

雷公藤红素抑制 Cd²⁺诱导的神经毒性

何飞¹, 刘园¹, 刘素素¹, 王娜¹, 宋海红¹, 熊国良², 卢建东², 喻长远¹, 王诗卉¹

1 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029

2 深圳市中医院, 广东 深圳 518000

何飞, 刘园, 刘素素, 王娜, 宋海红, 熊国良, 卢建东, 喻长远, 王诗卉. 雷公藤红素抑制 Cd²⁺诱导的神经毒性. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3443-3452.

HE F, LIU Y, LIU SS, WANG N, SONG HH, XIONG GL, LU JD, YU CY, WANG SH. Celastrol inhibits neurotoxicity induced by Cd²⁺. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3443-3452.

摘要: 镉 (cadmium, Cd) 是环境中常见的一种重金属, Cd²⁺可以通过穿透血脑屏障, 产生神经毒性, 从而诱发各种神经退行性疾病, 雷公藤红素是雷公藤的一种有效成分, 具有抗癌、抗炎等一系列药理作用, 本文探究雷公藤红素对 Cd²⁺诱导的相应神经毒性的影响作用。通过细胞增殖实验、细胞膜完整性实验、细胞形态实验探索了 Cd²⁺对小胶质细胞 HMC3 活力的影响; 通过一氧化氮 (NO) 检测实验、脂质过氧化 (malondialdehyde, MDA) 检测实验、蛋白免疫印迹实验分析了 Cd²⁺的神经毒性以及雷公藤红素对 Cd²⁺诱导的相应神经毒性的影响。结果表明: 与对照组相比, 当 Cd²⁺浓度达到 40 μmol/L 时, 对 HMC3 细胞增殖抑制率为 (57.17±8.23)% ($P < 0.01, n=5$), 继续增大 Cd²⁺浓度, 细胞活性将进一步降低; 当 Cd²⁺浓度达到 40 μmol/L 以上时, HMC3 的细胞膜明显受到破坏, 并且破坏作用与浓度呈剂量依赖性关系; 随着 Cd²⁺浓度的增加, 细胞形态开始变化, 贴壁效果变差。Cd²⁺使 HMC3 细胞释放的 NO 量显著增加, 而雷公藤红素能够有效地抑制 Cd²⁺诱导的 HMC3 细胞 NO 的释放; Cd²⁺使 HMC3 细胞脂质过氧化水平显著增加, 加入 10⁻⁷ mol/L 雷公藤红素后, MDA 的释放量显著减少; Cd²⁺会使 p-PI3K 蛋白含量增加, 而加入了雷公藤红素 (10⁻⁷、10⁻⁶ mol/L) 后, p-PI3K 蛋白和 p-AKT 蛋白的激活均被抑制, 从而抑制了细胞凋亡。综上所述, 雷公藤红素能够抑制 Cd²⁺诱导的小胶质细胞毒性, 从而起到神经保护作用。

关键词: 雷公藤红素; Cd²⁺; 小胶质细胞; 神经保护; 神经毒性

Received: March 4, 2022; Accepted: June 9, 2022

Supported by: Shenzhen Science and Technology Project (JCYJ20180507183842516); National Natural Science Foundation of China (82174531, 21606013)

Corresponding authors: WANG Shihui. Tel: +86-10-64421335-203; E-mail: wangshihui@mail.buct.edu.cn
YU Changyuan. Tel: +86-10-64421335-203; E-mail: yucy@mail.buct.edu.cn

基金项目: 深圳科学技术项目 (JCYJ20180507183842516); 国家自然科学基金 (82174531, 21606013)

Celastrol inhibits neurotoxicity induced by Cd²⁺

HE Fei¹, LIU Yuan¹, LIU Susu¹, WANG Na¹, SONG Haihong¹, XIONG Guoliang²,
LU Jiandong², YU Changyuan¹, WANG Shihui¹

1 College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2 Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518000, Guangdong, China

Abstract: Cadmium (Cd) is a common heavy metal in the environment. Cd²⁺ may penetrate the blood-brain barrier and produce neurotoxicity, thus inducing various neurodegenerative diseases. Celastrol is an effective component of *Tripterygium wilfordii* Hook. F., which has many pharmacological effects such as anti-cancer and anti-inflammatory. Here we explored the effect of celastrol on the corresponding neurotoxicity induced by Cd²⁺. Cell proliferation test, cell membrane integrity test, and cell morphology were observed to analyze the effect of Cd²⁺ on the viability of HMC3. The neurotoxicity of Cd²⁺ and the effect of celastrol on the corresponding neurotoxicity induced by Cd²⁺ were analyzed by nitric oxide (NO) test, lipid peroxidation (MDA) test, and Western blotting. When the concentration of Cd²⁺ reached 40 μmol/L, the inhibition rate of HMC3 cell proliferation was (57.17±8.23)% ($P<0.01$, $n=5$), compared with the control group. The cell activity continued to reduce when the Cd²⁺ concentration further increased. When the concentration of Cd²⁺ was higher than 40 μmol/L, the cell membrane of HMC3 was significantly damaged, and the damage was dose-dependent. Upon increasing the Cd²⁺ concentration, the cell morphology began to change and the adhesion also became worse. Cd²⁺ significantly increased the amount of NO released by HMC3 cells, while celastrol effectively inhibited the NO release of HMC3 cells induced by Cd²⁺. Cd²⁺ greatly increased the release of MDA in HMC3 cells, and the level of MDA decreased rapidly upon the addition of 10⁻⁷ mol/L celastrol. Cd²⁺ increased the expression of p-PI3K protein, and the levels of p-PI3K protein and p-AKT protein were inhibited by the addition of celastrol (10⁻⁷ mol/L, 10⁻⁶ mol/L), thus preventing cell apoptosis. In conclusion, celastrol inhibits Cd²⁺ induced microglial cytotoxicity and plays a neuroprotective role.

