

田蓯苁抗脑缺血再灌注程序性坏死的作用及机制研究

李海宁¹, 郑瑞芳², 都研文², 王 文³, 孙芳玲³, 刘砥威², 邢建国^{2*}

1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832000

2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002

3. 首都医科大学宣武医院, 北京 100053

摘要: 目的 研究田蓯苁抗脑缺血再灌注损伤程序性坏死的作用及机制。方法 人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 用 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 预处理 16 h 后缺氧培养 6 h、复氧培养 2 h 建立脑缺血再灌注程序性坏死模型, 在缺氧前 6 h 给予田蓯苁进行干预。采用 Hoechst33342/PI 染色检测坏死细胞数目; 采用 CCK-8 法检测细胞活力; 采用 ELISA 法检测细胞上清中乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平及细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平和线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 的变化; 采用荧光显微镜检测细胞线粒体膜电位变化; 采用 Western blotting 法检测细胞程序性坏死通路相关蛋白如受体相互作用蛋白 3 (receptor interacting protein kinase 3, RIPK3)、混合系结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)、钙/钙调蛋白依赖性激酶 II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII)、磷酸甘油酸变位酶 5 (phosphoglycerate mutase family 5, PGAM5) 表达情况。结果 与模型组比较, 田蓯苁组细胞存活率显著提高 ($P < 0.05$); 细胞上清中 LDH 活性和 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均显著降低 ($P < 0.05$); 细胞内 ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$); 细胞线粒体膜电位显著升高 ($P < 0.05$), mPTP 开放被显著抑制 ($P < 0.05$); 细胞 RIPK3、MLKL、CaMKII 和 PGAM5 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。结论 田蓯苁可能通过抑制程序性坏死途径, 保护线粒体, 从而发挥抑制脑缺血再灌注损伤的作用。

关键词: 田蓯苁; 人神经母细胞瘤细胞; 程序性坏死; 线粒体; 受体相互作用蛋白 3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)07-1974-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.07.014

Effect and mechanism of tilianin against necroptosis on cerebral ischemia-reperfusion

LI Hai-ning¹, ZHENG Rui-fang², DU Yan-wen², WANG Wen³, SUN Fang-ling³, LIU Di-wei², XING Jian-guo²

1. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830002, China

3. Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of tilianin against programmed necrosis of cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods** Human neuroblastoma cells SH-SY5Y were pretreated with Caspase inhibitor Z-VAD-FMK for 16 h, then cultured under hypoxia for 6 h and reoxygenated for 2 h to establish a model of programmed cerebral ischemia-reperfusion necrosis. Tilianin was given for intervention 6 h before hypoxia. Hoechst33342/PI staining was used to detect the number of necrotic cells; CCK-8 method was used to detect cell viability; ELISA method was used to detect lactate dehydrogenase (LDH) activity and interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in supernatant, intracellular reactive oxygen species (ROS) level and mitochondrial permeability transition pore (mPTP) changes in SH-SY5Y cells; Fluorescence microscopy was used to detect changes in cell mitochondrial membrane potential; Western blotting was used to detect expressions of receptor interacting protein

收稿日期: 2020-10-26

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (青年基金) 资助项目 (2020D01B50); 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目 (KY2020086); 2019 年新疆维吾尔自治区高层次人才引进工程 (柔性引进人才) 项目

作者简介: 李海宁 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药物制备及质量控制。Tel: 15726069394 E-mail: lhnmiku@163.com

*通信作者: 邢建国 (1968—), 男, 研究员, 从事中药民族药新制剂与新剂型研究。Tel: 13999178585 E-mail: xjguodd@163.com

kinase 3 (RIPK3), mixed-line domain-like proteins (MLKL), calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and phosphoglycerate mutase family 5 (PGAM5). **Results** Compared with model group, cell viability of tilianin group was significantly increased ($P < 0.05$); LDH activity and levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α in supernatant were significantly decreased ($P < 0.05$); ROS level were significantly reduced ($P < 0.05$); Cell mitochondrial membrane potential was significantly increased ($P < 0.05$); Mitochondrial membrane permeability transition pore (mPTP) opening was significantly inhibited ($P < 0.05$); Expressions of RIPK3, MLKL, CaMKII and PGAM5 were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Tilianin may protect mitochondria by inhibiting programmed necrosis pathway, thereby inhibiting cerebral ischemia-reperfusion injury.

