

甘丙肽2型受体对氧化应激海马神经元自噬的
调控作用及机制研究*杨 阳¹⁾ 张 晨¹⁾ 冯露秋¹⁾ 谢 清¹⁾ 杨成迎¹⁾ 甘 玲^{1,2)**}⁽¹⁾ 西南大学动物医学院, 重庆 402460; ⁽²⁾ 西南大学医学院免疫研究中心, 重庆 402460

摘要 本研究旨在解析仔猪脑海马甘丙肽2型受体 (galanin receptors type 2, GALR2) 参与氧化应激调节的分子机制. 本研究基于成功构建的仔猪活体和大鼠海马神经元氧化应激模型, 采用实时PCR技术考察仔猪脑海马和大鼠海马神经元GALR2的表达变化. 并采用实时PCR、蛋白质印迹法及透射电镜技术进一步探索GALR2介导的信号途径和自噬之间的关系. 结果发现, 与对照组相比, 氧化应激仔猪脑海马与海马神经元GALR2的转录水平上调 ($P < 0.01$; $P < 0.05$). 同时, 氧化应激神经元自噬相关基因 *LC3*、*ATG5* 与 *Beclin-1* 的转录水平均上调 ($P < 0.05$; $P < 0.05$; $P < 0.01$). 相关性分析结果显示, GALR2 与 *LC3*、*ATG5* 及 *Beclin-1* 的转录水平正相关 ($P < 0.05$; $P < 0.05$; $P < 0.01$). GALR2 特异性抑制剂 M871 的处理降低氧化应激海马神经元的活力 ($P < 0.01$)、抑制氧化应激引起的自噬小体数量增多 ($P < 0.01$)、自噬相关基因 *LC3*、*Beclin-1* 及 *ATG5* 转录水平的上调 (均 $P < 0.01$) 以及 *LC3-II/β-actin* 比值与 P62 蛋白质水平的升高 (均 $P < 0.05$), 表明伴随 GALR2 表达水平的抑制, 被氧化应激上调的海马神经元自噬效应被抑制, 从而削弱对氧化损伤的抵抗, 降低了神经元的活力. 与此同时, M871 的处理也降低了被氧化应激上调的 JNK 蛋白表达量 ($P < 0.01$) 及磷酸化水平 ($P < 0.05$), 表明 JNK 是 GALR2 调控海马神经元氧化应激的下游靶酶. 而 JNK 特异性抑制剂 SP600125 的处理则下调了被氧化应激上调的自噬标记蛋白 *LC3-II/β-actin* 比值 ($P < 0.01$), 表明氧化应激状态下, 抑制的 JNK 阻碍了神经元中上调的 GALR2 对自噬信号通路的激活. 综上所述: 氧化应激状态下, 海马神经元中上调的 GALR2 可通过调节 JNK 信号途径激活细胞自噬途径, 从而降低神经元的氧化应激损伤, 保护神经元.

关键词 GALR2, 氧化应激, 自噬, 海马神经元**中图分类号** S85, Q51, Q591**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0331

氧化应激 (oxidative stress, OS) 是指动物机体氧化与抗氧化作用失衡, 活性氧自由基 (oxygen free radical, OFR) 产生过多, 机体自身无法及时清除, 产生大量氧化中间产物, 进而导致动物机体损伤的病理状态. 仔猪在生长过程中, 由于环境、营养条件的改变及生物应激源的刺激, 容易发生氧化应激^[1]. 氧化应激可降低仔猪的生产性能、增加发病率和死亡率, 严重地阻碍了养猪业的发展^[2]. 动物脑海马体由于富含多不饱和脂肪酸、相对高水平的氧化还原过渡金属离子, 因此极易遭受氧化应激^[3-4], 同时海马体由于富含多种具有抗氧化特性的神经肽、神经递质和受体等, 使其也成为调节机体氧化应激的核心位点^[5]. Lathe^[6] 在 2001 年的一篇综述中特别强调了海马在监测生

理环境和调节应激反应中的重要作用.

甘丙肽 (galanin, GAL) 是一种在中枢神经系统中广泛分布的神经肽, 其主要通过激活 G 蛋白偶联受体 GALR1、GALR2 和 GALR 参与体内信号通路的调节, 与细胞的生长、分化、对环境的应激适应、炎症反应等多种生理或病理过程密切相关. 哺乳动物中 GAL 及 GALRs 在组织系统间的表达分布高度相似, 且序列具有较高同源性, 其中, GALR2 在海马齿状回中具有最高的表达水平^[7-9].

* 重庆市研究生科研创新项目 (CYS18135) 和重庆市生猪产业技术体系创新团队项目资助.

** 通讯联系人.

Tel: 13983416663, E-mail: gl9089@sina.com

收稿日期: 2020-09-10, 接受日期: 2020-12-11

Gan等^[10]研究发现, 脑海马GAL信号途径可能通过上调GALR2的表达参与对仔猪氧化应激的调控, 然而其下游的调控机制尚不清楚.

自噬 (autophagy) 是机体中回收再利用受损细胞器的溶酶体降解途径. 该途径高度保守, 广泛存在于真核生物中. 研究表明, 氧化应激中产生的活性氧物质 (reactive oxygen species, ROS) 能诱导自噬的发生, 而自噬能清除氧化应激损伤的线粒体、内质网、过氧化物酶体等细胞器, 减缓细胞死亡^[11-13], 因此, 自噬是动物机体氧化应激调控中不可或缺的重要环节^[14]. 当自噬过程被阻断时, 将发生毒性蛋白聚集和线粒体功能损伤, 从而加剧氧化应激^[12-13, 15-16]. 目前, 细胞自噬是否介导了GALR2信号途径对海马神经元氧化应激的调控尚不清楚. 本研究采用肌注右旋糖酐铁构建仔猪活体氧化应激模型, 考察GALR2转录水平的变化, 并基于成功培养的大鼠海马神经元, 采用H₂O₂诱导构建海马神经元氧化应激损伤模型, 检测GALR2与自噬信号通路相关分子的表达变化, 并进一步通过阻断试验探索细胞自噬和GALR2信号途径之间的关系, 为动物脑海马氧化应激调控机制的研究提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 试验动物

出生24 h内的SD大鼠 (SPF级) 购自重庆医科大学实验动物中心; 新生荣昌猪仔猪由重庆市荣昌猪保种猪场提供.

