

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.10.005

◇ 药学研究 ◇

三叶苷对 N-甲基-D-天冬氨酸诱导的人神经母细胞瘤细胞损伤的保护作用

周芮萱¹, 马松涛¹, 蒋刚²作者单位:¹成都医学院药学院, 四川 成都 610500; ²四川省肿瘤医院临床药学部, 四川 成都 610041

摘要:目的 研究三叶苷(Trilobatin)对 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)诱导的人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)损伤的保护作用。方法 采用体外细胞培养的方法,建立 SH-SY5Y 细胞 NMDA 损伤模型。分设对照组(0 mmol/L NMDA)、NMDA 损伤模型(0 μ mol/L 三叶苷)组、三叶苷组(10, 50, 100 μ mol/L)。对照组正常培养, NMDA 损伤模型组以 2 mmol/L 的 NMDA 为造模浓度,三叶苷组在 NMDA 损伤模型组的基础上分别以 10, 50, 100 μ mol/L 的三叶苷为细胞活性测试浓度。采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT 法)测定三叶苷对 SH-SY5Y 细胞活性的影响;通过 MTT 法、乳酸脱氢酶(LDH)释放量检测三叶苷对 NMDA 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用,用蛋白质印迹法(Western Blot)检测细胞内促凋亡蛋白 Bax, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 及 NMDA 受体调节亚单位 NR2B 蛋白表达水平,研究其作用机制。结果 三叶苷在 1~100 mmol/L 范围内不影响 SH-SY5Y 细胞的存活率。与对照组相比, NMDA 损伤模型组细胞存活率为(53.13 $\pm$ 3.31)%, 细胞存活率明显降低, 细胞凋亡明显增高。与对照组相比, 三叶苷组(10, 50, 100 μ mol/L)细胞存活率分别为(56.28 $\pm$ 2.05)%、(68.64 $\pm$ 1.74)%及(75.98 $\pm$ 1.84)%, 细胞存活率明显增高($F=293.3, P<0.001$), LDH 释放量减少, 细胞凋亡明显降低($F=314.1, P<0.001$)。三叶苷参与调控 NR2B 亚单位及凋亡相关蛋白的表达,可降低 NR2B 蛋白与促凋亡蛋白 Bax 的表达,上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。结论 三叶苷对 NMDA 诱导的神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞损伤有保护作用,其作用机制与 NR2B 亚单位相关。

关键词:壳斗科; 神经母细胞瘤; N-甲基天冬氨酸; 印迹法, 蛋白质; 三叶苷; 人神经母细胞瘤细胞

The protective effects of Trilobatin on SH-SY5Y cell injury induced by NMDA

ZHOU Ruixuan¹, MA Songtao¹, JIANG Gang²Author Affiliations: ¹Dept. of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China;²Dept. of Pharmacy, Sichuan Tumor Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: Objective To study the protective effects of Trilobatin on SH-SY5Y cell injury induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA). **Methods** NMDA induced SH-SY5Y cells injury model was established by in vitro cell culture and was assigned in to control group (0 mmol/L NMDA), NMDA injury model group (0 μ mol/L Trilobatin), Trilobatin (10, 50, 100 μ mol/L) group. The control group was cultured normally, the NMDA injury model group used 2 mmol/L of NMDA as the model-making concentration, and the Trilobatin group used 10, 50, 100 μ mol/L of Trilobatin as the cell activity test concentration on the basis of NMDA injury model group. MTT method was used to detect cell activity in order to determine the effective concentration. MTT assay and LDH assay were used to confirm the protective effects of Trilobatin. The protein expression levels of Bax, Bcl-2 and NR2B were detected by Western blotting. **Results** Trilobatin could not reduce the survival rate of SH-SY5Y cells at the concentration from 1 to 100 mmol/L. Compared with the control group, NMDA significantly reduced the cell viability, the cell viability decreased to (53.13 $\pm$ 3.31)%, the cell apoptosis was significantly increased. Compared with the control group, the cell viability rate of pretreatment with different concentration of Trilobatin (10, 50, 100 μ mol/L) groups were (56.28 $\pm$ 2.05)%, (68.64 $\pm$ 1.74)% and (75.98 $\pm$ 1.84)%, respectively, the cell viability significantly increased ($F=293.3, P<0.001$), the LDH release decreased and apoptosis decreased significantly ($F=314.1, P<0.001$). Trifloroside can regulate NR2B and apoptosis related protein expression, reduce the expression of NR2B protein and pro-apoptotic protein Bax, up-regulate the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2. **Conclusion** Trilobatin has protective effects on NMDA-induced neuroblastoma SH-SY5Y cells injury, and the mechanism of action is related to the NR2B subunit.

