

· 论 著 ·

獐牙菜苦苷对 PC12 细胞氧糖剥夺再灌注损伤的保护作用及机制

王 慧^{1,2}, 兰小兵², 郑 萍², 王 晴², 马 琳², 杨佳美², 刘 宁^{2,3}, 余建强^{2,3}

[1. 苏州大学附属独墅湖医院(苏州大学医学中心), 江苏 苏州 215000; 2. 宁夏医科大学药学院, 宁夏 银川 750004; 3. 宁夏特色中医药协同创新中心, 宁夏药物创新与仿制药研究重点实验室, 宁夏 银川 750004]

摘要:目的 探讨獐牙菜苦苷(Swe)对 PC12 细胞氧糖剥夺再灌注(OGD/R)损伤的保护作用及其机制。方法 ① 将 PC12 细胞放入恒温缺氧箱内(缺氧缺糖)4 h,再置 CO₂ 培养箱正常培养(再灌注)24 h 构建 PC12 细胞 OGD/R 模型。再灌注同时分别给予溶剂(OGD/R 模型组)、Swe 0.1, 1.0 和 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Swe 组)或阳性对照药尼莫地平 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (尼莫地平组)。MTT 法检测细胞存活率;试剂盒检测乳酸脱氢酶(LDH)漏出率;DCFH-DA 荧光探针检测 PC12 细胞内活性氧(ROS)含量;比色法测定超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)含量;Fluo-3 AM 荧光探针测定 PC12 细胞内 Ca²⁺ 浓度,JC-1 探针检测线粒体膜电位(MMP)水平。② 构建 PC12 细胞 OGD/R 模型,再灌注同时分别给予溶剂(OGD/R 模型组)、Swe 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Swe 组)或尼莫地平 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (尼莫地平组),流式细胞术检测细胞凋亡;Western 印迹法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达及胱天蛋白酶 3 活化水平。结果 ① 与细胞对照组相比,OGD/R 模型组细胞存活率显著降低,LDH 漏出率显著增加,Ca²⁺ 浓度显著升高,MMP 水平显著降低,ROS 和 MDA 含量显著增加,SOD, CAT 和 GSH-Px 活性显著降低,细胞凋亡率显著升高,Bcl-2/Bax 比值显著降低,胱天蛋白酶 3 活化水平显著增加(均 $P<0.01$)。与 OGD/R 模型组相比,Swe 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞 SOD 和 CAT 活性显著增强,胞内 Ca²⁺ 浓度及 ROS 和 MDA 含量显著降低($P<0.05$);Swe 1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组及尼莫地平组细胞存活率显著增加,LDH 漏出率显著降低,Ca²⁺ 浓度显著降低,MMP 水平显著升高,ROS 和 MDA 含量显著降低,SOD, CAT 和 GSH-Px 活性显著增强($P<0.05$, $P<0.01$)。② 与 OGD/R 模型组相比,Swe 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和尼莫地平组细胞凋亡率显著降低($P<0.01$);Swe 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Bcl-2/Bax 比值显著增加,胱天蛋白酶 3 活化水平显著降低($P<0.01$)。结论 Swe 对 PC12 细胞 OGD/R 损伤具有保护作用,其作用机制与抗氧化应激损伤和细胞凋亡有关。

关键词: 獐牙菜苦苷; PC12 细胞; 氧糖剥夺再灌注; 神经保护; 氧化应激

中图分类号: R285, R743

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2022)02-0090-08

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.02.002

脑卒中具有高死亡率和致残率的特点^[1-2],严重威胁人类健康,其中约 87% 属于缺血性脑卒中,又称脑缺血,是指由于各种原因引起的脑供血不足,缺血缺氧导致脑组织的软化和坏死^[3-4]。对于缺血性脑卒中的治疗,目前临床所用药物主要为组织纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA)等溶栓药物,然而由于其适应证和治疗时间窗窄,仅有 2%~5% 脑卒中患者能接受 tPA 治疗,其中

50% 能达到再灌注;此外,使用 tPA 治疗恢复血液供应后,其脑功能不但没有恢复,反而加重了脑损伤,称为脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemic/reperfusion injury, CIRI),限制了 tPA 等溶栓药物在临床上的使用。因此,进一步寻找疗效好、毒性低的抗缺血性脑损伤的神经保护药物,仍是目前亟待解决的重大问题。

CIRI 的机制复杂,大量研究证实,氧化应激在其发病机制中有重要作用,再灌注时,活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平急剧增加,引起线粒体损伤、钙超载、线粒体膜电位水平发生改变、能量代谢障碍和神经元凋亡^[5-6]。因此,可以通过抑制氧化应激,从而减少 CIRI^[7]。獐牙菜苦苷(swertiamarin,

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2017BY079); 宁夏医科大学优势学科群项目(XY201804)

