

肝豆汤对 Wilson 病模型高铜诱导的 SH-SY5Y 细胞自噬效应的影响及其作用机制

黄雅楠, 董健健, 徐陈陈, 程楠, 韩咏竹*

(安徽中医药大学神经病学研究所附属医院, 合肥 230061)

[摘要] **目的:**研究肝豆汤对高铜诱导的人神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞自噬效应的影响及其作用机制,为中医药防治脑型 Wilson 病(Wilson disease, WD)提供新的治疗靶点和研究思路。**方法:**噻唑蓝(MTT)比色法筛选硫酸铜(CuSO_4)造模浓度(0,100,200,400,800,1 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)及时间;MTT 比色法筛选含药血清浓度(5%,10%,15%,20%)及时间;乳酸脱氢酶(LDH)释放实验检测细胞 LDH 漏出率;流式细胞法检测细胞内活性氧(ROS)的含量;荧光染料 JC-1 检测细胞线粒体膜电位;流式细胞仪对自噬进行定量分析。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝激酶 B_1 (LKB_1),腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK),自噬微管相关蛋白轻链 3A/B(LC3A/B),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR),unc-51 样激酶 1(ULK1),磷酸化 ULK(p-ULK),磷酸化 AMPK(p-AMPK)蛋白的表达。**结果:**MTT 结果显示, CuSO_4 对细胞的损伤呈现一定的量效和时效关系($P < 0.01$),随着 CuSO_4 作用浓度及时间的增加,细胞存活率呈现下降趋势;10% 含肝豆汤兔血清可显著抑制 CuSO_4 诱导的细胞死亡($P < 0.01$)。LDH 释放实验显示,与正常组比较, CuSO_4 作用细胞后 LDH 漏出率显著增加($P < 0.01$),与模型组比较,含肝豆汤兔血清明显降低 CuSO_4 损伤细胞的 LDH 漏出率($P < 0.05$)。DCFH-DA 荧光染色显示,与正常组比较, CuSO_4 可显著增加细胞内 ROS 生成($P < 0.01$),与模型组比较,含肝豆汤兔血清可显著抑制 CuSO_4 诱导的细胞内 ROS 产生($P < 0.01$)。JC-1 染色结果显示,与正常组比较, CuSO_4 诱导细胞线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 显著降低($P < 0.01$),与模型组比较,含肝豆汤兔血清明显抑制 CuSO_4 诱导的线粒体膜电位降低 $\Delta\psi_m$ ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示,与正常组比较,模型组细胞内 LKB_1 ,AMPK, LC3A/B ,ULK1 及 p-AMPK 蛋白的表达显著增加,mTOR 及 p-ULK 蛋白的表达显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,含肝豆汤兔血清组 LKB_1 ,AMPK, LC3A/B ,ULK1 及 p-AMPK 蛋白表达显著降低,mTOR 及 p-ULK 蛋白表达显著增加($P < 0.01$)。**结论:**高铜可通过诱导细胞内线粒体氧化应激,上调自噬相关蛋白 LKB_1 ,p-AMPK,AMPK, LC3A/B 及 ULK1 的表达,下调自噬相关蛋白 mTOR 及 p-ULK 的表达,导致细胞发生自噬性死亡,而肝豆汤可通过调控 LKB_1 /AMPK 信号通路,下调自噬相关蛋白 LKB_1 ,p-AMPK, LC3A/B ,ULK 及 AMPK 的表达,上调自噬相关蛋白及基因 mTOR 及 p-ULK 的表达,抑制自噬的发生,阻断高铜诱导的神经元损伤,从而发挥神经保护作用。

[关键词] 肝豆汤; Wilson 病; 自噬; 肝激酶 B_1 (LKB_1)/腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路; 氧化应激

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)07-0061-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190702

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181217.0955.002.html>

[网络出版时间] 2018-12-18 14:28

Effect of Gandou Decoction on Autophagy of SH-SY5Y Cell Induced by High Copper and Its Mechanism

HUANG Ya-nan, DONG Jian-jian, XU Chen-chen, CHENG Nan, HAN Yong-zhu*

(Hospital Affiliated to Neurological Institute, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Gandou decoction on autophagy of SH-SY5Y cells induced by high copper and its mechanism, in order to provide new therapeutic targets and research ideas for the prevention

[收稿日期] 20181010(026)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603596,81573954)

