

研究论文

紫檀芪通过激活自噬缓解脊髓神经元细胞氧化应激损伤的作用及其机制

贺靖澜 李宗虎 董晓辉 王小英 刘月梅 申娜*

(河北工程大学附属医院, 邯郸 056002)

摘要 自噬在保护脊髓神经元细胞氧化应激损伤中具有重要的作用。紫檀芪(pterostilbene, PTE)是具有抗氧化作用的天然植物的提取物, 但其对神经元细胞的作用及其机制尚不清楚。该文采用CCK-8分析PTE对大鼠原代脊髓神经元细胞的细胞毒性; 不同浓度PTE作用神经元细胞24 h和48 h, 透射电镜和Western blot检测微管相关蛋白轻链3-II(microtubule-associated protein 1 light chain 3-II, MAP1LC3-II)、Beclin-1和P62蛋白质水平并分析自噬水平。PTE处理H₂O₂作用下的神经元细胞24 h, Western blot检测LC3-II水平, GFP-LC3转染观察自噬的数量。2',7'-二氯二氢荧光素乙酰乙酸(2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate, DCFDA)和MitoSOX染色分析细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平, 自噬相关基因5(autophagy related gene 5, ATG5)siRNA转染分析自噬在其中的作用。结果显示, 20 μ mol/L PTE对于神经元细胞无细胞毒性, PTE作用下神经元细胞中LC3-II、Beclin-1蛋白质水平呈剂量依赖性升高, 而P62则呈剂量依赖性下降($P<0.05$)。PTE增加H₂O₂作用下的神经元细胞中LC3-II蛋白质水平($P<0.05$), 自噬体数量增加, PTE可提高神经元细胞中自噬体数量。PTE明显降低神经元细胞中ROS水平, 但ATG5 siRNA转染抑制自噬后显著逆转PTE的保护作用。该研究结果提示, PTE可能通过提高氧化应激状态下的脊髓神经元细胞自噬水平来抑制细胞ROS的产生。

关键词 脊髓神经元细胞; 紫檀芪; 自噬; 氧化应激

Pterostilbene Inhibits ROS Production in Primary Spinal Cord Neurons by Activating Autophagy

He Jinglan, Li Zonghu, Dong Xiaohui, Wang Xiaoying, Liu Yuemei, Shen Na*

(Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan 056002, China)

Abstract Autophagy is an important self-adaptive mechanism by inhibiting ROS (reactive oxygen species) in primary spinal cord neurons. Pterostilbene, a natural plant extract, has an antioxidant effect; however whether pterostilbene could protect spinal cord neurons from oxidative stress remains unclear. In the present study, primary spinal cord neurons of Sprague Dawley rats were separated and cultured. CCK-8 analysis was used to detect the cytotoxicity. Spinal cord neurons were treated with pterostilbene in different doses for 24 h and 48 h, then LC3-II,

收稿日期: 2017-03-19 接受日期: 2017-05-18

邯郸市科技局(批准号: 1523108076-21)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0310-8572228, E-mail: shenna1982@sina.com

Received: March 19, 2017 Accepted: May 18, 2017

This work was supported by Handan Municipal Science and Technology Bureau (Grant No.1523108076-21)

*Corresponding author. Tel: +86-310-8572228, E-mail: shenna1982@sina.com

网络出版时间: 2017-07-25 16:20:13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170725.1620.004.html>

Beclin-1 and P62 levels were determined by Western blot and the autophagy level was determined by transmission electron microscope. Primary spinal cord neurons were treated with H_2O_2 and pterostilbene for 24 h, then LC3-II level was determined by Western blot and the number of autophagosomes by GFP-LC3 analysis. DCFDA and MitoSOX Red staining were used to detect the ROS production in cells, and *ATG5* siRNA transfection was used to analyze the involvement of autophagy. The results showed that there was a dose-dependent change in the levels of LC3-II, Beclin-1 and P62, and increased autophagosome number were observed in the pterostilbene-treated neurons ($P<0.05$). In addition, pterostilbene increased the level of LC3-II in cells treated with H_2O_2 ($P<0.05$), and GFP-LC3 analysis demonstrated the increased number of autophagosomes in pterostilbene-treated cells. Compared with that in the cells treated with H_2O_2 , pterostilbene significantly inhibited the ROS production; however, *ATG5* siRNA transfection significantly reversed the protection of pterostilbene. These results indicate that pterostilbene inhibits the ROS production in spinal cord neurons by activating autophagy.

Keywords spinal cord neurons; pterostilbene; autophagy; oxidative stress

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)造成的高致死率和瘫痪率仍然困扰着临床医生,因此,对SCI发病机制和修复方法仍需作深入的研究^[1]。SCI包括初次打击和二次损伤,二次损伤被认为是SCI引起临床症状的关键问题,治疗和预防二次损伤对于改善SCI的预后具有重要的意义^[1]。SCI二次损伤主要为神经元细胞的损伤,其中,氧化应激引起的神经元细胞的炎症、凋亡等是其重要因素^[2]。我们早前的研究发现,自噬在神经元细胞面对氧化应激时代偿性升高,并保护神经元细胞防止氧化应激引起的细胞凋亡^[3]。自噬是细胞的一种自我保护机制,主要通过溶酶体融合而降解错构的蛋白质及损伤的细胞器来维持细胞内的稳定^[4]。因此,若提高氧化应激状态下神经元细胞中的自噬水平对于防止细胞的损伤具有重要意义。研究发现,紫檀芪(pterostilbene, PTE)可促进多种肿瘤细胞的自噬^[5],但对脊髓神经元细胞的作用尚未见报道。