Key words: tilianin; SH-SY5Y cells; necroptosis; mitochondria; receptor interacting protein kinase 3

脑缺血再灌注会导致严重的炎症和氧化应激,从而加剧缺血损伤^[1]。细胞死亡为脑缺血再灌注损伤发生的主要事件之一。以往研究多集中于细胞凋亡,而细胞程序性坏死是一种不同于细胞凋亡的细胞死亡方式,具有坏死样结构特点,受细胞内一系列信号分子调控^[2-4]。抑制程序性坏死通路后,大部分缺血再灌注诱导的细胞死亡受到抑制^[5]。因此,脑缺血再灌注损伤后程序性坏死相关通路的激活是治疗脑缺血再灌注损伤的潜在靶点^[6]。当程序性坏死发生时,受体相互作用蛋白 3(receptor interacting protein kinase 3, RIPK3)作为程序性坏死关键调控蛋白,使混合系结构域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)被磷酸化和寡聚化,进而导致线粒体损伤和细胞膜破裂^[7-8]。钙/钙调蛋白依赖性激酶 II(calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII)是 RIPK3 的底物, CaMKII 被 RIPK3 磷酸化后,线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)大量开放,线粒体受损,加剧炎症反应^[9]。

田蓯苁是新疆民族药香青兰中的主要活性成分^[10],课题组前期研究发现,田蓯苁可以促进脑血管新生,对脑缺血再灌注损伤大鼠模型脑组织具有一定保护作用,可以通过调控活性氧(reactive oxygen species, ROS)/CaMKII 通路,抑制线粒体损伤,并抑制人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 死亡^[11-12]。本研究首先从调控 RIPK3 通路抑制程序性坏死角度来探讨田蓯苁抗脑缺血再灌注损伤的作用及机制,为其治疗脑缺血再灌注损伤提供依据。

1 材料

1.1 细胞

SH-SY5Y 细胞由中国医学科学院生物研究所惠赠。

1.2 药品与试剂

田蓯苁(批号 20170805,质量分数 $\geq 98\%$)由新疆维吾尔自治区药物研究所自制;胎牛血清(批号 10099-141C)、无糖培养基(批号 119660225)购自美

国 Gibco 公司;0.25%胰酶(批号 SH3004201)、DMEM 高糖培养基(批号 SH30022.01)购自美国 Hyclone 公司;厌氧袋(批号 C-1)购自日本三菱公司;Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK(批号 s702304)购自美国 Selleckchem 公司;CCK-8 试剂盒(批号 AR1160-500)、磷酸酶抑制剂(批号 AR1183)购自武汉博士德生物工程有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)细胞毒性检测试剂盒(批号 C0016)、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒(批号 P0012AC)购自上海碧云天生物技术有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号 23227)购自美国 Pierce 公司;DCFH-DA 活性氧荧光探针(批号 CA1410)、RIPA 裂解液(批号 R0010)、蛋白酶抑制剂 PMSF(批号 P0100)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)试剂盒(批号 SEKH-0002)、IL-6 试剂盒(批号 SEKH-0047)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒(批号 SEKH-0013)、线粒体膜电位试剂盒(批号 M8650)购自北京索莱宝生化试剂有限公司;mPTP 检测试剂盒(批号 BB-48122)购自上海贝博生物科技有限公司;蛋白 marker(批号 26616)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;RIPK3 抗体(ab62344)、MLKL 抗体(批号 ab255747)、CaMKII 抗体(批号 ab22609)、磷酸化 CaMKII(p-CaMKII)抗体(批号 ab182647)、磷酸甘油酸变位酶 5(phosphoglycerate mutase family 5, PGAM5)抗体(批号 ab126534)购自英国 Abcam 公司;磷酸化 MLKL(p-MLKL)抗体(批号 91689)购自美国 CST 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 TA-08)、IgG/辣根酶标记山羊抗小鼠抗体(批号 ZB-2305)、IgG/辣根酶标记山羊抗兔抗体(批号 ZB-2301)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;ECL 发光液(批号 WBKLS0500)购自美国 Millipore 公司。

