复方丹参有效组分及其组合物对 MIF 诱导人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞凋亡的作用

梁承杰[1]，曾水云[1]，魏　婷[1]，陈　晨[1]，杨　洁[1, 2]

（1. 南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室，南京　210046;
2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所蛋白质组学国家重点实验室，北京　100850）

摘要：为探究复方丹参（Fufang Danshen，FFDS）有效成分及其组合物对巨噬细胞移动抑制因子（macrophage migration inhibitory factor，MIF）诱导人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞凋亡的作用机制，采用噻唑蓝（MTT）法检测细胞生长情况；利用流式细胞仪技术检测细胞凋亡；通过 Western blotting 法检测目标蛋白的表达。研究结果表明，MIF 表现出与 $A\beta_{1-42}$ 相似的神经毒性，能够促进 SH-SY5Y 细胞的凋亡。MIF 可通过诱导 SH-SY5Y 细胞中 Bad 的表达量增加来引起细胞凋亡。而复方丹参组合物、丹参酮 IIA（tanshinone IIA，Tan IIA）和三七皂苷 R1（notoginsenoside R1，NG-R1）能够显著抑制 MIF 诱导的细胞凋亡，并能明显减少 Bad 的表达量。进而推测，复方丹参组合物可能通过下调 Bad 的表达而发挥神经保护作用。

关键词：中药学；巨噬细胞移动抑制因子（MIF）；复方丹参有效组分组合物；细胞凋亡；促凋亡蛋白 Bad；人神经母细胞瘤细胞

中图分类号：R91　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1674-2850(2018)05-0505-11

Role of the effective components of Fufang Danshen and their composition in MIF-induced apoptosis in human neuroblastoma cells SH-SY5Y

LIANG Chengjie[1], ZENG Shuiyun[1], WEI Ting[1], CHEN Chen[1], YANG Jie[1, 2]

(1. *State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology*, *School of Life Sciences*, *Nanjing University*, *Nanjing*　210046, *China*;
2. *State Key Laboratory of Protemics*, *Beijing Institute of Radiation*, *Academy of Military Medical Sciences*, *Beijing*　100850, *China*)

Abstract: The objective of this study are explored the mechanism of effective components of Fufang Danshen (FFDS or Danshen compound) and their composition (FFDS's composition) on macrophage migration inhibitory factor (MIF)-induced apoptosis in human neuroblastoma cells SH-SY5Y. Here, cell growth, apoptosis and target protein expression are detected by MTT assay, flow cytometry and Western blotting, respectively. The results show as follows: MIF presents neurotoxicity similar to $A\beta_{1-42}$ and can promote apoptosis of SH-SY5Y cells. MIF can induce the high expression of Bad in SH-SY5Y cells and then trigger apoptosis. FFDS's composition, tanshinone IIA (Tan IIA) and notoginsenoside R1 (NG-R1) can obviously inhibit apoptosis and reduce the expression of Bad in MIF-induced SH-SY5Y cells. Therefore, we speculate that FFDS's composition might play a role in the protection of nerve through

基金项目：高等学校博士学科点专项科研基金（20120091110038）；蛋白质组学国家重点实验室开放课题（SKLP-O201415）；医药生物技术国家重点实验室开放课题（KF-GN-201405）

作者简介：梁承杰（1991—），男，硕士研究生，主要研究方向：中药网络药理学

通信联系人：杨洁，教授，主要研究方向：中药网络药理学. E-mail: yangjie@nju.edu.cn

down-regulating the expression of Bad in neurodegenerative diseases.

Key words: science of Chinese pharmacology; macrophage migration inhibitory factor (MIF); composition of effective components of Fufang Danshen; apoptosis; proapoptotic protein Bad; human neuroblastoma cell

0　引言

炎症过程可能有助于阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）的脑病理改变，并加速疾病进程[1]。同时，β-淀粉样蛋白（beta-amyloid，Aβ）的积累能够活化免疫调节细胞，如神经胶质细胞，释放各种细胞因子，包括干扰素（interferon，IFN）、白细胞介素（interleukin，IL）和巨噬细胞炎性蛋白（macrophage inflammatory protein，MIP）。细胞因子的过度分泌将导致神经元损伤[2]。MIF 是一种促炎性细胞因子，能促进多种炎症介质[如肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor α，TNF-α）、IL-6 和 IFN-γ]的产生，在炎症和自身免疫性疾病的发病过程中起着重要的调节作用。MIF 是主要由非神经组织产生的一种多效性细胞因子，参与神经细胞功能的调节。本课题组前期的研究结果表明，脊髓 MIF 通过 MAPK 信号转导通路，上调脊髓 2-*N*-甲基-D-天冬氨酸（2-*N*-methyl-D-aspartic acid，NMDA）受体亚基 NR2B 的表达，在福尔马林诱导的炎症性疼痛的发病过程中起关键作用[3]。此外，荧光共定位分析显示，甲醛给药后小鼠脑部小胶质细胞是脊髓 MIF 的主要来源。本课题组之前的研究已经证实，脊髓 MIF 参与了坐骨神经慢性压迫性神经损伤引起的神经性疼痛的发病机制[4]。MIF 与其受体 CD74 之间的相互作用可以激活细胞外信号调节激酶（ERK）1/2 信号的转导，随后上调 IL-8 和 NMDA 受体的表达，增加前列腺素 E2 的产生。另一方面，据报道，MIF 在 AD 患者脑组织中的浓度高于正常人，并且在老年斑附近显示出较高水平，这意味着 MIF 在 AD 发病机制中具有一定的生理作用[5]。

