

# 基于内质网应激探讨淫羊藿苷对受损神经元的影响

吴承杰<sup>1</sup>, 马勇<sup>1,2</sup>, 郭杨<sup>1,2\*</sup>, 王磊<sup>1</sup>, 涂鹏程<sup>1</sup>, 潘娅岚<sup>1</sup>, 郑苏阳<sup>1</sup>, 黄桂成<sup>1,2</sup>

(1. 南京中医药大学 骨伤研究所, 南京 210023; 2. 南京中医药大学 附属医院, 南京 210029)

**[摘要]** **目的:** 从内质网应激的角度观察淫羊藿苷对受损神经元的影响, 并探究其修复受损神经元的部分机制。**方法:** 采用神经生长因子(NGF)将 PC12 细胞诱导分化为神经元, 并使用流式细胞术测定微管相关蛋白 2 (MAP2) 和神经元特异性烯醇化酶(NSE)表达阳性率进行鉴定。实验分为 4 组, 空白组为 PC12 诱导分化的神经元细胞; 溶剂组为 PC12 诱导分化的神经元 + 0.1% 二甲亚砜(DMSO); 毒胡萝卜素组为 PC12 诱导分化的神经元 + 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  毒胡萝卜素; 淫羊藿苷组为 PC12 诱导分化的神经元 + 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  毒胡萝卜素 + 0.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  淫羊藿苷, 使用细胞增殖活性检测试剂盒 (CCK-8) 法检测细胞的增殖, 流式细胞术检测细胞的凋亡, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP), 葡萄糖调节蛋白 78 (Grp78) 的蛋白表达, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测 CHOP, Grp78 mRNA 表达。**结果:** 与溶剂组比较, 毒胡萝卜素组可抑制经 NGF 诱导的神经元样 PC12 细胞的增殖活性, 可促使细胞凋亡, 并能够上调 CHOP, Grp78 的表达 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与毒胡萝卜素组比较, 淫羊藿苷组可缓解毒胡萝卜素对神经元增殖活性的抑制, 减少神经元凋亡, 并能够下调 CHOP, Grp78 的表达 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:** 淫羊藿苷可通过下调 CHOP 和 Grp78 的表达抑制内质网应激, 促进受损神经元的修复。

**[关键词]** 内质网应激; 神经元; 淫羊藿苷

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)02-0059-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20192402

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190904.1537.007.html>

**[网络出版时间]** 2019-09-04 16:59

## Effect of Icariin on Damaged Neurons Based on Endoplasmic Reticulum Stress

WU Cheng-jie<sup>1</sup>, MA Yong<sup>1,2</sup>, GUO Yang<sup>1,2\*</sup>, WANG Lei<sup>1</sup>, TU Peng-cheng<sup>1</sup>, PAN Ya-lan<sup>1</sup>,  
ZHENG Su-yang<sup>1</sup>, HUANG Gui-cheng<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Traumatology & Orthopedics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;  
2. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of icariin on damaged neurons from the perspective of endoplasmic reticulum stress, in order to explore some mechanisms for repairing damaged neurons. **Method:** PC12 cells were induced by nerve growth factor (NGF) to differentiate into neurons, and the positive rate of microtubule associated protein-2 (MAP2) and neuron-specific enolase (NSE) expressions was determined by flow cytometry. The experiment was divided into 4 groups, blank control group; PC12 induced differentiation into neuronal cells, solvent control group; PC12 induced differentiation into neurons + 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO), thapsigargin group; PC12 induced differentiation into nerves Yuan + 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  thapsigargin, and icariin group; PC12 induced differentiation into neurons + 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  thapsigargin + 0.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  icariin. The proliferation of the cells was detected by using cell counting kit-8 (CCK-8) method, the apoptosis of the cells was detected by flow cytometry,

**[收稿日期]** 20190520(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(81704100); 国家自然科学基金面上项目(81573997); 江苏高校“青蓝工程”资助项目(苏教师[2018]12号); 2017年地方高校国家级大学生创新训练计划项目(201710315004)

**[第一作者]** 吴承杰, 在读硕士, 从事骨关节及脊髓损伤修复方面的研究, E-mail: 782210632@qq.com

**[通信作者]** \* 郭杨, 博士, 研究员, 从事骨关节及脊髓损伤修复方面的研究, E-mail: drguoyang@126.com

the protein expressions of CCAAT/enhance-binding protein homologous protein (CHOP) and glucoseregulated protein 78 (Grp78) were detected by Western blot, and the mRNA expressions of CHOP and Grp78 were detected by real-time quantitative PCR (Real-time PCR). **Result:** Compared with the solvent control group, the thapsigargin group inhibited the proliferation of neuron-like PC12 cells induced by NGF, promoted apoptosis, and up-regulated the expressions of CHOP and Grp78 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the thapsigargin group, the icariin group can alleviate the inhibition of neurotrophic activity by thapsigargin, reduce neuronal apoptosis, and down-regulate the expressions of CHOP and Grp78 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Icariin can inhibit endoplasmic reticulum stress by down-regulating the expressions of CHOP and Grp78 and promote the repair of damaged neurons.

