

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.21.004

# Juxtanodin(JN)表达下调对少突胶质细胞氧化应激损伤的影响\*

王 涛 曹冰清 薛延莉 费裕朗 杨 谦

(陕西省人民医院神经内二科 陕西 西安 710068)

**摘要 目的:**探讨 JN 表达下调对少突胶质细胞氧化应激损伤的影响及其可能的机制。**方法:**采用大脑中动脉线栓法制备小鼠局灶性脑缺血模型,通过 mNSS 评分分析 JN<sup>-/-</sup> 小鼠及其同窝阴性对照鼠神经功能缺损的情况。通过制备少突胶质细胞系 OLN93 的氧糖剥夺模型(oxygen glucose deprivation, OGD)模拟脑白质缺血的病理改变。使用 siRNA 下调模型细胞中 JN 的表达,分析 JN 表达下调后模型细胞的存活情况以及与氧化应激有关的指标如乳酸盐脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)活性、一氧化氮(Nitric Oxide, NO)及丙二醛(Methane Dicarboxylic Aldehyde, MDA)等的变化情况;并通过 western blot 检测 BNIP3(Bcl-2/E1B-19K-interacting protein 3, BNIP3)的表达变化。**结果:**JN<sup>-/-</sup> 小鼠 mNSS 评分较其同窝阴性对照鼠升高( $P<0.05$ )。OGD 模型细胞与对照组相比,其存活率及 SOD 活性分别下降 35.82%及 37.27%,LDH 活性、MDA 及 NO 水平分别升高 52.01%,86.15%及 149.78%,且 BNIP3 蛋白表达上调 461%( $P<0.01$ )。而与 OGD 模型组相比,JN 表达下调可使细胞存活率和 SOD 活性分别下降 33.23%及 33.31%,而 LDH 的释放、MDA 及 NO 水平分别增加 58.12%,57.02%及 52.64%,且 BNIP3 表达上调 72%( $P<0.01$ )。**结论:**敲除 JN 使小鼠在脑缺血后神经功能恶化,而 JN 表达下调可使少突胶质细胞对氧化应激损伤更敏感,其机制可能与 BNIP3 表达上调有关。

**关键词:**少突胶质细胞;Juxtanodin;氧化应激

**中图分类号:**R-33;R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)21-4017-05

## The Effects of Juxtanodin (JN) Downregulation on the Oxidative Stress Injury of Oligodendrocytes\*

WANG Tao, CAO Bing-qing, XUE Yan-li, FEI Yu-lang, YANG Qian

(The No.2 Department of Neurology, Shaanxi Province People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects and the related mechanism of Juxtanodin (JN) downregulation on the oxidative stress injury of oligodendrocytes. **Methods:** The mNSS neuroscore for cerebral ischemic changes was performed on JN<sup>-/-</sup> mice and its negative control littermates through middle cerebral artery occlusion (MCAO). To simulate cerebral white matter ischemia, oligodendrocyte cell line OLN93 was induced by oxygen glucose deprivation (OGD). Then the cell viability, the levels of LDH, SOD, NO, MDA and the expression of BNIP3 that related to the process of oxidative stress were analyzed with or without JN siRNA. **Results:** The mNSS neuroscore of JN<sup>-/-</sup> mice was higher than its negative control littermates after MCAO and there was a significant difference between the two groups ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the cell survival rate and SOD activities in OGD injury group were significantly reduced by 35.82% and 37.27%, respectively ( $P<0.01$ ). Meanwhile, the LDH leakage rate was increased by 52.01%, and the level of MDA and NO was increased by 86.15% and 149.78%, respectively ( $P<0.01$ ). In addition, the expression of BNIP3 in OGD injury group was upregulated by 461%( $P<0.01$ ). More importantly, compared with the OGD group, decreased expression of JN by siRNA significantly further reduced the cell viability and SOD activities by 33.23% and 33.31%, respectively ( $P<0.01$ ). Meanwhile, the LDH leakage rate was increased by 58.12% ( $P<0.01$ ), and the level of MDA and NO was increased by 57.02% and 52.64%, respectively ( $P<0.01$ ). The expression of BNIP3 was significantly upregulated by 72% ( $P<0.01$ ). **Conclusions:** Knockdown of JN deteriorated the neurological function of mice suffered from cerebral ischemic disease. The oligodendrocytes was more vulnerable to oxidative stress injury when JN was down-regulated, which may be associated with the increased expression of BNIP3.

**Key words:** Oligodendrocyte; Juxtanodin; Oxidative stress

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

**Article ID:** 1673-6273(2018)21-4017-05

### 前言

脑梗死是一种病因和发病机制复杂的神经内科常见急症<sup>[1]</sup>。在脑梗死病变中,造成神经功能缺损的直接原因是灰质内神经

\* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(31100787);陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2017JM8029);

陕西省社会发展科技攻关项目(2014K11-03-02-07)

作者简介:王涛(1978-),博士,主要研究方向:脑血管病,基因工程, E-mail: wangt78@fmmu.edu.cn, 电话: 13488100945

(收稿日期:2018-04-29 接受日期:2018-05-25)