复方丹参作为心血管疾病的一个潜在有益的中草药，由三种中药组成：丹参（Danshen，*Salviae miltiorrhizae radix et rhizome*）、三七（Sanqi，*Notoginseng radix et rhizome*）和天然冰片（或右旋龙脑，*Borneolum*，D-borneol/(+)-borneol）[6]。近年来，大量研究已经揭示，复方丹参在改善神经系统功能和脑代谢方面起着重要作用，这表明复方丹参可能具有新的药用价值[7]。细胞凋亡与人类许多疾病的发生密切相关，如癌症、自身免疫病、艾滋病和神经退行性疾病（neurodegenerative diseases，NDD），尤其是 AD[8]. Tan IIA（如图 1 所示），作为丹参的主要活性成分，通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路和调节 p53、Ba、Caspase-3、Bcl-2 蛋白的表达，可减轻缺氧/复氧（hypoxia/reoxygenation，H/R）诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞（myocardial microvascular endothelial cells，MMECs）的凋亡。这可能提供了 Tan IIA 对 MMECs 的一种保护机制[9]。通过抑制一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）、基质金属蛋白酶-2（matrix metalloproteinase-2，MMP-2）和核因子 κB（nuclear factor kappa B，NF-κB）的 p65 转录和翻译，Tan IIA 能够降低 AD 的风险[10]。NG-R1 是一种新发现的植物雌激素，其通过增加细胞活力、减少氧化损伤（包括细胞凋亡）、恢复线粒体膜电位以及抑制氧化应激激活的 MAPK 信号转导通路，可以大大抵消 Aβ 的影响[11]。右旋龙脑属于单萜类化合物，能显著增加 Bcl-2 的表达与降低 Bax 的表达，对 Aβ 致 SH-SY5Y 细胞毒性具有保护作用，发挥抗氧化作用和抑制细胞凋亡的作用[12]。右旋龙脑能够改进山奈酚（kaempferol）透过血脑屏障（blood-brain barrier，BBB）[13]，而丹参素冰片酯（salvianic borneol ester，SBE）能够减少 Aβ 低聚物的形成和防止 H_2O_2 诱导的细胞毒性[14]。右旋龙脑有望成为 AD 和其他 Aβ 相关的 NDD 防治药物的候选化合物[12]。

本文将着重探讨 Tan IIA、NG-R1、右旋龙脑以及它们的组合物在人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 的潜在作用机制。

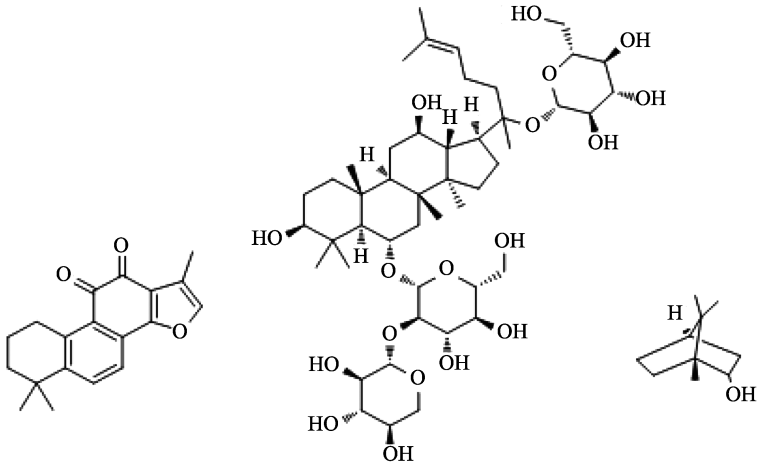


图 1 复方丹参有效组分（Tan IIA、NG-R1 和右旋龙脑）的结构

Fig. 1 Structures of effective components of FFDS (Tan IIA, NG-R1 and D-borneol)

1 材料与方法

1.1 化学品与试剂

实验中涉及的试剂如下：Wisent 公司的 DMEM/F12 培养液、0.25%胰酶、不含 EDTA 的 0.25%胰酶和 PBS，碧云天生物技术有限公司的青霉素、链霉素和细胞裂解液，Sigma 公司的 $A\beta_{1\text{-}42}$ 和蛋白酶抑制剂（protease inhibitor cocktails），Thermo 公司的胎牛血清（fetal bovine serum，FBS），Amresco 公司的二甲基亚砜（DMSO），R&D Systems 公司的 MIF，成都瑞芬思生物技术有限公司的石杉碱甲、Tan IIA、NG-R1 和右旋龙脑。

Biosharp 公司的 MTT 试剂盒，Vazyme 公司的 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒，TaKaRa 公司的 BCA 蛋白定量试剂盒，Tanon 公司的电化学发光（electrochemiluminescence，ECL）显影液，Bio-Rad 公司的聚偏氟乙烯（PVDF）膜，Abcam 有限公司的 Bad 抗体，Cell Signaling Technology（CST）公司的 p-Bad 抗体，Bioworld 公司的 β-actin 和辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）结合兔抗兔 IgG 抗体（HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody），HRP-linked GAPDH 购自康成生物工程有限公司。

1.2 实验仪器设备

流式细胞仪（Accuri C6，BD）；全自动化学发光成像分析系统（5200，Tanon）；二氧化碳细胞培养箱（MCO-15AC，SANYO）；冷冻离心机（5810R，Eppendorf）等。

软件：Image J v4.7 灰度分析软件。

1.3 $A\beta_{1\text{-}42}$ 聚合物的制备

将 0.1 mg $A\beta_{1\text{-}42}$ 干粉溶于 DMSO 中配制浓度为 4 mmol/L 的母液，−20℃储存。取 5 μL 母液加入 35 μL 1×PBS 中稀释成浓度为 500 μmol/L 的溶液，37℃静置 3 d，使其寡聚化。使用时取 8 μL 浓度为 500 μmol/L 的 $A\beta_{1\text{-}42}$ 与 1 mL 细胞培养液混匀，制成 4 μmol/L 寡聚化的 $A\beta_{1\text{-}42}$ 溶液。

1.4 MIF、复方丹参有效组分及其组合物的制备

将 2 μg MIF 溶于 0.2 mL 含有 0.1%（质量/体积）牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）的无菌 1×PBS 中，混匀制成浓度为 10 μg/mL 的母液，−20℃储存。使用时取 5 μL 浓度为 10 μg/mL 的 MIF 溶

液与1 mL培养液混匀制成50 ng/mL的MIF溶液。

精密称取2 mg Tan IIA、10 mg NG-R1和10 mg右旋龙脑，分别加入2 mL 95%乙醇溶解，超声波（250 W，33 kHz）处理30 min，配制成浓度分别为1 mg/mL Tan IIA、5 mg/mL NG-R1和5 mg/mL右旋龙脑的储存液。使用时，取4 μL上述溶液分别与1 mL培养液混匀，制备4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL右旋龙脑的工作液。

