

β -烟酰胺单核苷酸对氧糖剥夺 PC12 细胞自噬的影响

田梦芝¹, 龙佳欣¹, 陈笑一¹,
陈惠媚^{1,2}, 金泽龙¹, 李思特¹, 谢明霞¹, 杜可^{1*}

¹湖南中医药大学; ²中医药防治眼耳鼻咽喉疾病湖南省重点实验室, 长沙 410208

摘要:为了探讨 β -烟酰胺单核苷酸 (β -nicotinamide mononucleotide, NMN) 对氧糖剥夺 (oxygen glucose deprivation, OGD) 诱导的 PC12 细胞自噬的影响及其可能机制。通过体外建立 OGD PC12 细胞自噬损伤模型, MTT 法检测各组细胞存活率。透射电镜观察 NMN 处理后的自噬小体及溶酶体, MDC 荧光染色观测 NMN 对自噬小体的影响。Western blot 检测 LC3-II/LC3-I、Beclin1、p62、P-mTOR/mTOR 等自噬相关蛋白表达水平。结果显示, 与 Con 比, OGD 组细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$), 自噬小体及自噬溶酶体增多 ($P < 0.01$), MDC 荧光斑点及强度增强 ($P < 0.01$), Beclin1、LC3-II/LC3-I 表达量显著上调 ($P < 0.01$), p62、P-mTOR/mTOR 表达量显著下调 ($P < 0.01$)。与 OGD 组比, NMN 组细胞存活率显著提高 ($P < 0.01$), NMN 组和 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 组自噬小体及自噬溶酶体减少 ($P < 0.01$), MDC 荧光斑点及强度减弱 ($P < 0.01$), Beclin1、LC3-II/LC3-I 表达量下调 ($P < 0.01$), p62、P-mTOR/mTOR 表达量上调 ($P < 0.01$), 而雷帕霉素 (rapamycin, RAPA) 组则与之相反。与 RAPA 组相比, RAPA + NMN 组自噬小体及自噬溶酶体显著减少 ($P < 0.01$), MDC 荧光斑点及强度减弱 ($P < 0.01$), Beclin1、LC3-II/LC3-I 表达量显著下调 ($P < 0.01$), p62、P-mTOR/mTOR 表达量显著上调 ($P < 0.01$)。因此, NMN 可抑制 OGD 诱导的 PC12 细胞自噬损伤, 发挥抗神经元自噬损伤的保护作用, 并且这种保护作用可能与 mTOR 相关通路有关。本研究可为 NMN 防治 OGD 诱导的细胞自噬损伤提供一定的靶标参考, 为天然化合物的开发累积一定实验室数据。

关键词: β -烟酰胺单核苷酸; 氧糖剥夺; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 自噬损伤

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)2-0260-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.2.009

Effect of β -nicotinamide mononucleotide on autophagy in oxyglucose-deprived PC12 cells

TIAN Meng-zhi¹, LONG Jia-xin¹, CHEN Xiao-yi¹,
CHEN Hui-mei^{1,2}, JIN Ze-long¹, LI Si-te¹, XIE Ming-xia¹, DU Ke^{1*}

¹Hunan University of Traditional Chinese Medicine; ²Hunan Provincial Key Laboratory for the Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: This study aims to explore the impact of β -nicotinamide mononucleotide (NMN) on oxygen glucose deprivation (OGD)-induced autophagy in PC12 cells and its potential mechanisms. An in vitro model of OGD-induced autophagic injury in PC12 cells was established, and cell viability in each group was measured using the MTT assay. The autophagosomes and autolysosomes after NMN treatment were observed by transmission electron microscopy, and the effect of NMN on autophagosomes was observed by MDC fluorescence staining. Western blot analysis was conducted to evaluate the expression levels of autophagy-related proteins, including LC3-II/LC3-I, Beclin1, p62, P-mTOR/mTOR, and others. The results showed that compared with control group, the survival rate of OGD group was significantly decreased ($P < 0.01$), the number of autophagosomes and autolysosomes increased ($P < 0.01$), and the fluorescence spots and intensity of MDC were enhanced ($P <$

收稿日期: 2023-08-31 接受日期: 2023-11-16

基金项目: 国家重点实验室开放基金 (GTZK201711); 研究生创新创业训练计划 (CX20220794), 大学生创新创业训练计划 (S202210541074); 2022 年度湖南省普通高等学校教学改革研究项目 (HNJG-2022-0134)

