

二苯乙烯苷对氧糖剥夺星形胶质细胞凋亡的影响及其机制

张 琰

(济宁医学院医学影像系, 山东 济宁 272067)

摘 要 **目的** 观察 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(TSG)对大鼠大脑皮层星形胶质细胞(AS)缺氧、缺糖损伤所致凋亡的影响,以及内质网应激相关因子 Caspase-12、Caspase-3 的表达变化,探讨 TSG 脑保护作用的作用机制。**方法** 原代培养 Sprague-Dawley 大鼠大脑皮层 AS,建立缺氧、缺糖损伤模型,以流式细胞术检测细胞凋亡率,以透射电镜观察细胞超微结构尤其是凋亡小体的变化,研究缺氧缺糖对 AS 的影响;以钙离子敏感的荧光探针 Fura-2/AM 负载细胞检测细胞内游离钙离子浓度,研究氧糖剥夺(OGD)对不同组 AS 的影响;以免疫细胞化学染色方法和反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法观测内质网应激相关因子 Caspase-12 和 Caspase-3 各组的表达。**结果** 与正常对照组相比,缺氧缺糖处理后 AS 内游离钙离子浓度增高,TSG 预处理可明显降低细胞内游离钙离子,调节钙稳态失衡。免疫细胞化学染色和 RT-PCR 结果显示,缺氧缺糖损伤后细胞内 Caspase-12、Caspase-3 表达增加,TSG 预处理可显著抑制两者的表达。**结论** TSG 可抑制 OGD 诱导的 AS 凋亡,其机制可能通过抑制内质网应激发挥作用。

关键词 星形胶质细胞;二苯乙烯苷;氧糖剥夺;细胞凋亡;内质网应激

中图分类号:R-33 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-9760(2013)08-245-05

Effects and mechanisms of 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O-β-D-glucoside (TSG) against oxygen-glucose deprivation induced apoptosis in rat astrocytes

ZHANG Yan

(College of Medical Imageology, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of TSG on the apoptosis of rat cerebral cortical astrocytes induced by oxygen-glucose deprivation. To observe the endoplasmic reticulum stress related factors caspase-12 and caspase-3 expression in AS and explore the possible mechanism of brain protection by TSG. **Methods** Primary cultured cerebral cortical astrocytes were prepared from Sprague-Dawley rats, and a cell damage model was induced by oxygen-glucose deprivation (OGD). The change of cell morphology was observed by transmission electron microscope, and the detection of apoptotic cells was determined by the flow cytometry. Intracellular calcium concentration was monitored using the fluorescent Ca^{2+} indicator fura-2/AM by fluorescence dual wavelength spectrophotometer. The expression of apoptosis-related proteins, caspase-12 and caspase-3, was observed by immunocytochemistry and caspase-12 and caspase-3 mRNA were evaluated by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The concentration of intracellular Ca^{2+} was increased by OGD, and the application of TSG could decrease it. RT-PCR and immunocytochemistry analysis demonstrated that the levels of caspase-12, caspase-3 mRNA and protein increased by OGD, and the application of TSG could inhibit these expression. **Conclusion** The expression of caspase-12 and caspase-3 increases dramatically after OGD, which indicates that the endoplasmic reticulum stress could contribute to the occurrence and development of cell apoptosis induced by OGD in AS. TSG could inhibit the cell apoptosis induced by OGD in AS, and its mechanisms might be associated with the inhibition of the endoplasmic reticulum stress.

