

石斛碱对氧糖剥夺/再灌注诱导 Ht22 细胞损伤的神经保护作用及其机制研究

刘道航¹, 向菲¹, 王钰淳¹, 王倩¹, 饶江燕¹, 董志²

(1. 重庆医科大学重庆市分子生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属儿童医院发育疾病研究教育部重点实验室, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨石斛碱(dendrobium alkaloids, DNLA)对氧糖剥夺/再灌注(oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)作用的 Ht22 海马神经元细胞系的神经保护作用及其机制。**方法:**体外培养 Ht22 细胞系, 同时将细胞随机分为 9 组: 无任何处理的正常对照组(Control 组)、OGD/R 组、OGD/R+DNLA 治疗组(0.03 mg/mL)、OGD/R+DNLA 治疗组(0.3 mg/mL)、OGD/R+DNLA 治疗组(3 mg/mL)、OGD/R+焦亡相关蛋白 Caspase-1 的抑制剂 VX765 组(10 ng/mL)、OGD 过程中培养基加入聚乙二醇 PEG3000(1%)后再灌注组(OGD/R+PEG3000→Media)、OGD/R 后培养基中加入 PEG3000(1%)组(OGD/R+Media→PEG3000)、PEG3000(1%)组。对 Ht22 细胞 OGD 2 h 后复糖复氧 24 h 建立 OGD/R 模型; DNLA 自 OGD 前 12 h 开始即加入并持续到复糖复氧结束; VX765 则自氧糖剥夺开始即加入并持续到复糖复氧结束。MTT 法检测细胞死亡率及乳酸脱氢酶法测定细胞损伤率, 选取 DNLA 最佳剂量组(3 mg/mL)进行后续检测, 流式细胞技术 Annexin V FIFT/PI 双染测细胞焦亡率, Western blot 检测焦亡相关蛋白 Caspase-1、GSDMD 和 GSDMD-C 的表达以及白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-18 的表达, 免疫荧光染色法检测 Ht22 细胞 Caspase-1 的表达情况, 扫描电镜观察 Ht22 细胞的焦亡情况。**结果:**在 OGD/R 诱导 Ht22 细胞损伤后通过扫描电镜观察到细胞焦亡现象, 与 Control 组相比, OGD/R 组细胞活性下降($P=0.008$), 细胞损伤率升高($P=0.009$), 细胞焦亡率升高($P=0.005$), 焦亡相关蛋白 Caspase-1($P=0.000$)、GSDMD($P=0.001$)及 GSDMD-C($P=0.004$)蛋白的表达量明显升高, 炎症因子 IL-1 β ($P=0.006$)、IL-6($P=0.004$)、IL-18($P=0.000$)的表达量亦增加, PEG3000 组细胞存活率和损伤率均无明显变化($P=0.005$, $P=0.007$); 与 OGD/R 组相比, 3 个不同剂量的 DNLA 组细胞活性均有升高, 细胞损伤率明显降低, 细胞焦亡率递减, 以 DNLA 组(3 mg/mL)最为明显($P=0.005$, $P=0.009$, $P=0.003$), 焦亡相关蛋白 Caspase-1、GSDMD 的蛋白表达量降低($P=0.005$, $P=0.008$), GSDMD-C 蛋白表达量升高($P=0.002$), 炎症因子 IL-1 β ($P=0.005$)、IL-6($P=0.000$)、IL-18($P=0.007$)的蛋白表达量降低, VX765 抑制剂组的细胞存活率也有所上升($P=0.007$), 细胞损伤率降低($P=0.002$), 焦亡率也明显降低($P=0.008$), 焦亡相关蛋白 Caspase-1($P=0.006$)、GSDMD($P=0.007$)蛋白的表达量有所降低, GSDMD-C 蛋白的表达量升高($P=0.004$), 炎症因子 IL-1 β ($P=0.006$)、IL-6($P=0.004$)、IL-18($P=0.001$)的蛋白表达量亦降低, 有趣的是 OGD/R+PEG3000(1%)→Media 组较 OGD/R+Media→PEG3000(1%)组细胞存活率增加($P=0.007$, $P=0.006$), 损伤率下降($P=0.006$, $P=0.003$)。**结论:**OGD/R 作用后的 Ht22 细胞存在细胞焦亡现象, DNLA 对 OGD/R 诱导的 Ht22 细胞损伤具有神经保护作用, 其机制可能与抑制焦亡相关蛋白 Caspase-1 的表达有关。

【关键词】石斛碱; Ht22 细胞; 焦亡; 氧糖剥夺/再灌注; Caspase-1; 炎症因子

【中图分类号】R322.81; R329.2*4

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-04-13

Neuroprotective effect and mechanism of dendrobium alkaloids on Ht22 cell injury induced by OGD/R

Liu Daohang¹, Xiang Fei¹, Wang Yuchun¹, Wang Qian¹, Rao Jiangyan¹, Dong Zhi²

(1. Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University;

2. Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the neuroprotective effect and mechanism of dendrobium alkaloids(DNLA) on the Ht22 cell injury induced by oxygen glucose deprivation/reperfusion(OGD/R).