Keywords: celastrol; Cd²⁺; microglia; neuroprotection; neurotoxicity

雷公藤红素是从卫矛科雷公藤属木质藤本植物雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. F.) 中提取出来的一种活性良好的成分, 属于醌甲基三萜类化合物^[1], 具有多种生物活性。雷公藤红素大多存在于雷公藤的根部, 并且会受到环境和地理位置的影响, 先前的研究发现表明, 雷公藤红素具有抗癌、抗氧化、抗炎、免疫抑制等多种生理作用^[2]。

镉 (cadmium, Cd) 是一种有毒性的重金属, 具有很高的潜在生态风险。虽然镉在自然界中没有广泛分布, 且在自然条件下对人体也不会造成影响, 但近年来由于很多人为因素, 镉对环境 and 人类身体健康造成了严重危害^[3]。镉一般通过食物摄取进入人体^[4], 并在人体器官中积累, Cd²⁺可以产生致癌作用, 损害人体的心血管、肾脏、肝脏、神经、胃肠、生殖和

呼吸系统^[5]。研究表明,镉会穿过血脑屏障,导致神经毒性。在大脑中,镉诱导参与炎症、氧化应激和神经元凋亡的各种信号通路的激活^[6]。环境中的镉可以影响小胶质细胞的正常发育过程,因此也影响了神经元的存活、轴突的生长和突触的形成^[7],2010年朱俊德等^[8]发现慢性镉中毒致小鼠海马CA3区星型胶质细胞和小胶质细胞增多,而少突胶质细胞减少,这些变化可能是镉的神经毒性作用之一。

小胶质细胞分布在大脑中,是中枢神经系统中主要的常驻免疫细胞和吞噬细胞^[9],各种神经退行性疾病,包括帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 和肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS),都与小胶质细胞介导的神经炎症有关^[10]。神经炎症现在被认为是一把双刃剑,对神经元既有害又有益。越来越多的证据表明,中枢神经系统的小胶质细胞活化是不均匀的,可以分为两种相反的类型:促炎的M1表型和免疫抑制的M2表型。M1激活的小胶质细胞表达促炎细胞因子,驱动细胞浸润,而M2激活的小胶质细胞更具有修复性,促进碎片的吞噬作用,促进与细胞稳定性和修复相关的蛋白的表达^[11]。

越来越多的研究表明,雷公藤红素在各种神经退行性疾病模型中表现出了显著的神经保护作用。雷公藤红素可以通过抑制各种炎症因子的形成、清除自由基及过氧化物、启动热激反应,上调热休克蛋白 (heat shock protein, Hsp) 的表达,减少异常蛋白质的合成,逆转蛋白质的错误折叠等有效防治中枢神经退行性病变^[12]。雷公藤红素还能够通过下调神经元中 p-JNK, p-c-Jun 和 NF- κ B 的表达、诱导 AMPK α 磷酸化^[13]和抑制 Ca²⁺-CaMKII 依赖的 Akt/mTOR 途径^[14]起到一定的神经保护作用。但是,当前

对于雷公藤红素对 Cd²⁺诱导的小胶质细胞毒性是否有保护作用尚属未知。而本课题组前期曾经系统研究了不同浓度雷公藤红素对小胶质细胞炎症反应的影响机制^[15],基于此,本文详细探究了 Cd²⁺对小胶质细胞 HMC3 细胞增殖和细胞凋亡的影响,并且系统探索了雷公藤红素对 Cd²⁺诱导的神经毒性的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验原料与仪器

1.1.1 实验原料

雷公藤红素、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS)、Tris buffered saline Tween (TBST) 缓冲液、MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 细胞毒性检测试剂盒、一氧化氮检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、脂质氧化 (MDA) 检测试剂盒、一抗: Phospho-PI3K P85 α / β /P55 γ (Y467/Y464/Y199)、Rabbit Polyclonal Antibody 和 Phospho-Akt (Ser473) 抗体 (兔多抗) 购自上海碧云天生物技术有限公司。 β -actin 抗体购自 Proteintech 公司,胎牛血清和胰酶购自 Gibco by Life Technologies 公司。DMEM 培养基购自 Hyclon 公司。五水氯化镉购自上海麦克林生化科技有限公司。小胶质细胞 (HMC3) 购自北京北纳创联生物技术研究院。

1.1.2 实验仪器

超净工作台 (SW-CJ-1D, Suzhou purification 公司), 离心机 (Heraeus Pico 17, Thermo Fisher 公司), 酶联免疫检测仪 (K3 Plus, BIO-DL 公司), 恒温培养箱 (311, Thermo Fisher 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,于

