

何首乌苷通过激活 BDNF/TrkB 信号通路拮抗 H₂O₂ 诱导的大鼠海马神经元氧化损伤

李茜茜¹, 李 飞², 郎修远¹, 覃筱燕^{1*}

¹中央民族大学生命与环境科学学院转化神经科学中心, 北京 100081;

²南宁市公安局强制隔离戒毒所, 南宁 530001

摘要:探讨脑源性神经营养因子/酪氨酸激酶受体 B (BDNF/TrkB) 信号通路激活参与何首乌苷 (PMG) 对过氧化氢 (H₂O₂) 诱导神经元氧化应激损伤的保护作用。实验采用神经元原代培养, 建立大鼠鼠海马神经元氧化应激损伤模型。实验结果显示高浓度的 H₂O₂ 与 MTT 测定的细胞存活率降低相关, 选择细胞存活率在 40% ~ 50% 之间的 200 μmol/L H₂O₂ 浓度作为氧化应激损伤的实验浓度。与模型组相比, PMG 预处理组 (200 μmol/L) 可抑制 H₂O₂ 诱导的神经元损伤 ($P < 0.001$)。TUNEL 和 β-微管蛋白 III 荧光染色显示 PMG 保护 H₂O₂ 诱导的神经细胞损伤, 明显降低细胞凋亡率 ($P < 0.001$), 细胞骨架形态恢复正常。与 PMG + H₂O₂ 预处理组相比较, 当加入 BDNF/TrkB 信号转导通路阻断剂 K252a 后, PMG + H₂O₂ + K252a 组神经元细胞存活率大幅度下降 ($P < 0.01$), 细胞骨架形态呈损伤状态。同时, 我们发现 PMG 预处理恢复 H₂O₂ 诱导的 BDNF 和 P-TrkB 的低表达水平, 并且用 K252a 阻断 BDNF / TrkB 信号传导抑制了 PMG 对 BDNF 和 P-TrkB 表达水平的影响 ($P < 0.01$)。综上所述, 何首乌苷可能通过激活 BDNF/TrkB 信号转导通路及维护神经元骨架的完整, 实现对大鼠海马神经元氧化应激损伤的拮抗作用。

关键词:何首乌苷; 过氧化氢; 海马神经元; 氧化应激; BDNF/TrkB 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)7-1163-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.7.007

PMG antagonizes H₂O₂-induced oxidative damage in rat hippocampal neurons via activating BDNF/TrkB signaling pathway

LI Xi-xi¹, LI Fei², LANG Xiu-yuan¹, QIN Xiao-yan^{1*}

¹Center on Translational Neuroscience, College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China;

²Nanning City Public Security Bureau compulsory isolation drug rehabilitation center, Nanning 530001, China

Abstract: This study focuses on the protective role of *Polygonum multiflorum* glycosides (PMG) on hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced neuronal injury and the involvement of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase receptor B (BDNF/TrkB) signaling pathway. Oxidative stress injury model of neonatal rat hippocampal neurons was used. The results showed that the high concentration of H₂O₂ is associated with the lower the cell viability with MTT assay and 200 μmol/L H₂O₂, resulting in cell viability between 40% and 50%, was chosen for inducing oxidative stress. PMG pretreatment group (200 μmol/L) inhibited H₂O₂-induced neuronal damage comparing to model group ($P < 0.001$). TUNEL and β-tubulin III fluorescence staining showed PMG protected H₂O₂ induced damage of neuronal cells, the apoptosis rate ($P < 0.001$), and the damaged cytoskeleton morphology. Comparing with the PMG + H₂O₂ pretreatment group, inclusion of K252a, a BDNF/TrkB signal transduction pathway blocker, decreased the neuronal survival rate ($P < 0.01$) and maintained an abnormal state of cytoskeletal morphology. Finally, we found that PMG pretreatment restored H₂O₂ induced lower expression level of BDNF and P-TrkB and blocking BDNF/TrkB signaling with K252a inhibit the PMG effect on BDNF and P-TrkB expression level. In summary, PMG has a protective effect on H₂O₂-induced oxidative stress in neonatal rat hippocampal neurons, potentially through

收稿日期: 2018-11-22 接受日期: 2019-04-22

基金项目: 国家自然科学基金 (81873088); 中央高校自主科研基金 (2016SHXY01); 国家大学生创新训练计划 (GCCX2016110022)

* 通信作者 E-mail: zhongsjia01@163.com

activation of BDNF/TrkB signal transduction pathway to maintain normal morphology of neuronal skeleton.

