

银杏二萜内酯葡胺注射液通过下调 calpain 信号通路抑制脑缺血神经细胞凋亡

刘 秋, 许治良, 金治全, 周 军, 毕宇安, 王振中, 萧 伟*

(江苏康缘药业股份有限公司中药制药过程新技术国家重点实验室, 连云港 222001)

摘 要 研究银杏二萜内酯葡胺注射液(diterpene ginkgolides meglumine injection, DGMI)对缺氧缺糖/复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)损伤的人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 凋亡的抑制作用及其机制。采用试剂盒、Fluo-3 AM 法、Western blot 检测 SH-SY5Y 细胞氧糖剥离损伤 4 h 后, 与药物一起复氧 1 h 细胞乳酸脱氢酶(LDH)的漏出量、caspase-3/7 酶活力、细胞质中核小体含量、胞浆游离钙离子浓度以及 calpain、cleaved caspase-12 蛋白量的变化。结果显示 DGMI 能极显著降低 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞 LDH 的漏出量, 抑制 caspase-3/7 酶活性, 减少细胞核核小体的释放量, 下调细胞内游离钙离子浓度、calpain 和 cleaved caspase-12 蛋白量, 抑制 calpain 凋亡信号通路保护神经细胞。DGMI 对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡具有显著的抑制作用, 其作用机制可能与抑制细胞内 Ca^{2+} /calpain/caspase-12/caspase-3 信号通路有关。

关键词 银杏二萜内酯葡胺注射液; 缺氧缺糖损伤; 细胞凋亡; 钙离子; calpain; caspase-12

中图分类号 R965; R743.3 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2015)06-0707-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150612

Diterpene ginkgolides meglumine injection attenuates oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis of nerve cells via inhibition of calpain signaling pathway

LIU Qiu, XU Zhiliang, JIN Zhiqian, ZHOU Jun, BI Yu'an, WANG Zhenzhong, XIAO Wei*

State Key Laboratory of New Pharmaceutical Process for Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract To investigate the anti-apoptotic effect of diterpene ginkgolides meglumine injection (DGMI) on SH-SY5Y cells induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R), and to explore its mechanisms. After 4 h of OGD, the SH-SY5Y cells were treated with 25 mg/L DGMI for 1 h. The release of lactic dehydrogenase (LDH) was measured by cytotoxicity detection kit^{plus}. Cell apoptosis was detected by caspase-3/7 assays. Cell death was detected by ELISA. The concentration of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cytoplasm was measured by Fluo-3 AM and the levels of calpain and cleaved capaease-12 were evaluated by western blot. As we expected, DGMI significantly decreased the release of LDH, the concentration of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, the protein levels of calpain and cleaved caspase-12. Furthermore, DGMI injection also attenuated the activities of caspase-3/7 and the contents of cytoplasmic histone-associated-DNA-fragments. These data demonstrated that the DGMI injection showed good anti-apoptotic effect in SH-SY5Y cells induced by OGD/R. The mechanisms may be associated with the inhibition of Ca^{2+} /calpain/caspase-12/caspase-3 signaling pathway.

Key words diterpene ginkgolides meglumine injection; oxygen-glucose deprivation; apoptosis; calcium; calpain; caspase-12

This study was supported by the Science Foundation from the Ministry of Science and Technology of China (2013ZX09402203) and the Fund for Transformation of Major Science and Technology Achievements

脑缺血是引起脑卒中的主要原因。脑组织糖原和 ATP 储备有限,脑血流减少或中断引起细胞 ATP 不足导致的神经细胞膜去极化、兴奋性神经毒性损伤、钙离子超载、炎症反应等多重损伤造成的神经元坏死和凋亡是脑卒中病人高致残率、高致死率的主要原因^[1]。研究证实,脑缺血损伤神经细胞除了线粒体、内质网和死亡受体 3 条途径诱导细胞凋亡外,calpain 通路是氧糖剥离神经细胞凋亡的分子机制之一^[2]。银杏二萜内酯葡胺注射液(DGMI)是含银杏内酯 B(GB,60%)、银杏内酯 A(GA,35%)、银杏内酯 K(GK,2%)、银杏内酯 C(GC,2%)的新药,用于脑卒中的治疗。研究表明 GA、GB、GK 各单体可通过抑制脑缺血细胞的氧化应激、炎症反应和凋亡损伤来保护脑卒中神经元^[3-5]。本研究采用 SH-SY5Y 细胞缺氧缺糖(OGD)模型模拟脑缺血性损伤,检测 DGMI 对体外脑缺血神经细胞的抗凋亡作用及对 calpain 信号通路的抑制作用,进一步阐明了 DGMI 抗脑缺血细胞凋亡的分子机制。

