

梓醇调控自噬和凋亡促进 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞存活^①

王 园¹, 刘 珂¹, 邱邴勋¹,
祝慧凤¹, 王 涛¹, 万 东²

1. 西南大学 药学院暨中医药学院, 重庆 400715;

2. 重庆医科大学 附属第一医院 急诊医学科 & 重症医学科, 重庆 400016

摘要: 探讨梓醇对过氧化氢(H_2O_2)诱导的 PC12 细胞氧化损伤后调控凋亡和自噬相关分子的机制, 采用 0.01 mmol, 0.1 mmol, 1 mmol 的梓醇预处理 PC12 细胞 2 h 后, 再用 250 μ mol/L H_2O_2 损伤细胞 12 h. MTT 法检测细胞存活率, 设置梓醇低、中、高 3 个剂量组(0.01 mmol, 0.1 mmol, 1 mmol), 自噬抑制剂 3MA 阳性对照组, 阴性对照组, H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损伤模型组, 采用荧光单标检测 LC3 II 的表达, Western blot 检测凋亡和自噬相关蛋白 Bcl2/Bax, LC3 II/I 和 Cleaved-caspase 3 的表达情况. 结果显示, 梓醇呈剂量依赖性地提高了 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的存活, 并对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的 LC3 II/I, Bcl2/Bax 升高蛋白水平表达, 降低了 Cleaved-caspase 3 的表达; 随着梓醇浓度的增加, Cleaved-caspase 3 的表达减少, 而 LC3 II/I 和 Bcl2/Bax 的表达在升高. 得出梓醇通过恢复凋亡和自噬相关蛋白 Bcl2/Bax, LC3 II/I 的平衡能够保护 PC12 细胞免于 H_2O_2 诱导的氧化损伤.

关键词: 梓醇; PC12 细胞; 过氧化氢; 凋亡; 自噬

中图分类号: R282

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)02-0027-08

近年来, 生物学家将细胞的死亡形式分为凋亡性程序性细胞死亡(Apoptosis)、自噬性程序性细胞死亡(Autophagy)和细胞坏死(Necrosis) 3 种类型^[1]. Apoptosis 也称为 I 型程序性细胞死亡, Autophagy 称为 II 型程序性细胞死亡. 自噬在细胞的生长、发育和疾病发生中起着重要的作用. 随着参与自噬性程序性细胞死亡途径的关键分子的鉴定成功, 我们对其分子机制、生理功能和在病理过程中的作用有了进一步的了解. 近年来越来越多的研究提示, 自噬与凋亡两种程序性细胞死亡方式某些情况下可以相互拮抗或促进, 可先后发生或同时共存于同一细胞, 相同诱导因素在不同细胞中可分别诱发自噬或凋亡; 参与自噬和凋亡的分子也可能存在交叉, 这些分子在自噬与凋亡两种程序性细胞死亡中可发挥正向或负向作用^[2-3].

有学者提出 *Beclin 1* 可通过增强 Caspase-9 的活性来提高化疗药物 CDDP 诱导的人胃癌细胞 MKN28 的凋亡, 说明作为自噬重要调控基因的 *Beclin 1* 也可参与细胞凋亡的调控^[4]. 营养剥夺诱导的细胞自噬在 *Atg* 基因(*Atg5*, *Atg6/Beclin 1*, *Atg10*, *Atg12*)干扰 RNA 或 Autophagy 特异抑制剂(如 3MA)存在的情

① 收稿日期: 2016-02-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(81073084); 重庆市自然科学基金项目(CSTC2010BB5127); 教育部中央高校重点项目(XDJK2012B010); 重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2014jcyjA10083).

作者简介: 王 园(1989-), 女, 四川南充人, 硕士研究生, 主要从事中医药和缺血性脑卒中神经保护与神经修复的研究.

通信作者: 祝慧凤, 副教授.

况下,细胞可发生凋亡形式的程序性死亡^[5].

梓醇是地黄的有效成分之一,具有多种药理活性.研究表明梓醇能促进 PC12 细胞轴突生长^[6]、抑制细胞凋亡^[7].课题组及其他学者研究表明梓醇能够保护脑缺血,减少脑缺血后缺血区域及半暗带区域神经元^[8-10]和非神经细胞如脑内皮细胞和星性胶质细胞的坏死和凋亡^[11].研究表明神经细胞缺血后死亡的方式多种多样,包括坏死、凋亡和自噬^[11-12].但是梓醇是否可以通过调节自噬发挥保护作用尚未见相关报道.

