

. 实验研究 .

黄芪甲苷对 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用

黄万刚 杨东风 冯佳良 黄 淮 高 超 徐正虎

【摘要】目的 探讨黄芪甲苷对 PC12 细胞氧化应激损伤的作用。**方法** 体外培养 PC12 细胞,6-羟基多巴胺(6-OHDA)作用 PC12 细胞导致氧化应激损伤。根据细胞作用方法随机分为 4 组:①对照组,采用完全培养基正常培养;②6-OHDA 组,给予终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-OHDA 处理 24 h;③低、中、高剂量黄芪甲苷组,分别给予终浓度为 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的黄芪甲苷预处理 24 h,然后给予终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA 处理 24 h;④AG490 组,以 20 $\mu\text{mol/L}$ AG490(JAK2/STAT3 信号通路抑制剂)预处理 16 h,加入终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 黄芪甲苷处理 24 h,然后再给予终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA 处理 24 h。CCK8 法检测细胞生存率,流式细胞仪检测细胞凋亡率,酶联免疫吸附实验法检测细胞上清液超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平,免疫印迹法检测细胞 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达。**结果** 6-OHDA 作用后,PC12 细胞存活率明显降低,细胞凋亡率明显升高,细胞培养液 SOD 水平明显降低、MDA 水平明显升高,细胞 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平明显降低;黄芪甲苷预处理明显逆转 6-OHDA 的作用,而且呈剂量依赖性;AG490 预处理明显逆转黄芪甲苷的作用。**结论** 6-OHDA 作用 PC12 细胞,可导致氧化应激损伤促使细胞凋亡;黄芪甲苷预处理能激活 JAK2/STAT3 信号通路,抑制 6-OHDA 对 PC12 细胞的损伤,对 PC12 细胞起保护作用。

【关键词】 黄芪甲苷;6-羟基多巴胺;PC12 细胞;JAK2/STAT3 信号通路;氧化应激损伤

【文章编号】 1009-153X(2021)04-0270-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 742.5

Protective effect of astragaloside IV on 6-OHDA-induced oxidative stress injury in PC12 cells via activation of JAK2/STAT3 signaling pathway

HUANG Wan-gang¹, YANG Dong-feng², FENG Jia-liang¹, HUANG Huai³, GAO Chao¹, XU Zheng-hu¹. 1. Department of Neurosurgery, Hebei Petro China Central Hospital, Langfang 065000, China; 2. Department of Emergency Hebei Petro China Central Hospital, Langfang 065000, China; 3. Department of Neurology, Hebei Petro China Central Hospital, Langfang 065000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of astragaloside IV (AS IV) on the 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced oxidative stress injury in PC12 cells. **Methods** PC12 cells were cultured in vitro and the 6-hydroxy dicamine (6-OHDA) was used to cause oxidative stress injury in the PC12 cells. The PC12 cells were randomly divided into 4 groups: ①control group, the PC12 cells were cultured in medium without any drugs; ②6-OHDA group, the PC12 cells were treated by 6-OHDA for 24 h at a final concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$; ③low, medium, and high dose AS IV groups, the PC12 cells were treated by AS IV for 24 h at a final concentration of 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$, respectively, and then treated by 6-OHDA for 24 h; ④Ag490 group, the PC12 cells were trated by AG490 (JAK2 / STAT3 signaling inhibitor) for 16 h at a final concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$, then treated by AS IV for 24 h at a final concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$, and finally treated by 6-OHDA for 24 h. CCK8 method was used to detect the cell survival rate. Cytometry was used to detect the cell apoptosis rate. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the cell supernatant levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). Western blotting was used to detect the protein expression levels of p-JAK2 and p-STAT3. **Results** After 6-OHDA treatment, the survival rate of PC12 cells significantly reduced, and the apoptosis rate significantly increased, the SOD level in cell culture medium significantly reduced, the MDA level significantly increased, and the expression levels of p-JAK2 and p-STAT3 protein significantly reduced. AS IV pretreatment significantly reversed the effect of 6-OHDA on the PC12 cells dose-dependent manner. AG490 pretreatment significantly reversed the effect of AS IV. **Conclusions** 6-OHDA treatment can result in oxidative stress injury in PC12 cells and then cause cell apoptosis in PC12 cells. AS IV pretreatment can significantly inhibit the 6-OHDA-induced damage to PC12 cells by activating JAK2 / STAT3 signaling pathways.

