

CD36 在棕榈酸诱导的星形胶质细胞凋亡中的作用

马 飞, 师 思, 李 江, 王晓良*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 本文主要探讨分化抗原簇 36 (cluster of differentiation, CD36) 在棕榈酸 (palmitic acid, PA) 诱导的星形胶质细胞凋亡中的作用。采用 MTT 法检测细胞活性、TUNEL 法检测细胞凋亡, 发现 PA 可使星形胶质细胞活性显著下降, 凋亡显著增加。用流式细胞术检测星形胶质细胞对 BODIPY FL C16 的摄取, 结果表明 CD36 在星形胶质细胞摄取 PA 过程中发挥关键作用。采用钙离子荧光染料和实时荧光记录系统检测细胞内钙离子浓度变化, 发现 PA 进入细胞后可通过 IP3 受体 (inositol trisphosphate receptor, IP3R) 引起星形胶质细胞内钙释放和内质网钙衰竭。采用 CM-H₂DCFDA 荧光染色方法检测细胞内氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 发现 PA 可引起星形胶质细胞 ROS 水平显著增加。CD36 抑制剂 *N*-油酰基硫代琥珀酰亚胺 (sulfo-*N*-succinimidylolate, SSO) 可以减少 PA 的摄取及其诱导的星形胶质细胞钙超载和 ROS 水平升高。IP3R 抑制剂二苯基硼酸-2-氨基乙酯 (2-aminoethyl diphenylborinate, APB) 可以抑制 PA 引起的钙超载和 ROS 水平升高。SSO、APB 和抗氧化剂 *N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetyl-*L*-cysteine, NAC) 对 PA 引起的星形胶质细胞活性下降均具有明显的保护作用。综上所述, CD36 介导 PA 进入星形胶质细胞, 进而引起钙超载和氧化应激, 导致细胞凋亡。CD36 可能成为保护星形胶质细胞的新靶点。

关键词: 棕榈酸; 星形胶质细胞; CD36; 钙超载; 氧化应激

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 06-0950-08

Role of CD36 in palmitic acid-induced apoptosis of astrocytes

MA Fei, SHI Si, LI Jiang, WANG Xiao-liang*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: This study was designed to investigate the role of CD36 in palmitic acid (PA)-induced apoptosis of astrocytes and the potential mechanisms of the action. MTT assay was used to detect cell viability and TUNEL assay to detect cell apoptosis. It was found that PA significantly decreased astrocyte cell viability and increased cell apoptosis. The uptake of BODIPY FL C16 by astrocytes was measured by flow cytometry. The results showed that CD36 played a key role in the process of PA uptake by astrocytes. The changes of intracellular calcium concentration were detected by FLIPR real-time fluorescence recording system. It was found that IP3R mediated PA signal to induce intracellular calcium release and finally caused endoplasmic reticulum calcium depletion. The intracellular ROS level was detected with CM-H₂DCFDA fluorescence staining. The ROS level was induced by PA in astrocytes. The effect was blocked by CD36 inhibitor SSO through inhibition of the uptake of PA. PA-induced calcium overload and ROS increase were prevented by

收稿日期: 2018-03-16; 修回日期: 2018-03-28.

基金项目: 国家科技重大专项资助项目 (2018ZX09711001-004); 重大协同创新项目-重大前沿研究资助项目 (CAMS-I2M-1-010).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165330, E-mail: wangxl@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0224

IP3R inhibitor APB. SSO, APB and antioxidant NAC all had significant inhibitory effects on PA-induced astrocyte cell viability decrease. In conclusion, CD36 mediates the translocation of PA into astrocytes, which leads to calcium overload, oxidative stress and eventually cell apoptosis.

Key words: palmitate; astrocyte; CD36; calcium overload; oxidative stress

肥胖和糖尿病等代谢综合征可以引起轻、中度认知功能障碍和学习记忆能力下降^[1]。血液中高游离脂肪酸状态是肥胖和糖尿病患者的共同病理特征之一,肥胖患者血浆脂肪酸含量约是正常人的 1.2 倍^[2],糖尿病患者夜间和餐后血浆脂肪酸含量分别是正常人的 1.5 和 3 倍左右^[3],且代谢综合征患者大脑对脂肪酸的摄取率也增加约 50%^[4]。临床研究表明,在 60 岁以上的老年群体中血浆非饱和脂肪酸水平与认知功能呈负相关^[5]。动物实验也表明,高脂和肥胖可引起认知能力下降^[6]。由此可见脂毒性可能是引起代谢综合征患者大脑功能损伤的一个重要因素。人脑约由 1×10^{12} 个细胞组成,其中 10% 为神经元,其余主要为神经胶质细胞,而星形胶质细胞是中枢神经系统数量最多的神经胶质细胞类型。星形胶质细胞具有许多重要的生理功能,如星形胶质细胞包绕神经元并填充神经元间的间隙起结构支撑和隔离绝缘的作用并维持突触传递,参与血脑屏障的构成和脑血流量的调节,维持大脑内环境 K^+ 、 H^+ 离子浓度稳态,代谢谷氨酸、 γ -氨基丁酸等神经递质,分泌神经营养因子促进神经元生长和修复,协助神经元抗氧化损伤等^[7, 8]。星形胶质细胞正常生理功能的异常或丧失是亨廷顿病、阿尔兹海默病、帕金森病和肌萎缩性脊髓侧索硬化症等神经退行性疾病的重要病理机制^[9]。综上所述,脂肪酸对星形胶质细胞的损伤可能是引起代谢综合征相关脑病的重要机制。棕榈酸 (palmitic acid, PA) 是具有 16 个碳原子的饱和脂肪酸,也是人血浆和脑脊液中含量最高的一类脂肪酸,约占总游离脂肪酸的 25%^[10]。因而本文重点研究 PA 进入星形胶质细胞的转运和对星形胶质细胞的损伤机制。