分别精密称取2 mg Tan IIA、10 mg NG-R1和10 mg右旋龙脑，混匀，加入2 mL 95%乙醇溶解，超声波处理（250 W，33 kHz）30 min，制备复方丹参组合物储存液（1 mg/mL Tan IIA、5 mg/mL NG-R1、5 mg/mL右旋龙脑）。取4 μL该储存液与1 mL培养液混匀，制成复方丹参组合物工作液（4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL右旋龙脑）。

1.5　细胞培养

人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y获赠于张辰宇实验室（南京大学生命科学学院），DMEM/F12细胞培养基、胎牛血清和双抗生素（青霉素、链霉素）按89:10:1的体积比配制细胞培养液。

细胞在37℃、5%CO_2的培养箱中培养至汇合度为80%时，用胰酶消化细胞1 min，加入培养液终止消化。在1 000 r/min条件下离心5 min，弃上清液，加入培养液重悬细胞并混匀。

分至6孔或96孔细胞板中，待细胞贴壁后，弃掉细胞培养液，分别加入1 mL（6孔板）或100 μL（96孔板）预先配制的、工作浓度为4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL 右旋龙脑以及复方丹参组合物（4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL右旋龙脑）的培养液处理1 h（MTT和流式细胞术）或30 min（Western blotting法），然后每孔加入5 μL（6孔板）或0.5 μL（96孔板）10 μg/mL MIF至工作浓度为50 ng/mL，诱导6 h（Western blotting法）、24 h（流式细胞术）及36 h（MTT），接下来做进一步检测。

1.6　MTT法检测细胞活力

收集对数期的细胞接种于96孔板，每孔细胞量约5 000个。培养至细胞贴壁后，弃掉细胞培养液，然后分别加入100 μL预先配制的、工作浓度为4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL右旋龙脑以及复方丹参组合物（4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL右旋龙脑）的培养液，在37℃、5%CO_2的培养箱中培养1 h. 然后，加入0.5 μL 10 μg/mL的MIF（工作浓度为50 ng/mL），在37℃、5%CO_2的培养箱中孵育36 h. 每个样品有5个复制样本。以无血清培养基作为阴性对照。

接下来，加入10 μL 5 mg/mL的MTT溶液（用无菌PBS配制，最终浓度为0.5 mg/mL），37℃孵育4 h. 弃细胞培养液后，每孔加入150 μL DMSO，低速震荡混匀10 min，使沉淀充分溶解。在酶标仪上使用波长570 nm、参考波长630 nm测量光密度（optical density，OD）值。

1.7　流式细胞术检测细胞凋亡

分至6孔细胞板中，待细胞贴壁后，弃掉细胞培养液，分别加入1 mL预先配制的、工作浓度为4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL右旋龙脑以及复方丹参组合物（4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL右旋龙脑）的培养液处理1 h，然后每孔加入5 μL 10 μg/mL MIF至工作浓度为50 ng/mL，诱导24 h.

用无EDTA 0.25%胰酶消化贴壁细胞1 min，加入培养液终止消化，轻轻吹打至细胞脱落，在300*g*、4℃条件下离心5 min，弃上清液，收集细胞。然后用预冷的PBS洗涤细胞2次，每次在300*g*、4℃条件下离心，收集细胞。按照Annexin V-FITC/PI试剂盒的操作步骤，加入100 μL Binding buffer重悬细胞后，接着定量加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI轻摇混匀，室温避光反应10 min，补加400 μL Binding buffer

混匀，在流式细胞仪上检测（激发波长为 488 nm，FITC 和 PI 在 FL1 和 FL3 通道检测）。

1.8 Western blotting 法检测 Bad 的表达

分至 6 孔细胞板中，待细胞贴壁后，弃掉细胞培养液，分别加入 1 mL 预先配制的、工作浓度为 4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL 右旋龙脑以及复方丹参组合物（4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL 右旋龙脑）的培养液处理 30 min，然后每孔加入 5 μL 10 μg/mL MIF 至工作浓度为 50 ng/mL，诱导 6 h.

细胞经过药物和刺激孵育结束后，将培养液吸出，用预冷的 PBS 洗一遍，每孔加入 500 μL 胰酶消化 1 min，加入培养液终止消化，将细胞收集于 1.5 mL EP 管中，1 000 r/min 离心 5 min. 弃上清液，再加入 1 mL 预冷的 PBS 重悬，同条件下离心 5 min. 弃上清液，加入 80～100 μL 含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液混匀，置于冰上裂解 30 min，离心取蛋白上清液。

从 BCA 试剂盒中取 A、B 液根据 50:1（体积比）的比例，配制 3 mL BCA 工作液，并混匀待用，200 μL 分装，加入标准品和样品。取 8 μL 浓度为 5 mg/mL 的蛋白质标准品（BSA Standard）与 72 μL PBS 配制成浓度为 0.5 mg/mL 的溶液待用。在 96 孔板上，按照 BCA 蛋白质定量加样方案加入样品，置于摇床上，37℃摇 30 min，充分反应。然后在 562 nm 波长下，放入酶标仪测 OD 值，将所得数据制作成标准曲线，计算出每个样品的总蛋白量。

按照配方制作 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）凝胶，待胶凝结后，将蛋白样加至上样孔上，加入电泳液，在浓缩胶 90 V、分离胶 120 V 的条件下，分离目的蛋白。待电泳结束后，使用 PVDF 膜湿转，加入含 15%甲醇的预冷转膜液，置于冰盒中，在 300 mA 恒流条件下转膜 90 min. 转膜结束后，将 PVDF 膜置于 1×TBS 中洗 5 min，而后加入含 5%脱脂奶粉的 1×TBS 室温封闭 1 h，根据目标蛋白和内参蛋白的大小，裁剪 PVDF 膜，然后用 1×TBST 漂洗 3 次，每次 5 min. 将目标蛋白的一抗（1:1 000 for Bad）或内参抗体（1:3 000 for β-actin）按产品说明书中的比例用含 5%BSA 的 1×TBST 稀释，4℃过夜，回收一抗，用 1×TBST 洗涤蛋白膜 3 次，每次 5 min. 按 1:5 000 的比例用含 5%BSA 的 1×TBST 稀释二抗，室温孵育 1 h，回收二抗，用 1×TBST 洗涤蛋白膜 3 次，每次 5 min. 使用 ECL 显影液，在化学发光仪下检测蛋白的丰度。使用 Image J v4.7 软件处理数据。