Methods: Ht22 cell lines were cultured *in vitro* and randomly divided into 9 groups, i.e. control group(without any treatment), OGD/R group, OGD/R + low-dose DNLA treatment group(0.03 mg/mL), OGD/R + medium-dose DNLA treatment group(0.3 mg/mL), OGD/R + high-dose DNLA treatment group(3 mg/mL), OGD/R + VX765(inhibitor of Caspase-1) group

作者介绍: 刘道航 Email: dorian.lieu@gmail.com,

研究方向: 脑缺血疾病基础研究。

通信作者: 董志, Email: 100798@cqmu.edu.cn。

基金项目: 重庆市科委自然科学基金资助项目(编号: cstc2018jcyjAX0378, cstc2016jcyjA0268)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190925.1720.008.html>
(2019-09-26)

(10 ng/mL), OGD/R+PEG3000→Media group (normal medium was supplemented with medium containing PEG3000 (1%) in the process of OGD/R), OGD/R+Media→PEG3000 group (normal medium was supplemented with medium containing PEG3000 (1%) after the process of OGD/R) and PEG3000 (1%) group. OGD/R model was established for Ht22 cells after a 2 h oxygen glucose deprivation and 24 h reperfusion. DNLA was added from 12 hours before oxygen glucose deprivation and continued to the end of reperfusion. VX765 was added from the beginning of oxygen glucose deprivation and continued to the end of reperfusion. Cell activity rate was detected by MTT assay, and cell injury rate was determined by LDH assay. Then OGD/R+high-dose DNLA treatment group (3 mg/mL) was chosen for subsequent tests. Cell pyroptotic rate was measured by flow cytometry Annexin V FIFT/PI double staining, and expressions of pyroptosis-related proteins Caspase-1, GSDMD and GSDMD-C, were detected by Western blot assay, as well as interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-18 (IL-18). The expression of Caspase-1 in Ht22 cells was detected by immunofluorescence staining, and the process of pyroptotic Ht22 cells was observed by scanning electron microscopy (SEM). **Results:** The pyroptotic process of Ht22 cells was observed by SEM after OGD/R. Compared with the control group, cell activity notably decreased in the OGD/R group ($P=0.008$), while cell injury rate and pyroptotic rate increased ($P=0.009$, $P=0.005$). Expression of Caspase-1 ($P=0.000$) and GSDMD ($P=0.001$) proteins were significantly increased, while expression of GSDMD-C ($P=0.004$) interestingly decreased. The protein expression levels of inflammatory cytokines IL-1 β ($P=0.006$), IL-6 ($P=0.004$) and IL-18 ($P=0.000$) were also significantly increased, and the viability and injury rate of Ht22 cells in the PEG3000 group were not obviously changed ($P=0.005$, $P=0.007$). Compared with the OGD/R group, the 3 DNLA treatment groups showed increased cell viability and significantly decreased cell injury rate and pyroptotic rate, especially in the high-dose DNLA treatment group ($P=0.005$, $P=0.009$, $P=0.003$). The expression of Caspase-1, GSDMD that related to pyroptosis decreased a lot ($P=0.005$, $P=0.008$), while GSDMD-C proteins levels increased a lot ($P=0.002$), and the protein expression levels of inflammatory cytokines IL-1 β ($P=0.005$), IL-6 ($P=0.000$) and IL-18 ($P=0.007$) were decreased. The cell viability also increased in the OGD/R+VX765 group ($P=0.007$), and at the same time, the cell injury rate and pyroptotic rate obviously decreased ($P=0.002$, $P=0.008$). The expression levels of Caspase-1 ($P=0.006$) and GSDMD ($P=0.007$) were decreased, while the expression levels of GSDMD-C ($P=0.004$) increased. The expression levels of inflammatory cytokines, IL-1 β ($P=0.006$), IL-6 ($P=0.004$) and IL-18 ($P=0.001$), were significantly increased. Intriguingly, compared with the OGD/R+Media→PEG3000 group, the cell viability rate of the OGD/R+PEG3000→Media group increased ($P=0.007$, $P=0.006$) and its cell injury rate decreased ($P=0.006$, $P=0.003$). **Conclusions:** The Ht22 cells induced by OGD/R showed the process of pyroptosis. DNLA has a neuroprotective effect on OGD/R-induced Ht22 cell damage. The mechanisms may involve with the inhibition of the expression of Caspase-1, a protein related to pyroptosis.

[Key words] dendrobium alkaloids; Ht22 cells; pyroptosis; oxygen glucose deprivation/reperfusion; Caspase-1; inflammation

急性缺血性脑卒中是由脑血管血栓形成引起的一种严重神经性损伤疾病,可使大脑缺血缺氧从而导致行动不便、残疾甚至死亡^[1]。用于溶栓的重组组织纤溶酶原激活剂 rt-PA 可作为这一可怕疾病的治疗选择之一,但其明显的缺点(包括发病后仅 4.5 h 的治疗时间窗以及潜在的症状性颅内出血风险)导致其应用具有一定局限性^[2]。越来越多的研究表明炎症在缺血性中风中扮演重要角色,如白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-18 在大脑缺血再灌注后产生的级联反应^[3]。细胞焦亡也称作 Caspase-1 依赖型细胞程序性死亡,是一种新型的高度炎症性程序性细胞死亡,其特征是细胞扁平肿胀、破裂、胞膜破坏并释放促炎细胞因子导致缺血性卒中后的炎症反应^[4]。IL-1 β 、IL-6 及 IL-18 的活化被认为和 Caspase-1 有关^[5]。因此,有效抑制 Caspase-1 信号通路的激活并探讨其可能机制可为治疗缺血性脑卒