本研究拟离体培养 PC12 细胞,以 H_2O_2 氧化应激损伤 PC12 细胞,离体模拟脑缺血急性期自由基损伤神经元模型^[13],观察 PC12 细胞死亡的方式,观察梓醇是否有调控自噬或凋亡对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞发挥保护的作用.

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

倒置显微镜(奥林巴斯), CO_2 细胞培养箱(ESCO),生物安全柜(海尔),移液器(eppendorf),化学发光成像仪(Tanon-5200),电泳仪(BIO-RAD),PVDF 膜(millipore),ECL 化学发光液(advansta),BCA 蛋白浓度试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限公司),RIPA 裂解液(北京鼎国昌盛生物技术有限公司),肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12)细胞(中科院上海细胞所细胞库).

1.2 试剂与药物

马血清和 DMEM 培养基(Hyclone),胎牛血清(杭州四季青生物公司),0.25% 胰蛋白酶(Genview),二甲亚砜(DMSO,北京鼎国昌盛生物技术有限公司),四氮唑蓝(MTT, Sigma),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(武汉三鹰生物技术有限公司).梓醇购自石家庄流波百鸟生物技术有限公司,批号 20091091015,纯度 $\geq 98\%$.

1.3 药物配制与干预

1.3.1 药物配制

10 mmol 梓醇母液:称取 36.2 mg 梓醇溶解在 10 mL 细胞培养基中,过滤灭菌,备用.10 mmol 3MA 母液:称取 14.9 mg 3MA 后用 1 mL 培养基稀释溶解,过滤灭菌,备用.

1.3.2 药物干预

以不同浓度梓醇(0.01 mmol, 0.1 mmol, 1 mmol)和 3MA 预处理 PC12 细胞,干预 2 h 后加入 H_2O_2 达到所需的浓度,作用 12 h.分为阴性对照组, H_2O_2 损伤模型组,梓醇低、中、高剂量组(0.01 mmol, 0.1 mmol, 1 mmol),3MA 对照组.

1.4 PC12 细胞的培养

参考 Chen 等的方法^[14],稍加改进:细胞复苏后,接种在含 5% 胎牛血清,10% 马血清,DMEM 基础培养基,1% 青-链霉素的培养基中,培养条件 37 °C,5% CO_2 ,隔天更换细胞培养液.待细胞融合至 85%~90%,倒掉培养液,加入 0.25% 的胰蛋白酶消化,加入含血清的细胞培养液终止消化,计数,以 10^5 个/mL 密度进行种板,待细胞密度达 90% 时用于试验.

1.5 细胞存活率检测

将处于对数生长期的细胞悬液接种于 96 孔板中,待细胞贴壁并生长近融合状态时,按照 1.3.2 项进行分组和相应处理后,加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μ L,37 °C 继续孵育 4 h,终止培养,吸弃培养基,加入 DMSO 150 μ L,振荡 10 min.用酶标仪 490 nm 波长测定吸光度(A).本试验同时设立空白组(加入 200 μ L 无血清培养基),采用下列公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = \frac{OD_{\text{试验组}} - OD_{\text{空白组}}}{OD_{\text{正常组}} - OD_{\text{空白组}}} \times 100\%$$

式中, $OD_{\text{试验组}}$ 为试验组的吸光度, $OD_{\text{空白组}}$ 为空白组的吸光度, $OD_{\text{正常组}}$ 为正常组的吸光度.

1.6 Western Blot 检测

参照文献[15], 将培养板置于冰上并吸弃培养基, PBS 稍润洗, 吸弃 PBS, 每孔加入 80 μ L 的蛋白裂解液, 冰上作用 5 min. 收蛋白, 吸取裂解后的蛋白裂解液转移至 1.5 mL 离心管中, 涡旋混合置于冰上 10 min 后, 4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min 冷冻离心 10 min, 取上清液(含胞膜和胞浆裂解物)置于 4 $^{\circ}$ C 预冷的离心管中, -80 $^{\circ}$ C 保存备用. 取 20 μ L 样品蛋白上样, SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 电转蛋白至 PVDF 膜; 5%的血清封闭液室温封闭 2 h, 分别加入抗 LC3 I / II (1 : 1 000, cell signaling), P62(1 : 1 000, cell signaling), Beclin1 (1 : 1 000, cell signaling), Bax(1 : 500, Proteintech), Bcl2(1 : 500, 博奥森), Cleaved-caspase3(1 : 1 000, cell signaling), GAPDH(1 : 5 000, Proteintech)的一抗中 4 $^{\circ}$ C 过夜. 次日转入 1 : 5 000 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)室温孵育 2 h, 洗膜后, ECL 试剂盒显影, Tanon 5200 化学发光仪采集图像, 采用 Image J 软件进行分析.

