

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.22.007

米诺环素促进 PC12 细胞氧糖剥夺/复氧后神经突生长及机制研究*

杨洋,陶涛[△],付洁,何晓英,李小刚

(西南医科大学附属医院神经内科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 观察米诺环素对 PC12 细胞氧糖剥夺/复氧损伤后神经突生长的影响。**方法** 将体外培养的 PC12 细胞随机分为正常组、模型组(OGD/R)、米诺环素组(1 μmol/L, MC+OGD/R)和 MLCP 抑制剂组(1 nmol/L Calyculin A)。以氧糖剥夺 6 h/复氧模拟体外脑缺血再灌注损伤对 PC12 细胞进行处理,复氧 24 h 后采用 CCK-8 法测定 PC12 细胞的存活率,Western blot 法测定肌球蛋白轻链(MLC)及磷酸化肌球蛋白轻链(p-MLC)的表达,细胞免疫荧光染色标记 PC12 细胞轴突,荧光显微镜下观察轴突长度。**结果** 米诺环素组 PC12 细胞存活率明显高于模型组[(77.7±3.3)% vs. (48.6±3.2)%, $P<0.05$],氧糖剥夺/复氧损伤引起 PC12 细胞神经突回缩,米诺环素组 PC12 细胞神经突平均长度较模型组增加[(44.79±5.36) μm vs. (15.75±5.92) μm, $P<0.05$],MLCP 抑制剂组能阻断米诺环素的轴突生长促进作用。此外,模型组 PC12 细胞 MLC 磷酸水平明显高于米诺环素组[1.02±0.12 vs. 0.33±0.07, $P<0.05$]。**结论** 米诺环素通过激活 MLCP/MLC 信号通路,使 MLC 磷酸化水平下降,促进 PC12 细胞氧糖剥夺/复氧后神经突的生长。

[关键词] 米诺环素;PC12 细胞;氧糖剥夺/复氧损伤;轴突再生;MLCP/MLC 信号通路**[中图分类号]** R741.02**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)22-2909-04

Study on minocycline promoting neurite growth of PC12 cells after oxygen glucose deprivation/reoxygenation and the relative mechanism*

YANG Yang, TAO Tao[△], FU Jie, HE Xiaoying, LI Xiaogang

(Department of Neurology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of minocycline on neurite growth of PC12 cells after oxygen glucose deprivation and reoxygenation (OGD/R). **Methods** The in vitro cultured PC12 cells were randomly divided into the normal group, model group(OGD/R), minocycline group(1 μmol/L, MC+OGD/R) and MLCP inhibitor group(1 nmol/L calyculin A). PC12 cells were treated by oxygen glucose deprivation for 6 h and reoxygenation to mimic cerebral ischemia reperfusion injury in vitro. At 24 h after reoxygenation, the CCK-8 assay and Western blot were adopted respectively detect the survival ability of PC12 cells and the expressions of myosin light chain (MLC) and p-MLC respectively. Neurites were labeled with cellular immunofluorescence staining and the length of axon was observed by fluorescence microscope. **Results** The PC12 cells survival rate in the minocycline group was significantly higher than that in the model group [(77.7±3.3)% vs. (48.6±3.2)%, $P<0.05$]. OGD/R injury caused neurite retraction of PC 12 cells, the mean length of neurite of PC12 cells in the minocycline group was increased compared with the model group [(44.79±5.36) μm vs. (15.75±5.92) μm, $P<0.05$], and the MLCP inhibitor group could block the effect of minocycline for promoting the neurite growth. In addition, the phosphorylation level of PC12 cells MLC in the model group was obviously higher than that in the minocycline group [(1.02±0.12) vs. (0.33±0.07), $P<0.05$]. **Conclusion** Minocycline can reduce the phosphorylation level of MLC in PC12 cell by activating MLCP/MLC signaling pathway, and then promotes neurite growth after OGD/R.

