

和厚朴酚对过氧化氢诱导的人神经母细胞瘤细胞损伤的保护作用及机制研究

钱保进, 王 玉

摘要 目的 观察和厚朴酚(HNK)对过氧化氢(H_2O_2)诱导的人来源神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)损伤的保护现象,并探究其可能机制。方法 用 $400 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理SH-SY5Y细胞24 h,建立细胞损伤模型。保护组用HNK预孵SH-SY5Y细胞6 h后,加入 $400 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 共同作用24 h,探讨HNK的作用。采用CCK-8比色法测定细胞活力;流式细胞术测定细胞凋亡;Western blot法检测凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax、Caspase-3表达,以及内质网应激(ERS)相关蛋白BIP、CHOP及Caspase-12表达。结果 HNK增加 H_2O_2 作用下SH-SY5Y细胞活力($P < 0.01$),降低细胞凋亡率,增高Bcl-2/Bax比值,降低Caspase-3($P < 0.05$)、BIP、CHOP及Caspase-12蛋白表达($P < 0.01$)。结论 HNK通过抑制ERS相关的凋亡保护 H_2O_2 对SH-SY5Y细胞的损伤作用。

关键词 和厚朴酚;神经母细胞瘤细胞;内质网应激

中图分类号 R 745.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)10-1520-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.008

内质网(endoplasmic reticulum, ER)在真核细胞胞质内广泛分布,是细胞内合成蛋白质并进行折叠、寡聚化加工的重要场所,可维持内环境稳定;同时内质网在脂类代谢中起着核心作用。内质网在受到高糖、高脂等多种因素刺激时,生理功能发生紊乱,称为内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS);持续的ERS可能通过激活凋亡途径造成神经元细胞的损伤和凋亡。目前在多种神经退行性疾病中发现了ERS导致神经元细胞凋亡的现象,比如帕金森病(Parkinsons disease, PD)^[1]。研究^[2-4]表明PD主要的病理改变为多巴胺神经元变性死亡以及由应激诱发的神经元凋亡。其患者黑质内的神经细胞凋亡被过度激活^[5]。PD的发生发展与神经细胞ERS相关的凋亡有密切联系^[1,6]。和厚朴酚(honokiol,

HNK)是传统中药厚朴中分离出的有效成分之一,是一种含有酚羟基的活性物质,具有一定的心脑血管保护功效^[7-8]。此外,研究^[9-10]表明HNK具有抑制氧化应激和神经炎症等的神经保护作用。但HNK对神经细胞的ERS相关的凋亡作用目前尚不清楚。该实验用过氧化氢(H_2O_2)处理人来源神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)构建细胞损伤模型,探讨HNK对神经元细胞ERS损伤的保护作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y) SC-SP-5014 购于中科院上海细胞库;HNK 购于成都德锐可生物科技有限公司;DMEM 培养液和胎牛血清购于美国 Hyclone 公司;PBS 购于美国 GIBCO 公司;胰蛋白酶、CCK-8、流式试剂盒购于美国 Sigma 公司;Bcl-2、Bax 抗体购于美国 CST 公司;Caspase-3、 β -actin、BIP、CHOP、Caspase-12 抗体、羊抗兔 IgG 二抗辣根过氧化物酶(HRP)标记购于上海中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 细胞培养 SH-SY5Y 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37°C 、5% CO_2 恒温培养箱中进行培养,使其贴壁生长,每日更换培养基 1 次。通过倒置显微镜观察,当细胞覆盖到培养瓶 85% 左右时用胰酶消化进行传代。

1.3 实验分组 实验分为 4 组。① 保护组:先加入 $10 \mu\text{mol/L}$ HNK 于 DMEM 培养液孵育 6 h,再加入 H_2O_2 ;② 溶剂组:培养液加入与保护组 HNK 等体积的 DMSO;③ 对照组:只添加培养液;④ 损伤组:培养液加入终浓度为 $400 \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 。

1.4 建立模型 当 SH-SY5Y 细胞处于对数生长期时,以 3×10^4 个/ml 的密度接种于 96 孔板中,每孔 $100 \mu\text{l}$ 孵育 12 h 后,再加入梯度浓度的 H_2O_2 (0、50、100、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 24 h,每孔加入 $10 \mu\text{l}$ CCK-8 37°C 孵育 1 h,通过酶标仪于 450 nm 波长下,测量每孔吸光度值。用对照组的百分比来表示细胞活性从而筛选出 H_2O_2 的终浓度。

