

• 实验研究 •

N-硬脂酰酪氨酸对缺氧缺糖诱导神经元凋亡的影响

阳志晖, 杨 锐, 陆 阳*

(上海交通大学医学院 药理学系, 上海 200025)

摘要: **目的** 探讨 N-硬脂酰酪氨酸 (NsTyr) 对缺氧缺糖 (OGD) 诱导皮层神经元损伤的影响及作用机制。 **方法** 采用 MTT 及 Hoechst 33342 染色检测 NsTyr 对 OGD 诱导神经元活力及凋亡的影响; 通过免疫印迹探讨 NsTyr 抗 OGD 诱导神经元凋亡的分子机制, 并使用丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路的特异性阻断剂 SB203580、SP600125 和 U0126 考察其抗凋亡的信号转导通路。 **结果** NsTyr 对 OGD 造成的皮层神经元损伤有剂量相关的保护作用, 促进细胞存活, 减少细胞凋亡; NsTyr 通过上调 Bcl-2 表达、下调 Bax 表达、保持 Bcl-2/Bax 的平衡, 实现抗 OGD 损伤的作用, 该作用通过 ERK 和 P38 信号通路介导。 **结论** NsTyr 可通过 ERK 和 P38 信号通路调节凋亡基因的表达, 抑制 OGD 引起的神经元凋亡。

关键词: 硬脂酰酪氨酸; 细胞凋亡; 缺氧缺糖; 丝裂原活化蛋白激酶; 信号通路

中图分类号: R977.4; R971 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5515(2010)05-0000-06

Neuroprotective effects of NsTyr against OGD-induced apoptosis on cortical neurons

YANG Zhi-hui, YANG Rui, LU Yang

(Pharmacy Department, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of N-stearoyltyrosine (NsTyr) against OGD-induced apoptosis on primary cultured cortical neurons. **Methods** Cell death was evaluated with MTT assay, and the neuron apoptosis was analyzed through Hoechst staining. The mechanism and the signal pathways involved were studied by western blot analysis and the treatment of specific MAPK inhibitors. **Results** NsTyr alleviated dose-dependently the OGD-induced toxicity to cortical neurons. The protection of NsTyr was through reversing the up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2. Moreover, the effect was blocked by SB203580 and U0126, while no obvious influence on the regulation of Bcl-2 by SP600125 was observed. **Conclusion** NsTyr possesses protective effects on cortical neurons by regulating the balance between Bax and Bcl-2 through ERK and P38 signaling pathways.

Key words: NsTyr; apoptosis; OGD; MAPK; signal pathways

缺血性脑血管疾病是危害人类健康的主要病种之一, 具有发病率高、致残率高和病死率高的特点, 严重影响人类的健康和生命。脑缺血-再灌注损伤是大多数缺血性脑血管疾病的主要病理生理过程^[1-3]。脑缺血-再灌注损伤后产生大量活性氧 (ROS), ROS 不仅引起脂质、蛋白质和核酸的过氧化, 造成细胞

损伤, 还影响凋亡蛋白和抗凋亡蛋白 (Bax/Bcl-2) 比值, 促进神经细胞凋亡^[4], 加速疾病进程。

N-硬脂酰酪氨酸 (NsTyr) 为长链脂肪酰氨基酸, 属于内源性大麻素 (AEA) 类似物。前期研究已经证明该类化合物具有良好的神经保护作用: NsTyr 可以通过丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径保护

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (30672441, 30873057); 上海市科委基础重点课题 (08JC1413600); 十一五“重大新药创制”科技重大专项“综合性新药研究开发技术大平台” (2009ZX09301-007)

作者简介 阳志晖, 女, 博士, 研究方向为神经药理学。E-mail: xhxh99_sunny@hotmail.com

* **通讯作者** 陆 阳, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为药理学。Tel: 021-63846590-776464, E-mail: luyangssmu@yahoo.com

淀粉样蛋白 A β 25-35 诱导的神经元凋亡；大鼠脑片研究表明其具有抗氧化和抗谷氨酸损伤作用；而且对大鼠大脑中动脉缺血再灌（MACO）模型、沙土鼠短暂前脑缺血模型及慢性脑缺血模型均有神经保护活性，结果显示 NsTyr 可减少缺血后海马 CA1 区神经元凋亡细胞，预防慢性脑缺血引起的长时程电位抑制，改善缺血性脑损伤引起的学习记忆障碍^[5-8]。为了对 NsTyr 的神经保护作用进行更深入的研究，本实验采用神经元缺氧缺糖（OGD）损伤模拟临床上缺血症状，探索其神经保护作用、分子机制及信号通路。

