

## · 论著 ·

## 二氯乙酸钠对氧糖剥夺损伤的 BV2 细胞的保护作用及其机制研究

赵 辉<sup>1</sup>, 章越凡<sup>2</sup>, 李铁军<sup>1,3</sup> (1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 海军军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433; 3. 上海市浦东新区浦南医院药剂科, 上海 200125)

**[摘要]** 目的 研究二氯乙酸钠(dichloroacetate, DCA)对氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)损伤模型中小鼠小胶质细胞(BV2 细胞)的保护作用,并探讨其作用机制。方法 将 BV2 细胞分为 3 组:对照组、OGD 组、DCA 治疗组,通过 OGD 4 h 建立损伤模型。CCK-8 和流式细胞仪检测细胞凋亡及 ROS 和 NO 的表达, Western blot 检测 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达水平。结果 CCK-8 及流式细胞检测结果表明, DCA 可显著降低 OGD 诱导的 BV2 细胞凋亡,并且减少 OGD 后细胞中活性氧(ROS)和一氧化氮(NO)的表达( $P < 0.05$ )。Western blot 结果显示, DCA 可显著影响 OGD 损伤介导的 BV2 细胞 JNK、I- $\kappa$ B 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平( $P < 0.05$ )。结论 DCA 对 OGD 损伤的 BV2 细胞具有保护作用,其机制与抗凋亡、抗氧化和抗炎作用有关。

**[关键词]** 二氯乙酸钠;氧糖剥夺;ROS; NF- $\kappa$ B

**[中图分类号]** R966

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2019)02-0146-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.009

## Protective effect and mechanism of sodium dichloroacetate on BV2 cells damaged by OGD

ZHAO Hui<sup>1</sup>, ZHANG Yuefan<sup>2</sup>, LI Tiejun<sup>1,3</sup> (School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pharmacy, Punan Hospital of Pudong New Area, Shanghai 200125, Chian)

**[Abstract]** **Objective** To study the protective effect and mechanism of dichloroacetate (DCA) on BV2 microglia in oxygen glucose deprivation (OGD) injury model. **Methods** BV2 cells were divided into 3 groups: CON group, OGD group and DCA intervention group. The injury model was established by OGD 4 h. CCK-8 and flow cytometry was used to detect apoptosis and expression of ROS and NO in cells. Western blot was used to detect the expression of proteins related to NF- $\kappa$ B pathway. **Results** CCK-8 and flow cytometry showed that the apoptosis of BV2 cells induced by OGD and the expression of ROS and NO in OGD cells were decreased significantly by DCA ( $P < 0.05$ ). Western blot analysis showed that the expression of I- $\kappa$ B, JNK and NF- $\kappa$ B protein in BV2 cells mediated by OGD injury were influenced significantly by DCA ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** DCA had a protective effect on OGD-injured BV2 cells through anti-oxidation and anti-apoptosis.

**[Key words]** dichloroacetate; OGD; ROS; NF- $\kappa$ B

缺血性卒中是一种常见的神经系统性疾病,是导致死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。胶质细胞是脑内的天然免疫效应细胞,参与一系列神经退行性病变<sup>[2]</sup>。活化的小胶质细胞释放促炎因子以及细胞毒性因子(如 NO 和 ROS),导致神经元损伤<sup>[3]</sup>。研究表明,小胶质细胞激活诱发的炎症反应参与了脑卒中的损伤过程<sup>[4]</sup>。二

氯乙酸钠(DCA)是一种可口服吸收的小分子化合物,临床上可用于治疗线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作(MELAS)综合征、先天性乳酸性酸中毒和其他疾病的儿童<sup>[5]</sup>。最近的研究发现, DCA 通过抑制 PDK2 和减少冠状动脉肌内膜增生而起到潜在的血管保护作用<sup>[6]</sup>,并促进脑缺血后的脑再生<sup>[7]</sup>。笔者使用 BV2 细胞的 OGD 损伤模型,探讨 DCA 治疗是否具有保护作用及其可能的作用机制。

### 1 材料

#### 1.1 细胞株

BV2 细胞购自中科院上海细胞库,培养在含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基中(37℃, 5%