1.2 主要试剂

100 g/L 右旋糖酐铁购自湖北江峰药业有限公司; 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、总抗氧化能力 (T-AOC)、过氧化氢含量测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 多聚赖氨酸 (PDL)、阿糖胞苷、台盼蓝购自Sigma公司; L-谷氨酰胺、Penicillin-Streptomycin、HBSS basic、B27 supplement、FBS、DMEM/F-12培养基、NB (neurobasal TM-a) 培养液均购自美国GIBCO; 鼠抗MAP2多克隆抗体、鼠抗GFAP多克隆抗体、FITC Affinipure抗鼠荧光二抗购自美国Novusbio公司; DAPI购自北京四正柏生物有限公司; Triton-X-100购自北京索莱宝公司; 山羊血清工作液购自北京中杉生物试剂有限公司; MTT细胞增殖检测试剂盒、M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒、即用PCR扩增试剂盒、TBST购自上海生工生

物有限公司; 2步法实时定量PCR (RT-qPCR) 专用反转录试剂盒、SYBR Premix Ex TaqII 定量试剂盒购自TaKaRa公司 (日本); DEPC、BeyoECL Star (化学发光试剂盒) 购自碧云天生物技术有限公司 (中国上海); Trizol、脱脂奶粉购自BBI生命科学有限公司 (中国上海); 琼脂糖购自BIOWEST (西班牙); RIPA、PMSF、SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒、Tris、SDS、Glycine等购自Biosharp (中国安徽); 蛋白质印迹法 (Western blotting) 所用一抗均购自CST (美国); 二抗HRP-羊抗兔IgG购自武汉三鹰; M871、SP600125等抑制剂购自Abcam (英国); 戊二醛固定液购自Spi-Chem (中国北京).

1.3 试验方法

1.3.1 引物设计与合成

根据GenBank中已公布的基因序列号 (表1), 采用Primer Premier 5.0软件设计引物, 所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成.

1.3.2 仔猪肌肉注射右旋糖酐铁以构建氧化应激模型

将60只胎次相似、母猪日粮成分相同、体重差异不显著 (<0.1 kg) 的1日龄健康荣昌仔猪随机分为两组, 每组5个重复, 每个重复6只仔猪. 参考Meneghini^[17]的方法, 在仔猪出生的第1天, 氧化应激建模组每只仔猪肌肉注射200 mg右旋糖酐铁. 在仔猪出生的第3天, 氧化应激建模组仔猪继续肌肉注射400 mg右旋糖酐铁, 而对照组肌肉注射相同剂量的生理盐水. 7日龄时前腔静脉采集各组仔猪血液并按照T-AOC与过氧化氢含量测定试剂盒说明书要求检测血清中T-AOC的大小与H₂O₂的含量. 8日龄时在每个重复组中选取最接近平均体重的两只仔猪, 麻醉、剖杀后采集脑部组织样本, 并分离海马组织, 经液氮速冻后, 保存于-80℃冰箱备用. 提取总RNA, 并采用实时PCR (real-time PCR) 技术检测GALR2的转录水平.

1.3.3 原代大鼠海马神经元培养及氧化应激模型的构建

取新生24 h内SD大鼠在无菌条件断头处死, 冰上剥离海马组织, 并浸润在10% FBS -DMEM-F12培养基中剪碎、吹散、消化, 用200目孔径筛网过滤后, 用适量DMEM/F12 (含10% FBS胎牛血清) 将单细胞悬液稀释后, 均匀接种在细胞瓶或6孔板中, 进行海马神经元原代培养, 2~4 h后待大多数细胞开始附壁, 将培养基换成含2% B27、

Table 1 Primer pairs used in the study

Genes	NCBI No.	Sequences (5'→3')	Length/bp
<i>GAPDH-Pig</i>	NM_001206359.1	F: CATCAAGAAGGTGGTGAA R: AAGTGGAAGAGTGAGTGT	92
<i>GALR2-Pig</i>	XM_021066605.1	F: GCACCACCAACCTGTTTCATCCTC R: CAGAGCAGCGAGCCGAACAC	121
<i>GAPDH</i>	NM_017008.4	F: GACATGCCGCCTGGAGAAAC R: AGCCCAGGATGCCCTTTAGT	92
<i>GAL</i>	NM_033237.1	F: CCATTGACAACCACAGATCATTTA R: CAACACTTCCTAGTCTCCCTTC	96
<i>GALR1</i>	NM_012958.3	F: GTTCCCATAGGTGTACAGAGTTC R: GGTGTCTTAGTCCACAGGATTAC	108
<i>GALR2</i>	NM_019172.5	F: AACGCAAGGTGACACGGATGATC R: GGTTGACACAGGAGTTGGCATAGG	174
<i>GALR3</i>	NM_019173.1	F: TGCCTTAACCCGCTCGTCTA R: TGGGCTCCATACTCCAACCA	196
<i>LC3</i>	NM_199500.2	F: GCCTGTCTGGATAAGACCAA R: ACCATGCTGTGCTGGTTCAC	135
<i>Beclin-1</i>	NM_001034117.1	F: CTGGACCGAGTGACCATTCA R: AGACACCATCCTGGCGAGTT	133
<i>ATG5</i>	NM_001014250.1	F: AAGCAGCTCTGGATGGGACT R: CCACAGGACGGAACAGCTTC	165

1% L-谷氨酰胺及1%双抗（10⁵ U/L青霉素、100 mg/L链霉素）的neurobasal TM-a培养基进行维持培养，每2 d置换一次，2 d后加入阿糖胞苷（终浓度：2 mg/L）抑制胶质细胞增殖，24 h后全部置换培养基。采用MAP2-GFAP免疫荧光法鉴定神经元的纯度，以确保胶质细胞百分比低于5%。

为了确定诱导氧化应激发生的最佳条件，分别采用终浓度为0、100 μmol/L、200 μmol/L、300 μmol/L的H₂O₂对培养第7天的神经元进行2 h的诱导刺激，以构建体外培养的原代海马神经元氧化损伤模型，每组3个重复。按照MDA与SOD试剂盒说明书要求检测MDA含量和SOD的活性。

1.3.4 氧化应激对GAL及其受体与自噬的影响

采用Trizol裂解法分别提取大鼠海马神经元及猪脑海马的总RNA，并采用2步法real-time PCR专用反转录试剂盒进行cDNA的制备，反转录合成的cDNA分装于-20℃冷冻保存。以*GAPDH*作为内参基因，采用RT-qPCR技术检测神经元*GAL*、*GalR1-3*、自噬相关基因（*Beclin-1*、*LC3*与*ATG5*）及仔猪海马组织中*GalR2*的转录水平。real-time PCR的反应体系（20 μl）如下：SYBR Premix Ex Taq 10.0 μl，ROX Reference Dye 0.4 μl，PCR Forward Primer 0.4 μl，PCR Reverse Primer 0.4 μl，DNA模板2.0 μl，ddH₂O 6.8 μl。反应程序（两步