* 通信作者 Tel: 86-013974820001; E-mail: DKKTZTG@163.com

0.01). The expressions of Beclin1 and LC3-II/LC3-I were significantly up-regulated ($P < 0.01$), while the expressions of p62 and P-mTOR /mTOR were significantly down-regulated ($P < 0.01$). Compared to the OGD group, the survival rate of NMN group was significantly increased ($P < 0.01$), the autophagosome and autolysosomes were decreased in the NMN and 3-methyladenine(3-MA) group ($P < 0.01$), and the fluorescence spots and intensity of MDC were decreased ($P < 0.01$). The expressions of Beclin1 and LC3-II/LC3-I were down-regulated ($P < 0.01$), and the expressions of p62 and P-mTOR /mTOR were up-regulated ($P < 0.01$), but the opposite was true in RAPA group. Compared with rapamycin(RAPA) group, the autophagosomes and autolysosomes in RAPA + NMN group were significantly decreased ($P < 0.01$), the fluorescence spots and intensity of MDC were decreased ($P < 0.01$), and the expressions of Beclin1 and LC3-II/LC3-I were significantly down-regulated ($P < 0.01$). The expressions of p62 and P-mTOR /mTOR were significantly up-regulated ($P < 0.01$). Therefore, NMN can inhibit OGD-induced autophagy injury in PC12 cells and play a protective role against neuronal autophagy injury, and this protective effect may be related to mTOR pathways. This study can provide a certain target reference for NMN prevention and treatment of OGD-induced autophagy injury, and accumulate some laboratory data for the development of natural compounds.

Key words: β -nicotinamide mononucleotide; oxygen glucose deprivation; mammalian target of rapamycin; autophagic injury

缺血性脑血管疾病包括短暂性脑缺血和脑梗死两型。其中脑梗死在中医诊断学中命名为缺血性脑卒中(ischemia stroke, IS),是由于各种原因所致的局部脑组织区域血液供应障碍,导致脑组织缺血缺氧性病变坏死,进而产生一系列神经功能障碍的疾病。其致死率、致残率高且病理机制复杂,每年给全球造成极大的经济负担^[1]。脑细胞氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)是最常用的 IS 体外模型,广泛用于基础和临床前脑卒中的研究^[2]。

细胞自噬(autophagy)广泛存在于真核细胞内,在调节细胞生存和死亡的过程中起着重要的作用^[3,4]。大量研究提示自噬与 IS 的发生、发展密切相关,有研究表明^[5]神经元自噬能减轻缺血性脑损伤,也有研究报道^[6]神经元自噬能加重缺血性脑损伤,但具体机制尚不明确。

β -烟酰胺单核苷酸(β -nicotinamide mononucleotide, NMN)存在于多种食物中,对调节细胞衰老和维持机体正常功能至关重要,参与许多重要的细胞内信号通路的转导。有研究报道,体外给予 NMN 能迅速转化成 NAD^+ 而调节细胞衰老和维持机体正常功能^[7]。NMN 可以补偿 IS 导致 NAD^+ 的减少而改善缺血性神经元的损伤^[8]。这提示 NMN 在 IS 中发挥着一定的作用。有研究表明^[9], NMN 能够促进神经血管再生、改善脑微血管内皮功能、抗炎、抗凋亡。也有少量研究提示^[10],其可通过调控自噬来发挥抗缺血性脑损伤的作用,然而 NMN 调控自噬抗 IS 的具体机制尚不明确。

本研究旨在构建氧糖剥夺 PC12 细胞模型,通过体外实验 MTT 测细胞存活率,透射电镜检测自噬

小体、自噬溶酶体, MDC 观测自噬小体荧光强度, Western blot 检测 LC3-II/LC3-I、Beclin1、p62、P-mTOR/mTOR 自噬相关蛋白表达情况,以期明确 NMN 对 OGD 诱导的 PC12 细胞自噬损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12 细胞株(商品号:TCR9),购自中国科学院上海细胞库,本实验室传代培养。

1.1.2 药品与试剂

β -烟酰胺单核苷酸(货号:S31451-100 mg,上海源叶);3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)(批号:265839, MCE);雷帕霉素(Rapamycin, RAPA)(批号:HY-10219, MCE);胎牛血清(批号:2307029, VivaCell);1%青链霉素混合液(批号:42A0378K, 普诺赛);DMEM 高糖基础培养基(批号:WHB823P261, 普诺赛);DMEM 无糖基础培养基(批号:WH1022K081, 普诺赛);BCA 试剂盒(批号:23135865, Biosharp);蛋白酶抑制剂 PMSF(批号:21355980, Biosharp);Beclin1(批号:10024164, Proteintech group);LC3(批号:00115896, Proteintech group);mTOR(批号:10018370, Proteintech group);P-mTOR(批号:10020406, Proteintech group); β -actin(批号:21004031, Proteintech group);羊抗鼠二抗(批号:D20802-25, LI-COR);羊抗兔二抗(批号:D21207-05, LI-COR);二甲基亚砜(批号:22102134, Solarbio);细胞自噬检测试剂盒(MDC法)(批号:20221217, Solarbio);2.5% Gluta 固定液(批号:

20230208, Solarbio)。

1.1.3 主要仪器

超净工作台 (SJ-CJ-2FD, 苏州苏洁净化设备有限公司); 倒置显微镜 (AE2000, 麦克奥迪实业集团有限公司); 三气培养箱 (150i, 美国 Thermo Fisher 公司); 酶标仪 (ELX800, 美国 Bio-Tek 公司); 多功能微孔板检测系统 (Cytation™ 5, 美国 Bio Tek 公司); 红外荧光扫描成像系统 (Odyssey CLX, 美国 LI-COR 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 PC12 细胞接种于含有 10% 的胎牛血清、1% 青链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 及湿度饱和的培养箱中培养, 适时换液, 经 1~2 次传代后, 收集对数期细胞备用。

1.2.2 OGD 诱导 PC12 细胞自噬损伤模型制备

从培养箱中取出 PC12 细胞, 弃掉培养液, 用 PBS 清洗 2 遍, 加入适量的 DMEM 无糖基础培养基 (缺糖), 置于 94% N₂、5% CO₂、1% O₂ 条件下缺氧 6 h (缺氧)。

1.2.3 MTT 法测各组 PC12 细胞存活率

收集对数增长长期细胞, 以 6×10^3 个/孔接种于 96 孔板。设置正常对照组 (Con)、OGD 组、NMN (200、400、800、1 600、3 200 μmol/L) 组, 共计 7 组, 每组 5 个复孔, 每孔 100 μL。37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱下培养 24 h。OGD 组在上述条件下培养 24 h 后, 换 DMEM 无糖培养基, 再在 94% N₂、5% CO₂、1% O₂ 条件下培养 6 h 进行氧糖剥夺处理。NMN 各浓度组药物干预 24 h, 换 DMEM 无糖培养基, 再在 94% N₂、5% CO₂、1% O₂ 条件下培养 6 h 进行氧糖剥夺处理。采用 MTT 法测细胞存活率, 每孔加 50 μg/mL、100 μL MTT, 37 °C 孵育 4 h 后于 490 nm 波长处测定各组吸光度 (A) 值, 按如下公式计算各组细胞存活率 (R)。

$$R = [(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{正常对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$$

1.2.4 透射电镜观察 PC12 细胞自噬小体及自噬溶酶体

细胞以 1.5×10^6 个/mL 的密度接种于 6 cm 培养皿中, 设置 Con 组、OGD 组、NMN 组、3-MA 组、3-MA + NMN 组、RAPA 组、RAPA + NMN 组。37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱下培养 24 h。NMN (800 μmol/L) 进行干预, 3-MA (5 mmol/L)、RAPA (100

nmol/L) 分别在加 NMN 前 30 min 加入。各组干预 24 h 后, 除正常组外, 其余组换 DMEM 无糖培养基在 94% N₂、5% CO₂、1% O₂ 条件下培养 6 h, 使细胞处于氧糖剥夺状态。弃除旧培养基, 用含 EDTA 的胰酶消化细胞, 收集到 1.5 mL EP 管中, 在台式冷冻离心机 4 °C 下 1 500 r/min 离心 10 min 后弃去上清, 用 2.5% Gluta 固定液固定细胞团, 4 °C 冰箱保存过夜, 1% 饿酸后固定 2 h, 依次以 50%、70%、90%、100% 的丙酮脱水, 包埋、染色后, 用透射电子显微镜观察细胞内体数目和形态, 并进行拍照, 肉眼计数。

1.2.5 MDC 荧光法观测 PC12 细胞自噬小体

细胞以 1×10^6 个/mL 密度接种于 6 孔板, 同“1.2.4”一样操作处理后, 弃旧培养基, PBS 清洗 2 次, 加入 60 μL MDC 荧光染色液, 37 °C 孵育 15 min; 去除染色液, 用 PBS 清洗 3 次后在 Cytation™ 5 细胞成像多功能检测仪 CFP 20 倍镜下观察各组自噬小体的荧光斑点, 并拍照记录, 用 Image J 分析并计算荧光强度。

1.2.6 Western blot 检测 LC3-II/LC3-I、Beclin1、p62、mTOR、P-mTOR 的表达情况

收集对数增长长期细胞, 以 2.5×10^6 个/mL 密度接种于 10 cm 培养皿中。按“1.2.4”分组培养处理后, 弃除旧培养基, 预冷 PBS 清洗 2 次, 含有 1% PMSF 的 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min, 4 °C 下 12 000 r/min 冷冻离心 10 min 后取上清。定量、电泳后将蛋白转至 PVDF 膜上, 2.5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 4 °C 孵育一抗过夜, 次日室温孵二抗 1.5 h。Odyssey CLX 双色红外荧光扫描成像系统检测 LC3-II/LC3-I、Beclin1、p62、mTOR、P-mTOR 的蛋白表达情况, β-actin 为内参, 计算相对灰度值及 P-mTOR/mTOR 比值。