元细胞因缺血缺氧发生坏死<sup>[2]</sup>。然而,随着研究的深入,人们发现脑白质中少突胶质细胞及其形成的髓鞘的病变在其中也具有重要地位<sup>[3]</sup>。例如,当实验性地剥夺氧及葡萄糖后,少突胶质细胞胞体迅速肿胀,并蔓延至其形成髓鞘的突起,最终引造成轴突呈串珠样改变。这种形态学的改变是不可逆的,即使恢复能量供应,少突胶质细胞及髓鞘的结构破坏仍会继续,轴突最终也会丧失功能<sup>[4]</sup>。据统计,在脑缺血 60 分钟后即会出现不可逆的少突胶质细胞的死亡及轴突的丢失,从而造成脑白质功能障碍<sup>[5]</sup>。而在此病变过程中,氧化应激反应及其产物具有关键作用<sup>[6,7]</sup>。Juxtannodin(JN)是一种少突胶质细胞骨架蛋白,参与髓鞘形成<sup>[8]</sup>。JN 能够通过与 F-actin 直接结合,使细胞骨架发生变动,从而促进少突胶质细胞突起生长及形态变化,与少突胶质细胞的分化成熟及髓鞘形成关系密切<sup>[9]</sup>。由于在脑梗死过程中,少突胶质细胞因缺血缺氧迅速发生形态学改变,故 JN 在此过程中可能发挥一定作用。目前,JN 在中枢神经系统疾病,特别是缺血性脑血管病中的作用尚无报道,本研究探索在缺血缺氧条件下,JN 表达下调或缺失对实验动物神经功能及体外细胞系氧化应激的影响,并探讨其可能的作用机制。为进一步研究 JN 在脑梗死引起的氧化应激损伤的作用提供更多的实验依据及线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

少突胶质细胞系 OLN93 细胞为陕西省人民医院实验中心保存。DMEM 培养基购自 GIBCO (Invitrogen, USA);胎牛血清购自 Hyclone (USA);乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒购自艾美捷科技有限公司;胰蛋白酶、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)试剂盒均购自 Sigma 公司;Lipofectmine 2000 购自 Invitrogen 公司,MTT 试剂盒购自 Sigma 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司,JN 抗体及 BNIP3 抗体购自 Millipore 公司,GAPDH 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。JNsiRNA 由上海生工合成(正义序列为 5'-AGTATCTGTCATGATGTTTAC-3',反义序列 5'-GAACATCATGACAGATACTCC-3')。其他试剂均为国产分析纯。

敲除 JN 的小鼠 JN<sup>-/-</sup>及其同窝阴性对照小鼠(Wild Type, WT)均购自南京模式动物中心。本研究所选用的 JN<sup>-/-</sup>小鼠及其同窝阴性对照小鼠均为 8-11 周龄雄性小鼠,所有动物均饲养于独立通风系统(IVC-II 型,苏州市苏杭科技器材有限公司)中。饲养房间温度 24-26℃,自由饮水取食。

本研究所有动物实验均严格按照陕西省人民医院生物科研伦理委员会批准的方案进行;所有涉及的动物实验样本收集和处理均经陕西省人民医院生物科研伦理委员会批准。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物分组及大脑局部缺血模型的建立** 实验动物分为 JN<sup>-/-</sup>组及其同窝阴性对照小鼠,各 10 只。均采用大脑中动脉线栓法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)制备小鼠局灶性脑缺血模型<sup>[10]</sup>。小鼠经 4%戊巴比妥钠(40 mg/kg,腹腔注射)麻醉后,依次分离右侧颈总、颈外、颈内动脉,结扎右侧颈总动脉和颈外动脉,在靠近颈外、颈内动脉分叉处由颈总动脉沿颈内动脉缓慢插入尼龙栓线,深度约为 0.9 cm,稍遇阻力时

即停止,于栓塞 15 min 后栓线拔出复灌 24 h,动物苏醒后出现对侧肢体运动障碍即为模型成功。

**1.2.2 mNSS 神经功能损伤评分** 本实验于术后 24 h 进行神经功能缺损评分并进行记录。采用改良的神经功能缺损评分法(modified neurological severity score, mNSS)对实验动物进行神经功能测定<sup>[10]</sup>。正常为 0 分,最高为 18 分,分值越高表明神经功能缺损症状或程度越严重。

**1.2.3 少突胶质细胞系 OLN93 氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)模型的制备、分组及转染** 少突胶质细胞系 OLN93 细胞按常规的 PBS 洗涤、胰酶消化、血清终止、离心重悬后接种含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的孵箱中培养。制备 OGD 模型时<sup>[11]</sup>,将不含糖的 DMEM 提前 24 h 置于三气培养箱(设定为 O<sub>2</sub> 1%,CO<sub>2</sub> 5%,37℃),以去除培养液内已溶解的氧气。细胞以 1×10<sup>7</sup>/mL 密度接种,分为 4 组。对照组按正常条件培养,另外 3 组由常规培养基更换为无糖 DMEM 培养基,置于三气培养箱(设定为 O<sub>2</sub> 1%,CO<sub>2</sub> 5%,N<sub>2</sub> 94%,37℃)进行缺氧培养,3 h 后取出细胞,将无糖 DMEM 更换为基础正常 DMEM。其中,对照组及 OGD 模型组置于正常条件培养箱继续培养 24 h 后行相关检测。OGD 模型组的另外两组分别加入 JNsiRNA(33.2 nM)及 Negative control(33.2 nM)进行转染,转染试剂使用 Lipofectmine 2000,按照该转染试剂说明书进行操作。转染后 24 h 进行相关检测。

