

## 注射用丹参多酚酸通过调节 Akt/mTOR 通路介导的自噬对氧糖剥夺/再灌注 Neuro-2a 细胞凋亡的影响

张雯琪<sup>1</sup>, 李东娜<sup>1</sup>, 马萌萌<sup>2</sup>, 徐杨杨<sup>1</sup>, 王少峡<sup>1</sup>, 柴丽娟<sup>1,3</sup>, 郭虹<sup>1,3\*</sup>, 胡利民<sup>1,3\*</sup>

1. 天津中医药大学 省部共建组分中药国家重点实验室, 天津 301617

2. 兵器工业北京北方医院, 北京 100089

3. 方剂学教育部重点实验室 天津市中药药理学重点实验室, 天津 301617

**摘要:** 目的 研究注射用丹参多酚酸 (Salvianolate Lyophilized Injection, SLI) 对氧糖剥夺/再灌注 (oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 损伤小鼠脑神经瘤细胞株 Neuro-2a 的保护作用及机制。方法 体外培养 Neuro-2a 细胞, 建立 OGD/R 损伤模型, 给予 SLI (10、25、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 以及自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 干预, 检测 SLI 对 OGD/R 损伤 Neuro-2a 细胞存活率、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 漏出量及细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C) 的释放; 采用流式细胞仪检测细胞凋亡率; 采用 Western blotting 法检测凋亡及自噬相关蛋白的表达情况。结果 与 OGD/R 组比较, SLI 显著提高 OGD 4 h/R 24 h Neuro-2a 细胞存活率 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 降低 LDH 漏出量 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 抑制细胞凋亡和细胞内 Cyt-C 释放 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 调节活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartate protease, cleaved Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤 2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。SLI 还可以增加 OGD 4 h/R 6 h 细胞自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3II (microtubule-associated protein 1 light chain 3II, LC3II)、自噬效应蛋白 (Beclin-1) 表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 减少自噬选择性底物 p62 蓄积 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。加入自噬抑制剂, 可以抵消 SLI 对 OGD/R 损伤 Neuro-2a 细胞的保护及凋亡抑制作用。此外, SLI 可以降低磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-Akt) 水平以及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 介导细胞自噬的发生。结论 SLI 对 OGD/R 损伤后的 Neuro-2a 细胞具有保护作用, 其机制可能是通过调节 Akt/mTOR 信号通路介导的细胞自噬, 进而发挥抑制细胞凋亡的作用。

**关键词:** 注射用丹参多酚酸; 氧糖剥夺/再灌注; Neuro-2a 细胞; 自噬; 凋亡; 蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)09-2706-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.09.013

## Salvianolate Lyophilized Injection induced autophagy against neuronal apoptosis through Akt/mTOR pathway in Neuro-2a cells

ZHANG Wen-qi<sup>1</sup>, LI Dong-na<sup>1</sup>, MA Meng-meng<sup>2</sup>, XU Yang-yang<sup>1</sup>, WANG Shao-xia<sup>1</sup>, CHAI Li-juan<sup>1,3</sup>, GUO Hong<sup>1,3</sup>, HU Li-min<sup>1,3</sup>

1. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Beijing Northern Hospital of Weaponry Industry, Beijing 100089, China

3. Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

**Abstract: Objective** To study the protective effect and mechanism of Salvianolate Lyophilized Injection (注射用丹参多酚酸, SLI) on oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R)-injured mouse brain neuroma cell line Neuro-2a. **Methods** Neuro-2a cells were cultured *in vitro*, OGD/R injury model was established, SLI (10, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) were

收稿日期: 2022-01-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573644); 国家重点科技攻关项目 (2012ZX09101202)

作者简介: 张雯琪 (1996—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学相关研究。E-mail: 17622738901@163.com

\*通信作者: 郭虹 (1983—), 博士生导师, 主要从事中药脑血管及神经药理研究。E-mail: cacti1983@163.com

胡利民 (1966—), 博士生导师, 主要从事脑血管药理研究。E-mail: huliminth@126.com

administered for intervention. Effects of SLI on survival rate, lactate dehydrogenase (LDH) leakage and cytochrome C (Cyt-C) release of OGD/R-injured Neuro-2a cells were detected; Apoptosis was detected by flow cytometry; Expressions of apoptosis and autophagy-related proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with OGD/R group, SLI significantly increased the survival rate of Neuro-2a cells induced by OGD 4 h/R 24 h ( $P < 0.05, 0.01$ ), decreased the leakage of LDH ( $P < 0.05, 0.01$ ), inhibited cell apoptosis and Cyt-C release ( $P < 0.05, 0.01$ ), regulated cleaved cystein-aspartate protease (cleaved Caspase-3) and B lymphoma-2 (Bcl-2) protein expressions ( $P < 0.05, 0.01$ ). SLI increased the expressions of autophagy-associated protein microtubule-associated protein 1 light chain 3II (LC3II) and autophagy effector protein (Beclin-1) in cells induced by OGD 4 h/R 6 h ( $P < 0.05, 0.01$ ), reduced the accumulation of autophagy-selective substrate p62 ( $P < 0.05, 0.01$ ). The addition of an autophagy inhibitor could counteract the protective and apoptosis inhibitory effects of SLI on OGD/R-injured Neuro-2a cells. In addition, SLI could reduce the level of phosphorylated protein kinase B (p-Akt) and expression of mammalian target of rapamycin (mTOR) ( $P < 0.05, 0.01$ ) to mediate autophagy. **Conclusion** SLI has a protective effect on Neuro-2a cells after OGD/R injury, its mechanism may be regulating the autophagy mediated by Akt/mTOR signaling pathway, thereby inhibiting apoptosis.