[ **Key words** ] endoplasmic reticulum stress; neuron; icariin

脊髓损伤 (SCI) 是中枢神经系统严重受损的疾病之一, 可导致感觉和运动功能的丧失以及生活质量的下降<sup>[1]</sup>。随着人口基数的增加, SCI 病例总数也显著增加。其中, 老年患者的发病率增幅最大, 但其住院死亡率仍然很高<sup>[2]</sup>。虽然近期研究已部分阐明 SCI 后的病理生理过程, 但目前除了常规的 SCI 治疗和康复外, 创新且有效的治疗选择仍然有限<sup>[1]</sup>。温彬宇等<sup>[3]</sup>研究表明, 地黄饮子可抑制能量代谢障碍导致的内质网应激, 调节凋亡相关蛋白, 显著减少神经元凋亡。邱静等<sup>[4]</sup>研究表明, 加减薯蓣丸可上调核转录因子 E<sub>2</sub> 相关因子 2 (Nrf2) 蛋白表达, 从而减轻内质网应激诱导的神经元凋亡。现代药理研究和临床实践证明, 淫羊藿及其活性化合物 (淫羊藿苷) 具有广泛的药理作用, 特别是在激素调节、抗骨质疏松、免疫功能调节、抗氧化、抗衰老等方面的作用<sup>[5]</sup>。淫羊藿苷可抑制 SCI 后的炎症反应、脂质过氧化和细胞凋亡, 减轻脊髓组织病理损伤, 改善运动功能, 具有明显的神经保护作用<sup>[6]</sup>。有研究表明, 淫羊藿苷对 SCI 后运动功能的恢复及神经的保护作用与减轻内质网应激 (ERS) 有关<sup>[7]</sup>。当细胞暴露于外部应激因子以及结构异常时, 未折叠的蛋白质在 ER 中积累, 从而触发了 ERS 途径。其可激活介导程序性细胞死亡的促凋亡因子, CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP)。葡萄糖调节蛋白 78 (Grp78) 是 ER 的分子伴侣, 为了保护细胞免受未折叠蛋白质的影响, 其可介导未折叠蛋白质的重折叠<sup>[8]</sup>。因此, CHOP 和 Grp78 是 ERS 作用的关键因子, 淫羊藿苷可能通过此途径保护神经元, 促进 SCI 的恢复, 但具体机制仍不清晰, 应通过实验进一步验证。

## 1 材料

**1.1 细胞** PC12 细胞系 (可经神经生长因子诱导分化为神经元) 购自江苏凯基生物技术有限公司,

备存于南京中医药大学唐仲英科技楼临床医学实验研究中心实验室。

**1.2 药物及试剂** F-12K 培养基 (美国 Boster 公司, 批号 pyg0056); 胎牛血清 (FBS, 美国 Life Technology 公司, 批号 10099141); 马血清, 二甲基亚砷 (DMSO) (北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 s9050-200, d8372); 青霉素/链霉素 (上海源培生物科技股份有限公司, 批号 s110jv); 台盼蓝染液 (大连美伦生物公司, 批号 mb4681); 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (EDTA), BCA 蛋白含量测定试剂盒 (南京金益柏生物科技有限公司, 批号分别为 t1320-100, p10001); 多聚左旋赖氨酸 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 s20054-250 mg); 神经生长因子 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号 bs-0073p); 神经元特异性烯醇化酶 (NSE), 微管相关蛋白 2 (MAP2) 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab53025, ab134124); Grp78 抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 批号 sc-376768); CHOP, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 2895, 2679); 二抗 (美国 Bio-Rad 公司, 批号 12004162); 毒胡萝卜素 (上海晶纯生化科技股份有限公司, 批号 t135258); 淫羊藿苷 (成都瑞芬思生物科技股份有限公司, 批号 Y-004-180228); 细胞增殖毒性检测试剂盒-8 (CCK-8) 试剂盒 (安徽 Biosharp 生物科技股份有限公司, 批号 bs350b); Annexin V-FITC 凋亡试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 c1062s); PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒, TB Green™ Premix Ex Taq™ II PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司, 批号分别为 RR036A, RR820A)。

