

# 羟基红花黄色素 A 对谷氨酸诱导损伤神经元过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 表达的影响

刘星苗 孙莉 梁浩 孙国敏 程焱

**【摘要】 目的** 探讨羟基红花黄色素 A(HSYA)拮抗谷氨酸诱导神经元损伤的保护机制。**方法** 采集经体外原代培养第 7 天的 Sprague Dawley 胎鼠皮质神经元,通过形态学观察、噻唑蓝法、Western blotting 法分别检测过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )和磷酸化 PPAR $\gamma$ (p-PPAR $\gamma$ ,即 PPAR $\gamma$ 的失活形式)表达水平,以探讨 HSYA 抗谷氨酸诱导神经元损伤的保护机制。**结果** 经谷氨酸处理后神经元发生肿胀、部分崩解、死亡。与正常对照组相比,谷氨酸不同剂量组(1.00、5.00 和 10.00 mmol/L 组)的神经元存活率(66.60%、33.40%和 21.60%)和 PPAR $\gamma$ 蛋白表达水平显著降低,对照组灰度值:1.06 $\pm$ 0.18,谷氨酸 5.00 和 10.00 mmol/L 组灰度值分别为:0.32 $\pm$ 0.09、0.28 $\pm$ 0.07(均  $P=0.000$ ),p-PPAR $\gamma$ 蛋白表达水平明显升高,灰度值分别为:0.37 $\pm$ 0.05、1.83 $\pm$ 0.17 和 1.75 $\pm$ 0.21(均  $P=0.000$ )。HSYA 与谷氨酸共同处理后神经元形态明显改善、细胞相对存活率提高,谷氨酸 5.00 mmol/L,HSYA 0.01、0.10 和 1.00 mmol/L 组分别为 33.40%、35.30%、51.00%和 72.50%( $P=0.742$ 、0.033、0.002),PPAR $\gamma$ 蛋白表达水平呈现逐渐升高趋势,对照组,谷氨酸 5.00 mmol/L,HSYA 0.01、0.10 和 1.00 mmol/L 组灰度值分别为:1.20 $\pm$ 0.16、0.25 $\pm$ 0.06、0.39 $\pm$ 0.10、0.41 $\pm$ 0.12、0.37 $\pm$ 0.08,但差异未达到统计学意义(均  $P>0.05$ ),p-PPAR $\gamma$ 蛋白表达水平降低,对照组,谷氨酸 5.00 mmol/L,HSYA 0.01、0.10 和 1.00 mmol/L 组灰度值分别为:0.51 $\pm$ 0.14、1.91 $\pm$ 0.25、1.70 $\pm$ 0.26、1.25 $\pm$ 0.23、0.85 $\pm$ 0.19,( $P=0.022$ 、0.004、0.000)。**结论** HSYA 对由谷氨酸诱导的神经元损伤具有保护作用,其机制与抑制 PPAR $\gamma$ 蛋白磷酸化即抑制 PPAR $\gamma$ 活性有关。

**【关键词】** 色素类; 谷氨酸; 神经元; 过氧化物酶体增殖物激活受体

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2012.03.017

## The effects of hydroxysafflor yellow A on PPAR $\gamma$ expression in glutamate-induced neuron damage

LIU Xing-miao, SUN Li, LIANG Hao, SUN Guo-min, CHENG Yan

Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin Institute of Neurological Research, Key Laboratory of Wound Repair and Regeneration of Central Nervous System, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Variation and Regeneration of Neurotrosis, Tianjin 300052, China

Corresponding author: SUN Li (Email: sunli\_2000@hotmail.com)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of hydroxysafflor yellow A on PPAR $\gamma$  expression in glutamate-induced neuron damage. **Methods** Primary cultured cortical neurons of 7 d embryonic Sprague Dawley rat was prepared. Morphological observation and MTT method were used to detect cell damage; western blotting was chosen to examine PPAR $\gamma$  and p-PPAR $\gamma$  expression (inactivated form of PPAR $\gamma$ ) in total protein, in order to explore the protective effect of HSYA on glutamate-induced neuron damage. **Results** After treated with glutamate neurons were swelling, disintegrated or dead in morphological observation. Compared with the control group, cell survival rate in the groups treated with different dosage of glutamate (1.00, 5.00 and 10.00 mmol/L) was all decreased (66.60%, 33.40% and 21.60%;  $P=0.004$ , 0.000, and 0.000, respectively). In comparison with the control group, the expression of PPAR $\gamma$  in total protein decreased, the gray value in control group was 1.06 $\pm$ 0.18, while in glutamate 5.00 mmol/L and 10.00 mmol/L groups was 0.32 $\pm$ 0.09 and 0.28 $\pm$ 0.07, respectively ( $P=0.000$ , for all). The expression of

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81070968)