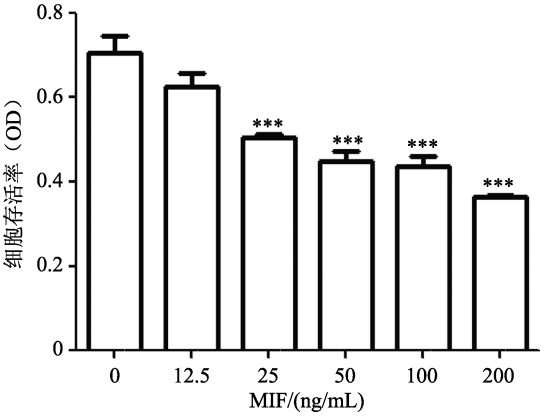
1.9 统计分析

数据使用均值±标准差（Means±SD）显示，使用 Graph Pad Prism 5.0 软件进行统计学分析。多组间差异使用 one way ANOVA 分析，两两间差异使用 *t* 检验。$P<0.05$ 表示差异显著，具有统计学意义。

2 结果

2.1 复方丹参有效组分及其组合物对 MIF 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的影响

使用不同浓度的 MIF 处理 SH-SY5Y 细胞，孵育 36 h 后，采用 MTT 法检测细胞生长情况。图 2 显示，MIF 显著地呈剂量依赖性抑制 SH-SY5Y 细胞的生长。这为后期实验选择 MIF 浓度为 50 ng/mL 奠定了基础。



注：***为与对照组相比，$P<0.001$

图 2 基于 MTT 法检测 MIF 对 SH-SY5Y 细胞生长的影响

Fig. 2 Effect of MIF on SH-SY5Y cells growth by MTT assay

使用不同浓度的复方丹参有效组分及其组合物处理SH-SY5Y细胞，孵育36 h后，采用MTT法检测细胞生长情况。图3显示，在一定浓度范围内，复方丹参有效组分及其组合物对细胞没有毒性。

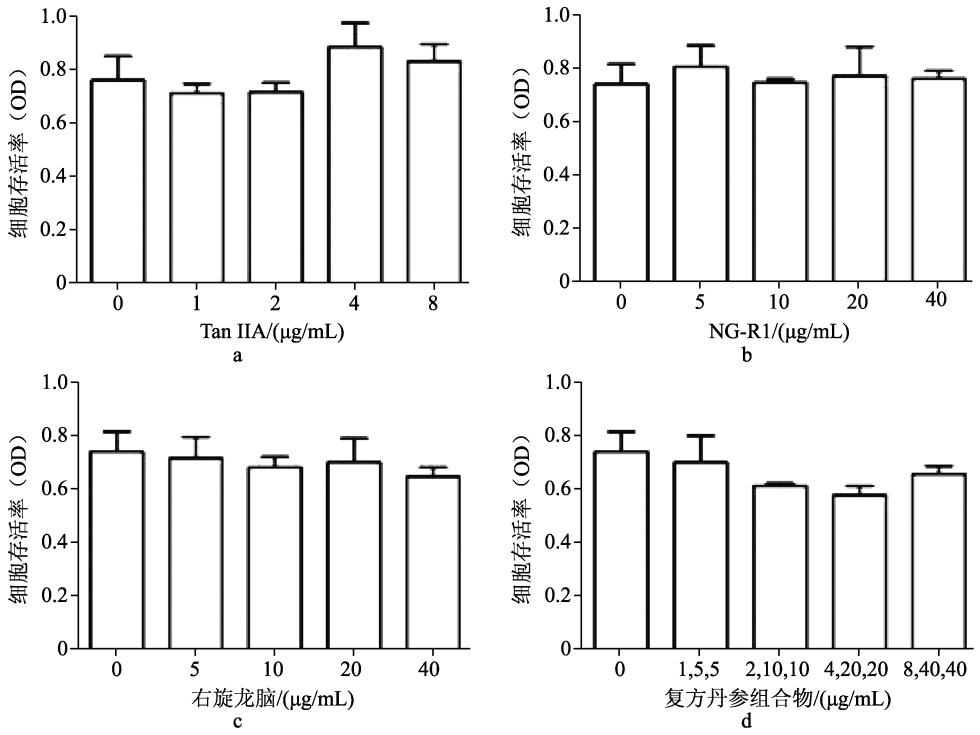


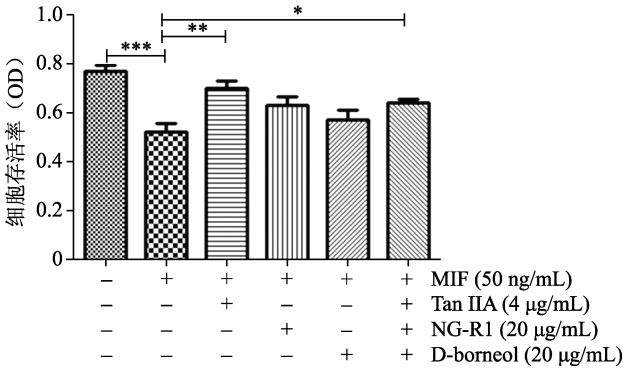
图3　基于MTT法检测复方丹参有效组分及其组合物对SH-SY5Y细胞生长的影响

Fig. 3　Effect of effective components of FFDS and their composition on SH-SY5Y cells growth by MTT assay

a—Tan IIA；b—NG-R1；c—右旋龙脑；d—复方丹参组合物

a-Tan IIA; b-NG-R1; c-D-borneol; d-FFDS' composition

分别使用4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL右旋龙脑以及复方丹参组合物孵育SH-SY5Y细胞1 h，再加入50 ng/mL MIF诱导细胞36 h. 图4显示，Tan IIA与组合物对MIF诱导SH-SY5Y细胞损伤具有显著的保护作用。