1.7 免疫荧光染色

细胞长至 85%~90%后, 弃培养液, PBS 每 5 min 振摇 3 次; 95%乙醇, -20 $^{\circ}$ C 固定 45 min, PBS 每 5 min 振摇 3 次; 甲醇破膜作用 2 min, PBS 每 5 min 振摇 3 次; 10%山羊血清常温封闭 60 min, 洗出封闭液, LC3 抗体(1 : 500), 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, PBS 润洗每 5 min 3 次; 加荧光标记的二抗-FITC, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h 左右, PBS 润洗每 5 min 3 次; DAPI 染核, 室温避光孵育 15 min, PBS 润洗每 5 min 3 次洗去 DAPI, 迅速于荧光显微镜下采集图像. 每张爬片 200 倍镜下观察和拍摄阳性细胞分布密集但互不重叠的 3 个视野, 采用 Image J 图像分析软件计数细胞共计 27 个视野的平均阳性细胞数, 进行统计分析.

1.8 统计学处理

结果均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示. 采用 Oringin 8.0 软件作图, 试验数据采用 IBM SPSS 20.0 统计学软件进行单因素方差分析(ANOVA), 组间两两比较用 SNK 法, $p<0.05$ 为差异具有统计学意义.

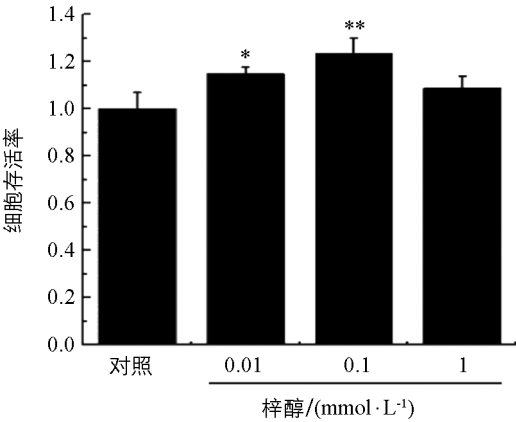
2 结 果

2.1 不同浓度的梓醇对正常 PC12 细胞存活率的影响

由图 1 可见, 加入梓醇后细胞 OD 值均高于对照组, 当梓醇浓度为 0.01 mmol 和 0.1 mmol 时明显高于对照组($p<0.05$, $p<0.01$), 而梓醇为 1 mmol 时, 细胞 OD 值虽高于对照组, 但差异无统计学意义. 说明梓醇在该浓度范围内对细胞无毒且可以使细胞活力增加, 且较低浓度组效果更好.

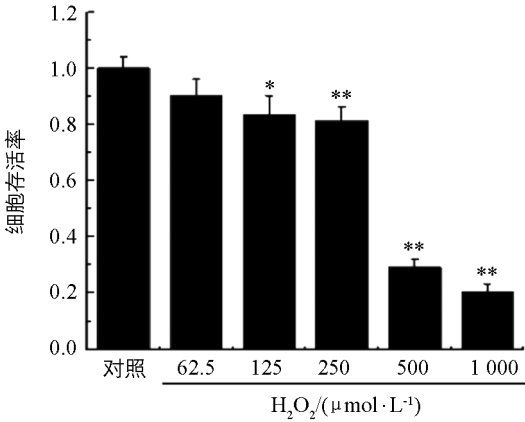
2.2 不同浓度 H₂O₂ 对 PC12 细胞损伤 12 h 后细胞存活率的影响

由图 2 可知, 随着 H₂O₂ 浓度的升高, 细胞的存活率与对照组相比呈现剂量依赖性降低, H₂O₂ 浓度低于 250 μ mol 后, 细胞存活率约为 80%. 与对照组相比, 500 μ mol 和 1 000 μ mol H₂O₂ 损伤后细胞存活率显著降低($p<0.01$). 结果表明选择浓度为 250 μ mol 的 H₂O₂ 作用 12 h 作为损伤条件进行后续试验^[19-20].



与对照组相比, * 表示 $p<0.05$, ** 表示 $p<0.01$.

图 1 不同浓度的梓醇对 PC12 细胞的存活率



与对照组相比, * 表示 $p<0.05$, ** 表示 $p<0.01$.

