

引用本文:解晨,王强,汤旒,等.溴莫尼定对低氧诱导的PC12细胞神经损伤的保护作用[J].安徽医药,2022,26(6):1089-1093.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.06.006.



◇ 药学研究 ◇

## 溴莫尼定对低氧诱导的PC12细胞神经损伤的保护作用

解晨,王强,汤旒,吴月容,谷有全

作者单位:兰州大学第一医院神经内科,甘肃 兰州 730000

通信作者:谷有全,男,主任医师,研究方向为脑血管病及介入治疗、神经系统感染性疾病,Email:guyq@lzu.edu.cn

**摘要:** **目的** 探讨溴莫尼定对缺氧诱导的PC12细胞神经损伤的保护作用及其机制。**方法** 实验于2018年5月至2019年8月进行,建立缺氧诱导的大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤PC12细胞损伤模型,实验分为对照组、缺氧组(缺氧损伤)、缺氧+0.25  $\mu\text{mol/L}$  溴莫尼定组、缺氧+0.5  $\mu\text{mol/L}$  溴莫尼定组、缺氧+1  $\mu\text{mol/L}$  溴莫尼定组。采用MTT法检测各组细胞活力;流式细胞仪检测各组细胞凋亡率;根据检测试剂盒测定乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛、超氧化物歧化酶(SOD)含量;蛋白质印迹法检测细胞中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)及蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/信号转导及转录活化因子3(STAT3)信号通路相关蛋白表达。**结果** 缺氧处理后,细胞活力较对照组降低[(0.35 $\pm$ 0.04)比(0.69 $\pm$ 0.08)]( $P<0.05$ ),溴莫尼定不同剂量组细胞活力较Hypoxia组升高[(0.37 $\pm$ 0.05)、(0.40 $\pm$ 0.06)、(0.44 $\pm$ 0.05)、(0.53 $\pm$ 0.07)、(0.60 $\pm$ 0.09)比(0.35 $\pm$ 0.04)]( $P<0.05$ );Hypoxia组细胞凋亡率增加[(32.89 $\pm$ 3.46)%比(3.58 $\pm$ 0.34)%]( $P<0.05$ ),溴莫尼定干预后细胞凋亡率降低[(7.41 $\pm$ 0.75)%比(32.89 $\pm$ 3.46)%]( $P<0.05$ ),Bax蛋白表达量降低[(1.48 $\pm$ 0.16比3.76 $\pm$ 0.31)]( $P<0.05$ ),而Bcl-2蛋白表达量升高[(0.89 $\pm$ 0.12)比(0.29 $\pm$ 0.04)]( $P<0.05$ );Hypoxia组细胞SOD含量较对照组降低[(50.43 $\pm$ 5.36) U/mg比(173.39 $\pm$ 18.21) U/mg]( $P<0.05$ ),溴莫尼定干预后可提高缺氧诱导的细胞SOD含量降低[(143.28 $\pm$ 15.43) U/mg比(50.43 $\pm$ 5.36) U/mg]( $P<0.05$ );Hypoxia组细胞LDH[(62.31 $\pm$ 6.82) U/mL比(19.07 $\pm$ 1.65) U/mL]、丙二醛含量[(4.29 $\pm$ 0.43)  $\mu\text{mol/g}$ 比(1.35 $\pm$ 0.12)  $\mu\text{mol/g}$ ]较对照组增高( $P<0.05$ ),溴莫尼定处理后可降低缺氧引起的LDH[(31.35 $\pm$ 3.21) U/mL比(62.31 $\pm$ 6.82) U/mL]、丙二醛含量[(1.76 $\pm$ 0.19)  $\mu\text{mol/g}$ 比(4.29 $\pm$ 0.43)  $\mu\text{mol/g}$ ]增加( $P<0.05$ );Hypoxia组细胞Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、STAT3、p-STAT3表达降低( $P<0.05$ ),溴莫尼定处理后可提高细胞Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、STAT3、p-STAT3的表达( $P<0.05$ );抑制Akt/mTOR/STAT3信号通路可逆转溴莫尼定对缺氧诱导的PC12细胞增殖、凋亡及LDH、丙二醛、SOD水平的影响。**结论** 溴莫尼定可通过激活Akt/mTOR/STAT3信号通路促进缺氧诱导的PC12细胞增殖、抑制细胞凋亡及增强其抗氧化能力进而对缺氧诱导的神经细胞损伤发挥保护作用。

