DOI:10.16016/j.1000-5404.202008129

川芎嗪对过氧化氢诱导星形胶质细胞氧化应激损伤的保护作用

杨 琴[1,2],漆国栋[1,3],伍亚民[2],王海燕[2],徐 珂[1],侯科名[1],江 琼[1] 400016 重庆,重庆医科大学中医药学院,中医药防治代谢性疾病重庆市重点实验室[1];400042 重庆,陆军特色医学中心野战外科研究所特殊环境战伤防治研究室[2];400010 重庆,重庆市中医骨科医院骨科[3]

[**摘要**] **目的** 探讨川芎嗪(tetramethylpyrazine,TMP)对过氧化氢(H_2O_2)所致大鼠星形胶质细胞凋亡的保护作用。**方法** 利用SD新生鼠(24~48 h)分离、培养星形胶质细胞,按随机数字表法分为空白对照组(以正常培养液培养)、模型组(100 μmol/L的H_2O_2作用24 h)、TMP剂量组(25、50、100 μmol/L TMP预处理48 h后,加入H_2O_2作用24 h)。采用CCK-8检测各组细胞存活率;GFAP染色观察细胞形态;流式细胞术检测各组细胞凋亡率;特定试剂盒检测乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)活力;Real-time PCR检测各组细胞中PI3K、AKT、Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA的表达;Western blot检测各组细胞PI3K、AKT、p-AKT、Bcl-2、Bax、Caspase-3的蛋白表达。**结果** 与空白对照组比较,模型组细胞存活率明显降低($P<0.05$),细胞凋亡率升高($P<0.05$),LDH含量增加($P<0.05$),SOD活性降低($P<0.05$),PI3K、AKT、Bcl-2 mRNA表达下调,Bax、Caspase-3 mRNA表达上调($P<0.05$),PI3K、p-AKT、Bcl-2蛋白表达明显降低,Bax、Caspase-3蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,TMP预处理后细胞存活率明显升高($P<0.05$),其中50 μmol/L组的细胞存活率最高($P<0.05$),细胞凋亡率明显降低($P<0.05$),LDH含量降低($P<0.05$),SOD活性升高($P<0.05$),PI3K、AKT、Bcl-2 mRNA表达上调,Bax、Caspase-3 mRNA表达下调($P<0.05$),PI3K、p-AKT、Bcl-2蛋白表达明显升高,Bax、Caspase-3蛋白表达明显降低($P<0.05$)。**结论** TMP对H_2O_2所致的大鼠星形胶质细胞氧化应激损伤具有保护作用,可改善损伤后细胞形态并抑制凋亡,该作用可能与PI3K、p-AKT蛋白活化有关。

[**关键词**] 川芎嗪;星形胶质细胞;氧化应激;细胞凋亡
[**中图法分类号**] R282.71;R285.5;R322.8 [**文献标志码**] A

Tetramethylpyrazine protects rat astrocytes against H_2O_2-induced oxidative stress injury

YANG Qin[1,2], QI Guodong[1,3], WU Yamin[2], WANG Haiyan[2], XU Ke[1], HOU Keming[1], JIANG Qiong[1]
[1]Chongqing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Metabolic Diseases, College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Special Environmental Warfare Injury Prevention and Control, Institute of Surgery Research, Army Characteristic Medical Center, Chongqing, 400042; [3]Department of Orthopedics, Chongqing Orthopedic Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effect of tetramethylprazine (TMP) on oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) in rat astrocytes. **Methods** Astrocytes were isolated from SD newborn rats (24~48 h old) and cultured, and then the cells were randomly divided into control group (cultured with normal culture medium), model group (100 μmol·L^{-1} H_2O_2 for 24 h), TMP groups (pretreatment of 25, 50, 100 μmol·L^{-1} TMP for 48 h, and then H_2O_2 was added for 24 h). CCK-8 assay

[**基金项目**] 重庆市科卫联合中医药科研项目(2019ZY023495)
[**通信作者**] 江 琼,E-mail:101755@cqmu.edu.cn

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

was used to detect cell survival rate, GFAP staining to observe cell morphology, flow cytometry to detect cell apoptosis, corresponding reagent test kits to detect the lactate dehydrogenase (LDH) content and superoxide dismutase (SOD) activity, real-time fluorescent quantitative PCR to measure the detect the mRNA expression of PI3K, AKT, Bcl-2, Bax and Caspase-3, and Western blotting to test the protein expression levels of PI3K, AKT, p-AKT, Bcl-2, Bax and Caspase-3 in each group of cells. **Results** The model group had significantly reduced cell survival rate ($P<0.05$), increased apoptotic rate ($P<0.05$), elevated LDH content ($P<0.05$), decreased SOD activity ($P<0.05$); down-regulated PI3K, AKT, Bcl-2 mRNA and protein levels, and up-regulated the expression levels of Bax and Caspase-3 mRNA and protein levels ($P<0.05$). Compared with the model group, TMP pretreatment resulted in significantly increased cell survival rate ($P<0.05$) [with the dose of 50 μmol/L highest ($P<0.05$)], lowest apoptotic rate ($P<0.05$) and LDH content ($P<0.05$), enhanced SOD activity ($P<0.05$), up-regulation of PI3K, AKT, and Bcl-2 at mRNA and protein levels, and down-regulation of Bax and Caspase-3 at mRNA and protein levels ($P<0.05$). **Conclusion** TMP exerts protective effects on oxidative stress injury of rat astrocytes induced by H_2O_2, and improves cell morphology and inhibits cell apoptosis after injury, and this effect may be related to the regulation of PI3K and p-AKT activation.

