

· 基础研究 ·

脊髓康通过 IRE1-XBP1 通路抑制内质网应激诱导的 PC12 细胞凋亡

涂鹏程^{1,2} 郭 杨^{1,2} 马 勇^{1,2,3} 王 磊^{1,2} 黄桂成^{1,2} 吴承杰^{1,2} 潘娅岚^{1,4}

摘要 目的 基于 IRE1-XBP1 通路探究脊髓康(JSK)抑制内质网应激(ERS)诱导的 PC12 细胞凋亡的作用及机制。方法 利用神经生长因子(NGF)诱导 PC12 细胞为神经元样细胞并通过流式细胞技术鉴定;诱导后细胞分为空白组(无干预措施)、模型组[2 $\mu\text{mol/L}$ 毒胡萝卜素(TG)]、脊髓康组(2 $\mu\text{mol/L}$ TG 及 0.0521 g/mL JSK 水提物冻干粉,合生药 0.625 g/mL);CCK8 法检测各组细胞 24、48、72 h 增殖活性,流式细胞技术检测各组细胞凋亡状态,Western Blot 与 q-PCR 检测 1 型内质网转膜蛋白激酶(IRE1)、X 盒结合蛋白 1(XBP1)、葡萄糖调节蛋白 78(Grp78)及 C/EBP 同源蛋白(CHOP)的蛋白及 mRNA 表达情况,透射电镜扫描各组细胞观察细胞及内质网形态学特征。结果 与空白组比较,模型组 NGF 诱导的神经元样 PC12 细胞增殖活性显著降低($P<0.05$),晚期凋亡明显增高($P<0.01$),电镜扫描显示其细胞粗面内质网结构肿胀,囊泡化,呈典型的细胞凋亡形态;Grp78、CHOP 蛋白表达显著升高($P<0.05$),XBP1 及 IRE1 蛋白表达也有微微上调,但差异无统计学意义($P>0.05$);Grp78、CHOP、XBP1 及 IRE1 mRNA 表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,JSK 组 24、48、72 h PC12 细胞增殖活性升高($P<0.05$),晚期凋亡及早期凋亡均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);Grp78、CHOP 的蛋白及 mRNA 表达均降低($P<0.05$),XBP1 及 IRE1 蛋白及 mRNA 表达明显上调($P<0.05$)。透射电镜观察 JSK 组内质网结构仍存在,存在完整的外膜,内质网膜破损较轻,可见部分凋亡形态学改变。结论 JSK 可能通过活化 IRE1-XBP1 途径改善 TG 诱导的内质网应激状态,从而抑制 ERS 导致的神经元样 PC12 细胞凋亡,这可能是其有效改善脊髓损伤后神经元功能修复的机制。

关键词 脊髓损伤;脊髓康;内质网应激;IRE1-XBP1 信号通路;神经元凋亡

Jisuikang Inhibited the Apoptosis of PC12 Cells Induced by Endoplasmic Reticulum Stress Through the IRE1-XBP1 Pathway

TU Peng-cheng^{1,2}, GUO Yang^{1,2}, MA Yong^{1,2,3}, WANG Lei^{1,2}, HUANG Gui-cheng^{1,2}, WU Cheng-jie^{1,2}, and PAN Ya-lan^{1,4} 1 Institute of Traumatology & Orthopedics and Laboratory of New Techniques of Restoration & Reconstruction of Orthopedics and Traumatology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023); 2 Department of Traumatology & Orthopedics, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210029); 3 School of Chinese Medicine, School of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023); 4 Nursing Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210029)

ABSTRACT Objective To investigate the role and mechanism of Jisuikang (JSK) in inhibiting endoplasmic reticulum stress induced PC12 cell apoptosis based on IRE1-XBP1 pathway. **Methods** PC12 cells were induced by nerve growth factor (NGF) and evaluated by flow cytometry to determine the purity of cells. After induction, the cells were divided into control group (no intervention measures), model group [2 $\mu\text{mol/L}$ toxic thapsigargin (TG)], and JSK group [(2 $\mu\text{mol/L}$ TG and 0.0521 g/mL freeze-dried powder

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81573997);国家自然科学基金青年基金项目(No. 81704100);江苏高校“青蓝工程”资助项目(No. 苏教师[2018]12号);2018年江苏省研究生科研创新计划(No. KYCX18_1546);江苏高校优势学科(中西医结合)建设工程资助项目(No. 苏政办发[2018]87号)

作者单位:1. 南京中医药大学骨伤修复与重建新技术实验室(南京 210023); 2. 南京中医药大学附属医院骨科(南京 210029); 3. 南京中医药大学中医学院·中西医结合学院(南京 210023); 4. 南京中医药大学中西医结合护理研究所(南京 210029)