PTE是存在于多种植物(包括蓝莓、葡萄等)中的天然植物抗毒素,同时也是抗氧化、抗肿瘤药物白藜芦醇的类似物^[6]。PTE具有多种药理作用,包括抗癌、抗炎反应、抗氧化应激和抗糖尿病等,并且PTE相对于白藜芦醇具有更佳的口服吸收性和代谢性能^[6]。在神经系统, PTE可保护缺血缺氧引起的中枢神经元细胞的损伤^[7],口服PTE可缓解缺血再灌注引起的大脑损伤^[8],但是在脊髓神经元细胞中尚未见报道。本文拟使用PTE和 H_2O_2 作用原代脊髓神经元细胞,并检测自噬、活性氧(reactive oxygen species, ROS)等指标水平来了解PTE对神经元细胞自噬和产生ROS的影响以及自噬在其中所扮演的作用。

1 材料与方法

本研究的SD大鼠购自河北工程大学附属医院动物房。动物实验方案获得河北工程大学附属医院动物伦理委员会批准。

1.1 试剂与抗体

神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)、微管相关蛋白轻链3-II(microtubule-associated protein 1 light chain 3-II, MAP1LC3-II)、Beclin-1、SQSTM1/P62、自噬相关基因5(autophagy related 5, ATG5)和 β -actin的一抗均购自Abcam公司; DCFDA染色试剂盒、Western blot、Alexa Fluor-555标志的二抗、免疫荧光、DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)和细胞蛋白质的提取试剂均购自上海碧云天生物技术有限公司;细胞培养的试剂,包括Neurobasal-A、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和0.25%胰蛋白酶均购自Thermo公司; CCK-8(Cell Counting Kit-8)购自Dojindo公司; MitoSOX Red染色试剂盒购自Invitrogen公司。

1.2 大鼠原代脊髓神经元细胞的培养

主要根据文献[9]进行原代脊髓神经元细胞的培养。在显微镜辅助下从E16SD大鼠的胚胎中分离脊髓组织,将脊膜和背根神经节从脊髓上分离。PBS洗涤3次,在离心管中使用HBSS(Hank's balanced salt solution)配制的0.25%胰蛋白酶,于37℃的条件下消化30 min,将细胞悬液经200目的滤网过滤。滤过的细胞接种于Neurobasal-A培养基(Thermo Fisher公司),加入2% B-27、2 mmol/L谷氨酰胺、1 μ mol/L阿糖胞苷和50 ng/mL神经生长因子(R&D公司),每3 d换培养基,培养至第7 d时收集神经元细胞进行处理。

1.3 实验设计

分析PTE细胞毒性实验, 分别使用1、5、10、20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ PTE作用神经元细胞24 h和48 h。分析PTE对正常神经元细胞自噬调节实验, 使用1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ PTE处理细胞24 h。分析PTE在提高氧化应激状态下对自噬水平及ROS水平调节实验, 分组为Control siRNA、PTE、 H_2O_2 、PTE+ H_2O_2 。首先使用10 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用神经元细胞1 h, 然后使用PTE共同处理24 h。分析自噬介导PTE调节细胞ROS水平的实验, 分组为Control、PTE+ H_2O_2 、PTE+ H_2O_2 +ATG5 siRNA、Control siRNA。

1.4 细胞免疫荧光

分离原代脊髓神经元细胞, 在24孔板中加入4%多聚甲醛固定10 min, 0.2% Triton X-100透膜处理15 min。5%山羊血清封闭30 min后, 使用NSE一抗(1:100)在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育细胞过夜。行免疫组化时, 孵育一抗后的细胞由辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下孵育2 h, 苏木素复染30 s。行免疫荧光时, 孵育Alexa Fluor-555标记的二抗室温下2 h, 再使用DAPI染核5 min后, 在荧光倒置显微镜下观察(Olympus公司)。

1.5 CCK-8(Cell Counting Kit-8)分析

96孔板每孔铺5 000个细胞, 培养过夜后, 予以不同组处理12 h后, 将处理的液体更换成100 μL 新鲜的培养基, 再在每个孔中加入10 μL CCK-8试剂, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育1 h, 最后在酶标仪上读取450 nm波长的 D 值, 所得值为相对于对照组的数值。

1.6 Western blot分析

提取细胞中的总蛋白, 使用上海碧云天生物技术有限公司推荐的含有1%的苯甲基黄酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)的放射免疫沉淀法裂解液(radio-immunoprecipitation assay, RIPA), 并采用BCA方法来测定蛋白质浓度。把细胞的总蛋白进行SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electro-phoresis), 然后通过湿转的方法将蛋白转移到PVDF(polyvinylidene difluoride)膜上(Bio-Rad公司)。5%脱脂牛奶封闭2 h后, 使用LC3-II、Beclin-1、P62和ATG5一抗(1:1 000)于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育过夜, TBST清洗3遍后, 使用辣根过氧化物酶标记的二抗在常温下孵育2 h后, 再使用ECL发光液(Thermo公司)在成像系统(PerkinElmer公司)上进行曝光。使用AlphaEaseFC 4.0软件进行蛋白质条带的半定量分析。

1.7 透射电镜

各组取2瓶细胞, 分别进行处理并离心成团, 在EP管中加2%戊二醛, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, PBS漂洗, 1%锇酸固定, 醋酸铀染色, 梯度丙酮脱水, 预包埋, Epon812环氧树脂包埋, 半薄切片及甲苯胺蓝染色进行定位, LKB-V超薄切片机超薄切片, 透射电镜下观察脊髓神经元细胞。

