

克拉霉素对糖氧剥离大鼠皮质神经细胞的保护作用及其抑制凋亡的机制研究

顾爱明¹, 郭如雅², 翟昌林² (1.嘉兴市妇幼保健院, 浙江 嘉兴 314000; 2.嘉兴市第一医院, 浙江 嘉兴 314000)

摘要: 目的 研究克拉霉素对大鼠皮质神经细胞糖氧剥离(oxygen glucose deprivation, OGD)后的保护作用及其与抑制凋亡相关的作用机制。方法 消化法提取原代大鼠皮质神经细胞, 建立皮质神经细胞 OGD 模型, OGD 前予以克拉霉素(clarithromycin, CAM)预处理; 通过存活/凋亡检测试剂盒于荧光显微镜下观察各组细胞凋亡情况; 试剂盒测定各组培养基 LDH 含量定量评估细胞凋亡情况; 蛋白免疫印迹法测定各组细胞 caspase-3, Bax, Bcl-2 的表达情况。结果 OGD 处理后皮质神经细胞凋亡及乳酸释放含量较正常组明显增加($P<0.01$), 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 预处理可显著减少 OGD 造成的细胞凋亡及 LDH 释放($P<0.01$); OGD 处理后皮质神经细胞 caspase-3, Bax/Bcl-2 表达显著升高($P<0.01$), 而 CAM 预处理有效降低了 caspase-3, Bax/Bcl-2 表达。结论 克拉霉素对糖氧剥离大鼠皮质神经细胞具有保护作用, 其作用可能与抑制了凋亡相关通路有关。

关键词: 克拉霉素; caspase-3; Bax; Bcl-2; 糖氧剥离; 皮质神经细胞

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)07-0973-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.07.009

引用本文: 顾爱明, 郭如雅, 翟昌林. 克拉霉素对糖氧剥离大鼠皮质神经细胞的保护作用及其抑制凋亡的机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(7): 973-977.

Study on the Protective Effect of Clarithromycin on Cortical Neurons Deprived of Oxygen and Glucose in Rats and Its Mechanism of Inhibition of Apoptosis

GU Aiming¹, GUO Ruya², ZHAI Changlin² (1.Jiaxing Maternity and Child Health Care Hospital, Jiaxing 314000, China; 2.Jiaxing First Hospital, Jiaxing 314000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To research the protective effect of clarithromycin(CAM) on cortical neurons deprived of oxygen and glucose in rats and its related apoptosis mechanisms. **METHODS** Extraction of primary rat cortical neurons, to establish the oxygen glucose deprivation (OGD) model with CAM pretreatment; the survival/apoptosis detection kit was used to detect the cell apoptosis; LDH kit was used to measure the content of LDH in the medium of each group to evaluate the apoptosis. The expression of caspase-3, Bax and Bcl-2 in each group were detected by Western blot. **RESULTS** After treatment with OGD, compared with the control group, the apoptosis of cortical neurons and the content of lactic acid were significantly increased, the difference was significant ($P<0.01$); With 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM pretreatment the apoptosis and LDH release induced by OGD was significantly reduced ($P<0.01$). After treatment with OGD, the expression of caspase-3 and Bax/Bcl-2 in cortical neurons was significantly higher than that in control group ($P<0.01$), while CAM pretreatment effectively reduced the expression of caspase-3 and Bax/Bcl-2. **CONCLUSION** CAM has protective effect on cortical neurons deprived of oxygen and glucose, which may be related to the promotion of caspase-3, upregulation of Bax, downregulation of Bcl-2 protein on apoptosis related pathways.

