doi:10.11659/jjssx.08E020002

·基础研究·

淫羊藿苷抑制内质网应激介导 HT22 细胞抗谷氨酸诱导凋亡

王 臻,朱 婧,薛 彤,白 宁 (陕西省人民医院麻醉科,陕西 西安 710068)

[摘 要] **目的** 探讨淫羊藿苷(ICA)通过调控内质网应激(ERS)通路保护小鼠海马神经元 HT22 细胞抗谷氨酸(Glu)损伤的机制。**方法** 筛选适当的 ICA 预处理浓度,以 Glu(5 mmol/L)处理 18 h 构建细胞损伤模型。将细胞分为对照组、Glu 损伤组、低剂量 ICA + Glu(L-ICA + Glu)组和高剂量 ICA + Glu(H-ICA + Glu)组。CCK-8 法检测细胞活性,TUNEL 染色显示凋亡细胞,比色法检测细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放量,JC-1 染色检测线粒体膜电位(MMP)变化,DCFH-DA 检测细胞活性氧(ROS)水平,Western blot 检测 ERS 通路和凋亡相关蛋白含量。此外,以上各组经 CHOP siRNA 预处理后,分为 Glu + ControlsiRNA 组、Glu + CHOPsiRNA 组、H-ICA + Glu + ControlsiRNA 组、H-ICA + Glu + CHOPsiRNA 组,检测细胞活性、凋亡率、ROS 含量、MMP 水平及凋亡相关蛋白表达。**结果** ICA 在浓度低于 10 μmol/L 时无明显毒性作用。ICA 能够显著提高 HT22 细胞活性,降低 LDH 释放量,抑制细胞凋亡,降低 ROS 水平,恢复 MMP,且呈剂量依赖性($P<0.05$)。此外,ICA 下调损伤后 p-eIF2α 和 CHOP 表达,同时增加 Bcl2,抑制 Bax($P<0.05$)。CHOP siRNA 预处理后,Glu 的损伤作用明显减弱;同时 CHOP siRNA 预处理能够明显增强 ICA 对 HT22 细胞的保护作用。**结论** ICA 可能通过部分抑制 ERS 诱导的氧化应激及凋亡,保护 HT22 细胞抗 Glu 损伤。

[关键词] 淫羊藿苷;内质网应激;HT22 细胞;氧化应激;凋亡

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-08-01

Icariin protects HT22 cells against glutamate induced apoptosis by inhibition of endoplasmic reticulum stress

WANG Zhen, ZHU Jing, XUE Tong, BAI Ning (Department of Anesthesiology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an Shaanxi 710068, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of icariin (ICA) protecting mouse hippocampal neuron HT22 cells against glutamate (Glu) injury by regulating the endoplasmic reticulum stress (ERS) pathway. **Methods** The appropriate pretreatment concentration of ICA were screened, and the cell injury model was constructed by Glu (5 mmol/L) treatment for 18 hours. The cells were divided into the control group, the Glu injury group, the low-dose ICA + Glu (L-ICA + Glu) group and the high-dose ICA + Glu (H-ICA + Glu) group. The cell viability was detected by CCK-8 assay, the apoptotic cell was assessed by TUNEL staining, the release of cell lactate dehydrogenase (LDH) was detected by colorimetric method, the change of mitochondrial membrane potential (MMP) was detected by JC-1 staining, the cellular reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA, and ERS pathway and apoptosis-related protein content were detected by Western blot. In addition, after pretreated with CHOP siRNA in the above groups, they were divided into the Glu + ControlsiRNA group, Glu + CHOPsiRNA group, H-ICA + Glu + ControlsiRNA group, H-ICA + Glu + CHOPsiRNA group. Cell viability, apoptosis rate, ROS content, MMP level and apoptosis-related protein expression were detected. **Results** ICA had no significant toxic effect at concentrations below 10 μmol/L. ICA could significantly increase the viability of HT22 cells, decrease LDH release, inhibit cell apoptosis, reduce ROS levels, and restore MMP in a dose-dependent manner ($P<0.05$). In addition, ICA down-regulated the expression of p-eIF2α and CHOP after injury, while increased Bcl2 level and inhibited Bax level ($P<0.05$). After CHOP siRNA pretreatment, the injury effect of Glu was significantly weakened. At the same time, CHOP siRNA pretreatment could significantly enhance the protective effect of ICA on HT22 cells. **Conclusion** ICA may protect HT22 cells against Glu injury by partially inhibiting ERS-induced oxidative stress and apoptosis.

Keywords: icariin; endoplasmic reticulum stress; HT22 cells; oxidative stress; apoptosis

谷氨酸(glutamate,Glu)是哺乳动物神经系统中含量非常丰富的兴奋性神经递质,通过突触间隙的相应受体,在神经元分化、生长、迁移等过程中发挥重要作用[1]。然而,Glu 过度释放或堆积会引起神经元损伤,表现为兴奋性神经毒性,最终诱发神经系统疾病[2]。内质网是真核细胞的重要细胞器,主要负责蛋白的合成、分泌及降解;内质网功能异常会引发错误蛋白超载,即内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)[3]。活性氧(reactive oxygen species,ROS)是 Glu 致神经元损伤的另一主要机制[4],能通过介导 ERS 广泛参与神经系统退行性病变过程[5]。

淫羊藿苷(icariin,ICA)是小檗科植物淫羊藿的主要活性成分。有研究显示,ICA 通过调节颗粒蛋白前体的表达减轻低浓度 Glu 诱导的 HT22 细胞损伤[6],