**1.3 仪器** ACB-4A1 型垂直流超净工作台 (新加坡 Esco 公司); HERAcell 150i 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司); HWS-26 型热恒温水浴锅 (上海一恒电器厂); DMI 3000B 型倒置荧光显微

镜(德国 Leica 公司);CA94545 型细胞分析仪(美国 Millipore 公司);ELX800 型 Perkin Elmer 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);FC500MPL 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司);Applied Biosystems 7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)自动化分析仪(美国 ABI 公司);221BR 46894 型蛋白半干转印仪及电泳仪(美国 Bio-Bad 公司);6131-26843 型微孔板离心机及各量程移液器(德国 Eppendorf 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组** 实验分为 4 组,空白组 PC12 诱导分化的神经元细胞;溶剂组 PC12 诱导分化的神经元细胞 + 0.1% DMSO;毒胡萝卜素组 PC12 诱导分化的神经元 + 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  毒胡萝卜素(毒胡萝卜素可诱导 ERS<sup>[9]</sup>);淫羊藿苷组 PC12 诱导分化的神经元 + 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  毒胡萝卜素 + 0.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  淫羊藿苷(经过前期实验及文献查阅,提示 0.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  淫羊藿苷可增强 PC12 细胞的活力<sup>[10]</sup>)。

**2.2 PC12 细胞的培养** 将 PC12 细胞从液氮罐中取出,迅速于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中融化。将冻存管中细胞悬液吸至 15 mL 离心管中,加入完全培养基 1 mL,1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min。吸弃上清液后加入含有 10% 马血清 + 5% FBS + 1% 青霉素/链霉素的 F-12K 培养基 5 mL,重悬 PC12 细胞。吸取台盼蓝染液和细胞悬液 20  $\mu\text{L}$ ,混匀并打入计数板中,利用细胞计数仪进行计数。以  $1\times 10^4$  个/mL 接种至 25  $\text{cm}^2$  培养皿中,加入含有 10% 马血清 + 5% FBS + 1% 青霉素/链霉素的 F-12K 培养基 10 mL,放入 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。隔 1~2 d 换液,倒置显微镜下观察细胞的形态特征及生长状况,细胞铺满 80% 培养瓶底面时进行传代。

**2.3 PC12 细胞的诱导分化与鉴定** 选择生长良好的 PC12 细胞,观察细胞铺满培养瓶底 80% 面积,吸弃培养基后加入含 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NGF 的 F-12K 培养基,并重悬细胞。计数后按 1:1 或 1:2 接种至 10  $\text{cm}^2$  培养皿中,另加入含 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NGF 的 F-12K 培养基至 10 mL,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。隔 1~2 d 换液,同时密切观察细胞形态特征。选择生长良好的 PC12 细胞,接种至预先用 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  L-多聚赖氨酸包被的 6 孔板中,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中诱导分化培养 5 d。待 PC12 细胞长出突起后,吸弃上清,用 0.25% 的胰蛋白酶-EDTA 消化 1~2 min,镜下观察细胞收起触角,变圆,加含 10% 血清的完全培养基终止消化。吹打下 PC12 细胞,

1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 6 min。用 1 mL 冷磷酸盐缓冲液(PBS)吹打细胞沉淀至悬液,测细胞浓度,按每 1.5 mL 的离心管  $2\times 10^5\sim 10\times 10^5$  个细胞分为 2 组,每组 3 管,1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 6 min。吸弃上清,一组加入 PBS 稀释的 NSE 抗体 200  $\mu\text{L}$ ,一组加入 MAP2 抗体 200  $\mu\text{L}$ ,轻轻吹打混匀,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 6 min,吸弃上清,各组加入冷 PBS 离心洗涤 2 次。细胞中加入预冷 PBS 500  $\mu\text{L}$ ,吹打均匀,转移至流式细胞管中,4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存或直接上流式细胞仪进样检测。

**2.4 CCK-8 法检测细胞增殖状态** 取生长良好的神经元,吸弃上清,用 0.25% 的胰蛋白酶-EDTA 消化 1~2 min,镜下观察细胞收起触角,变圆,加含 10% 血清的完全培养基终止消化。吹打下神经元,1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 6 min,收集细胞。加入含有 10% 马血清 + 5% FBS + 1% 青霉素/链霉素的 F-12K 培养基 5 mL,重悬神经元,进行计数。按照终浓度  $1\times 10^4$  个/mL,每孔 200  $\mu\text{L}$  接种于 3 块 96 孔培养板中,同时设置与实验平行的无细胞空白组,每组 6 孔,将培养板静置于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养 12~24 h。神经元贴壁后,吸弃原培养基,加入各组干预含药培养基。将 96 孔板置于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中分别培养 24,48,72 h。吸弃原培养基,改加有含 10% 马血清 + 5% FBS + 1% 青霉素/链霉素的 F-12K 培养基,同时每孔加入 CCK-8 溶液 10  $\mu\text{L}$ (避免产生气泡),静置于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 4 h,多功能酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 A。