1.2.7 统计学处理

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学数据处理及分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 结果均以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞存活率情况

如图 1 所示, 与 Con 组比, OGD 组细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$)。与 OGD 组比, NMN 400、800、1 600 μmol/L 浓度组的细胞存活率均显著提高 ($P < 0.01$), NMN 200 μmol/L、3 200 μmol/L 浓度组的细胞存活率无明显差异 ($P > 0.05$)。

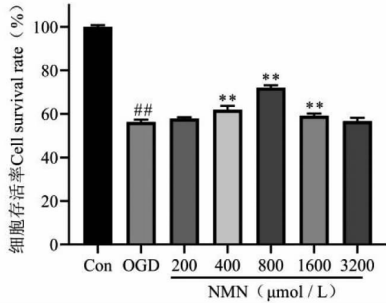


图1 各组细胞存活率情况($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 1 Cell survival rate of each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

注:与 Con 组比, ^{##} $P < 0.01$; 与 OGD 组比, ^{**} $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, ^{##} $P < 0.01$; Compared with OGD group, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.2 透射电镜观察各组细胞自噬小体及自噬溶酶体情况

如图2所示, Con 组细胞形态正常, 胞质均匀, 有少量自噬溶酶体。与 Con 组比, OGD 组胞质间隙变大, 自噬空泡、自噬小体及自噬溶酶体增多, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与 OGD 组相比, NMN 组及 3-MA 组自噬空泡、自噬小体及自噬溶酶体均减少, 而 RAPA 组出现大量空泡及自噬小体和自噬溶酶体, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与 3-MA 组相比, 3-MA + NMN 组自噬空泡、自噬小体及自噬溶酶体减少, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 RAPA 组相比, RAPA + NMN 组自噬空泡、自噬小体及自噬溶酶体均减少, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

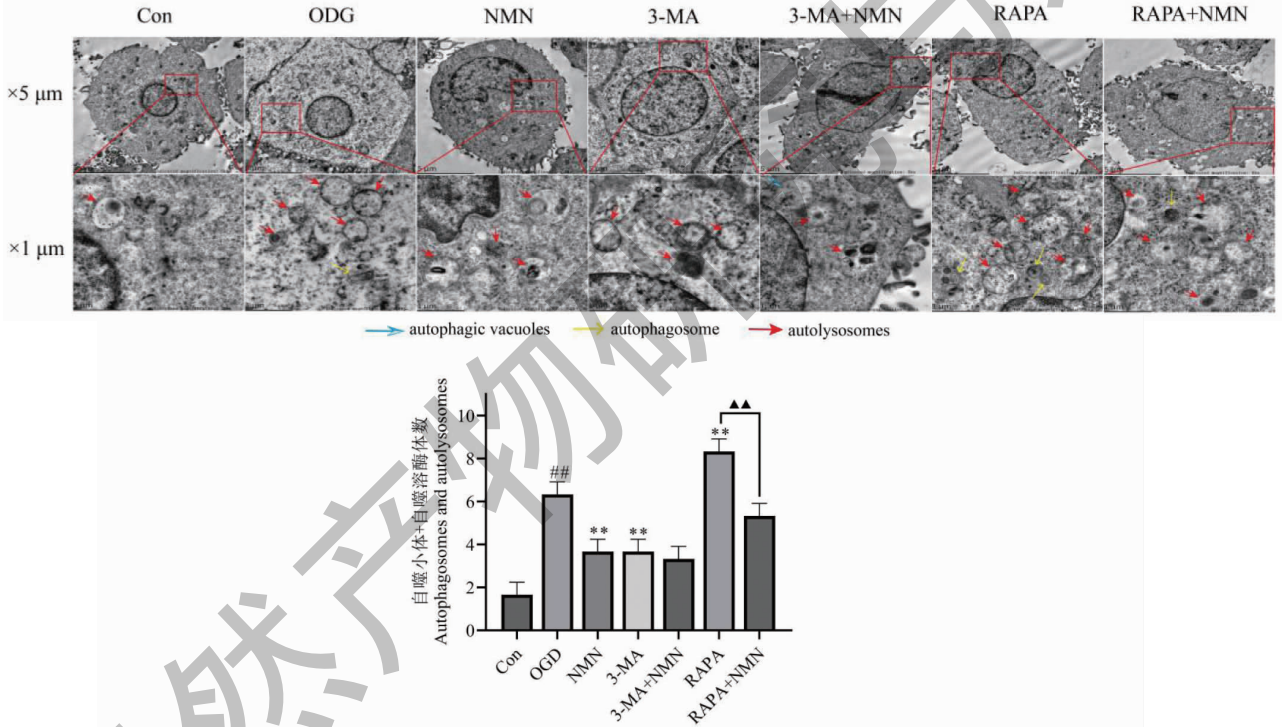


图2 透射电镜观察各组 PC12 细胞自噬小体及自噬溶酶体($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Autophagosomes and autolysosomes in PC12 cells observed by transmission electron microscopy($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与 Con 组比, ^{##} $P < 0.01$; 与 OGD 组比, ^{**} $P < 0.01$; 与 RAPA 组比, ^{▲▲} $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, ^{##} $P < 0.01$; Compared with OGD group, ^{**} $P < 0.01$; Compared with RAPA group, ^{▲▲} $P < 0.01$ 。

