

网络出版时间:2024-02-02 09:20:21 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20240201.1111.002

基于 PARP1 信号通路研究芒柄花素对糖氧剥夺/复氧复糖神经元细胞损伤的影响

郁 丽^{1,2}, 王 湄^{1,2}, 王文秀³, 曹丽平³, 何前松^{1,3}

摘要 目的 基于 PARP1 信号通路研究芒柄花素对糖氧剥夺/复氧复糖神经元细胞损伤的影响,为揭示运用锦鸡儿异黄酮治疗脑缺血再灌注损伤提供理论依据。方法 建立小鼠神经元细胞(HT22)糖氧剥夺/复氧复糖(OGD/R)模型,通过 Western blot 检测糖氧剥夺/复氧复糖不同时间 HT22 神经元细胞中 PARP1 和 PARG 表达情况,选择通路变化最佳时间点。分别使用芒柄花素、PARP1 抑制剂(PJ34)和 PARG 抑制剂处理 OGD/R 后的 HT22 细胞,设置 6 个组,分别为对照组、对照组 + 芒柄花素组、OGD/R 组、OGD/R + 芒柄花素组、OGD/R + PJ34 组、OGD/R + PARG 抑制剂组。对照组 HT22 细胞正常培养,不进行 OGD/R 处理;采用免疫荧光、Western blot 法检测各组细胞凋亡因子、相关蛋白表达水平。结果 在糖氧剥夺/复氧复糖 3 h 后,HT22 细胞中 PARP1 通路激活最明显,在 OGD/R 3 h 条件下,芒柄花素、PJ34 或 PARG 抑制剂处理后可提高 E3 泛素连接酶(Iduna),抑制 PARP1、PARG 通路蛋白表达,并降低 AIF 和 P53 表达,提高 AKT 蛋白磷酸化水平。结论 HT22 小鼠神经元细胞在 OGD/R 条件下,芒柄花素可通过提高 Iduna 蛋白表达抑制 PARP1/AIF/Akt 信号通路减轻 HT22 小鼠神经元细胞损伤。关键词 芒柄花素;糖氧剥夺/复氧复糖;神经元损伤;PARP1 信号通路

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)02-0207-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.004

临床上治疗脑梗死常用溶栓恢复血供,但恢复血供后,过量的自由基攻击神经元细胞,造成缺血/再灌注损伤^[1]。芒柄花素是药用植物锦鸡儿的主要活性成分-异黄酮类成分^[2]。课题组前期研究显示该类成分对脑缺血损伤具有保护作用,也有研

究报道芒柄花素具有抗炎、抗氧化和抗癌作用^[3-4],并且在多种神经疾病中具有保护特性,如阿尔茨海默病^[5]、创伤性脑损伤^[6]、焦虑和抑郁^[7]等。然而,芒柄花素在细胞糖氧剥夺/复氧复糖(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)损伤的作用还有待深入研究。多聚 ADP 核糖聚合酶 1[poly(ADP-ribose) polymerase 1, PARP1]可由 DNA 损伤激活,能促进聚合物 PAR 的形成。在脑缺血再灌注大鼠模型中,抑制 PARP1 和凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)核易位可抑制神经细胞的死亡^[8],但是,芒柄花素在 PARP1 信号通路的作用尚不清楚。因此,本研究通过建立 OGD/R 细胞损伤模型,基于 PARP1 通路探究芒柄花素在 OGD/R 损伤中的作用,为运用锦鸡儿异黄酮治疗脑缺血再灌注损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 芒柄花素(HY-N0183, MedChemExpress, 美国); PARP1 抑制剂 PJ34(HY-13688A, MedChemExpress, 美国); PARG 抑制剂 Ethacridine lactate(HY-B2174, MedChemExpress, 美国); RIPA 细胞裂解液(C1053, 北京普利莱基因技术有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒(E-BC-K318-M, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); P53 抗体(AF0879, 江苏亲科生物研究中心有限公司); AIF 抗体(17984-1-AP, 武汉三鹰生物技术有限公司); β -Actin 抗体(HC201, 北京全式金生物技术有限公司); PARP1 抗体(13371-1-AP, 武汉三鹰生物技术有限公司); PARG 抗体(DF13517, 江苏亲科生物研究中心有限公司); Iduna 抗体(bs-11669R, 北京博奥森生物技术有限公司); Cy3 Goat Anti-Mouse IgG(H + L)(AS008, 武汉爱博泰克生物技术有限公司)。

