

# 解毒化瘀方对凝血酶合并缺氧诱导 PC12 细胞损伤 ERK1/2 信号通路表达的影响

邓奕辉,成绍武,易亚乔,覃弘宇,李 银,李定祥\*

(湖南中医药大学中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室,细胞生物学与分子技术湖南省高校重点实验室,  
湖南 长沙 410208)

**[摘要]** **目的** 探讨急性缺血性中风(AIS)瘀毒病机的分子机制及解毒化瘀方对凝血酶合并缺氧损伤的保护作用。**方法** (1)用凝血酶合并缺氧损伤 PC12 细胞,模拟急性缺血性中风的体外细胞模型。(2)将细胞分为空白组,模型组,解毒化瘀方含药血浆组和 PD98059 组(MEK 抑制剂组),应用荧光定量实时 RT-PCR 方法检测 MEK1、PAR-1 及 ERK1/2 的 mRNA 表达,应用免疫荧光法检测 ERK1/2、P-ERK1/2 的蛋白表达。**结果** PCR 结果提示:模型组 MEK1、PAR-1 及 ERK1/2 的 mRNA 表达与空白对照组相比显著升高( $P<0.01$ ),解毒化瘀方组和 PD98059 组 MEK1、PAR-1 及 ERK1/2 的 mRNA 表达较模型组显著降低( $P<0.01$ ),免疫荧光结果提示:解毒化瘀方组和 PD98059 组 ERK1/2、P-ERK1/2 的蛋白表达较模型组显著降低( $P<0.01$ )。**结论** 解毒化瘀方以凝血酶为作用的分子靶点,能够显著降低 ERK1/2 信号通路在缺血性中风体外细胞模型中的表达。

**[关键词]** 解毒化瘀方;急性缺血性中风;凝血酶;ERK1/2 信号通路;黄连解毒汤

**[中图分类号]**R285.5;R255.2

**[文献标识码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.10.005

## Effect of Jiedu Huayu Fang on the Expression of ERK1/2 Signaling Pathway in PC12 Cells Injured by Thrombin and Hypoxia

DENG Yihui, CHENG Shaowu, YI Yaqiao, QIN Hongyu, LI Yin, LI Dingxiang\*

(Hunan Provincial Key Laboratory of Prevention and Treatment of Cardio-cerebral Diseases by Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, the Key Laboratory of Cell Biology and Molecular Technology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the molecular mechanism of cerebral vascular occlusion and the mechanism of brain cell damage induced by acute ischemic stroke (AIS) and the protective effect of Jiedu Huayu Fang. **Methods** (1) PC12 cells were used to establish acute ischemic stroke in vitro. (2) The cells were divided into blank group, model group, Jiedu Huayu Fang serum group and PD98059 group (MEK inhibitor group). The mRNA expression of MEK1, PAR-1 and ERK1/2 was detected by Real-time PCR, and the protein expression of P-ERK1/2 and ERK1/2 was detected by immunofluorescence assay. **Results** PCR results indicated that the expression of MEK1, PAR-1 and ERK1/2 mRNA in the model group was significantly higher than that in the blank control group ( $P<0.01$ ). The MEK1, PAR-1 and ERK1/2 mRNA expression in Jiedu Huayu Fang group and PD98059 group was much lower than that of model group ( $P<0.01$ ). Immunofluorescence results show that: the ERK1/2, p-ERK1/2 protein expression of JieDuHuaYuFang group and PD98059 group was much lower than that of model group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Jiedu Huayu Fang, as the molecular targets of thrombin, can significantly reduce the expression of ERK1/2 signaling pathway in acute ischemic stroke.

