

## 补阳还五汤类方提取物对 PC12 细胞氧化应激损伤模型凋亡与自噬的调控

刘芳<sup>1,2</sup>, 朱炎贞<sup>3</sup>, 赵冯岩<sup>1</sup>, 胡耀梅<sup>1</sup>, 黄晓洁<sup>1</sup>, 范若颖<sup>1</sup>, 余东霖<sup>1</sup>, 陈乃宏<sup>1,2,4\*</sup>

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208

3. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南 长沙 410208

4. 中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050

**摘要:**目的 从凋亡与自噬的调控探讨补阳还五汤类方提取物对 PC12 细胞氧化应激模型的保护机制。方法 以不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 PC12 细胞制备不同损伤程度的氧化应激模型, 采用 MTT 法确定补阳还五汤类方提取物对氧化应激损伤初期和加剧期发挥保护作用的有效浓度, 流式细胞术和 TUNNEL 法检测细胞凋亡情况, 透射电镜和 mRFP-GFP-LC3 腺病毒双标法检测细胞自噬情况, 蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白 (Bcl-2 和 Bax) 与自噬相关蛋白 (Beclin1、LC3A 和 LC3B) 的表达。结果 分别以 0.5、2.0 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 PC12 细胞制备氧化应激损伤的初期模型和加剧期模型; 与对照组比较, 模型组细胞凋亡率增加, 自噬程度加剧, Bax/Bcl-2 比例增加, Beclin1 和 LC3B 表达上调, LC3A 表达下调 ( $P < 0.05$ ); 与氧化应激损伤初期的模型 1 组比较, 补阳还五汤类方提取物均能下调 Bax/Bcl-2, 抑制凋亡率, 并一定程度上上调 Beclin1 和 LC3B/LC3A 的表达, 激活自噬 ( $P < 0.05$ ); 当氧化应激损伤程度加剧时, 模型细胞中出现较高水平的凋亡与自噬, 此时, 两方则通过抑制凋亡和降低自噬, 共同发挥保护作用。结论 补阳还五汤类方提取物可通过对凋亡与自噬的交互动态调控对不同程度损伤的氧化应激模型细胞发挥保护作用。

**关键词:** 补阳还五汤类方提取物; 氧化应激损伤; 凋亡; 自噬; Bcl-2; Bax; Beclin1; LC3A; LC3B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)20-5228-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.20.015

## Regulation of Buyang Huanwu Decoction extracts on apoptosis and autophagy of PC12 cells model with oxidative stress injury

LIU Fang<sup>1, 2</sup>, ZHU Yan-zhen<sup>3</sup>, ZHAO Feng-yan<sup>1</sup>, HU Yao-mei<sup>1</sup>, HUANG Xiao-jie<sup>1</sup>, FAN Ruo-ying<sup>1</sup>, YU Dong-lin<sup>1</sup>, CHEN Nai-hong<sup>1, 2, 4</sup>

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Research Center of Standardization and Functional Engineering of Traditional Chinese Medicine in Hunan Province, Changsha 410208, China

3. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

4. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

**Abstract: Objective** To explore the underlying mechanism of Buyang Huanwu Decoction extracts on apoptosis and autophagy in PC12 cells model with oxidative stress injury. **Methods** Different level oxidative stress injury models with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at various concentrations were established. The effective concentrations of Buyang Huanwu Decoction extracts were determined by MTT method in the initial stage and the intensifying period after oxidative stress injury. The apoptosis of PC12 cells were evaluated by FCM and TUNNEL, the autophagy situations were observed by TEM and mRFP-GFP-LC3. Furthermore, the proteins of Bax, Bcl-2, Beclin1, LC3A, and LC3B related to apoptosis were determined by Western blotting. **Results** The initial stage and the intensifying

收稿日期: 2020-03-05

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81704064); 湖南省自然科学基金青年项目 (2018JJ3385); 湖南省教育厅科学研究优秀青年项目 (17B199); 国家级大学生创新创业计划项目 (201910541036); 2018 年湖南省青年教师培养对象资助项目; 湖南省中药学一流学科资助项目 (校行科字[2018]3 号)

**作者简介:** 刘芳 (1980—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中医药防治脑缺血。E-mail: fliu0825@126.com

**\*通信作者** 陈乃宏 (1961—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为抗神经退行性疾病创新药物研发及机制分析、抗脑缺血创新药物研发及机制。E-mail: chennh@imm.ac.cn

period of oxidative stress injury cell models were established by  $H_2O_2$  at the concentration of 1.5 and 2.0 mmol/L, respectively. Compared with the control group, model group appeared increasing apoptosis and autophagy levels, and model group had higher expressions of Bax/Bcl-2, Beclin1, LC3B and lower expression of LC3A ( $P < 0.05$ ). Compared with the initial stage of oxidative stress injury cell models, Buyang Huanwu Decoction extracts could reduce the Bax/Bcl-2 and restrain apoptosis rates, while the autophagy was activated by up-regulation Beclin1 and LC3B/LC3A ( $P < 0.05$ ). When the serious apoptosis and excessive autophagy were observed in the intensifying period of oxidative stress injury cells, the extracts could play the protective effect by apoptosis restraining and autophagy alleviating. **Conclusion** Buyang Huanwu Decoction extracts can play the protective effects on oxidative stress injury cell models in different period by regulating apoptosis and autophagy.

