

. 实验研究 .

缺氧条件下谷氨酸转运体和 γ -氨基丁酸转运体
在星形胶质细胞中的表达变化及作用

王之涵 邢进 魏子龙 沙龙贵 周新军 林盈盈 邱永明 任力

【摘要】目的 探讨缺氧条件下谷氨酸转运体(GLT1)和 γ -氨基丁酸转运体(GAT1)在星形胶质细胞中的表达变化及作用。**方法** 星形胶质细胞在含有 10%胎牛血清 DMEM 中培养,在培养液中加入 100 μ mol/L 氯化钴溶液处理 16、24、48 h 模拟缺氧环境。通过慢病毒介导的表达特异性的短发夹 RNA(shRNA)沉默 GLT1 和 GAT1 基因表达,或者使 GLT1 和 GAT1 基因过表达。PCR 检测 GLT1 和 GAT1 mRNA 表达水平,免疫印迹法检测 GLT1 和 GAT1 蛋白表达水平,流式细胞术检测细胞凋亡。**结果** 加入氯化钴处理后,星形胶质细胞 GLT1 mRNA 和蛋白表达水平显著增高($P<0.05$),而 GAT1 mRNA 和蛋白表达水平显著下降($P<0.05$);两者均呈时间依赖性。沉默 GLT1 基因表达同时过表达 GAT1,星形胶质细胞凋亡率明显增加($P<0.05$);而过表达 GLT1 同时沉默 GAT1 基因表达,星形胶质细胞凋亡率明显减少($P<0.05$)。**结论** 缺氧条件下,体外培养的星形胶质细胞 GLT1 表达上调,而 GAT1 表达下调,促进星形胶质细胞凋亡。

【关键词】 脑缺血;缺氧;星形胶质细胞;细胞凋亡;谷氨酸转运蛋白 1; γ -氨基丁酸转运蛋白 1;基因表达

【文章编号】 1009-153X(2018)11-0735-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743; R 363

Expressions of glutamate and GABA transporters in astrocytes under hypoxia and their functions

WANG Zhi-han¹, XING Jin¹, Wei Zi-long¹, SHA Long-gui¹, LIN Ying-ying², QIU Yong-ming², REN Li¹. 1. Department of Neurosurgery, Shanghai Pudong Hospital, Fudan University, Shanghai 201300, China; 2. Department of Neurosurgery, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 2001274, China

【Abstract】Objective To investigate the expressions and functions of glutamate and γ -aminobutyric acid (GABA) transporters in astrocytes under hypoxic condition. **Methods** The expressions of glutamate transporter 1 (GLT1) mRNA and protein and GABA transporter 1 (GAT1) mRNA and protein in the astrocytes, who were cultured under the hypoxic condition and received the transfection of GLT1 and GAT1, were detected respectively by quantitative RT-PCR and west blot. The apoptosis of the astrocytes in whom the expressions of these transporters were changed was determined by flow cytometry. **Results** Under the hypoxic condition, the expressions of GLT1 and GAT1 mRNA and proteins in the astrocytes was significantly reduced ($P<0.05$). Apoptosis analysis showed that under the hypoxia, inhibition of GLT1 and overexpression of GAT1 significantly increased the astrocytes apoptosis ($P<0.01$), while overexpression of GLT1 and inhibition of GAT1 expression significantly reduced the astrocytes apoptosis ($P<0.01$). **Conclusions** The present study revealed the expressions and functions of glutamate and GABA transporters in the astrocytes under the ischemia. It is suggested that the increasing in GLT1 expression and decrease in GAT1 expression may have the curative effects on epilepsy or ischemia.

【Key words】 Astrocytes; Glutamate; Glutamate transporter 1; γ -aminobutyric acid transporter 1; Expression; Hypoxia; Apoptosis

多种原因可引起脑缺血、缺氧,从而导致神经功能障碍^[1,2]。Matsumoto 等^[3]报道脑缺血可引起中枢神经系统 L-谷氨酸的过量释放,从而导致神经元死亡。另有研究发现缺血引起 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)受体的激活,可以抑制 L-