**关键词:** 溴莫尼定; 缺氧损伤; PC12细胞; 蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/信号转导及转录活化因子3信号通路

## Protective effect of brimonidine against neural injury induced by hypoxia in PC12 cells

XIE Chen, WANG Qiang, TANG Ni, WU Yuerong, GU Youquan

Author Affiliation: Department of Neurology, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the protective effect and mechanism of brimonidine against hypoxia-induced neuronal injury in PC12 cells. **Methods** Experiments were conducted from May 2018 to August 2019, a model of PC12 cell injury induced by hypoxia was established. The experiment was divided into control group, Hypoxia group (hypoxia injury), Hypoxia+0.25  $\mu\text{mol/L}$  brimonidine group, Hypoxia+0.5  $\mu\text{mol/L}$  brimonidine group and Hypoxia+1  $\mu\text{mol/L}$  brimonidine group. Cell viability was measured by methylthiazolyl tetrazolium (MTT). The apoptotic rate of each group was detected by flow cytometry. The contents of lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) were determined according to the test kits. The expressions of Bax, Bcl-2 and Akt/mTOR/STAT3 signaling pathway-related proteins were detected by Western blotting. **Results** After hypoxia treatment, the cell viability (0.35 $\pm$ 0.04 vs. 0.69 $\pm$ 0.08) was lower than that in the control group ( $P<0.05$ ), and the cell viability in different dose groups of brimonidine (0.37 $\pm$ 0.05, 0.40 $\pm$ 0.06, 0.44 $\pm$ 0.05, 0.53 $\pm$ 0.07, 0.60 $\pm$ 0.09 vs. 0.35 $\pm$ 0.04) were higher than those in the Hypoxia group ( $P<0.05$ ); the apoptosis rate in the Hypoxia group was increased [(32.89 $\pm$ 3.46) % vs. (3.58 $\pm$ 0.34) %] ( $P<0.05$ ). After monidine intervention, the apoptosis rate decreased [(7.41 $\pm$ 0.75) % vs. (32.89 $\pm$ 3.46) %] ( $P<0.05$ ), and the expression of Bax protein decreased ( $P<0.05$ ) (1.48 $\pm$ 0.16 vs. 3.76 $\pm$ 0.31), while the expression of Bcl-2 protein increased (0.89 $\pm$ 0.12 vs. 0.29 $\pm$ 0.04) ( $P<0.05$ ); the SOD content of cells in the Hypoxia group [(50.43 $\pm$ 5.36) U/mg vs. (173.39 $\pm$ 18.21) U/mg] was higher than that in the control group ( $P<0.05$ ), and brimonidine could increase the hypoxia-induced SOD content [(143.28 $\pm$ 15.43) U/mg vs. (50.43 $\pm$ 5.36) U/mg] ( $P<0.05$ ); In the Hypoxia group, LDH [(62.31 $\pm$ 6.82) U/mL vs. (19.07 $\pm$ 1.65) U/mL], MDA content [(4.29 $\pm$ 0.43)  $\mu\text{mol/g}$  vs. (1.35 $\pm$ 0.12)  $\mu\text{mol/g}$ ] were higher than those in the control group ( $P<0.05$ ), brimonidine treatment could reduce the LDH [(31.35 $\pm$ 3.21) U/mL vs. (62.31 $\pm$ 6.82) U/mL], MDA content [(1.76 $\pm$ 0.19)  $\mu\text{mol/g}$  vs. (4.29 $\pm$ 0.43)  $\mu\text{mol/g}$ ] ( $P<0.05$ ). The expressions of Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR, STAT3 and p-STAT3 were decreased

in Hypoxia group ( $P<0.05$ ). After treatment with brimonidine, the expressions of Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR and p-STAT3 were increased ( $P<0.05$ ). Inhibition of Akt/mTOR/STAT3 signaling pathway reversed the effects of brimonidine on hypoxia-induced PC12 cell proliferation, apoptosis, and LDH, MDA, and SOD levels. **Conclusion** Brimonidine can protect hypoxia-induced neuronal injury by activating Akt/mTOR/STAT3 signaling pathway, promoting hypoxia-induced PC12 cell proliferation, inhibiting apoptosis and enhancing its antioxidant capacity.