**Key words:** Buyang Huanwu Decoction extracts; oxidative stress injury; apoptosis; autophagy; Bcl-2; Bax; Beclin1; LC3A; LC3B

补阳还五汤类方提取物包含补阳还五汤精简方和原方<sup>[1]</sup>, 前期研究中, 本课题组分别从体外和体内两个角度, 采用体外氧化应激细胞模型和体内局灶性脑缺血模型 (MCAO) 证实了补阳还五汤类方提取物对脑缺血损伤的疗效显著<sup>[2]</sup>, 并从细胞周期素依赖蛋白激酶 5 (cyclin-dependent kinase 5, CDK5) 介导的凋亡途径对其作用机制进行了初步研究<sup>[3-4]</sup>。近年研究表明, 在神经退行性疾病中 CDK5 与自噬之间亦存在关联性<sup>[5-6]</sup>。而凋亡与自噬作为细胞死亡的 2 种主要途径, 二者的相互作用机制亦受到脑缺血科研工作者的广泛关注<sup>[7]</sup>。缺血性脑损伤的原发性和继发性分子机制十分复杂, 脑缺血一旦发生, 脑内能量将很快被耗竭, 神经细胞程序性死亡迅速发生, 凋亡和自噬途径被激活, 并参与神经元的损伤过程, 由于凋亡与自噬之间存在多种信号交互方式, 如合作、对抗、协作等<sup>[8]</sup>, 在脑缺血后神经元发生死亡的过程中, 二者的具体调控机制关系具体如何? 研究者们通过实验得到的结论不尽相同, 一种观点认为激活自噬加速神经元的凋亡<sup>[9-10]</sup>, 而另一种相反的观点则认为激活自噬可抑制神经元凋亡<sup>[11-12]</sup>, 这很大一部分原因归结于实验材料的不同。针对凋亡与自噬的交互作用方式在脑缺血调控中存在的不同观点, 本课题组提出动态研究凋亡与自噬交互作用方式对脑缺血后神经元损伤的影响。本实验以不同损伤程度的氧化应激细胞模型为研究对象, 通过观察细胞内凋亡和自噬情况的变化, 着重检测凋亡蛋白 (Bcl-2、Bax) 与自噬蛋白 (Beclin1、LC3A、LC3B) 的表达, 从细胞分子水平动态探明补阳还五汤类方提取物对凋亡与自噬的调控机制, 为后续深入研究提供重要参考。

## 1 材料

### 1.1 药物

补阳还五汤精简方提取物 (BYJF) 处方由黄芪 30 g、川芎 9 g、地龙 6 g 组成, 参照前期研究<sup>[3]</sup>将其

提取制备成干浸膏, 相当于原生药 4.7 g/g; 补阳还五汤原方提取物 (BYYF) 处方由黄芪 120 g, 当归 6 g, 赤芍 4.5 g, 川芎 3 g, 红花 3 g, 桃仁 3 g, 地龙 3 g 组成, 参照前期研究<sup>[3]</sup>将其提取制备成干浸膏, 相当于原生药 4.5 g/g。使用前采用无菌水配制成 10 mg/mL 的母液, 经 0.25  $\mu$ m 滤膜滤过除菌, 使用时用无菌磷酸缓冲溶液 (PBS) 稀释至适当浓度。

### 1.2 试剂

DEME 高糖培养基 (HyClone 公司), 含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素; D-Hanks (Solarbio 公司); 青霉素-链霉素溶液 (Beyotime 公司); 胎牛血清 (Gibco 公司); 胰蛋白酶 (北京索莱宝科技有限公司); 四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT, Sigma 公司); 二甲基亚砜 (DMSO, Biosharp 公司); AnnexinV-PI 试剂盒 (联科生物公司, 批号 70-AP101-100); TUNNEL 试剂盒 (碧云天公司, 批号 C1088); mRFP-GFP-LC3 腺病毒[汉恒生物科技(上海)有限公司, 批号 HBAD-1007]; Bax (批号 ab182733)、Bcl-2 (批号 ab196495) 均为兔源, 均购自 Abcam 公司; Beclin (鼠源, Proteintech 公司, 批号 6666-5-1-1g); LC3A (批号 NB100-2331)、LC3B (批号 NB100-2220) 均为鼠源, 均购自 Novus 公司; 羊抗鼠 IgG-Dylight549 (批号 GAR002)、羊抗兔 IgG-FITC (批号 GAR001) 均购自联科生物公司; 其他试剂均为分析纯。

### 1.3 仪器

$CO_2$  培养箱、多功能酶标仪均购自 Thermo fisher 公司; 荧光显微镜 (Primo Vert ZEISS 公司); Cellometer Image Cytometer (K2) 流式细胞仪 (Nexcelom 公司); Cytation™ 5 细胞成像多功能检测系统 (BioTek 公司); 凝胶成像系统 (General Electric 公司); HT7700 日立透射电子显微镜。

### 1.4 细胞

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系 (PC12 细胞),

高分化, 购自长沙科文生物科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养及分组

采用 DEME 高糖培养基 (pH 7.2), 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中温育, 待细胞贴壁融合至 90% 时, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 加入培养基充分吹打至单细胞悬液, 传代或接种至合适的培养板中, 继续培育至对数生长期用于实验。凋亡和自噬实验中将细胞分成 7 组, 分别为 (1) 对照组; (2) 氧化应激损伤模型 1 (M1) 组: 采用 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用细胞 2 h; (3) 氧化应激损伤模型 2 (M2) 组: 采用 2.0 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用细胞 2 h; (4) BYJF+M1 组: 先用 5.0 mg/mL BYJF 处理细胞 2 h, 再加入 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 2 h; (5) BYYF+M1 组: 先用 2.0 mg/mL BYYF 处理 2 h, 再加入 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 2 h; (6) BYJF+M2 组: 先用 5.0 mg/mL BYJF 处理细胞 2 h, 再加入 2.0 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共同作用 2 h; (7) BYYF+M2 组: 先用 2.0 mg/mL BYYF 处理 2 h, 再加入 2.0 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 2 h。