[**Key words**] tetramethylprazine; astrocyte; oxidative stress; apoptosis

Supported by the Joint Project for Traditional Chinese Medicine Research of Chongqing Science and Technology Committee and Chongqing Health Committee (2019ZY023495). Corresponding author: JIANG Qiong, E-mail: 101755@cqmu.edu.cn

星形胶质细胞是中枢神经系统中含量最丰富,分布最广的一类神经胶质细胞,在突触形成、控制神经递质释放和摄取、营养因子的产生和控制神经元存活等方面起着重要作用[1],可介导诸如阿尔茨海默症[2]、癫痫[3]等多种中枢神经系统疾病的病变进程。中枢神经系统通常需要快速高效的氧化代谢运转,当氧化代谢异常时会出现氧化应激反应,通过损伤细胞脱氧核糖核酸、碳水化合物、蛋白质和脂质,从而引发细胞毒性导致中枢神经系统细胞损伤[4]。在发生氧化应激反应时,探讨如何保护中枢神经系统细胞中占据重要份额的星形胶质细胞,已成为中枢神经系统疾病基础研究领域的热点之一[5]。川芎嗪(tetra methyl pyrazine,TMP)是中药川芎中的活性生物碱成分,现代药理学研究表明 TMP 具有阻滞钙离子通道、抗氧化、保护神经、抑制血小板凝集、抗炎等作用[6]。临床上主要用于治疗脑缺血、脑梗死、冠心病等缺血性心血管疾病[7]。相关研究表明,TMP 能抑制自由基介导的神经元凋亡在缺血性中风中发挥神经保护的作用[8],另有研究表明 TMP 可以通过抑制氧化应激反应参与脑缺血再灌注损伤的神经保护[9]。TMP 对于治疗中枢神经系统疾病有巨大潜力,但是对星形胶质细胞氧化应激损伤的保护作用至今尚不清楚。因此,本研究以大鼠星形胶质细胞为研究对象,体外模拟氧化应激损伤环境,探讨 TMP 对氧化应激所致大鼠星形胶质细胞损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂与设备

SPF 级新生 24~48 h Sprague-Dawley 大鼠,购自陆军军医大学大坪医院实验动物中心,动物生产许可证号 SCXK(渝)2012-0005。所有操作按照《医学实验动物管理实施细则》要求,符合动物福利与伦理原则。

实验试剂包括:TMP(纯度≥98%)、过氧化氢溶液、无菌细胞爬片、L-多聚赖氨酸、CCK-8、DAPI、DyLight488 标记山羊小鼠二抗(北京索莱宝公司);胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司);高糖 DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、青霉素+链霉素双抗、0.25%胰酶(美国 HyClone 公司);PI3K 一抗、AKT 一抗、p-AKT 一抗、Caspase-3 一抗(美国 Abcam 公司);兔多克隆抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(美国 Invitrogen 公司);Bax 一抗、HRP 标记山羊抗兔二抗、HRP 标记驴抗山羊二抗、HRP 标记山羊抗小鼠二抗、HRP 山羊抗大鼠二抗(武汉塞维尔生物科技有限公司);Bcl-2 一抗(武汉三鹰生物技术有限公司);乳酸脱氢酶(LDH)含量检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定、蛋白上样缓冲液、RIPA 细胞裂解液、ECL 发光测试盒(上海碧云天公司);10%蛋白电泳预制胶、MOPS 电泳液(南京金斯瑞公司);Annexin V-FITC/PI(天津三箭生物技术有限公司)。RNAiso Plus、PCR 逆转录试剂盒、SYBR(日本 TaKaRa 公司)。

实验设备包括:激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司);荧光显微镜(日本 Olympus 公司);细胞培养箱、酶标仪、-80 ℃冰箱(美国 Tmermo Fisher Scientific 公司);蛋白电泳、电转仪、T100 梯度 PCR 仪、CFX Connect 型 Real-Time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);Odyssey FC 近红外双色激光和化学发光功能成像系统(德国 LI-COR 公司)。

