

本文引用:李雪花,李文媛,李兴江,等. 转录因子 Krüppel 样因子 7 对新生大鼠海马神经元缺血再灌注损伤的影响[J]. 新乡医学院学报,2019,36(3):213-217,223. DOI:10.7683/xyxyxb.2019.03.003.

【基础研究】

转录因子 Krüppel 样因子 7 对新生大鼠海马神经元缺血再灌注损伤的影响

李雪花¹, 李文媛^{2,3}, 李兴江^{2,3}, 孙广大^{2,3}, 赵庭琪⁴, 王莹^{2,3}
(1. 阜新市中心医院神经内科, 辽宁 阜新 123000; 2. 牡丹江医学院解剖学教研室, 黑龙江 牡丹江 157011; 3. 牡丹江医学院神经组织工程研究所, 黑龙江 牡丹江 157011; 4. 牡丹江医学院本科 2016 级, 黑龙江 牡丹江 157011)

摘要: **目的** 探讨转录因子 Krüppel 样因子 7(KLF7)对新生大鼠海马神经元缺血再灌注损伤的影响。**方法** 取新生 Sprague-Dawley 大鼠海马组织制备海马神经元单细胞悬液,按每孔 1×10^6 个细胞接种于聚赖氨酸包被 6 孔细胞培养板,细胞贴壁继续培养 7 d 后分为正常组、氧糖剥夺/复氧(OGD/R)组和 OGD/R + KLF7 组。正常组培养 7 d 的原代大鼠海马神经元按每孔 1×10^6 个细胞于含胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中进行培养,置于含体积分数 5% CO₂ 的培养箱中 37 ℃ 下培养 3 d; OGD/R 组培养 7 d 的原代大鼠海马神经元用磷酸盐缓冲液洗 3 次,用移液器将原培养液置换为无糖平衡盐溶液,置于三气缺氧细胞培养箱(体积分数 1% O₂、94% N₂、5% CO₂)中 37 ℃ 下培养 4 h,然后应用 $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基代替无糖平衡盐溶液,置于含体积分数 5% CO₂ 的常温培养箱中培养 24 h; OGD/R + KLF7 组培养成功的 OGD/R 模型细胞加入 Lenti-KLF7 慢病毒进行转染,置于含体积分数 5% CO₂ 的培养箱中 37 ℃ 下孵育 3 d。应用倒置相差显微镜观察各组海马神经元的生长状态,实时荧光定量聚合酶链反应检测各组细胞中 KLF7、NGF、Caspase-3、Bcl-2 和 Bax mRNA 表达,细胞计数试剂盒检测各组细胞活性,Hoechst33342/碘化丙啶双染法检测各组细胞凋亡情况。**结果** 3 组细胞中 KLF7、NGF、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 mRNA 相对表达量比较差异均有统计学意义($F = 237.702、24.031、476.505、112.900、89.467, P < 0.05$); OGD/R 组和 OGD/R + KLF7 组细胞中 KLF7、NGF、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 mRNA 相对表达量显著高于正常组($P < 0.05$); OGD/R + KLF7 组细胞中 KLF7、NGF 和 Bcl-2 mRNA 相对表达量显著高于 OGD/R 组($P < 0.05$), Caspase-3 和 Bax mRNA 相对表达量显著低于 OGD/R 组($P < 0.05$)。正常组、OGD/R 组和 OGD/R + KLF7 组细胞活性分别为 $1.080 \pm 0.090、0.499 \pm 0.049$ 和 0.727 ± 0.115 , 3 组细胞活性比较差异有统计学意义($F = 42.710, P < 0.05$); OGD/R 组和 OGD/R + KLF7 组细胞活性显著低于正常组($P < 0.05$), OGD/R + KLF7 组细胞活性显著高于 OGD/R 组($P < 0.05$)。正常组、OGD/R 组、OGD/R + KLF7 组细胞凋亡率分别为 $(40.6 \pm 6.3)\%、(76.7 \pm 4.3)\%$ 和 $(58.5 \pm 4.4)\%$, 3 组细胞凋亡率比较差异有统计学意义($F = 36.822, P < 0.05$); OGD/R 组和 OGD/R + KLF7 组细胞凋亡率显著高于正常组($P < 0.05$), OGD/R + KLF7 组细胞凋亡率显著低于 OGD/R 组($P < 0.05$)。**结论** KLF7 对 OGD/R 诱导的海马神经元缺血再灌注细胞损伤具有保护作用,其机制可能与介导 NGF 表达,进而调控 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 细胞凋亡信号通路有关。