Key words: *Polygonum multiflorum* glycosides; hydrogen peroxide; hippocampal neurons; oxidative stress; BDNF/TrkB signaling pathway

何首乌 *Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald. 是蓼科何首乌属植物, 俗称首乌。何首乌的活性成分主要包括二苯乙烯苷类、蒽醌类、酚类、黄酮类等。其中, 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷 (2, 3, 5, 4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside, THSG), 俗称二苯乙烯苷, 为该药用植物最主要的药理活性成分, 在该植物中的含量极高, 同时药理活性十分清晰, 亦称为何首乌苷 (*Polygonum multiflorum* glycosides, PMG)^[1-3]。近年来, 对 PMG (THSG 或二苯乙烯苷) 在神经损伤保护方面的研究日渐增多, 但其作用机理复杂多靶向, 尚未阐明^[1,2,4,5]。已发现的机制如通过维持神经元内的 β -tubulin III 微管蛋白的形态构成、调节 caspase 蛋白的表达量、抗氧化、提高脑内乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的活性等, 从而提升脑损伤大鼠的学习记忆能力^[1,2,5]。

脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)/酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase B, TrkB) 是神经细胞内一条重要的信号转导通路, 它参与突触可塑性的调节, 并在学习记忆中扮演着重要的角色。BDNF 是在脑内合成的一种蛋白质, 在中枢神经系统中广泛表达, 主要分布于杏仁核、海马、皮质等部位^[6], 是哺乳动物脑中分布最广、含量最高的神经营养因子, 它通过不同的途径调节神经元存活、分化和凋亡, 对神经系统发育和功能的维持具有重要作用^[7]。TrkB 是 BDNF 的受体, 二者结合后可触发一系列细胞内信号传递从而发挥生物学效应^[8]。在 BDNF/TrkB 信号传导通路中, BDNF 与 TrkB 结合后激活胞内区域, 引起 TrkB 自身磷酸化作用增强, 进而激活 Ras-MAPK 通路, 最后在 cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 的丝氨酸位点激活 CREB。CREB 通过增加 BDNF 基因及抗凋亡蛋白基因 Bcl-2 的表达, 促进神经细胞生存, 增加突触可塑性及神经发生^[9]。因此 BDNF/TrkB 信号转导通路是脑细胞内一条关键性的通路, 尤其是维持细胞生存、抑制细胞凋亡的相关过程中起着十分重要的作用。本研究拟在前期工作基础上^[1,2], 通过神经元原代培养并建立 H₂O₂ 损伤模型, 从细胞、分子水平观察何首乌苷对神经元氧化损伤及 BDNF/TrkB 信号通路的影响, 探讨何首乌苷对神经元氧化

应激损伤的拮抗作用, 为临床开发何首乌苷的药用价值提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 试验药物

何首乌苷 (PMG): 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷, 购自上海源叶生物技术有限公司, 批号: B21757, 规格: 20 mg/支, HPLC 法检测其浓度 $\geq 98\%$ 。将何首乌苷用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解配置成浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。使用时用蒸馏水配至所需浓度。

1.2 动物

实验动物为新生 24 h 内 SD 大鼠乳鼠, 采购于北京大学医学部实验动物中心, 合格证号: SCXK (京) 2016-0010; SYXK (京) 2016-0041。

1.3 试剂

噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT 货号: M2128)、K252a (货号: K1639)、POLY-L-Lysine 0.01% (货号: RNBC5367) 均购自 Sigma 公司; P-TrkB (货号: 4619S)、 β -tubulin III (货号: 5568S)、DAPI (货号: 4083S) 均购自 Cell signaling 公司; BDNF (货号: ab108319) 购自 Abcam 公司; TUNEL (货号: 11684809910) 购自 Roche 公司; DMEM/F-12 (货号: NYK0993)、胎牛血清 (货号: KSJ30472) 均购自 Thermo 公司; Neuralbasal medium (货号: 1297830)、B27 (货号: 1268476) 均购自 Invitrogen 公司; 胰蛋白酶 (货号: 20130506)、青霉素链霉素混合液 (货号: 20130410) 均购自北京索莱宝科技有限公司; Tween-20 (货号: 922C042) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.4 仪器

二氧化碳培养箱 (新加坡 ESCO 公司)、荧光/吸收光酶标仪 (美国 Thermo 公司)、高速冷冻离心机 5417R (德国 Eppendorf 公司)、Odyssey CLx 红外荧光扫描成像系统 (美国 LI-COR 公司)。

1.5 实验方法^[1,11]

