

川芎嗪对 t-BHP 致 PC12 细胞损伤的保护及机制

黄伟¹, 李涵², 李本岳¹, 张洋², 关莉^{2*}, 王奇^{1*}

(1. 广州中医药大学临床药理研究所, 广州 510006; 2. 广州中医药大学基础医学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**研究川芎嗪(TMP)对叔丁基过氧化氢(t-BHP)诱导的PC12细胞损伤的保护作用及对磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路的影响。**方法:**培养PC12细胞,孵育不同浓度的川芎嗪(10,25,50,100,200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),12 h后采用细胞增殖毒性检测试剂盒(CCK-8)确定川芎嗪的保护浓度。随后将PC12细胞分为空白组,t-BHP组,TMP组。空白组加入培养基,t-BHP组加入t-BHP(200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),TMP组加入TMP(25,50,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)预处理12 h后加入t-BHP(200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。共作用6 h后采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测乳酸脱氢酶(LDH)漏出量、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、活性氧(ROS)含量和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax),Akt,磷酸化Akt(p-Akt)及mTOR,p-mTOR的表达情况。**结果:**与空白组比较,t-BHP组细胞生存率降低($P < 0.01$),与t-BHP组比较,25,50,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的川芎嗪促进细胞增殖($P < 0.05, P < 0.01$),其中50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的细胞增殖率最高($P < 0.01$);与空白组比较,t-BHP组LDH的释放量,ROS和MDA含量显著增加($P < 0.01$),SOD和GSH-Px的活性显著降低($P < 0.01$),与t-BHP组比较,TMP组LDH的释放量,ROS和MDA含量显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),SOD和GSH-Px的活性显著升高($P < 0.05, P < 0.01$);Western blot表明与空白组比较,t-BHP组中p-Akt,p-mTOR蛋白表达水平明显下降($P < 0.01$),Bcl-2/Bax值明显降低($P < 0.01$),与t-BHP组比较,TMP(50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组中p-Akt,p-mTOR蛋白表达水平明显上升($P < 0.05$),Bcl-2/Bax值明显上升($P < 0.05$)。另外LY294002(PI3K蛋白抑制剂)处理减弱了这些变化。**结论:**川芎嗪通过激活PI3K/Akt/mTOR信号通路保护t-BHP诱导的PC12细胞损伤。

[关键词] 川芎嗪; 神经保护; PC12细胞; 叔丁基过氧化氢(t-BHP); 磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)11-0067-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191102

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190219.1435.012.html>

[网络出版时间] 2019-02-19 16:33

Protective Effect and Mechanism of Tetramethylpyrazine Against t-BHP-induced PC12 Cell Injury

HUANG Wei¹, LI Han², LI Ben-yue¹, ZHANG Yang², GUAN Li^{2*}, WANG Qi^{1*}

(1. Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. School of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of tetramethylpyrazine (TMP) on PC12 cells induced by tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) and the regulatory mechanism on signaling pathway of phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) /kinase B (Akt) /mammalian target of rapamycin (mTOR). **Method:** PC12 cells cultured in vitro were treated with t-BHP (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 6 h to establish a model of oxidative damage in PC12 cells. The experiment was divided into blank group, model group (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ t-BHP), TMP group. PC12 cells were

[收稿日期] 20181109(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(8167140990);广州市科创委项目(穗科创字[2018]94号)

[第一作者] 黄伟,在读硕士,从老年脑病药理学研究,E-mail:13724057313@163.com

[通信作者] *关莉,博士,教授,从事方剂药理学研究,Tel:020-39358028,E-mail:guanli@gzucm.edu.cn;