[基金项目] 陕西省科技研究发展计划(2012K13-02-23)

[通信作者] 白 宁,E-mail:xabainingemail@126.com

然而 ERS 信号通路是否同样参与上述过程尚不清楚。因此,本研究筛选合理的 ICA 浓度,探讨 ICA 预处理对 Glu 介导的 HT22 细胞凋亡的保护作用及调控机制,旨在为 ICA 治疗神经系统损伤提供新的理论基础,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞和主要试剂:小鼠海马神经元 HT22 细胞系于我院中心实验室保种,CCK-8 试剂盒(七海复泰生物科技有限公司,上海),JC-1 和 ROS 检测试剂盒(翊圣生物技术研究所,上海),TUNEL 凋亡试剂盒(Roche 公司,德国),DAPI(Sigma-Aldrich 公司,美国),乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)试剂盒(建成生物工程研究所,南京),DMEM 培养基和胎牛血清(Gibco 公司,美国),青—链霉素双抗混合液(100 ×)和 DMSO(索莱宝科技有限公司,北京),p-eIF2α、eIF2α、GRP78 和 CHOP 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国),Bcl2、Bax、β-actin 抗体及 CHOPsiRNA(SantaCruz 公司,美国),辣根过氧化物酶标记的二抗(中杉金桥生物技术有限公司,北京)。

仪器:细胞培养箱(Thermo 公司,美国),酶标仪(MolecularDevices,美国),高速低温离心机(艾本德公司,德国),激光共聚焦显微镜(奥林巴斯公司,日本),Western blot 蛋白分离及成像系统(Bio-Rad 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37 ℃、5% CO_2 的饱和湿环境中常规培养 HT22 细胞,添加青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 mg/mL)。每 2 d 换液 1 次,待细胞生长达 90% 左右时以 0.25% 胰酶消化传代,传代比例为 1∶2。取对数生长期的细胞作为实验对象。

1.2.2 药物处理和实验分组 ICA 以 DMSO 助溶配成母液,于 4 ℃保存,用时以无血清的 DMEM 培养基稀释(DMSO < 0.1%)。首先,检测不同浓度 ICA(0.1 ~ 100 μmol/L)处理 24 h 后对 HT22 细胞的毒性作用,最终选择浓度 5 μmol/L 和 10 μmol/L 用于后续实验。随后,将细胞分为对照组、Glu 损伤组、低剂量 ICA + Glu(L-ICA + Glu)组和高剂量 ICA + Glu(H-ICA + Glu)组。根据毒性试验结果分别给予 L-ICA + Glu 组和 H-ICA + Glu 组低浓度(5 μmol/L)和高浓度(10 μmol/L) ICA 预处理 24 h 后[7-8],加入 Glu(5 mmol/L)继续孵育 18 h[9];Glu 损伤组单纯用 Glu 处理 18 h;对照组则以等体积的无血清 DMEM 培养基稀释液(DMSO < 0.1%)孵育 18 h。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞活性 将 HT22 细胞以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板,每组设 5 个复孔。按照 1.2.2 方法处理后,弃培养基,PBS 缓慢冲洗。每孔加入100 μL无血清的 DMEM 和 10 μL 的 CCK-8 试剂混合液,37 ℃孵育 2 h 后,于 450 nm 波长处测定吸光度(opticaldensity,OD)。以对照组结果为 100%。

1.2.4 比色法检测细胞 LDH 释放量 将 HT22 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,按 1.2.2 方法处理后,收集上清培养基,并转移至 96 孔板内,每组设 5 个复孔。每孔加入 50 μL 反应底物,37 ℃孵育 30 min,加入等量终止液。室温放置 3 min,于 440 nm 波长处测定吸光值。对照组的值设为 1。

1.2.5 TUNEL 染色显示凋亡细胞 将 HT22 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 24 孔板内制作细胞爬片,并按1.2.2 方法处理后,4% 多聚甲醛室温固定 10 min,并以 Triton X-100 溶液(0.1%)于室温孵育 10 min。严格按照试剂盒步骤对细胞进行 TUNEL 染色[5],并用 DAPI 溶液(1 μg/mL)室温、避光复染细胞核 10 min。甘油封片后,激光共聚焦显微镜下计算随机 10 个视野中的细胞凋亡率,凋亡率 = 绿色细胞数/蓝色细胞数 × 100%。

1.2.6 JC-1 染色检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential,MMP)变化 调整 HT22 细胞密度为 3×10^5 个/孔,接种至 24 孔板中,并制作细胞爬片。按 1.2.2 方法处理后,弃培养基,PBS 洗涤、备用。按照每 50 μL 的 JC-1(200 ×)加入 8 mL 超纯水的比例稀释 JC-1 原液,剧烈振荡;然后再加入 2 mL 的 JC-1 染色缓冲液(5 ×),混匀后即为 JC-1 染色工作液。向各孔中加入 400 μL JC-1 染色工作液和等体积的细胞培养液,37 ℃避光孵育 20 min。激光共聚焦显微镜下观察染色结果,并用 Image J 分析结果。

1.2.7 DCFH-DA 检测细胞 ROS 含量 用无血清 DMEM 培养液将 DCFH-DA 稀释成 10 μmol/L 的工作液。将 HT22 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 24 孔板内制作细胞爬片,按 1.2.2 方法处理后,取一定量的上述工作液覆盖于处理后的细胞爬片,37 ℃避光孵育 20 min,并以无血清 DMEM 培养液洗涤细胞 2 次。于 488 nm 激发波长和 525 nm 发射波长处测定荧光强度,单纯 DCFH-DA 溶液用做调零,Image J 分析结果,对照组的值设为 1。

