

二甲双胍对*N*-甲基-*D*-天冬氨酸诱导的HT22细胞损伤的保护作用

蒋蒙蒙 吕馨 朱梦姚 袁海阳 郭自贺 王祎 贡岳松*

(南京中医药大学药学院, 南京 210023)

摘要 该文探究二甲双胍(metformin, Met)对*N*-甲基-*D*-天冬氨酸(*N*-methyl-*D*-aspartic acid, NMDA)诱导的HT22细胞损伤的神经保护作用。体外培养HT22细胞, 建立NMDA诱导HT22细胞神经损伤模型, 给予不同浓度的Met预保护, 检测细胞存活率, 确定Met预保护最佳浓度; Hoechst33342染色拍照观察细胞凋亡; 相应试剂盒检测培养基上清中乳酸脱氢酶(LDH)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性以及丙二醛(MDA)的含量; Western blot检测突触蛋白PSD95、NR2B以及AMPK、p-AMPK的表达情况。结果显示, 与对照组相比, NMDA可明显导致HT22细胞损伤, 4 mmol/L Met, 对其诱导的细胞神经损伤有最大保护作用; 模型组中, NMDA损伤导致HT22细胞凋亡, LDH活性升高, SOD活性降低, MDA含量升高, Met预保护均能逆转以上变化; Met还能上调PSD95、NR2B、p-AMPK的表达。总之, Met可能是通过激活AMPK, 调节PSD95/NR2B信号通路并发挥神经保护作用的。

关键词 二甲双胍; NMDA; 神经保护; HT22细胞; 阿尔茨海默病

Protective Effect of Metformin on NMDA-Induced Injury in HT22 Cells

JIANG Mengmeng, LÜ Xin, ZHU Mengyao, YUAN Haiyang, GUO Zihe, WANG Yi, GONG Yuesong*

(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract This study aimed to investigate the protective effect of Met on NMDA (*N*-methyl-*D*-aspartic acid)-induced HT22 cell damage. Firstly, a NMDA-induced HT22 cell injury model was established and pre-treated with different concentrations of Met. Cell viability was detected to determine the optimal concentration of pre-protection of Met. Furthermore, Hoechst33342 staining was used to observe apoptotic cells. The activities of LDH, SOD and MDA in HT22 cells were detected by test kits. Finally, the expression levels of synaptic proteins PSD95, NR2B, AMPK and p-AMPK were detected by Western blot. The results showed that NMDA significantly caused HT22 cell damage compared with the control group, and 4 mmol/L Met showed maximum protection on HT22 cell damage induced by NMDA. NMDA increased apoptosis rate of HT22 cells, LDH activity, and MDA content, and decreased SOD activity, which was reversed following Met pretreatment. Met could also up-regulate the expression levels of PSD95, NR2B, and p-AMPK. In conclusion, Met has a neuroprotective effect by activating AMPK and modulating NR2B/PSD95 signaling pathway.

Keywords metformin; NMDA; neuroprotection; HT22 cell; Alzheimer's disease

收稿日期: 2021-10-25

接受日期: 2021-11-29

高级人才科研启项目(批准号: 013074004016)和2016江苏省双创计划项目(批准号: 013033004004A)资助的课题

*通讯作者: Tel: 15605170283, E-mail: ygong@njucm.edu.cn

Received: October 25, 2021

Accepted: November 29, 2021

This work was supported by the Research Foundation for Advanced Talents (Grant No.013074004016) and the Jiangsu Provincial Dual Initiative of 2016 (Grant No.013033004004A)

*Corresponding author. Tel: +86-15605170283, E-mail: ygong@njucm.edu.cn

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性的且目前不可治愈的神经退行性疾病, 根据世界卫生组织发布的数据, 截至2020年, 全球估计有4 680万人患有痴呆症, 预计每20年, 患病人数将会是原来的两倍^[1]。而AD是最常见的痴呆症形式, 占痴呆症患者的60%~70%^[2], 其主要特征为记忆丧失以及其他认知障碍。