1.8 GFP-LC3转染

细胞在玻璃底的培养皿上培养过夜, 密度在50%~70%, 培养基液体量为2 mL。使用GFP-LC3腺病毒进行感染, MOI值为100, 腺病毒滴度为 $10^{10}/\text{mL}$, 腺病毒购自汉恒生物科技(上海)有限公司。腺病毒使用1 mL的无血清培养基进行稀释, 具体计算方式为: 6孔板细胞数量为 $(1\sim2)\times 10^6$, MOI值100, 病毒数量为 2×10^8 , 加入的腺病毒剂量为20 μL 。加入腺病毒前, 将培养基换成无血清的培养基1 mL, 把上述剂量的腺病毒溶解在无血清的培养基中。加入腺病毒后, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育2 h, 再将无血清的培养基更换成正常培养基, 然后将脊髓神经元细胞转移至培养箱孵育过夜, 在荧光显微镜下观察转染效果。当绿色荧光的细胞数量占据大部分时, 即可进行处理。处理后, 细胞中的自噬体等使用激光共聚焦显微镜(Leica TCS, SP8)进行观察。脊髓神经元细胞中 $\geq 1\ \mu\text{m}$ 的绿色的点状结构记为GFP-LC3阳性的自噬泡, 共计算不同区域6个细胞以上的自噬泡数量。

1.9 DCFDA染色

2',7'-二氯二氢荧光素乙酰乙酸(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFDA)染色是分析细胞内总ROS水平的经典方法。神经元细胞经过PTE和 H_2O_2 处理后, 在玻璃底的培养皿中使用10 $\mu\text{mol/L}$ 的DCFDA染液在37 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育20 min。细胞在共聚焦下观察, 或者用0.25%胰酶蛋白消化后, 使用流式细胞仪(FACSCaliber; Becton Dickinson, Heidelberg)在激发光波长488 nm和发射光波长525 nm条件下分析荧光强度。

1.10 MitoSOX染色

MitoSOX Red是针对线粒体ROS的新型的染色剂, 在被线粒体超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)氧化时发出红色荧光。50 μg MitoSOX Red染液溶解于13 μL DMSO中, 配成5 mmol/L的储存液。神经元细胞经过PTE和 H_2O_2 处理后, 使用含5 $\mu\text{mol/L}$ 的MitoSOX Red染液于37 $^{\circ}\text{C}$ 处理15 min, 经过PBS清洗后换成新鲜的

Neurobasal-A培养基, 在激光共聚焦显微镜(Leica TCS, SP8)下观察荧光强度。

1.11 *ATG5* siRNA的转录

ATG5 siRNA的设计参考文献[9], 具体序列见表1, 序列由上海吉玛制药技术有限公司合成。神经元细胞消化后计数, 在6孔板中每孔加入 2×10^5 的细胞, 培养过夜。转染使用Invitrogen公司的Lipofectamine 2000进行转染, 具体转染方法参考Invitrogen公司的操作手册。转染后48 h, 根据实验设计中处理方法进行干预。非特异性的非靶向siRNA作为对照RNA。转染后, 提取细胞总蛋白行Western blot分析转染效果。

1.12 统计学分析

使用SPSS 15软件包分析数据(SPSS Inc., Chicago, IL, USA), 不同组之间的差异使用方差分析(ANOVA)进行统计。如果方差分析具有统计学意义, 使用LSD方法进行两两之间的分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 原代神经元细胞的培养鉴定及PTE对原代神经元细胞活力的影响

原代脊髓神经元细胞在白光下呈长梭形, 典型的细胞双侧均有长条形的神经突起, 部分突起可见分叉, 交织成网络状。NSE免疫荧光显示, 神经元细胞胞质呈现丰富的红色, 证实存在大量的NSE蛋白质(图1A)。

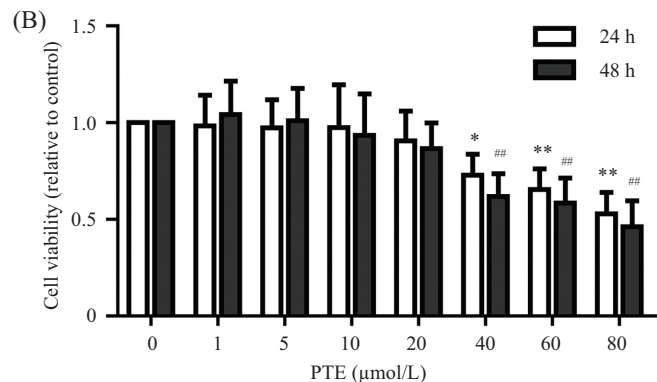
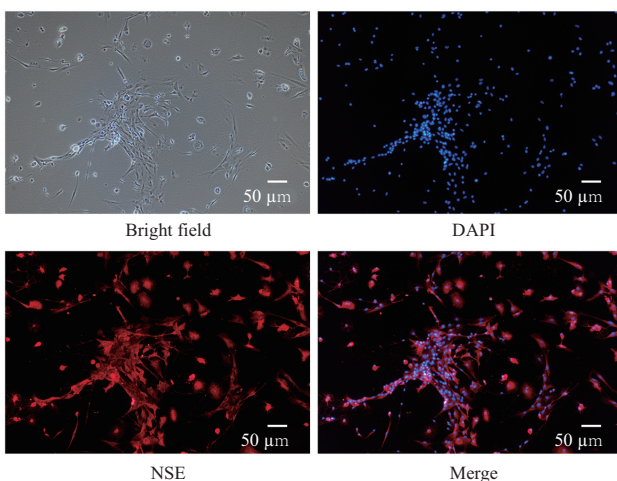
为了分析PTE对脊髓神经元细胞的毒性, 0~80 $\mu\text{mol/L}$ PTE作用神经元细胞24 h或48 h后, 采用CCK-8分析细胞活力。40、60和80 $\mu\text{mol/L}$ PTE作用24 h, 能显著抑制神经原细胞的活力($P < 0.05$, 图1B); 40、60和80 $\mu\text{mol/L}$ PTE作用48 h后, 细胞的活力相对于24 h组进一步下降($P < 0.05$, 图1B)。1、5、10和20 $\mu\text{mol/L}$ PTE作用24 h或48 h对于细胞的活力并无明显差异, 因此, 后续实验均采用20 $\mu\text{mol/L}$ PTE处理细胞24 h。

