



DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2022.220162

UBIAD1通过抑制 nNOS/NO 途径减轻氧糖剥夺再灌注损伤

郑海平, 涂然然, 陈春丽, 胡治平

(中南大学湘雅二医院神经病学科, 长沙 410011)

[摘要] 目的: 缺血性脑卒中的发病率和致残率均极高, 缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)是治疗的关键。UbiA类异戊烯转移酶结构域1蛋白(UbiA prenyltransferase domain containing 1 protein, UBIAD1)是一类具有多种生物学功能的酶, 参与线粒体呼吸链电子传递、脂代谢、氧化应激等, 这些过程均与IRI有关。本研究探讨UBIAD1在脑IRI中的作用及其作用机制。方法: 以小鼠神经细胞瘤(mouse neuroblastoma Neuro2a, N2a)细胞为研究对象, 构建氧糖剥夺再灌注(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)损伤模型, 以过表达UBIAD1的慢病毒载体转染N2a细胞, 构建稳定过表达UBIAD1的细胞模型。第1部分实验将N2a细胞分为5组: 未经OGD处理(non-OGD)组、经OGD处理4h后分别再灌注0、4、12、24h组; 第2部分实验将N2a细胞分为6组: 正常细胞(Con)+non-OGD组、转染空载体细胞(EV)+non-OGD组、UBIAD1过表达细胞(OE)+non-OGD组、Con+OGD处理(OGD/R)组、EV+OGD/R组、OE+OGD/R组; 第3部分将N2a细胞分为8组: Con+non-OGD组、OE+non-OGD组、Con+non-OGD+NOS特异性抑制剂7-硝基吲唑(7-nitroindazole, 7-NI)组、OE+non-OGD+7-NI组、Con+OGD/R组、OE+OGD/R组、Con+OGD/R+7-NI组、OE+OGD/R+7-NI组。使用激光共聚焦扫描显微镜观察高尔基体形态改变, 流式细胞术检测细胞凋亡率, MTT法检测细胞活力, Griess试剂盒检测NO的释放, 分别通过real-time PCR和蛋白质印迹法检测细胞UBIAD1、分泌途径衍生钙离子转运ATP酶1(secretory pathway Ca²⁺-ATPase isoform 1, SPCA1)、NOS的mRNA和蛋白质表达水平。结果: 与non-OGD组相比, 经OGD处理4h后再灌注0、4、12及24h的各N2a细胞中UBIAD1 mRNA和蛋白质表达水平均明显下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且再灌注时间越长, UBIAD1表达水平下调越显著。与Con+OGD/R组、EV+OGD/R组相比, OE+OGD/R组UBIAD1 mRNA和蛋白质表达水平均明显上调(均 $P<0.01$), 细胞凋亡率均下降(均 $P<0.01$), 细胞活力均增高(均 $P<0.01$), 高尔基体碎裂较少, 形态保存较完整, SPCA1 mRNA和蛋白质表达水平均明显上调(均 $P<0.05$)。OE+non-OGD组与Con+non-OGD组相比, OE+OGD/R组与Con+OGD/R组相比, 内皮型NOS(endothelial NOS, eNOS)及神经元型NOS(neuronal NOS, nNOS)的mRNA和蛋白质表达均下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$), NO含量均减少(均 $P<0.01$); Con+OGD/R+7-NI组与Con+OGD/R组相比, OE+OGD/R+7-NI组与OE+OGD/R组相比, NO含量均减少(均 $P<0.01$), N2a细胞凋亡率均下降(均 $P<0.01$)。结论: UBIAD1可减轻神经细胞OGD/R损伤, 改善OGD/R后高尔基体功能, 其机制可能与抑制nNOS/NO途径有关。

[关键词] 氧糖剥夺再灌注; UbiA类异戊烯转移酶结构域1蛋白; 缺血再灌注损伤; 高尔基体; 分泌途径衍生钙离子转运ATP酶1; 神经元型一氧化氮合酶/NO途径

UBIAD1 protects against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury via nNOS/NO pathway

ZHENG Haiping, TU Ranran, CHEN Chunli, HU Zhiping

收稿日期(Date of reception): 2022-03-23

第一作者(First author): 郑海平, Email: 507410@csu.edu.cn, ORCID: 0000-0002-0789-7290

通信作者(Corresponding author): 胡治平, Email: zhipinghu@csu.edu.cn, ORCID: 0000-0001-5672-9683

基金项目(Foundation item): 国家自然科学基金(8197052473)。This work was supported by the National Natural Science Foundation (8197052473), China.

(Department of Neurology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT

Objective: Cerebral infarction is a subtype of stroke with high incidence and disability rate. Ischemia reperfusion injury (IRI) is the key point of cerebral infarction treatment. UbiA prenyltransferase domain containing 1 (UBIAD1) is a kind of enzyme with various biological functions including electron transport in mitochondrial respiratory chain, lipid metabolism, and oxidative stress which are related to IRI. The purpose of this study aims to determine the neuroprotective effects and the underlying mechanisms of UBIAD1 in cerebral IRI.

Methods: We employed oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) model in mouse neuroblastoma Neuro2a (N2a) cells to mimic cerebral IRI. Lentivirus vector over-expressed UBIAD1 was transfected into N2a cells to maintain high and stable expression of UBIAD1. In the first part of the experiment, N2a cells were divided into 5 groups: A non-OGD (N2a cells without exposure to OGD) group, groups of reoxygenation 0, 4, 12 and 24 h after 4 h of OGD, respectively. In the second part of the experiment, N2a cells were divided into 6 groups: A Con (normal cell)+non-OGD group, an EV (cell transfected with empty vector)+non-OGD group, an OE (over-expressed UBIAD1)+non-OGD group, a Con+OGD/R group, an EV+OGD/R group, and an OE+OGD/R group. In the third part, the N2a cells were divided into 8 groups: A Con+non-OGD group, an OE+non-OGD group, a Con+non-OGD+nNOS inhibitor 7-nitroindazole (7-NI) group, an OE+non-OGD+7-NI group, a Con+OGD/R group, an OE+OGD/R group, a Con+OGD/R+7-NI group, and an OE+OGD/R+7-NI group. The morphological changes of Golgi apparatus were observed under the confocal laser scanning microscope. The mRNA and protein levels of *UBIAD1*, secretory pathway Ca^{2+} -ATPase isoform 1 (*SPCA1*), and *NOS* were determined by real-time PCR and Western blotting, respectively. Cell apoptosis rate was detected with flow cytometry; cell viability was detected with MTT assay, and NO release was determined with Griess assay.

Results: Compared with the non-OGD group, the expression levels of *UBIAD1* mRNA and protein in N2a cells in the groups of 0, 4, 12 and 24 h reoxygenation after OGD 4 h decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the longer the reoxygenation time, the more significant the reduction of *UBIAD1* expression. Compared with the Con+OGD/R group and the EV+OGD/R group, mRNA and protein levels of *UBIAD1* and *SPCA1* were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the apoptosis rate was decreased (all $P < 0.01$), and the cell viability was increased (all $P < 0.01$) in the OE+OGD/R group. The Golgi fragmentation was less in the OE+OGD/R group than that in the Con+OGD/R group and the EV+OGD/R group. The mRNA and protein levels of endothelial NOS (*eNOS*) and neuronal NOS (*nNOS*) were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the level of NO was decreased (all $P < 0.01$) in the groups over-expressed UBIAD1 (OE+non-OGD group vs Con+non-OGD group, OE+OGD/R group vs Con+OGD/R group). The level of NO and apoptosis rate of N2a cells were decreased (all $P < 0.01$) in the the groups pretreated with 7-NI (Con+OGD/R+7-NI group vs Con+OGD/R group, OE+OGD/R+7-NI group vs OE+OGD/R group).

Conclusion: UBIAD1 may exerts protective effects on OGD/R induced N2a cells by ameliorating Golgi apparatus dysfunction via the nNOS/NO pathway.