### 2.2 MTT 法检测细胞存活率

将 PC12 细胞以  $1 \times 10^6$  的密度接种于 96 孔板中, 待细胞融合至约 80% 时, 替换为无血清培养基同步化处理, 加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (终浓度为 0~5 mmol/L) 继续培养 2 h, 每组设置 5 个复孔, 采用 MTT 法检测细胞存活率, 每孔加入 10  $\mu$ L MTT 溶液, 4 h 后, 加入 100  $\mu$ L 二甲基亚砜, 振荡均匀后采用酶联免疫检测仪测量 490 nm 处各孔的吸光度 (A) 值, 并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{处理}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

将 PC12 细胞以  $1 \times 10^6$  的密度接种于 96 孔板中, 待细胞生长至对数生长期后, 完成同步化处理, 再将细胞分成 7 个组, 每组设置 5 个复孔。MTT 法测定各组细胞 A 值, 计算细胞存活率, 考察 BYJF 和 BYYF 提取物对不同程度氧化应激损伤模型细胞发挥保护作用的有效浓度。

### 2.3 流式细胞术检测 PC12 细胞的早期凋亡

将 PC12 细胞以  $1 \times 10^7$  的密度接种于 6 孔板中用于实验, 每组设置 3 个复孔, 细胞分组处理后, 胰酶消化收集细胞, PBS 离心洗涤后按 AnnexinV-PI 试剂盒步骤处理细胞, 上机检测。

### 2.4 Tunnel 法检测 PC12 细胞凋亡情况

将 PC12 细胞以  $1 \times 10^5$  的密度接种于 24 孔板中, 每组设置 3 个复孔, 细胞分组处理后, 弃去培

基, PBS 轻轻漂洗 3 次, 按 TUNNEL 试剂盒步骤处理细胞, 置于荧光显微镜下观察拍片, 采用 Image J 软件分析相对荧光强度。

### 2.5 透射电镜观察 PC12 细胞内自噬体

将 PC12 细胞以  $1 \times 10^7$  的密度接种于 6 孔板中, 细胞分组处理后, 弃去培养基, PBS 轻轻漂洗 3 次, 胰酶消化后收集细胞悬于 PBS 中, 1 000 r/min 离心 5~8 min, 小心弃去上清, 加入 2.5% 戊二醛 PBS 溶液固定细胞, 透射电子显微镜拍片。

### 2.6 mRFP-GFP-LC3 腺病毒双标法检测 PC12 细胞内自噬流

将 PC12 细胞以  $1 \times 10^5$  的密度接种于 24 孔板中, 每组设置 3 个复孔, 待细胞融合至 80% 左右时, 将腺病毒液稀释至感染复数 (MOI) 为 100, 加入细胞共培育 4 h, 替换为新鲜的完全培养基继续培养 36 h。细胞分组处理后, 弃去培养基, PBS 轻轻漂洗 3 次, 采用细胞成像多功能检测系统观察。

### 2.7 蛋白质印迹法检测氧化应激 PC12 细胞中凋亡与自噬相关蛋白的表达

将 PC12 细胞以  $1 \times 10^7$  的密度接种于 10 cm 的培养皿中, 细胞分组处理后, 加入 PIPA 裂解液冰上裂解 30 min, 刮板收集裂解物并离心, 收集上清液, 取少量上清, BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白液定量分析, 剩余部分加入 SDS 上样缓冲液, 其中上样缓冲液-蛋白样品 (1:4), -20 °C 保存备用。取蛋白样品 25  $\mu$ g 进行 SDS-PAGE 电泳分离, 先恒压 60 V 转 30 min 后 120 V 转 90 min, 湿转至 PVDF 膜上恒压 100 V 转膜, 封闭后分别与一抗 (Bcl-2、Bax、Beclin1、PI3K 的稀释比例均为 1:1 000,  $\beta$ -actin 的稀释比例为 1:1 500) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 随后与 HRP 标记的二抗 (1:1 000) 37 °C 孵育 1 h。将 ECL 显影液均匀滴加于 PVDF 膜上, 暗反应 3 min 后用凝胶成像仪显影。采用 Image J 测定蛋白条带的灰密度值, 以  $\beta$ -actin 为内参照, 以目的条带的灰密度值与  $\beta$ -actin 条带的灰密度值的比值作为该蛋白的相对表达量。

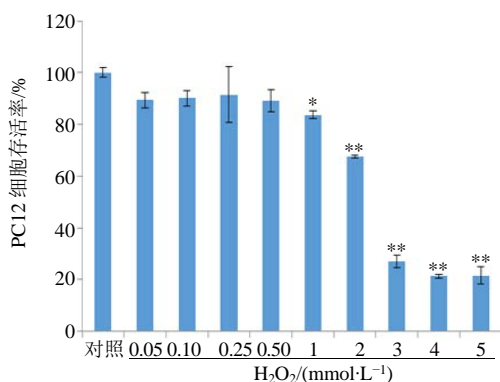
### 2.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 进行统计学分析。数据均经过方差齐性检验和正态性检验, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 3 结果

### 3.1 BYJF 和 BYYF 提取物对 PC12 细胞氧化应激损伤模型的保护作用

以不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 PC12 细胞, 结果见图 1,



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 下同

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group, same as below figures

图 1 不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 PC12 细胞的存活率 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Fig. 1 PC12 cells survival rates treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  at different concentrations ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