**1.2.4 MTT 法检测细胞活力** 将上述 4 组细胞(空白对照组、OGD 模型组、OGD 模型+JN siRNA 组、OGD 模型+Negative control 组)分别加入终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 反应 4 小时,吸去上清后,加入适量 DMSO 于 37℃震荡 10 min 以溶解蓝紫色结晶甲瓖。待结晶全部溶解后于 570 nm 测吸光值。细胞存活率按如下公式计算:细胞存活率=(测定组 OD 值-测定空白管 OD 值)/(正常组 OD 值-测定空白管 OD 值)100%。

**1.2.5 LDH 活性测定** 收集各组细胞培养液,按照试剂盒说明书测定 LDH 活性。

**1.2.6 SOD 活性、NO 及 MDA 含量测定** 将各组细胞弃去上清,用预冷的 PBS 洗涤后加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,于冰上裂解细胞并收集裂解液,按试剂盒说明书测定 SOD 活性、NO 含量及 MDA 含量。

**1.2.7 Western blot 检测 JN siRNA 干扰效率** 将转染 JN siRNA 及 Negative control 的细胞使用 RIPA 蛋白裂解试剂盒提取细胞蛋白,细胞蛋白定量采用 Pierce 公司的 BCA Protein Assay Kit,取 20 μg 蛋白进行 SDS-PAGE,100 V 恒压转移 2 h,半干法转移到 PVDF 膜上,室温封闭 1 h,将第一抗体 anti-JN 和膜 4℃孵育过夜;PBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 15 min;加入第二抗体室温孵育 1 h,再次洗膜 3 次;化学发光法检测目的蛋白的表达。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。所有数据采用均数±标准误(mean±SE)表达。神经功能学评分组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA);检验水准取α=0.05。

## 2 结果

### 2.1 JN 表达缺失会加重脑缺血模型小鼠神经功能缺损症状

对 JN<sup>-/-</sup>小鼠及其同窝阴性对照小鼠均行 MCAO 法造模,

于术后 24 h 进行神经功能 mNSS 评分。结果显示,经 MCAO 法造模后,JN<sup>-/-</sup>小鼠及其同窝阴性对照小鼠均存活,考虑与造模时栓塞时间较短有关。两组小鼠均有神经功能缺损表现。与同窝阴性对照小鼠相比,24 h 后 JN<sup>-/-</sup>小鼠神经功能缺损程度更为严重,其 mNSS 评分更高(图 1),差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

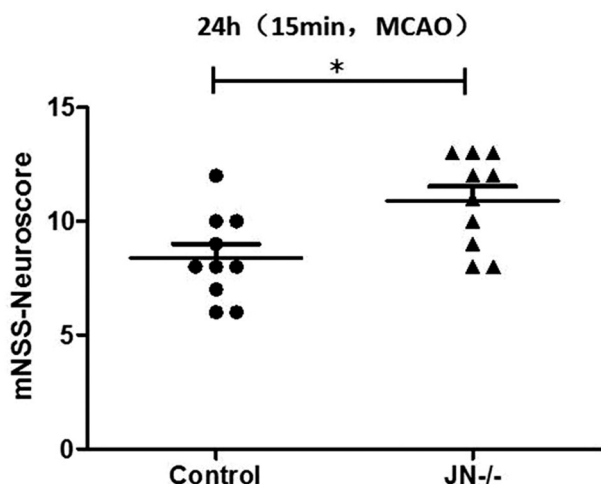


图 1 敲除 JN 的小鼠(JN<sup>-/-</sup>)会加重脑缺血模型小鼠的神经功能缺损  
Fig.1 JN deficient mice (JN<sup>-/-</sup>) have an aggravated neurological performance after experimental stroke

## 2.2 JN 表达下调对 OGD 损伤后少突胶质细胞存活的影响

首先通过转染 JN siRNA 来下调少突胶质细胞系 OLN93 中 JN 的表达。Western blot 结果显示,与对照组(Negative Control,NC)相比,转染 24 h 后,OLN93 细胞中 JN 表达下降(图 2A),表明干扰有效;相应的灰度扫描分析显示 JN 蛋白表达下调约 46.11%(图 2B),与 NC 组相比,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。MTT 结果显示,与正常对照组相比,OGD 模型组 OLN93 细胞的存活率下降 35.82%( $P<0.01$ )。当转染 JN siRNA 导致 JN 表达下调后,细胞存活率较模型组下降 33.23%( $P<0.01$ ),而转染 NC 组则与模型组相比无明显差别( $P>0.05$ ),提示 JN 表达下调加重了少突胶质细胞在 OGD 后的损伤(图 2C)。

## 2.3 JN 表达下调对 OGD 损伤后少突胶质细胞 LDH 活性的影响

与正常对照组相比,OGD 模型组 OLN93 细胞 LDH 释放量增加 52.01%( $P<0.01$ )。而当 JN 表达下调后,少突胶质细胞释放的 LDH 较模型组增加 58.12%(图 3),其差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。而转染 NC 组则与模型组相比无明显差别( $P>0.05$ )。