N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA), 是NMDA受体激动剂。当NMDA受体被过度激活时, 其可产生兴奋性毒性, 破坏突触可塑性^[3-4], 使活性氧激增, 导致神经变性和细胞死亡^[5-6], 加重AD。因此, NMDA受体功能的调节有益于AD。

二甲双胍(metformin, Met)是最普遍的口服降糖药之一。它不仅是胰岛素增敏剂, 也是AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)激动剂, 它能激活AMPK活性, 增强抗炎作用^[7], 调节自噬^[8], 增加胰岛素敏感性^[9], 减少淀粉样蛋白(amyloid- β protein, A β)的生成, 抑制Tau过磷酸化, 促进树突棘的形成, 从而改善学习记忆。

HT22细胞系来源于小鼠海马神经元组织, 在形态、结构及其他方面与神经元细胞极为相似, 且有明显的神经突触生长, 但与神经元细胞相比, 具有易于体外培养、可连续传代等优点, 所以常用来作为体外神经元细胞损伤模型细胞系, 也是诱导AD模型的细胞系之一。基于上述理论, 本实验通过NMDA诱导HT22细胞损伤来建立AD模型, 初步探讨Met在抗AD方面中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 小鼠海马神经元细胞系HT22由南京中医药大学中药鉴定实验室惠赠。

1.1.2 试剂 盐酸二甲双胍购自上海安耐吉化学有限公司; NMDA购自美国Sigma公司; DMEM培养基购自武汉塞维尔生物技术有限公司; 0.25%胰酶消化液购自美国HyClone公司; 胎牛血清FBS购自美国Lonsera公司; DMSO购自国药集团; MTT、青-链霉素混合液购自北京索莱宝科技有限公司; RIPA裂解液、Hoechst33342染色液购自上海碧云天生物技术有限公司; LDH试剂盒(货号: A020-2-1)、SOD试剂盒(货号: A001-3-2)、MDA试剂盒(货号: A003-1-2)均购自南京建成生物工程研究所; 高敏ECL发光

液底物购自上海天能科技有限公司; p-AMPK抗体、AMPK抗体、PSD95抗体购自美国Cell Signaling Technology公司; NR2B抗体购自美国Proteintech公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔IgG二抗购自南京良纬生物科技有限公司。

1.1.3 仪器 HERAcell150i型细胞培养箱购自美国Thermo公司; 酶标仪购自美国TECAN公司; 蛋白电泳仪、电泳槽、垂直电泳槽、转移槽、转移电泳槽、凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司; microtube 20R型微量冷冻高速离心机购自美国Beckman Coulter公司; IX73型倒置荧光显微镜购自日本Olympus公司。

1.2 方法

1.2.1 NMDA损伤模型的建立 HT22细胞置于37℃、5% CO₂的培养箱中, 用含10%胎牛血清以及2%青-链霉素混合液的DMEM完全培养基培养, 定期观察, 传代备用。待细胞进入对数生长期后, 以 5×10^3 个/mL密度接种于96孔板中, 每孔100 μ L, 每组6个复孔, 将NMDA用含2% FBS的DMEM培养基溶解, 配制成不同的浓度(1.25、2.5、5、10、20 μ mol/L), 待96孔板中的细胞贴壁后加入NMDA, 37℃共同孵育24 h, MTT法检测细胞存活率, 最后确定药物损伤的最佳浓度。

1.2.2 二甲双胍预保护浓度的确定 按“1.2.1”方法接种96孔板, MTT法确定细胞的安全浓度范围。实验分为正常对照组(Control组)、模型组(NMDA组)、Met处理组(NMDA+Met组)、调零空白组。将Met用含2% FBS的DMEM培养基溶解, 配制成不同浓度。Met处理组用0.25、0.5、1、2、4、8 mmol/L的二甲双胍干预HT22细胞, 提前2 h进行预保护, 再与上述确定的药物损伤最佳浓度共同培养24 h, MTT法确定Met保护的最佳浓度, 作为后续实验的基础。