1.2 细胞培养和糖氧剥夺/复氧复糖 小鼠 HT22 神经元细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司, CL-0697)在添加 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 1% P/S 的 DMEM 培养基中,并在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,每 3 d 更换 1 次细胞培

2023-07-07 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82160850);贵州省科技计划项目(编号:黔科合基础[2020]1Z071)

作者单位:¹ 贵州中医药大学第一临床医学院, 贵阳 550001

² 贵州中医药大学研究生院, 贵阳 550002

³ 贵州中医药大学第一附属医院神经内科, 贵阳 550001

作者简介:郁 丽,女,硕士研究生;

何前松,男,博士,教授,硕士生导师, E-mail: hqs0820@126.com

培养基。将 HT22 细胞接种 24 h 后进行 OGD/R 实验。将 HT22 细胞原培养基弃去,用无糖培养基洗涤数次后更换为无糖培养基,培养条件为 37℃、1% O₂、94% N₂ 和 5% CO₂,进行糖氧剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)6 h 后,更换为正常培养基在 95% 空气和 5% CO₂ 中 37℃ 进行复氧复糖 1、2、3、24 h。采用 Western blot 检测复氧不同时间(1、2、3、24 h)后细胞内 PARP1 和 PARG 蛋白表达情况,确定后续实验条件;确定 OGD/R 时间点后,设置 6 个组,分别为对照组、对照组 + 芒柄花素组、OGD/R 组、OGD/R + 芒柄花素组、OGD/R + PJ34 组、OGD/R + PARG 抑制剂组;对照组 HT22 细胞正常培养,不进行 OGD/R 处理。OGD/R + 芒柄花素(10 μmol/L)、OGD/R + PJ34(10 μmol/L)和 OGD/R + Ethacridine lactate(7.5 μmol/L)处理组在 OGD/R 后进行加入对应浓度药物进行孵育。

1.3 免疫荧光 各组细胞培养结束后,细胞于培养皿中用 4% 多聚甲醛固定,PBS 洗涤,每次 5 min,PBS 浸洗培养皿 3 次,每次 5 min,移液枪吸干 PBS,在培养皿内滴加 5% BSA,37 度封闭 30 min;弃封闭液,培养皿加入的稀释好的一抗(P53、AIF, 1:200),4℃ 孵育过夜;PBS 洗涤,加入稀释好的荧光二抗 Cy3(1:200),37℃ 孵育 30 min,PBS 浸洗培养皿 3 次,每次 5 min;滴加 DAPI 避光孵育 5 min,对本标进行染核,用流水冲洗多余的 DAPI;用 50% 甘油封闭培养皿,然后在荧光显微镜(奥林巴斯 CKX53 倒置荧光显微镜,北京瑞科中仪科技有限公司)下观察细胞采集图像。

1.4 Western blot 检测 取各组细胞,弃去培养基,用 RIPA 裂解液提取总蛋白,12 000 r/min 高速离心机 4℃ 离心 10 min,取上清液,BCA 蛋白定量试剂盒对总蛋白进行定量。对蛋白样品进行变性后,进行十二烷基硫酸钠凝胶电泳(SDS-PAGE)1.5

h,后用 300 mA 恒流转膜 1 h。PVDF 膜(Merck millipore)用脱脂奶粉封闭后,与一抗(AKT、p-AKT、PARP1、PARG、Iduna)4℃ 孵育过夜,次日 PVDF 膜室温孵育二抗 2 h,用发光液浸湿 PVDF 膜,置于超高灵敏度化学发光成像系统中进行显影。使用 Image J 软件用密度法定量蛋白条带灰度值,计算目的蛋白与内参蛋白(β-Actin)灰度值的比值均值或磷酸化蛋白与非磷酸化蛋白灰度值的比值均值,进行半定量统计分析。

