

迷迭香酸通过 MAPKs 信号通路对 H₂O₂ 诱导的星形胶质细胞凋亡的影响

曾晓红¹, 梁波², 郑瑞芳³, 刘砥威^{3*}

(1. 新疆乌鲁木齐市第一人民医院, 新疆 乌鲁木齐 830004; 2. 哈密市食品检验所, 新疆 哈密 839000; 3. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830004)

摘要: 目的 探究迷迭香酸通过 MAPKs 信号通路对 H₂O₂ 诱导的星形胶质细胞凋亡的影响。方法 CCK-8 法检测不同浓度迷迭香酸对 U87 细胞氧化应激损伤存活率的影响; 酶标法检测乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA) 和线粒体活性氧 (ROS); Western blot 法检测细胞中磷酸化丝裂原活化蛋白酶 P38 (p-P38MAPK)、磷酸化细胞外信号调节激酶 (P-ERK1/2)、凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 及 caspase-3 的表达。结果 迷迭香酸对 H₂O₂ 损伤星形胶质神经细胞具有保护作用, 可以提高细胞存活率, 并且可以剂量依赖性减少 LDH 和 MDA 产生, 从而起到抗氧化作用。迷迭香酸可以减少线粒体内 ROS 生成, 对线粒体损伤具有一定保护作用。与模型组比较, 迷迭香酸可下调凋亡蛋白的表达, 抑制 P38MAPK 蛋白磷酸化, 显著上调磷酸化 ERK1/2 蛋白的表达, 通过 MAPKs 途径起到抗线粒体凋亡的作用。结论 迷迭香酸对 H₂O₂ 诱导的 U87 细胞损伤具有保护作用, 其机制可能涉及 MAPKs 介导的凋亡信号通路。

关键词: 迷迭香酸; 星形胶质神经细胞; 氧化应激; MAPKs; 线粒体凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)02-0510-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.02.043

脑卒中是最常见的神经功能障碍疾病,也是导致死亡的第二大原因^[1]。星形胶质细胞是中枢系统最丰富的细胞^[2],在中枢神经系统中起广泛作用,参与调节神经发育、神经代谢和脑代谢,保护神经元免受氧化应激和兴奋性氧化的影响,对神经细胞的存活至关重要^[3]。氧化应激是导致很多病理机制的潜在因素,星形胶质细胞易受到氧化应激的影响,导致星形胶质细胞功能受损^[4]。星形胶质细胞是潜在的脑卒中治疗靶点,因此研究氧化应激对星形胶质细胞的损伤至关重要。

香青兰 *Dracocephalum moldevica* L. 是新疆地产民族药,临床上常用于脑缺血性脑损伤的治疗,具有抗氧化和脑神经保护活性,可对抗多种原因引起的脑神经细胞凋亡^[5-7]。酚酸类化合物迷迭香酸是香青兰中主要的有效成分,具有抗氧化、抗炎、抗血小板聚集等作用^[8]。在制药、食品及化妆品领域具有较高的应用价值,因此,对迷迭香酸进行研究具有一定的研究意义^[9]。首次对迷迭香酸星形胶质细胞氧化应激损伤保护作用进行研究,以期对脑卒中的治疗提供参考。

1 材料

迷迭香酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111871-201001); U87 细胞(中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心);胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号

1932595); 0.25% 胰酶(美国 Hyclone 公司); CCK-8 检测试剂盒(美国博士德公司,批号 13C21C60); p-P38-MAPK (批号 9215)、p-ERK1/2 抗体(批号 4370)、Bax Antibody (批号 2772)、Bcl-2 (批号 3498)、caspase-3 (批号 2202) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; GAPDH (英国 Abcam 公司,批号 18AF00403); 丙二醛测定试剂盒、乳酸脱氢酶测定试剂盒(中国南京建成生物工程研究所); 所有其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 细胞培养 U87 细胞是人脑星形胶质母细胞瘤细胞, DMEM 高糖培养基培养,辅加 10% 胎牛血清、100 μg/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,当细胞融合度达到 85%~90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化细胞,以 1:2 的比例进行传代,每隔 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期的细胞接种于培养板中进行后续实验。

