

基于 JNK 通路探讨调更汤对 GT1-7 下丘脑神经元 细胞凋亡的保护作用

李盛楠, 刘洋, 刘小菲, 丛超, 刘慧聪, 归雯佳, 王月娇, 肖珊, 单鑫, 徐莲薇*
(上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

[摘要] 目的: 研究调更汤通过 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)通路改善下丘脑神经元细胞凋亡的作用机制。方法: 采用下丘脑神经元细胞 GT1-7 细胞株,以三丁基氯化锡(TBTC)诱导模拟神经元细胞凋亡模型作为模型组($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),以 17β -雌二醇($17\beta\text{-E}_2$)为阳性药物作为 $17\beta\text{-E}_2$ 组($100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),调更汤低、中、高剂量组($31.25, 62.5, 125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)进行干预。以倒置荧光显微镜观察细胞形态学变化;细胞增殖毒性(CCK-8)法检测细胞活力;Hoechst 33258 染色观察凋亡细胞核的形态改变;Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)双染色法检测下丘脑神经元细胞凋亡率;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 JNK 通路凋亡相关蛋白凋亡信号调节激酶 1(ASK1), JNK, p53, 活化半胱氨酸蛋白酶(cleaved Caspase-3)表达水平及 JNK 抑制剂 SP600125 干预后磷酸化 JNK(p-JNK), cleaved Caspase-3 的蛋白表达水平。结果: 与正常组比较,模型组细胞活力显著降低($P < 0.01$),细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$),JNK 通路相关蛋白磷酸化 ASK1(p-ASK1), p-JNK, 磷酸化 p53(p-p53), cleaved Caspase-3 的表达显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,调更汤显著改善 GT1-7 细胞活力($P < 0.01$),降低细胞凋亡率($P < 0.01$),调节 p-ASK1, p-JNK, p-p53, cleaved Caspase-3 蛋白的表达;高剂量调更汤联合应用 SP600125($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理后,更显著的抑制 GT1-7 细胞 p-JNK, cleaved Caspase-3 的蛋白表达($P < 0.01$)。结论: 调更汤通过 JNK 通路改善下丘脑神经元细胞凋亡,为调更汤治疗绝经综合征和中枢神经保护作用提供理论依据。

[关键词] 绝经综合征; 下丘脑神经元细胞凋亡; 调更汤; c-Jun 氨基末端激酶通路

[中图分类号] R2-0;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)20-0049-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192037

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190703.1446.004.html>

[网络出版时间] 2019-07-05 10:52

Protective Effect of Tiaogeng Decoction in Improving Apoptosis of Hypothalamic Neurons Based on JNK Pathway

LI Sheng-nan, LIU Yang, LIU Xiao-fei, CONG Chao, LIU Hui-cong, GUI Wen-jia, WANG Yue-jiao,
XIAO Shan, SHAN Xin, XU Lian-wei*

(Longhua Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of Tiaogeng decoction in improving apoptosis of hypothalamic neurons through c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. **Method:** The GT1-7 cell line of hypothalamic neuron cells treated by tributyltin chloride (TBTC) was used to induce a model of neuronal apoptosis, with 17β -estradiol as a positive drug. They were divided into control group, model group ($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), $17\beta\text{-E}_2$ group ($100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and low, middle and high-dose Tiaogeng decoction groups ($31.25, 62.5, 125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). The cell morphology was observed under a fluorescent inverted microscope, and cell counting kit-8 (CCK-8) was

[收稿日期] 20190302(013)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81574010)

