

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.03.008
文章编号: 1005-8982 (2024) 03-0049-08

实验研究·论著

骨形成蛋白7对糖皮质激素诱导PC12 细胞凋亡的作用研究*

李峰, 谢方, 王雪, 孙兆炜, 钱令嘉, 赵云

(中国人民解放军军事科学院 军事医学研究院 军事认知与脑科学研究所, 北京 100850)

摘要: **目的** 探究骨形成蛋白7(BMP-7)对糖皮质激素(GC)诱导PC12细胞凋亡的作用。**方法** 采用不同浓度GC干预PC12细胞,明确不同浓度GC对PC12细胞凋亡的影响;在PC12细胞中感染BMP-7过表达/敲低慢病毒和对照病毒,然后采用DMSO或GC干预细胞,流式细胞仪检测细胞凋亡水平,实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测Bax基因表达,Western blotting法检测Cleaved-Caspase-3蛋白表达。**结果** 不同浓度GC处理后的细胞凋亡率、Bax基因和Cleaved-Caspase-3蛋白表达比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);与0 $\mu\text{mol/L}$ GC比较,GC浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 时,PC12细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$);GC浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 时,PC12细胞Bax基因和Cleaved-Caspase-3蛋白表达增加($P < 0.05$)。过表达或敲低BMP-7后4组细胞的细胞凋亡率、Bax基因和Cleaved-Caspase-3蛋白表达比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);与GC-NC组比较,GC-oe BMP-7组细胞凋亡率、Bax基因和Cleaved-Caspase-3蛋白表达均降低($P < 0.05$);与DMSO-NC组比较,GC-oe BMP-7组细胞凋亡水平、Bax基因和Cleaved-Caspase-3蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与DMSO-NC组比较,DMSO-sh BMP-7组细胞凋亡水平、Bax基因和Cleaved-Caspase-3蛋白表达均增加($P < 0.05$);与GC-NC组比较,GC-sh BMP-7组细胞凋亡水平、Bax基因和Cleaved-Caspase-3蛋白表达显著增加($P < 0.05$)。**结论** 高水平GC激素诱导PC12细胞凋亡增加,BMP-7可以拮抗GC诱导的细胞凋亡增加。

关键词: 骨形成蛋白7;糖皮质激素;PC12细胞;应激

中图分类号: R745.1

文献标识码: A

Effect of BMP-7 on glucocorticoid-induced apoptosis in PC12 cells*

Li Feng, Xie Fang, Wang Xue, Sun Zhao-wei, Qian Ling-jia, Zhao Yun

(Institute of Military Cognition and Brain Sciences Academy of Military Medical Sciences,
Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP-7) on glucocorticoid (GC)-induced apoptosis in PC12 cells. **Methods** PC12 cells were treated with different concentrations of GC to determine the impact of GC on apoptosis. PC12 cells were then infected with BMP7 overexpression/knockdown lentivirus or control virus. Subsequently, cells were treated with DMSO or GC, and apoptosis levels were assessed using flow cytometry. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was employed to measure Bax gene expression, and Western blotting was used to evaluate Cleaved-Caspase-3 protein expression. **Results** There were statistically significant differences in apoptosis rate, Bax gene expression, and Cleaved-Caspase-3 protein expression among cells treated with different concentrations of GC ($P < 0.05$). Compared to 0 $\mu\text{mol/L}$ GC, PC12 cell apoptosis significantly increased at a GC concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$), and at a concentration of 50 $\mu\text{mol/L}$, Bax gene expression and Cleaved-Caspase-3 protein expression increased ($P < 0.05$). Apoptosis rate, Bax gene

收稿日期: 2023-03-22

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 82271553, No: 31771290); 国防基础加强项目(No: 2022JCJQZD09712)