1.5.1 神经元原代培养及实验分组

无菌环境下取 SD 大鼠乳鼠的海马体剪碎, 用 0.25% 胰蛋白酶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化 25 min, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 液终止消化并吹打均匀, 用 100

目过滤筛除去未消化组织块,1 100 rpm 离心 5 min,弃上清,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 液重悬成单细胞悬液,调整细胞密度至 1×10^6 个/mL,接种到细胞板上,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后培养基更换为含 B27 的 Neurobasal[®] 培养基,每隔 2 d 半量换液一次,细胞培养 5 ~ 7 天,生长状态良好^[1,11]。实验时将细胞随机分为 7 组:control 组、H₂O₂ 模型组、K252a 组、K252a + H₂O₂ 组、PMG + H₂O₂ 预处理组、PMG + K252a + H₂O₂ 组和 PMG 组。Control 组不加任何药物处理;H₂O₂ 模型组加入终浓度为 200 μmol/L 的 H₂O₂;K252a 组加入终浓度为 200 nM 的 K252a;K252a + H₂O₂ 组加入终浓度为 200 nM 的 K252a 和 200 μmol/L 的 H₂O₂;PMG + H₂O₂ 组预先加入终浓度分别为 100、200、400 μmol/L 的 PMG 预处理 2 h 后再加入终浓度为 200 μmol/L 的 H₂O₂;PMG + K252a + H₂O₂ 组预先加入终浓度分别为 200 μmol/L 的 PMG 和 200 nM 的 K252a 预处理 2 h 后再加入终浓度为 200 μmol/L 的 H₂O₂;PMG 组分别加入终浓度为 100、200、400 μmol/L 的 PMG。各实验组处理后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养,20 ~ 24 h 后用于实验^[1,10]。

1.5.2 MTT 法测定细胞存活率

培养在 96 孔板里的细胞经药物处理 20 ~ 24 h 后,吸出培养基,PBS 轻洗 1 ~ 3 次,每孔加入 100 μL 终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT,培养箱孵育 2 ~ 4 h,吸去培养基,加入 150 μL DMSO,摇床上震荡 10 min,待颗粒溶解后,在波长为 560 nm 处测定吸光度 A 值。细胞存活率(100%) = 待测组 A 值/control 组 A 值 × 100%,设定 control 组细胞存活率为 100%,细胞的存活率与 A 值成正比。

1.5.3 β-Tubulin III 染色、DAPI 染色以及 TUNEL 染色

造模、给药与细胞培养均与前面实验相同。对各实验组分别进行 β-tubulin III、DAPI 及 TUNEL 免疫荧光染色,取出生长在 24 孔板盖玻片上的 SD 大鼠乳鼠海马神经元细胞,PBS 洗涤,4% 多聚甲醛固定 PBS 洗涤;用一抗 β-tubulin III(1:1 000)、二抗以及 DAPI 荧光染色,PBS 洗涤,封片,通过荧光显微镜分别观察各实验组细胞毒性损伤时的细胞骨架、核形态及凋亡分布变化。

1.5.4 Western blot 检测目的蛋白表达量

培养在 6 孔板里的细胞药物处理 20 ~ 24 h 后,用 0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 3 ~ 5 次,每孔加入 100

μL 的细胞裂解液,冰上静置 30 min,12 000 rpm 的高速冷冻离心 15 min,取上清液。用 BCA 法测定蛋白浓度,10% 的 SDS-PAGE 分离蛋白质并转膜(PVDF 膜),5% 的脱脂奶粉封闭 30 min,一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜,用 TBST 洗 3 ~ 5 次,在室温下二抗(1:1 000)孵育 1 h,TBST 洗 3 ~ 5 次,加化学发光液(A 液与 B 液等体积混合)在化学发光成像仪 Tanon4200 下观察蛋白质的表达量并拍照。

1.6 统计学分析方法

应用 Graphpapr prism5.0 软件进行独立性 *t* 检验,实验数据用 $\bar{x} \pm SD$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测 PMG 对 H₂O₂ 诱导神经元氧化应激损伤的保护作用

培养至 7 天,向神经元培养基内加入不同浓度的 H₂O₂(50、100、150、200、250、300、400 μmol/L),细胞继续培养 1 天。MTT 检测的实验数据表明,各浓度 H₂O₂ 损伤组细胞存在不同程度的损伤,且随着 H₂O₂ 浓度的提高,细胞存活率呈浓度依赖性的下降,分别为 74.62%、58.37%、50.63%、46.81%、31.93%、17.48%、9.36%,表明神经元损伤模型的建立。选择 H₂O₂ 浓度为 200 μmol/L 时,细胞存活率为 46.81%,作为后续实验最佳 H₂O₂ 损伤浓度。