[第一作者] 黄雅楠, 硕士, 医师, 从事神经系统遗传性疾病研究, E-mail:1479101883@qq.com

[通信作者] * 韩咏竹, 教授, 从事神经系统遗传性疾病研究, E-mail:neurodoctorqlc@163.com

and treatment of brain-type Wilson disease (WD) with traditional Chinese medicine. **Method:** CuSO_4 model showed a certain dose-effect and time-effect relationship according to methyl thiazolyl tetrazolium (MTT); lactate dehydrogenase (LDH) leakage rate was detected by LDH release assay; flow cytometry method was used to detect intracellular reactive oxygen species (ROS) content. The fluorescent dye JC-1 was used to detect the mitochondrial membrane potential of the cells. Flow cytometry was used to quantify autophagy. The expressions of liver kinase B_1 (LKB_1), AMP-activated protein kinase (AMPK), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3A/B), mammalian target of rapamycin (mTOR) and UNC-51-like kinase-1 (ULK1), phosphorylation-ULK (p-ULK), phosphorylation-AMPK (p-AMPK) were detected by Western blot. **Result:** According to MTT results, CuSO_4 showed a dose-effect and time-effect relationship with cells ($P < 0.01$). With the increase of the dosage and time of CuSO_4 , the survival rate of cells showed a downward trend ($P < 0.01$). MTT results showed that 10% of rabbit serum containing Gandou decoction significantly inhibited CuSO_4 -induced cell death ($P < 0.01$). The results of MTT showed that the leakage rate of LDH increased significantly after treatment with CuSO_4 compared with the normal group ($P < 0.01$), and the rabbit serum of Gandou decoction significantly decreased the LDH leakage rate of CuSO_4 -injured cells ($P < 0.05$). DCFH-DA fluorescence staining showed that CuSO_4 significantly increased the production of ROS in cells ($P < 0.01$). The rabbit serum containing Gandou decoction significantly inhibited CuSO_4 -induced intracellular ROS production ($P < 0.01$). JC-1 staining showed that CuSO_4 induced a significant decrease in mitochondrial membrane potential in cells ($P < 0.01$), while serum containing Gandou decoction inhibited CuSO_4 -induced mitochondrial membrane potential in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The western blot results showed that compared with the normal group, the protein expressions of LKB_1 , AMPK, LC3A/B, ULK, p-AMPK in the model group were significantly increased, while the protein expressions of mTOR and p-ULK were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expressions of LKB_1 , AMPK, LC3A/B, p-AMPK and ULK were significantly decreased, whereas the protein expressions of mTOR and p-ULK were significantly increased in the rabbit serum group containing Gandou decoction ($P < 0.01$). **Conclusion:** High copper can induce autophagic apoptosis in SH-SY5Y cells by inducing intracellular mitochondrial oxidative stress, up-regulating the expressions of autophagy-related proteins LKB_1 , AMPK, LC3A/B, ULK, p-AMPK and down-regulating the expressions of mTOR and p-ULK. However, Gandou decoction can inhibit the occurrence of autophagy, and cut off high copper-induced neuronal damage by down-regulating the expressions of autophagy-related proteins LKB_1 , AMPK, LC3A/B, ULK, p-AMPK, and up-regulating the expression of mTOR and p-ULK, so as to exert a neuroprotective effect.

[**Key words**] Gandou decoction; Wilson's disease; autophagy; liver kinase B_1 (LKB_1) /AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway; oxidative stress

Wilson 病(Wilson disease, WD)是 13 号染色体上 *ATP7B* 基因突变,引起的常染色体隐性遗传性铜代谢障碍性疾病^[1]。1912 年,医师 Samuel Alexander Kinnier Wilson 在 Brain 杂志上对其临床症状及体征进行了详细的阐述^[2],临床上以肝损害、锥体外系症状与角膜色素环等为主要表现。该病由于 *ATP7B* 基因的突变,导致铜代谢障碍,过量的铜在多器官和组织沉积,其中肝脏和大脑最为明显^[3]。铜参与线粒体呼吸链、神经递质合成和铁代谢等多种生理过程,铜的过度蓄积导致大脑皮质神经元变性坏死、减少神经胶质细胞增生^[4]。过量铜在脑内的聚集还可以通过氧化应激和神经炎症导致

神经细胞凋亡^[5],维持铜的稳态对机体的正常生命活动非常重要,因此组织和细胞中铜的含量必须得到控制^[6]。

自噬是经过降解重新循环吸收促进细胞的存活,以维持细胞正常生理功能的过程^[7],而过度自噬又可以加剧细胞死亡。在高等真核细胞中,自噬与细胞分化,发育和细胞死亡有关,当然也与人类多种疾病有关,例如癌症和神经退行性疾病^[8]。在自噬的形成过程中受到多种自噬基因和蛋白的调控,其中正向是通过腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)调控自噬的,而负向则是通过雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mTORC1) 进行调控^[9],目前调控自噬的通路有

