

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.06.004

天麻素对镉诱导的星形胶质细胞损伤的保护效应*

周翠红¹ 薛姗姗¹ 刘江正² 王化宁¹ 顾婷婷³ 彭正午^{1Δ}

(1 空军军医大学西京医院心身科 陕西 西安 710032; 2 空军军医大学毒理教研室 陕西 西安 710032;

3 空军军医大学西京医院麻醉科 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 探讨氯化镉 (CdCl₂) 和天麻素 (GAS) 对小鼠星形胶质细胞活力及神经营养因子 GDNF 和抗氧化基因 Nrf2, HO-1, SOD-1 表达的影响。**方法:** 首先, 给予体外培养的小鼠星形胶质细胞不同浓度的 CdCl₂ (Con, 2.5 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM) 处理 24 h 或 48 h, 随后检测细胞活力筛选出造成星形胶质细胞损伤的 CdCl₂ 浓度和时间。然后使用上述筛选的 CdCl₂ 作用浓度 (5 μM) 构建星形胶质细胞损伤的同时再给予不同浓度的天麻素 (0, 20 μg/mL, 30 μg/mL, 40 μg/mL, 50 μg/mL) 处理 24 h 或 48 h, 随后检测细胞活力并提取细胞 RNA 检测其 caspase3, GDNF (胶质源性神经营养因子 Glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) 和 Nrf2 (Nuclear factor erythroid2-related factor2), HO-1 (Heme oxygenase 1), SOD-1 (superoxide dismutase 1) 等抗氧化基因的 mRNA 表达的变化。**结果:** (1) 2.5 μM CdCl₂ 处理 24 h 后星形胶质细胞活力已经有明显下降 ($P < 0.05$), 5 μM CdCl₂ 处理 24 h 后, 星形胶质细胞活力显著下降 ($P < 0.01$); (2) CdCl₂ 浓度越大, 细胞损伤严重; (3) 一定浓度的天麻素处理可以缓解 CdCl₂ 造成的星形胶质损伤, 恢复其细胞活力, 下调 caspase3 mRNA 水平; (4) CdCl₂ 下调了星形胶质细胞的 GDNF, Nrf2, HO-1 和 SOD-1 的 mRNA 水平, 天麻素可以抑制 CdCl₂ 对上述基因的 mRNA 水平的调节作用, 且浓度越高调节作用越强。**结论:** 天麻素可能通过调节小鼠星形胶质细胞的 GDNF, Nrf2, HO-1 和 SOD-1 基因表达缓解 CdCl₂ 导致的细胞损伤。

关键词: 镉; 星形胶质细胞; GDNF; Nrf2; HO-1; SOD-1

中图分类号: R-33; R285.5; R74 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)06-1015-07

Protective Effect of Gastrodin on Cadmium-induced Injury of Astrocytes of Mice*

ZHOU Cui-hong¹, XUE Shan-shan¹, LIU Jiang-zheng², WANG Hua-ning¹, GU Ting-ting³, PENG Zheng-wu^{1Δ}

(1 Department of Psychosomatic, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of toxicology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Department of Anesthesia, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of cadmium and gastrodin on cell viability and the effect on the expression level of GDNF, Nrf2, HO-1 and SOD-1 of astrocytes from the hippocampus of mice. **Methods:** First, cultured hippocampal astrocytes from new-born (one day old) mice were divided into control and cadmium groups: control group was treated with medium (5% FBS+DMEM) and cadmium treatment groups were treated with 2.5, 5, 10 or 20 μM CdCl₂ for 24 or 48 hours respectively. Then cell viability was measured by CCK-8 and the appropriate concentration and time point (5 μM, 24 h) of CdCl₂ to induce cell injury were determined. After that, cultured astrocytes were divided into control, sham and GAS groups: control group was treated with medium (5% FBS+DMEM), sham group was treated with 5 μM CdCl₂ for 24 h, GAS groups were treated with 5 μM CdCl₂ and 20 μg/mL, 30 μg/mL, 40 μg/mL, 50 μg/mL gastrodin for 24 h respectively at the same time. Then cell viability was measured by CCK-8 and total RNA was extracted from cells and the mRNA levels of GDNF, Nrf2, HO-1 and SOD-1 were measured by Real-time PCR. **Results:** (1) Compared with the control, CdCl₂ significantly decreased the cell viability of astrocytes; (2) The effect of isoflurane revealed a dose effect---compared with 2.5 μM group, cells treated with 5.0-20 μM of CdCl₂ suffered more influence; (3) 5 μM CdCl₂ treated 24 h significantly down-regulated the mRNA levels of GDNF, Nrf2, HO-1 and SOD-1 mRNA level in the astrocytes; (4) Gastrodin administration restored the cell viability and expression of caspase3, GDNF, Nrf2, HO-1 and SOD-1 in the astrocytes post-CdCl₂ exposures. **Conclusion:** Gastrodin administration restored the decreased cell viability and reversed the disturbed expression of GDNF, Nrf2, HO-1 and SOD-1 in astrocytes exposed to CdCl₂.