1.2 大鼠星形胶质细胞原代及传代培养

取 24 h 内的新生 SD 大鼠,用体积为 75%的乙醇溶液麻醉 5 min,眼科剪快速取全脑置于含预冷的 PBS 培养皿中,充分清洗后仔细剥除脑膜和血丝,轻轻夹取大脑皮质至另一含预冷 DMEM 的培养皿中,清洗过后将大脑皮质置于培养皿中,用眼科剪剪成 1 mm^3 左右小块,加入 0.25%胰蛋白酶置于 37 ℃培养箱中消化 20 min,加入等体积的 FBS,终止消化,轻轻吹散,充分混匀,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入含 10%FBS 终培养基重悬细胞,70 μm 细胞筛过滤为单细胞悬液;1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入体积分数为 10% FBS 的培养基重悬细胞,计数,以 2×10^5/mL 接种于预先被 L-多聚赖氨酸包被的 6 cm^2 培养皿中,于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养,差速黏附处理 30 min,轻轻翻转培养皿,吸出未贴壁细胞悬液接种至另一培养皿中,置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中,每 2~3 天半量换液,7~8 d 传代。传代时,加入 0.25%胰蛋白酶,37 ℃消化 5~10 min,用含体积分数为 10%FBS 的培养基终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重悬,计数,以 2×10^5/mL 接种于预先被 L-多聚赖氨酸包被的 6 cm^2 培养皿中,于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养,差速黏附处理 30 min,轻轻翻转培养皿,吸出未贴壁细胞悬液接种至另一培养皿中,机械置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中,每 2~3 天半量换液。7~8 d 再次传代。

1.3 细胞分组

培养的星形胶质细胞分为 5 组:空白对照组、模型组、TMP 低剂量组、TMP 中剂量组、TMP 高剂量组。其中空白对照组用正常的细胞培养液培养,模型组用 100 μmol/L 的 H_2O_2 培养 24 h,TMP 低、中、高剂量组分别加入 25、50、100 μmol/L 的 TMP 预处理 48 h 后,再加入 100 μmol/L H_2O_2 作用 24 h。

1.4 CCK-8 检测细胞活性

取对数生长期星形胶质细胞以 5×10^3/mL 接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL。按照 1.3 分组方法处理细胞后,培养基中加入 10 μL CCK-8 原液,继续在培养箱孵育 3.5 h,酶标仪在 450 nm 处测定光密度值[$D(450)$],并计算细胞存活率。

细胞存活率=$D(450)_{药物处理组}/D(450)_{空白对照组}\times100\%$

1.5 GFAP 染色观察细胞形态

取适量细胞接种于放有爬片的 6 孔板中,按照 1.3 分组方法处理细胞后,去除培养基,PBS 洗 2 次;4%多聚甲醛固定 20 min,PBS 洗 5 min×3 次;免疫染色封闭液 37 ℃封闭 1 h,甩干。加入兔抗小鼠 GFAP 一抗(1∶500)4 ℃湿盒,避光孵育,过夜。次日室温复温 30 min,PBS 洗 5 min×3 次;加入 Dylight488 标记山羊抗小鼠二抗(1∶500),37 ℃避光孵育 1 h,PBS 洗 5 min×3 次;DAPI 染核 10 min,PBS 洗 5 min×3 次;抗荧光淬灭剂封片,激光共聚焦观察。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

取适量细胞接种于 6 孔板中,按照 1.3 分组方法处理细胞后,用 0.25%的胰酶消化细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,PBS 清洗细胞 2 次;加入 100 μL Binding Buffer、2 μL Annexin V-FITC 在加入 2 μL PI 轻柔混匀,温室避光孵育 5 min,流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.7 ELISA 检测 LDH、SOD

取适量细胞接种于 6 孔板中,按照 1.3 分组方法处理细胞后,收集细胞上清液,按照试剂盒说明书操作步骤,分别检测 LDH 的活性和 SOD 的含量。

1.8 Real-time PCR 检测细胞 PI3K、AKT、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达

取适量细胞接种于 6 孔板中,按照 1.3 分组方法处理细胞后,PBS 洗 2 次,每孔加入 1 mL 的 RNAiso Plus,按照试剂说明提取总 RNA,检测其浓度和纯度。采用逆转录试剂盒,根据说明 42 ℃,2 min 去除基因组 DNA 后,37 ℃,15 min;85 ℃,5 s 逆转录为 cDNA。然后进行 PCR 扩增反映,以 β-actin 为内参,采用 $2^{-\triangle\triangle ct}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。引物序列由北京擎科新业生物技术有限公司合成。PI3K(140 bp):上游 5′-CTCATTAGCGTGATTGTGCAT-3′;下游 5′-GCAATTCCCCATGAACTCACC-3′。AKT(133 bp):上游 5′-CTTCTATGGTGCGGAGATTGT-3′;下游 5′-CAGCCCGAAGTCCGTTATC-3′。Caspase-3(145 bp):上游 5′-GTGCAGCTACCTCAACTTCG-3′;下游 5′-CATAGTATCGCCAAATCTTGCT-3′。Bax(99 bp):上游 5′-TGGTTGCCCTCTTCTACTTTGC-3′;下游 5′-AGTCCAGTGTCCAGCCCAT-3′。Bcl-2(172 bp):上游 5′-GACAGAAGATCATGCCGTCCT-3′;下游 5′-ATCCGCTACAAGTTACACGTT-3′。β-actin(87 bp):上游 5′-GACTCCTATGTGGGTGACGA-3′;下游 5′-CCAGTTGGTAACAATGCCAT-3′。