**Key words:** Brimonidine; hypoxia injury; PC12 cells; Akt/mTOR/STAT3 signaling pathway

缺血性脑卒中是临床常见神经系统疾病,其主要病理类型为短暂性脑缺血发作、可逆性神经功能障碍、进展性卒中、完全性卒中,已严重影响患者生存质量,研究报道指出神经保护性治疗对减轻缺血性脑卒中患者后遗症具有重要意义<sup>[1]</sup>。既往研究显示自由基生成量增加与脑缺血缺氧性损伤密切相关<sup>[2]</sup>。因而寻找抗氧化剂防治缺血性脑卒中的发生成为研究热点。研究表明溴莫尼定是一种高度选择性 $\alpha_2$ 肾上腺素能受体激动剂,并可减少视网膜神经节细胞氧化应激损伤进而保护神经<sup>[3]</sup>。溴莫尼定酒石酸盐可通过激活 $\alpha_2$ -肾上腺素能受体而保护视网膜缺血性损伤<sup>[4]</sup>。但溴莫尼定对缺氧诱导的PC12细胞损伤的作用机制尚未可知。研究表明蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/信号转导及转录活化因子3(STAT3)信号通路激活可减轻脊髓损伤<sup>[5]</sup>。既往研究显示PC12细胞被广泛用于神经细胞功能、分化、凋亡、神经递质分泌等分子机制的研究,而缺氧所致的PC12细胞损伤与氧化应激有关<sup>[6-7]</sup>。但溴莫尼定是否调控Akt/mTOR/STAT3信号通路对缺氧诱导的PC12细胞损伤发挥保护作用尚未可知。本研究于2018年5月至2019年8月拟采用缺氧诱导PC12细胞损伤,观察并探讨溴莫尼定对PC12细胞缺氧损伤的保护作用及其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** 溴莫尼定购自上海晶都生物技术有限公司;Akt/mTOR/STAT3信号通路抑制剂雷帕霉素购自北京索莱宝科技有限公司;PC12细胞购自宁波明舟生物科技有限公司。RPMI 1640培养基购自杭州吉诺生物医药技术有限公司;胰蛋白酶与胎牛血清购自上海栩冉生物科技有限公司;噻唑蓝(MTT)购自上海泽叶生物科技有限公司;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)细胞凋亡试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司;乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;兔抗鼠B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体与辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗购自美国Thermo Fisher Scientific

公司;RIPA裂解液购自上海联迈生物工程有限公司;BCA蛋白定量检测试剂盒购自上海晶抗生物工程有限公司;兔抗鼠Akt及其磷酸化(p-Akt)、mTOR及其磷酸化(p-mTOR)、STAT3及其磷酸化(p-STAT3)抗体均购自美国Abcam公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 药物处理及实验分组** 制备细胞缺氧模型:配制三气通气箱,放入37℃恒温培养箱内,充入95%氮气与5%二氧化碳混合气体,外接传感器以此控制含氧量,缺氧处理时间24 h<sup>[8]</sup>。细胞培养于含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,置于37℃恒温培养箱内进行培养,选取对数生长期PC12细胞进行实验,实验设置五组:对照组(正常培养基培养细胞)、缺氧组(细胞缺氧处理24 h)、分别用终浓度为0.25  $\mu\text{mol/L}$ 、0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 的溴莫尼定处理细胞24 h,随后缺氧处理24 h,分别记作缺氧+0.25  $\mu\text{mol/L}$ 溴莫尼定组、缺氧+0.5  $\mu\text{mol/L}$ 溴莫尼定组、缺氧+1  $\mu\text{mol/L}$ 溴莫尼定组<sup>[9]</sup>。采用MTT实验检测各组细胞活力,筛选溴莫尼定适宜浓度用于后续研究。后续实验中为验证溴莫尼定是否通过激活Akt/mTOR/STAT3信号通路而发挥作用,实验分成缺氧+溴莫尼定组(用前述筛选出的适宜浓度的溴莫尼定处理细胞24 h,随后缺氧处理24 h)、缺氧+溴莫尼定+雷帕霉素组(含有前述筛选出的适宜浓度的溴莫尼定与800 nmol/L雷帕霉素处理细胞24 h,随后缺氧处理24 h)<sup>[10]</sup>。