2.2 氧化应激损伤模型构建 氧化应激模型模拟脑卒中星形胶质细胞损伤的病理变化, H₂O₂ 是氧化剂,可使活性氧大量激增造成氧化应激损伤。用 0.5 mmol/L H₂O₂ 诱导 U87 细胞 40 min,模拟星形胶质细胞氧化应激损伤。

首先将细胞随机分为高葡萄糖 DMEM 治疗对照组、氧化应激损伤模型组和药物干预治疗组。每一组根据迷迭香

收稿日期: 2019-09-20

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2019D01A80); 自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(KY2019099)

作者简介: 曾晓红(1968—),女,副主任药师,从事中药民族药研究。Tel: (0991) 2302511, E-mail: 2293380509@qq.com

* 通信作者: 刘砥威(1970—),男,研究员,从事中药民族药研究。Tel: (0991) 2812335, E-mail: 3498921775@qq.com

酸浓度 100、50、25、5 $\mu\text{mol/L}$ 进一步分为 4 个亚组，每组设置 3 个平行复孔 U87 细胞进行不同浓度迷迭香酸预处理 6 h，观察其对氧化应激损伤的影响。

2.3 细胞活性和乳酸脱氢酶释放检测 测定细胞活力和细胞膜释放的乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 通过 CCK-8 试剂盒法和 LDH 测定试剂盒-微量酶标法，分别按照说明书的指示，用酶标法进行检测。

2.4 细胞内脂质过氧化物丙二醛检测 通过细胞丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒-酶标法测定 MDA 水平，按照说明书的指示，用酶标仪进行检测。

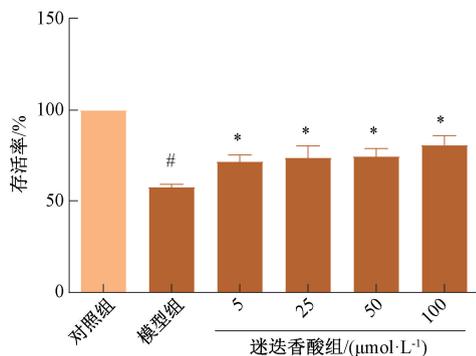
2.5 活性氧检测 细胞内活性氧 (Route Operation System, ROS) 水平检测，利用 ROS 可以将 2', 7'-二乙酰二氯荧光素 (DCFH-DA) 氧化成为可检测的绿色荧光物质 2, 7-荧光素二醋酸的原理，检测细胞内 ROS 水平。使用流式细胞仪和酶标仪进行拍照及分析，激发光波长为 485 nm，发射波长为 535 nm，以细胞内平均荧光强度 (Mean_ AvgInten) 表示 ROS 水平。

2.6 Western Blot 检测各组 U87 细胞 P-P38-MAPK、P-ERK1/2、Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白的表达 P-P38-MAPK/P-ERK1/2 及其下游凋亡蛋白 Bax、Bcl-2、caspase-3 等信号通路蛋白表达检测采用免疫印迹实验。U87 细胞在裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4、20 mmol/L EDTA、0.1% 十二烷基硫酸钠、100 mmol/L NaCl、1% NP-40、0.5% 脱氧胆酸钠、50 mmol/L 氟化钠、1 mmol/L 原肌球蛋白、1 mmol/L PMSF、2 mmol/L 焦磷酸钠、1 $\mu\text{g/mL}$ 抑肽素 A、100 $\mu\text{g/mL}$ 亮抑肽酶和复合蛋白酶抑制剂) 中完成组织蛋白提取工作。蛋白样品经沸水煮 3 min，加入 SDS-多聚丙烯酰胺凝胶。完成电泳，将蛋白电转至 PVDF 薄膜上。然后浸入 1:2 000 稀释的一抗，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日用 TBST 洗涤数次，再与 HRP 偶联的二抗室温孵育 45 min。最后使用 ECLTM 检测试剂盒使目的蛋白条带发光，条带区域和相对光密度值使用图像密度计算软件进行处理。实验结果以目的蛋白平均光密度对 GAPDH 平均光密度的相对值表示。