1.3 仪器

HERA cell-150i 细胞培养箱(美国 Thermo

Fisher Scientific 公司); SPARK 多功能微孔板检测仪(瑞士 Tecan 公司); FUSION FX6 多功能成像系统购自(法国 Vilber 公司); 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); TGL-16K 离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 荧光显微镜(美国 invitrogen 公司)。

2 方法

2.1 药物配制

田蓯苁和 Z-VAD-FMK 分别溶于 DMSO, 配制成质量浓度为 10 mg/mL 的母液。

2.2 细胞培养

SH-SY5Y 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.3 Z-VAD-FMK 对 SH-SY5Y 细胞程序性坏死的影响

取处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 以 2×10^5 /mL 接种于 6 孔板中, 培养 12 h。设置对照组、模型组和 Z-VAD-FMK 组。Z-VAD-FMK 组加入药物(Z-VAD-FMK 母液以 DMEM 高糖培养基稀释), 对照组和模型组加入不含药物的 DMEM 高糖培养基, 培养 16 h。弃去培养基, Z-VAD-FMK 组加入药物(Z-VAD-FMK 母液以无糖培养基稀释), 对照组和模型组加入不含药物的无糖培养基, 对照组正常培养 8 h; 将模型组和 Z-VAD-FMK 组的 96 孔板置于缺氧盒中, 于培养箱中培养 6 h; 打开缺氧盒, 取出 96 孔板, 加入含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 于培养箱中培养 2 h。模型组和 Z-VAD-FMK 组缺氧培养 6 h, 复氧培养 2 h。按照 Hoechst 33342/PI 试剂盒说明书检测坏死细胞。

2.4 田蓯苁对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

取处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 以 6×10^4 /mL 接种于 96 孔板中, 培养 12 h。设置对照组、模型组和田蓯苁组(2.5、5.0、10.0 μ g/mL), 除对照组外, 各组加入以 DMEM 高糖培养基稀释的 Z-VAD-FMK, 培养 10 h 后, 田蓯苁组加入不同质量浓度的药物(田蓯苁母液以 DMEM 高糖培养基稀释), 对照组和模型组加入不含药物的 DMEM 高糖培养基, 培养 6 h。弃去培养基, 除对照组外, 其余各组加入以无糖培养基稀释的 Z-VAD-FMK, 田蓯苁组另加入不同质量浓度的药物(田蓯苁母液以无糖培养基稀释), 对照组和模型组加入不含药物的无糖培养基, 对照组正常培养 8 h; 模型组和给药组缺氧培养 6 h, 复氧培养 2 h。每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 培养 2 h, 采用多功能微孔板检测仪

于 450 nm 处测定吸光度(A)值。

2.5 田蓯苁对 SH-SY5Y 细胞上清中 LDH 活性的影响

按“2.4”项下方法处理细胞, 取上清, $400 \times g$ 离心 5 min, 取 120 μ L 至 96 孔板中, 加入 60 μ L LDH 工作液, 混匀, 室温避光孵育 30 min, 采用多功能微孔板检测仪于 490 nm 处测定 A 值。

2.6 田蓯苁对 SH-SY5Y 细胞 ROS 水平的影响

按“2.4”项下方法处理细胞, 弃去培养基, 加入 DCFH-DA, 于 37 °C 孵育 20 min, 用无血清培养基洗涤 3 次, 采用多功能微孔板检测仪于 488 nm 处测定激发波长, 525 nm 处测定发射波长。荧光强度与 ROS 水平呈正相关。

2.7 田蓯苁对 SH-SY5Y 细胞上清液中炎症因子水平的影响

取处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 以 2×10^5 /mL 接种于 6 孔板中, 培养 12 h。按“2.4”项下方法处理细胞, 取上清液离心, 按照试剂盒说明书检测上清液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

2.8 田蓯苁对 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的影响

取处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 以 2×10^5 /mL 接种于 6 孔板中, 培养 12 h。按“2.4”项下方法处理细胞, 弃去培养基, PBS 洗涤 1 次, 加入 1 mL 培养基和 1 mL 线粒体膜电位染色工作液, 混匀, 于 37 °C 孵育 20 min, 弃上清, 用线粒体膜电位染色缓冲液洗涤 2 次, 加入 2 mL 培养基, 于荧光显微镜下观察并拍照。线粒体膜电位较高时, 产生红色荧光; 线粒体膜电位较低时, 产生绿色荧光。