中提供新的治疗策略。尽管许多新型化合物已经在细胞实验中被证明可以降低 OGD/R 后神经元损伤,但当其运用于人体时却不能突显其疗效,无论是其强大的毒副作用还是有限的治疗时间窗,都可能是临床试验不成功的原因。因此,许多学者将目光转移到运用无副作用或副作用可耐受的天然药物来治疗急性脑卒中相关疾病。石斛是我国传统名贵中药,多产于贵州和四川。石斛碱 (dendrobium alkaloids, DNLA) 和石斛多糖是石斛的提取物^[6],具有抗氧化、抗菌、抗 A β 损伤及抗炎作用^[7]。DNLA 是石斛的主要活性成分,具有多重明显的生理活性,如抗炎、抗氧化、抗退行性神经病变^[8]。之前的研究表明 DNLA 可明显改善 A β 25-35 和 β -Amyloid 样病变诱导的海马神经元退行性神经病变^[8]及抗氧化应激等作用^[9],但在急性脑损伤模型中的神经保护作用 and 药理机制却鲜有报道。本实验以 DNLA 为原

料,目的是研究焦亡现象是否存在于氧糖剥夺/再灌注(oxygen glucose deprivation/reperfusion,OGD/R)引起的神经元损伤中,同时探讨 DNLA 对缺血再灌注诱导神经元焦亡的影响及其抗炎作用,并明确在体外模型中这种作用是否与 Caspase-1/GSDMD 等信号激活有关。本实验拓展了传统中药单体 DNLA 的病理应用范围,为相关急性脑损伤疾病提供了新的治疗靶点和治疗方案。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

1.1.1 Ht22 细胞系 Ht22 细胞系为小鼠海马神经元细胞系,由广州欧姆尼生物科技有限公司提供。

1.1.2 药物与试剂 DNLA 购于成都瑞芬思生物科技有限公司(CAS:2115-91-5)。F12 培养基、DMEM 无糖培养基购自美国 Gibco 公司;PEG3000 购自上海碧云天公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司;MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司;Caspase-1 抗兔、IL-18 抗兔和 GSDMD 抗兔抗体购于 Abcam 公司;IL-1 β 抗兔、IL-6 抗兔及内参 β -actin 抗兔抗体购于 Proteintech 公司;山羊荧光二抗购于 Proteintech 公司;Dapi 细胞核染色剂购于上海碧云天公司。

1.1.3 实验仪器 Nikon 倒置显微镜(Eclipse C1),流式细胞仪(GuavaeasyCyte™ 8, Millipore, USA),扫描电镜(SU8010, HITACHI)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 Ht22 细胞是一种永生化的小鼠海马神经元细胞,将其培养于含 10%胎牛血清和 1%双抗的 F12 培养基中,培养条件为含 5%CO₂、37 °C 的孵箱,取对数生长期的 Ht22 细胞,0.25%的胰酶消化,按每孔约 5 000 个细胞的密度接种于 96 孔板上用于后续实验研究。

1.2.2 OGD/R 模型的建立 取培养对数期的 Ht22 细胞,胰酶消化,制备单细胞悬液,按每孔约 5 000 个细胞的密度接种于 96 孔板上,细胞贴壁后,正常培养 24 h 后吸弃原培养基,用 PBS 洗涤细胞 3 次后更换为 DMEM 无糖培养基,置于预先设置参数的厌氧培养箱中进行培养,当氧气浓度降至 1%时开始计时,氧糖剥夺 2 h 后,将 DMEM 无糖培养基更换为完全培养基,并重新置于常氧恒温培养箱中复氧再灌注 24 h^[10]。同时将细胞随机分为 9 组:无任何处理的正常对照组(Control 组)、OGD/R 组、OGD/R+低剂量 DNLA 治疗组(0.03 mg/mL)、OGD/R+中剂量 DNLA 治疗组(0.3 mg/mL)、OGD/R+高剂量 DNLA 治疗组(3 mg/mL)、OGD/R+焦亡相关蛋白 Caspase-1 的抑制剂 VX765 组(10 ng/mL)、OGD 过程中培养基加入聚乙二醇 PEG3000(1%)后再灌注组、OGD/R 后培养基中加入 PEG3000(1%)组、OGD/R+PEG3000(1%)组。

1.2.3 Ht22 细胞活性测定 接种细胞于 96 孔板,每组设 6 个复孔,每孔约 5 000 个细胞,每组重复 3 次,各组细胞处理结束,吸弃原培养基,PBS 洗 3 次,每孔加入 100 μ L DMEM 和 10 μ L MTT 溶液,37 °C 孵育 1 h,于酶标仪 450 nm 处测定光密度(optical density,OD)值,以每组 OD 值与正常 Control 组 OD 值的比值来计算细胞活性^[11]。

1.2.4 Ht22 细胞损伤率测定 接种细胞于 96 孔板,每组设 6 个复孔,每孔约 5 000 个细胞,每组重复 3 次,各组细胞处理结束,取各组细胞培养液上清 150 μ L 置于新 96 孔板,加入试剂盒中的 LDH 反应液,37 °C 孵育 30 min,然后于酶标仪 490 nm 处测量样品 OD 值^[11]。细胞 LDH 释放率(%)=细胞培养基中测定的酶活性单位/(细胞裂解液测定的酶活性单位+细胞培养基测定的酶活性单位)×100%。结果取平均值进行统计分析。

1.2.5 流式细胞术 分别设对照组(Control 组)、模型组(OGD/R 组)和 DNLA(3 mg/mL)+OGD/R 组,VX765(10 ng/mL)+OGD/R 组。各组细胞处理结束后,收集每组细胞悬液,调整细胞密度至 1×10^6 个/mL,PBS 冲洗 2 次。按照 Annexin V FITC 试剂盒说明书进行操作,定量分析细胞焦亡水平^[12]。