1.2.3 Hoechst33342染色检测细胞凋亡 Hoechst33342染色剂是一种与DNA结合的蓝色荧光染料, 可以穿透细胞膜从而检测细胞凋亡。将对数生长期的细胞消化后接种于24孔板中, 每孔2 mL, 随机分组为正常对照组(Control组)、模型组(NMDA组)、Met处理组(NMDA+Met组), 处理完成后, 将培养基吸弃, 用PBS冲洗2次, 用4%多聚甲醛固定10 min, PBS冲洗2次, 避光加入Hoechst33342染色液, 细胞培养箱37℃孵育15 min。PBS洗3次后, 放置于倒置荧光显微镜下观

察拍照。

1.2.4 细胞上清液中LDH和SOD活性以及MDA含量的检测 取对数生长期的HT22细胞以 1×10^6 个/mL密度接种于6孔板中, 每孔2 mL, 处理完成后收集细胞培养基上清液, 以商品试剂盒说明书方法进行检测。

1.2.5 Western blot法检测细胞中PSD95、NR2B、p-AMPK、AMPK的表达 处于对数生长期的HT22细胞, 经处理消化后以 1×10^6 个/mL细胞密度接种于6孔板, 每孔2 mL, 处理完成后收集细胞。吸弃上清, 用预冷PBS冲洗2次, 每次1.5 mL, 加入RIPA裂解液、PMSF以及磷酸酶抑制剂于冰上裂解, 裂解后刮取细胞置于离心管中, 高速冷冻离心机在4 °C、12 000 r/min条件下离心15 min, 取上清液。BCA法测蛋白浓度, 上样量为20 μ g, 计算上样体积, 加入上样缓冲液 (loading buffer)。上样进行SDS-PAGE凝胶电泳, 湿法转膜至NC膜上, 再置于摇床, 用5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 加入一抗p-AMPK(稀释比1:3 000)、AMPK(稀释比1:2 000)、PSD95(稀释比1:3 000)、NR2B(稀释比1:2 000), 4 °C过夜。TBST洗3次, 每次10 min。加入对应的二抗稀释液(稀释比1:10 000), 室温孵育1.5 h。TBST洗3次, 每次10 min, ECL发光。用Image J软件统计灰度值。

1.2.6 统计学处理 本论文研究均采用GraphPad Prism 8进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 组间比较 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 NMDA对HT22细胞存活率的影响

用不同浓度的NMDA作用于HT22细胞24 h, MTT检测结果显示, NMDA损伤后的细胞存活率呈剂量依赖性下降, 最终选择存活率小于60%的浓度(10 μ mol/L)作为后续实验浓度(图1)。

2.2 二甲双胍对HT22细胞活性的影响

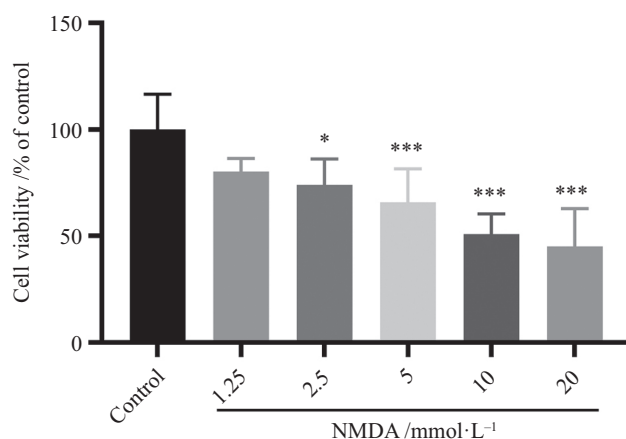
在Met对HT22细胞活性的影响研究中, 首先对Met的安全浓度范围检测, 显示在1 mmol/L时细胞活性增强($P < 0.05$)。给药Met预保护2 h, 后加入10 μ mol/L NMDA共同孵育24 h, MTT统计结果显示, 相比于模型组, 不同浓度的Met对HT22细胞活性均显著增强, 但Met在4 mmol/L时保护效果最佳, 因此用4 mmol/L的Met进行后续研究(图2)。