作者简介: 王 慧,硕士,初级药师,主要从事神经药理学研究, E-mail: 1948697634@qq.com

通讯作者: 余建强, E-mail: YujqLab@163.com

Swe)是从中药秦艽(*Gentiana macrophylla*, Pall)中提取的主要活性成分之一。秦艽有多种药理作用,包括抗炎、镇痛、抗肿瘤及保护肝和心脑血管^[8-9]。有研究表明,秦艽的水煎液对家兔全脑缺血损伤模型有一定的保护作用^[10]。Swe具有抗炎、抗氧化和镇静等药理活性^[11]。本课题组前期研究发现,Swe对CIRI的ICR小鼠具有神经保护作用,该作用与激活核转录因子红系 2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2),减少氧化应激损伤有关^[12];但对 PC12 细胞氧糖剥夺再灌注(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)损伤是否具有保护作用未见报道。因此,本研究通过建立 PC12 细胞 OGD/R 损伤模型,探讨 Swe 的神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 PC12 细胞和细胞培养

PC12 细胞由中国科学院昆明动物研究所提供。将 PC12 细胞用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基置含 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中培养。

1.2 药品、试剂和主要仪器

Swe(纯度>99%),北京中科质检生物技术有限公司;MTT、Fluo-3 AM 荧光探针钙离子浓度检测试剂盒和 JC-1 荧光探针线粒体膜电位检测试剂盒,上海碧云天生物技术公司;胎牛血清和胰蛋白酶,美国 Gibco 公司;尼莫地平(nimodipine)注射液,德国 Bayer 公司;Earle's 平衡盐溶液(Earle's balanced salt solution, EBSS),北京博奥拓达科技有限公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,瑞士 Roche 公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒、过氧化氢酶(catalase, CAT)检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒和活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒,南京建成生物工程研究所;兔抗大鼠 Bcl-2、Bax、胱天蛋白酶 3 和活化胱天蛋白酶 3 多克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗,英国 Abcam 公司。细胞培养箱(HF160W),力康生物医疗科技控股有限公司;酶标仪(Model 550),美国 Bio-Rad 生命医学产品有限公司;倒置显微镜(BH-NIC-B),日本奥林巴斯光学有限公司;激光共聚焦显微镜(TCS-SP),德国莱卡显微系统有限公司。

1.3 PC12 细胞 OGD/R 模型构建和分组给药

将 PC12 细胞从培养箱取出,弃掉培养液,用 EBSS 轻轻洗 3 遍,加入适量的 EBSS,置 37℃ 恒温缺氧箱(95% N₂ 和 5% CO₂)内缺氧 4 h(缺氧缺糖)。缺氧结束后轻轻取出培养皿,弃 EBSS,换成常规 1640 培养液进行培养,在 37℃ CO₂ 培养箱中培养 24 h(再灌注)。

实验分为细胞对照组、OGD/R 模型组、尼莫地平(阳性对照药)组和 Swe(0.1, 1.0 和 10.0 μmol·L⁻¹)组。除细胞对照组外,其余各组均进行 OGD/R 处理,模型组氧糖剥夺 4 h 后,换成常规培养基继续培养 24 h,尼莫地平组再灌注的同时加尼莫地平 12 μmol·L⁻¹,Swe 组再灌注的同时分别加 Swe 0.1, 1.0 和 10.0 μmol·L⁻¹,细胞对照组换成同体积培养基。

1.4 MTT 法检测 PC12 细胞存活率

将 PC12 细胞接种在 96 孔板中,每孔 6×10³ 细胞,细胞 OGD/R 模型构建和分组给药同 1.3,每孔加入 20 μL MTT(5 g·L⁻¹),在培养箱中孵育 4 h,轻轻吸掉上清,加入 DMSO 溶液 150 μL,震荡 10 min 后,用酶标仪在波长 490 nm 条件下测定各组吸光度值(A_{490 nm})。

1.5 比色法检测 PC12 细胞 LDH 漏出率

细胞 OGD/R 模型构建和分组给药同 1.3,将 PC12 细胞从培养箱中取出,收集各组细胞培养液,PBS 轻轻冲洗细胞 3 次,然后用胰酶消化收集细胞,超声破碎细胞 15 s,重复 3 次得细胞匀浆,根据 LDH 检测试剂盒说明书操作流程,用酶标仪在 440 nm 波长下分别检测培养液和细胞匀浆的吸光度值(A_{440 nm})。LDH 漏出率(%)=培养液 A_{440 nm}/(培养液 A_{440 nm}+细胞匀浆 A_{440 nm})×100%。

1.6 Fluo-3 AM 荧光探针法检测 PC12 细胞内 Ca²⁺ 浓度

将细胞接种在激光共聚焦专用培养皿中,细胞 OGD/R 模型构建和分组给药同 1.3。PC12 细胞从培养箱中取出,用 PBS 洗 3 遍,每次 5 min,按照试剂盒说明书操作,加入 Fluo-3 AM 工作液孵育 30 min,用 PBS 洗 3 遍,用激光共聚焦显微镜在激发波长 488 nm,发射波长 527 nm 条件下观察并采集图像,用 Olympus FV10-ASW4.1 Viewer 和 Image J 分析荧光强度,以荧光强度反映细胞内 Ca²⁺ 浓度。

1.7 JC-1 荧光探针法检测 PC12 细胞线粒体膜电位

将 PC12 细胞接种在共聚焦皿中,细胞 OGD/R 模型构建和分组给药同 1.3。弃培养基,加入根据试剂盒说明书提前配制好的 JC-1 染色工作液,在培养箱中染色 25 min,之后用 JC-1 染色缓冲液洗

