

依达拉奉对 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞 MAPKs 信号通路的影响*

张桂莲¹, 郭英英¹, 张磊², 李婷婷¹, 杜赞¹, 姚丽¹, 张王刚³, 吴海琴¹, 马珠琳¹

1. 西安交通大学第二附属医院 神经内科 (西安 710004); 2. 陕西中医学院第二附属医院 神经内科 (咸阳 712000);
3. 西安交通大学第二附属医院 血液内科 (西安 710004)

【摘要】 目的 探讨自由基清除剂依达拉奉通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号转导通路发挥细胞保护作用的途径,为阿尔茨海默病(AD)发病机制及 AD 治疗新药的研发增添理论依据。方法 培养肾上腺嗜铬瘤细胞(PC12 细胞),根据不同的干预措施将细胞分为 4 组。阴性对照组(高糖 DMEM 组);AD 模型组(30 $\mu\text{mol/L}$ A β_{25-35} 处理组);抑制剂对照组:10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580[丝裂原活化蛋白激酶 p38(p38)抑制剂]、10 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 [c-Jun 氨基末端激酶(JNK)抑制剂]或 10 $\mu\text{mol/L}$ PD98059[细胞外调节蛋白激酶(ERK)抑制剂]处理组;依达拉奉低、中、高剂量组:依达拉奉 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 及 30 $\mu\text{mol/L}$ A β_{25-35} 共同孵育组。Western blot 检测各组细胞 p-p38、p-JNK 及 p-ERK 蛋白的表达;RT-PCR 法检测以上各组(抑制剂对照组仅加入 SB203580 10 $\mu\text{mol/L}$) p38 mRNA 的表达。结果 ① 与阴性对照组比,AD 模型组 p-p38 蛋白表达增高($P<0.01$);与 AD 模型组比,抑制剂对照组和依达拉奉各组 p-p38 蛋白的表达减低($P<0.05$);依达拉奉 3 组的 p-p38 蛋白表达高于抑制剂对照组($P<0.05$),与低剂量依达拉奉组比,中剂量依达拉奉组 p-p38 蛋白有所减低($P<0.05$)。② 与阴性对照组比,AD 模型组 p-JNK 蛋白表达增高($P<0.05$);与 AD 模型组比,抑制剂对照组 p-JNK 蛋白的表达减低($P<0.05$)。③ p-ERK 表达在各组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。④ 与阴性对照组比,AD 模型组的 p38 mRNA 表达增加,而抑制剂对照组的 p38 mRNA 表达减少(分别 $P<0.05$);中、高剂量依达拉奉组 p38 mRNA 表达比 AD 模型组减低,且比抑制剂对照组还低($P<0.05$);以 40 $\mu\text{mol/L}$ 依达拉奉组 p38 mRNA 表达最低,与 20 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 依达拉奉组均明显不同($P<0.05$)。结论 A β_{25-35} 可能直接激活 MAPK 信号通路,尤其 p38 及 JNK,损伤 PC12 细胞。依达拉奉可能同时在 mRNA 水平及蛋白质水平,阻断 p38 信号转导通路,发挥抗 A β_{25-35} 引起的 PC12 细胞损伤作用,有望成为治疗 AD 的新药。

【关键词】 阿尔茨海默病 β 淀粉样蛋白 依达拉奉 MAPKs PC12 细胞

The Effect of Edaravone on MAPKs Signal Pathway Associated with A β_{25-35} Treatment in PC12 Cells ZHANG Gui-lian¹, GUO Ying-ying¹, ZHANG Lei², LI Ting-ting¹, DU Yun¹, YAO Li¹, ZHANG Wang-gang³, WU Hai-qin¹, MA Zhu-lin¹. 1. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 2. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China; 3. Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

【Abstract】 **Objective** To explore whether edaravone protects cells damage via mitogen-activated protein kinases (MAPKs) signal pathway, and which procedure of p38 be affected so as to add theories for AD pathogenesis and treatments. **Methods** According to different drugs treated, PC12 cells *in vitro* were divided into four groups. Negative control group: cells were treated with media alone. AD model group: cells were treated with 30 $\mu\text{mol/L}$ A β_{25-35} . Inhibitor control group: cells were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 [p38 mitogen-activated protein kinase (p38) inhibitor], 10 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 [c-Jun NH2 terminal kinase (JNK) inhibitor], or 10 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 extracellular signal regulated kinase (ERK) inhibitor]. Low-dose, middle-dose and high-dose edaravone group: cells plated for 24 hours treated with 30 $\mu\text{mol/L}$ A β_{25-35} and co-treated with 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ edaravone 3 hours, respectively. The morphology of the treated cells were observed, the p-p38, p-JNK and p-ERK proteins in each group were tested by the Western blot. The p38 mRNA were tested in each group above (only add SB203580 10 $\mu\text{mol/L}$ in third group) by the real time PCR. **Results** ① The p-p38 protein was significantly increased in model control group compared with that in negative control group ($P<0.05$). The p-p38 protein in the inhibitor group and edaravone groups was decreased significantly ($P<0.05$) when compared with that in model control group. The

