

CORM-2 通过激活 Caspase 依赖性线粒体途径诱导神经细胞凋亡及醒脑静对其干预作用的机制研究*

刘轶林, 洪 纓, 王 晶**

(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

摘 要:目的:探讨外源性一氧化碳释放剂(CORM-2)诱导大鼠神经细胞凋亡及醒脑静注射液对其干预作用的机制。方法:在光学显微镜下观察 CORM-2 对神经细胞形态的影响,通过 MTT 法检测 CORM-2 对细胞存活率的影响;应用流式细胞仪检测细胞凋亡率;以 Western Blotting 检测相关蛋白的表达。同时观察醒脑静注射液对神经细胞形态、细胞存活率及相关蛋白表达的影响。结果:CORM-2 影响神经细胞存活率呈时间依赖性和剂量依赖性;100、200、400、800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 作用于神经细胞 24 h 后,可使细胞存活率逐渐降低;可以诱导神经细胞凋亡及 Caspase 依赖性线粒体途径相关蛋白 Caspase-3、Caspase-9 及 Cytochrome C(Cyt C)的活化,且呈剂量依赖性。选择 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 对皮层神经细胞进行诱导损伤,经醒脑静注射液孵育神经细胞 20 h 后,10 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 20 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 醒脑静注射液可明显降低细胞早期凋亡率,细胞 Caspase-3、Caspase-9 与 Cyt C 的表达逐渐降低。结论:CORM-2 可能通过激活 Caspase 依赖性线粒体途径诱导神经细胞凋亡,醒脑静注射液可抑制细胞凋亡的线粒体途径从而干预 CORM-2 诱导的神经细胞凋亡。

关键词:CORM-2 神经细胞凋亡 Caspase 线粒体途径 醒脑静注射液

doi: 10.11842/wst.2013.08.010 中图分类号:R964 文献标识码:A

一氧化碳(Carbon Monoxide, CO)致脑损伤发病率和死亡率高,是全世界范围极其严重的问题,在很大程度上影响了患者的生活质量。迄今为止,对 CO 致脑损伤的发病机制已提出多种学说,如:缺血缺氧学说^[1-2]、自由基损伤学说^[3]、细胞凋亡学说^[3]、免疫损伤学说^[4]等。这些学说从不同的侧面对 CO 致脑损伤做出了相对合理的解释,但到目前为止,其确切机制仍无定论。近年来,越来越多的研究表明神经细胞凋亡在 CO 致脑损伤的病理过程中扮演着重要的角色,因此,神经细胞凋亡的机制研究将

为今后临床治疗提供基础理论依据。

细胞凋亡主要有 3 条途径,第一条是细胞表面死亡受体介导的通过胞外信号激活细胞内的 Caspase-8;第二条是通过线粒体释放凋亡酶激活因子激活 Caspase-9;第三条是内质网途径,内质网应激可特异性激活 Caspase-12。活化的 Caspase-8、Caspase-9 以及 Caspase-12 均可激活 Caspase-3 等下游效应蛋白酶,将细胞内的重要蛋白降解,最终导致细胞凋亡。此外,有些蛋白质可以不通过 Caspase,从线粒体内膜腔释放而直接诱导凋亡产生。

醒脑静注射液是安宫牛黄丸的精制注射液,其

收稿日期:2013-10-25

修回日期:2013-11-19

* 北京中医药大学自主选题项目(2009JYBZZ-JS041):醒脑静注射液对一氧化碳暴露诱导的神经细胞凋亡的干预作用及机制分析,负责人:王晶。

** 通讯作者:王晶,副教授,主要研究方向:中药神经药理和消化药理研究。

主要成分有麝香、冰片、栀子以及郁金,具有良好的醒脑开窍、清热凉血、解毒止痛疗效,对多种中枢神经系统危重急症均有显著疗效。研究发现,醒脑静注射液能够明显抑制创伤性脑损伤、缺氧、缺血再灌注等多种损伤因素诱导的神经细胞凋亡。

本研究采用外源性一氧化碳释放剂[Tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer, CORM-2]对体外培养的神经细胞进行诱导损伤,建立CO致脑损伤模型,观察Caspase依赖性途径在CORM-2诱导神经细胞凋亡的过程中是否发挥作用,探讨神经细胞凋亡的可能作用机制。同时,本研究拟观察醒脑静注射液对一氧化碳释放剂诱导神经细胞凋亡的影响,探讨醒脑静注射液干预外源性一氧化碳释放剂诱导神经细胞凋亡的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

孕16~18天Sprague-Dawley(SD)大鼠,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(京)2006-0009。

1.2 药品和试剂

胎牛血清购于美国Hyclone公司,Neurobasal培养基,批号:12348017;B27培养基添加剂,批号:0050129SA,均购于美国Gibco公司。CORM-2,批号:288144;MTT,批号:D20709;DMSO,批号:WXBB1799V;RuCl₃,批号:14898-67-0;胰蛋白酶,批号:08/2013;左旋多聚赖氨酸,批号:395003;台盼蓝,批号:T-0776;阿糖胞苷,批号:140784-201001,均购于美国Sigma公司。AnnexinV-PI凋亡试剂盒,批号:20120521,购于美国BD公司。Caspase-3,批号:sc-7148;Caspase-8,批号:sc-2147;Cytochrome C,批号:sc-13156;兔多克隆抗体及Caspase-9,批号:sc-83355;小鼠多克隆抗体均购于美国CST公司。Caspase-12,批号:sc-12396,购于美国Santa Cruz公司。醒脑静注射液,批号:20100412,购于河南天地药业股份有限公司。

1.3 神经细胞体外培养

无菌超净台下分离孕期16~18天胎鼠的大脑皮层,迅速置于冰冷的PBS中,剔除软脑膜和血管。用眼科剪将脑组织剪成1 mm×1 mm×1 mm大小,0.125%胰酶37℃消化15 min,每隔5 min轻摇一次,用含有10%胎牛血清、10%马血清的培养液终