**1.2.2 MTT法检测细胞增殖** 收集对数生长期PC12细胞,0.25%胰蛋白酶消化细胞,细胞计数( $5 \times 10^4$ 个/毫升),制备细胞悬液,按照每孔100  $\mu\text{L}$ 的密度接种于96孔板,每组设置3个复孔,按照“1.2.1”处理方法进行分组,每孔加入20  $\mu\text{L}$  MTT溶液,置于37℃、相对湿度95%、体积分数5%二氧化碳培养箱内培养4 h,每孔加入150  $\mu\text{L}$ 二甲基亚砜(DMSO),低速振荡混匀,应用酶标仪检测波长为490 nm处各孔吸光度。

**1.2.3 检测细胞中LDH、丙二醛、SOD水平** 各组细胞培养结束后,收集细胞,吸取培养上清液,按照LDH活性检测试剂盒检测细胞LDH活性,采用硫代巴比妥酸法检测细胞丙二醛含量,应用黄嘌呤氧化

酶法检测 SOD 活性,严格按照试剂盒说明书进行操作。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡** 收集各组对数生长期 PC12 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,细胞计数 ( $1 \times 10^4$  个/毫升),收集细胞,预冷 PBS 洗涤,1 000 r/min 转速离心 5 min (4 °C),收集细胞沉淀置于流式试管内,加入 500  $\mu$ L 结合缓冲液悬浮细胞,每孔依次加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 与 5  $\mu$ L PI,充分混匀,室温避光孵育 20 min,应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

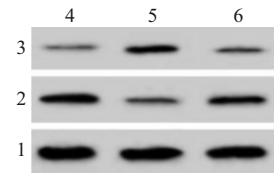
**1.2.5 蛋白质印迹法检测 Bax、Bcl-2 及 Akt/mTOR/STAT3 信号通路相关蛋白表达** 收集各组细胞,加入适量蛋白裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白,采用 BCA 法检测蛋白浓度,取 30  $\mu$ g 蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),结束后将分离的蛋白凝胶转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,室温条件下采用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,孵育一抗(1:1 000),4 °C 条件下孵育 24 h,孵育二抗(1:1 000),显影,暗室内曝光,应用凝胶成像分析及 ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS 21.0 软件分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示且均符合正态分布,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度溴莫尼定对缺氧诱导的 PC12 细胞活力的影响** 对照组、缺氧组、缺氧+0.25  $\mu$ mol/L 溴莫尼定组、缺氧+0.5  $\mu$ mol/L 溴莫尼定组、缺氧+1  $\mu$ mol/L 溴莫尼定组缺氧诱导的 PC12 细胞活力分别为 (0.69 $\pm$ 0.08)、(0.35 $\pm$ 0.04)、(0.44 $\pm$ 0.05)、(0.53 $\pm$ 0.07)、(0.60 $\pm$ 0.09) ( $F=34.73$ ,  $P < 0.001$ )。与对照组比较,缺氧组缺氧诱导的 PC12 细胞活力显著降低 ( $P < 0.05$ );相较于缺氧组,缺氧+0.25  $\mu$ mol/L 溴莫尼定组、缺氧+0.5  $\mu$ mol/L 溴莫尼定组、缺氧+1  $\mu$ mol/L 溴莫尼定组 PC12 细胞活力显著升高 ( $P < 0.05$ )。其中溴莫尼浓度为 1  $\mu$ mol/L 时作用效果最好,用于后续研究。

**2.2 溴莫尼定对缺氧诱导的 PC12 细胞凋亡的影响** 相较于对照组, Hypoxia 组 PC12 细胞凋亡率显著增加 ( $P < 0.05$ ), Bax 蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ );与 Hypoxia 组比较, Hypoxia+溴莫尼定组 PC12 细胞凋亡率显著降低 ( $P < 0.05$ ), Bax 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2 蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.05$ )。见图 1, 2; 表 1。



注: 1— $\beta$  肌动蛋白( $\beta$ -actin); 2—B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)蛋白; 3—Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax); 4—对照组; 5—缺氧组; 6—缺氧+溴莫尼定组。