【Key words】 Astragaloside IV; 6-hydroxydopamine (6-OHDA); PC12 cell; JAK2/STAT3 signaling pathway; Oxidative stress

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.04.014

基金项目:廊坊市科技支撑计划项目(2020013092)

作者单位:065000 河北廊坊,河北中石油中心医院神经外科(黄万刚、冯佳良、高 超、徐正虎),急诊科(杨东风),神经内科(黄 淮)

通讯作者:徐正虎,E-mail:15547662276@163.com

帕金森病是一种常见的神经退行性疾病,主要病理特征是黑质多巴胺神经元细胞凋亡和黑质纹状体通路退化,导致丘脑对肌张力和肌肉运动的控制能力减弱,出现肌强直、行动迟缓等^[1-3]。研究表明,氧化应激与帕金森病病人黑质神经元损伤密切相关^[4]。黄芪甲苷是中药黄芪的主要活性成分之一,具有

抗细胞凋亡、抗炎反应、免疫调节等生物活性,对神经损伤具有保护作用^[5,6]。本研究探讨黄芪甲苷对 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)导致的 PC12 细胞氧化应激损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及分组 PC12 细胞(中国科学院细胞库)用含 5%胎牛血清的 DMEM(美国 Sigma 公司)完全培养基培养,待细胞生长至 80%~90%融合后,进行传代。取对数生长期 PC12 细胞:①对照组,采用完全培养基正常培养;②6-OHDA 组,给予终浓度为 100 μmol/L 的 6-OHDA(上海生工生物股份有限公司)处理 24 h^[7];③低、中、高剂量黄芪甲苷组,分别给予终浓度为 25、50、100 μmol/L 的黄芪甲苷(成都科程生物科技发展有限公司)处理 24 h,然后给予终浓度为 100 μmol/L 6-OHDA 处理 24 h;④AG490 组,以 20 μmol/L AG490(JAK2/STAT3 信号通路抑制剂,美国 MedChem Express 公司)预处理 16 h,加入终浓度为 100 μmol/L 黄芪甲苷处理 24 h,然后再给予终浓度为 100 μmol/L 6-OHDA 处理 24 h。

1.2 CCK8 法检测细胞存活率 将 PC12 细胞接种于 96 孔板,处理结束后,每孔加入 20 μl CCK8 溶液(上海吉满生物科技有限公司)孵育 4 h,酶标仪检测 450 nm 处吸光度。细胞存活率=[(实验孔吸光度-空白孔吸光度)/(对照孔吸光度-空白孔吸光度)]×100%。

1.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 收集处理后的 PC12 细胞,PBS 洗涤 2 次,然后加入冰预冷的 70%乙醇 4 ℃固定 1~2 h,弃去固定液,加入 PBS 重悬、离心、弃上清液。按照 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞凋亡检测试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司)说明书操作,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.4 超氧化物歧化酶(superoxidedismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)的检测 收集处理后的 PC12 细胞,按照 SOD 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)和 MDA 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)检测 SOD 和 MDA 水平。

1.5 免疫印迹法检测 JAK2/STAT3 信号通路蛋白表达 收集处理后的 PC12 细胞,使用 RIPA 裂解液(碧云天生物技术研究)提取细胞总蛋白,BCA 法检测提取的蛋白样品浓度,取适量蛋白样品放入沸水中变性 5 min。以 50 μg 蛋白样品上样量进行 SDS-PAGE 电泳,分离目的蛋白后转膜至 NC 膜,加入 5%脱脂奶粉封膜 2 h。TBST 洗膜,加入 p-JAK2、JAK2、

p-STAT3、STAT3 和 GAPDH 一抗(美国 Sigma 公司)4 ℃孵育过夜,洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(美国 Sigma 公司)室温孵育 1 h;加入 ECL 化学发光液显色,显微镜下曝光、拍照。