5% CO₂ 恒温 37 °C 的培养箱中进行培养, 等待细胞生长稳定后, 取对数生长期的细胞进行后续的实验^[16]。

1.2.2 细胞增殖实验

首先取对数生长期的细胞, 制成细胞浓度为(5-10)×10⁴个/mL 的细胞悬液, 分于 96 孔板, 每个孔板加 100 μL 细胞悬液, 约 8 000 个细胞/孔, 孔板边缘用无菌 PBS 填充, 接种好的孔板放于培养箱中培养, 直到细胞贴壁^[17], 用不同浓度 Cd²⁺ 处理细胞设为实验组, 只含培养基的孔设为空白组, 只含正常细胞的孔设为对照组。将 96 孔板放入 5% CO₂、37 °C 的培养箱中孵育 24 h, 然后吸取上清液, 加入 100 μL 新鲜培养基和 10 μL MTT 试剂, 继续培养 4 h, 培养结束后, 将上清液去掉, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解后, 在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度 (OD) 值。按照式 (1) 和 (2) 计算细胞存活率 (A) 和抑制率 (B)。

$$A = (OD_E - OD_B) / (OD_C - OD_B) \times 100\% \quad (1)$$

$$B = (1 - A) \times 100\% \quad (2)$$

式中, A 为细胞活力, B 为细胞抑制率, OD_E 为实验组吸光度值, OD_B 为空白组吸光度值, OD_C 为对照组吸光度值。

1.2.3 膜完整性实验

本实验采用 LDH 检测试剂盒进行细胞膜完整性的评估^[18]。实验分成 4 组, 分别是只含培养基的空白组, 只含正常细胞的对照组和用不同 Cd²⁺ 浓度处理的实验组, 只含正常细胞的样品最大酶活性为对照组。细胞铺板后放入培养箱中培养, 待细胞贴壁后, 用 PBS 清洗一次, 每孔加入 200 μL 不含血清的培养基, 在相应孔中加入不同浓度的雷公藤红素, 放入培养箱中培养。在培养第 23 h 时取出孔板, 每孔加入 20 μL 的 LDH 释放剂, 反复吹吸混匀, 放入培养箱中

继续培养 1 h。将孔板放入离心机中 400×g 离心 5 min, 离心结束后将上清液转移到新的孔板中。每孔加入 60 μL LDH 检测工作液, 避光条件下在摇床上孵育 30 min, 在酶标仪 490 nm 处检测各孔的 OD 值。根据得到的 OD 值, 计算出每孔的 LDH 释放值。

$$C = (OD_{E/C} - OD_B) / (OD_F - OD_B) \times 100\% \quad (3)$$

式中, C 为 LDH 释放量 (阳性对照的百分比), OD_F 为样品最大酶活性对照孔的吸光度值。

1.2.4 一氧化氮检测实验

在 96 孔板中进行细胞铺板, 本实验包括空白组、对照组和用不同 Cd²⁺ 浓度和不同雷公藤红素预处理的实验组。培养一段时间后待细胞贴壁, 先在对应孔中加入雷公藤红素, 培养 1 h 后实验组加入相应浓度的 Cd²⁺, 放入培养箱中培养 24 h。先将 NO 试剂盒从 -20 °C 冰箱取出恢复至室温, 用细胞培养基稀释 NO 标准品, 标准品的浓度分别为 0、1、2、5、10、20、40、60、100 μmol/L, 分别取 50 μL 加入到新的孔板中, 将之前培养好的样品孔板放入离心机中 400×g 离心 5 min, 离心后每孔取 50 μL 上清液加入新的孔板中, 每孔依次加入 50 μL 室温 Griess Reagent I、Griess Reagent II。在酶标仪 540 nm 处检测各孔的 OD 值。

1.2.5 脂质过氧化检测实验

本实验用 6 孔板铺板, 分成 2 组, 只含正常细胞的对照组和加入不同浓度 Cd²⁺ 的实验组和不同雷公藤红素预处理后加入不同浓度 Cd²⁺ 的实验组。待细胞贴壁后加入相应药品, 在对照组加入新鲜培养基, 对应实验组加入雷公藤红素预处理 1 h, 随后用不同浓度的 Cd²⁺ 处理细胞, 24 h 后进行后续实验。提前制冰, 裂解全程在冰上操作, 先用 PBS 清洗细胞, 每孔加入 200 μL 的细胞裂解液, 反复吹打后吸取裂解液放入离心管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上

清液。进行蛋白含量测定并配制 TBA 储存液和检测工作液。将 MDA 标准品用去离子水稀释成相应浓度并绘出标准曲线。设置只含有裂解液的空白对照组、标品组和待测样品组, 各为 100 μL , 然后每孔分别加入 200 μL 的 MDA 检测工作液, 混合均匀后放入 100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中 15 min, 恢复室温后在 1 000 \times g 的离心条件下离心 10 min, 每管取 200 μL 上清液于新的 96 孔板中, 用酶标仪于 532 nm 处检测各孔的 OD 值。

1.2.6 蛋白免疫印迹实验

选择对数生长期的细胞, 用 6 孔板铺板, 放入培养箱中培养, 待细胞贴壁后吸去上清液, 在对应孔中加入相应浓度的雷公藤红素预处理 1 h, 其余孔加入新鲜培养基, 然后再加入不同浓度的 Cd²⁺ 处理 24 h, 提取细胞内的蛋白并用 BCA 法进行定量。配制合适浓度的凝胶, 上样进行电泳, 电泳完毕后将蛋白条带转到 PVDF 膜上, 转膜过程在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下进行, 转膜完毕后用 5% 的脱脂奶粉室温下封闭 1 h, 加入用脱脂奶粉稀释过的一抗孵育 1 h, 用 TBST 溶液清洗 3 次, 每次清洗 15 min, 然后加入稀释好的二抗孵育 1 h, 用 TBST 溶液清洗 3 次, 每次清洗 15 min, 完成后加入显影液反应 2 min, 于化学成像发光仪内检测成像。

1.2.7 统计学分析

本实验数据均采用 Origin 统计软件分析, 实验结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 样本均数的比较采用完全随机设计的单因素方差分析, $P<0.05$ 说明差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的 Cd²⁺ 对 HMC3 细胞活力的影响