1 材料

1.1 动物

健康清洁级 SD 孕鼠，孕期 16~18 d，由上海交通大学医学院实验动物中心提供，合格证号：SCXK 沪 2002-0010。

1.2 药物与试剂

受试药物 NsTyr 为白色粉末，由上海交通大学医学院药理学系制备^[3]，HPLC 分析质量分数为 98%，使用前用 DMSO 溶解。胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）批号 090526，杭州四季青公司产品；DMEM 培养液批号 11965，NeuroBasal 神经元条件培养液批号 21103，B27 营养液批号 17504-044，Trypsin 批号 25200056，均为美国 GIBCO 公司产品；Hoechst 33342 批号 B2261，DNase I 批号 D5025，多聚赖氨酸批号 P2636，SB203580 批号 S8307，SP600125 批号 S5567，U0126 批号 U120，均为美国 SIGMA 公司产品；anti-Bcl-2 批号 2867，anti-Bax 批号 2772，anti- β -actin 批号 4967，均为 Cell Signaling 公司产品。

1.3 仪器

3111 恒温细胞培养箱，美国 Thermo 公司产品；超净工作台，美国 NUAIRE 公司产品；IX70 荧光倒置显微镜，日本 OLYMPUS 公司产品；FACSCalibur 流式细胞仪，Becton Dickinson 公司产品；5804R 高速离心机，美国 Effendorf 公司产品；酶标仪，美国 SunRISE TECAN 公司产品。

2 方法

2.1 大脑皮层神经元原代培养及鉴定

孕鼠乙醚麻醉后，消毒，剖腹取出 16~18 日龄胎鼠，冰面上断头，置于 D-Hank's 液中，分离出

大脑皮层，剥除脑膜和血管，剪碎成糜状，收集足够的皮层组织，用滴管移到 15 mL 离心管中，静置，沉淀，去除解剖液，按皮层量加入适量消化液（0.25% 胰酶 1 mL，Dnase I 200 μ L，用 DMEM 稀释至 5 mL），37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。用口径由粗至细的滴管轻轻吹打，至细胞分散均匀。加入少量胎牛血清中止消化，1 000 $\times g$ 离心 3 min，弃上清液。细胞沉淀中加入含 10% FBS 的 DMEM，吹打均匀。用血细胞计数板计数细胞后，调整细胞密度，接种于预先包被有多聚赖氨酸的培养板。于 5% CO₂ 培养箱内 37 $^{\circ}$ C 下培养。细胞接种 24 h 贴壁后，改用 NeuroBasal 培养液 + B27 营养液培养，第 3 天或第 4 天，加入阿糖胞苷以抑制胶质细胞增殖，24 h 全换液，其后每 2 天半换液。培养第 7 天，取生长有皮层神经元的盖玻片，用 D-Hank's 液洗 2 遍，用 4% 多聚甲醛固定 5 min，空气干燥，浸洗 3 min，共 3 次，用免疫封闭液（Beyotime 公司）处理后滴加神经元特异性 β -tubulin III 抗体工作液（1:670），置于湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜，用免疫染色洗涤液（Beyotime 公司）浸洗 3 min，共 3 次，加入 FITC 标记的第二抗体（1:200）避光孵育 1 h 后以免疫染色洗涤液浸洗 3 min，共 3 次，用 Hoechst 33342 甘油溶液（5 μ g/mL）封片，荧光显微镜观察。

2.2 OGD 模型及药物处理

采用培养 8 d 的皮层神经元进行实验，培养板从 CO₂ 培养箱中取出后用 N₂ 预饱和的无糖 DMEM 培养基替换正常培养基，将培养板置入自制密封的玻璃缺氧箱内，通入混合气体（95% N₂ + 5% CO₂），37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。缺氧损伤的神经元再换回正常培养基，于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱进行恢复培养，模拟缺血-再灌损伤建立体外模型。在缺氧前 30 min 加入不同浓度的 NsTyr 及 MAPK 特异性通路阻滞剂，并作用于整个缺氧-恢复过程中。

