

枸杞多糖对小鼠海马神经元细胞系缺糖缺氧损伤保护作用及机制研究

马琳[#], 张蓓[#], 胡秀娟, 左娣, 和祯泉, 张春, 牛建国*

1. 宁夏医科大学 颅脑疾病重点实验室, 宁夏 银川 750004

2. 解放军九四二医院, 宁夏 银川 750004

3. 宁夏医科大学总医院, 宁夏 银川 750004

摘要:目的 探讨枸杞多糖(LBP)对小鼠海马神经元细胞系HT22细胞缺糖缺氧损伤保护作用的机制。方法 采用含1 mmol/L连二亚硫酸钠的无糖DMEM培养基建立HT22细胞缺糖缺氧损伤模型, 设对照组、模型组和LBP高、中、低剂量(100、50、25 mg/L)组, 以CCK8法检测细胞活性, 流式细胞术检测细胞凋亡情况; Western blotting检测Bcl-2、Bax蛋白表达情况; 利用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测TNF- α 、NF- κ B、I- κ B α 、Caspase-9基因转录活性。结果 与对照组比较, 模型组HT22细胞存活率显著降低、凋亡率显著增加($P < 0.05$); TNF- α 、NF- κ B、Caspase-9基因转录活性显著上调, I- κ B α 基因转录活性显著下调($P < 0.05$); Bax蛋白表达水平显著升高, Bcl-2的蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较, LBP各剂量组细胞存活率显著上升、凋亡率显著下降($P < 0.05$); TNF- α 、NF- κ B、Caspase-9基因转录活性显著下调, I- κ B α 基因转录活性显著上调($P < 0.05$); Bax蛋白表达水平显著降低, Bcl-2的蛋白表达水平显著增高($P < 0.05$)。结论 LBP可能是通过下调TNF- α 、NF- κ B、Caspase-9基因转录活性以及Bax蛋白表达, 增强I- κ B α 基因转录活性及Bcl-2的蛋白表达, 抑制缺糖缺氧损伤诱导神经细胞凋亡的发生。

关键词: 枸杞多糖; 缺糖缺氧损伤; 凋亡; 神经保护

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)04-0683-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.04.017

Protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharides on oxygen-glucose deprived mouse hippocampal neurons

MA Lin, ZHANG Bei, HU Xiujuan, ZUO Di, HE Zhengjuan, ZHANG Chun, NIU Jianguo

1. Ningxia Key Laboratory of Cerebrocranial Diseases, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

2. 942 Hospital of People's Liberation Army, Yinchuan 750004, China

3. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: Objectives To observe the protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) on oxygen-glucose deprived mouse hippocampal neurons. **Methods** Cultured mouse hippocampal neurons exposed to 1 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ to establish oxygen-glucose deprivation model, assigned to control group, model group and LBP group with different doses (100, 50 and 25 mg/L), the cell activity rate was measured by CCK8 assay, and the apoptosis rate was analyzed by Flow Cytometry; the protein expression of Bcl-2 and Bax was measured by Western blotting; RT-qPCR assay was used to evaluate the mRNA expression of TNF- α , NF- κ B, I- κ B α , Caspase-9. **Results** Compared with control group, HT22 cell survival rate and apoptosis rate in model group were significantly reduced ($P < 0.05$); TNF- α , NF- κ B, caspase-9 gene transcription activity was significantly increased, I- κ B α gene transcription activity was significantly decreased ($P < 0.05$); Bax protein expression level was significantly increased, Bcl-2 protein expression level was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with control group, LBP can significantly increase cell viability ($P < 0.05$); reduce the cell apoptosis rate ($P < 0.05$); the expression of TNF- α , NF- κ B, Bax and Caspase-9 were effectively down regulated; induce an increase of I- κ B α mRNA level and Bcl-2 protein level ($P < 0.05$). **Conclusion** LBP have significantly protective effects on

收稿日期: 2019-06-28

基金项目: 宁夏回族自治区“十三五”重大科技项目(2016BZ07); 宁夏自然科学基金项目(NZ13073); 宁夏高等学校科学项目(NGY2015083); 宁夏医科大学校级项目(XY201713)

#共同第一作者: 马琳 E-mail: malinzi11@sina.com

张蓓 E-mail: bei_bei114@126.com

*通信作者: 牛建国 Email: niujg@nxmu.edu.cn

oxygen-glucose deprivation, such protective effects may be mediated by its action on the downstream TNF- α , NF- κ B, Bax, Caspase-9, and up-regulation of Bcl-2 and I- κ B α .

