

王衍,陈玲,庞胤,等. 外源性八肽胆囊收缩素对谷氨酸诱导大鼠大脑皮层神经元凋亡的保护作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 62-67, 74.

Wang Y, Chen L, Pang Y, et al. Protective effect of exogenous cholecystokinin octapeptide on glutamate-induced neuronal apoptosis in the rat cerebral cortex [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 62-67, 74.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.008

外源性八肽胆囊收缩素对谷氨酸诱导大鼠大脑皮层神经元凋亡的保护作用研究

王 衍¹,陈 玲^{2*},庞 胤³,张海峰³,李贺扬⁴

(1.沧州医学高等专科学校医学系,河北 沧州 061001;2.沧州医学高等专科学校附属人民医院妇科,河北 沧州 061001;
3.沧州医学高等专科学校基础医学部,河北 沧州 061001;4.河北沧州市中心医院神经外五科,河北 沧州 061001)

【摘要】 目的 探讨外源性八肽胆囊收缩素(CCK-8)对谷氨酸诱导体外大鼠大脑皮层神经元损伤模型中神经细胞凋亡的保护作用及其可能作用机制。方法 不同浓度 CCK-8 处理体外培养的大鼠大脑皮层神经元,MTT 法检测细胞存活情况并筛选合适浓度。培养大鼠大脑皮层神经细胞并用谷氨酸(Glu)处理建立神经元损伤模型,分为模型组、CCK-8 组,另设对照组。采用流式细胞术检测细胞周期与凋亡率;Flou-4 实验检测各组细胞 Ca²⁺水平;实时定量 PCR 法检测 B 细胞淋巴瘤因子 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关蛋白(Bax)mRNA 表达情况;Western blot 检测 Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3 蛋白表达情况。结果 与对照组比较,模型组神经元细胞存活率、G₁ 期细胞分布比例、Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平降低,S 期、G₂/M 期细胞分布比例、细胞凋亡率、Ca²⁺水平、Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与模型组比较,CCK-8 组神经元细胞存活率、G₁ 期细胞分布比例、Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平升高,S 期、G₂/M 期细胞分布比例、细胞凋亡率、Ca²⁺水平、Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。结论 CCK-8 对谷氨酸诱导的神经元细胞凋亡有一定的抑制作用,可能是通过抑制钙离子内流,调节细胞内 Bax/Bcl-2 表达水平发挥作用。

【关键词】 外源性八肽胆囊收缩素;大脑皮层神经元;细胞凋亡;B 细胞淋巴瘤因子 2;Bcl-2 相关蛋白

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2023) 06-0062-06

Protective effect of exogenous cholecystokinin octapeptide on glutamate-induced neuronal apoptosis in the rat cerebral cortex

WANG Yan¹, CHEN Ling^{2*}, PANG Yin³, ZHANG Haifeng³, LI Heyang⁴

(1. Department of Medicine, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, China. 2. Department of Gynaecology, People's Hospital Affiliated to Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001. 3. Department of Basic Medicine, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001. 4. Department of Neurology V, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061001)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of exogenous cholecystokinin octapeptide(CCK-8) on neuronal apoptosis induced by glutamate in the rat cerebral cortex in vitro. Methods Rat cortical neurons cultured in vitro were treated with various concentrations of CCK-8. An MTT assay was used to assess cell survival and screen the appropriate concentration. Rat cortical neurons were treated with glutamic acid(Glu)to establish a neuron injury model and