通过 MTT 实验检测不同浓度 Cd²⁺ 对 HMC3 细胞活力的影响, Cd²⁺ 选取 0、1、5、10、20、

40、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 这 8 个浓度进行实验。

图 1 为不同浓度 Cd²⁺ 对 HMC3 细胞活力的影响, 根据实验结果, 与对照组相比, 当 Cd²⁺ 浓度是 0、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 时对 HMC3 细胞增殖没有明显的抑制作用 ($P>0.01$, $n=5$)。当 Cd²⁺ 浓度为 40–100 $\mu\text{mol/L}$ 时对 HMC3 细胞增殖有明显的抑制作用 ($P<0.01$, $n=5$), 且呈现浓度依赖性。当 Cd²⁺ 浓度达到 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 HMC3 细胞的增殖抑制率为 (57.17 \pm 8.23)% ($P<0.01$, $n=5$), 当药物的浓度增大时, 细胞的活力也逐渐降低。

2.2 不同浓度的 Cd²⁺ 对 HMC3 细胞膜的影响

LDH 存在于正常细胞的细胞质中, 一旦细胞膜受损, LDH 就会释放到细胞外环境中。因此, 可以通过检测培养基中 LDH 的含量来评估细胞膜的完整性^[19]。

在之前实验的基础上进一步探究不同浓度 Cd²⁺ 对 HMC3 细胞膜的影响, 选择 Cd²⁺ 浓度为 0、1、5、10、20、40、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 进行接下来的实验。

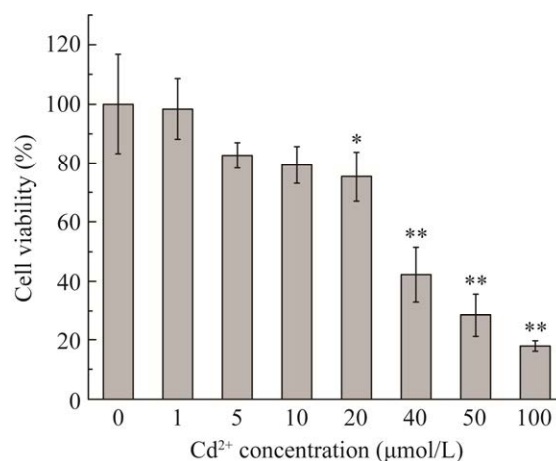


图 1 Cd²⁺ 对 HMC3 细胞活性影响

Figure 1 Effect of Cd²⁺ on HMC3 viability. *: $P<0.05$ compared with Cd²⁺ concentration of 0 $\mu\text{mol/L}$; **: $P<0.01$ compared with Cd²⁺ concentration of 0 $\mu\text{mol/L}$.

图 2 是不同浓度 Cd^{2+} 作用下 HMC3 细胞 LDH 的释放量。根据实验结果,与对照组相比,当 Cd^{2+} 浓度为 0–20 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞 LDH 的释放量没有明显变化 ($P>0.01, n=4$)。当 Cd^{2+} 浓度为 40–100 $\mu\text{mol/L}$ 时,LDH 释放量显著增加。当 Cd^{2+} 浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时增加量为阳性对照组的 $(22.97\pm 5.12)\%$ ($P<0.01, n=4$), LDH 释放量开始随 Cd^{2+} 浓度增大而增加,该实验结果与上述 MTT 实验基本一致,说明当 Cd^{2+} 浓度达到 40 $\mu\text{mol/L}$ 以上时,会对 HMC3 细胞膜造成破坏作用,且呈现浓度依赖性。

2.3 不同浓度的 Cd^{2+} 对 HMC3 细胞形态的影响

为了进一步探究不同浓度的 Cd^{2+} 对 HMC3 细胞的影响,进行了细胞形态学研究,本实验在光学显微镜下观察了不同浓度 Cd^{2+} 处理后 HMC3 细胞形态学变化。图 3 是用 0 $\mu\text{mol/L}$ (A)、1 $\mu\text{mol/L}$ (B)、5 $\mu\text{mol/L}$ (C)、10 $\mu\text{mol/L}$ (D)、20 $\mu\text{mol/L}$ (E)、40 $\mu\text{mol/L}$ (F)、50 $\mu\text{mol/L}$ (G)、100 $\mu\text{mol/L}$ (H) 8 个浓度的 Cd^{2+} 处理 HMC3 细胞后的细胞形态。根据观察结果,当细胞没有受到 Cd^{2+} 影

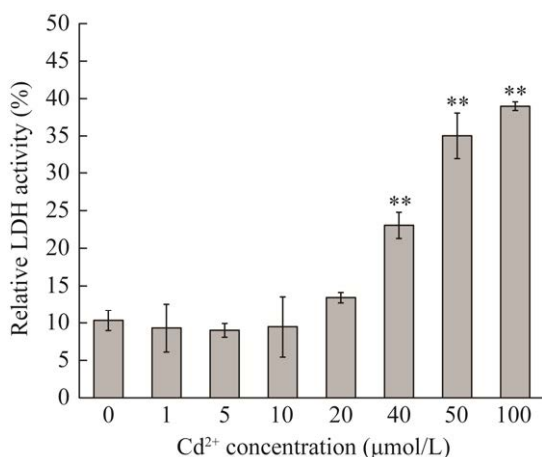


图 2 Cd^{2+} 对 HMC3 细胞 LDH 释放量的影响

Figure 2 Effect of Cd^{2+} on LDH release of HMC3. **: $P<0.01$ compared with Cd^{2+} concentration of 0 $\mu\text{mol/L}$.