从图中可以看出,当  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用浓度小于 0.5 mmol/L 时,  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 PC12 细胞的影响较小,组间无显著性差异;随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用浓度的增大,PC12 细胞的存活率逐渐降低,当  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 1.0 mmol/L 时,细胞存活率 80% 左右,显微镜下观察到细胞边界稍显模糊,有少量细胞出现脱落,损伤程度相对较轻;当  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度增至 2.0 mmol/L 时,细胞存活率为 60%~70%,镜检发现细胞形态有较明显的变圆趋势,损伤程度加剧;当  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度增至 3.0 mmol/L 时,死细胞增多导致培养基出现浑浊现象,表明损伤程度严重,提示不同浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理对 PC12 细胞造成不同程度的氧化应激损伤,考虑到细胞损伤严重时存活率太低,无法进行相关指标的检测,故后续实验分别采用 0.5、2.0 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用细胞,制备氧化应激损伤初期模型 (M1) 和加剧期模型 (M2)。

以不同浓度的 BYYF 和 BYJF 处理 PC12 细胞,结果见图 2。从中可以看出,对于 0.5、2.0 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理的 PC12 细胞,2.0 mg/mL BYYF 和 5.0 mg/mL BYJF 处理后,均能对氧化应激模型细胞发挥一定程度的保护作用,与对应的模型组比,具有统计学意义 ( $P < 0.05$ );对于相同浓度的 BYYF 和 BYJF,二者对 M1 期模型细胞的保护作用相当,对 M2 期细胞则表现出一定程度的差异性 ( $P < 0.05$ )。故后续实验选择补阳还五汤类方提取物的给药浓度分别为 BYYF 2.0 mg/mL、BYJF 5.0 mg/mL。

### 3.2 BYJF 和 BYYF 提取物对 PC12 细胞氧化应激不同程度损伤模型凋亡的影响

#### 3.2.1 流式细胞术检测 PC12 细胞的早期凋亡 结

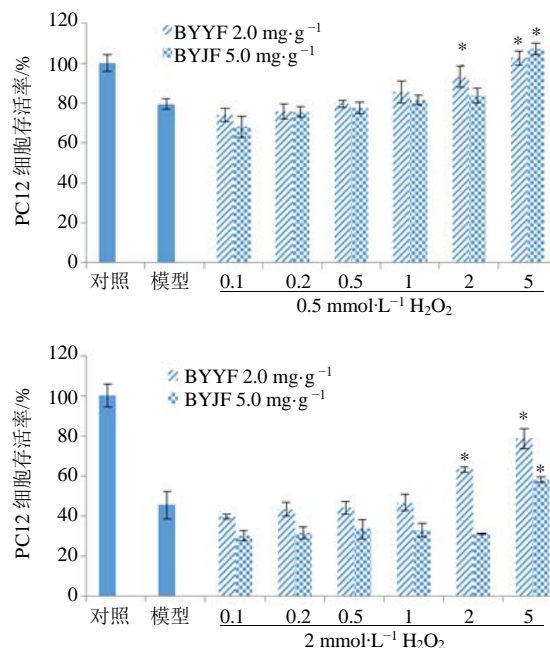


图 2 不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、BYYF 和 BYJF 处理 PC12 细胞的存活率 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 2 PC12 cells survival rates treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$ , BYYF, and BYJF at different concentrations ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

果见图 3 和图 4,与模型组比较,对照组细胞 90% 以上具有良好的活力,仅少量细胞发生早期凋亡和坏死 ( $P < 0.05$ ),属于细胞正常的生命活动,证实 2 种不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理均能导致 PC12 细胞发生一定程度的损伤;当 PC12 细胞经  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后,随着氧化应激程度的增加,其活细胞比例随之降低,早期凋亡细胞比例变化不大,处于 12%~18%,而坏死细胞的比例则呈现增长趋势,表明  $\text{H}_2\text{O}_2$  所导致的氧化应激对 PC12 细胞经由早期凋亡走向死亡具有加速作用。采用 BYJF 和 BYYF 处理后,相较于同一程度的氧化应激损伤模型细胞,两方均能一定程度发挥保护作用,主要表现为活细胞比例增加和坏死细胞比例降低 ( $P < 0.05$ ),但早期凋亡细胞的比例变化不明显,猜测可能在氧化应激初期 PC12 细胞已完成早期凋亡程序,使细胞进入到坏死阶段,而 BYJF 和 BYYF 提取物对氧化应激损伤发挥保护作用可能通过阻止细胞坏死来实现。此外,补阳还五汤类方提取物对 M1 期模型细胞的影响无统计学差异,对 M2 期模型细胞的早期凋亡率和坏死率则存在一定程度差异 ( $P < 0.05$ )。