KEY WORDS: clarithromycin; caspase-3; Bax; Bcl-2; oxygen glucose deprivation; cortical neuron

在过去的几十年里, 研究人员已经开发了多种具有神经保护作用的化合物, 如谷氨酸拮抗剂、钙通道阻滞剂、抗炎/抗氧化剂、GABA 激动剂和生长因子等。遗憾的是, 临床上缺乏有明确保护作用的神经保护剂于急性缺血性脑卒中后使用^[1]。大环内酯类抗菌药物在减轻缺血再灌注损伤中的保护作用及糖氧剥离(oxygen

glucose deprivation, OGD)后增加神经元细胞活性的研究早有报道^[2], 既往研究大环内酯类抗菌药物的脑缺血再灌注保护作用主要为调节免疫应答从而抑制了炎症对皮质神经元的破坏^[3-6], 本研究通过凋亡相关通路诠释了红霉素衍生物克拉霉素对 OGD 后的大鼠皮质神经细胞的保护作用。

作者简介: 顾爱明, 男, 硕士, 副主任医师

Tel: (0573)82823055

E-mail: 709469028@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料与动物

克拉霉素(clarithromycin, CAM)原料药(湖北新银禾化工有限公司, 纯度为 99%, CAS 编号: 81103-11-9); 一抗兔抗 caspase-3(批号: 8202S), Bax(批号: 5023S)、Bcl-2(批号: 15071S)、 β -actin(批号: 12620S)、二抗 HRP 标记的抗兔均购自 CST; DMEM/F12 培养基(Gibco, 货号: 11330057); LDH 试剂盒(南京建成生物工程研究所, 货号: A020-2); 存活/凋亡试剂盒(美国 Molecular Probes 公司, 货号: A10788)。

成年 SD 大鼠共 40 只, 体质量 230~260 g, 购自浙江大学动物实验中心, 动物合格证号为: 11400700159023, 使用许可证号为: SYXK(浙)2012-0001, 饲养于 SPF 动物房内, 雌雄比例 3:1 交配, 选取出生后 17 d 龄的仔鼠, 通过无菌操作取大鼠皮质原代神经细胞并进行培养。

1.2 原代大鼠皮质神经细胞的提取及培养

取 17 d 龄的 SD 大鼠, 麻醉后酒精消毒, 处死取脑, 于超净台中移除嗅球、海马结构、基底神经节, 通过显微剪剪碎皮质, 于皮质中添加 0.25%胰蛋白酶/EDTA 并吹打 1 min, 于 37 °C 培养箱中孵育 30 min, 加入 10%胎牛血清(FBS)停止消化, 将混悬液以 $80\times g$ 的转速离心 5 min, 弃上清液, 将细胞沉淀再悬浮于含 10%FBS 培养基的离心管中, 滴管吹打 10~15 次将细胞吹散均匀, 将细胞培养于含 DMEM/F12 培养基中, 将细胞转移至含聚赖氨酸/小鼠层黏连蛋白 6 孔板中, 每孔 3.2×10^6 细胞, 待细胞贴壁后更换培养基, 培养基配置为: 含 DMEM/F12 培养基中添加 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺、 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素, 每 3 d 更换 1 次。细胞培养于 37 °C 培养箱, 添加 5%的 CO_2 , 从细胞培养第 10 天开始进行后续实验。

1.3 细胞 LDH 活性测定

对细胞进行分组, 分别为对照组, 对照+ $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 组, 对照+ $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 组, 对照+ $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 组, OGD 组, OGD+ $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 组, OGD+ $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 组, OGD+ $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 组。各组弃去原培养基, 分别更换为不含糖及血清的 DMEM/F12 培养基, 分别于厌氧培养室(含 95% N_2 , 5% CO_2)中预处理 15 min, 预处理后于超净工作台中对照组各组更换

