

米诺环素对 PC12 细胞缺氧缺糖损伤后神经突生长的影响*

陶涛¹, 秦新月^{2△}, 冯金洲¹, 罗华², 李小刚²

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科 400016; 2. 泸州医学院附属医院神经内科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨米诺环素对大鼠嗜铬细胞瘤细胞(PC12)缺氧缺糖(OGD)损伤后细胞存活率及神经突生长的影响。方法 分别缺氧缺糖 2、4、6 h 及 8 h 建立 PC12 细胞 OGD 损伤模型,将细胞分为正常对照组,OGD 组和不同浓度的(0.1、1.0 μM 和 10.0 μM)米诺环素治疗组,在缺氧缺糖/复氧 24 h 后,用 CCK-8 法检测细胞存活率,免疫荧光法标记 MAP-2 并在荧光显微镜下观察神经突的生长,Western blot 法检测各组 GAP-43 蛋白的表达水平。**结果** 与 OGD 组比较,米诺环素能显著提 OGD 后 PC12 细胞的存活率[(46.1±2.9)% vs. (77.0±2.5)%, $P<0.01$],促进 PC12 细胞 OGD 损伤后神经突的生长,同时上调轴突再生蛋白 GAP-43 的表达[(0.34±0.04) vs. (2.11±0.10), $P<0.01$]。**结论** 米诺环素能减轻 OGD 损伤所致 PC12 细胞的死亡,并促进细胞神经突的生长。

关键词:米诺环素;神经突生长;氧糖剥夺;PC12 细胞

中图分类号:R743.31

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)05-0605-03

Effects of minocycline on neurite outgrowth of PC12 cells following oxygen glucose deprivation*

Tao Tao¹, Qin Xinyue^{2△}, Feng Jinzhou¹, Luo Hua², Li Xiaogang²

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of minocycline on cell viability and neurite outgrowth of pheochromocytoma cells (PC12) after oxygen-glucose deprivation(OGD) injury. **Methods** PC12 cells were exposed to OGD insult for 2, 4, 6, 8 h to establish a cerebral ischemia model in vitro. High-differentiated PC12 cells were cultivated and randomly divided into three groups: control group, OGD group and various doses of minocycline(0.1, 1.0, 10.0 μM) treated group. 24 h after OGD-reperfusion, PC12 cells viability was assessed by CCK-8 assay, the neurite was labeled with MAP-2 by immunofluorescence and neurite length was measured by the Image-Pro Plus 7.0 software, GAP-43 protein expression was determined by Western blotting. **Results** Compared to the OGD groups, minocycline induced a concentration-dependent increase in cells viability[(46.1±2.9)% vs. (77.0±2.5)%, $P<0.01$], improved neurite outgrowth and increased the expression of GAP-43 protein in PC12 cells after OGD injury[(0.34±0.04) vs. (2.11±0.10), $P<0.01$]. **Conclusion** Minocycline could protect against oxygen glucose deprivation injury and promote neurite outgrowth. This finding suggests minocycline may be a novel therapy for cerebral ischemia.

Key words: neurite outgrowth; minocycline; oxygen glucose deprivation; PC12 cell

缺血性卒中是严重危害人类健康的疾病之一,其已成为成人致残最主要的原因。成人中枢神经系统损伤后神经功能不能完全恢复是因为受损的神经元不能形成正确的轴突和树突连接^[1]。因此,不断开发新的神经保护剂促进中枢神经系统损伤后神经元轴突的再生,是目前医学界研究的热点问题。米诺环素是一种高脂溶性的第二代四环素类抗菌药物,除了抗菌作用以外,还具有抗炎症、抗凋亡及抗氧化应激等神经保护作用^[2]。近期一项研究表明米诺环素能强化神经生长因子诱导 PC12 细胞神经突的生长^[3]。但是米诺环素是否能促进 PC12 细胞缺氧缺糖损伤后神经突的生长,目前尚无相关报道。本研究通过体外培养 PC12 细胞,建立细胞缺氧缺糖(oxygen glucose deprivation, OGD)模型,观察米诺环素对 PC12 细胞 OGD 损伤的保护作用及神经突生长的影响。