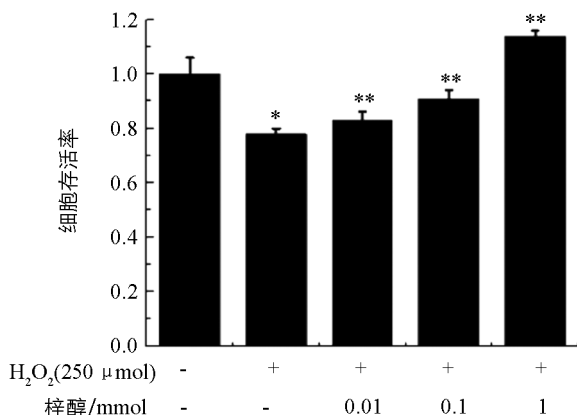
图 2 不同浓度的 H₂O₂ 对 PC12 细胞的存活率

2.3 不同浓度梓醇对 H_2O_2 损伤的 PC12 细胞存活率的影响

由图 3 可知, H_2O_2 损伤组与对照组相比细胞存活率显著降低($p < 0.05$), 表明模型成功. 随着梓醇浓度(0.01 mmol, 0.1 mmol, 1 mmol)的增高, H_2O_2 损伤的 PC12 细胞存活率也显著提高, 呈剂量依赖性增加. 结果表明梓醇能够剂量依赖性地保护 H_2O_2 诱导的自由基对 PC12 细胞的病理损伤($p < 0.01$).

2.4 梓醇对 Bcl2, Bax 和 Cleaved-caspase3 的影响

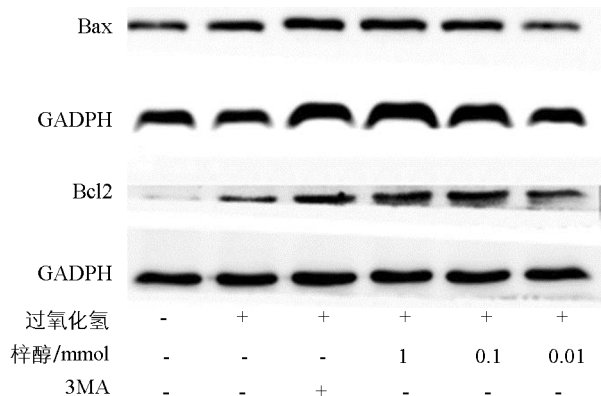
H_2O_2 诱导凋亡 12 h 后, Western blot 检测各组细胞中 Bcl2, Bax 和 Cleaved-caspase3 的蛋白表达情况, 结果见图 4, 模型组 Bcl2/Bax 的比值明显低于空白组($p < 0.05$). 随着梓醇浓度的增加, Bcl2/Bax 比值也在递增, 与模型组相比, 3MA 组和梓醇低、中、高剂量组均显著上调了 Bcl2/Bax 比值($p < 0.05$, $p < 0.01$). 结果表明, H_2O_2 诱导 Bax 的表达上升并降低 Bcl2 的表达, 而梓醇能显著逆转这一趋势, 通过恢复 Bax 与 Bcl2 的平衡, 对抗 H_2O_2 诱导 PC12 细胞凋亡的效应.



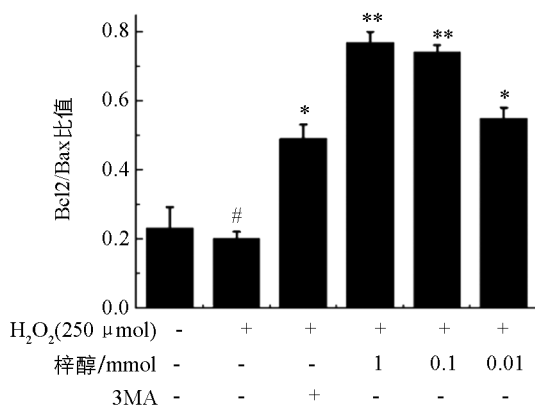
与阴性组相比, * 表示 $p < 0.05$;

与模型组相比, ** 表示 $p < 0.01$.

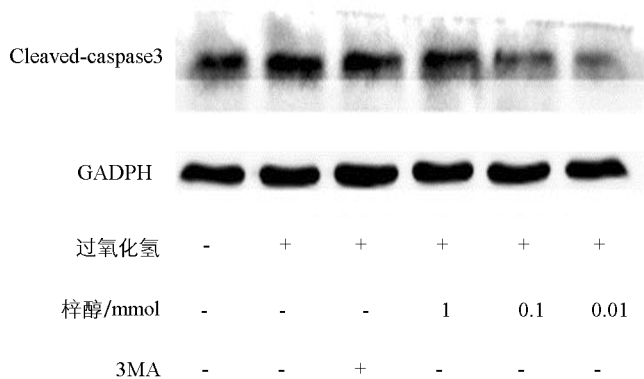
图 3 不同浓度梓醇对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的存活率