作者单位:300052 天津医科大学总医院神经内科,天津市神经病学研究所,教育部“中枢神经系统创伤修复与再生”重点实验室,天津市“神经损伤变异与再生”重点实验室

通讯作者:孙莉(Email:sunli\_2000@hotmail.com)

p-PPAR $\gamma$  increased, the gray value was  $0.37 \pm 0.05$  in control group, and  $1.83 \pm 0.17$  and  $1.75 \pm 0.21$  in glutamate 5.00 mmol/L and 10.00 mmol/L group ( $P = 0.000$ , for all). HSYA improved the morphology and cell survival rate of glutamate-induced neuron damage. The cell survival rate in glutamate 5.00 mmol/L group and that treated with HSYA 0.01 mmol/L, 0.10 mmol/L and 1.00 mmol/L was 33.40%, 35.30%, 51.00% and 72.50%, respectively ( $P = 0.742, 0.033, \text{ and } 0.002$ , respectively); HSYA slightly increased PPAR $\gamma$  expression but without statistical significance, the gray value was  $1.20 \pm 0.16$  in control group, and was  $0.25 \pm 0.06, 0.39 \pm 0.10, 0.41 \pm 0.12$  and  $0.37 \pm 0.08$  in glutamate 5.00 mmol/L group, and glutamate 5.00 mmol/L group treated with HSYA 0.01 mmol/L, 0.10 mmol/L or 1.00 mmol/L ( $P = 0.094, 0.145$  and  $0.576$ , respectively); HSYA obviously reduced p-PPAR $\gamma$  expression, the gray value in control group was  $0.51 \pm 0.14$ , in glutamate 5.00 mmol/L group and was  $1.91 \pm 0.25, 1.70 \pm 0.26, 1.25 \pm 0.23$  and  $0.85 \pm 0.19$  in glutamate 5.00 mmol/L group treated with HSYA 0.01 mmol/L, 0.10 mmol/L or 1.00 mmol/L ( $P = 0.022, 0.004$  and  $0.000$ , respectively). **Conclusion** HSYA can protect the glutamate-induced neuron damage, and the mechanism involves the inhibition of phosphorylation of PPAR $\gamma$ .

**【Key words】** Pigments; Glutamic acid; Neurons; Peroxisome proliferator-activated receptors

**Fund Project:** National Nature Science Foundation of China (No. 81070968)

近年研究发现,许多神经变性疾病如阿尔茨海默病、帕金森病、运动神经元病或多系统萎缩等,均与兴奋性氨基酸毒性损伤、氧化应激、自由基超载等因素有关。谷氨酸为中枢神经系统重要的兴奋性神经递质,已有大量文献报道谷氨酸代谢失衡释放过量,可产生神经毒性致神经元损伤<sup>[1]</sup>。羟基红花黄色素 A(HSYA)为具有单查尔酮苷类结构的化合物,是红花最有效的水溶性部位,具有抗氧化、保护细胞活性、抗肿瘤功效<sup>[2]</sup>。在本实验中,我们采用经体外原代培养的神经元制备谷氨酸损伤细胞模型,以期观察 HSYA 对体外谷氨酸诱导神经元损伤的保护作用。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 实验动物 清洁级孕 17~20 d 健康雌性 Sprague Dawley(SD)大鼠 30 只,体质量 350~400 g,购自军事医学科学院实验动物中心。实验前于实验室正常环境(12 h 白昼、12 h 夜晚,常温 26 ℃)单笼饲养 2~3 d,自由饮食,以保证孕鼠状态良好。

2. 主要试剂与药品 DMEM/F12 培养基(含 2.50 mmol/L L-谷氨酰胺、15 mmol/L HEPES 缓冲溶液),其中每 500 ml 含无水氯化钙 16.6 mg/L、L-亮氨酸 59.05 mg/L、亚油酸 0.042 mg/L,购自美国 Thermo Scientific 公司。胎牛血清(FBS, Certified)和质量浓度为 0.25% 胰蛋白酶-EDTA(胰蛋白酶 + 0.02% EDTA)购自美国 Invitrogen 公司。青霉素-链霉素溶液(青霉素 10 kU/ml、链霉素 10 mg/ml, 0.9% 氯化钠配制)和 L-谷氨酰胺(30 mg/ml)均为北京索来宝科

技有限公司产品。L-谷氨酸(L-Glutamate, 纯度 > 99%)和噻唑蓝(MTT)购自北京索来宝科技有限公司。免疫试剂中 I 抗工作液[为兔抗大鼠微管相关蛋白-2(MAP-2, 1:500)、小鼠抗大鼠过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ , 1:100)、兔抗大鼠磷酸化过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (p-PPAR $\gamma$ , 1:100)]分别购自英国 abcam 公司和美国 Santa-Cruz 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG II 抗(1:1000)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG II 抗(1:1000)及 TRITC-山羊抗兔 IgG II 抗(1:100)多克隆抗体,以及 ECL 化学发光显影检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司。DAPI 由北京索来宝科技有限公司提供,产品包装为 1 mg,用水配制成 1  $\mu$ g/ml 工作液,用于细胞核染色产生蓝色荧光。二甲基亚砜(DMSO)由上海碧云天生物技术公司提供。HSYA 纯度为 99%,由浙江永宁药业股份有限公司惠赠。浓度为 100 mmol/L 的苯甲基磺酰氟(PMSF)由上海碧云天生物技术公司生产。RIPA 裂解液(含 50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、体积分数为 1%的 Triton X-100、质量浓度为 1%的 sodium deoxycholate、质量浓度为 0.1%的 SDS 等)购自上海碧云天生物技术公司。SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5 $\times$ ,含少量 DTT 和巯基乙醇)及 Bradford 蛋白质浓度检测试剂盒为上海碧云天生物技术公司产品。

3. 试验仪器 HERAcell-150 型恒温二氧化碳孵箱购自德国 Heraeus 公司。UWB-6 型恒温水浴箱由南京科航实验仪器有限公司提供。Multiskan MK3 型酶标仪由美国 Thermo Scientific 公司提供。Fisher Scientific Sonic Dismembrator-100 型超声细胞