通讯作者:马 勇, Tel: 025-85811985, E-mail: zhongyi-my@263.net

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200614. 071

of JSK water extract (equal to 0.625 g/mL crude drugs)]. The proliferation activity of cells in each group for 24, 48 and 72 hours was detected by CCK8, the apoptotic rate of cells was analyzed by flow cytometry, the protein and mRNA expressions of inositol requiring enzyme-1 (IRE1), X-box binding protein 1 (XBP1), glucose regulated protein 78 (Grp78), C/EBP-homologous protein (CHOP) were detected by Western Blot and q-PCR, and the morphological characteristics of cells and endoplasmic reticulum were observed by transmission electron microscopy. **Results** Compared with the control group, the proliferation activity of NGF-induced neuron-like PC12 cells in the model group was significantly reduced ($P < 0.05$), and the late apoptosis was significantly increased ($P < 0.01$). Rough endoplasmic reticulum was swollen, vesiculated and showed typical apoptotic morphology. The expressions of Grp78 and CHOP were significantly increased ($P < 0.05$), and the expressions of XBP1 and IRE1 were also slightly up-regulated, but no statistically significant ($P > 0.05$). Grp78, CHOP, XBP1 and IRE1 mRNA expressions were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the proliferation activity of PC12 cells in JSK group for 24, 48, and 72 hours increased ($P < 0.05$), and the late and early apoptosis were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expressions of Grp78 and CHOP proteins and mRNA were decreased ($P < 0.05$), and the expressions of XBP1 and IRE1 proteins and mRNA were significantly up-regulated ($P < 0.05$). The structure of endoplasmic reticulum in JSK group was observed by transmission electron microscopy, with intact outer membrane, light damage of endoplasmic reticulum and morphological changes. **Conclusion** JSK may activate the IRE1-XBP1 pathway to improve the TG-induced ERS state, thereby inhibiting the apoptosis of neuron-like PC12 cells induced by ERS, which may be the mechanism of its effective improvement of neuronal functional repair after spinal cord injury.

KEYWORDS spinal cord injury; Jisui kang; endoplasmic reticulum stress; IRE1-XBP1 signaling pathway; neuronal apoptosis

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是脊柱外科和神经科学领域的一种严重的运动系统致残性疾病, 目前尚缺乏有效的治疗方法^[1,2]。SCI 后原发部位的脊髓坏死往往难以逆转, 但由局部内微循环障碍或炎症级联反应等因素导致的继发性损伤却是可以改善的^[3]。大量实验研究证实, 急性 SCI 后脊髓损伤区域存在广泛的神经元凋亡现象^[4,5], 而组织缺血、低氧、氧化应激等刺激诱导的内质网应激是其中重要因素之一^[6,7]。内质网稳态失衡后, 未折叠蛋白蓄积, 细胞产生应激反应, 激活相关凋亡信号通路, 引起程序性的神经元死亡^[8,9]。同时, 细胞也会反馈性的启动自我保护程序, 即“未折叠蛋白反应” (unfolded protein response, UPR), 通过内质网感应蛋白 [1 型内质网转膜蛋白激酶 (inositol requiring enzyme-1, IRE1)、蛋白激酶样内质网激酶 (protein kinase RNA-Like ER kinase, PERK)、活化转录因子 6 (an activating transcription factor 6, ATF6)] 与内稳态感受器葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, Grp78) 解离, 激活内质网中的一系列促生存机制^[9-11]。其中 IRE1-XBP1 (X-box binding protein 1, X 盒结合蛋白 1) 信号通路是 UPR 反应中最关键的一条信号之一, XBP1 剪接活化能够促进 ERS 多种分子伴侣基因的转

录、翻译, 促进蛋白质的正确折叠, 减轻内质网压力^[12]。

脊髓康 (JSK) 是中医治疗 SCI 的临床验方^[13], 前期研究显示其能够抑制一氧化氮合酶的表达, 减少一氧化氮和肿瘤坏死因子水平, 降低超氧化物歧化酶活性, 改善损伤区域炎症微环境, 抑制脊髓损伤部位继发性改变^[14]; 还能通过上调脑源性神经营养因子及神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 表达促进 SCI 后的神经修复^[15]。但目前尚无研究证实 JSK 能够通过调节内质网应激改善 SCI 后继发性神经元损伤, 基于此, 笔者设计实验利用 JSK 冻干粉处理毒胡萝卜素 (thapsigargin, TG) 诱导的 PC12 细胞神经元内质网应激模型, 观察 JSK 对 PC12 细胞的保护作用及内质网应激相关分子的影响。