关键词: Krüppel 样因子 7; 缺血再灌注损伤; 海马神经元; 凋亡
中图分类号: R338 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2019)03-0213-06

Effect of Krüppel-like factor 7 on ischemia-reperfusion injury of hippocampal neurons in neonatal rats

LI Xue-hua¹, LI Wen-yuan^{2,3}, LI Xing-jiang^{2,3}, SUN Guang-da^{2,3}, ZHAO Ting-qi⁴, WANG Ying^{2,3}
(1. Department of Neurology, Fuxin Central Hospital, Fuxin 123000, Liaoning Province, China; 2. Department of Anatomy, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China; 3. Institute of Neural tissue Engineering, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China; 4. Grade 2016, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Krüppel-like factors 7 (KLF7) on ischemia-reperfusion injury of hippocampal neurons in neonatal rats. **Methods** The hippocampal tissues of newborn Sprague-Dawley rats were isolated to

DOI:10.7683/xyxyxb.2019.03.003
收稿日期:2018-07-30
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81870977);黑龙江省自然科学基金资助项目(编号:LC2017040);黑龙江省卫生计生委立项科研课题(编号:2018-379);黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(编号:201810229030);牡丹江医学院大学生科研立项重点项目(编号:2018-28)。
作者简介:李雪花(1982-),女,河北邯郸人,硕士,副主任医师,研究方向:脑缺血再灌注损伤。
通信作者:王莹(1977-),男,黑龙江哈尔滨人,博士,副教授,研究方向:神经损伤与修复;E-mail:yingwang770224@163.com。

prepare the single cell suspension of hippocampal neuron, the single cell suspension was inoculated on a polylysine-coated 6-well cell culture plate (1×10^6 cells per well), and adherent cells were cultured for 7 days. The cells were divided into normal group, oxygen glucose deprivation (OGD)/reoxygenation (R) group and OGD/R + KLF7 group. The primary hippocampal neurons cultured for 7 days in the normal group were cultured in DMEM/F12 medium containing fetal bovine serum (1×10^6 cells per well), and continue to culture in the incubator containing 5% CO_2 for 3 days at 37 °C. In the OGD/R group, the primary hippocampal neurons cultured for 7 days were washed three times with phosphate buffer solution, then the original culture solution was replaced by sugar-free equilibrium salt solution with a transposer; the cells were cultured in a three-gas hypoxic cell incubator (volume fraction 1% O_2 , 94% N_2 , 5% CO_2) for 4 hours at 37 °C; the sugar-free equilibrium salt solution was replaced by $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ dextrose culture-medium, then the cells were cultured in a room temperature incubator containing with 5% CO_2 for 24 hours. The OGD/R cells in the OGD/R + KLF7 group were transfected with Lenti-KLF7 lentivirus and incubated in the incubator containing 5% CO_2 for 3 days at 37 °C. The growth of hippocampal neurons in each group was observed by inverted phase contrast microscopy. The expression of KLF7, NGF, Caspase-3, Bcl-2 and Bax mRNA was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. The cell viability was measured by cell counting kit-8 method, and the apoptosis was detected by Hoechst 33342/propidium iodine double staining. **Results** There was significant difference in the relative expressions of KLF7, NGF, Caspase-3, Bax and Bcl-2 mRNA in cells among the three groups ($F = 237.702, 24.031, 476.505, 112.900, 89.467; P < 0.05$). The relative expressions of KLF7, NGF, Caspase-3, Bax and Bcl-2 mRNA in cells in the OGD/R group and OGD/R + KLF7 group were significantly higher than those in the normal group ($P < 0.05$). The relative expressions of KLF7, NGF and Bcl-2 mRNA in cells in the OGD/R + KLF7 group were significantly higher than those in the OGD/R ($P < 0.05$). The relative expressions of Caspase-3 and Bax mRNA in cells in the OGD/R + KLF7 group were significantly lower than those in the OGD/R group ($P < 0.05$). The cell activity in the normal group, OGD/R group and OGD/R + KLF7 group was $1.080 \pm 0.090, 0.499 \pm 0.049$ and 0.727 ± 0.115 , respectively; there was significant difference among the three groups ($F = 42.710, P < 0.05$). The cell viability in the OGD/R group and OGD/R + KLF7 group was significantly lower than that in the normal group ($P < 0.05$), and the cell viability in the OGD/R + KLF7 group was significantly higher than that in the OGD/R group ($P < 0.05$). The apoptotic rate in the normal group, OGD/R group and OGD/R + KLF7 group was $(40.6 \pm 6.3)\%, (76.7 \pm 4.3)\%$ and $(58.5 \pm 4.4)\%$, respectively; there was significant difference among the three groups ($F = 36.822, P < 0.05$). The apoptotic rate in the OGD/R group and OGD/R + KLF7 group was significantly higher than that in the normal group ($P < 0.05$), and the apoptotic rate in the OGD/R + KLF7 group was significantly lower than that in the OGD/R group ($P < 0.05$). **Conclusion** KLF7 can protect hippocampal neurons from OGD/R-induced ischemia-reperfusion injury, and its mechanism may be related to mediating NGF expression and regulating the apoptosis signaling pathways of Caspase-3, Bcl-2 and Bax.