正常培养基, OGD 各组分别更换为不含糖及血清的 DMEM/F12 培养基, 各组分别添加不同浓度的 CAM, 对照组各组继续培养于正常培养箱, OGD 各组于正常培养箱中培养 30 min 后转移至厌氧培养箱中 37 °C 培养 3 h, OGD 结束后 OGD 各组更换为正常培养基, 重新于正常培养箱中培养 24 h, 培养结束后, 收集各组细胞培养基上清液, 采用 LDH 试剂盒测定各组细胞上清液的 LDH 活性, 同时胰酶消化, PBS 清洗后收集各组培养的细胞, 保存于-80 °C, 解冻后试剂盒测定细胞内 LDH 含量, LDH 活性百分比为细胞外 LDH 含量与细胞内 LDH 含量的比值。

1.4 细胞存活/凋亡测定实验

对 6 孔板细胞进行分组, 分别为对照组、OGD 组、OGD+ $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 组。同前, 对各组分别进行正常培养或糖氧剥离 3 h, 或于 OGD 前预先添加 CAM 等处理。待 OGD 后正常培养 24 h, 通过细胞存活/凋亡试剂盒测定各组细胞存活、凋亡情况, 根据试剂盒说明, 于各培养皿中添加 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 钙黄绿素和 $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溴化乙锭同型二聚体(EthD-1), 于 37 °C 避光孵育 30~45 min。通过荧光显微镜观察细胞存活及凋亡情况, 钙黄绿素将存活细胞内广泛存在的酯酶活性转化成绿色荧光, 因此绿色荧光代表存活细胞。而 EthD-1 将凋亡细胞染为红色荧光。荧光图像放大倍率为 200 倍。

1.5 Western blot 测定细胞 caspase-3、Bax、Bcl-2 表达

对 6 孔板细胞进行分组, 分别为对照组, OGD 组, OGD+ $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 组, 进行对应处理后正常培养 24 h, 弃去培养基, PBS 润洗 2 次, 于冰上添加 RIPA 裂解提取各组细胞蛋白, 通过 BCA 法测定蛋白浓度, 调节各组蛋白浓度相同后加上样缓冲液变性, 制胶, 每组 $20\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白加样电泳, 100 V 电压转膜 2 h, 根据标记蛋白进行剪膜, 室温下 20%牛奶封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次, 各 PVDF 膜条分别孵育对应 1 抗: caspase-3(1:1 000), Bax(1:1 000), Bcl-2(1:1 000), β -actin(1:1 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 对应二抗室温下孵育 1 h, 洗膜后加显影液化学显影, Quantity one 软件分析。

1.6 统计学方法

所有实验重复 3 次, 采用 SPSS 18.0 统计学软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 并进行正态

性及方差齐性检验, 组间比较采用 *t* 检验或方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 认为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 糖氧剥离恢复 24 h 后细胞 LDH 的表达

和对照组相比, OGD 组 LDH 的释放显著增加 ($P < 0.01$), 经 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CAM 预处理后 LDH 的释放较 OGD+ $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 组显著降低 ($P < 0.01$), $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CAM 预处理则无明显作用。

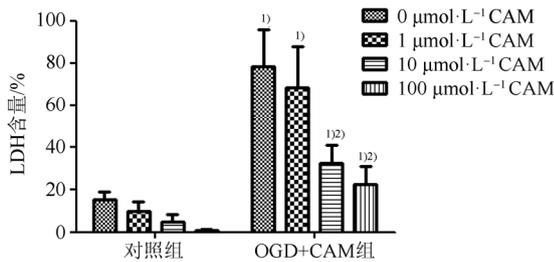


图 1 OGD 及 CAM 预处理对皮质神经细胞 LDH 释放的影响

与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 OGD+ $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 组相比, ²⁾ $P < 0.01$ 。
Fig. 1 Effect of OGD and CAM pretreatment on extracellular LDH content in cortex of each group Compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with OGD+ $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM group, ²⁾ $P < 0.01$.

