

## 姜黄素对 STS 诱导大鼠海马神经元损伤影响\*

覃筱燕, 张淑萍, 杨彬, 杨晓萍, 刘涛燕

**摘要:**目的 探讨姜黄素对星形孢菌素(STS)诱导的大鼠海马神经元损伤的保护作用。方法 运用大鼠海马神经元原代培养细胞,采用 STS 诱导建立神经细胞损伤模型,实验设 4 组,对照组、模型组、姜黄素组(20  $\mu\text{mol/L}$ )和姜黄素预处理组(姜黄素和 STS 分别为 20  $\mu\text{mol/L}$ ),镜下观察神经细胞形态学变化;噻唑蓝(MTT)法测定细胞活性,乳酸脱氢酶(LDH)释放率检测细胞毒性,免疫荧光染色法检测活性氧(ROS)水平;western blot 检测细胞中 active caspase-3、p-AKT 蛋白表达。**结果** 与模型组比较,姜黄素预处理组神经细胞损伤程度明显减轻;姜黄素预处理组细胞活性(0.877  $\pm$  0.016)较模型组(0.625  $\pm$  0.007)升高( $t=3.47, P<0.01$ ),LDH 释放量(0.383  $\pm$  0.025)低于模型组(0.582  $\pm$  0.051)( $t=3.25, P<0.01$ );模型组 ROS 阳性细胞数多于姜黄素预处理组;姜黄素预处理组 active caspase-3 表达量(0.951  $\pm$  0.089)低于模型组(1.370  $\pm$  0.131)( $t=3.64, P<0.01$ ),p-AKT 表达量(1.107  $\pm$  0.025)高于模型组(0.611  $\pm$  0.002)( $t=5.85, P<0.01$ )。**结论** 姜黄素通过抑制细胞 ROS 释放、下调 active caspase-3 和上调 p-AKT 蛋白表达发挥对 STS 所致大鼠海马神经元损伤的保护作用。

**关键词:**姜黄素;星形孢菌素(STS);海马神经元;active casepase-3;p-AKT

中图分类号: R 338.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)04-0518-03

## Effect of curcumin on cultured rat hippocampal neurons with STS-induced injury

QIN Xiao-yan, ZHANG Shu-ping, YANG Bin, et al (College of Life and Environmental Science, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

**Abstract: Objective** To investigate the protective effect of curcumin on cultured rat hippocampal neurons with staurosporine(STS)-induced injury. **Methods** The primary neonatal rat hippocampal neurons were cultured and STS was used to induce nerve cell damage. The neurons cultured were assigned into control group, model group (20  $\mu\text{mol/L}$  of STS), curcumin group (20  $\mu\text{mol/L}$ ), and curcumin pretreatment group (20  $\mu\text{mol/L}$  of curcumin and STS). The change of cell morphology was observed with microscope. Survival rate of hippocampal nerve cells was determined with methyl thiazolyl tertazolium(MTT) assay and lactate dehydrogenase(LDH) release assay. The reactive oxygen species (ROS) positive-cell number was measured with immunofluorescence staining. The expressions of active caspase-3 and p-AKT were detected by western blot. **Results** The morphology damage of hippocampal neurons in curcumin pretreatment groups was slighter than that in model group. The viability of hippocampal neurons in curcumin pretreatment group was higher than in model group (0.877  $\pm$  0.016 vs 0.625  $\pm$  0.007,  $P<0.01$ ). The cytotoxicity of hippocampal neurons in curcumin pretreatment group was significantly less than in model group (0.383  $\pm$  0.025 vs 0.582  $\pm$  0.051,  $P<0.01$ ). ROS positive cells in model group were significantly greater than in curcumin pretreatment group. The expression of active caspase-3 (Csp-3) in curcumin pretreatment group was significantly reduced compared to that in STS model group (0.951  $\pm$  0.089 vs 1.370  $\pm$  0.131,  $P<0.01$ ) and the expression of p-AKT significantly increased (1.107  $\pm$  0.025 vs 0.611  $\pm$  0.002,  $P<0.01$ ) in curcumin pretreatment group. **Conclusion** The protective effect of curcumin against STS-induced injury in cultured primary neonatal rat hippocampal neurons is likely through the inhibition of nerve cells, ROS release, the decrease of active caspase-3 expression, and the increase of p-AKT expression.