[第一作者] 李盛楠,在读博士,主治医师,从事中医药诊治生殖内分泌疾病研究,E-mail:lisncq@163.com

[通信作者] *徐莲薇,教授,主任医师,博士生导师,从事中医药诊治生殖内分泌疾病和不孕症研究,E-mail:doctorserryxlw@163.com

used to detect the cell viability. The cell nuclear morphology and the apoptosis rate of hypothalamic neurons were detected by Hoechst 33258 and Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) double staining. Western blot was used to detect the expression levels of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1), JNK, p53 and cleaved Caspase-3 of JNK pathway in GT1-7 cell. Western blot was used to analyze apoptosis-associated protein apoptosis signal-regulated kinase 1 (ASK1), JNK, p53, cleaved Caspase-3 expressions in JNK pathway and phosphorylation of JNK after intervention with JNK inhibitor SP600125, protein expression level of cleaved Caspase-3. **Result:** Compared with normal control group, the cell viability of the model group was significantly decreased ($P < 0.01$), whereas the apoptotic rate was significantly increased ($P < 0.01$). The expressions of phosphorylated ASK1 (p-ASK1), p-JNK, phosphorylated p53 (p-p53) and cleaved Caspase-3 increased significantly ($P < 0.01$). After intervention with Tiaogeng decoction, compared with model group, the activity of GT1-7 cells was significantly improved ($P < 0.01$), while the apoptotic rate was decreased ($P < 0.01$). The expressions of p-ASK1, p-JNK, p-p53, and cleaved Caspase-3 proteins were down-regulated. High-dose Tiaogeng decoction combined with SP600125 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) treatment significantly inhibited the expressions of p-JNK and cleaved Caspase-3 in GT1-7 cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** Tiaogeng decoction can improve the apoptosis of hypothalamic neurons through JNK pathway, and provide a theoretical basis for the treatment of menopausal syndrome and central nervous system protection.

[**Key words**] menopause syndrome; hypothalamic neuronal apoptosis; Tiaogeng decoction; c-Jun N-terminal kinase pathway

绝经综合征指妇女绝经前后出现性激素波动或减少所致的一系列躯体及精神心理症状^[1]。在女性衰老的过程中,卵巢功能衰退,雌激素分泌减少,引起下丘脑-垂体-卵巢(hypothalamus-pituitary-ovary, H-P-O)轴的调节功能失衡所致。

细胞凋亡学说是绝经综合征重要发病机制之一^[2]。研究发现,去卵巢雌性大鼠下丘脑神经元损伤与细胞凋亡相关^[3]。绝经前后体内雌激素水平的剧烈波动可能是导致下丘脑损伤的原因。有研究表明,内源性雌激素减少可能会通过氧化应激标志物(如氧化型谷胱甘肽和脂质过氧化)浓度的增高^[4],诱导氧化应激反应,导致许多组织(包括大脑)的损伤和凋亡^[4-7]。而 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号通路能介导多种胞外刺激诱导的细胞凋亡,并参与了多种细胞(如神经细胞等)凋亡的发生,在调控细胞凋亡中发挥着重要作用^[8]。

调更汤为上海中医药大学附属曙光医院孙卓君教授所立,从《伤寒论》的“桂枝龙骨牡蛎汤”化裁而来,应用于绝经综合征的治疗已有 30 余年,有较好的临床疗效^[9]。本课题组前期研究结果显示,“调更汤”可以增加大鼠卵巢超氧化物歧化酶(SOD)活力,减少脂质过氧化物丙二醛(MDA)的产生,改善切除卵巢大鼠下丘脑氧化损伤,延缓下丘脑神经组织衰老,同时可升调节下丘脑雌激素受体系统,具有下丘脑神经保护作用^[10]。

本实验拟在前期研究的基础上,以下丘脑神经元细胞凋亡作为切入点,以三丁基氯化锡(TBTC)诱导下丘脑 GT1-7 细胞作为神经元细胞凋亡模型,以 JNK 通路为核心,进一步探讨调更汤改善下丘脑神经元细胞凋亡,保护下丘脑神经元损伤的可能机制,为中医药治疗绝经综合征提供理论依据。

1 材料

1.1 药物 调更汤方药组成为知母 9 g,黄柏 9 g,柴胡 9 g,白芍 10 g,生地黄 15 g,淫羊藿 15 g,巴戟天 9 g,生龙骨 30 g,生牡蛎 30 g,夜交藤 30 g,所有药材由上海中医药大学附属龙华医院提供,由该院药剂科主任中药师奚燕鉴定为正品,委托中科院制成中药复方冻干粉。将中药复方放入 4 L 智能煎药壶中,加入纯净水 2 L,加热煎药,药水沸腾后再煎 1 h,药液用 4 层纱布过滤;将滤液(约 1 400 mL)倒入冷冻干燥机中, -50 ℃ 预冻 6 h,再抽真空干燥;干燥机升温,最后固定到 -40 ℃ 冻干 72 h(冻干的最终真空压力为 2 Pa);将冻干样品配制成含生药量 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的糊状药液, $0.22 \mu\text{mol}$ 微孔滤膜过滤除菌, -20 ℃ 冰箱保存备用。细胞培养时用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基稀释到相应终浓度 ($31.25, 62.5, 125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。 17β -雌二醇 ($17\beta\text{-E}_2$) (美国 Sigma 公司,批号 E2758-250); JNK 抑制剂 SP600125(美国 Selleck 公司,批号 S1460)。