为进一步明确 PMG 的最佳保护作用及毒性浓度,实验设置 8 个小组,分别为对照组、H₂O₂ 损伤组(终浓度 200 μmol/L)、PMG 不同浓度组(终浓度分别为 100、200、400 μmol/L)和 PMG 不同浓度预处理组,进行 MTT 检测。实验结果如表 1 所示,与 H₂O₂ 损伤组相比,终浓度分别为 100、200 μmol/L 的 PMG 预处理,神经元存活率大幅度上升(69.80%、93.63% 和 $P < 0.05$, $P < 0.001$),说明一定浓度范围的 PMG 对于 H₂O₂ 诱导的神经元氧化应激损伤具有保护作用。与对照组相比,终浓度分别为 100、200 μmol/L 的 PMG 对神经元存活没有影响,而 PMG 终浓度达到 400 μmol/L 时,细胞的存活率已经下降到 57.82%,说明过高浓度的 PMG 对神经细胞可产生毒性,因此,PMG 在做保护性药物时,应合理控制 PMG 的浓度范围,选择最佳保护浓度。

2.2 TUNEL 染色显示 PMG 对 H₂O₂ 氧化应激诱导神经元凋亡的抑制

培养 7 天的细胞采用 TUNEL 和 DAPI 染色法

表1 不同浓度 PMG 对 H₂O₂ 诱导神经
元毒性损伤细胞存活率的影响($\bar{x} \pm SD, n = 6$)

Table 1 Effect of different concentrations of PMG on H₂O₂-
induced neuronal toxicity in cell viability($\bar{x} \pm SD, n = 6$)

组别 Group	细胞存活率 Cell viability (%)
空白对照 Control	100.00 ± 0.021
H ₂ O ₂ 200 μmol/L	47.92 ± 0.024***
PMG 100 μmol/L	94.11 ± 0.033
PMG 200 μmol/L	98.96 ± 0.058
PMG 400 μmol/L	67.82 ± 0.040**
PMG 100 μmol/L + H ₂ O ₂ 200 μmol/L	69.80 ± 0.013 [#]
PMG 200 μmol/L + H ₂ O ₂ 200 μmol/L	93.63 ± 0.024 ^{###}
PMG 400 μmol/L + H ₂ O ₂ 200 μmol/L	36.08 ± 0.017

注: * 与 Control 组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; [#] 与 H₂O₂ 损伤组比较, [#] $P < 0.05$; ^{###} $P < 0.01$; ^{####} $P < 0.001$ 。

Note: * Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; [#] Compare with H₂O₂ injury group, [#] $P < 0.05$; ^{###} $P < 0.01$; ^{####} $P < 0.001$.

观察细胞凋亡率的变化。结果如图 1、2 显示, DAPI 染色正常细胞核呈圆形或椭圆形、浅蓝色; TUNEL 染色凋亡细胞核呈强荧光绿色, 为大小不均的点状, 细胞核固缩或溶解成碎片。对照组正常培养的大鼠海马神经元的 TUNEL 检测显示无强荧光染色, 绿色的细胞凋亡数极少。H₂O₂ 损伤组神经元表现出典型的凋亡形态特征: 为强荧光绿色, 细胞核固缩或溶解成碎片, 凋亡率显著提高。浓度为 200 μmol/L PMG 预先处理的大鼠海马神经元, 核固缩细胞的数目或核溶解成碎片明显减少, 统计显示 PMG + H₂O₂ 预处理组的细胞凋亡率与 H₂O₂ 损伤组相比下降 24% ($P < 0.01$), 具有统计学意义; 另外, PMG 组显示的 TUNEL 和 DAPI 染色结果排除了 PMG 对细胞具有毒性作用。TUNEL 染色结果显示 PMG 可拮抗 H₂O₂ 诱导的神经元凋亡的形态学变化。