3 遍,加入 2 mL 1640 培养基在显微镜下观察并采集图像。线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)较高时,JC-1 在线粒体中形成聚合物,产生红色荧光;MMP 较低时,JC-1 为单体,产生绿色荧光^[13]。通过计算各组红、绿荧光强度比值反映 PC12 细胞 MMP。

1.8 比色法检测 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性及 ROS 和 MDA 的含量

将细胞种植在 35 mm 培养皿中,细胞 OGD/R 模型构建和分组给药同 1.3。弃掉培养液,细胞用 PBS 洗 1 遍。按照试剂盒说明书操作,用荧光分光光度计检测 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性及 ROS 和 MDA 含量。

1.9 流式细胞术检测细胞凋亡

将 PC12 细胞接种在培养皿中,实验分为细胞对照组、OGD/R 模型组、尼莫地平(阳性对照药)组和 Swe (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。细胞 OGD/R 模型构建和给药方法同 1.3。按照 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书进行操作,收集 PC12 细胞用冷的 PBS 洗 3 遍,用 400 μL 结合液重悬细胞,加入 Annexin V-FITC 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 15 min,最后加入反应混合液孵育 5 min,用流式细胞仪检测分析细胞凋亡率。

1.10 Western 印迹法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达及胱天蛋白酶 3 活化水平

将 PC12 细胞接种在 60 mm 的培养皿中,实验分为细胞对照组、OGD/R 模型组和 Swe (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。细胞 OGD/R 模型构建和给药方法同 1.3。按全蛋白提取试剂盒说明操作,裂解细胞,用 BCA 蛋白检测试剂盒检测细胞总蛋白含量,通过 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白并转印到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉孵育封闭 2 h 后加入一抗(Bcl-2、Bax、胱天蛋白酶 3 和活化的胱天蛋白酶 3 抗体分别以 1:1000, 1:1000, 1:800 和 1:500 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;加入二抗(1:2000 稀释)室温孵育 2 h, ECL 显色后曝光检测蛋白条带印迹。利用 Image J 软件测定蛋白条带积分吸光度值,用目标蛋白与内参蛋白条带积分吸光度值的比值表示目标蛋白的相对表达水平。用活化蛋白与总蛋白条带积分吸光度值的比值表示蛋白活化水平。

1.11 统计学分析

实验结果数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS21.0 软件进行统计和分析,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Swe 对 OGD/R 损伤的 PC12 细胞存活率的影响

MTT 实验结果(图 1)显示,与细胞对照组[(98.3 $\pm$ 1.6)%]比较,OGD/R 模型组细胞存活率显著降低至(46 $\pm$ 4)% ($P<0.01$);Swe 1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞存活率分别为(58 $\pm$ 3)%和(65.5 $\pm$ 1.6)%,尼莫地平组为(67.7 $\pm$ 2.6)%,与模型组比较,均显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。

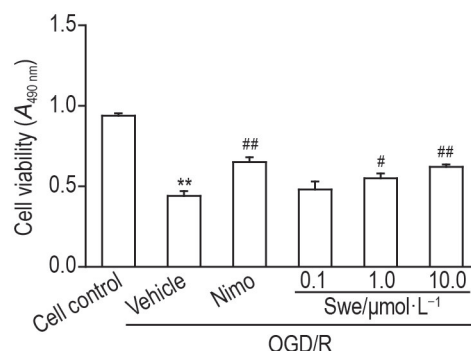


Fig. 1 Effect of swertiamarin (Swe) on viability of PC12 cells injured by oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) detected by MTT assay. PC12 cells were cultured in glucose-free Earle's balanced salt solution (EBSS) and placed in oxygen-deprived incubator for 4 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, then the EBSS was replaced with regular medium and placed back into an incubator under normal conditions to undergo reperfusion for 24 h. PC12 cells were treated with vehicle (OGD/R model group), Swe 0.1, 1, and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or nimodipine (Nimo) 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h in the entire process of reperfusion. $\bar{x}\pm s$, $n=6$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with OGD/R model group.

2.2 Swe 对 OGD/R 损伤的 PC12 细胞 LDH 漏出率的影响

LDH 漏出率检测结果(图 2)显示,与细胞对照组[(5.5 $\pm$ 1.1)%]比较,OGD/R 模型组 LDH 漏出率增加至(19.4 $\pm$ 1.2)% ($P<0.01$);与模型组比较, Swe 1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和尼莫地平组 LDH 漏出率明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

2.3 Swe 对 OGD/R 损伤的 PC12 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

图 3 结果显示,与细胞对照组比较,OGD/R 模型组绿色荧光强度显著增强($P<0.01$),提示细胞内 Ca^{2+} 浓度升高;与 OGD/R 模型组比较, Swe 0.1, 1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和尼莫地平组绿色荧光强度减弱,提示 Ca^{2+} 浓度均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

2.4 Swe 对 OGD/R 损伤的 PC12 细胞 MMP 的影响

MMP 检测结果(图 4)显示,与细胞对照组比

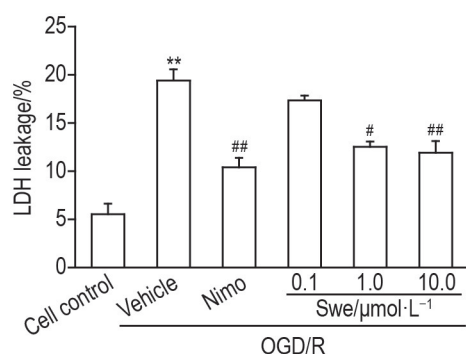


Fig.2 Effect of Swe on lactate dehydrogenase (LDH) leakage of PC12 cells injured by OGD/R. See Fig. 1 for the cell treatment. LDH leakage (%) = $A_{440 \text{ nm supernatant}} / A_{440 \text{ nm supernatant}} + A_{440 \text{ nm intracellular}} \times 100\%$. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with OGD/R model group.