谷氨酸的释放^[4,5]。谷氨酸转运蛋白 1 (glutamate transporter 1, GLT 1) 和 GABA 转运蛋白 1 (GABA transporter 1, GAT1) 共同维持细胞外 GABA 和谷氨酸的水平。然而,在缺血、缺氧状态下, GAT1 和 GLT1 相互作用机制目前仍然不清楚。本文探讨缺氧条件下星形胶质细胞 GAT1 和 GLT1 的表达变化及作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及氯化钴诱导缺氧环境 星形胶质细胞在含有 10% 胎牛血清 (PAA, Linz, Austria) 的 DMEM 中培养。在培养液中加入 100 μ mol/L 氯化钴

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2018.11.012

基金项目:上海市浦东新区卫生和计划生育委员会重点专科 (PWZzk2017-16)

作者单位:201300 上海,复旦大学附属上海市浦东医院神经外科(王之涵、邢进、魏子龙、沙龙贵、周新军、任力);200127 上海,上海交通大学医学院附属仁济医院神经外科(林盈盈、邱永明)

通讯作者:任力, E-mail: slysw@sina.com

溶液模拟缺氧环境,培养16、24、48 h后,进行分析星形胶质细胞GLT1和GAT1蛋白及mRNA表达。

1.2 GLT1和GAT1基因沉默与过表达 通过慢病毒介导的表达特异性的短发夹RNA获得GLT1或GAT1基因沉默稳转细胞株。靶向敲减序列是3'-GCCTGGATTTGGTTGAGTTAT-5'。采用基因重组技术将GLT1或GAT1基因插入慢病毒表达载体,构建慢病毒重组质粒。慢病毒转染细胞时加入8 μg/ml聚凝胺以提高转染效率。

1.3 GLT1和GAT1 mRNA表达的检测 转染48 h后,收集细胞,采用实时荧光定量PCR检测GLT1和GAT1 mRNA表达水平。Trizol-Reagent法分离提取RNA,使用DNA酶(DNA-free kit; Ambion Applied Biosystems)处理样品,除去样品中的DNA,使用RNA逆转录试剂盒(Promega)合成cDNA。甘油醛-3-磷酸脱氢酶作为内参。实时荧光定量PCR使用SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)试剂盒,采用7900HT Fast Real-Time PCR仪(Applied Biosystems)进行分析。实验重复3次。

1.4 GLT1和GAT1蛋白的检测 转染48 h后,收集细胞,采用免疫印迹法检测GLT1和GAT1蛋白表达。使用含有蛋白酶抑制剂混合物和磷酸化抑制剂混合物的RIPA缓冲液提取蛋白,取适量蛋白加至10%~15%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中,并转移到硝酸纤维素膜(Millipore, Billerica, MA, USA)。一抗孵育过夜后,加入适当浓度二抗孵育1 h。以增强化学发光法添加化学发光显影剂(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA),用柯达胶片曝光。一抗为GLT1, GAT1, actin蛋白为内参。

1.5 细胞凋亡测定 特定浓度西妥昔单抗、伊立替康或西妥昔单抗+伊立替康分别处理细胞24 h。使用Annexin V-PE凋亡检测试剂盒(559763, BD Pharmingen, USA)检测细胞凋亡。步骤如下:将细胞以1×10⁶个细胞/ml的浓度重悬于1×结合缓冲液中,

向以下各管中加入100 μl该悬浮液:①空管;②含Annexin V-PE 5 μl离心管;③含有7-AAD 5 μl离心管;④Annexin V-PE(5 μl)+7-AAD(5 μl)离心管。轻轻涡旋管并在室温下在避光温育15 min。将400 μl 1×缓冲液加入每管,并进行流式细胞术分析。

1.6 统计学分析 应用SPSS 19.0软件处理;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用t检验;P<0.05具有统计学意义。

2 结果

2.1 星形胶质细胞在缺氧条件下GLT1和GAT1 mRNA和蛋白的表达变化 利用氯化钴处理星形胶质细胞16、24、48 h模拟缺氧。与对照组相比,GLT1蛋白和mRNA表达水平明显下降,并呈时间依赖性(P<0.05,图1A、1C),而GAT1蛋白和mRNA表达明显上调(P<0.05,图1B、1D)。

2.2 过表达GAT1与抑制GLT1增加缺氧条件下星形胶质细胞死亡 利用慢病毒介导的shRNA基因敲除系统,敲除星形胶质细胞GLT1基因,结果显示mRNA表达降低60%以上(图2A)。同时,慢病毒介导的基因过表达系统有效增加GAT1表达(图2B)。GLT1和GAT1的蛋白质水平也被证实(图2C)。在缺氧条件下,GAT1过表达同时抑制GLT1的表达明显增加星形胶质细胞的凋亡率(图2D、2E)。

