

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.19.002

Homer1b/c 在缺氧复氧损伤神经元中的保护作用研究 *

苏敬敬 陶晓晓 舒 良 潘 辉 翟 宇[△]

(上海交通大学医学院附属第九人民医院神经内科 上海 200011)

摘要 目的:探讨 Homer1b/c 在缺氧复氧损伤神经元中的作用。**方法:**构建 pcDNA3.1-Homer1b/c 质粒和 Homer1b/c siRNA,过表达及 siRNA 干扰 Neuro-2a 细胞中 Homer1b/c 的水平,western blot 分析观察上调及下调 Homer1b/c 后 Homer1b/c 的蛋白表达变化,再予细胞缺氧复氧损伤处理,观察细胞生存率、乳酸脱氢酶(Lactic dehydrogenase, LDH)释放量及 caspase-3 活性的变化。**结果:**过表达及 siRNA 干扰 Homer1b/c 后,Homer1b/c 的蛋白水平分别较正常组明显增高及降低 (P 值分别 <0.01),提示过表达及干扰 Homer1b/c 的效果均明显,分别能明显提高及降低 Homer1b/c 的水平。在缺氧复氧损伤条件下,Homer1b/c 过表达组较空质粒转染组,其细胞生存率明显增加,LDH 释放量、caspase-3 活性明显降低 (P 值分别 <0.05);相反,下调 Homer1b/c 的水平后,与 control siRNA 转染组相比,细胞生存率明显降低,而 LDH 释放量和 caspase-3 活性明显增加 (P 值分别 <0.05)。**结论:**Homer1b/c 在缺氧复氧损伤神经元中具有神经保护作用。

关键词:Homer1b/c;缺氧复氧;神经保护;过表达;siRNA 干扰

中图分类号:R741.02 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)19-3605-04

Homer1b/c Neuroprotection under Hypoxia/reoxygenation-induced Neuronal Injury*

SU Jing-jing, TAO Xiao-xiao, SHU Liang, PAN Hui, ZHAI Yu[△]

(Department of Neurology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200011, China)

ABSTRACT Objective: To explore the role of Homer1b/c in hypoxia/reoxygenation-induced neuronal injury. **Methods:** The plasmids with pcDNA3.1-Homer1b/c and Homer1b/c small interfering RNA (siRNA) were constructed for over-expression and down-expression of Homer1b/c in Neuro-2a cells. Western blot analysis was determined to detect Homer1b/c protein levels after over-expression and down-expression of Homer1b/c. Cells were treated with hypoxia and reoxygenation (hypoxia/reoxygenation). The changes in cell viability, lactic dehydrogenase (LDH) release and caspase-3 activity were observed. **Results:** Compared with normal control group, Homer1b/c protein levels were markedly promoted and reduced in pcDNA3.1-Homer1b/c- and Homer1b/c siRNA-transfected cells, respectively, suggesting that Homer1b/c over-expression and down-expression were able to up-regulate and down-regulate Homer1b/c expression (P value<0.01). Under hypoxia/reoxygenation condition, compared with pcDNA3.1-transfected cells, there was a significant increase in cell viability, decreases in LDH release and caspase-3 activity in Homer1b/c over-expression cells (P value<0.05, respectively). In contrast, compared with control siRNA-transfected cells, Homer1b/c down-expression group produced opposite results, characterized by a significant decrease in cell viability, increases in LDH release and caspase-3 activity (P value<0.05, respectively). **Conclusion:** Homer1b/c plays a neuroprotective role in hypoxia/reoxygenation-induced neuronal injury.

Key words: Homer1b/c; Hypoxia/reoxygenation; Neuroprotection; Over-expression; Small interfering RNA

Chinese Library Classification(CLC): R741.02 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)19-3605-04

前言

Homer 蛋白属于新近发现的突触后密度(Post-synaptic density, PSD)蛋白家族成员。目前认为,Homer 家族包括 3 种基因,分别为 Homer1, Homer2 和 Homer3,其中 Homer1 包含三种剪切异构体,分别为短链形式的 Homer1a,以及长链形式的 Homer1b 和 1c^[12]。而 Homer1b 和 1c 在结构及功能方面较类

似,其 C 末端均包含一段螺旋(CC)结构域,该结构域介导 Homer 同型二聚体及四聚体的形成,因此,人们习惯于将它们统称为 Homer1b/c^[2]。研究表明,Homer1b/c 调控代谢型谷氨酸受体(Metabotropic glutamate receptors, mGluRs)功能及胞内钙离子的释放^[3,4],而其在缺氧复氧损伤神经元中的作用目前仍不清楚。