图 2 溴莫尼定对缺氧诱导的 PC12 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

表 1 溴莫尼定对缺氧诱导的 PC12 细胞凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

| 组别      | 重复次数 | 凋亡率/%                         | Bcl-2 蛋白                     | Bax                          |
|---------|------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 对照      | 3    | 3.58 $\pm$ 0.34               | 1.00 $\pm$ 0.17              | 1.00 $\pm$ 0.13              |
| 缺氧      | 3    | 32.89 $\pm$ 3.46 <sup>①</sup> | 0.29 $\pm$ 0.04 <sup>①</sup> | 3.76 $\pm$ 0.31 <sup>①</sup> |
| 缺氧+溴莫尼定 | 3    | 7.41 $\pm$ 0.75 <sup>②</sup>  | 0.89 $\pm$ 0.12 <sup>②</sup> | 1.48 $\pm$ 0.16 <sup>②</sup> |
| F 值     |      | 541.78                        | 87.82                        | 423.58                       |
| P 值     |      | <0.001                        | <0.001                       | <0.001                       |

注: Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤-2, Bax 为 Bcl-2 相关 X 蛋白。

①与对照组比较,  $P < 0.05$ 。②与缺氧组比较,  $P < 0.05$ 。

**2.3 溴莫尼定对缺氧诱导的 PC12 细胞 LDH、丙二醛、SOD 水平的影响** 与对照组相比, 缺氧组 PC12 细胞中 LDH、丙二醛水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), SOD 水平显著降低 ( $P < 0.05$ );相较于缺氧组, 缺氧+溴莫尼定组 PC12 细胞中 LDH、丙二醛水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), SOD 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 溴莫尼定对缺氧诱导的 PC12 细胞 LDH、丙二醛、SOD 水平的影响/ $\bar{x} \pm s$

| 组别      | 重复次数 | LDH/(U/mL)                    | 丙二醛/ $(\mu$ mol/g)           | SOD/(U/mg)                      |
|---------|------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 对照      | 3    | 19.07 $\pm$ 1.65              | 1.35 $\pm$ 0.12              | 173.39 $\pm$ 18.21              |
| 缺氧      | 3    | 62.31 $\pm$ 6.82 <sup>①</sup> | 4.29 $\pm$ 0.43 <sup>①</sup> | 50.43 $\pm$ 5.36 <sup>①</sup>   |
| 缺氧+溴莫尼定 | 3    | 31.35 $\pm$ 3.21 <sup>②</sup> | 1.76 $\pm$ 0.19 <sup>②</sup> | 143.28 $\pm$ 15.43 <sup>②</sup> |
| F 值     |      | 225.16                        | 290.81                       | 185.34                          |
| P 值     |      | <0.001                        | <0.001                       | <0.001                          |

注: LDH 为乳酸脱氢酶, SOD 为超氧化物歧化酶。

①与对照组比较,  $P < 0.05$ 。②与缺氧组比较,  $P < 0.05$ 。

**2.4 溴莫尼定对缺氧诱导的 PC12 细胞 Akt/mTOR/STAT3 信号通路的影响** 与对照组相比, 缺氧组 PC12 细胞中 Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、STAT3、p-STAT3 蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ );相对于缺氧组, 缺氧+溴莫尼定组 PC12 细胞中 Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、STAT3、p-STAT3 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

**2.5 抑制 Akt/mTOR/STAT3 信号通路逆转溴莫尼定对缺氧诱导的 PC12 细胞增殖和凋亡的影响** 实验结果显示, 与缺氧+溴莫尼定组相比, 缺氧+溴莫尼定+雷帕霉素组缺氧诱导的 PC12 细胞活力显著



表3 溴莫尼定对缺氧诱导的PC12细胞Akt/mTOR/STAT3信号通路的影响/ $\bar{x} \pm s$

| 组别      | 重复次数 | Akt                    | p-Akt                  | mTOR                   | p-mTOR                 | STAT3                  | p-STAT3                |
|---------|------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 对照      | 3    | 1.00±0.12              | 1.00±0.13              | 1.00±0.14              | 1.00±0.16              | 1.00±0.11              | 1.00±0.15              |
| 缺氧      | 3    | 0.39±0.04 <sup>①</sup> | 0.29±0.05 <sup>①</sup> | 0.34±0.05 <sup>①</sup> | 0.29±0.04 <sup>①</sup> | 0.42±0.06 <sup>①</sup> | 0.28±0.04 <sup>①</sup> |
| 缺氧+溴莫尼定 | 3    | 0.79±0.09 <sup>②</sup> | 0.90±0.09 <sup>②</sup> | 0.85±0.13 <sup>②</sup> | 0.86±0.09 <sup>②</sup> | 0.89±0.11 <sup>②</sup> | 0.92±0.09 <sup>②</sup> |
| F值      |      | 107.59                 | 145.02                 | 82.87                  | 108.178                | 92.17                  | 130.58                 |
| P值      |      | <0.001                 | <0.001                 | <0.001                 | <0.001                 | <0.001                 | <0.001                 |