2020-06-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81671290)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院神经内科,合肥 230022

作者简介:钱保进,男,硕士研究生;

王 玉,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-

mail: wangyu18b@163.com

1.5 CCK-8 比色法筛选 HNK 浓度 当 SH-SY5Y 细胞处于对数生长期时, 稀释到 3×10^4 个/ml 的密度后接种于 96 孔板中, 每孔 100 μl , 孵育 12 h 后, 对照组和损伤组中加入的培养液含 10% 胎牛血清; HNK 组和溶剂组分别加入不同浓度 (0、1、5、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$) HNK 及等体积 DMSO 孵育 6 h。孵育结束吸取掉上清液, 对照组再加入 DMEM 培养液, 损伤组和不同浓度的 HNK 组加 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 条件下孵育 24 h, 然后每孔加入 10 μl CCK-8, 最终筛选出 HNK 的适宜浓度。

1.6 免疫荧光染色观察 SH-SY5Y 细胞凋亡 细胞用 6 孔板接种, 每组按分组要求给予不同处理后, 吸出上清液, 经清洗、4% 多聚甲醛固定、0.1% Triton X-100 通透、3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物后滴加 5% BSA 于 37 $^\circ\text{C}$ 封闭 30 min。清洗后滴加合适浓度的一抗, 接着在湿盒中 4 $^\circ\text{C}$ 条件下孵育过夜, 再用 PBS 清洗。加入荧光二抗 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 清洗 3 次, 每次间隔 5 min。加入 DAPI 进行细胞核染色, 室温避光条件下孵育 10 min 后用 PBS 清洗 3 次, 每次间隔 5 min。接着滴加抗荧光淬灭剂后封片, 并迅速用荧光显微镜下观察。

1.7 流式细胞仪检测 SH-SY5Y 细胞凋亡 细胞用 6 孔板接种, 每组按分组要求给予不同处理后, 消化细胞, 制成单细胞悬液, 收集细胞于流式管内, 再用预冷 PBS 洗 3 次。在 EP 管中将细胞重悬浮于 200 μl 结合缓冲液里, 每管常规加入 10 μl 荧光素 FITC 标记的膜联蛋白 V (AnnexinV-FITC) 和 5 μl 碘化丙啶 (PI) 进行染色, 混匀后避光室温孵育 15 min, 再加入 300 μl 结合缓冲液后立即检测。根据 AnnexinV-FITC 及 PI 的荧光强度, 流式细胞仪检测细胞凋亡率 (%) , 同样操作重复 3 次。

1.8 Western blot 检测凋亡和内质网应激相关蛋白表达 收集各实验组处理的细胞, PBS 清洗 1 次后加入适当细胞裂解液。常规提取细胞蛋白, 再用 BCA 法对蛋白含量进行定量测定。取 20 μg 蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳; 再通过湿转法将蛋白条带印迹到 PVDF 膜上; 用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h; 再分别用特异的细胞抗体 (Bcl-2、Bax、Caspase-3、BIP、CHOP、Caspase-12、内参 GAPDH) 孵育, 在 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中过夜; 隔天洗膜 15 min \times 3 次; 相应的二抗在室温条件下孵育 1 h; 洗膜 8 min \times 3 次; 显色。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行处理, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布的两组间计量数据比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因

素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 H_2O_2 对 SH-SY5Y 细胞活性的影响

不同 H_2O_2 浓度 (0、50、100、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 SH-SY5Y 细胞后, 细胞活性分别为 (2.64 \pm 0.23)、(2.50 \pm 0.57)、(2.37 \pm 0.35)、(1.97 \pm 0.42)、(1.50 \pm 0.34)、(1.11 \pm 0.23), 各组间差异有统计学意义 ($F = 47.01, P < 0.001$), 见图 1。可见在一定范围内, 细胞损伤程度逐渐增加, 细胞活性明显下降。当 H_2O_2 的浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞损伤接近 50%, 因此选取 400 $\mu\text{mol/L}$ 作为造细胞损伤模型的浓度。

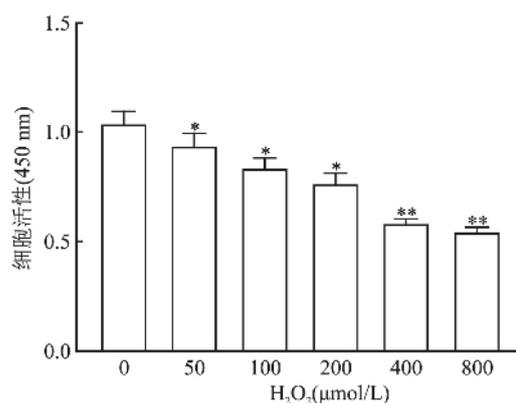


图 1 不同浓度 (50、100、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$) H_2O_2 对 SH-SY5Y 细胞活性的影响