* 陕西省科技攻关项目(No. 2010K16-08-02)和西安交通大学第二附属医院人才基金项目[No. RC(GG)201409]资助

p-p38 proteins were significantly increased in the three edaravone groups compared with that in inhibitor control group ($P<0.05$). The p-p38 protein in middle-dose edaravone group was decreased compared with that in low-dose edaravone group ($P<0.05$). There was no relationship in dose-dependent manner about edaravone. Compared with three edaravone groups, the p-p38 protein was lower than it in high-dose edaravone & inhibitor group ($P<0.05$). ② The p-JNK protein was significantly increased in model control group compared with that in negative control group ($P<0.05$). The p-JNK protein in the inhibitor group was decreased compared with that in model control group ($P<0.05$). ③ No significantly difference of p-ERK protein concentration was observed in other groups when compared with that in negative control group ($P>0.05$ each). ④ Compared with negative control group, the p38 mRNA in model control group was significantly increased, and it was significantly decreased in inhibitor control group ($P<0.05$ each). In 40 $\mu\text{mol/L}$ and 80 $\mu\text{mol/L}$ edaravone groups, the p38 mRNA was significantly decreased compared with that in model control group, and it still was decreased compared with that in inhibitor control group ($P<0.05$). The p38 mRNA in 40 $\mu\text{mol/L}$ edaravone group was the lowest among three edaravone groups, and it was obviously different from that in 20 $\mu\text{mol/L}$ and 80 $\mu\text{mol/L}$ edaravone groups ($P<0.05$). **Conclusion** $\text{A}\beta_{25-35}$ could increase the p-p38 and p-JNK protein expression in cultured PC12 cells, but there was no obviously expression of p-ERK protein. These indicated that $\text{A}\beta_{25-35}$ might activate MAPKs signal pathway, especially p38 and JNK, and lead to PC12 cell damage. Edaravone could decrease p38 mRNA induced- $\text{A}\beta_{25-35}$, which indicated edaravone could protect PC12 cell damage via blocking p38 signal pathway in mRNA stage and protein stage simultaneously. Hence, it is promising that edaravone would be a new medicine for AD.

[Key words] Alzheimer disease Amyloid beta Edaravone MAPKs PC12 cells

众所周知,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号转导通路是机体内最重要的蛋白质信息传递链,其家族包括丝裂原活化蛋白激酶 p38 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun NH2 terminal kinase, JNK)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal regulated kinases, ERK)等,其中 p38 是最主要的通路之一。我们的前期研究发现, β 淀粉样蛋白 25-35 (amyloid β -protein 25-35, $\text{A}\beta_{25-35}$)可引起 p38 在大鼠海马及嗅球的表达明显增多,支持 p38 参与了阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)的病理过程^[1,2];研究显示,自由基清除剂依达拉奉(化学名:3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5-酮)可以减轻 $\text{A}\beta_{25-35}$ 的细胞毒性、降低各种氧化损害指标的浓度/活性、提高抗氧化酶的活性及细胞存活率;抑制 $\text{A}\beta_{25-35}$ 聚合物的形成,直接减少 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的肾上腺嗜铬瘤细胞(PC12 细胞)凋亡^[3]。Lenka 等^[4]认为 p38 抑制剂可能是一种改善 AD 炎症反应的潜在药物,但传统的 p38 抑制剂——SB203580,由于不易透过血脑屏障和严重的中枢神经系统副作用被限制用于 AD。因此,开发安全有效的 p38 抑制剂治疗 AD 越来越受到重视。据 Shimazaki 等^[5]研究发现,依达拉奉能下调实验性免疫性心肌炎大鼠体内 p38 的表达,减轻心肌的病理性损害;减轻 H_2O_2 的氧化损伤^[6];激活氧化应激^[7];通过 PI3K/Akt 信号通路减轻 $\text{A}\beta$ 诱导 PC12 细胞 tau 蛋白的

磷酸化^[8,9];通过 ERK 信号转导通路发挥抗凋亡的作用^[10]。而 Giovannini 等^[11]的研究结果有所不同,他们研究发现,p38、JNK 及 ERK 的激活程度明显不同,其中 p38 与 JNK 的激活更明显。由于 3 条 MAPKs 信号转导通路在 AD 中的作用研究报道不一,依达拉奉对 AD 的抗氧化作用机制尚不清楚,是否与直接下调 MAPKs 信号转导通路有关?是通过 p38、JNK 通路还是 ERK 通路?本研究继续采用 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞损伤模型,对 AD 发病过程 p38 的作用进行验证,并分别用 3 种信号通路的特异性传统抑制剂及不同剂量依达拉奉干预,以期为依据依达拉奉抗 AD 的作用机制增添理论依据。

1 材料和方法

1.1 $\text{A}\beta_{25-35}$ 聚合物的制备

将 $\text{A}\beta_{25-35}$ 肽(北京博奥深)用三蒸水配制成 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的母液,0.22 μm 滤器过滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用(96 h 以后使用)。再将前述制备好的 $\text{A}\beta_{25-35}$ 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 7 d 即形成聚集形式的 $\text{A}\beta_{25-35}$ 。