1.9 Western blot 检测细胞 PI3K、AKT、p-AKT、Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达

取适量细胞接种于 6 孔板中,按照 1.3 分组方法处理细胞后,PBS 洗 2 次,将细胞置于冰上加入 RIPA 细胞裂解液裂解 30 min,细胞刮收集细胞裂解液,4 ℃,12 000 r/min,离心 20 min 取上清,采用 BCA 法测定蛋白浓度;取各组蛋白样品与上样缓冲液煮沸变性后,上样,每孔 20 μg;140 V 恒压电泳,根据各个蛋白分子量切胶;300 mA 恒流,1.5 h,转移到活化的 PVDF 膜上,转膜结束后 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h,TBAT 洗 3 次,每次 10 min。加入 PI3K 一抗(1∶1 000)、AKT 一抗(1∶10 000)、p-AKT 一抗(1∶10 000)、Caspase-3 一抗(1∶500)、Bax 一抗(1∶500)、Bcl-2 一抗(1∶1 000)、β-actin 一抗(1∶5 000),4 ℃孵育过夜;TBAT 洗 3 次,每次 10 min;根据一抗的种属不同,分别加入 HRP 标记山羊抗兔二抗(1∶5 000)、HRP 标记驴抗山羊二抗(1∶5 000)、HRP 标记山羊抗小鼠(1∶5 000)、HRP 标记山羊抗大鼠(1∶5 000)。温室孵育 2 h,TBST 洗 3 次,每次 10 min;ECL 化学发光剂反应成像。使用 Image J 分析各个条带的灰度值,以 β-actin 为内参,计算目的蛋白与内参的灰度比值,p-AKT 与 AKT 的灰度比值。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间采用单因素方差分析,两两比较用 LSD-t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 TMP 预处理对各组星形胶质细胞存活率的影响

与空白对照组比较,H_2O_2 干预后星形胶质细胞存活率明显下降($P<0.05$);与模型组比较,TMP 低剂量组、中剂量组、高剂量组细胞存活率明显增高,其中中剂量组(50 μmol/L)最明显($P<0.05$,表 1)。

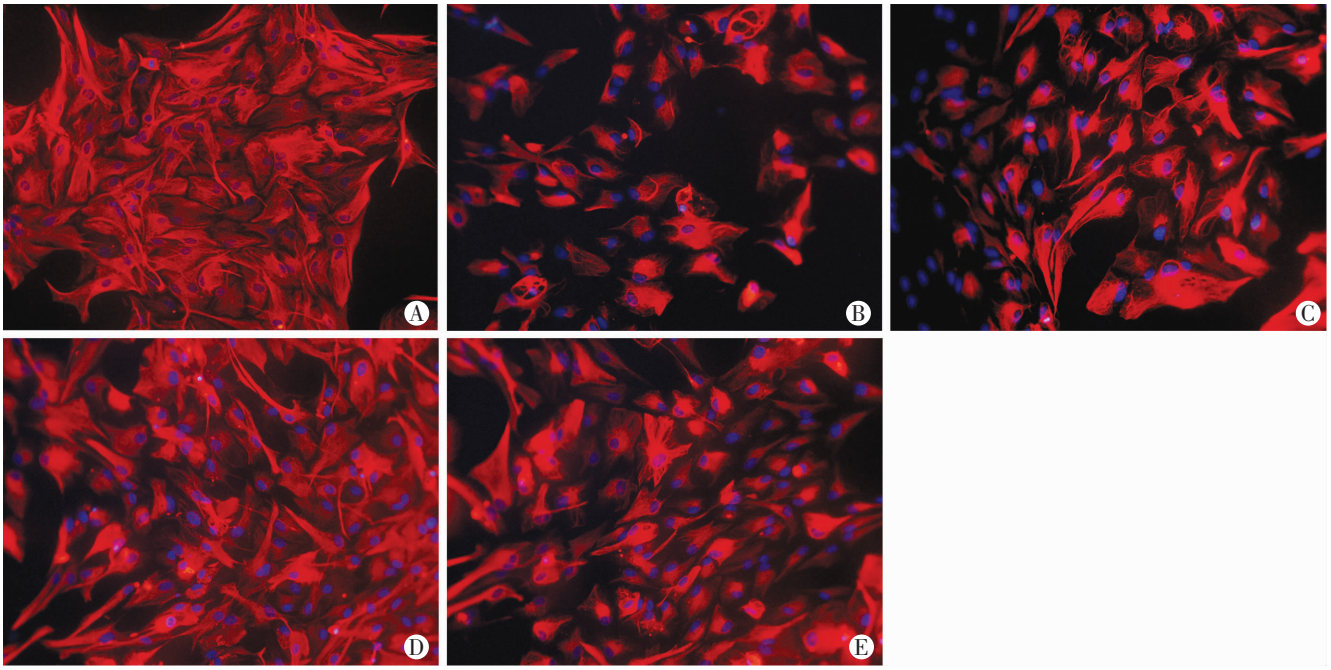
表 1 各组星形胶质细胞存活率($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	细胞存活率(%)
空白对照组	100.00
模型组	49.43±2.98[a]
TMP 低剂量组	65.69±4.93[b]
TMP 中剂量组	84.38±4.23[b]
TMP 高剂量组	73.93±3.89[b]