1.6 统计学方法 应用 SPSS 22.0 分析;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度黄芪甲苷对 6-OHDA 诱导 PC12 细胞存活率的影响 与对照组比较,6-OHDA 组细胞存活率明显降低($P < 0.05$);与 6-OHDA 组比较,黄芪甲苷组细胞存活率均明显升高($P < 0.05$),且随黄芪甲苷浓度升高细胞存活率呈逐渐升高趋势($P < 0.05$)。因此选择 100 μmol/L 黄芪甲苷进行后续实验。见表 1。

2.2 高剂量黄芪甲苷对 PC12 细胞凋亡的影响 与对照组比较,6-OHDA 组细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$);与 6-OHDA 组比较,高剂量黄芪甲苷组细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 高剂量黄芪甲苷对 PC12 细胞氧化应激反应的影响 与对照组比较,6-OHDA 组 SOD 水平明显降低($P < 0.05$),MDA 水平明显升高($P < 0.05$);与 6-OHDA 组比较,高剂量黄芪甲苷组 SOD 水平明显升高($P < 0.05$),MDA 水平明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 高剂量黄芪甲苷对 PC12 细胞 JAK2/ STAT3 通路活性的影响 与对照组比较,6-OHDA 组 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$);与 6-OHDA 组比较,高剂量黄芪甲苷组 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$);与黄芪甲苷组比较,AG490 组 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。见图 1。

2.5 抑制 JAK2/STAT3 通路对高剂量黄芪甲苷保护作用的影响 与高剂量黄芪甲苷组比较,AG490 组细胞存活率明显降低($P < 0.05$),细胞凋亡率明显升高

表 1 黄芪甲苷对氧化应激损伤后 PC12 细胞存活率的影响	
分组	细胞存活率(%)
对照组	100.58±7.14
6-OHDA 组	49.62±6.03 [*]
低剂量黄芪甲苷组	65.94±5.88 ^{*#}
中剂量黄芪甲苷组	77.32±8.11 ^{*##}
高剂量黄芪甲苷组	94.66±8.85 ^{*##△}

注:与对照组相应值比,* $P < 0.05$;与 6-OHDA 组相应值比,# $P < 0.05$;与低剂量黄芪甲苷组相应值比,& $P < 0.05$;与中剂量黄芪甲苷组相应值比,△ $P < 0.05$

表2 黄芪甲苷对氧化应激损伤后PC12细胞SOD和MDA水平以及细胞凋亡率的影响

分组	SOD(U/mg)	MDA(μmol/g)	细胞凋亡率(%)
对照组	52.69±6.17	1.26±0.19	3.57±0.49
6-OHDA 组	28.33±4.02*	2.44±0.35*	21.46±1.87*
高剂量黄芪甲苷组	49.25±5.16*#	1.58±0.26*#	7.71±0.96*#

注:与对照组相应值比,**P*<0.05;与6-OHDA 组相应值比,#*P*<0.05;SOD. 超氧化物歧化酶;MDA. 丙二醇

表3 抑制 JAK2/STAT3 通路对黄芪甲苷保护作用的影响

分组	细胞存活率(%)	细胞凋亡率(%)	SOD(U/mg)	MDA(μmol/g)
对照组	100.05±8.33	2.89±0.82	58.93±7.77	1.18±0.14
6-OHDA 组	51.62±6.01*	19.96±2.71*	31.52±3.89*	2.24±0.25*
高剂量黄芪甲苷组	96.04±9.05*#	6.58±1.34*#	52.57±6.61*#	1.33±0.11*#
AG490 组	60.78±5.59*#△	15.14±2.06*#△	36.95±4.12*#△	1.97±0.18*#△

注:与对照组相应值比,**P*<0.05;与6-OHDA 组相应值比,#*P*<0.05;与 100 μmol/L 黄芪甲苷组相应值比,△*P*<0.05;SOD. 超氧化物歧化酶;MDA. 丙二醇