与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较: * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

2.2 不同浓度 HNK 对 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞活性的影响 进一步实验观察不同浓度的 HNK 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的作用, 图 2 中细胞活性分别为 (1.98 \pm 0.91)、(1.23 \pm 0.09)、(1.32 \pm 0.13)、(1.40 \pm 0.10)、(1.56 \pm 0.13)、(1.78 \pm 0.19)、(1.54 \pm 0.17)、(0.91 \pm 0.17), 各组间差异有统计学意义 ($F = 28.87, P < 0.001$)。实验结果提示, 低浓度时, HNK 对 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡有一定保护作用, 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 时保护作用最佳; 随着浓度升高保护作用减弱, 达到 50 $\mu\text{mol/L}$ 时甚至产生损伤作用。因此, 选取 10 $\mu\text{mol/L}$ 作为观察 HNK 对 SH-SY5Y 细胞保护作用的浓度。

2.3 HNK 对 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响 免疫荧光法结果发现, 与对照组比较, 损伤组经过 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后, 凋亡细胞增多, Caspase-3 的荧光较强。与损伤组比

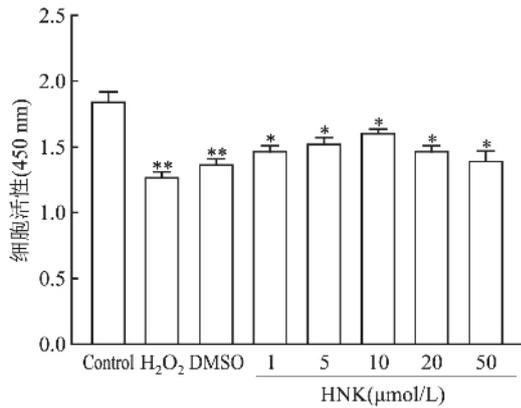


图2 不同浓度 HNK(1、5、10、20、50 μmol/L)对 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞活性的影响
与对照组(Control 组)比较: * P < 0.01, ** P < 0.001

较 保护组凋亡细胞减少, Caspase-3 的荧光强度减弱(图3)。此外, 溶剂组与损伤组比较, H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡情况差异无统计学意义。

在流式细胞检测仪上 AnnexinV-PI 双染色显示, 与对照组比较, 损伤组的细胞凋亡率升高, 差异有统计学意义(P < 0.01); 与损伤组比较, 保护组的细胞凋亡率下降, 差异有统计学意义(P < 0.01), 见图4。溶剂组与损伤组比较, H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡率差异无统计学意义。

2.4 HNK 对 Bcl-2/Bax 比值的影响 损伤组较对照组 Bcl-2/Bax 比值明显降低(P < 0.01), 保护组较损伤组比值增高, 差异有统计学意义(P < 0.01), 见图5。溶剂组与损伤组比较, HNK 对 Bcl-2/Bax 比值差异无统计学意义。

2.5 HNK 对 Caspase-3 蛋白表达的影响 与对照组相比, 损伤组 Caspase-3 蛋白表达增加, 而保护组 Caspase-3 蛋白表达降低, 差异均有统计学意义(P < 0.01), 见图6; 与损伤组比较, 溶剂组 HNK 对 Caspase-3 蛋白表达的影响差异无统计学意义。

2.6 HNK 对 ERS 的影响 损伤组 BIP、CHOP 及 Caspase-12 表达上调, 差异有统计学意义(P < 0.01), 提示 ERS 增加。加入低浓度 HNK 保护后, ERS 相关指标下调, 差异有统计学意义(P < 0.01), 见图7。溶剂组与损伤组比较, HNK 对 BIP、CHOP 及 Caspase-12 蛋白表达的影响差异无统计学意义。

3 讨论

ERS 过度可以干扰细胞正常功能, 或通过 ERS 相关的凋亡途径引起细胞凋亡, 导致疾病的发生。研究^[1]表明 ERS 介导的凋亡信号传导途径可能与多种中枢退行性疾病如 PD 的发病有关。HNK 是中药厚朴中有效活性成分之一, 有研究^[11]报道 HNK 具有抗炎、抗肿瘤和抗氧化的作用。但 HNK 对神经元 ERS 的作用尚不十分清楚。本研究主要探究 HNK 对 H₂O₂ 诱导神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及其可能机制。