[Key words] minocycline; PC12 cells; oxygen glucose deprivation/reoxygenation injury; axon regeneration; MLCP/MLC signaling pathway

缺血性卒中是成人致残最主要的原因,大多数脑梗死患者残留严重而持久的神经功能缺损。脑梗死

后神经再生和神经可塑性是当今神经科学研究的热点。目前认为受损神经元的轴突再生和突触形成与

* 基金项目:四川省卫生计生厅资助项目(16PJ548);西南医科大学附属医院课题(2015-PT-010)。作者简介:杨洋(1989-),硕士,主要从事脑血管疾病的研究。 [△] 通信作者, E-mail: congsheng1984@163.com。

神经功能恢复密切相关,中枢神经系统损伤后神经元信息网络整合功能的重建,形成新的神经环路,可促进神经功能的恢复。米诺环素是一种第二代半合成的四环素类抗生素,被认为是目前最有前途的神经保护剂。动物研究表明,米诺环素可促进大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后神经元轴突再生^[1],近期一项临床研究显示,急性缺血性卒中患者早期使用米诺环素可促进患者神经功能的恢复^[2]。本课题组前期的体外研究表明,米诺环素对 PC12 细胞氧糖剥夺损伤具有保护作用,可以显著提高细胞的存活率且促进神经突的生长^[3],但其具体机制尚不明确。肌球蛋白轻链磷酸酶(myosin light chain phosphatase,MLCP)是 Rho 激酶(ROCK)的下游底物之一,活化的 ROCK 灭活 MLCP,使其不能水解 MLC 的磷酸基团,从而提高细胞内 MLC 的磷酸化水平,导致生长锥的崩解及轴突回缩^[4]。所以本研究旨在观察米诺环素对氧糖剥夺/复氧后 PC12 细胞神经突生长的影响,并探讨 MLCP/MLC 信号通路对神经突生长的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 PC12 细胞高分化细胞株(中科院上海细胞库),DMEM 无糖培养基(Gibco 公司),盐酸米诺环素(美国 Sigma 公司),MLCP 抑制剂 Calyculin A、兔抗 MLC 和兔抗 p-MLC(美国 CST 公司),兔抗 MAP-2 及小鼠抗 GAPDH(美国 Santa Cruz 公司),Dylight 标记山羊抗兔抗体(碧云天生物公司)。其他试剂均购于相应代理商。

1.2 PC12 细胞的传代培养 体外培养 PC12 细胞,每 3 天换液 1 次,待细胞长满 80%~90%时,用 0.25%胰酶消化后,以 1:3 进行传代培养,取第 7~9 代细胞进行实验。取生长状态良好的细胞,用 DMEM 培养液吹打成细胞悬液,计数后分别以 5×10^4 /孔的细胞密度接种在 96 孔板, 4×10^5 /孔接种在 24 孔板, 2×10^6 /孔接种在 75 cm² 的培养瓶,置于 37 °C 5% CO₂ 恒温孵箱内培养。

1.3 氧糖剥夺/复氧模型的建立 参照本课题组前期报道的方法^[5],先去掉培养液,PBS 清洗 3 次后,加入不含血清的 DMEM 无糖培养基,置于含 94% N₂,1% O₂ 和 5% CO₂ 的孵箱中培养,6 h 后更换成 DMEM 高糖培养基,置于含 5% CO₂ 的正常氧孵箱中继续培养 24 h。

1.4 实验分组 将 PC12 细胞随机分为正常组、模型组、米诺环素组(MC 组)和 MLCP 抑制剂组(Cal 组)。正常组不进行任何处理;模型组采取氧糖剥夺 6 h 再复氧 24 h;米诺环素组在氧糖剥夺及复氧全过程中加入 1 μmol/L 米诺环素;MLCP 抑制剂组在氧糖剥夺 1 h 前预先加入 1 nmol/L MLCP 抑制剂,余同米诺环素组。