a:$P<0.05$,与空白对照组比较; b:$P<0.05$,与模型组比较

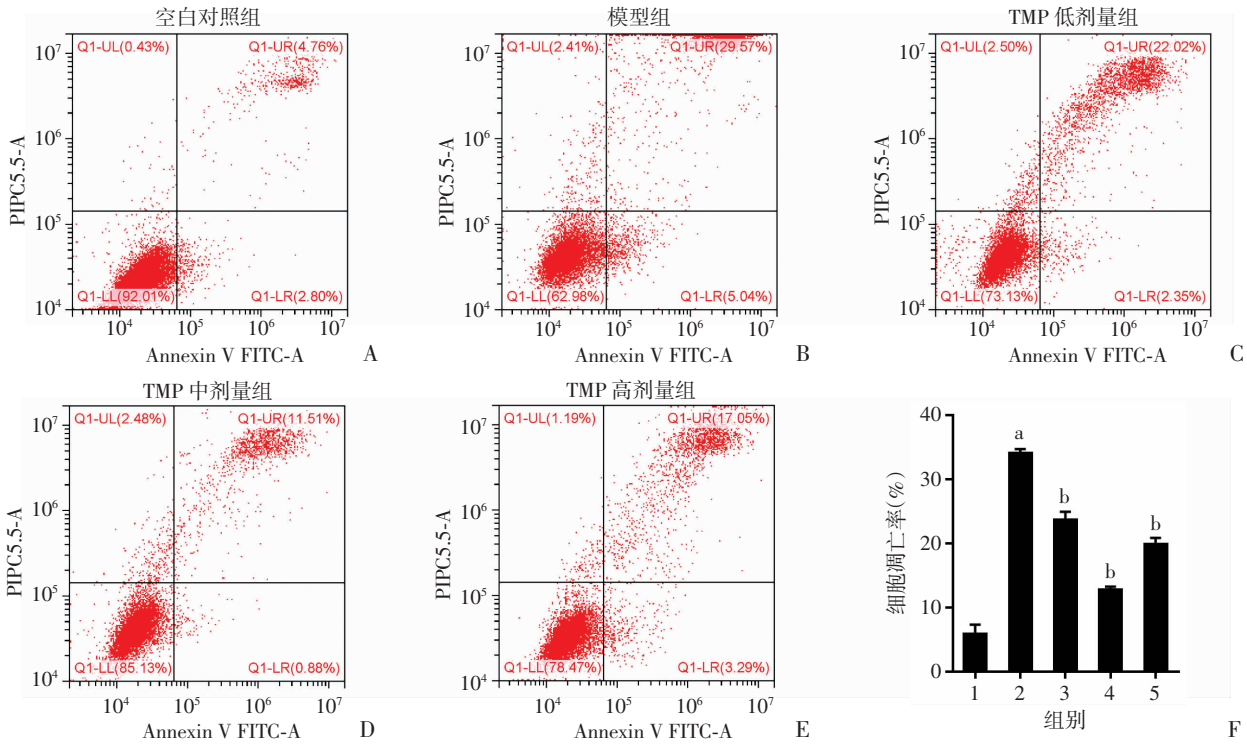
2.2 TMP 预处理对各组星形胶质细胞形态的影响

荧光显微镜下观察,空白对照组细胞生长状态良好,细胞分布均匀,轮廓清晰,核呈圆形或椭圆形,胞体较大呈扁平状胞体又伸出许多突起。模型组细胞形态发生明显变化,胞体空洞失去了完整性的结构,突触缩回,细胞核呈萎缩状。经 TMP 预处理后,细胞数量增加,胞体和突触逐渐恢复,尤其是在 TMP 中剂量组(50 μmol/L)接近空白对照组的细胞生长状态,见图 1。



A:空白对照组; B:模型组; C: TMP 低剂量组; D: TMP 中剂量组; E: TMP 高剂量组

图 1 荧光显微镜下各组星形胶质细胞形态观察 (×100)



A~E: 流式细胞仪检测结果;F: 各组细胞凋亡率(n=3) 1:空白对照组; 2:模型组; 3:TMP 低剂量组; 4: TMP 中剂量组; 5: TMP 高剂量组;a:P<0.05,与空白对照组比较; b:P<0.05,与模型组比较

图 2 流式细胞仪检测各组星形胶质细胞凋亡率

2.3 TMP 预处理对各组星形胶质细胞凋亡的影响

与空白对照组相比,模型组细胞凋亡明显升高(P<0.05)。TMP 低、中、高剂量组细胞凋亡较模型组显著降低,其中中剂量组最明显,但仍然低于空白对照组(P<0.05,图 2)。

2.4 TMP 预处理对各组星形胶质细胞 LDH、SOD 活性的影响

与空白对照组比较,模型组细胞上清液中 LDH 活性显著升高(P<0.05);与模型组比较,TMP 低、中、高剂量组细胞上清液中 LDH 活性有不同程度的降低(P<0.05)。与空白对照组比较,模型组中 SOD 的活性显著降低(P<0.05);与模型组比较,TMP 低、中、高剂量组能不同程度地升高 SOD 的活性(P<0.05,表 2)。

