

阿魏酸通过调控缺氧诱导因子-1 α 对氧糖剥夺诱导PC12细胞损伤的保护作用研究Protective effect of ferulic acid on PC12 cell injury induced by oxygen deprivation induced by regulation hypoxia-inducible factor-1 α 张男男¹, 徐士欣², 张军平²,
曹澜澜¹, 崔亚男¹, 刘亚鹭¹(1. 天津中医药大学 研究生院, 天津 300193;
2. 天津中医药大学 第一附属医院 中心实验室,
天津 300193)ZHANG Nan-nan¹, XU Shi-xin²,
ZHANG Jun-ping², CAO Lan-lan¹,
CUI Ya-nan¹, LIU Ya-lu¹(1. Graduate School, Tianjin University
of Traditional Chinese Medicine (TCM),
Tianjin 300193, China; 2. Central Labo-
ratory, The First Teaching Hospital of
Tianjin University of TCM, Tianjin
300193, China)

收稿日期: 2019-05-07

定稿日期: 2019-07-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目
(81774059; 81373850)作者简介: 张男男(1991-), 女, 硕士, 医师, 主
要从事中医药防治心脑血管疾病方
向研究

通信作者: 徐士欣 副教授, 硕士生导师

MP: (022) 29787795

E-mail: xushixint@163.com

摘要: 目的 研究阿魏酸(FA)通过调控缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)对氧糖剥夺(OGD)诱导大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12)细胞损伤的保护作用。方法 (1)将PC12细胞分为3组:正常组、模型组和实验组。正常组细胞不做任何处理,模型组用混合气体方法(94% N₂+5% CO₂+1% O₂)建立OGD模型,实验组于OGD损伤的同时给予不同浓度(2.5, 5.0, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的阿魏酸,于OGD 12 h后收集细胞。通过MTS法检测细胞活力,筛选出FA低、中、高3个浓度组(5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。(2)构建HIF-1 α 过表达质粒,用脂质体转染技术,将细胞实验分为4组:对照组、模型组、FA中浓度组、HIF-1 α 过表达+FA中浓度组。用MTS法检测转染HIF-1 α 过表达质粒后细胞活力变化,以免疫印迹法检测HIF-1 α 、BNIP3(隶属于Bcl-2蛋白超家族)蛋白水平表达变化。结果 (1)正常组、模型组和6个浓度(由低至高)实验组的细胞存活率分别为(100.00 \pm 4.67)%、(63.30 \pm 8.35)%、(67.38 \pm 6.63)%、(74.77 \pm 7.61)%、(81.50 \pm 7.33)%、(85.40 \pm 5.62)%、(66.12 \pm 3.62)%和(52.38 \pm 3.82)%;模型组与正常组比、或者实验组与模型组相比,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。(2)对照组、模型组、FA中浓度组、HIF-1 α 过表达+FA中浓度组的细胞存活率分别为(100.00 \pm 5.91)%、(68.03 \pm 4.18)%、(77.13 \pm 6.12)%和(56.58 \pm 5.71)%;对照组与模型组比、或者FA中浓度组与模型组相比,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);HIF-1 α 过表达+FA中浓度组与FA中浓度组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);这4组的HIF-1 α 相对表达量分别为1.00 \pm 0.12、1.57 \pm 0.12、1.24 \pm 0.19和1.62 \pm 0.11;这4组的BNIP3蛋白相对表达量分别为1.00 \pm 0.22、1.39 \pm 0.69、1.59 \pm 0.31和2.33 \pm 0.31;对照组与模型组相比、或者FA中浓度组与模型组比,HIF-1 α 和BNIP3蛋白水平均明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);HIF-1 α 过表达+FA中浓度组与FA中浓度组相比,HIF-1 α 蛋白水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 HIF-1 α 过表达可引起细胞损伤,FA可保护OGD诱导PC12细胞损伤,其作用机制是通过抑制HIF-1 α /BNIP3途径实现的。