材料与方法

1 细胞 PC12 细胞系购买于江苏凯基生物技术有限公司, 1×10^6 /瓶 (批号: #KG111)。

2 药物 脊髓康, 国家发明专利: ZL200910026193。组成: 生黄芪 30 g 当归 12 g 丹参 20 g 川芎 10 g 赤芍 12 g 水蛭 10 g 制大黄 10 g 泽泻 10 g 茯苓 10 g 枳实 10 g 厚朴 10 g 肉苁蓉 10 g 车前子 15 g 麝香 10 g 淫羊藿

10 g 蜈蚣 1 条,均购自南京中医药大学附属医院(江苏省中医院)药剂科。JSK 冻干粉制作如下:JSK 单倍处方量生药(200 g)经煎煮滤过,75%乙醇萃取后,浓缩至含生药 2 g/mL,经活性炭脱色,-80 ℃冻存 24 h 后经冷冻干燥机冻干成粉末(得 16.68 g),置于-80 ℃冰箱中保存使用,并按前期研究中^[14,15]有效给药量换算成冻干粉浓度(0.0521 g/mL)溶解并经滤过后实验。

3 试剂及仪器 F-12K 培养基(BOSTER, 美国,批号:#pyg0056),胎牛血清(Life Technology, 美国,批号:#10099141),NGF(博奥森,中国北京,批号:#bs-0073p),Alexa Fluor 488 Anti-NSE(神经元特异性烯醇化酶,neuronspecific enolase,批号:#ab53025) antibody、Alexa Fluor 647 微管结构蛋白(microtubule associated protein 2,MAP2,批号:#ab134124) antibody 购自美国 Abcam 公司,TG(Thermo Fisher, 美国,批号:#bp629-1),CCK8 试剂盒(Biosharp, 安徽,批号:#bs350b),Annexin V-FITC 凋亡试剂盒(碧云天,中国上海,批号:#c1062s),XBP1、IRE1、Grp78、C/EBP 同源蛋白(C/EBP-homologous protein,CHOP)抗体购自美国 Abcam 公司(批号:#ab37152,批号:#ab37073,批号:#sc-376768,批号:#ab179823),反转录试剂盒、Rt-qPCR 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司(批号:#RR036A,批号:#RR820A),钨酸固定液、电镜包埋液、醋酸铀及枸橼酸铅购自美国 SPI 公司。主要仪器:冷冻干燥机(Labconco, 美国),流式细胞仪(Beckman, 美国),多功能酶标仪(Perkin Elmer, 美国),化学发光成像仪(GE Healthcare, 美国),PCR 自动化分析仪(ABI, 美国)由公司生产,透射电镜(JEOL, 日本),WB 设备(Bio-Rad, 美国)。

4 PC12 细胞培养、诱导分化、鉴定与实验分组 PC12 细胞培养于 37 ℃、5% CO₂ 条件下,10% FBS、1% 双抗的 F-12K 培养基中,利用 NGF (50 μg/L)进行诱导分化^[16,17]。流式细胞术鉴定:经 NGF 诱导分化 5 天,PC12 细胞长出长突起,胰酶消化收集细胞,预冷 PBS 漂洗后,调节浓度 2~10×10⁶/mL,分为 2 组、每组 3 管、每管 100 μL,一组加入 Alexa Fluor 488 Anti-NSE antibody 5 μL、一组加入 Alexa Fluor 647 MAP2 antibody 5 μL,混匀,4 ℃孵育 1 h 后,冷 PBS 洗涤 2 次,重悬后流式细胞仪进样检测。

将 PC12 诱导分化的神经元细胞分为 3 组:空白对照组:普通培养基培养;模型组:培养基中添加 2 μmol/L TG;JSK 组:培养基中同时添加了 2 μmol/L TG 及 0.0521 g/mL JSK 冻干粉(合生药 0.625 g/mL)。

5 CCK8 检测各组神经元样 PC12 细胞增殖状态 PC12 细胞诱导分化后,以 4×10⁴/well 接种 96 孔培养板,按实验分组,每组 5 孔,分别培养 24、48、72 h 后,采用 CCK8 法检测神经元样细胞增殖活性。CCK8 法:吸弃原培养基,加入普通培养基 100 μL 及 10 μL 的 CCK-8 溶液,37 ℃、5% CO₂ 孵育 3 h,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

6 流式细胞术检测各组神经元样 PC12 细胞凋亡情况 PC12 细胞诱导分化后,以 1×10⁶/well 接种至六孔板,按上述实验分组给药干预 48 h 后消化收集细胞,预冷的 PBS 离心漂洗 2 次,100 μL 结合缓冲液悬浮细胞,加入 MAP 2 5 μL 混匀,避光暗室孵育 1 h;加入 Annexin V-FITC 5 μL,室温避光孵育 10 min 后,结合缓冲液离心洗涤 3 次,190 μL 结合缓冲液重悬细胞,加入 10 μL (20 μg/mL) PI(终浓度 1 μg/mL)混匀,5 min 后上流式细胞仪进样检测,重复 3 次。