## 2.4 JN 表达下调对 OGD 损伤后少突胶质细胞 MDA 含量、NO 含量及 SOD 活性的影响

与正常对照组相比,OGD 模型组 OLN93 细胞 SOD 活性下降 37.27%(图 4B),而 MDA(图 4A)及 NO(图 4C)水平分别升高 86.15%及 149.78%,其差异均具有统计学意义( $P<0.01$ );当 JN 表达下调后,与模型组细胞相比,少突胶质细胞 SOD 活

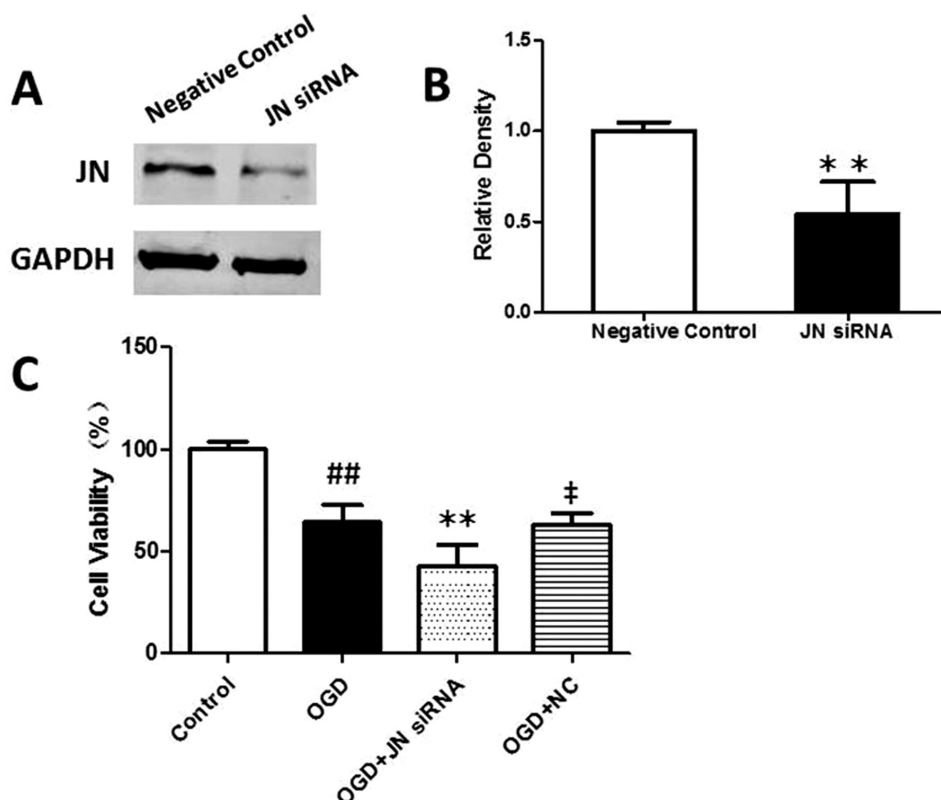


图 2 JN 表达下调对 OGD 损伤后少突胶质细胞存活的影响

Fig.2 The effect of JN downregulation on OGD induced OLN93 cell death

注:A.OLN93 细胞转染 JN siRNA 或 NC 后,western blot 检测 JN 表达情况;B.Western blot 结果的灰度扫描分析。注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;

C. OGD 处理后的 OLN93 细胞转染 JN siRNA 及 NC 后的存活情况。注:与对照组比较,## $P<0.01$ ,与 OGD 组比较,\*\* $P<0.01$ ,‡ $P>0.05$ 。

Note: A. Treatment with JN siRNA led to significant decreases in the JN level of OLN93 cells. B. Quantifications of the Western blots showed that JN siRNA led to significant decreases in JN

levels of OLN93 cells. Note: \*\* $P<0.01$ , vs Negative Control; C. JN reductions by JN siRNA led to significant increases in death of OGD induced OLN93 cells. Note: ## $P<0.01$ , vs Control group, \*\* $P<0.01$ , ‡ $P>0.05$ , vs OGD group.

性下降 33.31%(图 4B)、MDA(图 4A)及 NO 水平(图 4C)分别升高 57.02%及 52.64%,其差异均具有统计学意义( $P<0.01$ )。而转染 NC 组则与模型组相比无明显差别( $P>0.05$ )。

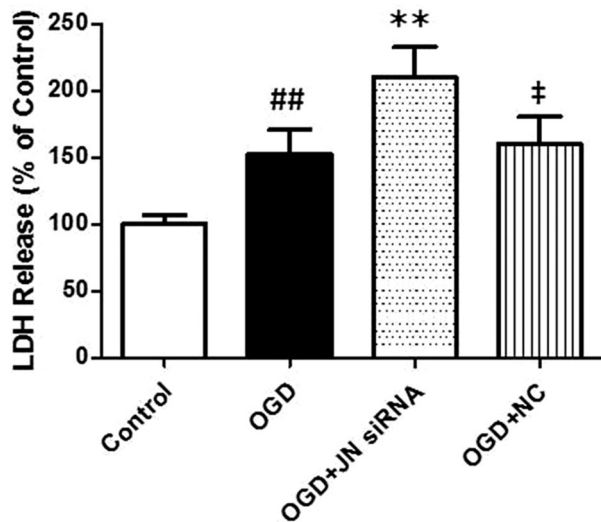


图 3 JN 表达下调对 OGD 损伤后少突胶质细胞 LDH 活性的影响  
Fig.3 The effect of JN downregulation on LDH release by OGD induced OLN93 cell

注:与对照组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ,与 OGD 组比较,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ,<sup>‡</sup> $P>0.05$   
Note: <sup>##</sup> $P<0.01$ , vs Control group, <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ , <sup>‡</sup> $P>0.05$ , vs OGD group.