1.2.8 细胞转染 HT22 细胞以 0.5×10^6 个/孔接种于 6 孔板,根据既往文献报道[10],严格按照转染说明书,对细胞进行操作,转染 48 h 后,Western blot 检测目的蛋白的表达情况。随后分为 Glu + ControlsiRNA 组、Glu + CHOPsiRNA 组、H-ICA + Glu + ControlsiRNA 组、H-ICA + Glu + CHOPsiRNA 组,经 ICA(10 μmol/L)

和 Glu 处理后,再次检测细胞活性、凋亡率、ROS 含量、凋亡相关蛋白表达以及 MMP 水平。

1.2.9 Western blot 检测关键蛋白的表达 制备处理后的细胞裂解液,分别提取总蛋白。定量后,高温变性,取 20 μg 蛋白液行 SDS-PAGE(8%)电泳,将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,加入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中,室温封闭 2 h,分别加入一定浓度的一抗(p-eIF2α、eIF2α、GRP78 和 CHOP 为 1∶1 000,Bcl2、Bax 和 β-actin 为 1∶500),于 4 ℃孵育过夜。加入相应的二抗(1∶5 000)室温孵育 2 h,电化学发光法显影,并用软件 Image Lab 5.1 分析蛋白的相对表达量。

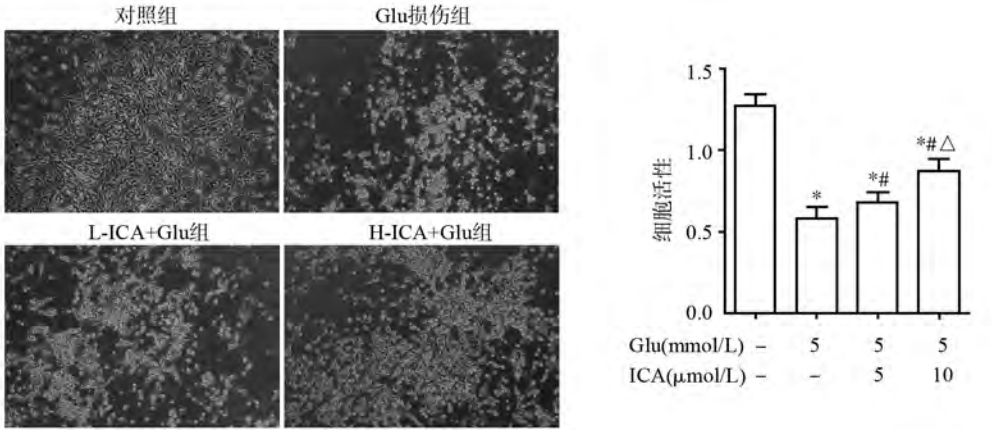
1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析比较差异,组间采用 *LSD* 法进一步比较。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICA 对 Glu 诱导 HT22 细胞损伤后细胞活性的影响

过量的 Glu 具有明显的神经毒性,以浓度为 5 mmol/L的 Glu 作用 18 h 后能够显著抑制 HT22 细胞增殖,见图 1。光镜下发现,与对照组相比,Glu 损伤组细胞表现为皱缩、变圆、折光性增强,并可见大量悬浮体;ICA 预处理 24 h 有效缓解上述情况。CCK-8 结果进一步提示,Glu 损伤组细胞活性明显较低,ICA 干预明显提高损伤后各组细胞活性,并呈剂量依赖性($P<0.05$)。提示 ICA 可以减轻 Glu 对 HT22 细胞的抑制。

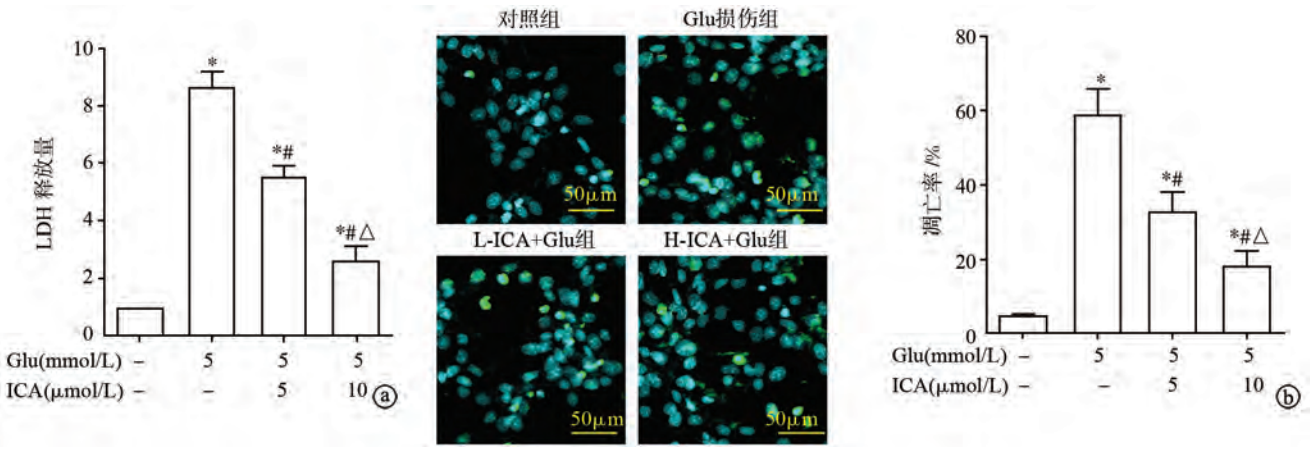


*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与 Glu 损伤组比较,$P<0.05$;△:与 L-ICA + Glu 组比较,$P<0.05$