关键词: 缺氧诱导因子-1 α ; 阿魏酸; 氧糖剥夺; 细胞损伤

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2019.20.015

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2019)20-2584-05

Abstract: Objective To investigate the protective effect of ferulic acid (FA) on oxygen-glucose deprivation (OGD) induced injury of rat adrenal pheochromocytoma (PC12) cells by regulating hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α). **Methods** (1) PC12 cells were divided into three groups: normal group, model group and experimental group. The normal group did not do any treatment. The model group used the mixed gas

method (94% N₂ + 5% CO₂ + 1% O₂) to establish the OGD model. The experimental group was given different concentrations (2.5, 5.0, 10, 20, 40, 80 μmol · L⁻¹) of FA at the same time as OGD injury, cells were collected after OGD for 12 h. The cell viability was detected by MTS method, and the low, medium and high concentration groups (5, 10, 20 μmol · L⁻¹) of FA were screened out. (2) Construction of HIF-1α over expression plasmid, using lipofection technology, the experiment was divided into 4 groups: normal group, model group, FA concentration - M group, HIF-1α over expression + FA concentration - M group. The cell viability of HIF-1α over expressing plasmid was detected by MTS assay, and the expression of HIF-1α and BNIP3 (belonging to Bcl-2 protein superfamily) protein was detected by immunoblotting. **Results** (1) The cell viability of normal group, model group and six concentrations experimental groups were (100.00 ± 4.67)%, (63.30 ± 8.35)%, (67.38 ± 6.63)%, (74.77 ± 7.61)%, (81.50 ± 7.33)%, (85.40 ± 5.62)%, (66.12 ± 3.62)%, and (52.38 ± 3.82)%; comparing between model group and control group or experimental groups and model group, the difference was significant (all *P* < 0.01). (2) The survival rates of control group, model group, FA concentration - M group, HIF-1α over expression + FA concentration - M group were (100.00 ± 5.91)%, (68.03 ± 4.18)%, (77.13 ± 6.12)%, and (56.58 ± 5.71)%; comparing between control group and model group or FA concentration - M group and model group, the difference was significant (*P* < 0.05); comparing between HIF-1α over expression + FA concentration - M group and FA concentration - M group, the difference was significant (all *P* < 0.05). The relative expression levels of HIF-1α in these four groups were 1.00 ± 0.12, 1.57 ± 0.12, 1.24 ± 0.19, and 1.62 ± 0.11. The relative expression levels of BNIP3 protein were 1.00 ± 0.22, 4.39 ± 0.69, 1.59 ± 0.31, and 2.33 ± 0.31. Comparing between control group and model group or FA concentration - M group and model group, the levels of HIF-1α and BNIP3 were lower, the difference was significant (*P* < 0.05). Comparing between HIF-1α over expression + FA concentration - M group and FA concentration - M group, HIF-1α protein level was increased, the difference was significant (*P* < 0.05). **Conclusion** Over expression of HIF-1α can cause cell damage, and FA can protect PC12 cells from injury induced by OGD. The mechanism of action is through inhibition of HIF-1α/BNIP3 pathway.

Key words: hypoxia inducible factor - 1α; ferulic acid; oxygen - glucose deprivation; cell injury

阿魏酸(FA)是阿魏、当归、川芎和升麻等中药的主要酚酸类有效成分之一^[1]。FA具有减轻炎症反应^[2]、削弱细胞凋亡^[3]等作用。缺氧诱导因子(HIF)转录系统已成为一个对局部或全身氧含量起重要作用的监管体系,成为治疗缺血缺氧性疾病的关键目标因子。BNIP3隶属于Bcl-2蛋白超家族,属于“BH3-only”促凋亡蛋白。本实验探讨FA对氧糖剥夺(OGD)损伤PC12细胞的保护作用,并观察其是否对HIF-1α/BNIP3起调节作用。

材料与方法

1 材料

细胞株 PC12大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株(高分化)购于武汉博士德生物科技有限公司。

药物及试剂 阿魏酸,含量:98%,批号:20160929,北京Solarbio公司生产。MTS细胞增殖试剂盒,美国Promega公司生产;缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)抗体,联科生物有限公司生产;HRP羊抗