1.2 试剂 DMEM 高糖培养基,胎牛血清,胰蛋白

酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 11965-092,10099-141,25200-056);二甲基亚砷(DMSO,北京鼎国昌盛生物技术公司,批号 DH105-10);TBTC(美国 Sigma 公司,批号 T50202-100);细胞增殖毒性检测(CCK-8)试剂盒(美国 Genview 公司,批号 GK3607-500T);双染 Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司,批号 556547);BSA(德国 Biofrox 公司,批号 4240GR100),抗体一抗 ASK1, p-ASK1, JNK, p-JNK, p53, p-p53, cleaved Caspase-3, GAPDH, 兔抗二抗(美国 CST 公司,批号分别为 8662, 3761, 9252, 4668s, 2524, 12571, 9662, 5174, 7074);BeyoECL Plus, 转膜液, SDS-PAGE 电泳液, 细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒, BCA 试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0018, P0021B, P0014B, C0003, P0010)。

1.3 细胞株 GT1-7 细胞株由上海交通大学医学院附属瑞金医院馈赠,传至第 5 代用于实验。

1.4 仪器 BSA124S 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),Ti-E 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司),YZB/USA1802-2009 型恒温培养箱(美国 Thermo 公司),5424R 型低温台式离心机(德国 Eppendorf Centrifuge 公司),Synergy H1MF 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),Cemiscop6300 型凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司),XSP-3C 型显微镜(上海民怡仪器仪表有限公司),MINI Protein V3 型电泳仪,Mini Trans Blot 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养和干预 将 GT1-7 下丘脑神经元细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在含有 5% CO₂ 的 37 °C 恒温孵育箱中培养,用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代,每 2 d 传代 1 次。取处于生长对数期的 GT1-7 细胞随机分为正常组,模型组,西药组和调更汤低中高剂量组(即调更汤低、中、高剂量组)。正常组未加任何处理因素;模型组予常规培养 24 h 后,用含有 1 mg·L⁻¹ 的 TBTC 培养基继续孵育 1 h 诱导下丘脑神经元细胞凋亡;西药组用 100 nmol·L⁻¹ 的 17β-E₂ 预处理细胞 24 h 后,换含有 1 mg·L⁻¹ TBTC 培养基继续孵育 1 h;调更汤组根据前期实验 CCK-8 法筛选剂量即用调更汤 31.25, 62.5, 125 mg·L⁻¹ 预处理细胞 24 h 后,换含有 1 mg·L⁻¹ 的 TBTC 培养基继续孵育 1 h。

2.2 JNK 抑制剂 SP600125 应用 分正常组,模型组,模型 + 抑制剂组,17β-E₂ 组,调更汤高剂量组,

调更汤高剂量 + 抑制剂组。各组培养同前,SP600125 于 TBTC 之前 1 h 以 10 μmol·L⁻¹ 加入模型 + 抑制剂组及调更汤高剂量 + 抑制剂组。各组在相同时间点加入 TBTC,正常组加入等量的培养基,每组均设置 3 个平行孔。

2.3 显微镜下观察 GT1-7 细胞形态 取处于对数生长期的 GT1-7 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液,调整密度为 40 × 10⁴ 个/孔,加入 6 孔板,每孔 2 mL,同 2.1 项下细胞培养、分组、加药和造模完成后,荧光倒置显微镜下观察细胞形态。

2.4 CCK-8 法检测 GT1-7 细胞活力

2.4.1 调更汤作用于 GT1-7 细胞的浓度确定 取处于对数生长期的 GT1-7 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液,调整密度为 2 × 10⁴ 个/孔,加入 96 孔板,每孔 0.1 mL,设置正常组及调更汤不同浓度组为实验组,每组设置 6 个副孔,剂量为调更汤 31.25, 62.5, 125, 250, 500 mg·L⁻¹ 干预细胞 24 h,吸弃培养基,每孔加入新鲜的 DMEM 培养基 90 μL, CCK-8 溶液 10 μL,37 °C 继续孵育 2 h 后,于 450 nm 酶标仪测定其吸光度 A,计算细胞存活率。以对细胞无毒性的浓度作为实验用浓度范围。

2.4.2 调更汤对损伤的 GT1-7 细胞的保护作用 取处于对数生长期的 GT1-7 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液,调整密度为 2 × 10⁴ 个/孔,加入 96 孔板,每孔 0.1 mL,同 2.1 项下细胞培养、分组、加药和造模完成后,采用 CCK-8 法进行细胞活性检测,在酶标仪于波长 450 nm 处测定其吸光度 A。

