 和模型组 ($P = 0.038$), 见图 3。

2.3 Beclin 1 免疫组化染色

细胞免疫组化染色良好, 细胞核与细胞质分界清晰, 细胞与背景清晰可辨。正常对照组 Beclin 1 染色浅淡。经过 H₂O₂ 处理后, 细胞 Beclin 1 染色面积增大, 染色加深。锂剂组细胞 Beclin 1 染色面积进一步增大, 染色更深。3-MA 干预组细胞 Beclin 1 染色面积较正常对照组大、染色深, 但细胞染色面积较模型组和锂剂组均小, 且染色更为浅淡(图 4)。

2.4 LC3b 免疫组化染色

细胞免疫组化染色良好, 细胞核与细胞质分界清晰, 细胞与背景清晰可辨。正常对照组 LC3b 染色浅淡。经过 H₂O₂ 处理后, 细胞 LC3b 染色面积增大, 染色加深。锂剂组细胞 LC3b 染色面积进一步增大, 染色更深。3-MA 干预组细胞 LC3b 染色面积较正常对照组大、染色深, 但细胞染色面积较模型组和锂剂组均小, 且染色更为浅淡(图 5)。

3 讨论

SH-SY5Y 细胞具有与正常神经细胞相似的形态与生理生化功能, 已经在多个领域的研究中得到应用^[5-9]。我们的实验结果表明, 锂剂能够提高神经

细胞损伤后的存活率。近年来, 研究认为锂剂对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)、脑损伤等中枢神经系统损伤性疾病有一定治疗作用^[10-12]。然而, 目前锂剂对神经损伤的保护与修复机制仍不清楚, 可能通过多种信号通路发挥作用^[12-13]。细胞自噬是近年来发现的一种细胞代谢活动, 是机体一种重要的防御和保护机制, 自噬能够调节细胞死亡发挥神经保护作用^[14-16]。有研究发现锂剂对慢性脊髓损伤也有一定治疗作用, 可能与促进自噬有关^[17-22]。然而锂剂治疗急性神经损伤, 是否涉及自噬调节的研究仍较少。

3-MA 是选择性 PI3K 抑制剂, 是最常用的自噬抑制剂。本研究利用 3-MA 观察锂剂促进神经修复的效果, 发现抑制自噬后, 损伤细胞的存活率明显下降。进一步免疫组化染色结果发现, 锂剂干预后, 细胞自噬水平明显升高, 而 3-MA 与锂剂同时干预, 自噬水平仅有微弱升高, 相较于锂剂干预明显减弱。3-MA 干预后的细胞存活率较模型组高, 说明锂剂的神经保护作用被 3-MA 抑制, 即抑制自噬会加重神经细胞损伤, 但锂剂的神经保护作用并非仅仅通过促进自噬发挥作用, 可能还存在其他作用途径。同时, 锂剂促进细胞自噬作用可能存在除了 PI3K 之外的信号通路。