1.2.6 扫描电镜观察细胞形态 各组处理结束的 Ht22 细胞用 4%戊二醛固定过夜,PBS 冲洗 3 次。将干燥后的试样涂于导电碳膜(MSP-2S,IXRF)上,扫描电镜观察。

1.2.7 免疫荧光法检测 Caspase-1 的表达 各组处理结束的 Ht22 细胞以 4%多聚甲醛固定 10 min。三养血清封闭,然后用 Caspase-1 抗体(1:20)4 °C 孵育过夜。PBS 冲洗细胞 3 次,抗兔二抗 37 °C 恒温孵育 40 min。采用 4,6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI,C1006,碧云天)对细胞核进行染色。用荧光显微镜(Eclipse C1,尼康,日本)观察成像。

1.2.8 Western blot 测定 Caspase-1、GSDMD、GSDMD-C、IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 的蛋白表达量 用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液裂解各组细胞,并用刮刀仔细刮下贴壁生长的 Ht22 细胞,并小心收集于 2 mL 离心管内,然后放置于冷冻离心机中以 12 000 r/min,4 °C 离心 10 min,提取上清液。BCA 法测定蛋白浓度。将 50 μ g 蛋白进行 Western blot 检测^[13],电泳,转膜,5%胎牛血清(BSA)室温封闭 2 h,加入一抗后 4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次(5 min/次),加入抗兔二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次(5 min/次),ECL 化学发光,每个实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

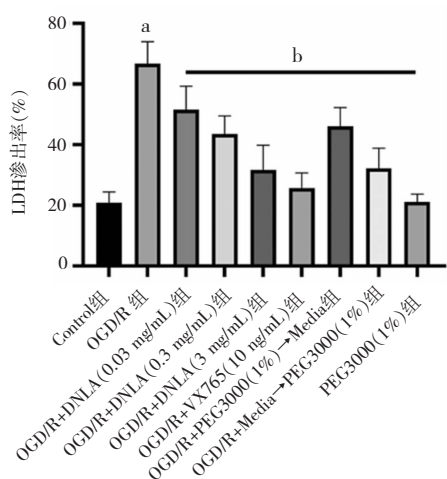
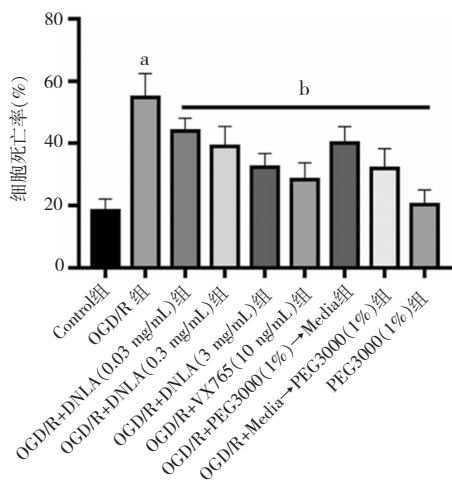
采用 GraphpadPrism 6.0 软件分析数据。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两个样本之间采用 Dunnett-*t* 检验统计分析,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 DNLA 对细胞活性及细胞损伤率的影响

与 Control 组相比,OGD/R 组的 Ht22 细胞活性明显降低,细胞损伤率明显升高($P=0.008$, $P=0.009$)。通过前期实验,

筛选出 3 个 DNLA 有效治疗浓度,相比于 OGD/R 组,3 组不同浓度剂量的 OGD/R+DNLA 组的细胞活性依次上升,细胞损伤率依次下降,当 DNLA 浓度在 3 mg/mL 时,即实验 DNLA 最大治疗浓度时,细胞活性的上升相比于其他 2 个浓度梯度组最为明显,细胞损伤率的下降也最为突出($P=0.005$, $P=0.009$),推断 3 mg/mL 的 DNLA 对细胞保护作用最强。后续实验选择浓度为 3 mg/mL 的 DNLA 进行流式细胞统计焦亡率;而 OGD/R+VX765 组对比 OGD/R 组,其细胞活性升高,细胞损伤率降低($P=0.007$, $P=0.002$);PEG3000(1%)组对细胞存活率和损伤率均无明显改变;OGD/R+PEG3000(1%)→Media 组相较于 OGD/R 组的 Ht22 细胞活性增加,细胞损伤率降低($P=0.004$, $P=0.006$);OGD/R+Media→PEG3000(1%)组相较于 OGD/R 组的 Ht22 细胞活性亦有增加,细胞损伤率降低($P=0.001$, $P=0.005$);有趣的是 OGD/R+PEG3000(1%)→Media 组相比 OGD/R+Media→PEG3000(1%)组的细胞活性更高,细胞损伤率更低,见图 1、表 1。