Key words: *Lycium barbarum* polysaccharides; oxygen-glucose deprivation; apoptosis; neuroprotection

缺血性脑血管疾病(Ischemic Cerebrovascular Disease, ICVD)严重威胁人类身体健康,影响患者生活质量,近年来还有低龄化发展的趋势,因此一直是国内外医学界广泛关注与高度重视的疾病^[1]。

研究发现,脑缺血损伤与细胞凋亡的关系非常密切,在脑缺血后的几个小时内,缺血半暗带或梗死区周围的神经元死亡主要以凋亡性死亡为主^[2]。对神经细胞具有抗凋亡等多种生物活性的药物,对提高缺血性脑血管病患者治愈率具有巨大的潜在价值。宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 是产于宁夏回族自治区的特色药材,其主要活性成分为枸杞多糖(*Lycium barbarum* polysaccharide, LBP),已有研究证明,LBP具有抗细胞损伤的作用,但其具体作用机制仍不清楚。研究发现,LBP具有一定的神经保护作用^[3],本研究旨在探讨LBP对连二亚硫酸钠所致小鼠海马神经元细胞系(HT22)缺血损伤的保护作用及机制。

1 材料

1.1 细胞

HT22细胞,由宁夏颅脑疾病重点实验室提供。

1.2 药物与主要试剂

LBP(青海康普生物科技股份有限公司,批号KPGQZTQW-13,规格100 mg,含量 $\geq 95\%$);连二亚硫酸钠(天津市凯通化学试剂有限公司);MTT检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司);Anexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);TNF- α 、I- κ B α 、NF- κ B、Caspase-9引物均由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表1;Bax、Bcl-2抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器

细胞培养箱(美国 Thermo 公司);Odyssey 双色红外激光成像(美国 LICOR 公司);倒置显微镜(德国 Lecia 公司);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公

司);CFX96 荧光定量PCR仪(美国 BIO-RAD 公司)。

2 方法

2.1 细胞模型建立及实验分组

HT22细胞采用含10%胎牛血清的DMEM作为培养基,置于5% CO₂、37℃培养箱中培养。取对数生长期的细胞,用无糖DMEM培养基清洗2次,加入含有1 mmol/L 连二亚硫酸钠无糖DMEM培养基置于5% CO₂、37℃培养箱中45 min,后弃去上清并加入预温的培养液,常规条件培养16 h。

实验分为对照组、模型组和LBP高、中、低(100、50、25 mg/L)3个剂量组。除对照组外,其余各组进行缺糖缺氧损伤模型的制备,模型组在模型制备后加入含10%胎牛血清的DMEM,LBP组在模型制备后加入相应浓度的LBP。

2.2 CCK8法检测细胞活性

取HT22细胞,以细胞数 7.5×10^4 /孔接种于96孔板中,每组设置6个平行孔,分组及给药方法同“2.1”项。每孔加入10 μ L CCK8溶液,在培养箱中培养2 h,酶标仪在450 nm波长处检测每孔的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

细胞存活率=实验组A值/对照组A值

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率

取HT22细胞,以细胞数 1.2×10^6 /孔接种于6孔板中,每组设置6个平行孔,分组及给药方法同“2.1”项。胰酶消化收集细胞,加入1 mL 4℃预冷的PBS洗涤2次,加入250 μ L Binding Buffer重悬细胞,加入5 μ L Anexin V-FITC、10 μ L PI溶液,轻柔混匀后于室温避光孵育15 min,利用流式细胞仪检测各组凋亡细胞的百分比。

2.4 Western blotting 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平

取HT22细胞,以细胞数 1.2×10^6 /孔接种于6孔板中,每组设置6个平行孔,分为对照组、模型组、

表1 实时定量PCR引物

Table 1 Primer sequences used for Q-PCR reactions

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
B-actin	GGCTGTATCCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
TNF- α	CCTGTAGCCACGTCGTAG	GGGAGTAGACAAGGTACAACCC
I- κ B α	AGCCCCGAGCATTCTATTGTG	TGGTCTTACGTGAGAGGGC
NF- κ B	ATGGCAGACGATGATCCCTAC	TGTTGACAGTGGTATTTCTGGTG
Caspase-9	TCCTGGTACATCGAGACCTTG	AAGTCCCTTTCGAGAAACAG

LBP(100 mg/L)组,造模及给药操作同“2.1”项。弃去培养基,用PBS洗涤2次,加入80 μ L细胞裂解液,置于冰上收集细胞,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心15 min吸取上清。按照试剂盒说明书,采用BCA法检测蛋白浓度。每组取40 μ g蛋白上样电泳,转膜。采用化学发光法检测各组 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平。