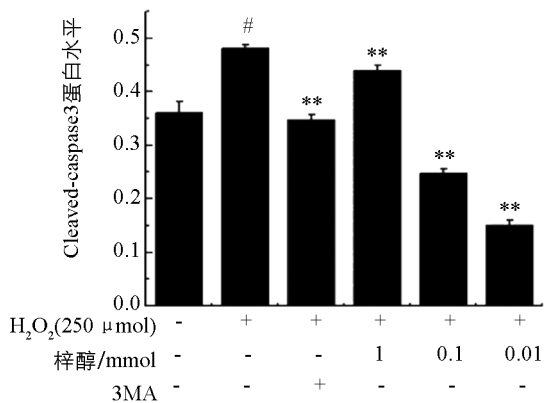
(a) Bax, Bcl2 蛋白的表达



(b) Bcl2/Bax 的比值统计图



(c) Cleaved-Caspase3 蛋白的表达



(d) Cleaved-Caspase3 蛋白水平统计图

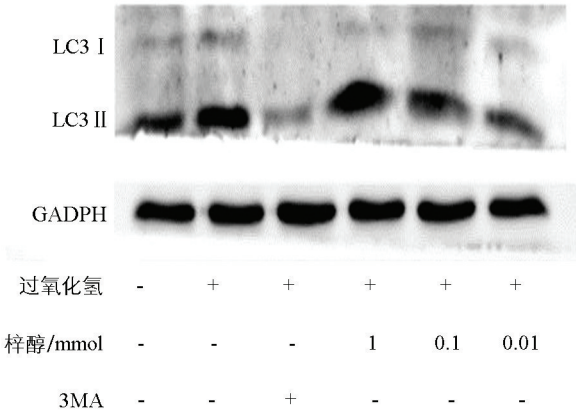
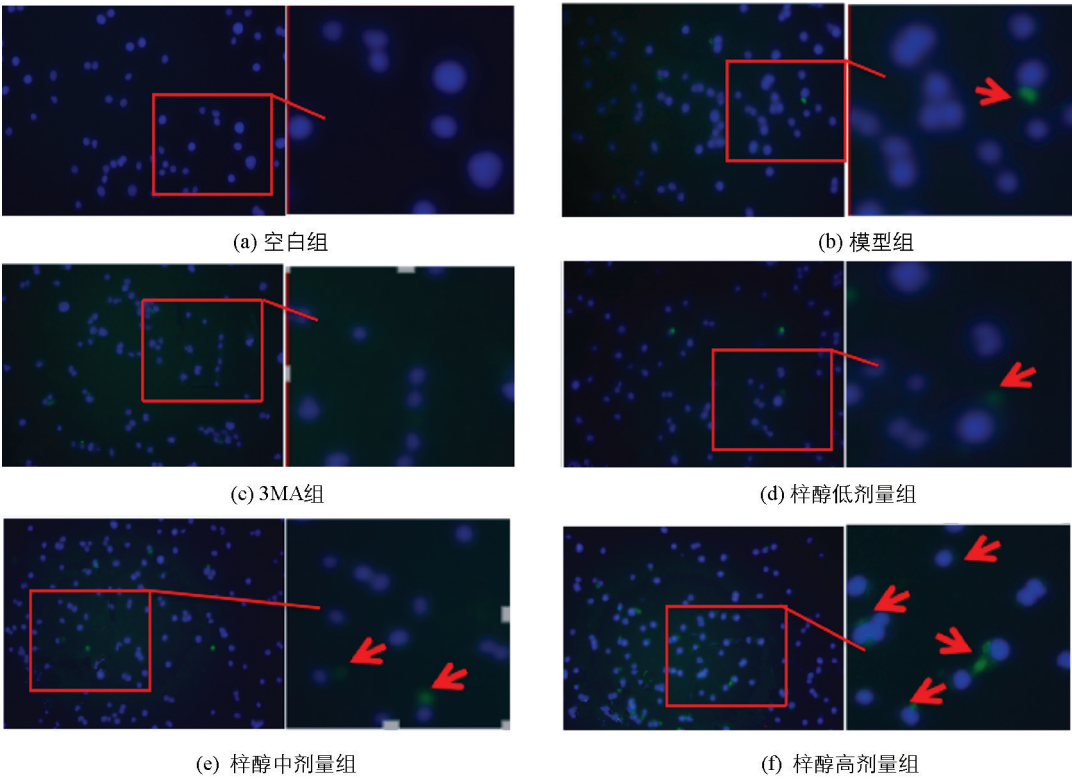
与空白组相比, # 表示 $p < 0.05$; 与模型组相比, * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$.