1.2 细胞分组及干预措施

采用 6 孔培养板(4×10^4 细胞/孔)常规培养 24 h 的大鼠 PC12 细胞(南京凯基),分别经高糖 DMEM 培养液(美国 Gibco)、 $\text{A}\beta_{25-35}$ 、不同浓度(低、中、高剂量为 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)依达拉奉(昆明积大)或不同抑制剂(p38 抑制剂为 SB203580, JNK 抑

制剂为 SP600125, ERK 抑制剂为 PD98059, 美国 Sigma-Aldrich) 处理, 根据不同的干预措施将细胞分为下列 4 组。① 阴性对照组: 加用高糖 DMEM 培养细胞 27 h; ② AD 模型组: 加用 $30 \mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 处理细胞 24 h; ③ 抑制剂对照组: 分别加用 SB203580 $10 \mu\text{mol/L}$ 、SP600125 $10 \mu\text{mol/L}$ 、PD98059 $10 \mu\text{mol/L}$ 处理细胞 24 h。④ 依达拉奉低、中、高剂量组: 20 、 40 、 $80 \mu\text{mol/L}$ 依达拉奉预处理 PC12 细胞 3 h, 再加入 $A\beta_{25-35}$ $30 \mu\text{mol/L}$ 共同孵育 24 h。

1.3 Western blot 检测蛋白表达

各组细胞干预 24 h 后, 弃培养基, PBS 冲洗 2 次, 用蛋白裂解液(含 PMSF)提取细胞总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。取 $50 \mu\text{g}$ 蛋白样本在 100 g/L 分离胶和 50 g/L 浓缩胶进行 SDS-PAGE(碧云天)电泳, 然后将蛋白半干转移至聚偏二氯乙烯膜(PVDF 膜), 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 与兔抗 p-p38 抗体($1:500$)、p-ERK 抗体($1:500$)、p-JNK 抗体($1:1000$)(美国 Abcam 公司)于 4°C 孵育过夜, PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。再加 HRP 标记的二抗($1:1000$)(美国 Abcam 公司)室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。洗膜后用 ECL 显影剂暗室曝光显影, Syngene 凝胶成像系统采集图片, 测定各显色条带的灰度值, 以 β -actin 为内参照, 并以阴性对照组目的条带与 β -actin 灰度值的比值为 1, 计算各干预组目的蛋白的相对表达量。

1.4 Real-time PCR 检测 p38 mRNA 表达

收集 6 孔板各孔细胞, 用 RNA fast200 总 RNA 极速抽提试剂盒提取各孔总 RNA, 分光光度计检测 A_{260}/A_{280} 比值在 $1.8\sim 2.0$ 之间。引物序列由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。p38 mRNA 上游引物: $5'$ -TCCTTGAGCTGTTCTCGC- $3'$, 下游引物: $5'$ -CTCCTACGAGCGTCGGCAA- $3'$ (217 bp), β -actin 上游引物: $5'$ -TCTTTGCA GCTCCTTCGTTGC- $3'$, 下游引物: $5'$ -CACGAT GGAGGGGAATACAGC- $3'$ 。按照 TaKaRa 公司反转录试剂盒说明书配制 $10 \mu\text{L}$ 体系反应液, 置于梯度 PCR 仪中。 37°C 、15 min, 85°C 、5 s, 将 mRNA 反转录成 cDNA。PCR 反应体系为 SYBR® Premix Ex Taq 酶 $10 \mu\text{L}$, ROX Reference Dye $0.4 \mu\text{L}$, cDNA 溶液 $2 \mu\text{L}$, p38/ β -actin 上、下游引物各 $0.8 \mu\text{L}$, dH_2O $6 \mu\text{L}$, 总计 $20 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增体系为: 95°C 预变性 30 s, 95°C 变性 5 s, 60°C 退火/延

伸 30 s, 扩增 40 个循环。反应结束后, 确认扩增曲线与溶解曲线。目的基因的表达采用相对定量法, 即以 β -actin 作为内参, 以目的基因 Ct 值减去内参 Ct 值为 ΔCt , 最终以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值计算, 并以阴性对照组 p38 mRNA 的相对表达为 1, 计算其它各组 p38 mRNA 的相对表达量。

1.5 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用单因素方差分析和 Bonferroni 事后两两比较方法比较处理组间数据, $\alpha_{\text{单侧}} = 0.05$ 。

2 结果

2.1 依达拉奉对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞形态学的影响

由图 1 可见, 阴性对照组细胞结构完整, 贴壁性好; AD 模型组细胞结构破坏, 表现为细胞贴壁性差, 胞体浓缩; 抑制剂对照组细胞形态与阴性对照组相似, 基本正常; 而预先用不同浓度依达拉奉(20 、 40 、 $80 \mu\text{mol/L}$)干预后, 再加入 $A\beta_{25-35}$ 组, 细胞形态均有不同程度的破坏, $20 \mu\text{mol/L}$ 依达拉奉组破坏最严重, $80 \mu\text{mol/L}$ 的依达拉奉组细胞破坏最轻。