图 1 ICA 对 Glu 诱导 HT22 细胞损伤后活性的影响(×200)

2.2 ICA 对 Glu 诱导 HT22 细胞损伤后 LDH 释放和凋亡的影响

Glu 损伤组中 LDH 的释放量明显增加($P>0.05$),ICA 可降低 LDH 的释放量,以 H-ICA + Glu 组最明显($P<0.05$),见图 2a。TUNEL 染色提示,Glu(5 mmol/L)处理 18 h 后 HT22 细胞中绿色荧光所占的比例增加($P<0.05$),而 ICA(5、10 μmol/L)均能有效降低细胞凋亡率,且呈剂量依赖性($P<0.05$),见图 2b。说明 ICA 能显著抑制 Glu 诱导 HT22 细胞分泌 LDH 以及凋亡。

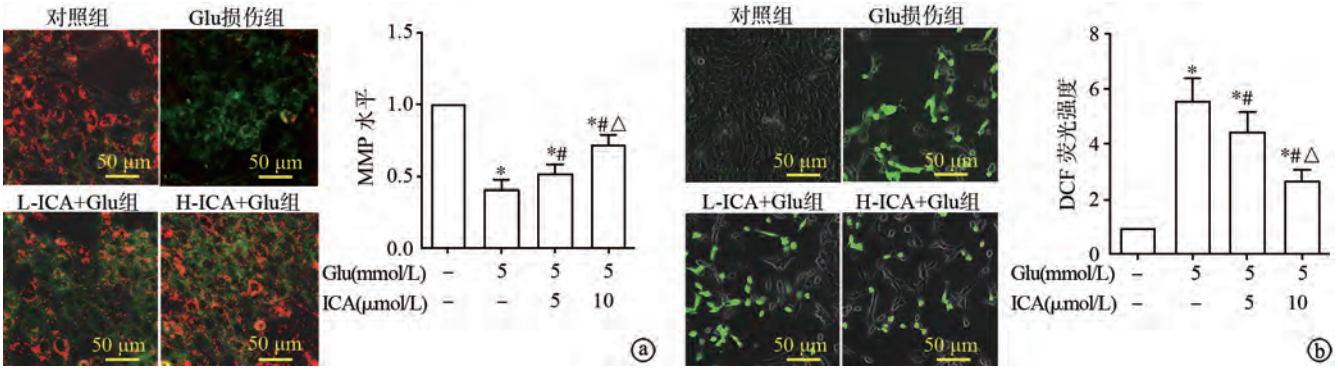


a:LDH 释放量;b:细胞凋亡率(绿色表示凋亡细胞,蓝色表示细胞核) *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与 Glu 损伤组比较,$P<0.05$;△:与 L-ICA + Glu 组比较,$P<0.05$

图 2 ICA 对 Glu 诱导 HT22 细胞损伤中 LDH 释放及凋亡的影响

2.3 ICA 对 Glu 诱导 HT22 细胞损伤后 MMP 变化和 ROS 含量的影响

实验结果显示,对照组细胞以红色荧光为主;Glu 损伤组红色荧光减弱,绿色荧光增强,提示 MMP 明显降低($P<0.05$);L-ICA + Glu 组和 H-ICA + Glu 组绿色荧光受到抑制,红色荧光增加($P<0.05$),见图 3a。Glu 提高 HT22 细胞中 ROS 的表达量,表现为绿色荧光增加($P<0.05$),ICA 预处理则显著降低其表达量($P<0.05$),见图 3b。以上结果提示,ICA 对 Glu 诱导的 HT22 细胞线粒体氧化应激损伤具有一定的保护作用。

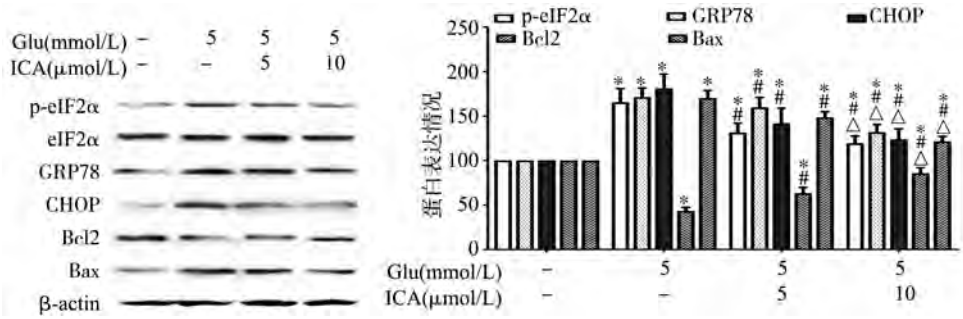


a:MMP 水平(红色表示高 MMP,绿色表示低 MMP);b:DCF 荧光强度(绿色表示 ROS 阳性) *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与 Glu 损伤组比较,$P<0.05$;△:与 L-ICA + Glu 组比较,$P<0.05$