【基金项目】2021 年医学科学研究课题(20210971)。

【作者简介】王衍(1976—),男,硕士,研究方向:颅脑外科学、临床应用解剖学。E-mail:zhuxitai407739xi@163.com

【通信作者】陈玲(1977—),女,硕士,研究方向:妇产科学、临床应用解剖学。E-mail:feng80730li@163.com

were divided into model, CCK-8, and control groups. The cell cycle and apoptosis rate were assessed by flow cytometry. The Ca^{2+} level was assessed by Flou-4 staining. Bcl-2 and Bax mRNA expression was assessed by Real-time quantitative PCR. Bcl-2, Bax, and cleaved caspase-3 protein expression was assessed by Western blot. **Results** Compared with the control group, the survival rate of neuronal cells, the distribution of G_1 phase cells, Bcl-2 mRNA and protein expression levels were decreased, and the distributions of S and G_2/M phase cells, the apoptosis rate, calcium ion level, Bax and cleaved caspase-3 protein expression levels were increased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the neuronal cell survival rate, G_1 phase cell distribution, snf Bcl-2 mRNA and protein expression levels were increased, whereas S and G_2/M phase cell distributions, apoptosis rate, calcium ion level, Bax and cleaved caspase-3 protein expression levels were decreased in the CCK-8 group ($P < 0.05$). **Conclusions** CCK-8 has an inhibitory effect on neuronal apoptosis induced by glutamate by inhibiting calcium influx and regulating Bax/Bcl-2 expression in cells.

[Keywords] exogenous cholecystokinin octapeptide; cortical neurons; apoptosis; B-cell lymphoma factor 2; Bcl-2-related protein

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

谷氨酸是中枢神经系统最主要的兴奋神经递质之一,参与着许多神经系统的正常生理活动^[1]。在许多中枢神经系统疾病中发现,谷氨酸呈异常释放的状态,且累积量较高时会产生兴奋性神经毒性,高浓度和低浓度谷氨酸均可损伤神经元,关于其具体浓度并未见有具体标准^[2]。据报道,谷氨酸神经毒性是影响大量慢性或急性神经疾病神经元损伤的主要途径,严重时可直接引发神经细胞元坏死,造成不可逆的神经损伤^[3]。外源性八肽胆囊收缩素(exogenous cholecystokinin octapeptide, CCK-8)是分布于中枢神经系统的经典脑肠肽,是脑组织含量最丰富的神经肽之一,以神经递质的形式参与消化、摄食、疼痛的感知及焦虑情绪的产生等多种生理过程^[4-5]。研究发现,CCK-8具有抑制 Ca^{2+} 内流、减少NO的生成和促进神经生长因子的生成等作用,能够减少神经元损伤,但其作用机制尚不明确^[6]。近期有关报道,CCK-8减少神经毒性的功能可能与影响细胞凋亡的过程有关^[7]。本研究旨在探讨CCK-8对大脑皮层神经元损伤大鼠模型神经元凋亡的影响,分析其能否发挥神经保护作用,为CCK-8的药物研发及谷氨酸神经毒性的临床治疗提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠(出生24 h内),雌雄不限,体重5~6 g,80只,来源于杭州子源实验动物科技有限公司[SCXK(浙)2019-0004]。实验在沧州医学高等专科学校动物实验中心[SYXK(冀)2019-0006]进行,实验经沧州医学高等专科学校审核通过(CYLL20230509),实验过程按照3R原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

CCK-8(武汉科斯坦生物科技有限公司,货号:601336);L-谷氨酸(美国Sigma公司,批号:G1251);兔抗 β -actin多克隆抗体、兔抗大鼠凋亡蛋白B细胞淋巴瘤因子2(b-cell lymphoma factor 2, Bcl-2)、Bcl-2相关蛋白(bcl-2 related x protein, Bax)和cleaved caspase-3多克隆抗体、山羊抗兔二抗IgG(美国Cell Signaling公司,批号:#4970、#15071、#41162、#9662、#2985);DMEM细胞培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司,批号:90023、S9030、T1300)。BD FACSAria II型流式细胞仪(上海实维实验仪器技术有限公司);Flou-4 AM钙离子检测试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司);RM2135型Leica石蜡切片机(德国Leica公司);Olympus型多功能显微镜(日本Olympus公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 大脑皮层神经元原代培养

将大鼠处死,无菌条件下分离大脑皮质(剔除血管与软组织),取适量皮质组织剪碎放入培养基内,0.25%胰蛋白酶37℃下消化15 min,加入10%胎牛血清终止消化。200目筛网过滤,收集滤液高速离心后收集细胞,使用DMEM培养基(15%胎牛血清)重悬,制成密度为 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液,将细胞接种于预先包被多聚赖氨酸的24孔板上,常规培养于37℃、5% CO_2 培养箱,48 h后加入10 $\mu\text{mol/L}$ 阿糖胞苷。每天观察细胞生长状态,3 d换液1次,培养8 d进行神经元鉴定后细胞可用于实验。