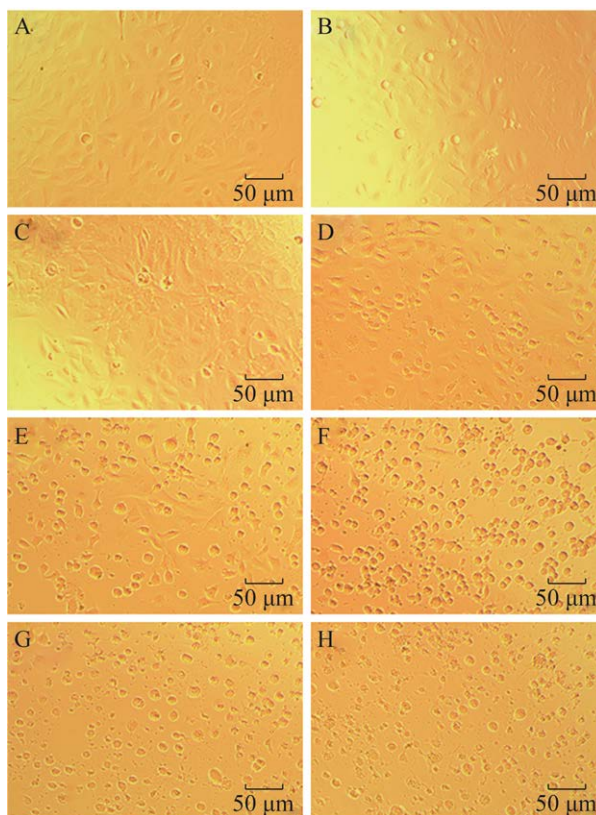


图 3 Cd^{2+} 浓度对 HMC3 细胞形态的影响

Figure 3 Effect of Cd^{2+} concentration on the morphology of HMC3 cells. The Cd^{2+} concentrations were 0 $\mu\text{mol/L}$ (A), 1 $\mu\text{mol/L}$ (B), 5 $\mu\text{mol/L}$ (C), 10 $\mu\text{mol/L}$ (D), 20 $\mu\text{mol/L}$ (E), 40 $\mu\text{mol/L}$ (F), 50 $\mu\text{mol/L}$ (G), and 100 $\mu\text{mol/L}$ (H), respectively.

响时,细胞贴壁情况良好,大部分细胞都紧贴细胞培养瓶的底部,呈现短梭形。当 Cd^{2+} 浓度增加时,细胞的贴壁程度逐渐减弱,细胞变圆,说明当 Cd^{2+} 浓度增加时 HMC3 细胞会受到影响,细胞可能会被激活^[20],并且存活率降低,与 MTT 和 LDH 实验的结果保持一致。

上述实验说明 Cd^{2+} 会抑制小胶质细胞增殖,对细胞膜造成破坏,使细胞形态发生变化,从而影响细胞活力,产生神经毒性。

2.4 雷公藤红素对 Cd^{2+} 诱导的 HMC3 细胞 NO 释放量的影响

小胶质细胞经活化后会产生 NO,形成自由

基, 从而造成蛋白质、线粒体结构的损坏^[21], 本实验研究了雷公藤红素对 Cd²⁺诱导的 NO 释放量的影响。

由于 NO 本身极不稳定, 在细胞内很快代谢成亚硝酸盐, 因此本实验中通过检测亚硝酸钠的量, 从而测定出一氧化氮的相对释放量, 其中亚硝酸钠和 NO 的摩尔浓度相同。图 4 为小胶质细胞 NO 释放量的标准曲线, 经计算得到标准曲线的 R^2 为 0.998。由该标准曲线和实验得到的数据可以计算出 NO 的释放量。图 5 为雷公藤红素对 Cd²⁺诱导的 NO 释放量的影响, 根据研究结果该实验选择了对 HMC3 细胞没有显著毒性的两个雷公藤红素浓度 (10^{-6} 、 10^{-7} mol/L)^[15], 以及对 HMC3 细胞有显著毒性的 Cd²⁺浓度 (20、40 μ mol/L)。根据实验结果可以得出, Cd²⁺对 HMC3 细胞 NO 释放量有促进作用, 随着 Cd²⁺浓度的增加 NO 的释放量也显著增加, 且雷公藤红素可以有效地抑制 Cd²⁺诱导的 HMC3 细胞 NO 的释放。当用 20 μ mol/L Cd²⁺处理后, HMC3 细胞 NO 释放量为 1.52 μ mol/L, 而当先用 10^{-7} mol/L 的雷公藤红素进行预处理后, NO 释放量为 0.86 μ mol/L ($P < 0.01$, $n = 3$); 当用 10^{-6} mol/L 的雷公藤红素进行预处理后, NO 释放量为

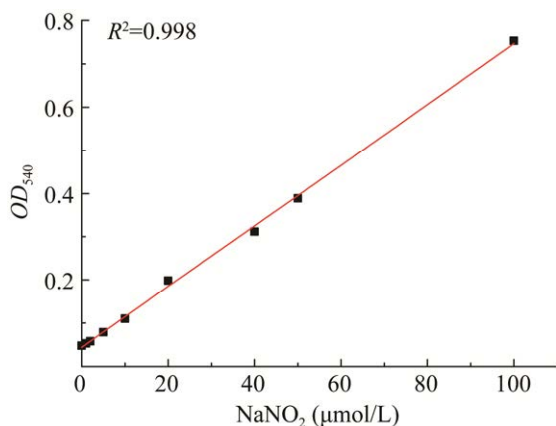


图 4 NO 检测标准曲线

Figure 4 Standard curve of NO test.