2.2 缺氧复氧及克拉霉素处理后细胞活力值表达分析

通路存活凋亡试剂盒可以直观发现糖氧剥离恢复 24 h 后, OGD 组凋亡细胞较对照组明显增多, 存活细胞明显减少, 而 OGD+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 则显著减少了 OGD 所造成的细胞凋亡及坏死数量,

说明 CAM 在糖氧剥离中对细胞坏死凋亡起到了保护作用, 见图 2。

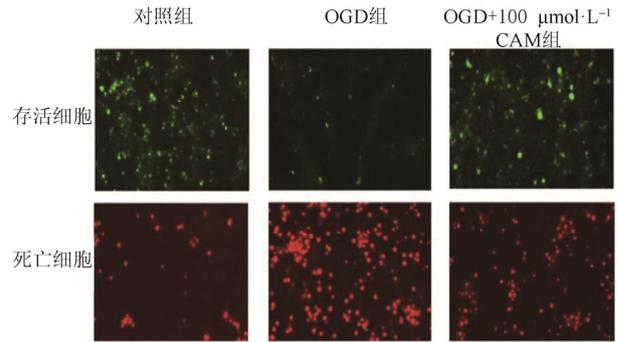


图 2 OGD 及 CAM 预处理后细胞存活及凋亡染色荧光分析
Fig. 2 Fluorescence analysis of cell survival and apoptosis after OGD and CAM pretreatment

2.3 缺氧复氧及克拉霉素处理对 caspase-3、Bax、Bcl-2 表达影响

通过 Western blot 测定, OGD 组相较于对照组, caspase-3 的相对表达量显著上升 ($P < 0.01$); 而 OGD+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 组与 OGD 组相比则显著减小了 caspase-3 的相对表达 ($P < 0.05$)。说明了 OGD 加重了皮质神经细胞的坏死凋亡, 引起了 caspase-3 的表达增加, 而应用 CAM 预处理可明显减少 caspase-3 的相对表达。

同时 OGD 组相较于对照组 Bax/Bcl-2 的比值明显上升 ($P < 0.01$); 而 OGD+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAM 组与 OGD 组相比则显著减小了 Bax/Bcl-2 的比值 ($P < 0.01$)。糖氧剥离加重了 Bax 的表达, 减小了 Bcl-2 的表达, CAM 预处理有效抑制了糖氧剥离所造成的 Bax 增高与 Bcl-2 降低。

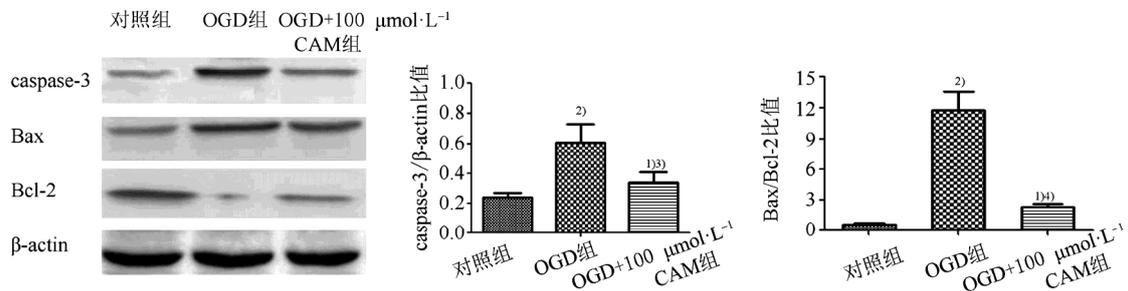


图 3 OGD 及 CAM 预处理对 caspase-3、Bax、Bcl-2 表达的影响

与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 OGD 组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 3 Effects of OGD and CAM pretreatment on the expression of caspase-3, Bax and Bcl-2 Compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with OGD group, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$.