为明确 Homer1b/c 在缺氧复氧损伤神经元中的作用,本研

* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(81200941)

作者简介:苏敬敬(1976-),女,博士,主治医师,主要从事脑血管病方面研究,电话:13761034024,E-mail:jingjingsu2000@163.com

△ 通讯作者:翟宇,E-mail:diyumail@126.com

(收稿日期:2015-02-14 接受日期:2015-03-05)

究采用转染效率高且分化良好的小鼠脑神经元细胞株 Neuro-2a^[5],并在缺氧复氧条件下模拟神经元体内缺氧过程,通过构建 pcDNA3.1-Homer1b/c 和 Homer1b/c siRNA,过表达及干扰 Neuro-2a 细胞中 Homer1b/c 的水平,研究在该条件下 Homer1b/c 的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠脑神经元细胞株(Neuro-2a)购自中国科学院细胞库。RT-PCR 反应试剂盒、EcoRI 和 BamHI 内切酶均购自 TaKaRa 公司。DME 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 和质粒纯化试剂盒购于 Sigma。转染试剂 Lipofectamine™2000 和 FuGENE 6 分别购自 Invitrogen 和 Roche 公司。兔抗 Homer 抗体和小鼠抗 GAPDH 抗体分别购自 Proteintech Group 和 Santa Cruz 公司。CCK-8 细胞计数试剂盒购自 Dojindo Molecular Technologies。乳酸脱氢酶 (Lactic dehydrogenase, LDH)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。Caspase-3 活性试剂盒购自 Chemicon 公司。

1.2 方法

1.2.1 Neuro-2a 细胞培养 Neuro-2a 细胞生长于含 10% 已灭活胎牛血清的 DMEM 培养基中 (含 100 U/mL 青霉素和 50 μg/mL 链霉素),37 °C、5%CO₂ 饱和湿度的温箱中培养,每两天换液一次。

1.2.2 缺氧再复氧细胞模型建立 取分化良好的 Neuro-2a 细胞(胰酶消化细胞后 72 h 以上),吸出培养皿中的培养液置另一无菌培养皿中备用。将培养液先用无氧混合气体(含 5% CO₂、10% H₂ 和 85% N₂,氧浓度 <1%)饱和,加入该培养皿中并置厌氧培养箱内培养,90 min 后取出细胞,加入吸出备用的培养液,置常氧培养箱内继续培养。

1.2.3 Homer1b/c 过表达及 siRNA 干扰 pcDNA3.1-Homer1b/c 质粒构建:使用 Trizol 试剂提取小鼠脑组织 Homer1b/c RNA,后经 RT-PCR 反应,将所得的 cDNA 作为模板行 PCR 反应,并将扩增片段克隆入载体 pcDNA3.1-Myc 中。小鼠 pcDNA3.1-Homer1b/c 引物为 F:5'-AAGAATTCATGGGGGAACAAC-CTATC-3',R 5'-AAGGATCCTTAGCTGCATTCTAGTAG-3',其中 EcoRI 和 BamHI 为酶切位点。

Homer1b/c siRNA 设计:设计小鼠 Homer1b/c siRNA 序列:Sense:5'-UCAGUUUAGAUGGCUCAAA-3',antisense:5'-UUUGAGCCAUCUAAACUGA-3',于 Invitrogen 公司合成上述碱基序列,合成后于每管中加入 600 μL DEPC 水,配成 20 μM 溶液,-80 °C 保存备用。

转染: 分别将 pcDNA3.1-Homer1b/c 质粒和 Homer1b/c siRNA 转染至 Neuro-2a 细胞,转染试剂分别为 Lipofectamine™2000 和 FuGENE 6。

1.2.4 Western blot 细胞经 SDS 裂解液裂解,行 SDS-PAGE 电泳,湿式转膜,封闭后经一抗、二抗孵育,最后取等量 ECL A+B 液,混匀后滴于 Parafilm 膜上,沥干后 kodak 医用 X 光片压片,显影。

1.2.5 细胞生存率分析 细胞生存率采用 CCK-8 细胞计数试剂盒检测。DMEM 培养液与 CCK-8 溶液按 10:1 的比例混合均

匀,弃去原始培养液,每孔加入 CCK-8 溶液混合液,37 °C、5% CO₂ 条件下避光孵育 4 h,在 450 nm 波长下测定各孔的吸光度 OD 值,制作生存曲线。