*王奇,硕士,教授,从事老年脑病研究,Tel:020-36585479,E-mail:wangqi@gzucm.edu.cn

pretreated with TMP (25, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 12 h, and then treated with t-BHP for 6 h. The cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method, and lactate dehydrogenase (LDH) leakage, malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) activity, reactive oxygen species (ROS) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Apoptosis was observed by annexin V-FITC/PI double staining. B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), total protein kinase B (Akt), and phosphorylated protein kinase B (p-Akt), mTOR and p-mTOR expressions were detected by Western blot. **Result:** The cell viability of PC12 cells treated with 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ t-BHP decreased to about 50% after 6 h. This condition was suitable for the establishment of oxidative damage model. Compared with the model group, TMP (25, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) pretreatment for 12 h significantly increased the survival rate of PC12 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), decreased the release of LDH and MDA ($P < 0.05$, $P < 0.01$), significantly reduced the ROS content in PC12 cells ($P < 0.01$), significantly increased the activity of SOD, GSH-Px ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and inhibited the cell apoptosis. Western blot showed that compared with the model group, the protein expressions of p-Akt and p-mTOR in TMP (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) pretreatment group increased significantly ($P < 0.01$), and the Bcl-2/Bax ratio increased significantly. Treatment with LY294002 (PI3K protein inhibitor) also attenuated these changes. **Conclusion:** Ligustrazine protects PC12 cell injury induced by t-BHP by activating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

[**Key words**] tetramethylpyrazine; neuroprotection; PC12 cell; tert-butyl hydroperoxide (t-BHP); phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) /kinase B (Akt) /mammalian target of rapamycin (mTOR)

氧化应激是中风、阿尔茨海默病^[1]、帕金森病等神经退行性疾病^[2]的主要发病机制之一。氧化应激可导致脱氧核糖核酸(DNA),碳水化合物,蛋白质和脂质的损伤,从而引发细胞毒性^[3]。虽然人体具有多种自然防御机制,但这些不能完全阻止所有损伤。因此,探索抗氧化应激的神经保护药物对于疾病的治疗过程具有重要意义^[4]。川芎,伞形科植物的干燥根茎,是传统医学常用中药,具有活血化瘀、祛风止痛、行气开郁之功效,临床上常用于治疗各种心脑血管疾病。川芎含有多种有效成分,如生物碱类,有机酸类,酚类等,其中生物碱类成分被证明具有抗氧化,保护神经,抗炎等活性。川芎嗪是川芎的生物碱类成分之一^[5],已被证明具有多种生物效应,具有活血化瘀、通脉养心的功效,临床上主要用于冠心病、心绞痛、脑梗死及其他缺血性心血管病的治疗^[6-7]。对于治疗神经疾病具有很大的潜力。有学者研究发现,川芎嗪与葛根素连用可以降低脑缺血对大鼠的神经损伤^[7-8],另有报道川芎嗪与血塞通联合治疗可以降低缺血性脑卒中患者的神经功能恢复时间和住院时间,改善血液流变学指标、神经功能评分^[9]。此外,刘文铠等^[10]的临床观察发现,丹参川芎嗪治疗后,其治疗总有效率、治疗效果以及神经功能改善情况显著高于对照组。PC12细胞系是源自大鼠肾上腺髓质的染色体细胞瘤的细胞系,经常被用于研究神经疾病的潜在机制。叔丁基

过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide, t-BHP)是一种稳定的氧化诱导剂,通常用作诱导剂来研究细胞凋亡^[11]。t-BHP的羟基具有强氧化性,可以氧化许多细胞大分子,如多不饱和脂肪酸, DNA和蛋白质^[12]。本实验拟建立PC12细胞t-BHP氧化损伤模型,考察氧化损伤相关指标及凋亡情况,并检测B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)和磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)相关蛋白的表达情况,来探究川芎嗪抗氧化损伤作用及其机制,进一步为治疗神经退行性疾病提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 PC12细胞株由广州中医药大学临床药理研究所提供。

1.2 试剂 川芎嗪(美仑生物技术公司,批号MB6572-S,纯度 $\geq 98\%$); t-BHP(美国Sigma公司,批号19997); RPMI-1640培养基、胎牛血清(美国Thermo公司,批号分别为11875135, 30044333); 细胞增殖/毒性检测试剂盒(CCK-8,日本同仁公司化学研究所,批号CK04); 乳酸脱氢酶(LDH), 超氧化物歧化酶(SOD), 活性氧(ROS), 丙二醛(MDA) Hoechst染色试剂盒, RIPA裂解液, ECL化学发光液(碧云天生物技术研究所,批号分别为C0016, S0060, S0033, S0131, C0003, P0013B, P0018); Bax,