1.5 CCK-8 法检测细胞活性 参照 CCK-8 试剂盒说明书,复氧 24 h 后,每组每孔均加入 10 μL 的 CCK-

8 试剂,放入 37 °C 孵箱中继续培养 4 h,选择 490 nm 波长,然后在酶标仪上检测 96 孔板中各孔的吸光度值[OD₄₉₀],每组 6 个复孔,重复 3 次实验,按公式计算 PC12 细胞的存活率=[实验组平均 OD₄₉₀/正常组平均 OD₄₉₀]×100%。

1.6 免疫细胞荧光 复氧 24 h 后,从 24 孔板中取出长有细胞的盖玻片,PBS 洗涤 3 次后,室温下用 4%多聚甲醛固定 20 min,PBS 漂洗 3 次后滴加 0.3% Triton X-100 37 °C 下破膜 20 min,PBS 漂洗后加 10%山羊血清置于 37 °C 恒温箱封闭 45 min,去除血清后加入兔抗 MAP2 抗体(1:100)于 4 °C 恒温箱孵育过夜,对照组用 PBS 代替一抗,PBS 漂洗后加入 Dylight 594 标记山羊抗兔抗体(1:150)37 °C 避光孵育 1 h,PBS 漂洗后加入 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)核染 5 min,50%甘油封片,荧光显微镜下观察并拍照,在 200 倍荧光显微镜下随机选取 10 个视野,实验重复 3 次,采用 Image-Proplus 软件对荧光图像进行分析,计算 PC12 细胞神经突的平均长度。

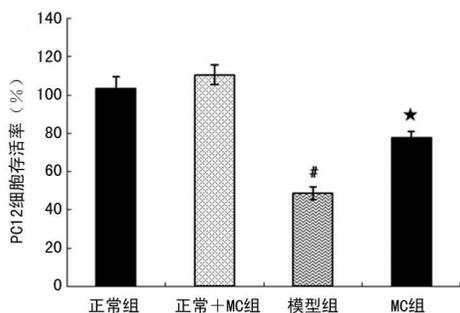
1.7 Western blot 参照凯基全蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白并测定样品蛋白浓度,以 1:4 加入 5×上样缓冲液,煮沸变性 5 min。每孔加入 100 μg 蛋白样品进行电泳分离(12% SDS-PAGE,60 V、45 min,80 V、90 min)后转膜(PDVF 膜,250 mA、40 min),分别加入一抗 MLC(1:1 000),p-MLC(1:500)和 GAPDH(1:1 000),4 °C 孵育过夜,次日加入二抗(1:3 000)孵育后 ECL 显影并拍照,用 Quantity One 软件对条带进行分析,以目的与内参条带光密度的比值作为蛋白表达的相对含量。

1.8 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,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

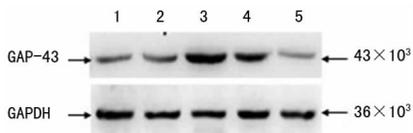
2.1 米诺环素对 OGD/R 损伤的 PC12 细胞的保护作用 复氧 24 h 后,模型组 PC12 细胞的存活率为 $(48.6 \pm 3.2)\%$,米诺环素(1 μmol/L)处理后能够明显提高氧糖剥夺/复氧后 PC12 细胞的存活率 $[(77.7 \pm 3.3)\%, P<0.05]$,图 1,而米诺环素对正常培养 PC12 细胞的存活率无影响($P>0.05$)。

2.2 米诺环素对 GAP-43 蛋白表达的影响 在正常组 PC12 细胞中加入米诺环素后 GAP-43 蛋白无明显改变,米诺环素并不会促进正常 PC12 细胞 GAP-43 的表达,也对正常 PC12 细胞无毒性作用;MC 组 GAP-43 蛋白的表达 (1.69 ± 0.22) 较模型组明显升高($P<0.05$);而 Gal 组 GAP-43 蛋白的表达明显低于 MC 组 $(0.32 \pm 0.13 vs. 1.69 \pm 0.22, P<0.05)$,见图 2。