A. DNLA 对 Ht22 细胞 LDH 渗出的影响 ($n=5$)B. DNLA 对 Ht22 细胞死亡率的影响 ($n=5$)

注:每组取值最中间的 5 个点的均值为本孔的 OD 值;a:相较于 Control 组, $P<0.01$;b:相较于 OGD/R 组, $P<0.01$

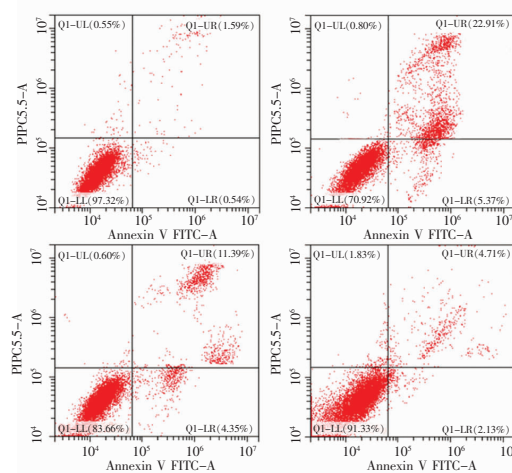
图 1 DNLA 对 Ht22 细胞的神经保护作用

表 1 不同浓度 DNLA 处理 Ht22 细胞 LDH 渗出率和 MTT 法测定细胞活性

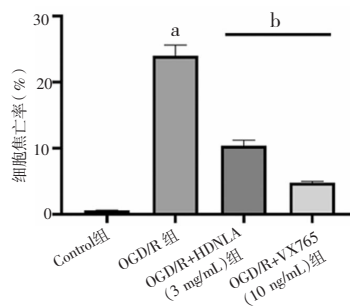
组别	LDH	MTT
Control组	20.922 ± 3.559	18.325 ± 3.804
OGD/R 组	66.840 ± 7.195	54.810 ± 7.611
OGD/R+DNLA(0.03 mg/mL)组	51.595 ± 7.761	43.915 ± 4.165
OGD/R+DNLA(0.3 mg/mL)组	43.875 ± 6.101	39.005 ± 6.407
OGD/R+DNLA(3 mg/mL)组	31.780 ± 8.125	32.340 ± 4.408
OGD/R+VX765(10 ng/mL)组	25.675 ± 5.124	28.280 ± 5.515
OGD/R+PEG3000(1%)→Media 组	46.075 ± 6.242	40.035 ± 5.312
OGD/R+Media→PEG3000(1%)组	32.926 ± 6.058	31.950 ± 6.371
PEG3000(1%)组	21.800 ± 3.595	20.285 ± 4.738
F 值	125.700	88.144
P 值	0.000	0.000

2.2 Ht22 细胞焦亡的变化

因为焦亡细胞和坏死细胞 PI 和 Annexin V 染色为阳性^[14],为进一步确定细胞焦亡是否发生在 OGD/R 处理的 Ht22 细胞中,采用流式细胞技术进行鉴定。结果发现 Control 组的 Ht22 细胞几乎没有发生焦亡,而 OGD/R 组的 Ht22 细胞焦亡率升高($P=0.005$),3 mg/mL 的 DNLA 预处理后进行 OGD/R,细胞焦亡率递减($P=0.003$)。同样,10 ng/mL 的 VX765 预处理后 Ht22 细胞进行 OGD/R,其细胞焦亡率也明显降低($P=0.008$),见图 2、表 2。



Q1-UR象限细胞认定为焦亡阳性细胞

A. 流式细胞测定 Ht22 细胞焦亡率 ($n=5$)

注:a,相较于 Control 组, $P<0.01$;b:相较于 OGD/R 组, $P<0.01$

B. 不同组别细胞焦亡率的比较 ($n=5$)

图 2 DNLA 对 Ht22 细胞焦亡的影响

表 2 DNLA (3 mg/mL) 处理 Ht22 细胞流式细胞法测定焦亡率

组别	焦亡率
Control组	0.580 ± 0.030
OGD/R组	23.976 ± 1.652
OGD/R+ DNLA 组 (3 mg/mL)	10.360 ± 0.840
OGD/R+VX765 组 (10 ng/mL)	4.756 ± 0.230
<i>F</i> 值	357.220
<i>P</i> 值	0.000

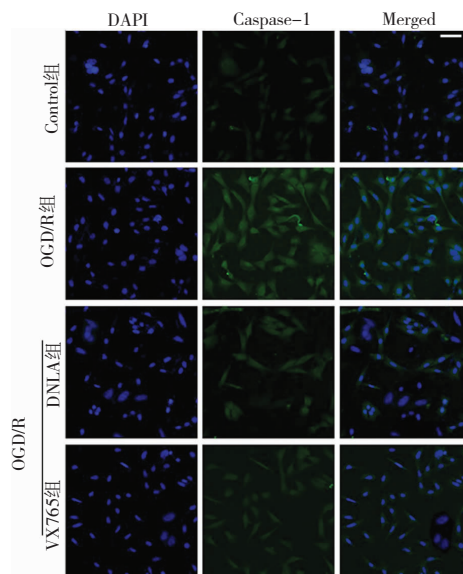
2.3 DNLA 在 OGD/R 诱导下对 Ht22 细胞中 Caspase-1/GS-DMD 焦亡信号通路的调控

相比于 Control 组, OGD/R 组焦亡相关蛋白 Caspase-1、GSDMD 和 GSDMD-C 表达量明显增加 ($P=0.000, P=0.001, P=0.004$)。与 OGD/R 组相比, 加入不同治疗量 DNLA 处理的 3 组 Ht22 细胞 Caspase-1 蛋白表达量下降, GSDMD 蛋白表达量下降, 以 OGD/R+DNLA 组 (3 mg/mL) 组 Caspase-1 和 GSDMD 蛋白表达量下降最为明显 ($P=0.005, P=0.008$)。有趣的是, 在经过 DNLA 和 VX765 处理后 OGD/R、GSDMD-C 蛋白表达量呈增长趋势 ($P=0.002, P=0.004$), 这可能与 GSDMD-N 与 GSDMD-C 之间的蛋白表达竞争抑制有关 (图 3、图 4、表 3)。