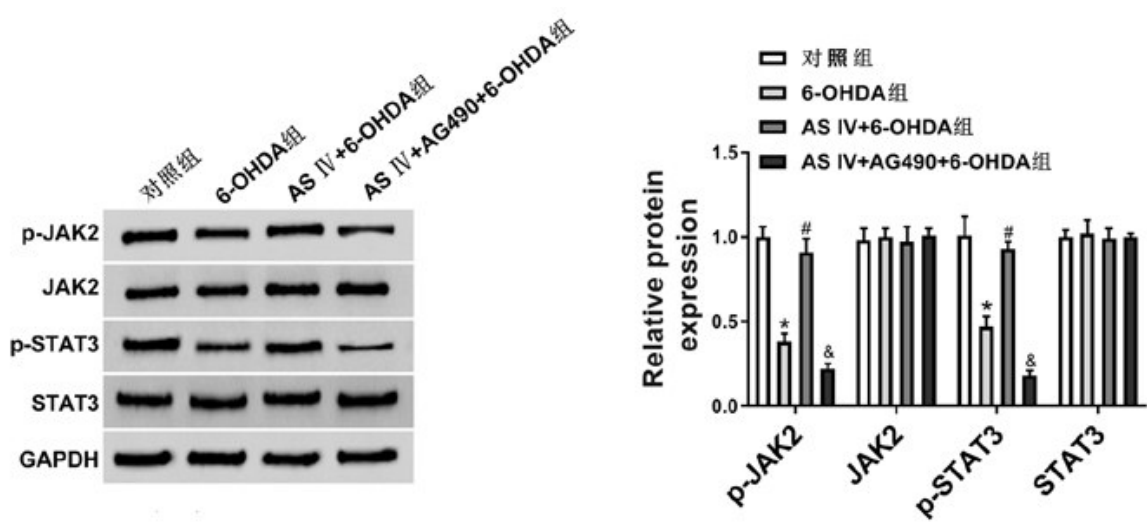


图1 免疫印迹法检测PC12细胞JAK2/ STAT3 通路蛋白表达水平

与对照组相应值比,**P*<0.05;与6-OHDA 组相应值比,#*P*<0.05;与 AS IV+6-OHDA 组(高剂量黄芪甲苷组)相应值比,&*P*<0.05;AS IV+AG490+6-OHDA 组. AG490 组

(*P*<0.05),细胞SOD水平明显降低(*P*<0.05),MDA水平明显升高(*P*<0.05)。见表3。

3 讨论

PC12细胞株是一种来源于可移植的鼠嗜铬细胞,胞质含有丰富的合成及分解多巴胺所需的酶类,具有典型的神经元特性,是常用的研究多巴胺能神经元病理和药理 的细胞^[8]。6-OHDA 是一种神经毒素,可导致黑质致密部的多巴胺能神经元凋亡,从而模拟帕金森病,常用于诱导帕金森病^[9,10]。本研究体外培养 PC12 细胞,6-OHDA 作用 PC12 细胞导致氧

化应激损伤。

6-OHDA 是多巴胺能神经递质的羟基化衍生物,在脑内可由多巴胺代谢生成,并通过自身氧化或酶氧化过程产生自由基、醌物质等损伤神经元,因此氧化应激损伤是6-OHDA 发挥神经毒性作用的重要机制之一^[11,12]。本研究 6-OHDA 作用 PC12 细胞后,SOD 水平明显降低,MDA 水平明显升高;使用黄芪甲苷预处理后,SOD 水平明显升高,MDA 水平明显降低。这说明黄芪甲苷能够增强 PC12 细胞的抗氧化应激损伤能力,减轻6-OHDA 诱导的 PC12 细胞氧化应激反应。本研究结果显示,6-OHDA 处理 PC12

细胞后,细胞存活率明显降低,细胞凋亡率明显升高;使用黄芪甲苷预处理,明显增高PC12细胞存活率,降低细胞凋亡率。这说明黄芪甲苷对6-OHDA诱导的PC12细胞凋亡具有抑制作用。

JAK2/STAT3 信号通路是细胞内重要的信号转导通路之一,细胞在受到外界因素刺激后,细胞内信使物质激活识别并结合胞膜受体,诱导其在胞浆内形成的JAK2结合位点,使JAK2发生磷酸化,暴露STAT3锚定点而导致磷酸化,使其激活并进入细胞核,调节目基因表达^[13]。JAK2/STAT3 信号通路在调控细胞增殖、分化、凋亡过程中发挥重要作用^[14,15],而且激活JAK2/STAT3 信号通路具有抗氧化应激损伤和神经保护作用^[16]。本研究结果显示6-OHDA处理后,PC12细胞p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平明显降低,黄芪甲苷预处理后p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平明显升高。这说明黄芪甲苷能够激活6-OHDA损伤的PC12细胞JAK2/STAT3通路。本研究使用JAK2/STAT3 信号通路抑制剂AG490进行实验,结果发现AG490能够逆转黄芪甲苷对6-OHDA损伤后PC12细胞的保护作用。这说明阻断JAK2/STAT3 信号通路后,黄芪甲苷对PC12细胞的保护作用减弱。