止消化,吸管轻轻吹打使细胞分散均匀,经200目金属网过滤。4%台盼蓝镜检,血球计数板进行细胞计数,调整细胞密度为 3×10^5 个/mL和 1×10^6 个/mL接种于预先用0.01%左旋多聚赖氨酸溶液包被的96孔细胞培养板及细胞培养瓶中,置37℃、5% CO₂培养箱中孵育。24 h细胞贴壁后,全量置换培养液,第3天加入浓度为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阿糖胞苷培养24 h后,全量置换培养液,以后3天半量置换一次,7天后用于实验。

1.4 细胞存活率实验

取接种于96孔细胞培养板的神经细胞分为6组,即空白组、正常对照组、CORM-2 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、CORM-2 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、CORM-2 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、CORM-2 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组。每组10个复孔,吸去原培养液,分别加入相应的培养基及含不同浓度的CORM-2培养液对神经细胞进行诱导损伤;同时,平行检测相应浓度的阴性对照RuCl₃和溶剂DMSO,分别在损伤后4、8、12、24 h,每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的MTT溶液20 μL ,继续孵育4 h后吸去全部上清液,每孔加入150 μL DMSO,震荡摇匀,使结晶充分溶解。置于酶标仪上,在540 nm处测量单个孔吸光度值(OD)。用以下公式计算细胞存活率:细胞存活率%=(A损伤浓度-A空白)/(A正常对照-A空白)×100%。

取培养7天的胎鼠皮层神经细胞,分为6组,即空白组、正常对照组、模型组、醒脑静大剂量组、醒脑静中剂量组、醒脑静小剂量组。每组10个复孔,吸去原培养液,模型组及醒脑静各剂量组用 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CORM-2进行诱导损伤,空白组及正常对照组给予正常培养液。4 h后给药组分别给予醒脑静注射液(5、10、20 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$),继续培养20 h后MTT法检测各组细胞活性。

1.5 流式细胞仪分析细胞凋亡率

将接种于细胞培养瓶的神经细胞分为5组,即正常对照组、CORM-2 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、CORM-2 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、CORM-2 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、CORM-2 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组。各组吸去原培养液,正常对照组给予正常培养液,损伤组分别加入不同浓度的CORM-2培养液对神经细胞进行诱导损伤,37℃、5% CO₂培养箱中继续培养。24 h后,胰蛋白酶消化收集细胞,1 000 rpm离心5 min;用PBS洗涤1~2次,1 000 rpm离心5 min;200 μL binding-

buffer 重悬细胞,加入 10 μL Annexin V-FITC,静置 20 min;300 μL binding-buffer 再次重悬细胞,加入 5 μL PI,避光静置 5 min;流式细胞仪进行分析测定。200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 建立模型后,给予低中高剂量的醒脑静注射液,用相同方法收集细胞后流式细胞仪进行检测。

1.6 Western Blotting 分析凋亡蛋白的表达

取培养 7 天的胎鼠皮层神经细胞,分为 5 组,即正常对照组、CORM-2 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、CORM-2 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、CORM-2 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、CORM-2 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。各组吸去原培养液,正常对照组给予正常培养液,损伤组分别加入不同浓度的 CORM-2 培养液对神经细胞进行诱导损伤,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中继续培养。24 h 后,收集细胞,用细胞裂解液 100 μL 冰浴裂解 1 h,15 000 rpm 离心 5 min,对上清液进行蛋白定量后,以 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质。将蛋白转印至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭后,Caspase-3、8、9、12 及细胞色素 C (Cytochrome C)一抗封闭过夜后,二抗封闭 2 h,漂洗后 ECL 混合液显色曝光,扫描记录。

取培养 7 d 的胎鼠皮层神经细胞,分为 5 组,即正常对照组、模型组、醒脑静大剂量组、醒脑静中剂量组、醒脑静小剂量组。每组吸去原培养液,模型组及醒脑静各剂量组用 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 进行诱导损伤,正常对照组给予正常培养液。给药组分别给予醒脑静注射液 5、10、20 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 继续培养 24 h 后,收集细胞,相同方法对 Caspase-3、8、9、12 及 Cytochrome C 的表达进行检测。

1.8 图像分析和统计学处理

Western Blotting 法测定 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-12 及 Cytochrome C 所得胶片,采用 LabWorks 软件对目的条带进行灰度分析。数据统计采用 SPSS 统计软件,对各组数据进行正态性检验和方差齐性检验,在各组数据均正态分布且方差齐性的条件下,用 ONE-WAY ANOVA 进行方差分析及 t 检验进行组间比较,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

1.2 CORM-2 及醒脑静注射液对神经细胞形态的影响

神经细胞培养 7 天后,生长良好,细胞呈椭圆形,胞体饱满且折光性良好,细胞之间形成网状的突触联系。神经细胞经 100、200、400、800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 孵育 4、8、12 h 后,各组细胞未见明显的形态学变化。当孵育时间延长至 24 h 后,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 组大部分细胞形态完整,可见少量细胞突触断裂;200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 组细胞体积减小,部分细胞呈圆球状,突起断裂,细胞之间的突触联系明显减少;400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 组细胞呈球形,少量细胞形态完整,仅见个别细胞间存在网状的突触联系;800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 组细胞轴突树突基本消失,未见网状结构,胞体没有折光性,可见大量的细胞碎片。

给予醒脑静注射液后,正常组细胞生长良好,细胞呈椭圆形,胞体饱满且折光性良好,细胞之间形成网状的突触联系;模型组细胞体积减小,部分细胞呈圆球状,突起断裂,细胞之间的突触联系明显减少;给予不同剂量的醒脑静注射液后,细胞形态均出现相应改善,与模型组相比,醒脑静低剂量