Key words: Krüppel-like factor 7; ischemia-reperfusion injury; hippocampal neurons; apoptosis

缺血性脑血管病是危害人类健康的常见疾病,及时恢复缺血区的血供是改善其预后的关键;脑缺血再灌注是其重要的病理生理阶段,但较长时间的缺血后再灌注可能进一步加剧脑组织损伤和功能障碍,即脑缺血再灌注损伤^[1-3]。心脏骤停、休克、卒中、麻醉和术中体外循环均可诱发脑缺血再灌注损伤^[4-5]。脑缺血再灌注损伤引起神经元损伤的病理生理机制涉及细胞凋亡等复杂细胞信号通路^[6-7],目前仍不十分清楚,尚缺乏有效的治疗方法。深入探讨脑缺血再灌注损伤引起神经元损伤的机制有助于改善缺血再灌注损伤的治疗策略。Krüppel 样因子 7 (Krüppel-like factor 7, KLF7) 是与神经疾病密切相关的转录因子,有研究显示, KLF7 参与和调控神经损伤后轴突再生、神经元发育和神经元分化^[8-11]。本课题组前期研究证实, KLF7 在坐骨神经和脊髓组织中高表达显著促进周围神经损伤和脊髓损伤的

功能恢复,并发现 KLF7 能够促进神经损伤后感觉神经元存活^[12-14]。目前,脑缺血再灌注损伤中 KLF7 对海马神经元的作用及调控机制未见报道。本研究通过构建氧糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 大鼠海马神经元体外缺血再灌注损伤细胞模型,观察 KLF7 对 OGD/R 细胞活性和细胞凋亡的影响,旨在探讨 KLF7 在体外对缺血再灌注损伤海马神经元的保护机制,为临床脑缺血再灌注损伤的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 出生 24 h 内新生 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 9 只,雌雄不限,体质量 12 ~ 15 g,由中国医科大学实验动物中心提供(许可证号:SCXK Liao 2003-0009)。

1.2 主要试剂与仪器 KLF7 慢病毒(Lenti-KLF7, 美国 ABM 公司),KLF7、神经生长因子(nerve growth factor,NGF)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteine-aspartic acid protease-3,caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)、Bcl-2 相关的 X 基因(Bcl-2 associated X protein,Bax)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)引物(美国 Ambion 公司)、细胞计数试剂盒(cell counting kit-8,CCK8)、碘化丙啶(propidium iodine,PI)、双苯并咪唑染料 Hoechst33342、胰蛋白酶、达尔伯克改良伊格尔培养基 F12(Dulbecco's modified Eagle's medium F12,DMEM/F12)、胎牛血清(美国 Sigma 公司)、反转录试剂盒、莫洛尼鼠白血病病毒反转录酶(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase,M-MLVRT)、TRIzol(美国 Invitrogen 公司);Olympus IX70 倒置相差显微镜、Olympus AX70 免疫荧光显微镜(日本 Olympus 公司)、CO₂ 细胞培养箱(日本 Thermo 公司)、超净工作台(苏州净化设备有限公司)、C21 三气缺氧细胞培养箱(美国 Biospherix 公司)、3550UV 型酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 大鼠海马神经元的分离培养 参照文献[6]的方法分离新生 SD 大鼠海马组织,应用胰蛋白酶 37℃ 下消化 15 min,用含体积分数 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 终止消化,制成 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 单细胞悬液,将单细胞悬液按每孔 1×10^6 个细胞接种于聚赖氨酸包被 6 孔细胞培养板,细胞贴壁继续培养 7 d,备用。

