

文章编号:1001-6880(2015)1-0139-05

泻根醇酸对 NMDA 诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用研究

张胜男,李煌,张玉琴,徐伟,陈立典,黄枚,褚克丹*,阙金花

福建中医药大学药学院,福州 450122

摘要:钙离子内流、 Ca^{2+} /钙调蛋白(CaM)依赖的蛋白激酶II(CaMKII)和cAMP应答元件结合蛋白(CREB)的磷酸化是NMDA诱导细胞凋亡的重要过程。本实验探讨了泻根醇酸(BA)对N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)诱导的PC12细胞损伤的保护作用及可能机制。MTT法测定细胞活力、测定LDH释放率、Fura-2/AM荧光标记法测定细胞内钙离子浓度,Western blot法测定CaMKII、p-CaMKII、CREB、p-CREB、Bax、Bcl-2蛋白表达。结果显示,与模型组相比,BA给药组细胞活力显著升高,LDH释放减少, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 降低,p-CREB、Bcl-2表达上调,Bax表达下调。BA能够通过 Ca^{2+} -CaMKII-CREB信号通路保护NMDA诱导的PC12细胞损伤,进而有望成为脑缺血疾病的神经保护药物。

关键词:泻根醇酸;脑缺血;PC12细胞; Ca^{2+} ;Bcl-2;Bax;p-CaMKII;p-CREB

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.028

Bryonolic Acid Protects Against NMDA-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells

ZHANG Sheng-nan, LI Huang, ZHANG Yu-qin, XU Wei, CHEN Li-dian,

HUANG Mei, CHU Ke-dan*, QUE Jin-hua

College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian 450122, China

Abstract: Calcium overload is considered as one of the mechanisms of cerebral ischemia. Ca^{2+} influx and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and cAMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation are considered to be involved in N-Methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis process. In this study, we investigated the neuroprotective effects of bryonolic acid (BA) in the NMDA-induced rat's adrenal pheochromocytoma cell line (PC12 cells) and the potential mechanism. NMDA induced cytotoxicity in PC12 cells was accompanied by cell viability decrease and lactate dehydrogenase (LDH) release, as well as Ca^{2+} influx, Bax up-regulation, p-CREB and Bcl-2 down-regulation. The results showed that pretreatment with BA significantly attenuated cells viability decrease and LDH release, as well as Ca^{2+} influx, Bax generation p-CREB and Bcl-2 protein increase. All these results indicated that BA protected PC12 cells against NMDA-induced apoptosis by inhibiting Ca^{2+} influx and regulating genes expression in Ca^{2+} -CaMKII-CREB signal pathway. Therefore, the present study supported the notion that BA may be a promising neuroprotective agent for the treatment of cerebral ischemia disease.

Key words: bryonolic acid; PC12 cells; Ca^{2+} ; Bcl-2; Bax; p-CaMKII; p-CREB

脑缺血已成为世界范围内的主要致残、致死因素^[1]。并且随着年龄的增长发病率逐渐升高。然而,缺血性中风的发病机制较为复杂,兴奋性毒性、钙超载、氧化应激、凋亡、炎症反应等^[2-5]。文献报道,脑缺血损伤与细胞外钙离子大量内流有关^[6],钙超载被认为是神经细胞死亡的最终共同途径^[7]。

因此,钙离子浓度的维持在脑缺血病理变化中起着重要作用。

天花粉是葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 或双边栝楼 *Trichosanthes rosthornii* HarHls 的干燥根,具有清热泻火、消肿排脓之功效。现代药理研究表明,天花粉对于减轻大鼠脑缺血再灌注损伤具有一定的作用^[8]。然而,其作用于脑缺血的成分尚未明确。泻根醇酸是天花粉中四环三萜类成分,具有细胞毒性、抗炎、抗肿瘤、抗氧化等生物活性^[9-13]。但是,其对神经细胞作用的影响尚无报道。本文以NMDA建立PC12钙离子超载模型,观察泻