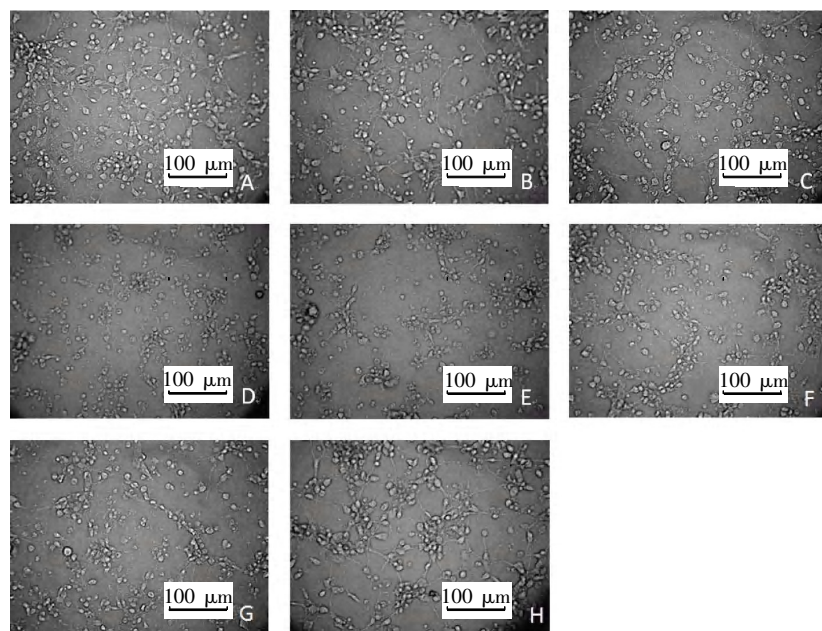


图 1 损伤 24 h 及给药 20 h 后不同组别细胞生长情况

注:A 正常对照组,B:100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 损伤组,C:200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 损伤组,D:400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 损伤组,E:800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 损伤组,F:5 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 醒脑静给药组,G:10 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 醒脑静给药组,H:20 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 醒脑静给药组。

组($5\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞碎片明显减少,醒脑静中剂量组($10\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞圆球状细胞有所减少,未见明显的细胞碎片,醒脑静高剂量组($20\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞形态有明显的改善,绝大部分细胞呈椭圆形,圆球状细胞基本消失,细胞间的网状突触联系很少断裂,与正常组细胞形态区别不大,具体见图1。

2.2 CORM-2 及醒脑静注射液对神经细胞存活率的影响

MTT 结果显示,CORM-2 孵育神经细胞 4、8、12 h 后,与正常对照组相比,100、200、400、800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 对神经细胞存活率无明显影响;但损伤时间延长至 24 h 后,各剂量 CORM-2

对神经细胞均表现出一定的毒性作用,且细胞存活率随着 CORM-2 浓度的升高而逐渐降低,表明 CORM-2 可降低细胞存活率,且呈剂量依赖性;而用同等剂量的阴性对照溶剂 DMSO 相同时间孵育细胞,细胞的存活率与对照组相比没有明显变化,说明 RuCl_3 以及 DMSO 对细胞没有明显的毒性作用。

与模型组相比,醒脑静各剂量组细胞存活率均有所升高,且随着醒脑静剂量的加大细胞存活率逐渐升高。醒脑静低剂量组($5\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)与模型组相比,无明显的统计学差异,醒脑静中剂量组($10\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)及高剂量组($20\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞存活率显著升高($P<$

表 1 CORM-2 损伤 4、8、12、24 h 后各组 OD 值及细胞存活率($\bar{x}\pm s$ $n=10$)

组别	吸光度/OD				相对存活率/%			
	4 h	8 h	12 h	24 h	4 h	8 h	12 h	24 h
空白组	0.157±0.006	0.125±0.006	0.126±0.005	0.126±0.010	—	—	—	—
正常对照组	0.752±0.036	0.772±0.037	0.762±0.039	0.779±0.033	100	100	100	100
CORM-2 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.754±0.023	0.763±0.038	0.759±0.030	0.718±0.040*	100.42±4.11	98.73±6.25	99.64±4.91	90.65±6.44
CORM-2 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.750±0.030	0.769±0.031	0.764±0.033	0.596±0.033**	99.61±5.27	99.58±5.02	100.34±5.48	71.93±5.26
CORM-2 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.746±0.033	0.761±0.033	0.768±0.037	0.416±0.037**	98.94±5.87	98.42±5.34	100.99±6.09	44.33±6.00
CORM-2 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.759±0.040	0.774±0.022	0.754±0.033	0.264±0.042**	101.23±7.06	100.40±3.57	98.85±5.40	21.11±6.71

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 2 给药 20 h 后各组 OD 值及细胞存活率($\bar{x}\pm s$ $n=10$)

组别	吸光度/OD	相对存活率/%
空白组	0.125±0.005	—
正常对照组	0.756±0.034	100
模型组	0.569±0.026	70.36±4.16
醒脑静低剂量组($5\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.584±0.027	72.70±4.34
醒脑静中剂量组($10\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.619±0.024**	78.21±3.79
醒脑静高剂量组($20\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.690±0.022**	89.52±3.42

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$ 。

表 3 CORM-2 对神经细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s$ $n=5$)

组别	早期凋亡率/%	中晚期凋亡率/%
正常对照组	2.3±0.9	1.2±1.0
CORM-2 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	13.1±3.1 $\Delta\Delta$	10.1±2.1 $\Delta\Delta$
CORM-2 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	32.2±1.7 $\Delta\Delta$	17.1±2.5 $\Delta\Delta$
CORM-2 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	42.0±2.3 $\Delta\Delta$	24.1±1.9 $\Delta\Delta$
CORM-2 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	51.0±1.5 $\Delta\Delta$	36.9±1.5 $\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

0.01),表明醒脑静注射液具有一定的保护神经细胞损伤的作用。具体见表1、2、图2。

2.3 CORM-2 诱导神经细胞凋亡及醒脑静注射液的保护作用

经 CORM-2 孵育 24 h 后,各组神经细胞的早期及中晚期凋亡率均受到一定程度的影响。流式细胞仪检测分析结果显示,100、200、400、800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 均可诱导神经细胞凋亡,随着 CORM-2 浓度的增大,早期凋亡率与中晚期凋亡率有逐渐上升的趋势,说明相应浓度 CORM-2 均能够诱导体外培养的胎鼠皮层神经细胞凋亡。具体见表3、图3。