3 讨论

通过提取原代大鼠皮质神经细胞,并通过更换无胎牛血清无糖培养基,于厌氧室处理建立细胞糖氧剥离损伤模型,可有效地模拟缺血性脑卒中神经元损伤过程,目前已广泛应用于缺血性脑卒中的分子生物学探索^[7]。本研究中,未予进行 OGD 造模的正常原代皮质神经细胞生长活跃,细胞体饱满,透光明显且轴突与树突边界清晰,细胞间呈交织状;当进行 OGD 处理后,培养皿中漂浮凋亡坏死细胞较前明显增多,细胞体固缩明显,贴壁不牢,胞体及突起拉长,骨架蛋白毁损严重,继续正常环境中培养 24 h 后,细胞转复改善并不明显。本研究于 OGD 前,给予 OGD+CAM 组预先使用 CAM 处理,相较于 OGD 组,CAM 预处理明显减少了由 OGD 所带来的皮质神经细胞的坏死凋亡,大部分细胞的形态重新恢复饱满,由 LDH 的释放可知,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CAM 即可取得疗效,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CAM 疗效显著且并未造成正常皮质神经元的损伤。

红霉素、CAM 和其他大环内酯类抗菌药物在临床中应用已有较长的历史,引起的不良反应也较少。既往研究的大环内酯类药物的缺血再灌注神经保护作用很少涉及到抗凋亡机制,相关研究显示红霉素预处理可以介导缺血后的转录应答,增加了脑缺血区域及体外培养的神经细胞对缺氧的耐受性^[8-10]。通过体外动物实验和临床研究发现大环内酯类抗菌药物也可以调解炎症机制^[3-4,6,11]。在确定 CAM 对糖氧剥离的皮质神经细胞有保护作用后,本研究主要通过 Western blot 探索了 CAM 对于凋亡通路的影响。

缺血性脑卒中再灌注后会不可避免地造成皮质神经细胞的损伤,在该病理生理过程中,凋亡与坏死是最主要的两大机制。神经元凋亡是一个可逆的、细胞自身程序性的过程,多种基因参与了凋亡的调控,Bcl-2 家族基因所表达的蛋白在这过程中发挥了显著的功能^[12-13]。然而 Bcl-2 家族基因表达了 2 类不同功能的蛋白质,其中 Bcl-w、Bcl-xl、Bcl-2 蛋白是抑制凋亡进程的,而 Bid、Bak、Bax 蛋白则是加快凋亡进程的,本研究所涉及的 Bcl-2、Bax 蛋白是 Bcl-2 家族中调节凋亡进程功能最明显的蛋白^[12]。缺血性脑卒中过程中,Bax 依附至线粒体膜,线粒体膜通透性增高导致细胞质中细胞色素 C 含量上升,内源性凋亡途径由此激

活^[14]。同时 Bcl-2 的含量减少导致线粒体膜的稳定性下降,内质网释放 Ca^{2+} 增多^[15],氧化自由基及脂类过氧化物生成增多进一步加重了凋亡进程^[16-17]。本研究中,通过 western blot 发现并验证 OGD 导致了皮质神经细胞的 Bax 表达上升,Bcl-2 表达下降,而经过 CAM 预处理后再进行 OGD 则重新大幅度地抑制了 Bax 表达上升与 Bcl-2 的表达下降。

此外,本研究探索了 CAM 在皮质神经细胞 OGD 过程中与另一个凋亡相关蛋白 caspase-3 之间的联系。caspase-3 作为凋亡执行蛋白酶,参与了 caspases 级联反应下行的重要过程,在凋亡程序中发挥后枢纽的功能^[18]。caspase-3 的激活也是受到 Bcl-2 家族基因所表达的蛋白调控的,缺血性脑卒中后 Bax 的上调及 Bcl-2 的下调均促进了 caspase-3 的活化。本研究也证实了 OGD 组 caspase-3 的表达较对照组明显升高,而经过 CAM 预处理后,caspase-3 的表达上升得到了很好地抑制。

综上所述,大鼠皮质神经细胞 OGD 后的凋亡很可能是 Bax、Bcl-2、caspase-3 凋亡通路所介导的。CAM 在 OGD 过程中可能抑制了 Bax、caspase-3 等促凋亡蛋白的表达及下调了抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达从而发挥保护皮质神经细胞的作用。本研究从凋亡方面探讨了 CAM 对 OGD 后皮质神经细胞的作用,为临床治疗提供了新的思路与依据。