**Key words:** Salvianolate Lyophilized Injection; oxygen-glucose deprivation/reperfusion; Neuro-2a cells; apoptosis; autophagy; protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway

缺血性脑卒中是一种常见的脑血管疾病, 不仅严重影响人们的身心健康, 而且给家庭和社会带来巨大经济负担。以往研究表明, 缺血性脑卒中以氧化应激、炎症反应和血管通透性增加等各种病理和生理变化为特征<sup>[1-2]</sup>。近来研究表明, 细胞自噬和凋亡可同时参与缺血性脑卒中的发病机制, 并且两者之间存在相互作用<sup>[3]</sup>。

细胞自噬是一种分解代谢过程, 是真核细胞中存在的重要现象。越来越多的证据表明, 自噬参与了缺血性脑卒中的发生和发展, 而且细胞自噬和凋亡参与相同的通路, 由此形成了一个复杂的网络。在大鼠缺血再灌注的早期过程中, 激活自噬可以为脑缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 诱导的损伤提供一定的神经保护作用<sup>[4]</sup>。在新生大鼠缺氧模型中, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抑制剂雷帕霉素治疗后, 可以诱导自噬并发挥对大鼠的神经保护作用<sup>[5]</sup>。自噬还可以通过抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cystein-aspartate protease, Caspase) 依赖性途径来阻断细胞凋亡的诱导, 从而减轻细胞损伤<sup>[6]</sup>。因此, 自噬的激活可能成为治疗缺血性卒中的潜在方向。然而, 自噬是一把“双刃剑”。在某些特殊情况下, 过度自噬可能导致细胞凋亡增加, 在缺血性卒中的进展中发挥有害作用<sup>[7]</sup>。自噬可以与细胞凋亡同时发生, 或自噬可能首先占主导地位, 但最终会导致自噬相关的细胞发生凋亡<sup>[8]</sup>。总之, 自噬和细胞凋亡之间的相互作用和串扰是复杂而重要的。因此, 缺血性脑卒中后如何干预自噬的发展是组织修复和功能恢复的关键。

注射用丹参多酚酸 (Salvianolate Lyophilized Injection, SLI) 是从丹参中提取的水溶性物质, 临床主要用于治疗轻中度缺血性脑卒中<sup>[9-11]</sup>。Chen 等<sup>[12]</sup>研究表明 SLI 中含有的主要成分为多种丹酚酸, 主要包括原儿茶醛、丹酚酸 B、丹酚酸 Y、丹酚酸 D、丹酚酸 E、精酸和迷迭香酸的非对映异构体, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等药理作用。本课题组前期研究证实, SLI 对大鼠脑缺血再灌注损伤具有明显保护作用, 其可能与减轻氧化应激、抑制炎症反应有关<sup>[13-14]</sup>。目前关于 SLI 如何调节自噬和凋亡以及 SLI 诱导的自噬和凋亡之间的相互作用的报道较少。因此, 本研究旨在揭示 SLI 对氧糖剥夺/再灌注 (oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 诱导小鼠脑神经瘤细胞株 Neuro-2a 自噬和凋亡的影响, 并进一步探讨细胞自噬和凋亡之间的关系。

## 1 材料

### 1.1 细胞

Neuro-2a 细胞株购自北京协和医学院。

### 1.2 药品与试剂

SLI (批号 20151004, 0.13 g/支, 含丹参多酚酸 100 mg、辅料甘露醇 30 mg, 国药准字 Z20110011) 由天津天士力之骄药业有限公司提供; MEM 培养基 (批号 SH30024.01)、青霉素、链霉素 (批号 SV30010) 购自美国 Hyclone 公司; CCK-8 检测试剂盒 (批号 CK04) 购自日本同仁化学研究所; 胎牛血清 (批号 10099141C)、胰蛋白酶 (批号 25200056)、D-Hank's (批号 13150016) 购自美国 Gibco 公司; Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 凋亡检测试剂盒 (批号 A13199) 购自美国 Invitrogen 公

司; RIPA 细胞裂解液购自北京索莱宝科技有限公司; BCA 测定试剂盒(批号 23227)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Immobilon Western 化学发光 HRP 底物(批号 WBKLS0500)、PVDF 膜(批号 03010040001)购自美国 Millipore 公司; 微管相关蛋白 1 轻链 3II(microtubule-associated protein 1 light chain 3II, LC3II) 抗体(批号 ab48394)、p62 抗体(ab56416)、B 淋巴细胞瘤 2(B cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体(批号 ab27795) 购自英国 Abcam 公司; 自噬效应蛋白(Beclin-1) 抗体(批号 3738)、磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt) 抗体(批号 4060)、Akt 抗体(批号 4685)、mTOR 抗体(批号 2983)、 $\beta$ -actin 抗体(批号 4970)、cleaved Caspase-3 抗体(批号 9664) 购自美国 CST 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 ZB-2301)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(批号 ZB-2305) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay 购自美国 Promega 公司; 自噬抑制剂 3-MA 购自美国 Sigma 公司; 细胞色素 C(cytochrome C, Cyt-C) 检测试剂盒购自武汉基因美生物科技有限公司。

### 1.3 仪器

FORMA3111 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 64R 型低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司); TE200 型倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司); Station 3 型多功能读板机(美国 Molecular Devices 公司); BD FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司); PowerPac™ Basic 电泳仪、Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems 电泳槽、Trans-Blot® SD System 半干转仪(美国 Bio-Rad 公司); Milli-Q Advantage A10, 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

## 2 方法

### 2.1 OGD/R 模型的建立

OGD/R 模型按照本课题组前期方法建立<sup>[15]</sup>。将处于对数生长期的 Neuro-2a 细胞消化并吹打成单细胞悬液, 调整细胞密度至  $4 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔板中。待 Neuro-2a 细胞生长至 80%~90% 融合时进行实验, 弃去培养基后以 D-Hank's 溶液洗涤细胞 3 次, 换成 D-Hank's 平衡盐溶液置于充满 95% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 混合气体的缺氧小室氧糖剥夺孵育 4 h, 再灌注时替换为完全培养基, 放置于常规细胞培养箱