Key words: Cadmium; Gastrodin; GDNF; Nrf2; HO-1; SOD-1

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R285.5; R74 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)06-1015-07

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81630032; 81401109); 国家科技支撑计划项目 (2016YFC1307100)

作者简介: 周翠红 (1986-), 女, 助理研究员, 主要研究方向: 神经生物学, E-mail: zch4610@126.com

Δ 通讯作者: 彭正午 (1984-), 男, 副研究员, 主要研究方向: 神经生物学, E-mail: pengzhengwu1446@163.com, 电话: 13720498289

(收稿日期: 2019-08-23 接受日期: 2019-09-18)

前言

镉(Cadium, Cd)是现代工农业环境中广泛存在的一种银白色剧毒重金属。随着工农业的迅猛发展,环境中的重金属镉污染也快速增加,人或动物类通过土壤、空气、水、饮食以及职业暴露等多种途径长时间接触镉,不仅对肝、肾、肺、胰、骨骼等多种器官造成损伤,还能透过血脑屏障损伤中枢神经系统^[1]。镉暴露会产生长期的神经损伤,包括突触传递和神经递质传递紊乱,大脑抗氧化系统异常等,从而引起认知功能障碍和焦虑行为^[2]。有研究证明,镉引起的氧化应激是其毒性机理的罪魁祸首,它也是许多神经退行性疾病的主要致病原因^[3,4]。

星形胶质细胞是大脑的重要组成成员,对大脑的诸多功能发挥关键调节作用,尤其是在维持神经元细胞微环境,清除氧自由基和代谢毒性物质,释放胶质源性神经营养因子(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)等神经营养因子维持神经元的正常功能等方面发挥至关重要的作用^[5]。并且已有研究表明,镉暴露会促使钙离子和活性氧(reactive oxygen species, ROS)在星形胶质细胞内积累致使其发生凋亡和坏死,这是镉中毒导致中枢神经受损的原因之一^[6,7]。

天麻素是从我国传统中药材兰科天麻属植物天麻的块茎中提取的主要成分,在多种神经病变中对神经元和星形胶质细胞具有良好的保护作用^[8,9]。此外,还有研究证实,天麻素具有抗氧化效果,可以上调小鼠的抗氧化基因 Nrf2 和 HO-1 抵抗双氧水诱导的氧化应激损伤^[10]。但天麻素对镉诱导的星形胶质细胞损伤是否具有保护作用尚不清楚。本研究以氯化镉(CdCl₂)诱导的小鼠星形胶质细胞损伤模型为对象,观察了不同浓度天麻素干预对镉损伤星形胶质细胞的活性,凋亡基因 caspase3,神经营养因子 GDNF 及抗氧化基因 Nrf2, HO-1 和 SOD-1 的表达水平的影响,为镉中毒导致中枢神经系统受损的机制及治疗策略提供新的参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

(1) 细胞培养试剂:DMEM (Hyclone) + 10% FBS (Hyclone); 0.25%胰酶(Gibco); (2) 异氟烷:扬子江药业集团有限公司; (3) 基因表达检测试剂:Trizol (Takara, 108-95-2); 反转录试剂盒 (Takara, RR036A); SYBR Premix Ex Taq (Takara, RR820A); (4) CdCl₂ · 2.5H₂O (AR, Aladdin, 7790-78-5); (5) CCK-8(上海七海复泰生物科技有限公司); (6) 天麻素(昆明制药集团有限公司); (7) 主要实验仪器:恒温细胞培养箱(Thermo

Scientific); PCR 仪(Thermo Scientific); 实时定量 PCR 仪(Thermo Scientific PikoReal); (8) 抗体:Anti-GFAP antibody (abcam, ab7260); Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor ® 568 conjugate (Invitrogen, A10042); DAPI (Roche, 10236276001)

1.2 实验方法

(1) 小鼠原代星形胶质细胞分离培养^[11]: 无菌条件下取出新生小鼠大脑, 在解剖镜下分离出海马, 剪碎后转移至含有 F12 培养基的离心管中, 用吸管反复吹吸约 12 次, 然后静置 3-5 min, 取上层细胞悬液用 200 目网筛过滤, 收集滤液, 接种于多聚赖氨酸包被过的培养瓶中, 置于 5% CO₂ 37℃ 恒温箱中培养, 48 h 后半量换液, 细胞长满(7-10 天)后将培养瓶固定在摇床上, 240 rpm 摇晃进行纯化去除上层杂细胞。

(2) 免疫荧光染色: 纯化好的细胞用 0.25%胰酶消化, 然后接种于玻片上进行培养, 细胞长满后去掉培液, PBS 洗 3 次, 4%PFA 固定 1 h, PBS 洗 3 次, 加一抗 (Anti-GFAP antibody 1: 500), 4℃ 孵育 24 h, PBS 洗后加二抗 (Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 568 1:1000), 室温孵育 2 h, 然后加 DAPI 染核 30 min, 洗后封片, 荧光显微镜检测拍照。

(3) CdCl₂ 处理: 准确称取 2.28 mg CdCl₂ · 2.5H₂O, 将其溶于 10 mL 含 5% FBS DMEM 培养基的 EP 管内, 充分溶解, 配制浓度为 1 mmol/L 的储备液, 并于超净工作台内用 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤分装, -20℃ 冰箱保存, 在实验临用前将其稀释至所需浓度。

(4) CCK-8 检测细胞活性: 将小鼠星形胶质细胞每孔 1 × 10⁴ 个接种于 96 孔板中, 并于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h 后换液, 分别加入 0、2.5、5、10 以及 20 μmol/L CdCl₂ 共同孵育 24 h 或 48 h 后使用 CCK-8 法测定细胞存活率。每孔 100 μL 培养体系中加入 10 μL CCK-8 试剂液, 37℃ 条件下孵育 4 h 后, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光值并计算细胞相对存活率 (细胞活力 × % = [A(加药) - A(空白)]/[A(0 加药) - A(空白)] × 100%)。

(5) 天麻素处理: 准确称取 100 mg 天麻素, 将其溶于 2 mL 含 5% FBS DMEM 培养基的 EP 管内, 充分溶解, 配制浓度为 50 mg/mL 的储备液, 并于超净工作台内用 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤, -20℃ 冰箱保存, 在实验临用前将其稀释至所需浓度。

(6) 基因表达检测: Trizol 提取 RNA 后, 反转录成 cDNA, 然后进行实时定量 PCR (Real Time-PCR) 反应, 检测 GDNF, Nrf2, HO-1 和 SOD-1 基因以及内参基因 GAPDH 的 mRNA 表达情况。RT-PCR 引物由 Takara 公司合成, 序列如表 1 所示。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of Real-time PCR