7 Western Blot 法检测 XBP1、IRE1、Grp78、CHOP 的蛋白表达 PC12 细胞诱导分化后,按上述实验分组给药干预 48 h 后, RIPA 裂解液(含 1% PMSF)裂解细胞,离心收集上清液,BCA 法测各组总蛋白的含量;取相等量总蛋白加入 loading buffer 后经沸水浴变性,聚丙烯酰胺凝胶恒压电泳,转印至 PVDF 膜。膜经过 5% 脱脂奶粉封闭后分别加入 XBP1、IRE1、Grp78、CHOP 一抗稀释液(1:1 000) 4 ℃过夜孵育,再经二抗(1:10 000)孵育后,加 ECL 发光液于凝胶成像系统下曝光成像。

8 实时定量 PCR 检测 XBP1、IRE1、Grp78、CHOP 的 mRNA 表达 PC12 细胞诱导分化的神经元细胞,按上述实验分组给药干预 48 h 后收集细胞,柱提法提取总 RNA,采用 TaKaRa PrimeScriptTMRT Master Mix 反转录试剂盒对每组提取的总 RNA 进行反转录,以大鼠 GAPDH 为内参,利用 TaKaRa TB Green Premix Ex Taq II PCR 试剂盒,使用 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System 进行 PCR 反应,收集各组 RNA 反应 CT 值,通过计算 2^{-ΔΔCt} 对 XBP1、Grp78、IRE1、CHOP 数据进行相对定量分析。具体引物序列见表 1。

9 透射电镜观察内质网显微结构 PC12 细胞诱导分化的神经元细胞,按实验分组给药干预 48 h 后收集细胞,洗涤后经钨酸固定液(1%)固定,梯度浓度乙醇脱水,丙酮与包埋液浸润包埋,固化,再经过 3% 的醋酸铀-枸橼酸铅双重染色。在透射电子显微镜下观察细胞显微结构,拍片,对细胞内质网结构进行观察评估。

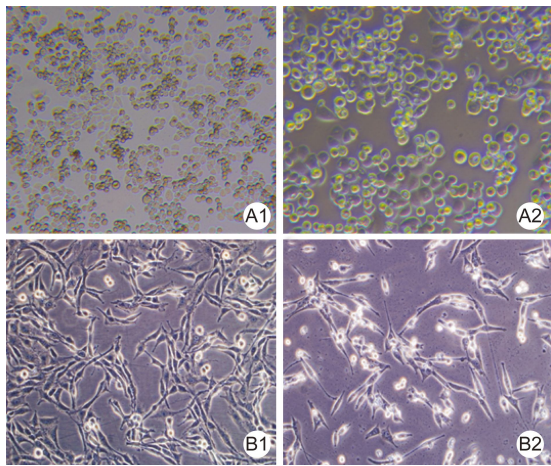
表 1 引物序列

蛋白	引物序列	引物大小 (bp)
GAPDH	上游: 5'-GACATGCCGCTGGAGAAAC-3'	92
	下游: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	
XBP1	上游: 5'-GAGTGCAAGTCCGTTTCCTC-3'	196
	下游: 5'-AAGGGAGGCTGGTAAGGAAC-3'	
IRE1	上游: 5'-TCGAGCATTAGCAACGC-3'	166
	下游: 5'-TTACGCAGTTCAGTAGG-3'	
Grp78	上游: 5'-CCCCAACTGGTGAAGAGGAT-3'	95
	下游: 5'-CCCCAAGACATGTGAGCAAC-3'	
CHOP	上游: 5'-ACCACCACACTGAAAGCAG-3'	83
	下游: 5'-AGCTGGACACTGTCTCAAAG-3'	

10 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件,实验数据计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差别比较采用单因素方差分析和 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

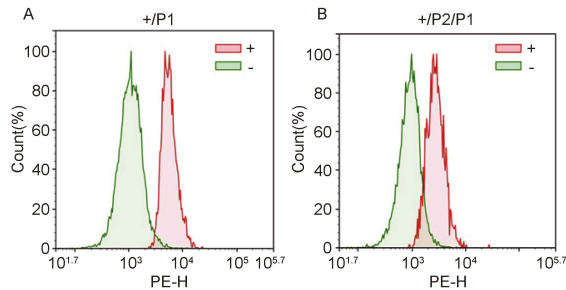
1 经 NGF 诱导的神经元样 PC12 细胞鉴定(图 1、2) 使用倒置显微镜观察经 NGF 培养 7 天后的 PC12 细胞,可见 PC12 细胞胞体呈三角形、梭形,突起较前明显变长,贴壁样生长,已具有神经元样形态。使用流式细胞测定 MAP2 和 NSE 表达阳性率,结果显示 MAP2 平均阳性率为 $(62.54 \pm 1.00)\%$,NSE 平均阳性率为 $(93.32 \pm 2.87)\%$,表明经 NGF 诱导后的 PC12 细胞已具有神经元样表型改变,可供后续实验使用。