收稿日期:2014-06-25 接收日期:2014-11-06

基金项目:福建省科技厅重点项目(2012Y0041);福建省教育厅项目(JA12176);国家级大学生创新创业训练计划项目(201410393008);校管课题(X2013015)

* 通讯作者 Tel:86-591-22861661; E-mail:chukd5917@163.com

根醇酸对 NMDA 诱导的 PC12 细胞损伤的影响，并用 Western Blot 法检测 CREB 等相关基因蛋白的表达，初步在分子细胞水平上探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

PC12 细胞株购于北京北纳创联生物技术研究院；泻根醇酸 (bryonolic acid) 由福建中医药大学药学院分离提供，纯度 > 98%；胰蛋白酶、RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (FBS) 均购于美国 Hyclone 公司；噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO)、N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA)、Fura-2/AM 均购于美国 Sigma 公司；乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒购于南京建成生物工程研究所；Bax、Bcl-2、CREB、p-CREB、CaMKII、p-CaMKII、 β -actin 均购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.1.2 主要仪器设备

超净工作台 (苏州安泰空气技术公司, SW-CJ-2FD)；CO₂ 细胞培养箱 (Thermo, 3111)；酶联免疫检测仪 (TECAN, Infinite M200 Pro)；倒置显微镜 (江南光电集团有限公司, YS100)；全自动凝胶成像系统 (Bio-rad, Gel Dox XR +) 等。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

PC12 细胞培养于 RMPI-1640 完全培养基中 (含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和链霉素) 的培养基，置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。2~3 d 传代一次，倒置显微镜下观察细胞生长状态，选取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 实验分组

取对数生长期的 PC12 细胞按照 2×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板上，37 °C、5% CO₂ 恒温恒湿培养箱中培养 24 h 后，用 PBS 轻轻荡洗 1 次，并按分组需要加药。正常组加入等量的 1640 培养基，模型组和药物组分别加入 1640 培养基和不同浓度的 BA，预孵育 24 h 后，加入 NMDA 使其终浓度为 20 mM，共孵育 6 h。

1.2.3 MTT 法检测细胞活力

孵育结束后，每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 10 μ L，继续培养 4 h，吸弃培养基，加入 100 μ L DMSO，待蓝紫色甲瓒颗粒完全溶解后，用酶联免疫检测仪测定波长 570 nm 下的吸光度值 (A)。细胞存活率 (%)

$$= \text{实验组 A 值} / \text{正常对照组 A 值} \times 100\%。$$

1.2.4 LDH 活性测定

孵育结束，收集各组细胞上清液，实验步骤按照试剂盒说明书操作，酶联免疫检测仪波长 450 nm 下测定吸光度值 A，计算 LDH 活性。

1.2.5 细胞内钙离子浓度测定

取对数生长期的 PC12 细胞按照 2×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板上，37 °C、5% CO₂ 恒温恒湿培养箱中培养 24 h 后，用 PBS 轻轻荡洗 1 次并分组。正常组、模型组、给药组 (100 μ M BA)，方法同上。孵育结束吸弃培养基，用 D-PBS 清洗，加入完全培养基，用 Fura-2/AM 5 μ M 37 °C 孵育 45 min，用含有 0.2% 牛血清蛋白的 D-PBS 清洗。测定前，细胞置于 37 °C 孵育 5 min。荧光条件：以 340 nm 和 380 nm 波长交替激发，发射波长为 510 nm，酶标仪测定。