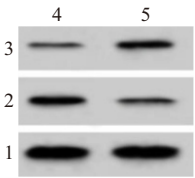
注: Akt为蛋白激酶B, mTOR为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, STAT3为信号转导及转录活化因子3, p-Akt为磷酸化的蛋白激酶B, p-mTOR为磷酸化的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, p-STAT3为磷酸化的信号转导及转录活化因子3。  
①与对照组比较,  $P<0.05$ 。②与缺氧组比较,  $P<0.05$ 。

表4 抑制Akt/mTOR/STAT3信号通路逆转溴莫尼定对缺氧诱导的PC12细胞增殖和凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

| 组别           | 重复次数 | 细胞活力      | 凋亡率/%      | Bcl-2蛋白   | Bax       |
|--------------|------|-----------|------------|-----------|-----------|
| 缺氧+溴莫尼定      | 3    | 0.61±0.08 | 7.49±0.72  | 1.00±0.13 | 1.00±0.15 |
| 缺氧+溴莫尼定+雷帕霉素 | 3    | 0.40±0.05 | 26.75±2.36 | 0.38±0.07 | 2.37±0.21 |
| t值           |      | 6.68      | 23.42      | 12.60     | 15.93     |
| P值           |      | <0.001    | <0.001     | <0.001    | <0.001    |

注: Akt为蛋白激酶B, mTOR为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, STAT3为信号转导及转录活化因子3, Bcl-2为B细胞淋巴瘤-2, Bax为Bcl-2相关X蛋白。

降低( $P<0.05$ ), 细胞凋亡率显著升高( $P<0.05$ ), Bax蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ ), Bcl-2蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ ), 见图3, 4; 表4。



注: 1— $\beta$ 肌动蛋白( $\beta$ -actin); 2—B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)蛋白; 3—Bcl-2相关X蛋白(Bax); 4—缺氧+溴莫尼定组; 5—缺氧+溴莫尼定+雷帕霉素组。

图4 抑制蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/信号转导及转录活化因子3(STAT3)信号通路逆转溴莫尼定对缺氧诱导的PC12细胞凋亡相关蛋白表达的影响

**2.6 抑制Akt/mTOR/STAT3信号通路逆转溴莫尼定对缺氧诱导的PC12细胞LDH、丙二醛、SOD水平的影响** 相较于缺氧+溴莫尼定组, 缺氧+溴莫尼定+雷帕霉素组缺氧诱导的PC12细胞中LDH、丙二醛水平显著升高( $P<0.05$ ), SOD水平显著降低( $P<0.05$ ), 见表5。

3 讨论

大脑耗氧量占总耗氧量的23%左右, 中枢神经系统对缺氧较为敏感, 一旦处于缺氧状态大脑最易受到缺氧损伤<sup>[11]</sup>。PC12细胞来源于大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤细胞, 其细胞形态、结构与功能与神经元细胞相似, 部分药物可通过抗炎、抗氧化对缺氧诱导的PC12细胞发挥保护作用<sup>[12]</sup>。因此本研究主要探讨溴莫尼定对缺氧诱导的PC12细胞增殖、凋亡及氧化应激的影响, 并探究其可能作用机制。

表5 抑制Akt/mTOR/STAT3信号通路逆转溴莫尼定对缺氧诱导的PC12细胞LDH、丙二醛、SOD水平的影响/ $\bar{x} \pm s$

| 组别           | 重复次数 | LDH/(U/mL) | 丙二醛/ ( $\mu$ mol/g) | SOD/(U/mg)   |
|--------------|------|------------|---------------------|--------------|
| 缺氧+溴莫尼定      | 3    | 30.14±2.73 | 1.75±0.16           | 145.33±14.87 |
| 缺氧+溴莫尼定+雷帕霉素 | 3    | 52.83±6.04 | 3.71±0.42           | 68.29±6.76   |
| t值           |      | 10.27      | 13.08               | 13.97        |
| P值           |      | <0.001     | <0.001              | <0.001       |