Bcl-2, p-Akt, Akt, β -肌动蛋白(β -actin) 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为#14796, #2764, #4060, #4691, #3678); mTOR, p-mTOR 抗体(美国 Affinity Biosciences 公司,批号 AF6308, AF3308); 山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗,山羊抗鼠 IgG 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 150110, 112586)。

1.3 仪器 MC170 型倒置显微镜,CTR4000 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司);1300A2 型生物安全柜,Varioskan Flash 型酶标仪,Midi40 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);DDY-10 型三恒电泳仪,Trans-Blot SD 型半干转印槽,全自动电泳凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);Allegra64R 型冷冻高速离心机(美国 Beckman 公司);BHC-1300 II A2 型超净工作台(中国金净公司)。

2 方法

2.1 药物制备 精密称取川芎嗪 13.90 mg 于 4 mL 无菌离心管,加入二甲基亚砜(DMSO) 1 mL,在涡旋震荡仪上涡旋混匀后配制成 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液备用。实验时用完全培养基稀释为 25, 50, 100, $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为工作液作用于 PC12 细胞。

2.2 细胞培养 PC12 细胞用含 10% FBS, $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 完全培养基,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的细胞培养箱中培养。2~3 d 传代 1 次。

2.3 建立 PC12 细胞氧化损伤模型^[13] 取对数生长期 PC12 细胞以 $8 \times 10^7/\text{L}$ 细胞密度接种于 96 孔培养板,每孔 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 。贴壁后加入 t-BHP 溶液,每孔最终浓度分别为 50, 100, 200, $400 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。连续培养 6 h 后,弃去培养基,向各组加培养基 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 和 CCK-8 $10 \text{ } \mu\text{L}$,放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱内培养 1 h,于 570 nm 处测定吸光度 A,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{阴性组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{阴性组}}) \times 100\%$$

2.4 川芎嗪预处理对 PC12 细胞的保护 取对数生长期 PC12 细胞按照 2.3 项种板,培养 12 h 贴壁后加入 10, 25, 50, 100, $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 川芎嗪预处理 12 h,加入 $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ t-BHP 作用 6 h 后,弃去培养基,向各组中加 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 培养基和 CCK-8 $10 \text{ } \mu\text{L}$,放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱内培养 1 h,波长 570 nm 处测定 A,计算细胞存活率。

2.5 LDH 和 SOD 活性,ROS,MDA 含量的测定 取对数生长期 PC12 细胞按 2.3 项处理培养 12 h 后

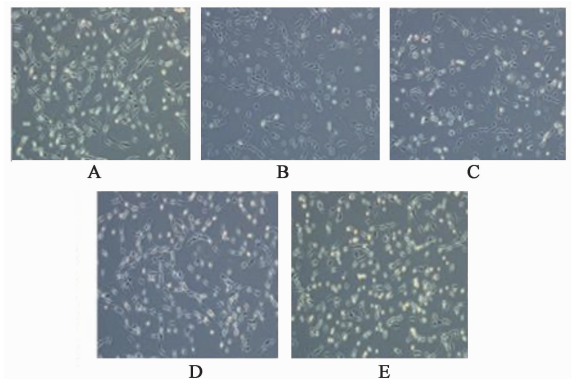
加入 25, 50, $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 川芎嗪预处理 12 h,加入 $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ t-BHP 作用 6 h 后按照试剂盒操作步骤检测 ROS,MDA 含量,LDH 和 SOD 活性。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达变化 将药物作用后的 PC12 细胞用 PBS 洗 3 次,加入 RIPA 细胞裂解液于冰上裂解 30 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 取上清,采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量后,将蛋白变性后取蛋白 $20 \text{ } \mu\text{g}$ 上样采用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后,将蛋白转印至 PVDF 膜,转膜结束后将膜置于含 5% BSA 中,常温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;加入稀释后的一抗(1:1 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;加入稀释后的二抗(1:5 000),常温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;ECL 发光液孵育 1 min 显影。使用 Image J 软件分析各个条带的灰度值,最后进行统计分析。