2.3 二甲双胍预保护可以抑制NMDA诱导的细胞凋亡

Hoechst33342染色剂是一种蓝色荧光染料。正常细胞在荧光显微镜下可以看出呈现均匀的淡蓝色荧光。细胞损伤后, 细胞核浓集、固缩, 会呈现出不规则的亮蓝色。检测结果显示, NMDA造模组的细胞大多呈现亮蓝色, Met预保护后, 细胞核形态恢复, 凋亡细胞明显减少, 且具有统计学意义($P < 0.001$)(图3)。

2.4 二甲双胍可缓解对NMDA诱导的HT22细胞损伤

结果显示, 与正常对照组相比较, NMDA模型组培养液中LDH活性升高($P < 0.01$)、SOD活性降低

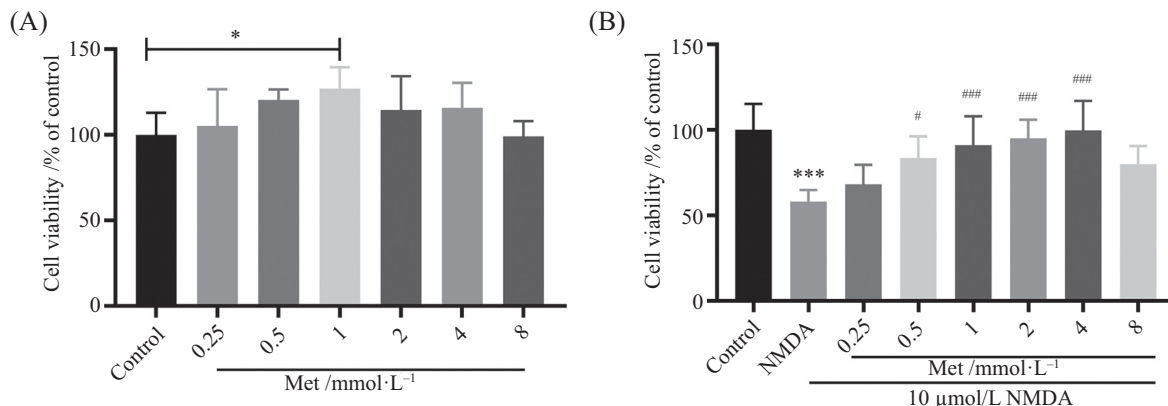


* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与正常对照组相比; $n = 6$ 。

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Control group; $n = 6$ 。

图1 NMDA对HT22细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of NMDA on the survival rate of HT22 cells