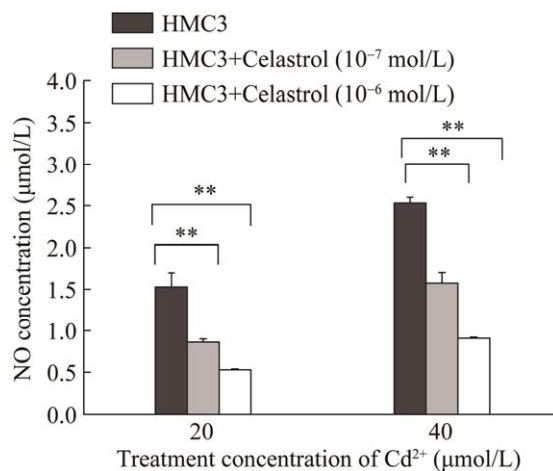


图 5 雷公藤红素对 Cd²⁺诱导的 HMC3 细胞 NO 释放量的影响

Figure 5 Effect of celastrol on NO release in Cd²⁺ induced HMC3 cells. **: $P < 0.01$.

0.53 μ mol/L ($P < 0.01$, $n = 3$)。当用 40 μ mol/L Cd²⁺处理后, NO 释放量为 2.53 μ mol/L, 而当先用 10^{-7} mol/L 的雷公藤红素预处理后, NO 释放量为 1.58 μ mol/L ($P < 0.01$, $n = 3$); 当先用 10^{-6} mol/L 的雷公藤红素预处理后, NO 释放量为 0.91 μ mol/L ($P < 0.01$, $n = 3$)。根据实验结果可以得出, Cd²⁺可以激活小胶质细胞, 从而使小胶质细胞释放 NO, 产生了大量的毒性因子, 而雷公藤红素可以抑制 Cd²⁺诱导的 HMC3 细胞 NO 释放量的增加。

2.5 雷公藤红素对 Cd²⁺诱导的 HMC3 细胞 MDA 水平的影响

细胞脂质过氧化水平通常被认为是评估细胞损伤的一个重要指标, 该实验通过加入不同浓度 Cd²⁺研究对 HMC3 细胞脂质过氧化氢水平的影响以及加入 10^{-7} mol/L 雷公藤红素是否能够抑制 Cd²⁺造成的细胞损伤。

图 6 为不同浓度 Cd²⁺和雷公藤红素对 HMC3 细胞 MDA 释放量的影响, 根据实验结果, 与对照组相比, 当 Cd²⁺浓度为 10 μ mol/L 时, 释放 MDA 的量为 15.37 μ mol/(L·mg), 当 Cd²⁺浓度为 20 μ mol/L 时, 释放 MDA 的量为 53.85 μ mol/(L·mg),

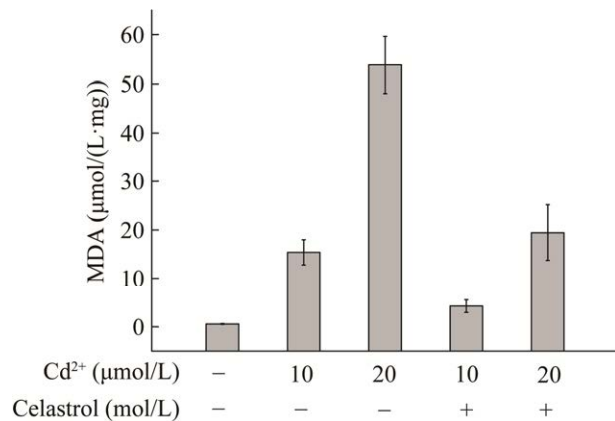


图6 雷公藤红素对 Cd²⁺诱导的 HMC3 细胞 MDA 释放量的影响

Figure 6 Effect of celastrol on MDA release in Cd²⁺ induced HMC3 cells. Cd²⁺ concentrations were 0, 10, and 20 μmol/L. Celastrol concentration was 10⁻⁷ mol/L.

MDA 释放量随 Cd²⁺浓度增加而增大, 当加入 10⁻⁷ mol/L 雷公藤红素后, 对应不同 Cd²⁺浓度处理组分的 MDA 释放量明显减少, 说明雷公藤红素可以抑制 Cd²⁺对 HMC3 细胞造成的氧化损伤。

2.6 雷公藤红素对 Cd²⁺诱导的 HMC3 细胞 PI3K-AKT 通路的影响

PI3K-AKT 信号通路是与神经退行性疾病治疗有关的一条重要通路, 本实验探究了 Cd²⁺对该信号通路的影响以及雷公藤红素是否能够抑制这种影响。

图 7 为不同浓度 Cd²⁺对细胞 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达量的影响, 根据实验结果, 当用不同浓度 Cd²⁺作用于细胞时, p-PI3K 和 p-AKT 蛋白都可以被激活, p-PI3K 蛋白表达量也随 Cd²⁺浓度升高而增加。当加入不同浓度雷公藤红素处理后, 抑制了相应 p-PI3K 蛋白和 p-AKT 蛋白的激活, 且抑制作用随雷公藤红素浓度升高而增大, 说明 Cd²⁺通过影响 PI3K-AKT 通路来影响 HMC3 细胞活力, 而雷公藤红素能够抑制 PI3K-AKT 通路进而保护 Cd²⁺诱导的神经损伤。