注:A 为 PC12 细胞;B 为 NGF 诱导后的神经元样细胞;
1 放大倍数为 40; 2 放大倍数为 100

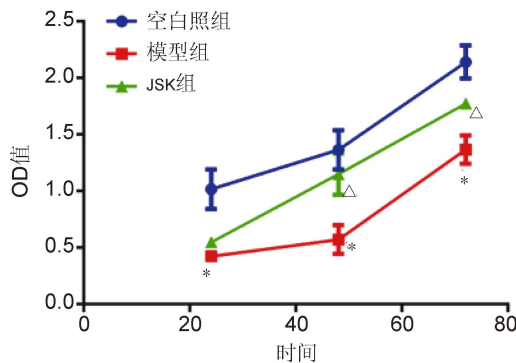
图 1 PC12 细胞及 NGF 诱导分化后的神经元样细胞

2 各组 PC12 细胞增殖比较(图 3) 与空白组比较,模型组 24、48、72 h OD 值均降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,JSK 干预 24、48、72 h 后 OD 值均显著增高 ($P < 0.05$)。



注:A 为 NES 流式细胞检测结果;B 为 MAP2 流式细胞检测结果

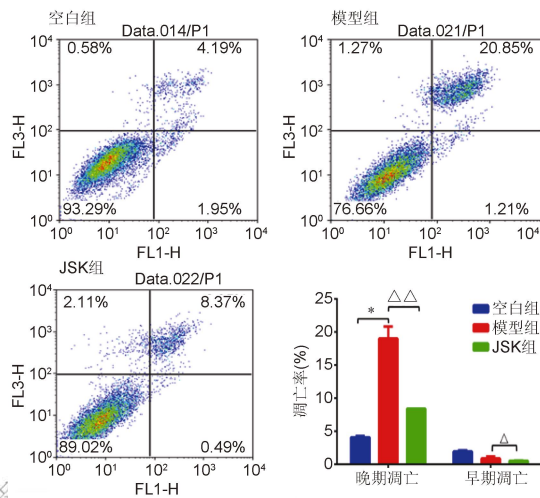
图 2 MAP2 和 NSE 表达的阳性率



注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,
 $\Delta P < 0.05$

图 3 各组 CCK8 检测神经元样 PC12 细胞的 OD 值比较

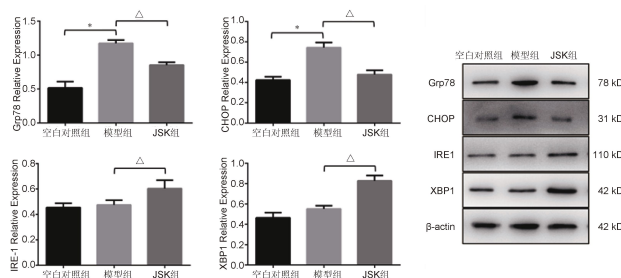
3 各组 PC12 细胞凋亡情况比较(图 4) 与空白组比较,模型组细胞的晚期凋亡率明显增高 ($P < 0.01$),与模型组比较,JSK 干预 PC12 细胞后晚期凋亡率及早期凋亡率均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 4 各组神经元样 PC12 凋亡率比较

4 各组神经元样 PC12 细胞 XBP1、IRE1、Grp78、CHOP 蛋白表达比较(图 5) 与空白组比较,模型组 Grp78、CHOP 蛋白表达显著升高($P<0.05$),XBP1 及 IRE1 蛋白表达也有微微上调,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,JSK 组 Grp78、CHOP 的蛋白表达均降低($P<0.05$),XBP1 及 IRE1 蛋白表达明显上调($P<0.05$)。



注:与空白组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$

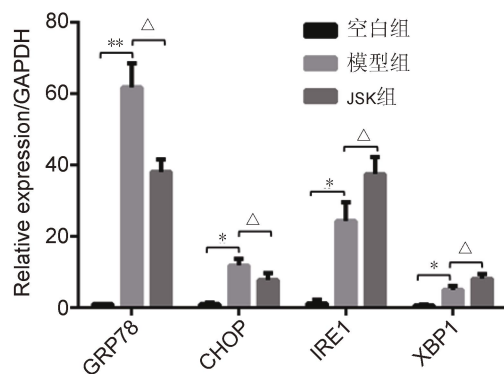
图 5 各组神经元样 PC12 细胞 Grp78、CHOP、XBP1、IRE1 蛋白表达比较