Key words: Fagaceae; Neuroblastoma; N-methylaspartate; Blotting, western; Trilobatin; SH-SY5Y cells

缺血性脑卒中(cerebral ischemic stroke)具有高发

一种严重威胁人类健康的临床常见疾病^[1-2]。据世界

发病率、高致残率、高死亡率和高复发率等特点,是

卫生组织统计,全世界每年有 150 万人发病,其中

1/3的病人因此死亡,1/3的病人导致长期残疾,严重影响病人生活质量^[3]。因此,寻求有效的药物预防和治疗缺血性脑卒中刻不容缓。

N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体是谷氨酸盐受体家族中的一员,是一种兴奋性神经递质谷氨酸的离子型受体。正常生理条件下,NMDA受体参与并维持多种神经系统功能。但在生理病变条件下,NMDA受体被过度激活,引起兴奋性神经毒性,从而导致缺血性脑卒中疾病的发生。正因如此,NMDA受体成为了治疗缺血性脑卒中的重要靶点。三叶苷是多穗柯嫩叶的甜味主要成分,具有显著降低血脂,减轻体重,改善氧化应激状态,清除自由基的作用^[4]。目前有研究报道提示,三叶苷具有抗脑缺血作用,但其分子机制不够明确^[5],因此,本研究于2015年11月至2016年7月通过建立体外兴奋性毒性损伤模型,探究三叶苷的保护作用,并进行相关分子机制的研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 三叶苷购自成都Biopurify公司(批号PRF15092821);NMDA和乙二胺四乙酸(EDTA)购自美国Amresco公司;DMEM细胞培养基、高糖培养液和胎牛血清购自美国Hyclone公司;胰酶和四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国Sigma公司;N-(2-羟乙基)哌嗪-N-乙磺酸钠(HEPES)购自江苏碧云天生物技术有限公司;乳酸脱氢酶(LDH)定量检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;凋亡蛋白Bcl-2、Bax抗体,美国Santa Cruz公司;NR2B亚基蛋白抗体,美国CST公司;鼠 β -肌动蛋白(β -actin)抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔,羊抗鼠二抗购自上海中杉金桥;RIPA蛋白裂解液由江苏碧云天生物技术有限公司提供。

1.2 主要仪器 日本SANYO HF90二氧化碳培养箱;日本Olympus IX53光学倒置显微镜;美国BIO-TEK ELx800酶标测试仪。

1.3 细胞株 人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)株由沈阳药科大学惠赠。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 SH-SY5Y细胞系培养于DMEM完全培养液,含有10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素双抗。于5%二氧化碳,37℃的培养箱中培养。

1.4.2 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法) 检测三叶苷对SH-SY5Y细胞存活率的影响 取对数生长期细胞并计数,以 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于96孔板内,每孔100 μL ,于5%二氧化碳,37℃的培养箱中培养24 h后,加入终浓度为25, 50, 100和

200 $\mu\text{mol/L}$ 的三叶苷100 μL 培养24 h,然后向每孔加入5 mg/mL的MTT 20 μL (终浓度约0.5 mg/mL),置于细胞培养箱中孵育4 h,孵育结束后,弃去上清液,向每孔中加入150 μL 的二甲基亚砜(DMSO),震荡5 min,于酶标仪490 nm处测定其吸光度,计算细胞存活率。

1.4.3 NMDA诱导SH-SY5Y细胞损伤模型的建立 采用NMDA(0 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$, 2 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$)共孵30 min,更换培养液继续培养12 h,显微镜下观察细胞形态变化,采用MTT法检测细胞损伤模型的建立。

1.4.4 MTT法检测三叶苷对NMDA诱导损伤的SH-SY5Y细胞的保护作用 取细胞损伤模型对数生长期细胞并计数,以 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于96孔板内,每孔100 μL ,于5%二氧化碳,37℃的培养箱中培养24 h后,分别加入终浓度为0, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的三叶苷孵育4 h,按1.4.3建立三叶苷干预细胞损伤模型,计算细胞存活率。

1.4.5 三叶苷对NMDA诱导损伤的SH-SY5Y细胞LDH释放量的影响 细胞分组及培养同1.4.4,按照LDH试剂盒操作要求进行反应,反应结束后用酶标仪测定在490 nm的吸光度,计算细胞凋亡率。