破碎仪为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品。PowerPac-300 型电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。GelDoc XR+ 型全自动凝胶成像分析系统由美国 Bio-Rad 公司提供。OLYMPUS IX-71 型荧光倒置显微镜由日本 Olympus 公司提供,可激发红、绿、蓝色荧光。

## 二、实验方法

1. 胎鼠皮质神经元体外原代培养 采用颈椎脱臼法处死 SD 大鼠,迅速取出子宫置于冰上,以预冷乙醇浸泡胎鼠 1 min,于无菌条件下分离大脑皮质,剔除脑膜和血管膜后剪碎皮质,37 ℃、质量浓度为 0.125% 胰蛋白酶消化 20 min 将胎鼠大脑皮质消化成单细胞悬液,以 DMEM/F12 培养基终止消化,吹打组织进一步形成单细胞悬液,调整细胞密度达  $4 \times 10^6/\text{ml}$  并接种于涂有 0.10 mg/ml 多聚赖氨酸、直径为 10 cm 的培养皿中,置于 37 ℃、体积分数为 5% 的恒温二氧化碳孵育箱、饱和湿度培养 24 h,全量换液继续培养,至第 3 天时滴加终浓度为 3~5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的阿糖胞苷,第 4 天全量换液,后根据细胞生长情况每隔 2 d 半量换液。于体外培养第 7 天时,采用神经元特异性抗体——MAP-2 进行免疫荧光染色鉴定神经元纯度,阳性细胞率 > 95% 即可作为实验材料。

2. 形态学观察 将培养皿置于倒置显微镜工作台,接通电源、转动转换器,调节准焦螺旋使物像清晰,观察各组细胞形态,并采集细胞形态变化图像。

3. 噻唑蓝比色法检测神经元活性 (1) 谷氨酸损伤实验:经体外原代培养的神经元接种于 96 孔板,置于 37 ℃、体积分数为 5% 恒温二氧化碳孵育箱、饱和湿度条件下培养 7 d 后分为 5 组:空白对照组(只加不含神经元的培养液)、正常对照组(正常培养 7 d 的神经元,不做任何处理)、谷氨酸模型组(1.00、5.00 和 10.00 mmol/L 组)。每组设 8 个复孔,于体外培养 7 d 的神经元于同一时间滴加含不同浓度谷氨酸培养液,作用 20 h 后每孔滴加质量浓度为 5 mg/ml 的 MTT 20  $\mu\text{l}$ ,继续培养 4 h 后吸去培养液,再滴加 100  $\mu\text{l}$  二甲基亚砜,37 ℃ 条件下反应 15 min 至紫色结晶全部溶解。以全自动酶标仪检测各孔光密度(OD)值,测试波长为 570 nm,计算细胞相对存活率:细胞相对存活率 = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)。每组重复进行实验 5 次,选择中间浓度作为模型组。(2) HSYA 保护实验:选择神经元损伤明显但不严重的谷氨酸 5.00 mmol/L 组作为损伤模型组。经体外培养 7 d 的

神经元接种于 96 孔板,置于 37 ℃、体积分数为 5% 恒温二氧化碳孵育箱、饱和湿度条件下培养 7 d 后同时滴加谷氨酸和 HSYA,并根据 HSYA 浓度的不同分为谷氨酸模型组(谷氨酸 5.00 mmol/L)、HSYA 保护组(0.01、0.10 和 1.00 mmol/L 组),以及空白对照组(只加不含神经元的培养液),每组设 8 个复孔,测定方法与谷氨酸实验相同。

4. Western blotting 法检测过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  和磷酸化过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  表达水平 (1) 总蛋白提取:以直径 10 cm 的培养皿培养细胞,经体外培养至第 7 天的神经元于谷氨酸损伤实验和 HSYA 保护实验反应 24 h 后以冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 30 s ( $\times 2$  次),滴加 300  $\mu\text{l}$  含 PMSF(终浓度为 1 mmol/L)的 RIPA 细胞裂解液,用细胞刮于冰上收集细胞,置于体积为 1.50 ml 离心管中,超声破碎细胞(500 J/s)5 s/次 ( $\times 6$  次),以离心半径为 16 cm、4 ℃、13 000 r/min 高速离心 15 min,收集上清即为总蛋白。Bradford 蛋白质检测试剂盒,以牛血清白蛋白为标准,检测每个样品中蛋白质浓度。取细胞上清液和蛋白上样缓冲液,按照 4 : 1 充分混匀,100 ℃ 水浴使蛋白质变性,15 min 后置于冰上,静置 10 min,充分冷却后即可上样、电泳,剩余蛋白质转移至新的离心管中,-80 ℃ 保存备用。(2) 电泳与转膜:蛋白质样品加入 SDS-PAGE 凝胶孔,以 80 V 电泳至溴酚蓝电泳及胶底部。聚偏二氟乙烯(PVDF)膜置于甲醇溶液中平衡 15 s,按照负极-海绵垫-3 层滤纸-胶-PVDF 膜-3 层滤纸-海绵垫顺序放置,于 0 ℃、80 V 电压恒压转膜 80 min 使蛋白质转移至 PVDF 膜上。(3) 特异性条带检测与定量分析:将 PVDF 膜置于平皿,滴加封闭液(质量浓度为 5% 的脱脂奶粉溶于磷酸盐缓冲液)封闭 1 h,磷酸盐缓冲液冲洗 10 min,孵育 I 抗(1 : 100 浓度稀释 PPAR $\gamma$  和 p-PPAR $\gamma$ ),4 ℃ 过夜,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min ( $\times 3$  次),孵育辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG II 抗(1 : 1000),室温 1 h,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min ( $\times 3$  次),ECL 滴加于待显影的 PVDF 膜上,迅速移入显影仪曝光并采集图片,应用 Image J 软件对不同处理组神经元摄片并进行蛋白质相对表达水平分析。