3.2.2 Tunnel 法检测 PC12 细胞凋亡情况 本研究进而采用 Tunnel 法观察细胞凋亡情况,结果见图 5,由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断

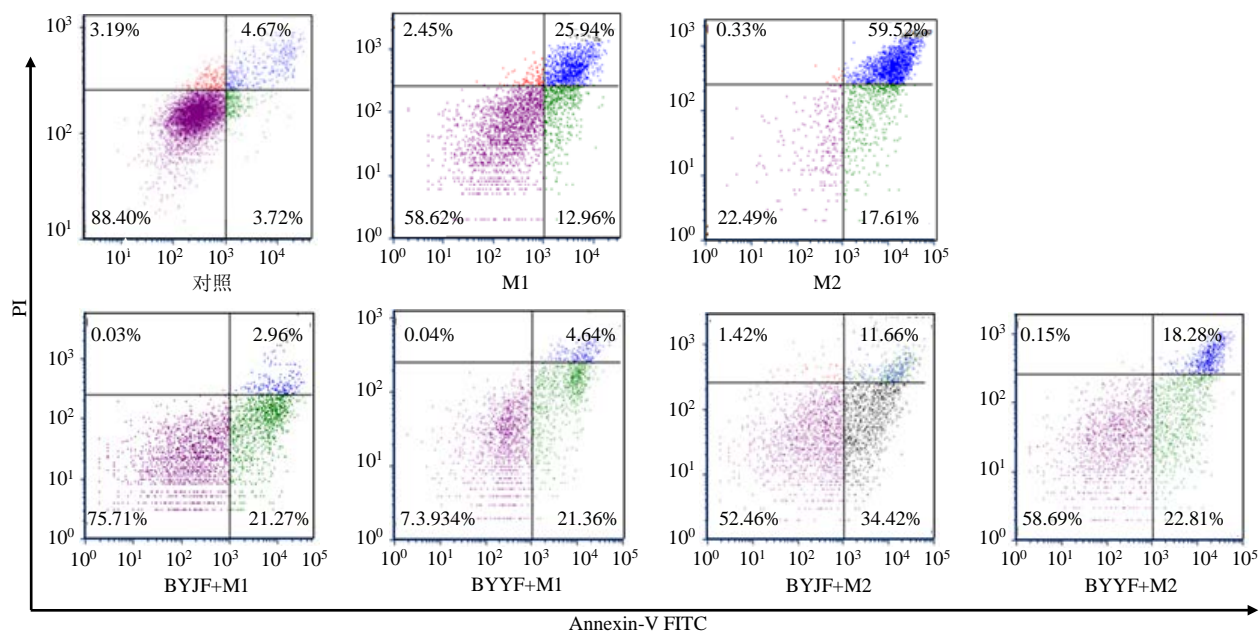
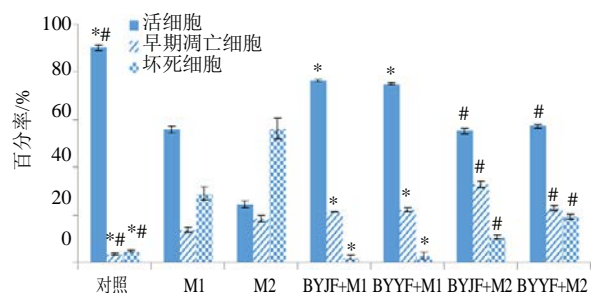
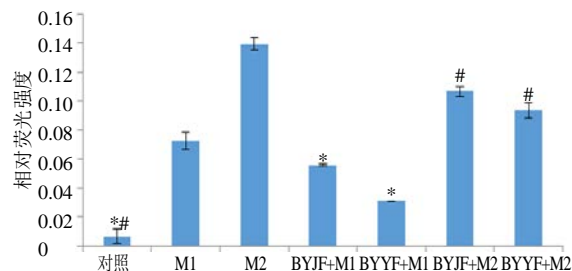
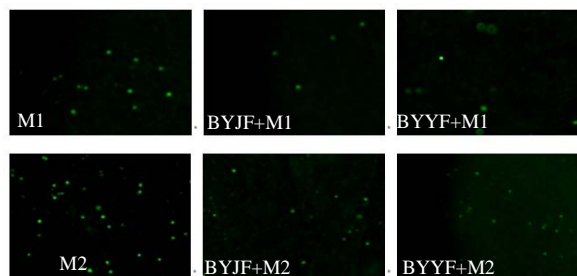
图 3 AnnexinV-PI 法检测 PC12 细胞的早期凋亡 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Fig. 3 Early apoptosis of PC12 cells detected by AnnexinV-PI method ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )与 M1 组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 M2 组比较: # $P < 0.05$ , 下同\* $P < 0.05$  vs M1; # $P < 0.05$  vs M2, same as below figures图 4 流式细胞术检测 PC12 细胞的早期凋亡 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Early apoptosis of PC12 cells detected by FCM

( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

裂, 故没有 3'末端形成, 无法将荧光衍生物标记到断 DNA 的 3'末端, 故对照组中几乎没有绿色荧光亮点, 而经不同浓度  $H_2O_2$  处理的 M1 和 M2 组 PC12 模型细胞中则出现不同程度和不同数量的荧光亮点, 表明在氧化应激状态下 PC12 细胞发生了不同程度的凋亡, 与对照组比有显著性差异; 且随着  $H_2O_2$  浓度的增加, 细胞凋亡程度加剧, 其中 M2 组 PC12 细胞呈现大范围的荧光亮点, 经 BYYF 和 BYJF 提取物处理后, 荧光数量和荧光亮度均有一定程度下降 ( $P < 0.05$ ), 表明补阳还五汤类方提取物能抑制  $H_2O_2$  处理后的细胞凋亡程度, 对发生氧化应激的 PC12 细胞发挥保护作用; 两方之间比较, BYYF 则较 BYJF 表现出一定程度的优势。

图 5 TUNEL 法检测 PC12 细胞凋亡 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Fig. 5 Apoptosis of PC12 cells detected by TUNEL method ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )



### 3.3 BYJF 和 BYYF 提取物对 PC12 细胞氧化应激不同程度损伤模型自噬的影响

正常 PC12 细胞存在一定水平的基础自噬, 经  $H_2O_2$  处理后, 细胞内自噬体数量明显增加, 且 M2 组比 M1 组存在更高水平的自噬, 在 M2 组细胞内, 可见大量的双层膜囊泡结构, 具有典型的自噬体特征, 放大后自噬体中的包裹物清晰可见, 提示  $H_2O_2$  处理能诱导细胞自噬体的形成。相较于 M1, BYJF 和 BYYF 处理组具有更高水平的自噬; 相较于 M2, BYJF 和 BYYF 处理组则表现为自噬程度降低。见图 6。