2.9 田蓯苁对 SH-SY5Y 细胞线粒体 mPTP 的影响

按“2.4”项下方法处理细胞, 收集细胞, 使用 HBSS 缓冲液重悬, 制成密度为 1×10^6 /mL 的细胞悬液。取 500 μ L 细胞悬液, 加入 5 μ L 染色工作液, 混匀后, 于 37 °C 避光孵育 15 min; 模型组和给药组加入 5 μ L 荧光淬灭剂, 混匀, 于 37 °C 避光孵育 15 min, $1000 \times g$ 离心 5 min, 收集细胞, 使用 HBSS 缓冲液重悬细胞, 采用多功能微孔板检测仪于 488 nm 处测定激发波长, 525 nm 处测定发射波长。mPTP 开放时, 荧光淬灭剂进入线粒体, 荧光强度变弱。

2.10 田蓯苁对 SH-SY5Y 细胞免疫印迹法检测蛋白表达

取处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 以 2×10^5 /mL 接种于 6 孔板中, 培养 12 h。按“2.4”项下方法处理细胞, 收集细胞, 加入含 PMSF 和磷酸酶

抑制剂的裂解液提取蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度,加入上样缓冲液,100 °C 加热变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,封闭后加入 RIPK3、MLKL、CaMKII、p-CaMKII、PGAM5、p-MLKL、GAPDH 抗体,孵育过夜,加入 IgG/辣根酶标记山羊抗小鼠/兔抗体,孵育,加入 ECL 显影,采用多功能成像系统采集图像并用 Image J 软件分析。

2.11 数据处理

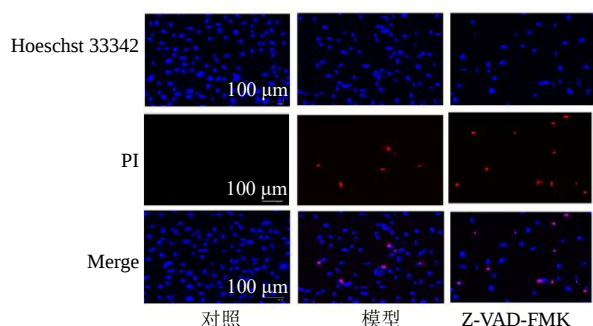
采用 Graphpad prism 8 软件处理数据,数据以

$\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据采用单因素方差 ANOVA 比较分析,两组间比较采用非配对 t 检验,多重比较校正使用 Bonferroni 法。

3 结果

3.1 Z-VAD-FMK 对 SH-SY5Y 细胞程序性坏死的影响

如图 1 所示,PI 将处于坏死的细胞染为红色,正常细胞和中早期凋亡细胞则被 Hoechst 着色为蓝色。与模型组比较,Z-VAD-FMK 显著促进 SH-SY5Y 细胞坏死 ($P < 0.05$)。



与模型组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs model group

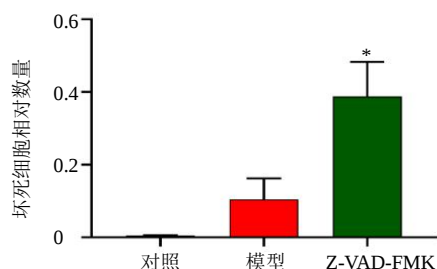


图 1 Z-VAD-FMK 对 H/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞程序性坏死的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of Z-VAD-FMK on necroptosis of H/R-injured SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 田蓿苷对 SH-SY5Y 细胞存活率和上清中 LDH 活性的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$),上清中 LDH 活性显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,田蓿苷组细胞存活率显著升高 ($P < 0.05$),上清中 LDH 活性显著降低 ($P < 0.05$),呈剂量相关性。