2.3 MDC 荧光染色观测各组 PC12 细胞自噬小体的情况

如图3和表1所示, Con 组可见仅有少量荧光斑点, 荧光强度较弱。与 Con 相比, OGD 组荧光斑点增多, 且荧光强度增强($P < 0.01$)。与 OGD 组相比, NMN 组、3-MA 组荧光斑点显著减少, 荧光强度

减弱($P < 0.01$); 而 RAPA 组荧光斑点显著增多, 荧光强度增强($P < 0.01$)。与 3-MA 组相比, 3-MA + NMN 组荧光斑点减少, 荧光强度减弱, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与 RAPA 组相比, RAPA + NMN 组荧光斑点显著减少, 荧光强度减弱, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

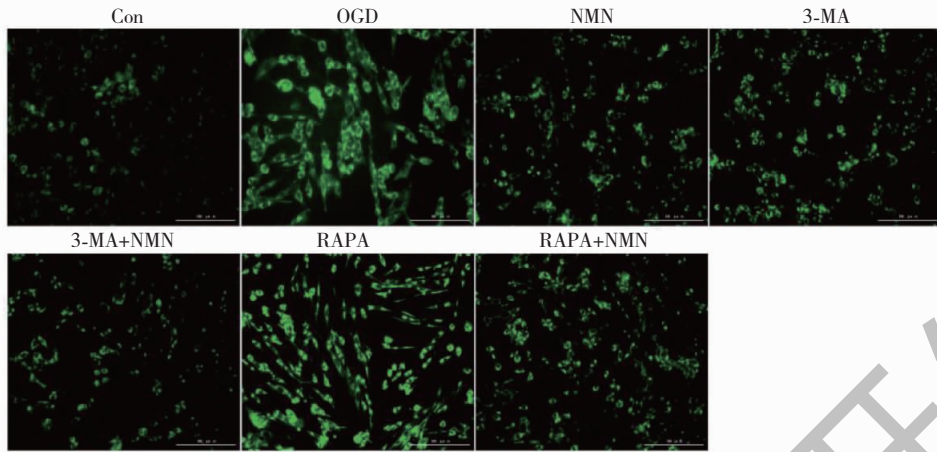


图3 MDC 荧光染色观测各组 PC12 细胞自噬小体的情况(×20)

Fig. 3 MDC fluorescence staining was used to observe the autophagic bodies of PC12 cells(×20)

表1 MDC 荧光染色观测各组 PC12 细胞自噬小体的情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 MDC fluorescence staining was used to observe the autophagic bodies of PC12 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Group	相对荧光强度 Relative fluorescence intensity(%)
Con	100.00 ± 0.60
OGD	233.00 ± 2.98 ^{##}
NMN	156.34 ± 1.16 ^{**}
3-MA	174.70 ± 3.32 ^{**}
3-MA + NMN	146.93 ± 10.14 [■]
RAPA	286.99 ± 12.91 ^{**}
RAPA + NMN	169.29 ± 2.65 [▲]

注:与 Con 组比,^{##} $P < 0.01$;与 OGD 组比,^{**} $P < 0.01$;与 3-MA 组比,[■] $P < 0.01$;与 RAPA 组比,[▲] $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control,^{##} $P < 0.01$;Compared with OGD group,^{**} $P < 0.01$;Compared with 3-MA group,[■] $P < 0.01$;Compared with RAPA group,[▲] $P < 0.01$ 。

2.4 各组细胞自噬相关蛋白表达情况

如图4所示,与 Con 相比,OGD 组细胞中 LC3-II/LC3-I、Beclin1 蛋白表达显著上调($P < 0.01$),P-mTOR/mTOR、p62 蛋白表达显著下调($P < 0.01$);与 OGD 组相比,NMN 组和 3-MA 组细胞中 LC3-II/LC3-I、Beclin1 蛋白表达显著下调($P < 0.01$),P-mTOR/mTOR、p62 显著上调($P < 0.01$),而 RAPA 组则刚好相反;与 RAPA 组相比,RAPA + NMN 组细胞中的 LC3-II/LC3-I、Beclin1 蛋白表达显著下调($P < 0.01$),P-mTOR/mTOR、p62 显著上调($P < 0.01$)。