很多,但是肝激酶 B₁(LKB₁)/AMPK 通路是其中非常重要的一条。本实验通过研究高铜对自噬的影响,为研究 WD 神经元损伤提供新的思路。杨任民、韩咏竹等 Wilson 病研究团队首创“清热解毒、通腑利湿”治法,以鱼腥草、黄连、泽泻、大黄等组方肝豆汤治疗 WD 患者,明显改善了其临床症状^[10],在肝豆汤的基础上加减的肝豆汤改良方可以通过调控细胞色素 C(Cyt C)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)等信号通路,改善高铜对脑的损伤^[11]。有实验表明肝豆汤联合二巯基丙磺酸钠疗法,减少了驱铜治疗引起的白细胞减少等症,显著改善了神经功能、保护肝脏,无肾功能损害,可为短期冲击治疗的首选方案^[12]。肝豆汤联合二巯基丙磺酸钠显著改善了 WD 病认知功能,及血清中的超氧化物歧化酶(SOD),同型半胱氨酸(HCY)水平,驱铜疗效明显^[13]。神经元自噬及其调控通路是目前科学的研究热点,而高铜可通过多种途径诱导自噬,其可能是脑型 WD 患者神经元损伤的重要环节。但目前尚不能完全阐明肝豆汤对高铜诱导的神经元损伤的具体疗效机制和作用靶点。因此,研究肝豆汤对高铜诱导的细胞自噬效应及其作用机制,对脑型 WD 患者的治疗有重要意义。

1 材料

1.1 细胞与动物 人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司(HNCL-014)。30 只家兔购自南京安立默科技有限公司,合格证号 SCXK(苏)2015-0004。本动物实验经安徽中医药大学伦理委员批准(批准号 20170911023)。

1.2 药物与试剂 中药肝豆汤组方及剂量:大黄 20 g,黄连 20 g,姜黄 20 g,金钱草 24 g,泽泻 24 g,三七 3 g(由安徽中医药大学神经病学研究所附属医院中药房提供,经安徽中医药大学药学院金传山教授鉴定均为正品)。丁苯酞(石药集团恩必普药业有限公司,批号 061102);MEM,DMEM-F12 培养基(美国 Gibco 公司,批号分别为 41500021,21600-015);胎牛血清(FBS,美国 Hyclone 公司,批号 10099141);最高灵敏度化学发光底物(Super Signal West Femto,美国 Pierce 公司,批号 21059);兔抗 mTOR,unc-51 样激酶 1(ULK1),自噬微管相关蛋白轻链 3(LC)3A/B, LKB1, p-ULK, p-AMPK, AMPK, β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(英国 Abcam 公司,批号分别为

ab32034, ab44989, ab56236, ab113970, ab156920, ab72845, ab80039, ab8226, ab150077, ab205719);蛋白细胞裂解液,活性氧(ROS)荧光测定试剂盒,JC-1 荧光测定试剂盒,乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司,批号分别为 P0013, KA3842, abFS1169, C0016);细胞自噬(MDC)测试盒(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 M251);噻唑蓝(MTT)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 M1020)。

1.3 仪器 Wellscan-MK-III 型多功能酶标仪(美国 Thermo 公司);BX50 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Fine Do X6 型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);Power Pac Basic 型电泳仪,Mini-protein Mini-transfer 型电转槽(美国 Bio-Rad 公司);DW-HW138 型 -86 °C 超低温冰箱(中科菱低温科技有限责任公司);YX280B 型高压灭菌压力锅(上海三申医疗器械有限公司);IMS-40 型制冰机(陕西鹏展科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养和传代 将细胞放在 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中培养,细胞为半悬浮半贴壁生长,细胞生长至密度约为 80% 时,即可传代,收集原培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,弃 PBS,加入胰酶消化液 2 mL,培养箱中放置约 15 s,当观察到细胞从培养瓶底脱离立刻终止消化,加入收集的原培养液,用吹打管轻微的吹打使细胞完全从培养瓶底脱落,1 800 r·min⁻¹离心 5 min,弃上清,接种于培养瓶中,每 2 d 换液 1 次,每 4~5 天传代 1 次。