KEY WORDS oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; UbiA prenyltransferase domain containing 1; ischemia reperfusion injury; Golgi apparatus; secretory pathway Ca^{2+} -ATPase isoform 1; neuronal NOS/NO pathway

缺血性脑卒中的发病率和致残率均极高, 对人类健康造成了极大的危害, 早期静脉溶栓及血管内介入治疗等可挽救缺血半暗带, 是目前最有效的治疗方式, 但受到时间窗及缺血半暗带的限制^[1]。缺血再灌注后会诱发缺血再灌注损伤, 包括炎症反应、氧化应激、细胞内钙超载、线粒体功能紊乱、细胞凋亡等多种病理生理过程, 可进一步加重脑梗死后的脑损伤^[2]。因此探讨缺血再灌注损伤的机制, 寻找有效的治疗方法十分重要。

UbiA 类异戊烯转移酶结构域 1 蛋白(UbiA prenyltransferase domain containing 1 protein, UBIAD1)参与许多生理及病理过程, 是抗氧化剂辅酶 Q10(coenzyme Q10, CoQ10)和维生素 K2 生物合成中的关键酶, 参与对脂质代谢的调控^[3]。UBIAD1 在不同的细胞定位于不同的亚细胞器, 从而发挥不同的功能。定位在人成骨样 MG63 细胞内质网上的 UBIAD1 可通过促进维生素的侧链交换催化维生素 K1 向维生素 K2 转换^[4]; 定位于人角膜细胞及果蝇 S2 细胞线粒体上的 UBIAD1 对维生素 K2 的合成及线粒体呼吸链电子传递至关重要^[5-6]; 定位在人上皮细胞高尔基体上的 UBIAD1 主要参与高尔基体合成 CoQ10, 即非线粒体型 CoQ10, 并通过 NO 发挥抗氧化作用^[7]。UBIAD1 能影响呼吸链电子传递、调节脂代谢、抗氧化应激等, 这些均与缺血再灌注损伤有关。本课题组前期的研究^[8]发现 UBIAD1 共定位于小鼠脑神经瘤细胞株(N2a)细胞的线粒体、内质网及高尔基体, 且 UBIAD1 过表达对氧糖剥夺再灌注(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)损伤后的 N2a 细胞亚细胞器功能障碍及裂解发挥保护作用。研究^[9]还发现嗅黏膜间充质干细胞可通过调节 UBIAD1 表达对 N2a 细胞 OGD/R 损伤发挥保护作用。可见 UBIAD1 具有多种生物学功能, 且与肿瘤、脂代谢紊乱、氧化应激及多种心脑血管疾病等密切相关。

高尔基体可通过改变自身结构和功能、调节分泌途径衍生钙离子转运 ATP 酶 1(secretory pathway Ca^{2+} -ATPase isoform 1, SPCA1)活性、表达自身氧化还原蛋白等参与氧化应激反应, 并与线粒体、溶酶体和内质网协作, 触发下游信号适应性修复细胞^[10]。笔者前期的研究^[11]还发现 SPCA1 活性受氧化应激的影响, SPCA1 具有维持钙稳态、减轻高尔基体应激的作用, 发挥神经保护的功能。如上所述, UBIAD1

可参与高尔基体 CoQ10 合成, 并通过 NO 发挥抗氧化作用。NO 的生物合成主要受 NOS 的影响。按细胞和组织来源 NOS 共有 3 种亚型: 神经元型 NOS(neuronal NOS, nNOS)、内皮型 NOS(endothelial NOS, eNOS)、诱导型 NOS(inducible, iNOS), 前 2 种在细胞处于生理状态下即可表达, 是钙离子和钙调蛋白依赖型, 合称为结构型 NOS, 后一种为非钙依赖型, 在细胞受到刺激时可大量表达。nNOS 能被 Ca^{2+} 激活, 生成 NO 影响细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)表达, 促环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)反应元件结合蛋白(cAMP responsive element binding protein, CREB)磷酸化, CREB 可介导线粒体应激对高尔基体的调控^[12]以及高尔基体应激^[13]。基于以上研究背景, 本研究以 N2a 细胞为实验对象, 研究 UBIAD1 是否通过调节 SPCA1 表达, 从而影响 nNOS/NO 通路, 减轻高尔基体应激, 发挥神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

N2a 细胞购于美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC), 使用含 1% 青霉素/链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基(含 10% 胎牛血清)在 37 °C、5% CO_2 的饱和湿度恒温箱中培养。

MTT、聚凝胺、山羊抗兔 IgG 二抗、山羊抗鼠 IgG 二抗、荧光素标记的山羊抗兔 IgG 二抗、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)购自美国 Sigma 公司; 细胞总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; TRIzol、蛋白质分子量标准 Marker 购自美国 Invitrogen 公司; RIPA 裂解液、BCA 试剂盒、NO 检测试剂盒、Griess 试剂盒购自江苏碧云天生物技术公司; SYBR Green PCR Master Mix 购自美国 Applied Biosystems 公司; 反转录第一链 cDNA 合成试剂盒、RNA 酶抑制剂、DNA 酶 I 购自加拿大 Fermentas 公司; 单克隆抗体 UBIAD1 购自美国 GeneTex 公司; 单克隆抗体 SPCA1、GM130 购自美国 Proteintech 公司; 单克隆抗体 eNOS、iNOS 购自英国 Abcam 公司; 单克隆抗体 nNOS 购自美国 Bioss 公司; 单克隆抗体 GAPDH 购自美国 SANTA 公司; Annexin V-FICT/PI 凋亡检测试剂

盒购自美国 Mbchem 公司; 过表达 UBIAD1 的慢病毒 (LV5-小鼠 UBIAD1) 购自苏州吉玛基因; 7-硝基吡唑 (7-nitroindazole, 7-NI) 购自上海谱振生物科技有限公司。

1.2 OGD/R

本研究用 OGD/R 模型来模拟体内的缺血再灌注过程。以无糖的 *D*-Hanks's 平衡盐溶液替代原有含糖培养基, 并向密闭盒内充入 95% N_2 和 5% CO_2 的混合气体以造成无氧环境, 将该密闭盒放入 37 °C 饱和湿度的恒温培养箱中。N2a 细胞在氧糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 的密闭容器内培养 4 h 后恢复有氧环境, 并将无糖 *D*-Hank's 平衡盐溶液替换成新鲜的含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 然后将培养瓶重新放入 37 °C 饱和湿度的恒温培养箱中, 再根据实验分组分别继续培养 0、4、12 及 24 h。选取合适的实验时间点进行后续实验。

1.3 MTT 法

采用 MTT 法检测细胞活力。各组细胞处理完毕后每孔加入 10 μ L MTT (5 g/L), 将细胞培养板重新放入 37 °C 饱和湿度的恒温培养箱中孵育 4 h, 使 MTT 还原为甲臜, 吸出上清液, 加入 DMSO 并用水平摇床摇匀, 使甲臜溶解。用酶标仪在 570 nm 波长处检测每孔的吸光度值, 实验重复 3 次。

1.4 Real-time PCR

使用 TRIzol 提取 N2a 细胞的总 RNA, 检测 RNA 的纯度和完整性。使用 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒配置 PCR 反应体系。在 ABI 7900 real-time PCR 仪上进行扩增反应, 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 20 s; 72 °C 退火 20 s; 72 °C 延伸 5 min, 共 40 个循环。引物 (表 1) 由上海生工生物工程技术有限公司合成。收集扩增各循环荧光信号, 循环结束后进行融解曲线分析; 检测并记录相应的 Ct 值, 以 GAPDH 为内参进行荧光校正和定量分析。

1.5 蛋白质印迹法

使用 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取 N2a 细胞的总蛋白质后用 BCA 法对蛋白质进行定量。取等量蛋白质行 SDS-PAGE 分离, 转移到 PVDF 膜上, 经封闭处理后分别加入单克隆抗体 UBIAD1 (1:1 000)、SPCA1 (1:500)、eNOS (1:400)、nNOS (1:400)、iNOS (1:200)、GAPDH (1:800), 在 4 °C 下孵育过夜, 洗膜后加入山羊抗兔 IgG 二抗 (1:4 000) 或山羊抗鼠 IgG 二抗 (1:8 000), 在室温下孵育 2 h, 洗膜后采用 ECL 试剂盒显影。运用 Gel pro 4.0 凝胶光密度分析软件分析结

果, 计算各条带积分光密度值 (integrated optical density, IOD)。

1.6 流式细胞术

使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测 N2a 细胞的凋亡情况。用 0.25% 的胰酶消化细胞, 并吹打成细胞悬液; 在室温下, 以 300 r/min 离心 5~10 min; 用预冷 (4 °C) 的 1 \times PBS 洗涤细胞, 再以 300 r/min 离心 5~10 min, 以上操作重复 2 次。用 100 μ L 细胞洗液重悬细胞后加入预冷的 400 μ L 1 \times 结合缓冲液; 然后加入 5 μ L Annexin V-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 和 5 μ L 碘化丙啶 (propidium iodide, PI), 轻轻混匀; 在室温、避光条件下孵育 5~15 min。流式细胞仪检测: 通过 FITC 通道 (FL1) 检测 Annexin V-FITC 的绿色荧光; 通过 PI 通道 (FL3) 检测 PI 的红色荧光。每个实验重复 3 次取平均值。用荧光素标记的 Annexin V 和 PI 对细胞进行双染色, 可区分存活细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞和坏死细胞。散点图可分为 4 个象限, 左下象限表示存活细胞, 右下象限代表早期凋亡细胞, 右上象限代表晚期凋亡及坏死细胞。