2.5 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测TNF- α 、I- κ B α 、NF- κ B、Caspase-9转录水平

取HT22细胞,以细胞数 1.2×10^6 /孔接种于6孔板中,每组设置6个平行孔,分为对照组、模型组、LBP(100 mg/L)组,造模及给药操作同“2.1”项。弃去培养基,用PBS洗涤2次,加入1 mL Trizol 剧烈摇晃后加入0.2 mL 氯仿并混匀,离心吸取上层无色水相,加入0.5 mL 异丙醇,室温沉淀10 min,离心弃去上清,加入1 mL 75%乙醇,洗涤2次,离心甩干,加入30 μ L DEPC水溶解。紫外分光光度法检测mRNA浓度后,用逆转录试剂盒将mRNA反转录为cDNA作为PCR模板。按照试剂盒说明书进行RT-qPCR检测。

2.6 统计学处理

结果经SPSS 20.0统计软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析进行各组统计学差异比较。

3 结果

3.1 LBP对细胞存活率的影响

CCK8法检测结果表明,模型组细胞存活率显

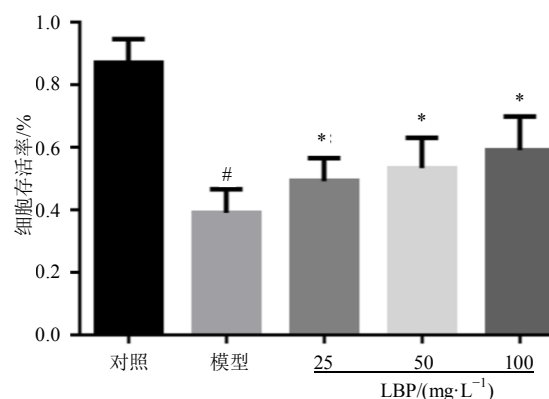
著低于对照组($P < 0.05$);与模型组比较,LBP高、中、低浓度组细胞存活率显著上升($P < 0.05$),并呈浓度相关性。见图1。

3.2 LBP对细胞凋亡率的影响

采用流式细胞术检测细胞凋亡率发现,模型组凋亡率明显高于对照组($P < 0.05$);与模型组比较,LBP高、中、低浓度组凋亡率明显下降($P < 0.05$),并呈浓度相关性。见图2。

3.3 LBP对HT22细胞Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

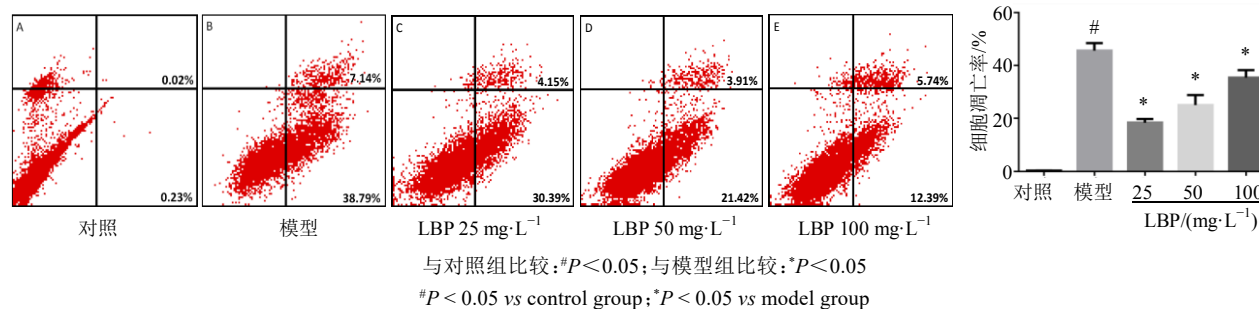
如图3所示,Western blotting结果显示,与对照组比较,模型组细胞Bax蛋白表达水平明显高于对



与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$
 $^{\#}P < 0.05$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ vs model group

图1 LBP对缺氧缺血损伤HT22细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effect of LBP on survival rate of HT22 cells with oxygen-glucose deprivation injury ($\bar{x} \pm s, n=6$)



与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$
 $^{\#}P < 0.05$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ vs model group

图2 LBP对缺氧缺血损伤HT22细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Effect of LBP on apoptosis rate of oxygen-glucose deprived by HT22 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