5. 免疫荧光法检测微管相关蛋白-2 表达水平 将玻片置入 6 孔板,以质量浓度为 0.10 mg/ml 的多聚赖氨酸包被,滴加神经元培养 7 d,再以质量浓度为 4% 的多聚甲醛固定 15 min,磷酸盐缓冲液冲洗

5 min(×3 次),再以质量浓度为 0.30% Triton X-100 通透 10 min,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(×3 次),山羊血清工作液封闭 30 min,吸去血清,不清洗,滴加 I 抗 MAP-2 单克隆抗体(1:500)4 ℃ 过夜,室温孵育 1 h,滴加 II 抗 TRITC-山羊抗兔 IgG(1:100)37 ℃ 作用 1 h,DAPI(10 μg/ml)染核,甘油封片,于荧光倒置显微镜下采集图像。

### 三、统计分析方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据计算与分析。计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,不同处理组间的两两比较行 SNK-*q* 检验。以  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、胎鼠大脑皮质神经元纯度鉴定

正常神经元经体外培养第 2 天后免疫荧光染色显示,大多数呈纺锤形,部分呈椭圆形或三角形,细胞突起明显,经免疫荧光鉴定证实神经元纯度为 50%~60%(图 1)。滴加阿糖胞苷后,胶质细胞生长受到抑制,再于培养第 7 天时将神经元特异性抗体 MAP-2 进行免疫荧光染色,以荧光倒置显微镜采集荧光信号,经 MAP-2 染色阳性神经元呈现红色荧光,同时以 DAPI 行细胞核染色,发出蓝色荧光,两种荧光叠加在一起者即为神经元。鉴定结果显示:培养第 2 天的神经元免疫荧光染色阳性率为 50%~60%,而培养第 7 天所得神经元阳性率可达 >95%,后者被选作实验材料。

### 二、形态学观察

不同浓度谷氨酸(1.00、5.00 和 10.00 mmol/L)与神经元共同孵育 24 h 后,部分神经元发生死亡、崩

解,大部分肿胀变圆,细胞突起变短或消失,胞体立体感差,并可见大量细胞碎片。HSYA 保护组(谷氨酸 5.00 mmol/L + HSYA 1.00 mmol/L)共同孵育 24 h 后神经元生长状态良好,极少肿胀变圆,且细胞立体感较好,细胞突起基本存在(图 2)。

### 三、细胞相对存活率观察

经 1.00、5.00 和 10.00 mmol/L 谷氨酸与神经元共同孵育 24 h 后,神经元活性明显降低,其中以 10.00 mmol/L 浓度组最低,为 21.60%,不同处理组之间差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,表 1)。损伤模型组神经元在滴加不同质量浓度的 HSYA(0.01、0.10 和 1.00 mmol/L)共同孵育 24 h 后,显示出对谷氨酸损伤的保护作用,并且呈现浓度依赖性,其中以 1.00 mmol/L 为神经元最佳保护浓度,细胞存活率约为 72.50%,与谷氨酸模型组之间差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,表 2)。

四、谷氨酸对过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  和磷酸化过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  表达的影响

经不同质量浓度谷氨酸处理后,与正常对照组相比,神经元 PPAR $\gamma$  蛋白表达水平降低、p-PPAR $\gamma$  蛋白表达水平升高,组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 3,表 3,4)。与谷氨酸模型组(5.00 mmol/L)相比,加入不同浓度 HSYA 后对神经元 PPAR $\gamma$  表达无明显影响,但可使 p-PPAR $\gamma$  蛋白表达水平明显降低,而且不同处理组之间差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 4,表 5,6)。