本研究仅对锂剂促进神经细胞保护作用进行了体外的初步半定量研究, 相关体内动物实验仍需进一步开展。同时, 有研究认为自噬除了对损伤细胞具

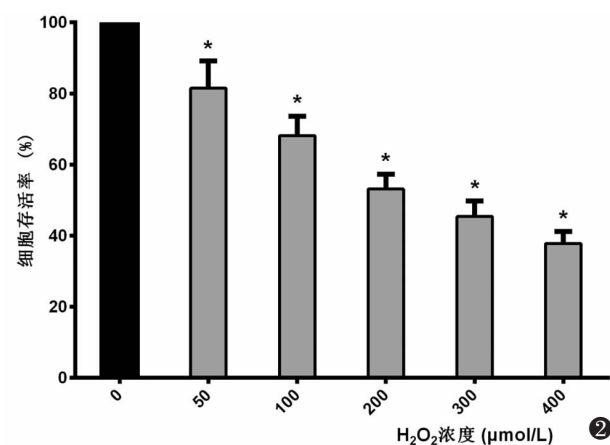
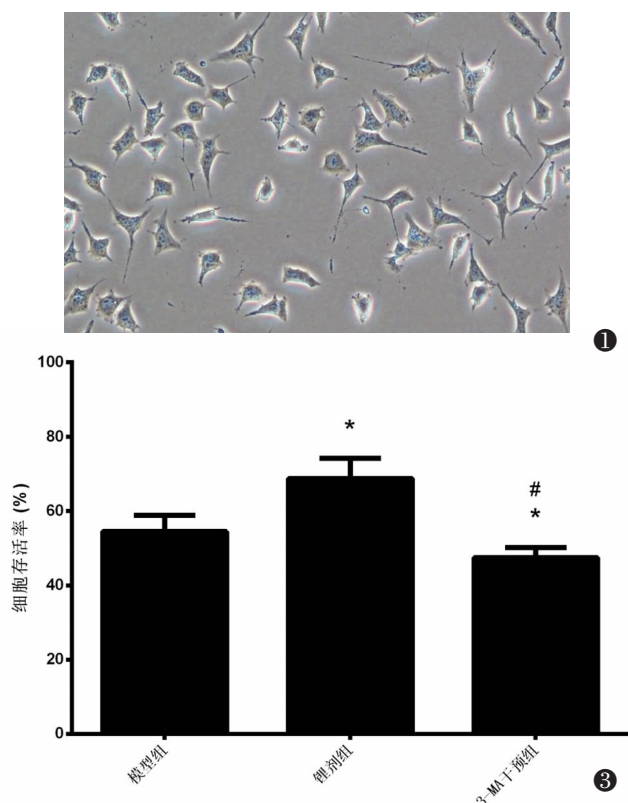


图 1 显微镜下 SH-SY5Y 细胞 (苏木素染色×200) 图 2 不同浓度 H₂O₂ 对细胞存活率的影响; 随着 H₂O₂ 浓度的增加, 细胞存活率逐渐下降。注: 与 H₂O₂ 浓度 0 μmol/L 比较, * $P < 0.05$ 图 3 3-MA 对细胞存活率的影响 注: 与模型组比较, * $P < 0.05$; 与锂剂组比较, # $P < 0.05$

Fig.1 The microscope showed the SH-SY5Y cell (Hematoxylin staining×200) Fig.2 Effects of different H₂O₂ concentration on cell survival. With the increase of H₂O₂ concentration, the cell survival rate was decreased gradually Note: Compared with the H₂O₂ concentration of 0 μmol/L, * $P < 0.05$ Fig.3 Effects of LiCl and 3-MA on cell survival Note: Compared with model group, * $P < 0.05$; compared with LiCl group, # $P < 0.05$