5 各组神经元样 PC12 细胞 XBP1、IRE1、Grp78、CHOP 的 mRNA 表达比较(图 6) 与空白组比较,模型组细胞 Grp78、CHOP、XBP1 及 IRE1 mRNA 表达均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,JSK 组 Grp78、CHOP mRNA 表达降低($P<0.05$),XBP1 及 IRE1 mRNA 表达均升高($P<0.05$)。

6 各组神经元样 PC12 细胞内质网显微结构比较(图 7) 使用透射电子显微镜对各组诱导后 PC12 细胞进行观察,结果显示:空白组神经元样 PC12 细胞内可见较为丰富的粗面内质网结构,细胞核体积较大并清晰可见,核仁明显(图 A、B);模型组神经元样 PC12 细胞经 TG 诱导刺激后出现粗面内质网结构明显肿胀,发生囊泡化,伴有核糖体脱落和核固缩,甚至部分可见核破碎,出现典型的细胞凋亡形态(图 C、D);经 JSK 干预后(图 E、F),神经元样 PC12 细胞的内质网肿胀、内质网膜破损较轻,未见核糖体脱落和核固缩,可见部分凋亡形态学改变,且凋亡形态学也得到改善。

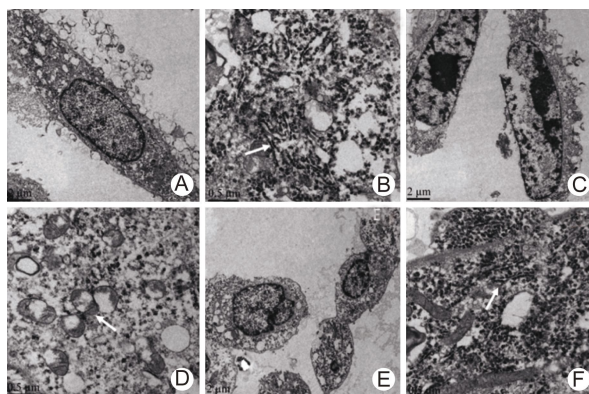
讨 论

SCI 分为原发性损伤与继发性损伤^[18]。前者是指机械力、中毒引起的如神经元坏死、轴突断裂等直接损伤;后者是在原发损伤基础上由于长期的组织缺血、炎症浸润和神经递质失衡等内环境紊乱造成的脊髓连续性丧失,持续时间长,对神经功能的破坏程度大^[19, 20]。研究发现,SCI 后损伤区域微环境的长期紊乱会激活



注:与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$ 比较

图 6 各组神经元样 PC12 细胞 XBP1、IRE1、Grp78、CHOP mRNA 表达



注:A、B 为空白组;C、D 为模型组;E、F 为脊髓康组;图中箭头所指为粗面内质网;A、C、E 放大倍数为 2 000, B、D、F 放大倍数为 10 000

图 7 各组神经元样 PC12 细胞内质网显微结构比较

残存神经元内质网应激反应,是造成 SCI 后继发性神经元凋亡的重要原因之一^[21, 22]。通常情况下内质网应激会引起大量未折叠蛋白蓄积^[23],这些异常蛋白会诱导细胞反馈性的启动保护机制—未折叠蛋白反应^[24],通过感应蛋白与 Grp78(内质网重要的驻留蛋白,内质网应激的标志分子)解离,激活一系列促生存机制;IRE1-XBP1 信号通路是其中最关键的信号通路之一^[25, 26],它与 Grp78 解离后活化后,能够对 XBP1 mRNA 进行非常规地剪接,成熟的 XBP1 mRNA 转录、翻译为转录因子,能够激活 ER 分子伴侣编码的基因进行转录、翻译,对未折叠蛋白进行正确折叠有明显的促进作用,对恢复内质网功能及细胞内环境稳态起着非常重要的作用^[27]。但 SCI 后脊髓局部缺血缺氧、毒物、细胞碎片及炎症级联等病理因素多样,长期严重的应激反应会导致内质网 UPR 生存机制崩溃,造成细胞一系列凋亡途径^[28, 29](如 Caspase-12 激酶途径、