**2.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况** 取生长良好的神经元,以  $1\times 10^6$  个/mL 接种至 6 孔板,在 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。待细胞贴壁后,吸弃原培养基,按上述实验分组给药干预 48 h。吸弃上清,用 0.25% 的胰蛋白酶-EDTA 消化 1~2 min。镜下观察细胞收起触角,变圆,加含 10% 血清的完全培养基终止消化。吹打下神经元,1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 6 min。加入冷 PBS 重悬,再 1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 6 min,重复 1 次,清洗细胞。加入结合缓冲液悬浮细胞 195  $\mu\text{L}$ ,加入 MAP2 5  $\mu\text{L}$  混匀,避光暗室孵育 1 h。加入 Annexin V-FITC 5  $\mu\text{L}$ ,室温避光孵育 10 min。1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 6 min,弃上清,加入结合缓冲液重悬细胞重复 3 次,再加入结合缓冲液重悬细胞 190  $\mu\text{L}$ 。加入 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  PI(终质量浓度 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )10  $\mu\text{L}$  混匀,上流式细胞仪进样检测,重复 3 次。

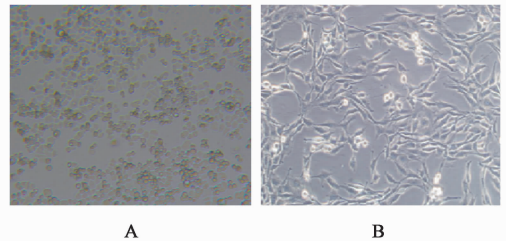
**2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 CHOP, Grp78 蛋白的表达** 取生长良好的神经元,以  $1 \times 10^6$  个/mL 接种至 6 孔板,在  $37^\circ\text{C}$   $5\% \text{CO}_2$  培养箱中培养。待细胞贴壁后,吸弃原培养基,按上述实验分组给药干预 48 h。吸弃培养基,6 孔板中每孔加入 RIPA (含  $1\% \text{PMSF}$ ) 裂解液  $150 \mu\text{L}$ 。裂解  $1 \sim 2 \text{ min}$  后,用细胞刷将细胞层刮下,转移至  $1.5 \text{ mL}$  离心管中,置于冰上裂解  $10 \text{ min}$ ,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $10 \text{ min}$ 。取上清至另一  $1.5 \text{ mL}$  离心管中,使用 BCA 法检测各组总蛋白的含量。取相同质量总蛋白,稀释至同一体积,加入  $1/3$  体积的 4 倍 loading buffer,沸水浴  $10 \text{ min}$  后,保存于  $-20^\circ\text{C}$  待测。 $100 \text{ V}$  恒压电泳  $90 \text{ min}$ ,  $100 \text{ V}$ ,  $400 \text{ mA}$  转膜  $60 \text{ min}$ 。 $5\%$  脱脂奶粉室温封闭  $2 \text{ h}$ ,弃封闭液, TBST 漂洗蛋白条带 3 次,每次  $10 \text{ min}$ 。配制  $5\%$  BSA 溶液,按  $1:1\ 000$  比例配制 CHOP, Grp78 及 GAPDH 抗体,  $4^\circ\text{C}$  过夜孵育。次日,加入 TBST 漂洗 3 次,每次  $10 \text{ min}$ 。用  $5\%$  BSA 稀释二抗,室温孵育  $2 \text{ h}$ 。回收二抗, TBST 漂洗 3 次,每次  $5 \text{ min}$ 。滴加 ECL 显影液,凝胶成像系统显影。利用 Image J 图像分析系统分析条带,计算条带灰度值与 GAPDH 蛋白条带灰度值的比值,表示蛋白相对含量。