已有文献报道,PA 引起的巨噬细胞^[11]和肾脏足细胞^[12]凋亡是通过分化抗原簇 36 (cluster of differentiation, CD36) 脂肪酸转运功能介导的。CD36 又名脂肪酸转位酶,是一种广泛存在于巨噬细胞、血小板、内皮细胞、心肌细胞、周皮细胞和胰岛细胞等细胞的膜糖蛋白,其主要功能之一是参与细胞对脂肪酸的摄取^[13]。然而尚未有文献报道 CD36 在星形胶质细胞中的功能。因此本研究采用 PA 损伤模型,研究 CD36 在 PA 诱导的星形胶质细胞损伤中的功能及 CD36 抑制

剂可能的保护作用。

材料与方法

动物 新生 12 h 内的 Wistar 乳鼠 (SPF 级),购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物证号 SCXK (京) 2015-0001。全部实验和操作过程均符合中国医学科学院、北京协和医学院动物保护委员会规定的相关条例。

药品和试剂 DMEM/F12 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;棕榈酸钠、棕榈油酸、BSA、MTT 购自于美国 Sigma-Aldrich 公司;CD36 抑制剂 sulfo-N-succinimidylolate (SSO) 购自于美国 Cayman Chemical 公司;4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-hexadecanoic acid (BODIPY FL C16) 购自于美国 Invitrogen 公司;CD36 (SM Φ) 小鼠单克隆抗体购自于美国 Santa Cruz 公司;山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor® 594)、IP3 介导的钙释放抑制剂 2-aminoethyl diphenylborinate (APB) 购自于美国 Abcam 公司;一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (绿色荧光) 购自于中国 Beyotime 公司;SERCA 抑制剂 thapsigargin (TG) 购自于中国 JK chemical 公司;5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA) 购自于中国 ABP Biotech 公司;FLIPR Calcium 6 Assay Kit 购自于美国 Molecular Devices 公司。

星形胶质细胞的原代培养 新生 12 h 内的 Wistar 乳鼠取脑,剥除脑膜,分离皮层组织并剪碎,37 °C 下经 0.125% 胰酶消化 20 min,终止消化后使用玻璃滴管轻柔吹打,用 40 μ m 筛网过滤。离心后将沉淀重悬于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,接种于包被多聚赖氨酸的培养瓶中,置于 37 °C 的 CO₂ 培养箱中进行培养。接种 24 h 后,换全液。之后每 3 天进行换液。约 12 天后星形胶质细胞铺满培养瓶底部,将培养瓶放入恒温振荡器中,37 °C 下 250 r·min⁻¹ 振荡培养 5 h 后消化传代,继续培养 24 h 后进行实验。

MTT 细胞活性检测 星形胶质细胞以每毫升 3×10^5 个细胞数接种于 96 孔板中,经相应处理后,每孔加入 MTT (5 mg·mL⁻¹) 10 μ L,将细胞板置于 37 °C

的 CO₂ 培养箱内继续孵育 4 h。弃去培养基, 每孔加入 DMSO 150 μL, 振荡 15 min 使结晶充分溶解, 在酶标仪上以波长 570 nm 检测每孔的 OD 值。

TUNEL 细胞凋亡检测 按照一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (绿色荧光) 说明书进行操作。星形胶质细胞以每毫升 3×10^5 个细胞数接种于 96 孔板中, 经相应处理后, 弃去培养基, HBSS 洗涤 1 次。含 0.3% Triton X-100 的 PBS 室温孵育破膜 5 min, 每孔加入 TUNEL 检测液 50 μL, 37 °C 避光孵育 1 h, HBSS 洗涤 3 次后用抗荧光淬灭封片液封片, 激发波长/发射波长为 488/530 nm 在荧光显微镜下观察, 绿色荧光细胞为凋亡细胞。每孔随机选取 3 个视野进行统计。

细胞内钙释放检测 星形胶质细胞以每毫升 5×10^5 个细胞数接种于 Costar 384 孔黑色透明底酶标板内, 生长至完全汇合时开始实验。按照检测试剂盒说明书用不含钙镁 HBSS 配制适量的 FLIPR Calcium 6 Assay 染液, 并加入适量的丙磺舒阻止细胞将荧光探针被动运输或主动分泌到胞外。每孔加入染液 20 μL, CD36 抑制剂组同时加入 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SSO, 室温避光孵育 2 h 后进行 FLIPR 实时荧光检测, 每 1 s 读取 1 次荧光值, 1 min 时加入 PA 5 μL 使其终浓度为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 继续读取荧光值 9 min。