图 4 不同浓度的梓醇对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤后 Bcl2, Bax 和 Cleaved-caspase3 的蛋白表达情况

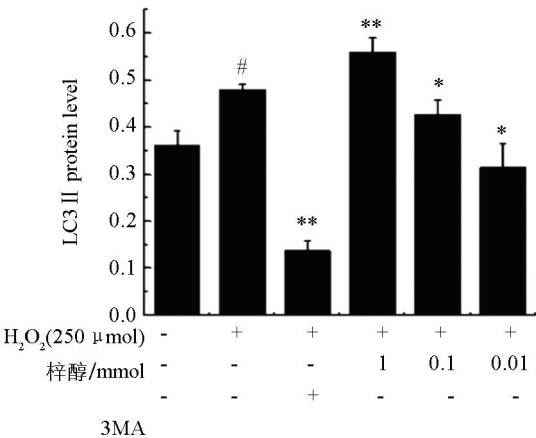
Cleaved-caspase3 的活化是细胞凋亡的典型特征之一, 与空白组相比, 模型组 Cleaved-caspase3 的活性显著增加($p<0.05$), 与模型组相比, 梓醇低、中剂量组的 Cleaved-caspase3 的活性明显降低($p<0.01$), 且均低于 3MA 组. 结果表明, 梓醇低、中、高剂量组均能显著抑制 H₂O₂ 诱导的 Cleaved-caspase3 激活, 提示梓醇可能通过影响 Caspase 依赖性凋亡信号通路起到抗凋亡的效应.

2.5 梓醇对 LC3 的免疫荧光染色和 Western blot 检测

免疫荧光染色结果显示, LC3 II 聚集于自噬体膜上, 自噬后的细胞表现为点状聚集增多, 空白组、3MA 组、梓醇低剂量组均未见 PC12 细胞显著表达 LC3 II 蛋白; 与空白组相比, 模型组有较少的 LC3 II 荧光表达; 与模型组相比, 梓醇高剂量组显著促进了 LC3 II 的表达, 表明梓醇对自噬的调控与其剂量有关, 低剂量梓醇抑制自噬, 而高剂量的梓醇促进了自噬的激活, 结果见图 5.



(g) Western blot检测LC3 II的蛋白表达



(h) LC3 II 蛋白水平统计

红色箭头所指自噬小体; 与空白组相比, #表示 $p<0.05$; 与模型组相比, *表示 $p<0.05$, **表示 $p<0.01$.

图 5 LC3 的免疫荧光表达和 Western blot 检测 LC3 II 的蛋白表达情况

Western blot 检测 LC3 II 蛋白表达情况,与空白组相比,模型组中 LC3 II 荧光的表达较强,与模型组比较,梓醇高剂量组显著性地促进了 LC3 II/LC3 I 的表达,梓醇低、中剂量组却抑制了 LC3 II/LC3 I 的表达,说明梓醇对 H_2O_2 诱导 PC12 损伤后自噬的调节与浓度相关,低浓度抑制自噬,高浓度激活自噬. Western blot 检测与荧光染色结果一致. 本试验有趣的现象是,与 3MA 组相比, H_2O_2 损伤细胞后,自噬是激活的状态,梓醇各剂量组均激活了自噬,只是激活程度各有差异,结果见图 5.

3 讨 论

H_2O_2 是一种活性氧分子,它参与了许多神经系统疾病的发病机制,常用作神经细胞氧化损伤的诱导剂. 过量的自由基会导致细胞损伤,引起机体衰老及功能障碍. 脑组织比其他任何组织器官更易受自由基的攻击,这是由于脑组织具有较高的需氧量、极高的代谢率,而抗氧化防御系统相对较缺乏. 本试验利用 H_2O_2 模拟细胞微环境活性氧积累,证明 $250\ \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 12 h 能显著诱导 PC12 细胞发生凋亡. 利用 3 个浓度的梓醇作用于 PC12 细胞,试验结果显示,梓醇预处理后能显著增加抗凋亡 Bcl2 的表达,证明了梓醇能抑制 H_2O_2 诱导的细胞凋亡. 这与马泰等^[16]研究相符.

除此以外,本研究有以下新发现:1)不同浓度的梓醇对生理条件下 PC12 细胞存活率有影响,随着梓醇浓度的升高,对 PC12 细胞的存活率促进作用在下降,提示梓醇浓度过高,可能会抑制 PC12 细胞的增殖和存活;2)不同浓度的梓醇对 PC12 细胞凋亡和自噬有不同影响.