1.3.2 细胞活力检测

原代培养神经元细胞8 d后,采用MTT实验检测不同浓度CCK-8对神经元细胞活力的影响,将神

神经元细胞接种于 96 孔板中,细胞浓度为 1×10^4 /mL。使用终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的谷氨酸处理大鼠皮层神经元细胞建立神经元损伤模型,再分别给予含有 0、0.01、0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 CCK-8 的培养液处理细胞,置于 37℃、体积数为 5% CO_2 的培养箱培养 24 h。取出 96 孔板,向各孔细胞加入 5 g/L 的 MTT 溶液 10 μL ,继续培养 4 h,各孔加入 DMSO 溶液 150 μL ,震荡器上充分震荡 10 min。酶标仪波长 490 nm 处检测各孔吸光值,实验重复 3 次。细胞存活率(%)=实验组 OD 值/对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.3.3 模型建立与细胞分组

将大鼠皮层神经元细胞常规培养于 DMEM 细胞培养基(10%胎牛血清+1%青链霉素),置于 5%、 CO_2 恒温箱中,37℃条件下培养,取对数生长期细胞用于实验。使用终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的谷氨酸处理大鼠皮层神经元细胞建立神经元损伤模型,分为模型组和 CCK-8 组,另设对照组。CCK-8 组使用含有 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 CCK-8 培养液处理细胞,对照组为等量完全培养基。

1.3.4 流式细胞术检测细胞周期

取处于对数生长期神经元细胞重新制备细胞悬液,浓度调整为 1×10^6 /mL,给予相应药物培养 24 h。使用 PBS 溶液反复洗涤细胞 3 次,接种于 6 孔板内,使用 80%乙醇溶液固定细胞 5 min,PBS 溶液清洗 2 次,去除残留乙醇溶液,加入 80 μL PBS 溶液、10 μL PI、50 μL FITC,避光孵育 60 min。重悬细胞上机收集细胞,于 FACS Aria 流式细胞仪波长 488 nm 处检测荧光强度,观察并分析细胞各周期分布情况。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡

收集对数生长期的细胞,PBS 重悬细胞制备细胞悬液,浓度调整为 1×10^6 /mL,给予对应浓度药物培养 24 h。弃去培养液,预冷的 PBS 洗涤 2 次,胰蛋白酶消化,用 500 μL 结合缓冲液重悬细胞为 1×10^6 /mL。高速离心 5 min,分别加入 195 μL Annexin V-FITC、5 μL PI 混匀,室温下避光孵育 20 min。流式细胞仪上机检测各组细胞凋亡率分析各组细胞凋亡情况。

1.3.6 Flou-4 染色检测细胞钙离子水平

取对数生长期神经元细胞进行实验,胰蛋白酶消化为细胞悬液,以 5×10^5 /mL 接种于 6 孔板中,按照各组对应药物操作后,置于 37℃、含有 5% CO_2 饱和湿度的培养箱。加入 1 mL 培养基和 Flou-4 AM

染液,于 37℃培养箱静置 20 min。弃去上清液,使用染色缓冲液洗涤 2 次,荧光显微镜下观察并拍照,IPP 6.0 软件分析。

1.3.7 RT-PCR 检测 mRNA 表达

取各组处于对数生长期的细胞,弃去培养液,PBS 清洗,加入细胞裂解试剂置于冰上裂解,TRIzol 沉淀法提取各组细胞总 RNA。反转录试剂盒合成 cDNA,用于配制 PCR 反应体系:2 $\times$ SYBR qPCR Master Mix 10 μL ,cDNA 样品 2 μL ,上、下游引物各 1 μL ,ddH₂O 6 μL 。引物设计为 Bcl-2: F-5'-GAGAGCGTCAACAGGGAGATG-3'、R-5'-CCAGCC TCCGTTATCCTGGA-3'; Bax: F-5'-CCGGCGAATT GGAGATGAAC-3'、R-5'-CCAGCCCATGATGGTT CTGAT-3'; β -actin: F-5'-GGCTGTATTCCCTC CATCG-3'、R-5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'。设置 PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min,94℃ 30 s,59℃ 30 s,72℃ 30 s,共循环 40 次。得 Ct 值,根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因与内参基因的相对表达量,比较各样本之间基因表达差异。