法）：95℃，30 s；95℃，5 s，60℃，30 s，40个循环；95℃，15 s，60℃，1 min，95℃，15 s。采用2^{-ΔΔCt}相对定量法计算基因相对表达量。

1.3.5 GALR2特异性抑制剂M871对氧化应激海马神经元的影响

将原代培养第7天的海马神经元随机分为对照组、氧化应激组及氧化应激+ M871组，每组3个重复。其中，氧化应激组采用终浓度为200 μmol/L H₂O₂进行诱导，而氧化应激+ M871组则在添加H₂O₂的基础上添加M871（终浓度为1 μmol/L）作为抑制剂处理组。采用透射电镜观察自噬体的形成变化：将细胞转移至1.5 ml离心管中，4℃下用0.1 mol/L PBS漂洗3次，15 min/次；1%锇酸溶液固定2 h，无菌水清洗3次，15 min/次；50%、70%、90%梯度乙醇浸泡脱水各15 min，100%乙醇脱水3次，5 min/次，100%环氧丙烷脱水3次，5 min/次；环氧丙烷：包埋液=2：1包埋2 h，环氧丙烷：包埋液=2：1包埋3 h或过夜，再使用纯包埋液处理过夜后室温静置3~4 h；放恒温烘箱内聚合，37℃ 12 h，45℃ 12 h，60℃ 48 h；超薄切片机切片（70 nm）；3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色，染片后晾干观察拍片，每组选取5张相同倍数视野进行自噬小体计数。RT-qPCR法检测各组神经元*GALR1-3*及*Beclin-1*、*LC3*与*ATG5*等基因的转录

变化,具体方法与1.3.4相同. Western blotting检测自噬相关蛋白LC3、P62和JNK信号通路相关蛋白质的表达水平:用含1% PMSF的RIPA裂解液裂解细胞,冰上静置30 min, 12 000 r/min, 4℃,离心30 min,收集上清;加入上样缓冲液 (loading buffer), 98℃热处理10 min后进行垂直电泳:80 V 20 min, 120 V 1 h;转膜:200 mA, 90 min;取下PVDF膜5%脱脂奶粉室温慢摇封闭1~2 h;一抗孵育:室温慢摇2 h或4℃过夜, TBST漂洗3次, 10 min/次;二抗孵育:室温慢摇1 h, TBST漂洗3次, 10 min/次,即可滴加适量显色液进行显影.

1.3.6 JNK特异性阻断剂SP600125对氧化应激海马神经元自噬的影响

将原代培养第7天的海马神经元随机分为3组.添加H₂O₂ (终浓度为200 μmol/L)作为氧化应激组,添加H₂O₂ (终浓度为200 μmol/L) + SP600125 (终浓度为20 μmol/L)作为抑制剂处理组,添加等量DMSO (<0.05%)设为对照组. Western blotting检测各组神经元LC3的表达变化.

1.3.7 统计分析

采用SPSS 20.0软件对试验数据进行统计分析.独立样本 t 检验或单因素方差分析检测各组数据的差异显著性.所有的试验结果均用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 表明差异显著, $P < 0.01$ 表明差异极显著.采用线性相关分析考察两变量之间的相关性.

2 结 果

2.1 氧化应激状态下仔猪海马组织中GALR2基因mRNA水平的变化

结果显示,与对照组相比,肌注右旋糖酐铁组仔猪脑组织及血清中的H₂O₂含量均极显著升高($P < 0.01$,图1a),T-AOC水平均极显著降低($P < 0.01$,图1b),表明仔猪氧化应激模型构建成功.

Real-time PCR结果显示,与对照组相比,氧化应激组仔猪脑海马GALR2的转录水平极显著上调($P < 0.01$) (图1c).

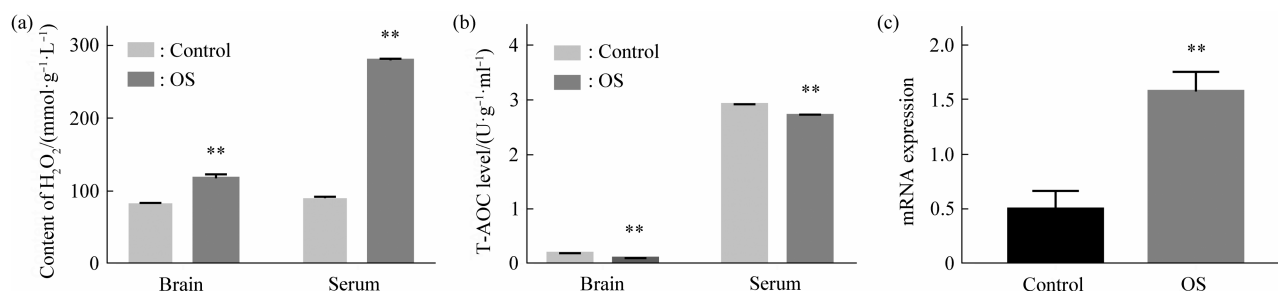


Fig. 1 Effects of iron injection on H₂O₂ content, T-AOC levels in brain and serum as well as GALR2 transcription levels in hippocampus of piglets ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

(a) The H₂O₂ content in brain and serum of piglets; (b) The T-AOC levels in brain and serum of piglets; (c) The transcription expression levels of GALR2 in hippocampus of piglets. OS: oxidative stress induced by the injection of iron dextran; ** the difference is extremely significant compared with the control, $P < 0.01$.

2.2 氧化应激状态下大鼠海马神经元中GAL及自噬信号通路相关基因mRNA水平的变化

由于神经元是构成神经系统结构和功能的基本单位,因此,为进一步考察GALR2参与氧化应激调控的下游信号途径,本研究在体外构建大鼠海马神经元氧化应激模型.结果显示,不同浓度H₂O₂处理下, H₂O₂浓度越高, SOD活力越低 (图2a), MDA含量越高 (图2b).与对照组相比, 200 μmol/L处理组神经元的SOD活力极显著降低($P < 0.01$,图2a),而MDA含量显著升高($P < 0.05$,

图2b).因此,后续选择200 μmol/L H₂O₂作为构建海马神经元氧化应激模型的工作浓度.

与对照组相比,氧化应激状态下,海马神经元中GALR2的表达量显著升高($P < 0.05$,图2c),与氧化应激状态下仔猪脑海马中上调的GALR2表达水平一致.此外,与对照组相比,氧化应激神经元中自噬相关基因LC3及ATG5的转录水平均显著上调($P < 0.05$), Beclin-1的转录水平则极显著上调($P < 0.01$,图2d).