给予不同剂量醒脑静注射液后,与模型组相比,低剂量组(5 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)凋亡率变化无显著差异,醒脑静中剂量组(10 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)及高剂量组(20 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞的总体分布有逐渐向左下方移动的趋势,且随着醒脑静剂量的加大,早期凋亡率显著降低($P<0.01$),但醒脑静中高剂量组对中晚期凋亡率的影响不明显。说明中高剂量的醒脑静注射液对 CORM-2 诱导的神经细胞早期凋亡具有一定的干预作用,而

对中晚期凋亡无明显作用。具体见表4、图4。

2.4 CORM-2 对神经细胞 Caspase-3、8、9、12 及 Cytochrome C 蛋白表达的影响

通过 Western Blotting 检测 CORM-2 对凋亡相关蛋白表达的影响,验证 Caspase 依赖性途径参与了 CORM-2 诱导的神经细胞凋亡。结果显示,神经细胞经 CORM-2 孵育 24 h 后,各组 Caspase-8 及 Caspase-12 的活性片段均无表达;与正常对照组比较,100、200、400、800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 可使 Caspase-3、Caspase-9 的活性片段及线粒体蛋白组分中 Cytochrome C 的表达显著增加($P<0.01$),且随着 CORM-2 浓度的增加,Caspase-3、Caspase-9 的活性片段及线粒体蛋白组分中 Cytochrome C 的表达逐渐升高。提示 CORM-2 可激活 Caspase-3、Caspase-9 的活性片段及线粒体蛋白组分中 Cytochrome C 的表达从而诱导神经细胞凋亡,且呈剂量依赖性。

给药 20 h 后,正常对照组各指标的活性片段均无表达,醒脑静低剂量组(5 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)与模型组相比

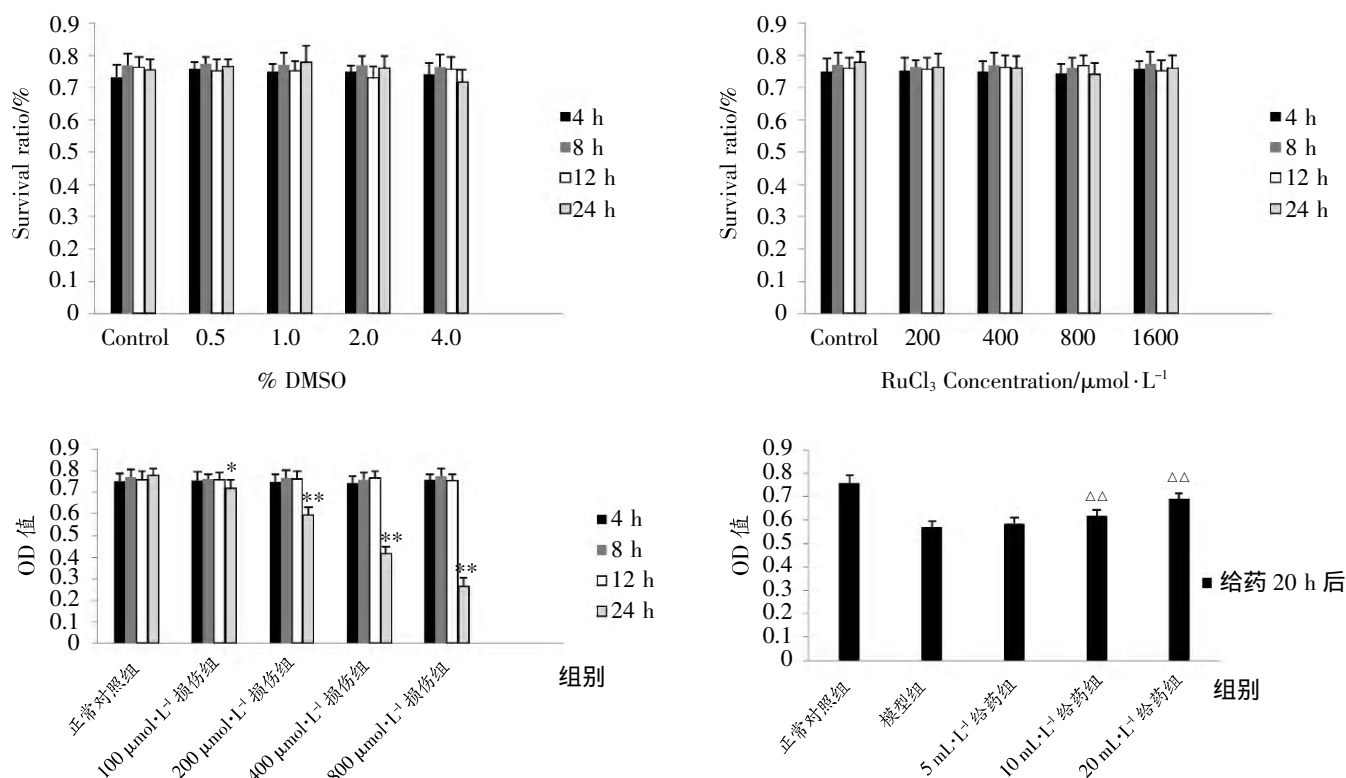


图2 CORM-2 分别损伤 4、8、12、24 h 后 DMSO 对照组、 RuCl_3 对照组及各浓度 CORM-2 诱导损伤组 OD 值;对 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 模型组分别给予低中高剂量的醒脑静注射液各组 OD 值
注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