1.5 统计学处理 应用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计分析并作图。所有实验重复 3 次,定量结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组之间定量数值比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OGD/R 可诱导 HT22 细胞 PARP1 通路激活

为了评价 OGD/R 对 HT22 细胞 PARP1 通路的影响,采用 Western blot 检测复氧不同时间(1、2、3、24 h)后细胞内 PARP1 和 PARG 蛋白表达情况。如图 1 所示,在小鼠神经元 HT22 细胞中,与对照组相比,进行糖氧剥夺 6 h 后再进行复氧复糖培养 1、2、3 h 细胞中 PARG 表达升高($P < 0.05$),复氧复糖培养 3 h 和 24 h 时细胞中 PARP1 表达升高($P < 0.05$)。综合来看,在 OGD/R 3 h 时,HT22 细胞中 PARP1/PARG 通路激活最明显,后续实验条件确定为 OGD/R 3 h。

2.2 芒柄花素及 PARP1 通路抑制剂处理对 HT22

细胞 OGD/R 损伤后 P53 和 AIF 表达影响 免疫荧光结果如图 2 所示,DAPI 染出来的细胞核在紫外线的激发下为蓝色,阳性表达为相应荧光素标记的红光。与对照组相比,芒柄花素组细胞中 p53 和 AIF 表达无明显差异变化,OGD/R 组细胞中 p53 和 AIF

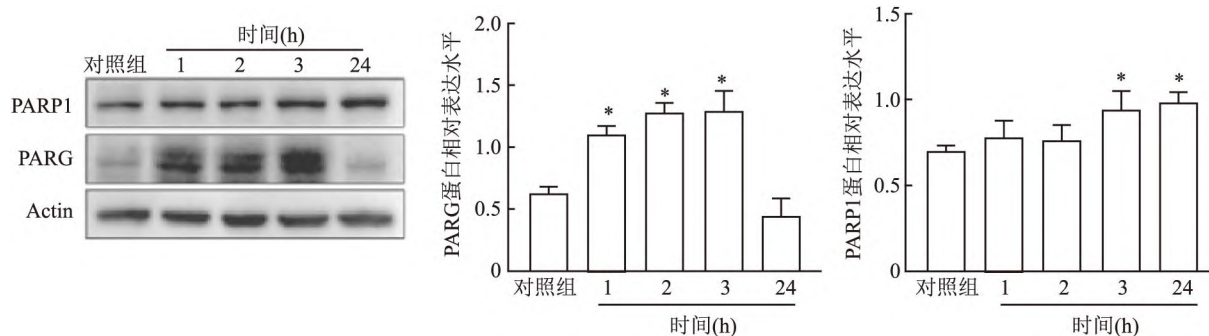


图 1 Western blot 检测 HT22 细胞 OGD/R 不同时间 PARP1 和 PARG 蛋白表达水平

与对照组比较;* $P < 0.05$

表达均升高($P < 0.05$);而在 OGD/R 后加入芒柄花素、PARP1 抑制剂 PJ34、PARG 抑制剂 Ethacridine lactate 孵育后,HT22 细胞中 AIF、p53 表达下降。这表明芒柄花素、PARP1 抑制剂 PJ34、PARG 抑制剂 Ethacridine lactate 均可降低 OGD/R 诱导的神经元细胞中 AIF、p53 表达(免疫荧光量化分析见图 3)。

2.3 芒柄花素对 HT22 细胞 OGD/R 损伤后 PARP1 通路的影响 如图 4 所示,与对照组相比,HT22 细胞经 OGD/R 后,细胞中 AKT 蛋白磷酸化比值下降($P < 0.05$),Iduna 蛋白表达下降($P < 0.05$),PARG 和 PARP1 蛋白表达量升高($P < 0.05$)。与 OGD/R 组细胞相比,在 OGD/R 后加入芒柄花素或 PARG 抑制剂 Ethacridine lactate 孵育后,细胞中 AKT 蛋白磷酸化比值上升($P < 0.05$),