1 材 料

1.1 试 剂

1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);青链霉素混合液(100×)(北京 Biotopped 公司);胰蛋白酶(美国 Amresco 公司);caspase-Glo3/7 试剂盒(美国 Promega 公司);细胞毒性检测试剂盒、细胞凋亡和坏死检测试剂盒(瑞士 Roche 公司);Fluo-3 AM 荧光探针(美国 Sigma 公司);calpain 2 Large Subunit (M-type) antibody、actin antibody、HRP 标记二抗(美国 CST 公司);cleaved caspase-12 antibody(美国 Abcam 公司);银杏二萜内酯葡胺注射液(DGMI,江苏康缘药业股份有限公司),产品批号为 130901;金纳多注射液(JND)产品批号为 H6138。

1.2 仪 器

CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);缺氧小室(加拿大 Stemcell 公司);微孔板检测系统 Flex Station 3(美国 MD 公司);ChemiDoc XRS 系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 细 胞

SH-SY5Y 细胞购自中科院上海细胞库。

2 方 法

2.1 细胞培养及缺氧缺糖/复氧(OGD/R)模型建立

SH-SY5Y 细胞培养于 1640 培养基(含 10% 胎牛血清,1×青链霉素混合液)中,置于 37℃,含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,选取对数生长期细胞进行实验。将 SH-SY5Y 细胞以每孔 2×10^4 个的密度接种至 96 孔板中培养 24 h,以无糖平衡盐溶液完全置换 1640 培养基置于缺氧小室中,将小室用 95% N₂ 和 5% CO₂ 混合气以 20 L/min 的气流速度充气 20 min 以排出空气,密封小室,将小室和对照组细胞置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中。将细胞在缺氧小室中培养一定的时间后,取出细胞板置于细胞培养箱中,和 DGMI 等药物一起复氧一定时间。然后进行细胞 LDH 漏出量、细胞凋亡、钙离子浓度和相关蛋白质含量的测定。

2.2 LDH 漏出量测定

将 SH-SY5Y 细胞以每孔 2×10^4 个的密度接种至 96 孔板中,OGD 4 h 后加入终浓度分别为 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/L 的 DGMI 和 JND 一起复氧培养 1 h 后,采用 Cytotoxicity Detection Kit^{plus} 试剂盒,按说明书加入催化剂和染料每孔 100 μL,室温孵育 15 min,加终止液每孔 50 μL,室温振荡孵育 10 s,于 490 nm 处测定各组吸收度 A_{490} 。

2.3 caspase-3/7 活性的测定

将 SH-SY5Y 细胞以每孔 2×10^4 个的密度接种至 96 孔底部不透明白板中,OGD 4 h 后分别加入终浓度为 25 mg/L 的药物,复氧 1 h 后应用 caspase-Glo3/7 试剂盒,参考说明书每孔加入酶作用底物 100 μL,室温孵育 30 min 后,用微孔板检测系统 Flex Station 3 读取各组发光强度。

2.4 细胞质中核小体含量的测定

将 SH-SY5Y 细胞以每孔 2×10^4 个的密度接种至 96 孔板中,OGD 4 h 后分别加入终浓度为 25 mg/L 的药物,复氧 1 h 后应用 Cell Death Detection ELISA 试剂盒,参考说明书,将各组细胞室温裂解 30 min 后,1 058 r/min 离心 10 min,取上清液与生物素标记的抗组蛋白抗体和 HRP 标记的抗

DNA 抗体混合后加入到包被有链霉亲和素的酶标板中,室温振荡孵育 2 h,洗涤酶标板,加入显色底物后用微孔板检测系统测定 405 nm 处各孔的吸收度,计算各组细胞胞质中核小体的含量,浓缩因子(enrichment factor) = $(A_{405, \text{drug}} - A_{405, \text{blank}}) / (A_{405, \text{control}} - A_{405, \text{blank}})$ 。

