

• 基础研究 •

干扰 NIX 通过抑制自噬缓解脊髓神经元的缺血再灌注损伤

王培文 姚学东 俞海明 庄华烽 许 昊

【摘要】 目的 观察线粒体外膜蛋白 NIX 能否通过抑制自噬缓解脊髓神经元缺血再灌注损伤。**方法** 利用 H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/mL}$) 处理分离的原代脊髓神经元, 以构建体外缺血再灌注模型, 通过转染 shNIX 干扰 NIX 的表达, 并通过流式凋亡检测与 CCK-8 增殖检测观察脊髓神经元的凋亡情况, PCR 检测 NIX 基因的转录水平, 蛋白免疫印迹法检测 NIX、LC3 与 Beclin 蛋白的表达水平。**结果** shNIX 能显著下调 NIX 基因的转录水平与蛋白的表达水平, 抑制效果明显, 用于后续的实验操作。流式凋亡检测与 CCK-8 增殖检测表明, 缺血再灌注损伤诱导脊髓神经元出现凋亡, 降低其增殖速度。缺血再灌注损伤促进 NIX、LC3 和 Beclin 的表达。shNIX 使缺血再灌注损伤诱导脊髓神经元的凋亡减少, 促进了细胞的增殖, 并且使 LC3 和 Beclin 的蛋白表达减少。**结论** 干扰 NIX 通过抑制自噬减弱了缺血再灌注诱导的脊髓神经元损伤。

【关键词】 NIX; 脊髓神经元; 缺血再灌注; 自噬

【中图分类号】 R394; R651.2 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2024)04-0088-04

Interference of NIX alleviates spinal cord neurons ischemia-reperfusion injury by inhibiting autophagy

WANG Peiwen, YAO Xuedong, YU Haiming, ZHUANG Huafeng, XU Hao

Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian 362000, China

【Abstract】 Objective This study aimed to observe whether interference of mitochondrial outer membrane protein NIX could alleviate spinal cord neurons ischemia-reperfusion injury by inhibiting autophagy. **Methods** Primary spinal cord neurons were isolated and treated with H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/mL}$) to construct the ischemia-reperfusion cell model in vitro. The expression of NIX was knocked down by transfection with shNIX. The apoptosis and proliferation of spinal cord neurons were observed by flow cytometry proliferation of CCK-8 proliferation detection. The transcriptional level of NIX gene was detected by PCR, and the protein expression of NIX, LC3, and Beclin were detected by Western blotting. **Results** shNIX significantly downregulated the transcription level and protein expression levels of NIX, and the inhibition effect is obvious, which is used for subsequent experimental operations. Flow cytometry proliferation of CCK-8 proliferation detection showed that ischemia-reperfusion injury induced apoptosis of spinal cord neurons with reduced proliferation rate. In addition, ischemia-reperfusion injury promoted the expressions of NIX, LC3, and Beclin. More importantly, shNIX reduced the apoptosis of spinal cord neurons, promoted cell proliferation, as well as reduced the protein expressions of LC3 and Beclin. **Conclusion** Interference of NIX attenuated ischemia-reperfusion induced spinal cord neurons injury by inhibiting autophagy.

【Key words】 NIX; spinal cord neuron cells; ischemia reperfusion; autophagy

脊髓损伤具有高致残率和高致死率的特点, 但目前缺少有效的治疗方法^[1]。研究表明, 脊髓损伤后可以观察到大量的神经元的凋亡, 恢复神经元功能可能是治疗脊髓损伤的一个重要途径。脊髓损伤通过多种途径介导线粒体自噬途径^[2]。NIX 位于线粒体外膜, 通过与自噬小体蛋白结合形成线粒体/

NIX/微管相关蛋白轻链 3 (LC3) 的复合物, 促进脊髓损伤后线粒体的过度自噬, 进而导致神经元死亡^[3]。本研究利用 H_2O_2 处理分离的原代脊髓神经元, 构建体外缺血再灌注损伤模型, 并通过转染 shNIX 干扰 NIX 的表达, 观察细胞凋亡、增殖及自噬相关蛋白表达。