Gene	Forward	Reverse
GDNF	TCAGCTGCCCAGCACATTTTC	TGGGAGCATCAGCTACCACATC
Caspase3	AACCAGATCACAACCTTCTGCAAA	TGGAGTCCAGTGAACTTCTTTCAG
Nrf2	TTGGCAGAGACATTCCCATTTG	AAACTTGCTCCATGTCCTGCTCTA
HO-1	TGCAGGTGATGCTGACAGAGG	GGGATGAGCTAGTGCTGATCTGG
SOD-1	AGCATTCCATCATTGGCCGTA	TACTGCGCAATCCCAATCACTC
GAPDH	CCAATGTGTCCGTCGTGGATCT	GTTGAAGTCGCAGGAGACAACC

1.3 统计学方法

实验结果采用均值 $\pm$ 标准差(SD)的形式表示,采用SPSS19.0进行数据统计分析。各组之间的比较用单因素方差分析,两两数据比较采用最小显著差数法(Least significant difference, LSD)检验;设 $P<0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠星型胶质细胞鉴定

胶质纤维酸性蛋白 GFAP 是星形胶质细胞的重要标志蛋白,是星形胶质细胞纯化鉴定中常用的指标之一^[12]。本实验对分离培养的新生小鼠星形胶质细胞进行了 GFAP 和 DAPI 免疫荧光染色,在荧光显微镜下观察了细胞形态和标志蛋白 GFAP 的表达。结果如图 1 所示,细胞呈星形,核较大是典型的星形胶质细胞形态,所有细胞均呈 GFAP 表达阳性。说明本实验所获得的细胞是星形胶质细胞且纯度较高,可以用于后续研究。

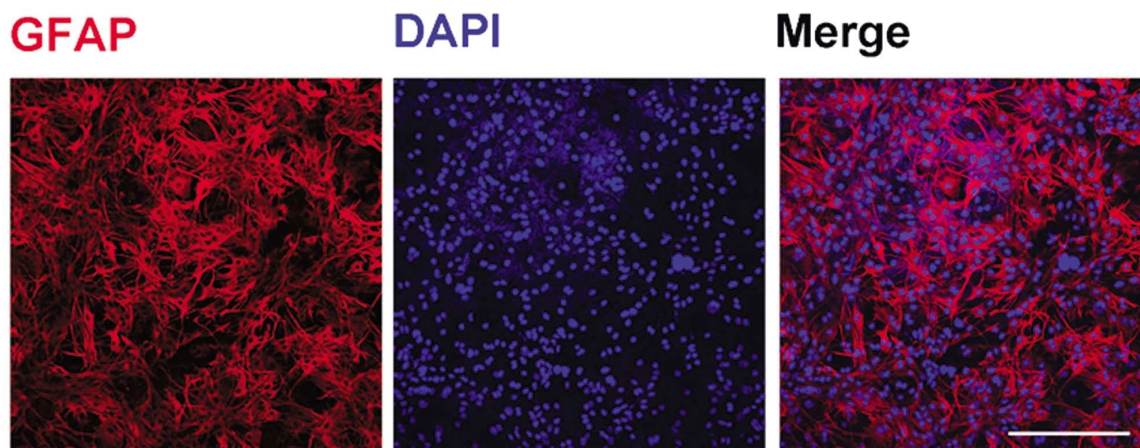


图 1 体外培养星形胶质细胞的形态及 GFAP 表达($\times 200$, 标尺 200 μm)

Fig.1 Photomicrographs of Astrocytes in culture ($\times 200$, Bar: 200 μm)

2.2 CdCl_2 处理对体外培养星形胶质细胞活力的影响

如图 2 所示,不同浓度 CdCl_2 处理 24 h ($F_{4,25}=11.79$, $P<0.01$; 图 2.A)和 48h ($F_{7,56}=31.75$, $P<0.01$; 图 2.B)后都导致了星形胶质细胞活力下降,各组细胞的活力出现明显差异。2.5 μM 的 CdCl_2 处理 24 后,细胞活力较对照组有明显下降($P<0.05$),浓度

增至 5 μM 时,细胞活力显著下降($P<0.01$),之后 CdCl_2 的浓度越高,细胞活力下降越明显。 CdCl_2 处理 48 h 后,细胞活力也是从 2.5 μM 浓度开始下降, CdCl_2 的浓度越高细胞损伤越严重,细胞活力越低。因此,在后续实验中我们选择 5 μM 的 CdCl_2 处理 24 h 来构建细胞损伤模型。

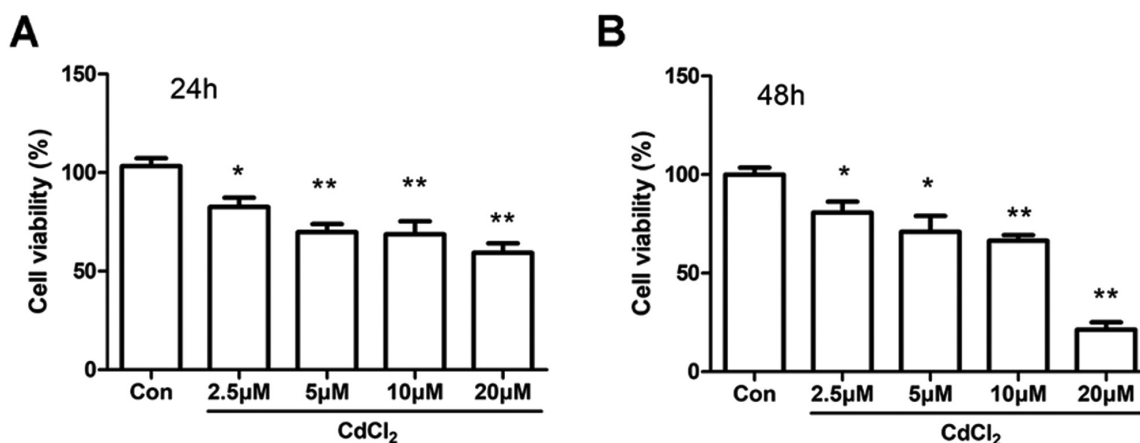


图 2 不同浓度 CdCl_2 对体外培养小鼠星形胶质细胞活性的影响。(A) CdCl_2 作用 24 h 后的细胞活性;(B) CdCl_2 作用 48 h 后的细胞活性。

注:与 Con 组比 * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

Fig.2 Cell viability of astrocytes at 24 h or 48 h post- CdCl_2 exposures. (A) Cell viability of astrocytes at 24 h post- CdCl_2 exposures;

(B) Cell viability of astrocytes at 48 h post- CdCl_2 exposures.