2.5 细胞质中游离钙离子浓度的测定

将 SH-SY5Y 细胞以每孔 2×10^4 个的密度接种至 96 孔底部透明的黑板中,OGD 1 h 后分别加入终浓度为 25 mg/L 的药物,一起复氧培养 1 h,各孔加入工作浓度为 $4 \mu\text{mol/L}$ 的 Fluo-3 AM 荧光探针,37 °C 孵育 30 min,弃细胞上清液,加入不含钙离子的平衡盐溶液(HBSS)重复洗涤 3 次细胞板,然后加入 HBSS-BSA 溶液每孔 100 μL ,37 °C 孵育 20 min,应用微孔板检测系统测定激发波长 485 nm、发射波长 525 nm 处各孔的荧光强度,检测后向各孔加入含 1% Triton X-100 的 BSS-BSA 溶液 25 μL ,振荡孵育 10 min,读取相同激发和发射波长处各孔 F_{max} ,最后向各孔加入 500 mmol/L EGTA 25 μL ,在相同波长处读取各孔 F_{min} ,计算各孔细胞内游离钙离子浓度(nmol/L) = $K_d \times (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$, $K_d = 390 \text{ nmol/L}$ 。

2.6 Western blot 检测蛋白质水平

将 SH-SY5Y 细胞以每孔 1×10^6 个的密度接种于 6 孔板中,收集各组细胞,加入蛋白裂解液提取总蛋白,应用 BCA 法测定样品蛋白浓度。经 SDS-PAGE 电泳后,电转蛋白至 PVDF 膜,封闭,分别加入相应稀释倍数的兔抗人的一抗,4 °C 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:3 000)溶液室温孵育 2 h 后洗涤膜,ECL 法显影,应用 ChemiDoc XRS 系统拍照,采用 Gel-Pro analyzer 4 图像分析软件进行显影条带灰度分析。

2.7 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学处理,One-way ANOVA 分析比较各组均数之间的差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 DGMI 显著抑制 OGD/R 损伤细胞 LDH 的漏出量

本研究测定了不同浓度 DGMI 和 JND 对

OGD/R 损伤 SH-SY5Y 细胞 LDH 漏出量的抑制作用,结果显示,DGMI 可显著抑制 OGD/R 损伤细胞 LDH 的漏出量(图 1),且呈浓度依赖性,同时确定最佳给药浓度为 25 mg/L。

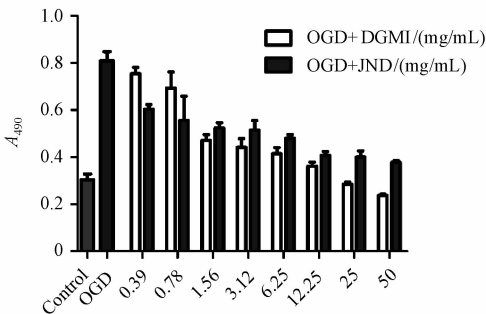


Figure 1 Effects of diterpene ginkgolides meglumine injection (DGMI) on inhibition of the release of lactic dehydrogenase (LDH) of SH-SY5Y cells damaged by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.2 DGMI 抑制 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞的凋亡

本研究应用试剂盒检测了 DGMI 对 OGD/R 诱导的神经细胞凋亡执行蛋白 caspase-3/7 的酶活力和细胞核中染色质片段化形成 histone-DNA 复合小体释放入细胞质的含量。实验结果显示,与对照组相比,SH-SY5Y 细胞 OGD/R 损伤后 caspase-3/7 酶活力和细胞质中核小体含量极显著升高(图 2),DGMI 可极显著性降低 caspase-3/7 酶活力和显著性减少细胞质中复合小体的含量,抑制 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞的凋亡。

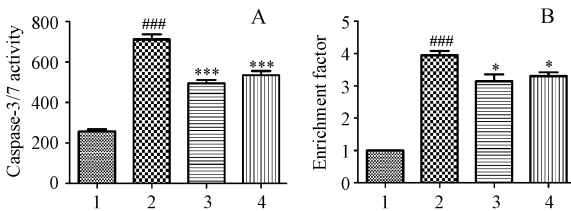


Figure 2 Effects of DGMI on inhibition of apoptosis of SH-SY5Y cells induced by OGD/R ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