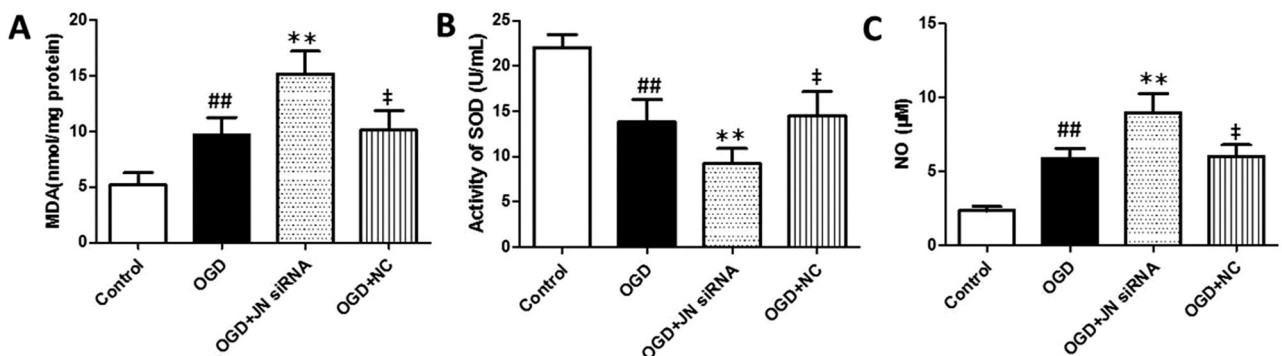


图 4 JN 表达下调对 OGD 损伤后少突胶质细胞 MDA、NO 含量及 SOD 活性的影响  
Fig.4 The effect of JN downregulation on SOD activity, MDA and NO generation by OGD induced OLN93 cell

注:与对照组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ,与 OGD 组比较,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ,<sup>‡</sup> $P>0.05$ 。  
Note: <sup>##</sup> $P<0.01$ , vs Control group, <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ , <sup>‡</sup> $P>0.05$ , vs OGD group.

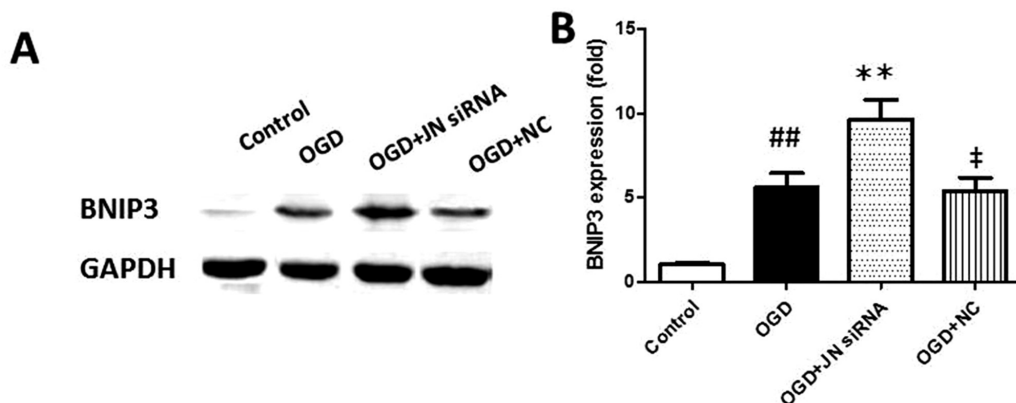


图 5 JN 表达下调对 OGD 损伤后少突胶质细胞 BNIP3 蛋白表达的影响  
Fig.5 BNIP3 expression in OLN93 cells after OGD was determined by western blot analysis

注:与对照组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ,与 OGD 组比较,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ,<sup>‡</sup> $P>0.05$ 。  
Note: <sup>##</sup> $P<0.01$ , vs Control group, <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ , <sup>‡</sup> $P>0.05$ , vs OGD group.

