

食欲素在细胞氧化应激中的神经保护作用 及其机制研究^{*}

李迎帅¹ 曹 飞¹ 王春梅¹ 杨春青¹ 刘 霞² 王琴琴^{1△}
(¹ 济宁医学院精神卫生学院,² 济宁医学院康复医学院, 济宁 272000)

摘 要 **目的** 探讨食欲素(Orexin)在氧化应激中的具体作用及其机制。**方法** 培养海马神经元细胞系 HT-22 细胞,随机分为对照组、H₂O₂(hydrogen peroxide)组、OA(Orexin A)组、OB(Orexin B)组、H₂O₂+OA 组及 H₂O₂+OB 组,通过 H₂O₂ 处理 HT-22 细胞建立氧化应激体外模型,采用显微镜分析方法检测各组细胞数量变化;利用实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR, qPCR)及蛋白印迹(Western blotting)等方法探究转录因子 Nrf2 在 HT-22 细胞氧化应激模型中的表达水平及其作用。**结果** 与对照组相比,H₂O₂ 显著增强 HT-22 细胞的死亡($P<0.05$);给予 OA 及 OB 处理后,与 H₂O₂ 组相比,OA 及 OB 均显著降低 H₂O₂ 引起的 HT-22 细胞的死亡($P<0.05$);与对照组相比,H₂O₂ 处理的 HT-22 细胞 Nrf2 的基因表达水平显著升高($P<0.05$);与 H₂O₂ 组相比,OA 和 OB 显著增加 HT-22 细胞内的 Nrf2 的表达水平($P<0.05$)。**结论** 食欲素可通过增强 HT-22 细胞内 Nrf2 的表达水平降低 H₂O₂ 引起的 HT-22 细胞的神经损伤,进而发挥神经保护作用。

关键词 食欲素;氧化应激;HT-22 细胞;过氧化氢;Nrf2

中图分类号:R966 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2022)10-335-05

Research on the neuroprotective roles of Orexin in cell model of oxidative stress

LI Yingshuai¹, CAO Fei¹, WANG Chunmei¹, YANG Chunqing¹, LIU Xia², WANG Qinqin^{1△}

(¹ School of Mental Health, ² College of Rehabilitation Medicine, Jining Medical University, Jining 272000, China)

Abstract: Objective To explore the roles and the underlying mechanisms of orexin in oxidative stress. **Methods** HT-22 cells were randomly divided into control group, H₂O₂(hydrogen peroxide) group, OA(Orexin A) group, OB(Orexin B) group, H₂O₂+OA group and H₂O₂+OB group. The cell model of oxidative stress was constructed by treating HT-22 cells with H₂O₂. OA and OB were added to investigate the effects of orexin on cell number and morphology using microscopic analysis. The levels of Nrf2 in HT-22 cells were detected by qPCR(Quantitative Real-time PCR) and Western blotting. **Results** Compared with the control group, the cell number decreased significantly after H₂O₂ treatment ($P<0.01$); OA and OB could robustly decrease the death of HT-22 cells induced by H₂O₂ ($P<0.05$); Compared with the control group, H₂O₂ led to a significant increase of the expression level of Nrf2 in HT-22 cells ($P<0.05$); Furthermore, compared with the H₂O₂ group, OA and OB obviously enhanced the expression levels of Nrf2 in HT-22 cells. **Conclusion** All of these results suggested that orexin increased the levels of Nrf2 in HT-22 cells and decreased the injury of HT-22 cells induced by H₂O₂, leading to the neuroprotective roles in oxidative stress.

Keywords: Orexin; Oxidative stress; HT-22 cell; Hydrogen peroxide; Nrf2

^{*} [基金项目] 2020 年山东省大学生创新创业训练计划项目(S202010443058); 2020 年济宁医学院大学生创新训练计划项目(cx2020025); 山东省自然科学基金项目(ZR2021QC039); 山东省医药卫生科技发展计划项目(202002081082)。