图 3 ICA 对 Glu 诱导的 HT22 细胞损伤中 MMP 和 ROS 水平的影响

2.4 ICA 对 Glu 诱导 HT22 细胞损伤后 ERS 及凋亡信号通路的影响

相对于对照组,Glu 损伤组 p-eIF2α、GRP78 和 CHOP 表达量增加;同时抗凋亡蛋白 Bcl2 下调,促凋亡蛋白 Bax 上调($P<0.05$);不同浓度(5 μmol/L 和 10 μmol/L)的 ICA 能显著抑制 ERS 的激活,表现为下调 p-eIF2α、GRP78 和 CHOP 的表达,Bcl2 表达增加,Bax 表达降低,Bcl2/Bax 比值升高($P<0.05$),见图 4。提示 ICA 可有效抑制 Glu 诱导 HT22 细胞中 ERS 及凋亡相关蛋白的活性。



*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与 Glu 损伤组比较,$P<0.05$;△:与 L-ICA + Glu 组比较,$P<0.05$

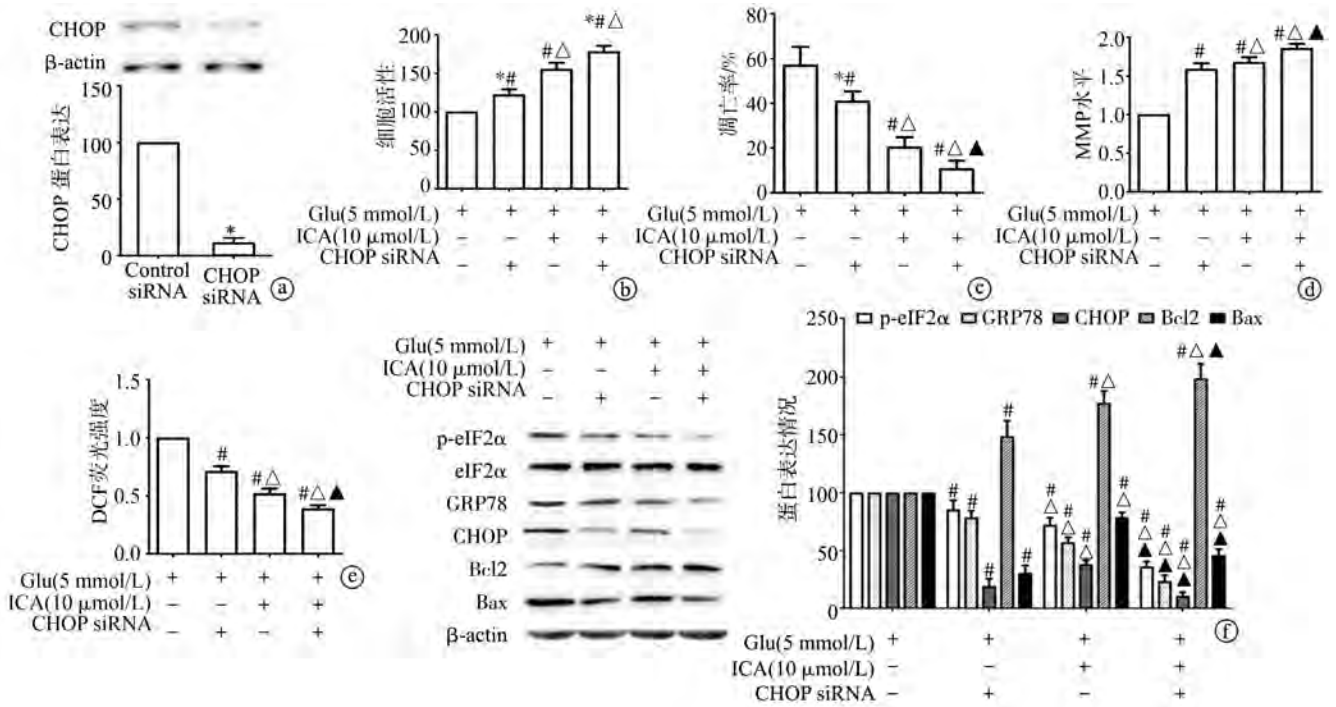
图 4 ICA 对 Glu 诱导的 HT22 细胞损伤中 ERS 和凋亡信号通路的影响

2.5 抑制 CHOP 对 ICA 保护 HT22 细胞抗 Glu 损伤的影响

与 Control siRNA 组比较,CHOP siRNA 组 CHOP 蛋白表达明显受到抑制($P<0.05$),见图 5a。同时,与 Glu + ControlsiRNA 组比较,H-ICA + Glu + ControlsiRNA 组细胞活性更高($P<0.05$),细胞 TUNEL 阳性率更低($P<0.05$),细胞 MMP 水平更稳定($P<0.05$),细胞 ROS 活性更弱($P<0.05$),见图 5b ~ e。同时,降低 CHOP 表达能够有效增强 ICA 对 Glu 损伤 HT22 细胞后的保护作用,表现在相对于 H-ICA + Glu + ControlsiRNA 组,H-ICA + Glu + CHOPsiRNA 组细胞活性和 MMP 水平升高($P<0.05$),凋亡率和 ROS 活性降低($P<0.05$),见图 5b ~ e。此外,Western blot 结果显示,联合应用 ICA 和 CHOP siRNA 可以进一步下调 ERS 相关蛋白(p-eIF2α、GRP78 和 CHOP)及 Bax 的表达,上调 Bcl2 的表达($P<0.05$),见图 5f。表明抑制 ERS 通路可以明显敏化 ICA 对 Glu 诱导 HT22 损伤的保护作用。