**[Keywords]** Jiedu Huayu Fang; acute ischemic stroke; thrombin; ERK1/2 signaling pathway; Huanglian Jiedu Decoction

**[收稿日期]**2016-03-27

**[基金项目]**国家自然科学基金(81373508);湖南省自然科学基金(14JJ2113);湖南省教育厅项目(16K063);湖南省中医药科研基金(201606);中西医结合基础湖南省重点学科资助。

**[作者简介]**邓奕辉,女,教授,主任医师,医学博士,博士研究生导师,研究方向:中西医结合防治糖尿病血管并发症。

**[通讯作者]**\*李定祥,男,副教授,医学博士,硕士研究生导师,E-mail:ldxlzy@hotmail.com。

急性缺血性中风 (acute ischemic stroke, AIS) 是最常见脑血管疾病之一,占各类脑中风(stroke)的 60%~80%<sup>[1]</sup>,已经成为严重影响人类健康和社会经济的重大医学问题。近年来,有关急性缺血性中风的机制的主要学说有能量耗竭、兴奋性氨基酸毒性、梗死灶周边半暗带去极化、炎性细胞因子、钙离子超载、一氧化氮(NO)和自由基损伤、细胞凋亡等<sup>[2-3]</sup>。本研究在总结前期研究成果和继承传统中医理论的基础上,提出了 AIS 的主要病机为与凝血酶毒性相关的瘀血阻滞、毒损脑络,解毒化癍法是该病有效治法的假说,并从 ERK1/2 信号转导通路来探讨解毒化癍方神经保护作用的分子机制。

## 1 材料

### 1.1 实验药物与试剂

解毒化癍方(药物组成有黄连、黄芩、黄柏、栀子、红花、川芎、赤芍和地龙,由黄连解毒汤加味而成)饮片(购于湖南省中医药研究院附属医院);胰蛋白酶(Sango 公司)、DMEM HIGH GLUCOSE(1X)培养基(美国 HyClone 试剂公司,批号 NAC1362)、胎牛血清(美国 HyClone 试剂公司,批号 NWK0489)、凝血酶(1000 U/20 mg)(中国 Solarbio 试剂公司批号 106A069)、PD98059(Cayman 产品,上海叶舟生物科技有限公司,产品编号,167869-21-8);一抗,美国圣克鲁斯公司;二抗(羊抗兔),康为世纪,货号 CW0160。

### 1.2 细胞及动物

PC12 细胞(来源于大鼠的肾上腺嗜铬细胞瘤细胞,高分化,永生性,购自长沙赢润生物技术有限公司,编号 2015032007);SD 大鼠 18 只,雌雄各半,体重为 180~200 g(购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号 2015032007)。

### 1.3 主要仪器

ABI-7300 Real-time 检测仪(美国 ABI 公司),逆转录试剂盒(立陶宛 Fermentas 公司,货号 #K1622),XDS-1B 倒置显微镜(日本奥林巴斯),普通二氧化碳培养箱(德国贺利氏),3131 三气培养箱(Thermo),SP-756 型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司),ELX800 酶标仪(美国罗氏公司)。

## 2 方法

### 2.1 凝血酶合并缺氧诱导 PC12 细胞损伤模型的建立

PC12 细胞以含 10%胎牛血清、100  $\mu$ mL 青霉素、100 g/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基于 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度下的培养箱中培养,2 d 换液一次,待细胞成长融合后传代培养。细胞以  $1 \times 10^5$  cells/mL 接种于 96 孔培养板,每孔 0.18 mL,培养 24 h 待细胞贴壁后再加终浓度为 50  $\mu$ g/L 的神

生长因子(NGF)诱导分化 72 h 后<sup>[4]</sup>,细胞神经元特性鉴定采用神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫荧光细胞化学方法。弃原培养液,将细胞分为,每组设 8 个复孔,分别加入 0、50、100、150、200  $\mu$ mL 凝血酶 10  $\mu$ L 和 100  $\mu$ L 无血清培养基培养,置于三气培养箱中(5%CO<sub>2</sub>、1%O<sub>2</sub>、94%N<sub>2</sub>)模拟缺氧培养过程,按 1、6、12、24 h 时间点依次培养孵育后取出。干预浓度及时间前期已通过前期实验明确<sup>[5]</sup>。