**Key words:** curcumin; STS; hippocampal neurons; active casepase-3;p-AKT

星形孢菌素(staurosporine, STS)作为一种广谱细胞凋亡诱导剂应用于各种细胞凋亡研究中,是一种常用、可靠的线粒体途径细胞凋亡诱导剂<sup>[1-2]</sup>。姜黄素(curcumin)是从草本植物姜黄(*Curcuma longa* Linn)的根茎中提取出来的酚类活性成分,具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗凋亡等广泛药理作

用<sup>[3-4]</sup>,其通过抗氧化及抑制 $\beta$ -淀粉样蛋白聚集可用于防治阿尔茨海默病等神经退行性疾病<sup>[5]</sup>。研究显示姜黄素在亚微摩尔浓度范围内对细胞内、外 $\beta$ -淀粉样蛋白介导的神经细胞毒性损伤具有保护作用<sup>[6-7]</sup>。本研究采用 STS 诱导原代培养大鼠乳鼠海马神经元损伤模型,观察姜黄素对 STS 诱导线粒体途径的神经细胞凋亡影响,进一步探索姜黄素在防止及改善神经细胞损伤中的作用及分子机制。

### 1 材料与方法

1.1 实验动物 1 日龄 SD 大鼠乳鼠 80 只,雌雄不

\* 基金项目: 国家自然科学基金(31070288); 中央高校自主科研基金(1112KYZY41); 中央民族大学 985 资助项目(MUC98504-14)

作者单位: 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081

作者简介: 覃筱燕(1968-), 女, 广西人, 教授, 硕士, 研究方向: 神经生理药理学。

限(北京大学医学院实验动物中心)。合格证号: SCXK(京)2005-0013。

1.2 主要试剂与仪器 姜黄素、噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、STS、多聚赖氨酸和阿糖胞苷(美国 Sigma 公司);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)(美国 Promega 公司);胰蛋白酶、达尔伯克改良伊格尔(Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)高糖培养基、B27、胎牛血清(美国 Invitrogen 公司)。TBST、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)等试剂均为国产分析纯。实验时将姜黄素提取物溶于胎牛血清 DMEM 细胞培养基中,终浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ 。STS 终浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ 。CK2-倒置显微镜(日本 Olympus 公司),22R 冷冻高速离心机(德国 Heraeus 公司),sunrise 酶标仪(澳大利亚 Tecan 公司),DM-R 型多功能显微镜及测量系统(德国 Leica 公司),BH-2 型荧光显微镜及摄影系统(日本 Olympus 公司)。

1.3 乳鼠海马神经细胞原代培养及分组处理 无菌条件下取新生大鼠乳鼠脑,分离出海马组织,剪碎,0.25% 胰蛋白酶消化,吹打分散过滤细胞。用含 10% 胎牛血清 DMEM 细胞培养液制成细胞悬液,调整细胞数至  $1 \times 10^6$  个/mL,将细胞悬液接种于细胞培养板,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育,第 3 d 换用含 1% 阿糖胞苷和 5% 胎牛血清 DMEM 培养液抑制杂细胞生长,每隔 3 d 换液 1 次,细胞培养至 7 d 时供实验用。显微镜观察神经细胞形态变化。实验设 4 组:对照组、模型组、姜黄素组和姜黄素预处理组。对照组不加任何处理因素;细胞培养至第 7 d,模型组加入终浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  的 STS 制备细胞损伤模型;姜黄素预处理组加入终浓度分别为 20  $\mu\text{mol/L}$  的姜黄素和 STS;姜黄素组只加入终浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  的姜黄素处理。各组细胞置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续孵育 24 h 后用于实验观察。每天用倒置显微镜观察神经生长状态及形态变化,并拍下原代培养大鼠海马神经细胞。

#### 1.4 指标及方法

1.4.1 MTT 法检测细胞活性 细胞孵育 24 h 后,每孔加入终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT,置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中避光继续孵育 4 h,吸去培养液,每孔加入 DMSO 液 150  $\mu\text{L}$ ,室温下置于摇床上振荡 15 min,待孔内颗粒完全溶解后,用酶标仪 570 nm 处测定各孔吸光度(A)值。A 值与细胞活性呈正相关。

1.4.2 LDH 释放量检测 用培养基中 LDH 释放量反映细胞毒性损伤程度。按照 LDH 试剂盒说明书进行检测,细胞毒性计算:细胞毒性 = 释放到培养基中 LDH/释放到培养基中的 LDH + 胞内 LDH。

1.4.3 免疫荧光染色法检测活性氧(reactive oxy-

gen species, ROS) 阳性细胞 将 5 mmol/L 的 MitoSOX<sup>TM</sup> 试剂原液稀释成 5  $\mu\text{mol/L}$  的工作液,取出处理好的细胞板,吸去培养液,每孔在培养有细胞的盖玻片上加 1.0 ~ 2.0 mL 工作液,于 37  $^{\circ}\text{C}$  避光条件下放置 10 min 后,缓冲液清洗 3 次,镜检。