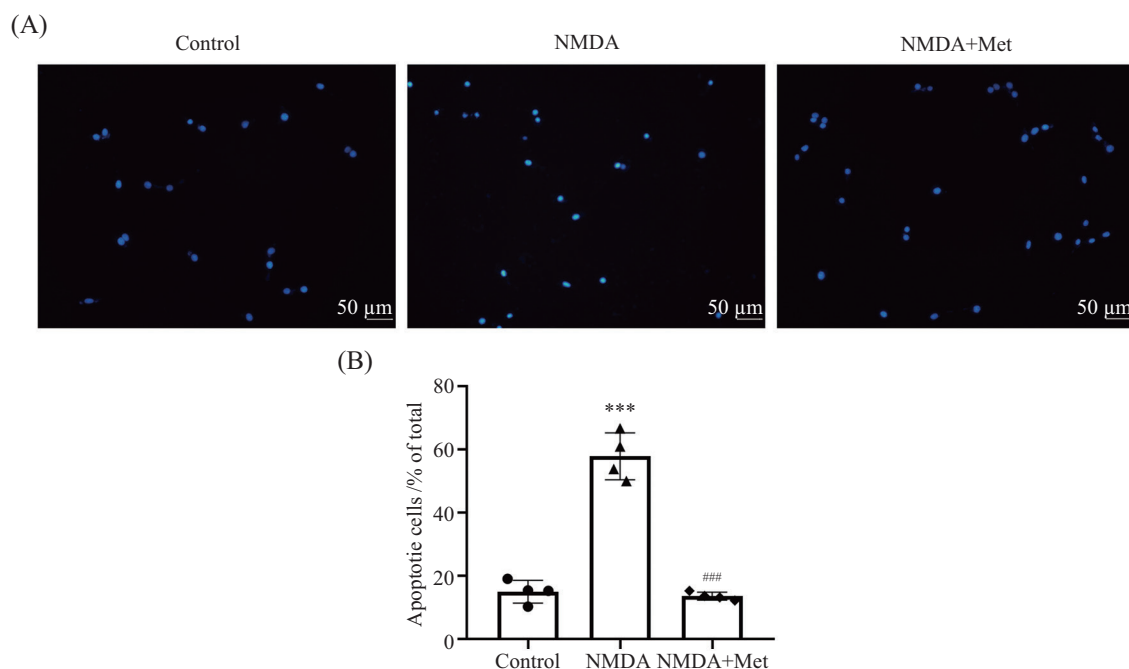


A: 不同浓度的二甲双胍对HT22细胞的影响; B: 不同浓度二甲双胍对NMDA诱导HT22细胞损伤的影响。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与正常对照组相比; # $P<0.05$, ### $P<0.001$, 与NMDA模型组相比; $n=6$ 。

A: effects of different concentrations of Met on HT22 cells; B: effects of different concentrations of Met on NMDA-induced HT22 cell injury. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs Control group; # $P<0.05$, ### $P<0.001$ vs NMDA group; $n=6$ 。

图2 不同浓度二甲双胍对HT22细胞存活率的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of metformin on the survival rate of HT22 cells



A: Hoechst33342染色拍摄荧光图; B: 凋亡细胞统计图; *** $P<0.001$, 与正常对照组相比; ### $P<0.001$, 与NMDA模型组相比; $n=4$ 。

A: photomicrography of Hoechst33342 staining; B: statistical diagram of apoptotic cells. *** $P<0.001$ vs Control group; ### $P<0.001$ vs NMDA group; $n=4$ 。

图3 二甲双胍对NMDA诱导的细胞凋亡的影响

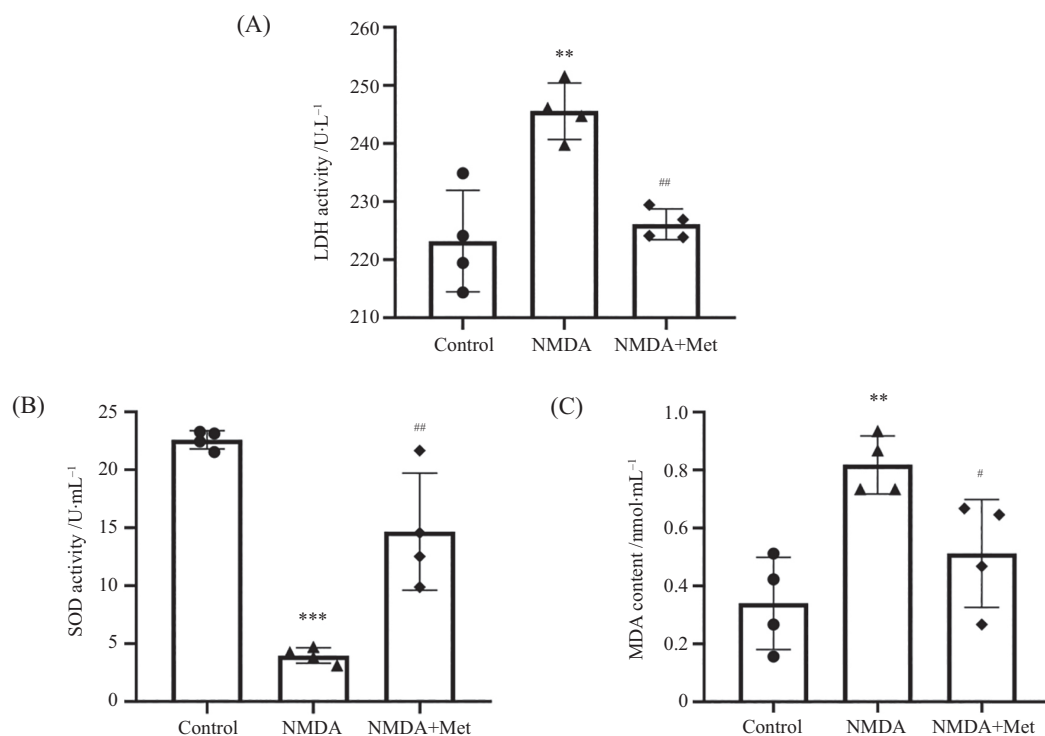
Fig.3 Effects of Met on apoptosis induced by NMDA