脂肪酸摄取检测 星形胶质细胞以每毫升 1×10^5 个细胞数接种于 6 孔板内。实验开始前, 对 SSO+BODIPY 组加入 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SSO 孵育 30 min, 其他组不进行处理。配制 $10 \text{ μmol} \cdot \text{L}^{-1}$ BODIPY 工作液。弃去 6 孔板内的培养基, 每孔加入预热的 BODIPY 工作液 1 mL, CO₂ 培养箱内 37 °C 孵育 20 min 后分别加入预冷的 HBSS 2 mL, 弃去 6 孔板内液体, HBSS 洗 1 次, 加入 0.25% 胰酶 500 μL 放置于 CO₂ 培养箱内 37 °C 消化 1 min, 加入 FACS 缓冲液 (含 10% FBS, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的 HBSS, 冰浴预冷) 500 μL 终止消化, 收集细胞悬液, 4 °C, $600 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 FACS 缓冲液 500 μL 重悬细胞, 流式上机检测 2×10^4 个细胞, 检测参数为激发波长/发射波长为 488/510 nm, 统计各组平均荧光强度。

免疫荧光染色 星形胶质细胞以每毫升 1×10^5 个细胞数接种于 96 孔板内培养 24 h, 弃去培养基, 用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗涤 2 遍, 4% PFA 室温固定 1 h, PBS 洗涤 3 次, 5% 山羊血清室温封闭 30 min。弃去封闭液, CD36 抗体 (SMΦ) 小鼠单克隆抗体 (1:200 稀释), 4 °C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 加入山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor® 594) (1:500 稀释) 室温孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, DAPI 染核, 荧光显微镜下观

察并进行图像采集, DAPI 的激发/发射波长为 360/460 nm 呈蓝色荧光, Alexa Fluor® 594 的激发/发射波长为 590/617 nm 呈红色荧光。

ROS 检测 星形胶质细胞以每毫升 1×10^5 个细胞数接种于 Costar 96 孔黑色透明底板内培养 24 h, HBSS 洗涤 2 次, 加入 CM-H₂DCFDA 50 μL ($20 \text{ μmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 于 CO₂ 培养箱内 37 °C 避光孵育 30 min。HBSS 洗涤 3 次, 每孔加入 HBSS 100 μL, 荧光酶标仪进行读数, 激发波长/发射波长为 495/525 nm。

结果统计 所有结果以 mean±SEM 表示。采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 结合 Dunnett's post hoc test 检验比较各组间差异, $P < 0.05$ 认为存在显著性差异。

结果

1 PA 对星形胶质细胞形态、活性和凋亡的影响

体外培养条件下, Wistar 大鼠皮层原代星形胶质细胞呈不规则的扁平状, 单层铺路石样排列。PA 损伤后使星形胶质细胞收缩变圆, 胞体变小, 间隙增大, 少数细胞悬浮脱落 (图 1A)。PA 可以浓度依赖性引起星形胶质细胞活性下降, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA 损伤 24 h 可以使星形胶质细胞活性下降 (36.1 ± 1.2)% ($P < 0.001$, 图 1B)。TUNEL 染色结果 (图 1C) 表明, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA 损伤 24 h 后星形胶质细胞凋亡率为 (16.6 ± 1.5)%, 与对照组相比凋亡率显著增加 ($P < 0.01$), 同等浓度的棕榈油酸 (palmitoleic acid, PO) 对星形胶质细胞凋亡无影响 (图 1D)。

2 CD36 介导星形胶质细胞对 PA 的摄取

细胞免疫荧光染色表明, CD36 在星形胶质细胞表达 (图 2A)。BODIPY FL C16 为氟化硼二吡咯荧光标记的 PA 类似物, 在激发波长/发射波长为 488/515 nm 时可在荧光显微镜下观察到绿色荧光。 $10 \text{ μmol} \cdot \text{L}^{-1}$ BODIPY 孵育 20 min 后可观察到星形胶质细胞内有较强的绿色荧光, 提前使用 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CD36 抑制剂 SSO 孵育或 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA 孵育 30 min, 再用 $10 \text{ μmol} \cdot \text{L}^{-1}$ BODIPY FL C16 孵育 20 min 后可观察到星形胶质细胞内绿色荧光较弱, 表明 SSO 可以抑制星形胶质细胞对 BODIPY FL C16 的摄取 (图 2B)。流式细胞仪定量分析表明, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SSO 可使星形胶质细胞对 BODIPY FL C16 的摄取率降低 (69.9 ± 1.9)% ($P < 0.001$), PA 通过竞争 CD36 抑制星形胶质细胞对 BODIPY FL C16 的摄取 (图 2C 和 D)。