2.7 统计学分析 所有实验均进行了 3 次平行实验。采用 SPSS21.0 进行数据分析，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 SNK-q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

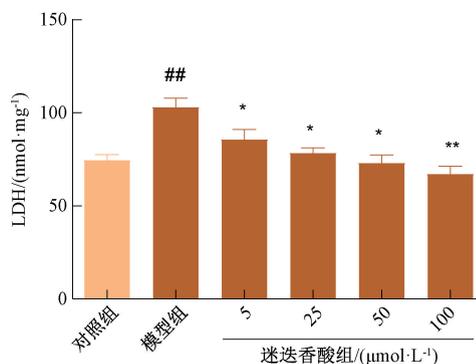
3 结果

3.1 迷迭香酸预给药对 U87 细胞氧化损伤的保护作用 与对照组比较，模型组细胞存活率降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较，迷迭香酸处理后细胞存活率升高 ($P < 0.05$)，见图 1。与对照组比较，模型组细胞 LDH 的释放升高 ($P < 0.05$)，与模型组比较，迷迭香酸处理后 LDH 的释放减少，且呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)，见图 2。与对照组比较，模型组细胞 MDA 的释放升高 ($P < 0.05$)，与模型组比较，迷迭香酸处理后 MDA 的释放减少，且呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)，见图 3。说明迷迭香酸具有清除氧自由基 MDA，减少机体过氧化程度，减少细胞损伤的程度。



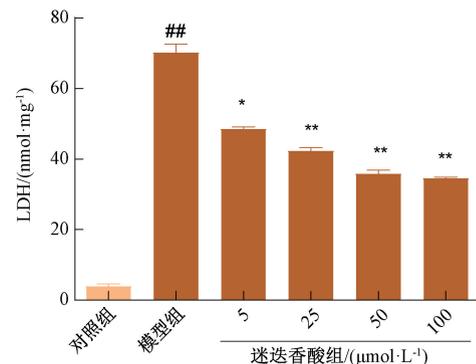
注：与对照组比较，[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ 。

图 1 迷迭香酸对 H_2O_2 损伤 U87 存活率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与对照组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

图 2 迷迭香酸对 H_2O_2 损伤 U87 LDH 释放的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

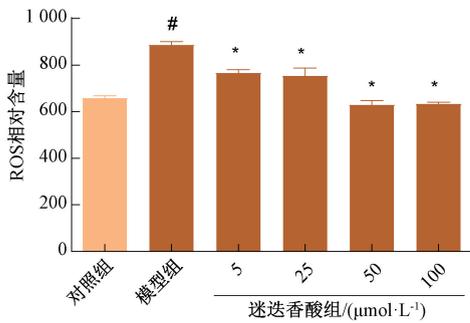


注：与对照组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

图 3 迷迭香酸对 H_2O_2 损伤 U87 MDA 释放的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

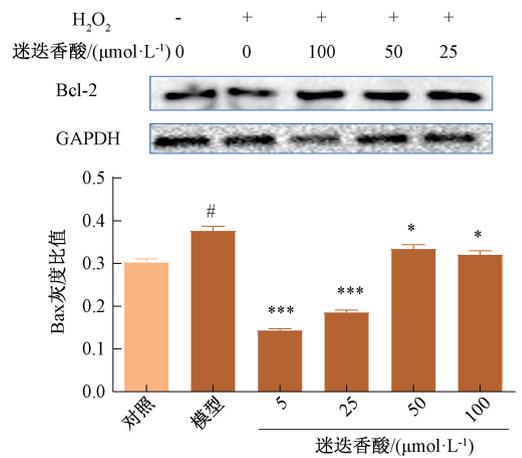
3.2 迷迭香酸对减少线粒体活性氧的产生 图 4 显示，与对照组比较，模型组 U87 细胞 DCFH-DA 的荧光强度增加 ($P < 0.05$)；与模型组比较，迷迭香酸治疗组，DCFH-DA 的荧光强度降低，并呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。结果表明迷迭香酸可以减少线粒体内 ROS 的产生，改善线粒体功能障碍，调节细胞环境平衡。