1.3.8 Western blot 检测蛋白表达

提前按照比例(1:99)将 RIPA 细胞裂解液与蛋白酶抑制剂 PMSF 配制成蛋白裂解液,取出各组神经元细胞后,弃去培养液,离心收集细胞,PBS 清洗后加入蛋白裂解液冰上裂解,4℃下 12 000 r/min 离心 10 min,提取总蛋白,并对蛋白上清液进行浓度测定。确定蛋白上样量,制备分离胶与浓缩胶进行凝胶电泳。250 mA 恒流 2 h 转至 PVDF 膜上,加入脱脂牛奶封闭 2 h,4℃孵育一抗(1:1000)过夜,TBST 清洗 5 次,加入 1:3000 稀释二抗,摇床封闭 2 h,TBST 清洗 5 次。加入化学发光试剂 ECL A 液与 B 液进行显色,曝光、显影,Image J 软件分析。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 23.0 统计学软件分析数据,数据均采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。结果以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 对细胞活力的影响

使用谷氨酸处理细胞后,细胞活性明显降低($P < 0.05$)。不同浓度 CCK-8(0、0.01、0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$)作用于大鼠皮层神经元细胞后,各组细胞

存活率均明显升高,且呈现浓度依赖性($P<0.05$)。根据对细胞活力的影响结果,后续实验 CCK-8 选择 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 作为统一给药浓度,见表 1。

2.2 各组细胞周期分布比较

细胞周期分布检测可以显示各时期细胞情况,直观反映细胞是否出现凋亡,流式细胞仪检测细胞周期分布结果显示,与对照组比较,模型组大脑皮层神经元细胞 G_1 期细胞分布减少,S 期、 G_2/M 期细胞分布比例增加($P<0.05$)。与模型组比较,CCK-8 组大脑皮层神经元细胞 G_1 期细胞分布增加,S 期、 G_2/M 期细胞分布比例减少($P<0.05$),见表 2,图 1。

表 1 各组细胞存活情况比较($\bar{x}\pm s,n=3$)
Table 1 Comparison of cell survival in each group

药物 Drug	浓度($\mu\text{mol/L}$) Concentration	细胞存活率(%) Cell viability
谷氨酸 Glutamate	50	62.36 $\pm$ 0.53 [*]
	0	100.00 $\pm$ 0.00
CCK-8	0.01	65.78 $\pm$ 0.64 [*]
	0.1	68.67 $\pm$ 0.63 [*] Δ
	1	74.95 $\pm$ 0.59 [*] Δ $\blacktriangle$

注:与 $0\text{ }\mu\text{mol/L}$ CCK-8 组相比,^{*} $P<0.05$;与 $0.01\text{ }\mu\text{mol/L}$ CCK-8 组比, ^{Δ} $P<0.05$;与 $0.1\text{ }\mu\text{mol/L}$ CCK-8 组比, ^{$\blacktriangle$} $P<0.05$ 。
Note. Compared with $0\text{ }\mu\text{mol/L}$ CCK-8 group,^{*} $P<0.05$. Compared with $0.01\text{ }\mu\text{mol/L}$ CCK-8 group, ^{Δ} $P<0.05$. Compared with $0.1\text{ }\mu\text{mol/L}$ CCK-8 group, ^{$\blacktriangle$} $P<0.05$.

表 2 各组细胞周期分布比较($\bar{x}\pm s,\%,n=3$)
Table 2 Comparison of cell cycle distribution in each group

组别 Groups	G_1 期 Phase G_1	S 期 Phase S	G_2/M 期 Phase G_2/M
对照组 Control group	44.34 $\pm$ 1.72	22.17 $\pm$ 1.75	12.21 $\pm$ 2.01
模型组 Model group	35.49 $\pm$ 1.63 [*]	29.75 $\pm$ 2.08 [*]	26.68 $\pm$ 1.69 [*]
CCK-8 组 CCK-8 group	48.82 $\pm$ 1.72 ^{Δ}	23.33 $\pm$ 2.26 ^{Δ}	11.64 $\pm$ 1.94 ^{Δ}

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$;与模型组相比, ^{Δ} $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group,^{*} $P<0.05$. Compared with model group, ^{Δ} $P<0.05$.