1.4.4 Caspase-3、p-AKT 蛋白表达检测 采用 western blot 法,在 6 孔板中进行细胞培养,培养 1 周后分组收集蛋白样品,上样,聚丙烯酰胺凝胶电泳(分离胶浓度为 10%、1  $\times$  浓缩胶)后转膜(聚偏二氟乙烯膜),封闭液封闭 30 min,一抗(active caspase-3、p-AKT)抗体稀释浓度为 1:1 000)孵育过夜,TBST 液洗涤 3 ~ 5 次后用稀释辣根过氧化物酶标记的二抗摇床孵育 1 h,洗涤 3 ~ 5 次后进行显影,检测目的蛋白。

1.5 统计分析 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 13.0 软件进行独立性  $t$  检验,计量资料组间比较采用 Student  $t$  test 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 姜黄素对大鼠乳鼠海马神经元形态学影响 原代培养 5 d 后显微镜下观察,对照组神经元胞体饱满,轴、树突细长明显,交织成网络,模型组神经细胞胞体皱缩、变形,突起减少、变短,并沿突起方向出现大量空泡,姜黄素预处理组神经元形态与对照组差异不明显,神经元胞体饱满,轴、树突细长明显,交织成网络。

2.2 姜黄素对大鼠海马神经细胞存活率影响 与对照组比较,模型组大鼠海马神经细胞 MTT A 值( $0.625 \pm 0.007$ )下降 40% 左右( $t = 4.80$ ,  $P < 0.01$ ),表明造模成功。姜黄素预处理组较模型组 A 值( $0.877 \pm 0.016$ )升高 20% ( $t = 3.47$ ,  $P < 0.01$ )。与正常对照组( $1 \pm 0.013$ )比较,姜黄素组 A 值( $1.102 \pm 0.008$ )无明显变化( $t = 1.55$ ,  $P > 0.05$ )。与对照组 LDH 释放量( $0.113 \pm 0.008$ )比较,模型组 LDH 释放量( $0.582 \pm 0.051$ )升高( $t = 5.64$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较,姜黄素预处理组 LDH 释放量( $0.383 \pm 0.025$ )下降( $t = 3.25$ ,  $P < 0.01$ )。

2.3 大鼠乳鼠海马神经元 ROS 阳性细胞数变化 MitoSOX<sup>TM</sup> Red reagent 对活细胞内线粒体产生的 ROS 特异荧光染成红色。与对照组比较,模型组 ROS 阳性细胞数增多,表明 STS 对海马神经元具有毒性损伤作用;与模型组比较,姜黄素预处理组 ROS 阳性细胞数减少,表明姜黄素可拮抗 STS 对神经细胞的毒性损伤。

2.4 姜黄素对海马神经细胞 caspase-3 表达影响

(图 1) 与对照组比较,模型组 active caspase-3 表达量( $1.370 \pm 0.131$ )增加( $t = 3.81, P < 0.01$ ),姜黄素预处理组 active caspase-3 表达量( $0.951 \pm 0.089$ )低于模型组( $1.370 \pm 0.131$ ),差异有统计学意义( $t = 3.64, P < 0.01$ )。

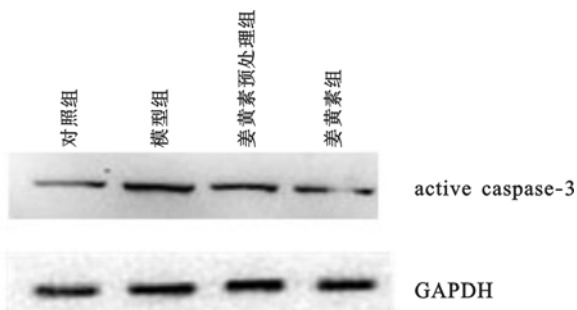


图 1 大鼠海马神经细胞中 active caspase-3 表达变化

2.5 姜黄素对海马神经细胞 p-AKT 表达影响(图 2) 与对照组比较,模型组 p-AKT 表达量( $0.611 \pm 0.002$ )降低( $t = 7.19, P < 0.01$ ),姜黄素预处理组 p-AKT 表达量( $1.107 \pm 0.025$ )高于模型组( $0.611 \pm 0.002$ ),差异有统计学意义( $t = 5.85, P < 0.01$ ),表明姜黄素可扭转 STS 介导的 p-AKT 表达量下降趋势。