Iduna 蛋白表达上升($P < 0.05$),PARG 和 PARP1 蛋白表达量均下降($P < 0.05$);细胞 OGD/R 后加入 PARP1 抑制剂 PJ34 孵育,细胞中 p-AKT 和 Iduna 蛋白表达量上升($P < 0.05$),而 PARG 和 PARP1 蛋白表达量均下降($P < 0.05$)。这表明芒柄花素可通过抑制 PARP1/PARG 通路对 OGD/R 诱导的神经元损伤进行保护。

3 讨论

本研究中,PARP1 在 OGD/R 诱导的神经元损伤的调控中发挥了关键作用。PARP1 及 PARG 在 OGD/R 条件下均上调,在复氧复糖 3 h 时达到高峰,但在 24 h,PARG 表达发生回降。在 OGD/R 后使用芒柄花素、PARP1 抑制剂 PJ34 或 PARG 抑制剂

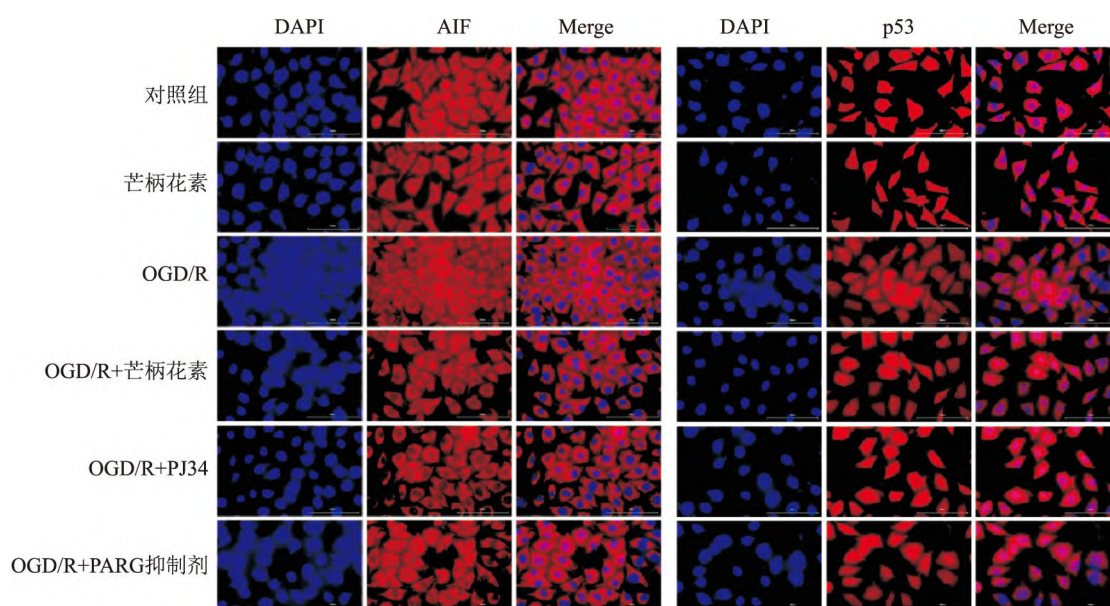


图2 免疫荧光检测 HT22 细胞 P53、AIF 蛋白表达情况 $\times 400$

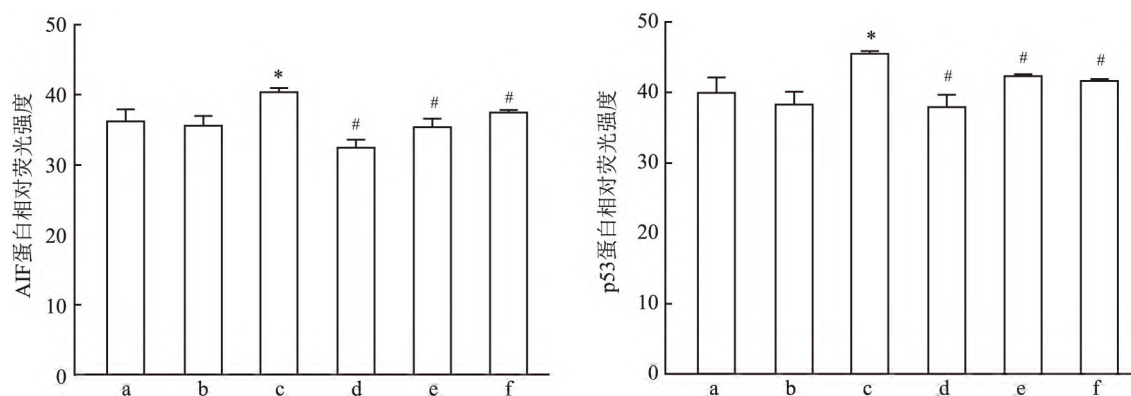
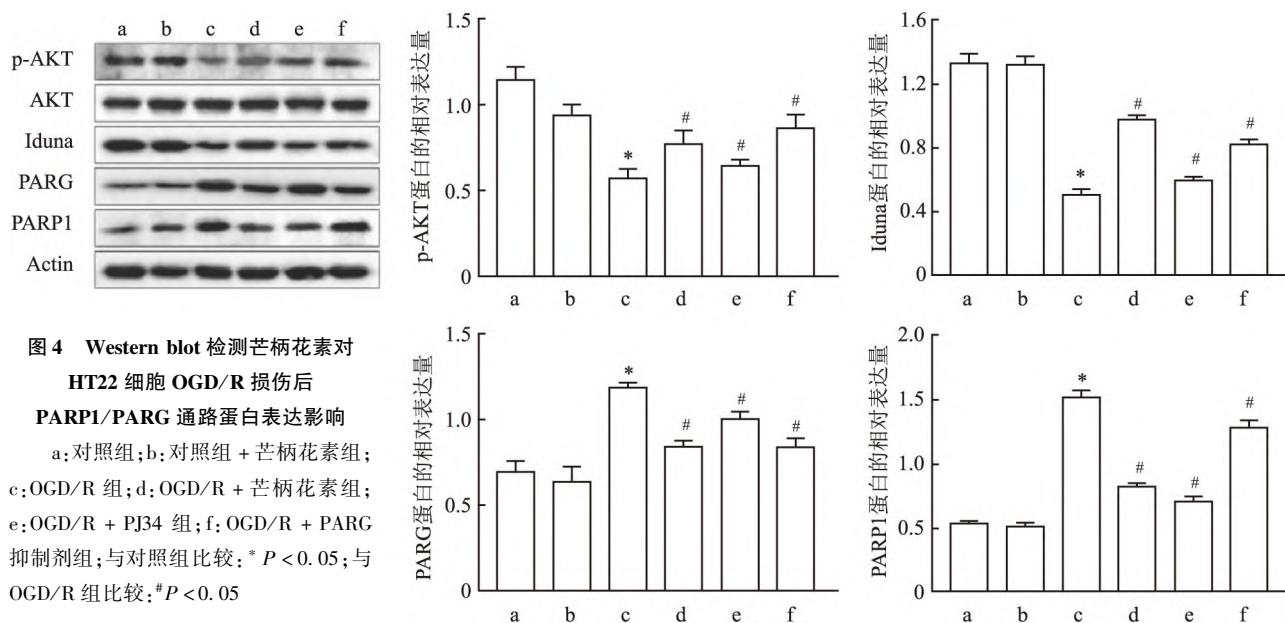


图3 免疫荧光检测 HT22 细胞 P53、AIF 蛋白表达差异性分析

a:对照组;b:对照组 + 芒柄花素组;c:OGD/R 组;d:OGD/R + 芒柄花素组;e:OGD/R + PJ34 组;f:OGD/R + PARG 抑制剂组;与对照组比较: * $P < 0.05$;与 OGD/R 组比较: # $P < 0.05$