($P<0.001$)、MDA含量升高($P<0.01$); 与模型组相比, 二甲双胍组培养液中LDH活性下降($P<0.01$)、SOD活性升高($P<0.01$)、MDA含量降低($P<0.05$)。结果表明, 二甲双胍能逆转NMDA诱导的HT22细胞损伤(图4)。

2.5 二甲双胍对HT22细胞中PSD95和NR2B表达以及p-AMPK水平的影响

通过 Western blot检测各组细胞中PSD95、

NR2B、p-AMPK的表达情况。实验结果表明, NMDA处理后, 细胞中AMPK的表达水平无明显变化, PSD95、NR2B、p-AMPK的表达水平显著降低($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.01$)(图5)。给予二甲双胍预保护后, PSD95、NR2B及p-AMPK的表达水平显著升高($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$), AMPK表达无明显变化(图5)。

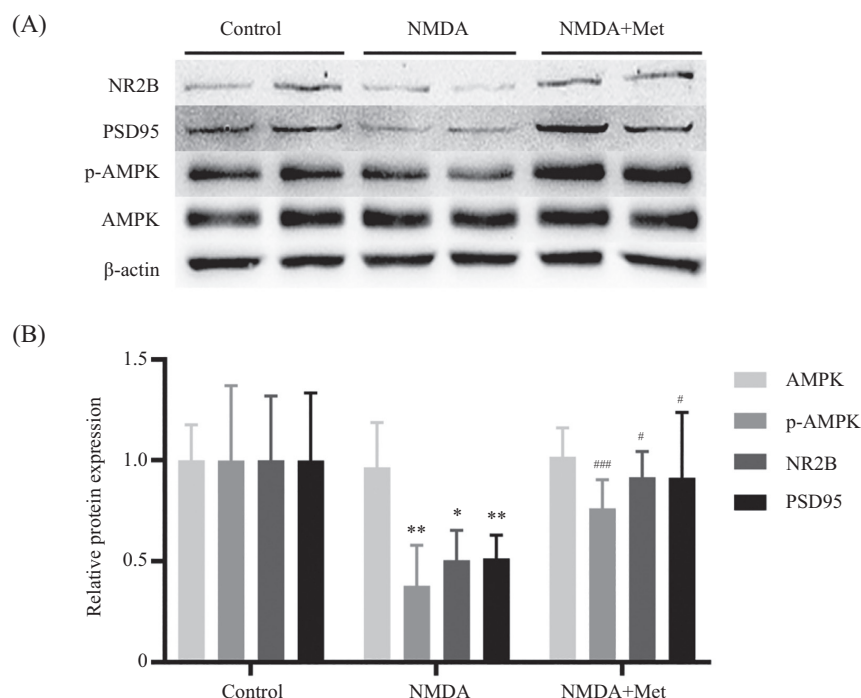


A: LDH活力统计图; B: SOD活力统计图; C: MDA含量统计图。** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与正常对照组相比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与NMDA模型组相比; $n=4$ 。

A: statistical diagram of LDH activity; B: statistical diagram of SOD activity; C: statistical diagram of MDA content. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs Control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs NMDA group; $n=4$.