1: Control; 2: OGD/R; 3: OGD + DGMI; 4: OGD + JND; A: Effects of DGMI on caspase-3/7 activities of the SH-SY5Y cells induced by OGD/R; B: Effects of DGMI on the levels of cytoplasmic histone-associated-DNA-fragments of the SH-SY5Y cells induced by OGD/R

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs OGD/R group

3.3 DGMI 抑制 OGD/R 损伤细胞钙离子超载

细胞内钙离子作为第二信使可激活 calpain 通路诱导细胞凋亡,本研究应用 Fluo-3 AM 荧光探针

检测了 DGMI 对细胞浆游离钙离子浓度的影响。试验结果显示,与对照组相比,OGD/R 可极显著升高细胞中钙离子浓度(图 3),DGMI 可极显著抑制细胞内钙离子超载发挥细胞保护作用。

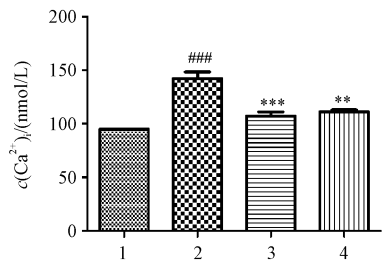


Figure 3 Effects of DGMI on inhibition of the concentration of $[Ca^{2+}]_i$ of SH-SY5Y cells damaged by OGD/R ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
1: Control; 2: OGD/R; 3: OGD + DGMI; 4: OGD + JND; ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ vs OGD/R group

3.4 DGMI 抑制 OGD/R 损伤细胞 calpain 通路

calpain 通路是脑缺血神经细胞凋亡损伤的信号传导通路之一,本研究应用 Western blot 检测了 DGMI 对此信号通路的影响。试验结果显示:与对照组相比,OGD/R 上调 calpain 和 cleaved caspase-12 蛋白诱导细胞凋亡(图 4-A, B, C),DGMI 可极显著下调 calpain 和 cleaved caspase-12 蛋白量抑制 calpain 信号通路。

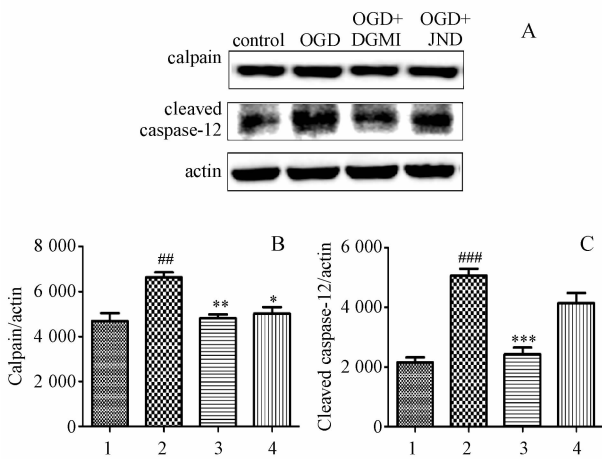


Figure 4 Protein levels of the OGD/R-induced SH-SY5Y cells treated with DGMI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
1: Control; 2: OGD/R; 3: OGD + DGMI; 4: OGD + JND; A: Protein levels of calpain, cleaved caspase-12 tested by Western blot; B-C: Protein levels quantified by band gray-value ratio to actin; B: Calpain; C: Cleaved caspase-12
$P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs OGD/R group

4 讨论

SH-SY5Y 细胞的 OGD 模型是模拟缺血性脑卒中的经典模型,已成为离体水平研究脑缺血损伤机制及药物作用的重要手段。SH-SY5Y 细胞 OGD/R 损伤后,细胞 LDH 漏出量及细胞凋亡水平显著增加。DGMI 可极显著抑制 OGD/R 损伤细胞 LDH 的漏出量,抑制凋亡执行蛋白 caspase-3/7 的酶活力,减少细胞凋亡产生的核小体损伤,显著性降低 OGD/R 神经细胞凋亡,且 DGMI 保护作用优于 JND,这可能与银杏二萜内酯含量高于 JND 有关。