3 讨论

神经系统疾病是危害人类健康的常见病和多发病,不仅致死率高,而且其后遗症给患者家庭和社会带来沉重的负担[11]。神经元是神经系统的基本组成单位,机体内外的多种损伤因素均可以引起神经元功能紊乱。Glu 是重要的兴奋性神经递质,高浓度 Glu 能够激活突触后膜的相应受体,通过改变细胞内离子浓



a:CHOP 蛋白表达;b:细胞活性;c:凋亡率;d:MMP 水平;e:DCF 荧光强度;f:ERS(p-eIF2α、GRP78 和 CHOP)及凋亡相关蛋白(Bcl2 和 Bax)表达情况 *:与 Control siRNA 组比较,$P<0.05$;#:与 Glu + ControlsiRNA 比较,$P<0.05$;△:与 Glu + CHOPsiRNA 组比较,$P<0.05$;▲:与 H-ICA + Glu + ControlsiRNA 组比较,$P<0.05$

图 5 抑制 CHOP 对淫羊藿苷保护 HT22 细胞抗谷氨酸损伤的影响

度(如 Ga^{2+})或者氧化应激水平,诱导神经元凋亡[12]。HT22 细胞是永生化的小鼠海马神经元,因缺乏离子型 Glu 受体[13],而常用于研究 Glu 的氧化应激损伤[14]。有研究表明,Glu 通过竞争性抑制半胱氨酸摄取,导致细胞谷胱甘肽耗竭和 ROS 累积而诱导凋亡[15]。因此,有效地逆转上述过程是治疗神经系统疾病的关键,探索新的神经保护方法以及潜在的调控机制,成为目前该领域研究的热点。

ICA 是小檗科植物淫羊藿的主要活性成分,传统医学认为其具有益精气、坚筋骨、补腰膝、强心力的功效[16]。而现代医学研究发现,ICA 是含有 8-异戊烯基的黄酮醇苷类化合物,具有更广泛的药理学作用,包括抗癌、增强免疫、调节内分泌及改善心脑血管功能等[17-18]。近年来,ICA 对神经系统的保护作用受到广泛的关注。Li 等[19]的研究证实,ICA 调节乙酰-α-微管蛋白和磷酸化的微管蛋白结合蛋白 Tau,修复受损的细胞网络骨架并恢复磷酸化蛋白激酶 B,介导大鼠皮质神经元抗高半胱氨酸的毒性反应。重要的是,ICA 通过突触间隙的 Glu 受体在大鼠抑郁症模型中发挥保护作用[20]。因此,ICA 具有多种神经保护作用;然而,其对 Glu 诱导的神经损伤的调控机制未见报道。因此,本研究以 Glu 预处理 HT22 细胞构建氧化应激诱导的凋亡模型,探讨 ICA 对其拮抗作用。结果显示,Glu(5 mmol/L)处理 18 h 可引起 HT22 细胞活性降低以及凋亡和 LDH 分泌增加,与以往研究一致[21-22]。不同浓度(5 μmol/L 和 10 μmol/L)的 ICA 显著增加细胞活性并降低凋亡率和 LDH 释放量,说明 ICA 具有抗 Glu 诱导的 HT22 细胞凋亡作用。

线粒体是细胞进行氧化磷酸化、合成三磷酸腺苷的主要场所,在细胞能量代谢中扮演重要角色[23]。线粒体功能损伤后可使呼吸链障碍、膜电位去极化、三磷酸腺苷合成减少等,干扰正常的细胞代谢[23]。线粒体既是 ROS 产生的主要场所,也是 ROS 攻击的靶器官,因而在其损伤后会产生放大效应,最终导致细胞死亡[23]。JC-1 是一种广泛用于检测线粒体 MMP 的理想荧光探针。正常情况下,JC-1 聚集在线粒体内,可以产生红色荧光;线粒体损伤后,JC-1 外漏并以单体形式存在,发出绿色荧光。目前常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例[24]。本研究荧光检测显示,Glu 明显诱导 MMP 降低,同时引起细胞内 ROS 堆积,ICA 预处理能有效逆转上述变化,说明 ICA 具有清除过度 ROS 的功能[25],进而提高线粒体膜的稳定性,发挥抑制细胞凋亡的作用。

PERK-eIF2α-CHOP 是 ERS 重要的调控通路[26]。静息状态下,PERK 与 GRP78 相互结合处于稳态;当内质网内的错误蛋白增多,PERK 解离并激活,磷酸化下

游分子 eIF2α,并上调 CHOP 分子入核诱导凋亡[27]。已有研究证实,CHOP 可以通过抑制抗凋亡蛋白(如 Bcl2)和活化多种促凋亡蛋白(如 Bax、Bak)发挥作用[28-29]。此外,ROS 介导的 ERS 是 Glu 损伤神经元的重要分子病理基础[15],可能与凋亡相关蛋白促进 MMP 去极化有关[30]。本研究显示,经 ICA 处理后,HT22 细胞中 p-eIF2α、GRP78 和 CHOP 的表达明显降低,而 Bcl2/Bax 比值增加。以上结果说明,ICA 能有效阻断 HT22 细胞中 Glu 诱导的氧化应激反应及 ERS,进一步稳定线粒体功能,从而抑制凋亡发生。更重要的是,本研究应用 siRNA 特异性抑制效应分子 CHOP 后,ICA 的作用明显增强,提示 ICA 部分通过下调 PERK-eIF2α-CHOP 介导 HT22 细胞抗 Glu 诱导的氧化应激反应性凋亡。