3 讨论与结论

2017 年柳叶刀研究显示^[11],脑卒中是造成我国生命损失年数的主要疾病,其病情进展快、致死率和致残率高。其中 IS 占整个脑卒中的 60% ~ 70%

,IS 是由于血管阻塞导致大脑某一区域的血液供应减少而引起的^[12]。脑组织缺血缺氧后,会引发细胞自噬、细胞凋亡、氧化应激、细胞内钙超载等一系列病理生理反应^[13]。IS 幸存者康复周期长,加大了全球经济负担^[1]。目前,市场上用于防治 IS 的药物存在诸多禁忌。故不断探索防治 IS 的药物是非常有必要的。OGD 是体外研究 IS 的经典模型^[2]。PC12 细胞系是研究神经元损伤最常用的细胞系之一,常用于缺血缺氧损伤的研究^[14]。故本实验采用 OGD PC12 细胞模型展开体外研究。

NMN 是人体内天然存在的物质,也存在于很多食物之中,分子量为 334.22。为烟酰胺磷酸核糖转移酶反应的产物,也是 NAD⁺ 的关键前体之一^[7]。有研究发现^[15],通过调节生物体内 NMN 的水平,对心脑血管疾病、神经退行性疾病及老化退行性疾病

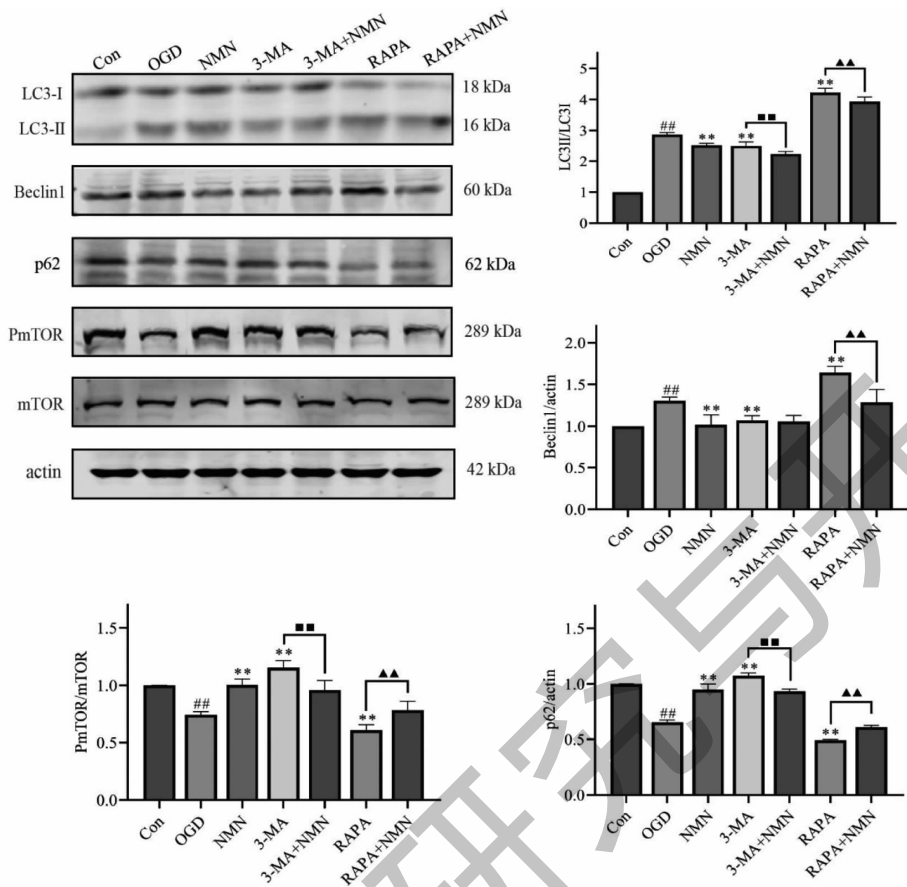


图4 各组细胞自噬相关蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Expression of autophagy-related proteins in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与 Con 组比,### $P < 0.01$;与 OGD 组比,* $P < 0.01$;与 3-MA 组比,■ $P < 0.01$;与 RAPA 组比,▲ $P < 0.01$ 。Note:Compared with control,### $P < 0.01$;Compared with OGD group,* $P < 0.01$;Compared with 3-MA group,■ $P < 0.01$;Compared with RAPA group,▲ $P < 0.01$ 。

等有较好的治疗和修复作用。也有研究报道^[16],给予 NMN 可减少大鼠 MCAO 模型的梗死面积和神经功能损伤。在本实验中,通过 MTT 证明了 OGD 能使 PC12 细胞存活率降低,NMN 在 400、800、1 600 $\mu\text{mol/L}$ 浓度可提高 OGD PC12 细胞存活率,其中 800 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时存活率最高;而在 NMN 200、3 200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时的细胞存活率无明显差异,这说明 200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度还未能达到提高 OGD 诱导的 PC12 细胞存活率的有效浓度,而 3 200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度则可能是浓度过高而对细胞本身产生了一定的损害。