注：***为P<0.001，**为P<0.01，*为P<0.05

图4　基于MTT方法检测复方丹参有效组分及其组合物对MIF诱导SH-SY5Y细胞生长抑制的影响

Fig. 4　Effect of effective components of FFDS and their composition on MIF-induced SH-SY5Y cells growth inhibition by MTT assay

2.2　复方丹参有效组分及其组合物对MIF诱导SH-SY5Y细胞凋亡的影响

AD患者的脑部MIF含量比正常人高，使用流式细胞术检测MIF对SH-SY5Y细胞凋亡的作用。寡聚化的$A\beta_{1\text{-}42}$对神经细胞有显著的毒性作用，可作为神经细胞凋亡实验的阳性指标。分别用4 μmol/L寡聚化的$A\beta_{1\text{-}42}$和50 ng/mL MIF孵育以及共孵育细胞24 h，用Annexin V-FITC/PI双染检测，发现$A\beta_{1\text{-}42}$和MIF分别促进SH-SY5Y细胞发生早期凋亡，共孵育可诱导细胞发生大部分早期凋亡及少部分晚期凋亡（如图5所示）。而且50 ng/mL MIF诱导SH-SY5Y细胞24 h，细胞向右偏移，细胞膜通透性增加，Annexin V进入胞质，意味着细胞处于前期凋亡期，呈现出与4 μmol/L $A\beta_{1\text{-}42}$相似的促细胞凋亡作用；MIF与$A\beta_{1\text{-}42}$

共孵育，向右偏移更加严重，表现出更强的促细胞凋亡作用。

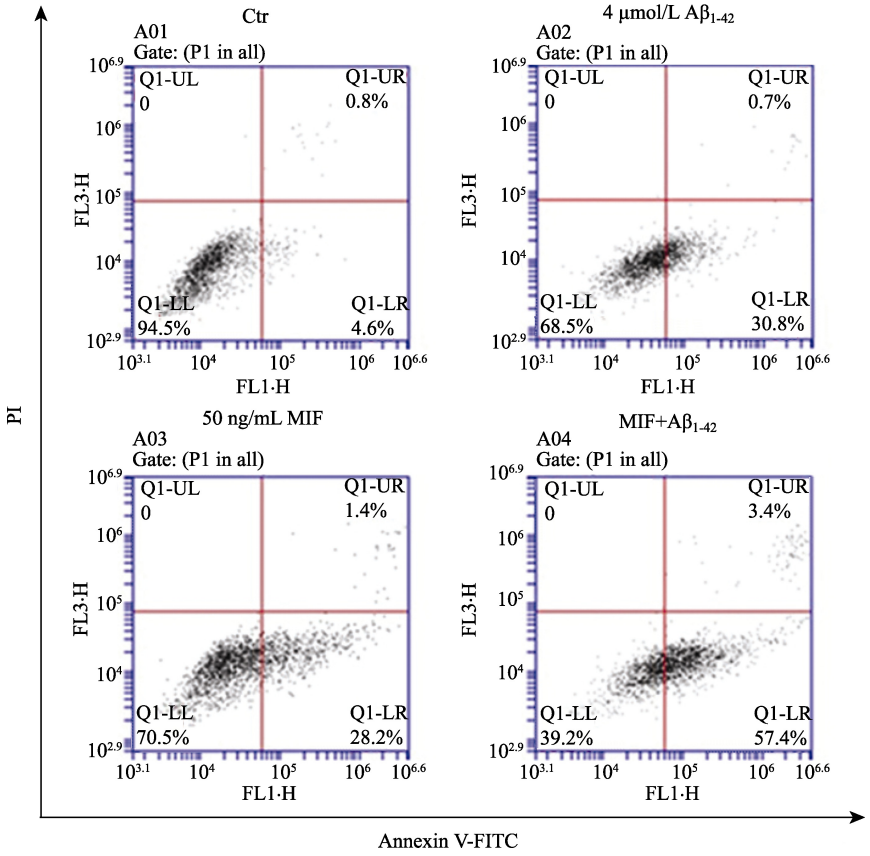


图 5 使用流式细胞仪检测 MIF 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of MIF on SH-SY5Y cells apoptosis using flow cytometry

分别加入 4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL 右旋龙脑以及复方丹参组合物（4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL 右旋龙脑）孵育 SH-SY5Y 细胞 1 h，然后加入 50 ng/mL MIF 诱导刺激细胞 24 h. 结果发现，Tan IIA、NG-R1 及复方丹参组合物均可改善 MIF 对细胞的损伤作用，能够有效地保护细胞（如图 6 所示）。

2.3 复方丹参有效组分及其组合物对 MIF 致 SH-SY5Y 细胞损伤的影响

Bad 作为促凋亡蛋白的一员，其含量增加会引起 SH-SY5Y 的细胞毒作用。图 7 显示，Bad 的表达与 MIF 之间呈现出显著的浓度依赖性，MIF 呈浓度依赖性并促进细胞中 Bad 表达量上调。特别是 MIF 浓度在 50 ng/mL 时可诱导 Bad 的显著增加。这是选择 MIF 浓度为 50 ng/mL 的原因之一。

分别加入 Tan IIA（4 μg/mL）、NG-R1（20 μg/mL）、右旋龙脑（20 μg/mL）、复方丹参组合物（4 μg/mL Tan IIA、20 μg/mL NG-R1、20 μg/mL 右旋龙脑）预培养 SH-SY5Y 细胞 30 min，然后加入 MIF（50 ng/mL）诱导 6 h. Western blotting 分析显示，Tan IIA、NG-R1 和复方丹参组合物能够显著抑制 MIF 诱导引起的细胞中 Bad 的表达（如图 8 所示）。