继续培养 0、6、12、24 h 以建立 OGD/R 模型。

### 2.2 分组与给药

根据前期实验结果, 设置对照组、OGD/R 组、OGD/R+SLI (10、25、50  $\mu$ g/mL) 组<sup>[16-18]</sup>及 OGD/R+3-MA+SLI (50  $\mu$ g/mL) 组和 OGD/R+3-MA 组。

**2.2.1 对照组** 将完全培养基替换为 MEM 培养液, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h 后替换为完全培养基孵育 0、6、12、24 h。

**2.2.2 OGD/R 组** 将完全培养基替换为 D-Hank's 平衡盐溶液, 置于充满 95% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 混合气体的缺氧小室孵育 4 h, 然后替换为完全培养基孵育 0、6、12、24 h。

**2.2.3 OGD/R+SLI (10、25、50  $\mu$ g/mL) 组** 将完全培养基替换为含有不同浓度 SLI 的 D-Hank's 溶液, 置于充满 95% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 混合气体的缺氧小室孵育 4 h 后, 然后分别替换为含有不同浓度 SLI 的完全培养基孵育 0、6、12、24 h。

**2.2.4 OGD/R+3-MA+SLI (50  $\mu$ g/mL) 组** 将完全培养基替换为含有 2.5 mmol/L 3-MA 的完全培养基提前孵育 1 h, 1 h 时后替换为含有 50  $\mu$ g/mL SLI、2.5 mmol/L 3-MA 的 D-Hank's 溶液, 置于充满 95% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 混合气体的缺氧小室孵育 4 h, 然后替换为含有 50  $\mu$ g/mL SLI 的完全培养基孵育 24 h。

**2.2.5 OGD/R+3-MA 组** 将完全培养基替换为含有 2.5 mmol/L 3-MA 的完全培养基提前孵育 1 h, 1 h 后替换为含有 2.5 mmol/L 3-MA 的 D-Hank's 溶液, 置于充满 95% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 混合气体的缺氧小室孵育 4 h, 然后替换为完全培养基孵育 24 h。

### 2.3 SLI 对 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞存活率和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH) 漏出量的影响

**2.3.1 细胞存活率的测定** Neuro-2a 细胞悬液以  $1 \times 10^6$ /mL 接种于 96 孔板中, 培养至细胞贴壁生长均匀, 即可用于实验。各组细胞加入药物干预后, 弃去上清液, 每孔加入 100  $\mu$ L 含有 10% CCK-8 的 MEM 培养基, 37 °C 避光孵育 30 min 后, 使用多功能酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A) 值。

**2.3.2 LDH 漏出量的测定** 按“2.3.1”项下方法处理细胞, 每孔收集细胞上清液 25  $\mu$ L, 转移至新的 96 孔板中, 加入预先配制好的 CytoTox-ONE™ Reagent, 20 °C 孵育 30 min, 加入终止液 50  $\mu$ L, 摇晃混合 30 s, 测定  $A_{560 \text{ nm}}/A_{590 \text{ nm}}$  值。

## 2.4 SLI 对 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞凋亡的影响

按“2.3.1”项下方法处理细胞, Neuro-2a 细胞经胰蛋白酶消化后, 用冷的 PBS 洗涤, 然后重悬于 150  $\mu$ L 含有 5  $\mu$ L Annexin-V-FITC 和 1  $\mu$ L PI 的混合缓冲液中。37  $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min 后, 通过流式细胞仪定量荧光强度。正常活细胞不会被染色, 凋亡细胞可被标记上 Annexin V, 坏死和凋亡晚期细胞可被 Annexin V 和 PI 同时染色。

## 2.5 SLI 对 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞 Cyt-C 释放的影响

各组加入药物干预后, 收集 Neuro-2a 细胞并洗涤 2 次。使用 Cyt-C 检测试剂盒测定 Cyt-C 释放。

## 2.6 SLI 对 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞凋亡及自噬相关蛋白表达的影响

Neuro-2a 细胞悬液以  $1 \times 10^6$ /mL 接种在 6 孔板中, 培养至细胞贴壁生长均匀, 各组细胞加入药物处理后, 弃去培养基, 用冷的 D-Hank's 平衡缓冲盐溶液清洗 3 次, 每孔加入 100  $\mu$ L 含 1% 蛋白酶抑制剂 PMSF 的细胞裂解液, 于冰上孵育 10 min, 收集裂解液, 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 再加入 Loading Buffer 煮沸变性。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 4% 脱脂奶粉, 室温封闭 1.5 h, 分别加入 cleaved Caspase-3 (1 : 1000)、Bcl-2 (1 : 1000)、LC3II (1 : 1000)、

Beclin-1 (1 : 1000)、p62 (1 : 1000)、p-Akt (1 : 2000)、Akt (1 : 1000)、mTOR (1 : 1000) 和  $\beta$ -actin (1 : 1000) 抗体, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜后, 用 TBST 缓冲液洗涤 5 次, 每次 5 min; 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠/兔 IgG 抗体 (1 : 10 000), 室温孵育 1 h, 用 TBST 缓冲液洗涤 5 次, 每次 5 min。最后用化学发光成像系统进行显影。采用 Image J 软件分析各目的蛋白的灰度值, 用于计算各目的蛋白的表达。

## 2.7 统计学处理

数据采用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行分析, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差 (One-Way ANOVA) 中的 Tukey 检验进行分析。

## 3 结果

### 3.1 SLI 对 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞形态、存活率及 LDH 漏出量的影响

如图 1-A 所示, 倒置显微镜下可以观察到, 对照组 Neuro-2a 细胞呈多边形, 贴壁生长良好, 细胞密度大, 胞体饱满; OGD/R 组细胞稀疏, 贴壁性差, 胞体明显皱缩; OGD/R+SLI (10  $\mu$ g/mL) 组细胞形态有所改善, 轮廓相对融合; OGD/R+SLI (25、50  $\mu$ g/mL) 组细胞形态较 OGD/R 组有明显改善, 轮廓融合, 细胞贴壁性良好。如图 1-B、C 所示, 与对照组比较, OGD/R 组细胞存活率明显降低 ( $P < 0.01$ ), 细胞上清液中 LDH 漏出量明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 OGD/R 组比较, OGD/R+SLI (25、50  $\mu$ g/mL)