Ethacridine lactate 孵育细胞,均可有效抑制 HT22 细胞 OGD/R 损伤后凋亡因子 P53 和 AIF 表达,并抑制 PARP1 信号通路相关蛋白表达。表明芒柄花素可通过抑制 PARP1 信号通路参与 HT22 小鼠神经元细胞凋亡的调控。

PARP1 是多聚 ADP 核糖聚合酶的一种,主要负责 DNA 链缺口和断链轻度激活后染色体 DNA 修复,然而,过度活化的 PARP1 可以将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)转化为长 PAR 聚合物,从细胞核转移到细胞质后产生细胞毒性作用,PAR 聚合物可诱导 AIF 从线粒体外膜池释放,加剧细胞凋亡的联级反应,同时多聚 ADP 核糖甘油水解酶 PARG 将 ADP 核糖从蛋白上降解^[9]。PARP1 在缺血再灌注表达后上调,抑制 PARP1 信号通路对缺血再灌注损伤具有保护作用^[10]。在本研究中,OGD/R 诱导的 HT22 小鼠神经元细胞中 PARP1 在复氧复糖 3、24 h 后均升高,PARG 在 OGD/R 条件下以时间依赖性上调,但在 24 h 表达下降(图 1),故本研究选择 OGD/R 3 h 作为后续研究实验条件。另外,本研究中在 OGD/R 条件下,HT22 细胞中除了 PARP1 和 PARG 被激活,凋亡诱导因子 AIF 和 P53 表达升高,而芒柄花素与 PARP1 抑制剂 PJ34 和 PARG 抑制剂 Ethacridine lactate 效果一致,均抑制了 PARP1 和 PARG,同时部分逆转了 AIF 和 P53 的累积,而挽救了细胞的凋亡。这表明芒柄花素可通过抑制 PARP1 和 PARG 激活而抑制 OGD/R 诱导的 HT22 小鼠神经元细胞发生凋亡。

Iduna 是一种 PAR 聚合物依赖的 E3 泛素连接酶,调节 DNA 损伤,Iduna 对 PARP1 的 OAR 依赖泛

素化靶向其进行蛋白酶体降解,通过 PAR 结合和泛素 E3 连接酶活性,Iduna 保护细胞免受 DNA 损伤剂诱导的细胞死亡^[11]。Iduna 可通过抑制 PARP1 诱导的细胞死亡来保护 HT22 细胞免受过氧化氢诱导的氧化应激^[12]。本研究显示在 OGD/R 条件下,HT22 细胞中 Iduna 蛋白表达水平下降,经芒柄花素或 PARG 抑制剂 Ethacridine lactate 孵育后可部分逆转,但 PARP1 抑制剂 PJ34 却没有这种效果。这表明芒柄花素是通过上调 Iduna 来抑制 OGD/R 诱导的 PARP1 表达而减轻 HT22 小鼠神经元细胞损伤。

有研究^[13]说明芒柄花素通过激活 AKT 磷酸化蛋白介导对大鼠脑缺血/再灌注的神经保护作用,本研究结果与之一致。本研究显示芒柄花素处理 OGD/R 后的 HT22 细胞可升高 p-AKT 蛋白磷酸化比值,同时,在此研究中,PARP1 抑制剂 PJ34 和 PARG 抑制剂 Ethacridine lactate 处理可使 OGD/R 后的 HT22 细胞中 p-AKT 比值升高。这表明芒柄花素可通过抑制 PARP1 通路来激活 AKT 的磷酸化而抑制 OGD/R 诱导的 HT22 细胞凋亡。

综上所述,本研究结果显示 HT22 小鼠神经元细胞在 OGD/R 条件下,芒柄花素可通过提高 Iduna 蛋白表达抑制 PARP1/AIF/Akt 信号通路来减轻 HT22 小鼠神经元细胞损伤。这些结果为开发运用锦鸡儿异黄酮治疗脑缺血再灌注损伤提供了依据,后续可在体内动物模型研究中进一步证明这一机制,以排除体外研究的局限性。