2.3 细胞活力及损伤程度检测

细胞按 2×10^4 的密度接种于 96 孔培养板中生长 7 d 后，体外 OGD 损伤 1 h 后进行恢复培养，期间依据实验需要加入药物处理。作用结束时，加入 10 μ L MTT（用 0.01 mol/L 的 PBS 溶解至 10 mg/mL，4 $^{\circ}$ C 保存 2 周或 -20 $^{\circ}$ C 长期保存），37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后弃去上清，加 DMSO 100 μ L，微量振荡仪振荡至结晶完全溶解，用酶标仪读取 490 nm 吸光度值。同时设置调零孔（培养基、MTT、DMSO），对照孔（细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、

MTT、DMSO), 每组设定 6~10 复孔, 独立实验重复 3 次。处理组与未处理对照组的吸光度平均值的比值代表相对细胞活力改变。

2.4 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡及形态学观察

损伤后, 倒置显微镜观察细胞形态。采用 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡。PBS 溶解的 Hoechst 33342 终质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, pH 7.0, 滤过, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。细胞涂片用 0.1% 多聚甲醛固定 30 min, 用 PBS 洗 5 min, 将制备好的玻片浸泡在装有 Hoechst 33342 染液的染色缸中, 避光作用 20 min, 用 PBS 洗涤 2~3 次, 封片。荧光显微镜(激发光 340 nm)下, 每份样本随机取 5 个视野, 每个视野约 60 个细胞, 正常细胞呈弥散均匀荧光, 凋亡细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光, 或细胞核呈分叶、碎片状, 边集, 结果以凋亡细胞占总细胞的百分数表示。

2.5 NsTyr 抗 OGD 诱导神经元凋亡的机制及信号通路

将神经元接种于六孔板, 每孔 2×10^6 , 培养至第 8 天, 分 6 组(空白对照组、模型组、NsTyr 组、NsTyr + SB203580 组、NsTyr + SP600125 组、NsTyr +

U0126 组)。收集各组全细胞裂解液, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作, 酶标仪蛋白定量。蛋白样品各取 40 μg , 10% SDS-PAGE 电泳后, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭。加一抗(兔抗鼠 Bcl-2、Bax 抗体分别用 TBST 按 1:1 000 稀释), 膜置于一抗中 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 洗膜。加入相应的辣根过氧化物酶标记的 IgG(用 TBST 按 1:10 000 稀释), 室温放置 1 h, 37 $^{\circ}\text{C}$ 洗膜。化学发光剂 ECL 显影, 扫描仪扫描。

2.6 统计方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析采用 SPSS 15.0 软件作单因素数方差分析(ANOVA), 组间采用 SNK 检验。

3 结果

3.1 原代皮层神经元的鉴定

光镜下观察, 原代培养细胞在 4 h 贴壁, 16 h 后有突起, 呈单个分散状态, 胞浆透亮, 胞体逐渐增大, 至接种第 7 天光晕明显, 突起增多, 边缘清晰发亮, 有明显连接和网络形成。免疫荧光实验证实细胞中神经元 >95% (图 1)。

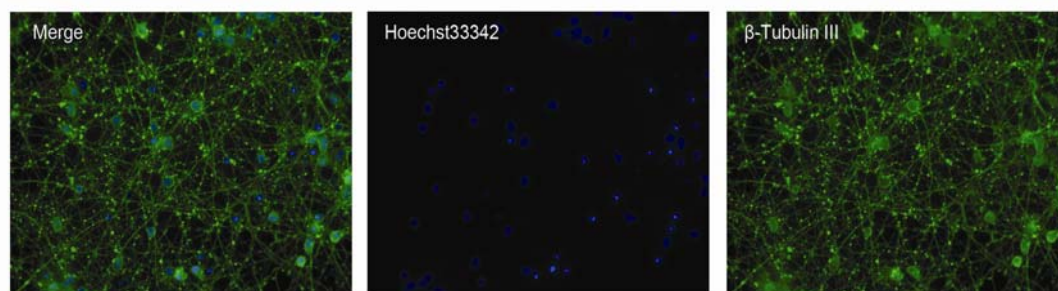


图 1 原代培养神经元的鉴定

3.2 NsTyr 预处理可对抗神经元 OGD 损伤

通过 MTT 法检测细胞活力及细胞损伤程度, 评价 NsTyr 对神经元 OGD 损伤的保护作用, 绘制剂量曲线。OGD 刺激前 30 min 加入不同浓度(0.01~10 $\mu\text{mol/L}$)的 NsTyr, 恢复培养时维持 NsTyr 的作用, 24 h 后进行检测。0.1~1 $\mu\text{mol/L}$ 的 NsTyr 可对抗 OGD 引起的细胞损伤, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 NsTyr 保护作用最强(图 2)。以后的实验采用 0.5 $\mu\text{mol/L}$ NsTyr 进行分子机制研究。