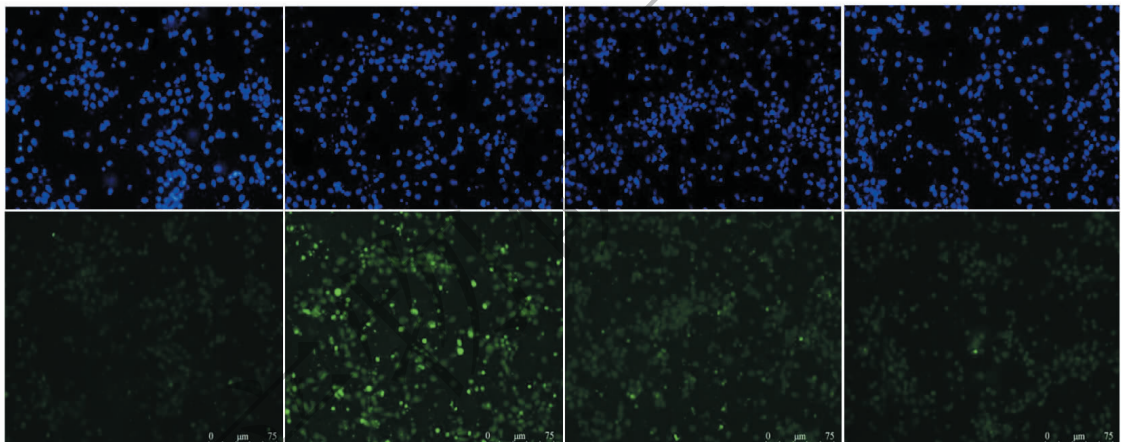


图1 TUNEL 检测显示 PMG 对 H₂O₂ 诱导的神经元凋亡的影响

Fig. 1 Effect of PMG on H₂O₂-induced neuronal apoptosis induced by TUNEL staining

2.3 BDNF/TrkB 信号通路激活参与 PMG 对 H₂O₂ 诱导神经元氧化应激损伤的保护

2.3.1 MTT 法检测 BDNF/TrkB 信号转导通路阻断剂 K252a 对细胞存活率的影响

细胞培养至 7 天, 生长状态良好, 在 PMG 预处理组神经元培养基中预先加入 BDNF/TrkB 信号转导通路阻断剂 K252a 2 h 后, 再按照前文所述的类似步骤进行加药物和 MTT 检测。MTT 检测结果如图 3 所示: 与对照组相比, K252a 组细胞存活率没有明显下降; 与 PMG + H₂O₂ 预处理组相比较, 当加入 K252a 后, PMG + H₂O₂ + K252a 组神经元细胞的存活率大幅度下降 ($P < 0.01$), PMG 失去了原有的保护作用, 说明 PMG 的保护作用与 BDNF/TrkB 信号

转导通路激活密切相关, 推测 PMG 通过上调 BDNF 及其磷酸化受体 TrkB 的表达发挥其保护作用。

2.3.2 β-Tubulin III 染色显示 PMG 和 K252a 对细胞骨架形态的影响

培养 7 天的细胞用 β-tubulin III 进行荧光染色标记, 能反映不同实验组神经细胞骨架形态的变化。β-Tubulin III 阳性染色为绿色网状细胞突起, 较好地显示细胞骨架的形态。我们的实验结果从图 4 中看出, 对照组正常神经元轴、树突细长和密集, 排列有序, 交织成网络; H₂O₂ 损伤组 β-tubulin III 阳性神经元显著减少, 被 β-tubulin III 标记的突起稀少和不同程度的断裂弯曲, 排列紊乱, 不形成网络。而经过 PMG + H₂O₂ 预处理组的神经元骨架形态保持相对

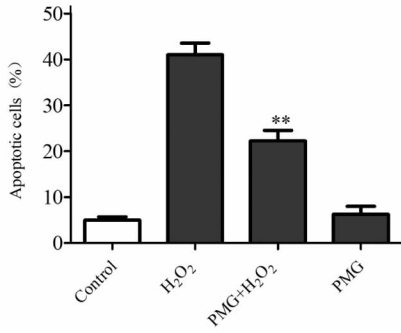


图2 不同处理组量化的凋亡细胞百分率(TUNEL阳性细胞)统计图

Fig. 2 Statistics of percentage of apoptotic cells (TUNEL positive cells) quantified by different treatment groups

注: * 与 Control 组相比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Note: * Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

完整,说明 PMG 可以通过维护神经元内微管蛋白 β -tubulin III 的正常形态及表达来有效抑制 H₂O₂ 诱导的神经元骨架形态损伤。与 PMG + H₂O₂ 预处理组相比,加入 BDNF/TrkB 信号转导通路阻断剂 K252a, PMG + H₂O₂ + K252a 组细胞骨架显示损伤状态, PMG 失去了原有的维护神经元骨架形态完整