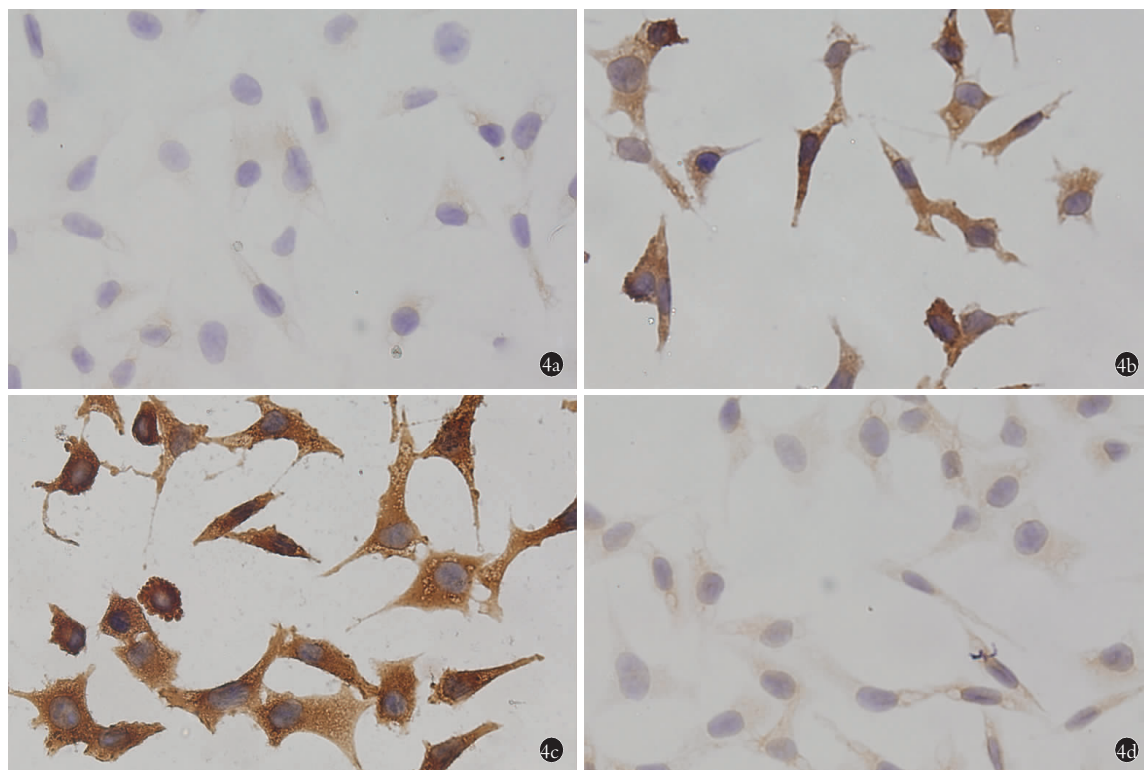


图 4 各处理组细胞 Beclin 1 免疫组化染色(×400) 4a. 对照组 4b. 模型组 4c. 锂剂组 4d. 3-MA 组

Fig.4 Immunohistochemical staining of Beclin-1 in different handling groups(×400) 4a. Control group 4b. Model group 4c. Lithium group 4d. 3-MA group