Note: * $P<0.05$ vs. Con, ** $P<0.01$ vs. Con.

2.3 天麻素对镉损伤星形胶质细胞的保护效应

天麻素具有神经保护作用,本研究在体外检测了不同浓度天麻素对 CdCl_2 损伤的星形胶质细胞活力及凋亡基因 caspase3 的影响(给细胞 5 μM 的同时加入不同浓度的天麻素),结果如图 3 所示,不同浓度天麻素处理 24 h 或 48 h 后,各组细胞活性

($F_{5,30}=6.069$, $P<0.01$; 图 3.A; $F_{5,30}=4.574$, $P<0.01$; 图 3.B) 存在显著差异,caspase3 mRNA 水平也存在显著差异($F_{5,30}=4.428$, $P<0.05$; 图 3.C; $F_{5,30}=4.989$, $P<0.01$; 图 3.D)。5 μM 的 CdCl_2 (sham 组)对星形胶质细胞造成了严重损伤,其细胞活力显著低于对照 Con 组($P<0.01$),凋亡基因 caspase3 mRNA 水平也显著高于 Con 组

($P<0.05$)。天麻素对星形胶质细胞具有保护作用且有浓度依耐性,天麻素和 $5\ \mu\text{M}$ 的 CdCl_2 同时作用 24 h 后, $40\ \mu\text{g/mL}$ 浓度的天麻素可以明显增加镉损伤星形胶质细胞活性 (与 sham 组相比 $P<0.05$),降低了 caspase3 的 mRNA 水平(与 sham 组相比 $P<0.05$), $50\ \mu\text{g/mL}$ 浓度的天麻素显著增加了镉损伤星形胶质

细胞活性(与 sham 组相比 $P<0.01$),同时也降低了 caspase3 的 mRNA 水平(与 sham 组相比 $P<0.05$)。天麻素和 $5\ \mu\text{M}$ 的 CdCl_2 同时作用 48 h 后, $50\ \mu\text{g/mL}$ 的天麻素可以明显增加镉损伤星形胶质细胞活性并降低 caspase3 的 mRNA 水平(与 sham 组相比 $P<0.05$)。

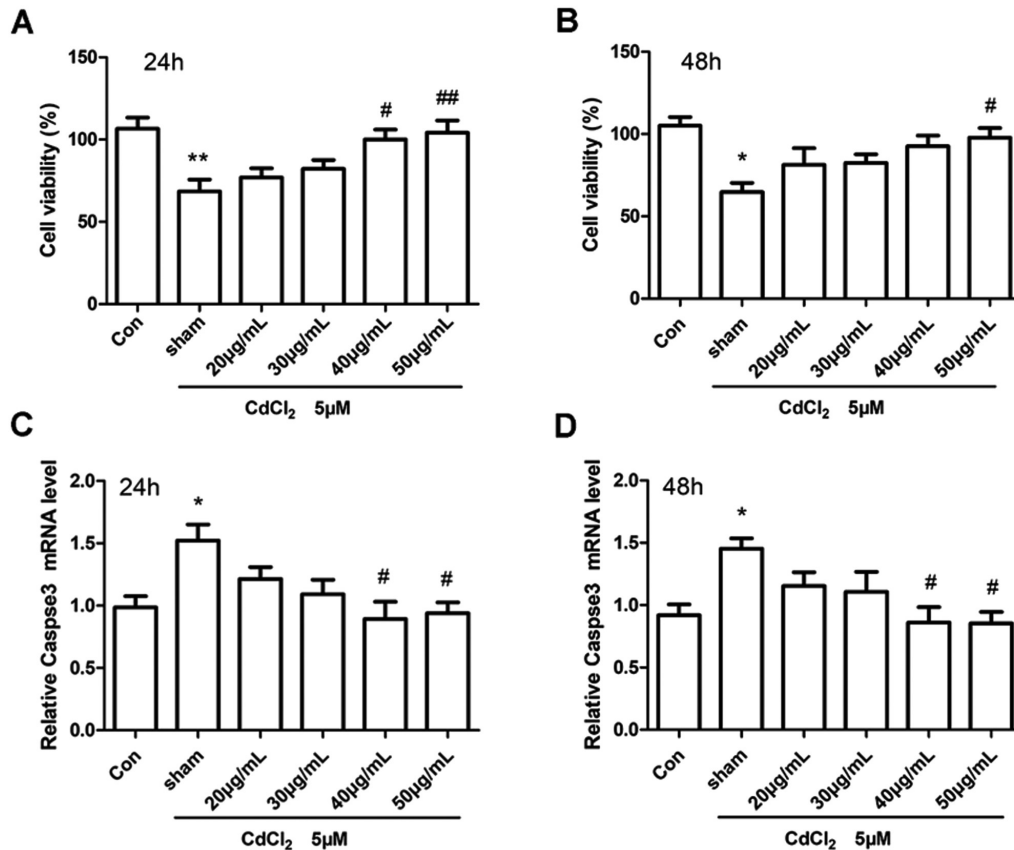


图3 不同浓度天麻素对镉损伤星形胶质细胞($5\ \mu\text{M}$ CdCl_2 损伤)活性及 caspase3 mRNA 水平的影响。(A)天麻素和 $5\ \mu\text{M}$ CdCl_2 作用 24 h 后的细胞活性;(B)天麻素和 $5\ \mu\text{M}$ CdCl_2 作用 48 h 后的细胞活性;(C)天麻素和 $5\ \mu\text{M}$ CdCl_2 作用 24 h 后细胞的 caspase3 mRNA 水平变化;(D)天麻素和 $5\ \mu\text{M}$ CdCl_2 作用 48 h 后细胞的 caspase3 mRNA 水平变化。注:与 Con 组比 ** $P<0.01$;与 sham 组比 * $P<0.05$, # $P<0.01$ 。