3 讨论

3.1 钙调神经磷酸酶对 Aβ-诱导的细胞凋亡的影响

据报道，p38α MAPK 在 BACE1 的降解和 Aβ 的生成中发挥重要作用，涉及 AD 的发病机制[15]；Aβ 肽

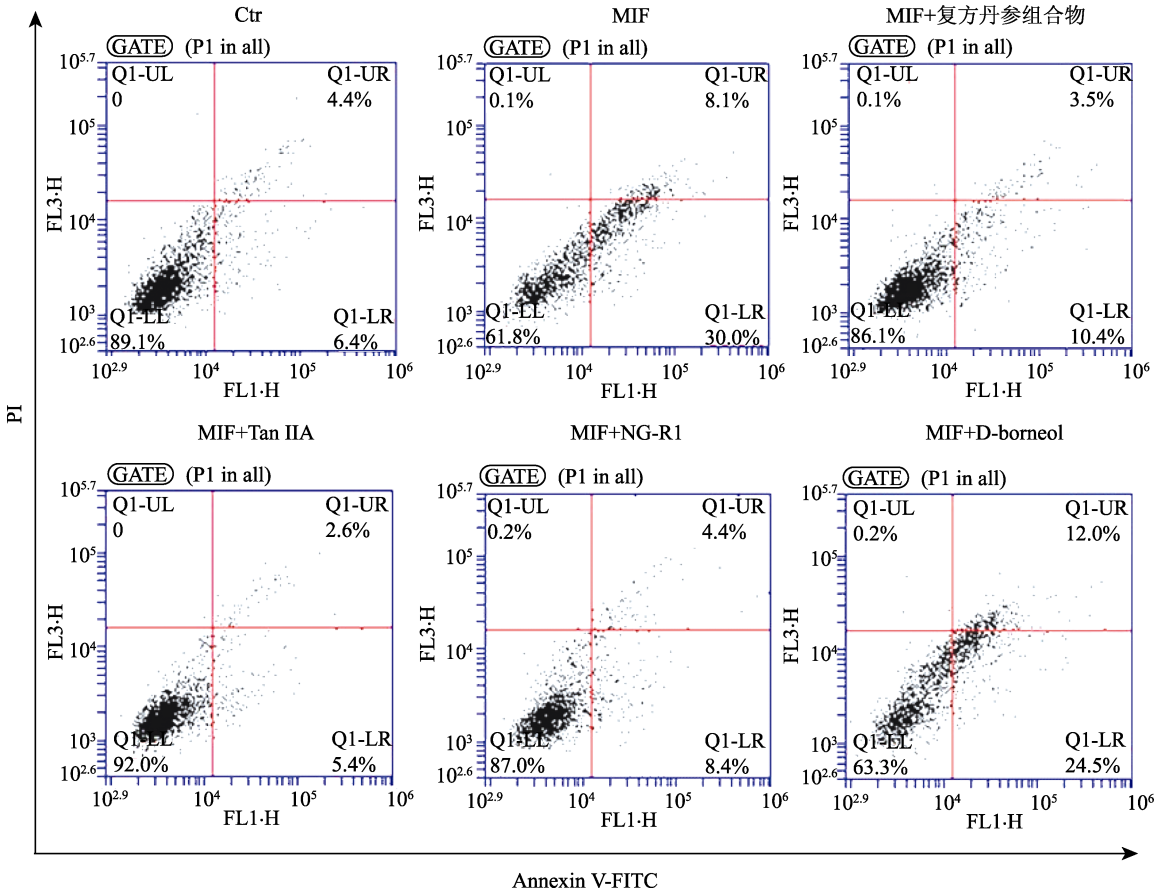
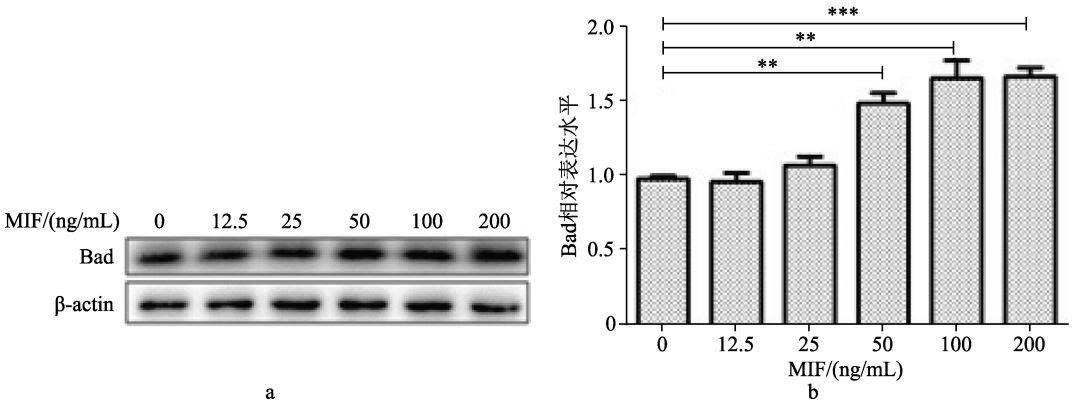


图6　复方丹参有效组分及其组合物对MIF诱导SH-SY5Y细胞凋亡的作用

Fig. 6　Effect of effective components of FFDS and their composition on MIF-induced apoptosis in SH-SY5Y cells



注：***为 $P<0.001$，**为 $P<0.01$

图7　MIF诱导SH-SY5Y细胞中Bad表达量的上调

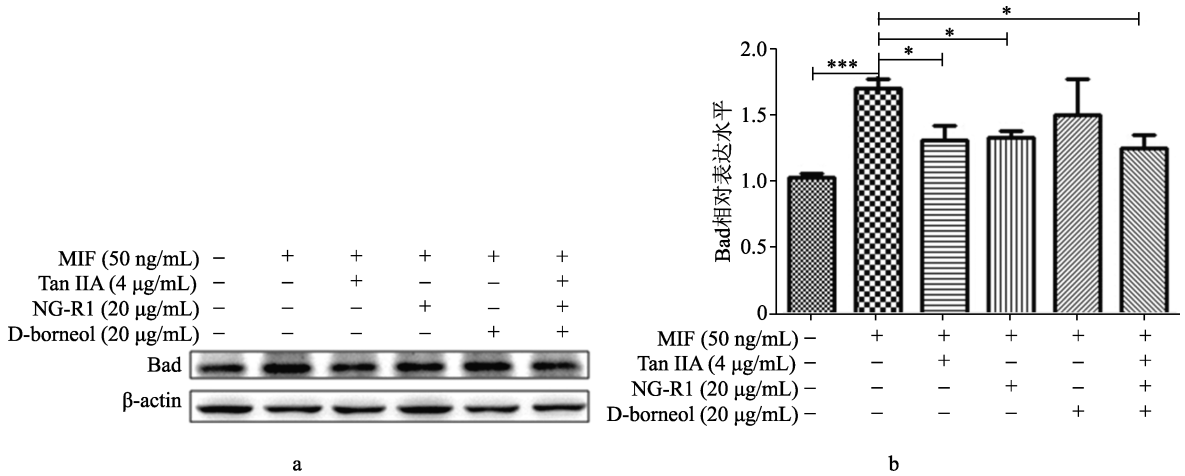
Fig. 7　Up-regulation of Bad level in MIF-induced SH-SY5Y cells