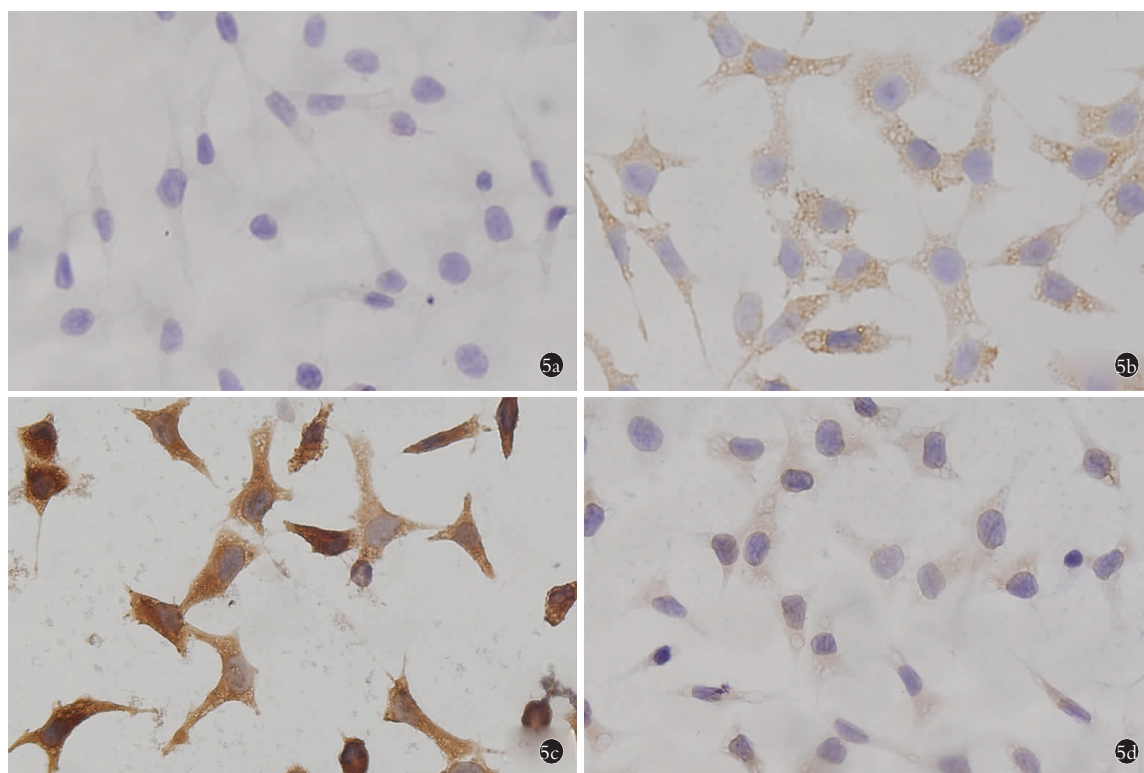


图 5 各处理组细胞 LC3b 免疫组化染色(×400) 5a. 对照组 5b. 模型组 5c. 锂剂组 5d. 3-MA 组

Fig.5 Immunohistochemical staining of LC3b in different handling groups (×400) 5a. Control group 5b. Model group 5c. Lithium group 5d. 3-MA group

有保护作用,自噬作用过强也会导致细胞死亡,即使干预药物相同也存在相反的现象^[23-24]。笔者认为可能与药物的浓度及自噬的动态变化有关。以上均需要更进一步的研究^[25]。

本研究证实了锂剂对神经细胞损伤具有保护作用,能够促进神经细胞损伤后存活,为应用锂剂治疗中枢神经损伤的有效性提供了一定依据,进一步扩展了锂剂的应用范围,也为探索锂剂的作用机制提供了理论基础。