Fig.3 Effect of gastrodin and CdCl_2 exposures on Cell viability and caspase3 mRNA of astrocytes. (A) Cell viability of astrocytes at 24 h post- CdCl_2 and gastrodin exposures; (B) Cell viability of astrocytes at 48 h post- CdCl_2 and gastrodin exposures; (C, D) The mRNA levels of caspase3 of astrocytes post- CdCl_2 and gastrodin exposures.

Note: ** $P<0.01$ vs. Con; * $P<0.05$ vs. sham; # $P<0.01$ vs. sham.

2.4 天麻素抑制镉诱导的星形胶质细胞 GDNF, Nrf2, HO-1 和 SOD-1 mRNA 下调

GDNF 是星形胶质细胞释放的重要神经营养因子,与星形胶质细胞生物学功能密切相关^[13]。本实验检测了 CdCl_2 和天麻素作用 24 h 后各组细胞的 GDNF mRNA 水平变化。结果显示,各组细胞的 GDNF mRNA 水平有显著差异($F_{5,30}=6.754$, $P<0.01$; 图 4.A)。 $5\ \mu\text{M}$ 的 CdCl_2 处理 24 h 后(sham 组),星形胶质细胞的 GDNF mRNA 水平显著下降 (与 Con 对照组相比 $P<0.01$), $40\ \mu\text{g/mL}$ 的天麻素和 $5\ \mu\text{M}$ 的 CdCl_2 同时作用 24 h 后, 细胞的 GDNF mRNA 水平明显上升 (与 sham 组相比 $P<0.05$), $50\ \mu\text{g/mL}$ 的天麻素对镉损伤受损星形胶质细胞的 GDNF mRNA 表达上调作用更加显著(与 sham 组相比 $P<0.01$)。为了进一步阐述天麻素缓解 CdCl_2 诱导的星形胶质细胞损伤的作用机制,我们检测了各组细胞的抗氧化基因 Nrf2, HO-1 和 SOD-1 的 mRNA 表达水平。结果显示,各组细胞的 Nrf2 ($F_{5,30}=10.49$, $P<0.01$;

图 4.B), HO-1 ($F_{5,30}=5.118$, $P<0.01$; 图 4.C) 和 SOD-1 ($F_{5,30}=7.240$, $P<0.01$; 图 4.D) mRNA 水平有显著差异。与正常对照组 Con 相比, $5\ \mu\text{M}$ 的 CdCl_2 处理 24 h 后(sham 组),星形胶质细胞的 Nrf2, HO-1 和 SOD-1 mRNA 水平明显下降($P<0.05$), $40\ \mu\text{g/mL}$ 和 $50\ \mu\text{g/mL}$ 的天麻素有效地抑制了 CdCl_2 对 Nrf2, HO-1 和 SOD-1 mRNA 的下调作用(与 sham 组比, $P<0.05$)。说明天麻素可能通过上调星形胶质细胞的神经营养因子 GDNF 和抗氧化基因 Nrf2, HO-1 和 SOD-1 表达来缓解 CdCl_2 对其造成的细胞损伤。

3 讨论

本文在体外研究了重金属镉和中药材提取物天麻素对小鼠星形胶质细胞的细胞活力,神经营养因子 GDNF 以及抗氧化基因 Nrf2, HO-1 和 SOD-1 mRNA 表达的影响。发现镉暴露会导致星形胶质细胞活力下降, GDNF 和抗氧化基因 Nrf2, HO-1

和 SOD-1 mRNA 表达的下调, 而一定浓度的天麻素可以有效阻止镉造成的星形胶质细胞活力下降和 GDNF 和抗氧化基因 Nrf2、HO-1 和 SOD-1 mRNA 表达下调, 对镉暴露导致的星型