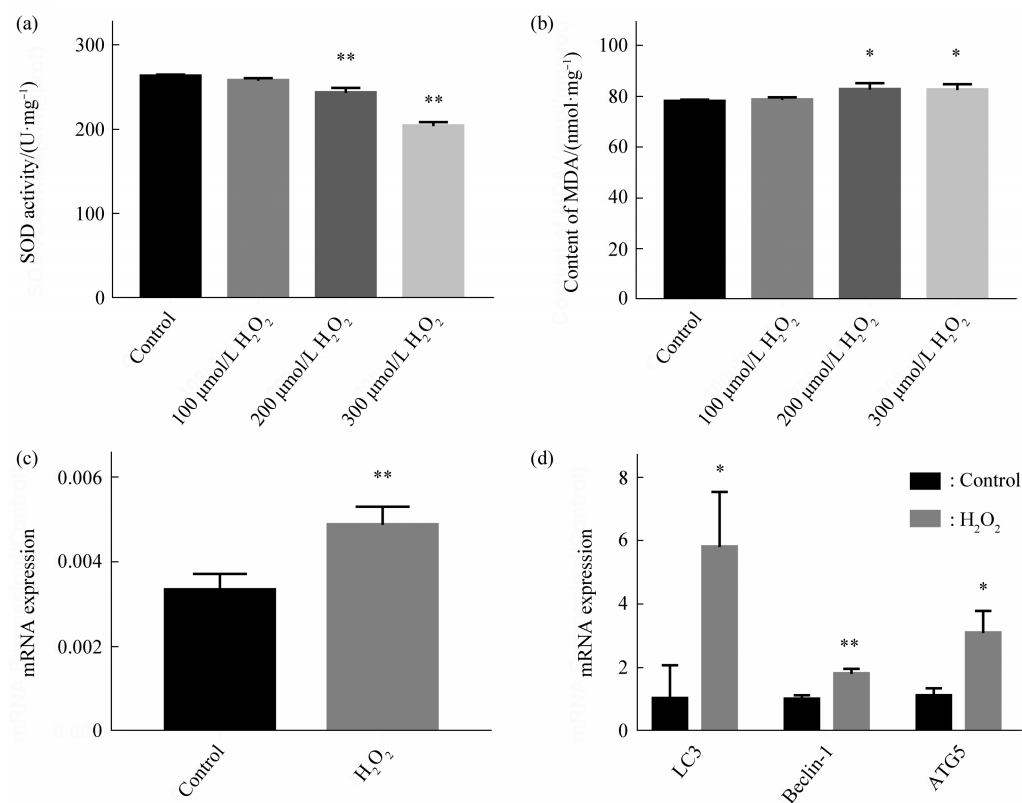


Fig. 2 Effect of H₂O₂ on MDA content, SOD activity and the transcription levels of GALR2 and autophagy signaling pathway related genes in hippocampal neurons ($\bar{x}\pm s$, $n\geq 3$)

(a) SOD activities; (b) MDA content; (c) The transcription levels of GALR2; (d) The transcription levels of LC3, Beclin-1 and ATG5. *The difference is significant compared with the control, $P<0.05$; ** The difference is extremely significant compared with the control, $P<0.01$.

2.3 大鼠海马神经元中GALR2与自噬相关基因转录水平的相关性分析

线性相关性分析结果显示：海马神经元中GALR2与LC3的转录水平呈显著正相关关系 (Pearson系数=0.978, $P<0.05$, 图3a); GALR2与

Beclin-1的转录水平呈极显著正相关关系 (Pearson系数=0.990, $P<0.01$, 图3b); GALR2与ATG5的转录水平呈显著正相关关系 (Pearson系数=0.714, $P<0.05$, 图3c). 以上结果表明GALR2的表达与神经元的自噬信号通路呈正相关.

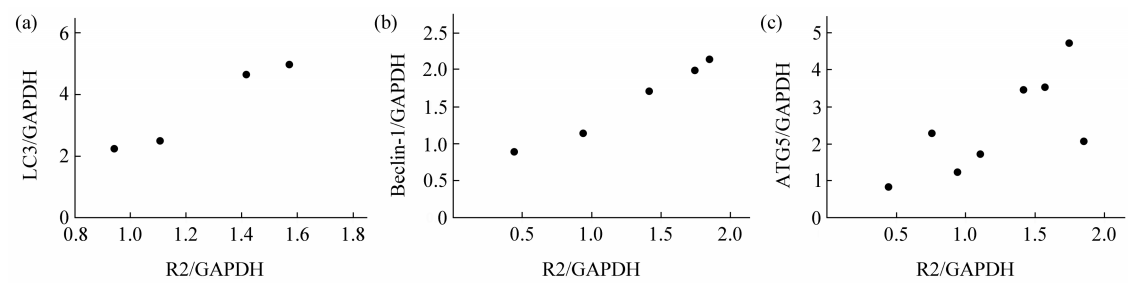


Fig. 3 Correlation analysis of GALR2 and LC3/ Beclin-1/ATG5 transcription levels ($\bar{x}\pm s$, $n\geq 3$)

(a) Correlation analysis of GALR2 and LC3 transcription level; Pearson=0.978, $P<0.05$. (b) Correlation analysis of GALR2 and Beclin-1 transcription expression levels; Pearson=0.990, $P<0.01$. (c) Correlation analysis of GALR2 and ATG5 transcription levels; Pearson=0.714, $P<0.05$.

2.4 GALR2特异性抑制剂M871对氧化应激海马神经元细胞活力、自噬水平及自噬相关基因表达水平的影响

为考察 GALR2 是否介导了氧化应激海马神经元自噬活性的变化,本研究在使用 GALR2 特异性抑制剂 M871 处理神经元后,采用 MTT 法考察海马神经元的活力.结果显示,在 M871 处理后,氧化应激海马神经元的活力极显著下降 ($P<0.01$),进一步表明 GALR2 参与了海马神经元抵抗氧化应激损伤,保护神经元活率的调控过程(图 4a).

采用透射电镜观察神经元自噬小体.结果显示,与对照组相比(图 4b, e),氧化应激组海马神经元双层膜结构的自噬小体数量极显著增多 ($P<0.01$, 图 4c, e),而 M871 处理组的自噬

小体数量同氧化应激组相比则极显著降低 ($P<0.01$, 图 4d, e).Western blotting 分析结果显示,氧化应激状态下,海马神经元中自噬降解底物 P62 表达量极显著上升 ($P<0.01$, 图 4f, g),而 LC3 蛋白表达量也显著增加,LC3 II/ β -actin 比值显著升高 ($P<0.05$, 图 4f, h),由此表明,氧化应激诱发了不完全的自噬效应.而使用 M871 处理后, P62 的蛋白质表达水平与 LC3-II/ β -actin 比值均显著降低 ($P<0.05$), LC3、Beclin-1 及 ATG5 的转录水平均极显著下调 ($P<0.01$, 图 4i).以上结果显示,伴随 GALR2 表达的抑制,被氧化应激上调的海马神经元自噬效应被显著抑制,表明氧化应激上调的 GALR2 通过激活自噬通路抵抗氧化损伤.