1.2.6 Western blot 检测 CaMKII、p-CaMKII、CREB、p-CREB、Bax、Bcl-2 的表达

取对数生长期的 PC12 细胞按照 4×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板上，在 37 °C、5% CO₂ 恒温恒湿培养箱中培养 24 h 后，用 PBS 轻轻荡洗 1 次，实验分成正常组、模型组、给药组 (100 μ M BA)，方法同上。孵育结束，加入裂解液提取各组细胞蛋白样品，BCA 法进行蛋白定量。取适量样品，加入等体积 5 × 蛋白上样缓冲液，100 °C 金属浴 6 min。各组取 20 μ g 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (5% 浓缩胶、13% 分离胶) 电泳分离。将分离蛋白转移到 PVDF 膜，5% 脱脂奶室温封闭 2 h，分别加入 5% 脱脂奶配制的一抗 [β -actin (1: 1000)、CaMKII (1: 1000)、p-CaMKII (1: 1000)、CREB (1: 1000)、p-CREB (1: 1000)、Bax (1: 1000)、Bcl-2 (1: 1000)]，4 °C 过夜。TBST 洗 3 × 10 min，加入 5% 脱脂奶配制的二抗 (1: 7000) 室温孵育 2 h，TBST 洗 3 × 10 min，ECL 发光显影。

1.2.7 统计学方法

数据用均数 ± 标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示，应用 SPSS18.0 统计软件对各组数据进行统计学分析。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较各组间的差异，差异以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 BA 对 NMDA 诱导 PC12 细胞损伤的作用

20 mM NMDA 能成功诱导 PC12 细胞损伤，存活率仅为 $51.6 \pm 2.8\%$ ，与正常对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.01$)，而 PC12 细胞经过 BA 高、中、

低三种浓度预处理后,存活率均有不同程度增加,且药物组 100 μM 和 1000 μM 与模型组相比差异显著($P < 0.05$),并随着剂量的增加有明显的量效关系。说明 BA 对 NMDA 诱导的 PC12 细胞损伤具有较好的保护作用。结果见图 1A。

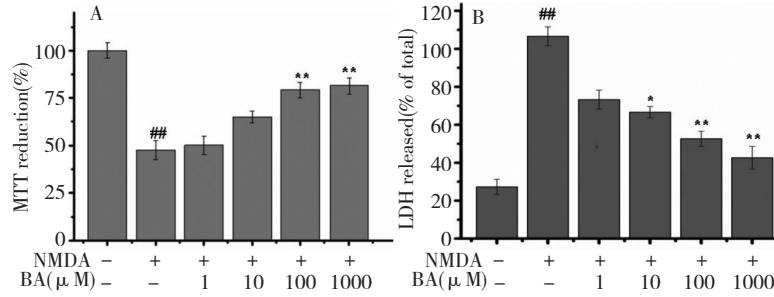


图 1 BA 对 NMDA 诱导 PC12 细胞的影响($\bar{x} \pm SD, n = 8$)

Fig. 1 Effect of BA on NMDA-induced PC12 cells ($\bar{x} \pm SD, n = 8$)

注:与正常空白组相比, $^{##}P < 0.01$;与 NMDA 模型组相比, $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$ 。

Note: $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$ vs NMDA group.

2.3 BA 对 NMDA 诱导 PC12 细胞内钙离子浓度的影响

PC12 经 NMDA 处理后,细胞内钙离子浓度明显高与正常组,具有统计学意义($P < 0.01$);但是,当用 100 μM BA 预先处理后,与模型组相比,钙离子水平显著降低($P < 0.01$)。说明,BA 对 PC12 的保护作用可能与调节细胞内钙离子浓度有关。结果见图 2。

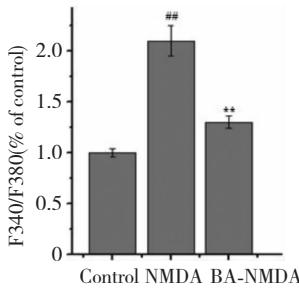


图 2 BA 对 NMDA 诱导 PC12 细胞内钙离子浓度的影响

($\bar{x} \pm SD, n = 6$)

Fig. 2 Effect of BA on intracellular Ca^{2+} concentration in NMDA-induced PC12 cells ($\bar{x} \pm SD, n = 6$)

注:与正常空白组相比, $^{*}P < 0.01$;与模型组相比, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

Note: $^{*}P < 0.01$ compared with control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ compared with NMDA group.