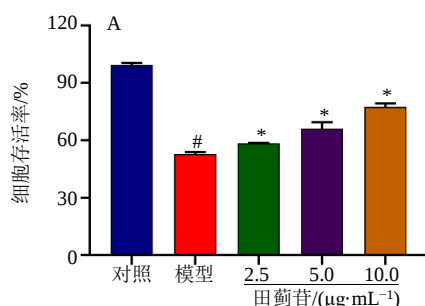
3.3 田蓿苷对 SH-SY5Y 细胞 ROS 水平的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组细胞 ROS 水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,田蓿苷

组细胞 ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$),且呈剂量相关性。

3.4 田蓿苷对 SH-SY5Y 细胞上清液中炎症因子水平的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,田蓿苷 (2.5 $\mu\text{g/mL}$) 组细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$),田蓿苷 (5、10 $\mu\text{g/mL}$) 组细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均显著降低 ($P < 0.05$)。



与对照组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, 下图同

* $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group, same as belows

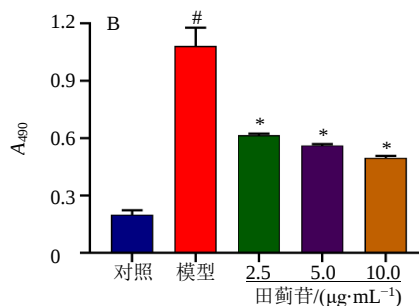


图 2 田蓿苷对 SH-SY5Y 细胞存活率 (A) 和上清中 LDH 活性 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of tilianin on cell viability (A) and LDH activity (B) in supernatant of SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

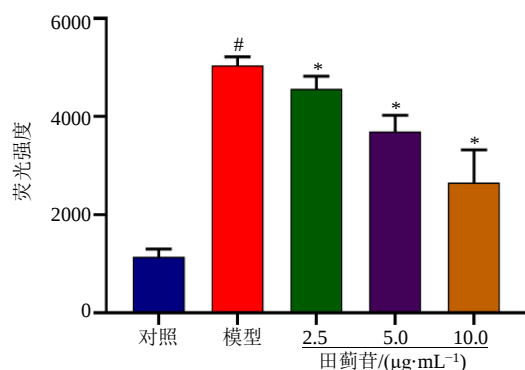


图 3 田蓯苣对 SH-SY5Y 细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of tilianin on ROS level in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

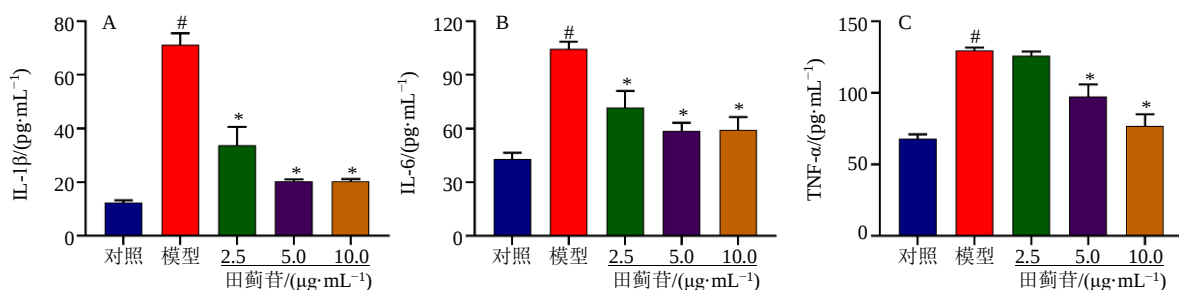


图 4 田蓯苣对 SH-SY5Y 细胞上清液中 IL-1β (A)、IL-6 (B) 和 TNF-α (C) 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of tilianin on levels of IL-1β (A), IL-6 (B) and TNF-α (C) in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