脑缺血神经细胞内钙离子超载是诱发缺血半暗带区细胞凋亡和缺血核心区细胞坏死共同的信号通路^[2]。氧糖剥夺神经细胞生物能量代谢不足,ATP 合成减少或中断导致细胞膜 ATP 依赖性离子通道(如 Na^+/K^+-ATP 泵)功能障碍, Na^+ 内流, K^+ 外流^[6-7],细胞离子稳态失调引起细胞膜广泛缺氧去极化^[8],膜去极化触发突触前神经元电压门控钙离子通道开放,大量钙离子内流,钙离子浓度升高诱导突触前神经元释放大量的谷氨酸(兴奋性神经递质)进入突触间隙,过量的谷氨酸激活神经细胞膜 AMPA、NMDA 等化学门控钙离子通道开放, Na^+ 、 Ca^{2+} 继续内流,超载的钙离子可触发细胞多种损伤机制诱导神经元坏死和凋亡^[9-10]。半胱氨酸蛋白酶 calpain 是 Ca^{2+} 激活的一种重要蛋白酶,以酶原形式存在,可广泛参与细胞凋亡的各途径^[2]。活化的 calpain 可直接或间接损伤细胞内质网和线粒体膜结构蛋白,导致细胞内钙库释放钙离子,细胞钙离子浓度进一步升高,诱导进一步的细胞损伤^[1],同时 calpain 在 N-末端 T132 和 K158 位点剪切位于内质网内膜上 pro-caspase-12 蛋白^[11],caspase-12 由酶原形式转化为活化状态,活化的 caspase-12 可激活 caspase-3 等凋亡执行蛋白启动细胞凋亡程序。

本研究通过 Fluo-3 AM 荧光探针检测细胞内游离钙离子浓度和 Western blot 测定蛋白含量变化结果显示,DGMI 可极显著性降低细胞内游离钙离子浓度,下调 calpain 和 cleaved caspase-12 蛋白量,抑制细胞凋亡的 Ca^{2+} /calpain/caspase-12/caspase-3 通路。DGMI 通过 calpain 通路抑制细胞凋亡,促进脑缺血条件下神经细胞的存活,是其在脑缺血治疗过程中发挥重要作用的重要机制之一。

参 考 文 献

- [1] Fann DY, Lee SY, Manzanero S, *et al.* Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes[J]. *Ageing Res Rev*, 2013, **12**(4):941–966.
- [2] Nakka VP, Gusain A, Mehta SL, *et al.* Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia; multiple neuroprotective opportunities[J]. *Mol Neurobiol*, 2008, **37**(1):7–38.
- [3] Wang X, Jiang CM, Wan HY, *et al.* Neuroprotection against permanent focal cerebral ischemia by ginkgolides A and B is associated with obstruction of the mitochondrial apoptotic pathway via inhibition of c-Jun N-terminal kinase in rats[J]. *J Neurosci Res*, 2014, **92**(2):232–242.
- [4] Gu JH, Ge JB, Li M, *et al.* Inhibition of NF-kappaB activation is associated with anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of Ginkgolide B in a mouse model of cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, **47**(4):652–660.
- [5] Ma S, Yin H, Chen L, *et al.* Neuroprotective effect of ginkgolide K against acute ischemic stroke on middle cerebral ischemia occlusion in rats[J]. *J Nat Med*, 2012, **66**(1):25–31.
- [6] Mongin AA. Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia; the perfect storm[J]. *Pathophysiology*, 2007, **14**(3/4):183–193.
- [7] Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia; a cellular perspective[J]. *Neuropharmacology*, 2008, **55**(3):289–309.
- [8] White SH, Brisson CD, Andrew RD. Examining protection from anoxic depolarization by the drugs dibucaine and carbapentane using whole cell recording from CA1 neurons[J]. *J Neurophysiol*, 2012, **107**(8):2083–2095.
- [9] Li XM, Yang JM, Hu DH, *et al.* Contribution of downregulation of L-type calcium currents to delayed neuronal death in rat hippocampus after global cerebral ischemia and reperfusion[J]. *J Neurosci*, 2007, **27**(19):5249–5259.
- [10] Suzuki Y, Yamazaki Y, Hozumi Y, *et al.* NMDA receptor-mediated Ca^{2+} influx triggers nucleocytoplasmic translocation of diacylglycerol kinase ζ under oxygen-glucose deprivation conditions, an *in vitro* model of ischemia, in rat hippocampal slices[J]. *Histochem Cell Biol*, 2012, **137**(4):499–511.
- [11] Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis[J]. *J Cell Biol*, 2000, **150**(4):887–894.