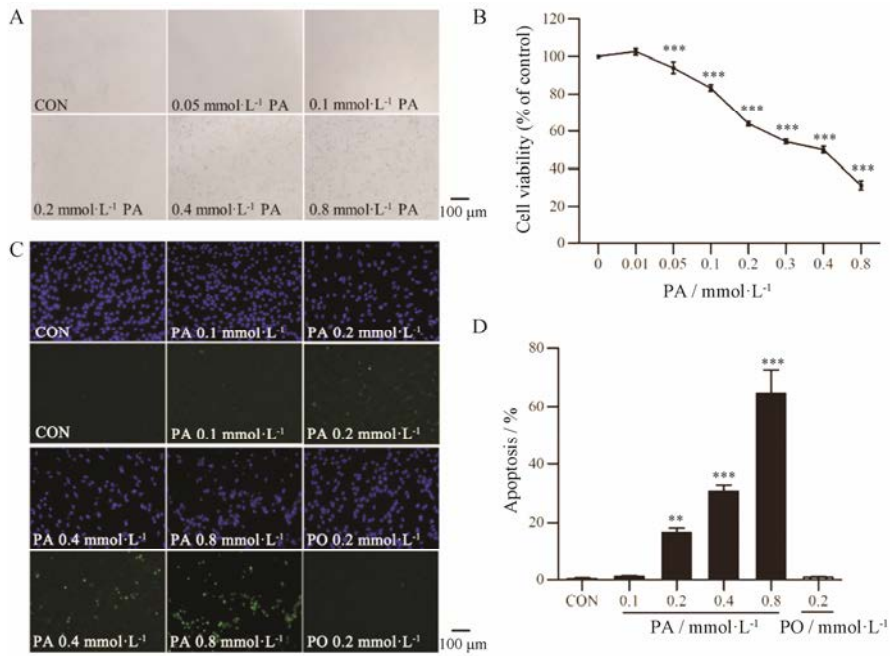


Figure 1 Effects of palmitic acid (PA) on astrocyte cell morphology (A), viability (B, $n=8$) and apoptosis (C and D, $n=5$). Astrocytes were treated with different doses of palmitate for 24 h, and then cell viability was detected by MTT assay, cell apoptosis was detected by TUNEL assay. Nuclei were stained by DAPI (blue), and apoptotic cells were stained by TUNEL (green). $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs CON group

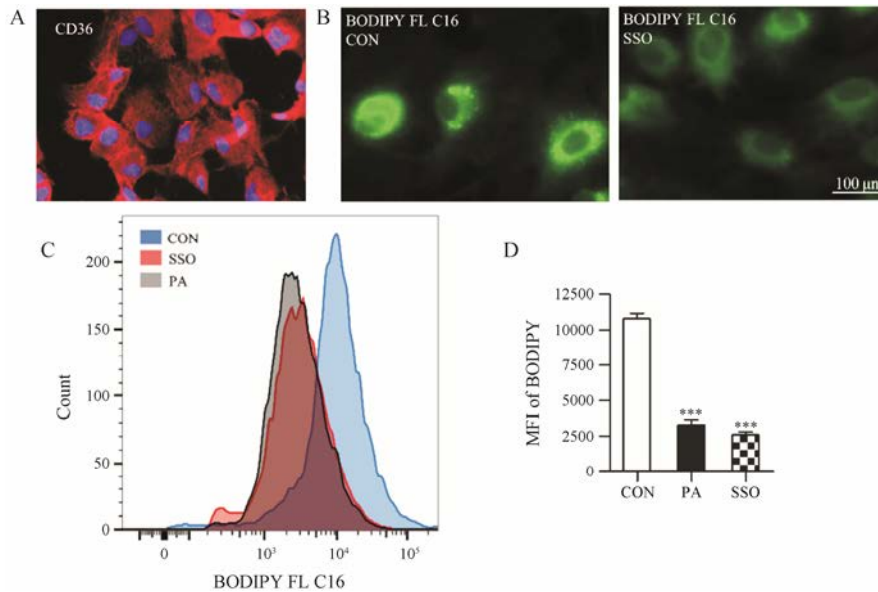


Figure 2 Cluster of differentiation (CD36) meditates the uptake of PA by astrocytes. A: Expression of CD36 in astrocytes confirmed by cellular immunofluorescence staining. Nuclei were stained by DAPI (blue), and CD36 were stained by Alexa Fluor® 594 (red); B: Observation of BODIPY FL C16 uptake and effect of CD36 inhibitor sulfo-*N*-succinimidylololate (SSO) by fluorescence microscope; C: Quantitative analysis of BODIPY FL C16 uptake and effects of CD36 inhibitor and PA by flow cytometry ($n=3$, mean \pm SEM). MFI: Mean fluorescence intensity. *** $P < 0.001$ vs CON group

3 CD36 抑制剂 SSO 对 PA 引起的星形胶质细胞凋亡和细胞活性下降具有保护作用

SSO 是 CD36 抑制剂, 广泛作为工具药用于 CD36 相关功能的研究^[14-17]。0.2 mmol·L⁻¹ PA 损伤星形胶质细胞 24 h 后细胞凋亡率为 (16.6 \pm 1.5)%, 与对照组

相比具有显著差异 ($P < 0.001$), 而 PA+SSO 组星形胶质细胞凋亡率为 (2.8 \pm 0.6)%, 与模型组相比具有显著差异 ($P < 0.001$, 图 3A 和 B)。0.2 mmol·L⁻¹ PA 损伤 24 h 可以使星形胶质细胞活性下降 (51.0 \pm 0.7)%, 与对照组相比具有显著差异 ($P < 0.001$), 而 PA+SSO