2.2 MAPK 蛋白表达结果

2.2.1 p-p38 蛋白检测结果 见图 2。与阴性对照组相比, AD 模型组的 p-p38 蛋白表达增高 ($P < 0.01$); 与 AD 模型组比较, 抑制剂对照组和依达拉奉各组 p-p38 蛋白的表达减低 ($P < 0.05$); 而依达拉奉 3 组中的 p-p38 蛋白表达高于抑制剂对照组 ($P < 0.05$), 与低剂量依达拉奉组比较, 中剂量依达拉奉组 p-p38 蛋白有所减低 ($P < 0.05$), 低剂量与高剂量依达拉奉组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), p-p38 蛋白在依达拉奉 3 组间无明显剂量依赖关系。

2.2.2 p-JNK 蛋白检测结果 见图 2。与阴性对照组相比, AD 模型组的 p-JNK 蛋白表达增高 ($P < 0.05$); 与 AD 模型组比较, 抑制剂对照组 p-JNK 蛋白的表达减低 ($P < 0.05$), 而依达拉奉 3 个剂量组的 p-JNK 蛋白的表达与 AD 模型组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2.3 p-ERK 蛋白检测结果 见图 2。与阴性对照组相比, AD 模型组、抑制剂对照组及各依达拉奉组 p-ERK 的表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 p38 mRNA 检测结果

由图 3 可见, 与阴性对照组比较, AD 模型组的 p38 mRNA 表达增加, 而抑制剂组的 p38 mRNA

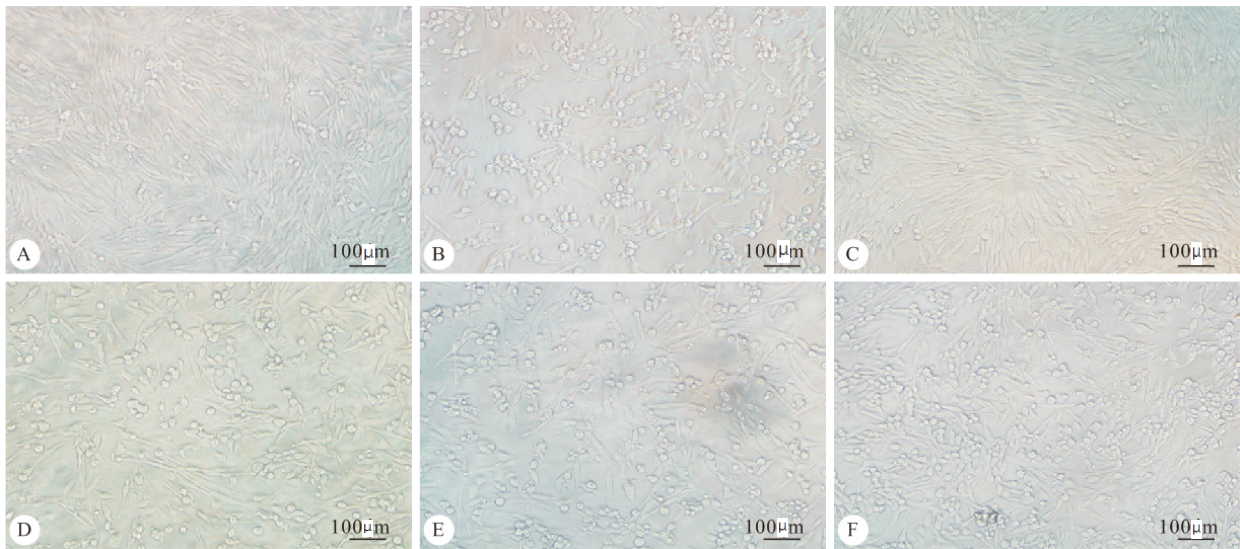


图 1 依达拉奉对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导 PC12 形态学的影响

Fig 1 Edaravone effects PC12 cells morphology with Aβ₂₅₋₃₅ treatment (Scale bar=100 μm)

A: Negative control group; B: AD model group; C: Inhibitor (SB203580) control group; D,E,F: 20, 40, 80 μmol/L edaravone group

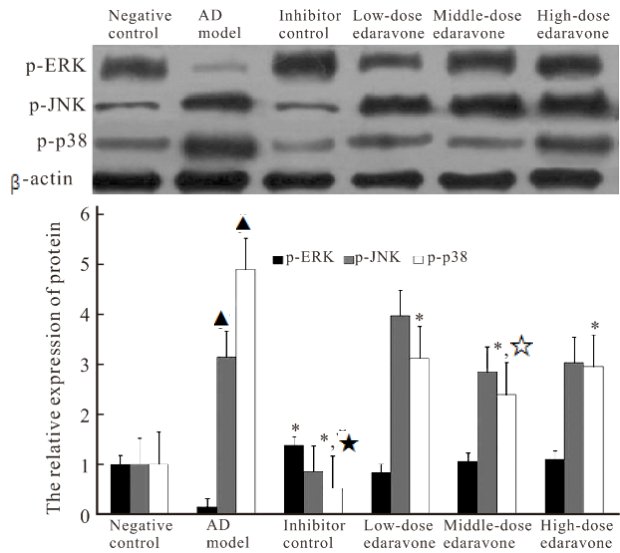


图 2 依达拉奉对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞 MAPK 通路的抑制作用 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Fig 2 Inhibition of edaravone on MAPK pathway in Aβ₂₅₋₃₅-induced PC12 cells (n=3, $\bar{x} \pm s$)