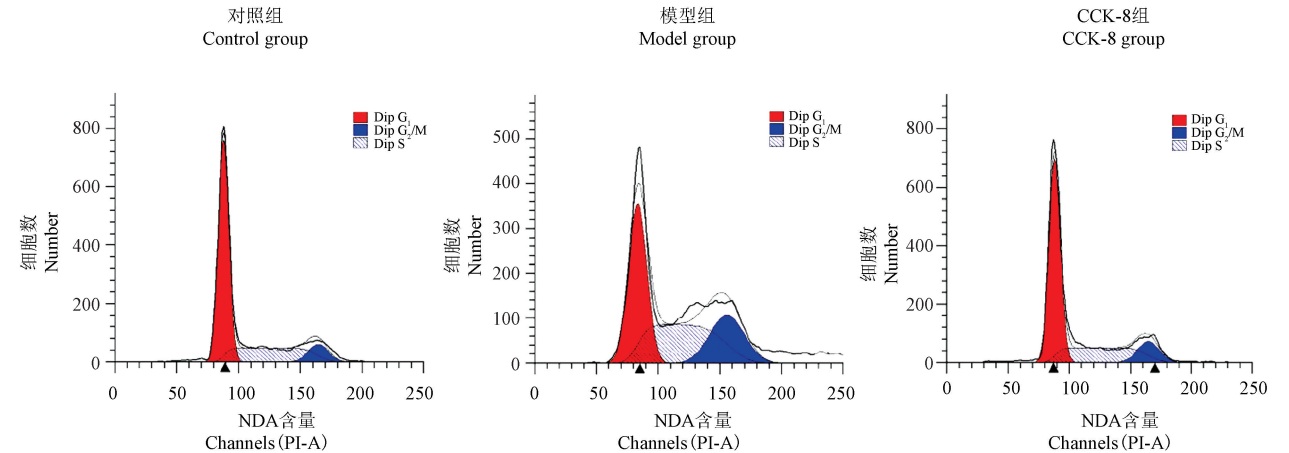


图 1 各组细胞周期分布检测
Figure 1 Cell cycle distribution in each group

2.5 Bcl-2 和 Bax mRNA 水平比较

Bcl-2 和 Bax mRNA 水平可以反映出 Bcl-2/Bax 经典细胞凋亡通路在基因水平的表达情况,与对照组比较,模型组大脑皮层神经元细胞中 Bcl-2 mRNA 表达水平明显降低,Bax mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.05$)。与模型组比较,CCK-8 组大脑皮层神经元细胞中 Bcl-2 mRNA 表达水平明显升高,Bax mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$),见表 3。

2.6 凋亡蛋白水平比较

Western blot 实验结果显示,与对照组比较,模型组大脑皮层神经元细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低,Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$)。与模型组比较,CCK-8 组大脑皮层神经元细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平明显升高,Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$),见表 4,图 4。