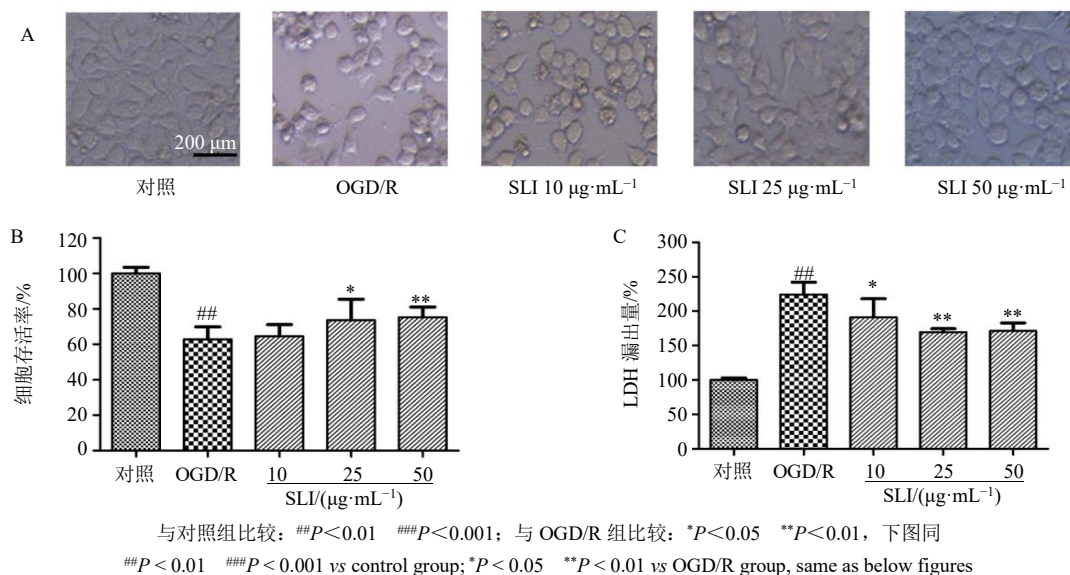


图 1 SLI 对 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞形态 (A)、存活率 (B) 及 LDH 漏出量 (C) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

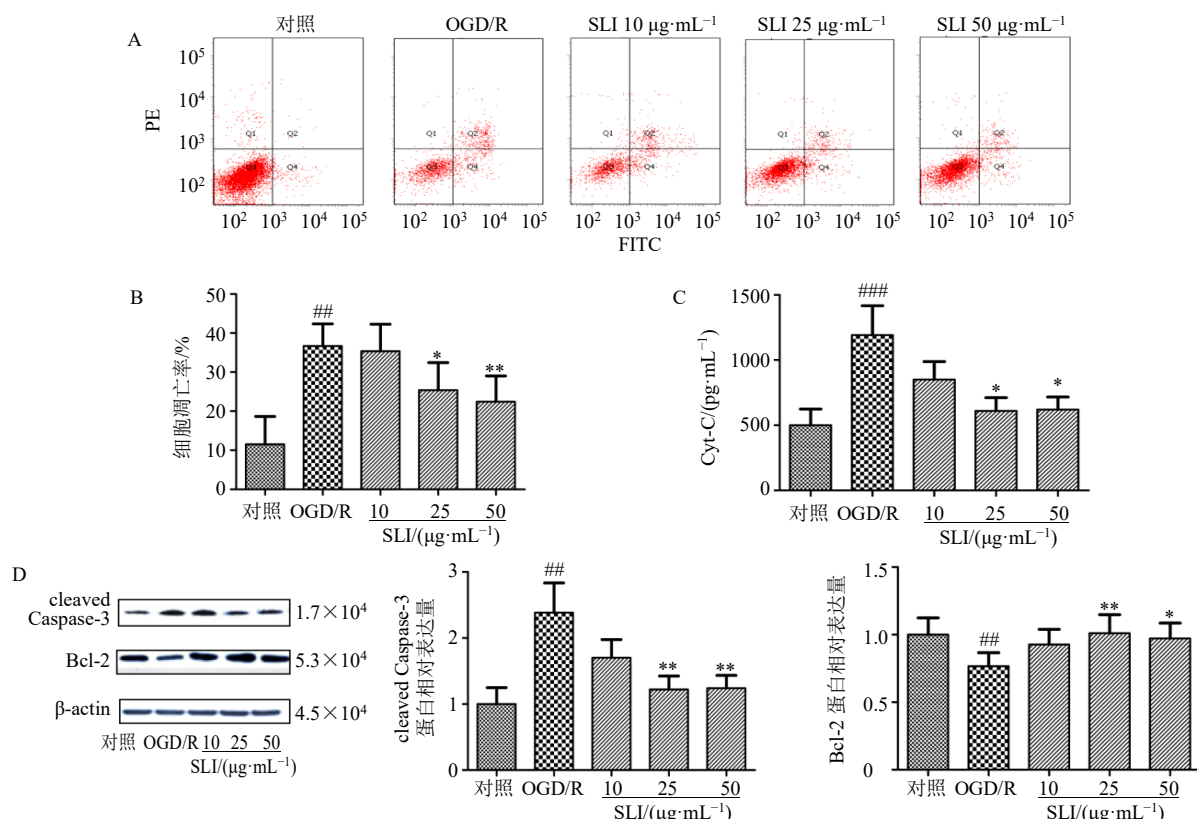
Fig. 1 Effect of SLI on cells morphology (A), survival rate (B) and LDH leakage (C) of Neuro-2a cells induced by OGD/R ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组细胞存活率显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ ), OGD/R + SLI (10、25、50  $\mu\text{g/mL}$ ) 组细胞上清液中 LDH 漏出量均显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ )。表明 SLI 可以改善 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞损伤, 且呈剂量相关性。