较, OGD/R 模型组红/绿荧光比值显著降低 ($P<0.01$); 与 OGD/R 模型组比较, Swe 1 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和尼莫地平组红/绿荧光比值显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

2.5 Swe 对 OGD/R 损伤的 PC12 细胞氧化应激水平的影响

PC12 细胞氧化应激水平检测结果 (图 5) 显示, 与细胞对照组比较, OGD/R 模型组 PC12 细胞 ROS 和 MDA 水平显著升高 ($P<0.01$), SOD, CAT 和 GSH-Px 的活性显著降低 ($P<0.01$); 与 OGD/R 模型组比较, Swe 0.1, 1 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组及尼莫地平组细胞 ROS 和 MDA 水平显著降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), SOD, CAT 和 GSH-Px 的活性显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

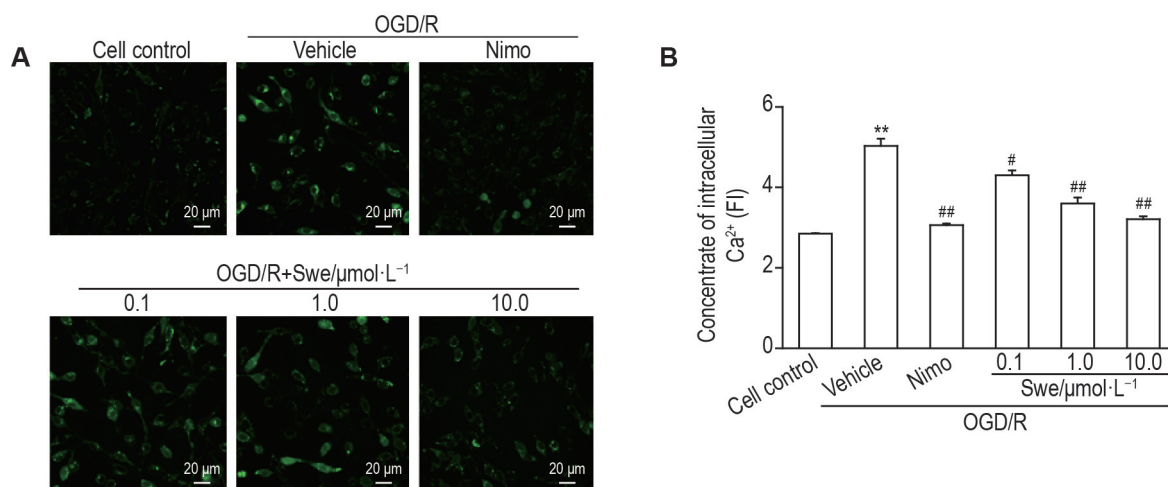


Fig.3 Effect of Swe on intracellular Ca^{2+} concentration of PC12 cells injured by OGD/R by Fluo-3 Am fluorescent probe detection. See Fig.1 for the cell treatment. B was the quantitative result of A. FI: fluorescence intensity. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with OGD/R model group.

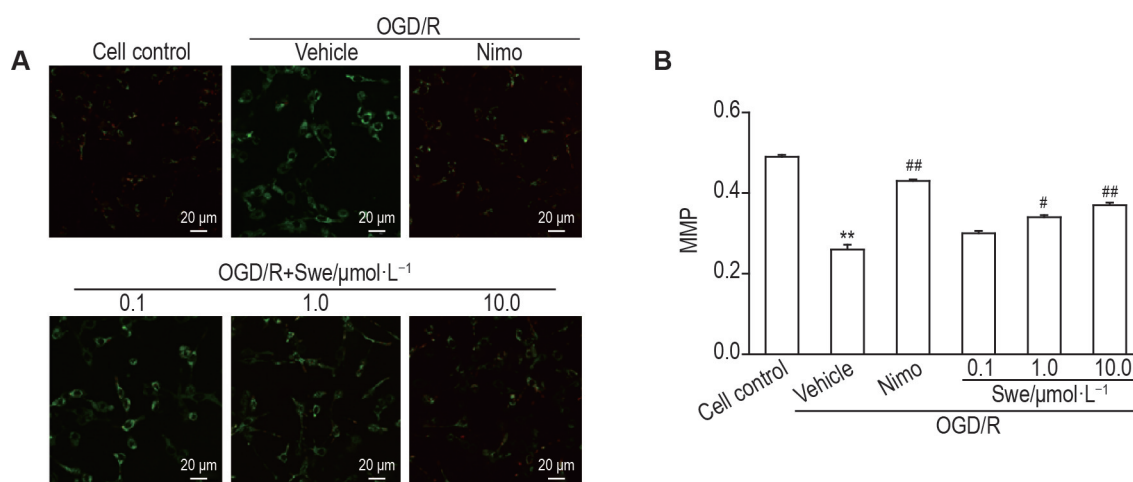


Fig.4 Effect of Swe on mitochondrial membrane potential (MMP) of PC12 cells injured by OGD/R by JC-1 probe detection. See Fig.1 for the cell treatment. B was the quantitative result of A. $\text{MMP} = \text{FI}_{\text{Red}} / \text{FI}_{\text{Green}}$. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with OGD/R model group.