小鼠IgG、定量PCR试剂盒,均由武汉博士德生物有限公司生产。

仪器 倒置相差显微镜,日本Olympus公司产品;全自动多功能酶标仪,德国Thermo公司产品;实时荧光定量PCR(RT-PCR)仪,瑞士Roche公司产品。

2 实验方法

2.1 分组与处置

将细胞分为8组:正常组、模型组和6个浓度实验组。

正常组的PC12细胞生长24h后,更换DMEM高糖培养液,置于培养箱中继续培养。模型组更换为DMEM无糖培养液;实验组更换为终浓度为(2.5, 5.0, 10, 20, 40, 80 μmol · L⁻¹)的FA溶液。除了正常组以外,将细胞置于三气培养箱(94% N₂ + 5% CO₂ + 1% O₂)中,建立OGD12h体外模型,每个浓度设置6个复孔。

2.2 以MTS法筛选低、中、高3个浓度FA^[4]

按照文献方法操作。按照试剂盒说明书检测细

胞活力。每孔加入 MTS 溶液 20 μL 继续培养 2 h, 用多功能酶标读板仪检测各孔 490 nm 处的光密度 (OD) 值, 并对细胞活力进行统计。

2.3 主要检测指标

2.3.1 分组

构建 HIF-1 α 过表达质粒, 用脂质体转染技术, 将细胞实验分为 4 组: 正常组、模型组、FA 中浓度组和 HIF-1 α 过表达 + FA 中浓度组。

2.3.2 以免疫印迹法检测 HIF-1 α 和 BNIP3 蛋白变化^[5]

分组、培养、造模同 2.3.1。按照文献方法操作。造模结束后, 提取细胞总蛋白, SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色观察蛋白电泳, 电泳仪将蛋白质转移至 PVDF 膜上。分别加入相应的一抗和二抗。化学发光检测系统显影, 拍照。用 ImagJ 对 WB 条带进行密度分析, 计算目的条带与 β -Actin 内参条带的光密度比值。

2.3.3 以时 RT-PCR 检测 BNIP3 mRNA 表达^[5]

分组、培养、造模同 2.3.1。按照文献方法操作。收集各组细胞, Trizol 提取细胞总 RNA。引物由美国 GeneCopoeia 公司合成。逆转录合成 cDNA 为模板, 以时定量 RT-PCR 检测 BNIP3 mRNA 的表达, 计算目的基因相对表达量。

2.4 次要检测指标——荧光显微镜下经 DAPI 染色观察细胞形态变化^[6]

分组: 将细胞实验分为 5 组: 正常组、模型组和低、中、高 3 个浓度实验组按照文献方法操作。

给药干预结束后, 每孔加终浓度为 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DAPI 染液对细胞进行染核, 用甘油对细胞爬片进行封片, 置于荧光显微镜下, 随机取 6 个视野, 200 倍镜下观察并拍照分析。

3 统计学处理

用 SPSS17.0 统计分析软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析; 组间两两比较, 用 SNK-q 检验。

结 果

1 低、中、高 3 个浓度 FA 的筛选

6 个浓度实验组与模型组比较, 在 5 ~ 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内, 随着药物浓度的增加, 细胞活力也同时增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 在 40 ~ 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内, 细胞活力逐渐下降, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。所以后续将选用 3 个浓度 (5, 10,

20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) FA 进行实验。结果见表 1。

表 1 阿魏酸 (FA) 不同浓度对氧糖剥夺 (OGD) 损伤 PC12 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of different concentrations of ferulic acid (FA) on the viability of PC12 cells injured by oxygen-glucose deprivation (OGD; $\bar{x} \pm s$)

Group	Concentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	<i>n</i>	Cell viability (%)
Control	0	6	100.00 \pm 4.67
Model	0	6	63.30 \pm 8.35**
Experimental - A	2.5	6	67.38 \pm 6.63
Experimental - B	5.0	6	74.77 \pm 7.61##
Experimental - C	10.0	6	81.50 \pm 7.33##
Experimental - D	20.0	6	85.40 \pm 5.62##
Experimental - E	40.0	6	66.12 \pm 3.62
Experimental - F	80.0	6	52.38 \pm 3.82##