3.3 迷迭香酸降低 MAPKs 及其下游凋亡信号的表达 图 5~6 显示，与对照组比较，模型组上调 p-P38MAPK、caspase-3、Bax 蛋白表达；p-ERK1/2、Bcl-2 蛋白的表达下



注：与对照组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，^{*}*P*<0.05。

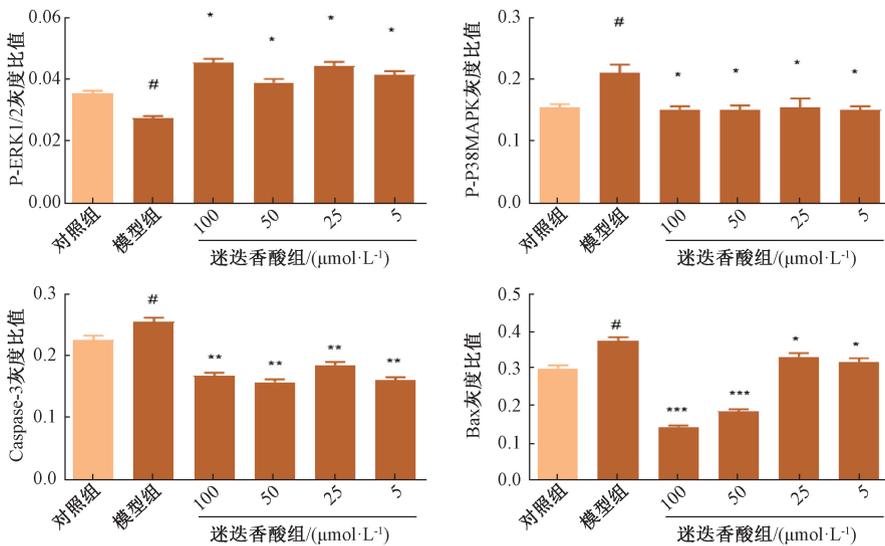
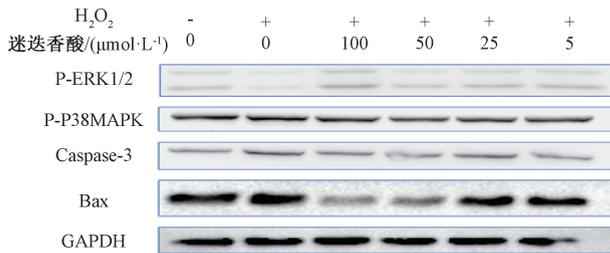
图4 迷迭香酸对 H₂O₂ 损伤 U87 ROS 释放的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)



注：与对照组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图6 Bcl-2 蛋白的表达 (*n*=3)

调。与模型组比较，迷迭香酸显著降低前三者蛋白的表达量；上调 p-ERK1/2、Bcl-2 蛋白的表达。



注：与对照组比较，[#]*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图5 MAPKs 及其下游凋亡信号的表达 ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)

4 讨论

几十年来，脑卒中研究主要集中在神经元。然而，仅针对细胞死亡的神经元机制的干预最终未能促进神经恢复或减少缺血诱导的损伤^[10]。研究发现，脑卒中后神经细胞存活需要胶质细胞，特别是星形胶质细胞的存活和功能维持^[11]。一项研究表明，在脑缺血中维持和保护星形细胞功能可能比神经元更重要^[12]。缺血性损伤后，星形胶质细胞发生肿胀，星形胶质细胞间隙连接可能保持不紧，导致谷氨酸的吸收和释放平衡恶化，以及促凋亡因子的扩散，这