### 3.2 SLI 对 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞凋亡的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, OGD/R 组细胞凋亡率、Cyt-C 释放量以及 cleaved Caspase-3 蛋白表达水

平显著升高 ( $P < 0.01, 0.001$ ), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与 OGD/R 组比较, OGD/R + SLI (25、50  $\mu\text{g/mL}$ ) 组细胞凋亡率、Cyt-C 释放量以及 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。表明 SLI 在神经元 OGD/R 过程中具有保护作用, 可减轻 OGD/R 损伤诱导的细胞凋亡, 说明 SLI 具有抗细胞凋亡的特性。



A-Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡 B-各组细胞凋亡率 C-各组细胞 Cyt-C 释放量 D-各组细胞 cleaved Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达  
A-cell apoptosis detected by Annexin V-FITC/PI B-apoptosis rate of cells in each group C-Cyt-C release of cells in each group D-cleaved Caspase-3 and Bcl-2 protein expressions of cells in each group

图 2 SLI 对 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of SLI on apoptosis of Neuro-2a cells induced by OGD/R ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.3 SLI 对 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞自噬相关蛋白表达的影响

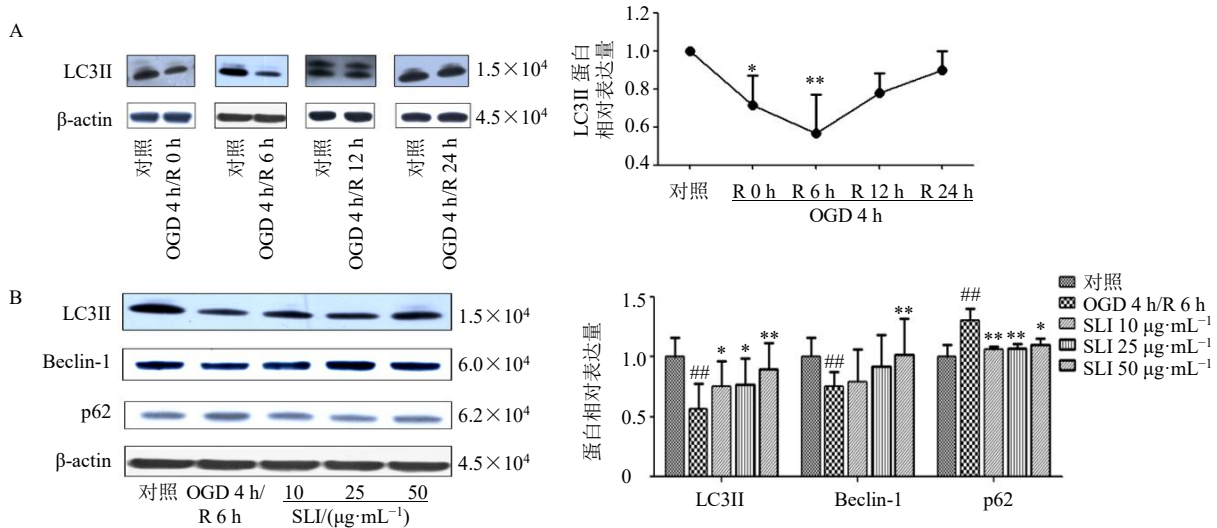
如图 3-A 所示, 与对照组相比, 缺氧 4 h 后细胞 LC3II 蛋白表达已经出现显著降低 ( $P < 0.05$ ), 复氧后 6 h 达到最低点 ( $P < 0.01$ )。因此, 进一步评估了 SLI 对 OGD 4 h/R 6 h 自噬蛋白表达的影响。如图 3-B 所示, 与对照组比较, OGD/R 组细胞 LC3II 和 Beclin-1 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), p62 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, OGD/R + SLI (10、25、50  $\mu\text{g/mL}$ ) 组 LC3II 蛋白表达水平均可显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ ), p62 蛋白表

达水平均可显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ); OGD/R + SLI (50  $\mu\text{g/mL}$ ) 组 Beclin-1 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。表明 SLI 能够通过提高自噬水平发挥对 OGD/R 损伤 Neuro-2a 细胞的保护作用。

### 3.4 SLI 通过激活自噬抑制 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞凋亡

如图 4 所示, 与对照组比较, OGD/R 组细胞存活率显著降低 ( $P < 0.01$ ), LDH 漏出量、细胞凋亡率以及 Cyt-C 释放量均明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 OGD/R 组比较, OGD/R + SLI (50  $\mu\text{g/mL}$ ) 组细胞存活率显著升高 ( $P < 0.01$ ), LDH 漏出量、细胞凋亡率