## 讨 论

谷氨酸是中枢神经系统重要的兴奋性神经递质,但其过量释放可产生神经毒性引起神经元损

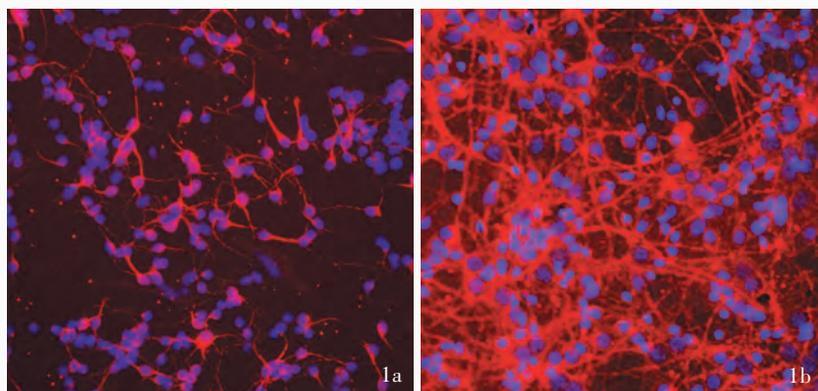
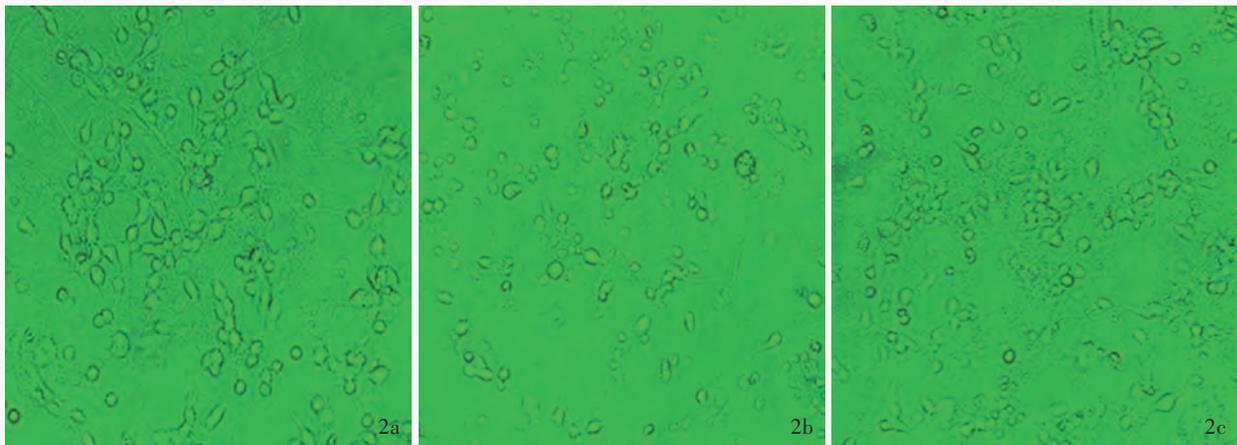


图 1 胎鼠大脑皮质神经元纯度鉴定 免疫荧光染色 ×200 1a 体外培养第 2 天时,大部分神经元呈纺锤形,部分形态为三角形,胞体立体感良好,部分细胞之间已可见突起联系 1b 体外培养第 7 天的神经元多呈梭形,胞体立体感良好,形态饱满,神经突起较长并相互连接成网络

Figure 1 Immunofluorescence staining of the cortical neurons of fetal mice (microtubule associated protein - 2) × 200. Culture in vitro on the second day (Panel 1a). Culture in vitro on the seventh day (Panel 1b)



**图 2** 胎鼠大脑皮质体外培养第 7 天时的神经元形态观察 倒置显微镜 ×200 2a 正常对照组神经元多呈梭形,胞体立体感良好,形态饱满,神经突起较长并连成网络 2b 谷氨酸 5.00 mmol/L 损伤组部分神经元发生死亡、崩解,大部分细胞肿胀变圆,细胞突起变短或消失,胞体立体感差,可见大量细胞碎片 2c HSYA 1.00 mmol/L 保护组神经元生长状态良好,细胞立体感强,细胞突起基本存在

**Figure 2** Morphology of cortical neurons in fetal mice Inverted microscopy ×200. Control group. The neuron appearances are normal (Panel 2a). Glutamate 5.00 mmol/L group. Some neurons are dead or disintegrated. Many neurons present abnormal appearances. A larger number of cellular fragments can be seen (Panel 2b). HSYA 1.00 mmol/L group. Neuron appearances are nearly normal (Panel 2c)

**表 1** 不同浓度谷氨酸损伤组细胞存活率的比较

**Table 1.** The survival rate of neurons treated by glutamate in different concentration

组别	样本例数	OD 值 ( $\bar{x} \pm s$ )	细胞存活率 (%)	F 值	P 值
正常对照组(1)	5	0.56 ± 0.05	100.00	72.891	0.001
谷氨酸 1.00 mmol/L(2)	5	0.38 ± 0.06	66.60		
谷氨酸 5.00 mmol/L(3)	5	0.21 ± 0.02	33.40		
谷氨酸 10.00 mmol/L(4)	5	0.15 ± 0.02	21.60		

注:组间两两比较行 SNK-q 检验, (1):(2)P=0.004; (1):(3)P=0.000; (1):(4)P=0.000; (2):(3)P=0.005; (2):(4)P=0.002; (3):(4)P=0.118

**表 2** 不同浓度 HSYA 保护组细胞存活率的比较

**Table 2.** The survival rate of glutamate-induced neuron damage treated with HSYA in different concentration

组别	样本例数	OD 值 ( $\bar{x} \pm s$ )	细胞存活率 (%)	F 值	P 值
谷氨酸 5.00 mmol/L(1)	5	0.21 ± 0.02	33.40	21.417	0.006
HSYA 0.01 mmol/L(2)	5	0.22 ± 0.03	35.30		
HSYA 0.10 mmol/L(3)	5	0.30 ± 0.02	51.00		
HSYA 1.00 mmol/L(4)	5	0.41 ± 0.03	72.50		

注:组间两两比较行 SNK-q 检验, (1):(2)P=0.742; (1):(3)P=0.033; (1):(4)P=0.002; (2):(3)P=0.047; (2):(4)P=0.003; (3):(4)P=0.018