1.4 大鼠海马神经元 OGD/R 模型制备 参照文献[15]方法制备大鼠海马神经元 OGD/R 模型。将培养 7 d 的原代大鼠海马神经元分为正常组、OGD/R 组和 OGD/R + KLF7 组,正常组培养 7 d 的原代大鼠海马神经元按每孔 1×10^6 个细胞于含胎牛血清的 DMEM/F12 中进行培养,置于含体积分数 5% CO₂ 的培养箱中 37℃ 下培养 3 d。OGD/R 组培养 7 d 的原代大鼠海马神经元用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution,PBS)洗 3 次,用移液器将原培养液置换为无糖平衡盐溶液,在三气缺氧细胞培养箱(体积分数:1% O₂、94% N₂、5% CO₂)中 37℃ 下培养 4 h,将细胞从三气缺氧细胞培养箱取出,应用 $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基代替无糖平衡盐溶液,置于含体积分数 5% CO₂ 的常温培养箱中培养 24 h。OGD/R + KLF7 组取上述培养成功的 OGD/R 模型细胞,每孔在原培养液中加入 2 μL 的 Lenti-KLF7 慢病毒进行转染,置于含体积分数 5%

CO₂ 的培养箱中 37℃ 下孵育 3 d。应用倒置相差显微镜观察各组海马神经元的生长状态。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)检测各组细胞中 KLF7、NGF、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达 将 3 组细胞接种于 6 孔板中,每孔 1×10^6 个细胞,应用 TRIzol 提取液提取各组细胞总 RNA,并用反转录试剂盒和反转录酶反转录 cDNA。反应体系:10 μL SYBR Green PCR Master Mix,2 μL 引物和 8 μL cDNA。KLF7 上游引物序列为 5'-TTTCCTGGC-AGTCATCTGCAC-3',下游引物序列为 5'-GGGTC-TGTTTGTTCAGTCTGTC-3';NGF 上游引物序列为 5'-CGGTCTTCCCGCCCTAGCCTG-3',下游引物序列为 5'-ATTTGCACGCCGCTCCTTTGC-3';Caspase-3 上游引物序列为 5'-TGGAACAAATGGACCTGT-TGACC-3',下游引物序列为 5'-AGGACTCAAAT-TCTGTTGCCACC-3';Bcl-2 上游引物序列为 5'-TTCTTTGAGTTCGGTGGGGTC-3',下游引物序列为 5'-TGCATATTTGTTTGGGGCAGG-3';Bax 上游引物序列为 5'-TCCACCAAGAAGCTGAGCGAG-3',下游引物序列为 5'-GTCCAGCCCATGATGTTCT-3';GAPDH 上游引物序列为 5'-TGGTGGTATGGG-TCAGAAGGACTC3',下游引物序列为 5'-CATGGCT-GGGGTGTTGAAGGTCTCA-3'。实验重复 6 次,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析各组细胞 KLF7、NGF、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 mRNA 相对表达量。

1.6 流式细胞术检测各组细胞活性 将 3 组细胞接种于 6 孔板中,每孔 1×10^6 个细胞,每孔加入 10 μL CCK8 溶液培养 2 h,应用酶标仪检测各组细胞于 450 nm 处的吸光度值^[16],观察细胞活性。

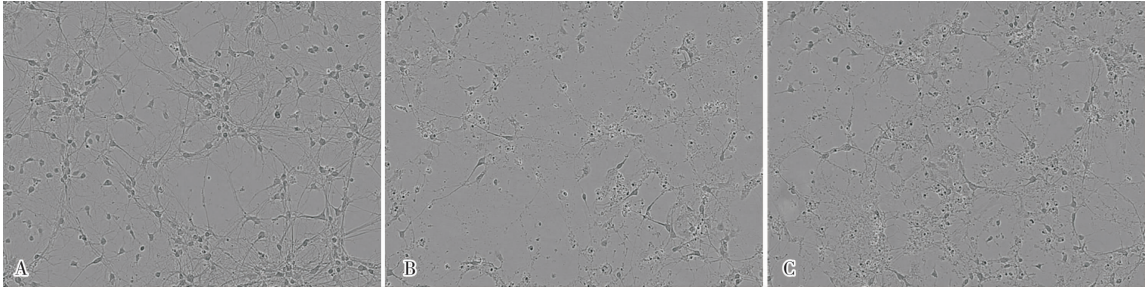
1.7 Hoechst33342/PI 双染法检测各组细胞凋亡率 将 3 组细胞接种于 6 孔板中,每孔 1×10^6 个细胞,用 1 mL Hoechst33342 染色液 37℃ 下孵育 30 min,PI 室温孵育 15 min^[17],在 Olympus AX70 免疫荧光显微镜下用紫外光激发,计数细胞凋亡率,细胞凋亡率 = 凋亡细胞数/细胞总数 × 100%。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和多重极差检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组海马神经元形态学 倒置相差显微镜下观察可见,正常组海马神经元突起生长明显,相互交织呈网络样结构(图 1A)。OGD/R 组海马神经元数