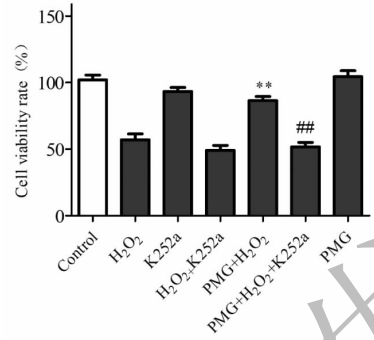


图3 K252a 逆转 PMG 对 H₂O₂ 诱导神经元氧化应激损伤细胞存活率的影响 ($n = 6$)

Fig. 3 Effect of K252a reversal of PMG on H₂O₂-induced neuronal oxidative stress-induced cell viability ($n = 6$)

注: * 与 H₂O₂ 损伤组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;

*** $P < 0.001$; # 与 PMG + H₂O₂ 组相比较, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$.

Note: * Compare with the H₂O₂ injury group, * $P < 0.05$;

** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$;

compare with PMG + H₂O₂ group,

$P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$.

性的作用,说明 PMG 维护神经元骨架的正常形态与 BDNF/TrkB 信号转导通路激活相关。

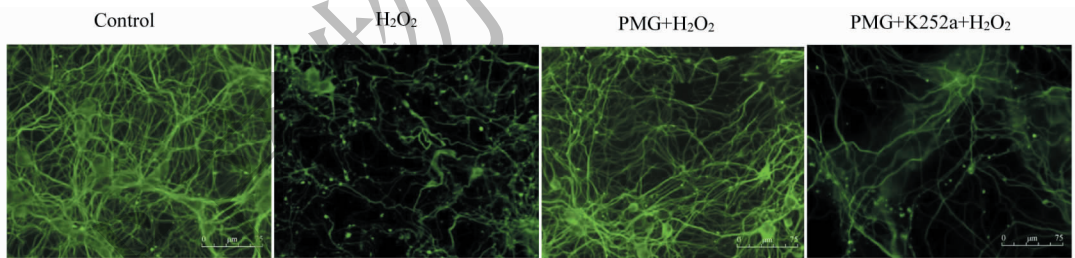


图4 β -tubulin III 染色观察 PMG 和 K252a 对 H₂O₂ 诱导神经元损伤细胞骨架形态的影响 (10×20)

Fig. 4 Effect of PMG and K252a on the cytoskeleton morphology of H₂O₂-induced neuronal injury by β -tubulin III staining (10×20)

注: β -tubulin III 显示为绿色细胞突起。

Note: β -tubulin III shows green cell protrusion.

2.3.3 Western blot 检测 PMG 对 H₂O₂ 诱导神经元氧化应激损伤中 BDNF 和 P-TrkB 蛋白表达量的影响

通过 Western blot 法对不同处理组 BDNF 和其磷酸化 TrkB 蛋白表达量的检测如图 5 显示,与正常对照组相比, H₂O₂ 处理组 BDNF 和 P-TrkB 表达下降;而 PMG + H₂O₂ 预处理组扭转了 H₂O₂ 处理组引起的 BDNF 和 P-TrkB 表达量的下降 ($P < 0.001$);

加入 BDNF/TrkB 信号转导通路阻断剂 K252a 后, PMG + H₂O₂ + K252a 处理组 BDNF 和 P-TrkB 表达下调 ($P < 0.01$)。实验结果表明:加入 K252a 后,通过 MTT 和 Western blot 法检测发现 PMG 原有的保护作用失效, BDNF 和 P-TrkB 表达下降 ($P < 0.01$),由此推测, BDNF/TrkB 信号转导通路介导了 PMG 对 H₂O₂ 诱导的神经元氧化应激损伤的保护作用, BDNF 是该过程中的重要因子, BDNF 可能通过调控

下游信号分子蛋白的表达来实现这一作用的。

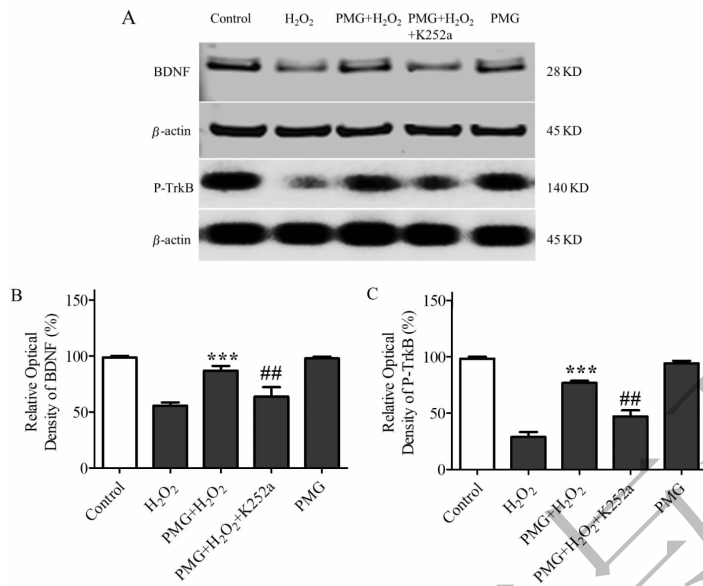


图5 Western blot 法检测 PMG 对 H₂O₂ 诱导神经元损伤中 BDNF 蛋白表达量的影响 (n=5)