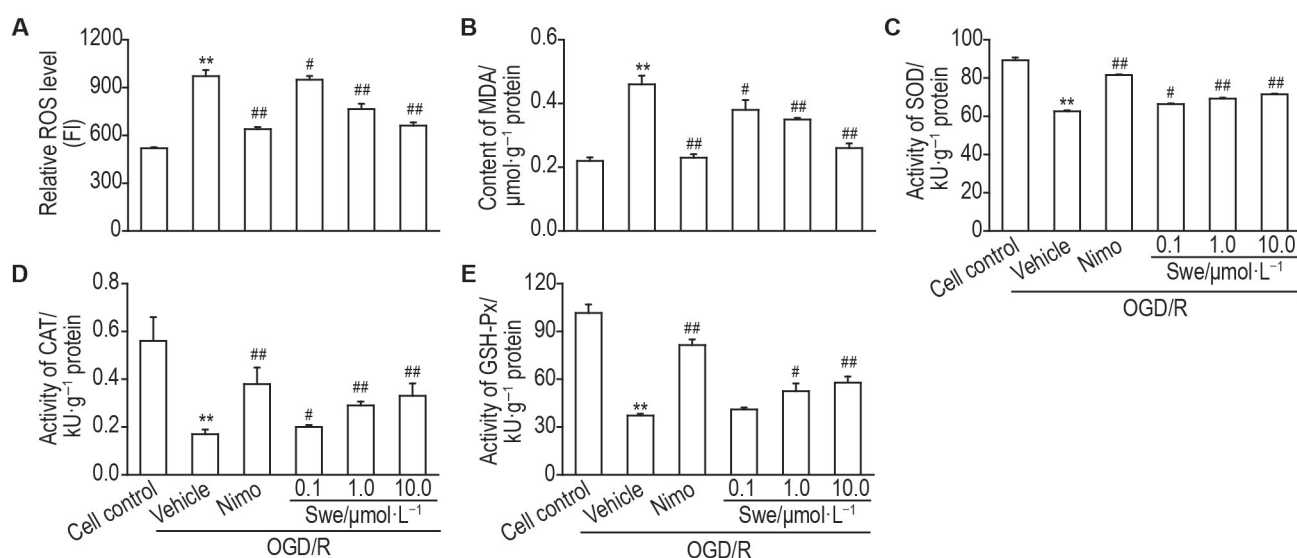


Fig.5 Effect of Swe on oxidative stress of PC12 cells injured by OGD/R. See Fig.1 for the cell treatment. ROS: reactive oxygen species; MDA: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GSH-Px: glutathione peroxidase. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ** $P < 0.01$, compared with cell control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with OGD/R model group.

2.6 Swe对OGD/R损伤的PC12细胞凋亡的影响

细胞凋亡检测结果(图6)显示,与细胞对照组比较,OGD/R模型组细胞早期凋亡率和细胞死亡率明显增加($P < 0.01$);与OGD/R模型组比较,Swe $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和尼莫地平显著降低细胞早期凋亡率和细胞死亡率($P < 0.01$)。

2.7 Swe对OGD/R损伤的PC12细胞Bcl-2和Bax蛋白表达及胱天蛋白酶3活化水平的影响

Western 印迹检测结果(图7)显示,与细胞对照组比较,OGD/R模型组Bcl-2/Bax比值明显降低($P < 0.01$),胱天蛋白酶3活化水平明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,Swe $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组Bcl-2/Bax比例