表1 *ATG5* siRNA的序列

Table 1 Sequence of *ATG5* siRNA

引物 Primer	方向 Direction	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
ATG5	Sense	GGC CUU UCA UUC AGA AGC UTT
	Antisense	AGC UUC UGA AUG AAA GGC CTT
Negative control	Sense	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT
	Antisense	ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT

(A)



A: 大鼠原代脊髓神经元细胞的培养和NSE免疫荧光鉴定; B: 不同剂量PTE作用24 h或48 h后原代脊髓神经元细胞的活力, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $###P < 0.01$, 分别与相应时间的对照组进行比较。

A: primary spinal cord neurons culture and NSE immunocytochemistry; B: cell viability after PTE treatment for 24 h or 48 h, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $###P < 0.01$ compared with control group at the corresponding time.

图1 大鼠原代脊髓神经元细胞的培养及PTE对细胞活力的影响

Fig.1 Primary spinal cord neurons culture and the effect of PTE on the cell viability

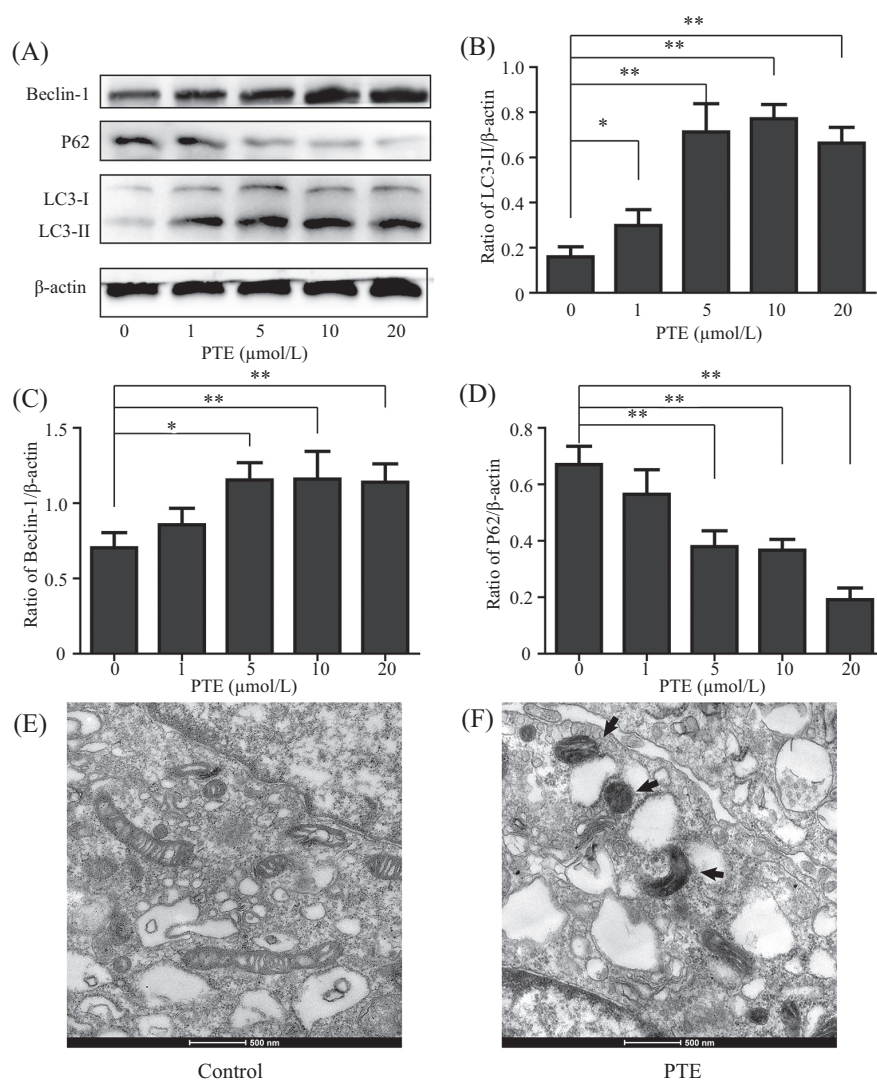
2.2 PTE促进脊髓神经元细胞中自噬相关蛋白的改变

采用Western blot方法分析LC3-II、Beclin-1和P62蛋白质表达水平。神经元细胞中, LC3-II蛋白水平随着PTE浓度的增加逐渐升高, 尤其是10 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.05$, 图2A和图2B), Beclin-1水平变化与LC3-II相似($P<0.05$, 图2A和图2C)。由于P62是自噬降解特异性蛋白质的“运输者”, 因此, 随着PTE浓度的增加, P62水平反而逐渐下降, 这也证实了PTE激活正常脊髓神经元细胞自噬($P<0.05$, 图2A和图2D)。透射电镜结果发现, 20 $\mu\text{mol/L}$ PTE处理后的神经元细胞中