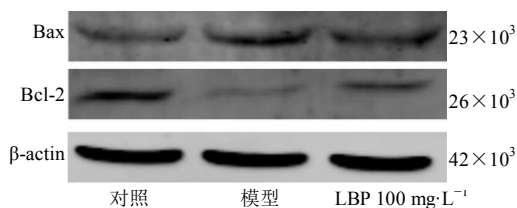


图3 LBP对缺氧缺血损伤HT22细胞Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of LBP on Bcl-2、Bax expression of oxygen-glucose deprived by HT22 cells

照组,而Bcl-2蛋白相对表达水平明显低于对照组;与模型组比较,LBP 100 mg/L剂量组Bax蛋白表达水平明显下调,同时Bcl-2蛋白表达水平明显上调。

3.4 LBP对TNF- α 、I- κ B α 、NF- κ B、Caspase-9 mRNA水平的影响

如图4所示,与对照组比较,模型组细胞内TNF- α 、NF- κ B、Caspase-9 mRNA表达均显著高于对照组($P < 0.05$),I- κ B α mRNA表达水平显著低于对

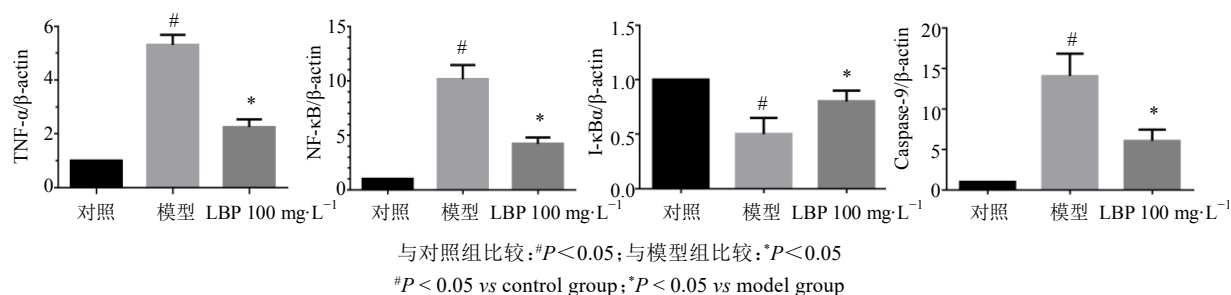


图4 LBP对缺氧缺血损伤HT22细胞TNF- α 、I- κ B α 、NF- κ B、Caspase-9转录水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Effect of LBP on TNF- α , I- κ B α , NF- κ B and Caspase-9 mRNA transcription of oxygen-glucose deprived by HT22 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

照组($P < 0.05$);与模型组比较,LBP 100 mg/L剂量组可显著抑制缺氧缺血损伤诱导的HT22细胞TNF- α 、NF- κ B、Caspase-9基因表达的上调,并使I- κ B α 的转录活性增强($P < 0.05$)。

4 讨论

当发生脑缺血损伤时,神经细胞通过坏死和凋亡2种混合途径走向死亡,但是迟发型神经细胞死亡主要以细胞凋亡为主,凋亡可能决定了最终梗死灶体积^[2,4]。神经元坏死是不可逆的,而逆转凋亡过程可作为脑缺血治疗的潜在靶点^[5]。目前全球将近有200个治疗脑卒中药物进入临床试验,这些药物在细胞及实验动物模型上有很好的疗效,但是目前只有组织型纤维蛋白溶活剂(tPA)获得美国FDA的批件进入临床。tPA通过溶栓治疗缺血性脑血管疾病,然而疗效并不乐观,这可能是与tPA药理作用单一有关^[6-8]。

LBP被认为是一种很有潜力的神经保护药物,能够改善MPTP诱导的帕金森模型小鼠的病理症状和行为缺陷^[9];延缓视神经横断(PONT)后轴突的继发性病变,抑制小胶质细胞和巨噬细胞的活化^[10];通过减少氧化应激和细胞凋亡的发生,改善由脂多糖引起的大鼠认知和记忆缺陷^[11]。本实验采用含1 mmol/L连二亚硫酸钠的无糖DMEM培养基处理小鼠海马神经元HT22细胞系,造成细胞缺氧缺血损伤,使细胞活性降低,并诱导细胞凋亡。既往研究显示,LBP能够改善由缺氧缺血引起的神经元损伤,其机制可能是LBP能够提高缺氧缺血损伤神经元的抗氧化能力,并改善细胞线粒体的结构和功能^[12]。本实验中,CCK8实验和流式细胞术结果均显示,与模型组比较,LBP各剂量组均能抑制缺氧缺血损伤诱导的细胞存活率降低和凋亡发生。