2.2 含药血清制备及保存 家兔(30 只)喂养 3 d 后,随机分为空白组、肝豆汤组和丁苯酞 3 组,每组 10 只。空白组予生理盐水 4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,肝豆汤组予肝豆方浓煎液 4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃(含生药量 2.2 g·mL⁻¹),丁苯酞组予 4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃(给药剂量按临床用量乘以动物等效面积系数再乘以培养基内血清稀释度计算)灌胃,每日 2 次,持续 10 d。禁食 12 h 后,用 25% 乌拉坦(5 mL·kg⁻¹)麻醉,腹主动脉采血(无菌),血液室温静置 2 h,离心 3 000 r·min⁻¹, 15 min,取上清,上清 4 °C,5 000 ×g 离心 30 min,取上清,过滤,放置 56 °C 水浴中灭活 30 min, -20 °C 保存。

2.3 MTT 比色法检测细胞活性 取对数生长期的细胞,消化收集,细胞悬液以每孔 2 × 10⁴ 个细胞接种,实验设 6 个复孔,每孔 100 μ L,设正常组和空白组,放于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h,弃原

培养基,正常组加完全培养基 100 μL ,空白组为 100 μL 的 PBS,模型组加入不同浓度的 CuSO_4 (100, 200, 400, 800, 1 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用细胞 12, 24, 36, 48 h。每孔加 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液 20 μL (避光操作),放在置于 37 $^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱中培养 4 h。弃液,每孔加 DMSO 150 μL 震荡 15 min,完全混匀。

2.4 试剂盒检测 LDH 活性 收集细胞上清液,按照试剂盒步骤所需配制试剂及操作。实验分为空白组、标准组、测定组、阴性组,空白组加入双蒸水 25 μL 和基质缓冲液 25 μL 。标准组加入双蒸水 5 μL 和基质缓冲液 25 μL ,丙酮酸标准液 (2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)20 μL 。测定组加入待测样本 20 μL 和基质缓冲液 25 μL ,辅酶 1 应用液 5 μL 。阴性组加入的双蒸水 5 μL ,待测样本 20 μL 和基质缓冲液 25 μL 。混匀,在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴 15 min 后,每组分别加入 2,4-二硝基苯肼 25 μL ,继续混匀,37 $^\circ\text{C}$ 水浴 15 min 后每组分别 NaOH 溶液 (0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 250 μL ,室温静置 5 min,测吸光度 A (波长 450 nm)。LDH = (测定 A - 阴性 A) / (标准 A - 空白 A) \times 对照品浓度 \times 数量 \times 1 000。LDH 漏出率 = [培养液 LDH / (胞质 LDH + 培养液 LDH)] \times 100%。

2.5 流式细胞仪检测细胞内 ROS 的释放 取对数生长期的细胞,用不含 EDTA 的胰酶消化,消化约 20 s 立即终止,1 800 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞,弃上清,加入 PBS 2 mL 洗 1 次,加终浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的二氯二氢荧光素乙酰乙酸酯 (DCFH-DA) 工作液 1 mL,以充分覆盖细胞。37 $^\circ\text{C}$,避光 30 min 后加入 PBS 2 mL 洗 2 次,收集后,加 PBS 700 μL 重悬细胞,吹打,加入流试管内,立即上流式细胞仪进行检测。

2.6 流式细胞仪检测线粒体膜电位 $\Delta\psi_m$ 取对数生长期的细胞,收集各组处理过的细胞,用不含 EDTA 的胰酶消化,培养箱中消化约 20 s,终止消化,1 800 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞,弃上清,加入 PBS 2 mL 洗 1 次,加入终浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 JC-1 工作液 1 mL,以充分覆盖细胞。37 $^\circ\text{C}$ 20 min (避光),每 5 min 摇晃 1 次。孵育后加入 PBS 2 mL 洗 2 次,收集细胞,加入无血清培养基 700 μL 重悬细胞,吹打管轻柔吹打细胞,加入流试管内,立即上流式细胞仪进行检测。

2.7 流式细胞仪检测细胞自噬 取对数生长期的细胞,收集细胞,800 $\times g$ 离心 5 min,用 1 \times Wash buffer (10 \times Wash buffer 用去离子水稀释成 1 \times) 300 ~ 400 μL 洗 1 次,弃上清。加入 1 \times Wash buffer

重悬细胞,使终密度为 1 $\times 10^6$ 个/L,吸取悬液 90 μL 到 1.5 mL 的离心管中,加入单丹磺酰尸胺染液 10 μL 混匀,室温避光染色 30 min,收集细胞,800 $\times g$ 离心 5 min,用的 1 \times Wash buffer 300 ~ 400 μL 洗 2 遍,弃上清,加入 Collection buffer 100 μL 重悬细胞,上流式细胞仪进行检测。