### 2.2 解毒化癍方含药血浆的制备

处方饮片置于煎煮容器内,加相当于药材 5 倍量水浸泡 1 h,煮沸 45 min 过滤,浓缩成每毫升含生药 2 g 的药液,冷却后装入无菌容器中,于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。SD 大鼠 9 只灌服解毒化癍方水煎液(按生药 36.6 g/kg 灌胃,即成人临床用量的 5 倍),每天 1 次,连续 7 d,于末次给药后 2 h 无菌条件下腹主动脉取血,取血后立即以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,组内血浆混合后 0.22  $\mu$ m 过滤除菌后,-80  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

### 2.3 解毒化癍方含药血浆对 PC12 细胞增殖的半数抑制浓度及作用时间的确定

采用 MTT 法测定,分为空白对照组(不含血浆),解毒化癍方含药血浆组(终浓度分别为 1%、5%、10%、15%)。PC12 细胞培养于 96 孔板,待贴壁分化后以无血清 DMEM 培养液培养 24 h,使细胞同步于 G<sub>0</sub> 期,分别加入浓度为 0、1%、5%、10%、15%的含药血浆。作用 24 h 后,加 10  $\mu$ L 5 mg/mL 的 MTT 于培养箱中培养 4 h 后,吸去上清加 150  $\mu$ L 的 DMSO,震荡 10 min 后于 490 nm 波长处检测光密度值(OD),计算各含药血浆抑制 PC12 细胞增殖的浓度(IC<sub>50</sub>)。

采用 MTT 法测定,分为无血浆对照组和含药血浆组(各含药血浆组终浓度为各含药血浆的增殖抑制半数浓度 IC<sub>50</sub>),于 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 继续培养。分别于 0、12、24、48 h 后取出,加 10  $\mu$ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 于培养箱中溶液培养 4h 后,吸去上清加 150  $\mu$ L 的 DMSO,震荡 10 min 后于 490 nm 波长处检测光密度值(OD),以 OD 值反映 PC12 细胞的增殖活性。

### 2.4 分组给药及指标检测

将细胞置于玻璃培养皿中并随机分为空白组(正常细胞组)、模型组(凝血酶 150  $\mu$ mL、在缺氧条件下作用 12 h)、解毒化癍方含药血浆组(含药血浆+模型细胞,简称血浆组)和 PD98059 组(MEK 信号通路抑制剂+模型细胞,简称对照组)。取空白组和模型组细胞,加入 PBS 平衡液润洗(加入量以刚好没过玻片为准)2 次后,加入 4%多聚甲醛固定 15 min,进行 PCR 及激光共聚焦检测。含药血浆组加入含 10%浓度解毒化癍方的培养液于三气培养

箱中培养 24 h 后检测相关指标。PD98059 组加入 10  $\mu\text{L}$  浓度为 20  $\mu\text{m}$  的阻断剂,培养 2 h 后检测相关指标。平行重复 3 次实验取平均值。

2.4.1 荧光定量实时 PCR 检测 PAR-1 及 ERK1/2 的 mRNA 的表达 引物由 Invitrogen Biotechnology CO., LTD 中国公司合成(见表 1),按照合成单加入 ddH<sub>2</sub>O,制成 7.5  $\mu\text{m}$ d/L 溶液。RNA 的提取:按照试剂盒说明书提取细胞 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 纯度,并进行 RNA 定量。PCR 条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  复性 45 s,60  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,40 个循环。PCR 产物分析:取 PCR 产物琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下观察条带,数据采用仪器自带软件分析(ABI Prism 7300 SDS Software),各标本重复 3 次,取平均值。

表 1 引物序列和扩增序列长度

引物	引物序列(5'-3')	扩增产物片段长度(bp)
PAR-1	TCAGGAATCCCAGTGAAG	202
	TACACGGAGGATATGAAG	
ERK1	TCTGCCCTACTCATCCTG	171
	GCCTCCACATCCAATCAC	
ERK2	CTTCCAACCTCTGCTGAAC	117
	CGGTGGCTACATACTCTGTC	