可见大量双层膜结构的自噬泡(图2E和图2F)。

2.3 氧化应激时PTE对脊髓神经元细胞中自噬水平的影响

在10 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 预处理1 h的神经元细胞中, 使用PTE作用24 h, 分析氧化应激环境下PTE对神经元细胞自噬水平的影响。相对于单纯 H_2O_2 组, PTE显著提高神经元细胞中LC3-II和Beclin-1的水平, 并降低P62水平($P<0.05$, 图3A和图3B)。GFP-LC3转染观察脊髓神经元细胞后, PTE+ H_2O_2 组比单纯 H_2O_2 组明显增加细胞中的绿色点状的LC3阳性的自噬泡数量($P<0.05$, 图3C和图3D)。此结果提示, 氧化应激时



A: Western blot分析自噬标志蛋白质LC3-II、Beclin-1和P62水平; B: LC3-II条带的半定量分析; C: Beclin-1条带的半定量分析; D: P62条带的半定量分析, $*P<0.05$, $**P<0.01$; E: 对照组的神经元细胞的透射电镜结果; F: 20 $\mu\text{mol/L}$ PTE处理神经元细胞后的透射电镜结果。

A: protein levels of LC3-II, Beclin-1 and P62 in spinal cord neurons; B: semi-quantity analysis of LC3-II level; C: semi-quantity analysis of Beclin-1 level; D: semi-quantity analysis of P62 expression, $*P<0.05$, $**P<0.01$; E: the analysis of autophagosomes in spinal cord neurons in the control group by transmission electron microscopy; F: the analysis of autophagosomes in spinal cord neurons treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ of PTE by transmission electron microscopy.

图2 PTE对脊髓神经元细胞中自噬相关蛋白质LC3-II、Beclin-1、P62及自噬体数量的影响

Fig.2 Effect of PTE on the protein levels of LC3-II, Beclin-1, P62 and autophagosome number in primary spinal cord neurons

PTE可提高脊髓神经元细胞自噬水平。

2.4 PTE抑制脊髓神经元细胞中ROS的产生

DCFDA和MitoSOX染色分析神经元细胞内总ROS和线粒体ROS水平。10 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 24 h 明显增加细胞内的DCFDA和MitoSOX染色的荧光强度,但是PTE可以显著降低细胞中DCFDA和MitoSOX染色的荧光强度($P<0.05$,图4A~图4C)。这说明,PTE对于神经元细胞在一定程度上可抑制细胞内ROS的产生,以调节氧化应激水平。

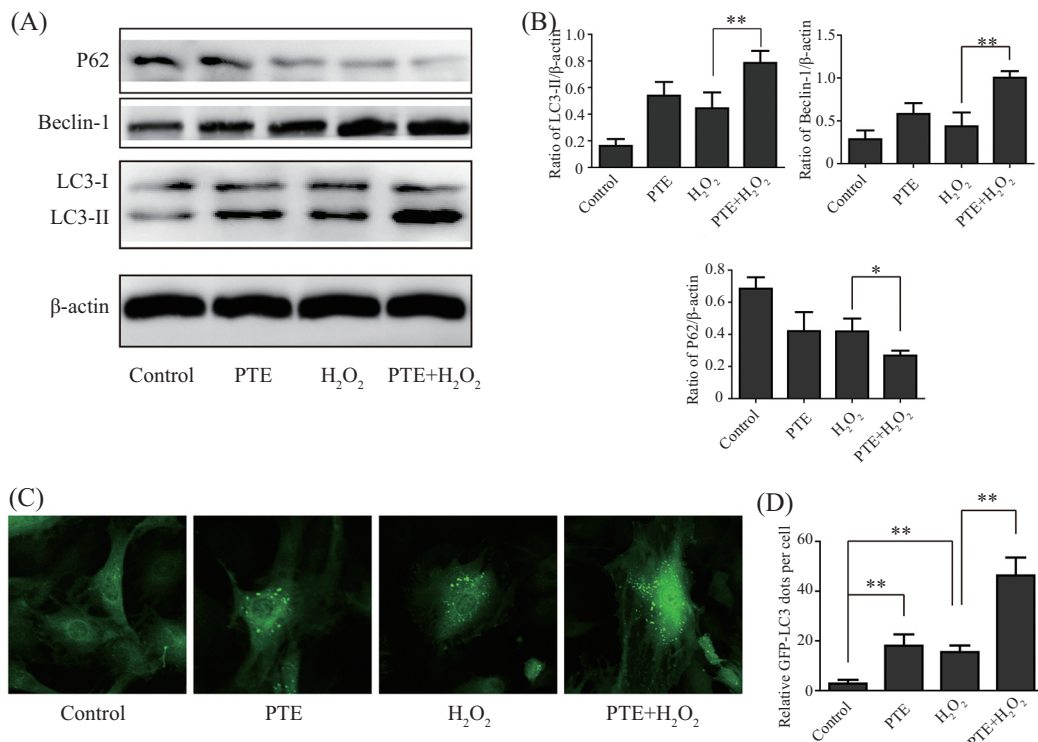
2.5 抑制自噬逆转PTE对神经元细胞中ROS产生的作用

通过沉默ATG5抑制自噬来进一步分析自噬在PTE抑制神经元细胞产生ROS的作用。ATG5 siRNA转染细胞 48 h后, Western blot结果发现,ATG5水平明显下降($P<0.05$,图5A和图5C)。ATG5 siRNA显著抑制PTE+ H_2O_2 作用下的LC3-II水平,证实ATG5 siRNA导致自噬水平的下降($P<0.05$,图5B和图5D)。DCFDA和MitoSOX染色分析发现,PTE