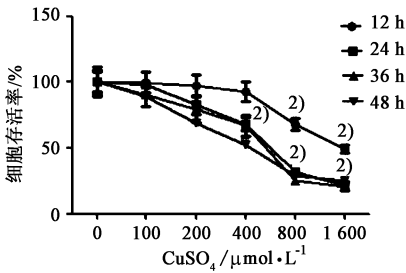
2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测自噬信号通路相关蛋白的表达 选取对数生长期的细胞,分为正常组、模型组、丁苯酞组、肝豆汤组,置于 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中继续培养 24 h,收集细胞,裂解细胞,提取细胞总蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白含量,制胶与上样,各取每组蛋白进行电泳 (浓缩胶电压为 60 V, 60 min,分离胶电压为 110 V, 90 min,应根据情况不同做适当的调整),蛋白样品转移到提前剪好的 NC 膜上 (250 mA 转移 1.5 h),用 5% 脱脂奶粉封闭 (37 $^\circ\text{C}$ 封闭 1.5 h),封闭完成后用 TBST 洗 3 次,每次 10 min,置于一抗 (mTOR 1 : 1 万; ULK1 为 1 $\text{mg}\cdot\text{L}$; LC3A/B 2 $\text{mg}\cdot\text{L}$; LKB1 1 : 500; p-ULK 1 : 1 万; p-AMPK 1 : 1 000 ~ ; AMPK 1 : 1 000; β -actin 1 : 1 000) 中室温下孵育 4 ~ 6 h 或者 4 $^\circ\text{C}$ 过夜,一抗孵育完成后,用洗涤缓冲液 (TBST) 洗 3 次,每次 10 min,室温下二抗 (1 : 1 万) 孵育 1.5 ~ 2 h 后,与上述同样方法洗涤,在暗室条件下进行化学发光反应,按 1 : 1 配制超灵敏化学发光免疫印迹检测试剂,避光保存,将配好的发光检测试剂均匀的涂于 NC 膜的蛋白条带上,将 NC 膜放置于成像仪中,关上仪器门,进行成像、拍照,用 AlphaView SA 软件进行数据分析,以 β -actin 作为内参,计算各组蛋白的相对表达量。

2.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,各实验均重复 3 次后计算结果,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据采用两独立样本 t 检验,多组数据采用单因素方差分析进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 CuSO_4 造模浓度的筛选 CuSO_4 对细胞的损伤呈现一定的量效和时效关系,随着 CuSO_4 作用浓度的增加及作用时间的延长,细胞存活率呈现下降的趋势 ($P < 0.01$)。600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 作用 24 h 后,存活率接近半数抑制浓度 (IC_{50}),因此选择该浓度 CuSO_4 作为细胞 24 h 造模浓度。见图 1。

3.2 含药血清作用浓度与时间筛选 含 10% 肝豆汤兔血清,丁苯酞血清可明显抑制 CuSO_4 诱导的细胞死亡,因此选择 10% 的含药血清浓度为最佳作用浓度,24 h 为最佳作用时间 ($P < 0.01$)。见图 2。



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 2 同)

图 1 不同浓度 CuSO₄ 不同时间对细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Different concentration of copper act on cells at different times ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

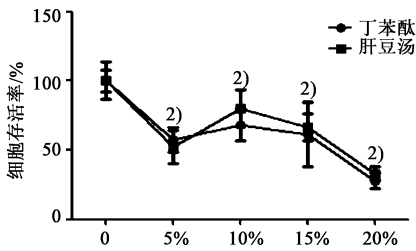


图 2 肝豆汤对 CuSO₄ 损伤 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of Gandou decoction (GDD) on survival rate of CuSO₄ injured SH-SY5Y ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 LDH 试剂盒检测 SH-SY5Y 细胞漏出率 与正常组比较,经 600 μmol·L⁻¹ 的 CuSO₄ 损伤细胞 24 h 后,LDH 漏出率显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较,含 10% 肝豆汤兔血清及丁苯酞兔血清作用细胞 24 h 后,LDH 漏出率明显降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 肝豆汤 CuSO₄ 损伤 SH-SY5Y 细胞 LDH 漏出率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of GDD on LDH leakage rate in SH-SY5Y cells injured by CuSO₄ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	LDH/%
正常	-	71.66 ± 1.15
模型	-	189.00 ± 0.47 ²⁾
丁苯酞	10	113.30 ± 3.99 ⁴⁾
肝豆汤	10	88.60 ± 3.03 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 5 同)。