锂剂能够通过提高受损神经细胞的自噬水平发挥神经细胞保护作用,可能是治疗神经创伤的新方法。

参考文献

- [1] 王放,高中洋,张廷,等.嗅鞘细胞移植联合跑步训练对改善脊髓损伤大鼠后肢运动功能的研究[J].中国骨伤,2016,29(10):928-938.
WANG F,GAO ZY,ZHANG T,et al. Study of olfactory ensheathing cells transplantation and treadmill training on improving hindlimb motor function of spinal cord injury rats[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma[J]. 2016,29(10):928-938. Chinese.
- [2] Lazzara CA, Kim YH. Potential application of lithium in Parkinson's and other neurodegenerative diseases[J]. Front Neurosci, 2015, 9: 403.
- [3] Liechit FD, Studle N, Theurillat R, et al. The mood-stabilizer lithium prevents hippocampal apoptosis and improves spatial memory in experimental meningitis[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113607.
- [4] Sarkar S, Floto RA, Berger Z, et al. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase[J]. J Cell Biol, 2005, 170(7): 1101-1111.
- [5] Ballesteros MA, Marín MJ, Martín MS, et al. Effect of neuroprotective therapies (hypothermia and cyclosporine a) on dopamine-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells[J]. Brain Inj, 2013, 27(3): 354-360.
- [6] Funakoshi T, Aki T, Unuma K, et al. Lysosome vacuolation disrupts the completion of autophagy during norephedrine exposure in SH-SY5Y human neuroblastoma cells[J]. Brain Res, 2013, 1490: 9-22.
- [7] Gu X, Sun J, Li S, et al. Oxidative stress induces DNA demethylation and histone acetylation in SH-SY5Y cells: potential epigenetic mechanisms in gene transcription in A beta production[J]. Neurobiol Aging, 2013, 34(4): 1069-1079.
- [8] Park JH, Lee JE, Shin IC, et al. Autophagy regulates chlorpyrifos-induced apoptosis in SH-SY5Y cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 268(1): 55-67.
- [9] Verhaar R, Drukarch B, Bol JG, et al. Tissue transglutaminase crosslinks beclin 1 and regulates autophagy in MPP⁺-treated human SH-SY5Y cells[J]. Neurochem Int, 2013, 62(4): 486-491.
- [10] 王放,周超,高正超,等.锂剂抑制脊髓损伤后大鼠细胞凋亡的机制研究[J].中国骨伤,2018,31(4):379-385.
WANG F,ZHOU C,GAO ZC,et al. Depressant effect of Lithium on apoptosis of nerve cells of adult rats after spinal cord injury[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2018, 31(4): 379-385. Chinese with abstract in English.
- [11] Carlson SW, Yan H, Dixon CE. Lithium increases hippocampal SNARE protein abundance after traumatic brain injury[J]. Exp Neurol, 2017, 289: 55-63.
- [12] Li B, Ren J, Yang L, et al. Lithium inhibits GSK3 beta activity via two different signaling pathways in neurons after spinal cord injury[J]. Neurochem Res, 2018, 43(4): 848-856.
- [13] 张舵,贺西京. 锂剂治疗脊髓损伤机制的研究进展[J]. 中国骨伤, 2015, 28(7): 679-682.
ZHANG D, HE XJ. Advances in mechanisms of treatment for spinal cord injury with lithium[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(7): 679-682. Chinese with abstract in English.
- [14] Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Blomgren K, et al. Autophagy in acute brain injury[J]. Nat Rev Neurosci, 2016, 17(8): 467-484.
- [15] Lipinski MM, Wu J, Faden AI, et al. Function and mechanisms of autophagy in brain and spinal cord trauma[J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 23(6): 565-577.
- [16] Nikolettou V, Papandreou ME, Tavernarakis N. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(3): 398-407.
- [17] 周凯亮,张小磊,吴凯,等. 细胞自噬在脊髓损伤中作用的研究进展[J]. 中国骨伤, 2015, 28(8): 695-698.
ZHOU KL, ZHANG XL, WU K, et al. Progress on the role of autophagy in spinal cord injury[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(8): 695-698. Chinese with abstract in English.
- [18] Guttuso T Jr. Low-dose lithium adjunct therapy associated with reduced off-time in Parkinson's disease: a case series[J]. J Neurol Sci, 2016, 368: 221-222.
- [19] Raja M, Soleti F, Bentivoglio AR. Lithium treatment in patients with huntington's disease and suicidal behavior[J]. Mov Disord, 2015, 30(10): 1438.
- [20] Shimada K, Motoi Y, Ishiguro K, et al. Long-term oral lithium treatment attenuates motor disturbance in tauopathy model mice: Implications of autophagy promotion[J]. Neurobiol Dis, 2012, 46(1): 101-108.
- [21] Wong YW, Tam S, So KF, et al. A three-month, open-label, single-arm trial evaluating the safety and pharmacokinetics of oral lithium in patients with chronic spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 2011, 49(1): 94-98.
- [22] Yang ML, Li JJ, So KF, et al. Efficacy and safety of lithium carbonate treatment of chronic spinal cord injuries: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial[J]. Spinal Cord, 2012, 50(2): 141-146.
- [23] Fang B, Li XQ, Bao NR, et al. Role of autophagy in the bimodal stage after spinal cord ischemia reperfusion injury in rats[J]. Neuroscience, 2016, 328: 107-116.
- [24] Xie L, Yu S, Yang K, et al. Hydrogen sulfide inhibits autophagic neuronal cell death by reducing oxidative stress in spinal cord ischemia reperfusion injury[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017(1): 1-15.
- [25] Zhou K, Sansur CA, Xu H, et al. The temporal pattern, flux, and function of autophagy in spinal cord injury[J]. Int J Mol Sci, 2017, 8(2): E466.

(收稿日期:2018-12-06 本文编辑:王宏)