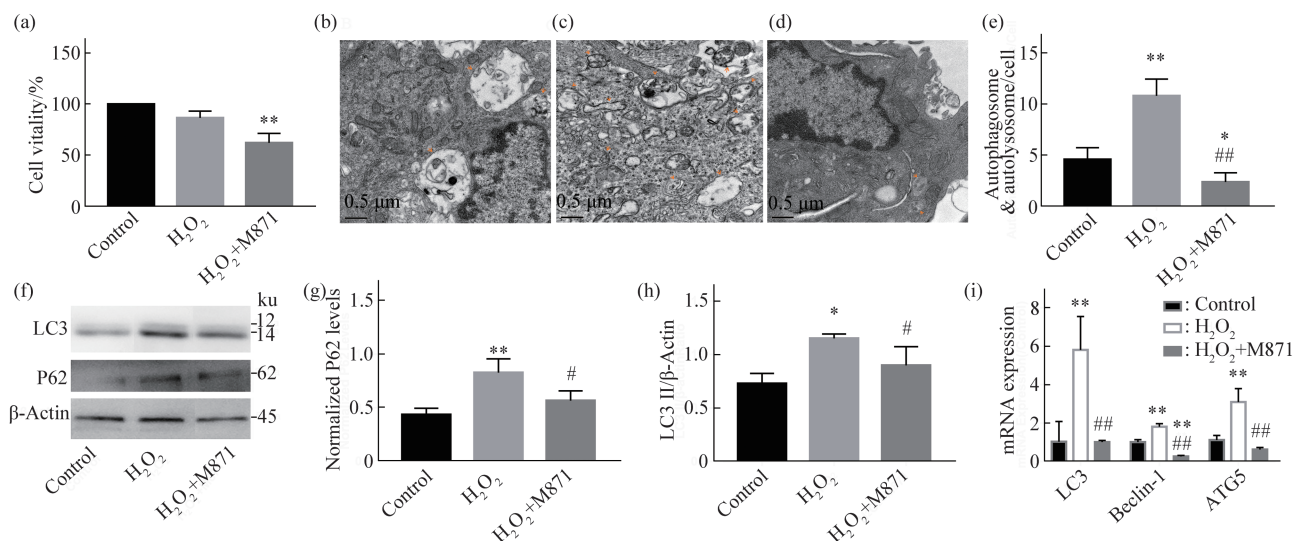


Fig.4 Effect of M871 on viability and autophagy of hippocampal neurons ($\bar{x}\pm s$, $n\geq 3$)

(a) Neuronal viability; (b) Electron micrograph in the control group (20 000 $\times$, arrow means autophagosomes); (c) Electron micrograph in the oxidative stress group (20 000 $\times$, arrow means autophagosomes); (d) M871 group (20 000 $\times$, arrow means autophagosomes); (e) Statistical analysis of the number of autophagosomes in each group; (f) The expression profiles of LC3 and P62 detected by Western blotting; (g) Based on figure (f), the protein level of P62 was digitized; (h) LC3-II/ β -actin ratio was calculated based on (f); (i) Transcription levels of LC3, Beclin-1 and ATG5. *The difference is significant compared with the control, $P<0.05$; ** The difference is extremely significant compared with the control, $P<0.01$; # The difference is significant compared with the oxidative stress group, $P<0.05$; ## The difference is extremely significant compared with the oxidative stress group, $P<0.01$.

2.5 JNK信号通路在氧化应激激活海马神经元自噬过程中的功能解析

本研究发现:氧化应激状态下,海马神经元中 JNK 的蛋白质水平极显著上调 ($P<0.01$),磷酸化蛋白 p-JNK 表达量显著增加 ($P<0.05$);而与氧化应激组相比, M871 处理组 JNK 蛋白表达量极显著减少 ($P<0.01$),磷酸化蛋白 p-JNK 表达水平显著下调 ($P<0.05$) (图 5a, b, c).由此表明, JNK 是 GALR2 调控海马神经元氧化应激的下游靶酶.

为进一步表明 JNK 介导了 GALR2 调节自噬抵抗氧化应激过程,本研究采用 JNK 特异性抑制剂 SP600125 处理氧化应激海马神经元.结果表明,与氧化应激组相比,抑制剂组的 p-JNK 水平极显著降低 ($P<0.01$),与此同时,被氧化应激上调的自噬标记蛋白 LC3-II/ β -actin 比值也显著下调 ($P<0.01$) (图 5d, e, f),表明氧化应激状态下,抑制的 JNK 阻碍了神经元中上调的 GALR2 对自噬信号通路的激活.