表 2 各组星形胶质细胞 LDH、SOD 活性 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组别	LDH/U·L^{-1}	SOD/U·L^{-1}
空白对照组	61.71±8.94	32.01±0.51
模型组	151.21±27.84^{a}	15.89±1.32^{a}
TMP 低剂量组	104.37±20.57^{b}	19.04±1.13^{b}
TMP 中剂量组	82.59±9.55^{b}	28.42±0.21^{b}
TMP 高剂量组	97.19±3.32^{b}	23.01±0.37^{b}

a: P<0.05,与空白对照组比较;b: P<0.05,与模型组比较

2.5 TMP 预处理对各组星形胶质细胞 PI3K、AKT、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响

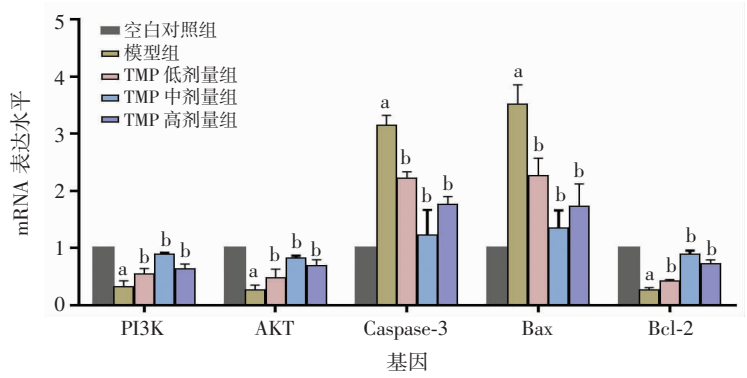
与空白对照组比较,模型组 PI3K、AKT 和 Bcl-2 mRNA 表达下调(P<0.05);与模型组比较,TMP 低、中、高剂量组 PI3K、AKT 和 Bcl-2 mRNA 表达上调(P<0.05)。与空白对照组比较,模型组 Bax、Caspase-3 mRNA 表达上调(P<0.05);与模型组比较,TMP 低、中、高剂量组 Bax、Caspase-3 mRNA 表达下调(P<0.05,图 3)。

2.6 TMP 预处理对各组星形胶质细胞 PI3K、AKT、p-AKT、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型组 PI3K、p-AKT 和 Bcl-2 蛋白表达明显降低(P<0.05);与模型组比较,TMP 低、中、高剂量组可上调 PI3K、p-AKT 和 Bcl-2 的蛋白表达,其中中剂量组最为明显(P<0.05)。与空白对照组比较,模型组 Bax、Caspase-3 蛋白表达明显升高(P<0.05);与模型组比较,TMP 低、中、高剂量组 Bax、Caspase-3 蛋白表达明显降低(P<0.05,图 4)。

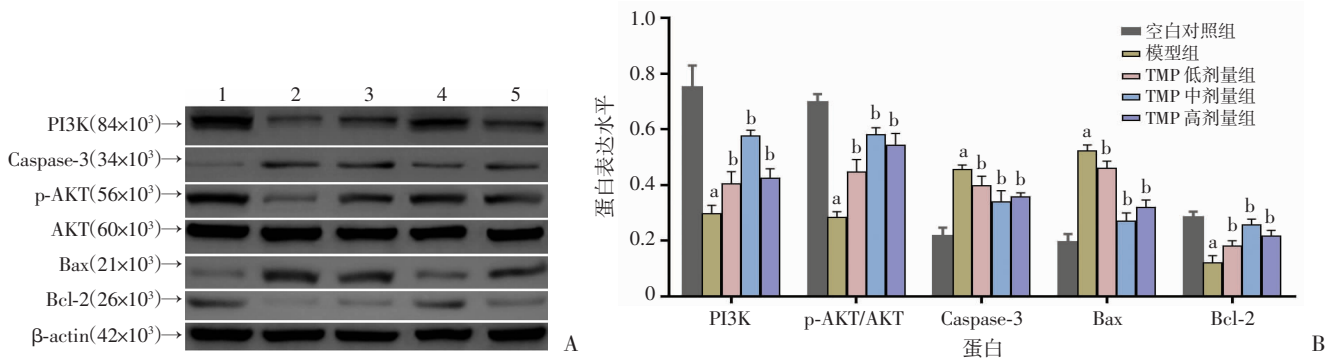
3 讨论

氧化应激损伤是指体内活性氧的产生与抗氧化体系的清除能力严重失调的一种病理状态,通常对需氧量



a: $P<0.05$,与空白对照组比较; b: $P<0.05$,与模型组比较

图 3 Real-time PCR 检测各组星形胶质细胞 PI3K、AKT、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达



A:Western blot 检测各组相关蛋白表达 1:空白对照组; 2:模型组; 3:TMP 低剂量组; 4: TMP 中剂量组; 5: TMP 高剂量组;B:各组蛋白定量分析($n=3$);a: $P<0.05$,与空白对照组比较;b: $P<0.05$,与模型组比较