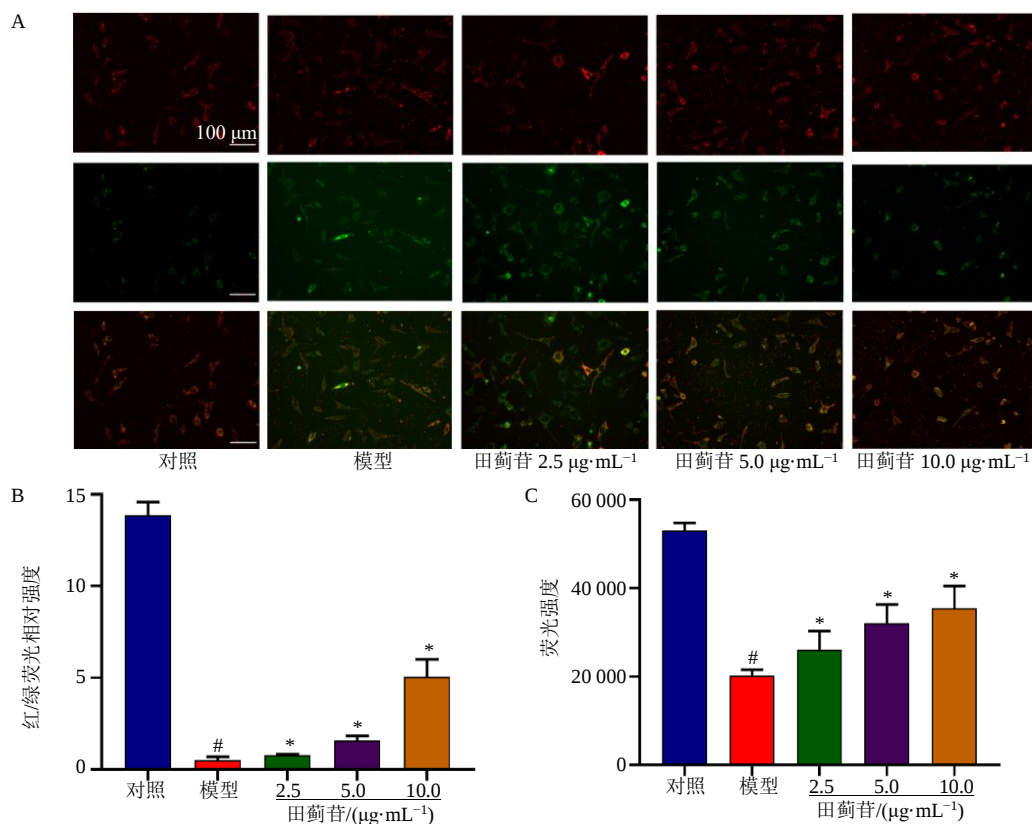


图 5 田蓯苣对 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位 (A、B) 和 mPTP (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of tilianin on mitochondrial membrane potential (A, B) and mPTP (C) in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.5 田蓯苣对 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位和 mPTP 的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组细胞线粒体膜电位和线粒体荧光强度均显著降低 ($P<0.05$), 表明 mPTP 开放; 与模型组比较, 田蓯苣组细胞线粒体膜电位和线粒体荧光强度显著升高 ($P<0.05$)。

3.6 田蓯苣对 SH-SY5Y 细胞 RIPK3、MLKL、CaMKII 和 PGAM5 蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 RIPK3、p-MLKL/MLKL、p-CaMKII/CaMKII 和 PGAM5 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 田蓯苣 (2.5 μg/mL) 组细胞 p-MLKL/MLKL、p-CaMKII/CaMKII 和 PGAM5 蛋白表达水平显著降低 ($P<$