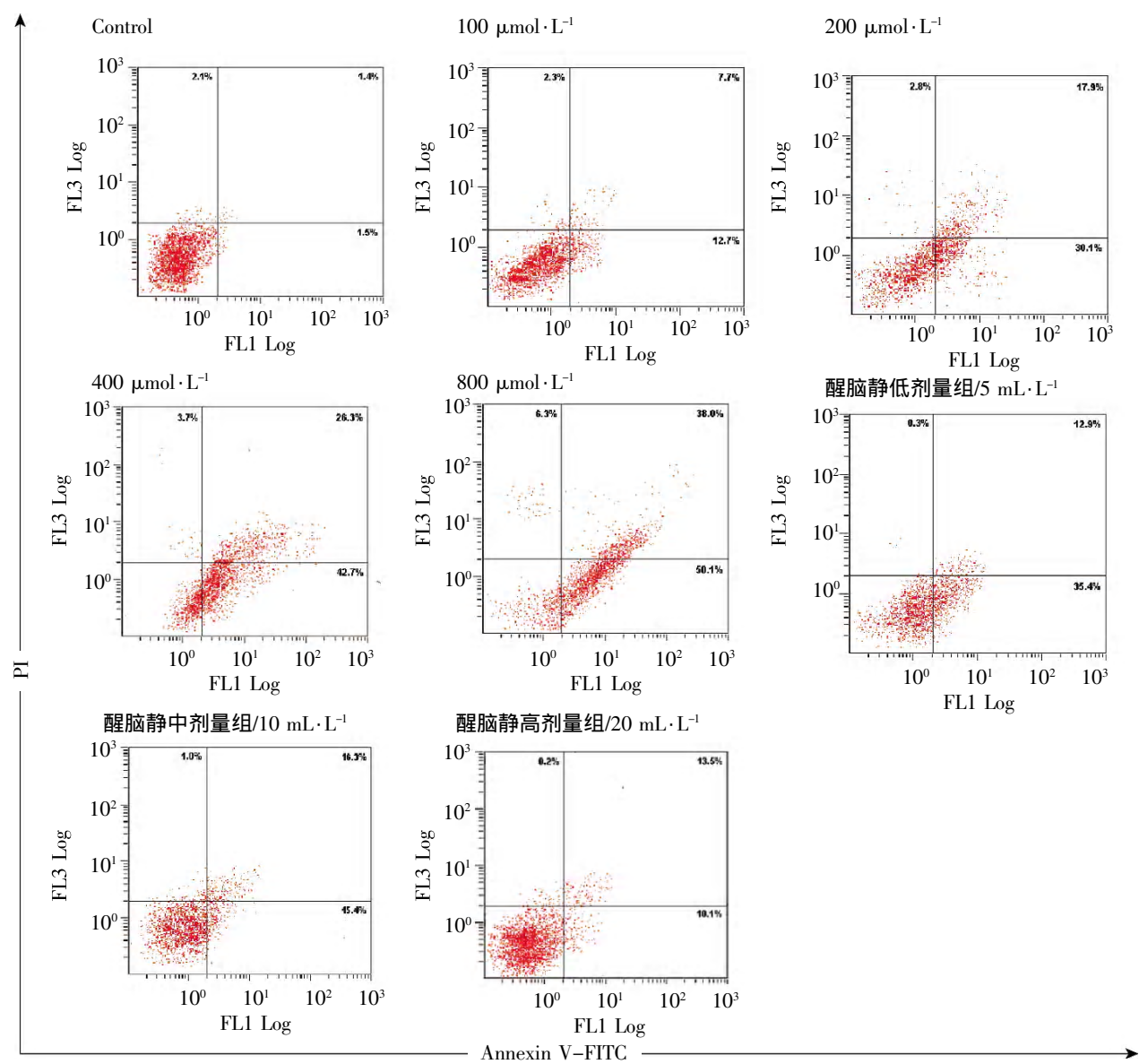
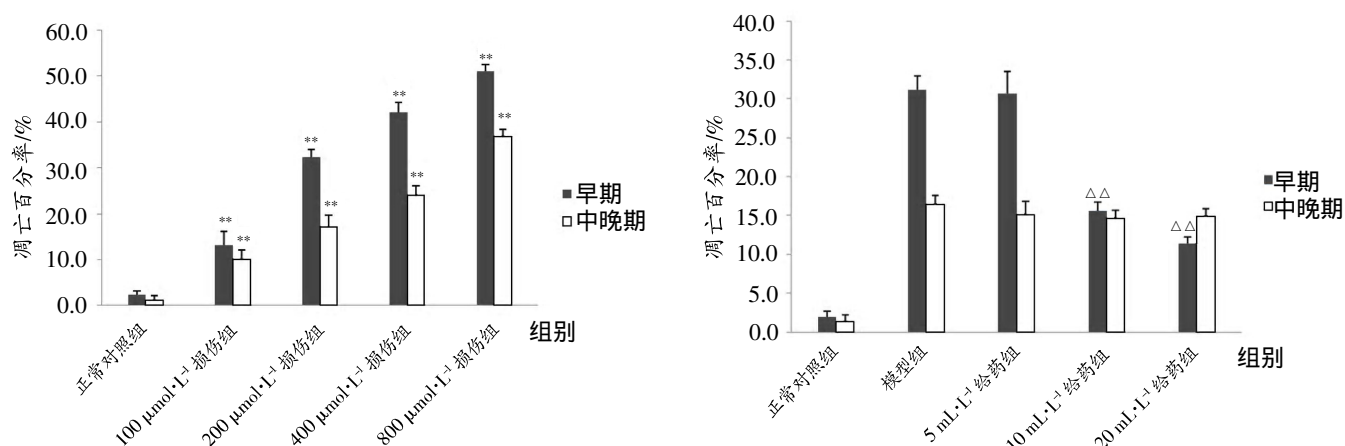


图 3 不同浓度 CORM-2 诱导损伤及醒脑静给药后的神经细胞流式散点图

表 4 醒脑静注射液对 CORM-2 诱导神经细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	早期凋亡率/%	中晚期凋亡率/%
正常组	1.9±0.7	1.4±0.8
模型组	31.1±1.8	16.4±1.2
醒脑静低剂量组(5 mL·L ⁻¹)	30.7±2.8	15.1±1.7
醒脑静中剂量组(10 mL·L ⁻¹)	15.6±1.2 ^{△△}	14.6±1.0
醒脑静高剂量组(20 mL·L ⁻¹)	11.4±0.9 ^{△△}	14.9±0.9

注：与模型组比较，^{△△} $P<0.01$ 。



注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图4 不同浓度 CORM-2 损伤 24 h 及不同剂量醒脑静给药后各组凋亡率