**[基金项目]** 浦东新区科技发展基金(PKJ2015-Y26);浦东新区卫生和计划生育委员会学科建设项目(PWZbr 2017-16)

**[作者简介]** 赵 辉, 硕士研究生, Email: zhaohui19951227@hotmail.com

**[通讯作者]** 李铁军, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 心脑血管药理, Email: 18930502906@163.com

CO<sub>2</sub>),每48 h更换培养基并传代。

## 1.2 药物与试剂

二氯乙酸钠(DCA, TCI公司,货号:D1719);DMEM完全培养基、DMEM无糖培养基(Gibco公司);凋亡检测试剂盒、NO试剂盒、ROS试剂盒、蛋白质提取试剂盒(上海碧云天生物技术公司);抗体: $\beta$ -actin, SAPK/JNK, P-SAPK/JNK, I- $\kappa$ B, P-I- $\kappa$ B, stat3, P-stat3, NF- $\kappa$ B, P-NF- $\kappa$ B (CST公司)。

## 1.3 仪器

细胞培养箱(Thermo公司);高速水平离心机(Eppendorf公司);缺氧装置(Billups-Rothenberg公司);酶标仪(Thermo公司);流式细胞仪(BD Biosciences公司);Western blot图像扫描仪(Odyssey公司)。

## 2 方法

### 2.1 OGD模型的建立

参考文献<sup>[8]</sup>建立体外模拟脑缺血模型,即OGD模型,并根据本实验目的稍作修改。细胞接种在细胞培养板中。细胞贴壁后,对照组更换为不含血清的DMEM,OGD组用无糖DMEM培养基,DCA给药组更换为加有DCA的无糖DMEM培养基,于培养箱中适应1 h,然后置于缺氧装置中,通入混合气(95%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>)密闭后,置于培养箱中,1~4 h后取出细胞,做后续处理。

### 2.2 CCK8法测定细胞活力

将BV2细胞以 $1.2 \times 10^5$ 个/ml的密度接种于96孔板中,按照“2.1”项下操作方法,在OGD之前将给药组更换为加入不同浓度的二氯乙酸钠(1、10、100、400、800  $\mu$ mol/L)适应性培养1 h,OGD组和给药组置于缺氧装置中OGD 4 h后,采用CCK-8法检测细胞活力,用酶标仪测定450 nm处上述不同浓度组的吸光度值(A)。

### 2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

以 $1.0 \times 10^6$ 个/ml的密度将BV2细胞接种于6孔板中,分为对照组、OGD组和给药组,细胞贴壁后,OGD组更换为无糖DMEM培养基,给药组更

换为加有DCA的无糖DMEM培养基,适应性培养1 h后,OGD组和给药组置于缺氧装置中OGD 4 h,之后分别收集各组细胞,使用凋亡试剂盒对细胞进行处理,流式细胞术检测细胞凋亡。

### 2.4 流式细胞术检测细胞内ROS和NO的表达

以 $1.0 \times 10^6$ 个/ml的密度将BV2细胞接种于6孔板中,细胞贴壁后,OGD组更换为无糖DMEM培养基,给药组更换为加有DCA的无糖DMEM培养基,适应性培养1 h后,OGD组和给药组置于缺氧装置中OGD 4 h,之后分别收集各组细胞,按照相应的ROS和NO检测试剂盒说明书对细胞进行前处理,流式细胞术检测ROS和NO含量。

### 2.5 Western blot检测蛋白表达

以 $1.0 \times 10^6$ 个/ml的密度将BV2细胞接种于6孔板中,细胞贴壁后,OGD组更换为无糖DMEM培养基,给药组更换为加有DCA的无糖DMEM培养基,然后OGD 4 h,结束后分别收集各组细胞,置于预冷的RIPA裂解液中裂解30 min,离心,取上清液。BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。10% SDS-PAGE分离蛋白,转移至硝酸纤维素膜上,将硝酸纤维素膜用含有5%脱脂奶粉的Tris缓冲液封闭2 h,4  $^{\circ}$ C环境下一抗孵育过夜,弃去一抗,漂洗3次(5 min/次),室温下与二抗孵育1 h后洗液膜。使用Western blot图像扫描仪进行扫描统计。

### 2.6 统计分析

使用SPSS 17.0软件进行统计分析。数据以(均数 $\pm$ 标准差)表示。*t*检验用于组间比较, $P < 0.05$ 时表示有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 DCA对OGD诱导的BV2细胞损伤的保护作用

OGD 1~4 h后,细胞生存率显著降低,与对照组比较有显著性差异( $P < 0.01$ ),以OGD 4 h为最佳时间(图1A)。DCA浓度为400  $\mu$ mol/L可显著提高OGD 4 h后的细胞活力( $P < 0.01$ ),因此选择OGD 4 h,给药浓度400  $\mu$ mol/L作为后续试验条件(图1B)。