量显著减少,突起萎缩,网络样结构受损(图 1B)。 OGD/R + KLF7 组较 OGD/R 组海马神经元数量增多,突起数量增加,网络样结构受损情况改善(图 1C)。



A:正常组;B:OGD/R 组;C:OGD/R + KLF7 组。

图 1 3 组海马神经元形态(倒置相差显微镜,×100)

Fig.1 Morphology of hippocampal neurons in the three groups(inverted phase contrast microscope, ×100)

2.2 3 组细胞中 KLF7、NGF、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 mRNA 相对表达量比较 结果见表 1。3 组细胞中 KLF7、NGF、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 mRNA 相对表达量比较差异均有统计学意义 ($F = 237.702、24.031、476.505、112.900、89.467, P < 0.05$)。OGD/R 组和 OGD/R + KLF7 组细胞中

KLF7、NGF、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 mRNA 相对表达量显著高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$); OGD/R + KLF7 组细胞中 KLF7、NGF 和 Bcl-2 mRNA 相对表达量显著高于 OGD/R 组, Caspase-3 和 Bax mRNA 相对表达量显著低于 OGD/R 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 3 组细胞中 KLF7、NGF、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 mRNA 相对表达量比较

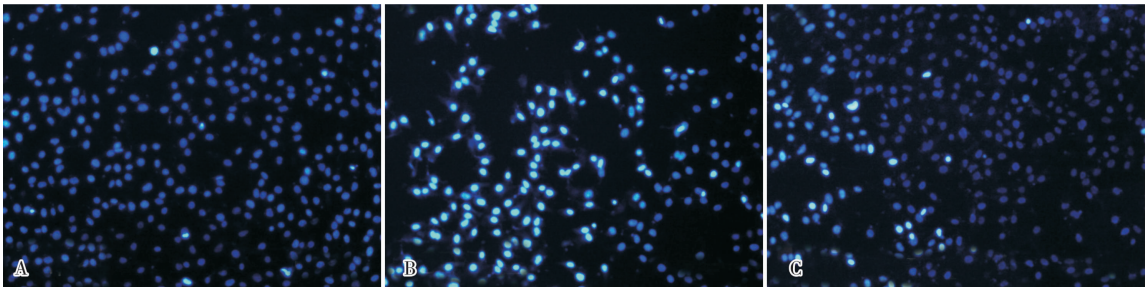
Tab.1 Comparison of the relative expression of KLF7,NGF, Caspase-3,Bax and Bcl-2 mRNA among the three groups

($\bar{x} \pm s$)						
组别	<i>n</i>	KLF7 mRNA	NGF mRNA	Bcl-2 mRNA	Caspase-3 mRNA	Bax mRNA
正常组	6	0.101 ± 0.045	0.032 ± 0.009	0.086 ± 0.063	0.037 ± 0.018	0.128 ± 0.097
OGD/R 组	6	0.338 ± 0.053 ^a	0.154 ± 0.037 ^a	0.476 ± 0.062 ^a	1.388 ± 0.047 ^a	2.067 ± 0.120 ^a
OGD/R + KLF7 组	6	1.020 ± 0.060 ^{ab}	0.285 ± 0.067 ^{ab}	0.840 ± 0.106 ^{ab}	0.437 ± 0.097 ^{ab}	1.210 ± 0.227 ^{ab}