胶质细胞损伤发挥保护作用。提示我们天麻素可能对镉中毒导致的神经系统疾病具有缓解作用, 抗氧化系统可能在其中发挥重要作用。

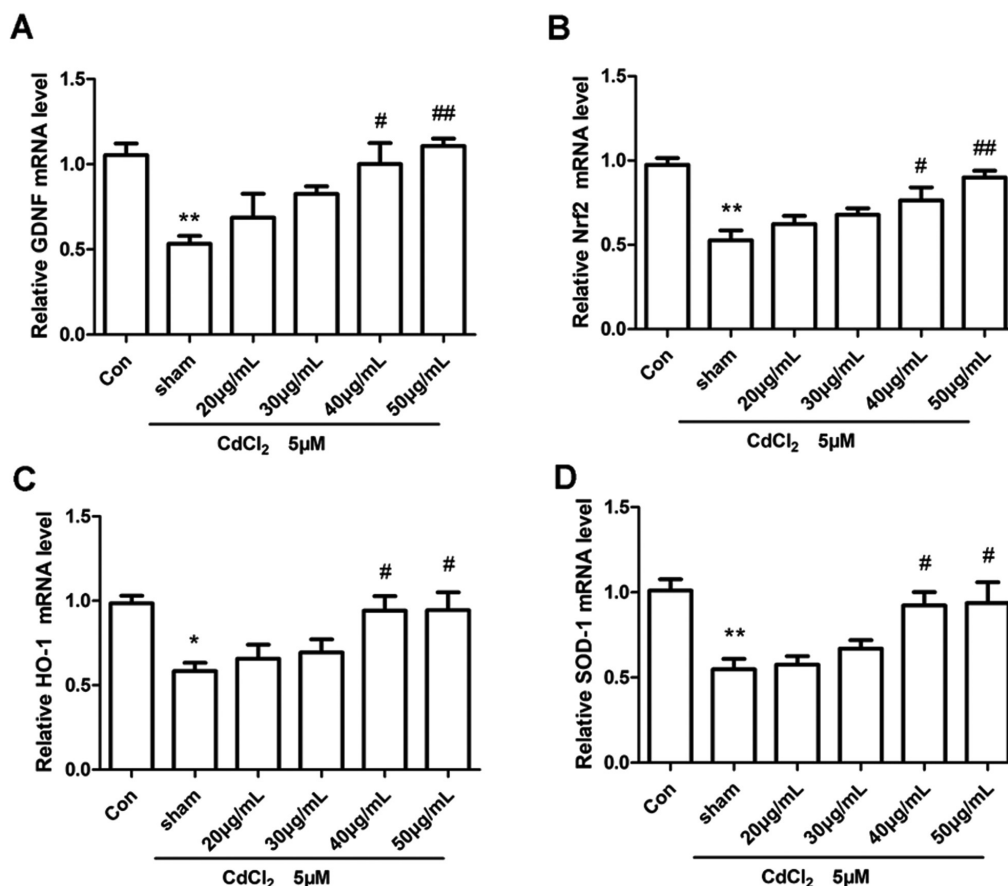


图 4 不同浓度天麻素和 5 µM CdCl₂ 对体外培养星形胶质细胞基因表达的影响

(A) CdCl₂ 和天麻素处理 24 h 后, 细胞的 GDNF mRNA 水平变化; (B) CdCl₂ 和天麻素处理 24 h 后, 细胞的 Nrf2 mRNA 水平变化; (C) 各组细胞的 HO-1 mRNA 水平变化; (D) 各组细胞的 SOD-1 mRNA 水平变化。

注: 与 Con 组比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 sham 组比 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Fig.4 Effect of gastrodin and CdCl₂ exposures on gene expression of astrocytes

(A-D) The mRNA levels of GDNF, Nrf2, HO-1 and SOD-1 of astrocytes post-CdCl₂ and gastrodin exposures. Note: * $P < 0.05$ vs. Con; ** $P < 0.01$ vs. Con; # $P < 0.05$ vs. sham; ## $P < 0.01$ vs. sham.

镉是一种具有生物积累性的剧毒重金属物质, 是被国际癌症研究署和美国国家毒理学计划统一划分的第一类人类致癌物质, 对细胞增殖, 分化, 凋亡及其他细胞活性均有影响^[14,15]。诸多研究表明, 镉可以增加血脑屏障通透性, 严重损伤中枢神经系统功能, 与阿尔兹海默症, 帕金森, 肌肉萎缩症, 认知障碍, 焦虑抑郁等多种神经退行性疾病和神经紊乱疾病的发生密切相关^[16-18]。

星形胶质细胞对于维持大脑中枢神经系统病理生理功能至关重要, 包括在中枢神经系统受损后释放 BDNF, GDNF 等神经营养因子, 表达抗氧化酶清除氧化应激产生的细胞毒性物质等对神经元发挥支持保护作用, 促进组织的修复等^[19,20]。先前的研究表明, 星形胶质细胞是镉中毒的靶点之一, 包括抑制星形胶质细胞增殖、抑制神经营养因子释放, 抑制其抗氧化能力, 促使其凋亡等^[5,21]。Bandyopadhyay 等的研究发现镉会抑制发育中的大鼠大脑星形胶质细胞标记物 GFAP 表达, 使其功能紊乱^[22]。Suttinee 等的研究发现镉会诱导星形胶质细胞的 IL-6 和 IL-8

表达异常, 导致大脑炎症。Jiang 等的研究也证实, 镉会扰乱星形胶质细胞的钙离子信号促使其死亡^[20]。更有研究发现, 镉会诱导星形胶质发生氧化应激损伤, 抑制其 Nrf2、HO-1 和 SOD-1 等抗氧化基因表达, 破坏其抗氧化能力, 促使其凋亡, 而使用抗氧化剂可以有效缓解星形胶质细胞镉中毒^[7]。更重要的是 Turnquist 等人的研究还发现, 星形胶质细胞是镉透过血脑屏障后的首要攻击对象, 镉诱导的神经毒性可能是由于大脑星形胶质和各种类型的细胞中过量的活性氧产生所致, 而氧化应激如 ROS 是许多神经退行性疾病, 包括阿尔兹海默病、帕金森病和肌萎缩侧索硬化症的突出特征, 星形胶质细胞的氧化应激损伤和死亡可能是镉导致阿尔兹海默症和肌肉萎缩症等疾病的重要原因之一^[22,24]。本研究给予体外培养的小鼠星形胶质细胞不同浓度的 CdCl₂ 处理, 结果发现低浓度 (2.5 µM) 的 CdCl₂ 就能明显降低细胞的活性, 下调其神经营养因子 GDNF 和抗氧化基因 Nrf2、HO-1 和 SOD-1 的表达, 并且 CdCl₂ 对星形胶质细胞的损伤作用具有浓度依耐性, 浓度越高, 星形胶质细胞损伤越