2.5 Hoechst 33258 染色法观察凋亡细胞核形态 取对数生长期的单细胞悬液,调整密度为 5 × 10⁴ 个/孔,将细胞接种于 24 孔板,每孔 500 μL,同 2.1 项下细胞培养、分组、加药和造模完成后,吸尽液体,每孔加入固定液 0.5 mL,固定 10 min;去固定液,用 PBS 洗 2 遍,每次 3 min,洗涤时摇床轻摇;吸尽液体,每孔加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液,染色 5 min;去染色液,用 PBS 洗 2 遍,每次 3 min,洗涤时避光摇床轻摇;荧光倒置显微镜下观察细胞核的变化情况。

2.6 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测 GT1-7 细胞凋亡率 取对数生长期的单细胞悬液,调整细胞密度为 15 × 10⁴ 个/孔,将细胞接种于 12 孔板,每孔 1 mL,同 2.1 项下细胞培养、分组、加药和造模完成后,消化收集细胞,PBS 洗涤 2 次,重悬于 Binding Buffer 中,加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μL,室温避光染色 15 min,用 BD 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 JNK 通路相关蛋白的表达 取对数生长期的单细胞悬液,调整细胞密度 50×10^4 个/孔,将细胞接种于 6 孔板,每孔 2 mL,同 2.1 及 2.2 项下细胞培养、分组、加药和造模完成后,刮法收集细胞,冰上裂解细胞 1 h 后, $15\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清;BCA 法测定蛋白浓度;10% 分离胶 80 V 电泳分离;350 mA 恒流转膜 60 min,5% BSA 封闭 1 h;所有指标及内参的一抗根据说明书 1:1 000 稀释,抗体加入封闭液中稀释到所需浓度,4 °C 孵育过夜;所有指标及内参的二抗根据说明书 1:2 000 稀释,加入二抗室温孵育 1 h,洗涤;ECL 化学发光显色剂显色;用凝胶分析系统扫描出图像。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件对所得数据进行统计处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若数据符合方差齐性要求,各组间差异采用单因素方差分析 LSD 检验;若方差不齐,采用 Dunnett *T* 检验分析组间差异; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 GT1-7 细胞活力的影响 与正常组比较,调更汤 31.25,62.5,125 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理对 GT1-7 神经细胞没有抑制作用,因此选择 31.25,62.5,125 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行后续实验。见表 1。

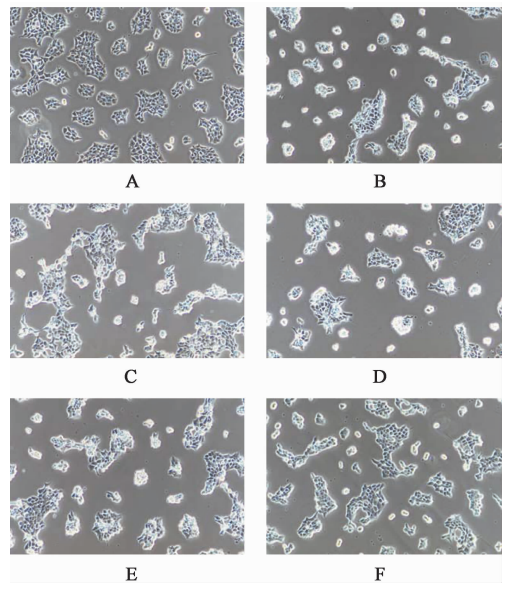
表 1 调更汤不同剂量对 GT1-7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effect of different doses of Tiaogeng decoction on viability of GT1-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活力
正常	-	1.000 ± 0.126
调更汤	31.25	0.890 ± 0.030
	62.5	0.921 ± 0.074
	125	0.917 ± 0.120
	250	0.636 ± 0.111 ¹⁾
	500	0.595 ± 0.090 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 TBTC 诱导后 GT1-7 细胞形态的影响 正常组 GT1-7 细胞生长良好,形态规则,树枝状突触明显,细胞透亮;与正常组比较,模型组 GT1-7 细胞贴壁细胞数目减少,细胞体积缩小,连接消失,与周围细胞脱离,形态固缩呈亮圆点状,突触缩短或消失;与模型组比较,17 β -E₂ 组细胞形态多数正常,固缩亮圆点细胞显著减少,调更汤低、中、高剂量组固缩亮圆点细胞显著减少。见图 1。

3.3 对 TBTC 诱导后 GT1-7 细胞活力及凋亡率的影响



A. 正常组;B. 模型组;C. 17 β -E₂ 组;D. 调更汤低剂量组;E. 调更汤中剂量组;F. 调更汤高剂量组(图 2~3 同)

图 1 调更汤对 TBTC 诱导后 GT1-7 细胞形态的影响(倒置荧光显微镜, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Tiaogeng decoction on morphology of TBTC-induced apoptosis on GT1-7 cells (inverted fluorescence microscope, $\times 200$)