2.4.2 免疫荧光法检测 ERK1/2、P-ERK1/2 蛋白的表达 PC12 细胞以  $1 \times 10^4/\text{mL}$  接种于 24 孔板中,制作细胞爬片,吸取并弃上清加 4% 多聚甲醛固定 15 min,加 0.5% 曲拉通作用 10 min,再以牛血清蛋白封闭液封闭 1 h,加一抗(1:500)4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,PBS 润洗后加 FITC 羊抗兔荧光二抗(1:100)室温孵育 30 min,润洗后甘油封片于激光共聚焦显微镜下观察拍照。

## 2.5 统计方法

数据均用 SPSS 17.0 进行统计,计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。多组间均数比较用单因素方差分析;组间两两比较方差齐者用 LSD 检验,方差不齐者用 Dunnett T3 检验。

## 3 结果

### 3.1 解毒化瘀方含药血浆对 PC12 细胞增殖的半数抑制浓度和作用时间

随着解毒化瘀方含药血浆浓度的增高,各组 IC<sub>50</sub> 均在 10%~15% 的范围内,且各组间无差异( $P > 0.05$ ),则可确定含药血浆作用浓度为 10%。在 12 h 时间点,10% 浓度含药血浆与对照组相比无统计学意义( $P > 0.05$ ),24 h 与 48 h 时均可抑制 PC12 的生长,与对照组相比具有统计意义( $P < 0.05$ )。因此,含药血浆的作用时间为 24 h。

### 3.2 各组凝血酶原(PAR-1)、MEK1、ERK1/2 的 mRNA 表达荧光定量实时 PCR 检测

结果显示,PC12 细胞凝血酶原(PAR-1)、MEK1、ERK1/2 mRNA 表达在模型组与空白组相比显著升高( $P < 0.01$ ),解毒化瘀方含药血浆组的凝血酶原(PAR-1)、MEK1、ERK1/2 的 mRNA 与模型组相比表达均降低( $P < 0.01$ ),与 PD98059 对照组(MEK 抑制剂组)比较差异无统计学意义。见表 2。

表 2 各组 PAR-1、MEK1、ERK1/2 的

组别	mRNA 表达(灰度值)			( $\bar{x} \pm s, n=5$ )
	PAR1	MEK1	ERK1	ERK2
空白组	0.00384 $\pm$ 0.00036	0.0114 $\pm$ 0.071	0.0088 $\pm$ 0.00033	0.0259 $\pm$ 0.167
模型组	0.0536 $\pm$ 0.0063 $\Delta\Delta$	0.0621 $\pm$ 0.015 $\Delta\Delta$	0.0608 $\pm$ 0.0055 $\Delta\Delta$	0.175 $\pm$ 0.0763 $\Delta\Delta$
对照组	0.0127 $\pm$ 0.00067**	0.025 $\pm$ 0.039**	0.0352 $\pm$ 0.00076**	0.0545 $\pm$ 0.069**
血浆组	0.0146 $\pm$ 0.0037**	0.0187 $\pm$ 0.029**	0.0297 $\pm$ 0.0171**	0.0677 $\pm$ 0.009**
F 值	59.994	44.335	84.345	54.826
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

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

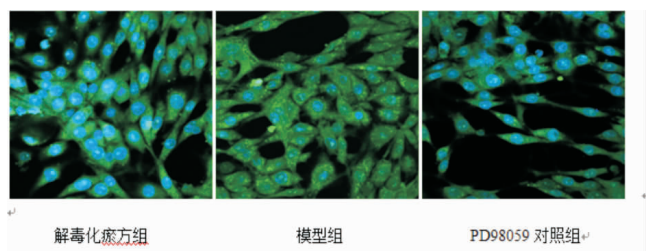
### 3.3 各组 ERK1/2、P-ERK1/2 蛋白的表达

与无血浆空白组比较,模型组 P-ERK1/2 与 ERK1/2 显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较 PD98059 组和解毒化瘀方含药血浆 P-ERK1/2 与 ERK1/2 表达明显下降( $P < 0.01$ ),含药血浆组与 PD98059 组(MEK 抑制剂组)比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果见表 3、图 1-2。