表 1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of real-time PCR

基因	引物序列 (5'-3')	片段大小/bp
UBIAD1	正向: GGCCATTCTCCATTCCAACA	183
	反向: GCCAGCCTCTCGGTCAGA	
SPCA1	正向: TCAGATGTGGCAAAGCAAAG	191
	反向: TAACCAGCCAACCAACATGA	
eNOS	正向: TCAGCCATCACAGTGTTC	87
	反向: ATAGCCCGCATAGCGTATCAG	
nNOS	正向: CCCAACGTCATTCTGTCCGT	182
	反向: TCTACCAGGGGCCGATCATT	
iNOS	正向: CACCTTGAGTTCACCCAGT	170
	反向: ACCACTCGTACTTGGGATGC	

UBIAD1: UbiA 类异戊烯转移酶结构域 1 蛋白; SPCA1: 分泌途径衍生钙离子转运 ATP 酶 1; eNOS: 内皮型 NOS; nNOS: 神经元型 NOS; iNOS: 诱导型 NOS。

1.7 慢病毒转染

将 N2a 细胞接种于 24 孔板, 置于饱和湿度、37 °C、5% CO_2 的恒温培养箱中培养过夜, 待细胞达到约 50% 融合时进行转染。取出 24 孔板, 弃去原有培养基, 每孔加入 5 μ g/mL 聚凝胺和完全培养基的混

合液 0.5 mL, 加入不同浓度梯度的过表达 UBIAD1 的慢病毒(LV5-小鼠 UBIAD1)感染 N2a 细胞。将细胞放回培养箱孵育, 8~12 h 后观察细胞, 感染 48~96 h 后, 用免疫荧光显微镜检测绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 报告基因的病毒表达情况, 并确定最佳转染时间和病毒浓度。本实验共分 6 组: 正常细胞(Con)+未经 OGD 处理(non-OGD)组、转染空载体细胞(EV)+non-OGD 组、UBIAD1 过表达细胞(OE)+non-OGD 组、Con+经 OGD/R 处理(OGD/R)组、EV+OGD/R 组、OE+OGD/R 组。

1.8 免疫荧光染色

在 6 孔板内小心放置盖玻片, 接种 N2a 细胞至 6 孔板进行培养。细胞片在室温下经 4% 甲醛固定液固定 20 min 后自然干燥; 用 PBS(0.01 mol/L)洗涤细胞片 3 次, 每次 5 min; 滴加正常山羊血清封闭液, 在室温下封闭 20 min 后甩去多余液体; 滴加 GM130 抗体(1:100)50 μ L, 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜; 用 PBS(0.01 mol/L)洗涤细胞片 3 次, 每次 5 min; 滴加荧光素标记的山羊抗兔 IgG 二抗 50 μ L, 在室温下避光放置 40 min; 用 PBS(0.01 mol/L)洗涤细胞片 3 次, 每次 5 min; 用 DAPI 复染细胞核 5 min; 用 PBS(0.01 mol/L)洗涤细胞片 3 次, 每次 5 min; 在激光共聚焦扫描显微镜 (LeicaTCS-SP5 型)下观察、采集并保存图像。

1.9 NO 含量的测定

为进一步研究 UBIAD1 的作用机制, 用 nNOS 特

异性抑制剂 7-NI 预处理 N2a 细胞(100 μ mol/L, 24 h)。实验共分 8 组: Con+non-OGD(A1)组、OE+non-OGD(A2)组、Con+non-OGD+7-NI(A3)组、OE+non-OGD 组+7-NI(A4)组、Con+OGD/R 组(B1)、OE+OGD/R(B2)组、Con+OGD/R+7-NI(B3)组、OE+OGD/R+7-NI(B4)组。

采用 Griess 试剂盒检测 NO 含量。按照说明书步骤进行操作在 540 nm 波长处测定各样本的吸光度值, 每样本检测 3 复孔。根据检测结果制作标准工作曲线, 计算 NO 含量(细胞样本 NO 含量/细胞样品蛋白质的浓度), 单位为 μ mol/mg 蛋白。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 23.0 进行统计学分析。数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较用 *t* 检验, 多组间均数比较用单因素方差分析(one-way ANOVA)。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OGD/R 对 N2a 细胞中 UBIAD1 表达的影响

与未行 OGD 处理(non-OGD)组相比, 经 OGD 处理 4 h 后再灌注 0、4、12 及 24 h 的各组 N2a 细胞中 UBIAD1 mRNA 和蛋白质表达水平均明显下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图 1), 且再灌注时间越长, UBIAD1 表达水平下调越显著。选择 12 h 作为后续实验的再灌注时间。

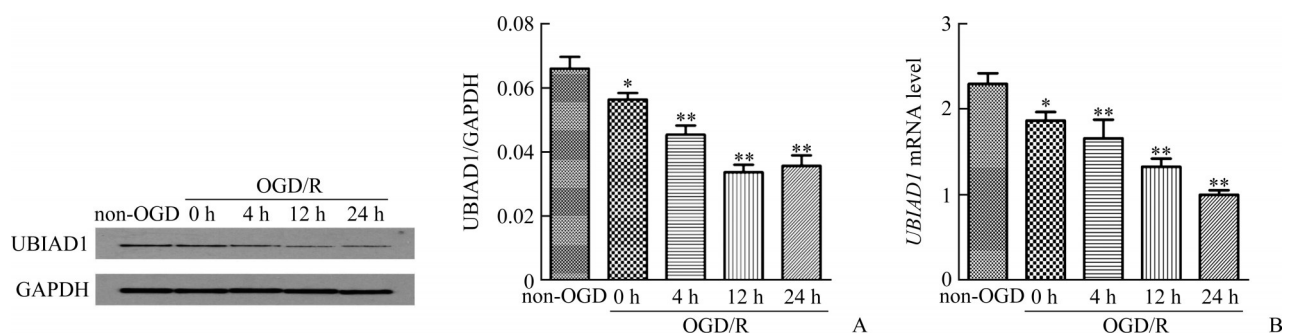


图 1 OGD/R 后 N2a 细胞 UBIAD1 的 mRNA 和蛋白质表达水平比较

Figure 1 Comparison of mRNA and protein expression levels of UBIAD1 in N2a cells after OGD/R

A: UBIAD1 protein expression levels determined with Western blotting; B: UBIAD1 mRNA expression levels determined with real-time PCR. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs the non-OGD group. OGD/R: Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; UBIAD1: UbiA prenyltransferase domain containing 1 protein.

2.2 过表达 UBIAD1 减轻 N2a 细胞的 OGD/R 损伤

蛋白质印迹法(图 2A)和 real-time PCR(图 2B)结果显示: 过表达 UBIAD1 的 N2a 细胞与正常或转染空载

体的 N2a 细胞相比(OE+OGD/R 组 vs Con+OGD/R 组或 EV+OGD/R 组, OE+non-OGD 组 vs Con+non-OGD 组或 EV+non-OGD 组), UBIAD1 mRNA 和蛋白质表

达水平均明显上调(均 $P<0.01$)。

流式细胞术结果(图2C)显示: 行OGD/R处理的N2a细胞与未接受OGD处理的N2a细胞相比(OE+OGD/R组 vs OE+non-OGD组、Con+OGD/R组 vs Con+non-OGD组、EV+OGD/R组 vs EV+non-OGD组), 细胞凋亡率均显著上升(均 $P<0.01$); 与Con+OGD/R组或EV+OGD/R组相比, OE+OGD/R组细胞凋亡率均显著降低(均 $P<0.01$), 而Con+OGD/R组与EV+OGD/R组之间细胞凋亡率差异无统计学意义

($P>0.05$)。

MTT结果(图2D)显示: Con+OGD/R组与Con+non-OGD组相比, EV+OGD/R组与EV+non-OGD组相比, 细胞活力均明显下降(均 $P<0.01$); 但OE+OGD/R组与OE+non-OGD组相比, 细胞活力差异无统计学意义($P>0.05$); 与Con+OGD/R组或EV+OGD/R组相比, OE+OGD/R组细胞活力均明显增加(均 $P<0.01$), 而Con+OGD/R组与EV+OGD/R组之间细胞活力差异无统计学意义($P>0.05$)。