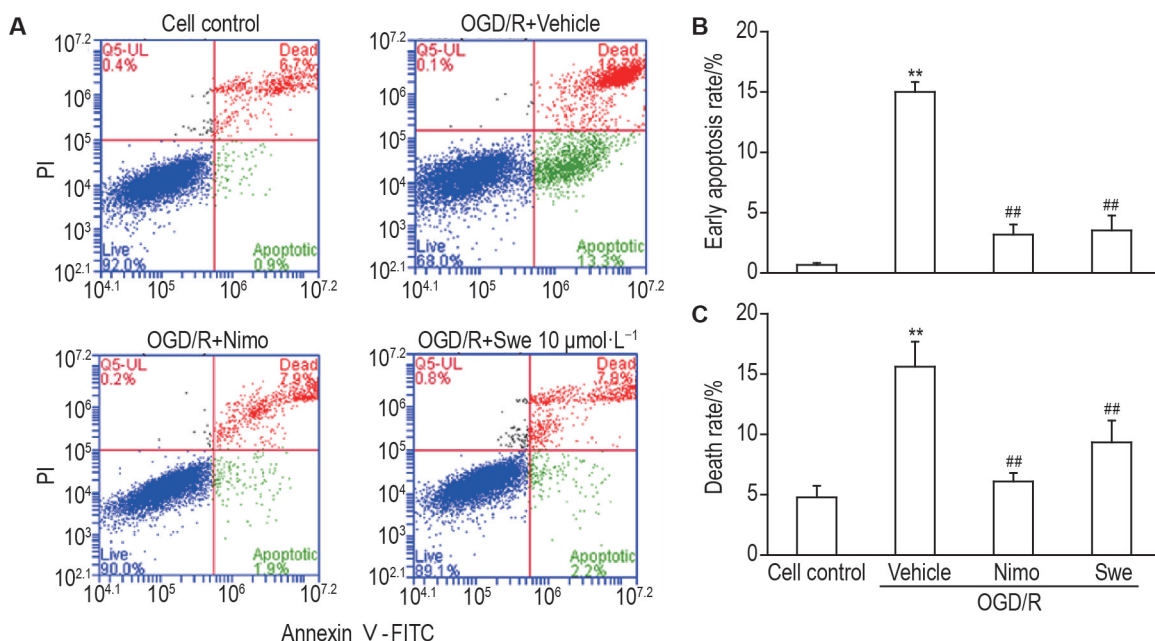


Fig.6 Effect of Swe on apoptosis of PC12 cells injured by OGD/R by flow cytometry. See Fig.1 for the cell treatment of OGD/R. PC12 cells were treated with Vehicle, Swe $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ or Nimo $12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h in the entire process of reperfusion. B and C were the quantitative results of A. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ** $P < 0.01$, compared with cell control group; ## $P < 0.01$, compared with OGD/R model group.

明显升高 ($P<0.01$), 胱天蛋白酶 3 活化水平明显降低 ($P<0.01$)。

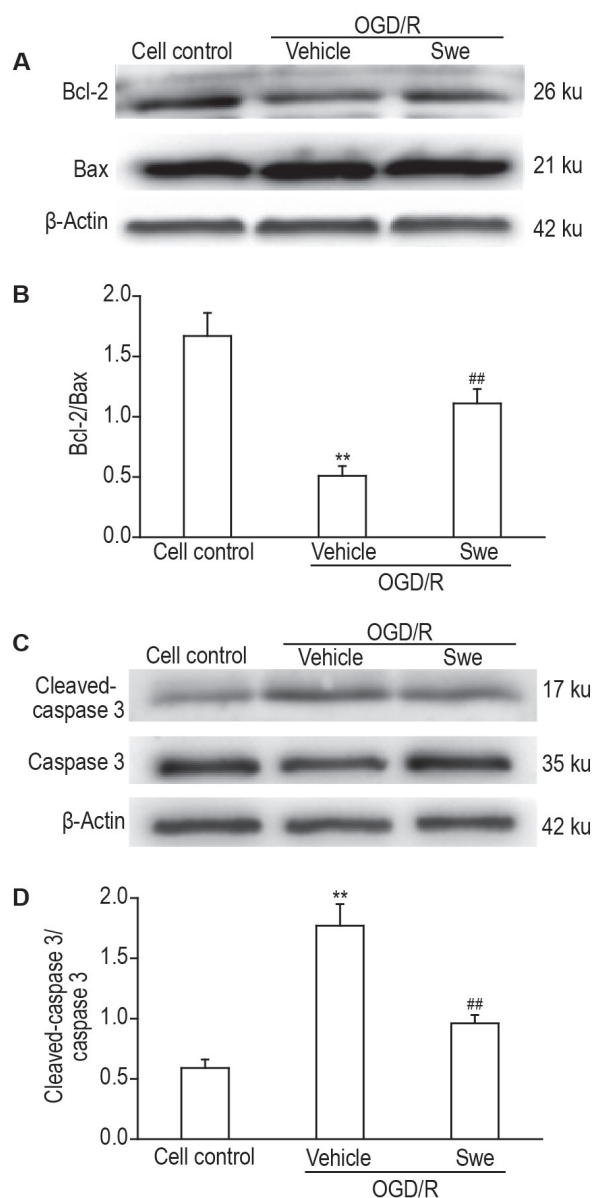


Fig.7 Effect of Swe on expression levels of Bcl-2 and Bax and activation level of caspase 3 in OGD/R injured PC12 cells by Western blotting. See Fig.1 for the cell treatment of OGD/R, and PC12 cells were treated with Swe $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h in the entire process of reperfusion. B and D were the quantitative results of A and C, respectively. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ** $P<0.01$, compared with cell control group; ## $P<0.01$, compared with OGD/R model group.