综上,ICA 可以保护神经元,其作用机制一定程度上与抑制细胞 ROS 堆积,进而抑制 ERS 信号通路激活,最终稳定 MMP 水平并恢复其功能,以减轻细胞凋亡有关(图 6);然而,其具体作用机制仍需深入研究。

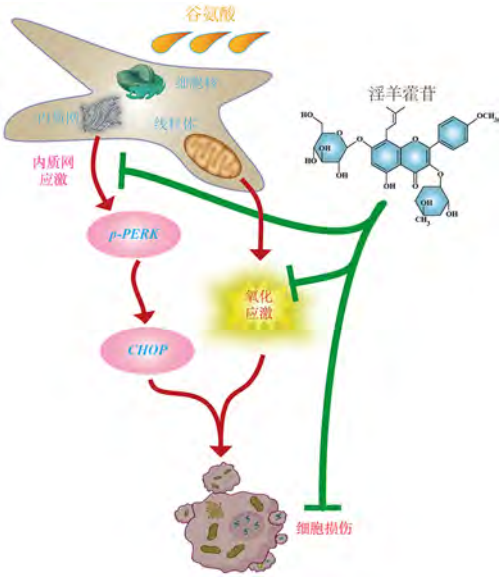


图 6 ICA 通过抑制 ERS 通路保护 HT22 细胞抗 Glu 损伤的机制图

[参考文献]

[1] Jakaria M, Park SY, Haque ME, et al. Neurotoxic agent-induced injury in neurodegenerative disease model: focus on involvement of glutamate receptors[J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 307. doi: 10.3389/fnmol.2018.00307.

[2] Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury[J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(6): 657 – 668. doi: 10.1007/s00018 – 003 – 3319 – x.

[3] Choi AY, Choi JH, Lee JY, et al. Apigenin protects HT22 murine hippocampal neuronal cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. Neurochem Int, 2010, 57(2): 143 – 152. doi: 10.1016/j.neuint.2010.05.006.

[4] Li J, O W, Li W, et al. Oxidative stress and neurodegenerative disorders[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(12): 24438 – 24475. doi: 10.3390/ijms141224438.

[5] Jin ML, Park SY, Kim YH, et al. The neuroprotective effects of cordycepin inhibit glutamate-induced oxidative and ER stress-associated apoptosis in hippocampal HT22 cells[J]. Neurotoxicology, 2014, 41: 102 – 111. doi: 10.1016/j.neuro.2014.01.005.

[6] 高宁辛,马宇昕,田素民,等. 淫羊藿苷通过调节 PGRN 表达减轻 L-谷氨酸诱导的 HT22 细胞损伤[J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(6): 679 – 684. doi: 10.16557/j.cnki.1000 – 7547.2017.06.006.

[7] Liu B, Zhang H, Xu C, et al. Neuroprotective effects of icariin on corticosterone-induced apoptosis in primary cultured rat hippocampal neurons[J]. Brain Res, 2011, 1375: 59 – 67. doi: 10.1016/j.brainres.2010.12.053.

[8] Zeng KW, Ko H, Yang HO, et al. Icariin attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity by inhibition of tau protein hyperphosphorylation in PC12 cells[J]. Neuropharmacology, 2010, 59(6): 542 – 550. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.07.020.

[9] Tobaben S, Grohm J, Seiler A, et al. Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(2): 282 – 292. doi: 10.1038/cdd.2010.92.

[10] Choi JH, Choi AY, Yoon H, et al. Baicalein protects HT22 murine hippocampal neuronal cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through inhibition of reactive oxygen species production and CHOP induction[J]. Exp Mol Med, 2010, 42(12): 811 – 822. doi: 10.3858/emm.2010.42.12.084.

[11] 屈洪党. 神经系统疾病的诊断原则[J]. 中华全科医学, 2014, 12(7): 1015 – 1016.

[12] 邓 奕,汪 宁,朱 荃,等. 神经细胞损伤的细胞模型研究概况[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(2): 374 – 376.

[13] Jeong GS, Byun E, Li B, et al. Neuroprotective effects of constituents of the root bark of Dictamnus dasycarpus in mouse hippocampal cells[J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(8): 1269 – 1275. doi: 10.1007/s12272 – 010 – 0818 – 9.

[14] Elphick LM, Hawat M, Toms NJ, et al. Opposing roles for caspase and calpain death proteases in L-glutamate-induced oxidative neurotoxicity[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 232(2): 258 – 267. doi: 10.1016/j.taap.2008.07.008.

[15] Sukprasansap M, Chanvorachote P, Tencomnao T. Cleistocalyx nervosum var. paniala berry fruit protects neurotoxicity against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. Food Chem Toxicol, 2017, 103: 279 – 288. doi: 10.1016/j.fct.2017.03.025.

[16] 宋宜祥,黎巍威,王学美. 淫羊藿苷神经保护作用机制研究进展[J]. 环球中医药, 2014, 7(4): 300 – 304. doi: 10.3969/j.issn.1674 – 1749.2014.04.018.

[17] Makarova MN, Pozharitskaya ON, Shikov AN, et al. Effect of lipid-based suspension of Epimedium koreanum Nakai extract on sexual behavior in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 114(3): 412 – 416. doi: 10.1016/j.jep.2007.08.021.