Caspase-12 是起始 Caspase, 是 ERS 的特异性凋亡成员, 其诱导 Caspase-3 激活^[12-13]。CHOP 是 ERS 条件下诱导的转录因子, 可引起细胞周期停滞及 DNA 损伤, 使细胞发生凋亡, 已经被广泛视为 ERS 的凋亡标志^[14]。目前认为 CHOP 可以通过下调 Bcl-2 的表达而促进 ERS 诱导的细胞凋亡。因此

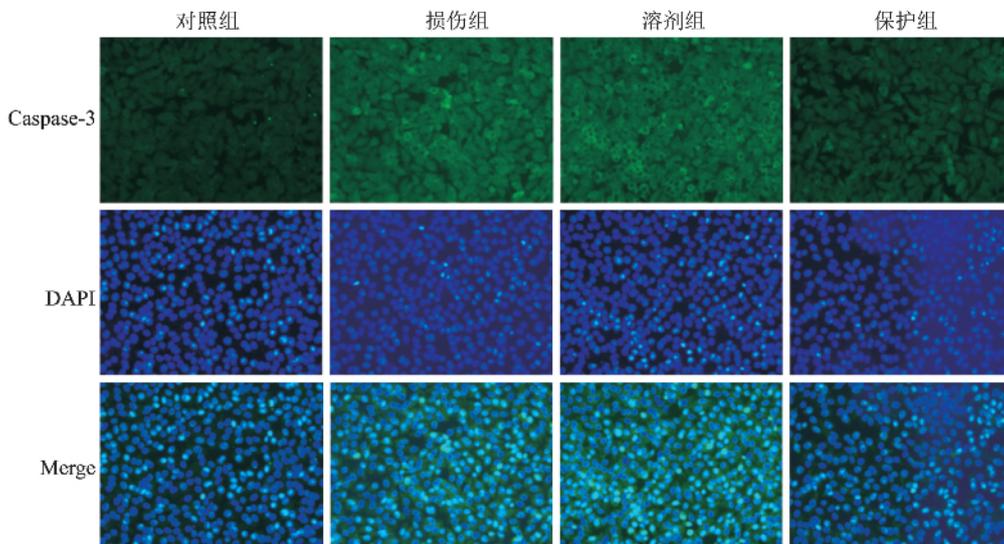


图3 免疫荧光观察 SH-SY5Y 细胞的 Caspase-3 表达情况 ×50

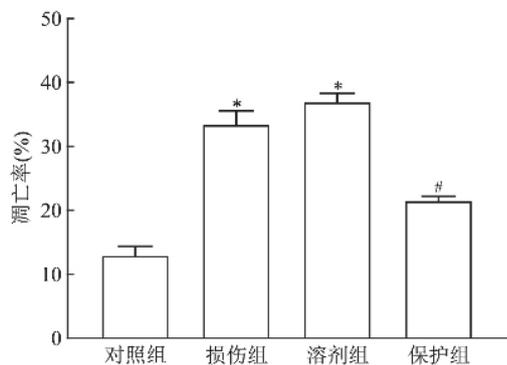
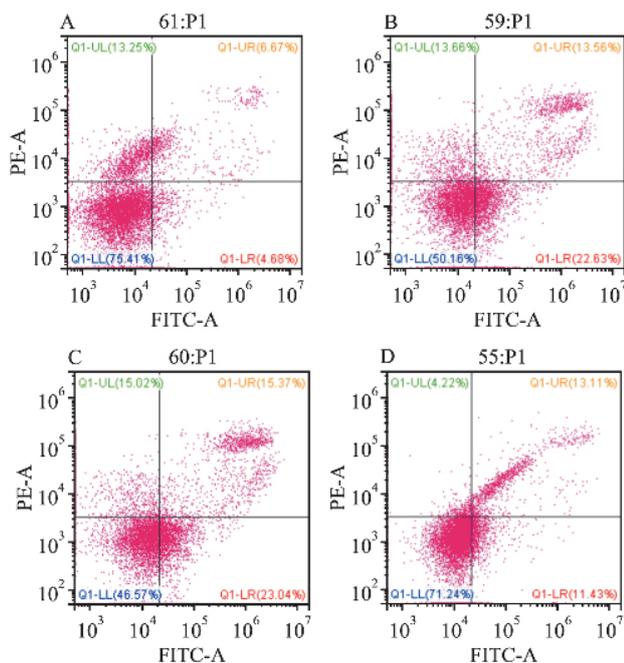