由图 2 可知, NsTyr 剂量相关地减少 OGD 诱导的细胞损伤。不同浓度 NsTyr 在缺氧处理前 30 min 加入, MTT 检测在恢复培养 24 h 进行。3 次独

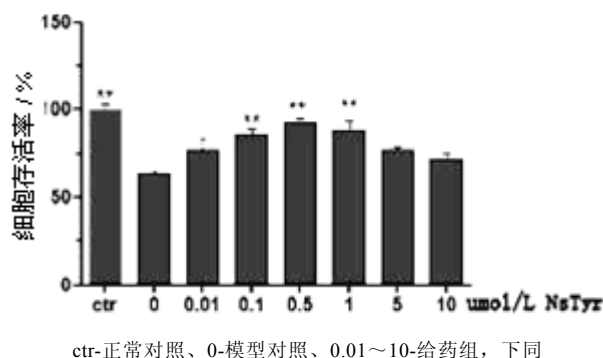


图 2 NsTyr 可对抗神经元 OGD 损伤的效果

立实验统计数据显示, 与模型对照缺氧缺糖 1 h 并

恢复 24 h, 即 OGD1 h + R24 h 组比较, 有显著差异 ($P<0.01$)。

3.3 NsTyr 可改善 OGD 引起的细胞形态学变化并抑制 OGD 引起的神经元凋亡

模型对照组神经元胞体胀大, 细胞膜破裂, 神经突触基本断裂 (图 3-A), 凋亡率由 4% 上升到 20.5% (与正常对照组相比 $P<0.05$), 呈现神经元坏死状态。Hoechst 33342 染色显示各组中的凋亡细胞, C-NsTyr 对早期凋亡细胞的影响, 结果可在 OGD 损伤后看到凋亡小体及凋亡碎片 (图 3-B), 呈现程序性死亡特征。

将 3 次独立实验统计数据进行比较, 结果见图 4。给予 NsTyr 后, 可抑制神经突触断裂, 保持神经元形态完整, 并抑制神经元凋亡, 凋亡率下降到 13.25%。

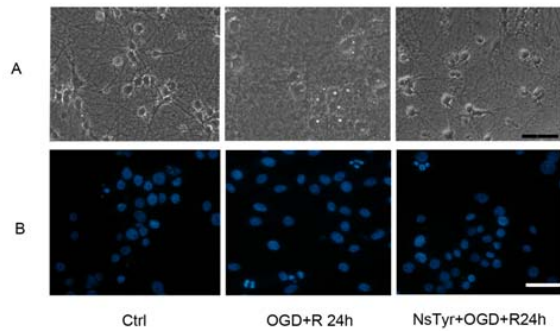
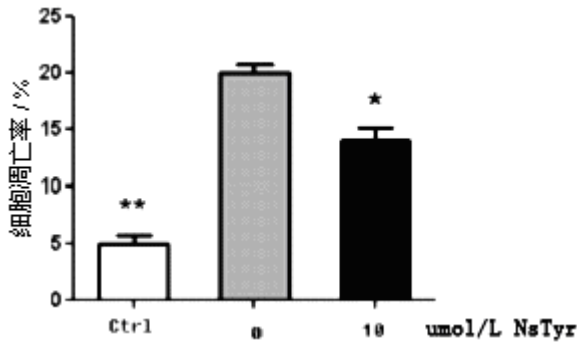


图 3 NsTyr 抑制 OGD 诱导的神经元凋亡



与模型对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

图 4 对抗神经元 OGD 损伤的 3 次独立实验的统计数据比较

3.4 NsTyr 通过 MAPK 途径影响 Bcl-2/Bax 的表达

与正常组比较, OGD 损伤组凋亡蛋白 Bax 表达明显增加, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显减少 (图 5)。在缺氧处理前 30 min 加入 NsTyr, 则可逆转 Bax 的上调和 Bcl-2 的下调。在给予 NsTyr 处理前