Model: Oxygen-glucose deprivation; Experimental group: FA; Compared with control group, ** $P < 0.01$; Compared with model, ## $P < 0.01$

2 FA 抑制 HIF-1 α 表达促进 OGD 损伤 PC12 细胞的存活

模型组与正常组比较, 细胞活力明显降低而 HIF-1 α 蛋白表达水平明显提高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。FA 中浓度组与模型组比较, 上述指标的差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。HIF-1 α + FA - M 与 FA 中浓度组比较, 上述指标的差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。表明 HIF-1 α 过表达组上调 HIF-1 α 的表达, 提示 FA 可抑制 HIF-1 α 的表达, 从而促进细胞存活。结果见表 2。

表 2 转染 HIF-1 α 后 FA 对 OGD 损伤细胞活力和缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of FA on the viability of OGD-injured cells and the expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein after transfection of HIF-1 α ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Cell viability (%)	HIF-1 α /total protein ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)
Control	6	100.00 \pm 5.91	1.00 \pm 0.12
Model	6	68.03 \pm 4.18**	1.57 \pm 0.12**
FA - M	6	77.13 \pm 6.12#	1.24 \pm 0.19#
HIF-1 α + FA - M	6	56.58 \pm 5.71&&	1.62 \pm 0.11&

Compared with control group, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with FA - M group, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$

表3 FA对OGD损伤细胞BNIP3(隶属于Bcl-2蛋白超家族)mRNA和BNIP3蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of FA on BNIP3(belonging to Bcl-2 protein superfamily) mRNA and BNIP3 protein levels in OGD-injured cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	BNIP3 mRNA fold change	BNIP3/total protein ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)
Control	6	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.22
Model	6	5.63 \pm 0.48**	4.39 \pm 0.69**
FA-M	6	2.08 \pm 0.51##	1.59 \pm 0.31##
HIF-1 α + FA-M	6	3.68 \pm 0.70 ^{&&}	2.33 \pm 0.31

Compared with control group, ** $P < 0.01$; Compared with model group, ## $P < 0.01$; Compared with FA-M group, ^{&&} $P < 0.01$

3 FA对BNIP3基因和蛋白表达的影响

模型组与正常组比较,HIF-1 α 和BNIP3基因和蛋白的表达水平均明显提高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。HIF-1 α 和BNIP3基因表达水平的差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果见表3。

4 DAPI染色观察细胞核形态学变化

正常培养的PC12细胞形态完整,染色质均匀,无明显凋亡发生。OGD12h后,出现细胞凋亡进一步加重,细胞核固缩,形成许多颗粒光斑,凋亡严重的细胞核形成碎片,细胞核解体。FA组也有部分细胞表现为凋亡形态,但数量明显低于模型组。见图1。