图4 流式细胞术测定 SH-SY5Y 细胞的凋亡情况

A: 对照组; B: 损伤组; C: 溶剂组; D: 保护组; 与对照组比较:

* $P < 0.01$; 与损伤组比较: # $P < 0.01$

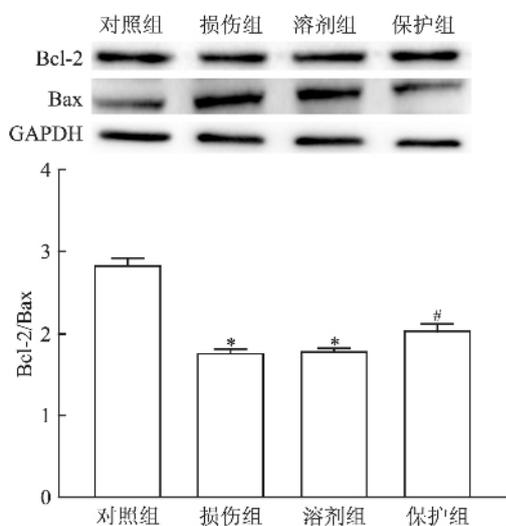


图5 Bcl-2/Bax 比值情况

与对照组比较: * $P < 0.01$; 与损伤组比较: # $P < 0.01$

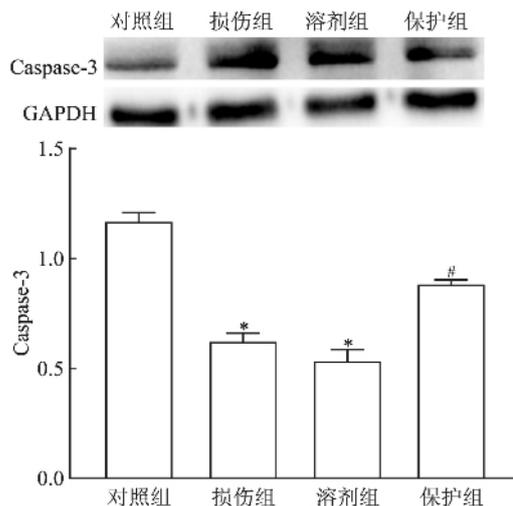


图6 Caspase-3 蛋白表达情况

与对照组比较: * $P < 0.01$; 与损伤组比较: # $P < 0.01$

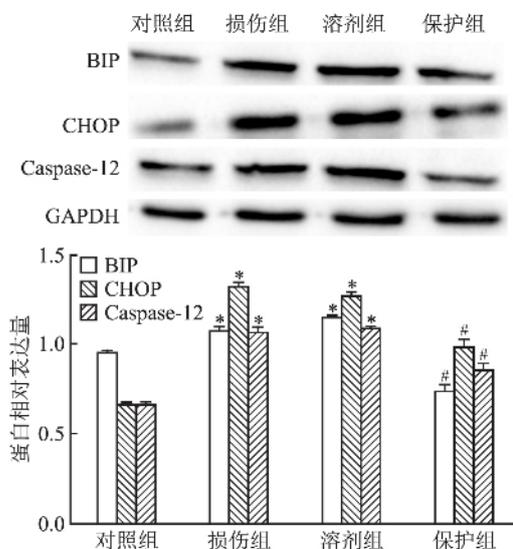


图7 BIP、CHOP 及 Caspase-12 蛋白表达情况

与对照组比较: * $P < 0.01$; 与损伤组比较: # $P < 0.01$

通过药物干预后研究 Caspase-12 和 CHOP 表达可以初步了解药物对 ERS 的作用。

本研究中,与对照组比较, H_2O_2 刺激后造成 SH-SY5Y 细胞损伤 ($P < 0.01$), 导致细胞凋亡, 同时 Bcl-2/Bax 比值显著降低, Caspase-3 蛋白水平增加 ($P < 0.01$), 此外 BIP、CHOP 及 Caspase-12 蛋白表达升高 ($P < 0.01$) 提示 H_2O_2 刺激的神经细胞 ERS 损伤模型成功。溶剂组与损伤组比较, HNK 对 BIP、CHOP 及 Caspase-12 蛋白表达的影响差异无统计学意义, 提示溶剂 DMSO 不会对研究造成影响。与损伤组比较, $10 \mu\text{mol/L}$ HNK 保护组凋亡细胞减少, Caspase-3 的荧光强度减弱, 同时蛋白表达结果也验