1 材料与方

1.1 材料与试剂 PC12 高分化细胞株购于中国科学院上海细胞库;DMEM 培养基、胎牛血清、DMEM 无糖培养基购自美国 Gibco 公司;盐酸米诺环素购自 Sigma 公司;GAP-43 抗体和 MAP-2 抗体购自 Santa Cruz 公司; β -actin 抗体购自北京四正柏公司;全蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物公司;Dylight594 标记的羊抗兔抗体、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、

ECL-Plus 显影试剂盒及 CCK-8 试剂盒均购于碧云天生物技术研究所。另有仪器 Thermo Forma3131 CO₂ 培养箱, Nikon SMZ-10A 和 FDX-35 荧光倒置显微镜和荧光显微照相系统。

1.2 细胞培养及实验分组 PC12 细胞用 DMEM 完全培养基(含 10% 的胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 μg/L 链霉素),置于 37 °C, 5% CO₂ 及饱和湿度的孵箱中常规培养。隔天换液,待细胞铺满瓶底 80%~90%时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1:3 传代,收获第 5~8 代 PC12 细胞用于以下实验。取处于对数生长期的 PC12 细胞以 2×10^5 /mL, 每孔 100 μL 接种在 96 孔板(CCK-8 实验),每孔 1 mL 接种在 24 孔板(神经突测定),以 1×10^6 /mL 密度接种于 75 cm² 培养瓶(Western blot 检测)。细胞分为 3 组:正常对照组、OGD 组、米诺环素治疗组。

1.3 细胞 OGD 模型的建立及药物干预 参照并改进本课题组前期报道的培养方案。当细胞培养 12 h 后,用 PBS 清洗 3 遍,加入无血清无糖 DMEM 培养基,并将细胞置于含 5% CO₂, 94% N₂, 1% O₂, 37 °C 的三气培养箱中培养 6 h,然后加入无血清的高糖 DMEM 培养液,置于恒温孵箱中继续培养 24 h 模拟缺糖缺氧再灌注。正常对照组全过程加入无血清高糖 DMEM 培养基,置于正常培养箱培养。不同浓度的米诺环素

(0.1、1.0、10.0 μM) 在 OGD 及再复氧的全过程加入。

1.4 CCK-8 法检测 PC12 细胞存活率 复氧 24 h 后, 在 96 孔培养板每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中继续孵育 4 h, 在 ELX-800 全自动酶标仪 (Bio-TEK) 上测定各孔在 450 nm 波长处的吸光度 (OD) 值。每组 6 孔, 重复 3 次实验。以正常对照组 CCK-8 吸光值为基数 100%, OGD 组及药物干预组细胞存活率按公式计算: 细胞存活率 (%) = 处理组平均 OD 值 / 正常对照组平均 OD 值 \times 100%。

1.5 免疫细胞荧光测定神经突长度 将盖玻片置于 24 孔板中, 每组设置 3 个复孔。室温下使用 2% 多聚甲醛固定 10 min, 0.1% Triton X-100 破膜 30 min, 山羊血清封闭 30 min, 兔抗大鼠 MAP-2 多克隆抗体 (1:100) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 清洗 3 遍后加入 Dylight 594 山羊抗兔 (1:150), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, DAPI (1:50) 避光反应 5 min, 50% 甘油封片后在荧光显微镜下观察并拍照。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件对 PC12 细胞神经突长度进行测定, 每次实验在 200 倍荧光显微镜下随机选取 10 个视野, 每组至少选取 50 个细胞进行测量, 实验重复 3 次, 计算各组神经突长度的平均值。

1.6 蛋白免疫印迹 (Western blot) 检测 GAP-43 蛋白表达 复氧 24 h 后, 收集各组细胞, 按照凯基全蛋白提取试剂盒说明书提取细胞蛋白, 同时用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后, 采用湿转法将蛋白转移至 0.45 μM 聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上 (250 mA 恒流, 1 h), 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h 后加入兔抗 GAP-43 (1:200), 小鼠抗 β -actin (1:1000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔或羊抗小鼠 (1:3000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h。采用 ChemiDocTM 凝胶扫描成像系统显微拍照, Quantity One 图像分析软件测定各条带的灰度值, 蛋白的相对含量以目的蛋白与内参灰度值的比值表示。