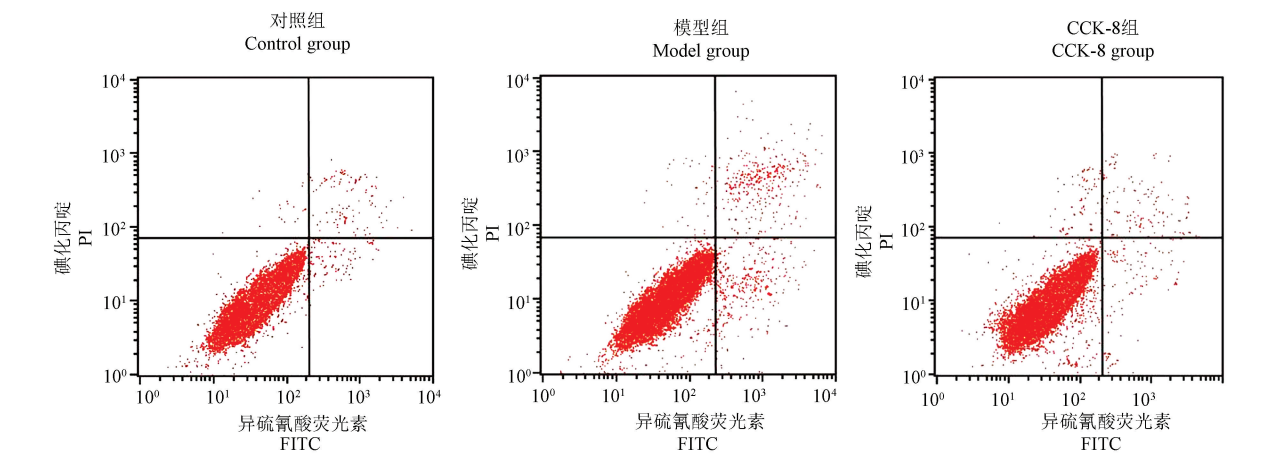


图 2 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况
Figure 2 Apoptosis was detected by flow cytometry

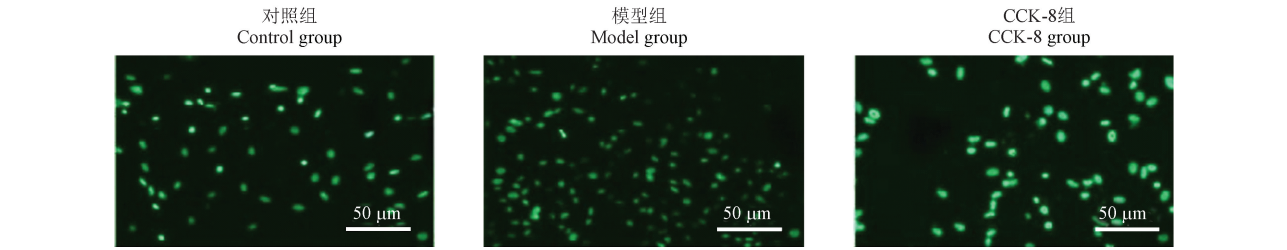


图 3 Flou-4 检测细胞钙离子水平 (Flou-4 AM)
Figure 3 Flou-4 was used to detect the level of calcium in cells

表 3 各组细胞 Bcl-2 和 Bax mRNA 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 Comparison of Bcl-2 and Bax mRNA levels of cells in each group

组别 Groups	Bcl-2	Bax
对照组 Control group	0.55±0.04	0.35±0.03
模型组 Model group	0.22±0.03 [*]	0.91±0.07 [*]
CCK-8 组 CCK-8 group	0.52±0.06 [△]	0.39±0.04 [△]

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$;与模型组相比,[△] $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with model group, [△] $P<0.05$.

表 4 各组细胞凋亡蛋白水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Comparison of apoptotic protein levels in each group

组别 Groups	Bcl-2	Bax	cleaved caspase-3
对照组 Control group	0.67±0.06	0.35±0.02	0.26±0.03
模型组 Model group	0.28±0.03 [*]	0.89±0.07 [*]	0.69±0.04 [*]
CCK-8 组 CCK-8 group	0.56±0.06 [△]	0.43±0.04 [△]	0.33±0.04 [△]

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$;与模型组相比,[△] $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with model group, [△] $P<0.05$.

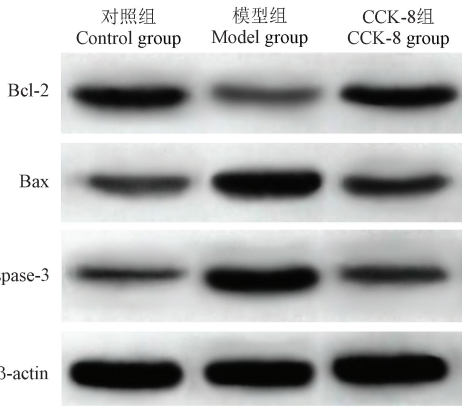


图 4 各组细胞凋亡蛋白表达水平检测
Figure 4 Expression level of apoptosis protein was detected in each group