LC3 II 免疫荧光显示 PC12 细胞受到 H_2O_2 损伤后,自噬有所激活,其中 3MA 和梓醇低剂量均抑制了自噬的激活,而梓醇高剂量却促进了 PC12 细胞 LC3 II 荧光的强表达. Western blot 检测证明, H_2O_2 可使 LC3 II 的表达上调,不同浓度的梓醇可使 LC3 II 不同程度上的抑制. LC3 是自噬泡形成过程中的关键蛋白,具有 2 种形式: LC3 I 和其蛋白水解衍生物 LC3 II. LC3 I 定位于胞浆, LC3 II 定位于自噬双层膜上. 一旦自噬体与溶酶体融合,自噬体内的 LC3 II 便被溶酶体中的水解酶降解,所以 LC3 II 含量或 LC3 II/LC3 I 的比值的增高反映了自噬活性的增强^[17].

为探讨梓醇是否调控自噬和凋亡来影响 PC12 细胞的存活,采用 3MA 作为抑制自噬工具药,发现短期内 3MA 也促进了 Bcl2/Bax 的表达,同时抑制了激活型 Cleaved-caspase3 的表达,抑制了凋亡的发生. 上述结果提示梓醇不仅可以通过抑制凋亡发挥保护作用,还可以通过调节自噬来发挥对神经细胞的保护. 梓醇低剂量显著性地降低了激活型 Cleaved-caspase3 的表达,并且表达量比梓醇高剂量更低,显著地抑制了凋亡的发生. 但梓醇高剂量抑制 Cleaved-caspase3 的活化表达量却相对低剂量和中剂量少. 两者从不同角度证实梓醇调控自噬和凋亡的程度与其剂量相关.

有研究表明脑缺血时,抑制自噬有利于对脑缺血的保护;也有研究证实激活自噬可以促进对脑缺血的保护. 在脑缺血等病理条件下,自噬被激活将会改变细胞的死亡模式,减少细胞的坏死和凋亡^[18]. 因此自噬是一把双刃剑,自噬既可以导致凋亡,也可以挽救细胞免于凋亡^[19-20]. 仅从 western blot 和免疫荧光结果看,我们尚且不能明确梓醇通过对自噬的调节究竟发挥保护性作用还是抑制作用,但结合 PC12 细胞的存活数据,我们认为,梓醇低剂量促进 PC12 细胞的存活主要与低剂量梓醇抑制凋亡有关,可能是梓醇低剂量对凋亡和自噬综合调控作用的结果;而梓醇高剂量促进细胞存活率的能力最强,提示高剂量的梓醇有可能通过激活自噬促进细胞的存活.

既往研究表明,梓醇对中枢神经系统疾病的防治作用主要集中在梓醇抗脑缺血缺氧、减轻自由基损伤所致的凋亡方面. 本研究发现了梓醇促进 PC12 细胞存活的不同机制,不同浓度的梓醇均能上调

Bcl2/Bax 的比值, 降低 Cleaved-caspase3 的活化. 但梓醇低剂量抑制自噬, 高剂量激活自噬, 说明梓醇调控自噬、减轻细胞凋亡与其剂量有关, 但是梓醇如何通过对凋亡和自噬的交互作用调控细胞的存活尚需要课题组进一步研究.

参考文献:

- [1] CHEN W, SUN Y, LIU K, et al. Autophagy: a Double-Edged Sword for Neuronal Survival After Cerebral Ischemia [J]. *Neural Regeneration Research*, 2014, 9(12): 1210—1216.
- [2] 韩侨宇, 江 昭, 陈春花. 自噬在脑缺血损伤中的作用研究 [J]. *解剖科学进展*, 2013, 19(5): 436—439.
- [3] 付晶晶, 段君凯, 李 红. 细胞自噬与凋亡的交互作用 [J]. *生命的化学*, 2014, 34(5): 649—653.
- [4] LIA Dan-qing, DUAN Yan-long, BAO Yong-ming, et al. Neuroprotection of Catalpol in Transient Global Ischemia in Gerbils. *Neuroscience Research*, 2004, 50(2): 169—177.
- [5] LIANG J H, DU J, XU L D, et al. Catalpol Protects Primary Cultured Cortical Neurons Induced by Abeta(1-42) Through a Mitochondrial-Dependent Caspase Pathway [J]. *Neurochem Int*, 2009, 55(8): 741—746.
- [6] ZHU H F, WAN D, LUO Y, et al. Catalpol Increases Brain Angiogenesis and up-Regulates VEGF and EPO in the Rat After Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion [J]. *Int J Biol Sci*, 2010, 6(5): 443—453.
- [7] 张自强, 刘玉梅, 薛帮群, 等. 梓醇对过氧化氢诱导的星形胶质细胞氧化损伤的保护作用 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(15): 1955—1958.
- [8] CAI Q Y, CHEN X S, ZHAN X L, et al. Protective Effects of Catalpol on Oligodendrocyte Death and Myelin Break-down in a Rat Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 497(1): 22—26.
- [9] HU L, SUN Y, HU J. Catalpol Inhibits Apoptosis in Hydrogen Peroxide-Induced Endothelium by Activating the PI3K/Akt Signaling Pathway and Modulating Expression of Bcl-2 and Bax [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 628(1—3): 155—163.
- [10] WANG P, XU T Y, WEI K, et al. ARRB1/Beta-Arrestin-1 Mediates Neuroprotection Through Coordination of BECN1-Dependent Autophagy in Cerebral Ischemia [J]. *Autophagy*, 2014, 10(9): 1535—1548.
- [11] LIU A J, WANG S H, HOU S Y, et al. Evodiamine Induces Transient Receptor Potential Vanilloid-1-Mediated Protective Autophagy in U87-MG Astrocytes [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2013: 354840.
- [12] URBANEK T, KUCZMIK W, BASTA-KAIM A, et al. Rapamycin Induces of Protective Autophagy in Vascular Endothelial Cells Exposed to Oxygen-Glucose Deprivation [J]. *Brain Research*, 2014, 1553: 1—11.
- [13] 陶 真, 吉训明, 罗玉敏. 体外脑缺血模型 [J]. *国际脑血管病杂志*, 2013, 21(2): 155—160.
- [14] CHEN L, XU B, LIU L, et al. Cadmium Induction of Reactive Oxygen Species Activates the mTOR Pathway, Leading to Neuronal Cell Death [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2011, 50(5): 624—632.
- [15] 胡昌华, 李彦杰, 刘海洋, 等. 西罗莫司酯化物对肾癌细胞系 786-0 的抑制作用及其机制初探 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2014, 36(2): 1—6.
- [16] 马 泰, 孙国平, 李家斌. 细胞自噬的研究方法 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 39(3): 204—209.
- [17] BUCKLEY K M, HESS D L, SAZONOVA I Y, et al. Rapamycin up-Regulation of Autophagy Reduces Infarct Size and Improves Outcomes in Both Permanent MCAL, and Embolic MCAO, Murine Models of Stroke [J]. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2014, 6(8): 1—9.
- [18] GAO L, JIANG T, GUO J, et al. Inhibition of Autophagy Contributes to Ischemic Postconditioning-Induced Neuro6protection Against Focal Cerebral Ischemia in Rats [J]. *PloS one*, 2012, 7(9): e46092.

- [19] CHEN L, XU B, LIU L, et al. Hydrogen Peroxide Inhibits mTOR Signaling by Activation of AMPK α Leading to Apoptosis of Neuronal Cells [J]. *Laboratory Investigation*, 2010, 90(5): 762—773.
- [20] SU C, SUN F, CUNNINGHAM R L, et al. ERK5/KLF4 Signaling as a Common Mediator of the Neuroprotective Effects of Both Nerve Growth Factor and Hydrogen Peroxide Preconditioning [J]. *Age (Dordrecht)*, 2014, 36(4): 9685.

Catalpol Promotes H₂O₂-Injured PC12 Cell Survival by Regulating Autophagy and Apoptosis

WANG Yuan¹, LIU Ke¹, QIU Bing-xun¹,
ZHU Hui-feng¹, WANG Tao¹, WAN Dong²

1. School of Pharmaceutical Sciences and Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Emergency Medicine and ICU, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: This study aimed to explore the molecular mechanism for the regulation of autophagy or apoptosis by catalpol after the H₂O₂-induced oxidative injure in PC12 cells. PC12 cells were pretreated with catalpol at different concentrations (0.01, 0.1 and 1 mmol), and then the viability of H₂O₂-injured PC12 cells was measured by MTT assay. There were four groups: catalpol of different concentrations (0.01, 0.1 or 1 mmol), autophagy inhibitor 3-MA positive control, negative control and H₂O₂-injured PC12 cell model. Fluorescent single staining was used to detect the expression of LC3II, and Western blot to detect the expression of autophagy-related proteins LC3 II / I, Bcl2/BAX and cleaved-caspase 3. Compared with the model group, catalpol dose-dependently promoted the survival of H₂O₂-injured PC12 cells, increased the expression of LC3 II / I and Bcl2/BAX, and reduced the expression of cleaved-caspase 3. Interestingly, as catalpol concentration increased, the reduction degree of cleaved-caspase 3 reduced, while LC3 II / I and Bcl2/BAX increased. Catalpol can protect H₂O₂-injured PC12 cells and promote their survival through restoring the balance between Bcl2/Bax and LC3 II / I-the two genes related to autophagy and apoptosis.

Key words: catalpol; PC12; H₂O₂; apoptosis; autophagy

责任编辑 周仁惠