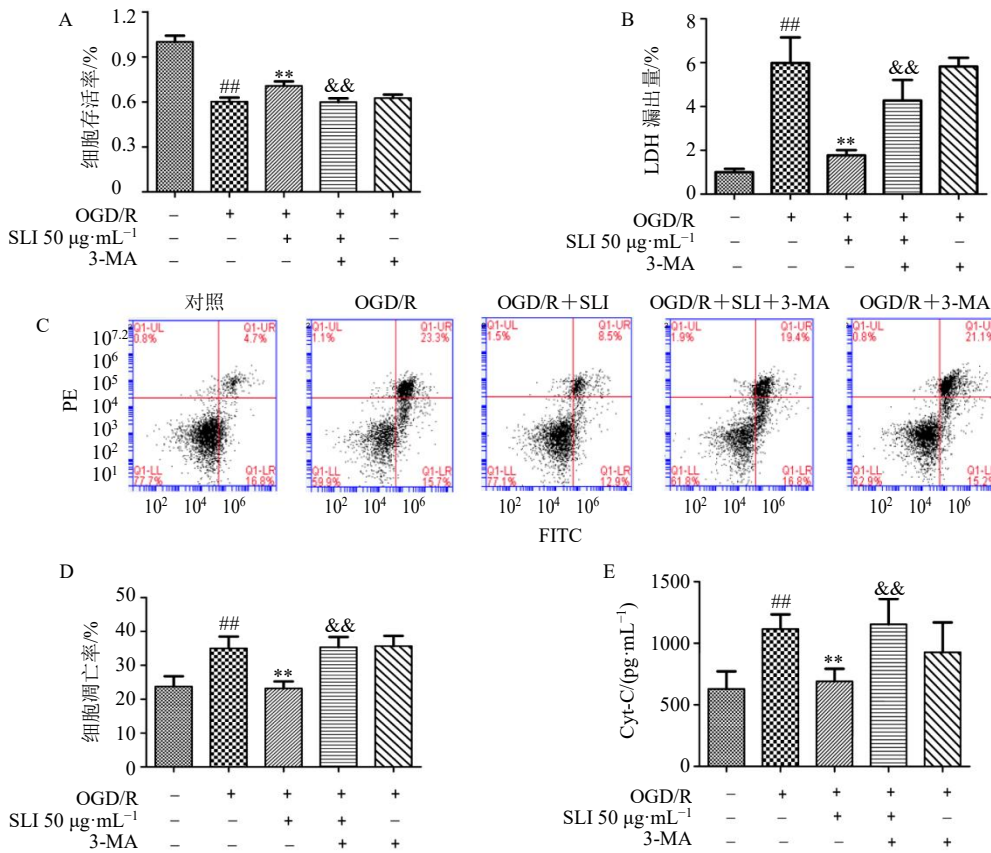




A-缺氧4 h后, 复氧0、6、12、24 h 细胞 LC3II 蛋白表达情况 B-缺氧4 h后, 复氧6 h 各组细胞 LC3II、Beclin 和 p62 蛋白表达情况  
A-expressions of LC3II protein in cells after 4 h of hypoxia, 0, 6, 12, and 24 h after reoxygenation B-expressions of LC3II, Beclin and p62 in cells of each group after 4 h of hypoxia and 6 h of reoxygenation

图3 SLI 对 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞自噬相关蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of SLI on autophagy related proteins in Neuro-2a cells induced by OGD/R ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



A-各组细胞存活率 B-各组细胞 LDH 漏出量 C-Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡 D-各组细胞凋亡率 E-各组细胞 Cyt-C 释放量 与 SLI 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组比较:  $\&\&P < 0.01$

A-survival rate of cells in each group B-LDH leakage of cells in each group C-cell apoptosis detected by Annexin V-FITC/PI D-apoptosis rate of cells in each group E-Cyt-C release of cells in each group  $\&\&P < 0.01$  vs SLI 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  group

图4 SLI 通过激活自噬抑制 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞的凋亡 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 SLI inhibited apoptosis on Neuro-2a cells induced by OGD/R by activating autophagy ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

和 Cyt-C 释放量均显著降低 ( $P < 0.01$ )。但加入自噬抑制剂 3-MA 后, 与模型组相比, 细胞存活率、LDH 漏出量、细胞凋亡率和 Cyt-C 释放量没有明显变化, 但与 OGD/R+SLI (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。说明加入自噬抑制剂 3-MA 后, 药物未能对凋亡细胞发挥保护作用, 从而表明自噬的激活可能在 SLI 介导的凋亡抑制中发挥关键作用。

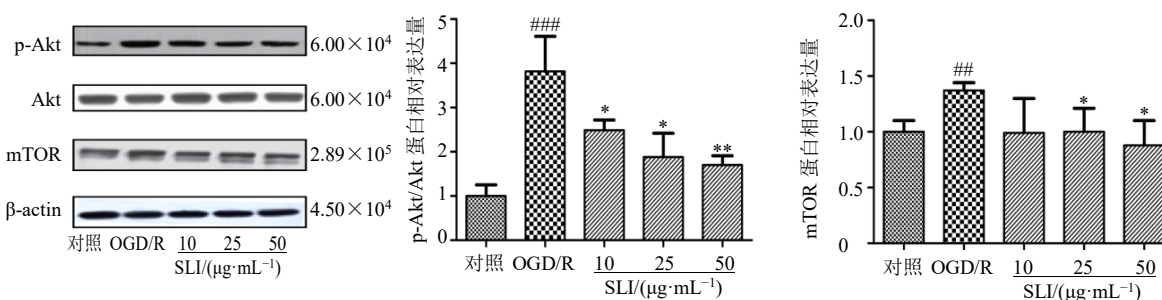


图5 SLI通过调控Akt/mTOR信号通路抑制OGD/R诱导的Neuro-2a细胞凋亡 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 SLI inhibited apoptosis on Neuro-2a cells induced by OGD/R by regulating Akt/mTOR signaling pathway ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), OGD/R+SLI (25、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组 mTOR 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。提示 SLI 可能通过抑制 Akt/mTOR 活性提高自噬水平, 从而发挥对 OGD/R 损伤 Neuro-2a 细胞的保护作用。

#### 4 讨论

缺血性脑卒中是一种严重的脑血管疾病, 是指脑血管狭窄或闭塞, 最终导致脑组织缺氧甚至坏死<sup>[19]</sup>。中医认为缺血性中风属于血瘀证范畴, “活血化瘀”是最常用的治疗方法, 而丹参是“活血化瘀”最常用的药物之一, 且丹参类制剂对心脑血管系统有较好作用<sup>[20]</sup>。SLI 是利用冷冻干燥法从丹参水溶性提取物中分离得到, 在我国临床上已广泛用于治疗急性缺血性脑卒中。本课题组前期研究显示, SLI 可以促进脑缺血/再灌注 (middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R) 损伤或糖尿病模型中风后大鼠神经功能的恢复, 其机制可能与减少氧化应激、抑制炎症反应和增强血脑屏障功能有关<sup>[21-23]</sup>。然而, 其潜在的作用机制尚不完全清楚, 需要进一步研究。因此, 本研究在 Neuro-2a 细胞中建立 OGD/R 模型探索了 SLI 的保护机制, 并且证明了 SLI 对 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞损伤具有一定的神经保护作用, 其可以通过激活 Akt/mTOR 依赖的自噬途径减少神经元凋亡。