图4 二甲双胍对NMDA诱导的HT22细胞培养液中LDH、SOD、MDA的影响

Fig.4 Effects of Met on LDH, SOD and MDA in HT22 cell culture medium induced by NMDA



A: Western blot不同条带图; B: Western blot条带灰度值分析。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与正常对照组相比; # $P<0.05$, ## $P<0.001$, 与NMDA模型组相比; $n=4$ 。

A: different Western blot strip graphs; B: analysis of Western blot strip gray value. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Control group; # $P<0.05$, ## $P<0.001$ vs NMDA group; $n=4$.

图5 二甲双胍对NMDA诱导的HT22细胞中PSD95、NR2B、p-AMPK、AMPK蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of Met on expression of PSD95, NR2B, p-AMPK and AMPK in NMDA-induced HT22 cells

3 讨论

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年人中最常见的痴呆形式, AD患者数量的日益增长给患者家庭和社会都带来了沉重的负担。AD的主要特征是突触丢失、 β -淀粉样蛋白沉积以及Tau蛋白的过度磷酸化。NMDA受体的过度激活, 是AD的常见病因之一, 被认为与AD相关的突触功能障碍有关^[12]。而临床用药美金刚就是NMDA受体拮抗剂, 可以改善AD的症状。因此, 我们选用NMDA体外诱导AD模型。

本实验结果显示, NMDA能显著降低HT22细胞的存活率并且该作用呈剂量依赖性, 增强模型组细胞内LDH的活性, 导致SOD活性下降, MDA含量升高; Hoechst33342染色显示NMDA可诱导细胞凋亡; NMDA模型组细胞内PSD95、NR2B、p-AMPK蛋白表达水平下降。而在此基础上, 二甲双胍预保护能显著提高HT22细胞的存活率。LDH能反映细胞的损伤程度, SOD和MDA是氧化应激的重要指标, 二甲双胍处理增强了SOD活性, 减少了损伤细胞内MDA的含量以及LDH的释放量, 表明二甲双胍有较好的抗氧化作用, 可起到神经保护作用; 此外, 二甲双胍还能减弱NMDA诱导的HT22细胞的凋亡作用^[13]; 这些结果显示, 二甲双胍对NMDA诱导的HT22细胞损伤具有神经保护作用。

AMPK是体内能量代谢的重要标志, 维持真核细胞ATP生产和消耗平衡的重要蛋白, 与维持 Ca^{2+} 稳态、线粒体功能障碍等方面密切相关^[8]。有文献报道, 二甲双胍激活AMPK可防止细胞凋亡并增加神经元活力^[14]。本实验结果显示, 二甲双胍通过激活AMPK的磷酸化逆转了NMDA诱导的HT22细胞的死亡。研究表明, AD的认知障碍始于突触功能的改变, 然后才可检测到明显的神经元丢失^[15-16]。PSD95是突触形成和神经发育过程中的一种重要支架蛋白, 通过其PDZ结构域与NMDA受体NR2B的C-端特异性结合^[17], 影响突触可塑性和学习记忆过程^[18-19]。因此本实验检测了PSD95与NR2B的表达情况, 发现了NMDA会导致PSD95表达下调, 而二甲双胍的预保护会显著增加PSD95的表达量, 增强突触可塑性。已有越来越多的文献表明, NMDA受体的NR2B亚单位比NR2A亚型更有利于长时程增强(long-term potentiation, LTP)的诱导, 并提示了NR2B亚单位在学习和记忆过程中的重要作用^[20-21]。

本研究发现, 二甲双胍不仅可以逆转NMDA诱导的NR2B的表达下调, 还能明显增强PSD95的表达能力, 保护HT22细胞免受损伤, 这一结果增强了之前实验室结果的可信度, 且进一步深入研究了突触的变化。

综上所述, 二甲双胍对NMDA诱导的HT22细胞损伤的保护作用能够通过激活AMPK磷酸化, 上调NR2B以及PSD95蛋白表达, 保护突触功能, 改善氧化应激, 从而具有一定抗AD作用。但二甲双胍确切的保护机制还需要进一步探究。