伤。有证据表明,谷氨酸神经毒性是神经元缺血、缺氧损害导致神经元死亡的主要因素之一<sup>[1]</sup>。谷氨酸参与许多神经系统变性疾病的发病过程,然而至今尚未发现能够有效抑制神经毒性的药物。HSYA 为具有单查尔酮苷类结构的化合物,是红花有效的水溶性部位,具有抗氧化、保护细胞活性、抗肿瘤功效。但是从细胞水平观察 HSYA 抗谷氨酸神经毒性保护作用的实验研究甚少。在本实验中,我们采用不同浓度谷氨酸建立神经元损伤模型,发现无论谷氨酸浓度高低(1.00 ~ 10.00 mmol/L)均可造成神经元损伤,且不同浓度之间均具有统计学差异。由于谷氨酸处理浓度太小对神经元损伤不够明显,处理浓度太大导致神经元死亡过多,从而对药物的反应性差,我们最终选择对神经元有明显损伤但不严重的 5 mmol/L 谷氨酸作为模型组。

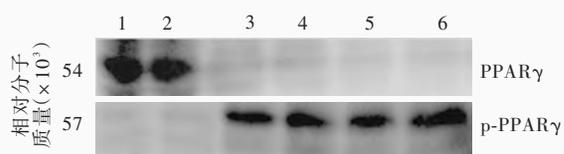
PPAR $\gamma$ 属于核受体超家族,是一种配体激活的转录因子,活化后从细胞质转位至细胞核,能够识别和结合目的基因启动子区的顺式作用元件,对多种代谢过程发挥调控作用;并可通过影响其他转录因子的表达和活性,间接发生对目的基因的调控作用,进而参与体内多种病理生理学过程<sup>[3-4]</sup>。已有研究发现,PPAR $\gamma$ 激活对脑缺血-再灌注损伤具有一定的保护作用,其作用机制与 PPAR $\gamma$ 活化后自细胞质移位至细胞核,抑制炎症相关转录因子[如核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)等]活性,抑制炎症反应,减轻氧化应激,抑制细胞凋亡,促进新生血管生成有关<sup>[5-8]</sup>。PPAR $\gamma$ 激动剂对脑缺血的保护作用与增加 PPAR $\gamma$  DNA 结合能力有关,并可被 PPAR $\gamma$ 抑制剂所逆转,提示 PPAR $\gamma$ 激动剂对脑缺血的保护作用是通过激活 PPAR $\gamma$ 实现的<sup>[6]</sup>。有研究显示,在神经元缺氧-复

**表 3** 不同浓度谷氨酸损伤组神经元 PPAR $\gamma$  表达水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 灰度值)

**Table 3.** The PPAR $\gamma$  expression in neurons treated by glutamate in different concentrations ( $\bar{x} \pm s$ , gray value)

组别	样本例数	PPAR $\gamma$	F 值	P 值
对照组(1)	5	1.06 $\pm$ 0.18		
谷氨酸 5.00 mmol/L(2)	5	0.32 $\pm$ 0.09	92.260	0.000
谷氨酸 10.00 mmol/L(3)	5	0.28 $\pm$ 0.07		

注: 组间两两比较行 SNK-*q* 检验, (1):(2)*P* = 0.000; (1):(3)*P* = 0.000; (2):(3)*P* = 0.728



1~2: 模型组 (model group) 3~4: 谷氨酸 5.00 mmol/L (glutamate 5.00 mmol/L) 5~6: 谷氨酸 10.00 mmol/L (glutamate 10.00 mmol/L)

**图 3** 琼脂糖凝胶电泳检测不同浓度谷氨酸诱导神经元损伤后 PPAR $\gamma$  和 p-PPAR $\gamma$  表达水平的变化

**Figure 3** The PPAR $\gamma$  and p-PPAR $\gamma$  expression levels in neurons treated by different concentrations of glutamate

**表 5** 不同浓度 HSYA 保护组神经元 PPAR $\gamma$  表达水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 灰度值)

**Table 5.** The PPAR $\gamma$  expression in neurons treated with HSYA in different concentrations ( $\bar{x} \pm s$ , gray value)

组别	样本例数	PPAR $\gamma$	F 值	P 值
正常对照组(1)	5	1.20 $\pm$ 0.16		
谷氨酸 5.00 mmol/L(2)	5	0.25 $\pm$ 0.06		
HSYA 0.01 mmol/L(3)	5	0.39 $\pm$ 0.10	65.506	0.000
HSYA 0.10 mmol/L(4)	5	0.41 $\pm$ 0.12		
HSYA 1.00 mmol/L(5)	5	0.37 $\pm$ 0.08		

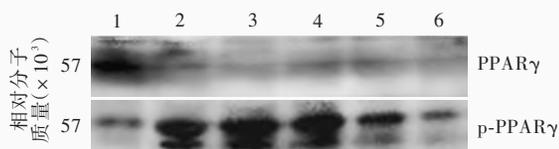
注: 组间两两比较行 SNK-*q* 检验, (1):(2)*P* = 0.000; (1):(3)*P* = 0.000; (1):(4)*P* = 0.000; (1):(5)*P* = 0.000; (2):(3)*P* = 0.094; (2):(4)*P* = 0.145; (2):(5)*P* = 0.576; (3):(4)*P* = 0.753; (3):(5)*P* = 0.204; (4):(5)*P* = 0.310

**表 4** 不同浓度谷氨酸损伤组神经元 p-PPAR $\gamma$  表达水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 灰度值)

**Table 4.** The p-PPAR $\gamma$  expression in neurons treated by glutamate in different concentrations ( $\bar{x} \pm s$ , gray value)