影响 与正常组比较,模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.01$),凋亡比率显著增加 ($P < 0.01$),细胞核固缩、碎裂、染色增强,呈高亮蓝色;与模型组比较,17 β -E₂ 组和调更汤低、中、高剂量组细胞活力显著升高 ($P < 0.01$),细胞凋亡率显著减少 ($P < 0.01$),固缩、碎裂、高亮蓝色的细胞核显著减少。见表 2,图 2。

表 2 调更汤对 TBTC 诱导后 GT1-7 细胞活力及凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Tiaogeng decoction on cell activity and apoptosis rate of GT1-7 cells induced by TBTC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活力	凋亡率
正常	-	1.000 ± 0.042	0.047
模型	-	0.479 ± 0.079 ²⁾	0.297 ± 0.005 ²⁾
17 β -E ₂	100 ⁵⁾	0.975 ± 0.068 ⁴⁾	0.065 ± 0.005 ⁴⁾
调更汤	31.25	0.846 ± 0.067 ⁴⁾	0.196 ± 0.006 ⁴⁾
	62.5	1.018 ± 0.055 ⁴⁾	0.114 ± 0.005 ⁴⁾
	125	1.082 ± 0.050 ⁴⁾	0.144 ± 0.008 ⁴⁾

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⁾ $P < 0.01$;⁵⁾ 浓度单位为 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 3,4 同)。

3.4 对 JNK 通路相关蛋白表达的影响 与正常组

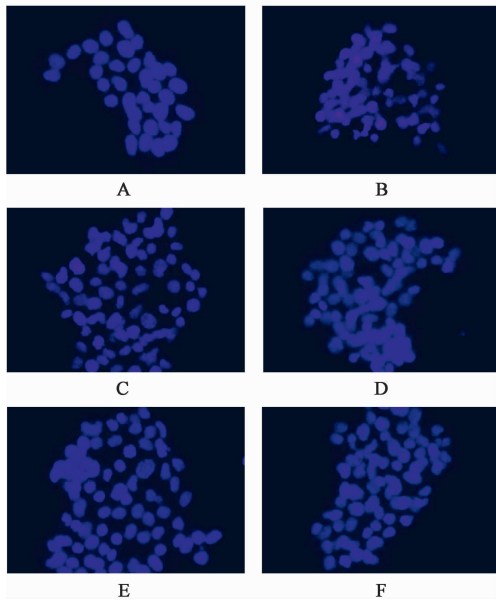


图 2 调更汤对 TBTC 诱导的 GT1-7 细胞核影响 (Hoechst, ×300)
Fig. 2 Effect of Tiaogeng decoction on nuclear morphology of TBTC-induced damage on GT1-7 cells (Hoechst, ×300)

表 3 调更汤对 TBTC 诱导后 GT1-7 细胞 JNK 通路凋亡相关蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Tiaogeng decoction on expressions of apoptosis-related proteins of JNK pathway after TBTC-induced apoptosis on GT1-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	p-ASK1/ASK1	p-JNK/JNK	p-p53/p53	cleaved Caspase-3/GAPDH
正常	-	0.971 ± 0.064	0.026 ± 0.010	0.482 ± 0.101	0.015 ± 0.001
模型	-	1.697 ± 0.277 ²⁾	1.040 ± 0.246 ²⁾	1.112 ± 0.081 ²⁾	1.090 ± 0.050 ²⁾
17β-E ₂	100 ⁵⁾	1.495 ± 0.205	0.741 ± 0.037 ³⁾	1.099 ± 0.134	0.790 ± 0.131 ³⁾
调更汤	31.25	0.899 ± 0.185 ⁴⁾	0.760 ± 0.095 ³⁾	0.982 ± 0.170	0.717 ± 0.237 ³⁾
	62.5	0.969 ± 0.183 ⁴⁾	0.713 ± 0.132 ⁴⁾	0.873 ± 0.143 ³⁾	0.438 ± 0.158 ⁴⁾
	125	0.971 ± 0.188 ⁴⁾	0.699 ± 0.333 ⁴⁾	0.722 ± 0.141 ³⁾	0.125 ± 0.120 ⁴⁾

4 讨论

绝经综合征属于中医学“绝经前后诸证”范畴。肾精亏虚为本病的病机之本,与肝血不足密切相关,同时兼夹气、火、痰、瘀等“标实”,因此本病为本虚标实、虚实夹杂之证^[11]。调更汤由出自《伤寒论》的桂枝龙骨牡蛎汤加减而来,有协理阴阳、调和营卫、安神固摄之功效。结合绝经综合征女性肝肾不足的病机变化,去桂枝,加淫羊藿、巴戟天温补肾阳,白芍与生地配伍养肝柔肝,并加入知母、黄柏清热存阴,夜交藤入心肝经,养心安神,具有补益肝肾、平衡阴阳的作用。