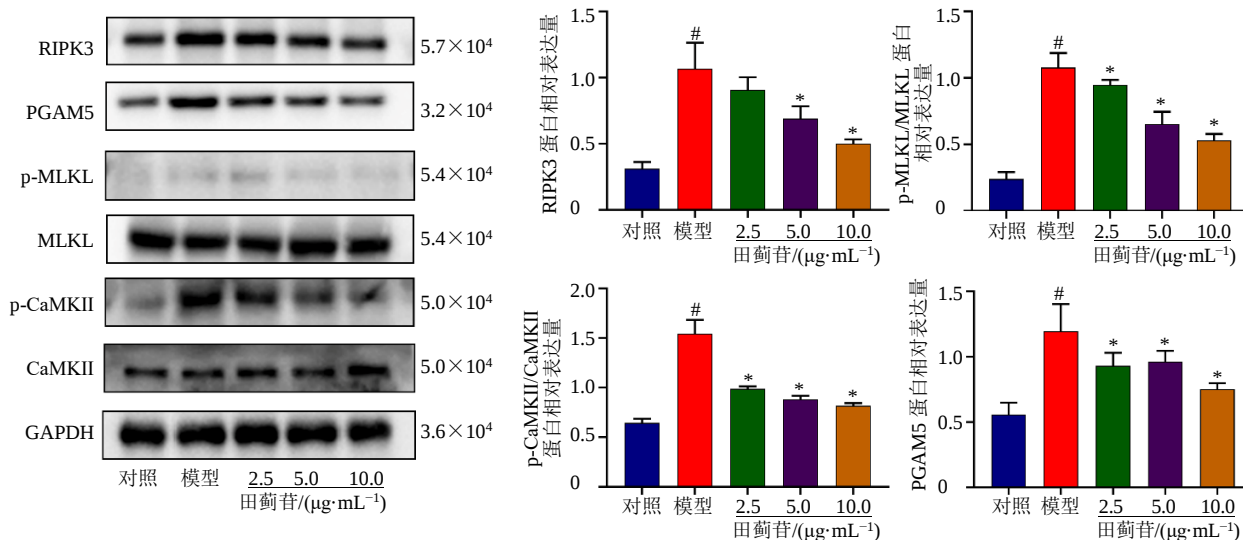


图 6 田蓯苣对 SH-SY5Y 细胞 RIPK3、MLKL、CaMKII 和 PGAM5 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of tilianin on expressions of RIPK3, MLKL, CaMKII and PGAM5 in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

0.05), 田蓯苣(5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组细胞 RIPK3、p-MLKL/MLKL、p-CaMKII/CaMKII 和 PGAM5 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$)。

4 讨论

与细胞凋亡不同, 程序性坏死过程不涉及关键的细胞凋亡调节因子。程序性坏死过程中, 死亡细胞的形态如早期丧失浆膜完整性、缺乏核碎裂、线粒体功能障碍和氧化应激与细胞坏死类似^[3]。多种中枢神经系统损伤疾病的发病机制均涉及程序性坏死, 通过干预程序性坏死信号通路, 对中枢神经系统损伤尤其是脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用^[13-15]。

课题组前期研究发现, 香青兰总黄酮能够保护阿霉素损伤的心肌细胞^[16]; 其中的单体成分田蓯苣可以有效抑制糖氧剥夺后细胞中 CaMKII 依赖性线粒体介导的细胞凋亡和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) /核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 炎症通路的激活, 对高血压、高血脂、动脉粥样硬化大鼠具有显著改善作用, 并对心肌和大脑缺血再灌注损伤有显著保护作用^[11-12]。因此, 田蓯苣在心脑血管疾病的防治中具有广阔的应用前景。

程序性坏死是在凋亡执行被阻止的情况下, 凋亡受体的死亡结构域诱导的坏死性细胞死亡^[7-8]。在体外诱导细胞凋亡基础上, 使用 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 进行干预, 可以使细胞发生程序性坏死^[17]。基于前期研究, 本研究采用缺氧 6 h、复氧 2 h 的方法模拟缺血再灌注脑损伤, 联合 Z-VAD-FMK

诱导 SH-SY5Y 细胞发生程序性坏死, 结果显示, 模型组细胞坏死细胞显著升高, 上清液中 LDH 活性和细胞内 ROS 水平显著升高, 线粒体膜电位降低、mPTP 开放, 表明模型建立成功; 田蓯苣对 SH-SY5Y 细胞程序性坏死具有保护作用。

在程序性坏死细胞中, RIPK3 可直接磷酸化 MLKL 的第 357 位苏氨酸和第 358 位丝氨酸, p-MLKL 可作为程序性坏死的特异性标志物^[7]。MLKL 能够诱导线粒体丝氨酸/苏氨酸磷酸酶 (PGAM5), 从而导致线粒体损伤, 如线粒体膜电位降低、线粒体通道开放等^[8]。Zhang 等^[9]发现了由 RIPK3-CaMKII 通路介导的一种程序性细胞坏死机制, RIPK3-CaMKII 通路激活后, RIPK3 通过激活 CaMKII, 造成心肌细胞的程序性坏死及继发的恶性心脏重构和心力衰竭。程序性坏死通路激活后, MLKL 能够与线粒体损伤相关蛋白 PGAM5 结合, 进而导致线粒体损伤。本研究结果显示, 模型组细胞 RIPK3、p-MLKL、p-CaMKII 和 PGAM5 蛋白表达水平均显著升高, 田蓯苣组细胞 RIPK3、p-MLKL、p-CaMKII 和 PGAM5 蛋白表达水平均显著降低, 表明田蓯苣可能通过抑制程序性坏死通路相关蛋白表达, 从而保护 SH-SY5Y 细胞。