Fig. 5 Western blot assay for the effect of PMG on the expression of BDNF protein in H₂O₂-induced neuronal injury (n=5)

注:A 为 Western blot 法检测 BDNF 和 P-TrkB 蛋白表达,B、C 为光密度统计分析结果。* 与 H₂O₂ 损伤组比较,*** P<0.001;
与 PMG + H₂O₂ 组比较,## P<0.01。

Note:A is the Western blot method for the detection of BDNF and P-TrkB protein expression,B and C are the results of optical density statistical analysis. * Compared with the H₂O₂ injury group,*** P<0.001; # Compared with the PMG + H₂O₂ group,## P<0.01.

3 讨论

氧化应激是目前神经损伤研究的一个热点方向,其主要机理是有害刺激引起机体氧化-抗氧化之间的失衡,ROS 大量积累,造成钙稳态的失调、细胞色素 C 的过量释放以及脂类的过氧化,造成神经细胞的死亡^[11,12]。研究表明,阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD)^[13] 等神经退行性疾病都与氧化应激损伤有关。过氧化氢 (H₂O₂) 是氧化应激模型常用的损伤药物,通过氧化应激作用可能诱导多种细胞的凋亡^[14]。

BDNF/TrkB 信号通路与神经发生、发育以及疼痛密切相关,而且参与抑郁症等神经疾病的发生发展,BDNF/TrkB 控制着下游多个信号转导通路的表达^[14,15],在 AD 患者大脑海马和皮质内 BDNF 的 mRNA 水平和蛋白质含量都有降低,提示 BDNF 可能与 AD 的发生发展相关^[14]。正常老化和 AD 患者脑中磷酸化 TrkB 的表达也减少^[16]。BDNF 与高亲和力的 TrkB 结合后可以激活 MEK/ERK/RSK、PI3K/Akt 和 Ca²⁺/CAM/CAMK 信号通路^[17],诱导 CREB 磷酸化,从而激活 BDNF 等神经营养因子的

转录^[18],促进突触可塑性、增加神经元活性及神经发生^[9]。k252a 是一种特异性 TrkB 的抑制剂,能使 TrkB 受体不能磷酸化而发挥作用,阻断了 BDNF/TrkB 信号传导通路^[19]。因此,在研究中常配合相关药物使用该抑制剂,结合实验结果验证药物发挥作用是否是通过影响 BDNF/TrkB 信号转导通路实现。

本研究中,我们在前期研究工作基础上,将原代培养的 1 日龄 SD 大鼠乳鼠海马神经元与 H₂O₂ 培养一段时间后进行 MTT 检测,并采用 TUNEL 法观察细胞凋亡的形态改变。结果表明,与对照组相比,H₂O₂ 可以诱导神经元损伤,而与 H₂O₂ 损伤组相比,PMG 预处理组细胞存活率升高而凋亡细胞数量明显较少,说明了 PMG 对 H₂O₂ 诱导大鼠乳鼠海马神经元氧化应激损伤具有一定的保护作用。为进一步探讨 BDNF/TrkB 信号转导通路对 PMG 保护作用的影响,本实验向细胞培养基中加入 BDNF/TrkB 信号转导通路阻断剂 K252a,并使用 MTT、β-tubulin III 荧光染色和 Western Blot 法等进行相关的检测。实验结果表明,与对照组相比,K252a 组细胞存活率没

有明显下降;与 PMG + H₂O₂ 预处理组相比较,当加入 K252a 后,MTT 检测 PMG + H₂O₂ + K252a 组神经细胞存活率大幅度下降 ($P < 0.01$), β -tubulin III 荧光染色显示细胞骨架形态呈损伤状态,PMG 失去了原有的保护作用;同时,Western blot 检测发现 PMG 预处理组能逆转 H₂O₂ 损伤神经元的 BDNF 和 P-TrkB 表达量下调 ($P < 0.001$),当加入 K252a 后,PMG + H₂O₂ + K252a 处理组 BDNF 和 P-TrkB 表达明显下调 ($P < 0.01$)。实验结果表明,PMG 的保护作用与 BDNF/TrkB 信号转导通路激活密切相关。PMG 可以阻止 H₂O₂ 氧化应激诱导的 BDNF 和磷酸化的受体 TrkB 表达量的下降,BDNF 是该过程中的重要因子。