[△] [通信作者] 王琴琴, E-mail: qqwang@mail.jnmc.edu.cn

氧化应激参与帕金森病(Parkinson's disease, PD)及阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)等神经退行性疾病的发生发展^[1]。目前关于氧化应激在 PD 等神经退行性疾病中的调节机制尚不完全明确。转录因子 Nrf2 能调控下游抗氧化酶的表达,从而参与机体代谢及抗氧化等过程中,促进个体不断适应变化的环境^[2-3];Nrf2 还参与 AD 及 PD 等多种神经退行性疾病的病理过程中^[2]。

食欲素是一种神经肽,主要是由外侧下丘脑神经元分泌,包括食欲素 A (Orexin A, OA)和食欲素 B (Orexin B, OB)^[4]。食欲素系统功能异常参与多种神经退行性疾病如 AD 及 PD 的发病过程中^[5-7]。

本研究以 H₂O₂ 诱导的 HT-22 细胞为体外氧化应激模型探讨食欲素在氧化应激过程中的作用,阐明食欲素在氧化应激中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 HT-22 细胞系购自上海通派生物公司。培养至含有 FBS (10%) 的 DMEM 培养基中,在细胞恒温培养箱(5% CO₂, 37℃)中培养,待细胞长满,传代于六孔板中,用于后续实验。

1.1.2 药品和试剂 OA 及 OB 购自 Phoenix Pharmaceuticals 公司;DMEM 购自 HyClone 公司;Nrf2 抗体购自 abclonal 公司; β -actin 抗体、羊抗鼠 IgG 及羊抗兔 IgG 购自 ZSGB-BIO。

1.2 方法

1.2.1 氧化应激细胞模型建立 HT-22 细胞种于六孔板中,加入 H₂O₂ 处理建立体外氧化应激模型。将细胞随机分为 6 组:对照组、H₂O₂ 组、OA 组、OB 组、H₂O₂+OA 组及 H₂O₂+OB 组。待细胞长至 40%~50%时,H₂O₂ 组给予 H₂O₂ (500 μ M · L⁻¹) 处理,OA 组给予 OA (10⁻⁷ M · L⁻¹) 处理,OB 组给予 OB (10⁻⁷ M · L⁻¹) 处理,H₂O₂+OA 组及 H₂O₂+OB 组中给予 H₂O₂ (500 μ mol · L⁻¹) + OA/OB (10⁻⁷ M · L⁻¹) 处理,待处理 24h 后利用显微镜观察各组细胞状态及数量,并分别拍照,用于后续计数。

1.2.2 qPCR 检测各组 Nrf2 的表达 总 RNA 提取:待细胞处理完毕,吸除培养基并用 PBS 缓冲液清洗两遍后,加入一定量的裂解液 RZ (TIANGEN 公司),待细胞充分裂解后,收集裂解液至 EP 管中 (RNase-free)。按照总 RNA 提取试剂盒 (TIAN-

GEN 公司)的说明书进行提取,将提取的 RNA 溶于适量的 RNase-Free 双蒸水中,待 RNA 充分溶解后,检测 RNA 的浓度。

反转录:根据说明书 (TIANGEN 公司),取适量提取的总 RNA (20 μ l 的反应体系里加入 50ng~2 μ g 的 RNA) 置于 EP 管 (RNase-free),按稀释比例加入 5 $\times$ gDNA Buffer,加 RNase-free 的水补齐至 20 μ l,充分混合均匀后置于 42℃ 水浴锅中反应 3min,结束后取出 EP 管置于冰上,按照相应的稀释比例加入 10 $\times$ King RT Buffer、FastKing RT Enzyme Mix 及 FQ-RT Primer Mix,加 RNase-free 的水补齐总体积 10 μ l,充分混匀后加入到前面的 gDNA 步骤的反应体系中,混合均匀后置于 42℃ 水浴锅中孵育 15min,之后 95℃ 孵育 3min。反应结束后通过 qPCR 仪检测目的基因 Nrf2 的变化水平。Nrf2 qPCR 引物如下:forward: 5'-CGTCCCTAGGTCCTT-GTTCC-3'; reverse: 5'-TCAAATCCATGTCCTGCTGGG-3'。