组别	样本例数	p-PPAR $\gamma$	F 值	P 值
对照组(1)	5	0.37 $\pm$ 0.05		
谷氨酸 5.00 mmol/L(2)	5	1.83 $\pm$ 0.17	841.292	0.000
谷氨酸 10.00 mmol/L(3)	5	1.75 $\pm$ 0.21		

注: 组间两两比较行 SNK-*q* 检验, (1):(2)*P* = 0.000; (1):(3)*P* = 0.000; (2):(3)*P* = 0.053



1: 模型组 (model group) 2~3: 谷氨酸 5.00 mmol/L (glutamate 5.00 mmol/L) 4: HSYA 0.01 mmol/L (HSYA 0.01 mmol/L) 5: HSYA 0.10 mmol/L (HSYA 0.10 mmol/L) 6: HSYA 1.00 mmol/L (HSYA 1.00 mmol/L)

**图 4** 琼脂糖凝胶电泳观察, 经不同浓度 HSYA 处理后, 谷氨酸诱导损伤神经元 PPAR $\gamma$  和 p-PPAR $\gamma$  表达变化

**Figure 4** The PPAR $\gamma$  and p-PPAR $\gamma$  expression levels of glutamate-treated neurons with the protection of HSYA in different concentrations

**表 6** 不同浓度 HSYA 保护组神经元 p-PPAR $\gamma$  表达水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 灰度值)

**Table 6.** The p-PPAR $\gamma$  expression in neurons treated with HSYA in different concentrations ( $\bar{x} \pm s$ , gray value)

组别	样本例数	p-PPAR $\gamma$	F 值	P 值
正常对照组(1)	5	0.51 $\pm$ 0.14		
谷氨酸 5.00 mmol/L(2)	5	1.91 $\pm$ 0.25		
HSYA 0.01 mmol/L(3)	5	1.70 $\pm$ 0.26	33.048	0.001
HSYA 0.10 mmol/L(4)	5	1.25 $\pm$ 0.23		
HSYA 1.00 mmol/L(5)	5	0.85 $\pm$ 0.19		

注: 组间两两比较行 SNK-*q* 检验, (1):(2)*P* = 0.000; (1):(3)*P* = 0.000; (1):(4)*P* = 0.001; (1):(5)*P* = 0.035; (2):(3)*P* = 0.022; (2):(4)*P* = 0.004; (2):(5)*P* = 0.000; (3):(4)*P* = 0.014; (3):(5)*P* = 0.001; (4):(5)*P* = 0.009

氧损伤过程中, PPAR $\gamma$  随着缺氧后复氧时间的延长而呈现逐渐下降趋势<sup>[9]</sup>。本实验结果亦提示: 谷氨酸对神经元损伤 24 h 后 PPAR $\gamma$  表达水平即呈现出逐渐下降趋势, 表明正常神经元中的 PPAR $\gamma$  可起到一定的保护作用, 随着谷氨酸浓度的增加其对神经元的损伤作用亦逐渐加剧, 使得 PPAR $\gamma$  表达水平下调, 从而削弱了 PPAR $\gamma$  的保护作用。

p-PPAR $\gamma$  是 PPAR $\gamma$  在蛋白激酶介导下的磷酸化形式, PPAR $\gamma$  的磷酸化过程不直接影响其转录过程, 而是通过转录后修饰调节实现的<sup>[10]</sup>。已有研究

表明, PPAR $\gamma$  磷酸化可抑制其从细胞质向细胞核移位<sup>[11]</sup>, 而 PPAR $\gamma$  是核转录因子, 在细胞核内处于活化状态, 与目的基因结合而发挥调控作用, 因此细胞质内的 p-PPAR $\gamma$  为 PPAR $\gamma$  的活性抑制状态<sup>[12-13]</sup>; 蛋白激酶抑制剂可抑制 PPAR $\gamma$  磷酸化, 增强 PPAR $\gamma$  与其目的基因的结合, 从而逆转上述过程<sup>[10]</sup>, 而且 PPAR $\gamma$  磷酸化的逆转与激活 PPAR $\gamma$  对损伤的修复有着相似的保护作用<sup>[13]</sup>。在本实验中, 我们发现: 经谷氨酸处理 24 h 后的神经元 p-PPAR $\gamma$  表达水平明显升高, 提示谷氨酸神经毒性可使 PPAR $\gamma$  发生磷

酸化,不仅能使 PPAR $\gamma$  表达水平降低,而且还可抑制 PPAR $\gamma$  从细胞质向细胞核移位,降低其活性,从两方面削弱了 PPAR $\gamma$  的保护作用。与此同时,表达水平升高的 p-PPAR $\gamma$  参与了多种病理过程,如抑制脂质分化、加重胰岛素抵抗等,进一步加剧由谷氨酸诱导的神经元损伤。