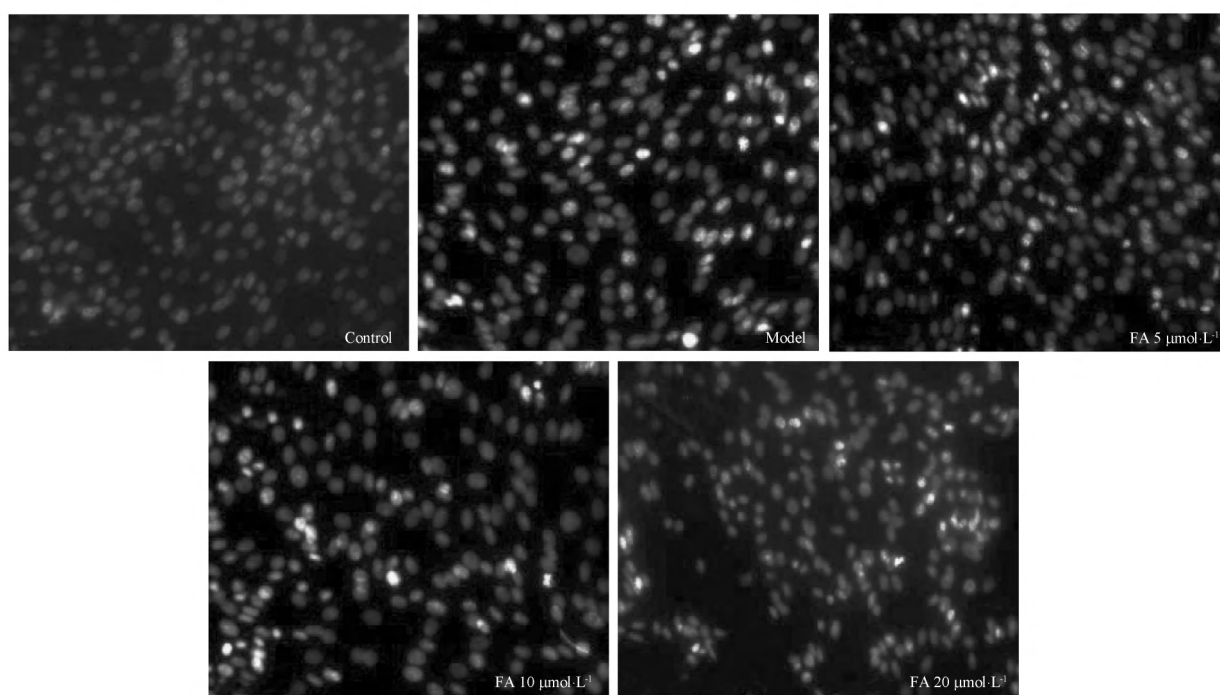


图1 荧光显微镜下各组细胞核形态学变化($\times 200$)

Figure 1 Morphological changes of cells in each group under fluorescence microscope ($\times 200$)

讨 论

在离体培养的大鼠神经元缺血样损伤后,HIF-1 α 表达明显增加,过表达HIF-1 α 可导致细胞死亡。同样,缺血性脑损伤在体实验中,脑组织HIF-1 α 表达上调,加入HIF-1 α 抑制剂后则具有明显的保护作用,表明HIF-1 α 可能参与了神经损伤^[7]。在缺血缺氧早期,HIF-1 α 的表达诱导神经元凋亡;而晚期HIF-1 α 的上调,可起到抑制神经元凋亡的作用^[8]。BH3-only蛋白是Bcl-2

家族中促凋亡蛋白,其成员BNIP3、Noxa和Nix启动子上均具有缺氧反应原件(HRE),受HIF-1 α 转录调控,可参与或启动线粒体凋亡信号通路,激活Caspase级联反应,产生活化的caspase-3,从而诱导凋亡。BH3-only蛋白在脑缺血性损伤的神经细胞凋亡过程中起重要作用^[9]。

本实验结果显示,阿魏酸可呈浓度依赖性提高OGD损伤PC12细胞活性,改善细胞形态;阿魏酸可降低HIF-1 α 表达,同时细胞活力提高,而过表达HIF-1 α 后,该保护效应消失,同时检测HIF-1 α 下游促凋亡靶基因BNIP3基因和蛋白,发现模型组

BNIP3 基因和蛋白水平升高,阿魏酸可显著降低 BNIP3 的表达,而转染过表达 HIF-1 α 后,BNIP3 基因表达水平升高,因此推测阿魏酸可通过调节 HIF-1 α /BNIP3 途径,发挥保护细胞的作用。

参考文献:

- [1] 胡益勇,徐晓玉.阿魏酸的化学和药理研究进展[J].中成藥,2006,28(2):253-255.
- [2] 孟锐,陈逸青,陈勤.阿魏酸对痴呆小鼠脑内胶质细胞活化与炎性细胞因子表达的影响[J].中国医院药學杂志,2018,38(1):50-53.
- [3] 邢玉凤,刘东海,张淑红,等.阿魏酸对戊四氮致癫痫大鼠海马组织中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响[J].中风与神经疾病杂志,2017,34(10):919-921.
- [4] ZHANG L-C, JIN X, HUANG Z, et al. Protective effects of choline against hypoxia-induced injuries of vessels and endothelial cells[J]. *Exp Ther Med* 2017, 13(5): 2316-2324.
- [5] REN Z, ZHANG R, LI Y, et al. Ferulic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via an-

tioxidant and anti-apoptotic mechanisms *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Mol Med* 2017, 40(5): 1444-1456.