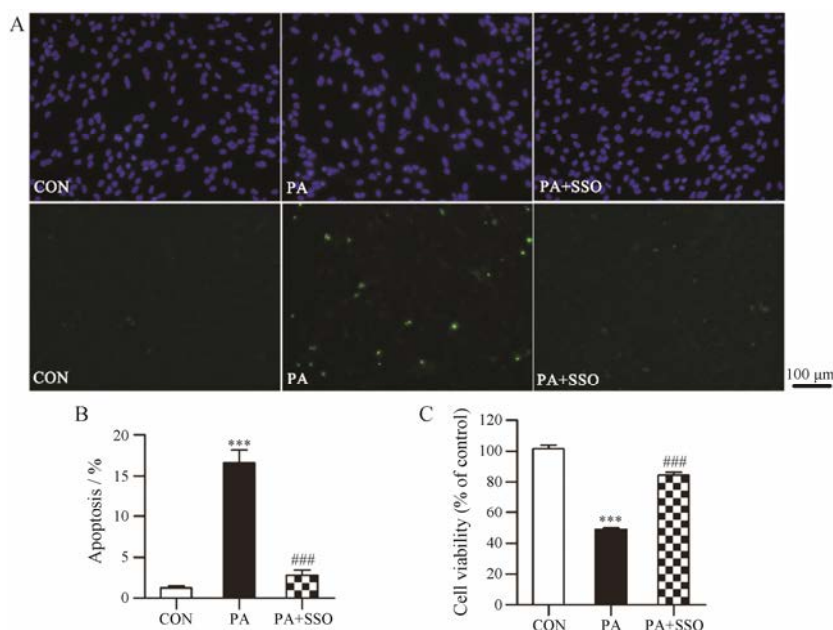


Figure 3 Effects of SSO on PA-induced apoptosis (A and B, $n=5$) and cell viability decrease (C, $n=8$) in astrocytes. Astrocytes were treated with $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA or $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA + $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SSO for 24 h, and then cell viability was detected by MTT assay, cell apoptosis was detected by TUNEL assay. Nuclei were stained by DAPI (blue), and apoptotic cells were stained by TUNEL (green). Mean \pm SEM. *** $P < 0.001$ vs CON group; ### $P < 0.001$ vs PA group

组星形胶质细胞活性下降 (15.7 ± 1.9)%，与模型组相比具有显著差异 ($P < 0.001$, 图 3C)。以上结果表明, SSO 通过抑制 CD36 减少星形胶质细胞对 PA 的摄取, 从而对星形胶质细胞起保护作用。

4 CD36 抑制剂 SSO 可抑制 PA 引起的星形胶质细胞内钙离子水平升高

利用钙离子荧光染料 Calcium 6 Assay 染液和 FLIPR 实时荧光记录系统观察 PA 对星形胶质细胞内钙离子水平的影响。 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA 可使星形胶质细胞内钙离子水平显著增加, 同等浓度的 PO 无明显作用 (图 4A 和 B)。正常生理情况下细胞内钙离子水平升高可能由胞外钙离子内流或内质网钙离子释放引起, 因本实验使用不含钙、镁的 HBSS 作为外液, 因此 PA 引起的星形胶质细胞内钙离子升高来自于内质网钙离子释放。同时加入 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CD36 抑制剂 SSO 或 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IP3R 抑制剂 APB 可以显著抑制 PA 诱导的星形胶质细胞内质网钙离子释放 ($P < 0.001$, 图 4A 和 B)。毒胡萝卜素 (thapsigargin, TG) 是内质网 Ca^{2+} -ATP 酶抑制剂, 能够阻止细胞内钙离子向内质网的转运。 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TG 即可引起内质网钙离子衰竭, TG 引起的细胞内钙离子升高的水平可间接反映内质网钙储量^[18]。PA、PA+SSO 或 PA+APB 分别与星形胶质细胞孵育 4 h, 然后加入 TG 并观察细胞内钙离子升高水平。 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA 孵育后星形

胶质细胞钙离子释放明显减少, 说明 PA 损伤使星形胶质细胞内质网钙离子储存能力显著下降 ($P < 0.001$), 同时加入 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CD36 抑制剂 SSO 或 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IP3R 抑制剂 APB 对此具有一定的保护作用 ($P < 0.05$, 图 4C 和 D)。

5 CD36 抑制剂可抑制 PA 引起的星形胶质细胞内 ROS 水平升高

利用 $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$ 活性氧荧光探针检测星形胶质细胞内 ROS 水平, 与对照组相比, 棕榈损伤星形胶质细胞 4 h 后使细胞内 ROS 探针的荧光强度增加至 1.9 倍 ($P < 0.001$), 同等浓度的 PO 对星形胶质细胞内 ROS 水平无明显影响。 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CD36 抑制剂 SSO 或 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IP3R 抑制剂 APB 可以阻断 PA 引起的星形胶质细胞内 ROS 的升高 ($P < 0.001$) (图 5)。提示 PA 导致星形胶质细胞内氧化应激可能与其引起内质网钙离子释放导致细胞内钙超载有关。 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA 损伤 24 h 可以使星形胶质细胞活性下降 (42.4 ± 0.6)%, 与对照组相比具有显著差异 ($P < 0.001$), 而 PA+APB 组星形胶质细胞活性下降 (32.5 ± 1.2)%, 与模型组相比具有显著差异 ($P < 0.05$), PA+NAC 组星形胶质细胞活性下降 (18.7 ± 2.4)%, 与模型组相比具有显著差异 ($P < 0.001$, 图 5C)。表明抑制细胞内钙离子释放和抗氧化均可抑制 PA 引起的星形胶质细胞损伤。