可能加速周围神经元的细胞死亡^[13-14]。因此，神经胶质细胞（包括星形胶质细胞）在氧化应激下的存活可能对减少神经元死亡，限制梗死面积至关重要^[15]。因此本实验对迷迭香酸保护脑卒中星形胶质细胞损伤进行研究。

线粒体是细胞能量的来源，调节 ATP 需求与供应，调节 Ca²⁺ 信号，协调局部代谢，整合生存/死亡信号。进一步对线粒体内 ROS 进行检测显示，星形胶质细胞 ROS 释放大量激增，诱发细胞凋亡蛋白发生变化，从而导致线粒体损伤，诱导细胞凋亡。迷迭香酸预保护后可以明显减少 ROS

的产生,减少LDH、MDA的释放,保护线粒体免受氧化应激损伤的影响,从而抑制细胞凋亡。

p38MAPK过度激活是造成缺血性损伤的原因,最终导致线粒体释放凋亡蛋白Bax,启动caspase凋亡信号蛋白,引起细胞凋亡。ERK1/2是抗凋亡蛋白,具有抗凋亡作用。迷迭香酸预保护后可以逆转这些蛋白的变化,并且可以平衡Bax和Bcl-2凋亡和抗凋亡蛋白的表达,起到保护星形胶质细胞的作用。

参考文献:

[1] Mozaffarian D, Benjamin E J, Go A S, *et al.* Heart disease and stroke statistics-2016 update; a report from the american heart association[J]. *Circulation*, 2016, 133(4): 38-60.

[2] Herculano-Houzel S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution[J]. *Glia*, 2014, 62(9): 1377-1391.

[3] Guillam ón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description[J]. *Neurologia*, 2015, 30(2): 119-29.

[4] Daverey A, Agrawal S K. Curcumin alleviates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in astrocytes [J]. *Neuroscience*, 2016, 333: 92-103.

[5] Jiang H L, Fang J S, Xing J G, *et al.* Tiliarin mediates neuro protection against ischemic injury by attenuating CaMKII-dependent mitochondrion-mediated apoptosis and MAPK/NF-κB signaling[J]. *Life Sci*, 2019, 216: 233-245.

[6] 于 宁,姜 雯,谭梅娥,等. HPLC 法测定不同采收期香青兰中黄酮和酚酸类的含量[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36

(6): 991-997.

[7] 曾 诚,马丽月,于 宁,等. 香青兰提取物基本理化性质研究[J]. *中草药*, 2016, 47(21): 3817-3823.

[8] 尤 茹,马雪倩,吴炳火,等. 迷迭香酸药理作用研究进展 [J]. *四川生理科学杂志*, 2015, 37(2): 93-97.

[9] 李 珂,胡志敏. 迷迭香酸生物学作用研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2019(9): 1032-1036.

[10] Xu M, Zhang H L. Death and survival of neuronal and astrocytic cells in ischemic brain injury: a role of autophagy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32: 1088-1099.

[11] Elmann A, Telerman A, Erlank H, *et al.* Achillolide a protects astrocytes against oxidative stress by reducing intracellular reactive oxygen species and interfering with cell signaling [J]. *Molecules*, 2016, 21(3): 301.

[12] Yu S, Wang X, Lei S, *et al.* Sulfiredoxin-1 protects primary cultured astrocytes from ischemia-induced damage [J]. *Neurochem Int*, 2015, 82: 19-27.

[13] Zhou Y, Zhou Y, Yu S, *et al.* Sulfiredoxin-1 exerts anti-apoptotic and neuroprotective effects against oxidative stress-induced injury in rat cortical astrocytes following exposure to oxygen-glucose deprivation and hydrogen peroxide [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(1): 43-52.

[14] Kim Y K, Yoon H H, Lee Y D, *et al.* Anthocyanin extracts from black soybean (*Glycine max* L.) protect human glial cells against oxygen glucose deprivation by promoting autophagy [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2012, 20(1): 68-74.

[15] Toussaint F, Charbel C, Allen B G, *et al.* Vascular CaMKII: heart and brain in your arteries [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 311(3): 462-478.