1.2.3 蛋白印迹检测各组 Nrf2 蛋白的表达 总蛋白提取:待细胞处理结束,将细胞内的培养基吸除干净,用 PBS 缓冲液清洗 2 遍后,然后将 PBS 吸干净,加入适量含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液 RIPA 裂解 20~30min (将样品置于冰上进行操作),待细胞充分裂解后,将裂解后的细胞转移到 1.5ml EP 管中。于 12000g,4℃ 离心 15min。将上清转移至新的 EP 管中,按比例加入适量蛋白上样缓冲液,放于 100℃ 金属浴中加热 10min,用于后续实验。

蛋白印迹:将提取的细胞蛋白样品,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法将蛋白进行分离,之后通过转膜的方法将蛋白转移到 PVDF 膜上,加入 1 $\times$ TBST 洗膜 5min,然后加入 5% 的脱脂奶粉进行封闭 1~2h,之后吸掉封闭液,加入稀释好的一抗,放于 4℃ 摇床上,过夜孵育。第二天将一抗回收,加入 1 $\times$ TBST 洗膜 3 次,每次 10~15min,倒掉 TBST,加入稀释好的二抗,然后放于室温孵育 1h,之后回收二抗,加入 1 $\times$ TBST 洗膜 3 次,每次 10~15min,洗膜完毕后,之后将底物加入到 PVDF 膜上进行显色,用 proteinsimple 仪器采集数据,并使用 ImageJ 软件进行灰度分析。

1.3 统计学方法

数据均利用 GraphPad 6.0 软件进行统计。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,多组间比较采用

方差分析,组间多重比较采用 Bqnferroni 法校正。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HT-22 细胞氧化应激模型的建立

本研究利用 H_2O_2 诱导的 HT-22 细胞为模型,

结果显示,与对照组相比,在处理 24h 的情况下,不同浓度的 H_2O_2 引起 HT-22 细胞数量不同程度地降低(图 1)。其中 $500\mu M \cdot L^{-1}$ 的 H_2O_2 处理 24h 能引起 HT-22 细胞数量降低 50% 左右。因此本研究后续均采用 $500\mu M \cdot L^{-1} H_2O_2$ 处理的 HT-22 细胞作为细胞模型。

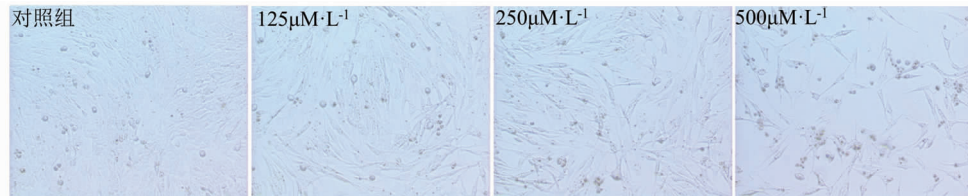
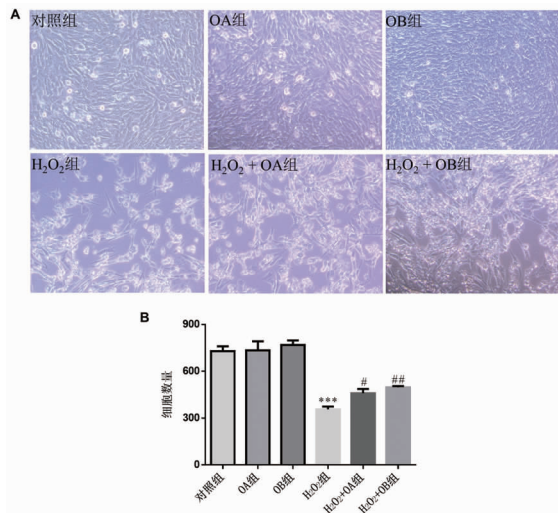


图 1 不同浓度的 H_2O_2 引起的 HT-22 细胞的变化

2.2 食欲素对 HT-22 细胞死亡的影响

与对照组相比, H_2O_2 组 HT-22 细胞数量降低约 50%, 而与 H_2O_2 组相比, OA 和 OB 显著增加 HT-22 细胞数量(约 30%), 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。因此, OA 和 OB 显著降低 H_2O_2 引起的 HT-22 细胞死亡, 说明 OA 和 OB 能显著降低 H_2O_2 对 HT-22 的神经损伤, 进而发挥神经保护作用(图 2)。