2.4 DNLA 在 OGD/R 诱导下对 Ht22 细胞 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 炎症因子的调控

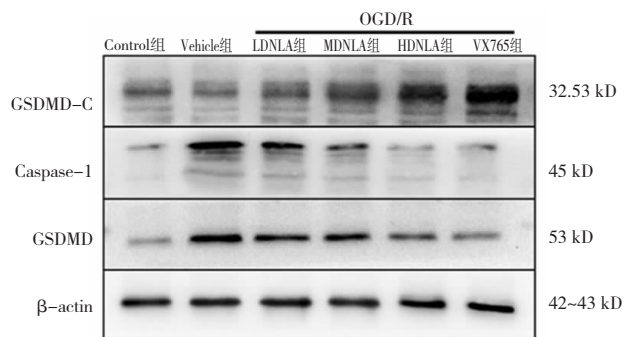
相比于 Control 组, OGD/R 组炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 蛋白表达量明显升高 ($P=0.006, P=0.004, P=0.000$)。与 OGD/R 组相比, 加入 DNLA 处理后, 细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 蛋白表达量均有下降 ($P=0.005, P=0.000, P=0.007$);

VX765 抑制剂组亦有相同趋势 ($P=0.006, P=0.004, P=0.001$), 提示 DNLA 可能通过降低焦亡相关蛋白 Caspase-1 蛋白的表达来减少炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 蛋白的表达 (图 5、表 4)。

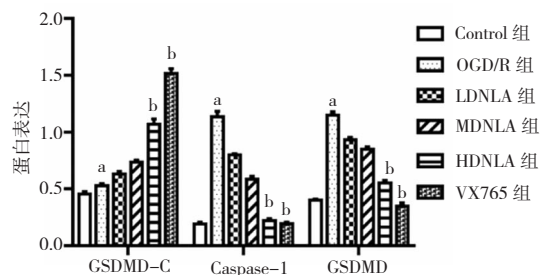


注: 各组 Ht22 细胞 Caspase-1 在经过 DNLA 和 VX765 处理后的荧光表达情况 ($n=5$); 绿色细胞为阳性细胞, 蓝色为细胞核染色; 标尺 = 50 μ m

图 3 DNLA 对 OGD/R 诱导的 Ht22 海马神经元 Caspase-1 蛋白表达的影响



A. 焦亡相关蛋白 Western blot 测定结果 ($n=3$)



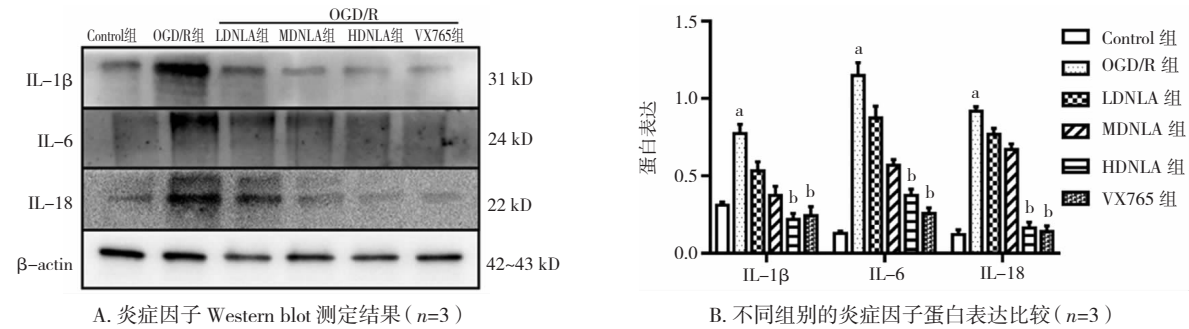
B. 不同组别的焦亡相关蛋白表达比较 ($n=3$)

注: 所有值都表示为相应蛋白 OD 值与 β -actin 蛋白的 OD 值的百分比, 并通过 β -actin 蛋白表达水平进行校正; a: 相较于 Control 组, $P<0.01$; b: 相较于 OGD/R 组, $P<0.01$

图 4 DNLA 对 OGD/R 诱导的 Ht22 细胞 Caspase-1 蛋白表达的影响

表 3 不同浓度 DNLA 处理 Ht22 细胞后 Caspase-1、GSDMD 和 GSDMD-C 蛋白表达量

组别	Caspase-1	GSDMD	GSDMD-C
Control组	0.193 ± 0.015	0.400 ± 0.010	0.456 ± 0.054
OGD/R 组	1.136 ± 0.045	1.150 ± 0.018	0.526 ± 0.013
OGD/R+DNLA 组 (0.03 mg/mL) 组	0.800 ± 0.010	0.933 ± 0.031	0.633 ± 0.011
OGD/R+DNLA 组 (0.3 mg/mL) 组	0.586 ± 0.025	0.850 ± 0.022	0.733 ± 0.020
OGD/R+DNLA 组 (3 mg/mL) 组	0.223 ± 0.015	0.550 ± 0.026	1.070 ± 0.045
OGD/R+VX765 组 (10 ng/mL) 组	0.193 ± 0.016	0.350 ± 0.030	1.516 ± 0.040
<i>F</i> 值	793.900	539.200	532.215
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000



注:所有值都表示为相应蛋白 OD 值与 β -actin 蛋白的 OD 值的百分比,并通过 β -actin 蛋白表达水平进行校正;a:相较于 Control 组, $P<0.01$;b:相较于 OGD/R 组, $P<0.01$