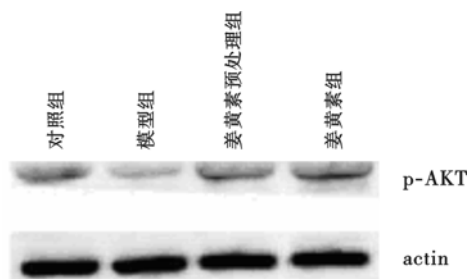


图 2 大鼠乳鼠海马神经细胞中 p-AKT 表达变化

### 3 讨论

线粒体信号通路是细胞凋亡的主要途径<sup>[8]</sup>。研究发现<sup>[8-9]</sup>,线粒体内包含一些与细胞凋亡有密切关系的物质,如细胞色素 C (CytC)、Ca<sup>2+</sup> 和 ROS 等,在 ROS 依赖程序性细胞死亡中,ROS 氧化损伤能加速细胞的死亡进程。ROS 还可以调解凋亡相关基因表达,导致神经细胞凋亡<sup>[9]</sup>。Caspases 家族是调节凋亡发生的关键家族之一。Caspase-3 表达和活化产生的 active caspase-3 水平升高是多种致凋亡因素诱发细胞凋亡的关键环节<sup>[10]</sup>。本研究结果显示 STS 介导的神经细胞损伤模型与对照组比较细胞存活率下降,细胞毒性增加,ROS 阳性细胞数增多;Activecaspase-3 表达量增加,表明造模成功。

AKT 磷酸化可以直接作用于多种抗凋亡信号分子,阻断其诱导凋亡作用<sup>[11]</sup>。本研究结果表明 STS 损伤模型组 p-AKT 表达量下降,姜黄素预处理组 p-AKT 表达量增加,提示姜黄素通过上调 p-AKT 表达拮抗 STS 对神经细胞凋亡作用。

姜黄素是姜黄属中药姜黄、郁金等根茎中提取出来的一种酚性色素,具有抗炎、抗氧化应激、抗癌、免疫调节、凋亡调节等方面的复合特性<sup>[3-7]</sup>。姜黄素无明显毒副作用的特性使其有可能成为一种神经保护的保健和治疗药物<sup>[12]</sup>。本研究结果显示姜黄素预处理(终浓度 20 μmol/L)可拮抗 STS 介导的神经细胞存活率下降,LDH 释放量增加及 ROS 阳性细胞数升高;同时姜黄素还可扭转 STS 介导的 active caspase-3 表达量的增加和 p-AKT 表达量的下降。提示姜黄素能对 STS 诱导的体外培养大鼠海马神经元损伤具有一定保护作用,作用机制可能与调制细胞凋亡线粒体途径中的 active caspase-3、p-AKT 蛋白表达有关。

### 参考文献

- [ 1 ] Swannie HC, Kaye SB. Protein kinase C inhibitors [ J ]. Curt Oncol Rep, 2002, 4: 37 - 46.
- [ 2 ] 刘安恒, 张卫卫, 曹亚南, 等. Staurosporine 诱导乳鼠心肌细胞凋亡与 Bcl22/Bax 的关系 [ J ]. 心脏杂志, 2009, 21 ( 2 ): 169 - 173.
- [ 3 ] 薛海鹏, 李湘洲, 旷春桃, 等. 姜黄素的抗氧化机制及其为先导物的抗氧化化合物研究进展 [ J ]. 食品科学, 2010, 31 ( 7 ): 302 - 306.
- [ 4 ] Zhao CX, Zhang L, Yu HX, et al. Curcumin protects mouse neuroblastoma neuro-2A cells against hydrogen-peroxide-induced oxidative stress [ J ]. Food Chemistry, 2011, 129 ( 2 ): 387 - 394.
- [ 5 ] Ono K, Hasegawa K, Naiki H, et al. M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils *in vitro* [ J ]. J Neurosci Res, 2004, 75 ( 6 ): 742 - 750.
- [ 6 ] Qin XY, Cheng Y, Cui J, et al. Potential protection of curcumin against amyloid β-induced toxicity on cultured rat prefrontal cortical neurons [ J ]. Neuroscience Letters, 2009, 463 ( 2 ): 158 - 161.
- [ 7 ] Qin XY, Cheng Y, Yu LC. Potential protection of curcumin against intracellular amyloid β-induced toxicity in cultured rat prefrontal cortical neurons [ J ]. Neuroscience Letters, 2010, 480 ( 1 ): 21 - 24.
- [ 8 ] Adamsl JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis [ J ]. Genes Dev, 2003, 17 ( 20 ): 2481 - 2495.
- [ 9 ] Fulda S, Debatin KM. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review [ J ]. Cancer Detect Prev, 2006, 30 ( 3 ): 217 - 223.
- [ 10 ] Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors [ J ]. Cell, 2000, 102: 1 - 4.
- [ 11 ] Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy [ J ]. Cell Signal, 2002, 14 ( 5 ): 381 - 395.
- [ 12 ] 陈思砚, 潘静, 陈生弟. 姜黄素在神经系统疾病治疗中的应用 [ J ]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, 30 ( 6 ): 732 - 734.

收稿日期: 2012-02-07

(解学魁编辑 周欣琳校对)