注: * * * $P < 0.001$ vs. 对照组; # $P < 0.05$ vs. H_2O_2 组;

$P < 0.01$ vs. H_2O_2 组

图 2 食欲素显著降低 H_2O_2 引起的 HT-22 细胞死亡

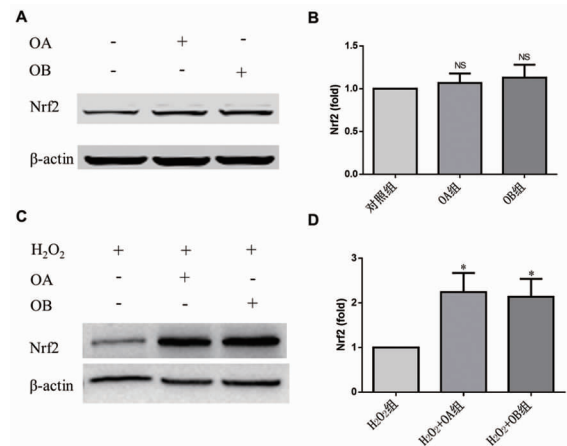
2.3 H_2O_2 对 HT-22 细胞中 Nrf2 基因表达水平的影响

qPCR 结果显示,与对照组相比, H_2O_2 组 Nrf2 基因表 $\Delta\Delta CT$ 达约为 -2.064, 说明相对于对照组, H_2O_2 显著升高 HT-22 细胞中 Nrf2 的基因表达水

平。

2.4 食欲素对 HT-22 细胞中 Nrf2 蛋白表达水平的影响

相对于对照组, OA 及 OB 对 HT-22 细胞中 Nrf2 的表达无显著影响, 而 OA 和 OB 组 HT-22 细胞中 Nrf2 的蛋白表达水平约为 H_2O_2 组的 2 倍。说明相对于 H_2O_2 组, OA 和 OB 显著升高 HT-22 细胞内 Nrf2 的蛋白表达水平(图 3), 提示 OA 和 OB 很可能通过增强 HT-22 细胞中 Nrf2 的表达水平, 进而发挥神经保护作用。



注: NS ($P > 0.05$) vs. 对照组;

* $P < 0.05$ vs. H_2O_2 组

图 3 食欲素引起的 HT-22 细胞的 Nrf2 蛋白表达水平的变化

3 讨论

氧自由基的聚集会造成细胞内蛋白质及 DNA 等的损伤, 进而引起组织及器官的功能异常, 从而

导致机体疾病的产生和发展^[8-9]。氧化应激参与多种神经系统的发生过程中^[1]。已有研究显示,食欲素参与多种氧化应激相关神经退行性疾病的病理过程中^[1],然而其在氧化应激中的具体作用机制尚不明确。本研究利用体外 H₂O₂ 诱导的 HT-22 细胞的氧化应激模型发现,H₂O₂ 显著降低 HT-22 细胞的数量,OA 及 OB 能显著降低 H₂O₂ 诱导的 HT-22 细胞的死亡,进而在细胞氧化应激模型中发挥神经保护作用。

H₂O₂ 可引起细胞成分破坏,引起氧化应激,导致细胞死亡^[10]。H₂O₂ 是用来建立氧化应激模型的常用药物,有研究者发现 600 μM · L⁻¹ 的 H₂O₂ 处理 24h 能引起 HT-22 细胞数量降低 50% 左右^[10]。这在一定程度上和本研究的实验结果是一致的。Nrf2 属于碱性亮氨酸拉链 (bZIP) 转录因子家族成员^[2],参与氧化应激过程中,并在 HT-22 细胞的氧化应激模型中发挥一定的作用^[11-12]。本研究中,与对照组相比,H₂O₂ 处理会引起 HT-22 细胞数量的显著下降,说明 H₂O₂ 对 HT-22 细胞有一定的神经毒性;与 H₂O₂ 组相比,OA 及 OB 处理均能显著增加 HT-22 细胞的数量,说明 OA 及 OB 能够减轻 H₂O₂ 的神经毒性作用;与对照组相比,H₂O₂ 显著增加 HT-22 细胞中 Nrf2 的基因表达水平,提示 Nrf2 在 H₂O₂ 诱导的氧化应激中的潜在作用;与 H₂O₂ 组相比,OA 和 OB 显著增加 HT-22 细胞内的 Nrf2 蛋白的表达水平。一方面提示 OA 及 OB 对 Nrf2 表达水平的调控作用,另一方面本研究也提示食欲素系统与 Nrf2 信号通路的相关性。