严重。进一步证实,镉造成的星形胶质细胞功能损伤可能是镉中毒破坏中枢神经系统导致相关疾病发生的重要原因。

天麻素是一种传统中草药提取物,在多种神经精神疾病的临床治疗中广泛应用^[25]。研究也表明,天麻素可以减少阿尔兹海默症模型小鼠大脑的 β -淀粉沉淀和神经损伤,有效缓解其认知功能障碍^[26]。我们先前的研究也发现,天麻素不仅可以上调大鼠海马 BDNF 表达,缓解其抑郁样行为,同时也能上调体外培养的海马星形胶质细胞的 BDNF 表达,缓解血清饥饿诱导的星形胶质细胞活性损伤^[27]。更重要的是,诸多的研究表明天麻素具有抗氧化作用^[28,29]。先前的研究发现,天麻素通过调节 Nrf2 抗氧化信号通路,抑制 1-甲基-4-苯基-吡啶离子诱导的细胞氧化应激损伤^[30]。Zhang 等人的研究也发现,天麻素通过上调 Nrf2 和 HO-1 表达缓解双氧水诱导的细胞氧化应激损伤^[31]。Li 等人的研究还发现,天麻素可以降低血管性痴呆大鼠的氧化应激损伤,改善其学习认知功能^[32]。此外,还有研究发现,天麻素可以上调海马 CA1 区的 Sirt1 和 PGC-1 α ,改善阿尔兹海默症大鼠的学习记忆功能,同时也能抑制 PKR/eIF2 α 信号通路缓解阿尔兹海默症大鼠的氧化应激损伤^[33,34]。以上研究均表明天麻素可能通过抗氧化作用发挥神经保护作用,但天麻素是否对镉诱导的星形胶质细胞损伤具有保护作用尚不清楚。本研究给予体外培养的小鼠星形胶质细胞镉损伤的同时给予不同浓度的天麻素处理,结果发现一定浓度的天麻素能够有效地缓解镉导致的细胞活性下降,并且可以抑制镉导致的细胞的 GDNF 和抗氧化基因 Nrf2, HO-1 和 SOD-1 的 mRNA 下调,表明天麻素可能通过其抗氧化作用对镉中毒造成的星形胶质细胞损伤发挥保护作用。

综上所述,本研究发现天麻素可以抑制镉诱导的星形胶质细胞损伤,并且能够上调损伤细胞的 GDNF 和抗氧化基因 Nrf2, HO-1 和 SOD-1 的 mRNA 水平。表明天麻素可能通过调节星形胶质细胞的抗氧化能力发挥神经保护作用。但本研究具有一定的局限性,首先,本文只在体外观察了镉暴露以及天麻素干预后星形胶质细胞的活力和凋亡相关基因改变,没能从细胞形态以及流式细胞学方等比较直观的方面反应细胞改变情况;其次,在机制探索方面只是观察到了抗氧化基因改变而未能使用抑制剂进行验证;第三,观察只局限于体外培养的星形胶质细胞镉中毒后的影响,而天麻素是否可以对镉中毒导致的各种神经退行性疾病具有保护作用以及具体的细胞分子机制还需要后续更多更详细的探索研究。

参考文献(References)

- [1] Phuagkhaopong S, Ospanpant D, Kasemsuk T, et al. Cadmium-induced IL-6 and IL-8 expression and release from astrocytes are mediated by MAPK and NF-kappaB pathways[J]. *Neurotoxicology*, 2017, 60: 82-91
- [2] Moyano P, de Frias M, Lobo M, et al. Cadmium induced ROS alters M1 and M3 receptors, leading to SN56 cholinergic neuronal loss, through AChE variants disruption[J]. *Toxicology*, 2018, 394: 54-62
- [3] Wang B, Du Y. Cadmium and its neurotoxic effects[J]. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 2013: 898034
- [4] Chong W, Jimenez J, McIlvin M, et al. α -Synuclein Enhances Cadmium Uptake and Neurotoxicity via Oxidative Stress and Caspase Activated Cell Death Mechanisms in a Dopaminergic Cell Model of Parkinson's Disease [J]. *Neurotoxicity research*, 2017, 32(2): 231-246
- [5] Ospanpant D, Phuagkhaopong S, Suknuntha K, et al. Cadmium induces apoptotic program imbalance and cell cycle inhibitor expression in cultured human astrocytes [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2019, 65: 53-59
- [6] He W, Li Y, Tian J, et al. Optimized mixture of As, Cd and Pb induce mitochondria-mediated apoptosis in C6-glioma via astroglial activation, inflammation and P38-MAPK[J]. *American journal of cancer research*, 2015, 5(8): 2396-408
- [7] Yang CS, Tzou BC, Liu YP, et al. Inhibition of cadmium-induced oxidative injury in rat primary astrocytes by the addition of antioxidants and the reduction of intracellular calcium [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103(3): 825-834
- [8] Kumar H, Kim IS, More SV, et al. Gastrodin protects apoptotic dopaminergic neurons in a toxin-induced Parkinson's disease model [J]. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2013, 2013: 514095
- [9] 张雅红, 周翠红, 何珊珊, 等. 天麻素对 CUS 大鼠抑郁样行为和海马 BDNF/GDNF 水平的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(16): 3001-3004
- [10] Zhang H, Yuan B, Huang H, et al. Gastrodin induced HO-1 and Nrf2 up-regulation to alleviate H₂O₂-induced oxidative stress in mouse liver sinusoidal endothelial cells through p38 MAPK phosphorylation [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(10): e7439
- [11] Zhou CH, Zhang YH, Xue F, et al. Isoflurane exposure regulates the cell viability and BDNF expression of astrocytes via upregulation of TREK-1[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16: 7305-7314
- [12] Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation[J]. *Braz J Med Biol Res*, 1999, 32(5): 619-631
- [13] Kajitani N, Miyano K, Okada-Tsuchioka M, et al. Identification of Lysophosphatidic Acid Receptor 1 in Astroglial Cells as a Target for Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Expression Induced by Antidepressants [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2016, 291(53): 27364-27370
- [14] Labudda M. Biochemical mechanisms of neurotoxicity caused by cadmium [J]. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 2011, 62(4): 357-363
- [15] Joseph P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis [J]. *Toxicology and applied pharmacology*, 2009, 238(3): 272-279
- [16] Rigon AP, Cordova FM, Oliveira CS, et al. Neurotoxicity of cadmium on immature hippocampus and a neuroprotective role for p38 MAPK [J]. *Neurotoxicology*, 2008, 29(4): 727-734
- [17] Ashok A, Rai NK, Tripathi S, et al. Exposure to As-, Cd-, and Pb-mixture induces A β , amyloidogenic APP processing and cognitive impairments via oxidative stress-dependent neuroinflammation in young rats [J]. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 2015, 143(1): 64-80
- [18] Rai NK, Ashok A, Rai A, et al. Exposure to As, Cd and Pb-mixture impairs myelin and axon development in rat brain, optic nerve and retina [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 273(2): 242-258
- [19] Ransom BR, Ransom CB. Astrocytes: multitasking stars of the cen-