2.3 抑制GAT1与过度表达GLT1减少缺氧条件下星形胶质细胞的死亡 构建GLT1过度表达同时GAT1低表达的星形胶质细胞,结果显示,GLT1 mRNA高度上调(图3A),而GAT1的表达下降70%以上(图3B)。GLT1和GAT1的蛋白质水平也呈相应变化(图3C)。GLT1过表达且GAT1低表达能够减少星形胶质细胞在缺氧条件下的凋亡(图3D、3E)。

3 讨论

目前,神经系统共发现5种谷氨酸转运蛋白亚型,其中2型谷氨酸转运体(GLT1)最具有特征性^[8]。

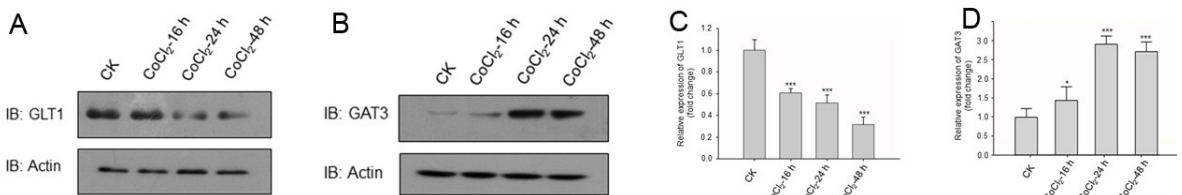


图1 在缺氧条件下星形胶质细胞GLT1和GAT1蛋白和mRNA表达变化 A、B. 蛋白表达;C、D. mRNA表达;CK. 对照组;CoCl₂-16h、CoCl₂-24h、CoCl₂-48h. CoCl₂模拟缺氧16、24、48 h;与对照组相比,*P<0.05,***P<0.01