## 2.5 JN 表达下调对 OGD 损伤后少突胶质细胞 BNIP3 蛋白表达的影响

与正常对照组相比,OGD 模型组 OLN93 细胞中的 BNIP3 表达上调约 461%(图 5A,B),其差异有统计学意义( $P<0.01$ );当 JN 表达下调后,与模型组细胞相比,少突胶质细胞中 BNIP3 表达上调 72.12%(图 5B),其差异有统计学意义( $P<0.01$ )。而转染 NC 组则与模型组相比无明显差别( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

脑梗死是一种急性缺血性脑血管病,这种急症常导致神经功能严重受损,甚至死亡,是导致成人致残的关键因素<sup>[12]</sup>,给家庭、社会的护理带来沉重负担。高血压、糖尿病、高血脂、吸烟以及年龄等都是致病风险因素<sup>[13]</sup>。脑梗死的发病机制非常复杂,其中,氧化应激是导致脑梗死后脑组织损伤的重要因素,而活性氧类物质(Reactive oxygen species,ROS)则在其中发挥关键作用<sup>[14]</sup>。活性氧本身是细胞正常代谢的一部分,在较低浓度下对细胞的生长、增殖、分化及凋亡具有调节作用,但在高浓度下却促进血管类疾病,特别是缺血性脑血管病的进展<sup>[15]</sup>。在脑梗死的病理生理过程中,ROS 的产生大量增加,进而通过脂质过氧化、蛋白氧化及 DNA 损伤等途径发挥其细胞毒性作用<sup>[16]</sup>。在脑梗死的再灌注损伤过程中,ROS 释放会进一步增加,其含量越高,细胞损伤越大;在此过程中,内皮细胞释放的 NO 与超

氧化物反应生成过氧亚硝酸盐,进而与 ROS 一起发挥其对细胞的破坏作用<sup>[17]</sup>。体内抗氧化系统可以平衡 ROS 的产生并维持细胞正常代谢,如细胞产生 SOD 可以将超氧化物转换为过氧化氢及氧。但在脑梗死的急性病变过程中,ROS 等有害物质迅速增加,这种平衡很快就被打破,造成神经元、胶质细胞的死亡<sup>[18]</sup>。因此,减轻氧化应激损伤、恢复活性氧代谢平衡成为脑梗死治疗的重要方向<sup>[19]</sup>。

少突胶质细胞是中枢神经系统的髓鞘形成细胞,对有毒刺激,特别是缺血缺氧条件下造成的氧化应激非常敏感易损<sup>[20]</sup>。由此引起少突胶质细胞的死亡及髓鞘的破坏会导致神经元功能受损、神经电冲动传导异常<sup>[21]</sup>。因此,保护少突胶质细胞对于减轻脑梗死患者神经功能损伤具有重要意义。JN 是一种少突胶质细胞特异的骨架蛋白,能够凭借其 C 末端的 34 个氨基酸残基组成的 F-actin 结合位点与 actin 相结合,促进少突胶质细胞突起的生长<sup>[22]</sup>。由于 JN 在表达时机上与髓鞘的主要成份-髓鞘碱性蛋白 MBP 相近,且 JN 定位于髓鞘最外层、郎飞氏结附近,故 JN 与髓鞘的形成关系密切<sup>[23]</sup>。然而,在脑梗死病变过程中,特别是少突胶质细胞敏感的氧化应激反应中,JN 发挥何种作用目前仍不清楚。

在本研究中,我们首先通过 MCAO 法制备了小鼠局灶性脑缺血模型,其中,动脉闭塞时间为 15 min,因为文献报导这种较短时间的闭塞主要引起皮层下及脑白质的损伤,而这些部位正是少突胶质细胞聚集的区域<sup>[24]</sup>。我们发现在敲除 JN 的小鼠中,术后其 mNSS 神经功能评分较其同窝阴性对照小鼠显著升高(图 1,  $P<0.05$ );由于 mNSS 神经功能评分越高,提示神经功能缺损越严重,因此该结果表明,敲除 JN 的小鼠对于缺血缺氧造成的脑损害更敏感,提示 JN 在脑梗死病变过程中可能发挥重要作用。为明确 JN 在此过程中与氧化应激的联系,我们通过少突胶质细胞系 OLN93 制备了 OGD 模型。OGD 模型是目前公认的模拟脑缺血的细胞模型,广泛用于脑缺血性损伤、氧化应激等实验研究<sup>[25]</sup>。在本研究中,OGD 模型组细胞较对照组而言,其细胞存活下降(图 2C),LDH 活性增加(图 3),差异均具有统计学意义( $P<0.01$ )。由于 LDH 存在于组织细胞的胞浆中,当细胞因缺血缺氧损害导致细胞膜通透性增加时,LDH 便会释出,其释放量与细胞损伤程度呈正比。因此,以上结果提示 OGD 模型造成少突胶质细胞受损,死亡增加。MDA 反映的是脂质过氧化水平,与细胞受 ROS 损害的程度有关<sup>[26]</sup>;NO 则可诱导氧自由基生成产生神经毒性作用<sup>[15]</sup>。SOD 作为抗氧化系统重要成员,其活性高低可直接体现细胞清除氧自由基的能力。在本研究中,OGD 模型组细胞较对照组而言,MDA(图 4A)及 NO(图 4C)水平升高,而 SOD 活性下降(图 4B),差异均具有统计学意义( $P<0.01$ ),提示 OGD 造成少突胶质细胞氧化损伤增加,抗氧化能力减弱。为进一步明确 JN 在少突胶质细胞氧化损伤中的作用,我们先通过 siRNA 在 OLN93 细胞中下调 JN 的表达并通过 western blot 进行了验证(图 2A,B)。继而在 OGD 模型中通过 siRNA 下调 JN 的表达,发现与 OGD 模型组相比较,JN 表达下调会导致细胞存活率进一步下降(图 2C),LDH 活性增加(图 3),MDA(图 4A)及 NO(图 4C)水平升高,而 SOD 活性下降(图 4B),差异均具有统计学意义( $P<0.01$ )。这些结果提示 JN 表达的下调会加重 OGD 对少突胶质细胞的