表5 不同浓度 CORM-2 对 Caspase-3,8,9,12 活化体及 Cyt C 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9	Caspase-12	Cyt C
正常组	0.001±0.000	0	0	0	0
CORM-2 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.050±0.006 $\Delta\Delta$	0	0.042±0.001 $\Delta\Delta$	0	0.158±0.005 $\Delta\Delta$
CORM-2 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.107±0.017 $\Delta\Delta$	0	0.054±0.009 $\Delta\Delta$	0	0.210±0.014 $\Delta\Delta$
CORM-2 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.117±0.015 $\Delta\Delta$	0	0.071±0.005 $\Delta\Delta$	0	0.296±0.031 $\Delta\Delta$
CORM-2 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.220±0.032 $\Delta\Delta$	0	0.082±0.011 $\Delta\Delta$	0	0.524±0.027 $\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

各活性片段表达无明显变化;与模型组比较,醒脑静中剂量组($10\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)及醒脑静高剂量组($20\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)使 Caspase-3、Caspase-9 及 Cyt C 的表达显著减少($P<0.01$),且随着醒脑静注射液浓度的增加,Caspase-3、Caspase-9 及 Cyt C 的表达逐渐降低。结果表明, $10\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 $20\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 醒脑静注射液可通过抑制 Caspase-3、Caspase-9 及 Cyt C 的表达从而降低神经细胞凋亡率。具体见表6,图5、6。

3 讨论

研究发现,在实验大鼠的大脑皮质、海马、纹状体等部位均有细胞凋亡发生^[5,6];数据显示,凋亡在深度中毒后3天明显增加,5~7天达到高峰,当神经细胞出现大量凋亡时,神经系统损伤症状明显

出现^[7,8]。因此,CO致脑损伤与神经细胞凋亡有密切联系。CORM-2是过渡金属化合物钌的羰基化合物二聚体分子,溶于DMSO后能够缓慢释放CO。因此采用CORM-2对神经细胞诱导损伤所建立的凋亡模型避免了直接应用CO气体毒性较大这一安全问题。

本研究通过MTT及流式细胞仪检测神经细胞活力及凋亡率,构建了CO诱导的神经细胞凋亡模型。胎鼠神经细胞对CO的耐受性较高,经CORM-2孵育24h后,各浓度CORM-2所释放的CO均对神经细胞表现出一定的毒性作用,在CORM-2浓度由 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增至 $800\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的过程中,神经细胞的早期及中晚期凋亡率不断升高,早期凋亡率从10%上升至50%左右,提示成功建立体外模型。因

表 6 不同浓度 CORM-2 对 Caspase-3,8,9,12 活化体及 Cyt C 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9	Caspase-12	Cyt C
正常组	0	0	0	0	0
模型组	0.171±0.010	0	0.263±0.021	0	0.490±0.026
20 mL·L ⁻¹ 给药组	0.045±0.005 ^{△△}	0	0.025±0.007 ^{△△}	0	0.199±0.009 ^{△△}
10 mL·L ⁻¹ 给药组	0.062±0.015 ^{△△}	0	0.066±0.003 ^{△△}	0	0.316±0.014 ^{△△}
5 mL·L ⁻¹ 给药组	0.151±0.006	0	0.263±0.015	0	0.469±0.018

注 :与模型组比较 ,^{△△} $P<0.01$ 。

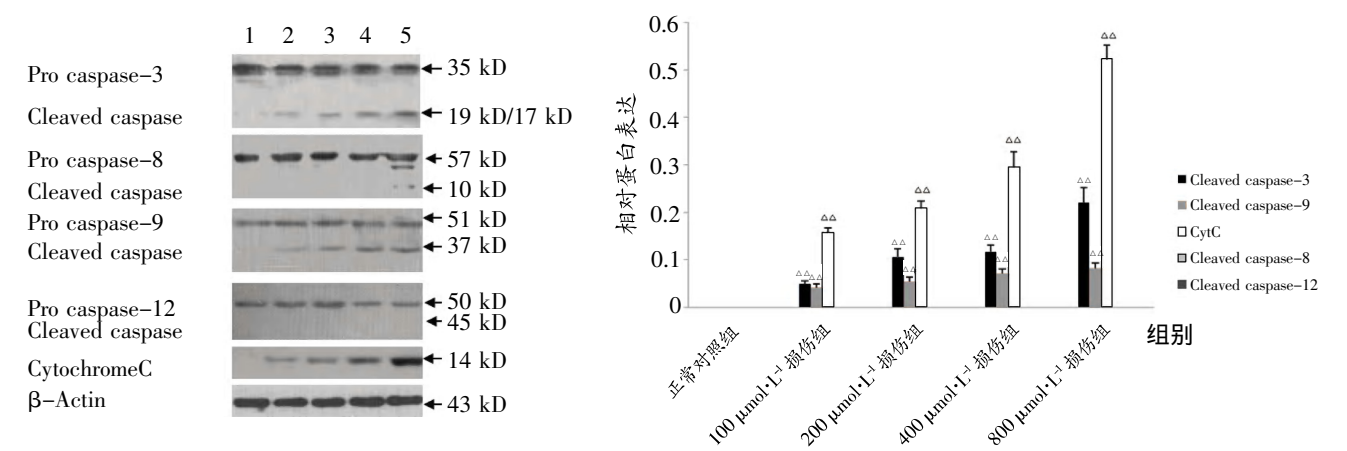


图 5 损伤 24 h 后不同组别 Caspase-3 ,8 ,9 ,12 前体和活化体及 Cyt C 表达

注 :1 :正常对照组 2 :100 μmol·L⁻¹ CORM-2 损伤组 3 :200 μmol·L⁻¹ CORM-2 损伤组 4 :400 μmol·L⁻¹ CORM-2 损伤组 5 :800 μmol·L⁻¹ CORM-2 损伤组。与正常对照组比较 ,^{△△} $P<0.01$ 。