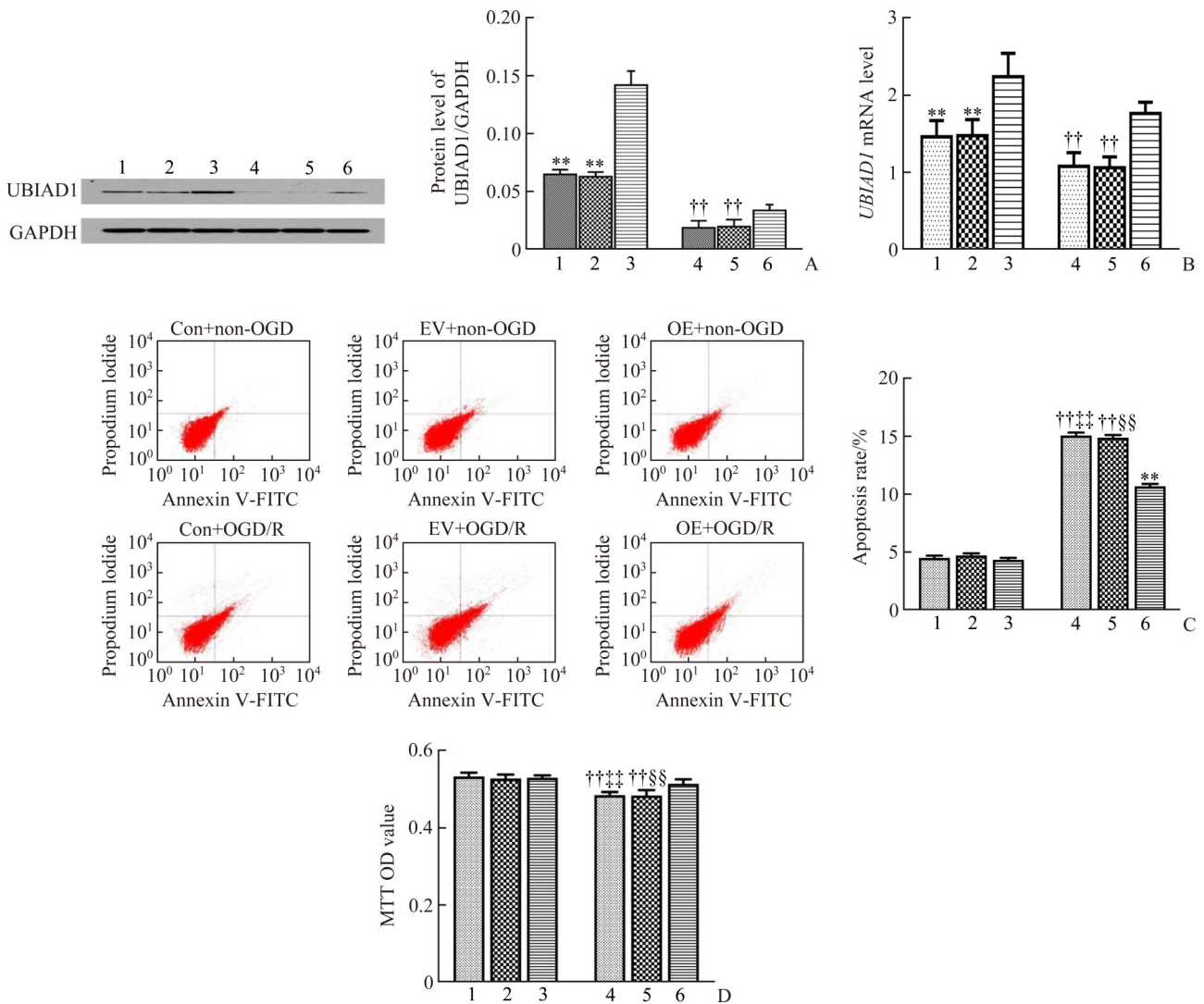


图2 过表达UBIAD1减轻N2a细胞OGD/R损伤

Figure 2 Overexpressed UBIAD1 ameliorated OGD/R injury in N2a cells

A: UBIAD1 protein expression levels determined with Western blotting after transfection with overexpressing plasmid; B: UBIAD1 mRNA expression levels determined with real-time PCR after transfection with overexpressing plasmid; C: Cell apoptosis determined with flow cytometry; D: Cell viability determined with MTT assay. 1: Con+non-OGD; 2: EV+non-OGD; 3: OE+non-OGD; 4: Con+OGD/R; 5: EV+OGD/R; 6: OE+OGD/R. ** $P<0.01$ vs the OE+non-OGD group; †† $P<0.01$ vs the OE+OGD/R group; ††† $P<0.01$ vs the Con+non-OGD group; §§ $P<0.01$ vs the EV+non-OGD group. OGD/R: Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; UBIAD1: UbiA prenyltransferase domain containing 1 protein.

2.3 过表达UBIAD1减轻OGD/R后N2a细胞的高尔基体应激

激光共聚焦扫描显微镜下可见(图3A): 未行OGD处理的各组(Con+non-OGD组、EV+non-OGD、OE+non-OGD组)N2a细胞的高尔基体结构紧密, 呈环形或新月形环绕在细胞核周围, 高尔基体形态未发生改变, 结构完整; 经OGD/R处理后, Con+OGD/R组和EV+OGD/R组N2a细胞的高尔基体结构松散甚至碎裂, 不能维持正常的环形或新月形结构, 呈扇形散开, 分布于细胞核周围, 而OE+OGD/R组N2a细胞虽然部分高尔基体结构出现松散, 但基本能维持正常形态。

蛋白质印迹法(图3B)和real-time PCR(图3C)结果

显示: 过表达UBIAD1的N2a细胞与正常或转染空载体的N2a细胞相比(OE+OGD/R组 vs Con+OGD/R组或EV+OGD/R组, OE+non-OGD组 vs Con+non-OGD组或EV+non-OGD组), 高尔基体上SPCA1 mRNA及蛋白质表达水平明显上调(均 $P<0.05$); 正常或转染空载体的N2a细胞相比(Con+non-OGD组 vs EV+non-OGD组、Con+OGD/R组 vs EV+OGD/R组), SPCA1 mRNA及蛋白质表达水平差异均无统计学意义(均 $P>0.05$); 行OGD/R处理的N2a细胞与未接受OGD处理的N2a细胞相比(OE+OGD/R组 vs OE+non-OGD组、Con+OGD/R组 vs Con+non-OGD组、EV+OGD/R组 vs EV+non-OGD组), SPCA1 mRNA及蛋白质表达水平明显下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