程序性坏死发生后, 大量释放 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子, 加重脑损伤^[18-19]。敲除 RIPK3 的小鼠发生程序性坏死后, 炎症反应得到明显改善, 表明程序性坏死发生后, 细胞内容物的释放是导致炎症反应的主要原因, 抑制 RIPK3 可以保护细胞膜结构^[20]。本研究结果显示, 田蓯苣组细胞上清

中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均降低,表明田蓯苁能够减轻发生程序性坏死后 SH-SY5Y 细胞的损伤。

综上所述,田蓯苁能够提高缺氧复氧损伤的 SH-SY5Y 细胞活力,其机制可能与保护细胞线粒体、调节程序性坏死通路蛋白 RIPK3 及其下游 MLKL、CaMKII 的表达有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Eltzschig H K, Eckle T. Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1391-1401.
- [2] Degterev A, Huang Z, Boyce M, *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury [J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(2): 112-119.
- [3] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson S A, *et al.* Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018 [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541.
- [4] Wu M Y, Yiang G T, Liao W T, *et al.* Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1650-1667.
- [5] Linkermann A, Bräsen J H, Darding M, *et al.* Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(29): 12024-12029.
- [6] Liu C L, Zhang K, Shen H T, *et al.* Necroptosis: A novel manner of cell death, associated with stroke [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2): 624-630.
- [7] Wang H Y, Sun L M, Su L J, *et al.* Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP₃ [J]. *Mol Cell*, 2014, 54(1): 133-146.
- [8] Wang Z G, Jiang H, Chen S, *et al.* The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways [J]. *Cell*, 2012, 148(1/2): 228-243.
- [9] Zhang T, Zhang Y, Cui M Y, *et al.* CaMKII is a RIP₃ substrate mediating ischemia-and oxidative stress-induced myocardial necroptosis [J]. *Nat Med*, 2016, 22(2): 175-182.
- [10] Dastmalchi K, Damien Dorman H J, Laakso I, *et al.* Chemical composition and antioxidative activity of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2007, 40(9): 1655-1663.
- [11] 马丽月, 曾诚, 郑瑞芳, 等. 田蓯苁对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织的保护作用研究 [J]. *中国药房*, 2018, 29(20): 2805-2810.
- [12] Jiang H, Fang J, Xing J, *et al.* Tilianin mediates neuroprotection against ischemic injury by attenuating CaMKII-dependent mitochondrion-mediated apoptosis and MAPK/NF- κ B signaling [J]. *Life Sci*, 2019, 216: 233-245.
- [13] 孟俊杰, 母得志, 屈艺. 坏死性凋亡在神经系统疾病中作用的研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2016, 36(9): 1290-1294.
- [14] 杨海玉, 刘勇. 中枢神经系统损伤疾病的坏死性凋亡机制研究进展 [J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(3): 327-330.
- [15] 赵振杰, 陈明, 俞照妹. 坏死性凋亡调节机制的研究进展 [J]. *吉林医学*, 2015, 36(10): 2116-2117.
- [16] 都研文, 郑瑞芳, 曾诚, 等. 香青兰总黄酮对阿霉素心肌毒性的保护机制研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(24): 6045-6051.
- [17] Li X H, Yao X Y, Zhu Y Z, *et al.* The caspase inhibitor Z-VAD-FMK alleviates endotoxic shock via inducing macrophages necroptosis and promoting MDSCs-mediated inhibition of macrophages activation [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1824.
- [18] 吴晨露, 谢南南, 周伸奥, 等. 程序性细胞坏死的分子机制及其在炎症中的作用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2016, 38(1): 7-16.
- [19] Chan F K M, Luz N F, Moriwaki K. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33(1): 79-106.
- [20] Silke J, Rickard J A, Gerlic M. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(7): 689-697.

[责任编辑 李亚楠]