3.4 肝豆汤对 CuSO₄ 损伤的 SH-SY5Y 细胞 ROS 的影响 与正常组比较,600 μmol·L⁻¹ 的 CuSO₄ 作用细胞 24 h 后,DCF 的荧光强度显著增强 ($P <$

0.01),表明 CuSO₄ 加剧了细胞内 ROS 生成;与模型组比较,经含 10% 肝豆汤兔血清及含丁苯酞兔血清给药作用细胞 24 h 后,DCF 的荧光强度呈剂量依赖性的降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 肝豆汤对 CuSO₄ 损伤的 SH-SY5Y 细胞 ROS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of GDD on ROS in SH-SY5Y cells injured by CuSO₄ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	ROS
正常	-	63.02 ± 3.27
模型	-	88.47 ± 1.31 ²⁾
丁苯酞	10	14.62 ± 1.49 ⁴⁾
肝豆汤	10	12.07 ± 1.79 ⁴⁾

3.5 肝豆汤对 CuSO₄ 损伤的 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的 Δψ_m 影响 与正常组比较,600 μmol·L⁻¹ 的 CuSO₄ 作用细胞 24 h 后,JC-1 的荧光强度显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,含肝豆汤兔血清及丁苯酞兔血清给药作用细胞 24 h 后,JC-1 的荧光强度呈剂量依赖性升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 肝豆汤对 CuSO₄ 损伤的 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的 Δψ_m 影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of GDD on mitochondrial membrane potential Δψ_m of SH-SY5Y cells injured by CuSO₄ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	JC-1
正常	-	16.21 ± 1.50
模型	-	6.23 ± 0.99 ²⁾
丁苯酞	10	17.80 ± 1.17 ³⁾
肝豆汤	10	20.56 ± 1.56 ³⁾

3.6 肝豆汤对 SH-SY5Y 细胞自噬的影响 与正常组比较,模型组细胞荧光强度显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,肝豆汤组与丁苯酞细胞荧光强度较模型组显著减弱 ($P < 0.01$),表明肝豆汤组细胞内的自噬体和溶酶体显著减少。见表 4。

3.7 肝豆汤对 SH-SY5Y 细胞内自噬相关蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组细胞内 LKB₁, AMPK, LC3A/B, ULK 及 p-AMPK 蛋白的表达显著增加, mTOR 及 p-ULK 蛋白的表达显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,肝豆汤组及丁苯酞组的 LKB₁, AMPK, LC3A/B, ULK 及 p-AMPK 蛋白表达显著降低, mTOR 及 p-ULK 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 5。

表 4 肝豆汤对 SH-SY5Y 细胞自噬的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of GDD on autophagy in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	MDC
正常	-	6.67 ± 0.80
模型	-	342.90 ± 9.78 ²⁾
丁苯酞	10	58.41 ± 0.81 ⁴⁾
肝豆汤	10	37.21 ± 1.08 ⁴⁾

4 讨论

细胞在遭到各种不同的刺激时,机体就会产生一种具有高活性的物质,同时体内存在调节氧化应激的物质,促进高活性物质的代谢^[14]。但是,在病理下,当氧化-还原系统遭到破坏时,导致由于

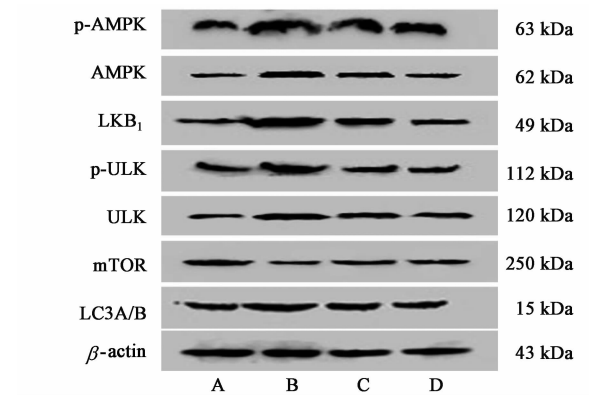
表 5 含肝豆汤兔血清对 SH-SY5Y 细胞自噬信号通路相关蛋白相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of rabbit serum with GDD on expression of autophagy signaling pathway related proteins expression levels in SH-SY5Y ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	AMPK / β -actin	ULK1 / β -actin	mTOR / β -actin	LKB ₁ / β -actin	LC3A/B / β -actin	p-AMPK / β -actin	p-ULK / β -actin
正常	-	0.81 ± 0.04	0.41 ± 0.04	1.87 ± 0.07	0.54 ± 0.06	0.77 ± 0.03	0.75 ± 0.02	4.08 ± 0.02
模型	-	1.59 ± 0.04 ²⁾	0.81 ± 0.01 ²⁾	0.65 ± 0.01 ²⁾	3.08 ± 0.12 ²⁾	1.99 ± 0.12 ²⁾	1.77 ± 0.10 ²⁾	1.25 ± 0.02 ²⁾
丁苯酞	10	1.36 ± 0.11 ⁴⁾	0.68 ± 0.02 ⁴⁾	1.11 ± 0.01 ⁴⁾	0.82 ± 0.07 ⁴⁾	1.29 ± 0.09 ⁴⁾	1.31 ± 0.01 ⁴⁾	2.51 ± 0.06 ⁴⁾
肝豆汤	10	1.06 ± 0.08 ⁴⁾	0.55 ± 0.02 ⁴⁾	1.56 ± 0.03 ⁴⁾	0.60 ± 0.01 ⁴⁾	1.16 ± 0.05 ⁴⁾	1.15 ± 0.06 ⁴⁾	2.13 ± 0.02 ⁴⁾