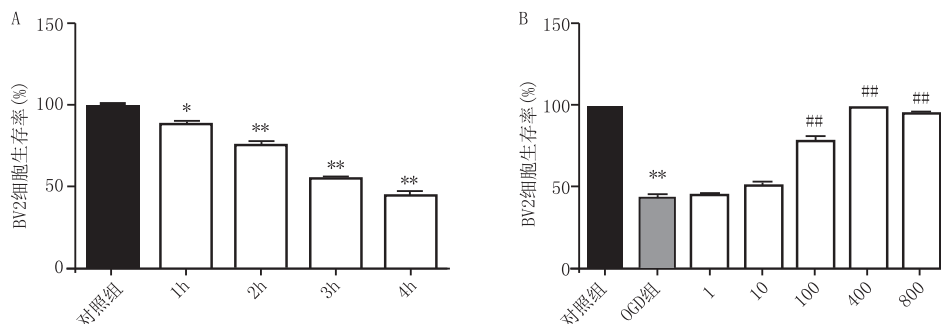


图1 DCA对OGD诱导BV2细胞损伤的影响

A. 不同的OGD时间;B. 不同的DCA浓度( $\mu$ mol/L)

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,与对照组比较;## $P < 0.01$ ,与OGD组比较

### 3.2 DCA降低OGD诱导的BV2细胞凋亡

为了考察DCA对OGD损伤的BV2细胞凋亡的影响,本研究采用流式细胞术检测细胞凋亡。结果显示(图2),与对照组相比,OGD诱导细胞的凋亡率增加,由对照组(2.62±0.22)%上升到(8.55±0.37)%( $P<0.01$ ),而DCA可显著减少细胞凋亡,凋亡率降至(3.95±0.16)%( $P<0.01$ )。

### 3.3 DCA降低OGD诱导的BV2细胞中ROS和NO的含量

与对照组相比,OGD提高了BV2细胞中ROS和NO的含量( $P<0.01$ );而DCA可显著降低BV2细胞内ROS( $P<0.01$ )和NO( $P<0.05$ )的含

量(图3)。

### 3.4 DCA对NF- $\kappa$ B/STAT3信号通路的调节作用

NF- $\kappa$ B信号通路广泛参与凋亡、炎症反应,因此本研究检测了DCA对该信号通路的影响。结果如图4A和图4B所示,OGD损伤后P-NF- $\kappa$ B、P-JNK及P-I- $\kappa$ B的表达水平均显著升高( $P<0.01$ );DCA可显著下调OGD诱导的P-NF- $\kappa$ B、P-JNK( $P<0.05$ )及P-I- $\kappa$ B蛋白的升高( $P<0.01$ )。而STAT3在脑卒中血管生成方面起到重要作用,OGD后P-STAT3表达显著上调( $P<0.01$ ),而DCA治疗组P-STAT3表达显著降低( $P<0.05$ )。