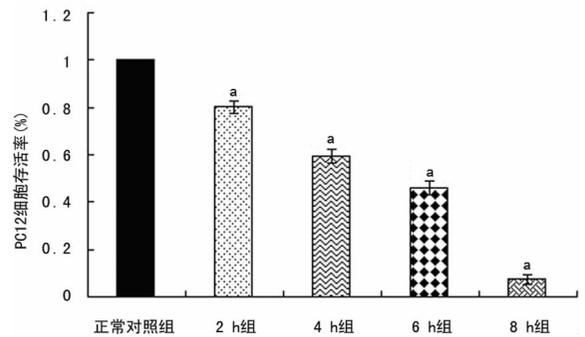
1.7 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布且方差齐性的资料, 组间比较采用单因素方差分析, 均数间两两比较采用 LSD 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同缺氧缺血时间对 PC12 细胞存活率的影响 CCK-8 法测得 OGD (2、4、6、8 h) 后, PC12 细胞的存活率呈时间依赖性下降。OGD 2 h 及 8 h 时, PC12 细胞的存活率分别为 (80.2 \pm 2.7)%, (7.3 \pm 1.9)%, OGD 6 h 时, PC12 细胞的存活率为 (46.1 \pm 2.9)%, 接近 50%。因此, 本实验选取 OGD 6 h 作为体外 PC12 细胞 OGD 时间, 用于探讨米诺环素对 PC12 细胞 OGD 损伤的保护作用。见图 1。

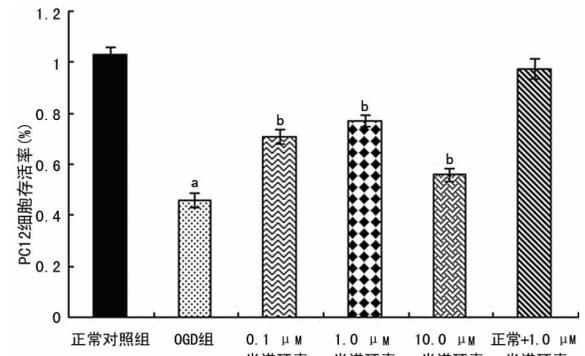
2.2 米诺环素对 PC12 细胞 OGD 损伤后细胞存活率的影响

CCK-8 结果显示, 不同浓度米诺环素 (0.1、1.0、10.0 μM) 可提高 OGD 损伤后 PC12 细胞的存活率 (70.7 \pm 2.9)%, (77.0 \pm 2.5)%, (55.8 \pm 2.5)%, 与 OGD 组 [(46.1 \pm 2.9)%] 比较差异有统计学意义 ($P<0.01$), 其中 1.0 μM 作用最明显, 用于后续的研究。米诺环素对正常培养细胞的存活率无促进作用。见图 2。



^a: $P<0.01$, 与正常对照组比较。

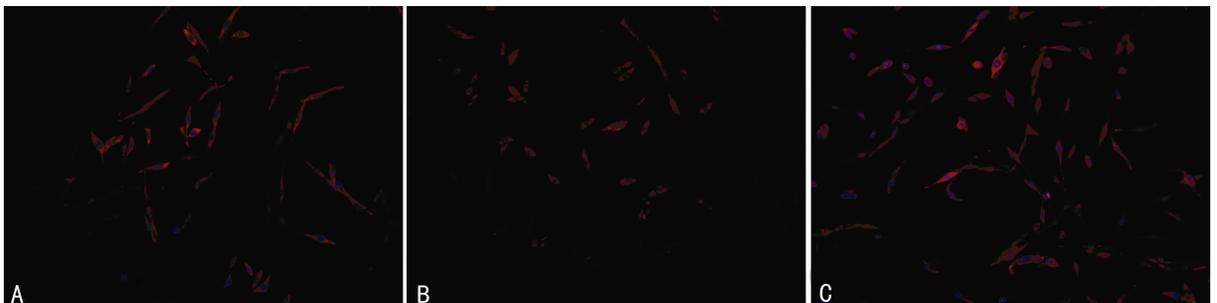
图 1 不同 OGD 时间对 PC12 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)