大量中间产物的积累引起的机体损伤^[15]。本实验用 MTT 比色法测细胞存活率和 LDH 测细胞毒性以观察高铜对细胞的损伤作用,通过对细胞内 ROS,线粒体膜电位的检测以观察高铜对线粒体的功能的影响,实验结果显示高铜组细胞存活率较低,细胞毒性增加,ROS 的含量增加,而肝豆汤可以显著增加细胞的存活率,减少细胞毒性和 ROS 的含量,因此高铜可以通过增加细胞的氧化应激,从而损伤细胞和线粒体的功能,导致细胞损伤,而肝豆汤通过间接或者直接的减少细胞内 ROS 的产生,保护线粒体功能,从而对细胞有保护效应。

LKB₁ 参与多种生物学过程,是肝脏代谢的关键调节器,在肝脏的再生方面起着双重作用,其可磷酸化并激活 AMPK 相关蛋白激酶亚家族的成员^[16],是 AMPK 重要的上游调控分子^[17]。有研究表明,脂联素可以诱导 LKB₁ 基因以 APPL1 依赖性的方式从胞浆中易位到细胞核中,导致 AMPK 的活化^[18],AMPK 是细胞能量代谢和细胞应激中重要的传感器或效应器,调控的细胞能量代谢,维持细胞内能量稳态,在多种组织中,维持细胞的生存和协调细胞的功能



A. 正常组; B. 模型组; C. 丁苯酞组; D. 肝豆汤组

图 3 SH-SY5Y 细胞自噬信号通路相关蛋白相对表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of autophagy signaling pathway related proteins expression levels in SH-SY5Y

能^[19]。其可以抑制蛋白质,碳水化合物和脂质生物的合成还可以抑制细胞的生长和增殖。AMPK 减少骨骼肌蛋白质合成的活化通过激活 TSC2 来抑制 mTOR 信号传导途径^[20]。mTOR 是调节翻译和细胞分裂的最重要的蛋白之一^[21],是自噬的负性调控因子,也是自噬调节的中心,当细胞营养充足时,其可被活化,进而通过抑制自噬相关基因 1 (ATG1) 从而抑制自噬的生成。ULK1 是形成自噬体的前体。其不仅可以负向调节 mTORC1,而且是 mTORC1 的靶向效应物。可以磷酸化 SESN2 和 SQSTM1 来调节自噬^[22]。还有证据表明,AMPK 可以通过直接与 ULK1 的相互作用并其磷酸化从而诱导自噬得发生^[23]。LC3 合成之后 C 末端被 Atg4 水解转变成 LC3-I,在 Atg3 和 Atg7 基因的参与下 LC3-I 与磷脂酰乙醇胺 (PE) 结合变成 LC3-II 结合在自噬的膜上,是自噬形成最显著的标志分子^[24]。Western blot 结果显示,与正常组比较,高铜组 LKB₁, AMPK, LC3A/B, ULK 和 p-AMPK 蛋白的表达显著增加, mTOR 和 p-ULK 蛋白的表达显著降低。与模型组比较,含肝豆汤兔血清组的 LKB₁, AMPK, LC3A/B,

ULK 和 p-AMPK 蛋白表达显著降低, mTOR 和 p-ULK 蛋白表达显著增加。有证据表明高水平的 ROS 可以通过抑制 mTOR 信号通路或者是胞质 p53 最终导致自噬性细胞死亡^[25]。实验结果说明高铜显著激活了自噬 LKB₁-AMPK 信号通路, 诱导自噬的发生, 加剧了对细胞的损伤。而肝豆汤可能是通过减少细胞内 ROS 的生成下调了自噬信号通路, 抑制了自噬的发生, 对神经元细胞起到保护作用。

[参考文献]

[1] Poujois A, Trocello J M, Djebrani-Oussedik N, et al. Exchangeable copper: a reflection of the neurological severity in Wilson's disease [J]. *Eur J Neurol*, 2017, 24 (1): 154-160.