30 min 加入特异性 MAPK 阻滞剂, 发现 SB203580 和 U0126 可阻断 NsTyr 对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响, 而 SP600125 仅阻断 NsTyr 对 Bax 表达的影响。将 3 次独立实验统计数据进行比较, 有显著差异: (图 6)。这提示 NsTyr 可能主要是通过 ERK 及 p38 途径调控细胞凋亡蛋白的表达, 进而减轻 OGD 诱导的神经元凋亡。

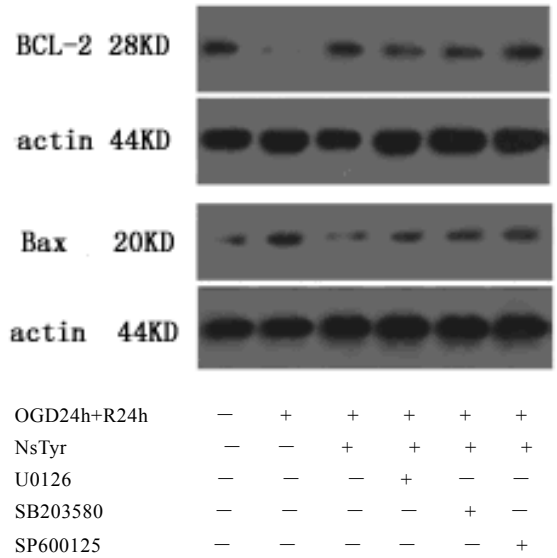
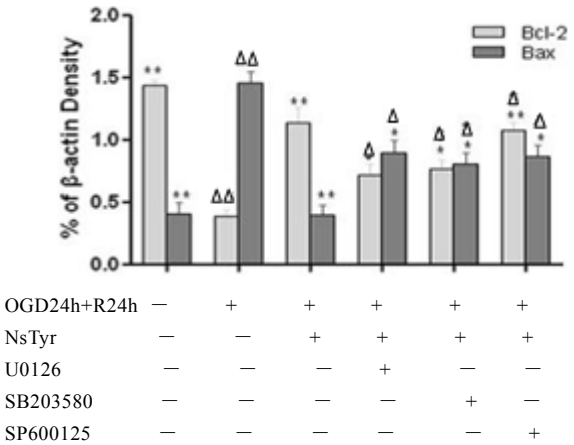


图 5 NsTyr 通过 MAPK 途径调节凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达



与模型对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$;

与给药组比较: $^{\$}P<0.05$ $^{ss}P<0.01$

图 6 影响 Bcl-2/Bax 的表达的 3 次独立实验的统计数据比较

4 讨论

缺血性脑血管疾病发病率高, 致残率高, 缺血后神经功能的修复和重建是治疗的难题^[9-10]。硬脂酰酪氨酸是 AEA 类似物, AEA 不但可以参与多种急性神经损伤的保护, 而且对多种神经退行性疾病

也有保护作用。在前期研究中发现, NsTyr 同样具有良好的神经保护作用, 采用沙土鼠短暂前脑缺血模型及慢性脑缺血模型, 发现 NsTyr 可以改善缺血性脑损伤引起的学习记忆障碍, 减少缺血后海马 CA1 区神经元凋亡细胞, 预防慢性脑缺血引起的长时程电位抑制。

本实验采用神经元 OGD 损伤 1 h 并进行恢复培养 24 h 模拟体内缺血再灌注损伤过程。实验发现损伤组细胞活力下降 45%, 镜下形态学观察可见细胞形态破坏, 胞体肿胀, 突触断裂, 细胞核出现凋亡小体, 神经元呈现坏死及凋亡两种状态。给予 NsTyr 后可以减轻由于 OGD 引起的神经元坏死及凋亡损伤状态。在对其机制的研究中, 发现 NsTyr 可以抑制 OGD 诱导的 Bcl-2 下调和 Bax 上调, 保持 Bcl-2/Bax 的平衡。Bcl-2 是抗凋亡蛋白, Bax 是促凋亡蛋白, 当 Bcl-2 以同源二聚体存在时, 发挥抑制细胞凋亡的功能, 而当 Bcl-2 与 Bax 形成异源二聚体时, 会导致细胞色素 C 向细胞中聚集, 活化 caspase-3, 激活凋亡级联反应, 从而促进细胞凋亡的发生^[11-13]。所以, NsTyr 可能通过维持 Bcl-2/Bax 的平衡抑制细胞色素 C 向细胞中聚集, 从而抑制 caspase-3 激活, 阻断凋亡级联反应, 减少 OGD 诱导的细胞凋亡。