处理ATG5沉默的细胞,其DCFDA和MitoSOX染色荧光强度反而进一步升高($P<0.05$,图5E和图5F),提示自噬介导了PTE对神经元细胞ROS产生的抑制作用。

3 讨论

严重SCI后的二次损伤包括缺血再灌注损伤、炎症、水肿、ROS产生引起的氧化应激损伤、谷氨酸盐导致的细胞毒性、细胞内 Ca^{2+} 积聚以及细胞凋亡和坏死等^[10]。SCI损伤后,脊髓神经元细胞线粒体中由于吸收大量的 Ca^{2+} 而导致线粒体膜通透性改变,从而产生大量ROS,引起细胞氧化应激,因此,脊髓神经元细胞的氧化应激损伤在SCI二次损伤中具有重要的意义^[11]。本文使用 H_2O_2 以提高细胞内ROS水平的氧化剂,模拟体内细胞的氧化应激的损伤。本课题组前期工作已证实自噬在氧化应激状态下神经元细胞中代偿性升高,并且自噬可以缓解氧化应激引起的细胞损伤,对于神经元细胞具有保护作用^[3]。

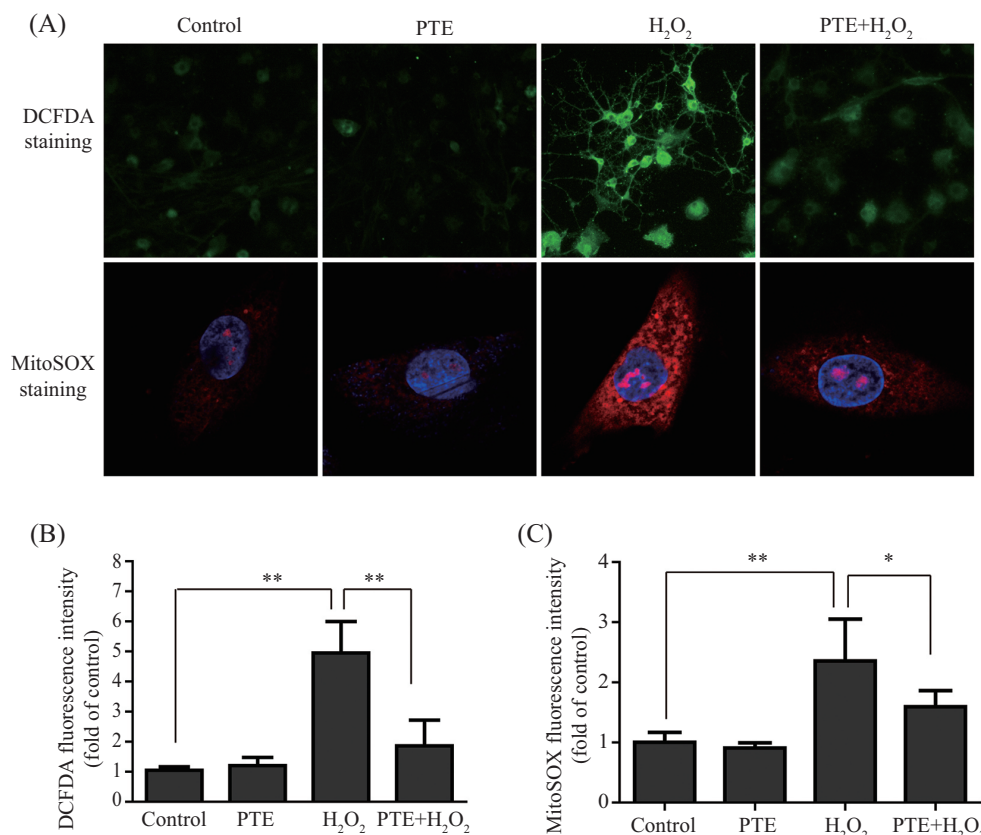


A: Western blot分析LC3-II、Beclin-1和P62蛋白质表达水平; B: LC3-II、Beclin-1和P62条带的半定量分析; C: GFP-LC3转染后细胞中绿色点状自噬体的数量; D: 根据GFP-LC3结果, GFP-LC3点状阳性自噬泡的定量统计结果。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: the protein level of LC3-II, Beclin-1 and P62 determined by Western blot; B: semi-quantity analysis of LC3-II, Beclin-1 and P62 proteins; C: the number of autophagosome in cells transfected with GFP-LC3 under confocal microscopy; D: quantity analysis for the number of GFP-LC3 dots per cell. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图3 PTE对 H_2O_2 处理的脊髓神经元细胞自噬水平的影响

Fig.3 Effect of PTE on the autophagic level in spinal cord neurons treated with H_2O_2



A: 脊髓神经元细胞的DCFDA和MitoSOX染色的荧光表现; B: DCFDA染色的定量分析; C: MitoSOX染色的定量分析。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: primary spinal cord neurons with DCFDA and MitoSOX staining; B: quantity analysis of intensity of the DCFDA staining; C: quantity analysis of intensity of the MitoSOX staining. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图4 PTE抑制H₂O₂处理的脊髓神经元细胞中ROS的产生

Fig.4 Effect of PTE on ROS production in primary spinal cord neurons treated with H₂O₂