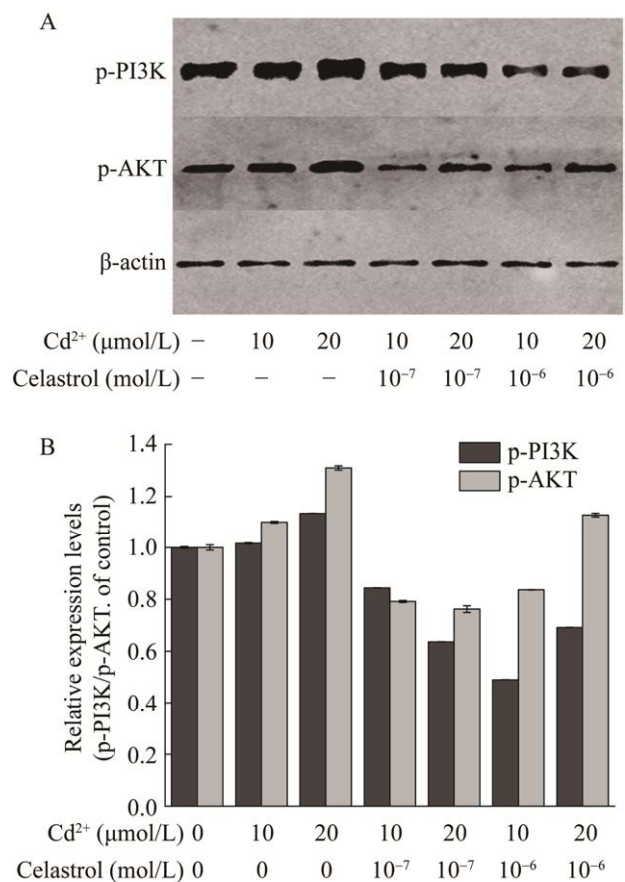


图7 雷公藤红素对 Cd²⁺诱导的 HMC3 细胞内 PI3K-AKT 通路的影响

Figure 7 Effect of celastrol on Cd²⁺ induced PI3K-AKT pathway in HMC3 cell. (A) Expression levels of p-PI3K and p-AKT treated with different concentrations of Cd²⁺ and celastrol. (B) Histogram of expression levels of p-PI3K and p-AKT after treatment with different concentrations of Cd²⁺ and celastrol.

3 讨论

随着工业的发展, 重金属离子造成的环境污染和损害人类健康问题日趋严重^[22], 镉暴露会导致很多疾病的发生, 尤其是它对神经系统的危害。雷公藤红素作为雷公藤有效提取物, 在各种疾病模型中表现出神经保护作用, 并且雷公藤红素显著减弱镉导致的神经细胞存活降

低、形态改变和核断裂以及神经细胞 caspase-3 的活化^[23]。同时,雷公藤红素还显著阻止镉诱导 JNK 的磷酸化,但对 Erk1/2 和 P38 通路没有影响^[24]。2016 年朱雨等^[25]发现雷公藤红素通过抑制神经细胞 Cd²⁺-CaMKII 依赖的 Akt/mTOR 通路干预镉诱导神经细胞凋亡。2017 年王晓雪^[26]发现雷公藤红素靶向神经细胞 NOX2-ROS 介导 PP5-JNK 通路改善镉诱导的神经细胞凋亡。然而以上研究均针对神经元细胞,而雷公藤红素对 Cd²⁺诱导的小胶质细胞毒性是否有保护作用尚不清晰,基于此,本文通过多种现代分析技术,系统探索了 Cd²⁺对小胶质细胞的毒性作用以及雷公藤红素对 Cd²⁺诱导的小胶质细胞神经毒性的影响作用。

首先考察了 Cd²⁺会对小胶质细胞增殖的影响作用,根据 MTT 实验结果,当 Cd²⁺浓度为 40–100 μmol/L 时, HMC3 细胞的增殖能力明显减弱,并且细胞活性随 Cd²⁺浓度的升高逐渐下降。接着由 LDH 实验,探讨了 Cd²⁺是否会对细胞膜产生破坏作用,结果显示在同样的浓度范围内,即 40–100 μmol/L 时, LDH 释放量与 Cd²⁺浓度呈现正相关。同时,细胞形态学检验也说明当 Cd²⁺浓度增加时,细胞贴壁状况逐渐变差,细胞变圆。综合以上结果,可以说明 Cd²⁺通过破坏细胞膜和细胞形态的方式,对小胶质细胞产生毒性作用。

然后,通过 NO 和 MDA 实验探索了雷公藤红素对 Cd²⁺诱导 HMC3 细胞毒性的保护作用,结果显示,雷公藤红素对 Cd²⁺诱导 HMC3 细胞产生过多的 NO 和 MDA 有明显的抑制作用,从而抑制了 Cd²⁺诱导的神经损伤。

最后,利用 Western blotting 实验阐释了雷公藤红素的神经保护机制,发现雷公藤红素通过调节 PI3K-AKT 通路的方式显著抑制 Cd²⁺诱导的 HMC3 细胞凋亡。

当 Cd²⁺浓度达到 40 μmol/L 时,对小胶质细胞增殖产生影响,破坏细胞膜完整性和细胞形态,从而减少细胞活力,且呈现浓度依赖性。Cd²⁺可以增加 HMC3 细胞的 NO、MDA 释放量,还可以提高细胞凋亡相关蛋白 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达量,而雷公藤红素可以相应抑制 Cd²⁺诱导小胶质细胞产生的上述变化。综上所述,雷公藤红素可以通过调节小胶质细胞 NO、MDA 释放量和 PI3K-AKT 通路蛋白表达量的方式抑制 Cd²⁺引起的神经毒性,对解决金属镉带来的环境和健康危害有一定的借鉴作用。