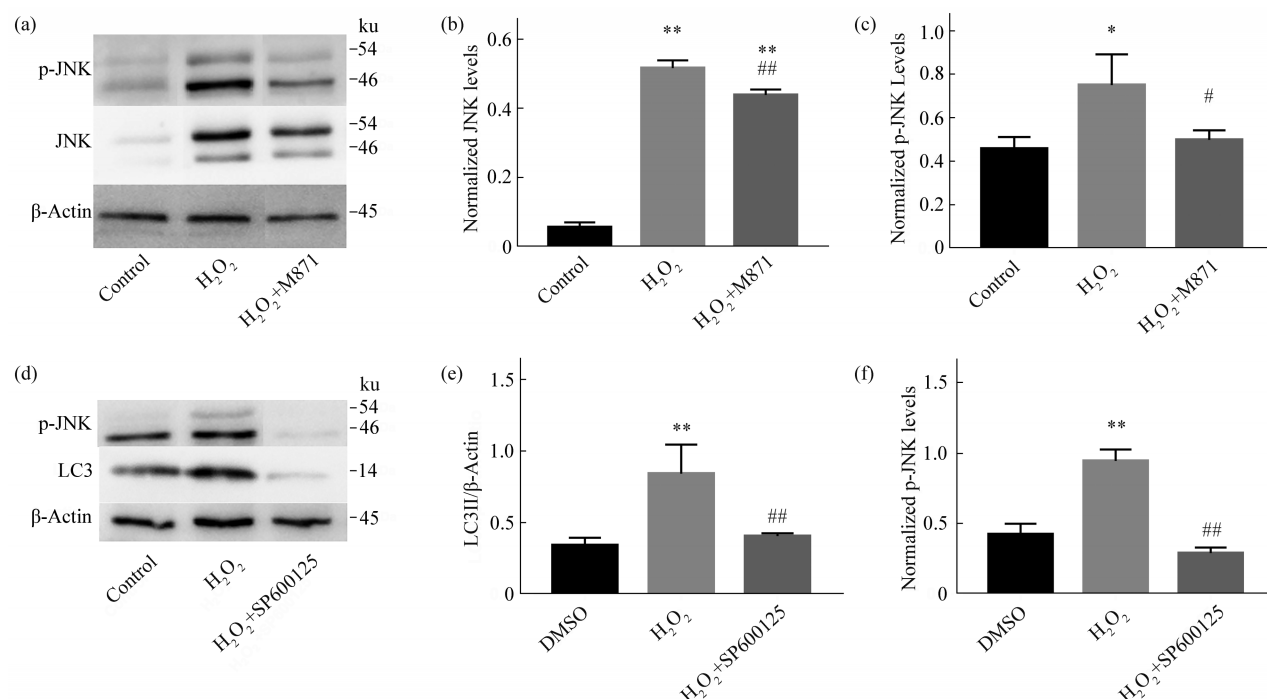


Fig. 5 Regulation of JNK pathway to autophagy in hippocampal neurons with oxidative stress ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

(a) Western blotting technique was used to detect the effect of M871 on JNK protein and its phosphorylation level in oxidative stress hippocampal neurons; (b) The protein level of JNK was digitized based on (a); (c) JNK phosphorylation level was digitized based on (a); (d) Western blotting technique was used to detect the effect of SP600125 on JNK phosphorylation and LC3 protein expression in oxidative stress hippocampal neurons. (e) LC3-II/β-actin ratio was calculated based on (d). (f) JNK phosphorylation level was digitized based on (d). *The difference is significant compared with the control, $P<0.05$; ** The difference is extremely significant compared with the control, $P<0.01$; # The difference is significant compared with the oxidative stress group, $P<0.05$; ## The difference is extremely significant compared with the oxidative stress group, $P<0.01$.

3 讨 论

肌肉注射右旋糖酐铁是诱导新生仔猪氧化应激的有效模型^[18-19]. 与此相似, 在本研究中, 肌肉注射右旋糖酐铁极显著地提高了仔猪脑海马H₂O₂的含量, 降低了总抗氧化能力, 表明仔猪脑海马氧化应激模型构建成功. H₂O₂和O^{2•-}是生物学中最常见也最重要的ROS. 因此, 为了进一步考察脑海马神经元在氧化应激状态下激活的GALR2对下游信号通路的调节机制, 本研究采用H₂O₂处理原代海马神经元以构建神经元氧化应激模型. 结果发现, 200 μmol/L的H₂O₂处理能极显著降低SOD活力, 且显著增加MDA的含量. 由于SOD是对抗氧自由基的第一道防线, 而MDA是脂质过氧化的产物, 引起细胞毒性应激的罪魁祸首之一, 是氧化应激标志物^[20], 因此上述结果表明, 海马神经元氧化损伤模型构建成功. 此外, 本研究发现, 成功诱发的氧化应激导致海马神经元中GALR2转录水平增加, 这与氧化应激仔猪海马组织中GALR2的表达变化一致, 表明海马神经元表达的GALR2参与了对氧

化应激的调控. 由于神经肽及其受体的抗应激作用明显优于其他内源性化合物^[21], 因此解析海马中神经肽信号通路对氧化应激的调控, 将有助于实现氧化应激损伤的精准防控. 以前的研究表明, 神经肽P物质(substance P, SP)^[22]、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)^[23]及肌肽(carnosine)^[24]等都曾被报道在氧化应激过程中发挥重要的调控功能. 与此同时, 我们也发现自噬相关基因LC3、ATG5及Beclin-1的转录水平也显著或极显著上调. ATG1~10、12~14、16和18被称为“核心ATG蛋白”, 是自噬体形成所必需的关键物^[25], 自噬启动时, ULK1(Unc-like kinase 1, Atg1同源物)复合物会调节Beclin-1及ATG12-ATG5-ATG16等复合物的生成, 启动自噬体的形成^[26-27]. 自噬过程中, 当自噬泡闭合时, ATG12-ATG5-ATG16复合物从膜上脱落, 只有膜结合形式的LC3-II定位于自噬体膜上, 其含量与自噬体数量成正比, 因而被广泛用于自噬研究^[28]. 因此, 检测LC3、ATG5及Beclin-1的表达变化能很好地反映神经元的自噬状态. 这与以前的研究报道相似,

外源性 H_2O_2 的添加可导致胞内物质氧化及自噬相关蛋白 Beclin-1 水平的增加^[29-30]。另外有文献提出, 自噬在神经退行性疾病的发展过程中扮演着重要角色, 对神经元的存活起着关键的调控性作用。李天亮^[31] 利用 siRNA 干扰技术抑制自噬相关基因 (autophagy related gene, ATG) *ATG5* 或 *ATG7* 的表达后发现, 通过抑制细胞自噬, 可显著提高 salinomycin 诱导的细胞凋亡率。Cheng 等^[32] 的研究结果显示, 通过调节自噬可以促进神经元的存活, 当自噬相关蛋白 Beclin-1 和 *ATG5* 的表达被抑制时, 细胞活力显著降低。由此可见, 自噬介导了细胞氧化应激过程中抵抗损伤、保护细胞的作用过程。本研究的相关性分析表明, *GALR2* 与自噬相关基因的表达水平呈正相关, 推测 *GALR2* 可能通过调节自噬途径来发挥抗氧化损伤, 保护神经元的作用。为了验证该推测, 本研究采用 *GALR2* 特异性抑制剂 M871 抑制 *GALR2* 的表达, 结果表明, 伴随 *GALR2* 表达的抑制, 被氧化应激上调的海马神经元自噬效应被显著抑制。以前的大量研究报道了 *GALR2* 在海马病理性损伤部位的高度表达, 而相关体外试验也证实了 *GALR2* 对氧化损伤神经元的高度营养及修复作用^[33-34]。因此, 结合本研究结果, 不难理解 *GALR2* 能调节自噬抵抗氧化损伤保护, 从而保护神经元的效果和机制。

c-Jun N 端激酶 (c-Jun N-terminal kinases, JNK), 也被称为应激活化蛋白激酶 (stress-activated protein kinase, SAPK), 是 MAPK 家族中一种响应于细胞内各种应激信号而激活的蛋白酶体, 可对细胞自噬等机体多种生理活动进行调节^[35]。研究表明, JNK 可响应于胞内 ROS 的刺激而被活化, 并通过介导抗氧化反应激活自噬^[36]。JNK 可促进 Bcl-2 / Bcl-xL 磷酸化, 导致 Beclin-1 与 Bcl-2 / Bcl-xL 的解离, 同时干扰解离后的 Beclin-1 与其他含 BH3 结构域蛋白结合, 从而刺激自噬的发生^[37]。与 JNK 同属 MAPK 家族中细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular regulated kinases, ERK) 通路在促进神经元细胞增殖、分化抑制凋亡中发挥重要的调节作用。MAPK/ERK 通道参与了增殖、分化、生存和长时程增强^[38], 而 p38 MAPK 通道在中枢神经系统的激活可导致细胞死亡, 与脑缺血损伤有密切关系。Banerjee 等^[39] 的研究显示, *GALR2* 可通过 p38-MAPK 介导促血管生成细胞因子 (proangiogenic cytokines)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和 IL-6