细胞凋亡是继发性损伤的重要机制, 并且在脑 I/R 损伤期间显著加重<sup>[24]</sup>。在凋亡过程中, Cyt-C 从线粒体膜间隙释放到胞质中, 随后招募并导致

#### 3.5 SLI 通过调控 Akt/mTOR 信号通路抑制 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞凋亡

随后又检测了细胞内 Akt 的磷酸化水平及 mTOR 的表达。如图 5 所示, 与对照组比较, OGD/R 组细胞 Akt 磷酸化水平及 mTOR 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.01, 0.001$ ); 与模型组比较, OGD/R+SLI (10、25、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组 Akt 磷酸化水平均显著

Caspase 级联反应。最终, Caspase-3 被活化, 导致细胞凋亡<sup>[25]</sup>。Bcl-2 家族主要参与线粒体介导的凋亡途径<sup>[26]</sup>, 是一种主要的抗凋亡蛋白。本研究通过流式细胞术检测发现 SLI 明显降低了 OGD/R 诱导 Neuro-2a 细胞的凋亡率, 抑制了 Cyt-C 的释放, 降低了 cleaved Caspase-3 的表达, 并上调了 Bcl-2 蛋白表达水平, 证明 SLI 在体外具有抗凋亡作用。

越来越多的证据支持自噬的调节是脑 I/R 损伤的一种机制。Luo 等<sup>[27]</sup>发现, 通过激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/Akt 途径抑制自噬有助于防止缺血损伤引起的神经元死亡。相反, Yu 等<sup>[28]</sup>提出适度激活自噬可以通过调节 mTOR 增加海马神经元的自噬, 减少再灌注损伤, 保护神经元。关于自噬在缺血性卒中中的作用存在相互矛盾的报道, 这可能与损伤程度和时间有关。因此, 自噬在缺血性脑卒中是有益还是有害仍有待进一步讨论。本研究发现自噬水平随着复氧时间的延长先降低后升高, 并在复氧 24 h 后恢复到正常水平。也就是说, 自噬在脑缺血早期被激活, 这与之前的报道一致<sup>[29]</sup>。本研究发现 SLI 可以激活 OGD/R 诱导的 Neuro-2a 细胞自噬, 增加 LC3II 和 Beclin-1 的表达, 减少 p62 的积累, 并最终提高细胞存活率。总之, SLI 在体外表现出明显的自噬保护作用。

许多应激途径依次引发神经细胞内的自噬和凋亡, 它们之间的相互作用复杂但意义重大。Luo 等<sup>[30]</sup>证实自噬可能通过减少凋亡相关分子表达而表现为

抗凋亡机制。然而, He 等<sup>[31]</sup>研究表明, 凋亡激活通常与自噬增加有关。在许多情况下, 自噬先于凋亡。Sirois 等<sup>[32]</sup>观察到自噬早于细胞凋亡的发展, 并在细胞凋亡被激活时持续发生。在本研究中, 自噬抑制在复氧 6 h 时处于最低点, 然后逐渐升高, 复氧 24 h 细胞凋亡率明显高于对照组。这表明自噬先于凋亡发生, 与文献中的报道一致。本研究的局限性在于没有对凋亡进行时间相关性分析, 并且对自噬检测仪持续到复氧 24 h, 自噬是否会继续上升并导致过度自噬尚不清楚。但 SLI 能够明显逆转 OGD/R 诱导的自噬抑制和凋亡的发生, 而且 SLI 激活自噬的时间早于抑制凋亡的时间。此外, 当自噬抑制剂 3-MA 抑制自噬时, SLI 提高细胞存活率、减少细胞凋亡和 Cyt-C 释放的能力减弱, 表明 SLI 可以通过上调自噬抑制细胞凋亡。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路是经典的自噬通路。mTOR 是自噬的主要负调节因子, 位于 PI3K/Akt 通路的下游。研究显示, 神经营养因子的神经保护作用是通过皮层神经元中的 PI3K/Akt/mTOR 通路由自噬介导的<sup>[33]</sup>。同时, PI3K/Akt/mTOR 通路是细胞内关键的信号转导通路, 可促进细胞生长并抑制细胞凋亡<sup>[34]</sup>。基于该途径, 体外观察了 OGD/R 处理后, 给予 SLI 的 Neuro-2a 细胞中 p-Akt 和 mTOR 的表达。结果表明, SLI 可以下调 p-Akt 和 mTOR 的表达, 从而促进自噬。这表明 SLI 对缺血性卒中的神经保护作用可以通过 Akt/mTOR 通路调节自噬活性。但是, Akt/mTOR 信号通路并不是调节自噬的唯一通路, 为了进一步阐明 SLI 是否可以调节 Akt 通路, 可以使用 Akt 磷酸化抑制剂 Ly294002 在后续研究中进行验证。

本研究主要探索了 OGD/R 诱导 Neuro-2a 细胞后自噬与凋亡的关系, 并研究了 Akt/mTOR 信号通路在调控 Neuro-2a 细胞中的作用。发现 SLI 通过诱导自噬和抑制细胞凋亡来改善 OGD/R 诱导的损伤, 并通过 Akt/mTOR 依赖性途径发挥神经保护作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] Yang Q W, Huang Q Y, Hu Z P, *et al.* Potential neuroprotective treatment of stroke: Targeting excitotoxicity, oxidative stress, and inflammation [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 1036.

[2] Yang C J, Hawkins K E, Doré S, *et al.* Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic

stroke [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(2): C135-C153.