#: $P < 0.05$, compared with normal group; *: $P < 0.05$, compared with model group

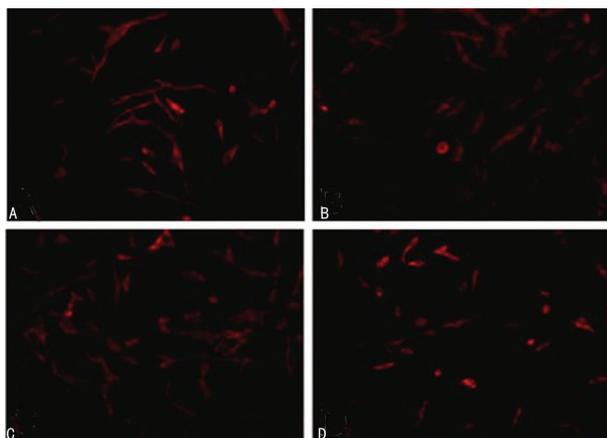
图 1 米诺环素对 PC12 细胞氧糖剥夺/复氧损伤后的保护作用



1: 正常组; 2: 模型组; 3: MC 组; 4: Cal 组; 5: 正常+MC 组

图 2 米诺环素对氧糖剥夺/复氧损伤后 PC12 细胞 GAP-43 蛋白表达的影响

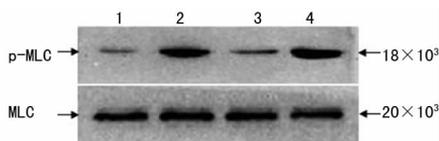
2.3 米诺环素促进 PC12 细胞氧糖剥夺/复氧损伤后神经突生长 荧光显微镜下观察可见正常组 PC12 细胞呈梭形, 细胞两极各有一个长突起(图 3)。模型组神经突平均长度为 $(15.75 \pm 5.92) \mu\text{m}$, MC 组为 $(44.79 \pm 5.36) \mu\text{m}$, Cal 组为 $(25.33 \pm 5.39) \mu\text{m}$, 各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A: 正常组; B: 模型组; C: MC 组; D: Cal 组

图 3 米诺环素对氧糖剥夺/复氧损伤后 PC12 细胞神经突生长的影响($\times 200$)

2.4 米诺环素对 PC12 细胞 OGD/R 损伤后 MLC 磷酸化的影响 正常组 PC12 细胞中 p-MLC 蛋白仅有少量表达(0.21 ± 0.06); 模型组 p-MLC 的表达显著增加(1.02 ± 0.12), 经米诺环素处理后, PC12 细胞 p-MLC 的表达较模型组明显下降(0.33 ± 0.07), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 预先加入抑制剂 Calyculin A 的 PC12 细胞, p-MLC 的表达较 MC 组明显增加(1.38 ± 0.09 , $P < 0.05$)。各组间 MLC 蛋白的表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 4。



1: 正常组; 2: 模型组; 3: MC 组; 4: Cal 组

图 4 米诺环素对氧糖剥夺/复氧损伤后 PC12 细胞 MLC 磷酸化的影响

3 讨论

缺血缺氧性脑损伤可造成不同程度的神经功能缺损, 而神经功能的恢复与神经元的修复及轴突再生密切相关, 促进轴突再生、神经元网络重建以及突触环路形成是目前研究的热点, 也成为神经康复的首要目标。PC12 细胞氧糖剥夺/复氧损伤真实地反映了缺血性脑卒中引起的脑损害。

米诺环素是一种高脂溶性的四环素类抗生素, 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有效药物。米诺环素能有效的通过血脑屏障从而在颅脑创伤、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^[6-7]。近年来多项体外研究表明米诺环素对 PC12 细胞氧糖剥夺/复氧损伤具有一定的保护作用^[8-9], 本研究前期的研究结果显示, 100 nmol/L 至 10 $\mu\text{mol/L}$ 米诺环素能提高氧糖剥夺/复氧损伤后 PC12 细胞的存活率, 其中 1 $\mu\text{mol/L}$ 米诺环素对 PC12 细胞的保护作用最佳。因此本试验选取该浓度的米诺环素用于后续神经突生长的研究。