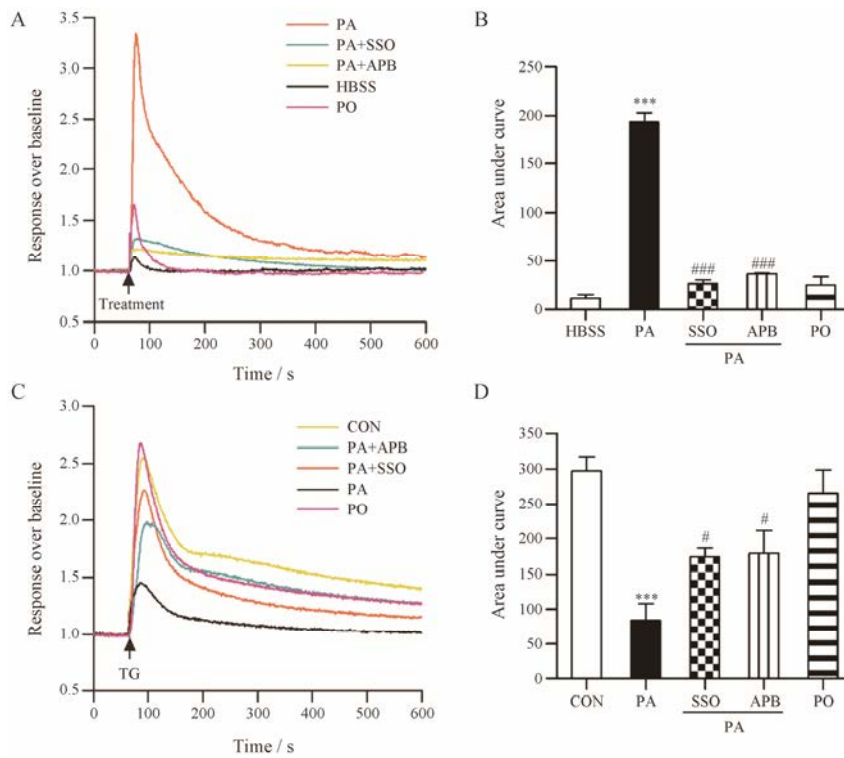


Figure 4 PA causes a significant $[Ca^{2+}]_i$ elevation (A and B) and $[Ca^{2+}]_{ER}$ depletion (C and D, $n=4$) in astrocytes by activating IP3R, which can be suppressed by SSO. A, B: For HBSS, PA or PO group, astrocytes were incubated with Calcium 6 Assay working solution for 2 h, then calcium-induced fluorescence was captured by FLIPR real-time fluorescence recording system, at the time point of 60 s, HBSS, $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA or $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PO was added. For PA+SSO or PA+APB group, astrocytes were incubated with Calcium 6 Assay working solution containing $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SSO or $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ APB for 2 h, then calcium-induced fluorescence was captured by FLIPR real-time fluorescence recording system, at the time point of 60 s, $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA was added. $n=4$, mean \pm SEM. *** $P<0.001$ vs HBSS group; ### $P<0.001$ vs PA group. C, D: Astrocytes were incubated with $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA, $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PO, $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA+ $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SSO or $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA+ $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ APB for 4 h, then incubated with Calcium 6 Assay working solution for 2 h, calcium-induced fluorescence was captured by FLIPR real-time fluorescence recording system, at the time point of 60 s, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TG was added. $n=4$, mean \pm SEM. *** $P<0.001$ vs CON group; # $P<0.05$ vs PA group

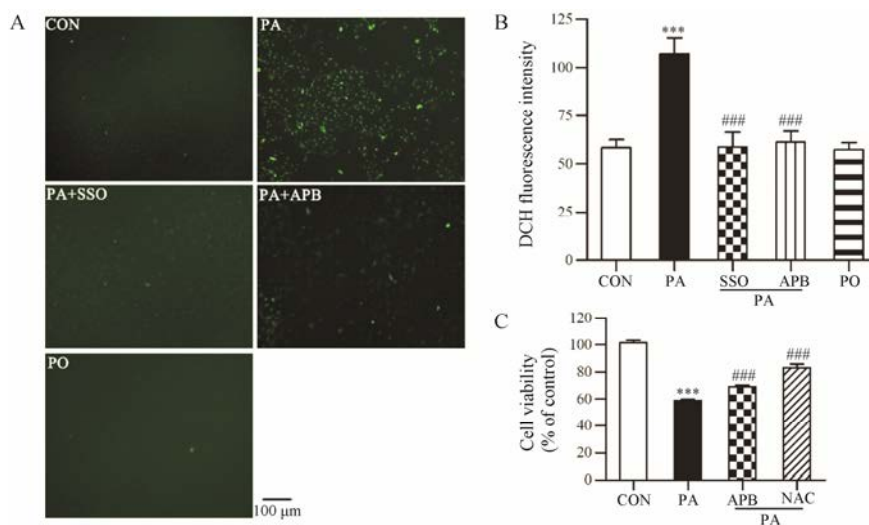


Figure 5 Effects of SSO on PA-induced ROS increase in astrocytes. A, B: Astrocytes were treated with $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA, $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA+ $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SSO or $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA+ $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ APB for 4 h, then astrocytes were incubated with $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CM- H_2DCFDA for 30 min, fluorescence was measured by fluorescence microscope (A) or multi-mode microplate reader (B). C: Astrocytes were treated with $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA, $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA+ $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ APB or $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA+ $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAC for 24 h, and then cell viability was detected by MTT assay. $n=8$, mean \pm SEM. *** $P<0.001$ vs CON group; ### $P<0.001$ vs PA group