Key words: Astrocytes; TSG; Oxygen-glucose deprivation; Cell apoptosis; Endoplasmic reticulum stress

2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(TSG)是何首乌中提取分离的主要有效成分,具有

抗炎、抗氧化、清除自由基、抑制动脉粥样硬化等多种作用^[1]。随着 TSG 研究的不断深入,发现其在

神经细胞损伤中具有显著保护作用。研究表明, TSG 对 $\text{A}\beta$ 或谷氨酸诱导的神经细胞损伤均有明显的保护作用。TSG 还能减少缺血、缺氧损伤等诱导的神经元细胞凋亡^[2-3]等作用;课题组前期研究表明 TSG 对氧糖剥夺(OGD)诱导损伤的 AS 具有保护作用,且呈剂量依赖性^[4]。目前 TSG 抑制 AS 凋亡的确切机制尚未见文献报道。本文采用 OGD 诱导 AS 损伤、凋亡,观察 TSG 对 OGD 诱导 AS 凋亡的影响,并检测 AS 内质网应激凋亡相关分子 Caspase-12、Caspase-3 的表达,探讨其作用机制,为明确 TSG 在脑缺血缺氧中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

TSG(中国药品生物制品检定所);Cleaved Caspase-3 多克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司);Caspase-12 多克隆抗体(美国 Chemicon 公司);钙离子荧光探针 Fura-2/AM(美国 Biotium 公司);鼠尾胶原、D-hanks、PBS、Earle 平衡盐溶液自制。

1.2 方法

1.2.1 鼠脑 AS 的分离培养及 AS 缺氧、缺糖损伤模型的建立 原代培养 SD 大鼠大脑皮层 AS,取生长状态良好的第 4 代细胞用于实验。实验分为正常组、缺氧缺糖组和 TSG 预处理组。根据本室前期研究结果,缺氧缺糖损伤模型取缺氧缺糖 12h,记为 OGD12, TSG 终浓度为 $50\mu\text{mol/L}$ ^[4]。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡率及透射电镜观察细胞超微结构变化 将各组细胞进行相应处理后,胰蛋白酶消化、1000rpm 离心 10min 收集细胞后去上清,于 70% 乙醇(-20°C 预冷) 4°C 固定 24h,细胞浓度调整为 1×10^6 个/ml, PBS 洗 3 次,悬于含 RNase A 的 PI 染液中, 37°C 孵育 30min,流式细胞仪检测凋亡细胞。收集各组细胞经取样、固定、脱水、浸泡、包埋后切片染色,透射电镜观察、照相。

1.2.3 细胞内游离钙离子浓度的测定 应用钙离子敏感的荧光探针负载细胞后荧光双波长分光光度计检测各组细胞内游离钙离子浓度的变化

1.2.4 凋亡因子 Caspase-3、Caspase-12 的免疫细胞化学染色 将第 4 次传代后的细胞种于 24 孔培养板内(每孔 1×10^5 个),待细胞铺满瓶底后,分组进行相应处理后进行免疫细胞化学染色。

1.2.5 RT-PCR 检测凋亡因子 Caspase-3、Caspase-

12 mRNA 的表达 收集各组细胞,提取细胞总 RNA,检测 RNA 完整性及纯度;以 RT-PCR 法检测 Caspase-3、Caspase-12 mRNA 的表达。Caspase-3 正向引物:5'-AGAAGCTTGAATC-CACGAGCA-3',反向引物:5'-TTTTCT-GAAGACGTGCCCAT-3',产物大小:475bp;Caspase-12:正向引物:5'-AGGGAATCCAGAG-CACAGAA-3',反向引物:5'-CTTTGCTTGTG-GATACCCAA-3',产物大小:537bp;按照 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司,立陶宛)说明进行逆转录反应: 70°C 5min, 37°C 5min, 42°C 60min, 70°C 10min。PCR 反应条件:预变性 95°C 1min;变性 95°C 30s,退火 60°C 30s,延伸 68°C 1min30s,30 个循环;再延伸 68°C 10min。取 PCR 产物进行 1.8% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统扫描。

1.3 统计学方法

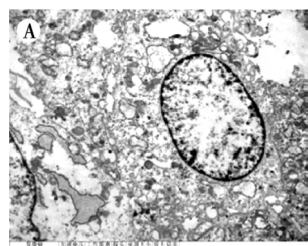
所得实验数据以 SPSS11.0 统计分析软件进行处理,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用方差分析, $P<0.05$ 为有统计学意义。