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2020J01211)

作者单位: 福建医科大学附属第二医院骨科, 泉州 362000

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.04.026

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 H_2O_2 购买于麦克林, cDNA 和 PCR 的试剂盒信息购买于 APEXbio, shNIX 和对照 shNC 均购买于江苏赛索飞生物科技有限公司, Lipofectamin3000 购买于赛默飞生物, TriQuick Reagent 购买于 SoLarbio, 抗体 NIX 和 LC3 从武汉三鹰购买, BCA 试剂盒、CCK-8 试剂购买于 biosharp, 流式细胞仪品牌为 BD Biosciences, 型号为 FACSCanto II。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠原代脊髓神经元分离 动物实验获得了福建医科大学附属第二医院伦理委员会的批准[伦理号:【2020】福医附二伦理审字(82)]。32 只雌雄 SD 大鼠合笼饲养并每日对雌鼠进行检查。当发现有雌鼠阴道内有孕栓时, 计为妊娠第 1 天。在第 15 天时采用脱颈椎法处死孕鼠, 取出胎鼠。用 Hanks 液冲洗胎鼠 3 次后, 分离原代大鼠脊髓神经元细胞。具体方法如下: 首先使胎鼠俯卧于培养皿中, 剥离胎鼠背部皮肤以及脊髓两侧的组织以暴露出整条脊髓, 取腹侧部于 PBS 液中清洗 2 次。然后将脊髓剪成 1 mm^3 大小并放入 1.5 mL 的 0.25% 胰蛋白酶液中, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 的 5% 的 CO_2 培养箱中孵育 30 min , 震荡 5 次。筛网过滤细胞悬液后放入离心机于 $1\,000\text{ 转/min}$ 下离心 8 min 。于培养箱中孵育 5 h 后, 再补加适量的培养液继续培养 24 h , 全量换液后于第 3 天加终浓度为 $2.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的阿糖胞苷作用 48 h 抑制非神经细胞增殖。此后每 $2\sim 3$ 天半量换液, 选取第 3 代细胞用于实验。

1.2.2 大鼠脊髓神经元缺血再灌注模型构建 将大鼠脊髓神经元原培养基去掉, 加入 H_2O_2 工作液处理 15 min , 然后更新为原培养基继续培养, 即可制成大鼠脊髓神经元缺血再灌注损伤模型。

1.2.3 干扰 NIX 根据 Lipofectamin3000 说明书于大鼠脊髓神经元转染 shRNA。当细胞密度为 80% 时, 准备两个 EP 管, 分别用 MEM 稀释 lipofectamine 和 shRNA, 然后将稀释的两管以 $1:1$ 的比例混合孵育 15 min , 再将混合物与细胞共孵育, 于 48 h 后开展后续的实验。

1.2.4 NIX 的基因表达检测 TriQuick Reagent 试剂提取大鼠脊髓神经元中的总 RNA。取 $1\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 用于 cDNA 逆转录。并根据 SoLarbio 试剂盒的说明书进行 PCR 扩增。

1.2.5 蛋白免疫印迹法检测 NIX、LC3 和 Beclin

的蛋白表达水平 大鼠脊髓神经元经处理后加入预冷的裂解液于冰上裂解。收集裂解液, 并使用 BCA 法检测蛋白浓度。用缓冲液制成电泳样品。取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。然后进行 PVDF 转膜, 再用 5% 牛血清白蛋白于室温下封闭 2 h 。接着 PVDF 膜和稀释的一抗于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜孵育。第二天用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min , 加入 ECL 观察蛋白条带。使用 Image J 对蛋白条带进行半定量。GAPDH 为内参。

1.2.6 流式凋亡检测 对照组为正常培养后, 大鼠脊髓神经元转染 shNC 48 h ; 模型组为大鼠脊髓神经元经过 H_2O_2 处理 15 min 后, 再转染 shNC 4 h ; 模型+shNIX 组为模型组大鼠脊髓神经元再转染 shNIX 48 h 。取 5×10^5 细胞加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ Annexin V-FITC 和 $5\text{ }\mu\text{L}$ PI, 轻轻吹打混匀后于室温避光孵育 15 min 。最后上流式细胞仪检测。