REFERENCES

- [1] MINNERUP J, SUTHERLAND B A, BUCHAN A M, et al. Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(9): 11753-11772.
- [2] KATAYAMA Y, INABA T, NITO C, et al. Neuroprotective effects of erythromycin on cerebral ischemia reperfusion-injury and cell viability after oxygen-glucose deprivation in cultured neuronal cells [J]. *Brain Res*, 2014(1588): 159-167.
- [3] AZUMA A, FURUTA T, ENOMOTO T, et al. Preventive effect of erythromycin on experimental bleomycin-induced acute lung injury in rats [J]. *Thorax*, 1998, 53(3): 186-189.
- [4] LABRO M T, ABDELGHAFAR H. Immunomodulation by macrolide antibiotics [J]. *J Chemother*, 2001, 13(1): 3-8.
- [5] LI Y J, AZUMA A, TAKAHASHI S, et al. Fourteen-membered ring macrolides inhibit vascular cell adhesion molecule 1 messenger RNA induction and leukocyte migration: role in preventing lung injury and fibrosis in bleomycin-challenged mice [J]. *Chest*, 2002, 122(6): 2137-2145.
- [6] MORIKAWA K, ZHANG J, NONAKA M, et al. Modulatory effect of macrolide antibiotics on the Th1-and Th2-type cytokine production [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2002, 19(1): 53-59.
- [7] COBLE M D, HILL C R, BUTLER J M. Haplotype data for 23 Y-chromosome markers in four US population groups [J].

- Forensic Sci Int Genet, 2013, 7(3): e66-e68.
- [8] BRAMBRINK A M, KOERNER I P, DIEHL K, et al. The antibiotic erythromycin induces tolerance against transient global cerebral ischemia in rats (pharmacologic preconditioning) [J]. *Anesthesiology*, 2006, 104(6): 1208-1215.
- [9] HUBER R, KASISCHKE K, LUDOLPH A C, et al. Increase of cellular hypoxic tolerance by erythromycin and other antibiotics [J]. *Neuroreport*, 1999, 10(7): 1543-1546.
- [10] KOERNER I P, GATTING M, NOPPENS R, et al. Induction of cerebral ischemic tolerance by erythromycin preconditioning reprograms the transcriptional response to ischemia and suppresses inflammation [J]. *Anesthesiology*, 2007, 106(3): 538-547.
- [11] KUDOH S, AZUMA A, YAMAMOTO M, et al. Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157(6 Pt 1): 1829-1832.
- [12] LIU D, LU C, WAN R, et al. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(4): 431-443.
- [13] ZHONG F F, WU C L, SUN X F, et al. Effects of Buyang Huanwu decoction combined with edaravone on the apoptosis of neuron and expression of Bcl-2 and Bax following cerebral ischemia-reperfusion in mice [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2016, 33(11): 1392-1396.
- [14] CROMPTON M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12(4): 414-419.
- [15] MATHAI J P, GERMAIN M, SHORE G C. BH3-only BIK regulates BAX, BAK-dependent release of Ca^{2+} from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(25): 23829-23836.
- [16] RANJAN P, BOSS J M. C/EBPbeta regulates TNF induced MnSOD expression and protection against apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(10): 1837-1849.
- [17] MÉTRAILLER-RUCHONNET I, PAGANO A, CARNESECCHI S, et al. Bcl-2 protects against hyperoxia-induced apoptosis through inhibition of the mitochondria-dependent pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42(7): 1062-1074.
- [18] CHENG C Y, SU S Y, TANG N Y, et al. Ferulic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis by enhancing GABAB1 receptor expression in transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(8): 889-899.

收稿日期: 2017-02-07
(本文责编: 李艳芳)