下丘脑通过促性腺激素释放激素(GnRH)神经元细胞分泌 GnRH 调节垂体分泌卵泡刺激素(FSH)

比较,模型组 p-ASK1, p-JNK, p-p53, cleaved Caspase-3 蛋白表达显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,17β-E₂ 组 p-JNK, cleaved Caspase-3 蛋白表达显著减少($P < 0.05$), p-ASK1 及 p-p53 蛋白表达呈下降趋势,但无显著差异;调更汤低剂量组 p-ASK1, p-JNK, cleaved Caspase-3 蛋白表达显著降低($P < 0.05, P < 0.01$), p-p53 蛋白表达呈下降趋势,但无显著意义;调更汤中、高剂量组 p-ASK1, p-JNK, cleaved Caspase-3 蛋白表达显著降低($P < 0.01$), p-p53 蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。见表 3, 图 3。

3.5 对 TBTC 诱导后 GT1-7 细胞 p-JNK 及 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 p-JNK, cleaved Caspase-3 蛋白表达显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,模型 + 抑制剂组 p-JNK 蛋白表达降低($P < 0.05$), cleaved Caspase-3 蛋白表达显著降低($P < 0.01$), 17β-E₂ 组、调更汤高剂量组及调更汤高剂量 + 抑制剂组 p-JNK, cleaved Caspase-3 蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。见表 4, 图 4。

和促黄体生成素(LH),在性激素分泌和维持女性生殖功能方面起到重要作用^[12]。下丘脑神经元GT1-7细胞具有高度分化神经内分泌细胞特性,能模拟 GnRH 神经元功能^[13],因此本实验选用下丘脑 GT1-7 神经元细胞株作为研究对象。TBTC 对神经系统有高毒性,低浓度 TBTC 能诱导神经元细胞凋亡^[14-15]。在本实验研究中,与正常对照组相比,低浓度 TBTC 干预 GT1-7 细胞株后,细胞增殖活性受到显著抑制、细胞凋亡率显著升高,光镜观察可见贴壁细胞数目减少,细胞体积缩小,连接消失,与周围细胞脱离,形态固缩呈亮圆点状,突触缩短或消失;证实低浓度 TBTC 干预 GT1-7 细胞株能够模拟下丘脑神经元细胞凋亡模型。

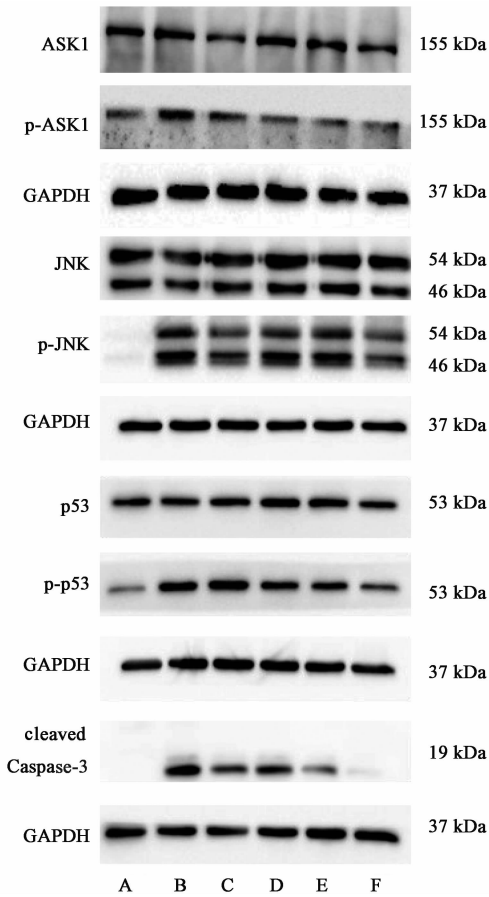
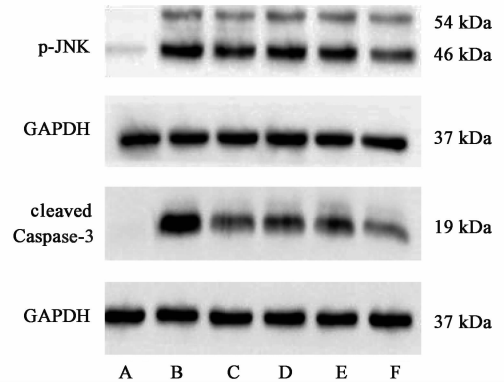