^a: $P<0.01$, 与正常对照组比较; ^b: $P<0.01$, 与 OGD 组比较。

图 2 米诺环素对 PC12 细胞 OGD 损伤后细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.3 米诺环素促进 PC12 细胞神经突的生长 荧光显微镜下观察可见, 正常对照组 PC12 细胞呈梭形, 细胞两极有明显的突起, OGD 组 PC12 细胞呈梭形, 神经突回缩, 而各浓度米诺环素治疗组相对于 OGD 组, PC12 细胞神经突长度增加 ($P<0.01$), 其中 1.0 μM 米诺环素对 PC12 细胞神经突生长的促进作用最强。见图 3。

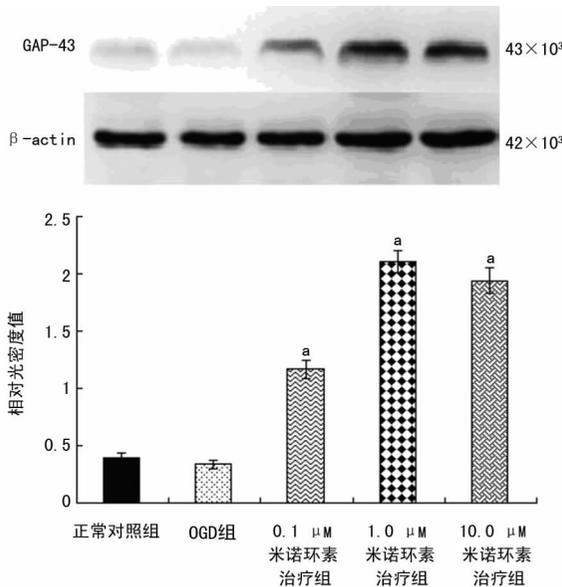


A: 正常对照组; B: OGD 组; C: 米诺环素组 (1.0 μM)。

图 3 米诺环素对 PC12 细胞 OGD 损伤后神经突生长的影响 (200 \times)

2.4 米诺环素促进 PC12 细胞 GAP-43 蛋白的表达 为进一步验证米诺环素对 PC12 细胞 OGD 损伤后神经突生长的影

响,Western blot 法测定轴突再生相关蛋白 GAP-43 的结果显示,正常对照组 PC12 细胞 GAP-43 蛋白呈基础表达(0.40±0.04),0.1、1.0、10.0 μM 米诺环素治疗组 GAP-43 的表达水平(1.17±0.08、2.11±0.10、1.94±0.11)均明显高于 OGD 组(0.34±0.04),差异有统计学意义($P<0.01$),见图 4。



^a: $P<0.01$,与 OGD 组比较。

图 4 各组 PC12 细胞 GAP-43 蛋白的表达水平

3 讨论

本研究发现,采取 OGD 6 h 再复氧复糖法能有效模拟脑缺血再灌注损伤的体外模型。低剂量米诺环素(0.1、1.0、10.0 μM)能有效提高 PC12 细胞 OGD 损伤后的存活率,同时能显著促进 PC12 细胞的轴突生长。

成年哺乳动物中枢神经系统损伤后轴突再生困难,导致严重而持久的神经功能缺损。缺血损伤后促进神经元的轴突再生,形成新的突触联系和神经环路,促进神经网络的重建从而改善神经功能。本研究首先建立 PC12 细胞 OGD 模型,CCK-8 法测得 OGD 6 h 后 PC12 细胞的病死率约为 54%。米诺环素是一种第二代四环素类衍生物,它具有抗菌和抗炎活性并被临床实践证实为一种治疗粉刺和关节炎的安全药物。米诺环素具有高脂溶性,能有效地通过血脑屏障从而在颅脑损伤,卒中,脊髓损伤,神经退行性疾病如肌萎缩性侧索硬化、帕金森病、亨廷顿病及多发性硬化等疾病的动物模型中发挥神经保护作用。大量研究表明米诺环素具有抗炎、抗凋亡、抗氧化应激及血管保护作用^[4-5]。米诺环素在神经疾病的病理生理过程中具有以下生物活性:抑制小胶质细胞的增殖及活化,从而使细胞因子如 TNF-α、IL-1、IL-6 的分泌降低,同时还可以抑制脂质的分泌和基质金属蛋白酶的活性^[6];通过 caspases 非依赖途径上调抗凋亡因子 Bcl-2 的表达^[7-8]及调控环氧化酶 2(COX-2),诱导一氧化氮合酶(iNOS)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)的活性^[9]。本研究发现米诺环素能缓解 OGD 对 PC12 细胞的损伤,使细胞存活率提高达 56%~77%。与 Chen 等^[10]研究结果类似,而米诺环素(0.1~10.0 μM)对正常 PC12 细胞存活率无影响(数据未发布)。