REFERENCES

- [1] 吴丹,寇芳,吕春明,等. 雷公藤红素抗癌作用的研究进展. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 356-361.
Wu D, Kou F, Lv CM, et al. Process of the anti-cancer effects of celastrol. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2013, 19(11): 356-361 (in Chinese).
- [2] 钟点,陈渊,赵伟. 雷公藤红素抗炎及免疫抑制的研究进展. 药物生物技术, 2018, 25(1): 64-69.
Zhong D, Chen Y, Zhao W. Research progress of anti-inflammatory and immunosuppressive effects of celastrol. Pharm Biotechnol, 2018, 25(1): 64-69 (in Chinese).
- [3] 刘慧. 镉对酵母细胞的毒性效应及其生物吸附[D]. 太原: 山西大学, 2014.
Liu H. Toxic effect of cadmium on yeast cells and its biosorption[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2014 (in Chinese).
- [4] Fujie K, Aoki T, Ito Y, et al. Sister-chromatid exchanges induced by trihalomethanes in rat erythroblastic cells and their suppression by crude catechin extracted from green tea. Mutat Res, 1993, 300(3/4): 241-246.
- [5] Abdolmohammad-Zadeh H, Salimi A. A magnetic adsorbent based on salicylic acid-immobilized magnetite nano-particles for pre-concentration of Cd(II) ions. Front Chem Sci Eng, 2021, 15(2): 450-459.
- [6] Chen L, Liu L, Huang SL. Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. Free Radic Biol Med, 2008, 45(7): 1035-1044.
- [7] Landi S, Naccarati A, Ross MK, et al. Induction of

- DNA strand breaks by trihalomethanes in primary human lung epithelial cells. *Mutat Res*, 2003, 538(1/2): 41-50.
- [8] 朱俊德, 余资江, 戈果, 等. 慢性镉中毒对小鼠海马CA3区神经胶质细胞的影响. *实用医学杂志*, 2010, 26(12): 2102-2104.
Zhu JD, Yu ZJ, Ge G, et al. Effects of chronic cadmium toxicity on neuroglial cells in hippocampal CA3 area of mice. *J Pract Med*, 2010, 26(12): 2102-2104 (in Chinese).
- [9] Wu CF, Bi XL, Yang JY, et al. Differential effects of ginsenosides on NO and TNF- α production by LPS-activated N9 microglia. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(3): 313-320.
- [10] Tang Y, Le WD. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2): 1181-1194.
- [11] Benson MJ, Manzanero S, Borges K. Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse models. *Epilepsia*, 2015, 56(6): 895-905.
- [12] 钱利武, 周国勤, 陈师农, 等. 雷公藤红素抗神经退行性疾病研究概况. *中国现代应用药学*, 2011, 28(7): 629-633.
Qian LW, Zhou GQ, Chen SN, et al. Recent advances in the study of celastrol anti-neurodegenerative diseases. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2011, 28(7): 629-633 (in Chinese).
- [13] Zhang RJ, Zhang NN, Zhang H, et al. Celastrol prevents cadmium-induced neuronal cell death by blocking reactive oxygen species-mediated mammalian target of rapamycin pathway. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(1): 82-100.
- [14] Zhang RJ, Zhu Y, Dong XQ, et al. Celastrol attenuates cadmium-induced neuronal apoptosis via inhibiting Ca^{2+} -CaMKII-dependent Akt/mTOR pathway. *J Cell Physiol*, 2017, 232(8): 2145-2157.
- [15] 宋海红, 毕滢, 何栾樱, 等. 雷公藤甲素与雷公藤红素对小胶质细胞炎症反应的影响机制. *北京化工大学学报(自然科学版)*, 2020, 47(5): 83-88.
Song HH, Bi Y, He LY, et al. Effects of triptolide and celastrol on the microglia inflammatory response. *J Beijing Univ Chem Technol (Nat Sci Ed)*, 2020, 47(5): 83-88 (in Chinese).
- [16] Bi XL, Yang JY, Dong YX, et al. Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF- α production by lipopolysaccharide-activated microglia. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5(1): 185-193.
- [17] Chang JY, Chavis JA, Liu LZ, et al. Cholesterol oxides induce programmed cell death in microglial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 249(3): 817-821.
- [18] Li J, Shen FH, Guan CW, et al. Activation of Nrf2 protects against triptolide-induced hepatotoxicity. *PLoS One*, 2014, 9(7): e100685.
- [19] Dong YY, Chang YL, Gao HD, et al. Characteristic synergistic cytotoxic effects toward cells in graphene oxide dressing with cadmium and copper ions. *Toxicol Res (Camb)*, 2019, 8(6): 908-917.
- [20] Varnum MM, Ikezu T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2012, 60(4): 251-266.
- [21] González H, Elgueta D, Montoya A, et al. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol*, 2014, 274(1/2): 1-13.
- [22] Root HD, Thiabaud G, Sessler JL. Reduced texaphyrin: a ratiometric optical sensor for heavy metals in aqueous solution. *Front Chem Sci Eng*, 2020, 14(1): 19-27.
- [23] 李艳华. 雷公藤红素对实验性脑缺血大鼠神经保护作用及其机制的研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
Li YH. The neuroprotective effect of celastrol and the underlying mechanism in experimental ischemic stroke[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2012 (in Chinese).
- [24] Wang H, Engstrom AK, Xia ZG. Cadmium impairs the survival and proliferation of cultured adult subventricular neural stem cells through activation of the JNK and p38 MAP kinases. *Toxicology*, 2017, 380: 30-37.
- [25] 朱雨. 雷公藤红素抑制 Ca^{2+} -CaMKII 依赖的 Akt/mTOR 通路干预镉诱导神经细胞凋亡分子机理研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2016.
Zhu Y. Studies on molecular mechanisms of celastrol intervention in cadmium-induced neuronal apoptosis via inhibiting Ca^{2+} -CaMKII-dependent Akt/mTOR pathway[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2016 (in Chinese).
- [26] 王晓雪. 雷公藤红素抑制镉诱导神经细胞 JNK 通路激活抗凋亡分子机理研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2017.
Wang XX. Studies on molecular mechanisms of celastrol's prevention of cadmium-induced activation of JNK pathway from apoptosis in neuronal cells[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2017 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)