讨论

本研究采用 PA 损伤模型, 研究 CD36 在 PA 诱导的星形胶质细胞凋亡中的作用, 及 CD36 抑制剂 SSO 的保护作用。实验结果表明: ① PA 可引起原代星形胶质细胞活性显著下降, 细胞凋亡显著增加; ② CD36 在星形胶质细胞中表达并介导 PA 的摄取; ③ PA 可引起 IP3R 依赖的细胞内钙释放和内质网钙衰竭, 此作用可被 CD36 抑制剂所抑制; ④ PA 引起星形胶质细胞 ROS 水平显著增加, 此作用可被 CD36 抑制剂及 IP3R 抑制剂所抑制; ⑤ CD36 抑制剂、IP3R 抑制剂和抗氧化剂均可显著抑制 PA 引起的星形胶质细胞损伤。

虽然 PA 损伤星形胶质细胞的机制研究已有报道, 但主要集中于氧化应激损伤^[19, 20]、内质网应激^[21]、线粒体损伤^[19, 22]、神经酰胺毒性^[23]和炎症反应^[24, 25]等。PA 的转运机制仍不清楚。本研究通过细胞免疫荧光方法证明, CD36 在星形胶质细胞中表达 (图 2A), 进一步通过荧光标记脂肪酸摄取实验证明, CD36 在星形胶质细胞中也具有脂肪酸摄取功能 (图 2B 和 C), 并且 CD36 抑制剂 SSO 可显著抑制 PA 引起的星形胶质细胞凋亡 (图 3)。

内质网是细胞内重要的钙离子储存库, 正常生理状态下细胞内钙离子浓度需要维持在约 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而内质网钙离子浓度维持在约 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右^[26]。内质网上主要存在 3 种钙离子通道或转运体, 包括激活后引起内质网钙释放的 IP3 受体、雷诺丁受体 (ryanodine receptor, RYR) 及消耗 ATP 将细胞内钙离子逆浓度梯度转运到内质网的 Ca^{2+} -ATP 酶 (Ca^{2+} -ATPase, SERCA)。在肾脏足细胞^[12]、肝细胞^[27]和心肌细胞^[28]中, PA 可以激活 PLC, 增加 IP3 的产生, 引起内质网钙离子释放。本研究发现, PA 也可引起星形胶质细胞内质网钙离子释放, 使细胞内钙离子水平显著增加 (图 4A 和 B)。PA 损伤使星形胶质细胞内质网钙离子含量显著下降, 失去钙储存库的功能 (图 4C 和 D), 提示 PA 引起星形胶质细胞钙水平升高是持续性的。与本研究结果一致, Wang 等^[19]在 BALB/c 小鼠星形胶质细胞内也观察到了 PA 引起的细胞内钙离子水平增加, 然而 Wong 等^[20]在 SD 大鼠星形胶质细胞内并未观察到此现象, 实验结果不一致的机制仍不清楚。但本研究的意义在于, PA 引起的细胞内钙离子水平增加和内质网钙衰竭需要在 CD36 介导 PA 转运的前提下实现。此外, 非饱和脂肪酸 PO (PA 的类似物) 不能引起内质网钙离子释放。

胞浆内钙浓度升高可通过多种途径对细胞产生

损伤作用。一方面线粒体钙离子单向转运体 (mitochondria Ca^{2+} uniporter, MCU) 摄取钙增加引起线粒体内钙超载及其功能障碍^[29]。另一方面胞浆内钙浓度升高同时会激活多种钙依赖性降解酶, 破坏磷脂、核酸和蛋白质等重要的生命大分子。此外, 胞浆内钙浓度升高通过激活黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO) 和磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2) 等增加细胞内 ROS 的产生^[29]。与其他文献^[19, 20, 22]报道一致, 本研究也发现 PA 可引起星形胶质细胞内 ROS 水平显著增加, IP3R 抑制剂可以抑制 PA 诱导的 ROS 升高 (图 5)。提示 PA 引起星形胶质细胞 ROS 水平升高是由于内质网钙释放和线粒体钙超载所致, 可能的损伤机制如图 6 所示。

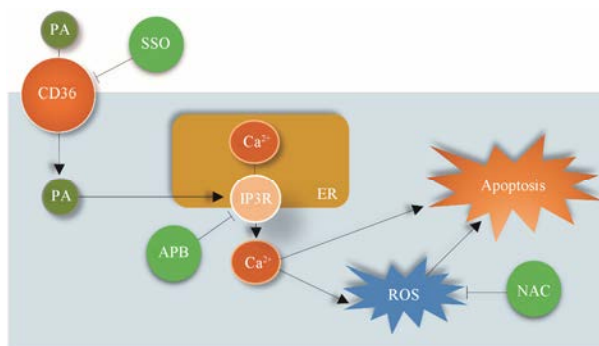


Figure 6 CD36 mediates the apoptosis of astrocytes induced by PA via calcium overload and oxidative stress

综上所述, CD36 是星形胶质细胞摄取脂肪酸的关键转运体, 脂肪酸进入细胞后激活 IP3R 促进内质网钙离子释放, 进而引起钙超载和氧化损伤。本研究提示抑制 CD36 功能, 可以从源头阻断 PA 的毒性, 可能成为潜在的保护星形胶质细胞免受脂肪酸损伤的靶点。