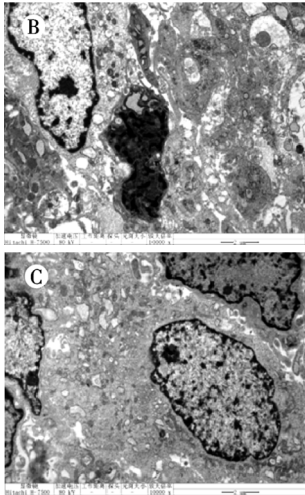
2 结果

2.1 TSG 对缺氧缺糖大鼠 AS 凋亡的影响

流式细胞术检测细胞凋亡率,AS 正常对照组为 $(2.32\pm 0.3)\%$, OGD 组升高至 $(27.05\pm 3.0)\%$ 。TSG 预处理组显著降低至 $(4.05\pm 1.1)\%$ (与 OGD 组比较, $P<0.01$)。

电镜下可见正常对照组细胞器完整、细胞核均染清晰饱满,缺氧、缺糖组细胞体积不同程度缩小,胞膜上出现小泡但连续性完整,细胞器退变,胞质浓缩深染,胞核皱缩、核内染色质浓缩边集,有凋亡小体,呈现凋亡细胞特征。TSG 预处理组,部分细胞呈现凋亡特征程度较轻,超微结构正常的细胞数较多(图 1)。

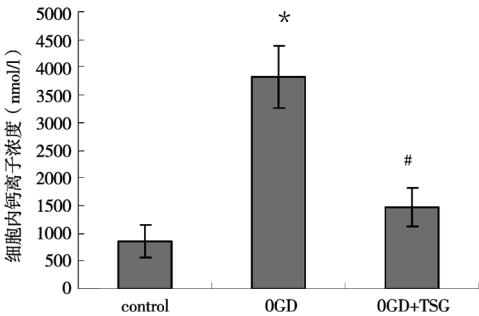




(A)对照组 (B)OGD12 组 (C)TSG (50 μ mol/L)+OGD12 组
图 1 电镜下细胞超微结构改变($\times 10000$)

2.2 TSG 对缺氧缺糖大鼠 AS 细胞内钙离子浓度的影响

经荧光双波长分光光度计监测各组 AS 内钙离子荧光值,缺氧缺糖 AS 内游离钙离子浓度明显高于对照组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。TSG 预处理后,细胞内游离钙离子浓度明显降低、接近正常值(图 2)。



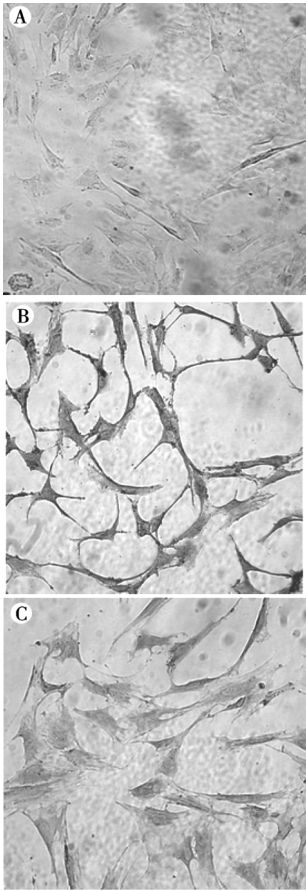
$n=6, \bar{x} \pm s$, 与对照组相比 * $P<0.05$, 与 OGD12 组比较, # $P<0.05$
图 2 TSG 对 OGD 损伤 AS 细胞内钙离子浓度的影响