本实验证实,HSYA 对谷氨酸诱导的神经元损伤具有保护作用。细胞形态学观察结果显示:与谷氨酸损伤组相比,HSYA 保护组神经元生长状态良好,细胞死亡崩解、肿胀变圆的数量较少,且细胞立体感较好,存在大量细胞突起,具有明显的形态保护作用;MTT 法证实:HSYA 保护组细胞存活率显著高于谷氨酸损伤组,提示 HSYA 对谷氨酸诱导的神经元损伤具有一定保护作用,而且呈浓度依赖性,最佳保护浓度为 1.00 mmol;Western blotting 检测结果表明:HSYA 对谷氨酸诱导损伤神经元的 PPAR $\gamma$  表达水平无明显影响,但是可降低 p-PPAR $\gamma$  表达水平,提示 HSYA 不是通过改变细胞 PPAR $\gamma$  蛋白质表达,而是通过调节 PPAR $\gamma$  的活性,对转录翻译后蛋白质的后期修饰进行调控,降低蛋白质磷酸化水平,从而发挥神经保护作用。有研究显示,PPAR $\gamma$  活性受多种途径调控,其中有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)途径在 PPAR $\gamma$  失活过程中发挥重要作用,一是通过 PPAR $\gamma$  磷酸化,二是通过抑制 PPAR $\gamma$  从细胞质向细胞核移位而使 PPAR $\gamma$  失活<sup>[14]</sup>。由此可以进一步推测,谷氨酸诱导神经元损伤的机制亦可能是通过激活 MAPK 途径,进而使 PPAR $\gamma$  磷酸化,从而参与病理过程,而 HSYA 则是通过抑制该过程而产生神经保护作用,其具体机制尚需进一步研究加以证实。

综上所述,HSYA 可通过减轻 PPAR $\gamma$  磷酸化,拮抗谷氨酸诱导的神经损伤,达到对谷氨酸介导的神经系统退行性疾病的防治作用。

#### 参 考 文 献

- [1] Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*, 1990, 11:379-387.
- [2] Chang HT, Han HX, Tu PF, et al. Chemical components and

- pharmacological effects of Safflower, a kind of traditional Chinese medicine. *Guo Wai Yi Yao Zhi Wu Yao Fen Ce*, 1999, 14:201-203. [常海涛, 韩宏星, 屠鹏飞, 等. 中药红花化学成分及药理作用. *国外医药·植物药分册*, 1999, 14:201-203.]
- [3] Schnegg CI, Robbins ME. Neuroprotective Mechanisms of PPAR $\delta$ : modulation of oxidative stress and inflammatory processes. *PPAR Res*, 2011, 2011:373560.
- [4] Ou Z, Zhao X, Labiche LA, et al. Neuronal expression of peroxisome proliferator - activated receptor - gamma (PPAR gamma) and 15d-prostaglandin J2-mediated protection of brain after experimental cerebral ischemia in rat. *Brain Res*, 2006, 1096:196-203.
- [5] Xu YW, Sun L, Liang H, et al. 12/15-Lipoxygenase inhibitor baicalein suppresses PPAR gamma expression and nuclear translocation induced by cerebral ischemia/reperfusion. *Brain Res*, 2010, 1307:149-157.
- [6] Sun L, Xu YW, Liang H, et al. Altered peroxisome proliferator-activated receptor isotypes expression after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 2010, 43:216-221. [孙莉, 徐艳炜, 梁浩, 等. 局灶性脑缺血再灌注大鼠过氧化物酶体增殖物激活受体亚型表达的改变. *中华神经科杂志*, 2010, 43:216-221.]
- [7] Sun L, Xu YW, Liang H, et al. Peroxisome proliferator - activated receptor  $\gamma$  nuclear translocation induced by focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 2010, 43:512-515. [孙莉, 徐艳炜, 梁浩, 等. 局灶性脑缺血再灌注大鼠过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 核移位的改变. *中华神经科杂志*, 2010, 43:512-515.]
- [8] Sun L, Cheng Y. The peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist - mediated protection of brain after cerebral ischemia. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2007, 7 Suppl:36-38. [孙莉, 程焱. 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 激动剂对脑缺血的保护作用. *中国现代神经疾病杂志*, 2007, 7增刊:36-38.]
- [9] Di ZL, Tian Y, Ma HB, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in hippocampus neurons in rats after oxygen deprivation/oxygen supply in vitro. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao (Yi Xue Ban)*, 2009, 34:1238-1242. [狄政莉, 田晔, 马红兵, 等. 缺氧/复氧损伤对大鼠海马神经元过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 表达的影响. *中南大学学报(医学版)*, 2009, 34:1238-1242.]
- [10] Helenius K, Yang Y, Alasaari J, et al. Mat1 inhibits peroxisome proliferator - activated receptor gamma - mediated adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*, 2009, 29:315-323.
- [11] von Knethen A, Tzieply N, Jennwein C, et al. Casein-kinase - II - dependent phosphorylation of PPARgamma provokes CRM1 - mediated shuttling of PPARgamma from the nucleus to the cytosol. *J Cell Sci*, 2010, 123:192-201.
- [12] Sun L, Nicholson AC, Hajjar DP, et al. Adipogenic differentiating agents regulate expression of fatty acid binding protein and CD36 in the J744 macrophage cell line. *J Lipid Res*, 2003, 44:1877-1886.
- [13] Jurkowski W, Roomp K, Crespo I, et al. PPAR $\gamma$  population shift produces disease-related changes in molecular networks associated with metabolic syndrome. *Cell Death Dis*, 2011, 2:e192.
- [14] Burgermeister E, Seger R. MAPK kinases as nucleo-cytoplasmic shuttles for PPAR gamma. *Cell Cycle*, 2007, 6:1539-1548.

(收稿日期:2012-03-31)

欢迎订阅 2012 年《中国现代神经疾病杂志》