细胞自噬被称为 II 型细胞程序性死亡,是指细胞在自噬相关基因的调控下,利用溶酶体降解自身受损、变性或衰老的大分子物质以及细胞器以维持其生存、分化、生长及稳定的过程^[3]。研究表明^[17],IS 后会诱发自噬,同时自噬也伴随着 IS 病理过程的

发生发展,在 IS 的急性期、亚急性期、恢复期和后遗症期四个分期中扮演不同的调控作用^[18]。

mTOR 是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,相对分子质量为 289 kDa。其不同蛋白质结合,可形成 2 种不同复合物,即 mTORC1 和 mTORC2。mTORC1 对雷帕霉素敏感,负责整合生长因子和营养信号,主要调控细胞自噬、核糖体生物发生、蛋白翻译和脂质合成等^[19]。mTOR 被认为是自噬的阀门。研究表明,磷酸化 mTOR 可以减轻氧糖剥夺损伤,发挥保护细胞的作用^[20]。3-MA 是一种常用的自噬抑制剂^[21]。RAPA 是 mTOR 抑制剂,可通过抑制 mTORC1 诱导自噬的发生,也被叫作自噬激活剂^[22]。本实验设置 3-MA、RAPA 组,用于干预调控 OGD 诱导的 PC12 细胞自噬;同时也设置了 3-MA、RAPA 与药物联用组来观察 NMN 是否能对抗 3-MA 或 RAPA 对 OGD 诱导的 PC12 细胞自噬的影响。

Beclin-1、LC3 和 p62 蛋白水平可作为自噬作用的重要检测指标。Beclin1 是一个成熟的自噬调节因子,与自噬呈正相关。Beclin1 与 VPS15、VPS34、ATG14 等蛋白相互作用来执行自噬和膜运输功能^[23]。LC3 是酵母中的泛素样修饰剂 ATG8 的同源物,被认为在自噬过程中起作用。LC3 经过 ATG4 处理后失去 C 末端残基转变成 LC3-I。LC3-I 经历泛素化样酶促反应级联,共价连接至自噬体膜的脂质分子磷脂酰乙醇胺,转变成 LC3-II^[24],LC3-II/LC3-I 比值升高则说明自噬水平升高^[25]。p62 是反映自噬活性的标记蛋白,其蛋白的水平与自噬呈负相关,即出现自噬时,在细胞质中 p62 蛋白不断被降解;当自噬活性减弱、自噬功能缺陷时,p62 蛋白会在细胞质中不断累积^[26]。本实验通过 Western blot 技术证实了 NMN 能够下调 Beclin1、LC3-II/LC3-I 蛋白相对表达量,上调 P-mTOR/mTOR、p62 蛋白表达量。此外还运用透射电镜技术和 MDC 法证实了 NMN 可减少 OGD PC12 细胞的自噬小体、自噬溶酶体数量及荧光斑点和强度。以上说明 NMN 能够抑制 OGD 诱导的 PC12 细胞自噬。

综上,提示一定剂量的 NMN 可抗 OGD 诱导的 PC12 细胞自噬损伤,从而发挥细胞保护作用,并且这种保护作用可能和 mTOR 相关通路有关。本研究可为 NMN 防治 OGD 诱导的细胞自噬损伤提供一定的靶标参考,为天然化合物 NMN 的开发积累一定实验室数据。