- [6] CHEN B, NING J L, GU J T, et al. Caspase-3 inhibition prevents the development of hepatopulmonary syndrome in common bile duct ligation rats by alleviating pulmonary injury [J]. *Liver International*, 2015, 35(4): 1373-1382.
- [7] SCHAIBLE E V, WINDSCHUGL J, BOBKIEWICZ W, et al. 2-Methoxyestradiol confers neuroprotection and inhibits a maladaptive HIF-1 α response after traumatic brain injury in mice [J]. *J Neurochem*, 2014, 129(6): 940-954.
- [8] YEH S H, OU L C, GEAN P W, et al. Selective inhibition of early-but not late-expressed HIF-1 α is neuroprotective in rats after focal ischemic brain damage [J]. *Brain Pathol*, 2011, 21(3): 294-262.
- [9] ALTHAUS J, BERNAUDIN M, PETIT E, et al. Expression of the gene encoding the pro-apoptotic BNIP3 protein and stimulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein following focal cerebral ischemia in rats [J]. *Neurochem Int*, 2006, 48(8): 687-695.

(本文编辑 权菊香)

(上接第 2583 页)

讨 论

本研究中低、高剂量实验组小鼠 BLAF 中炎性因子 IL-4、IL-5 含量及肺组织 Underwood 评分较模型组降低, TGF- β 1 较模型组升高,且低、高剂量实验组差异显著,提示栀子苷对支气管哮喘幼年小鼠气道炎症反应也具有显著的抑制作用,抗炎效果显著,可有效缓解其肺组织炎性病理损伤。研究报道^[8-9],肺泡巨噬细胞 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路在气道炎症反应的形成与调控中具有重要意义。本研究中模型组肺组织 TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白相对表达量均较正常组升高而低、高剂量实验组较模型组降低,提示栀子苷可通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路活化继而抑制支气管哮喘幼年小鼠气道炎症反应,缓解其炎性病理损伤。

参考文献:

- [1] 孙雪松,王吉元,李树斌,等.大柴胡汤治疗痰瘀互结型支气管

哮喘的临床疗效及其对外周血清白细胞介素-8 和肿瘤坏死因子- α 的影响[J].世界中医药,2018,13(11):67-72.

- [2] 朱迪娜,辛文锋,张文生.栀子苷治疗糖尿病及其并发症的分子机制研究进展[J].环球中医药,2015,8(5):624-628.
- [3] 洪滔,贾波,舒坤,等.寒喘舒对支气管哮喘模型小鼠气道重建的影响[J].江西医药,2017,52(12):1289-1291.
- [4] 颜延凤,朱佳.定喘汤对哮喘模型小鼠肺组织炎性病变及 Th2 细胞相关炎性因子的影响[J].江苏中医药,2019,51(1):81-85.
- [5] 张世鑫,朱周靓,夏勇,等.低浓度大气颗粒物短期暴露对小鼠肺组织损伤效应研究[J].预防医学,2018,30(1):26-30.
- [6] 黄玉强.雷公藤多甙对哮喘小鼠气道炎症及重塑影响的研究[D].青岛:青岛大学,2007.
- [7] 雷升萍,王靓,龙子江,等.黄精多糖通过 TLR4-MyD88-NF- κ B 通路抑制缺氧/复氧 H9c2 心肌细胞炎性因子释放[J].中国药理学通报,2017,33(2):255-260.
- [8] SHIMOD T, OBASE Y, NAGASAKA Y, et al. Lung sound analysis and airway inflammation in bronchial asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2016, 4(3): 505-511.
- [9] 黄翠源,潘灵辉,林飞,等.肺泡巨噬细胞 TLR4/MyD88 信号通路参与并介导了机械通气所致的肺损伤[J].细胞与分子免疫学杂志,2015,31(2):182-185.

(本文编辑 谢菁菁)