a—免疫印迹；b—统计分析

a-Western blotting; b-Statistic analysis

能够上调钙调神经磷酸酶（calcineurin，CaN）的活性并增加钙蛋白酶I（calpain I，CaP I）和CaN催化亚基（CaN A）的裂解[16]。CaN是一种钙/钙调素（calmodulin，CaM）-依赖性蛋白磷酸酶，由60 ku的CaN A和18 ku的Ca^{2+}-结合调节亚单位（CaN B）组成。CaP I能够裂解CaN A的自抑制结构域，CaN A

进而被激活。通过促凋亡蛋白 Bad 的去磷酸化作用，CaN 能够介导 Aβ 诱导的细胞凋亡；CaN 可能是 Ca^{2+} 稳态异常和神经细胞凋亡之间的联系物[17]。Aβ 和 PrP 能够诱导 CaN 过度活化，导致 Bad 去磷酸化和易位到线粒体，进而释放细胞色素 C，并可能进一步触发细胞凋亡级联反应，例如 Caspase-3 的激活。事实上，Bad 通过结合和抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xL 来促进细胞凋亡，导致促凋亡基因 Bax 和 Bak 的激活[18~20]。并且 Bax 和 Bak 可进一步聚集并破坏线粒体的膜电位，进而直接导致细胞死亡[21]。



注：***为 $P<0.001$，*为 $P<0.05$

图 8 复方丹参有效组分及其复合物对 MIF 诱导 SH-SY5Y 细胞中 Bad 蛋白表达水平的影响

Fig. 8 Effect of effective components of FFDS and their composition on the expression of Bad protein level in MIF-induced SH-SY5Y cells

a—免疫印迹；b—统计分析

a-Western blotting; b-Statistic analysis

众所周知，哺乳动物细胞凋亡受到 Bcl-2 家族蛋白、衔接蛋白 Apaf-1（凋亡蛋白酶活化因子 1）和半胱氨酸蛋白酶 Caspase 家族蛋白的调节[22]。Bcl-2 家族包括抗凋亡蛋白（如 Bcl-2 和 Bcl-xL）和促凋亡蛋白（如 Bax 和 Bad）。Bcl-2 和 Bcl-xL 通过与 Bax 形成异二聚体抑制 Bax 的活性而发挥作用。Apaf-1、细胞色素 C 和 Caspase-9 形成一个复合物并介导 pro-Caspase-9 的激活，激活的 Caspase-9 随即裂解并激活 Caspase-3. 当 Bad 响应生存因子（如白细胞介素 3）而被磷酸化时，也被隔离在细胞质中，与 14-3-3 蛋白形成复合物，不能与抗凋亡蛋白 Bcl-2 相互作用，致使 Bcl-2 促进细胞生存[19~20]。当 Bad 被去磷酸化和易位到线粒体时，它能够结合抗凋亡蛋白 Bcl-2 家族成员（如 Bcl-2 或 Bcl-xL），导致 Bax 和 Bak 在线粒体膜的聚集，促进凋亡蛋白（如细胞色素 C）的释放，触发 Caspase 的激活[18]。

3.2 MIF 通过下调 Bad 的表达而诱导细胞凋亡

MIF 作为一种促炎细胞因子，可能参与了 AD 的神经炎症和 Aβ 聚集引发的毒性。MIF 缺乏与星形胶质细胞激活的减少和 tau 蛋白过度磷酸化的降低相关[23]。可见，抑制 MIF 以及 MIF 诱导的星形胶质细胞的活化可能有助于 AD 的预防和治疗。此外，JNK（p-JNK 和 p-BAD）和 p53 蛋白的激活可能参与了高热（hyperthermia，HT）诱导的角质细胞凋亡，增强内源性 MIF 表达能够抑制细胞凋亡[24]。这可能是研究 MIF 诱导的人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞毒作用的原因之一。

本课题组以前的研究已经证实了复方丹参有效组分对三氯化铝（$AlCl_3$）和 D-半乳糖（D-Gal）致 AD 模型小鼠的海马神经元具有保护作用，并确定复方丹参有效组分能显著降低 INF-γ 的血清水平，减轻 INF-γ 相关的炎症反应，并能够修复 AD 模型小鼠因长期摄入三氯化铝及 D-半乳糖引起的学习记忆障碍[25]。本文的目的是探讨复方丹参有效成分及其组合物对神经细胞的保护作用，进一步采用 MTT 法、流式细

胞仪和 Western blotting 法探究其对 MIF 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的作用机制。MTT 检测显示，MIF 呈现出类似于 $A\beta_{1\text{-}42}$ 的神经毒性，复方丹参有效成分及其组合物没有明显的细胞毒性；Tan IIA 和复方丹参组合物对 MIF 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤具有显著的保护作用。此外，MIF 和 $A\beta_{1\text{-}42}$ 一样，均能够促进 SH-SY5Y 细胞凋亡，而 Tan IIA、NG-R1 和复方丹参组合物能显著抑制 MIF 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡。Western blotting 结果显示，MIF 可以上调 Bad 的表达而引发 SH-SY5Y 细胞凋亡，而 Tan IIA、NG-R1 和复方丹参组合物却能够显著下调 Bad 的表达。

4　结论

MIF 表现出诱导细胞凋亡的作用，这是通过上调 Bad 的表达来实现的。复方丹参组合物及其所包含的 Tan IIA 和 NG-R1 可以降低 Bad 的表达水平，抑制 MIF 诱导的细胞凋亡，从而发挥神经保护作用。本文报道了 MIF 诱导人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞致使 Bad 的高表达。因此，推测复方丹参组合物可能通过 CaN 来调控 MIF 刺激引发的 Bad 表达，在神经退行性疾病（如 AD）的神经保护中发挥作用。

[参考文献] (References)

[1] POPP J, BACHER M, KÖLSCH H, et al. Macrophage migration inhibitory factor in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease[J]. Journal of Psychiatric Research, 2009, 43(8): 749-753.