3 讨论

CIRI 的发病机制复杂, 大量研究表明, ROS 大量产生引起的氧化应激在 CIRI 的发生发展中起到关键作用。本课题组前期研究发现, Swe 在 ICR 小鼠大脑中动脉栓塞模型上可抗 CIRI, 具有神经保护作用^[12], 且该作用与激活 Nrf2 信号通路抑制氧化应激

损伤有关。本研究采用 PC12 细胞建立氧糖剥夺 4 h、再灌注 24 h 的体外 OGD/R 模型, MTT 法和 LDH 漏出率检测结果表明, Swe 组细胞存活率明显升高, LDH 漏出率明显降低, 说明 Swe 可降低 OGD/R 引起的 PC12 细胞损伤。Swe 可对抗 OGD/R 引起的 SOD, GSH-PX 和 CAT 活性降低及 ROS 和 MDA 含量增加, 说明 Swe 可以减少 PC12 细胞 OGD/R 引起的氧化应激损伤。

线粒体功能障碍与氧化应激密切相关。脑缺血再灌注会诱导氧化应激, 使 ROS 的水平增加, 改变线粒体膜电位, 导致细胞内 Ca^{2+} 浓度增加。 Ca^{2+} 超载可引起细胞损伤, 进一步加重氧化应激, 触发下游凋亡信号通路的激活。此外, MMP 能反映线粒体的功能和损伤程度, MMP 的降低最终导致细胞凋亡^[14-15]。因此, 维持细胞内 Ca^{2+} 水平和增加 MMP 可以降低 OGD/R 引起的 PC12 细胞损伤。本研究结果表明, Swe 显著抑制 OGD/R 损伤后 PC12 细胞内 Ca^{2+} 超载, 提高 MMP 水平。说明 Swe 能减少 OGD/R 引起的 PC12 细胞氧化应激和维持线粒体功能。

凋亡是脑缺血再灌注细胞死亡的主要方式之一。细胞凋亡受凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的调节, 其中促凋亡蛋白会激活下游胱天蛋白酶家族, 包括将凋亡执行蛋白胱天蛋白酶 3 激活成为活化的胱天蛋白酶 3, 从而引起 DNA 的损伤和细胞凋亡的产生^[16-18]。文献报道, 增加 Bcl-2/Bax 比例, 抑制胱天蛋白酶 3 活化水平可以减少细胞凋亡^[19-21]。本研究中, OGD/R 模型组细胞凋亡率增加, Bcl-2/Bax 明显降低, 胱天蛋白酶 3 活化水平明显增加, Swe 可显著减少 OGD/R 引起的 PC12 细胞凋亡。

综上所述, Swe 对 PC12 细胞 OGD/R 损伤具有保护作用, 且 Swe 的神经保护作用与抑制氧化应激、减少细胞凋亡有关, 此研究结果与前期在 ICR 小鼠体内研究结果相一致, 由此说明 Swe 有可能作为潜在的抗 CIRI 的神经保护剂。

参考文献:

- [1] Feigin VL, Mensah GA, Norrving B, *et al.* Atlas of the global burden of stroke (1990-2013): the GBD 2013 study[J]. *Neuroepidemiology*, 2015, 45(3): 230-236.
- [2] GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden

- of Disease Study 2016[J]. *Lancet*, 2017, 390(10100): 1211-1259.
- [3] Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, *et al*. The ASCOD phenotyping of ischemic stroke (Updated ASCO Phenotyping)[J/OL]. *Cerebrovasc Dis*, 2013, 36(1):1-5 [2021-03-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23899749/>. DOI: 10.1159/000352050.
- [4] Ouyang YB, Stary CM, Yang GY, *et al*. microRNAs: innovative targets for cerebral ischemia and stroke [J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(1): 90-101.
- [5] 郎丰山, 黄云霞, 薛云, 等. 脑缺血再灌注损伤病理生理机制研究进展[J]. 食品与药品(*Food and Drug*), 2018, 20(4): 312-316.
- [6] 周平, 谢伟杰, 孙桂波, 等. 缺血性脑卒中发病机制及药物干预研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘(*World Latest Medicine Information*), 2018, 18(34): 53-54+61.
- [7] Dirnagl U, Meisel A. Endogenous neuroprotection: mitochondria as gateways to cerebral preconditioning?[J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55(3): 334-344.
- [8] 王琳, 聂艳琼, 孙娜, 等. 秦艽的化学成分、分子生物学和药理学研究进展[J]. 安徽农业科学(*Journal of Anhui Agricultural Sciences*), 2012, 40(18): 9629-9630, 9638.
- [9] 刘建红, 李福安, 李建华. 秦艽水煎液对家兔全脑缺血再灌注损伤模型 HSP70 表达的影响[J]. 青海医学院学报(*Journal of Qinghai Medical College*), 2008, 29(1): 29-32.
- [10] 李冬梅, 肖怀, 刘光明. 獐牙菜属植物研究进展[J]. 大理学院学报(*Journal of Dali University*), 2007, 6(2):77-80.
- [11] 陈康, 吴涛, 宋红萍. 獐牙菜苦苷的药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床(*Drugs & Clinic*), 2016, 31(10): 1684-1688.
- [12] Wang H, Wei W, Lan X, *et al*. Neuroprotective effect of swertiamarin on cerebral ischemia/reperfusion injury by inducing the Nrf2 protective pathway[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(5): 2276-2286.
- [13] Zhu XJ, Shi Y, Peng J, *et al*. The effects of BAFF and BAFF-R-Fc fusion protein in immune thrombocytopenia[J]. *Blood*, 2009, 114(26): 5362-5367.
- [14] Kaneko Y, Tajiri N, Shoji H, *et al*. Oxygen-glucose-deprived rat primary neural cells exhibit DJ-1 translocation into healthy mitochondria: a potent stroke therapeutic target[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(3): 275-281.
- [15] Li Y, Wang M, Wang S. Effect of inhibiting mitochondrial fission on energy metabolism in rat hippocampal neurons during ischemia/reperfusion injury[J]. *Neurol Res*, 2016, 38(11): 1027-1034.
- [16] Tao T, Li CL, Yang WC, *et al*. Protective effects of propofol against whole cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through the inhibition of the apoptosis-inducing factor pathway[J]. *Brain Res*, 2016, 1644: 9-14.
- [17] Li K, Ding D, Zhang M. Neuroprotection of osthole against cerebral ischemia/reperfusion injury through an anti-apoptotic pathway in rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(3): 336-342.
- [18] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, *et al*. Control of apoptosis by the Bcl-2 protein family: implications for physiology and therapy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 49-63.
- [19] Lalier L, Cartron PF, Juin P, *et al*. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5): 887-896.
- [20] Aboutaleb N, Shamsaei N, Khaksari M, *et al*. Pre-ischemic exercise reduces apoptosis in hippocampal CA3 cells after cerebral ischemia by modulation of the Bax/Bcl-2 proteins ratio and prevention of caspase-3 activation[J]. *J Physiol Sci*, 2015, 65(5): 435-443.
- [21] Fan W, Dai Y, Xu H, *et al*. Caspase-3 modulates regenerative response after stroke[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(2): 473-486.