▲ $P < 0.05$, vs. negative control group; * $P < 0.05$, vs. AD model group; ★ $P < 0.05$, vs. three edaravone groups; ☆ $P < 0.05$, vs. low-dose edaravone group

表达减少, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05); 40 μmol/L、80 μmol/L 依达拉奉组 p38 mRNA 表达比 AD 模型组减低, 且比抑制剂对照组还低 ($P < 0.05$); 与 20 μmol/L、80 μmol/L 依达拉奉组比较, 40 μmol/L 依达拉奉组 p38 mRNA 表达最低 ($P < 0.05$)。

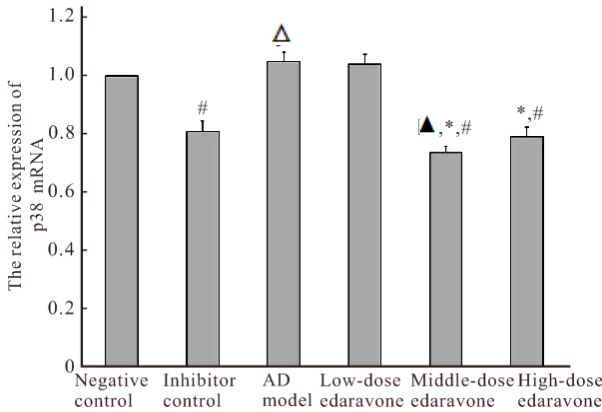


图 3 依达拉奉对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞 p38 mRNA 表达的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Fig 3 Effect of edaravone on p38 mRNA in Aβ₂₅₋₃₅-induced PC12 cells (n=3, $\bar{x} \pm s$)

△ $P < 0.05$, vs. negative control group; # $P < 0.05$, vs. AD model group; * $P < 0.05$, vs. inhibitor control group; ▲ $P < 0.05$, vs. edaravone 20, 80 μmol/L group

3 讨论

已有证据表明, MAPKs 信号转导通路在中枢神经系统广泛表达, 参与了神经系统多种疾病的发生发展, 各种细胞外刺激信号, 包括细胞因子、神经生长因子及各种应激刺激 (如热休克、紫外线、高渗状态等) 均可通过这一通路影响神经元的分化、生存、重塑及突触传递等。在哺乳动物体内, 主要存在 3 条不同的 MAPKs 信号转导通路, 即 p38、JNK 及 ERK1/2。其中 JNK 和 p38 通路在炎症及细胞凋亡

等应激反应中发挥作用,ERK1/2 通路调控细胞生长及分化。

研究表明, $A\beta$ 可以诱导 JNK 蛋白在神经元表达,从而激活 c-Jun、ATF2、Elk-1 等转录因子,导致神经元凋亡^[12];脑室注射 $A\beta$ 后,机体内 JNK、bax、Fas 配体等凋亡蛋白表达增加^[13],相关的结果在 PS-1 基因突变的 AD 患者脑内也被发现^[14];相反,抑制 JNK 的表达可以减轻缺氧复氧后大鼠海马神经元及谷氨酸引起的培养皮层神经元的损伤^[14, 15]。

p38 是 MAPKs 通路最主要的信号通路,其可通过多种途径参与 AD 的发病、进展^[16-18]。前期,我们采用大鼠侧脑室注射 $A\beta_{25-35}$,发现 p-p38 可表达于大鼠的海马及嗅球,且在海马表达更明显,而 p-p38 抑制剂 SB203580 可以减少这种表达,改善 AD 大鼠的学习记忆能力^[1, 2]。Li 等^[7]应用氧糖剥夺 PC12 细胞模型,发现氧化应激的激活与 p38 信号转导通路有关。本研究发现,应用 $A\beta_{25-35}$ 处理 PC12 细胞后,细胞内 p-p38、p-JNK 蛋白表达明显增加,进一步支持 MAPKs 通路,尤其 p38 和 JNK 在 AD 病理过程中的作用。

研究证实,传统的 p38 抑制剂 SB203580,属一种细胞可通透的分子,对细胞内 p38 活性具有抑制作用。本研究发现,应用 SB203580 干预后,PC12 细胞内 p-p38 表达明显减少,进一步验证了 SB203580 对 p-p38 的抑制作用。由于 SB203580 对 p38 的作用并非阻断上游激酶对 p38 的激活,而是通过竞争结合蛋白激酶-ATP-结合袋,使 p38 失去与 ATP 结合的能力,抑制 p38 磷酸化活性而发挥作用^[19],因此,作为 p38 通路诱导的炎症反应抑制剂,SB203580 可能对 AD 发挥有效治疗^[4, 20]。但据以往的研究发现,SB203580 对 p-p38 的抑制作用并不持久^[1, 2]。当受新的应激或 $A\beta$ 不断刺激时,p-p38 分子可持久处于活化状态,而由于 SB203580 是通过与 ATP 竞争 p38 结合位点发挥作用,故 SB203580 无法阻断上游激酶对 p38 的激活。更重要的是,SB203580 不易透过血脑屏障且有严重的中枢神经系统副作用,可能使其在 AD 治疗中受到限制^[4]。