CHOP 途径)的上调。因此,笔者设想通过刺激内质网相关因子 IRE1、XBP1 的表达,提高 UPR 效率,增强细胞对内质网应激的适应能力。

中医学将 SCI 归属为“痿证”和“体惰”,目前认为其病机为“督脉受损、邪气内阻”。JSK 是以“健脾温肾、化痰通督、疏肝理气”为治则构建的治疗脊髓损伤的临床验方,能够改善 SCI 患者神经功能的恢复情况^[13]。方中黄芪、茯苓、车前子、泽泻补气健脾利水,肉苁蓉、益智仁、淫羊藿温补肾阳,枳实、厚朴疏肝理气,大黄、虻虫、蜈蚣、水蛭、丹参、赤芍、川芎、当归活血化痰,共奏健脾温肾、化痰通督之功。实验研究显示其能够改善大鼠 SCI 损伤局部炎性微环境,促进小胶质细胞对神经元碎片的吞噬作用且能够上调 NGF 等神经生长因子分泌,促进神经元损伤修复^[30-33]。但其是否能够通过促进神经元 UPR,从而改善神经元内质网应激还未研究清楚,因此本实验研究进一步探究了 JSK 对 TG 诱导的 PC12 细胞的内质网应激的调节作用及机制。

与 Ye T 等^[34]的研究一致,本次研究表明 TG 能够刺激细胞发生 ERS,表现为 PC12 细胞 ERS 相关标志分子 Grp78、CHOP 表达显著上调。此次研究还进一步显示了 TG 诱导的 ERS 能够显著抑制 PC12 细胞的增殖活性,诱导 PC12 细胞的凋亡,同时笔者还观察到 UPR 相关信号 IRE1、XBP1 也有上调趋势,笔者推测这与细胞 ERS 状态下的反馈性保护作用相关。而 JSK 冻干粉能够显著抑制 TG 诱导的 ERS,表现为 Grp78、Chop 的蛋白及 mRNA 表达水平的下调,继而降低 PC12 细胞的凋亡率,改善其增殖活性;同时 JSK 冻干粉能够显著上调 UPR 相关信号分子 IRE1、XBP1 的蛋白及 mRNA 表达。由此笔者推测,JSK 能够改善 TG 诱导的神经元样 PC12 细胞的内质网应激及凋亡状态,而这种作用很可能与其促进 IRE1-XBP1 通路活化相关。

综上所述,JSK 能够通过促进 IRE1-XBP1 通路活化,改善 PC12 细胞内质网应激,抑制 ERS 诱导的凋亡状态,对神经元样 PC12 细胞有显著的保护作用。由于 JSK 化合物成分复杂,未来将进一步研究 JSK 复方所含各种成分化合物对脊髓损伤的保护作用,以对其改善 SCI 后脊髓神经功能恢复的机制有更科学、客观的认识。

利益冲突:无利益冲突。

参 考 文 献

[1] Eckert MJ, Martin MJ. Trauma: spinal cord injury[J].

Surg Clin North Am, 2017, 97(5): 1031-1045.

[2] Ropper AE, Ropper AH. Acute spinal cord compression[J]. N Engl J Med, 2017, 376(14): 1358-1369.

[3] Hilton BJ, Moulson AJ, Tetzlaff W. Neuroprotection and secondary damage following spinal cord injury: concepts and methods[J]. Neurosci Lett, 2017, 652: 3-10.

[4] Sabelstrom H, Stenudd M, Dias DO, et al. Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice[J]. Science, 2013, 342(6158): 637-640.

[5] Yu WR, Fehlings MG. Fas/FasL-mediated apoptosis and inflammation are key features of acute human spinal cord injury: implications for translational, clinical application[J]. Acta Neuropathol, 2011, 122(6): 747-761.

[6] Wang S, Wu J, Zeng YZ, et al. Necrostatin-1 mitigates endoplasmic reticulum stress after spinal cord injury[J]. Neurochem Res, 2017, 42(12): 3548-3558.

[7] Rong F, Gao X, Liu K, et al. Methotrexate remedies spinal cord injury *in vivo* and *in vitro* via suppression of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(5): 4191-4198.

[8] Penas C, Guzmán MS, Verdú E, et al. Spinal cord injury induces endoplasmic reticulum stress with different cell-type dependent response[J]. J Neurochem, 2007, 102(4): 1242-1255.

[9] Ohri SS, Hetman M, Whittemore SR. Restoring endoplasmic reticulum homeostasis improves functional recovery after spinal cord injury[J]. Neurobiol Dis, 2013, 58: 29-37.

[10] Valenzuela V, Oñate M, Hetz C, et al. Injury to the nervous system: A look into the ER[J]. Brain Res, 2016, 1648(Pt B): 617-625.

[11] Qi B, Sun R, Rong J, et al. Cyclic adenosine phosphate improves functional recovery after spinal cord injury via activating unfolded protein response[J]. Pharmazie, 2019, 74(2): 115-119.