Protection of swertiamarin against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced injury in PC12 cells and mechanism

WANG Hui^{1,2}, LAN Xiao-bing², ZHENG Ping², WANG Qing², MA Lin²,
YANG Jia-mei², LIU Ning^{2,3}, YU Jian-qiang^{2,3}

[1. Dushu Lake Hospital Affiliated to Soochow University (Medical Center of Soochow University), Suzhou 215000, China; 2. College of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 3. Ningxia Characteristic Chinese Medicine Collaborative Innovation Center, Ningxia Key Laboratory of Pharmaceutical Innovation and Generic Drug Research, Yinchuan 750004, China]

Abstract: OBJECTIVE To explore the protective effect of swertiamarin (Swe) on oxygen-glucose

deprivation/reperfusion (OGD/R) injury in PC12 cells and the related mechanism. **METHODS** ① PC12 cells were placed into an anoxic incubator for hypoxia and glucose deficiency for 4 h before being placed into a CO₂ incubator for 24 h of normal culture to establish an OGD/R model. During reoxygenation, PC12 cells were maintained with vehicle (OGD/R group), Swe 0.1, 1 or 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Swe group) and nimodipine 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Nimo group). The survival rate of PC12 cell was detected by MTT assay, and the lactate dehydrogenase (LDH) leakage rate was detected by the LDH activity assay kit. The content of reactive oxygen species (ROS) in PC12 cells was detected by the DCFH-DA fluorescence probe. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of malondialdehyde (MDA) were determined using the colorimetric method. The Fluo-3 Am fluorescent probe was used to detect Ca²⁺ concentrations in PC12 cells, and the JC-1 probe was used to detect mitochondrial membrane potential (MMP). ② A PC12 cell OGD/R model was established that was maintained with vehicle (OGD/R model group), Swe 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Swe group) or Nimo 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Nimo group) along with reoxygenation. The level of apoptosis was detected by flow cytometry. Western blotting was used to detect the expression levels of Bcl-2 and Bax, as well as the activation level of caspase 3. **RESULTS** ① Compared with the cell control group, the cell survival rate was decreased, the leakage rate of LDH was increased, the Ca²⁺ concentration in PC12 cells was increased, the MMP was decreased in the OGD/R group, the activities of SOD, CAT and GSH-Px were decreased, the content of MDA was increased, cell apoptosis was increased, the ratio of Bcl-2/Bax was decreased and the activation level of caspase 3 was increased in the OGD/R group ($P<0.01$). Compared with the OGD/R group, the activities of SOD and CAT were increased in PC12 cells, the Ca²⁺ concentration and the contents of ROS and MDA were decreased in the Swe 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group ($P<0.05$), the cell survival rate was increased, the leakage rate of LDH was decreased, the Ca²⁺ concentration in PC12 cells was decreased, the MMP was increased, the activities of SOD, CAT and GSH-Px were increased, the contents of ROS and MDA were decreased in Swe 1 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups and Nimo group ($P<0.05$, $P<0.01$). ② Compared with the OGD/R group, cell apoptosis was decreased in the Swe 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group and Nimo group ($P<0.01$), the ratio of Bcl-2/Bax was increased and the activation of caspase-3 was decreased in the Swe 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group ($P<0.01$). **CONCLUSION** Swe protects PC12 cells from OGD/R-induced injury, and this effect is associated with inhibiting oxidative stress and reducing apoptosis.

Key words: swertiamarin; PC12 cells; oxygen-glucose deprivation/reperfusion; neuroprotection; oxidative stress

Foundation item: Key Research and Development Project of Ningxia Hui Autonomous Region (2017BY079); and Superior Subject Group Project of Ningxia Medical University (XY201804)

Corresponding author: YU Jian-qiang, E-mail: YujqLab@163.com

(收稿日期: 2021-03-21 接受日期: 2021-12-05)

(本文编辑: 赵楠)