2.3 Cleaved Caspase-3、Caspase-12 在各组 AS 内的表达

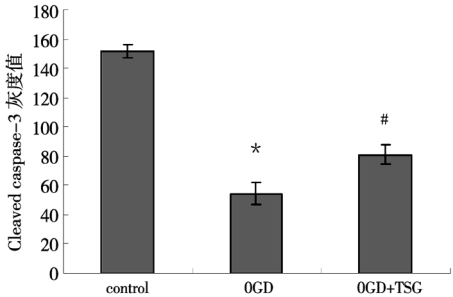
免疫细胞化学染色显示 Cleaved Caspase-3、Caspase-12 阳性染色位于胞浆。Cleaved Caspase-3 的表达:正常对照组细胞胞体饱满突起粗大,细胞透明很少染色(图 3-1-A);缺氧缺糖组细胞胞体缩小、突起回缩细长,细胞染色较深呈棕褐色(图 3-1-B);TSG 预处理组细胞胞体和突起回缩减轻,细胞染色较浅呈棕黄色(图 3-1-C)(图 3-2)。Caspase-12 的表达:正常对照组细胞胞体饱满、突起粗大,细胞染色很浅较透明(图 3-3-A);缺氧缺糖组细胞胞体缩小突起回缩,染色呈棕褐色(图 3-

3-B);TSG 预处理组胞体和突起回缩减轻,细胞染色较浅、接近正常组(图 3-3-C)(图 3-4)。

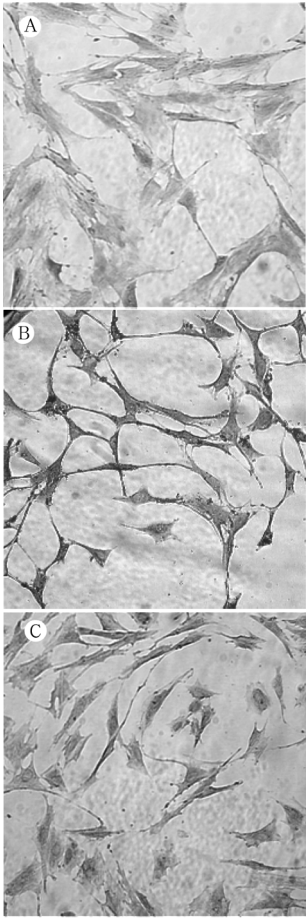
经灰度值扫描,Cleaved Caspase-3 和 Caspase-12 免疫细胞化学染色结果如下,OGD 组平均灰度值显著降低与对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.01, P<0.05$)。经 TSG 预处理后,平均灰度值均升高,预处理组与缺氧缺糖组相比,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。



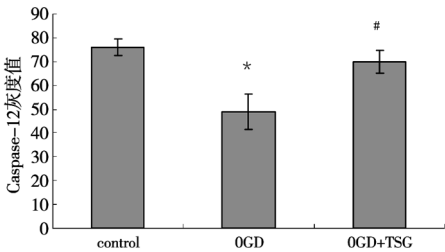
(A)对照组 (B)OGD12 组 (C)TSG (50 μ mol/L)+ OGD12 组
图 3-1 免疫细胞化学显示 Cleaved Caspase-3 在胞浆的表达($\times 400$)



与对照组相比 * $P<0.05$, 与 OGD12 组比较, # $P<0.05$
图 3-2 各组 Cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响



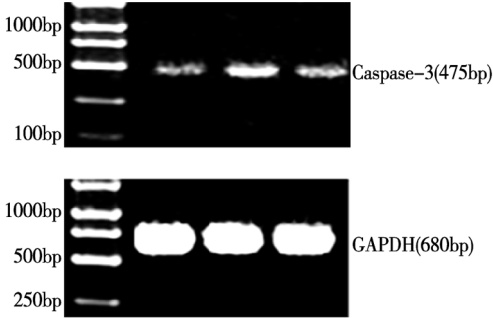
(A)对照组 (B)OGD12组 (C)TSG(50 μ mol/L)+ OGD12组
图 3-3 免疫细胞化学显示 Caspase-12 在胞浆的表达($\times 400$)



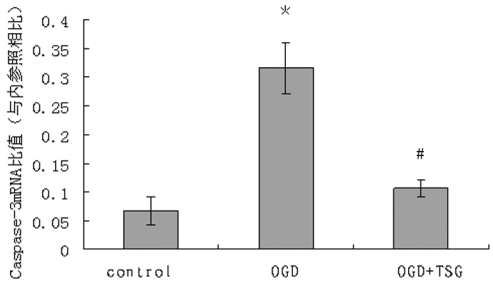
n=6, $\bar{x} \pm s$, 与对照组相比 * $P < 0.05$, 与 OGD12 组比较, # $P < 0.05$
图 3-4 各组 Caspase-12 蛋白表达的影响