1.4.6 三叶苷对NMDA诱导损伤的SH-SY5Y细胞蛋白表达的影响 蛋白质印迹法(Western Blot)检测促凋亡蛋白Bax、抗凋亡蛋白Bcl-2及NMDA受体调节亚单位NR2B蛋白表达,采用BCA蛋白定量法检测蛋白浓度。每组按20 μL 蛋白上样进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)后,用5%脱脂奶粉封闭1 h,将一抗的抗体按照说明书用封闭液配制至适当的浓度,4℃孵育过夜。各个抗体稀释的倍数如下:Bcl-2(1:600), Bax(1:600), β -actin(1:1000), NR2B(1:1000)。次日用等渗缓冲盐溶液(TBST)漂洗膜3次,每次5 min。将二抗按1:8 000比例用TBST稀释,室温下孵育1 h。用TBST漂洗膜3次,每次10 min,最后以增强化学发光法(ECL)显影, β -actin作为内参,采用Image J灰度分析软件,对所得蛋白条带进行定量分析。

1.5 统计学方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用SPSS 16.0软件统计处理,两组间比较应用成组 t 检验,多组间比较应用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三叶苷对SH-SY5Y细胞生长的影响 通过MTT法检测三叶苷对SH-SY5Y细胞活性的影响,结

果显示,三叶苷组在0~100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内对SH-SY5Y细胞的生长无明显影响,在200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时,细胞存活率为 $(86.46 \pm 2.01)\%$,开始对细胞生长产生抑制作用,与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ 三叶苷)相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。因此本研究选择10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续活性测试浓度。

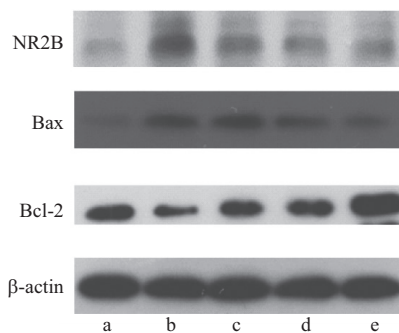
2.2 NMDA 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤模型的建立 采用MTT法检测NMDA对SH-SY5Y细胞存活率的影响,结果显示,1, 2, 5 mmol/L NMDA诱导下的细胞存活率分别为 $(82.99 \pm 3.13)\%$ 、 $(53.13 \pm 3.31)\%$ 、 $(26.34 \pm 1.97)\%$,差异有统计学意义($F = 262.1, P < 0.001$)。随着NMDA浓度的增加,对细胞的抑制作用也逐步开始增加。2 mmol/L的NMDA造模30 min,对细胞抑制率达到50.00%左右,因此选用2 mmol/L的NMDA为造模浓度。

2.3 MTT 法检测三叶苷对 NMDA 诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响 采用MTT法初步检测确定三叶苷对NMDA诱导损伤的SH-SY5Y细胞具有保护作用。实验结果表明,NMDA(2 mmol/L, 30 min)诱导损伤的模型中,NMDA损伤模型(0 $\mu\text{mol/L}$ 三叶苷)组细胞存活率为 $(53.51 \pm 2.07)\%$;在三叶苷浓度为10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的条件下,细胞存活率分别为 $(56.28 \pm 2.05)\%$ 、 $(68.64 \pm 1.74)\%$ 、 $(75.98 \pm 1.84)\%$,差异有统计学意义($F = 293.3, P < 0.001$),说明三叶苷对NMDA诱导损伤的SH-SY5Y细胞的保护作用具有浓度依赖性。

2.4 三叶苷对 NMDA 诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞 LDH 释放量的影响 LDH释放量法可间接反映细胞凋亡状态,采用LDH法再次证明了三叶苷对NMDA诱导损伤的SH-SY5Y细胞具有保护作用。实验结果显示,NMDA增加了细胞凋亡,NMDA损伤模型(0 $\mu\text{mol/L}$ 三叶苷)组细胞凋亡率达到了 $(52.50 \pm 1.97)\%$,与对照组(0 mmol/L NMDA)细胞凋亡率 $(10.29 \pm 2.11)\%$ 比较差异有统计学意义($t = 58.93, P < 0.001$);不同浓度的三叶苷(10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$)能减少细胞凋亡,细胞凋亡率分别为 $(39.80 \pm 1.76)\%$ 、 $(31.13 \pm 2.21)\%$ 、 $(22.18 \pm 2.52)\%$,差异有统计学意义($F = 314.1, P < 0.001$),表明三叶苷对NMDA诱导损伤细胞的保护作用呈现浓度依赖性。