**2.7 Real-time PCR 检测 CHOP, Grp78 的 mRNA 表达** 取生长良好的神经元,以  $1 \times 10^6$  个/mL 接种至 6 孔板,在  $37^\circ\text{C}$   $5\% \text{CO}_2$  培养箱中培养。待细胞贴壁后,吸弃原培养基,按上述实验分组给药干预 48 h。吸弃上清,用  $0.25\%$  的胰蛋白酶-EDTA 消化  $1 \sim 2 \text{ min}$ ,镜下观察细胞收起触角,变圆,加含  $10\%$  血清的完全培养基终止消化。用移液器轻柔吹打,  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $6 \text{ min}$ ,收集细胞。使用 trizol 法提取 RNA,并测定各组 RNA 浓度。使用反转录试剂盒进行反转录。在 Genbank 上查找 CHOP, Grp78,  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 序列,设计并由生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物合成, CHOP, 上游  $5'$ -AAATAACAGCCGGAACCTGA- $3'$  和下游  $5'$ -CTTTTCCTGGGATGAGATA- $3'$ ,产物长度  $83 \text{ bp}$ ; Grp78, 上游  $5'$ -CCCCAACTGCTGAAGAGGAT- $3'$  和下游  $5'$ -CCCCAAGACATGTGAGCAAC- $3'$ ,产物长度  $95 \text{ bp}$ ;  $\beta$ -actin, 上游  $5'$ -TACAACCTCTTGCAGCTCC- $3'$  和下游  $5'$ -ATCTTCATGAGGTAGTCAGTC- $3'$ ,产物长度  $157 \text{ bp}$ 。以  $\beta$ -actin 为内参,利用 PCR 试剂盒进行 CHOP, Grp78 进行相对定量分析。使用 Real-time PCR 系统,设置 Real-time PCR 扩增条件进行 PCR 反应,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对数据进行相对定量分析。

**2.8 统计学分析** 所有数据分析由统计软件 SPSS 19.0 完成,所有检测数据均表示为  $\bar{x} \pm s$ ,采用单因素方差分析和 SNK- $q$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 NGF 诱导的神经元样 PC12 细胞鉴定** 使用倒置显微镜观察经 NGF 培养 7 d 后的 PC12 细胞,镜下可见 PC12 细胞的突起较前明显变长,细胞形态呈三角形,且呈贴壁样生长,说明诱导后的 PC12 细胞已具有神经元样形态。见图 1。使用流式细胞测定 MAP2 和 NSE 表达阳性率,结果显示 MAP2 平均阳性率为  $(62.54 \pm 1.00)\%$ ,NSE 平均阳性率为  $(93.32 \pm 2.87)\%$ ,表明经 NGF 诱导后的 PC12 细胞已具有神经元样的作用,可供后续实验使用。



A. PC12 细胞; B. NGF 诱导的 PC12 细胞

图 1 PC12 细胞形态学变化(倒置显微镜,  $\times 100$ )

Fig. 1 Morphological changes of PC12 cells (inverted microscope,  $\times 100$ )

**3.2 对受损神经元增殖的影响** 与空白组比较,溶剂组 A 无明显差异,表明 DMSO 对细胞无明显影响;与溶剂组比较,毒胡萝卜素组 A 显著降低 ( $P < 0.01$ ),表明毒胡萝卜素抑制细胞增殖活性;与毒胡萝卜素组比较,淫羊藿苷组 A 显著增高 ( $P < 0.01$ ),表明淫羊藿苷组能改善毒胡萝卜素对神经元增殖活性的抑制。见表 1。

**3.3 对受损神经元凋亡的影响** 与溶剂组比较,神经元经毒胡萝卜素干预后,48 h 细胞凋亡率显著增多 ( $P < 0.01$ );与毒胡萝卜素比较,使用淫羊藿苷干预毒胡萝卜素作用后的神经元,48 h 细胞凋亡率显著减低 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.4 对受损神经元 CHOP, Grp78 蛋白表达的影响** 与溶剂组比较,毒胡萝卜组 CHOP, Grp78 的蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ );与毒胡萝卜素组比较,淫羊藿苷组 CHOP, Grp78 的蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ )。见图 2,表 3。

**3.5 对受损神经元 CHOP, Grp78 mRNA 表达的影响** 与空白组比较,溶剂组 CHOP, Grp78 mRNA

表 1 淫羊藿苷对受损神经元增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of icariin on proliferation in damaged neurons( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	干预时间		
		24 h	48 h	72 h
空白	-	1.018 ± 0.176	1.366 ± 0.173	2.141 ± 0.146
溶剂	-	0.826 ± 0.082	1.295 ± 0.101	2.293 ± 0.196
毒胡萝卜素	2	0.425 ± 0.031 <sup>3)</sup>	0.573 ± 0.127 <sup>3)</sup>	1.367 ± 0.125 <sup>3)</sup>
淫羊藿苷	0.1	0.494 ± 0.236	0.927 ± 0.167 <sup>5)</sup>	1.774 ± 0.107 <sup>5)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与溶剂组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ ;与毒胡萝卜素组比较<sup>4)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>5)</sup> $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 2 淫羊藿苷对损伤神经元凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of icariin on apoptosis in damaged neurons( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