注:与正常组比较^a $P < 0.05$;与 OGD/R 组比较^b $P < 0.05$ 。

2.3 3 组细胞活性比较 正常组、OGD/R 组、OGD/R + KLF7 组细胞活性分别为 $1.080 \pm 0.090、0.499 \pm 0.049$ 和 0.727 ± 0.115 ,3 组细胞活性比较差异有统计学意义($F = 42.710, P < 0.05$)。OGD/R 组和 OGD/R + KLF7 组细胞活性显著低于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$);OGD/R + KLF7 组细胞活性显著高于 OGD/R 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 3 组细胞凋亡率比较 结果见图 2。正常组、OGD/R 组、OGD/R + KLF7 组细胞凋亡率分别为 $(40.6 \pm 6.3)\%、(76.7 \pm 4.3)\%$ 和 $(58.5 \pm 4.4)\%$, 3 组细胞凋亡率比较差异有统计学意义($F = 36.822, P < 0.05$)。OGD/R 组和 OGD/R + KLF7 组细胞凋亡率显著高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$);OGD/R + KLF7 组细胞凋亡率显著低于 OGD/R 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A:正常组;B:OGD/R 组;C:OGD/R + KLF7 组。

图 2 3 组细胞凋亡情况(Hoechst33342/PI 双染法,×200)

Fig.2 Apoptosis in the three groups(Hoechst33342/PI double staining, ×200)

3 讨论

转录因子在许多神经系统疾病的发病过程中发挥至关重要的调控作用。研究发现,多种转录因子及其相关基因信号网络在缺血性脑损伤过程中具有调控作用,能够显著促进脑卒中动物神经血管功能恢复^[18-19]。KLF属于锌指家族的转录因子,由17个成员组成,在细胞生长、分化、增殖、迁移、凋亡、代谢和炎症反应中具有不同的调节功能^[20]。研究表明,KLF参与调控多种人类疾病,包括癌症、糖尿病、肥胖、心血管疾病和炎症性疾病等^[11]。

KLF家族在中枢神经系统中广泛表达^[8]。目前,KLF在中枢神经系统细胞中的表达对神经损伤后神经元存活和增殖的作用尚不清楚。有研究表明,KLF能够调控视网膜神经节细胞和皮层神经元轴突生长能力,其中KLF4和KLF9能抑制轴突再生^[21],而KLF6和KLF7能促进轴突生长^[8]。研究表明,KLF11可作为一种过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma,PPAR γ)调控因子,通过PPAR γ 介导发挥脑血管保护作用^[22]。KLF2可作为一种脑卒中保护因子,通过调节血脑屏障促进脑血管功能^[20]。而KLF7在17个KLF家族成员中具有独特的神经再生功能,调控神经损伤后轴突再生及神经元发育、分化和存活^[11]。然而,KLF7在调节脑血管病发病机制中的作用和机制仍不清楚。

本研究发现,OGD/R组海马神经元数量较正常组显著减少,突起萎缩,网络样结构受损,说明成功构建了OGD/R体外缺血再灌注损伤细胞模型。而应用KLF7慢病毒转染能够有效增加OGD/R体外缺血再灌注损伤海马神经元数量和神经突起生长,改善网络样结构形成。另外,本研究结果显示,OGD/R+KLF7组细胞活性较OGD/R组显著升高,而细胞凋亡率较OGD/R组显著降低,提示KLF7对海马神经元缺血再灌注损伤具有保护作用,推测KLF7是一种参与调控OGD/R诱导的神经元损伤的转录因子。

本课题组前期研究显示,KLF7能通过调控下游靶基因NGF信号通路,显著促进周围神经损伤和脊髓损伤的功能恢复,NGF为KLF7下游靶基因,KLF7表达与NGF表达具有显著正相关性,KLF7通过调控NGF表达而调控神经再生微环境^[14]。本研究发现,与正常组和OGD/R组比较,OGD/R+KLF7组细胞KLF7和NGF mRNA相对表达量显著增高,证实KLF7慢病毒转染显著促进细胞内KLF7表达,上调NGF表达,因此,推测KLF7通过调控NGF对

OGD/R诱导的神经元损伤发挥保护作用。Caspase-3、Bcl-2和Bax是调控神经元凋亡的重要途径,本研究发现,OGD/R+KLF7组细胞Bcl-2 mRNA表达显著高于OGD/R组,而Caspase-3和Bax mRNA表达显著降低,推测KLF7调节脑血管发病机制可能与介导NGF信号通路,进而调控Caspase-3、Bcl-2和Bax细胞凋亡信号通路有关。

综上所述,KLF7对OGD/R诱导的海马神经元缺血再灌注损伤有保护作用,其机制可能与介导NGF表达,进而调控Caspase-3、Bcl-2和Bax细胞凋亡信号通路有关。

参考文献:

[1] 闫磊,胡江平,邵新然,等.淫羊藿苷联合冰片对脑缺血-再灌注损伤模型大鼠抗氧化活性、炎症反应和血脑屏障通透性影响[J].陕西中医,2018,39(12):1659-1662.