- [3] Chen S D, Wu C L, Hwang W C, *et al.* More insight into BDNF against neurodegeneration: Anti-apoptosis, anti-oxidation, and suppression of autophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 545.
- [4] Sun Y M, Zhang T, Zhang Y, *et al.* Ischemic postconditioning alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury through activating autophagy during early reperfusion in rats [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(9): 1826-1840.
- [5] Huang L F, Chen C W, Zhang X, *et al.* Neuroprotective effect of curcumin against cerebral ischemia-reperfusion via mediating autophagy and inflammation [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 64(1): 129-139.
- [6] Li Z R, Ma T, Guo Y J, *et al.* Sanggenon O induced apoptosis of A549 cells is counterbalanced by protective autophagy [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 87: 688-698.
- [7] Mo Y, Sun Y Y, Liu K Y. Autophagy and inflammation in ischemic stroke [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(8): 1388-1396.
- [8] Lange C, Lehmann C, Mahler M, *et al.* Comparison of cellular death pathways after mTHPC-mediated photodynamic therapy (PDT) in five human cancer cell lines [J]. *Cancers*, 2019, 11(5): 702.
- [9] Zhou L M, Zuo Z, Chow M S S. Danshen: An overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use [J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(12): 1345-1359.
- [10] 苏小琴, 张磊, 李海燕, 等. 基于 Q-marker 的中药注射剂质量控制研究思路——以注射用丹参多酚酸为例 [J]. *中草药*, 2019, 50(19): 4663-4672.
- [11] 辛浩琳, 崔英, 周官恩. 注射用丹参多酚酸盐联合长春西汀注射液治疗腔隙性脑梗死的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(3): 450-454.
- [12] Chen X L, Guo Y J, Hu Y J, *et al.* Quantitative analysis of highly similar salvianolic acids with <sup>1</sup>H qNMR for quality control of traditional Chinese medicinal preparation Salviaolate Lyophilized Injection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 124: 281-287.
- [13] Wang F J, Wang S X, Chai L J, *et al.* Xueshuantong Injection (lyophilized) combined with Salviaolate Lyophilized Injection protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through attenuation of oxidative stress [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(6): 998-1011.
- [14] Yang C S, Xu Y Y, Zhang W Q, *et al.* Salviaolate Lyophilized Injection regulates the autophagy-lysosomal pathway in cerebral ischaemia/reperfusion rats [J]. *J*



- Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113898.
- [15] Chai L J, Guo H, Li H, *et al.* Scutellarin and caffeic acid ester fraction, active components of Dengzhanxin Injection, upregulate neurotrophins synthesis and release in hypoxia/reoxygenation rat astrocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(1): 100-107.
- [16] 刘文杰, 袁庆, 张彤, 等. 注射用丹参多酚酸对周细胞增殖与迁移和凋亡的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(1): 27-30.
- [17] 袁庆, 胡利民, 王少峡, 等. 注射用丹参多酚酸对胶质细胞神经营养因子及神经元的保护作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(10): 893-896.
- [18] 徐耀, 殷孟兰, 赵磊, 等. 丹参和三七有效组分对氧糖剥夺损伤的大鼠星形胶质细胞谷氨酸摄取的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(1): 59-62.
- [19] Hankey G J. Stroke [J]. *Lancet*, 2017, 389(10069): 641-654.
- [20] 陈璐, 聂永伟, 张燕欣, 等. 丹参单体化合物及丹参类制剂对心脑血管系统信号通路影响的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(11): 2333-2342.
- [21] He Q S, Wang S X, Liu X L, *et al.* Salvianolate Lyophilized Injection promotes post-stroke functional recovery via the activation of VEGF and BDNF-TrkB-CREB signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(1): 108-122.
- [22] Wang F J, He Q S, Wang J X, *et al.* Neuroprotective effect of Salvianolate Lyophilized Injection against cerebral ischemia in type 1 diabetic rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 258.
- [23] Zhao C, Li X L, Li X J, *et al.* Salvianolate Lyophilized Injection (SLI) strengthens blood-brain barrier function related to ERK1/2 and Akt signaling pathways [J]. *Brain Res*, 2019, 1720: 146295.
- [24] Tian Z H, Tang C Y, Wang Z G. Neuroprotective effect of ginkgetin in experimental cerebral ischemia/reperfusion via apoptosis inhibition and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway activation [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 18487-18495.
- [25] Guo Y J, Zhao Y, Zhou Y X, *et al.* LZ-101, a novel derivative of danofloxacin, induces mitochondrial apoptosis by stabilizing FOXO3a via blocking autophagy flux in NSCLC cells [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7): 484.
- [26] Belzacq A S, Vieira H L A, Kroemer G, *et al.* The adenine nucleotide translocator in apoptosis [J]. *Biochimie*, 2002, 84(2/3): 167-176.
- [27] Luo T F, Liu G Y, Ma H X, *et al.* Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt pathway contributes to the protection of ginsenoside Rb<sub>1</sub> against neuronal death caused by ischemic insults [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9): 15426-15442.
- [28] Yu B, Ruan M, Liang T, *et al.* The synergic effect of tetramethylpyrazine phosphate and borneol for protecting against ischemia injury in cortex and hippocampus regions by modulating apoptosis and autophagy [J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 63(1): 70-83.
- [29] Wang P, Guan Y F, Du H, *et al.* Induction of autophagy contributes to the neuroprotection of nicotinamide phosphoribosyltransferase in cerebral ischemia [J]. *Autophagy*, 2012, 8(1): 77-87.
- [30] Luo S Q, Rubinsztein D C. BCL2L1/BIM: A novel molecular link between autophagy and apoptosis [J]. *Autophagy*, 2013, 9(1): 104-105.
- [31] He G Q, Xu W M, Tong L Y, *et al.* Gadd45b prevents autophagy and apoptosis against rat cerebral neuron oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(4): 390-403.
- [32] Sirois I, Groleau J, Pallet N, *et al.* Caspase activation regulates the extracellular export of autophagic vacuoles [J]. *Autophagy*, 2012, 8(6): 927-937.
- [33] Bak D H, Zhang E J, Yi M H, *et al.* High  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice prevent streptozotocin-induced Purkinje cell degeneration through BDNF-mediated autophagy [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15465.
- [34] Sun D Y, Lei W, Hou X D, *et al.* PUF60 accelerates the progression of breast cancer through downregulation of PTEN expression [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 821-830.

[责任编辑 李亚楠]