[12] Valenzuela V, Collier E, Armentano D, et al. Activation of the unfolded protein response enhances motor recovery after spinal cord injury[J]. Cell Death Dis, 2012, 3(2): e272.

[13] Wang JW, Wu M, Huang GC, et al. Effect of Jisui-kang on kinetic dysfunction in patients after spinal injury[J]. Chin J Integr Med, 2008, 14(3): 190-193.

[14] Ma Y, Zhou J, Yanga WG, et al. Effects of Jisui-

- kang on hemorheology and inflammatory factors in rats following spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2008, 3(11): 1176–1180.
- [15] Guo Y, Ma Y, Pan YL, et al. Jisuikang, a Chinese herbal formula, increases neurotrophic factor expression and promotes the recovery of neurological function after spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(9): 1519–1528.
- [16] Jung IS, Kim HJ, Ran N, et al. Effects of extremely low frequency magnetic fields on NGF-induced neuronal differentiation of PC 12 cells[J]. *Bioelectromagnetics*, 2014, 35(7): 459–469.
- [17] 赵宇红, 陈旺, 曾宇. 芹黄素对布雷菲德菌素诱导的神经元样 PC12 细胞内质网应激途径的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(3): 663–666.
- [18] Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, et al. Traumatic spinal cord injury-repair and regeneration[J]. *Neurosurgery*, 2017, 80(3S): S9–S22.
- [19] Sun X, Jones ZB, Chen XM, et al. Multiple organ dysfunction and systemic inflammation after spinal cord injury: a complex relationship[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 260.
- [20] Cordaro M, Casili G, Patemiti I, et al. Fumaric acid esters attenuate secondary degeneration after spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2017, 34(21): 3027–3040.
- [21] Kuroiwa M, Watanabe M, Katoh H, et al. Effect of amiloride on endoplasmic reticulum stress response in the injured spinal cord of rats[J]. *Eur J Neurosci*, 2014, 40(7): 3120–3127.
- [22] Zhang HY, Wang ZG, Lu XH, et al. Endoplasmic reticulum stress: relevance and therapeutics in central nervous system diseases[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(3): 1343–1352.
- [23] Estébanez B, de Paz JA, Cuevas MJ, et al. Endoplasmic reticulum unfolded protein response, aging and exercise: an update[J]. *Front Physiol*, 2018, 9:1744. doi: 10.3389/fphys.2018.01744.
- [24] Laguesse S, Creppe C, Godin JD, et al. Unveiling the role of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cortical neurogenesis[J]. *Med Sci (Paris)*, 2016, 32(6–7): 568–571.
- [25] Vincenz L, Jäger R, O'Dwyer M, et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response: targeting the Achilles heel of multiple myeloma[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(6): 831–843.
- [26] Tan Z, Zhang W, Sun J, et al. ZIKV infection activates the IRE1-XBP1 and ATF6 pathways of unfolded protein response in neural cells[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 275.
- [27] Chan JY, Luzuriaga J, Maxwell EL, et al. The balance between adaptive and apoptotic unfolded protein responses regulates beta-cell death under ER stress conditions through XBP1, CHOP and JNK[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 413:189–201. doi: 10.1016/j.mce.2015.06.025.
- [28] Penas C, Guzmán MS, Verdú E, et al. Spinal cord injury induces endoplasmic reticulum stress with different cell-type dependent response[J]. *J Neurochem*, 2007, 102(4): 1242–1255.
- [29] Zhu Y, Zhang L, Fu R, et al. The change tendency of endoplasmic reticulum stress associated proteins in rats with spinal cord injury[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 1938–1947.
- [30] 苑文超, 王磊, 马勇, 等. 中药复方脊髓康对小胶质细胞吞噬神经元碎片作用的影响[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(20): 3359–3363.
- [31] 苑文超, 王磊, 马勇, 等. 中药复方“脊髓康”对神经干细胞分化作用的影响[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2017, 19(10): 1707–1712.
- [32] 郭杨, 马勇, 潘娅岚, 等. 脊髓康对大鼠脊髓损伤后神经功能恢复及脑源性神经营养因子表达的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2014, 20(8): 701–708.
- [33] 潘娅岚, 马勇, 郭杨, 等. 脊髓康对脊髓损伤大鼠脊髓组织结构及神经生长因子表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(15): 144–149.
- [34] Ye T, Meng X, Zhai Y, et al. Gastrodin ameliorates cognitive dysfunction in diabetes rat model via the suppression of endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome activation[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1346. doi: 10.3389/fphar.2018.01346.

(收稿: 2019-07-08 在线: 2020-07-28)

责任编辑: 汤 静