的分泌, 诱导 SCCHN 肿瘤中的血管生成。此前该作者也曾发表 *GALR2* 通过 ERK 途径介导其他癌症表型 (如癌细胞的生长及存活) 的相关报道^[40]。本研究发现, JNK 是 *GALR2* 调控海马神经元氧化应激的下游靶酶。抑制的 JNK 阻碍了氧化应激神经元中上调的 *GALR2* 对自噬信号通路的激活, 证实氧化应激激活的 *GALR2* 可通过调节 JNK 信号通路上调氧化应激海马神经元中的自噬活性, 从而保护神经元免遭氧化应激损伤。

4 结 论

本研究首次表明, 氧化应激状态下, 海马神经元中上调的 *GALR2* 通过调节 JNK 信号途径激活细胞自噬途径, 从而减缓海马神经元的氧化应激, 保护神经元。本研究结果为仔猪神经系统氧化应激的调节机制及损伤防控提供了重要的信息。

参 考 文 献

- [1] 朱若岑, 蒋维维, 谭柱良, 等. 动物体内活性氧、氧化应激与细胞凋亡以及抗氧化剂研究进展. 中兽医医药杂志, 2015, **34**(3): 21-25
Zhu R C, Jiang W W, Tan Z L, *et al.* Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2015, **34**(3): 21-25
- [2] 李永义, 段绪东, 赵娇, 等. 茶多酚对氧化应激仔猪生长性能和免疫功能的影响. 中国畜牧杂志, 2011, **47**(15): 53-57
Li Y Y, Duan X D, Zhao J, *et al.* Chinese Journal of Animal Science, 2011, **47**(15): 53-57
- [3] Butterfield DA, Reed T, Newman S F, *et al.* Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Free Radical Biology and Medicine, 2007, **43**(5): 658-677
- [4] McKinnon, Peter J. DNA repair deficiency and neurological disease. Nature Reviews Neuroence, 2009, **10**(3): 100-112
- [5] Mao P. Oxidative stress and its clinical applications in dementia. Journal of Neurodegenerative Diseases, 2013, **2013**: 319898
- [6] Lathe R. Hormones and the hippocampus. Journal of Endocrinology, 2001, **169**(2): 205-231
- [7] Hokfelt T, Tatemoto K. Galanin: a multitasking neuropeptide. Exp Suppl, 2010, **102**: 1-5
- [8] Mitsukawa K, Lu X, Bartfai T. Galanin, galanin receptors and drug targets. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, **65**(12): 1796-1805
- [9] 马骥. Galanin 在神经细胞发育过程中的作用研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2008
Ma J. The Involvement of Galanin in Neuronal Development[D]. Shanghai: East China Normal University, 2008
- [10] Gan L, Yang B, Mei H. The effect of iron dextran on the transcriptome of pig hippocampus. Genes & Genomics, 2016, **39**(1): 1-14