综上所述,PMG 对 H₂O₂ 诱导的大鼠海马神经元氧化应激损伤具有拮抗作用,其机制可能是通过激活 BDNF/TrkB 通路,上调 BDNF 及其磷酸化的受体 TrkB 表达量,维护神经元骨架的正常形态得以实现,实验结果为临床使用以及进一步开发何首乌苷的药用价值提供了参考。

参考文献

- 1 Yang XP, Liu TY, Qin XY, et al. Potential protection of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside against staurosporine-induced toxicity on cultured rat hippocampus neurons [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 576:79-83.
- 2 Yu Y, Wang BL, Zhang Y, et al. The effect of Polygonum multiflorum thunb. glycoside on learning and memory and expression of ChAT and AChE in the hippocampus of subacute aging model mice [J]. *Sichuan J Zool (四川动物)*, 2017, 36(1):48-53.
- 3 Chen BB, Jiang AL, Zhang Y. Research progress on pharmacological activities of stilbene glucoside, active component from *Polygonum multiflorum* Thunb. [J]. *Chin J Clin Pharm Therap (中国临床药理学与治疗学)*, 2016, 21:710-715.
- 4 Zhang L, Li L, Li YL. Mechanism of the protection of stilbene glycoside which is the effective component of tuber fleeceflower root on nerve cells [J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res (中国组织工程研究)*, 2004, 8:118-120.
- 5 Li YH. Recent advances in anti-aging study of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucopyranoside-a main component of *Polygonum multiflorum* [J]. *Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2016, 41:182-185.
- 6 Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain [J]. *EMBO J*, 1982; 1:

- 549-553.
- 7 Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity [J]. *Neuroscience*, 2003; 122:647-657.
- 8 Lin WH, Meng HM, Lu YD, et al. The effect of BDNF and its receptor TrkB in experimental epileptic rats [J]. *Chin J Neuroimmunol Neurol (中国神经免疫学和神经病学杂志)*, 2007, 14(1):11-13.
- 9 Pang Y, Yang JH, Liu QF, et al. Effects of exposure to lanthanum during perinatal period on CREB phosphorylation and BDNF expression in hippocampus of rats [J]. *Chin J Publ Heal (中国公共卫生)*, 2014, 30:204-206.
- 10 Guo HJ, Liang H, Xiang Z, et al. Protective effects of a chalcone derivative G01 on H₂O₂-induced oxidative damage in cortical neurons of mice [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2015, 27:2138-2141.
- 11 Guo Z, Pan RY, Qin XY. Potential protection of *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract against oxidative stress in rat cortical neurons [J]. *J Anal Methods Chem*, 2013, 5:326570.
- 12 Li Z. Effects of lycium barbarum polysaccharides on Oxidative stress-induced Retinal ganglion cells apoptosis [D] Yinchuan: Ningxia Medical University (宁夏医科大学), 2015.
- 13 Pastorin G, Marchesan S, Hoebeke J, et al. Design and activity of cationic fullerene derivatives as inhibitors of acetylcholinesterase [J]. *Org Biomol Chem*, 2006, 4:2556-2562.
- 14 Song JH, Yu JT, Tan L. Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease: risk, mechanisms, and therapy [J]. *Mol Neurobiol*, 2015; 52:1477-1493.
- 15 Zhou XJ, Hu Y, Liu P. Research progress on brain-derived neurotrophic factor and depression [J]. *Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展)*, 2011, 38:1085-1090.
- 16 Zhao Y, Xu MH, Dong WX. Advance of drug therapy for Alzheimer's disease [J]. *World Clin Drug (世界临床药物)*, 2011; 32(10):45-47.
- 17 Chen MH, Ha EH, Liao HF, et al. Perfluorinated compound levels in cord blood and neurodevelopment at 2 years of age. [J]. *Epidemiology*, 2013, 24:800-808.
- 18 Johansson N, Fredriksson A, Eriksson P. Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice [J]. *Neurotoxicology*, 2008, 29:160-169.
- 19 Lecht S, Arien-Zakay H, Kohan M, et al. Angiostatic effects of K252a, a Trk inhibitor, in murine brain capillary endothelial cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 339:201-213.