图 3 GT1-7 细胞 JNK 通路凋亡相关蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of apoptosis-related proteins in JNK pathway in GT1-7 cells

表 4 TG 高剂量组联合 SP600125 对 TBTC 处理 GT1-7 细胞后 p-JNK 及 cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 4 Effect of high-dose Tiaogeng decoction combined with SP600125 on expressions of p-JNK and cleaved Caspase-3 after TBTC-induced apoptosis on GT1-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	p-JNK/GAPDH	cleaved Caspase-3 /GAPDH
正常	-	0.127 ± 0.075	0.096 ± 0.011
模型	-	1.419 ± 0.583 ²⁾	1.354 ± 0.221 ²⁾
模型 + 抑制剂	-	1.187 ± 0.503 ³⁾	0.960 ± 0.173 ⁴⁾
17β-E ₂	100 ⁵⁾	1.177 ± 0.377 ⁴⁾	0.967 ± 0.119 ⁴⁾
调更汤高剂量	125	1.212 ± 0.520 ⁴⁾	0.820 ± 0.144 ⁴⁾
调更汤高剂量 + 抑制剂	125	0.907 ± 0.389 ⁴⁾	0.500 ± 0.065 ⁴⁾

细胞凋亡学说是绝经综合征重要发病机制之一^[16]。研究显示,在绝经期前后,下丘脑神经元会发生与细胞凋亡有关的细胞损伤^[3,17]。本课题组前期实验已经证实“调更汤”对去势大鼠下丘脑神经组织有保护作用^[10],但作用机制有待进一步深入



A. 正常组; B. 模型组; C. 模型 + 抑制剂组; D. 17β-E₂ 组; E. 调更汤高剂量组; F. 调更汤高剂量 + 抑制剂组

图 4 GT1-7 细胞 p-JNK 及 cleaved Caspase-3 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of p-JNK and cleaved Caspase-3 protein expression in GT1-7 cells

研究。

JNK 是丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族重要成员之一,主要参与细胞凋亡和细胞应激等一系列的细胞调控^[18]。JNK 信号通路是多级蛋白激酶的级联反应,凋亡信号调节激酶 (ASK1),作为 JNK 通路的上游因子,可磷酸化激活 JNK^[19]。JNK 磷酸化可激活下游基因 p53 家族蛋白,从而抑制 p53 的降解,促进细胞凋亡^[20]。Caspase-3 作为凋亡执行因子,是凋亡过程的主要效应因子,它的活化标志着凋亡进入不可逆阶段^[21-22]。本实验中,低浓度 TBTC 干预 GT1-7 细胞后, p-ASK1, p-JNK, p-p53, cleaved Caspase-3 的蛋白表达显著增加,而 17β-E₂ 和低剂量、中剂量、高剂量调更汤干预后,受损 GT1-7 细胞株增殖活性明显增加,且细胞凋亡率显著降低,显示了 17β-E₂ 和调更汤具有下丘脑神经元细胞抗凋亡作用;同时,调更汤中、高剂量干预后各组的 p-ASK1, p-JNK, p-p53, cleaved Caspase-3 的蛋白表达减少。

SP600125 是一种广谱 JNK 抑制剂,能够阻断 JNK 的磷酸化水平^[23]。实验结果显示,SP600125 可明显降低 p-JNK, cleaved Caspase-3 的蛋白表达;TG 高剂量组联合 SP600125 后, p-JNK, cleaved Caspase-3 的蛋白降低更为显著,显示调更汤增强了 SP600125 阻断 JNK 磷酸化作用。可见,调更汤抑制 GT1-7 细胞凋亡的作用与降调节 JNK 级联通路有关。本研究还发现,调更汤具有降调节 JNK 上游蛋白 p-ASK1 作用,因此,考虑 ASK1/JNK 通路可能是调更汤的作用靶点之一,课题组将进一步深入研究调更汤通过 JNK 通路抑制 GT1-7 细胞凋亡的机制。

综上所述,调更汤能够通过降调节 JNK 通路相

关蛋白 p-ASK1, p-JNK, p-p53, cleaved Caspase-3 的表达,抑制受损下丘脑神经元细胞 GT1-7 细胞凋亡,起到下丘脑神经元细胞保护作用,阐释了“调更汤”的部分作用机制,为中医药防治绝经综合征提供了理论依据。

[参考文献]

[1] 谢幸,苟文丽. 妇产科学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社,2013:364.