RhoA/ROCK 信号途径是调节神经元轴突再生的主要信号通路, 其下游底物之一肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)是重要的细胞骨架蛋白之一, 相对分子质量为 20×10^3 , 其表达与突触再生密切相关。细胞内的 MLC 磷酸化水平对调节突出再生起到重要作用, 在肌球蛋白轻链激酶(MLCK)和肌球蛋白轻链磷酸酶(MLCP)双重调节下, MLC 发生磷酸化和去磷酸化的相互转化。既往研究证实, Calyculin A 可通过抑制 MLCP 阻断神经生长因子(NGF)对 PC12 细胞神经突生长的促进作用^[10]。生长相关蛋白-43(GAP-43)是一种表达在轴突末梢的突出前蛋白, 与神经系统发育、突触形成和神经再生有着密切关系, 已经被证实神经细胞受损之后的轴突再生过程中表达明显增高, 且在促进神经突生长和突出重塑中起到至关重要的作用^[11-12], 可通过观察其表达水平, 了解轴突再生情况。

本研究发现, 氧糖剥夺/复氧可诱导 PC12 细胞凋亡, 降低其存活率, 并通过上调 p-MLC, 诱导神经突回缩或抑制轴突再生。复氧 24 h 后, MC 组较模型组 PC12 细胞存活率明显增高, 说明米诺环素可缓解 PC12 细胞氧糖剥夺/复氧损伤。模型组较正常组 p-

MLC 水平明显增高,而 MC 组较模型组 p-MLC 有明显下降趋势,且细胞存活率、GAP-43 的表达及轴突长度测定较模型组均有明显增高,说明米诺环素可能通过调节 MLCP/MLC 信号通路,调节细胞内 MLC 的磷酸化水平,进而缓解氧糖剥夺/复氧对 PC12 细胞的损伤作用并促进轴突再生。模型组较 MC 组 p-MLC 表达明显增高,GAP-43 表达明显减少,且神经突长度明显缩短,说明 Calyculin A 可能阻断了米诺环素与 MLCP/MLC 信号通路的相互作用。因此,笔者认为 MLCP/MLC 信号通路可能与米诺环素促进 PC12 细胞氧糖剥夺/复氧损伤后神经轴突再生密切相关。

综上所述,本研究发现 $1 \mu\text{mol/L}$ 米诺环素对 PC12 细胞氧糖剥夺/复氧损伤具有保护作用,可明显提高损伤细胞的存活率,显著促进缺血缺氧/复氧之后神经突的生长,其机制可能为米诺环素促进受损的 PC12 细胞中 MLCP/MLC 信号通路激活,使得 MLC 磷酸化水平降低,同时促进 GAP-43 表达增加,进而促进轴突再生及突触网络的重建。本研究发现,米诺环素对氧糖剥夺/复氧损伤的 PC12 细胞神经突生长的促进作用与 MLCP/MLC 信号通路的激活密切相关,揭示了米诺环素促进 PC12 细胞神经突生长潜在的细胞和分子机制,为将来的临床应用提供了理论基础。未来的研究可进一步探索 MLCP/MLC 信号通路激活靶点,为新型药物的研究提供理论依据。