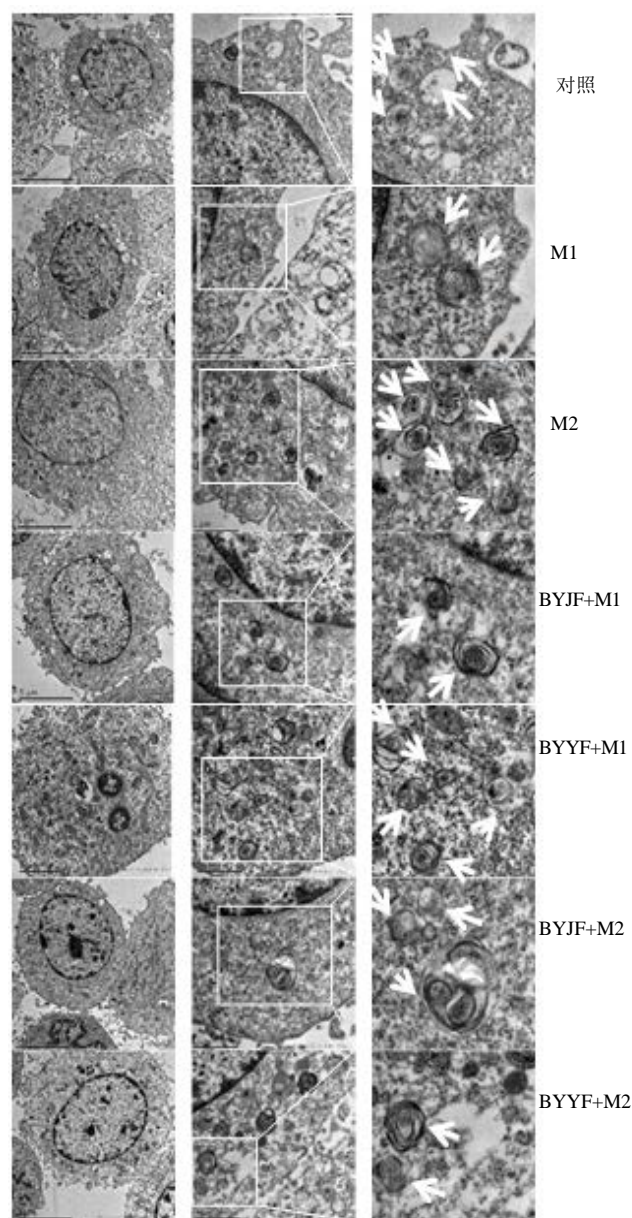


图 6 透射电镜观察 PC12 细胞内自噬体

Fig. 6 Autophagosomes in PC12 cells by transmission electron microscope

本研究进而采用 mRFP-GFP-LC3 腺病毒感染细胞, 实时监测自噬流。mRFP 和 GFP 可用于标记及追踪 LC3, GFP 是酸敏感型蛋白, 自噬小体与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 由于内部的酸性环境改变, GFP 荧光淬灭。因此, GFP 的减弱可指示自噬溶酶体形成的顺利程度, 即红 (mRFP) 绿 (GFP) 荧光合成后出现的黄色斑点越亮则自噬流越顺畅, 反之, 自噬流进程受阻。由图 7 可知, PC12 细胞经不同浓度  $H_2O_2$  处理后, 随着氧化应激程度的加剧, 模型组中有明显的自噬体斑点形成, 出现荧光点状聚集, 且 M2 组中的自噬程度高于 M1 组; 对照组中, GFP-LC3 呈现弥散分布, 荧光均匀, 与两个模型组相比, 均具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。给药 BYJF 和 BYYF 提取物后, 相较于 M1 组, BYJF 和 BYYF 处理组中具有更强的自噬流荧光聚集 ( $P < 0.05$ ), 表明自噬程度增加; 相较于 M2 组细胞内大量的自噬流, 药物处理组细胞中荧光聚集斑点显著减弱 ( $P < 0.05$ ), 表明自噬流程度降低。

上述结果提示, 在  $H_2O_2$  诱导的 PC12 细胞氧化应激损伤初期, BYJF 和 BYYF 提取物可能通过激活自噬清除受损细胞, 对 PC12 细胞发挥保护作用, 而在氧化应激损伤加剧期, 两方则通过抑制过渡自噬有效防止细胞发生大规模死亡, 且两方之间无统计学差异。

### 3.4 BYJF 和 BYYF 提取物对氧化应激 PC12 细胞中凋亡与自噬相关蛋白的影响

与对照组比较, M1 和 M2 组中细胞内的 Bax/Bcl-2 比例增加, Beclin1 和 LC3B/LC3A 表达上调 ( $P < 0.05$ ), 表明不同浓度  $H_2O_2$  处理 PC12 细胞后, 均将导致细胞发生凋亡和自噬, 引发氧化应激损伤; 采用补阳还五汤类方提取物处理后, 相较于氧化应激损伤初期的 M1 组细胞, BYJF 和 BYYF 均能降低凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 的比例, 一定程度上上调自噬正性因子 Beclin1 蛋白的表达, LC3B/LC3A 蛋白比值明显升高 ( $P < 0.05$ ), 提示两方均能通过一定程度抑制凋亡、激活自噬清除受损细胞, 从而发挥保护作用; 相较于氧化应激损伤加剧期的 M2 组细胞, BYJF 和 BYYF 均能较大幅度的下调 Bax/Bcl-2, 降低 Beclin1 和 LC3B/LC3A 的表达 ( $P < 0.05$ ), 提示两方均能通过抑制凋亡和减轻过渡的自噬对损伤严重的 PC12 细胞发挥保护作用, 其中 BYYF 对 PC12 细胞凋亡蛋白的调控程度略优于 BYJF ( $P < 0.05$ )。见图 8。