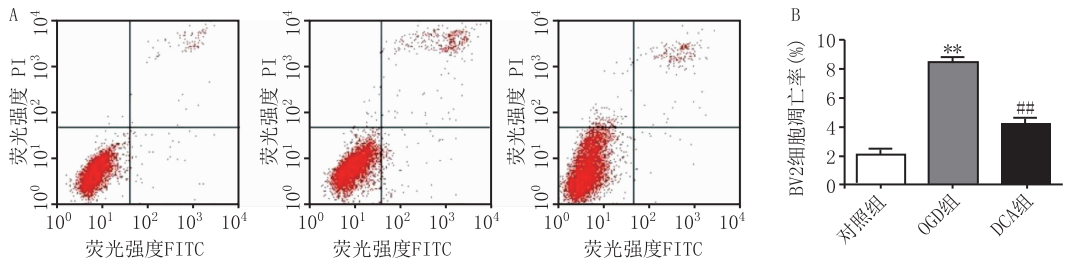


图2 DCA对OGD诱导的BV2细胞凋亡率的影响

A. 流式细胞术检测细胞凋亡情况;B. 细胞凋亡比例 \*\* $P<0.01$ ,与对照组比较;# $P<0.01$ ,与OGD组比较( $n=3$ )

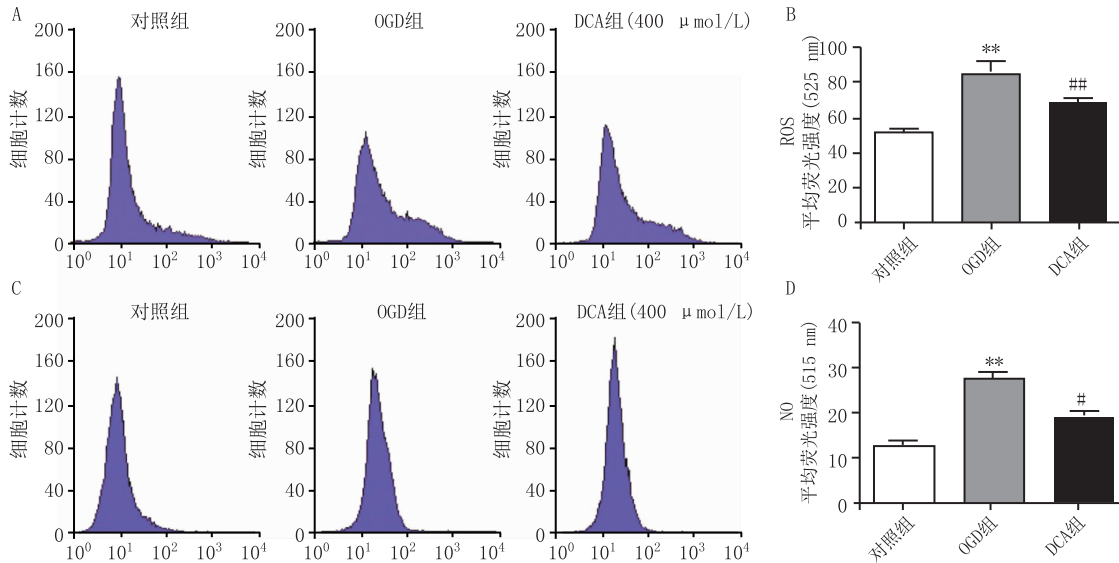


图3 DCA对OGD诱导的BV2细胞内ROS和NO含量的影响

A. 流式细胞术检测细胞内ROS含量;B. ROS含量统计图;C. 流式细胞术检测细胞内NO含量;D. NO含量统计图

\*\* $P<0.01$ ,与对照组比较;# $P<0.05$ ,# $P<0.01$ ,与OGD组比较( $n=3$ )

## 4 讨论

卒中是由血管阻塞或出血引起的脑血液循环障碍并诱发脑神经系统的损伤,致死率较高,其病理机制复杂,目前仍缺乏有效的治疗方法,而炎症反应已被证实为卒中诱发损伤中一个关键影响因素。小胶质细胞的激活是诱发卒中炎症反应的主要原因之

一<sup>[9]</sup>,激活的小胶质细胞在形态及功能上会发生明显改变,并在炎症部位产生大量的神经毒素和促炎症介质,从而导致神经元损伤,并且会释放促炎因子和细胞毒性因子,如IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NO和ROS<sup>[4]</sup>。因此,降低小胶质细胞的激活以及抑制其细胞毒性因子的释放对神经元的保护具有重要作用。