1.2.7 CCK-8 增殖检测 对照组、模型组和模型+shNIX 组分组处理同流式凋亡检测一样。然后消化细胞, 取 3000 个细胞 ($100\text{ }\mu\text{L}$ 培养基中) 接种于 96 孔板中。每个组别的每个时间点设置 3 个复孔。于指定的时间 0 、 24 、 48 和 72 h 时, 每组的 3 个复孔分别加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的 CCK-8 溶液, 将培养板放入培养箱中孵育 2 h 后用酶标仪测定 450 nm 处的吸光值, 即 OD 值。

1.3 统计学分析 所有的数据均用平均数 \pm 标准差显示。所有的柱形图与折线图均由 Graphpad 8.02 绘制, 组间的比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 shNIX 抑制大鼠脊髓神经元中 NIX 的基因转录和蛋白表达水平 将 shNIX 和对照干扰载体 shNC 分别利用 lip300 转染入原代大鼠脊髓神经元 48 h 后检测 NIX 的基因表达水平和蛋白表达水平。与 shNC 组相比, shNIX 降低了 NIX 的基因转录和蛋白表达水平, 降低至 shNC 的 40% 水平, 被用于后续的实验。

2.2 NIX 在大鼠脊髓神经元缺血再灌注损伤模型中表达上调 NIX 的基因转录和蛋白表达水平结果如图 1A 和图 1B, 相对于对照组, 模型组中 NIX 的基因转录和蛋白表达明显增加, 基因表达水平约增加 2 倍, 而蛋白表达水平约增加 1.5 倍, shNIX 能降低缺血再灌注损伤诱导的 NIX 基因转录和蛋白水平。

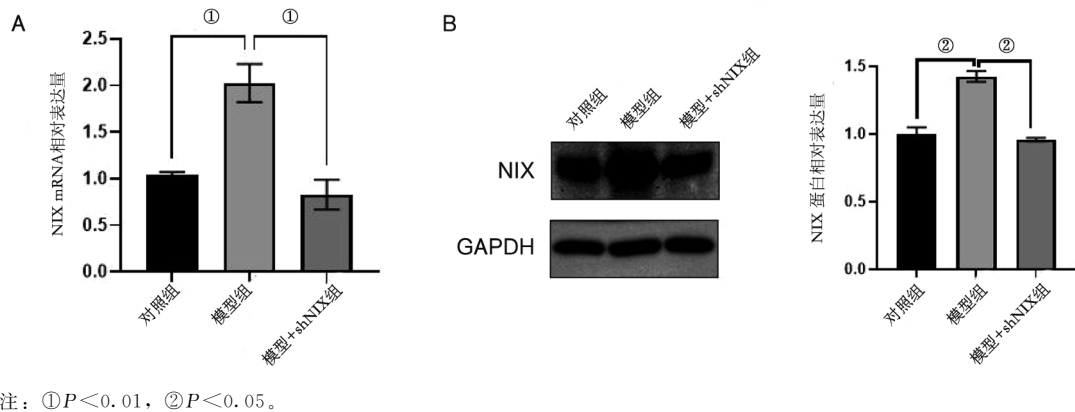
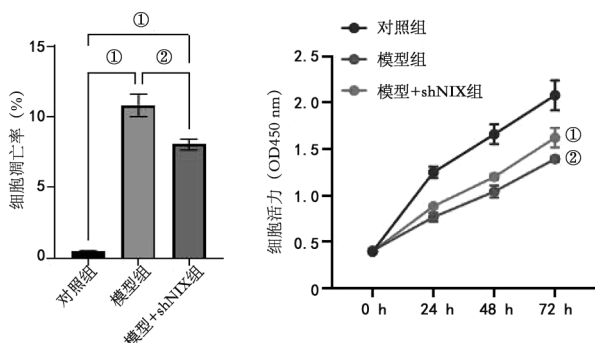