SP600125 是 JNK 通路的特异性抑制剂,属吡唑啉酮类化合物,对 JNK 的作用类似于 SB203580 对 p38 的作用,即通过与 JNK 激酶竞争 ATP 结合位点,实现对 JNK 激酶的抑制。本研究以 SB203580 和 SP600125 作为对照,研究自由基清除剂依达拉奉对 MAPKs 通路的影响。

可以肯定的是,依达拉奉能够抑制缺血诱导的细胞损伤^[21, 22];并能减轻光诱导的大鼠视网膜损伤后 p38 的水平^[23, 24];还可抑制移植肝脏再灌注引起的 p38 激活^[25];除此之外,几项研究也证实依达拉奉能够通过干扰 MAPKs 通路,尤其 JNK,保护心、肾等重要脏器^[26, 27]。我们的前期研究发现, $A\beta_{25-35}$ 可引起离体培养的 PC12 细胞内活性氧(ROS)产生、并诱导细胞凋亡,依达拉奉可以减轻这种氧化损伤^[3]。Tsunekawa 等^[28]应用软骨藻酸诱导的大鼠海马,预先应用依达拉奉处理,发现 ROS 的产生及 p38 的激活明显减轻,其结论与我们的及 Lenka 等报道一致^[3, 4]。本研究发现,在 AD 的发生、发展中,除了 p38 信号转导通路参与,MAPKs 家族中的另一个信号通路 JNK 也参与了此过程,与相关研究一致^[29],但是,本研究应用依达拉奉干预后,只有 p-p38 的表达减少,提示依达拉奉仅能抑制 p-p38 的表达,而对 p-JNK 无抑制作用。据白雪等^[30]报道,应用杏仁核注射 $A\beta_{25-35}$ 制备 AD 大鼠模型,发现大鼠海马及额叶皮层 p38 mRNA 表达显著增高,提示 $A\beta$ 可能通过影响 p38 基因表达增加 p38 蛋白表达。本研究采用 PCR 技术检测发现,细胞内 p38 mRNA 表达显著增加,说明 $A\beta$ 对 p38 蛋白表达的影响至少部分在基因水平增加其 mRNA 表达实现的,依达拉奉对 $A\beta$ 引起的一系列氧化损伤及炎症反应的干预至少部分是通过抑制 p38 mRNA 表达减弱,与白雪报道一致^[30]。鉴于依达拉奉高效的羟基捕获作用,且含有亲脂性基团,血脑屏障通透率高,因此,安全、高效、毒副作用小可能是依达拉奉作为潜在的 p38 抑制剂的优点。

本研究还发现,中等剂量的依达拉奉对 p38 mRNA 及 p38 蛋白表达的抑制作用比低剂量及高剂量依达拉奉均强,提示依达拉奉的抑制作用与其浓度无剂量依赖关系,推测可能与依达拉奉阻断 p38 引起的炎症瀑布(级联)反应有关,40 $\mu\text{mol/L}$ 可能是依达拉奉的最适干预浓度。在老年大鼠脑内,MAPKs 家族的另一个信号通路——ERK 被发现表达下降,同时伴随着一些神经营养因子表达的下降。在 $A\beta$ 损伤的离体培养大鼠神经元,应用布洛芬干预后,ERK 大量表达, $A\beta$ 沉积减少。Kimura 等^[31]最新报道,6-Demethoxynobiletin 可以增强 PC12 细胞外 ERK 的磷酸化,减轻 AD 的病理过程。Kawasaki 等^[32]应用 NO 诱导培养的大鼠星形胶质细胞损害,发现 MAPKs 的 3 个通路均发生改变,依达拉奉能够通过 MAPKs 通路减轻细胞凋

亡。更有 Liu 等^[10]通过血清剥夺引起 PC12 细胞损害,再用依达拉奉干预,结果发现细胞存活提高与依达拉奉的抗凋亡作用呈正相关,抑制 ERK 可以阻止依达拉奉减少凋亡及提高存活能力,提示依达拉奉可能通过 ERK 信号转导通路发挥抗凋亡作用。但是,本研究发现,在用 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 损害后,p-ERK 蛋白的表达有所下降,应用依达拉奉后 p-ERK 蛋白的表达有所增加,但与对照组相比差异均无统计学意义。因此,由本实验结果推测,在 AD 的病理机制中,ERK 信号转导通路的作用可能并不像 p38 及 JNK 的作用明显,与上述结果不同^[9, 31],而与 Giovannini 等^[11]研究结果一致。不同的结论也许与不同的实验模型、不同的检测时间、不同的干预药物以及干预药物的不同剂量等有关,尚需进一步研究证实。

可以确定,氧化应激参与 $A\beta$ 引起的 AD 病理损害^[33]。根据 Lu 等^[34]报道,ROS 能激活 p38 损伤神经细胞,这是线粒体依赖的细胞凋亡方式之一。结合本研究,我们推测依达拉奉能够清除 AD 中过量的 ROS,下调 p38,抑制 ROS/MAPKs 信号通路,继而抑制线粒体依赖的凋亡通路,减少 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞损害。在这一过程中,依达拉奉对 p38 的抑制,可能直接同时作用于 mRNA 及蛋白水平。