MAPK 级联信号传导通路在信号传递过程中占据重要地位, 参与细胞生长、发育、分化和凋亡等一系列生理病理过程。MAPK 级联信号通路主要包括 3 条经典途径: 细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated protein kinase, ERK) 通路、c-jun 氨基末端激酶 (c-jun N-terminal kinase, JNK) 通路和 p38 MAPK 通路^[14-15]。SB203580 和 U0126 均可部分阻断 NsTyr 对 Bcl-2 表达的影响, 而 SP600125 对 NsTyr 的作用无影响, 提示 NsTyr 可能主要是通过 ERK 及 p38 途径调控抗凋亡蛋白的表达。而 SB203580、U0126 和 SP600125 均可阻断 NsTyr 对 Bax 表达的影响, 提示 NsTyr 是通过激活 3 条途径产生协同作用共同抑制细胞凋亡的。

NsTyr 还具有良好的抗氧化活性。NsTyr 通过增加抗氧化物谷胱甘肽和抗氧化酶 CAT 活性, 增强细胞的抗氧化能力, 进而减少海马 CA1 区的神经元的凋亡^[6]。笔者观察到 NsTyr 可以减少 OGD 诱导的自由基产生。ROS 是外源性氧化剂或细胞内有氧代谢过程中产生的具有很高生物活性的超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟自由基 ($HO\cdot$)、一

氧化氮 (NO) 等含氧化合物的总称^[16]。ROS 过量产生后以线粒体为靶点导致脑缺血损伤, ROS 可通过下调 Bcl-2/Bax, 攻击线粒体使细胞色素 C 从线粒体释放到胞浆中, 激活 caspase 基因, 诱导细胞凋亡^[17]。而 NsTyr 可通过减少 ROS 的产生调节 Bcl-2/Bax 的平衡, 抑制 OGD 诱导的细胞凋亡, 这一作用主要通过 ERK 和 p38 信号通路介导。

本实验在前期工作的基础上通过离体细胞模型进一步验证了 NsTyr 抗缺血缺糖损伤的活性, 探讨了其作用的分子机制和信号通路, 为该类化合物的深入研究奠定了更坚实的基础。

参考文献

- [1] 赵明. 脑缺血再灌注损伤机理及药物保护的研究进展[J]. 锦州医学院学报, 2002, (5): 72-73.
- [2] Yang P, Jia Y H, Li J, *et al.* Anti-oxidation of tanshinone II_A and prohibitin on cardiomyocytes [J]. Chin Herb Med, 2010, 2 (3): 204-210.
- [3] 王维亭, 徐向伟, 何小云, 等. 内皮损伤引起血小板沉积测定方法的建立与应用[J]. 药物评价研究, 2009, 32 (2): 101-103.
- [4] Val'erie L, Philippe B, Arnaud B, *et al.* Free radical production and changes in superoxide dismutases associated with hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of embryonic rat forebrain neurons in culture [J]. Free Radic Biol Med, 2000, 29 (12): 1291-1301.
- [5] Yao L Y, Lin Q, Niu Y Y, *et al.* Synthesis of lipoamino acids and their activity against cerebral ischemic injury [J]. Molecules, 2009, 14 (10): 4051-4064.
- [6] Zhang Y B, Kan M Y, Yang Z H, *et al.* Neuroprotective effects of N-stearoyltyrosine on transient global cerebral ischemia in gerbils [J]. Brain Res, 2009, 1287: 146-156.
- [7] Lin Q, Hai J, Yao L Y, *et al.* Neuroprotective effects of NSTyr on cognitive function and neuronal plasticity in rats of chronic cerebral hypoperfusion [J]. Brain Res, 2010, 1325: 183-190.
- [8] Yang Z H, Sun K, Suo S H, *et al.* N-stearoyltyrosine protects primary neurons from A β (25-35) toxicity through attenuating MAPK activity [J]. Neuroscience, 2010, 169 (4): 1840-1847.
- [9] 吴兰鸥, 詹合琴, 闫俊岭, 等. 三七皂苷 Rg₁ 对大鼠脑缺血-再灌注损伤的保护作用及机制探讨[J]. 中草药, 2006, 37 (2): 229-233.
- [10] 张丽君, 吕文伟, 王志, 等. 人参花蕾皂苷对脑缺血-再灌注大鼠的抗氧化作用及其机制[J]. 中草药, 2005, 36 (11): 1693-1694.

(下接第 389 页)