氧化损伤,使少突胶质细胞抗氧化能力进一步减弱。BNIP3 属于泛素超家族,能够以 caspase 依赖的方式诱导细胞死亡,在少突胶质细胞氧化应激损伤中可能具有重要作用<sup>[27]</sup>。我们的研究显示,与对照组相比,OGD 损伤使少突胶质细胞中 BNIP3 蛋白表达增加(图 5A);而与 OGD 组相比,进一步下调 JN 的表达可使 BNIP3 表达增加更为显著,差异均具有统计学意义( $P<0.01$ )。提示 OGD 诱导的少突胶质细胞损伤与 BNIP3 表达密切相关,而 JN 表达下降则可加重这一趋势。

少突胶质细胞在脑梗死造成的缺血缺氧条件下的损伤机制,特别是其在氧化应激过程中的病变规律目前并不清楚。本研究通过动物实验及体外细胞模型,发现少突胶质细胞的标记分子 JN 可能减轻氧化应激损伤,发挥对少突胶质细胞的保护作用,从而为进一步研究 JN 在缺血性脑血管病及氧化应激损伤中的作用提供了线索和思路。

#### 参考文献(References)

- [1] Khandelwal P, Yavagal DR, Sacco RL. Acute Ischemic Stroke Intervention[J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 67(22): 2631-2644
- [2] Eswaradass P, Appireddy R, Evans J, et al. Imaging in acute stroke[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2016, 14(8): 963-975
- [3] Choi JY, Kim BG. Toll-like Receptor 2: A Novel Therapeutic Target for Ischemic White Matter Injury and Oligodendrocyte Death[J]. Exp Neurol, 2017, 26(4): 186-194
- [4] Baltan S. Age-specific localization of NMDA receptors on oligodendrocytes dictates axon function recovery after ischemia [J]. Neuropharmacology, 2016, 110(Pt B): 626-632
- [5] Jing L, He Q, Zhang JZ, et al. Temporal profile of astrocytes and changes of oligodendrocyte-based myelin following middle cerebral artery occlusion in diabetic and non-diabetic rats [J]. Int J Biol Sci, 2013, 9(2): 190-199
- [6] Scheuer T, Brockmüller V, Blanco Knowlton M, et al. Oligodendroglial maldevelopment in the cerebellum after postnatal hyperoxia and its prevention by minocycline[J]. Glia, 2015, 63(10): 1825-1839
- [7] Mifsud G, Zammit C, Muscat R, et al. Oligodendrocyte pathophysiology and treatment strategies in cerebral ischemia [J]. CNS Neurosci Ther, 2014, 20(7): 603-612
- [8] Zhang B, Cao Q, Guo A, et al. Juxtanodin: an oligodendroglial protein that promotes cellular arborization and 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase trafficking [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(32): 11527-11532
- [9] Rahmani MR, Shamsizadeh A, Moghadam-Ahmadi A, et al. Monoacylglycerol lipase inhibitor, JZL-184, confers neuroprotection in the mice middle cerebral artery occlusion model of stroke [J]. Life Sci, 2018, 198: 143-148
- [10] Shen M, Wang S, Wen X, et al. Dexmedetomidine exerts neuroprotective effect via the activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in rats with traumatic brain injury[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95: 885-893
- [11] Fu P, Tang R, Yu Z, et al. Bumetanide-induced NKCC1 inhibition attenuates oxygen-glucose deprivation-induced decrease in proliferative activity and cell cycle progression arrest in cultured OPCs via p-38 MAPKs[J]. Brain Res, 2015, 1613: 110-119
- [12] Van Veluw SJ, Shih AY, Smith EE, et al. Detection, risk factors, and functional consequences of cerebral microinfarcts [J]. Lancet Neurol, 2017, 16(9): 730-740