图 4 Western blot 检测各组星形胶质细胞 PI3K、AKT、p-AKT、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达

大、抗氧化水平偏低的中枢神经系统具有高危性[10-11]。有研究表明,在中枢神经系统生理与病理变化中占据重要份额的星形胶质细胞,同样也对氧化应激损伤相当敏感[12]。TMP 作为抗氧化保护剂在各领域研究中日益广泛,相关研究表明,TMP 对氧化应激所致的大鼠视网膜神经节细胞[13]、大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株[14-15]损伤具有保护作用,因此为 TMP 对星形胶质细胞的潜在保护作用提供了理论依据。

过氧化氢是一种活性氧分子,作为一种可以通过增加细胞内的活性氧含量发挥对细胞氧化损伤的强氧化剂,参与许多神经系统疾病的发病机制,常常用来模拟细胞体外氧化应激损伤模型[16]。本研究参考既往研究中神经样细胞的造模方案[17-18]并结合前期预实验,最终选择 100 μmol/L 的 H_2O_2 培养 24 h,提示造模成功,细胞形态明显改变,存活率约 50%。而经适宜浓度 TMP 预处理后,细胞形态明显改善且存活率升高,反映细胞氧化损伤程度的 LDH 漏出率降低,细胞抗氧化酶类物质 SOD 含量升高,结合流式细胞术也证明细胞凋亡显著减少。

细胞凋亡是一个多环节、多因素决定的复杂过程,可能通过激活或抑制多条信号通路,与调控凋亡蛋白家族的表达有关[19]。Bcl-2 蛋白家族中的重要成员有 Bcl-2 和 Bax 蛋白等,分别为抗凋亡和促凋亡蛋白。细胞接受凋亡信号时,Bax 蛋白表达增高,Bcl-2 却降低,造成线粒体跨膜电位下降,可进一步激活 Caspase 家族[20]。而 Caspase-3 是 Caspase 级联反应的凋亡执行因子,可直接介导细胞的凋亡[21]。本研究通过 Real-time PCR 与 Western blot 检测探讨了 TMP 保护作用与调控凋亡家族蛋白的联系,发现适宜浓度 TMP 预处理后,细胞中 Bcl-2 的 mRNA 与蛋白表达显著上升,Caspaase-3、Bax 的 mRNA 与蛋白表达显著降低。本研究初步探讨了 PI3K/AKT 信号通路中的关键蛋白表达与 TMP 保护作用的联系,该信号通路可能通过激活通路中的配体蛋白 PI3K,促进 AKT 蛋白的磷酸化,而磷

酸化的 AKT 蛋白在通路的中游位置,可以进一步影响下游凋亡家族蛋白的表达,从而影响细胞的凋亡,决定细胞的命运[22]。以往研究表明,TMP 可能通过激活 PI3K/Akt 细胞存活途径机制参与脑缺血缺氧损伤后的神经保护效应[8]。与以往的结果相似,本研究结果显示,H_2O_2 诱导的星形胶质细胞 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平显著降低,而经过适宜 TMP 预处理后 PI3K、p-AKT 蛋白表达显著升高。

综上,本研究提示过氧化氢可产生氧化应激损伤并诱导星形胶质细胞凋亡,适宜浓度 TMP 可抑制因氧化损伤所致的星形胶质细胞凋亡,发挥保护作用,该作用可能通过调控凋亡家族蛋白中 Bax、Bcl-2、Caspaase-3 表达,与激活 PI3K/AKT 通路上的关键蛋白 PI3K、p-AKT 表达有关。然而上述结论仍需体内实验进一步论证。本研究有助于了解 TMP 在星形胶质细胞层面抗氧化应激损伤中的保护作用,为临床深入应用奠定了理论基础。

参考文献:

[1] MATIAS I, MORGADO J, GOMES F C A. Astrocyte heterogeneity: impact to brain aging and disease[J]. Front Aging Neurosci, 2019, 11: 59. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00059.

[2] CARTER S F, HERHOLZ K, ROSA-NETO P, *et al*. Astrocyte biomarkers in Alzheimer's disease[J]. Trends Mol Med, 2019, 25(2): 77-95. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.11.006.

[3] BOISON D, STEINHÄUSER C. Epilepsy and astrocyte energy metabolism[J]. Glia, 2018, 66(6): 1235-1243. DOI: 10.1002/glia.23247.

[4] CHEN L, LIU B. Relationships between stress granules, oxidative stress, and neurodegenerative diseases[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 1809592. DOI: 10.1155/2017/1809592.

[5] CABEZAS R, BAEZ-JURADO E, HIDALGO-LANUSSA O, *et al*. Growth factors and neuroglobin in astrocyte protection against neurodegeneration and oxidative stress[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(4): 2339-2351. DOI: 10.1007/s12035-018-1203-9.

[6] GUO M, LIU Y, SHI D. Cardiovascular actions and therapeutic potential oftetramethylpyrazine (active component isolated from rhizoma Chuanxiong): roles and mechanisms[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 2430329. DOI: 10.1155/2016/2430329.