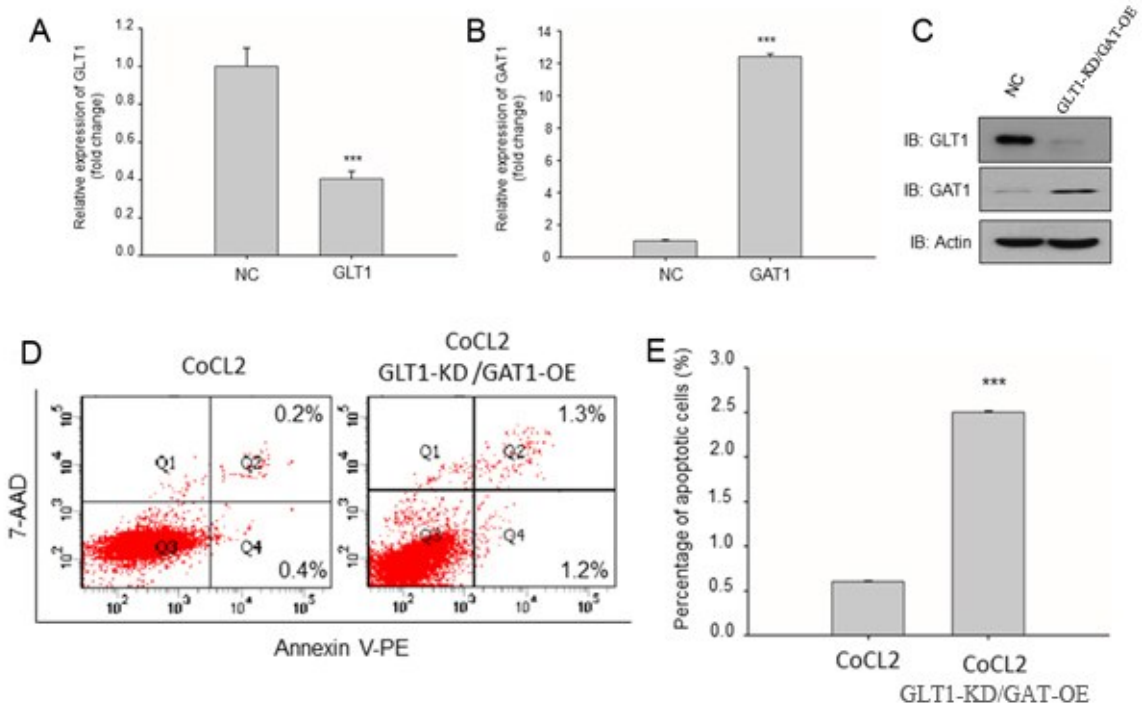


图2 过表达GAT1与抑制GLT1对缺氧条件下星形胶质细胞凋亡率的影响

A~C. 稳定转染过表达GAT1与GLT1-shRNA的星形胶质细胞GAT1与GLT1蛋白和mRNA水平的检测,与对照组相比,**** $P < 0.01$;D、E. 过表达GAT1与抑制GLT1增加细胞凋亡率,与对照组相比,*** $P < 0.01$;NC. 对照组;CoCl₂: GLT1-OE/GAT1-KD. 过表达GAT1与抑制GLT1组

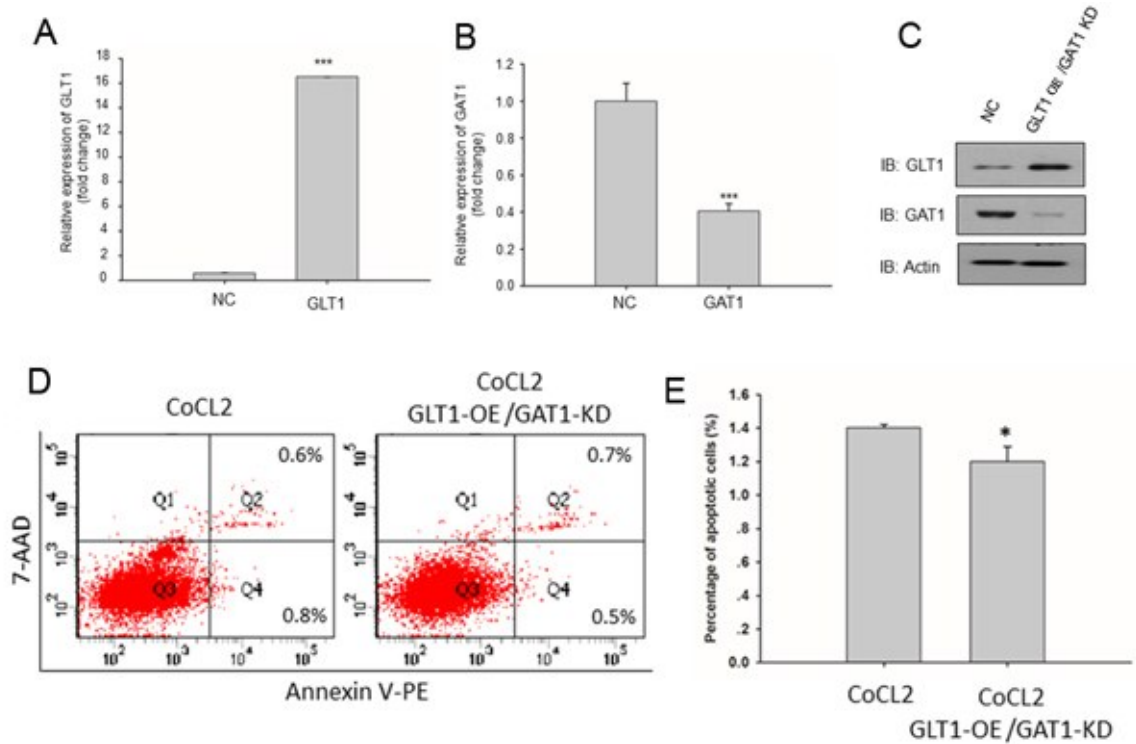


图3 抑制GAT1与过度表达GLT1对缺氧条件下星形胶质细胞凋亡率的影响

A~C. 稳定转染GAT1-shRNA与过表达GLT1的星形胶质细胞GAT1与GLT1蛋白和mRNA水平的检测,与对照组相比,*** $P < 0.01$;D、E. 抑制GAT1与过度表达GLT1减少细胞凋亡率,与对照组相比,*** $P < 0.01$;NC. 对照组;CoCl₂: GLT1-OE/GAT1-KD. 抑制GAT1与过度表达GLT1组