[2] Ala A, Walker A P, Ashkan K, et al. Wilson's disease [J]. *Lancet*, 2007, 369(9559): 397-408.

[3] WANG H, CHENG N, DONG J, et al. Serum pentraxin 3 is elevated in patients with neurological Wilson's disease [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2016, 462: 178-182.

[4] Banci L, Bertini I, Cantini F, et al. Cellular copper distribution: a mechanistic systems biology approach [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(15): 2563-2589.

[5] Papur Ö Ş, Akman S A, Terziog lu O. Clinical and genetic analysis of pediatric patients with Wilson [J]. *Turk J Gastroenterol*, 2015, 26: 397-403.

[6] CHEN C, SHEN B, XIAO J J, et al. Currently clinical views on genetics of Wilson's disease [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128(13): 1826.

[7] Yamahara K, Yasuda M, Kume S, et al. The role of autophagy in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *J Diabet Res*, 2013, doi:1155/2013/193757.

[8] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(7): 713-720.

[9] Inoki K. mTOR signaling in autophagy regulation in the kidney [J]. *Semin Nephrol*, 2014, 34(1): 2-8.

[10] 丁超, 王训. 肝豆汤改良方调节高铜诱导神经元损伤的信号调控机制的研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2014.

[11] 徐陈陈, 董健健, 程楠, 等. 肝豆汤改良方对 Wilson's 病模型 TX 小鼠神经元内 Cyt C/Caspase 信号通路的分子调控机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(6): 143-148.

[12] 张静, 方媛, 崔圣伟, 等. 肝豆汤联合二巯基丙磺酸钠对湿热内蕴型肝豆状核变性患者的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(17): 190-194.

[13] 张静, 陈怀珍, 艾文龙, 等. 肝豆汤联合 DMPS 驱铜治

疗对 Wilson 病湿热内蕴型认知功能障碍的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(15): 210-215.

[14] Costa A, Scholer-Dahirel A, Mechta-Grigoriou F. The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment [J]. *Semin Cancer Biol*, 2014, 25: 23-32.

[15] 刘晓杰, 杨威, 祁金顺. 氧化应激与阿尔茨海默病 [J]. *生理学报*, 2012, 64(1): 87-95.

[16] Maillet V, Boussetta N, Leclerc J, et al. LKB1 as a gatekeeper of hepatocyte proliferation and genomic integrity during liver regeneration [J]. *Cell Reports*, 2018, 22(8): 1994-2005.

[17] Mauro L, Naimo G D, Gelsomino L, et al. Uncoupling effects of estrogen receptor α on LKB1/AMPK interaction upon adiponectin exposure in breast cancer [J]. *FASEB J*, 2018, 32(8): 4343-4355.

[18] Deepa S, ZHOU L, Ryu J, et al. APPL1 mediates adiponectin-induced LKB1 cytosolic localization through the PP2A-PKC signaling pathway [J]. *Molecular Endocrinol*, 2011, 25(10): 1773-1785.

[19] Lim J H, Kim H W, Kim M Y, et al. Cinacalcet-mediated activation of the CaMKK β -LKB1-AMPK pathway attenuates diabetic nephropathy in db/db mice by modulation of apoptosis and autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 270.

[20] Inoki K, ZHU T, GUAN K L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival [J]. *Cell*, 2003, 115(5): 577-590.

[21] ZHANG Y, Nicholatos J, Dreier J R, et al. Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1 [J]. *Nature*, 2014, 513(7518): 440-443.

[22] Ro S H, Semple I A, Park H, et al. Sestrin2 promotes Unc-51-like kinase I mediated phosphorylation of p62/sequestosome-1 [J]. *FEBS J*, 2014, 281(17): 3816-3827.

[23] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. *Nature Cell Biol*, 2011, 13(2): 132-141.

[24] CHANG H P, LU C C, CHIANG J H, et al. Pterostilbene modulates the suppression of multidrug resistance protein 1 and triggers autophagic and apoptotic mechanisms in cisplatin-resistant human oral cancer CAR cells via AKT signaling [J]. *Int J Oncol*, 2018, 10(1): 3892-4298.

[25] LI L, CHEN Y, Gibson S B. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(1): 50-65.

[责任编辑 周冰冰]