[2] 秦尔奇,鲁凌云,贾必燕,等. 针刺治疗围绝经期综合征现代分子机制研究综述[J]. 中华中医药杂志, 2016,31(3):951-953.

[3] FANG Y Y, ZENG P, QU N, et al. Evidence of altered depression and dementia-related proteins in the brains of young rats after ovariectomy[J]. J Neurochem, 2018, 146(6): 703-721.

[4] Doshi S B, Agarwal A. The role of oxidative stress in menopause [J]. J Midlife Health, 2013, 4(3): 140-146.

[5] Naziroğlu M, Simşek M, Simşek H, et al. The effects of hormone replacement therapy combined with vitamins C and E on antioxidants levels and lipid profiles in postmenopausal women with type 2 diabetes[J]. Clinica Chimica Acta, 2004, 344(1/2):63-71.

[6] Dilek M, Naziroğlu M, Oral H B, et al. Melatonin modulates hippocampus NMDA receptors, blood and brain oxidative stress levels in ovariectomized rats[J]. J Membr Biol,2010, 233(1/3):135-142.

[7] Lamas A Z, Caliman I F, Dalpiaz P L, et al. Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats [J]. Life Sci, 2015, 124:101-109.

[8] 魏娜,贺海波,张长城,等. JNK 信号通路 with 细胞凋亡关系的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013,18(7):807-812.

[9] JIA M, Kluwe L, LIU H C, et al. Efficacy and side-effects of a semi-individualized Chinese herb mixture "TiaoGeng Tang" for menopausal syndrome in China [J]. In Vivo,2015,29(1): 109-115.

[10] XU L W, Kluwe L, ZHANG T T, et al. Chinese herb mix Tiao-Geng-Tang possesses Anti-aging and antioxidative effects and upregulates expression of estrogen receptors alpha and beta in ovariectomized rats [J]. BMC Complement Altern Med, 2011, 11(1): 137.

[11] 贾曼,刘慧聪,徐莲薇. 浅谈中医对更年期综合征的认识[J]. 陕西中医,2014,35(8):1033-1036.

[12] Terasaka T, Otsuka F, Tsukamoto N, et al. Mutual interaction of kisspeptin, estrogen and bone morphogenetic protein-4 activity in GnRH regulation by GT1-7 cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 381(1/2): 8-15.

[13] 冯涛,吴晓敏,许晓玲,等. GT1-7 细胞及其在生殖相关研究中的应用[J]. 东北农业大学学报,2016,47(1):102-108.

[14] Gennari A, Viviani B, Galli C L, et al. Organotins induce apoptosis by disturbance of $[Ca^{2+}]_i$ and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of Caspases in rat thymocytes[J]. Toxicology Appl Pharmacol, 2000, 169(2): 185-190.

[15] Mitra S, Gera R, Siddiqui W A, et al. Tributyltin induces oxidative damage, inflammation and apoptosis via disturbance in blood-brain barrier and metal homeostasis in cerebral cortex of rat brain: an *in vivo* and *in vitro* study[J]. Toxicology,2013,310:39-52.

[16] 秦尔奇,鲁凌云,贾必燕,等. 针刺治疗围绝经期综合征现代分子机制研究综述[J]. 中华中医药杂志, 2016,31(3):951-953.

[17] Mittelman-Smith M A, Williams H, Krajewski-Hall S, et al. Role for kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons in cutaneous vasodilatation and the estrogen modulation of body temperature[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(48):19846-19851.

[18] 蒋义鑫,徐元,周之毅,等. 金复康口服液诱导肺癌细胞 A549 凋亡的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018,24(9):160-165.

[19] Win S, Than T A, Kaplowitz N. The regulation of JNK signaling pathways in cell death through the interplay with mitochondrial SAB and upstream post-translational effects[J]. Int J Mol Sci,2018,19(11):3657.

[20] 洪铭岩,崔建忠,李冉,等. c-jun 氨基末端激酶在弥漫性脑创伤大鼠脑中表达及对神经元自噬的影响[J]. 中华外科杂志,2012,50(2):166-170.

[21] D'Amelio M, Cavallucci V, Ceconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(7):1104-1114.

[22] 罗吉,罗燕,李勇敏,等. 重楼皂苷 I 对结肠癌 HCT116 细胞凋亡及 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(6):172-176.

[23] SHEN H T, WU N, WANG Y, et al. JNK inhibitor SP600125 attenuates paraquat-induced acute lung injury: an *in vivo* and *in vitro* study[J]. Inflammation, 2017, 40(4):1319-1330.

[责任编辑 孙丛丛]