图 1 NIX 基因转录及蛋白表达水平

2.3 shNIX 降低缺血再灌注损伤诱导的大鼠脊髓神经元凋亡 如图 2 所示, 与对照组相比, 模型组的凋亡从低于 1% 增加到约 10%, 而 shNIX 降低缺血再灌注损伤诱导的凋亡。如图 3 所示, CCK-8 的增殖检测显示在 72 h, 对照组的增殖最快。与对照组相比, 模型组的增殖下降。与模型组相比, 模型+shNIX 组的增殖能力增强, 尽管仍然低于对照组。



注: ① $P < 0.01$, ② $P < 0.05$ 注: ① $P < 0.05$, ② $P < 0.05$ 。

图 2 大鼠脊髓神经元的凋亡比例

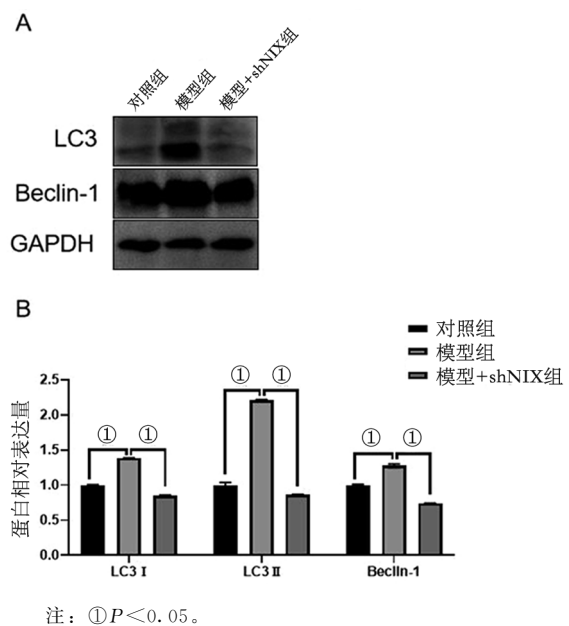
图 3 CCK-8 的增殖检测细胞活力

2.4 shNIX 调控自噬相关蛋白表达 最后检测自噬的关键指标 LC3 与 Beclin 的蛋白表达水平。与对照组相比, 模型组的 LC3 与 Beclin 的蛋白表达水平均显著上调, 而 shNIX 抑制了缺血再灌注损伤诱导 LC3 与 Beclin 的蛋白表达水平上调。见图 4。

3 讨论

脊髓损伤是一种破坏神经的病理状态, 包括一系列破坏性事件, 如缺血、氧化应激、炎症事件、凋亡途径和运动功能障碍^[4]。其中促进神经元恢复可能是治疗脊髓损伤有效途径之一^[5]。

BNIP3 和 NIX 是 BCL-2 家族“非典型”成员,



注: ① $P < 0.05$ 。

图 4 shNIX 调控自噬相关蛋白表达

它们具有与 BCL-2 其他家庭蛋白成员不同的 BH3 结构域, 并通过二聚化插入至细胞器的膜从引发细胞死亡, 因而也被称为调节细胞命运的功能因子^[6]。NIX 参与线粒体的自噬, 例如在脑病性 mtDNA 耗竭综合征中, BNIP3 和 NIX 累积诱导线粒体自噬, 而 FBXL4 通过阻止 NIX 和 BNIP3 的积累来积极抑制线粒体自噬^[7]。在脊髓损伤中, 研究表明 NIX 的表达上调, 并通过形成线粒体-BNIP3-LC3 自噬体复合物并导致线粒体自噬^[8]。与这个研究一致的是, 在我们的研究中 H_2O_2 处理原代脊髓神经元促进了 NIX 的表达。

自噬是一种分解代谢过程, 旨在去除受损的蛋白质或细胞器, 它是溶酶体降解和产生生存信号的重要机制^[9]。研究表明, 自噬在心肌缺血损伤过程中诱导细胞存活, 但在再灌注损伤过程中导致细胞