- signaling pathway[J]. *Heart Vessels*, 2015, 30(3): 396-405
- [10] Liu D. Effects of procyanidin on cardiomyocyte apoptosis after myocardial ischemia reperfusion in rats [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2018, 18(1): 35
- [11] He W, Su Q, Liang J, et al. The protective effect of nicorandil on cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway in rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(4): 1296-1301
- [12] Liu P, Dong J. Protective effects of carnosis acid against mitochondria-mediated injury in H9c2 cardiomyocytes induced by hypoxia/reoxygenation[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6): 5629-5634
- [13] Li J, Zhou Y, Zhang W, et al. Relief of oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis by using curcumin nanoparticles [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 153: 174-182
- [14] Yu W, Zha W, Ke Z, et al. Curcumin Protects Neonatal Rat Cardiomyocytes against High Glucose-Induced Apoptosis via PI3K/Akt Signalling Pathway[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 4158591
- [15] Li W, Wu M, Tang L, et al. Novel curcumin analogue 14p protects against myocardial ischemia reperfusion injury through Nrf2-activating anti-oxidative activity[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 282(2): 175-183
- [16] Lv FH, Yin HL, He YQ, et al. Effects of curcumin on the apoptosis of cardiomyocytes and the expression of NF- $\kappa$ B, PPAR- $\gamma$  and Bcl-2 in rats with myocardial infarction injury[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(6): 3877-3884
- [17] Duan W, Yang Y, Yan J, et al. The effects of curcumin post-treatment against myocardial ischemia and reperfusion by activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Basic Res Cardiol*, 2012, 107(3): 263
- [18] Sukardi R, Sastroasmoro S, Siregar NC, et al. The role of curcumin as an inhibitor of oxidative stress caused by ischaemia re-perfusion injury in tetralogy of Fallot patients undergoing corrective surgery[J]. *Cardiol Young*, 2016, 26(3): 431-438
- [19] Yeh CH, Chen TP, Wu YC, et al. Inhibition of NF $\kappa$ B activation with curcumin attenuates plasma inflammatory cytokines surge and cardiomyocytic apoptosis following cardiac ischemia/reperfusion[J]. *J Surg Res*, 2005, 125(1): 109-116
- [20] Huang Z, Ye B, Dai Z, et al. Curcumin inhibits autophagy and apoptosis in hypoxia/reoxygenation-induced myocytes [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(6): 4678-4684
- [21] Geng HH, Li R, Su YM, et al. Curcumin protects cardiac myocyte against hypoxia-induced apoptosis through upregulating miR-7a/b expression[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 81: 258-264
- [22] Naserzadeh P, Mehr SN, Sadabadi Z, et al. Curcumin Protects Mitochondria and Cardiomyocytes from Oxidative Damage and Apoptosis Induced by Hemiscorpius Lepturus Venom [J]. *Drug Res (Stuttg)*, 2018, 68(2): 113-120
- [23] Nehra S, Bhardwaj V, Kar S, et al. Chronic Hypobaric Hypoxia Induces Right Ventricular Hypertrophy and Apoptosis in Rats: Therapeutic Potential of Nanocurcumin in Improving Adaptation [J]. *High Alt Med Biol*, 2016, 17(4): 342-352

(上接第 4021 页)

- [13] Caplan LR. Lacunar infarction and small vessel disease: pathology and pathophysiology[J]. *J Stroke*, 2015, 17(1): 2-6
- [14] Francis A, Baynosa R. Ischaemia-reperfusion injury and hyperbaric oxygen pathways: a review of cellular mechanisms[J]. *Diving Hyperb Med*, 2017, 47(2): 110-117
- [15] Dröse S, Stepanova A, Galkin A. Ischemic A/D transition of mitochondrial complex I and its role in ROS generation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(7): 946-957
- [16] Yang J, Qi J, Xiu B, et al. Reactive Oxygen Species Play a Biphasic Role in Brain Ischemia[J]. *J Invest Surg*, 2018, 8: 1-6
- [17] Chen ZQ, Mou RT, Feng DX, et al. The role of nitric oxide in stroke [J]. *Med Gas Res*, 2017, 7(3): 194-203
- [18] Fang Y, Liu X, Zhao L, et al. RhGLP-1 (7-36) protects diabetic rats against cerebral ischemia-reperfusion injury via up-regulating expression of Nrf2/HO-1 and increasing the activities of SOD [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2017, 21(5): 475-485
- [19] Davis SM, Pennypacker KR. Targeting antioxidant enzyme expression as a therapeutic strategy for ischemic stroke [J]. *Neurochem Int*, 2017, 107: 23-32
- [20] Rowe DD, Collier LA, Seifert HA, et al. Leukemia inhibitor factor promotes functional recovery and oligodendrocyte survival in rat models of focal ischemia[J]. *Eur J Neurosci*, 2014, 40(7): 3111-3119
- [21] Miyamoto N, Maki T, Pham LD, et al. Oxidative stress interferes with white matter renewal after prolonged cerebral hypoperfusion in mice [J]. *Stroke*, 2013, 44(12): 3516-3521
- [22] Ruskamo S, Chukhlieb M, Vahokoski J, et al. Juxtanodin is an intrinsically disordered F-actin-binding protein[J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 899
- [23] Liang F, Hwang JH, Tang NW, et al. Juxtanodin in retinal pigment epithelial cells: Expression and biological activities in regulating cell morphology and actin cytoskeleton organization [J]. *J Comp Neurol*, 2018, 526(2): 205-215
- [24] Krey L, Lühder F, Kusch K, et al. Knockout of silent information regulator 2 (SIRT2) preserves neurological function after experimental stroke in mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35 (12): 2080-2088
- [25] Perez-Alvarez MJ, Villa Gonzalez M, et al. Role of mTORC1 Controlling Proteostasis after Brain Ischemia [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 60
- [26] Fu Y, Si Z, Li P, et al. Acute psychoactive and toxic effects of D. metel on mice explained by 1H NMR based metabolomics approach[J]. *Metab Brain Dis*, 2017, 32(4): 1295-1309
- [27] Li C, Guan T, Chen X, et al. BNIP3 mediates pre-myelinating oligodendrocyte cell death in hypoxia and ischemia[J]. *J Neurochem*, 2013, 127(3): 426-433