证了这一结论,提示 HNK 可以抑制 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡。此外,HNK 能明显下调 BIP、CHOP 及 Caspase-12 蛋白表达,减少 SH-SY5Y 细胞的凋亡,说明 HNK 能够抑制 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 细胞 ERS 相关的凋亡。

综上,HNK 可以在 H_2O_2 诱导的神经细胞损伤中发挥保护作用,其机制可能与抑制 ERS 相关的细胞凋亡有关,因此 HNK 可能对 ERS 导致的神经损伤性疾病如 PD 的防治具有潜在的改善和保护作用。

参考文献

- [1] Paschen W, Mengesdorf T. Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration[J]. *Cell Calcium*, 2005, 38: 409–15.
- [2] Patel S, Fitzgerald J J, Antoniadis C A. Oculomotor effects of medical and surgical treatments of Parkinson's disease[J]. *Prog Brain Res*, 2019, 249: 297–305.
- [3] Qiu F, Wang K, Li T, et al. Differential diagnosis of multiple-system atrophy with parkinson's disease by external anal- and urethral-sphincter electromyography[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 15: 3061–7.
- [4] Gupta H V, Lyons K E, Wachter N, et al. Long term response to levodopa in Parkinson's disease[J]. *J Parkinson Dis*, 2019, 9 (Suppl 1): 1–5.
- [5] 苏胜有. Caspase 家族与神经细胞凋亡的研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(80): 76–7.
- [6] 刘浩,张念平,赵燕等. 帕金森病发病机制的研究进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2015, 17(11): 1230–2.
- [7] 黄赞,李智文,黄晖昱等. 和厚朴酚通过调节 PI3K/AKT 通路介导的 EMT 抑制 Hep3B 细胞迁移和转移[J]. *中国卫生标准管理*, 2019, 10(20): 124–8.
- [8] 魏明豪,曹屹东,贾栋等. 和厚朴酚通过激活 SIRT1/FOXO1 信号通路抵抗小鼠脓毒症脑损伤[J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(10): 1840–4.
- [9] Guo S, Xu J J, Wei N, et al. Honokiol attenuates the memory impairments, oxidative stress, neuroinflammation, and GSK-3 β activation in vascular dementia rats[J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 71(1): 97–108.
- [10] Ye J S, Chen L, Lu Y Y, et al. Honokiol-mediated mitophagy ameliorates postoperative cognitive impairment induced by surgery/sevoflurane via inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome in the hippocampus[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1–13.
- [11] Liu X, Li W, Chen T, et al. Hyaluronic acid modified micelles encapsulating Gem-C12 and HNK for glioblastoma multiforme chemotherapy[J]. *Mol Pharmaceut*, 2018, 15: 1203–14.
- [12] Hitomi J, Katayama T, Taniguchi M, et al. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12[J]. *Neurosci Lett*, 2004, 357(2): 127–30.
- [13] Smith W W, Jiang H, Pei Z, et al. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity[J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(24): 3801–11.
- [14] Marciniak S J, Yun C Y, Ouyang S, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(24): 3066–77.

Protective effect and mechanism of honokiol on human neuroblastoma cell injury induced by hydrogen peroxide

Qian Baojin, Wang Yu

(Dept of Neurology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the protective effect of honokiol (HNK) on hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced injury of human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) and explore its possible mechanism. **Methods** SH-SY5Y cells were treated with 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 hours to establish a cell injury model. In the protection group, SH-SY5Y cells were preincubated with HNK for 6 hours, and then treated with 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 hours. The activity of SH-SY5Y cells was determined by CCK8 colorimetry. Apoptosis of SH-SY5Y cells was determined by flow cytometry. The protein expressions of cytoplasmic Bcl-2, Bax, caspase-3, BIP, CHOP and caspase-12 were detected by Western blot. **Results** HNK promoted the activity of SH-SY5Y cells treated with H_2O_2 ($P < 0.01$), decreased cell apoptosis rate, increased Bcl-2/Bax ratio, and decreased protein expressions of Caspase-3 ($P < 0.05$), BIP, CHOP and Caspase-12 ($P < 0.01$). **Conclusion** HNK protects SH-SY5Y cells from H_2O_2 -induced damage by inhibiting ERS-associated cell apoptosis.

Key words honokiol; human neuroblastoma cells; endoplasmic reticulum stress