⁹⁾。GLT1是星形胶质细胞的关键转运蛋白,在大脑皮层和海马中高表达^[9-12]。在脑缺氧缺血性疾病中,GLT1的功能受到抑制,加重神经元的损伤^[13,14]。也有报道称,GAT1的两个主要亚型负责调节细胞外GABA的水平,分别为神经元GAT1和胶质细胞GAT1^[15,16]。在突触间隙中,GAT1将GABA转移,从而抑制GABA传递。慢性神经系统异常,多发生在缺氧缺血的早期,可能与GAT功能的变化密切相关^[17,18]。另外,脑血栓大鼠模型研究发现GAT1蛋白水平降低^[19]。

我们发现在缺氧条件下培养的星形胶质细胞GLT1和GAT1的表达显著降低;过表达GAT1同时抑制GLT1增加星形胶质细胞凋亡率,而下调GAT1与过度表达GLT1减少星形胶质细胞凋亡率。这提示GLT1和GAT1在缺氧状态下星形胶质细胞的表达和发挥功能,抑制GAT1与过度表达GLT1可能对脑缺血缺氧性疾病治疗有一定的作用。

总之,GLT1和GAT1在缺血缺氧脑损伤中起着重要作用,靶向干扰GLT1和GAT1功能可能对脑缺血缺氧性疾病的治疗有影响。

【参考文献】

[1] Mwaniki MK, Atieno M, Lawn JE, *et al.* Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review [J]. *Lancet*, 2012, 379: 445-452.

[2] Douglas-Escobar M, Weiss MD. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician [J]. *JAMA Pediatr*, 2015, 169: 397-403.

[5] Matsumoto M, Zornow MH, Scheller MS, *et al.* AMPA and NMDA receptor antagonists do not decrease hippocampal glutamate concentrations during transient global ischemia [J]. *Anesthesiology*, 1992, 77: 764-771.

[6] Matsumoto N, Kumamoto E, Furue H, *et al.* GABA-mediated inhibition of glutamate release during ischemia in substantia gelatinosa of the adult rat [J]. *J Neurophysiol*, 2003, 89: 257-264.

[7] Voytenko LP, Lushnikova IV, Savotchenko AV, *et al.* Hippocampal GABAergic interneurons coexpressing alpha7-nicotinic receptors and connexin-36 are able to improve neuronal viability under oxygen-glucose deprivation [J]. *Brain Res*, 2015, 1616: 134-145.

[8] Dumont AO, Goursaud S, Desmet N, *et al.* Differential

regulation of glutamate transporter subtypes by pro-inflammatory cytokine TNF-alpha in cortical astrocytes from a rat model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *PloS One*, 2014, 9: e97649.

[9] Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, *et al.* Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT [J]. *Eur J Neurosci*, 1997, 9: 1646-1655.

[10] Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, *et al.* Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry [J]. *Neuron*, 1995, 15: 711-720.

[11] Holmseth S, Dehnes Y, Huang YH, *et al.* The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS [J]. *J Neurosci*, 2012, 32: 6000-6013.

[12] Kojima S, Nakamura T, Nidaira T, *et al.* Optical detection of synaptically induced glutamate transport in hippocampal slices [J]. *J Neurosci*, 1999, 19: 2580-2588.

[13] Ji YF, Zhou L, Xie YJ, *et al.* Upregulation of glutamate transporter GLT-1 by mTOR-Akt-NF-small ka, Cyrillic B cascade in astrocytic oxygen-glucose deprivation [J]. *Glia*, 2013, 61: 1959-1975.

[14] Dallas M, Boycott HE, Atkinson L, *et al.* Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes [J]. *J Neurosci*, 2007, 27: 3946-3955.

[15] Conti F, Minelli A, Melone M. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications [J]. *Brain Res*, 2004, 45: 196-212.

[16] Jin XT, Galvan A, Wichmann T, *et al.* Localization and function of GABA transporters GAT-1 and GAT-3 in the basal ganglia [J]. *Front Syst Neurosci*, 2011, 5: 63.

[17] Clarkson AN, Huang BS, Macisaac SE, *et al.* Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke [J]. *Nature*, 2010, 468: 305-309.

[18] Lee V, Maguire J. The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type [J]. *Front Neural Circuits*, 2014, 8: 3.

[19] Frahm C, Siegel G, Grass S, *et al.* Stable expression of the vesicular GABA transporter following photothrombotic infarct in rat brain [J]. *Neuroscience*, 2006, 140: 865-877.

(2018-03-24收稿,2018-05-18修回)