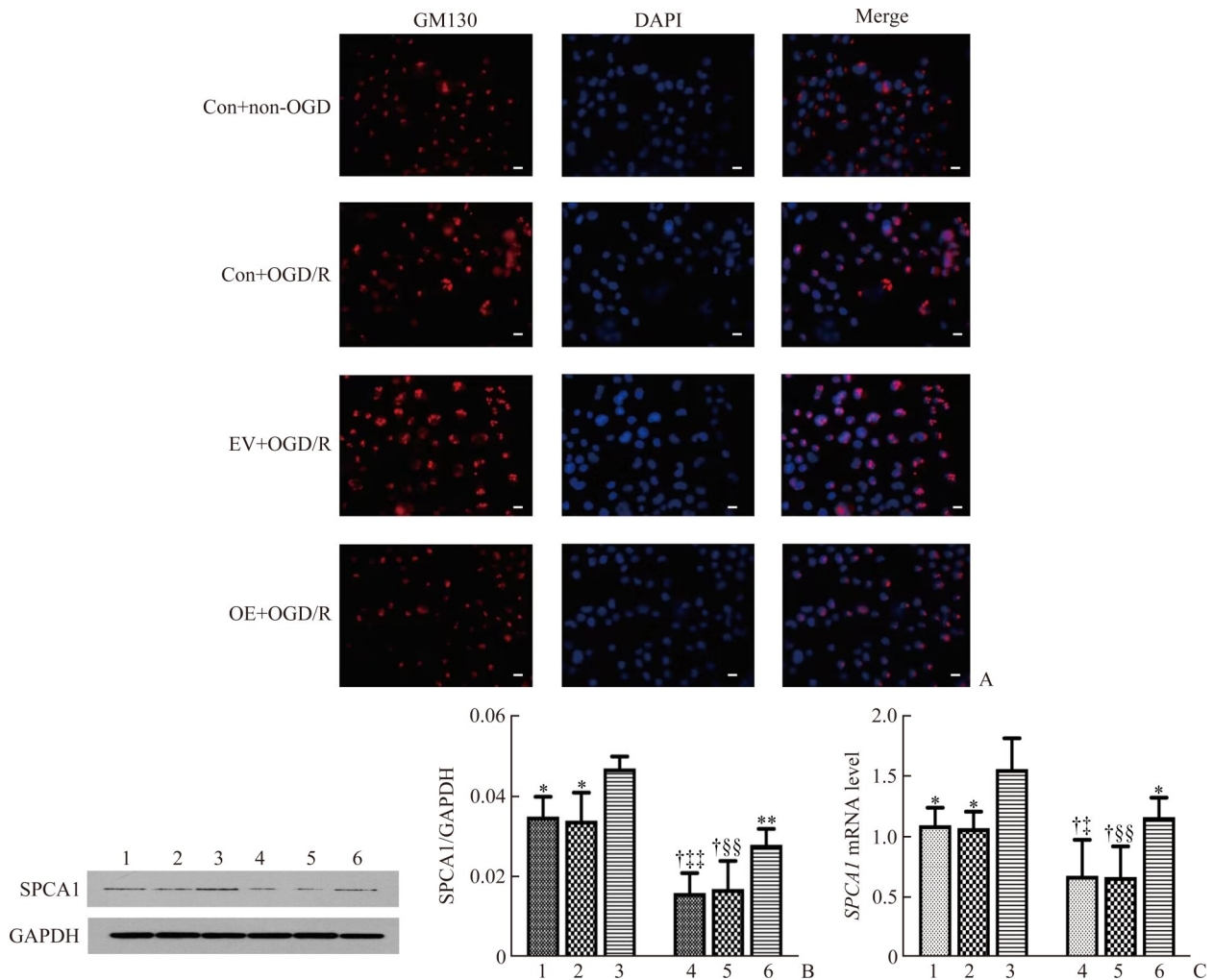


图3 过表达UBIAD1减轻OGD/R后N2a细胞高尔基体应激

Figure 3 Over-expressed UBIAD1 ameliorated Golgi stress in N2a cells after OGD/R

A: Morphology of Golgi apparatus detected by GM130 staining under confocal laser scanning microscopy, scale bar=10 μ m; B: SPCA1 protein expression levels determined by Western blotting; C: SPCA1 mRNA expression levels determined by real-time PCR. 1: Con +non-OGD; 2: EV+non-OGD; 3: OE+non-OGD; 4: Con+OGD/R; 5: EV+OGD/R; 6: OE+OGD/R. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs the OE+non-OGD group; † $P<0.05$ vs the OE+OGD/R group; †† $P<0.05$, ††† $P<0.01$ vs the Con+non-OGD group; § $P<0.05$, §§ $P<0.01$ vs the EV+non-OGD group. OGD/R: Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; UBIAD1: UbiA prenyltransferase domain containing 1 protein.

2.4 UBIAD1通过nNOS/NO途径减轻OGD/R后N2a细胞的损伤

蛋白质印迹法和 real-time PCR 结果(图 4)显示: 行 OGD/R 处理的 N2a 细胞与未接受 OGD 处理的 N2a 细胞相比(B1 组 vs A1 组、B2 组 vs A2 组、B3 组 vs A3 组、B4 组 vs A4 组), *eNOS* 的 mRNA 和蛋白质表达均明显上调(均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 过表达 UBIAD1 的 N2a 细胞与正常 N2a 细胞相比(A2 组 vs A1 组、A4 组 vs A3 组、B2 组 vs B1 组、B4 组 vs B3 组), *eNOS* 的 mRNA 和蛋白质表达均明显下调(均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。对正常或过表达 UBIAD1 的 N2a 细胞而言, 接受 OGD/R 处理较未接受 OGD 处理的各组(B1 组 vs A1

组、B2 组 vs A2 组), *nNOS* 的 mRNA 和蛋白质表达均明显上调(均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); A2 组与 A1 组、A4 组与 A3 组、B2 组与 B1 组相比, *nNOS* 的 mRNA 和蛋白质表达均明显下调(均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但 B3 组与 B4 组间 *nNOS* 表达差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$); 各亚组间 *iNOS* 表达水平差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。加抑制剂与未加抑制剂的各组相比(A3 组 vs A1 组、A4 组 vs A2 组、B3 组 vs B1 组、B4 组 vs B2 组), *nNOS* 的 mRNA 和蛋白质表达水平均明显下调(均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), *eNOS*、*iNOS* 的 mRNA 和蛋白质表达在上述组间的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

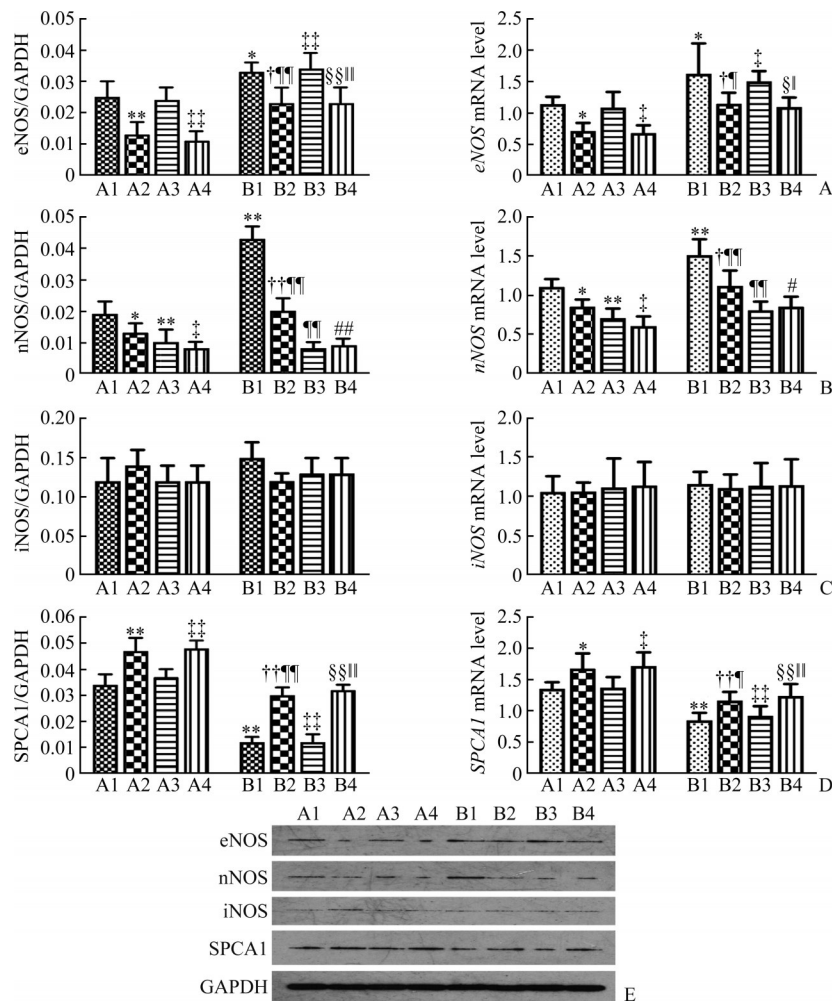


图4 过表达UBIAD1下调OGD/R后N2a细胞中nNOS的表达

Figure 4 Over-expressed UBIAD1 down-regulated the mRNA and protein expression nNOS in N2a cells after OGD/R

A-D: Histogram showing the mRNA and protein expression of *eNOS* (A), *nNOS* (B), *iNOS* (C), and *SPCA1* (D); E: Electropherogram showing the protein expression of *eNOS*, *nNOS*, *iNOS*, and *SPCA1*. A1: Con+non-OGD; A2: OE+non-OGD; A3: Con+non-OGD+7-NI; A4: OE+non-OGD+7-NI; B1: Con+OGD/R; B2: OE+OGD/R; B3: Con+OGD/R+7-NI; B4: OE+OGD/R+7-NI. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the Group A1; † $P < 0.05$, ‡ $P < 0.01$ vs the Group A2; ‡ $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs the Group A3; § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$ vs the Group A4; ¶ $P < 0.05$, ¶¶ $P < 0.01$ vs the Group B1; ‖ $P < 0.05$, ‖‖ $P < 0.01$ vs the Group B3; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs the Group B2. OGD/R: Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; UBIAD1: UbiA prenyltransferase domain containing 1 protein; *eNOS*: Endothelial nitric oxide synthase; *nNOS*: Neuronal nitric oxide synthase; *iNOS*: Inducible nitric oxide synthase; 7-NI: 7-nitroindazole.