- tral nervous system[J]. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2012, 814: 3-7
- [20] Jiang JH, Ge G, Gao K, et al. Calcium Signaling Involvement in Cadmium-Induced Astrocyte Cytotoxicity and Cell Death Through Activation of MAPK and PI3K/Akt Signaling Pathways [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(9): 1929-1944
- [21] Kushwaha R, Mishra J, Tripathi S, et al. Arsenic, Cadmium, and Lead Like Troglitazone Trigger PPAR γ -Dependent Poly (ADP-Ribose) Polymerase Expression and Subsequent Apoptosis in Rat Brain Astrocytes [J]. *Molecular neurobiology*, 2018, 55(3): 2125-2149
- [22] Rai A, Tripathi S, Kushwaha R, et al. CDK5-induced p-PPARgamma (Ser 112) downregulates GFAP via PPRES in developing rat brain: effect of metal mixture and troglitazone in astrocytes [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1033
- [23] Turnquist C, Horikawa I, Foran E, et al. p53 isoforms regulate astrocyte-mediated neuroprotection and neurodegeneration [J]. *Cell death and differentiation*, 2016, 23(9): 1515-1528
- [24] Cui ZG, Ogawa R, Piao JL, et al. Molecular mechanisms involved in the adaptive response to cadmium-induced apoptosis in human myelomonocytic lymphoma U937 cells [J]. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 2011, 25(8): 1687-1693
- [25] Matias M, Silvestre S, Falcão A, et al. *Gastrodia elata* and epilepsy: Rationale and therapeutic potential [J]. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 2016, 23(12): 1511-1526
- [26] Hu Y, Li C, Shen W. Gastrodin alleviates memory deficits and reduces neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Neuropathology*, 2014, 34(4): 370-377
- [27] Zhang R, Peng Z, Wang H, et al. Gastrodin ameliorates depressive-like behaviors and up-regulates the expression of BDNF in the hippocampus and hippocampal-derived astrocyte of rats [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(1): 172-179
- [28] Zhang TH, Huang CM, Gao X, et al. Gastrodin inhibits high glucose-induced human retinal endothelial cell apoptosis by regulating the SIRT1/TLR4/NF- κ Bp65 signaling pathway [J]. *Molecular medicine reports*, 2018, 17: 7774-7780
- [29] Haddadi R, Poursina M, Zeraati F, et al. Gastrodin microinjection suppresses 6-OHDA-induced motor impairments in parkinsonian rats: insights into oxidative balance and microglial activation in SNc [J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26: 1305-1316
- [30] Li Q, Niu C., Zhang X., et al. Gastrodin and Isorhynchophylline Synergistically Inhibit MPP-Induced Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells by Targeting ERK1/2 and GSK-3 β Pathways: Involvement of Nrf2 Nuclear Translocation [J]. *ACS chemical neuroscience*, 2018, 9(3): 482-493
- [31] Zhang H, Yuan B, Huang H, et al. Gastrodin induced HO-1 and Nrf2 up-regulation to alleviate H₂O₂-induced oxidative stress in mouse liver sinusoidal endothelial cells through p38 MAPK phosphorylation [J]. *Brazilian journal of medical and biological research*, 2018, 51(10): e7439
- [32] Li Y, Zhang Z. Gastrodin improves cognitive dysfunction and decreases oxidative stress in vascular dementia rats induced by chronic ischemia [J]. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015, 8(11): 14099-109
- [33] Huang R, Wu F, Zhao J, et al. Electroacupuncture plus Gastrodin Improves Learning-memory Ability Possibly by Up-regulating Expression of SIRT 1 and PGC-1 α in Hippocampal CA 1 Region of Alzheimer's Disease Rats [J]. *Zhen ci yan jiu = Acupuncture research*, 2018, 43(3): 140-145
- [34] Zhang JS, Zhou SF, Wang Q, et al. Gastrodin suppresses BACE1 expression under oxidative stress condition via inhibition of the PKR/eIF2 α pathway in Alzheimer's disease [J]. *Neuroscience*, 2016, 325: 1-9

(上接第 1010 页)

- [18] Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2005, 54: 1626-1634
- [19] Anil Kumar P, Welsh GI, Saleem MA, et al. Molecular and cellular events mediating glomerular podocyte dysfunction and depletion in diabetes mellitus [J]. *Front Endocrinol*, 2014, 5: 151
- [20] Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21: 212-222
- [21] Zhao L, Wang X, Sun L, et al. Critical role of serum response factor in podocyte epithelial-mesenchymal transition of diabetic nephropathy [J]. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 2016, 13(1): 81-92
- [22] Wang Z, Liu J, Sun W. Effects of asiaticoside on levels of podocyte cytoskeletal proteins and renal slit diaphragm proteins in adriamycin-induced rat nephropathy [J]. *Life Sci*, 2013, 93(8): 352-358
- [23] Wu X, Gao Y, Xu L, et al. Exosomes from high glucose-treated glomerular endothelial cells trigger the epithelial-mesenchymal transition and dysfunction of podocytes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9371
- [24] Singh D K, Winocour P, Farrington K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2011, 7(3): 176-184
- [25] Gorin Y, Block K. Nox4 and diabetic nephropathy: With a friend like this, who needs enemies? [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 61: 130-142