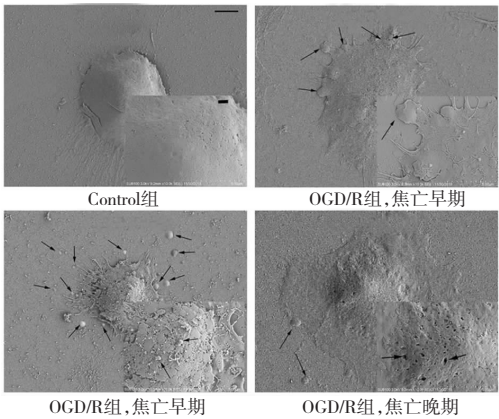
图 5 DNLA 对 OGD/R 后炎症因子蛋白表达的影响

表 4 不同浓度 DNLA 处理 Ht22 细胞后 IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 蛋白表达量

组别	IL-1 β	IL-6	IL-18
Control 组	0.310 $\pm$ 0.020	0.126 $\pm$ 0.015	0.120 $\pm$ 0.030
OGD/R 组	0.773 $\pm$ 0.060	1.146 $\pm$ 0.085	0.916 $\pm$ 0.030
OGD/R+DNLA (0.03 mg/mL)	0.533 $\pm$ 0.056	0.873 $\pm$ 0.077	0.766 $\pm$ 0.040
OGD/R+DNLA (0.3 mg/mL)	0.373 $\pm$ 0.058	0.566 $\pm$ 0.037	0.670 $\pm$ 0.036
OGD/R+DNLA (3 mg/mL)	0.216 $\pm$ 0.040	0.373 $\pm$ 0.040	0.163 $\pm$ 0.037
OGD/R+VX765 组 (10 ng/mL)	0.233 $\pm$ 0.055	0.256 $\pm$ 0.035	0.140 $\pm$ 0.036
F 值	51.732	153.101	313.310
P 值	0.000	0.000	0.000

2.5 Ht22 细胞焦亡形态学观察

扫描电镜对 OGD/R 诱导后的 Ht22 细胞不同阶段的细胞膜形态特点进行观察。发现 Control 组的 Ht22 细胞肿胀程度较轻,相比于 Control 组,在 OGD/R 组成功观测到不同阶段的 Ht22 细胞焦亡形态,在 OGD/R 前期,细胞膜损伤严重,能够看到明显的泡状突起和焦亡小体流出,在 OGD/R 后期又观测到焦亡相关的非选择性渗透膜孔(图 6)。



注:描电镜下 Control 组 Ht22 细胞和 OGD/R 组不同阶段的 Ht22 细胞的形态学比较;箭头处分别为焦亡小体和 非选择性渗透膜孔;标尺 =5 μ m

图 6 Ht22 细胞在 OGD/R 不同阶段的焦亡形态

3 讨论

脑卒中是世界范围内继心血管疾病和癌症之后最常见的死亡原因之一,其患病率随着年龄的增长而增加。短暂性脑缺血的后果往往很严重,并对

脆弱的海马神经元 CA1 区的锥体神经元有选择性损伤作用^[5]。本研究建立了 OGD/R 模型,实验结果表明 OGD/R 组的 Ht22 细胞活性降低及细胞损伤率升高,说明氧糖剥夺 2 h 再灌注 24 h 形成的 OGD/R 模型是成功的;而经过 DNLA 及 Caspase-1 抑制剂 VX765 治疗后,Ht22 细胞的活性均有不同程度的升高,细胞损伤率则明显降低,表明 DNLA 对 OGD/R 引起的 Ht22 细胞损伤有一定保护作用。聚乙二醇 (PEG) 在之前的实验中被用来进行细胞焦亡的鉴定,因为其可物理性阻断焦亡细胞膜膜孔释放 LDH 及炎症因子的特性^[16],本实验通过筛选发现较大体积的 PEG (如 PEG8000) 具有明显的细胞毒性,而较小体积的 PEG3000 则对细胞存活率基本无任何影响,所以实验选择了体积较小的 PEG3000 (1%) 鉴定 Ht22 细胞是否发生焦亡。OGD 前培养基加入聚乙二醇 PEG3000 (1%) 后再灌注组相比 OGD 后培养基中加入 PEG3000 (1%) 再灌注 24 h 组的细胞活性更高,细胞损伤率更低。流式细胞结果也表明 OGD/R 处理诱导的 Ht22 细胞死亡方式主要是焦亡,而 DNLA 和 VX765 则能逆转其焦亡的发生。通过扫描电镜首次观察到 OGD/R 引起 Ht22 细胞焦亡的发生,提示 Ht22 细胞在 OGD 过程中发生了细胞焦亡,其机制可能和焦亡相关蛋白 Caspase-1 的表达有关。