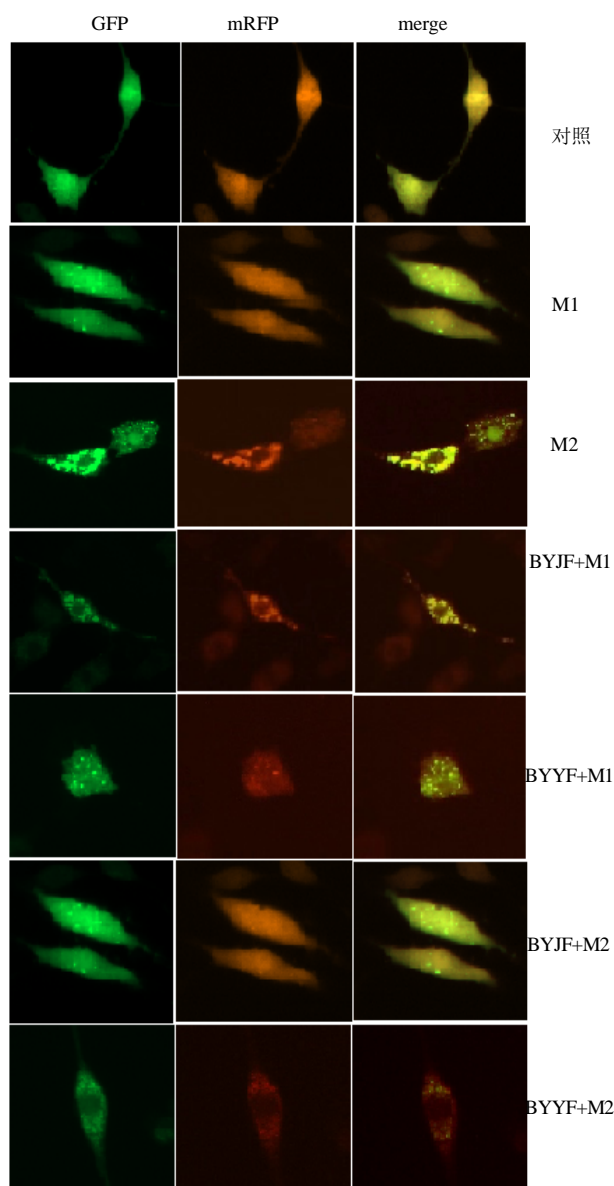


图 7 PC12 细胞的自噬流图 (400×) 以及统计学分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 7 Autophagic flux photos of PC12 cells (400×) and statistical analysis ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

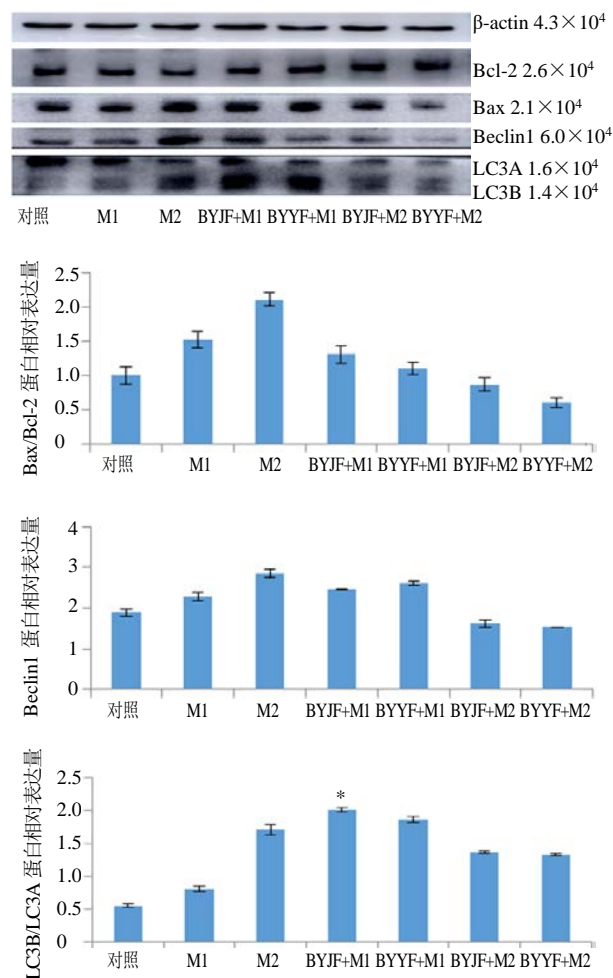


图 8 PC12 细胞中 Bax/Bcl-2、Beclin1 和 LC3B/LC3A 蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Expressions of Bax/Bcl-2, Beclin1, and LC3B/LC3A proteins in PC12 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

综上所述,本实验结果表明采用不同浓度  $H_2O_2$  处理将对 PC12 细胞造成不同程度的氧化应激损伤,且损伤程度具有浓度相关性;当细胞发生氧化应激损伤时,细胞凋亡和自噬程度均增加;在氧化应激损伤初期,补阳还五汤类方提取物均能一定程度抑制凋亡、激活自噬对 PC12 细胞发挥保护作用;当氧化应激损伤程度加剧时,模型细胞中出现高水平的凋亡与自噬,此时,两方则通过抑制凋亡和降低自噬,共同发挥保护作用。结果提示,补阳还五汤类方提取物可通过对凋亡与自噬的交互调控作用对不同程度损伤的氧化应激模型细胞挥发保护作用。