1.2.6 LDH 释放量检测 LDH 释放量采用 LDH 试剂盒检测。弃去细胞培养液,用正常细胞液洗涤 3 次,每孔各加入 60 μL LDH 检测工作液混匀,室温避光孵育 30 min,然后各孔中再加入 50 μL 终止液,在 490 nm 处测定吸光度 OD 值。

1.2.7 Caspase-3 活性测定 Caspase-3 活性采用 caspase-3 活性试剂盒检测,将细胞裂解液离心,提取上清液中的蛋白,按照每个样品中提取 100 μg 蛋白加入 96 孔板内,然后每孔各加入 10 μL caspase-3 活性底物,37 °C 避光孵育 2 h。最后荧光酶标仪激发波长 405 nm,发射波长 505 nm 测定各孔的吸光度 OD 值。

2 结果

2.1 过表达及 siRNA 干扰 Homer1b/c 后其蛋白水平检测

Neuro-2a 细胞中 siRNA 干扰及过表达 Homer1b/c 后,Homer1b/c 的蛋白水平分别较正常组明显降低及增高 (P 值分别 <0.01)(图 1),提示干扰及过表达 Homer1b/c 的效果均明显,分别能明显降低及提高 Homer1b/c 的表达。

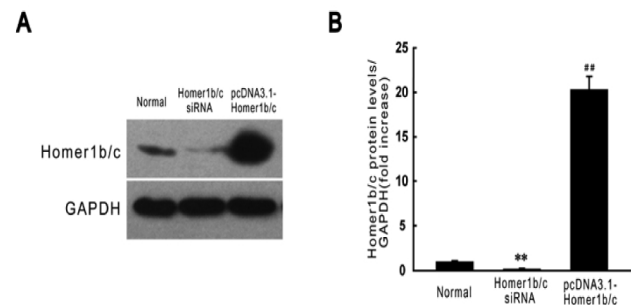


图 1 下调及上调 Homer1b/c 后 Homer1b/c 的蛋白表达

Fig. 1 The protein expression of Homer1b/c after down-expression and up-expression of Homer1b/c

**P<0.01 vs Normal; ##P<0.01 vs Normal.

2.2 Homer1b/c 提高了缺氧细胞生存率和降低了 LDH 的释放

在空质粒转染组,缺氧处理较无缺氧处理的细胞,细胞生存率明显降低(P<0.05),LDH 释放明显增加 (P<0.05),提示缺氧处理使细胞受到损伤(图 2A-D)。在缺氧条件下,Homer1b/c 过表达组较空质粒转染组,其细胞生存率明显增加,细胞 LDH 释放明显降低 (P 值分别 <0.05),提示过表达 Homer1b/c 有抗细胞凋亡作用 (图 2A,C); 相反,Homer1b/c siRNA 后较 control siRNA 转染组,其细胞生存率明显降低,LDH 释放明显增加 (P 值均 <0.05),提示 Homer1b/c 干扰后加重了细胞的缺氧性损伤(图 2B,D)。

2.3 Homer1b/c 降低了缺氧细胞中 caspase-3 活性

在缺氧条件下,Homer1b/c 上调组较空质粒转染组,其细胞 caspase-3 活性明显降低,差异具有显著意义,P<0.05 (图 3A); 而 Homer1b/c 下调组较 control siRNA 转染组,其细胞 caspase-3 活性明显增高,P<0.05 (图 3B),进一步提示 Homer1b/c 在缺氧诱导的 Neuro-2a 细胞损伤中有抗凋亡作用。