2.5 三叶苷对 NMDA 诱导损伤的 SH-SY5Y 细胞蛋白表达的影响 Bax和Bcl-2是细胞内与凋亡关系密切的蛋白,细胞发生凋亡时,凋亡蛋白Bax表达量上升,抗凋亡蛋白Bcl-2表达量下降。从图1可知,与对照组(0 mmol/L NMDA)细胞蛋白Bax表达

量 (0.044 ± 0.003) 、蛋白Bcl-2表达量 (1.290 ± 0.051) 、NR2B蛋白表达 (0.068 ± 0.003) 相比,NMDA损伤模型(0 $\mu\text{mol/L}$ 三叶苷)组细胞蛋白Bax表达量 (0.270 ± 0.016) 明显升高($t = 24.64, P < 0.001$),蛋白Bcl-2表达量 (0.790 ± 0.028) 下降($t = 15.65, P < 0.001$),NR2B蛋白表达 (0.340 ± 0.019) 明显增加($t = 24.89, P < 0.001$)。与NMDA损伤模型(0 $\mu\text{mol/L}$ 三叶苷)组相比,三叶苷(10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$)组细胞蛋白Bax表达量 (0.300 ± 0.020) 、 (0.200 ± 0.015) 、 (0.110 ± 0.002) 随药物浓度的增加逐渐减少(均 $P < 0.01$),蛋白Bcl-2表达量 (1.100 ± 0.028) 、 (1.240 ± 0.062) 、 (1.400 ± 0.047) 明显升高(均 $P < 0.001$),NR2B蛋白表达 (0.190 ± 0.013) 、 (0.160 ± 0.160) 、 (0.120 ± 0.006) 随药物浓度的增加逐渐减少(均 $P < 0.001$)。



注:a为对照组,b为N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)损伤模型组,c、d、e分别为三叶苷浓度为10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 同时NMDA浓度为2 mmol/L条件下的人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)蛋白表达; β -actin为内参

图1 三叶苷对NMDA诱导损伤的SH-SY5Y细胞蛋白(NR2B、Bax和Bcl-2)表达的影响(蛋白质印迹法)

3 讨论

据流行病学统计,我国年龄标化的卒中患病率为1 115/10万,每年的年龄标化发病率为247/10万,死亡率为115/10万^[6]。目前,脑卒中已经成为我国第1位的致死原因。缺血性脑卒中的发病机制复杂,由神经兴奋性毒性、钙离子超载、再灌注损伤、酶系统激活、细胞凋亡等共同参与,最终引起细胞死亡^[7]。发病过程是由于脑供血不足使脑细胞失去能量及氧气的供应,从而导致兴奋性氨基酸(EAA)谷氨酸大量释放,使NMDA受体被过度激活,引起细胞内钙离子超载,最终导致细胞死亡^[8]。由此可见,NMDA受体介导的兴奋性毒性和钙离子超载是缺血性脑卒中发病机制的触发者。而脑缺血发生后,在致死区和正常区之间存在半暗带,这个区域可保持一定量的血流以维持新陈代谢^[9]。缺血中心区和缺血半暗带的细胞损伤和死亡方式具有明显的差异,在缺血中心区,细胞是以急性坏死为主要

方式,具有不可逆性;而半暗带细胞的凋亡需要钙离子、细胞信号传导机制、基因转录等参与,具有潜在可挽救性^[10]。目前,研究发现,选择性NMDA受体拮抗剂可起到神经保护的作用,挽救缺血半暗带部分残留的尚具活力的可逆性损伤神经元和脑组织,且具有临床应用的可能^[11]。NMDA受体为兴奋性氨基酸谷氨酸的离子型受体,具有异四聚体结构,由NR1,NR2,NR3及NR4等亚单位组成,NR1是基本的功能亚单位,NR2是重要的调节亚单位,有NR2A,NR2B,NR2C,NR2D等4个不同的亚型^[12-14]。近期研究表明,不同类型的NR2亚单位构成的NMDA受体对神经损伤表现出不同的作用,含有NR2B的NMDAR及其介导的信号分子在兴奋毒性和缺血引起的神经元死亡中起主要作用^[15]。当NMDA-NR2B亚基被激活时,大量钙离子内流,从而激活一系列的酶系统,最终引起细胞死亡。研究结果显示,随着三叶苷药物浓度的增加,NMDA-NR2B蛋白的表达逐渐减少,说明三叶苷对NMDA诱导的SH-SY5Y细胞损伤的保护作用机制与NMDA-NR2B亚单位相关。