2.7 统计学方法 统计学分析采用 Graph Pad Prism 5 进行统计学分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较均值,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 川芎嗪预处理对 PC12 细胞形态的影响 空白组 PC12 细胞排列规则整齐,大小均一。t-BHP ($200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 模型组细胞大小不规整,数量减少,部分悬浮于培养液中。川芎嗪(浓度分别为 25, 50, $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理组细胞形态数量增加,状态接近空白组细胞,见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 川芎嗪 $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 川芎嗪 $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; E. 川芎嗪 $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 1 川芎嗪预处理对 t-BHP 诱导的 PC12 细胞形态学的影响(倒置显微镜, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of tetramethylpyrazine (TMP) pretreatment on t-BHP-induced morphological changes in PC12 cells (inverted microscope, $\times 200$)

3.2 不同浓度 t-BHP 对 PC12 细胞存活率的影响
在一定浓度范围内 t-BHP 会造成 PC12 细胞氧化应激损伤影响细胞存活率。与空白组比较, 50 ~ 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 t-BHP 作用于 PC12 细胞, 6 h 内会呈浓度依赖性降低细胞存活率。其中 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ t-BHP 会造成 PC12 细胞 50% 左右损伤 ($P < 0.01$), 适宜用于建立氧化损伤模型。见表 1。

表 1 不同浓度 t-BHP 对 PC12 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effect of t-BHP on survival of PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白	-	100.00
t-BHP	50	88.92 \pm 9.78 ¹⁾
	100	72.01 \pm 11.12 ²⁾
	200	45.86 \pm 5.41 ²⁾
	400	20.32 \pm 3.11 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 川芎嗪预处理对 t-BHP 损伤的 PC12 细胞存活率的影响
与空白组比较, 模型组 PC12 细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 不同浓度川芎嗪预处理后, t-BHP 损伤的 PC12 细胞存活率明显上升 ($P < 0.05, P < 0.01$)。其中 25, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下, 细胞存活率较模型组有显著差异, 见表 2。

表 2 川芎嗪预处理对 t-BHP 损伤的 PC12 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 2 Protective effect of TMP on PC12 cells treated with t-BHP ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白	-	100.00
模型	200	44.22 \pm 8.93 ¹⁾
TMP	10	47.55 \pm 4.65
	25	59.15 \pm 5.36 ²⁾
	50	73.96 \pm 2.91 ³⁾
	100	67.17 \pm 4.61 ²⁾
	200	48.67 \pm 1.86

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$ (表 3 ~ 5 同)。

3.4 川芎嗪预处理对 MDA 含量及细胞上清液中 LDH 含量的影响
与空白组比较, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ t-BHP 作用 PC12 细胞 6 h 后, 胞内脂质过氧化产物 MDA 显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 川芎嗪低、中、高剂量能明显降低细胞内 MDA 的含量 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组比较, 模型组的 PC12 细胞上清液中 LDH 活性显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 川芎嗪低、中、高剂量能不同程度的降低氧

化损伤后 PC12 细胞上清液中 LDH 活性 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 川芎嗪预处理对氧化损伤 PC12 细胞中 MDA 含量及上清液中 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 3 Effect of TMP pretreatment on contents of MDA and LDH activity in PC12 cells treated with t-BHP ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	LDH/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	MDA/ $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$
空白	-	88.10 \pm 8.24	0.85 \pm 0.23
模型	200	181.84 \pm 8.77 ¹⁾	3.02 \pm 0.55 ¹⁾
TMP	25	165.89 \pm 4.73 ³⁾	1.97 \pm 0.32 ³⁾
	50	141.85 \pm 7.95 ²⁾	1.24 \pm 0.52 ²⁾
	100	159.28 \pm 4.10 ³⁾	2.68 \pm 0.38 ³⁾

3.5 川芎嗪预处理对 PC12 细胞内 GSH-Px, SOD 活性和 ROS 含量的影响
与空白组比较, t-BHP 诱导 6 h 后, 细胞内 ROS 含量显著升高 ($P < 0.01$), GSH-Px, SOD 的活性显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 川芎嗪低、中、高剂量能不同程度的升高细胞浆内 GSH-Px, SOD 的活力 ($P < 0.05, P < 0.01$), 并降低 ROS 含量 ($P < 0.01$)。见表 4。