[2] DENG H,ZUO X,ZHANG J,et al. Alipoic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats[J]. *Mol Med Rep*,2015,11(5):3659-3665.

[3] DONG H,WANG S,ZHANG Z,et al. The effect of mitochondrial calcium uniporter opener spermine on diazoxide against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*,2014,23(2):303-309.

[4] ZHANG M,YAN H,LI S,et al. Rosmarinic acid protects rat hippocampal neurons from cerebral ischemia/reperfusion injury via the Akt/JNK3/caspase-3 signaling pathway[J]. *Brain Res*,2017,1657:9-15.

[5] SHAO S,XU M,ZHOU J,et al. Atorvastatin attenuates ischemia/reperfusion-induced hippocampal neurons injury via akt-nNOS-JNK signaling pathway[J]. *Cell Mol Neurobiol*,2017,37(4):753-762.

[6] WANG Z,HAN X,CUI M,et al. Tissue kallikrein protects rat hippocampal CA1 neurons against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury through the B2R-Raf-MEK1/2-ERK1/2 pathway [J]. *J Neurosci Res*,2014,92(5):651-657.

[7] YANG C,LAI H,ZHAN C,et al. nNOS expression of hippocampal neurons in aged rats after brain ischemia/reperfusion and its role in DND development[J]. *Chin J Traumatol*,2002,5(4):232-236.

[8] BHATTARAI S,SOCHACKA-MARLOWE A,CRUTCHFIELD G,et al. Krüppel-like factors 7 and 6a mRNA expression in adult zebrafish central nervous system[J]. *Gene Expr Patterns*,2016,21(1):41-53.

[9] GALVAO J,IWAO K,APARA A,et al. The Krüppel-like factor gene target dusp14 regulates axon growth and regeneration [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2018,59(7):2736-2747.

[10] LAUB F,LEI L,SUMIYOSHI H,et al. Transcription factor KLF7 is important for neuronal morphogenesis in selected regions of the nervous system[J]. *Mol Cell Biol*,2005,25(13):5699-5711.

[11] MOORE D L,APARA A,GOLDBERG J L. Krüppel-like transcription factors in the nervous system: novel players in neurite outgrowth and axon regeneration[J]. *Mol Cell Neurosci*,2011,47(4):233-243.

河北医科大学,2015.

[10] DACIES S J,JACKSON P R,POTOKAR J,*et al.* Treatment of anxiety and depressive disorders in patients with cardiovascular disease[J]. *BMJ*,2004,328(7445):939-943.

[11] ROWAN P J,HBS D,CAMPBELL J A,*et al.* Depressive symptoms have an independent, gradient risk for coronary heart disease incidence in a random, population-based sample [J]. *Ann Epidemiol*,2005,15(4):316-320.

[12] 曹化,马树人,蒙涛,等. 冠心病患者抑郁状况的调查[J]. 疑难病杂志,2009,8(1):52-53.

[13] REESE R L,FREEDLAND K E,STEINMEYERR B C,*et al.* Depression and rehospitalization following acute myocardial infarction[J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*,2011,4(6):626-633.

[14] 郭大伟,周品一,江宏伟,等. BDNF 基因表达水平对肝癌细胞 97-H 增殖和迁移影响机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志,2017,24(21):1501-1506.

[15] JI H,DAI D,WANG Y,*et al.* Association of BDNF and BCHE with Alzheimer's disease;meta-analysis based on 56 genetic case-control studies of 12 563 cases and 12 622 controls[J]. *Exp Ther Med*,2015,9(5):1831-1840.

[16] 高海清. 抑郁症与心血管疾病概述[J]. 山东医药,2001,41(10):53.

[17] SHAH A J,VELEDAR E,HONG Y,*et al.* Depression and history of attempted suicide as risk factors for heart disease mortality in young individuals[J]. *Arch Gen Psychiatry*,2011,68(11):1135-1142.