- [11] Filomeni G, Zio D D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death & Differentiation*, 2015, **22**(3): 377-388
- [12] Scherzshouval R, Shvets E, Elazar Z. Oxidation as a post-translational modification that regulates autophagy. *Autophagy*, 2007, **3**(4): 371-373
- [13] Wu D, Cederbaum A I. Inhibition of autophagy promotes CYP2E1-dependent toxicity in HepG2 cells *via* elevated oxidative stress, mitochondria dysfunction and activation of p38 and JNK MAPK. *Redox Biol*, 2013, **1**(1): 552-565
- [14] Lee J, Giordano S, Zhang J H. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochemical Journal*, 2012, **441**: 523-540
- [15] Jeon Y M, Lee M Y. Airborne nanoparticles (PM0.1) induce autophagic cell death of human neuronal cells. *J Appl Toxicol*, 2016, **36**(10): 1332-1342
- [16] Wang T, Wang Q, Song R, *et al.* Autophagy plays a cytoprotective role during cadmium-induced oxidative damage in primary neuronal cultures. *Biological Trace Element Research*, 2015, **168**(2): 481-489
- [17] Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med*, 1997, **23**(5): 783-792
- [18] Langie S A, Kowalczyk P, Tudek B, *et al.* The effect of oxidative stress on nucleotide-excision repair in colon tissue of newborn piglets. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2010, **695**(1-2): 75-80
- [19] Lipinski P, Starzynski R R, Canonne-Hergaux F, *et al.* Benefits and risks of iron supplementation in anemic neonatal pigs. *Am J Pathol*, 2010, **177**(3): 1233-1243
- [20] 周晓静. 酮病奶牛血浆 GH 的动态变化及 BHBA 对肝细胞氧化应激的影响[D]. 广西: 广西大学, 2019
Zhou X J. Dynamic Changes of Plasma DH in Ketosis Cows and Effects of BHBA on Hepatic Oxidative Stress Abstract[D]. Guangxi: Guangxi University, 2019
- [21] Ishida H, Shirayama Y, Iwata M, *et al.* Infusion of neuropeptide Y into CA3 region of hippocampus produces antidepressant-like effect *via* Y1 receptor. *Hippocampus*, 2007, **17**(4): 271-280
- [22] 黄波, 付红敏, 杨鸣, 等. 高氧对早产鼠肺泡II型上皮细胞的影响及神经肽P物质的保护作用. 第三军医大学学报, 2008(24): 2285-2288
Huang B, Fu H M, Yang M, *et al.* *Journal of Third Military Medical University*, 2008(24): 2285-2288
- [23] Dang H X, Li J, Liu C, *et al.* CGRP attenuates hyperoxia-induced oxidative stress-related injury to alveolar epithelial type II cells *via* the activation of the Sonic hedgehog pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, **40**(1): 209-216
- [24] Ommati M M, Heidari R, Ghanbarinejad V, *et al.* The neuroprotective properties of carnosine in a mouse model of manganism is mediated *via* mitochondria regulating and antioxidative mechanisms. *Nutritional Neuroscience*, 2020, **23**(9): 1-13
- [25] Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, *et al.* Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, **10**(7): 458-467
- [26] Dowdle WE, Nyfeler B, Nagel J, *et al.* Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis *in vivo*. *Nat Cell Biol*, 2014, **16**(11): 1069-1079
- [27] Ronan B, Flamand O, Vescovi L, *et al.* A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy. *Nature Chemical Biology*, 2014, **10**(12): 1013-1019
- [28] Bildirici I, Longtine MS, Chen B, *et al.* Survival by self-destruction: a role for autophagy in the placenta?. *Placenta*, 2012, **33**(8): 591-598
- [29] Djavaheiri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, *et al.* NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**(41): 30373-30382
- [30] Djavaheiri-Mergny M, Javelaud D, Wietzerbin J, *et al.* NF-kappaB activation prevents apoptotic oxidative stress *via* an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNFalpha-treated Ewing sarcoma cells. *FEBS Letters*, 2004, **578**(1-2): 111-115
- [31] 李天亮. 内质网应激相关基因 DDIT3 调控肿瘤细胞自噬与凋亡的分子机制研究[D]. 山东: 山东大学, 2014
Li T L. Molecular Mechanisms of Autophagy and Apoptosis Regulated by Endoplasmic Reticulum Stress Related Gene DDIT3 in Human Cancer Cell [D]. Shandong: Shandong University, 2014
- [32] Cheng X Y, Li S Y, Mao C J, *et al.* Serum response factor promotes dopaminergic neuron survival *via* activation of beclin 1-dependent autophagy. *Neuroscience*, 2018, **371**: 288-295
- [33] Lundstrom L, Elmquist A, Bartfai T, *et al.* Galanin and its receptors in neurological disorders. *Neuromolecular Medicine*, 2005, **7**(1-2): 157-180
- [34] Elson J L, Kochaj R, Reynolds R, *et al.* Temporal-spatial profiling of pedunculopontine galanin-cholinergic neurons in the lactacystin rat model of parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 2018, **34**(1): 16-31
- [35] Kyriakis J M, Banerjee P, Nikolakaki E, *et al.* The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, 1994, **369**(6476): 156-160
- [36] Li Y, Luo Q, Yuan L, *et al.* JNK-dependent Atg4 upregulation mediates asperphenamate derivative BBP-induced autophagy in MCF-7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, **263**(1): 21-31
- [37] Zhou F, Yang Y, Xing D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *The FEBS Journal*, 2011, **278**(3): 403-413
- [38] Thiels E, Kanterewicz B I, Norman E D, *et al.* Long-term depression in the adult hippocampus *in vivo* involves activation of extracellular signal-regulated kinase and phosphorylation of Elk-1. *Journal of Neuroence the Official Journal of the Society for Neuroence*, 2002, **22**(6): 2054-2062
- [39] Banerjee R, Van Tubergen E A, Scanlon C S, *et al.* The G protein-coupled receptor GALR2 promotes angiogenesis in head and neck cancer. *Mol Cancer Ther*, 2014, **13**(5): 1323-1333
- [40] Banerjee R, Henson B S, Russo N, *et al.* Rap1 mediates galanin receptor 2-induced proliferation and survival in squamous cell carcinoma. *Cellular Signalling*, 2011, **23**(7): 1110-1118

The Regulatory Effect and Mechanism of Galanin Receptor on Autophagy in Hippocampal Neurons Under Oxidative Stress*

YANG Yang¹⁾, ZHANG Chen¹⁾, FENG Lu-Qiu¹⁾, XIE Qing¹⁾, YANG Cheng-Ying¹⁾, GAN Ling^{1,2)**}

¹⁾The Department of Veterinary Medicine, Rongchang Campus, Southwest University, Chongqing 402460, China;

²⁾Immunology Research Center, Institute of Medical Sciences, Southwest University, Chongqing 402460, China)

Abstract The aim of this study is to elucidate the molecular mechanism of Galanin receptors type 2 (GALR2) which involved in regulation of oxidative stress in the hippocampus. We used real-time PCR technique to investigate the change of GALR2 expression in hippocampus of piglets and hippocampal neurons of rats, based on the successfully constructed oxidative stress model. Real-time PCR, Western blotting and transmission electron microscopy were used to further explore the relationship between the signal pathway mediated by GALR2 and autophagy. The results showed that the transcription levels of GALR2 were up-regulated in the hippocampus of oxidative stressed piglets and rat hippocampal neurons compared with the control group ($P < 0.01$; $P < 0.05$). At the same time, the transcription levels of LC3, ATG5 and Beclin-1 in oxidative stressed neurons were up-regulated ($P < 0.05$; $P < 0.05$; $P < 0.01$). Correlation analysis showed that GALR2 was positively correlated with LC3, ATG5 and Beclin-1 ($P < 0.05$; $P < 0.05$; $P < 0.01$). The treatment with M871, a specific inhibitor of GALR2, decreased the activity of hippocampal neurons under oxidative stress ($P < 0.01$), increased the number of autophagosomes ($P < 0.01$) and transcription levels of LC3, Beclin-1 and ATG5 ($P < 0.01$), and increased the ratio of LC3-II/actin and P62 protein level ($P < 0.05$), showing that the autophagy of hippocampal neurons, which was up-regulated by oxidative stress, was inhibited with the inhibition of GALR2 expression, thus weakening the resistance to oxidative damage and decreasing the viability of neurons. Simultaneously, M871 treatment also decreased the up-regulated protein level ($P < 0.01$) and the phosphorylation level of JNK ($P < 0.05$) in oxidative stressed neurons, indicating that JNK is the downstream target enzyme of GALR2 in hippocampal neurons under oxidative stress. However, treatment with JNK specific inhibitor SP600125 lowered the ratio of LC3-II/actin, which was up-regulated by oxidative stress ($P < 0.01$), showing the inhibition of JNK blocks the activation of the autophagic pathway by an up-regulated GALR2 in neurons. To sum up: under oxidative stress, the up-regulated GALR2 in hippocampal neurons can activate the autophagy pathway by up-regulating JNK signal pathway, thus attenuate oxidative stress injury and protect neurons.

Key words GALR2, oxidative stress, autophagy, hippocampal neurons

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0331

* This work was supported by grants from Chongqing Postgraduate Research and Innovation Project (CYS18135) and The Innovation Team of Pig Industry Technology System in Chongqing.

** Corresponding author.

Tel: 86-13983416663, E-mail: gl9089@sina.com

Received: September 10, 2020 Accepted: December 11, 2020