表 3 免疫荧光相关信号通路 ERK1/2、P-ERK1/2

组别	蛋白的表达(灰度值)		( $\bar{x} \pm s, n=5$ )
	ERK1/2	P-ERK1/2	
空白组	6.95 $\pm$ 1.28	6.96 $\pm$ 1.29	
模型组	20.70 $\pm$ 1.37 $\Delta\Delta$	14.83 $\pm$ 0.58 $\Delta\Delta$	
对照组	9.87 $\pm$ 1.19**	10.31 $\pm$ 0.57**	
血浆组	11.40 $\pm$ 0.90**	10.10 $\pm$ 0.57**	
F 值	42.103	30.936	
P 值	0.000	0.000	

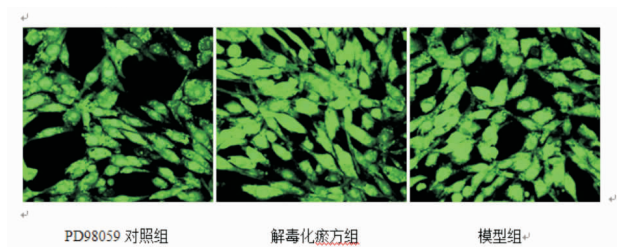
注:与空白组比较, $\Delta \Delta P < 0.01$ ;与模型组比较,\*\* $P < 0.01$ 。



注:绿色荧光采用 FITC 染色剂染色,细胞核采用 Hoechst 染色剂染色。平均荧光强度值越大表示蛋白表达越强。

图 1 ERK1/2 蛋白表达荧光图( $\times 600$ )





注:绿色荧光采用 FITC 染色剂染色,细胞核采用 Hoechst 染色剂染色。平均荧光强度值越大表示蛋白表达越强。

图 2 P-ERK1/2 蛋白表达荧光图( $\times 600$ )

## 4 讨论

急性缺血性中风的基本病理生理过程由脑血管阻塞和随之发生的脑细胞损伤组成,而凝血酶在这个过程中起了关键作用。近年来,凝血酶在 AIS 发生发展中的作用受到了学术界的重视<sup>[6]</sup>,凝血酶不仅是血液凝固血栓形成的关键水解酶,而且也通过与蛋白酶活化受体 (protease-activated receptor, PAR) 结合发挥对神经细胞的毒性作用,因此,以凝血酶为靶点来研究 AIS 具有重要价值<sup>[7]</sup>。PAR 介导的凝血酶反应在脑损伤中具有双重作用,凝血酶在低浓度时诱导脑耐受性,在高浓度时对脑细胞产生毒性效应而加重对脑组织的损害,以上过程是通过信号转导来实现的。ERK1/2 信号传导通路是一条可以被多种因素广泛激活的有丝分裂原活化蛋白激酶通路。MAPK 具有诱导 ERK 磷酸化的作用,ERK1/2 磷酸化可促进神经细胞存活,但持续的磷酸化能导致细胞的凋亡<sup>[8]</sup>。PD98059 为 ERK 上游激酶 MEK1 特异性阻断剂,能够阻断 ERK1/2 信号通路的传导,可消除凝血酶诱导的 ERK1/2 激活作用,阻断凝血酶诱导的脑耐受;在体外用凝血酶处理也能活化 ERK1/2,而用 PD98059 可以完全阻断用凝血酶预处理后的细胞保护作用<sup>[9]</sup>。