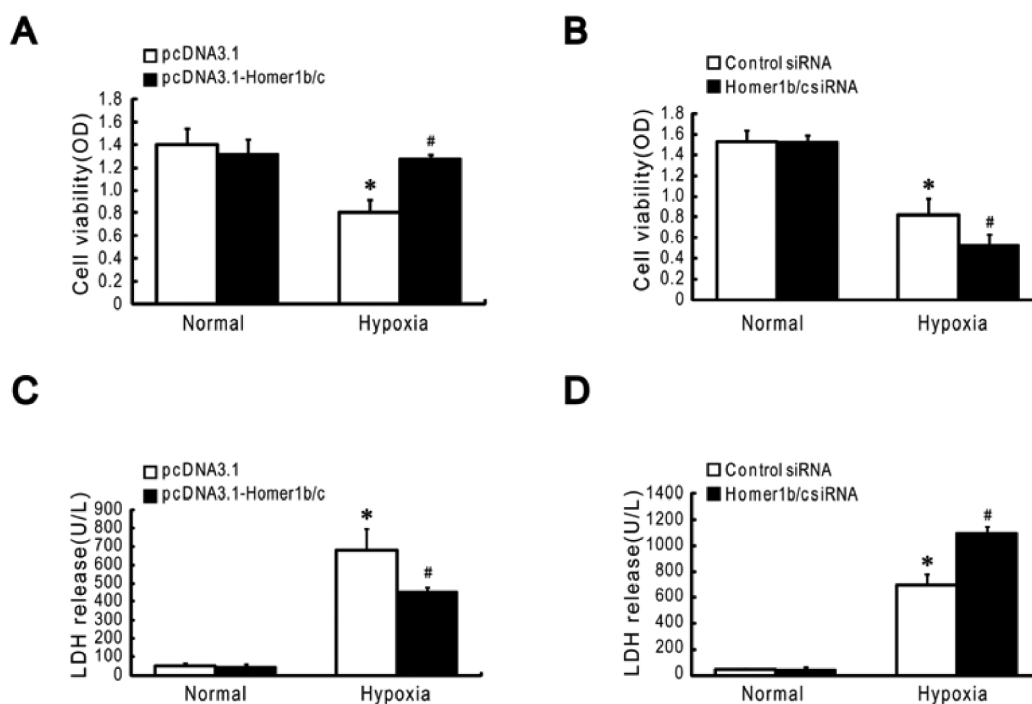


图2 过表达及 siRNA 干扰 Homer1b/c 后细胞生存率、

LDH 释放的变化

Fig. 2 The changes in cell viability and LDH release after over-expression and small interfering RNA of Homer1b/c

* $P < 0.05$ vs pcDNA3.1- or control siRNA-transfected cells under normal conditions; # $P < 0.05$ vs pcDNA3.1- or control siRNA-transfected cells under hypoxia.

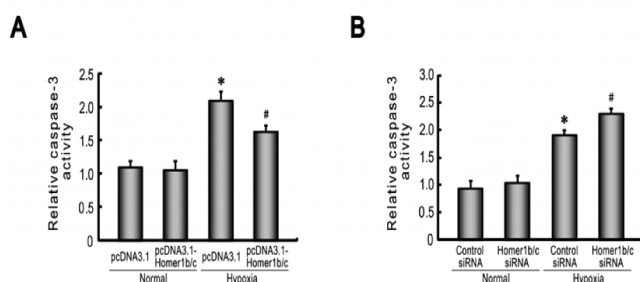


图3 过表达及 siRNA 干扰 Homer1b/c 后细胞 caspase-3 活性的变化

Fig. 3 The changes in caspase-3 activity after over-expression and small interfering RNA of Homer1b/c

* $P < 0.05$ vs pcDNA3.1- or control siRNA-transfected cells under normal conditions; # $P < 0.05$ vs pcDNA3.1- or control siRNA-transfected cells under hypoxia.

3 讨论

Homer1b/c 是新近发现的构架蛋白, 位于突触后致密区 (PSDs)。它可与 I 组代谢型谷氨酸受体 (mGluR1a/5) 的胞浆 C 端结合, 并偶联于内质网跨膜蛋白 IP3Rs 和 Shank^[6-8]。Homer1b/c 通过其 N 端的 EVH1 区域与其它蛋白结合, 而作为 Homer1b/c 结合配体的序列是 PxxF 基序。研究表明, Homer1b/c 可调控 mGluR1s 蛋白的膜定位和突触后组装, 还可调控 mGluR1s 偶联于 G 蛋白的能力, 及胞内钙池对 IP3 和 ryanodine 受体的敏感性^[9,10]。又有证据表明, Homer1b/c 与 Shank 的相互作用可调节轴突生长及突触的形成^[11]。基于上述 Homer1b/c 在生理状态