[7] 谢保城, 陈世春, 王清辉, 等. 丹参川芎嗪注射液辅助治疗急性脑梗死疗效与安全性的系统评价[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(17): 3573-3581. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20180611.015.
XIE B C, CHEN S C, WANG Q H, *et al*. Systematic review on efficacy and safety of Danshen Chuanxiongqin Injection in treatment of acute cerebral infarction[J]. China J Chin Materia Medica, 2018, 43(17): 3573-3581. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20180611.015.

[8] ZHANG G X, ZHANG T, WU L M. *et al*. Neuruprotective effect and mechanism of action of tetramethylpyrazine nitrone for ischemic stroke therapy[J]. Neuromolecular Med, 2018, 20(1): 97-111. DOI: 10.1007/s12017-018-8478-x.

[9] 喻志慧, 黎良达. 川芎嗪对小鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(12): 1648-1652. DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2020.12.013.
YU Z H, LI L D. Effect of ligustrazine on the cerebral ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(12): 1648-1652. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2020.12.013.

[10] JIANG T, SUN Q, CHEN S. Oxidative stress: a major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease[J]. Prog Neurobiol, 2016, 147: 1-19. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2016.07.005.

[11] CHO C H, KIM E A, KIM J, *et al*. N-Adamantyl-4-methylthiazol-2-amine suppresses amyloid β-induced neuronal oxidative damage in cortical neurons[J]. Free Radic Res, 2016, 50(6): 678-690. DOI: 10.3109/10715762.2016.1167277.

[12] 陈艳清, 甄然, 杨璇, 等. 星形胶质细胞的功能作用研究进展[J]. 脑与神经疾病杂志, 2020, 28(5): 327-330.
CHEN Y Q, ZHEN R, YANG X, *et al*. Research progress on the function of astrocytes[J]. J Brain Nerv Dis, 2020, 28(5): 327-330.

[13] 孙旋, 冯卓蕾, 陈娜. 川芎嗪对过氧化氢致大鼠视网膜神经节细胞氧化损伤的抑制作用及机制[J]. 眼科新进展, 2019, 39(6): 515-518. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2019.0118.
SUN X, FENG Z L, CHEN N. Inhibitory effect of ligustrazine on rat retinal ganglion cell oxidative damage induced by peroxide hydrogen and its mechanisms[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2019, 39(6): 515-518. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2019.0118.

[14] 黄伟, 李涵, 李本岳, 等. 川芎嗪对 t-BHP 致 PC12 细胞损伤的保护及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25

(11): 67-72. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20191102.
HUANG W, LI H, LI B Y, *et al*. Protective effect and mechanism of tetramethylpyrazine against t-BHP-induced PC12 cell injury[J]. Chin J Exper Trad Med Formul, 2019, 25(11): 67-72. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20191102.

[15] GUAN D S, SU Y F, LI Y X, *et al*. Tetramethylpyrazine inhibits $CoCl_2$-induced neurotoxicity through enhancement of Nrf2/GCLc/GSH and suppression of HIF1α/NOX2/ROS pathways[J]. J Neurochem, 2015, 134(3): 551-565. DOI: 10.1111/jnc.13161.

[16] QUINCOZES-SANTOS A, BOBERMIN L D, LATINI A, *et al*. Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1[J]. PLoS ONE, 2013, 8(5): e64372. DOI: 10.1371/journal.pone.0064372.

[17] 黑鑫鑫, 刘涛. 石菖蒲活性成分对过氧化氢诱导 PC12 细胞 Caspase-1、IL-18 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(5): 1025-1028.
HEI X X, LIU T. Protective effects of β-asarone, an active ingredient of Acorus tatarinowii, on the pyroptosis of PC12 cells induced by H_2O_2[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(5): 1025-1028.

[18] 李尽文, 许月莹, 曹天寿, 等. 姜黄素对过氧化氢诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 四川化工, 2019, 22(3): 1-5.
LI J W, XU Y Y, CAO T S, *et al*. The neuroprotective effects of curcumin against H_2O_2-induced oxidative stress in PC12 cells[J]. Sichuan Chem Ind, 2019, 22(3): 1-5.

[19] D'ARCY M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. Cell Biol Int, 2019, 43(6): 582-592. DOI: 10.1002/cbin.11137.

[20] ZHAO W W, FENG H T, SUN W, *et al*. Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) induced apoptosis and necroptosis in endothelial cells: Roles of NOX4 and mitochondrion[J]. Redox Biol, 2017, 11: 524-534. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.036.

[21] SÁNCHEZ-MIGALLÓN M C, VALIENTE-SORIANO F J, NADAL-NICOLÁS F M, *et al*. Apoptotic retinal ganglion cell death after optic nerve transection or crush in mice: delayed RGC loss with BDNF or a caspase 3 inhibitor[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57(1): 81. DOI: 10.1167/iovs.15-17841.

[22] YU J S, CUI W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI_3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination[J]. Development, 2016, 143(17): 3050-3060. DOI: 10.1242/dev.137075.

(收稿:2020-08-17;修回:2020-09-23)
(编辑 吴培红)