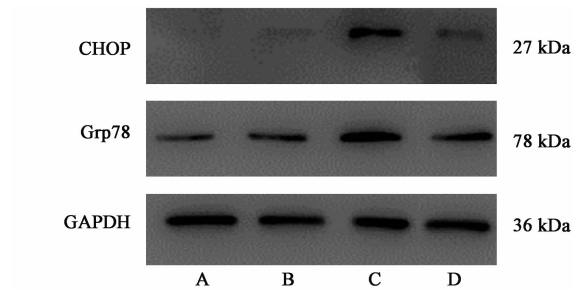
组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞凋亡率/%
空白	-	4.103 ± 0.174
溶剂	-	4.793 ± 0.573
毒胡萝卜素	2	19.04 ± 1.786 <sup>3)</sup>
淫羊藿苷	0.1	13.03 ± 2.765 <sup>5)</sup>

表 4 淫羊藿苷对受损神经元 CHOP, Grp78 mRNA 相对表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of icariin on CHOP and Grp78 mRNA in damaged neurons( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	CHOP	Grp78
溶剂	-	0.741 ± 0.258 <sup>1)</sup>	0.926 ± 0.217 <sup>1)</sup>
毒胡萝卜素	2	14.011 ± 6.231 <sup>3)</sup>	37.258 ± 3.767 <sup>3)</sup>
淫羊藿苷	0.1	6.997 ± 3.361 <sup>4)</sup>	25.690 ± 6.855 <sup>5)</sup>

注:设空白组 mRNA 相对表达为 1。



A. 空白组; B. 溶剂组; C. 毒胡萝卜素组; D. 淫羊藿苷组

图 2 各组神经元 CHOP, Grp78 的蛋白表达表达

Fig. 2 Electrophoresis of protein expression of CHOP and Grp78 in neurons of each group

表 3 淫羊藿苷对受损神经元 CHOP, Grp78 蛋白的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of icariin on CHOP and Grp78 protein in damaged neurons( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	CHOP/GAPDH	Grp78/GAPDH
空白	-	0.088 ± 0.003	0.264 ± 0.005
溶剂	-	0.067 ± 0.003	0.531 ± 0.014
毒胡萝卜素	2	0.479 ± 0.009 <sup>3)</sup>	1.069 ± 0.021 <sup>3)</sup>
淫羊藿苷	0.1	0.198 ± 0.004 <sup>5)</sup>	0.715 ± 0.012 <sup>5)</sup>

表达明显降低( $P < 0.05$ );与溶剂组比较,毒胡萝卜素组 CHOP, Grp78 mRNA 表达明显升高( $P < 0.01$ );与毒胡萝卜素组比较,淫羊藿苷组 CHOP, Grp78 的 mRNA 表达明显降低( $P < 0.05$ )。见表 4。

#### 4 讨论

ER 具有调节跨膜蛋白和细胞内钙浓度、合成磷脂和胆固醇以及影响蛋白质折叠的功能<sup>[11]</sup>,但机体在缺氧、缺血、外伤等情况下会出现 ERS 反应,表现为 ER 腔内蛋白质折叠和未折叠蛋白质的累积<sup>[12]</sup>。ERS 是 SCI 病理学的主要机制之一<sup>[13]</sup>,其可通过激活 CHOP 使细胞发生凋亡<sup>[14]</sup>。然而,细胞中的肌醇必需酶-1 (IRE-1),活化转录因子 6 (ATF6),蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK) 3 个 ERS 传感器可缓解 ERS<sup>[15-16]</sup>,消除错误折叠或未折叠蛋白,并使细胞重新回到稳态<sup>[17]</sup>。在正常细胞中,伴侣蛋白 Grp78 结合 ER 膜蛋白 PERK 并阻止其活化。当未折叠蛋白质在 ERS 下而积累时,Grp78 与 PERK 发生解离,导致其活化,进而抑制蛋白质合成,最终减轻 ER 内错误折叠蛋白的过载<sup>[14,18]</sup>。由于其 mRNA 上存在内部核糖体进入位点,一些 mRNA(如 ATF4)的翻译未被抑制,ATF4 蛋白可增加参与蛋白质折叠和控制氧化还原的基因表达<sup>[19-20]</sup>。如果 ERS 反应剧烈,ATF4 则会增加 CHOP 的表达,从而引发细胞凋亡<sup>[21]</sup>。