3 讨论

谷氨酸是脑内兴奋性神经递质,与细胞膜上的特异性受体结合参与多种神经系统生理活动,如记忆、感知、神经细胞的发育调节等^[7]。在既往研究中发现,高浓度的谷氨酸对神经元可造成一定程度的神经毒性,抑制神经细胞的发育^[8]。病理状态下,细胞外高浓度的谷氨酸会过度激活受体,引发急性神经元水肿和迟发性神经元变性,对神经元造成损伤,长时间会导致神经元细胞衰亡^[9]。神经元细胞是构成神经系统的基本结构和功能单位,各动物的神经系统虽大不相同,繁复程度也不可相提并论,但其基本组织—神经元细胞的基本特征却大致相同^[10]。因此,体外培养大鼠大脑皮层神经元细胞,可以模拟神经元细胞在高浓度的谷氨酸下发生凋亡的过程。

CCK-8 是一种由多个氨基酸组成的多肽,参与调节饮食、学习记忆和神经递质的释放等生理过程,据报道,CCK-8 能够抑制神经细胞凋亡,具有神经保护的药理作用^[11-12]。另有研究发现,CCK-8 可通过调节凋亡蛋白水平保护体外培养的神经元细胞^[13]。本研究通过采用不同浓度 CCK-8 处理体外培养的大鼠大脑皮层神经元细胞,从分子机制上探讨 CCK-8 对谷氨酸诱导的大脑皮层神经元细胞增殖和凋亡的影响。结果显示,在 MTT 实验中,使用高浓度的谷氨酸处理大脑皮层神经元细胞后,细胞活力明显降低,且采用不同浓度的 CCK-8(0、0.01、0.1 和 1 μmol/L)作用大脑皮层神经元细胞后,各组细胞存活率均明显升高,且呈现浓度依赖性。提示在高浓度的谷氨酸损伤条件下,CCK-8 可以大幅度

的提高大脑皮层神经元细胞的存活率。此外,相较于对照组,模型组神经元细胞凋亡率也明显下降,说明谷氨酸诱导下,神经元细胞坏死和凋亡的情况较为严重,但 CCK-8 组神经元的细胞凋亡率却明显高于模型组。提示 CCK-8 能够抑制谷氨酸诱导的大脑皮层神经元细胞凋亡,对大脑皮层神经元细胞具有保护作用。研究发现,CCK-8 对谷氨酸诱导的神经元细胞周期也具有明显作用^[13],在流式细胞术检测细胞周期实验中,发现模型组细胞多分布于 G₂ 期,添加 CCK-8 作用后,能够显著减少神经元细胞由 G₂ 向 M 期进行转变,从而抑制细胞的凋亡,进一步证实 CCK-8 对神经元细胞的保护作用。

在本研究中,与对照组比较,模型组神经元细胞内 Ca²⁺、Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白水平明显升高,而 Bcl-2 表达水平明显降低。谷氨酸介导着 N-甲基-D-天(门)冬氨酸受体,这是一种调节 Ca²⁺ 通道的主要受体,高浓度的谷氨酸可以与其结合,引起 Ca²⁺ 的内流,引发钙超载,导致蛋白酶的激活和基因表达的改变,造成神经元细胞坏死和凋亡^[14-15]。Bcl-2 家族蛋白作为细胞凋亡的调控因子,可以通过改变线粒体外膜的通透性,诱发膜间隙的凋亡蛋白释放,引起细胞凋亡^[16]。研究结果提示谷氨酸诱导的神经元细胞凋亡与下调 Bax/Bcl-2 比值相关,与既往研究报道一致。在本研究中,使用 CCK-8 处理细胞后,与模型组对比,CCK-8 组神经元细胞 Ca²⁺ 水平明显降低,且抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平升高,促凋亡蛋白 Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平均呈下降趋势。表明 CCK-8 对谷氨酸的神经毒性的抑制作用可能与抑制 Ca²⁺ 内流,上调抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平,抑制神经元细胞凋亡有关。

综上所述,CCK-8 对谷氨酸诱导的神经元细胞凋亡有一定的抑制作用,可能是通过抑制 Ca²⁺ 内流,调节细胞内 Bax/Bcl-2 表达水平发挥作用,为临床治疗谷氨酸神经毒性提供实验依据。

参考文献:

[1] Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, et al. Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the CNS by controlling the balance between glutamate uptake and release [J]. Cells, 2019, 8(2): 184.
[2] Manucha W. Mitochondrial dysfunction associated with nitric oxide pathways in glutamate neurotoxicity [J]. Clin Investig Arterioscler, 2017, 29(2): 92-97.