References

- [1] Elias MF, Elias PK, Sullivan LM, et al. Obesity, diabetes and cognitive deficit: the Framingham Heart Study [J]. *Neurobiol Aging*, 2005, 26 Suppl 1: 11–16.
- [2] Arner P, Ryden M. Fatty acids, obesity and insulin resistance [J]. *Obes Facts*, 2015, 8: 147–155.
- [3] Miles JM, Wooldridge D, Grellner WJ, et al. Nocturnal and postprandial free fatty acid kinetics in normal and type 2 diabetic subjects: effects of insulin sensitization therapy [J]. *Diabetes*, 2003, 52: 675–681.
- [4] Karmi A, Iozzo P, Viljanen A, et al. Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome [J]. *Diabetes*, 2010, 59: 2171–

- 2177.
- [5] Marília B, Vencato PH, Luiza O, et al. Fatty acid status and its relationship to cognitive decline and homocysteine levels in the elderly [J]. *Nutrients*, 2014, 6: 3624–3640.
- [6] Farr SA, Yamada KA, Butterfield DA, et al. Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment [J]. *Endocrinology*, 2008, 149: 2628–2636.
- [7] Kimelberg HK, Nedergaard M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets [J]. *Neurotherapeutics*, 2010, 7: 338–353.
- [8] Liu DM, Zhang M, Jiang XM, et al. Protective effects and the mechanisms of donepezil and galantamine on neuronal injury induced by glucose deprivation/reoxygenation [J]. *Acta Pharm Sin (药理学报)*, 2017, 52: 928–935.
- [9] Phatnani H, Maniatis T. Astrocytes in neurodegenerative disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7: a020628.
- [10] Pilitsis JG, Diaz FG, Wellwood JM, et al. Quantification of free fatty acids in human cerebrospinal fluid [J]. *Neurochem Res*, 2001, 26: 1265–1270.
- [11] Kim DH, Cho YM, Lee KH, et al. Oleate protects macrophages from palmitate-induced apoptosis through the down-regulation of CD36 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 488: 477–482.
- [12] Xu S, Nam SM, Kim JH, et al. Palmitate induces ER calcium depletion and apoptosis in mouse podocytes subsequent to mitochondrial oxidative stress [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1976.
- [13] Abumrad N, Coburn C, Ibrahimi A. Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1441: 4–13.
- [14] Harmon CM, Abumrad NA. Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids [J]. *J Membr Biol*, 1993, 133: 43–49.
- [15] Han WQ, Zhu Q, Hu J, et al. Hypoxia-inducible factor prolyl-hydroxylase-2 mediates transforming growth factor beta 1-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833: 1454–1462.
- [16] Moon JS, Karunakaran U, Elumalai S, et al. Metformin prevents glucotoxicity by alleviating oxidative and ER stress-induced CD36 expression in pancreatic beta cells [J]. *J Diabetes Complications*, 2016, 31: 21–30.
- [17] Kuda O, Pietka TA, Demianova Z, et al. Sulfo-*N*-succinimidyl oleate (SSO) inhibits fatty acid uptake and signaling for intracellular calcium *via* binding CD36 lysine 164: SSO also inhibits oxidized low density lipoprotein uptake by macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288: 15547–15555.
- [18] Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, et al. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage [J]. *Agents Actions*, 1989, 27: 17–23.
- [19] Wang Z, Liu D, Wang J, et al. Cytoprotective effects of melatonin on astroglial cells subjected to palmitic acid treatment *in vitro* [J]. *J Pineal Res*, 2012, 52: 253–264.
- [20] Wong KL, Wu YR, Cheng KS, et al. Palmitic acid-induced lipotoxicity and protection by (+)-catechin in rat cortical astrocytes [J]. *Pharmacol Rep*, 2014, 66: 1106–1113.
- [21] Frago LM, Canelles S, Freire-Regatillo A, et al. Estradiol uses different mechanisms in astrocytes from the hippocampus of male and female rats to protect against damage induced by palmitic acid [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 330.
- [22] González-Giraldo Y, Garcia-Segura LM, Echeverria V, et al. Tibolone preserves mitochondrial functionality and cell morphology in astrocytic cells treated with palmitic acid [J]. *Mol Neurobiol*, 2017. DOI: 10.1007/s12035-017-0667-3.
- [23] Gómez dPT, Velasco G, Sánchez C, et al. *De novo*-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis [J]. *Biochem J*, 2002, 363: 183–188.
- [24] Liu L, Chan C. IPAF inflammasome is involved in interleukin-1 β production from astrocytes, induced by palmitate; implications for Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35: 309–321.
- [25] Gupta S, Knight AG, Gupta S, et al. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes [J]. *J Neurochem*, 2012, 120: 1060–1071.
- [26] Clapham DE. Calcium signaling [J]. *Cell*, 2007, 131: 1047–1058.
- [27] Egnatchik RA, Leamy AK, Jacobson DA, et al. ER calcium release promotes mitochondrial dysfunction and hepatic cell lipotoxicity in response to palmitate overload [J]. *Mol Metab*, 2014, 3: 544–553.
- [28] Rabkin SW, Huber M, Krystal G. Modulation of palmitate-induced cardiomyocyte cell death by interventions that alter intracellular calcium [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1999, 61: 195–201.
- [29] Liao Y, Hao Y, Chen H, et al. Mitochondrial calcium uniporter protein MCU is involved in oxidative stress-induced cell death [J]. *Protein Cell*, 2015, 6: 434–442.