2.4 TSG 对 OGD 大鼠 AS 内 Caspase-3、Caspase-12 mRNA 水平的影响

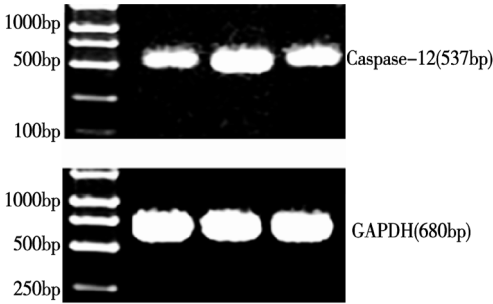
RT-PCR 结果显示, OGD 后, Caspase-3、Caspase-12 mRNA 水平明显升高, TSG 预处理可明显下调相应凋亡相关分子 mRNA 的表达水平(图 4)。



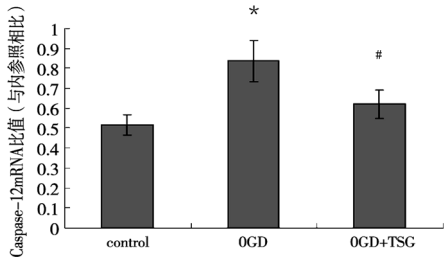
(1)marker (2)对照组 (3)OGD12组 (4)TSG + OGD12
图 4-1 Caspase-3 RT-PCR 扩增片断琼脂糖电泳图



n=6, $\bar{x} \pm s$, 与对照组相比 * $P < 0.05$, 与 OGD12 组比较, # $P < 0.05$
图 4-2 不同处理因素对 AS 表达 Caspase-3 mRNA 影响



(1)marker (2)对照组 (3)OGD12组 (4)TSG + OGD12
图 4-3 Caspase-12 RT-PCR 扩增片断琼脂糖电泳图



n=6, $\bar{x} \pm s$, 与对照组相比 * $P < 0.05$, 与 OGD12 组比较, # $P < 0.05$
图 4-4 不同处理因素对 AS 表达 Caspase-12 mRNA 影响

3 讨论

脑缺血损伤的最基本因素是脑细胞缺氧缺糖, 本文利用氧糖剥夺方式建立缺氧、缺糖损伤模型模

拟体内 AS 损伤。研究表明缺氧缺糖后脑细胞死亡的主要形式是凋亡,其机制可能与线粒体功能障碍、内质网应激、钙离子失衡等因素有关。

除神经元以外,AS 是脑内数量最多的细胞,其功能状态对神经元的存活与功能有重要影响,因此抑制脑缺氧缺糖损伤后 AS 的凋亡可为脑缺血损伤的治疗提供一种新的神经保护策略。

本文利用流式细胞仪检测细胞凋亡率,透射电镜观察细胞超微结构尤其是凋亡小体的变化,发现 OGD 可致 AS 发生凋亡,TSG 预处理可显著降低细胞凋亡率,改善细胞超微结构。

内质网(endoplasmic reticulum,ER)是真核细胞内重要的亚细胞器,含多种酶系统,参与脂类代谢过程。多种生理或病理条件会引起未折叠蛋白或错误折叠蛋白在 ER 聚集,损伤 ER 的正常生理功能,即内质网应激^[5]。最新研究表明,内质网在细胞凋亡的发生发展中发挥了重要作用^[6]。内质网应激介导了与死亡受体和线粒体途径不同的新的凋亡通路。早期的 ERS 是机体自身代偿的过程,对细胞具有保护作用;当内质网功能因严重 ERS 受损时,细胞就会发生凋亡以去除损伤细胞^[7-8]。