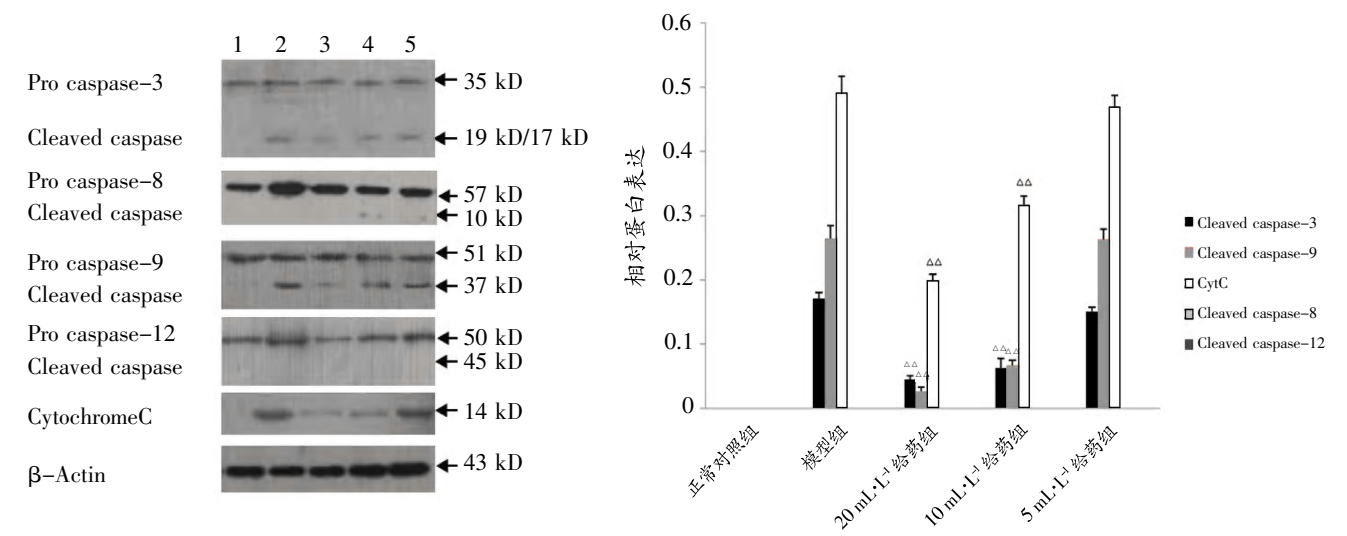


图 6 给药 20 h 后不同组别 Caspase-3 ,8 ,9 ,12 前体和活化体及 Cyt C 表达

注 :1 :正常对照组 2 :200 μmol·L⁻¹ CORM-2 损伤模型组 3 :20 mL·L⁻¹ 醒脑静给药组 4 :10 mL·L⁻¹ 醒脑静给药组 5 :5 mL·L⁻¹ 醒脑静给药组。与正常对照组比较 ,^{△△} $P<0.01$ 。

此,选择 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 对神经细胞进行损伤可以达到预期的 30%左右的早期凋亡率,适合作为未来抗凋亡药物的筛选模型。同时,本实验所建立的凋亡模型为进一步研究 CO 致神经细胞凋亡的分子机制奠定了基础。

凋亡是多基因严格控制的过程,涉及到细胞的基因信息编码机制的活化^[9]。在一定的生理或病理条件下,某些信号系统被激活,导致相应基因的表达发生改变,其表达产物在一定程度上促进或抑制细胞凋亡的发生。本研究发现, $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CORM-2 即可诱导神经细胞发生凋亡,而随着 CORM-2 浓度的不断增加,神经细胞的早期及中晚期凋亡率也随之升高,说明 CORM-2 可以诱导神经细胞发生凋亡,促使神经细胞进入凋亡程序,并且凋亡的程度与 CORM-2 的浓度有着密切的关系。

在神经细胞凋亡的过程中,Caspase 家族扮演着重要的角色,它们引发的级联反应是细胞凋亡信号转导过程的中心环节,并可通过与众多蛋白因子的相互作用调控细胞凋亡^[10]。细胞凋亡的三条主要途径线粒体途径、死亡受体途径及内质网途径均需要 Caspase 家族成员的参与,从而激活凋亡信号转导通路。随着研究的深入,人们发现线粒体在细胞凋亡中发挥着重要的中心调控作用^[11],保护线粒体功能的完好可以抑制细胞凋亡的发生^[12]。细胞受到凋亡刺激时,可导致线粒体膜肿胀,通透性增高,从而使位于线粒体内与凋亡相关的多种活性物质释放出来,而 Cytochrome C 从线粒体内的释放是细胞凋亡的关键环节^[13]。在线粒体内膜的各种促凋亡因子的诱导下,Cytochrome C 从线粒体内释放到胞浆,由此激活 Caspase-9,进而激活下游效应蛋白 Caspase-3,从而启动 Caspase 介导的凋亡级联反应。

本研究通过 Western Blotting 方法检测不同浓度 CORM-2 对细胞凋亡的 3 条主要途径线粒体途径、死亡受体途径及内质网途径中的关键蛋白 Caspase-3、Caspase-9、Caspase-8、Caspase-12 活性片段及线粒体蛋白组分中 Cytochrome C 表达的影响,旨在探索 Caspase 依赖性途径在 CORM-2 诱导的神经细胞凋亡中是否发挥作用。结果表明,CORM-2 可使 Caspase-3、Caspase-9 活性片段与线粒体蛋白组分中 Cytochrome C 的表达显著

增加,且随着 CORM-2 浓度的增加,Caspase-3、Caspase-9 与线粒体蛋白组分中 Cytochrome C 的表达逐渐升高,说明 CORM-2 能够促使 Cytochrome C 从线粒体释放到胞浆,并使 Caspase-9 与其结合形成凋亡体,最终激活下游的效应蛋白 Caspase-3,从而启动 Caspase 的一系列级联反应,诱导细胞发生凋亡;而与死亡受体途径和内质网途径相关的 Caspase-8 与 Caspase-12 的活性片段均无表达,由此可见,CORM-2 可能是通过 Caspase 依赖性线粒体途径诱导神经细胞凋亡。