下的调控作用, 人们逐渐对其在各种病理损伤条件下的作用产生兴趣。众所周知, 谷氨酸系统与神经心理性疾病的发生发展密切相关, 且谷氨酸受体与 Homer1b/c 之间存在相互作用, 提示人们开始探索 Homer1b/c 在心理应激损伤中的作用, 人们发现, Homer1b/c 可介导调控小鼠急性、慢性应激认知功能障碍, 且认为 Homer1b/c 可能成为新一代抗抑郁药的治疗靶点^[3,10]。又有研究表明, 在脂多糖诱导的神经炎症反应中, Homer1b/c 明显提高了炎症因子的表达, 提示 Homer1b/c 加剧了脂多糖诱导的神经炎症反应^[11]。因此, 我们推测 Homer1b/c 不同的作用可能因不同的损伤条件而存在差异。目前, 有关 Homer1b/c 在缺氧复氧损伤神经元中的作用研究仍未见报道。本课题组前期通过上调及下调神经元中 Homer1b/c 的表达, 再予细胞缺氧复氧损伤处理和组织型激肽释放酶 (Tissue kallikrein, TK) 干预, 我们发现 Homer1b/c 参与了 TK 的神经元保护作用^[9], 因此, 这些结果提示我们, Homer1b/c 在缺氧复氧神经元损伤中是否也发挥了一定的保护作用? 本研究通过过表达及 siRNA 干扰 Neuro-2a 细胞中的 Homer1b/c 基因, 再予细胞缺氧复氧处理, 发现过表达 Homer1b/c 后较空质粒转染组, 细胞生存率明显增加, LDH 释放、caspase-3 活性明显降低, 而下调 Homer1b/c 表达后, 其细胞生存率明显降低, LDH 释放、caspase-3 活性明显增加。提示 Homer1b/c 对缺氧复氧损伤神经元可能起到一定的保护作用。

目前认为, mGluR1s 在生理状况下具有抗神经细胞凋亡的作用, 但其确切分子机制并不清楚^[12-14]。近年, Rong 等^[15]又报道了一种新的磷酸肌醇 3 激酶增强子 (Phosphoinositide 3 kinase enhancer, PIKE), 并将其命名为 PIKE-L, 该分子主要定位于神

经元胞浆和胞核,它可与 Homer1b/c 形成蛋白复合体,并将 mGluRI 和磷酸肌醇激酶 3 (Phosphoinositide 3-kinase, PI3K)两者功能联系起来。研究表明,mGluRI 的激动剂 Quisqualate刺激可促进 mGluRI-Homer-PIKE-L 复合体的形成,该复合体可激活下游 PI3K,PI3K 转位至核内激活 Akt,从而抑制神经元凋亡。并且发现,mGluRI 接受激动剂刺激及下游 PI3K 激活后的抗凋亡作用均依赖于该复合体的形成。因此,mGluRI-Homer-PIKE-L 复合体在 mGluRI 与下游生存信号分子 PI3K 之间起桥梁的作用,推测它的形成可能是 mGluRI 受体激动后抑制细胞凋亡的机制之一^[15-18]。本研究我们在缺氧诱导的 Neuro-2a 细胞损伤中,通过上调及下调 Homer1b/c 的表达,发现 Homer1b/c 具有抗细胞凋亡作用。因此,我们推测 Homer1b/c 上调后的抗凋亡机制可能是通过促进 mGluRI-Homer-PIKE-L 复合体的形成而实现。另有研究表明,下调 Homer1b/c 的表达明显降低了 mGluRI 的水平,据此我们推测,如果上调 Homer1b/c 的水平可能出现 mGluRI 水平的提高^[19-21],这些均提示我们,Homer1b/c 的保护作用可能通过 mGluRI 的保护作用实现。

总之,我们的研究显示在缺氧复氧损伤神经元中,上调 Homer1b/c 的表达能明显提高细胞生存率,降低 LDH 释放及 caspase-3 活性,而下调其表达后作用恰相反,细胞生存率明显降低,LDH 释放及 caspase-3 活性明显增加,提示在缺氧复氧损伤条件下,Homer1b/c 可能发挥一定的抗神经元细胞凋亡作用,结合 Rong 等^[15]文献报道,分析 Homer1b/c 的保护作用可能通过促进 mGluRI-Homer-PIKE-L 复合体的形成而实现。但本文仅在细胞水平层面研究 Homer1b/c 的作用,今后可在动物脑缺血再灌注损伤模型中对其功能进一步验证,通过制作 Homer1b/c 基因敲除小鼠,后行大脑中动脉缺血再灌注损伤处理,观察小鼠行为学、组织学变化,研究 Homer1b/c 在小鼠脑缺血再灌注损伤中的作用及探讨其机制。本研究通过对缺氧复氧损伤神经元中 Homer1b/c 作用的深入研究,有望寻找缺血性脑损伤新的治疗靶点,为缺血性卒中的防治提供新的治疗策略。