蛋白质印迹法和 real-time PCR 结果(图 4)显示: 行 OGD/R 处理的 N2a 细胞与未接受 OGD 处理的 N2a 细胞相比(B1 组 vs A1 组、B2 组 vs A2 组、B3 组 vs A3 组、B4 组 vs A4 组), *SPCA1* 的 mRNA 和蛋白质表达均明显下调(均 $P < 0.01$); 过表达 UBIAD1 的 N2a 细胞与正常 N2a 细胞相比(A2 组 vs A1 组、A4 组 vs A3 组、B2 组 vs B1 组、B4 组 vs B3 组), *SPCA1* 的 mRNA 和蛋白质表达均明显上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 加抑制剂与未加抑制剂的各组相比(A3 组 vs A1 组、A4 组 vs A2 组、B3 组 vs B1 组、B4 组 vs B2 组), *SPCA1* 的 mRNA 和蛋白质表达水平差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

流式细胞仪结果(图 5A, 5B)显示: 未接受 OGD 处理的各组(A1 组、A2 组、A3 组、A4 组)间, 细胞凋亡率差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$); 行 OGD/R 处理的 N2a 细胞与未接受 OGD 处理的 N2a 细胞相比(B1 组 vs A1 组、B2 组 vs A2 组、B3 组 vs A3 组、B4

组 vs A4 组), 细胞凋亡率均明显升高(均 $P < 0.01$); 行 OGD/R 处理的 N2a 细胞, 加抑制剂与未加抑制剂的相比(B3 组 vs B1 组、B4 组 vs B2 组), 过表达 UBIAD1 与正常的相比(B2 组 vs B1 组), 细胞凋亡率均显著下降(均 $P < 0.01$); B4 组与 B3 组之间细胞凋亡率的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

行 OGD/R 处理的 N2a 细胞与未接受 OGD 处理的 N2a 细胞相比(B1 组 vs A1 组、B2 组 vs A2 组、B3 组 vs A3 组、B4 组 vs A4 组), NO 含量均升高(均 $P < 0.01$); 过表达 UBIAD1 与正常的 N2a 细胞相比(A2 组 vs A1 组、B2 组 vs B1 组), NO 含量均减少(均 $P < 0.01$); 加抑制剂与未加抑制剂的 N2a 细胞相比(A3 组 vs A1 组、A4 组 vs A2 组、B3 组 vs B1 组、B4 组 vs B2 组), NO 含量均减少(均 $P < 0.01$); B4 组的 NO 含量较 B3 组升高($P < 0.01$), A3 组与 A4 组间差异无统计学意义($P > 0.05$, 图 5C)。

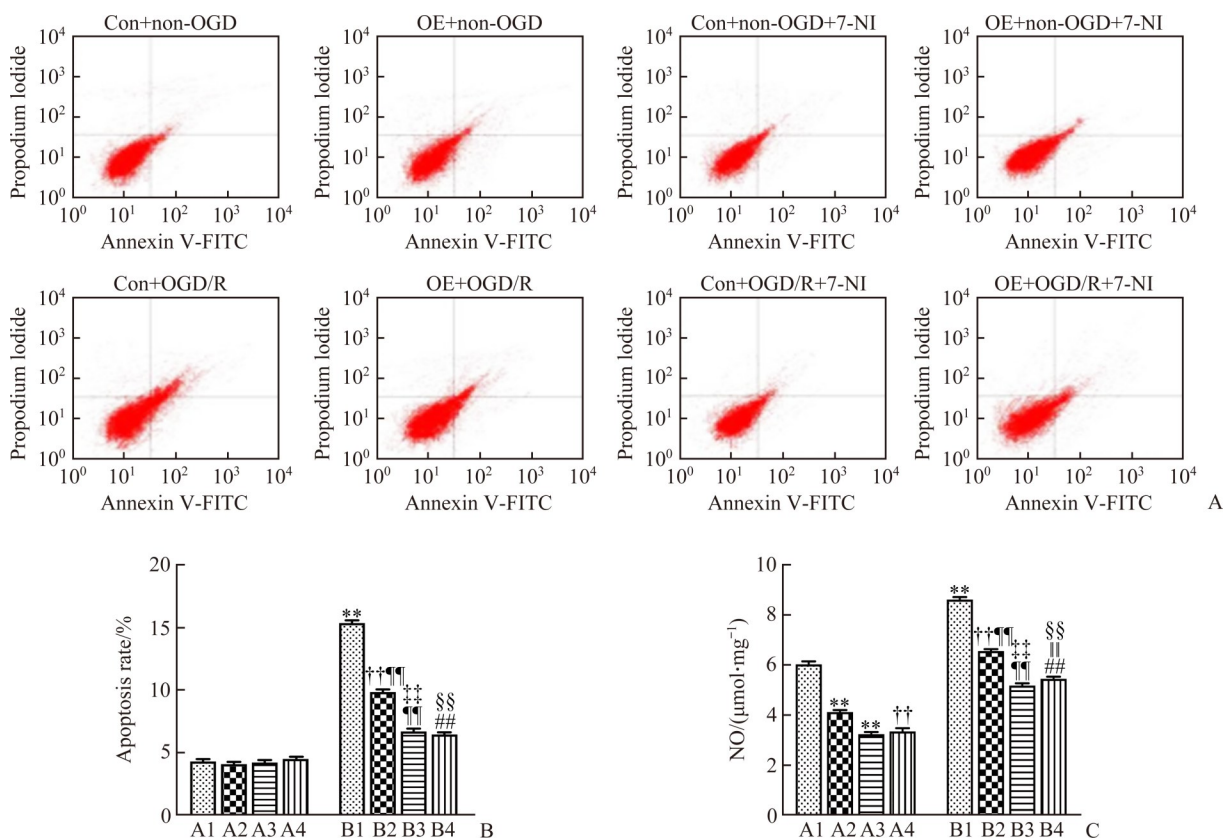


图5 UBIAD1通过抑制nNOS/NO表达减轻OGD/R后N2a细胞的损伤

Figure 5 UBIAD1 reduced OGD/R induced N2a cell injury through down-regulation of the nNOS/NO pathway

A and B: Cell apoptosis determined by flow cytometry assay; C: NO release of N2a cells. A1: Con+non-OGD; A2: OE+non-OGD; A3: Con+non-OGD+7-NI; A4: OE+non-OGD+7-NI; B1: Con+OGD/R; B2: OE+OGD/R; B3: Con+OGD/R+7-NI; B4: OE+OGD/R+7-NI. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the Group A1; † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs the Group A2; ‡ $P < 0.05$, ‡‡ $P < 0.01$ vs the Group A3; § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$ vs the Group A4; ¶ $P < 0.05$, ¶¶ $P < 0.01$ vs the Group B1; || $P < 0.05$, ||| $P < 0.01$ vs the Group B3; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs the Group B2. OGD/R: Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; UBIAD1: UbiA prenyltransferase domain containing 1 protein; nNOS: Neuronal nitric oxide synthase; 7-NI: 7-nitroindazole.

3 讨论

缺血性脑卒中具有高发病率和致残率的特点, IRI是目前治疗的重点和难点。虽然关于缺血再灌注的研究已有很多, 但目前尚无有效的治疗缺血性脑卒中的方法。因此探讨IRI的机制, 进而寻找有效的治疗方案具有十分重要的临床意义。

已有研究证实UBIAD1功能障碍可导致心血管疾病^[7]、帕金森病^[6]、施奈德结晶状角膜营养不良^[14]及泌尿系肿瘤^[15]。但目前鲜有关于UBIAD1与IRI关系的研究, 鉴于UBIAD1通过参与多种物质的合成和调节发挥重要功能, 笔者推测UBIAD1在脑IRI中亦可能有神经保护作用。本研究采用体外实验探究UBIAD1在N2a细胞OGD/R损伤中的作用及其机制, 结果显示OGD/R可使UBIAD1表达下调, 而过表达UBIAD1的N2a细胞经过OGD/R处理后凋亡减少, 细胞活力增加, 证实UBIAD1可能在OGD/R损伤中对N2a细胞发挥保护作用。

IRI的机制复杂, 细胞凋亡及氧化应激在其中发挥重要作用。高尔基体通过自身结构及功能的改变, 参与细胞凋亡、鞘脂类代谢、信号转导、抗氧化等过程。SPCA1定位在高尔基体上, 其功能主要是维持高尔基体内Ca²⁺稳态, 参与蛋白质从高尔基体转运到细胞质的过程^[16]。一方面, SPCA1的活性受氧化应激的调控; 另一方面, SPCA1能减轻高尔基体应激, 对维持高尔基体功能及形态的完整性起重要作用。体内及体外实验^[17-18]均证实SPCA1具有神经保护作用。本研究发现: 经OGD/R处理后, N2a细胞的高尔基体形态出现改变, 甚至碎裂, N2a细胞SPCA1的表达明显下调。这与既往研究^[11, 19-20]结果一致。SPCA1表达下调可能是因为OGD/R处理使高尔基体碎裂, 破坏了SPCA1结构或功能的完整性。进一步研究发现: 在OGD/R处理后, 过表达UBIAD1的N2a细胞高尔基体碎裂明显减少, 同时SPCA1的表达上调。这提示UBIAD1对高尔基体有保护作用。UBIAD1可通过维持高尔基体形态完整性及上调SPCA1表达来减轻OGD/R处理后发生的高尔基体应激, 从而发挥对N2a细胞的保护作用。