本实验还通过 MTT,流式细胞仪,Western Blotting 方法检测不同剂量的醒脑静注射液对 CORM-2 诱导神经细胞凋亡的影响。研究发现,中剂量($10\ \text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)及高剂量($20\ \text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$)的醒脑静注射液对神经细胞的存活率及早期凋亡率均有一定的改善作用,且这种作用呈剂量依赖性,随着醒脑静剂量的加大,神经细胞的早期凋亡率逐渐降低。此外 Western Blotting 结果显示,模型组 Caspase-3、Caspase-9 活性片段及 Cyt C 大量产生,说明凋亡产生;中高剂量的醒脑静注射液使 Caspase-3、Caspase-9 的活性片段及 Cyt C 的表达显著减少,且随着剂量的增大,Caspase-3、Caspase-9 及 Cyt C 的表达逐渐降低。说明醒脑静注射液能够使 Cyt C 的释放减少,抑制了凋亡的发生,干预 Caspase 的一系列级联反应,最终抑制细胞凋亡。由此可见,醒脑静注射液可能通过抑制细胞凋亡的线粒体途径从而干预 CORM-2 诱导的神经细胞凋亡,且通过第二部分的实验研究发现醒脑静注射液对神经细胞早期凋亡作用显著,而对中晚期凋亡作用不明显,这一结果验证了线粒体通路在细胞早期凋亡中的重要作用,同时也进一步验证了保护线粒体功能在抑制凋亡发生中的重要作用。

本研究仅对 CORM-2 诱导的神经细胞凋亡及醒脑静注射液的干预作用进行了初步的探讨,关于 CO 通过诱导神经细胞凋亡致脑损伤的作用机制依然有大量问题需进一步的探讨,例如,凋亡过程中涉及哪些分子调控及信号转导过程等。在今后的工作中,本研究将对凋亡过程中具体涉及的分子调控及信号转导过程进行分析研究,以期阐明醒脑静注射液对 CO 致神经细胞凋亡的确切机制,为今后的临床治疗提供基础理论依据。

参考文献

- 1 Stoller K P. Hyperbaric oxygen and carbon monoxide poisoning: a critical review. *Neurol Res*, 2007, 29(2):146~155.
- 2 Lo C P, Chen S Y, Lee K W, *et al.* Brain injury after acute carbon monoxide poisoning: early and late complications. *Am J Roentgenol*, 2007, 189(4):W205~211.
- 3 Taskiran D, Nesil T, Alkan K. Mitochondrial oxidative stress in female and male rat brain after ex vivo carbon monoxide treatment. *Hum Exp Toxicol*, 2007, 26(8):645~651.
- 4 Thom S R, Bhopal E V, Fisher D, *et al.* Delayed neuropathology after carbon monoxide poisoning is immune mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(37):13660~13665.
- 5 Zhivotovsky B, Ccdervakk B, Jiang S, *et al.* Involvement of Ca^{2+} in the formation of high molecular weight DNA fragments in thymocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 202(1):120~127.
- 6 Piantadosi C A, Zhang J, Levin S D, *et al.* Apoptosis and delayed neuronal damage after carbon monoxide poisoning in the rat. *Exp Neurol*, 1997, 147(1):103~144.
- 7 Kim H S, Loughran P A, Kim P K, *et al.* Carbon monoxide protects hepatocytes from TNF- α /Actinomycin D by inhibition of the caspase-8-mediated apoptotic pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(4):1172~1178.
- 8 Wang X, Wang Y, Kim H P, *et al.* Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. *J Biol Chem*, 2007, 282(3):1718~1726.
- 9 Song R, Zhou Z, Kim P K, *et al.* Carbon monoxide promotes Fas/CD95-induced apoptosis in Jurkat cells. *J Biol Chem*, 2004, 279(43):44327~44334.
- 10 Zhang Y, Goodyer C, LeBlanc A. Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjection with active caspase-3, -6, -7 and -8. *J Neurosci*, 2000, 20(22):8384~8389.
- 11 Green D R, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 2004, 305(5684):626~629.
- 12 Searabelli T M, Stephanou A, Pasini E, *et al.* Minoencycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(5):865~874.
- 13 Han L H, Zhao Y S, Jia X Q. Mathematical modeling identified c-FLIP as an apoptotic switch in death receptor induced apoptosis. *Apoptosis*, 2008, 13(10):1198~1204.

Involvement of Caspase-dependent Mitochondrial Pathway in CORM-2 Induced Apoptosis in Neuronal Cells and Mechanism of Intervention Effect of *Xingnaojing* Injection

Liu Yilin, Hong Ying, Wang Jing

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: This study was aimed to investigate the mechanism of CO-releasing molecules (CORM-2) induced apoptosis and the intervention effect of *Xingnaojing* (XNJ) Injection in neuronal cells of rats. Optical microscope was applied to observe morphologic changes of neuronal cells. MTT assay was performed to assess the survival rates of CORM-2 on neuronal cells. Apoptosis was examined by flow cytometric analysis and the expression of relative proteins was measured by western blotting analysis. At the same time the morphologic changes, survival rates and expression of relative proteins of neuronal cells were also checked after XNJ treatment. The results showed that CORM-2 can influence survival rates in a time- and concentration-dependent manner. Survival rates decreased gradually after the cultures subjected to 24 h with $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of CORM-2. It can induce neuronal apoptosis and activate Caspase-3, Caspase-9 and Cytochrome C in a concentration-dependent manner. The neuronal cells were treated with $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of CORM-2 and then incubated with $10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ and $20 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ XNJ injection for 20 h. It turned out early neuronal apoptosis decreased and the expression of Caspase-3, Caspase-9 and Cytochrome C also decreased. To sum up, CORM-2 may induce neuronal apoptosis through Caspase-dependent mitochondrial pathway, which can be intervened by XNJ Injection through inhibiting Caspase-dependent mitochondrial pathway.

Keywords: CORM-2, neuronal apoptosis, Caspase, mitochondrial pathway, *Xingnaojing* Injection

(责任编辑 张丰丰 张志华, 责任译审 王 晶)