[18] 周成刚,任寰,曾火焱,等. 农村社区冠心病并发抑郁发生率和相关因素的研究[J]. 现代预防医学,2006,33(6):877-879.

[19] 黄玲,沈兰,刘琦,等. 协同护理模式对老年心肌梗死患者心理弹性以及焦虑、抑郁水平的影响[J]. 中国健康心理学杂志,2018,26(8):1194-1197.

[20] AGGARWAL S,GHILARDI N,XIE M H,*et al.* Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17 [J]. *J Biol Chem*,2003,278(3):1910-1914.

[21] 王秀华,何国平,周文娟,等. 社区老年冠心病患者并发抑郁的影响因素[J]. 中国老年学杂志,2010,30(3):385-387.

[22] 平军娇,邓顺顺,万静,等. 伴与不伴抑郁症状的首发精神分裂症患者脑源性神经营养因子、同型半胱氨酸及 C-反应蛋白水平比较[J]. 新乡医学院学报,2018,35(8):697-700.

[23] 李佩幡,涂祥兵,王艺明,等. 抗抑郁剂对抑郁模型大鼠额叶炎症因子的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2018,27(4):300-304.

[24] DRAGO S,BERGERONE S,ANSELMINO M,*et al.* Depression in patients with acute myocardial infarction: influence on autonomic nervous system and prognostic role. Results of a five-year follow-up study[J]. *Int J Cardiol*,2007,115(1):46-51.

[25] PATRON E,MESSEROTTI B S,FAVRETTO G,*et al.* Association between depression and heart rate variability in patients after cardiac surgery: a pilot study[J]. *J Psychosom Res*,2012,73(1):42-46.

[26] GOMEZ-CAMINERO A,BLUMENTALS W A,RUSSO L J,*et al.* Does panic disorder increase the risk of coronary heart disease? A cohort study of a national managed care database[J]. *Psychosom Med*,2005,67(5):688-691.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)

(上接第 217 页)

[12] LI W Y,WANG Y,ZHAI F G,*et al.* AAV-KLF7 promotes descending propriospinal neuron axonal plasticity after spinal cord injury[J]. *Neural Plast*,2017,2017:1621629.

[13] LI W Y,ZHANG W T,CHENG Y X,*et al.* Inhibition of KLF7-targeting microRNA 146b promotes sciatic nerve regeneration [J]. *Neurosci Bull*,2018,34(3):419-437.

[14] WANG Y,LI W Y,JIA H,*et al.* KLF7-transfected Schwann cell graft transplantation promotes sciatic nerve regeneration [J]. *Neuroscience*,2017,340(2):319-332.

[15] CAO Y,ZHANG L,SUN S,*et al.* Neuroprotective effects of syringic acid against OGD/R-induced injury in cultured hippocampal neuronal cells[J]. *Int J Mol Med*,2016,38(2):567-573.

[16] WEI R,ZHANG R,LI H,*et al.* MiR-29 targets PUMA to suppress oxygen and glucose deprivation/reperfusion (OGD/R)-induced cell death in hippocampal neurons [J]. *Curr Neurovasc Res*,2018,15(1):47-54.

[17] 张伟,梁智辉. Annexin V-FITC/PI 双标记与 Hoechst33342/PI 双标记流式细胞术检测细胞凋亡的比较[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2014,30(11):1209-1212.

[18] WEI X W,HAO L Y,QI S H. Inhibition on the S-nitrosylation of MKK4 can protect hippocampal CA1 neurons in rat cerebral ischemia/reperfusion[J]. *Brain Res Bull*,2016,124:123-128.

[19] YANG R,HU K,CHEN J,*et al.* Necrostatin-1 protects hippocampal neurons against ischemia/reperfusion injury via the RIP3/DAXX signaling pathway in rats[J]. *Neurosci Lett*,2017,651:207-215.

[20] MOORE D L,BLACKMORE M G,HU Y,*et al.* KLF family members regulate intrinsic axon regeneration ability[J]. *Science*,2009,326(5950):298-301.

[21] APARA A,GALVAO J,WANG Y,*et al.* KLF9 and JNK3 interact to suppress axon regeneration in the adult CNS[J]. *J Neurosci*,2017,37(40):9632-9644.

[22] DUNCAN J,WANG N,ZHANG X,*et al.* Chronic social stress and ethanol increase expression of KLF11, a cell death mediator, in rat brain[J]. *Neurotox Res*,2015,28(1):18-31.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)