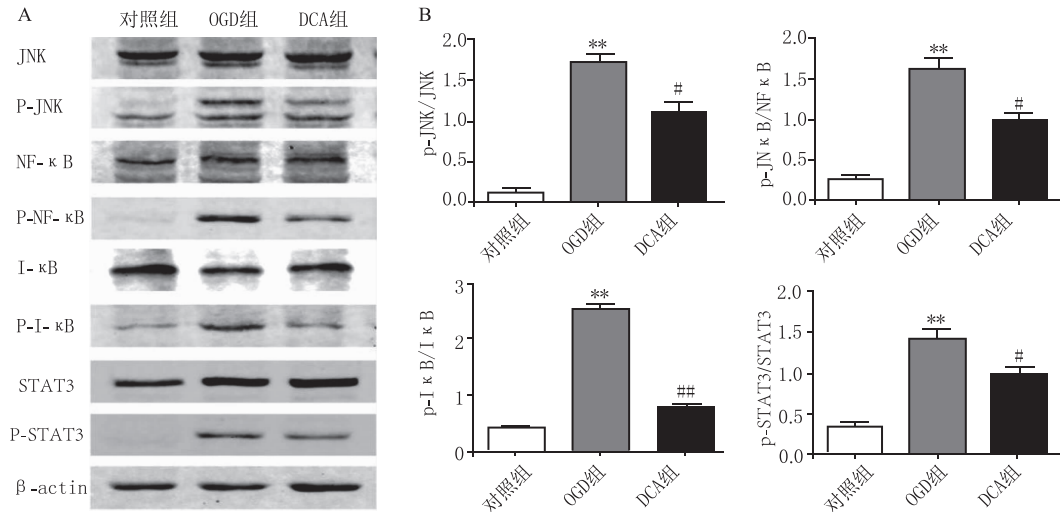


图4 DCA对OGD诱导下BV2细胞NF-κB/STAT3通路的影响

A. Western blotting 检测 JNK、NF-κB、I-κB、STAT3 及其磷酸化蛋白的表达水平；

B. p-JNK/JNK 比值；p-NF-κB/NF-κB 比值；p-I-κB/I-κB 比值；p-STAT3/STAT3 比值

\*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较；# $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 与 OGD 组比较 ( $n=3$ )

最新研究表明, DCA 在血管保护和促进血管内皮修复中起着重要作用<sup>[6]</sup>, 可以改善动脉粥样硬化患者的血管钙化<sup>[10]</sup>。然而, DCA 对小胶质细胞激活引起的炎症反应的作用尚无研究报道。本研究研究了 DCA 对 OGD 诱导的 BV2 小胶质细胞凋亡和炎症反应的抑制作用, 并初步探讨其可能的机制。首先建立 OGD 损伤 BV2 细胞模型, 同时加入不同浓度的 DCA 进行处理。结果发现, DCA 可剂量依赖性抑制 OGD 介导的 BV2 细胞损伤, 并且当 DCA 浓度为 400  $\mu\text{mol/L}$  时抑制作用最强。于是, 笔者选择 400  $\mu\text{mol/L}$  给药剂量进行机制探讨。

本研究结果表明, 经过 OGD 损伤, BV2 细胞凋亡明显增加并且细胞内 ROS 和 NO 水平显著升高, 而 DCA 可显著抑制细胞凋亡并下调细胞内 ROS、NO 的水平, 提示 DCA 可能通过抑制 BV2 细胞激活后 ROS 和 NO 的水平发挥神经保护活性。为进一步探讨 DCA 是否通过抗炎作用发挥对小胶质细胞的保护作用, 笔者对 JNK、I-κB 和 NF-κB 的蛋白表达, I-κB 磷酸化水平以及 NF-κB 磷酸化水平进行检测。NF-κB 作为促炎因子基因表达的最主要调节者之一<sup>[11]</sup>, 与脑缺血再灌注损伤中神经炎症的发生及小胶质细胞激活密切相关<sup>[12]</sup>。I-κB 是 NF-κB 信号通路的重要组成, 正常情况下, I-κB 和 NF-κB 形成复合体存在于胞质中。当受到胞外信息刺激时, I-κB 发生磷酸化并被泛素-蛋白酶体系降解, 导致 NF-κB p65 核结合位点暴露并使之发生核转位, NF-κB p65 入核后与相关免疫基因结合进而促进这些基因转录。本研究结果显示, OGD 诱

导的 BV2 细胞激活伴随 JNK、I-κB、NF-κB 磷酸化水平的增加; 而 DCA 处理可显著抑制上述改变。结合 DCA 对 OGD 所致 BV2 细胞激活后 ROS、NO 表达的降低, 表明 DCA 可能通过抑制 JNK/I-κB/NF-κB 信号通路的激活, 进而抑制 OGD 诱导的 BV2 细胞炎症反应, 最终发挥神经保护作用。

本研究结果表明, DCA 能够显著抑制 OGD 诱导的 BV2 细胞凋亡并且可以减少细胞内 ROS 和 NO 的水平, 并通过调控 NF-κB/STAT3 信号通路产生抗炎及神经保护作用。DCA 可能在脑缺血中对小胶质细胞引起的损伤具有保护作用。进一步的研究需要在脑缺血动物模型上更深入地解释 DCA 对脑缺血的影响及其作用机制, 为 DCA 在临床用于缺血性脑卒中的治疗提供药理学理论基础。

#### 【参考文献】

- [1] MOZAFFARIAN D, BENJAMIN E J, GO A S, et al. Heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2015, 131(4): e29-322.
- [2] JIN R, YANG G, LI G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 87(5): 779-789.
- [3] LAMKANFI M, DIXIT V M. Mechanisms and functions of inflammasomes[J]. *Cell*, 2014, 157(5): 1013-1022.
- [4] IADECOLA C, ANRATHER J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation[J]. *Nat Med*, 2011, 17(7): 796-808.
- [5] MICHELAKIS E D, SUTENDRA G, DROMPARIS P, et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate

[J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(31): 31-34.