死亡^[10]。LC3 和 Bcln-1 是自噬正向调控相关蛋白,一些研究已经使用它们来检测自噬^[11]。本研究的结果表明,脊髓神经元在 H₂O₂ 处理后,LC3 和 Bcln-1 的表达上调。与此同时,流式凋亡和 CCK-8 的增殖结果表明凋亡增加,细胞增殖减慢。而干扰 NIX 的表达后,LC3 和 Bcln-1 的表达被抑制,凋亡减少,细胞增殖加快,这意味着干扰 NIX 可以通过抑制自噬减缓 H₂O₂ 诱导神经元损伤。

综上所述, H₂O₂ 通过促进 NIX 的表达介导自噬诱导大鼠神经元损伤,而干扰 NIX 抑制自噬促进神经元的存活。因此, NIX 有望成为恢复神经元功能一个靶点。

参考文献

- [1] 殷德振,陈聪,王鹏,等. LncRNA CYTOR 对大鼠背脊髓神经元细胞损伤及炎症因子的影响 [J]. 河北医药, 2023, 45 (8): 1152-1156.
- [2] 丁铁群,李喜功,潘文明,等. 脊髓损伤中线粒体自噬的作用及进展 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27 (35): 5727-5733.
- [3] NIE P, WANG H, YU D, et al. NIX Mediates Mitophagy in Spinal Cord Injury in Rats by Interacting with LC3 [J]. Cell Mol Neurobiol, 2022, 42 (6): 1983-1994.
- [4] ANJUM A, YAZID M D, FAUZI D M, et al. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions and Un-

derlying Recovery Mechanisms [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21 (20): 7533.

- [5] HU X, XU W, REN Y, et al. Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. Signal transduction and targeted therapy, 2023, 8 (1): 245.
- [6] FIELD J T, GORDON J W. BNIP3 and Nix: Atypical regulators of cell fate [J]. Biochimica et Biophysica Acta Molecular cell research, 2022, 1869 (10): 119325.
- [7] NGUYEN-DIEN G T, KOZUL K L, CUI Y, et al. FBXL4 suppresses mitophagy by restricting the accumulation of NIX and BNIP3 mitophagy receptors [J]. The EMBO Jou, 2023, 42 (13): e112767.
- [8] YU D, LI M, NI B, et al. Bcl-2/E1B-19KD-Interacting Protein 3/Light Chain 3 Interaction Induces Mitophagy in Spinal Cord Injury in Rats Both In Vivo and In Vitro [J]. Journal of neurotrauma, 2018, 35 (18): 2183-2194.
- [9] FILOMENI G, DE ZIO D, CECCONI F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs [J]. Cell death and differentiation, 2015, 22 (3): 377-388.
- [10] SHI B, MA M, ZHENG Y, et al. mTOR and Beclin1: Two key autophagy-related molecules and their roles in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. The Journal of Cellular Physiology, 2019, 234 (8): 12562-12568.
- [11] GALLUZZI L, GREEN D R. Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery [J]. Cell, 2019, 177 (7): 1682-1699.

• 基础研究 •

基于体外微量反应评价某些甾醇类化合物对 5 α 还原酶的抑制作用

林 滨 蔡沓粟 何小蓉 何 宇 江 举

【摘 要】 目的 基于体外微量反应,体外筛选有效的 5 α 还原酶抑制物。**方法** 从 SD 大鼠肝脏中获得 5 α 还原酶的粗酶,建立体外微量反应体系,通过反应前后睾酮量的变化来评价受试甾醇类化合物对 5 α 还原酶的抑制作用。**结果** 在反应体系中加入二甲基亚砷 (DMSO),解决非那雄胺及受试甾醇类化合物在水相中溶解度低等的问题,确保微量反应有效进行,从而得到可靠的筛选结果。**结论** 羊毛甾醇在体外具有较好的 5 α 还原酶抑制效果,或许可以成为新型的 5 α 还原酶抑制物。

【关键词】 5 α 还原酶; 非那雄胺; 体外; 脱发

【中图分类号】 R914 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2024)04-0091-04

基金项目: 福州市科学技术局医疗卫生项目 (2022-S-070); 福州市“十四五”临床专科培育建设项目整形外科 (20220303)

作者单位: 福州市皮肤病防治院,福州 350025

通信作者: 江 举, Email: 846069532@qq.com

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.04.027