Bcl-2是细胞中重要的抗凋亡蛋白,而Bcl-2相关x蛋白(Bax)能促进细胞色素C穿过线粒体膜,激活Caspases-9,发挥促进细胞凋亡的作用^[13]。已有

研究表明,LBP通过下调Bax、上调Bcl-2表达,减轻三甲基锡(TMT)对Neuro-2细胞的神经毒性作用^[14]。本实验发现,LBP 100 mg/L剂量组能够明显抑制促凋亡因子Bax的表达,并增强凋亡抑制蛋白Bcl-2的表达,改善由缺氧缺血造成的神经细胞损伤。LBP抑制NF- κ B途径的作用已经在软骨细胞中得到了验证^[15],NF- κ B是一类具有多种生物效应的细胞因子,能够被TNF- α 激活解离,启动下游促凋亡信号^[16]。本实验结果显示,LBP 100 mg/L剂量组能够明显下调由缺氧缺血损伤引起的TNF- α 、NF- κ B、Caspase-9基因转录水平的增加,减少I- κ B α 的泛素降解,从而改善缺氧缺血引起的神经细胞凋亡。

本实验发现,LBP可以通过抗凋亡机制发挥其对缺氧缺血所致神经元损伤的保护作用,机制可能与下调TNF- α 、NF- κ B、Caspase-9基因转录活性以及Bax蛋白表达,增强I- κ B α 基因转录活性及Bcl-2的蛋白表达相关。本研究结果为临床利用LBP治疗缺血性脑血管病患者提供参考。

参考文献

- [1] 朱贤富,王振华. 脑缺血/再灌注损伤机制的研究[J]. 医学综述, 2010, 18(16): 2786-2789.
- [2] 宋修云,胡金凤,陈乃宏. 神经细胞凋亡与脑缺血疾病[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(3): 307-310.
- [3] 张芳,郭盛,钱大玮,等. 枸杞多糖的提取纯化与分子结构研究进展及产业化开发现状与前景分析[J]. 中草药, 2017, 48(3): 424-432.
- [4] Takuma K, Baba A T, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection [J]. Prog Neurobiol, 2004, 72(2): 111-127.
- [5] 杨飞雪,汪宁. 浅谈缺血性脑血管病的病理生理机制[J]. 黑龙江医药, 2014, 27(6): 1283-1286.
- [6] Goldstein L B. Acute ischemic stroke treatment in 2007 [J]. Circulation, 2007, 116(13): 1504-1514.
- [7] Mureanu D F, Buzoianu A, Florian S I, et al. Towards a

- roadmap in brain protection and recovery [J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(12): 2861-2871.
- [8] Fisher M, Feuerstein G, Howells D W, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable peclinical recommendations [J]. Stroke, 2009, 40(6): 2244-2250.
- [9] Wang X H, Pang L, Zhang Y Q, et al. *Lycium barbarum* Polysaccharide promotes nigrostriatal dopamine function by modulating PTEN/AKT/mTOR pathway in a Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) murine model of Parkinson's disease [J]. Neurochem Res, 2018, 43(4): 938-947.
- [10] Li H Y, Ruan Y W, Kau W F, et al. Effect of *Lycium barbarum* (Wolfberry) on alleviating axonal degeneration after partial optic nerve transection [J]. Cell Transplant, 2015, 24(3): 403-417.
- [11] Chen W W, Cheng X, Chen J Z, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides prevent memory and neurogenesis impairments in scopolamine-treated rats [J]. PloS One, 2014, 9(2): 88076.
- [12] 马琳, 马然, 王艺, 等. 枸杞多糖对小鼠海马神经元细胞系缺糖缺氧再灌注损伤的影响 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(10): 1172-1175.
- [13] Zong W X, Edelstein L C, Chen C, et al. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis [J]. Genes Dev, 1999, 13(4): 382387.
- [14] Zhao W Y, Pan X Q, Li T, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides protect against trimethyltin chloride-induced apoptosis via sonic hedgehog and PI3K/Akt signaling pathways in mouse Neuro-2a cells [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 9826726.
- [15] 蔡松涛, 孙京涛, 魏瑄. 枸杞多糖抑制核因子-κB (NF-κB)通路降低骨关节炎软骨细胞炎性细胞因子水平 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(11): 989-993.
- [16] Liu Y Q, You S, Tashiro S, et al. Roles of Ras and extracellular signal-regulated kinase-dependent IkappaBalpha degradation in oridonin-enhanced phagocytosis of apoptotic cells by human macrophage-like U937 cells [J]. Int Immunopharmacol, 2006, 6(2): 260-268.