[18] 路宇仁,陈跌冰,崔元璐,等. 淫羊藿苷药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24: 209 – 220. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20181734.

doi:10.11659/jjssx.08E020102

·基础研究·

不同浓度多聚赖氨酸溶液对同种异体骨进行表面改性的实验研究

笪 虎[1],张建中[2],宋建宽[1],徐长明[1],熊 卓[3] (1.涟水县人民医院骨科,江苏 涟水 223400;2.淮安市急救中心,江苏 淮安 223001;3.清华大学机械工程系,北京 100084)

[摘 要] **目的** 探讨多聚赖氨酸溶液对兔同种异体骨进行表面改性使其具有良好的细胞亲和力与最低细胞毒性的最佳浓度。**方法** 使用浓度为100 mg/mL、30 mg/mL、1 mg/mL、0.1 mg/mL、0.025 mg/mL和0.01 mg/mL的多聚赖氨酸溶液,采取冻干法,分别对兔同种异体骨的微孔进行表面改性。根据多聚赖氨酸浓度,将兔同种异体骨分为100 mg/mL组、30 mg/mL组、1 mg/mL组、0.1 mg/mL组、0.025 mg/mL组和0.01 mg/mL组,同时,将未行表面改性的同种异体骨设为空白对照组。将兔骨髓间充质干细胞(BMSCs)分别种植在各组同种异体骨内,并向成骨方向进行诱导和增殖。采用噻唑蓝(MTT)比色试验检测BMSCs在各组同种异体骨微孔表面的黏附、增殖情况,同时检测各组经诱导培养后的细胞表达碱性磷酸酶(ALP)的活性。**结果** 在经不同浓度多聚赖氨酸溶液表面改性的同种异体骨中,空白对照组和0.01 mg/mL组BMSCs增殖及其表达ALP的活性明显小于其他各组($P<0.05$),而其他各组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 从经济、有效方面考虑,多聚赖氨酸溶液对同种异体骨进行表面改性的最佳浓度为0.025 mg/mL,该浓度可使同种异体骨具有良好的细胞亲和力与最低的细胞毒性。

[关键词] 多聚赖氨酸;浓度;同种异体骨;表面改性;细胞亲和力;细胞毒性

[中图分类号] R318.08 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-08-15

Effect of different concentrations of polylysine on surface modification of allograft bone

DA Hu[1],ZHANG Jian-zhong[2],SONG Jian-kuan[1],XU Chang-ming[1],XIONG Zhuo[3] (1.Department of Orthopedics,Lianshui County People's Hospital,Lianshui Jiangsu 223400,China;2.Huaian City Emergency Center,Huaian Jiangsu 223001,China;3.Department of Mechanical Engineering,Tsinghua University,Beijing 100084,China)

Abstract: Objective To investigate the best concentration of polylysine solution for surface modification of rabbit allograft bone with good cell affinity and minimum cytotoxicity. **Methods** The polylysine solution with concentrations of 100 mg/mL,30 mg/mL,1 mg/mL,

[基金项目] 国家自然科学基金(31070860)

[通信作者] 熊 卓,E-mail:xiongzhuo9@mails.thu.edu.cn

[19] Li XA,Ho YS,Chen L,et al. The protective effects of icariin against the homocysteine-induced neurotoxicity in the primary embryonic cultures of rat cortical neurons[J]. Molecules,2016,21(11):1557. doi:10.3390/molecules21111557.

[20] Zhang X,Sun H,Su Q,et al. Antidepressant-like activity of icariin mediated by group I mGluRs in prenatally stressed offspring[J]. Brain Dev,2017,39(7):593-600. doi:10.1016/j.braindev.2017.03.021.

[21] Chen ZW,Liu A,Liu Q,et al. MEF2D mediates the neuroprotective effect of methylene blue against glutamate-induced oxidative damage in ht22 hippocampal cells[J]. Mol Neurobiol,2017,54(3):2209-2222. doi:10.1007/s12035-016-9818-1.

[22] Akanda MR,Kim MJ,Kim IS,et al. Neuroprotective effects of sigesbeckia pubescens extract on glutamate-induced oxidative stress in HT22 cells via downregulation of MAPK/caspase-3 pathways[J]. Cell Mol Neurobiol,2018,38(2):497-505. doi:10.1007/s10571-017-0496-y.

[23] Spinelli JB,Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism[J]. Nat Cell Biol,2018,20(7):745-754. doi:10.1038/s41556-018-0124-1.

[24] 李 响,吴振起,马雪涛,等.注射用血栓通对大鼠血管内皮细胞凋亡机制的影响[J].中华中医药杂志,2010,25(7):1137-1139.

[25] 龚其海,杨丹莉,石京山,等.淫羊藿苷的神经药理作用及分子机制研究进展[J].中国新药与临床杂志,2011,30(7):481-486.

[26] 彭智远,刘旺华,曹 雯.脑缺血再灌注损伤细胞凋亡机制的研究进展[J].中华中医药学刊,2017,35(8):1957-1961. doi:10.13193/j.issn.1673-7717.2017.08.008.

[27] 方向楠,秦彦文,岳卫东.内质网应激与缺血性脑血管病的研究进展[J].中华老年心脑血管病杂志,2016,18(4):441-443. doi:10.3969/j.issn.1009-0126.2016.04.030.

[28] McCullough KD,Martindale JL,Klotz LO,et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state[J]. Mol Cell Biol,2001,21(4):1249-1259. doi:10.1128/mcb.21.4.1249-1259.2001.

[29] Puthalakath H,O'Reilly LA,Gunn P,et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim[J]. Cell,2007,129(7):1337-1349. doi:10.1016/j.cell.2007.04.027.

[30] Wasiak S,Zunino R,McBride HM. Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death[J]. J Cell Biol,2007,177(3):439-450. doi:10.1083/jcb.200610042.

(编辑:贺绍梅)