钙超载是许多原因引起细胞损害的“最后共同通路”,也是细胞损伤的重要标志之一^[9]。缺氧、缺血再灌注、氧化性应激等多种损伤因素都能导致细胞内钙超载。内质网应激可致内质网内钙离子平衡打乱,细胞内游离钙离子增多引起钙蛋白酶活化,内质网膜上 Caspase-12 前体剪切活化并释放入胞浆。活化的 Caspase-12 进一步启动内质网应激反应性凋亡级联反应,诱导细胞凋亡。

Caspase-12 是 Caspase 家族中较新的成员,正常是以前体形式存在,位于内质网的胞质面,也是这个家族中唯一定位于 ER 的成员,国外学者的研究发现,细胞凋亡的死亡受体途径和线粒体途径中 Caspase-12 不被活化,敲除 Caspase-12 的缺陷鼠可抵抗内质网应激引起的凋亡而其他途径凋亡仍可发生。这表明 Caspase-12 与内质网应激介导的凋亡有关,而不涉及其他凋亡信号通路^[10]。因此 Caspase-12 被誉为是介导 ERS 致凋亡通路的关键分子。Caspase-12 可被内质网应激信号通路剪切激活^[11],活化的 Caspase-12 通过激活 Caspase-9,进一步激活下游的细胞凋亡执行分子 Caspase-3,从而启动凋亡通路。

本文结果显示,经缺氧、缺糖诱导的 AS 细胞内游离钙离子明显增多,Caspase-12、Caspase-3 mRNA 和蛋白的表达显著增加,与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$),表明缺氧缺糖可能是通过内质网应激凋亡通路来介导信号转导,进一步导致缺血性脑损伤的发生。TSG 预处理后,细胞内游离钙离子浓度显著降低接近正常水平,Caspase-12 和 Caspase-3 mRNA 和蛋白的表达较 OGD 组明显下调($P<0.05$),提示 TSG 可以通过阻断细胞内钙离子介导的内质网应激或直接抑制内质网应激特有的凋亡起始因子 Caspase-12 而减少缺氧缺糖损伤 AS 凋亡的发生,其具体机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 田汝芳,龙石银,田英,等.二苯乙炔苄抗动脉粥样硬化的药理作用[J].现代生物医学进展,2010,10(2):1193-1197.
- [2] 孙欣,顾宜,李晓峰,等.二苯乙炔苄对抗 MPP+ 诱导的 PC12 细胞凋亡的作用[J].第四军医大学学报,2009,30(24):2910-2913.
- [3] 赵玲,李春阳,张丽,等.二苯乙炔苄对局灶性脑缺血大鼠脑组织细胞凋亡的影响[J].中草药,2008,39(3):394-397.
- [4] 张琰,马奎元,董睿.何首乌提取物二苯乙炔苄对缺氧缺血大鼠星形胶质细胞的影响及其机制的初步探讨[J].济宁医学院学报,2012,35(1):20-23.
- [5] Walter P,Ron D.The unfolded protein response:from stress pathway to homeostatic regulation[J].Science,2011,334(6059):1081-1086.
- [6] Danial NN,Korsmeyer SJ.Cell death:critical control points[J].Cell,2004,116(2):205-219.
- [7] Scull CM,Tabas I.Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2011,31(12):2792-2797.
- [8] Faria G,Cardoso CR,Larson RE,et al.Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts:a role for endoplasmic reticulum stress[J].Toxicol Appl Pharm,2009,234(2):256-265.
- [9] 潘雪刁,朱邦豪,马丽,等.灯盏花素对人脐静脉内皮细胞内 Ca^{2+} 水平的调控作用[J].中国药理学通报,2007,23(5):672-677.
- [10] Nakagawa T,Zhu H,Morishima N,et al.Caspase 12 mediates endoplasmic reticulum specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid beta[J].Nature,2000,403(6765):98-103.
- [11] 袁艳,贾天明,李小雨,等.内质网应激相关因子 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白及 Caspase-12 在癫痫性脑损伤大鼠中的表达及促红细胞生成素对其影响[J].实用儿科临床杂志,2012,27(1):47-49.

(收稿日期 2013-04-09)