参考文献 (References)

- [1] CONWAY M E. Alzheimer's disease: targeting the glutamatergic system [J]. Biogerontology, 2020, 21(3): 257-74.
- [2] LIN T W, TSAI S F, KUO Y M. Physical exercise enhances neuroplasticity and delays Alzheimer's disease [J]. Brain Plast, 2018, 4(1): 95-110.
- [3] ZADORI D, SVERE G, SZALARDY L, et al. Glutamatergic dysfunctioning in Alzheimer's disease and related therapeutic targets [J]. J Alzheimers Dis, 2014, 42(Suppl 3): S177-87.
- [4] SKAPER S D, FACCI L, ZUSSO M, et al. Synaptic plasticity, dementia and Alzheimer disease [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2017, 16(3): 220-33.
- [5] CHENG Y J, LIN C H, LANE H Y. Involvement of cholinergic, adrenergic, and glutamatergic network modulation with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2283.
- [6] BUKKE V N, ARCHANA M, VILLANI R, et al. The dual role of glutamatergic neurotransmission in Alzheimer's disease: from pathophysiology to pharmacotherapy [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7452.
- [7] MARKOWICZ-PIASECKA M, SIKORA J, SZYDLOWSKA A, et al. Metformin: a future therapy for neurodegenerative diseases: theme: drug discovery, development and delivery in Alzheimer's disease guest editor: Davide Brambilla [J]. Pharm Res, 2017, 34(12): 2614-27.
- [8] SALMINEN A, KAARNIRANTA K, HAAPASALO A, et al. AMP-activated protein kinase: a potential player in Alzheimer's disease [J]. J Neurochem, 2011, 118(4): 460-74.
- [9] GUPTA A, BISHT B, DEY C S. Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes [J]. Neuropharmacology, 2011, 60(6): 910-20.
- [10] LU X Y, HUANG S, CHEN Q B, et al. Metformin ameliorates abeta pathology by insulin-degrading enzyme in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 2315106.
- [11] OU Z, KONG X, SUN X, et al. Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice [J]. Brain Behav Immun, 2018, 69: 351-63.
- [12] MOTA S I, FERREIRA I L, REGO A C. Dysfunctional synapse in Alzheimer's disease: a focus on NMDA receptors [J]. Neuropharmacology, 2014, 76(Pt A): 16-26.

- [13] GE J, HUANG Y, ZHANG Y, et al. Metformin inhibits propofol-induced apoptosis of mouse hippocampal neurons HT-22 through downregulating Cav-1 [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 1561-9.
- [14] CHUNG M M, CHEN Y L, PEI D, et al. The neuroprotective role of metformin in advanced glycation end product treated human neural stem cells is AMPK-dependent [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(5): 720-31.
- [15] TERRY R D, MASLIAH E, SALMON D P, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment [J]. *Ann Neurol*, 1991, 30(4): 572-80.
- [16] COLOM-CADENA M, SPIRES-JONES T, ZETTERBERG H, et al. The clinical promise of biomarkers of synapse damage or loss in Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2020, 12(1): 21.
- [17] KORNAU H C, SCHENKER L T, KENNEDY M B, et al. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95 [J]. *Science*, 1995, 269(5231): 1737-40.
- [18] WANG D, LI B, WU Y, et al. The effects of maternal atrazine exposure and swimming training on spatial learning memory and hippocampal morphology in offspring male rats via PSD95/NR2B signaling pathway [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 39(7): 1003-15.
- [19] BUSTOS F J, VARELA-NALLAR L, CAMPOS M, et al. PSD95 suppresses dendritic arbor development in mature hippocampal neurons by occluding the clustering of NR2B-NMDA receptors [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94037.
- [20] ZHUO M. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain [J]. *Mol Brain*, 2009, 2: 4.
- [21] WANG K, SUN W, ZHANG L, et al. Oleanolic acid ameliorates abeta25-35 injection-induced memory deficit in Alzheimer's disease model rats by maintaining synaptic plasticity [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2018, 17(5): 389-99.