细胞焦亡是一种由微生物刺激、钙超载和自由基引起的宿主细胞死亡新途径,具有明显的固有炎

症特点^[17]。因此,深入探讨 DNLA 对神经细胞的损伤机制对于治疗多种神经系统疾病具有重要意义。本研究成功并首次证明了在 OGD/R 模型中 DNLA 可通过抑制 Caspase-1 的表达以降低 Ht22 细胞焦亡的发生来起到神经保护作用,并且初探其特异性抑制剂 VX765 抗 OGD/R 诱导的神经元损伤机制。实验表明在 OGD/R 模型中 DNLA 能通过减少 Caspase-1 蛋白表达量来降低 Ht22 细胞焦亡的发生,且具有剂量依赖性。GSDMD 作为 Caspase-1 的底物,前者可被后者激活并切割形成 GSDMD-C 片段和 GSDMD-N 片段,GSDMD-N 片段在细胞膜上寡聚从而导致细胞膜非选择性离子通道形成^[18],为炎性小体 IL-1 β 、IL-6 及 IL-18 的释放创造了条件^[19],而 GSDMD-C 的过表达则会抑制 GSDMD-N 在细胞膜上的寡聚^[20]。本实验通过观察 GSDMD 和 GSDMD-C 蛋白量的变化来推测 GSDMD-N 蛋白表达量的改变,结果表明 DNLA 可通过抑制 Caspase-1 来减少 GSDMD 蛋白的表达,从而减少 GSDMD-N 片段的寡聚,同时其抑制剂 VX765 对 Ht22 细胞的保护作用与增强其抗焦亡能力有关,表明 DNLA 是通过抑制 Caspase-1/GSDMD 信号通路可抑制 OGD/R 诱导的 Ht22 细胞焦亡的发生来发挥神经保护作用。IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 在脑缺血再灌注模型中被公认为重要的神经损伤因子^[21],而 Caspase-1 则能促进炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 IL-18 的成熟^[22]。本研究结果显示,DNLA 可明显降低 OGD/R 所致的 Ht22 细胞对以上炎症因子的成熟和释放,从而抑制细胞焦亡,这也间接证实了海马神经元是 IL 受体分布丰富的区域。

综上所述,本实验证明了在 OGD/R 模型中 Ht22 细胞焦亡现象的发生;DNLA 可通过抗焦亡对 OGD/R 诱导的 Ht22 细胞损伤模型发挥神经保护作用,其机制可能与 Caspase-1/IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 Caspase-1/GSDMD/IL-1 β 、IL-6、IL-18 两条通路有关。

参 考 文 献

- [1] Jain KK. Neuroprotection in cerebrovascular disease[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2000, 9(4): 695-711.
- [2] Chi MS, Chan LY. Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke in patients not fulfilling conventional criteria[J]. Neurologist, 2017, 22(6): 219-226.
- [3] Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells[J]. J Leukoc Biol, 2010, 87(5): 779-789.
- [4] Tobin MK, Bonds JA, Minshall RD, et al. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2014, 34(10): 1573-1584.
- [5] Xi H, Zhang Y, Xu Y, et al. Caspase-1 inflammasome activation mediates homocysteine-induced pyroptosis in endothelial cells[J]. Circ Res, 2016, 118(10): 1525-1539.
- [6] Zhang GN, Zhong LY, Bligh SW, et al. Bi-bicyclic and bi-tricyclic compounds from *Dendrobium thysiflorum*[J]. Phytochemistry, 2005, 66(10): 1113-1120.
- [7] Zhang W, Wu Q, Lu YL, et al. Protective effects of *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids on amyloid beta (25-35)-induced neuronal injury[J]. Neural Regen Res, 2017, 12(7): 1131-1136.
- [8] Li LS, Lu YL, Nie J, et al. *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloid, a novel autophagy inducer, protects against axonal degeneration induced by A β 25-35 in hippocampus neurons *in vitro*[J]. CNS Neurosci Ther, 2017, 23(4): 329-340.
- [9] Nie J, Jiang LS, Zhang Y, et al. *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids decreases the level of intracellular beta-amyloid by improving impaired autolysosomal proteolysis in APP/PS1 mice[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1479.
- [10] Mao XY, Zhou HH, Li X, et al. Huperzine A alleviates oxidative glutamate toxicity in hippocampal HT22 cells via activating BDNF/TrkB-dependent PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36(6): 915-925.
- [11] Jia Z, Dong A, Che H, et al. 17-DMAG protects against hypoxia-/reoxygenation-induced cell injury in HT22 cells through Akt/Nrf2/HO-1 pathway[J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(2): 95-102.
- [12] McKinnon KM. Flow cytometry: an overview[J]. Curr Protoc Immunol, 2018, 120: 5.1.1-5.1.11.
- [13] Akanda MR, Kim MJ, Kim IS, et al. Neuroprotective effects of *Sigesbeckia pubescens* extract on glutamate-induced oxidative stress in HT22 cells via downregulation of MAPK/caspase-3 pathways[J]. Cell Mol Neurobiol, 2018, 38(2): 497-505.
- [14] Chen D, Yu J, Zhang L. Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1865(2): 228-236.
- [15] Chen H, Yoshioka H, Kim GS, et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(8): 1505-1517.
- [16] Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by Caspase-1-dependent necrosis[J]. Mol Microbiol, 2000, 38(1): 31-40.
- [17] Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases[J]. Immunol Rev, 2017, 277(1): 61-75.
- [18] Sobowale OA, Parry-Jones AR, Smith CJ, et al. Interleukin-1 in stroke: from bench to bedside[J]. Stroke, 2016, 47(8): 2160-2167.
- [19] Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling[J]. Nature, 2015, 526(7575): 666-671.
- [20] Shi J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. Nature, 2015, 526(7575): 660-665.
- [21] Zhao GC, Yuan YL, Chai FR, et al. Effect of *Melilotus officinalis* extract on the apoptosis of brain tissues by altering cerebral thrombosis and inflammatory mediators in acute cerebral ischemia[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 1346-1352.
- [22] Ito M, Shichita T, Okada M, et al. Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury[J]. Nat Commun, 2015, 6: 7360.

(责任编辑: 冉明会)