[6] DEUSE T, HUA X, WANG D, et al. Dichloroacetate prevents restenosis in preclinical animal models of vessel injury[J]. *Nature*, 2014, 509(7502): 641-644.

[7] HONG D K, KHO A R, CHOI B Y, et al. Combined treatment with dichloroacetic acid and pyruvate reduces hippocampal neuronal death after transient cerebral ischemia[J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 137.

[8] 洪倩, 王实, 陈昌秀, 等. 血塞通注射液对体外 OGD/R 损伤的 BV2 细胞炎症反应的影响[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(1): 140-145.

[9] FAGAN S C, WALLER J L, NICHOLS F T, et al. Minocycline to improve neurologic outcome in stroke (MINOS): a dose-finding study[J]. *Stroke*, 2010, 41(10): 2283-2287.

[10] YANG Y, SUN Y, CHEN J, et al. AKT-independent activation of p38 MAP kinase promotes vascular calcification[J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 97-103.

[11] TAKPP, FIRESTEIN G S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(1): 7-11.

[12] 崔春英, 申超, 洪艳, 等. 柿叶黄酮提取物抑制 BV2 小胶质细胞活化在体外氧糖剥夺/再灌注损伤模型中发挥抗炎作用的研究[J]. *免疫学杂志*, 2018, 34(7): 593-599.

[收稿日期] 2018-10-20 [修回日期] 2018-12-27  
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 140 页)

[2] 卢畅, 费文超, 纪世召, 等. 海军某士官学校学员基层部队服役期间训练伤发生情况调查[J]. *解放军预防医学杂志*, 2017, 35(1): 16-18.

[3] 王伟新, 王玉梅, 平安, 等. 海上训练防晒霜的研制与效果评价[J]. *解放军药学学报*, 2004, 20(1): 40-42.

[4] BOULWARE D R. A randomized, controlled field trial for the prevention of jellyfish stings with a topical sting inhibitor[J]. *J Travel Med*, 2006, 13(3): 166-171.

[5] 张智. 水母蜇伤皮肤防护剂研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2010.

[6] LOTAN A. Method for inhibiting nematocyst discharge: US, US6406709[P]. 2002.

[7] 唐俊敏. 油包水乳化体系的配方设计及生产工艺研究(待续)[J]. *日用化学品科学*, 2006, 29(10): 39-41.

[8] 唐俊敏. 油包水乳化体系的配方设计及生产工艺研究(续前)[J]. *日用化学品科学*, 2006, 29(11): 34-37.

[9] 董银卯. 化妆品配方设计 7 步[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016.

[10] GASPAR L R, MAIA CAMPOS P M. Rheological behavior and the SPF of sunscreens[J]. *Int J Pharm*, 2003, 250(1): 35-44.

[11] COUTEAU C, PAPARIS E, EL-BOURRY-ALAMI S, et al. Influence on SPF of the quantity of sunscreen product applied[J]. *Int J Pharm*, 2012, 437(1-2): 250-252.

[12] OUYANG H. Evaluation of sunscreens using the critical wavelength test[J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2013, 68(4): AB185.

[13] 常明泉, 王刚, 汪依林, 等. 派莎防晒霜体外抗水效能的测定[J]. *中国药房*, 2010(33): 3109-3110.

[14] HEINRICH U, TRONNIER H, KOCKOTT D, et al. Comparison of sun protection factors determined by an in vivo, and different in vitro, methodologies: a study with 58 different commercially available sunscreen products[J]. *Int J Cosmet Sci*, 2004, 26(2): 79-89.

[15] COLIPA In vitro UV protection method task force. COLIPA 2011: Method for in vitro determination of UVA protection [S]. 2011

[16] 李竹, 苏瑾, 周世伟, 等. 防晒化妆品防水功效评价参数研究[J]. *上海预防医学杂志*, 2008(09): 423-426.

[17] 中国轻工业联合会. GB/T 29665-2013: 护肤乳液[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.

[18] 侯晓军, 唐菱, 周芑, 等. 星点设计-效应面法优化硼酸乳膏基质配方及质量控制[J]. *中国药师*, 2016, 19(5): 879-883.

[19] 中国轻工业联合会. GB/T 13531.1-2008: 化妆品通用检验方法 pH 值的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

[20] 国家轻工业局行业管理司. QB/T2410-1998: 防晒化妆品 UVB 区防晒效果的评价方法 紫外吸光度法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1998.

[收稿日期] 2018-10-29 [修回日期] 2019-01-02  
[本文编辑] 陈盛新