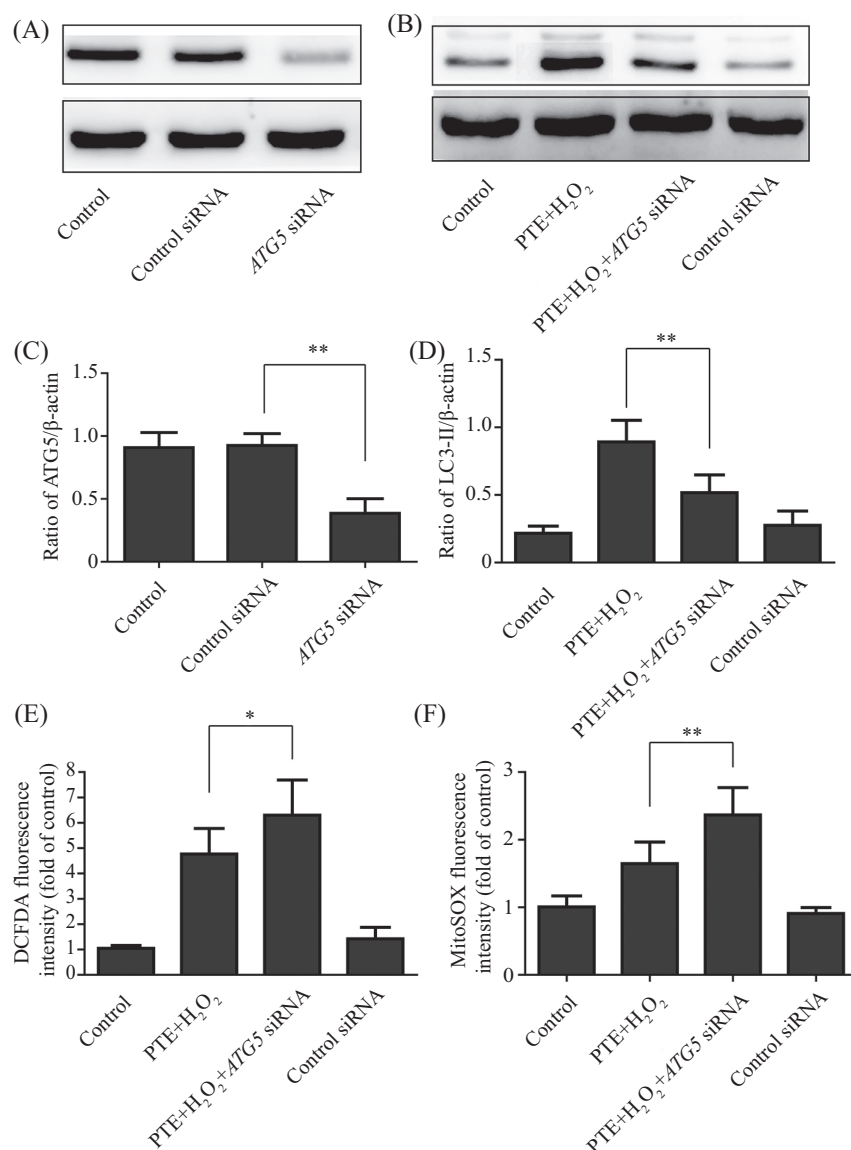
本文进一步发现, PTE可以通过激活神经元细胞的自噬来保护神经元细胞, 降低细胞中ROS水平, 这为将来临床治疗SCI损伤提供了一定的理论和实验依据。

研究报道, 白藜芦醇可以缓解多种疾病的发展, 如心血管疾病、骨关节炎等, 但白藜芦醇的生物利用度较低。白藜芦醇的类似物PTE却具有小分子、半衰期长、生物利用度相对较高等优点, 近来逐渐受到重视。PTE不仅可抑制氧化应激引起的内皮细胞凋亡^[12], 同时, 可通过磷酸腺苷活化的蛋白激酶 $\alpha 1$ (adenosine monophosphate-activated protein kinase $\alpha 1$, AMPK $\alpha 1$)-雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, mTOR)信号通路激活内皮细胞的自噬^[13]。在多种肿瘤细胞中发现, PTE可以激活自噬, 具有抗癌作用^[5]。虽然PTE对于肿瘤细胞具有一定的细胞毒性, 但本研究首先证实, 20 $\mu\text{mol/L}$ 及以下浓度的PTE对于原代脊髓神经元细胞不具有细胞毒作用。LC3-I、Beclin-1和P62蛋白质水平分析证实, PTE可以促进正常神经元细胞的自

噬, 而在H₂O₂作用下的神经元细胞中, PTE同样可以进一步提高自噬的水平, 并且通过GFP-LC3转染进行了证实。

神经元细胞消耗能量较大, 其线粒体数量也较为丰富, 可以提供充足的能量, 当神经元细胞受到氧化应激损伤时, 线粒体产生的ROS是细胞中所有ROS的主要来源^[14]。另一方面, ROS的大量产生亦会导致线粒体能量合成的障碍, 引起神经元细胞的损伤。H₂O₂是具有线粒体膜通透性的ROS中重要的一员, H₂O₂通过Fenton反应导致大量羟自由基生成, 进一步损伤下游的线粒体、核酸和蛋白质等^[15]。本文使用H₂O₂模拟体内的神经元细胞氧化应激损伤, 通过DCFDA染色证实了H₂O₂可导致细胞产生大量的ROS, 而使用MitoSOX染色发现, 线粒体ROS在其中发挥重要作用。