2.4 BA 对 NMDA 诱导 PC12 细胞 CaMKII、p-CaMKII、CREB、p-CREB、Bax、Bcl-2 的表达

如图 3 所示,与正常组相比,模型组中 Bcl-2、p-

2.2 BA 对 NMDA 诱导 PC12 细胞 LDH 释放的影响

BA 可以抑制 NMDA 引起的 LDH 的释放。模型组的 LDH 释放率为 $106.5 \pm 11.3\%$, 明显高于正常组($P < 0.01$);而预先用 BA 孵育的给药组其 LDH 释放率较模型组有所降低, 并 100 μM 和 1000 μM 的 BA 组差异显著($P < 0.01$)。结果见图 1B。

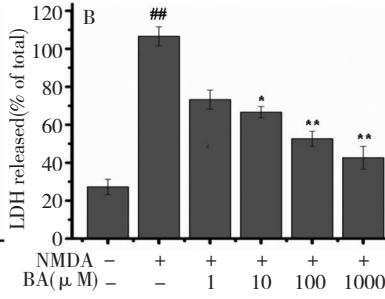


图 1 BA 对 NMDA 诱导 PC12 细胞的影响($\bar{x} \pm SD, n = 8$)

CREB 表达量显著降低, p-CaMKII、Bax 表达水平显著升高。与模型组相比, BA 药物组 Bcl-2、p-CREB 则显著上调、Bax 表达降低。CaMKII 和 CREB 在各实验组中表达无显著性差异, p-CaMKII 表达在模型组和药物组表达无显著性差异。

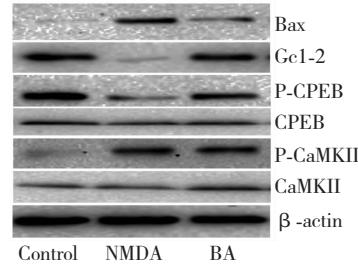


图 3 BA 对 NMDA 诱导的 PC12 细胞蛋白水平表达的影响

Fig. 3 Effect of BA on protein levels on NMDA-induced PC12 cells

3 讨论

目前,缺血性中风是继癌症、心血管疾病的第三种致死致残的疾病。然而,对于治疗急性脑缺血的临床药物较少,有必要开发研究新的治疗药物。兴奋性毒性是脑缺血引起神经细胞死亡的一个重要原因^[14]。NMDA 是一种兴奋性氨基酸,能通过作用于突触后神经元的相应受体,激活受体门控性钙通道,引起细胞内钙超载。胞内钙超载继发性引起线粒体中毒,细胞能量代谢障碍,内源性兴奋性氨基酸

(EAA)过度释放,加重神经毒性,导致细胞死亡。NMDA诱导的神经细胞死亡与 p-CREB 和 Bcl-2 低表达,Bax 高表达有关^[15]。

PC12 细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤的细胞株,具有神经细胞特性,可传代培养,类型较为单一,细胞特性稳定,常用于体外神经性疾病的研究。目前,已有高浓度的 NMDA 损伤 PC12 细胞的模型用于脑卒中的文献报道^[16,17]。本实验研究表明,给药组细胞活力明显升高,LDH 释放量减低。说明 BA 对 NMDA 诱导的 PC12 损伤细胞有保护作用。

Ca^{2+} 是细胞内关键的第二信使,在神经细胞中,胞内自由钙离子浓度的变化能调控多种不同神经功能,对酶活性、神经递质释放、神经可塑性以及基因表达等方面起着非常重要的作用。静息状态下,细胞内游离钙离子浓度仅为 $10^{-8} \sim 10^{-7}$ M,细胞受到刺激,可升高到 10^{-6} M。脑缺血再灌注后,细胞内的 Ca^{2+} 超载,脑组织中钙调蛋白(CaM)活性和含量也明显升高。临幊上多种 CaM 抑制剂可抑制神经原细胞的 Ca^{2+} 内流,从而抑制脑缺血对神经损伤的作用,缩小梗死面积。