SCI 部位微环境的改变可导致蛋白质错误折叠<sup>[22-23]</sup>,ERS 的下调或许能减少神经细胞的凋亡,促进神经功能恢复<sup>[12,24-25]</sup>。淫羊藿,味辛、甘,性温,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿等功效,淫羊藿苷为其有效药理成分<sup>[26]</sup>。有研究表明,五味子与淫羊藿混

合提取物可改善 D-半乳糖致脑衰老小鼠的学习记忆能力<sup>[27]</sup>;淫羊藿苷能显著降低丙二醛含量,增加超氧化物歧化酶活性,改善脊髓脂质过氧化,脊髓水肿和组织病理学损伤,并促进 CSI 大鼠运动功能的恢复<sup>[28]</sup>;高剂量淫羊藿苷的早期和持续治疗通过线粒体凋亡途径抑制促炎因子,氧化应激和神经细胞凋亡,显著增强 CSI 后的运动恢复<sup>[29]</sup>;淫羊藿苷能抑制 CSI 后的炎症、脂质过氧化和细胞凋亡,减轻脊髓组织病理学损伤,具有明显的神经保护作用<sup>[30]</sup>。因此,淫羊藿苷促进受损神经元修复可能与 ERS 有关。

本研究通过淫羊藿苷干预受损神经元,验证淫羊藿苷调控 ERS 修复受损神经元的有效性及部分机制。CCK-8,流式细胞术检测的实验结果均显示,毒胡萝卜素可促进 ERS 促使神经生长因子诱导的神经元样 PC12 细胞发生凋亡,且凋亡率较高;淫羊藿苷组方中药物可缓解毒胡萝卜素诱发的 ERS,减少神经元凋亡。Western blot 及 Real-time PCR 结果显示,毒胡萝卜素作为 ERS 激动剂,能够上调 CHOP, Grp78 的表达,表明毒胡萝卜素可上调 CHOP, Grp78 的表达激活 ERS,进而诱导神经元凋亡;与毒胡萝卜素组相比,经淫羊藿苷组干预后下调 CHOP, Grp78 的表达,表明淫羊藿苷可通过下调 CHOP, Grp78 的表达抑制毒胡萝卜素诱导的 ERS。据上可得,CHOP, Grp78 高表达提示 ERS,淫羊藿苷可通过下调 CHOP 和 Grp78 的表达抑制 ERS,促进受损神经元的修复。

有研究表明,上调 Grp78 有利于 ER 中蛋白质的正确折叠,促进细胞的恢复;而下调 Grp78 可引起 ER 中未折叠蛋白积累,ERS 持续激活导致细胞凋亡<sup>[31-32]</sup>。CHOP 高表达提示 ERS 的激活,细胞呈现凋亡趋势<sup>[33]</sup>;另有研究表明,CHOP 具有抗细胞凋亡的作用<sup>[34]</sup>。在本实验中,淫羊藿苷可抑制 ERS,下调受损神经元 CHOP 和 Grp78 的表达,从而抗神经元凋亡。此与有些文献研究结果不同,也许存在其他通路影响 CHOP 和 Grp78 的表达,应进行多实验验证及多系统通路研究。然而,本实验尚有部分不足,如未做动物实验、未涉及基因敲除、未进行系统通路研究等,应进行下一步研究。

#### 【参考文献】

[ 1 ] Hayta E, Elden H. Acute spinal cord injury: a review of pathophysiology and potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs for pharmacological intervention[J].

J Chem Neuroanat, 2018, 87: 25-31.

[ 2 ] Jain N B, Ayers G D, Peterson E N, et al. Traumatic spinal cord injury in the United States, 1993-2012[J]. JAMA, 2015, 313(22): 2236-2243.

[ 3 ] 温彬宇, 张志辰, 高俊峰, 等. 地黄饮子抑制能量障碍诱导的 APP/PS1 小鼠内质网应激及神经元凋亡的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 111-117.

[ 4 ] 邱静, 谭子虎, 杨琼, 等. 加减薯蓣丸通过 Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 通路改善 APP/PS1 小鼠神经元凋亡[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(21): 38-44.

[ 5 ] MA H, HE X, YANG Y, et al. The genus epimedium: an ethnopharmacological and phytochemical review [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(3): 519-541.

[ 6 ] REN X S, DING W, YANG X Y. Neuroprotective effect of icariin on spinal cord injury in rats [J]. China J Orthop Traumatol, 2018, 31(11): 1054-1060.

[ 7 ] LI H, ZHANG X, QI X, et al. Icariin inhibits endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis after spinal cord injury through modulating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(2): 277-286.