参考文献(References)

- [1] Wang Q, Chikina MD, Pincas H, et al. Homer1 alternative splicing is regulated by gonadotropin-releasing hormone and modulates gonadotropin gene expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34 (10): 1747-1756
- [2] Su JJ, Pan H, Zhou HG, et al. Acid-sensing ion channels activation and hypoxia upregulate Homer1a expression [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(3): 264-274
- [3] Wagner KV, Hartmann J, Labermaier C, et al. Homer1/mGluR5 Activity Moderates Vulnerability to Chronic Social Stress [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2015, 40: 1222-1233
- [4] Murotomi K, Takagi N, Muroyama A, et al. Transient focal cerebral ischemia differentially decreases Homer1a and 1b/c contents in the postsynaptic density[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 515(1): 92-96
- [5] Su J, Tang Y, Zhou H, et al. Tissue kallikrein protects neurons from hypoxia/reoxygenation-induced cell injury through Homer1b/c [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(11):2205-2215
- [6] Shaffer C, Guo ML, Fibuch EE, et al. Regulation of group I metabotropic glutamate receptor expression in the rat striatum and prefrontal cortex in response to amphetamine in vivo [J]. *Brain Res*, 2010, 1326: 184-192
- [7] de Bartolomeis A, Tomasetti C, Cicale M, et al. Chronic treatment with lithium or valproate modulates the expression of Homer1b/c and its related genes Shank and Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2012, 22(7): 527-535
- [8] Lv MM, Cheng YC, Xiao ZB, et al. Down-regulation of Homer1b/c attenuates group I metabotropic glutamate receptors dependent Ca^{2+} signaling through regulating endoplasmic reticulum Ca^{2+} release in PC12 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(4): 1568-1574
- [9] Knackstedt LA, Moussawi K, Lalumiere R, et al. Extinction training after cocaine self-administration induces glutamatergic plasticity to inhibit cocaine seeking[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(23): 7984-7992
- [10] Wagner KV, Hartmann J, Mangold K, et al. Homer1 mediates acute stress-induced cognitive deficits in the dorsal hippocampus [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(9): 3857-3864
- [11] Cui Z, Zhou L, Liu C, et al. The Role of Homer1b/c in Neuronal Apoptosis Following LPS-Induced Neuroinflammation [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(1): 204-215
- [12] Kalda A, Zharkovsky A. Metabotropic glutamate receptor agonists protect from oxygen-glucose deprivation- and colchicine-induced apoptosis in primary cultures of cerebellar granule cells [J]. *Neuroscience*, 1999, 92(1): 7-14
- [13] Kalda A, Kaasik A, Vassiljev V, et al. Neuroprotective action of group I metabotropic glutamate receptor agonists against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal death [J]. *Brain Res*, 2000, 853(2): 370-373
- [14] Copani A, Bruno V, Battaglia G, et al. Activation of metabotropic glutamate receptors protects cultured neurons against apoptosis induced by beta-amyloid peptide[J]. *Mol Pharmacol*, 1995, 47(5): 890-897
- [15] Rong R, Ahn JY, Huang H, et al. PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluRI to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis[J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(11): 1153-1161
- [16] Guhan N, Lu B. Homer-PIKE complex: a novel link between mGluRI and PI 3-kinase[J]. *Trends Neurosci*, 2004, 27(11): 645-648
- [17] Chan CB, Ye K. PIKE GTPase are phosphoinositide-3-kinase enhancers, suppressing programmed cell death [J]. *J Cell Mol Med*, 2007, 11(1): 39-53
- [18] Zhu DY, Zhou LM, Zhang YY, et al. Involvement of metabotropic glutamate receptor 5 in cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(12): 2130-2141
- [19] Chen T, Fei F, Jiang XF, et al. Down-regulation of Homer1b/c attenuates glutamate-mediated excitotoxicity through endoplasmic reticulum and mitochondria pathways in rat cortical neurons [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(1): 208-217
- [20] Obara I, Goulding SP, Gould AT, et al. Homers at the Interface between Reward and Pain[J]. *Front Psychiatry*, 2013, 4: 39
- [21] Fei F, Rao W, Zhang L, et al. Down regulation of Homer1b/c improves neuronal survival after traumatic neuronal injury [J]. *Neuroscience*, 2014, 267: 187-194