Ca^{2+} /钙调蛋白依赖(CaM)的蛋白激酶 II(CaMKII)是一种多功能丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在脑突触后致密区蛋白中占 1% ~ 2%。它分为 α 、 β 两个亚型,在 Ca^{2+} 敏感的信号通路中起主导作用,是不同外界刺激引起的神经可塑性改变的基础。 Ca^{2+} /CaM 复合物能够激活 CaMKII 发生自磷酸化,发挥蛋白激酶活性,调控细胞中许多反应^[18,19]。文献表明,CaMKII 磷酸化是脑缺血病变的一个重要过程^[20,21]。CaMKII 能够激活 CREB,调控特定基因的表达。

cAMP 应答元件结合蛋白(CREB)是一种重要的核转录因子,在神经系统中发挥着重要作用。它参与了神经细胞增殖、神经诱导分化、神经突触生长等生理活动^[22,23]。因此,CaMKII 和 CREB 可以作为神经元凋亡中许多信号通路中的交汇点。

本实验结果表明,天花粉中泻根醇酸对 NMDA 诱导的 PC12 细胞损伤具有保护作用,可明显提高 NMDA 诱导的 PC12 细胞的存活率,减少 LDH 的释放,并且呈剂量依赖关系。NMDA 能引起 PC12 细胞内 CaMKII 磷酸化;BA 干预后,p-CREB、Bcl-2 水平上调,Bax 表达下调。BA 可能通过 Ca^{2+} -CaMKII-CREB 信号通路调控脑缺血引起细胞凋亡。基于此,泻根醇酸有望成为治疗脑缺血的神经保护类化

合物,具有广阔的开发前景和研究意义。

致谢:本课题在康复技术协同创新中心和国家中医药管理局中医康复研究中心资助下,在福建省科技厅福建省中药学重点实验室完成。

参考文献

- Simerabet M, Robin E, Aristi I, et al. Preconditioning by an in situ administration of hydrogen peroxide: involvement of reactive oxygen species and mitochondrial ATP-dependent potassium channel in a cerebral ischemia-reperfusion model. *Brain Res*, 2008, 1240:177-184.
- Candelario-Jalil E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10:644-654.
- Janardhan V, Qureshi AI. Mechanisms of ischemic brain injury. *Curr Cardiol Reports*, 2004, 6:117-123.
- Amantea D, Nappi G, Bernardi G, et al. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS*, 2009, 276:13-26.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 2008, 55: 310-318.
- Ma SW, Liu HX, Jiao HY, et al. Neuroprotective effect of ginkgolide K on glutamate-induced cytotoxicity in PC 12 cells via inhibition of ROS generation and Ca^{2+} influx. *Neuro Toxicol*, 2012, 33:59-69.
- Bano D, Nicotera P. Ca^{2+} signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke*, 2007, 38:S674-676.
- Chen W(陈威), Zhang SW(张思为), Wang H(王红). Study of radices trichosanthis on neuronal apoptosis in rats with local cerebral ischemia reperfusion. *Mod J Integr Tradit Chin Med West Med* (现代中西医结合杂志), 2011, 20: 1844-1845.
- Tanaka S, Uno C, Akimoto M, et al. Anti allergic effect of bryonolic acid from luffa cylindrica cell suspension cultures. *Planta Med*, 1991, 57:527-530.
- Takeda T, Kondo T, Mizukami H, et al. Chem. Bryonolic acid production in hairy roots of *Trichosanthes kirilowii* Max. var Japonica Kitam. Transformed with *Agrobacterium rhizogenes* and its cytotoxic activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1994, 42:730-732.
- Kondo T, Inoue M, Mizukami H, et al. Cytotoxic activity of bryonolic acid isolated from transformed hairy roots of *Trichosanthes kirilowii* var. japonica. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18:726-729.