中医认为,缺血性中风多是在内伤积损的基础上,复因劳逸失度、情志不遂、饮酒饱食或外邪侵袭等触发,引起脏腑阴阳失调,气血逆乱。病理因素多为风、火、痰、气、瘀<sup>[10]</sup>。王永炎院士<sup>[11]</sup>认为本病为毒损脑络,导致脑络破损,经络、气血瘀滞不通,脑脉、神机失养,而出现神昏、肢体麻木、言语不利、半身不遂等症状。从临床发病特点看,缺血性中风可分为两个阶段,第一阶段发生在脑脉闭阻前,该阶段时程较长,是缺血性中风发病的基础。由于人体正气逐渐亏虚,而痰浊、瘀血等多种致病因素也因之缓慢形成,当正虚邪实达到一定程度后,在诱因的作用下导致脏腑阴阳失调、气血逆乱而致脑脉闭阻。第二个阶段发生在脑脉闭阻后,这个阶段时程较短,病情变化迅

速。脑脉闭阻,脑髓失养,进而毒邪内生,损络伤髓,神明失养。脑脉闭阻多责之于瘀,络损髓伤,神明失养多责之于毒,因此可以认为 AIS 的基本病机为瘀血阻滞、毒损脑络,临床治疗当以化瘀解毒为法。

本实验结果显示,凝血酶合并缺氧 PC12 细胞的 MEK1、PAR1 和 ERK1/2 的 mRNA 表达明显升高,而采用解毒化瘀方含药血浆干预后能明显降低细胞 MEK1、PAR1 和 ERK1/2 的 mRNA 表达,含药血浆组和 PD98059 阻断剂组下降程度相当,表明解毒化瘀方能干预 ERK 信号通路的传导并有效降低凝血酶原的表达。免疫荧光结果表明,凝血酶合并缺氧可以使 P-ERK1/2 和 ERK1/2 的蛋白表达上调,加重细胞的损伤。解毒化瘀方含药血浆和 PD98059 均可减少 P-ERK1/2 和 ERK1/2 的蛋白表达,抑制神经细胞的凋亡。

我们可以推论 ERK1/2 信号通路参与了神经细胞凋亡的过程,是急性缺血性中风的一条重要信号转导通路。而凝血酶原很可能是其作用的有效靶点。通过阻断信号通路可以有效的降低细胞损伤。综上所述,解毒化瘀方对 PC12 细胞损伤具有保护作用,可为临床上对急性缺血性中风的治疗提供实验依据。

## 参考文献:

- [1] 中华医学会神经病学分会,脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010 [J]. 中国全科医生, 2011, 14(12B): 4013-4017
- [2] Brouns R, De Devn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2009, 111(6): 483-495.
- [3] McColl BW, Allan SM, Rothwell NJ. Systemic infection, inflammation and acute ischemic stroke [J]. Neuroscience, 2009, 158(3): 1049-1061.
- [4] 覃弘宇,李 银,李定祥等.基于凝血酶合并缺氧诱导 PC12 细胞损伤的模型研究[J].重庆医学, 2016, 45(27): 597-600
- [5] Bo C, Beth F, Michael AW, et al. Thrombin Activity Associated with Neuronal Damage during Acute Focal Ischemia [J]. J Neuroscience, 2012, 32(22): 7622-7631.
- [6] Bo C, Beth F, Michael AW, et al. Thrombin Activity Associated with Neuronal Damage during Acute Focal Ischemia [J]. J Neuroscience, 2012, 32(22): 7622-7631.
- [7] Bo C. Thrombin in Ischemic Stroke Targeting. Translational Stroke Research[M]. Springer New York, 2012: 189-204.
- [8] 李 强,杨桂英,李 峰,等.ERK 信号通路在神经细胞凋亡中的双重作用[J].齐齐哈尔医学院报, 2014, 35(22): 357-59.
- [9] Chenguang Y. Distinct roles for ERK1 and ERK2 in pathophysiology of CNS [J]. Front Biol, 2012(7): 267-276.
- [10] 徐瑾瑜,顾 星,张秋雁.丹龙醒脑片治疗缺血性脑卒中的实验研究进展[J].湖南中医药大学学报, 2014, 34(2): 62-63.
- [11] 李澎涛,王永炎,黄启福.“毒损脑络”病机假说的形成及其理论与实践意义[J].北京中医药大学学报, 2001, 24(1): 1-6.