氧化应激是由于细胞内活性氧和活性氮的产生和清除的失平衡引起。研究发现, PTE可以抑



A: *ATG5* siRNA转染后ATG5水平; B: *ATG5*沉默后脊髓神经元细胞中LC3-II水平; C: 细胞ATG5条带的半定量分析; D: LC3-II条带的半定量分析; E: *ATG5*沉默对DCFDA染色荧光强度的影响; F: *ATG5*沉默对MitoSOX染色荧光强度的影响, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: *ATG5* level after *ATG5* siRNA transfection; B: LC3-II level after *ATG5* silence; C: semi-quantity analysis of the *ATG5* level; D: semi-quantity analysis of LC3-II level; E: DCFDA staining after *ATG5* silence; F: MitoSOX staining after *ATG5* silence, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图5 抑制自噬逆转PTE对脊髓神经元细胞ROS的作用

Fig.5 Effect of autophagic inhibition on the ROS production regulated by PTE in spinal cord neurons

制多种细胞中ROS的产生。在小鼠海马的神经元HT22细胞中, PTE通过Nrf2[nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2]信号通路抑制谷氨酸盐和高糖诱导生成的ROS^[16-17]。本文中PTE作用H₂O₂处理的脊髓神经元细胞, 同样可以抑制ROS的产生, 证实了PTE在脊髓神经元细胞中抗氧化应激的作用。通过*ATG5* siRNA转染抑制自噬后, 分析发现, 自噬参与介导PTE抑制ROS生成, 这也从另一方面证实本课题组前期研究证实的自噬在神经元细胞氧化应激中的自我保护作用^[3]。

综上所述, 20 μmol/L的PTE可提高正常和氧化应激状态下的自噬水平。PTE可抑制H₂O₂作用下细胞中ROS的产生, 但是沉默*ATG5*以抑制自噬水平, 却可以逆转上述PTE的保护作用。本研究结果提示, PTE可能通过促进自噬抑制脊髓神经元细胞的ROS产生, 缓解氧化应激, 保护神经元细胞。

参考文献 (References)

- 1 Chen HC, Fong TH, Lee AW, Chiu WT. Autophagy is activated in injured neurons and inhibited by methylprednisolone after

- experimental spinal cord injury. *Spine* 2012; 37(6): 470-5.
- 2 Wang JF, Li Y, Song JN, Pang HG. Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury. *Neurochem Int* 2014; 64: 37-47.
- 3 贺靖澜, 王 冉, 申 娜, 董晓辉, 李宗虎, 付治安. 自噬对氧化应激引起的脊髓神经元细胞损伤的作用及其机制. *中国细胞生物学学报*(He Jinglan, Wang Ran, Shen Na, Dong Xiaohui, Li Zonghu, Fu Zhian. The effect of autophagy on the injury of primary spinal cord neurons induced by the oxidative stress. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2017; 39(4): 440-7.
- 4 Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451(7182): 1069-75.
- 5 Ko CP, Lin CW, Chen MK, Yang SF, Chiou HL, Hsieh MJ. Pterostilbene induce autophagy on human oral cancer cells through modulation of Akt and mitogen-activated protein kinase pathway. *Oral Oncol* 2015; 51(6): 593-601.
- 6 Remsberg CM, Yanez JA, Ohgami Y, Vega-Villa KR, Rimando AM, Davies NM. Pharmacometrics of pterostilbene: Preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. *Phytother Res* 2008; 22(2): 169-79.
- 7 Li D, Song T, Yang L, Wang X, Yang C, Jiang Y. Neuroprotective actions of pterostilbene on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats through upregulation of heme oxygenase-1. *Int J Dev Neurosci* 2016; 54: 22-31.
- 8 Zhou Y, Zhang XM, Ma A, Zhang YL, Chen YY, Zhou H, *et al.* Orally administrated pterostilbene attenuates acute cerebral ischemia-reperfusion injury in a dose- and time-dependent manner in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2015; 135: 199-209.
- 9 Anderson KN, Potter AC, Piccenna LG, Quah AK, Davies KE, Cheema SS. Isolation and culture of motor neurons from the newborn mouse spinal cord. *Brain Res Brain Res Protoc* 2004; 12(3): 132-6.
- 10 Fatima G, Sharma VP, Das SK, Mahdi AA. Oxidative stress and antioxidative parameters in patients with spinal cord injury: Implications in the pathogenesis of disease. *Spinal Cord* 2015; 53(1): 3-6.
- 11 McEwen ML, Sullivan PG, Springer JE. Pretreatment with the cyclosporin derivative, NIM811, improves the function of synaptic mitochondria following spinal cord contusion in rats. *J Neurotrauma* 2007; 24(4): 613-24.
- 12 Zhang L, Zhou G, Song W, Tan X, Guo Y, Zhou B, *et al.* Pterostilbene protects vascular endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Apoptosis* 2012; 17(1): 25-36.
- 13 Zhang L, Cui L, Zhou G, Jing H, Guo Y, Sun W. Pterostilbene, a natural small-molecular compound, promotes cytoprotective macroautophagy in vascular endothelial cells. *J Nutr Biochem* 2013; 24(5): 903-11.
- 14 Hall ED. Lipid peroxidation. *Adv Neurol* 1996; 71: 247-57; discussion 57-8.
- 15 Fariss MW, Chan CB, Patel M, van Houten B, Orrenius S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Interv* 2005; 5(2): 94-111.
- 16 Wang B, Liu H, Yue L, Li X, Zhao L, Yang X, *et al.* Neuroprotective effects of pterostilbene against oxidative stress injury: Involvement of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway. *Brain Res* 2016; 1643: 70-9.
- 17 Yang Y, Fan C, Wang B, Ma Z, Wang D, Gong B, *et al.* Pterostilbene attenuates high glucose-induced oxidative injury in hippocampal neuronal cells by activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1863(4): 827-37.