注: Akt为蛋白激酶B, mTOR为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, STAT3为信号转导及转录活化因子3, LDH为乳酸脱氢酶, SOD为超氧化物歧化酶。

溴莫尼定属于 $\alpha$ 2肾上腺素能受体激动剂, 研究表明溴莫尼定对神经细胞具有一定保护作用, 但关于其具体作用机制尚未阐明<sup>[13]</sup>。研究报道指出溴莫尼定可通过减少视网膜神经节细胞凋亡而减缓小鼠视神经损伤<sup>[14]</sup>。相关研究表明溴莫尼定可抑制细胞凋亡相关蛋白活化从而减少细胞凋亡<sup>[15]</sup>。本研究结果显示, 缺氧处理后PC12细胞活力显著降低, 不同浓度的溴莫尼定处理后细胞活力显著升高, 提示溴莫尼定可促进缺氧诱导的PC12细胞存活。细胞凋亡与PC12细胞缺氧损伤密切相关, 研究表明Bax表达升高可促进细胞色素C(CytC)释放而激活caspase-3从而促进细胞凋亡, 而Bcl-2表达升高可抑制CytC释放从而抑制细胞凋亡<sup>[16]</sup>。本研究结果显示缺氧处理后PC12细胞凋亡率显著升高, Bax蛋白表达量增加, 而Bcl-2蛋白表达量减少, 但溴莫尼定处理后细胞凋亡率显著降低, Bax蛋白表达量减少, 而Bcl-2蛋白表达量增加, 提示缺氧可诱

导PC12细胞凋亡,而溴莫尼定可抑制缺氧诱导的PC12细胞凋亡,其作用机制可能通过调控细胞凋亡相关蛋白表达而发挥作用。SOD属于抗氧化酶类并可通过清除自由基及减少过氧化物的生成而发挥抗氧化损伤的作用,细胞缺氧损伤发生时细胞透性增加导致LDH从细胞质溢出,丙二醛属于脂质过氧化物并可反应细胞损伤程度<sup>[17]</sup>。本研究结果显示缺氧处理后PC12细胞中SOD水平显著降低,而溴莫尼定可抑制缺氧诱导的PC12细胞中SOD水平的降低,提示溴莫尼定可能通过促进PC12细胞生成SOD而清除氧自由基。本研究结果显示缺氧处理后PC12细胞中丙二醛、LDH水平显著升高,而溴莫尼定抑制缺氧诱导的PC12细胞丙二醛、LDH水平升高,提示溴莫尼定可能通过以降低丙二醛、LDH水平而维持细胞膜完整性。本研究证实溴莫尼定对缺氧损伤的PC12细胞具有保护作用。

Akt/mTOR信号通路激活可减轻心肌细胞氧化损伤<sup>[18]</sup>。研究表明mTOR是Akt下游的靶点基因,STAT3是mTOR下游的靶点基因,Akt通过磷酸化下游靶蛋白可影响炎症、氧化应激等生物学过程,促进其信号通路的激活可减轻炎症、氧化应激进而减轻脑缺血再灌注损伤及脑损伤引起的急性肺损伤<sup>[19-20]</sup>。本研究结果显示缺氧处理后PC12细胞中Akt/mTOR/STAT3信号通路相关蛋白Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、STAT3、p-STAT3的表达水平均显著降低,而溴莫尼定可显著提高Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、STAT3、p-STAT3的表达水平,推测溴莫尼定可能通过激活Akt/mTOR/STAT3信号通路而保护缺氧诱导的PC12细胞损伤。本研究结果显示抑制Akt/mTOR/STAT3信号通路可逆转溴莫尼定对缺氧诱导的PC12细胞增殖、凋亡及LDH、丙二醛、SOD水平的影响,分析原因可能为Akt/mTOR/STAT3信号通路激活后可能抑制氧化应激反应从而抑制细胞凋亡。提示溴莫尼定可通过激活Akt/mTOR/STAT3信号通路而促进缺氧诱导的PC12细胞增殖,抑制细胞凋亡及减轻氧化损伤从而保护神经细胞。

综上所述,溴莫尼定可促进PC12细胞缺氧损伤导致的氧自由基的清除,促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,保护缺氧损伤神经细胞,其作用机制与激活Akt/mTOR/STAT3信号通路有关。

(本文图1,3见插图6-2)

### 参考文献

- [1] 张冬梅,曹琪璐,景临林,等.PC12细胞低压性缺氧损伤模型的建立[J].浙江大学学报(医学版),2021,50(5):614-620.
- [2] 刘录山,邓懿铭,李清.缺氧通过HIF-1 $\alpha$ /PCSK9信号途径诱导神经细胞凋亡[J].中南医学科学杂志,2021,49(4):373-378.