#### 4 讨论

普遍认为,凋亡对细胞死亡的调节是单向性的,而自噬对细胞死亡的调节具有双重性:温和适度的自噬能维持轴突的动态平衡并且有效清除死亡细

胞,是细胞的存活途径;严重或快速的自噬使细胞内容物过度降解,或加剧凋亡,导致细胞死亡。根据本实验的研究结果推测,补阳还五汤类方提取物可能通过抑制细胞凋亡和动态影响自噬水平对氧化应激损伤不同程度的 PC12 细胞发挥保护作用。在氧化应激损伤初期,凋亡与自噬均被一定程度激活,二者共同合作清除受损细胞,但由于自噬处于相对较低水平,机体清除受损细胞的速度较慢,不利于细胞存活,故此时补阳还五汤类方提取物通过一定程度激活自噬、对受损细胞进行及时清除以保护正常细胞,此时凋亡减轻、自噬增加;当细胞处于较严重的氧化应激损伤状态时,凋亡与自噬水平进一步增加,由于过高水平的自噬将导致正常细胞受损,药物可通过抑制过渡自噬、降低凋亡发挥保护作用。结果提示补阳还五汤类方提取物对氧化应激损伤模型细胞凋亡与自噬的调控并非一成不变的,而是根据细胞的受损程度进行动态调节的。

中医治疗脑缺血以辨证论治为治疗原则,采用中药复方,在辨证论治的整体思想指导下配伍组方,往往可以通过多层次、多途径、多靶点综合作用于多个病理环节,从整体上有效防止神经元凋亡,保护脑缺血损伤,这是中医药优势所在。秉承对传统中医药的继承和创新精神,结合方剂学“整体取性原理”和“君药不可缺少”的理论,选取补阳还五汤原方中的黄芪入药,不仅大补元气,且能行气,利营卫之气,通营卫之阻滞以活血;秉承“瘀血不去,新血不生”和“血行风自灭”的观念,辅以川芎行气活血,气行则血行,血行则瘀去脉通也,使气血和顺;地龙长于行散走窜,通经活络,为佐药。三药合用即为补阳还五汤精简方,意即通过“祛瘀”“化旧”或“去腐”等方法来祛除体内沉积的瘀血及其他陈旧性的病理产物,这与现代医学所描述的自噬过程不谋而合,自噬的发生与中医的气虚血瘀关系密切,中医补气、宣畅气化可以增强细胞对胞体内积聚过多的蛋白、亚细胞器等“自我消化”的“精化气”功能。然而过度的补气宣畅将导致“方不对症”,使机体内正常细胞器被清除,从而导致阴阳失调,如张锡纯<sup>[13]</sup>在《医学衷中参西录》记载“若其脉象实而有力,其人脑中多伴充血,而复用黄芪之温而升补者,以助其血愈上行,必至凶危立见。”因此,补阳还五汤精方对于黄芪的用量极为考究,且采用现代中药制备工艺保证中药有效成分最大限度溶出,力求更好发挥中药复方的整体功效。从实验

结果来看,补阳还五汤原方与精方提取物对体外氧化应激细胞模型的保护作用均呈现一定程度的浓度相关性,但两方的有效浓度范围不同,且两方对凋亡相关蛋白的影响程度亦存在一定差异,如原方提取物对凋亡的抑制程度略大,推测两方提取物在化学成分上可能存在较大的相似性及一定的差异性,而这些差异性成分可能与凋亡蛋白的调控具有一定的相关性,提示后续可通过网络药理学对二者的化学成分及对应的调控位点进行相关研究。

此外,由于离体细胞实验和体内动物实验存在一定的差异,本课题组拟在脑缺血动物模型中对补阳还五汤类方的作用机制展开进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 刘芳,杨岩涛,贺福元,等.补阳还五汤类方成分的药代动力学比较研究[J].中国中医药信息杂志,2016,23(7):82-86.
- [2] 刘芳,王宇红,蔡光先,等.补阳还五汤及其精简方(脑健片)对脑缺血大鼠海马组织 CDK4/CyclinD1 表达的影响[J].中国中药杂志,2015,40(20):4058-4062.
- [3] 刘芳,王宇红,邵乐,等.补阳还五汤精简方对大鼠中动脉阻塞模型大鼠海马组织 Cdk5 的调控[J].中国药理学通报,2017,33(8):1176-1181.
- [4] 刘芳,陈乃宏,胡耀梅,等.补阳还五汤类方对氧化应激 PC12 模型细胞 Cdk5 及凋亡因子的影响[J].中国药理学通报,2019,35(12):1758.
- [5] Su L Y, Li H, Lv L, *et al.* Melatonin attenuates MPTP-induced neurotoxicity via preventing CDK5-mediated autophagy and SNCA/a-synuclein aggregation[J]. *Autophagy*, 2015, 11(10): 1745-1759.
- [6] Zheng W, Yang S, Gao G Y, *et al.* CDK5-mediated phosphorylation and autophagy of RKIP regulate neuronal death in Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(12): 2870-2880.
- [7] Zhang Y, Zhang Y, Jin XF, *et al.* The role of astragaloside IV against cerebral ischemia/reperfusion injury: Suppression of apoptosis via promotion of P62-LC3-autophagy[J]. *Molecules*, 2019, 24(9): 1838-1854.
- [8] Su M, Mei Y, Sinha S. Role of the crosstalk between autophagy and apoptosis in cancer[J]. *J Oncol*, 2013, 2013: 1-14.
- [9] Gao L, Jiang T, Guo J, *et al.* Inhibition of autophagy contributes to ischemic postconditioning-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia in rats[J].



- PLoS One*, 2012, 7(9): e46092.
- [10] Jeong J H, Yu K S, Bak D H, *et al.* Intermittent fasting is neuroprotective in focal cerebral ischemia by minimizing autophagic flux disturbance and inhibiting apoptosis [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(5): 3021-3028.
- [11] Buckley K M, Hess D L, Sazonova I Y, *et al.* Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAL, and embolic MCAO, murine models of stroke [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2014, 21(6): 8-16.
- [12] Zhang Q, Bian H, Guo L, *et al.* Pharmacologic preconditioning with berberine attenuating ischemia-induced apoptosis and promoting autophagy in neuron [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(2): 1197-1207.
- [13] 张锡纯. 医学衷中参西录 [M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2009.