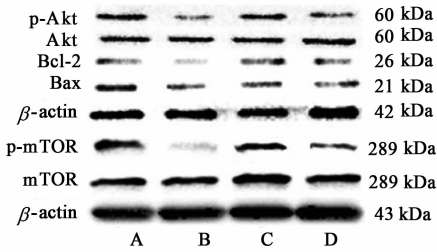
表 4 川芎嗪预处理对 PC12 细胞内 GSH-Px, SOD 活性和 ROS 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 4 Effect of TMP pretreatment on ROS, GSH-Px and SOD activity in PC12 cells treated with t-BHP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	GSH-Px/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	ROS/%
空白	-	32.67 \pm 5.79	69.47 \pm 5.08	115.67 \pm 4.19
模型	200	16.52 \pm 6.23 ¹⁾	36.77 \pm 6.37 ¹⁾	265.33 \pm 5.44 ¹⁾
TMP	25	21.33 \pm 7.41 ³⁾	49.83 \pm 3.70 ³⁾	237.00 \pm 5.17 ³⁾
	50	25.37 \pm 4.78 ²⁾	62.33 \pm 6.05 ²⁾	166.00 \pm 6.16 ²⁾
	100	19.67 \pm 5.73 ³⁾	49.06 \pm 7.21 ³⁾	215.67 \pm 4.92 ³⁾

3.6 川芎嗪预处理 t-BHP 诱导的 PC12 细胞中 Bcl-2, Bax, 总蛋白激酶 Akt, p-Akt 及 mTOR, p-mTOR 蛋白表达的影响
与空白组比较, t-BHP (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 模型组显著下调 p-Akt, p-mTOR 蛋白表达 ($P < 0.01$); 显著下调 Bcl-2/Bax 值 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 用川芎嗪 (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 预处理显著上调 p-Akt, p-mTOR 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 值 ($P < 0.01$)。而与川芎嗪组比较, 川芎嗪与 LY294002 联合处理可以减少 p-Akt, p-mTOR 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 值 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2, 表 5。

4 讨论

近年来对于中枢神经系统氧化状态的研究为中风, 阿尔兹海默症等神经退行性疾病的治疗带来新



A. 空白组; B. 模型组; C. 川芎嗪 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 川芎嗪 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + LY294002 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 2 PC12 细胞 Bcl-2, Bax, Akt, mTOR, p-Akt, p-mTOR 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of expression of Bcl-2, Bax, Akt, mTOR, p-Akt, p-mTOR in all groups

表 5 川芎嗪预处理 t-BHP 诱导的 PC12 细胞中 Bcl-2, Bax, Akt, mTOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of TMP pretreatment on t-BHP-induced Bcl-2, Bax, Akt, mTOR protein expression in PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	p-Akt/Akt	Bcl-2/Bax	p-mTOR/mTOR
空白	-	71.60 \pm 3.69	49.96 \pm 0.43	17.10 \pm 4.70
模型	-	40.32 \pm 0.92 ¹⁾	21.84 \pm 0.18 ¹⁾	25.58 \pm 1.00 ¹⁾
川芎嗪	50	94.31 \pm 3.50 ²⁾	119.79 \pm 2.65 ²⁾	83.70 \pm 0.64 ²⁾
川芎 + LY294002	50 + 20	46.73 \pm 4.55 ³⁾	84.15 \pm 0.92 ³⁾	34.76 \pm 5.10 ³⁾

保护细胞活力,减少 LDH 渗漏与 MDA 含量。其中 TMP 在 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 效果最显著,而 TMP 在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时效果不如 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 显著,且与 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 各项指标类似,表明川芎嗪对细胞活力保护作用不呈剂量依赖性,并且高剂量的 TMP 会对 PC12 细胞造成与氧化应激相关的损伤,这一结果与林文新等^[20]的研究相符。

内源性抗氧化物酶(SOD, GSH-Px)是防止氧化应激产生损伤的第一道防线^[21-22],这些内源性的抗氧化物酶通过清除过量的 ROS 使机体处于平衡状态^[23],其酶活性的高低反应了机体清除 ROS 的能力。本实验对 PC12 细胞内 SOD, MDA, GSH-Px 的活力进行了检测。实验结果表明,模型组细胞内 SOD, GSH-Px, MDA 的活性明显下降,说明细胞受到损伤,清除 ROS 的能力受到显著抑制。给予不同浓度的川芎嗪预培养后,损伤的细胞内 SOD, MDA, GSH-Px 的活性明显升高,表明川芎嗪能够明显改善 t-BHP 对 PC12 细胞内 SOD, MDA, GSH-Px 活性的抑制,提高细胞活力以及清除 ROS 的能力。实验结果显示,增强内源性抗氧化物酶的活性可能是川芎嗪降低胞内 ROS 含量的机制之一。