显然,由于细胞种类的差异及体内外环境的复杂多变,继续在原代培养的神经元和诸如转基因 AD 动物模型上评估依达拉奉调节 p38 的最佳浓度及特殊的分子机制等,对进一步研究依达拉奉对 AD 的潜在治疗作用机制非常必要。

参 考 文 献

- 张桂莲, 杜 赞, 姚 丽等. 阿尔茨海默病大鼠嗅球 p38MAPK 的表达. 四川大学学报(医学版), 2009; 40(1): 40-43.
- 张桂莲, 姚 丽, 杜 赞等. p38MAPK 在 $A\beta_{25-35}$ 诱导 AD 大鼠海马 CA1 区表达的研究. 南方医科大学学报, 2008; 28(7): 1176-1179.
- Zhang GL, Zhang WG, Du Yun, *et al.* Edaravone ameliorates oxidative damage associated with $A\beta_{25-35}$ treatment in PC12 cells. J Mol Neurosci, 2013; 50(3): 494-503.
- Lenka M, Alaina JA. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. Neuropharmacology, 2010; 58(3): 561-568.
- Shimazaki H, Watanabe K, Veeraveedu PT, *et al.* The antioxidant edaravone attenuates ER-stress-mediated cardiac apoptosis and dysfunction in rats with autoimmune myocarditis. Free Radic Res, 2010; 44(9): 1082-1090.
- Zhao ZY, Luan P, Huang SX, *et al.* Edaravone protects HT22 neurons from H_2O_2 -induced apoptosis by inhibiting the MAPK signaling pathway. CNS Neurosci Ther, 2013; 19(3): 163-169.
- Li CT, Zhang WP, Lu YB, *et al.* Oxygen-glucose deprivation activates 5-lipoxygenase mediated by oxidative stress through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in PC12 cells. J Neurosci Res, 2009; 87(4): 991-1001.
- 王鹏军, 尚 宏, 宋荣蓉. MCI-186 减轻 $A\beta$ 诱导 PC12 细胞 tau 蛋白磷酸化的研究. 中国老年学杂志, 2009; 29(20): 2624-2627.
- 王鹏军, 宋荣蓉, 赫丹丹. PI3K/Akt 信号在阿尔茨海默病样细胞中的作用及依达拉奉对其影响. 中风与神经疾病杂志, 2010; 27(1): 12-15.
- Liu XY, Yao LL, Chen YJ, *et al.* Survivin is involved in the anti-apoptotic effect of edaravone in PC12 cells. Mol Cell Biochem, 2009; 327(1-2): 21-28.
- Giovannini MG, Bellucci FCA, Melani C, *et al.* Casamenti. Differential activation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways in the hippocampus of CRND8 transgenic mouse, a model of Alzheimer's disease. Neuroscience, 2008; 153(3): 618-633.
- Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, *et al.* Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. J Neurosci, 2001; 21(19): 7551-60.
- Shoji M, Iwakami N, Takeuchi S, *et al.* JNK activation is associated with intracellular beta-amyloid accumulation. Brain Res Mol Brain Res, 2000; 85(1-2): 221-33.
- 刘荣国, 崔 翔, 宋 娜等. 二氮嗪预处理对缺氧复氧后大鼠海马神经元凋亡及 JNK 表达的影响. 福建医科大学学报, 2010; 44(1): 24-29.
- 王 蕊, 金 英, 闫恩志等. 吡格列酮对谷氨酸诱导皮质神经元损伤保护作用及其抑制 JNK 信号的机制. 中国药理学通报, 2010; 26(3): 362-367.
- Zhu X, Mei M, Lee HG, *et al.* P38 activation mediates amyloid- β cytotoxicity. Neurochem Res, 2005; 30(6-7): 791-796.
- Savage MJ, Lin YG, Ciallella JR, *et al.* Activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 in an Alzheimer's disease model is associated with amyloid deposition. J Neurosci, 2002; 22(9): 3376-3385.
- Zhu X, Rottkamp CA, Boux H, *et al.* Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol, 2000; 59(10): 880-888.
- Gum RJ, McLaughlin MM, Kumar S, *et al.* Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the P38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket. J Biol Chem, 1998; 273(25): 15605-15610.
- Liu XP, Zheng HY, Qu M, *et al.* Upregulation of astrocytes protein phosphatase-2A stimulates astrocytes migration via inhibiting p38 MAPK in tg2576 mice. Glia, 2012; 60(9): 279-288.