参考文献

- [1] TAO T, XU G H, SI C C, et al. Minocycline promotes axonal regeneration through suppression of RGMA in rat MCAO/reperfusion model[J]. *Synapse*, 2013, 67(4): 189-198.
- [2] 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.
- [3] 陶涛,秦新月,冯金洲,等.米诺环素对 PC12 细胞缺氧缺糖损伤后神经突生长的影响[J]. *重庆医学*, 2015, 44(5): 605-607.
- [4] WALSH M P, COLE W C. The role of actin filament dynamics in the myogenic response of cerebral resistance arteries[J]. *J Cereb Blood Flow Metabolism*, 2013, 33(1): 1-12.
- [5] 陶涛,秦新月,马勋泰,等. ERK1/2 通路介导米诺环素促进 PC12 细胞氧糖剥夺后血红素加氧酶-1 的表达[J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(1): 117-120.
- [6] HAHN J N, KAUSHIK D K, MISHRA M K, et al. Impact of minocycline on extracellular matrix metalloproteinase inducer, a factor implicated in multiple sclerosis immunopathogenesis[J]. *J Immunol*, 2016, 197(10): 3850-3860.
- [7] PLANE J M, SHEN Y, PLEASURE D E, et al. Prospects for minocycline neuroprotection[J]. *Arch Neurol*, 2010, 67(12): 1442-1448.
- [8] SONG Y, WEI E Q, ZHANG W P, et al. Minocycline protects PC12 cells from ischemic-like injury and inhibits 5-lipoxygenase activation[J]. *Neuroreport*, 2004, 15(14): 2181-2184.
- [9] CHEN X, CHEN S, JIANG Y, et al. Minocycline reduces oxygen-glucose deprivation-induced PC12 cell cytotoxicity via matrix metalloproteinase-9, integrin $\beta 1$ and phosphorylated Akt modulation[J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(8): 1391-1396.
- [10] FUJITA A, HATTORI Y, TAKEUCHI T, et al. NGF induces neurite outgrowth via a decrease in phosphorylation of myosin light chain in PC12 cells[J]. *Neuroreport*, 2001, 12(16): 3599-3602.
- [11] AIGNER L, ARBER S, KAPFHAMMER J P, et al. Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice[J]. *Cell*, 1995, 83(2): 269-278.
- [12] HONER W G, FALKAI P, CHEN C, et al. Synaptic and plasticity-associated proteins in anterior frontal cortex in severe mental illness[J]. *Neuroscience*, 1999, 91(4): 1247-1255.

(收稿日期:2018-01-20 修回日期:2018-05-08)

(上接第 2908 页)

- 学报, 2013, 41(4): 1-4.
- [5] 秦丽,关莉,林锐珊,等.白藜芦醇通过调节 iNOS 抑制 C57BL/6J 小鼠动脉粥样硬化的机制探讨[J]. *中国病理生理杂志*, 2015(9): 1601-1605.
 - [6] 张彦,马双陶,杨永健.糖尿病合并动脉粥样硬化小鼠模型的建立[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(2): 186-189.
 - [7] 刘季晨.血清淀粉样 P 物质对巨噬细胞炎症反应以及氧化应激的影响及机制[D]. 广州:南方医科大学, 2016.
 - [8] 刘应柯,张玉峰,刘尚岭,等.脂脉宁对动脉粥样硬化家兔氧化应激反应及 LDL-R, VCAM-1 基因表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(20): 214-217.
 - [9] 徐能全,邱启祥,周小龙,等.下丘脑-垂体轴反馈调节方式对内皮细胞 MDA 代谢和 NOS 表达的影响[J]. *重庆医学*, 2011, 40(8): 742-743, 751.
 - [10] 赵彦,赵美丽,林爱翠,等.长收缩运动对动脉粥样硬化兔血管内皮生长因子与一氧化氮的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2016, 38(10): 726-729.
 - [11] 赵洪宇,蒋梦会,曹久妹,等. IL-6/STAT3 通路对 THP-1 单核细胞环氧化酶 2 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(3): 251-255, 260.
 - [12] 姜红菊,李润智,杜修文,等.宁心解毒汤、血塞通、瑞舒伐他汀对 ApoE^{-/-} 小鼠炎症因子和 As 斑块的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(12): 1214-1218.

(收稿日期:2018-01-11 修回日期:2018-05-25)