氧化应激在IRI的病理生理过程中扮演重要角色, 会进一步触发炎症反应、能量衰竭等。活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)在氧化应激损伤中起重要作用, 清除ROS/RNS可以减轻氧化应激及IRI。

NO是中枢神经系统重要的神经递质, NO的生成主要受NOS的调控。内源性NO生物利用度降低与动脉粥样硬化、脑卒中、肿瘤等多种疾病有关^[21]。低

浓度的NO可能促进肿瘤细胞生长; 高浓度的NO有细胞毒性, 可损害线粒体呼吸链, 导致细胞凋亡^[22]; NO浓度过低或过高均有危害, 参与疾病的发生和发展^[23]。本研究结果显示: N2a细胞经过OGD/R处理后, NO释放量明显增加, 过表达UBIAD1可减少NO的释放, 并使细胞凋亡率明显下降。这提示经过OGD/R处理后过高的NO浓度对N2a细胞生长不利, 而过表达UBIAD1可能通过减少NO释放对N2a细胞的OGD/R损伤发挥保护作用。

eNOS是一种钙依赖型的合酶, 功能受Ca²⁺浓度的调节, 在心血管系统中起重要的调节作用。在正常情况下, eNOS的合成产物是NO, 但在缺少四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH4)或L-精氨酸时, eNOS不能合成NO, 而是生成超氧阴离子, 这个过程称之为eNOS解偶联, 是氧化应激后BH4或者L-精氨酸的氧化所致^[24]; 超氧阴离子氧化NO生成具有极高活性的过氧硝酸盐, 过氧硝酸盐又可氧化BH4生成BH3⁻, 降低BH4的水平, 进一步导致eNOS解偶联, 形成一个恶性循环。eNOS解偶联与高脂血症、高血压、糖尿病等疾病相关。本研究发现OGD/R后N2a细胞中eNOS表达上调, 与之前文献^[23]的结果一致, 可能是OGD/R诱导的氧化应激使细胞内钙超载, Ca²⁺浓度增加, 而上调eNOS的表达。进一步研究发现: 过表达UBIAD1的N2a细胞OGD/R后eNOS表达下调, N2a细胞凋亡率明显下降。其可能原因有二: 1)UBIAD1过表达可上调SPCA1的表达, SPCA1作为高尔基体内的钙锰离子泵, 可调节Ca²⁺稳态, 从而使OGD/R后N2a细胞内Ca²⁺浓度降低, eNOS活化减少; 2)UBIAD1具有抗氧化作用, 其生成的CoQ10可重偶联eNOS^[25], 过表达UBIAD1后, 氧化应激后解偶联的eNOS减少, 而重偶联后的eNOS与底物可能形成酶-底物复合物, 因此被检测到的量少。

nNOS也是一种钙依赖型的合酶, 定位在不同的亚细胞器, 可发挥不同的功能, 参与多种疾病的病理过程^[26]。nNOS在中枢神经系统、周围神经系统、上皮细胞、胰岛细胞、肾上腺等均有表达, 与血压的中枢调控、神经元的死亡及脑血管疾病有关。在生理状态下, nNOS精确调控有神经保护作用的NO的生成、释放及失活, 但在氧化应激等病理状态(如缺血性脑卒中、帕金森病、阿尔茨海默病等)下, 细胞内钙超载能大量激活nNOS, 生成过多的NO并导致细胞毒性^[27], 进一步导致神经元死亡。7-NI是nNOS的选择性抑制剂, 选择性强, 应用广泛^[28]。本研究证实7-NI可显著抑制nNOS的表达, 对eNOS及iNOS的表达无影响。nNOS基因敲除及接受7-NI治

疗的大鼠与正常大鼠相比,梗死面积明显减少,脑梗死后病灶周围的神经细胞再生明显增多^[29]。动物试验^[30]也发现抑制nNOS可改善脑缺血损伤,证明在脑梗死中nNOS具有神经毒性,抑制nNOS的活性可通过调节体内NO的含量减轻脑梗死后的缺血性损伤并促进神经再生。

本研究结果发现:在OGD/R处理后,N2a细胞nNOS表达明显上调且细胞凋亡率升高,7-NI可降低OGD/R处理的N2a细胞的凋亡率,但对正常N2a细胞的凋亡率无明显影响。这提示nNOS在OGD/R中对N2a细胞发挥神经毒性作用,而7-NI对N2a细胞无明显毒性作用,且在OGD/R中发挥保护作用,与之前的动物实验^[29-30]结果一致。

UBIAD1过表达后,N2a细胞nNOS的表达下调,SPCA1的表达上调,提示UBIAD1、SPCA1和nNOS之间存在一定联系。7-NI抑制nNOS表达后,N2a细胞

SPCA1表达无明显变化,UBIAD1过表达后SPCA1表达上调,而nNOS表达下降,说明SPCA1表达不受nNOS的调控,SPCA1可能是nNOS的上游蛋白质。与未进行OGD处理的N2a细胞相比,OGD/R组N2a细胞的nNOS表达上调,UBIAD1过表达后nNOS表达下降,这可能是因为氧化应激后Ca²⁺超载可大量激活nNOS,而UBIAD1过表达可上调SPCA1表达水平,SPCA1可以调节钙超载并维持Ca²⁺浓度的稳定,从而减少nNOS的活化。N2a细胞的凋亡率随着nNOS表达的上调而升高,UBIAD1过表达或7-NI抑制nNOS表达后,N2a细胞凋亡率明显下降,说明OGD/R后N2a细胞的凋亡率与nNOS的表达水平呈正相关。

综上,UBIAD1可减轻OGD/R损伤后N2a细胞高尔基体应激及凋亡;UBIAD1可能通过上调SPCA1抑制nNOS/NO途径,发挥神经保护作用(图6)。

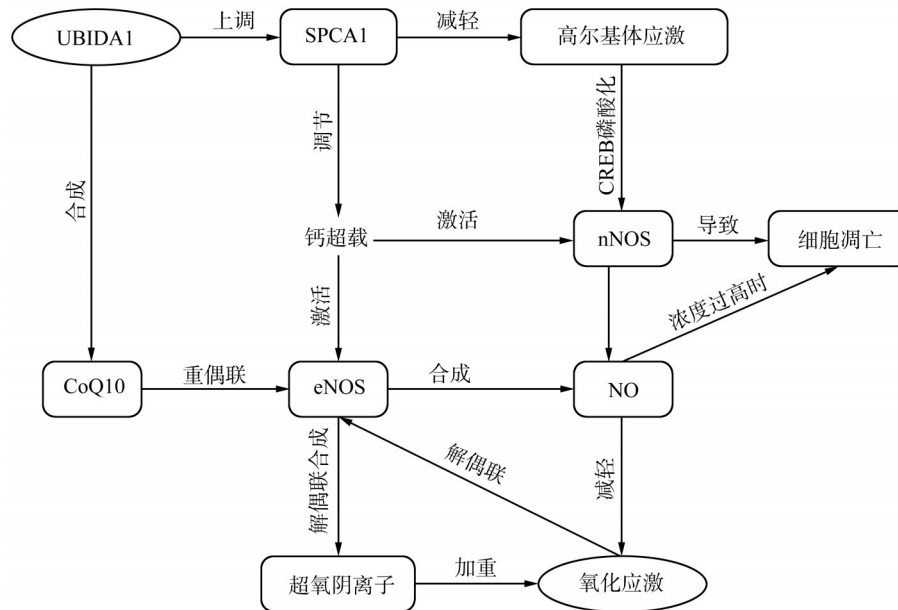


图6 UBIAD1减轻OGD/R损伤的作用及其可能机制

Figure 6 Role of UBIAD1 in reducing OGD/R damage and the underlying mechanism

UBIAD1: UbiA prenyltransferase domain containing 1 protein; SPCA1: Secretory pathway Ca²⁺-ATPase isoform 1; CoQ10: Coenzyme Q10; OGD/R: Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; nNOS: Neuronal NOS; eNOS: Endothelial NOS.

作者贡献声明: 郑海平 实验操作, 数据分析, 论文写作; 涂然然 论文修改; 陈春丽 实验指导, 论文修改; 胡治平 项目立项, 实验指导及论文撰写。所有作者阅读并同意最终的文本。

利益冲突声明: 作者声称无任何利益冲突。

参考文献

- [1] Magoufis G, Safouris A, Raphaeli G, et al. Acute reperfusion therapies for acute ischemic stroke patients with unknown time of symptom onset or in extended time windows: an individualized approach[J]. Ther Adv Neurol Disord, 2021, 14: 17562864211021182. <https://doi.org/10.1177/17562864211021182>.