参考文献

- [1] Wu M Y, Yang G T, Liao W T, et al. Current mechanistic con-

- cepts in ischemia and reperfusion injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1650–67.
- [2] Křížová L, Dadáková K, Kašparovská J, et al. Isoflavones [J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1076.
- [3] Tay K C, Tan L T, Chan C K, et al. Formononetin: a review of its anticancer potentials and mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:820.
- [4] Tian J, Wang X Q, Tian Z. Focusing on formononetin: recent perspectives for its neuroprotective potentials [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 905898.
- [5] Fei H X, Zhang Y B, Liu T, et al. Neuroprotective effect of formononetin in ameliorating learning and memory impairment in mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82(1): 57–64.
- [6] Li Z, Zeng G, Zheng X, et al. Neuroprotective effect of formononetin against TBI in rats *via* suppressing inflammatory reaction in cortical neurons [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 349–54.
- [7] Zhang C, Zhu L, Lu S, et al. The antidepressant-like effect of formononetin on chronic corticosterone-treated mice [J]. *Brain Res*, 2022, 1783: 147844.
- [8] Wang Z, Qiu Z, Hua S, et al. Nuclear Tkt promotes ischemic heart failure *via* the cleaved Parp1/Aif axis [J]. *Basic Res Cardiol*, 2022, 117(1): 18.
- [9] Alemasova E E, Lavrik O I. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(8): 3811–27.
- [10] Liu S, Luo W, Wang Y. Emerging role of PARP-1 and Parthanatos in ischemic stroke [J]. *J Neurochem*, 2022, 160(1): 74–87.
- [11] Koo J H, Yoon H, Kim W J, et al. Cell-penetrating function of the poly (ADP-ribose) (PAR)-binding motif derived from the PAR-dependent E3 ubiquitin ligase iduna [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 779.
- [12] Xu H, Li X, Wu X, et al. Iduna protects HT22 cells by inhibiting parthanatos; the role of the p53-MDM2 pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 384(1): 111547.
- [13] Liang K, Ye Y, Wang Y, et al. Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats *via* downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Neurol Sci*, 2014, 344(1–2): 100–4.

The effect of formononetin on the neuron cell damage of oxygen-glucose deprivation/reoxygenation was studied based on the PARP1 signaling pathway

Yu Li^{1,2}, Wang Mei^{1,2}, Wang Wenxiu³, Cao LiPing³, He QianSong^{1,3}

(¹First Clinical Medicine College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001;

²Graduate School of Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550002; ³Dept of Neurology,

The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001)

Abstract Objective To study the effect of formononetin on the cell damage of glucose/oxygen deprivation/reoxygenation glyconeurons *via* the PARP1 signaling pathway, and to offer theoretical support for the use of Caragana isoflavones in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods** In mouse neurons (HT22), a model of Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) was created. Western blot was used to detect the expression of PARP1 and PARG in HT22 neurons at various time points of glucose-oxygen deprivation/reoxygenation, and the optimal time point of pathway modification was chosen. After OGD/R, HT22 cells were treated with formononetin, PARP1 inhibitor (PJ34), and PARG inhibitor, and six groups were developed: control group, control group + formononetin group, OGD/R group, OGD/R + formononetin group, OGD/R + PJ34 group, OGD/R + PARG inhibitor group. HT22 cells were grown normally without OGD/R therapy in the control group. The expression levels of apoptotic factors and associated proteins in each group were determined using immunofluorescence and Western blot. **Results** PARP1 pathway was activated most obviously in HT22 cells after 3 hours of glucose and oxygen deprivation/reoxygenation. Under the condition of OGD/R 3 h, treatment with formononetin, PJ34 or PARG inhibitor could increase E3 ubiquitin ligase (Iduna), inhibit the expression of PARP1 and PARG pathway proteins, reduce the expression of AIF and P53, and increase the phosphorylation level of AKT protein. **Conclusion** Formononetin can block the PARP1/AIF/Akt signaling pathway by raising the expression of Iduna protein in the presence of OGD/R, hence decreasing the damage to HT22 mouse neurons.

Key words formononetin; OGD/R; neuronal injury; PARP1 signaling pathways