综上所述,6-OHDA作用PC12细胞,可导致细胞发生氧化应激损伤而发生细胞凋亡;黄芪甲苷预处理能通过激活JAK2/STAT3 信号通路,抑制6-OHDA对PC12细胞的损伤,对PC12细胞起保护作用。

【参考文献】

[1] 王 刚,崔海伦,刘 军,等. 帕金森病发病机制及诊断与治疗转化研究进展[J]. 中国现代神经疾病杂志,2018,18(1):19-24.

[2] Schneider RB, Iourets J, Richard IH. Parkinson's disease psychosis: presentation, diagnosis and management [J]. Neurodegener Dis Manag, 2017, 7(6): 365-376.

[3] Zella MAS, Metzdorf J, Ostendorf F, et al. Novel immunotherapeutic approaches to target alpha-synuclein and related neuroinflammation in Parkinson's disease [J]. Cells, 2019, 8(2): 105-110.

[4] 梁志刚,罗鼎真,王晓民. 氧化应激、线粒体功能障碍与帕金森病[J]. 中国老年学杂志,2018,38(11):254-257.

[5] 靳晓飞,高维娟. 黄芪甲苷生物活性及神经保护作用研究进展[J]. 河北中医医药学报,2017,32(3):54-57.

[6] 于婧文,郭敏芳,张 婧,等. 黄芪甲苷对体外由脂多糖诱导的星形胶质细胞炎症反应及其作用机制的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2018,38(11):829-832.

[7] Zubeyir, ulmazoulu, Vulkan, et al. Uleuropein and rutin protect against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells through modulation of mitochondrial function and unfolded protein response[J]. Interdiscip toxicol, 2017, 10(4): 129-141.

[8] Joohee L, Kwangho S, Eugene H, et al. Neuroprotection against 6-OHDA toxicity in PC12 cells and mice through the Nrf2 pathway by a sesquiterpenoid from Tussulago farfara [J]. Redox Biol, 2018, 18: 6-15.

[9] 李晓波,徐 芳. 姜黄素对6-羟基多巴胺诱导的帕金森病模型的神经保护作用及机制研究[J]. 中南药学,2015,13(1):34-37.

[10] Hernandez- Baltazar D, Zavala- Flores LM, Villanueva-Olivo A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: novel findings in an older model [J]. Neurologia, 2017, 32(8): 533-539.

[11] Asanuma M, Okumura-Torigoe N, Miyazaki I, et al. Region-specific neuroprotective features of astrocytes against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(3): 598.

[12] Cruces-Sande A, Rodríguez-Pérez AI, Herbello-Hermelo P, et al. Copper increases brain oxidative stress and enhances the ability of 6-hydroxydopamine to cause dopaminergic degeneration in a rat model of Parkinson's disease [J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(4): 2845-2854.

[13] Kong XJ, Gong Z, Zhang L, et al. JAK2/STAT3 signaling mediates IL-6-inhibited neurogenesis of neural stem cells through DNA demethylation/methylation [J]. Brain Behav Immun, 2019, 79: 159-173.

[14] La Fortezza M, Schenk M, Cosolo A, et al. JAK/STAT signalling mediates cell survival in response to tissue stress [J]. Development, 2016, 143(16): 2907-2919.

[15] Hoffmann CH, Harms U, Rex A, et al. Vascular signal transducer and activator of transcription-3 promotes angiogenesis and neuroplasticity long-term after stroke [J]. Circulation, 2015, 131(20): 1772-1782.

[16] Li J, Wang T, Jiang XF. Inhibition of miR-337-3p involved in the protection of CoCl₂-induced injury in PC12 cells via activating JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(11): 19076-19086.

(2021-02-25 收稿,2021-03-10 修回)