- [2] Mizuma A, Yenari MA. Anti-inflammatory targets for the treatment of reperfusion injury in stroke[J]. *Front Neurol*, 2017, 8: 467. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00467>.
- [3] Arslanbaeva, L, Tosi G, Ravazzolo M, et al. UBIAD1 and CoQ10 protect melanoma cells from lipid peroxidation-mediated cell death[J]. *Redox Biol*, 2022, 51: 102272. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102272>.
- [4] Nakagawa, K, Hirota Y, Sawada N, et al. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme[J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 117-121. <https://doi.org/nature0946410.1038/nature09464>.
- [5] Du C, Li Y, Dai L, et al. A mutation in the UBIAD1 gene in a Han Chinese family with Schnyder corneal dystrophy[J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 2685-2692. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209473>. <https://doi.org/290>.
- [6] Vos M, Esposito G, Edirisinghe JN, et al. Vitamin K2 is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency[J]. *Science*, 2012, 336(6086): 1306-1310. <https://doi.org/10.1126/science.1218632>.
- [7] Mugoni V, Postel R, Catanzaro V, et al. Ubiad1 is an antioxidant enzyme that regulates eNOS activity by CoQ10 synthesis[J]. *Cell*, 2013, 152(3): 504-518. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.013>.
- [8] Huang Y, Hu Z. UBIAD1 protects against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced multiple subcellular organelles injury through PI3K/AKT pathway in N2A cells[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 7480-7496. <https://doi.org/10.1002/jcp.26602>.
- [9] Liu J, Huang Y, He J, et al. Olfactory mucosa mesenchymal stem cells ameliorate cerebral ischemic/reperfusion injury through modulation of UBIAD1 expression[J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 580206. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.580206>.
- [10] Jiang Z, Hu Z, Zeng L, et al. The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria?[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(8): 907-917. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.011>.
- [11] He J, Liu J, Huang Y, et al. Olfactory mucosa mesenchymal stem cells alleviate cerebral ischemia/reperfusion injury via golgi apparatus secretory pathway Ca^{2+} -ATPase isoform1[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 586541. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.586541>.
- [12] Li T, You H, Zhang J, et al. Study of GOLPH3: a potential stress-inducible protein from golgi apparatus[J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(3): 1449-1459. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8624-2>.
- [13] Reiling JH, Olive AJ, Sanyal S, et al. A CREB3-ARF4 signalling pathway mediates the response to Golgi stress and susceptibility to pathogens[J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(12): 1473-1485. <https://doi.org/10.1038/ncb2865>.
- [14] Jo Y, Hamilton JS, Hwang S, et al. Schnyder corneal dystrophy-associated UBIAD1 inhibits ER-associated degradation of HMG CoA reductase in mice[J/OL]. *eLife*, 2019, 8: e44396. [2022-03-20]. <https://doi.org/10.7554/eLife.44396>.
- [15] Yan L, Li Q, Sun K, et al. MiR-4644 is upregulated in plasma exosomes of bladder cancer patients and promotes bladder cancer progression by targeting UBIAD1[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(10): 6277-6289. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7653622>.
- [16] Micaroni M, Perinetti G, Berrie CP, et al. The SPCA1 Ca^{2+} pump and intracellular membrane trafficking[J]. *Traffic*, 2010, 11(10): 1315-1333. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01096.x>.
- [17] BaelenVan, Dode K, Vanoevelen J, et al. The Ca^{2+}/Mn^{2+} pumps in the Golgi apparatus[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1742(1/3): 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.08.018>.
- [18] He W, Hu Z. The role of the Golgi-resident SPCA Ca^{2+}/Mn^{2+} pump in ionic homeostasis and neural function[J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(3): 455-468. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0644-6>.
- [19] Hicks SW, Machamer CE. Golgi structure in stress sensing and apoptosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1744(3): 406-414. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.03.002>.
- [20] Hu Z, Fan J, Zeng L, et al. Transient cerebral ischemia leads to TGF-beta2 expression in Golgi apparatus organelles[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2008, 5(3): 178-184. <https://doi.org/10.2174/156720208785425693>.
- [21] Ritchie RH, Drummond GR, Sobey CG, et al. The opposing roles of NO and oxidative stress in cardiovascular disease[J]. *Pharmacol Res*, 2017, 116: 57-69. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.12.017>.
- [22] Seabra AB, de Lima R, Calderon M. Nitric oxide releasing nanomaterials for cancer treatment: current status and perspectives[J]. *Curr Top Med Chem*, 2015, 15(4): 298-308. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150108122918>.
- [23] Rochette L, Lorin J, Zeller M, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets?[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 140(3): 239-257. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.004>.
- [24] Wierońska JM, Cieślak P, Kalinowski L. Nitric oxide-dependent pathways as critical factors in the consequences and recovery after brain ischemic hypoxia[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1097. <https://doi.org/10.3390/biom11081097>.
- [25] Chew GT, Watts GF. Coenzyme Q10 and diabetic endotheliopathy: oxidative stress and the 'recoupling hypothesis'[J]. *QJM*, 2004, 97(8): 537-548. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hch089>.
- [26] Ally A, Powell I, Ally MM, et al. Role of neuronal nitric oxide synthase on cardiovascular functions in physiological and pathophysiological states[J]. *Nitric Oxide*, 2020, 102: 52-73. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.06.004>.
- [27] Zhou QG, Zhu XH, Nemes AD, et al. Neuronal nitric oxide synthase and affective disorders[J]. *IBRO Rep*, 2018, 5: 116-132. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2018.11.004>.
- [28] 张朝再, 董雷, 牟凤辉, 等. 神经型一氧化氮合酶抑制剂的研究进展[J]. *药学学报*, 2014, 49(6): 781-788. <https://pubmed>.

- ncbi.nlm.nih.gov/25212021.
- ZHANG Chaozai, DONG Lei, MU Fenghui, et al. Progress in the studies on neuronal nitric oxide synthase inhibitors[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2014, 49(6): 781-788. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25212021>.
- [29] Sun Y, Jin K, Childs JT, et al. Neuronal nitric oxide synthase and ischemia-induced neurogenesis[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25(4): 485-492. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600049>.
- [30] Luo CX, Zhu XJ, Zhou QG, et al. Reduced neuronal nitric oxide synthase is involved in ischemia-induced hippocampal neurogenesis by up-regulating inducible nitric oxide synthase expression[J]. J Neurochem, 2007, 103(5): 1872-1882. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04915.x>.

(本文编辑 郭征)

本文引用: 郑海平, 涂然然, 陈春丽, 胡治平. UBIAD1通过抑制 nNOS/NO 途径减轻氧糖剥夺再灌注损伤[J]. 中南大学学报(医学版), 2022, 47(10): 1332-1344. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2022.220162

Cite this article as: ZHENG Haiping, TU Ranran, CHEN Chunli, HU Zhiping. UBIAD1 protects against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury via nNOS/NO pathway[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2022, 47(10): 1332-1344. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2022.220162

欢迎订阅 2023 年《中南大学学报(医学版)》

《中南大学学报(医学版)》原名《湖南医科大学学报》，创刊于1958年，为教育部主管、中南大学主办的医药卫生类综合性学术期刊。该刊已被美国医学文献分析和联机检索系统(Medline, PubMed)及其《医学索引》(IM)、荷兰《医学文摘》(EM)、Scopus、WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)、中国科学引文数据库(核心库)(CSCD)、《WJCI报告》等国内外多家重要数据库或权威文摘期刊收录；是中国科技论文统计源期刊、中文核心期刊及中国期刊方阵“双效”期刊；为中国高校百佳科技期刊、中国精品科技期刊、RCCSE中国权威学术期刊(A+)和湖南省十佳科技期刊。

本刊为月刊，国际标准开本(A4幅面)，每月月末出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷，图片彩色印刷。定价45元/册，全年540元。国内外公开发售。国内统一连续出版物号：CN 43-1427/R；国际标准连续出版物号：ISSN 1672-7347；国内邮发代号：42-10，国外邮发代号：BM422。欢迎新老用户向当地邮局(所)订阅，漏订或需增订者也可直接与本刊编辑部联系订阅。

欢迎投稿

地址：湖南省长沙市湘雅路110号湘雅医学院内

电话：0731-84805495, 0731-84805496

Email: xbyxb@csu.edu.cn, xyxb2005@vip.163.com, xyxb2005@126.com

[Http://xbyxb.csu.edu.cn](http://xbyxb.csu.edu.cn)

欢迎订阅

邮编：410078

《中南大学学报(医学版)》编辑部