前期研究显示,OA 能显著降低氧化应激引起的 SH-SY5Y 细胞损伤^[13],这也进一步支持本研究的结论。本研究提示,Nrf2 很有可能参与到食欲素介导的神经保护作用。正常生理条件下,Keap1 会与 Nrf2 结合引起 Nrf2 进入降解途径,当外界条件改变如某些氧化应激相关刺激等存在时,会引起 Nrf2 从复合物中分离出来,进而入核,Nrf2 入核之后会引起一些抗氧化酶等的产生,从而发挥抗氧化过程^[2]。本文结果显示,H₂O₂ 显著增加 HT-22 细胞中的核因子 Nrf2 的基因表达水平,但是 H₂O₂ 对 HT-22 细胞内 Nrf2 蛋白表达的影响需要进一步探究;而食欲素显著增强 HT-22 细胞内 Nrf2 蛋白的表达,因此我们推测食欲素很有可能是通过增强 HT-22 细胞内 Nrf2 的表达及入核,进而引起抗氧化应激相关因子的产生,从而降低 H₂O₂ 引起的

HT-22 细胞的死亡^[2]。而 Nrf2 在其中的具体作用机制需要进一步采用动物实验和细胞实验去阐释。

综上,本课题研究结果显示食欲素能增强 H₂O₂ 引起的 HT-22 细胞的 Nrf2 的表达水平,并降低 H₂O₂ 引起的 HT-22 细胞的神经损伤,发挥神经保护作用。而关于食欲素对 Nrf2 的具体调控机制还需要进一步探究。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Kononova J, Gerasymchuk D, Parkkinen I, et al. Interplay between microRNAs and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (23): 6055. DOI: 10.3390/ijms20236055.
- [2] Fao L, Mota SI, Rego AC. Shaping the Nrf2-ARE-related pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 54: 100942. DOI: 10.1016/j.arr.2019.100942.
- [3] Wang X, Chen XX, Zhou WQ, et al. Ferroptosis is essential for diabetic cardiomyopathy and is prevented by sulforaphane via AMPK/NRF2 pathways [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12 (2): 708-722. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.10.005.
- [4] Han Y, Yuan K, Zheng YB, et al. Orexin receptor antagonists as emerging treatments for psychiatric disorders [J]. *Neurosci Bull*, 2020, 36 (4): 432-448. DOI: 10.1007/s12264-019-00447-9.
- [5] Liguori C, Spanetta M, Izzi F, et al. Sleep-wake cycle in Alzheimer's disease is associated with tau pathology and orexin dysregulation [J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 74 (2): 501-508. DOI: 10.3233/JAD-191124.
- [6] Shimizu S, Takenoshita N, Inagawa Y, et al. Positive association between cognitive function and cerebrospinal fluid orexin A levels in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 73 (1): 117-123. DOI: 10.3233/JAD-190958.
- [7] Huang S, Zhao ZX, Ma JJ, et al. Increased plasma orexin-A concentrations are associated with the non-motor symptoms in Parkinson's disease patients [J]. *Neurosci Lett*, 2021, 741: 135480. DOI: 10.1016/j.neulet.2020.135480.
- [8] Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22 (3): 377-388. DOI: 10.1038/cdd.2014.150.

(下转第 343 页)