近期研究表明米诺环素能强化神经生长因子诱导 PC12 细胞神经突的分化^[3],并且促进大鼠局灶性脑缺血后皮质神经轴突的再生,改善大鼠神经功能^[11]。2007 年,Lampl 等^[12]开展的一项临床研究表明急性缺血性卒中患者,早期给予口服米诺环素治疗可以改善患者的神经功能缺失评分和生活能力状态分级评分。本研究发现,OGD 损伤使 PC12 细胞神经突回

缩,而米诺环素能促进 OGD 损伤后的细胞神经突长度增加。GAP-43 广泛表达在神经组织,被认为是神经元发育和再生的一种标志蛋白,对轴突生长和突触形成具有重要作用。本实验进一步发现,米诺环素能上调 PC12 细胞 OGD 损伤后 GAP-43 蛋白的表达。

综上所述,米诺环素对 PC12 细胞 OGD 损伤具有神经保护作用,可促进细胞神经突长度的增加,并能上调轴突再生相关蛋白 GAP-43 的表达,为缺血性脑血管病的神经康复治疗提供新的途径,但具体机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Papadopoulos CM, Tsai SY, Cheatwood JL, et al. Dendritic plasticity in the adult rat following middle cerebral artery occlusion and Nogo-a neutralization[J]. Cereb Cortex, 2006, 16(4): 529-536.
- [2] Fagan SC, Cronin LE, Hess DC. Minocycline development for acute ischemic stroke[J]. Transl Stroke Res, 2011, 2(2): 202-208.
- [3] Hashimoto K, Ishima T. A novel target of action of minocycline in NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells: translation initiation factor eIF4AI[J]. PLoS One, 2010, 5(11): e15430.
- [4] Plane JM, Shen Y, Pleasure DE, et al. Prospects for minocycline neuroprotection[J]. Arch Neurol, 2010, 67(12): 1442-1448.
- [5] Yong VW, Wells J, Giuliani F, et al. The promise of minocycline in neurology[J]. Lancet Neuro, 2004, 3(12): 744-751.
- [6] Fan X, Lo EH, Wang X. Effects of minocycline plus tissue plasminogen activator combination therapy after focal embolic stroke in type 1 diabetic rats[J]. Stroke, 2013, 44(3): 745-752.
- [7] Matsukawa N, Yasuhara T, Hara K, et al. Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke[J]. BMC Neurosci, 2009, 10: 126.
- [8] Ossola B, Lantto TA, Puttonen KA, et al. Minocycline protects SH-SY5Y cells from 6-hydroxydopamine by inhibiting both caspase-dependent and-independent programmed cell death[J]. J Neurosci Res, 2012, 90(3): 682-690.
- [9] Kalonia H, Mishra J, Kumar A. Targeting neuro-inflammatory cytokines and oxidative stress by minocycline attenuates quinolinic-acid-induced Huntington's disease-like symptoms in rats[J]. Neurotox Res, 2012, 22(4): 310-320.
- [10] Chen X, Chen S, Jiang Y, et al. Minocycline reduces oxygen-glucose deprivation-induced PC12 cell cytotoxicity via matrix metalloproteinase-9, integrin β1 and phosphorylated Akt modulation[J]. Neurol Sci, 2013, 34(8): 1391-1396.
- [11] Tao T, Xu G, Si Chen C, et al. Minocycline promotes axonal regeneration through suppression of RGMA in rat MCAO/reperfusion model[J]. Synapse, 2013, 67(4): 189-198.
- [12] Lampl Y, Boaz M, Gilad R, et al. Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study[J]. Neurology, 2007, 69(14): 1404-1410.