参考文献

- 1 Herpich F, Rincon F. Management of acute ischemic stroke [J]. *Crit Care Med*, 2020, 48:1654-1663.
- 2 Babu M, Singh N, Datta A. *In vitro* oxygen glucose deprivation model of ischemic stroke: a proteomics-driven systems biological perspective [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59: 2363-2377.
- 3 Huang YG, Tao W, Wang JF, et al. Progress of researches on acupuncture treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating autophagy in the ischemic cerebral tissue [J]. *Acupunct Res* (针刺研究), 2019, 44:459-64.
- 4 Yang JB, Meng WL, Hu DD, et al. Research progress of natural products improving atherosclerosis by regulating autophagy [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 35:1991-2002.
- 5 Deng YH, Dong LL, Zhang YJ, et al. Enriched environment boosts the post-stroke recovery of neurological function by promoting autophagy [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16: 813-819.
- 6 Li XB, Hou FF. Triptolide inhibiting autophagy and improving neurological function in rats suffered from ischemic stroke through the mTOR / ULK 1 pathway [J]. *China Pharm* (中国药师), 2022, 25:1-5.
- 7 Wang X, Hu X, Yang Y, et al. Nicotinamide mononucleotide protects against β -amyloid oligomer-induced cognitive impairment and neuronal death [J]. *Brain Res*, 2016, 1643:1-9.
- 8 Hong W, Mo F, Zhang Z, et al. Nicotinamide mononucleotide: a promising molecule for therapy of diverse diseases by targeting NAD⁺ metabolism [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:246.
- 9 Kiss T, Nyúl-Tóth Á, Balasubramanian P, et al. Nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation promotes neurovascular rejuvenation in aged mice: transcriptional footprint of SIRT1 activation, mitochondrial protection, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects [J]. *Geroscience*, 2020, 42: 527-546.
- 10 Wang P, Guan YF, Du H, et al. Induction of autophagy contributes to the neuroprotection of nicotinamide phosphoribosyltransferase in cerebral ischemia [J]. *Autophagy*, 2012, 8: 77-87.
- 11 GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016 [J]. *Lancet*, 2017, 390:1151-1210.
- 12 Li Z, Jiang Y, Li H, et al. China's response to the rising stroke burden [J]. *BMJ*, 2019, 364:l879.
- 13 Paul S, Candelario-Jalil E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: an overview of clinical and preclinical studies [J]. *Exp Neurol*, 2021, 335: 113518.
- 14 Wiatrak B, Kubis-Kubiak A, Piwowar A, et al. PC12 cell line: cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions [J]. *Cells*, 2020, 9:958.
- 15 Liu D, Gharavi R, Pitta M, et al. Nicotinamide prevents NAD⁺ depletion and protects neurons against excitotoxicity and cerebral ischemia: NAD⁺ consumption by SIRT1 may endanger energetically compromised neurons [J]. *Neuromolecular Med*, 2009, 11:28-42.
- 16 Zhao Y, Guan YF, Zhou XM, et al. Regenerative neurogenesis after ischemic stroke promoted by nicotinamide phosphoribo-

- syltransferase-nicotinamide adenine dinucleotide cascade [J]. *Stroke*, 2015, 46:1966-1974.
- 17 Ginet V, Spiehlmann A, Rummel C, et al. Involvement of autophagy in hypoxic-excitotoxic neuronal death [J]. *Autophagy*, 2014, 10:846-60.
 - 18 Zhou P, Xu WJ, Zang R, et al. Study on the mechanism of autophagy regulation in neural repair in rats with subacute ischemic stroke [J]. *China Med Herald (中国医药导报)*, 2022, 19:20-24.
 - 19 Deleyto-Seldas N, Efeyan A. The mTOR-autophagy axis and the control of metabolism [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:655731.
 - 20 Melanis K, Stefanou MI, Themistoklis KM, et al. mTOR pathway-a potential therapeutic target in stroke [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2023, 16:17562864231187770.
 - 21 Li N, Gao H. Recent advances in polymer-based autophagy inhibitors [J]. *Ion Exch Adsorpt (离子交换与吸附)*, 2022, 38:365-376.
 - 22 Gong J, He X, Sha S, et al. Effects of rapamycin mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway on hepatocellular carcinoma cells [J]. *Chin J Anat (解剖学杂志)*, 2021, 44:307-311.
 - 23 Tran S, Fairlie WD, Lee EF. Beclin1: protein structure, function and regulation [J]. *Cells*, 2021, 10:1522.
 - 24 Fan S, Yue L, Wan W, et al. Inhibition of autophagy by a small molecule through covalent modification of the LC3 protein [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60:26105-26114.
 - 25 Oh SH, Choi YB, Kim JH, et al. Quantification of autophagy flux using LC3 ELISA [J]. *Anal Biochem*, 2017, 530:57-67.
 - 26 Jeong SJ, Zhang X, Rodriguez-Velez A, et al. p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31:458-471.
-
- (上接第 226 页)
- 15 A JY, He J, Sun RB. Metabolomics data processing-ten key issues in principal component analysis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53:929-937.
 - 16 Wu XH, Zou AG, Tang LX, et al. Research progress on natural extract *D*-limonene as a food additive component [J]. *Light Ind Sci Technol (轻工科技)*, 2017, 33:1-2.
 - 17 Li W, Shao YY, Gao JH, et al. Study on the flavor preserving agent of lemon essence and its antioxidant effect on citral [J]. *J Hubei Univ Technol (湖北工业大学学报)*, 2007, 22:68-71.
 - 18 Xia SQ, Deng SY, Fan GR, et al. Research progress on the antibacterial properties and sustained-release formulations of citral [J]. *Food Res Dev (食品研究与开发)*, 2022, 43:200-207.
 - 19 Guo FY, Chen WW, Chen HM, et al. The antibacterial mechanism of linalool against *Escherichia coli* [J]. *Mod Food Sci Technol (现代食品科技)*, 2020, 36:113-118.
 - 20 Qiu ZJ, Yuan JF, Gong MG. Comparative analysis of essential oil components in *Forsythiae Fructus* from different regions of China [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2023, 35:1739-1746.
 - 21 Deng W, Liu K, Cao S, et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative properties of grapefruit essential oil prepared by molecular distillation [J]. *Molecules*, 2021, 25:217-217.