[ 8 ] Kuroiwa M, Watanabe M, Katoh H, et al. Effect of amiloride on endoplasmic reticulum stress response in the injured spinal cord of rats [J]. Eur J Neurosci, 2014, 40(7): 3120-3127.

[ 9 ] Sari F R, Watanabe K, Widyantoro B, et al. Sex differences play a role in cardiac endoplasmic reticulum stress (ERS) and ERS-initiated apoptosis induced by pressure overload and thapsigargin [J]. Cardiovasc Pathol, 2011, 20(5): 281-290.

[ 10 ] MO Z T, LI W N, ZHAI Y R, et al. The effects of icariin on the expression of HIF-1 $\alpha$ , HSP-60 and HSP-70 in PC12 cells suffered from oxygen-glucose deprivation-induced injury [J]. Pharm Biol, 2017, 55(1): 848-852.

[ 11 ] XU C, Bailly-Maitre B, Reed J C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions [J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2656-2664.

[ 12 ] Ohri S S, Maddie M A, ZHANG Y, et al. Deletion of the pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress response effector CHOP does not result in improved locomotor function after severe contusive spinal cord injury [J]. J Neurotrauma, 2012, 29(3): 579-588.

[ 13 ] WANG J, LI H, REN Y, et al. Local Delivery of beta-elemene improves locomotor functional recovery by alleviating endoplasmic reticulum stress and reducing neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(2): 595-609.

- [14] Hood K N, ZHAO J, Redell J B, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to the loss of newborn hippocampal neurons after traumatic brain injury [J]. *J Neurosci*, 2018, 38 (9) :2372-2384.
- [15] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation [J]. *Science*, 2011, 334 (6059) :1081-1086.
- [16] Hotamisligil G S, Davis R J. Cell signaling and stress responses [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a006072.
- [17] Bertolotti A, ZHANG Y, Hendershot L M, et al. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2 (6) :326-332.
- [18] Harding H P, ZHANG Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase [J]. *Nature*, 1999, 397 (6716) :271-274.
- [19] HE C H, GONG P, HU B, et al. Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (24) :20858-20865.
- [20] Wek R C, Cavener D R. Translational control and the unfolded protein response [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9 (12) :2357-2371.
- [21] Harding H P, ZHANG Y, Bertolotti A, et al. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response [J]. *Mol Cell*, 2000, 5 (5) :897-904.
- [22] GAO Y, YANG H, CHI J, et al. Hydrogen gas attenuates myocardial ischemia reperfusion injury independent of postconditioning in rats by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced autophagy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43 (4) :1503-1514.
- [23] Chong W C, Shastri M D, Eri R. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious nexus implicated in bowel disease pathophysiology [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (4) :771.
- [24] Penas C, Guzman M S, Verdu E, et al. Spinal cord injury induces endoplasmic reticulum stress with different cell-type dependent response [J]. *J Neurochem*, 2007, 102 (4) :1242-1255.
- [25] BI Y, ZHU Y, ZHANG M, et al. Effect of shikonin on spinal cord injury in rats via regulation of hmgb1/tlr4/nf-kb signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43 (2) :481-491.
- [26] 路宇仁, 陈映冰, 崔元璐, 等. 淫羊藿苷药理作用研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 (17) :209-220.
- [27] 刘聪, 李宁, 敬舒, 等. 五味子-淫羊藿混合提取物对 D-半乳糖致脑衰老小鼠学习记忆能力的改善作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (21) :147-152.
- [28] REN X S, DING W, YANG X Y. Icariin alleviates lipid peroxidation after spinal cord injury in rats [J]. *J South Med Univ*, 2018, 38 (6) :711-715.
- [29] LI H, ZHANG X, ZHU X, et al. The effects of icariin on enhancing motor recovery through attenuating pro-inflammatory factors and oxidative stress via mitochondrial apoptotic pathway in the mice model of spinal cord injury [J]. *Front Physiol*, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.01617.
- [30] 任宪盛, 丁巍, 杨小玉. 淫羊藿苷在大鼠脊髓损伤中的神经保护作用 [J]. *中国骨伤*, 2018, 31 (11) :1054-1060.
- [31] ZHU G, Lee A S. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230 (7) :1413-1420.
- [32] RAO R V, Bredesen D E. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16 (6) :653-662.
- [33] Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, et al. The Role of the PERK/eIF2alpha/ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress [J]. *Curr Mol Med*, 2016, 16 (6) :533-544.
- [34] Southwood C M, Garbern J, JIANG W, et al. The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease [J]. *Neuron*, 2002, 36 (4) :585-596.

[责任编辑 周冰冰]