近年许多研究表明川芎嗪能够保护神经细胞免受理化因素损伤。严钢莉等^[24]研究发现川芎嗪通过调控线粒体凋亡减弱 $\text{A}\beta$ 诱导的 PC12 细胞损伤。

的思路。通常在中枢神经系统中,ROS 的产生和降解维持着氧化应激的平衡^[14]这种平衡一旦打破,氧化应激将成为神经元损伤和多种疾病的触发因素。

t-BHP 已被广泛用作体外模型的氧化应激指标。来自 t-BHP 的自由基会与细胞内酶,膜脂和其他必需化合物发生反应^[15-16]导致细胞凋亡和细胞死亡^[12],而且相对于 H_2O_2 比较稳定^[17]。在该研究中,笔者选择 t-BHP 来诱导氧化应激对细胞损伤。

当细胞膜受损时,LDH 将释放到培养基中,LDH 释放是细胞损伤的重要信号^[18]。同时,MDA 是细胞或者机体内脂质过氧化的产物,可直接反映细胞损伤程度^[19]。研究结果表明,川芎嗪可以明显

TANG 等^[25]研究表明川芎嗪联合冰片通过 PI3K/Akt 信号通路抑制氧化应激诱导的 SY5Y 自噬凋亡。WANG 等^[26]认为川芎嗪通过激活 AMPK/mTOR 信号通路保护糖皮质激素诱导的骨髓间充质干细胞凋亡。川芎嗪是否能够通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路保护 PC12 细胞免受氧化应激损伤尚未见相关文献报道。本研究为了探讨川芎嗪对 t-BHP 诱导的 PC12 细胞损伤的影响,首先运用 t-BHP 进行体外培养造模,观察川芎嗪对 PC12 细胞的保护作用,结果发现经川芎嗪预处理后可以减弱 t-BHP 诱导的氧化损伤作用。为进一步阐明川芎嗪减弱 t-BHP 诱导的 PC12 细胞损伤的机制,本研究对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路中所涉及的一些关键蛋白进行研究。结果表明,川芎嗪能够促进 Akt 及其下游蛋白 mTOR 的磷酸化,但并不影响 Akt 总蛋白的表达量,并且当川芎嗪与 LY294002 (LY294002 是一种可选择性渗透细胞的 PI3K 特异性抑制剂,LY294002 作用于酶的 ATP 结合位点,抑制自体吞噬的整合作用)联合干预时 Akt 和 mTOR 的磷酸化有所减弱进一步证实川芎嗪通过介导 PI3K/Akt/mTOR 信号通路影响细胞凋亡。综上所述,利用了 t-BHP 诱导的 PC12 细胞氧化损伤模型考察川芎嗪抗氧化损伤作用。结果表明,川芎嗪可拮抗 t-BHP 诱导的氧化损伤,其机制可能是通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号

通路从而抑制细胞凋亡。因实验内容缺乏体内实验的论证,结果具有一定的局限性,但实验结果为川芎嗪的进一步开发提供了理论基础。

[参考文献]

[1] CHEN Z C, ZHONG C J. Oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. *Neurosci Bull*, 2014, 30(2): 271-281.

[2] Sandra F I, Miquel V, Celine P. Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases: focus on parkinson's disease and huntington's disease[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12:1-25.

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

[4] 傅瑜,廖琴,樊东升. 神经保护剂治疗缺血性脑卒中的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(11): 973-977.

[5] 周惠芬,何昱,张宇燕,等. 川芎和黄芪有效部位组合给药后川芎嗪在脑缺血再灌注大鼠体内的 PK-PD 结合研究[J]. *中草药*, 2016, 47(19): 3463-3468.

[6] 吴平勇,曾宪涛,王学军,等. 川芎嗪对心肌缺血再灌注损伤防治作用的系统评价与 Meta 分析[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2014, 6(6): 653-657.

[7] 李健琳,韩江全,陈玲. 川芎嗪和葛根素配伍对脑缺血大鼠神经细胞凋亡及 Caspase-3 影响[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2016, 37(4): 423-425.