[2] AKIYAMA H, BARGER S, BARNUM S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease[J]. Neurobiology of Aging, 2000, 21(3): 383-421.

[3] WANG F Z, SHEN X F, GUO X R, et al. Spinal macrophage migration inhibitory factor contributes to the pathogenesis of inflammatory hyperalgesia in rats[J]. Pain, 2010, 148(2): 275-283.

[4] WANG F Z, XU S Q, SHEN X F, et al. Spinal macrophage migration inhibitory factor is a major contributor to rodent neuropathic pain-like hypersensitivity[J]. Anesthesiology: the Journal of the American Society of Anesthesiologists, 2011, 114(3): 643-659.

[5] BACHER M, DEUSTER O, ALJABARI B, et al. The role of macrophage migration inhibitory factor in Alzheimer's disease[J]. Molecular Medicine, 2010, 16(3-4): 116.

[6] ZHANG Y, PI Z, SONG F, et al. Ginsenosides attenuate D-galactose-and $AlCl_3$-inducedspatial memory impairment by restoring the dysfunction of the neurotransmitter systems in the rat model of Alzheimer's disease[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 194: 188-195.

[7] KAVIRAJAN H, SCHNEIDER L S. Efficacy and adverse effects of cholinesterase inhibitors and memantine in vascular dementia: a meta-analysis of randomised controlled trials[J]. The Lancet Neurology, 2007, 6(9): 782-792.

[8] ZHANG B, WANG L L, REN R J, et al. MicroRNA-146a represses LRP2 translation and leads to cell apoptosis in Alzheimer's disease[J]. FEBS Letters, 2016, 590(14): 2190-2200.

[9] CUI Z T, LIU J P, WEI W L. The effects of tanshinone IIA on hypoxia/reoxygenation-induced myocardial microvascular endothelial cell apoptosis in rats via the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 83: 1116-1126.

[10] JIANG P, LI C, XIANG Z, et al. Tanshinone IIA reduces the risk of Alzheimer's disease by inhibiting iNOS, MMP-2 and NF-κBp65 transcription and translation in the temporal lobes of rat models of Alzheimer's disease[J]. Molecular Medicine Reports, 2014, 10(2): 689-694.

[11] MA B, MENG X, WANG J, et al. Notoginsenoside R1 attenuates amyloid-β-induced damage in neurons by inhibiting reactive oxygen species and modulating MAPK activation[J]. International Immunopharmacology, 2014, 22(1): 151-159.

[12] HUR J, PAK S C, KOO B S, et al. Borneol alleviates oxidative stress via upregulation of Nrf2 and Bcl-2 in SH-SY5Y cells[J]. Pharmaceutical Biology, 2013, 51(1): 30-35.

[13] ZHANG Q, WU D, WU J, et al. Improved blood-brain barrier distribution: effect of borneol on the brain pharmacokinetics of kaempferol in rats by *in vivo* microdialysis sampling[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 162: 270-277.

[14] HAN M, LIU Y, ZHANG B, et al. Salvianic borneol ester reduces β-amyloid oligomers and prevents cytotoxicity[J]. Pharmaceutical Biology, 2011, 49(10): 1008-1013.

[15] SCHNÖDER L, HAO W, QIN Y, et al. Deficiency of neuronal p38α MAPK attenuates amyloid pathology in Alzheimer disease mouse and cell models through facilitating lysosomal degradation of BACE1[J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(5): 2067-2079.

[16] LI Q, FANG J, YANG M, et al. Galantamine inhibits calpain-calcineurin signaling activated by beta-amyloid in human neuroblastoma SH-SY5Y cells[J]. Neuroscience Letters, 2010, 480(3): 173-177.

[17] AGOSTINHO P, LOPES J P, VELEZ Z, et al. Overactivation of calcineurin induced by amyloid-beta and prion proteins[J]. Neurochemistry International, 2008, 52(6): 1226-1233.

[18] CORY S, ADAMS J M. Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch[J]. Cancer Cell, 2005, 8(1): 5-6.

[19] YANG J. Molecular modeling of human BAD, a pro-apoptotic Bcl-2 family member, integrating glycolysis and apoptosis[J]. Protein and Peptide Letters, 2010, 17(2): 206-220.

[20] YANG J, LI J H, WANG J, et al. Molecular modeling of BAD complex resided in a mitochondrion integrating glycolysis and apoptosis[J]. Journal of Theoretical Biology, 2010, 266(2): 231-241.

[21] LIU X, DAI S, ZHU Y, et al. The structure of a Bcl-x_L/Bim fragment complex: implications for Bim function[J]. Immunity, 2003, 19(3): 341-352.

[22] YUAN J, YANKNER B A. Apoptosis in the nervous system[J]. Nature, 2000, 407(6805): 802-809.

[23] LI S Q, YU Y, HAN J Z, et al. Deficiency of macrophage migration inhibitory factor attenuates tau hyperphosphorylation in mouse models of Alzheimer's disease[J]. Journal of Neuroinflammation, 2015, 12(1): 177.

[24] YOSHIHISA Y, REHMAN M U, KONDO T, et al. Role of macrophage migration inhibitory factor in heat-induced apoptosis in keratinocytes[J]. The FASEB Journal, 2016, 30(11): 3870-3877.

[25] LIANG C, CHEN C, YANG J. The effects of the composition of the effective components of Fufang Danshen in Alzheimer's disease mice induced by aluminum trichloride and D-galactose[EB/OL]. Beijing: Sciencepaper Online[2016-11-22]. http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201611-281.