- [10] 陈婉真,梅淑莺,吴佳恬.父母考试态度与焦虑对国中子女考试焦虑与学习被动性之影响[J].中华辅导与咨商学报,2010(27):285-328.
- [11] 曹钧,董爱民,张宁.青少年逆反心理的相关因素研究[J].精神医学杂志,2008(2):86-88. DOI:10.3969/j.issn.1009-7201.2008.02.003.
- [12] 王玲晓,张丽娅,常淑敏.中考家庭社会经济地位与学习投入的关系:父母教育期望和父母教养行为的多重中介作用[J].中国特殊教育,2018(12):75-81. DOI:10.3969/j.issn.1007-3728.2018.12.013.
- [13] Igartua JJ, Hayes AF. Mediation, moderation, and conditional process analysis: concepts, computations, and some common confusions [J]. Span J Psychol, 2021, 24:49. DOI:10.1017/SJP.2021.46.
- [14] 温忠麟,侯杰泰,张雷.调节效应与中介效应的比较和应用[J].心理学报,2005(2):268-274.
- [15] 汤彩云,卢永彪,杨超,等.亲子间教育期望差异与临考学生积极情感的关系:亲子沟通与学业自我效能感的中介作用[J].贵州师范大学学报(自然科学版),2022,40(4):114-120. DOI:10.16614/j.gznuj.zrb.2022.04.017.
- [16] 郭筱琳,何苏日那,秦欢,等.亲子间教育期望差异对小学生情感幸福感的影响:学业成绩和学业自我效能感的中介作用[J].心理发展与教育,2019,35(4):467-477. DOI:10.16187/j.cnki.issn1001-4918.2019.04.10.
- [17] 余秀兰.父母社会背景、教育价值观及其教育期望[J].南京师大学报(社会科学版),2020(4):62-74.
- [18] 朱绍宁,王金明,李慧,等.特殊儿童父母亲职压力与生活质量的关系:养育效能感的中介作用[J].济宁医学院学报,2021,44(3):171-174. DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2021.03.005.
- [19] 刘莹,郭瑞,李文平.什么影响了弱势职业阶层子女的学业成就—基于中国教育追踪调查基线数据的分析[J].复旦教育论坛,2021,19(3):54-60. DOI:10.13397/j.cnki.fef.2021.03.007.
- [20] 胡咏梅,元静.学校投入与家庭投入哪个更重要?—回应由《科尔曼报告》引起的关于学校与家庭作用之争[J].华东师范大学学报(教育科学版),2021,39(1):1-25. DOI:10.16382/j.cnki.1000-5560.2021.01.001.
- [21] 段照明,贾雨航,李圣洁,等.父母关系感知与大学生攻击性行为:手机成瘾的中介作用[J].济宁医学院学报,2021,44(6):407-410. DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2021.06.007.
- [22] 陈艳艳.第一代大学生家长参与对学业投入的影响分析—基于自我决定理论的视角[J].安徽农业大学学报(社会科学版),2021,30(6):124-132. DOI:10.19747/j.cnki.1009-2463.2021.06.018.
- [23] 谢爱磊,洪岩璧.社会资本概念在教育研究中的应用—综述与评论[J].清华大学教育研究,2017,38(1):21-30. DOI:10.14138/j.1001-4519.2017.01.002110.
- [24] Ryff CD, Lee YH, Essex MJ, et al. My children and me: midlife evaluations of grown children and of self [J]. Psychology and Aging, 1994, 9(2):195-205. DOI:10.1037/0882-7974.9.2.195.

(收稿日期 2022-03-09)

(本文编辑:石俊强)

(上接第 338 页)

- [9] Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine [J]. Redox Biol, 2015, 4: 180-183. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002.
- [10] Wu XQ, Luo P, Rao W, et al. Homer1a attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative damage in HT-22 cells through AMPK-dependent autophagy [J]. Front Neurosci, 2018, 12: 51. DOI: 10.3389/fnins.2018.00051.
- [11] Jiang T, Cheng H, Su JJ, et al. Gastrudin protects against glutamate-induced ferroptosis in HT-22 cells through Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Toxicol In Vitro, 2020, 62: 104715. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.104715.
- [12] Xu BT, Qin YY, Li D, et al. Inhibition of PDE4 protects neurons against oxygen-glucose deprivation-induced endoplasmic reticulum stress through activation of the Nrf2/HO-1 pathway [J]. Redox Biol, 2020, 28: 101342. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101342.
- [13] Wang CM, Yang CQ, Cheng BH, et al. Orexin-A protects SH-SY5Y cells against H₂O₂-induced oxidative damage via the PI3K/MEK1/2/ERK1/2 signaling pathway [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2018, 32. DOI: 10.1177/2058738418785739.

(收稿日期 2022-07-22)

(本文编辑:石俊强)