[8] 林文新,马阮昕,冯真英. 川芎嗪对过氧化氢诱导 PC12 细胞氧化应激的作用[J]. *江西中医药*, 2018, 49(2): 29-31.

[9] 李杰. 川芎嗪联合血栓通治疗缺血性脑卒中的疗效分析[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2014, 17(17): 108-109.

[10] 刘文铠,肖辉亮,周徐州. 丹参川芎嗪注射液辅助辨治缺血性脑卒中的临床研究[J]. *中国生化药物杂志*, 2014, 34(2): 120-121.

[11] Ghosh M, Manna P, Sil P C. Protective role of a coumarin-derived schiff base scaffold against tertiary butyl hydroperoxide (TBHP)-induced oxidative impairment and cell death via MAPKs, NF-kappaB and mitochondria-dependent pathways[J]. *Free Radic Res*, 2011, 45(5): 620-637.

[12] Bajpai V K, Alam M B, Ju M K, et al. Antioxidant mechanism of polyphenol-rich *Nymphaea nouchali* leaf extract protecting DNA damage and attenuating oxidative stress-induced cell death via Nrf2-mediated heme-oxygenase-1 induction coupled with ERK/p38 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1397-1407.

[13] 陈剑平,李中桂,张尚斌,等. 大枣神经保护作用的活

性组分筛选及其作用机制研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(25): 3495-3498.

[14] 高婷,王子旭,陈祝茗,等. ROS 介导的氧化应激与自噬[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(3): 656-662.

[15] ZHOU J, MA X, CUI Y, et al. Methyleugenol protects against t-BHP-triggered oxidative injury by induction of Nrf2 dependent on AMPK/GSK3beta and ERK activation[J]. *J Pharmacol Sci*, 2017, 135(2): 55-63.

[16] SHEN C, MA W, ZHENG W, et al. The antioxidant effects of riluzole on the APRE-19 cell model injury-induced by t-BHP [J]. *BMC Ophthalmol*, 2017, 17(1): 210.

[17] 高健美,李德芬,牛爽,等. 金丝桃苷对过氧化氢诱导的 A549 细胞氧化损伤的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(11): 128-133.

[18] 刘亭,宋菲,杨健,等. 基于 HSF1 高表达 H9c2 细胞的参芎葡萄糖注射液抗氧化损伤作用探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(8): 85-90.

[19] 张建武,闵冬雨,周云,等. 番茄红素对 H₂O₂ 致乳鼠心肌细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(12): 160-164.

[20] 林文新,马阮昕,冯真英. 川芎嗪对过氧化氢诱导 PC12 细胞氧化应激的作用[J]. *江西中医药*, 2018, 49(2): 29-31.

[21] Aydemir T, Oztürk R, Bozkaya L A, et al. Effects of antioxidant vitamins A, C, E and trace elements Cu, Se on CuZn SOD, GSH-Px, CAT and LPO levels in chicken erythrocytes [J]. *Cell Biochem Funct*, 2000, 18(2): 109-115.

[22] 陈丹丹,彭成,李梦婷,等. 自噬参与氢溴酸樟柳碱对缺氧状态下 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(20): 144-149.

[23] 卢春风,杨玉,商宇,等. ROS 介导的氧化应激在 INH 诱导的细胞毒性中的作用及褪皮素的干预[J]. *生态毒理学报*, 2015, 10(3): 209-215.

[24] 严钢莉,李朝武,聂海岭,等. 丹参川芎嗪注射液对 Aβ 损伤的 PC12 细胞保护作用及机制研究[J]. *卒中与神经疾病*, 2016, 23(1): 15-20.

[25] TANG F, ZHOU X, WANG L, et al. A novel compound DT-010 protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in zebrafish and H9c2 cells by inhibiting reactive oxygen species-mediated apoptotic and autophagic pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 820: 86-96.

[26] WANG L, ZHANG H Y, GAO B, et al. Tetramethylpyrazine protects against glucocorticoid-induced apoptosis by promoting autophagy in mesenchymal stem cells and improves bone mass in glucocorticoid-induced osteoporosis rats [J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(6): 419-430.

[责任编辑 周冰冰]