(下转第 190 页)

- receptor gamma gene rearrangement in cutaneous T-cell lymphoma; comparative study of polymerase chain reaction with denaturing gradient gel electrophoresis and GeneScan analysis. *Br J Dermatol*,2010;162(4):822-829.
- 9 Alessi E, Coggi A, Venegoni L, *et al.* The usefulness of clonality for the detection of cases clinically and/or histopathologically not recognized as cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol*,2005;153(2):368-371.
 - 10 Yazdi AS, Medeiros LJ, Puchta U, *et al.* Improved detection of clonality in cutaneous T-cell lymphomas using laser capture microdissection. *J Cutan Pathol*,2003;30(8):486-490.
 - 11 Gallardo F, Costa C, Bellosillo B, *et al.* Lymphomatoid papulosis associated with mycosis fungoides: clinicopathological and molecular studies of 12 cases. *Acta Derm Venereol*,2004;84(6):463-468.
 - 12 Greisser J, Palmedo G, Sander C, *et al.* Detection of clonal rearrangement of T-cell receptor genes in the diagnosis of primary cutaneous CD30 lymphoproliferative disorders. *J Cutan Pathol*,2006;33(11):711-715.
 - 13 Steinhoff M, Hummel M, Anagnostopoulos I, *et al.* Single-cell analysis of CD30⁺ cells in lymphomatoid papulosis demonstrates a common clonal T-cell origin. *Blood*,2002;100(2):578-584.
 - 14 Gellrich S, Wernicke M, Wilks A, *et al.* The cell infiltrate in lymphomatoid papulosis comprises a mixture of polyclonal large atypical cells (CD30-positive) and smaller monoclonal T cells (CD30-negative). *J Invest Dermatol*,2004;122(3):859-861.
- (2014 - 07 - 15 收稿, 2014 - 11 - 24 修回)
- 编辑 吕 熙
-
- (上接第 184 页)
- 21 Wang GB, Su JJ, Li LJ, *et al.* Edaravone alleviates hypoxia-acidosis/ reoxygenation- induced neuronal injury by activating ERK1/2. *Neurosci Lett*, 2013; 543: 72-77. doi: 10. 1016/j. neulet. 2013. 02. 067. Epub 2013 Apr.
 - 22 Watanabe K, Ma M, Wen J, *et al.* Effects of edaravone in heart of aged rats after cerebral ischemia-reperfusion injury. *Biol Pharm Bull*,2007;30(3):460-464.
 - 23 Imai S, Inokuchi Y, Nakamura S, *et al.* Systemic administration of a free radical scavenger, edaravone, protects against light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *Eur J Pharmacol*,2010;642(1-3):77-85.
 - 24 Inokuchi Y, Imai S, Nakajima Y, *et al.* Edaravone, a free radical scavenger, protects against retinal damage *in vitro* and *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther*,2009;329(2):687-698.
 - 25 Kobayashi Y, Akamatsu Y, Iwane T, *et al.* Signaling pathway on the effect of oxygenated warm perfusion prior to cold preservation of the liver grafts from non-heart-beating donors, and the additive effect of edaravone. *Transplant Proc*,2009; 41(1):49-51.
 - 26 Lee IT, Shih RH, Lin CC, *et al.* Role of TLR4/NADPH oxidase/ROS-activated p38 MAPK in VCAM-1 expression induced by lipopolysaccharide in human renal mesangial cells. *Cell Commun Signal*,2012;10(1):33-48.
 - 27 Arumugam S, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, *et al.* Involvement of AMPK and MAPK signaling during the progression of experimental autoimmune myocarditis in rats and its blockade using a novel antioxidant. *Exp Mol Pathol*,2012; 93(2):183-189.
 - 28 Tsunekawa K, Kondo F, Okada T, *et al.* Enhanced expression of WD repeat-containing protein 35 (WDR35) stimulated by domoic acid in rat hippocampus; involvement of reactive oxygen species generation and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *BMC Neurosci*, 2013; 14: 4. doi: 10. 1186/1471-2202-14-4.
 - 29 Cao M, Liu F, Ji F, *et al.* Effect of c-Jun N-terminal kinase (JNK)/p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in morphine-induced tau protein hyperphosphorylation. *Behav Brain Res*,2013;237(15):249-255.
 - 30 白雪, 王 菁, 王松林等. β -淀粉样蛋白₂₅₋₃₅ 杏仁核注射对大鼠海马 Caspase-3 及 P38MAPK mRNA 表达的影响. *上海医学*,2010;33(12):1117-1119.
 - 31 Kimura J, Nemoto K, Yokosuka A, *et al.* 6-Demethoxynobiletin, a nobiletin-analog citrus flavonoid, enhances extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in PC12D cells. *Biol Pharm Bull*,2013;36(10):1646-1649.
 - 32 Kawasaki T, Kitao T, Nakagawa K, *et al.* Nitric oxide-induced apoptosis in cultured rat astrocytes: protection by edaravone, a radical scavenger. *Glia*,2007;55(13):1325-1333.
 - 33 Butterfield DA, Galvan V, Lange MB, *et al.* *In vivo* oxidative stress in brain of Alzheimer disease transgenic mice: requirement for methionine 35 in amyloid β -peptide of APP. *Free Radic Biol Med*,2010;48(1):136-144.
 - 34 Lu TH, Hsieh SY, Yen CC, *et al.* Involvement of oxidative stress-mediated ERK1/2 and p38 activation regulated mitochondria-dependent apoptotic signals in methylmercury-induced neuronal cell injury. *Toxicol Lett*,2011;204(1):71-80.
- (2014 - 07 - 27 收稿, 2014 - 10 - 12 修回)
- 编辑 沈 进