NMDA受体介导的兴奋性毒性和钙离子超载是缺血性脑卒中发病机制的触发者,本研究结果表明,三叶苷对NMDA诱导的SH-SY5Y细胞损伤有保护作用。NMDA刺激SH-SY5Y细胞可导致细胞发生凋亡,NMDA受体介导的兴奋性神经毒性将导致神经元的凋亡^[16-17]。实验结果显示,三叶苷能减少细胞凋亡的发生,可以降低NMDA诱导的LDH释放量的增加。三叶苷通过上调Bcl-2,抑制Bax表达达到神经保护作用,以上研究结果表明三叶苷可以抑制NMDA诱导的神经兴奋性毒性的发生,可挽救缺血半暗带部分残留的尚具活力的可逆性损伤神经元和脑组织,为三叶苷在缺血性脑卒中的防治方面提供了实验依据。本研究仅仅表明三叶苷的作用机制与NMDA-NR2B亚单位相关,但具体的作用机制有待进一步的研究。

参考文献

- [1] ROTHWELL PM, COULL AJ, GILES MF, et al. Change in stroke incidence, mortality, case-fatality, severity, and risk factors in Oxfordshire, UK from 1981 to 2004 (Oxford Vascular Study) [J]. *Lancet*, 2004, 363(9425): 1925-1933.
- [2] STRONG K, MATHERS C, BONITA R. Preventing stroke: saving lives around the world [J]. *Lancet Neurology*, 2007, 6(2): 182-187.
- [3] MOZAFFARIAN D, BENJAMIN EJ, GO AS, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics -- 2016 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2016, 133(4): 447-454.
- [4] GWYNNE RM, BORNSTEIN JC. Synaptic transmission at functionally identified synapses in the enteric nervous system: roles for both ionotropic and metabotropic receptors [J]. *Current Neuropharmacology*, 2007, 5(1): 1-17.
- [5] SUN Y, LI W, LIU Z. Preparative isolation, quantification and antioxidant activity of dihydrochalcones from Sweet Tea (*Lithocarpus polystachyus* Rehd.) [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 1002: 372-378.
- [6] LI J, WANG L, CHAO B, et al. Prevalence of stroke in China: an epidemiological study based on the National Stroke Screening Survey [J]. *Lancet*, 2015, 386: S49.
- [7] 刘红玉, 房伟. 缺血性脑卒中发病机制的研究进展 [J]. *中国现代医生*, 2010, 48(25): 11-12.
- [8] SIMON RR, SWAN JH, GRIFFITH T, et al. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain [J]. *Science*, 1984, 226(4676): 850-852.
- [9] 安泳潼, 夏玉叶, 闵旸. 缺血性脑卒中的发病机制及其治疗 [J]. *世界临床药物*, 2010, 31(1): 35-39.
- [10] WANG X, MA Z, FU Z, et al. Hydroxysafflor yellow A protects neurons from excitotoxic death through inhibition of NMDARs [J]. *Asn Neuro*, 2016, 8(2): 1759091416642345. DOI: 10.1177/1759091416642345.
- [11] 胡倩, 王莉, 江伟. NMDA受体拮抗剂神经保护和毒性作用的研究进展 [J]. *国外医学: 麻醉学与复苏分册*, 2005, 26(6): 327-330.
- [12] VON EJ, COSEREA I, PAWLAK V, et al. Excitotoxicity in vitro by NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 53(1): 10-17.
- [13] KARAKAS E, SIMOROWSKI N, FURUKAWA H. Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit [J]. *EMBO J*, 2009, 28(24): 3910-3920.
- [14] FRANK RA, GRANT SG. Supramolecular organization of NMDA receptors and the postsynaptic density [J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2017, 45: 139-147.
- [15] 刘佩强, 覃丹雪, 陈慧英, 等. NMDA受体磷酸化调控及其与神经系统疾病关系的研究进展 [J]. *山东医药*, 2018, 58(26): 88-91.
- [16] AAMODT SM, CONSTANTINE-PATON M. The role of neural activity in synaptic development and its implications for adult brain function [J]. *Adv Neurol*, 1999, 79: 133-144.
- [17] GOTTSCHALK W, POZZOMILLER LD, FIGUROV A, et al. Presynaptic modulation of synaptic transmission and plasticity by brain-derived neurotrophic factor in the developing hippocampus [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(17): 6830-6839.

(收稿日期: 2019-04-28, 修回日期: 2019-05-27)