- [3] 王璐,林斌武,王燕,等.溴莫尼定对视网膜神经节细胞氧化应激损伤的保护作用[J].中华实验眼科杂志,2018,36(1):12-15.
- [4] 孙萍.视网膜电图评估溴莫尼定酒石酸盐预防视网膜缺血实验研究[J].内蒙古医学院学报,2006,28(3):211-212,225.
- [5] SUN Z, HU L, WEN Y, et al. Adenosine triphosphate promotes locomotor recovery after spinal cord injury by activating mammalian target of rapamycin pathway in rats[J]. Neural Regen Res, 2013, 8(2):101-110.
- [6] 曹琪璐,刘菁,赵彤,等.氟西汀对PC12细胞缺氧损伤的保护作用[J].中国药理学通报,2021,37(6):866-870.
- [7] 景临林,杨颖,武柠子,等.黄芩素-7-甲醚对缺氧致PC12细胞损伤的保护作用[J].中国现代应用药学,2018,35(6):787-792.
- [8] 季玮,李长栋,荔志云,等.异甘草素对PC12细胞缺氧前后LDH和SOD活性的影响[J].中华神经外科疾病研究杂志,2016,15(2):132-135.
- [9] TSAO SW, GABRIEL R, THAKER K, et al. Effects of brimonidine on retinal pigment epithelial cells and müller cells exposed to amyloid-beta 1-42 peptide in vitro[J]. Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina, 2018, 49(10):S23-S28.
- [10] 马珂,徐会友,赵飞,等.胰岛素样生长因子-1对氯化钴诱导的PC12细胞凋亡的抑制作用[J].天津医药,2019,47(4):371-376.
- [11] 张佳佳,苏刚,陈丽霞,等.缺氧条件下中枢神经系统外泌体作用机制[J].中国细胞生物学学报,2021,43(1):103-109.
- [12] MUSSINA K, TOKTARKHANOVA D, FILCHAKOVA O. Nicotinic acetylcholine receptors of PC12 cells[J]. Cell Mol Neurobiol, 2021, 41(1):17-29.
- [13] LINDSEY JD, DUONG-POLK KX, HAMMOND D, et al. Differential protection of injured retinal ganglion cell dendrites by brimonidine[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(3):1789-1804.
- [14] GUO X, NAMEKATA K, KIMURA A, et al. Brimonidine suppresses loss of retinal neurons and visual function in a murine model of optic neuritis[J]. Neurosci Lett, 2015, 592(1):27-31.
- [15] MARANGOZ D, GUZEL E, EYUGLU S, et al. Comparison of the neuroprotective effects of brimonidine tartrate and melatonin on retinal ganglion cells[J]. Int Ophthalmol, 2018, 38(6):2553-2562.
- [16] YANG Z, WANG L, HU Y, et al. Butorphanol protects PC12 cells against OGD/R-induced inflammation and apoptosis[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(3):1969-1975.
- [17] 吕慧君,王运良,白宏英,等.姜黄素灌胃对帕金森病大鼠中脑黑质氧化应激损伤的影响及其机制探讨[J].山东医药,2018,58(11):40-42.
- [18] 王宇霆,周海燕,滕辉. Akt/mTOR信号通路在乌司他丁减轻大鼠心肌细胞氧化应激损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(5):637-640.
- [19] 兰晶,潘敬芳.姜黄素对脑缺血再灌注损伤大鼠PI3K/AKT/mTOR的影响[J].重庆医学,2017,46(1):36-39.
- [20] XU X, ZHI T, CHAO H, et al. ERK1/2/mTOR/Stat3 pathway-mediated autophagy alleviates traumatic brain injury-induced acute lung injury[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 2018, 1864(5 Pt A):1663-1674.

(收稿日期:2020-03-02,修回日期:2022-04-25)