[通信作者] 赵云, E-mail: 15710282409@139.com

expression, and Cleaved-Caspase-3 protein expression differed significantly among the four groups with BMP-7 overexpression or knockdown ($P < 0.05$). Compared to the GC-negative control (GC-NC) group, cells in the GC-overexpressing BMP-7 group showed decreased apoptosis, Bax gene expression, and Cleaved-Caspase-3 protein expression ($P < 0.05$). No significant differences were observed in apoptosis level, Bax gene expression, and Cleaved-Caspase-3 protein expression between the GC-overexpressing BMP-7 group and the DMSO-negative control (DMSO-NC) group ($P > 0.05$). In comparison to the DMSO-NC group, cells in the DMSO-knockdown BMP-7 group exhibited increased apoptosis, Bax gene expression, and Cleaved-Caspase-3 protein expression ($P < 0.05$). The GC-knockdown BMP-7 group showed a significant increase in apoptosis level, Bax gene expression, and Cleaved-Caspase-3 protein expression compared to the GC-NC group ($P < 0.05$). **Conclusion** High levels of GC induce increased apoptosis in PC12 cells, and BMP-7 can counteract GC-induced apoptosis.

Keywords: BMP-7; glucocorticoid; PC12 cells; stress

应激是机体应对生存环境中多种不良因素刺激时所产生的身心紧张状态及其反应^[1],是抑郁症、成瘾症、心血管疾病、溃疡和癌症等多种疾病的重要风险因素^[2-4]。慢性应激诱导相关疾病的发生与下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)的过度激活密切相关^[5]。HPA轴过度激活诱导血清皮质醇水平升高,高水平糖皮质激素(Glucocorticoid, GC)能够使海马神经元凋亡和再生失衡,导致神经细胞萎缩和丢失,造成海马结构和功能损伤,从而影响认知功能^[6-7]。因此,研究如何保护海马神经元免受GC诱导的损伤十分重要。骨形成蛋白7(bone morphogenetic protein 7, BMP-7)作为一种保护性细胞因子,在神经系统发育和损伤恢复过程中发挥了良好的神经保护作用^[8-9],但其对慢性应激中GC诱导的神经损伤作用尚不明确。PC12细胞来源于大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤,是一个特征良好的神经元模型。该细胞系被广泛用作神经毒性和神经保护研究的模型系统^[10]。本研究旨在观察GC对PC12细胞凋亡的影响,以及BMP-7对GC诱导的海马神经元凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),微量紫外分光光度计(中国台湾 Ulabx 公司),PCR 基因扩增仪(英国 Techne 公司),LightCycler 96 荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司),高速冷冻离心机(日本 HITACHI 公司),NovoCyte TM 流式细胞仪(美国安捷伦科技公司)。过表达和敲低 BMP7 病毒、阴性对照病毒(上海和元生物股份有限公司),RPMI 1640 基础培养基(美国 Gibco 公司),GC 和二

甲基砷(DMSO)(美国 Selleck 公司),TRIzol 试剂(美国 Sigma 公司),胎牛血清(美国 Hyclone 公司),细胞凋亡试剂盒(Annexin V Binding Buffer, Annexin V-APC, 7-AADsolution)(美国 Protein Simple 公司),ABScript II RT Master Mix 逆转录相关分子生物学试剂(武汉爱博泰克生物科技有限公司),TB Green Premix Ex Taq™ II PCR 相关分子生物学试剂(日本 TaKaRa 公司),RIPA 裂解液和 Cocktail(中国碧云天科技公司),BMP-7、Cleaved-Caspase-3、 β -actin、HRP 标记山羊抗兔抗体和 HRP 标记山羊抗小鼠抗体(武汉爱博坦克生物科技有限公司),高分化大鼠 PC12 细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与干预 PC12 细胞采用含 10% FBS 和 1% 青/链霉素双抗的 RPMI 1640 基础培养基(简称完全培养基)进行培养。培养箱条件为 37 °C、5% 二氧化碳、加湿环境。选取生长良好的大鼠 PC12 细胞,将 PC12 细胞接种至新的培养皿中,待细胞贴壁后,分别加入 0、10、20、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 GC 溶液(GC 溶于 DMSO 后加入细胞中),将培养皿放入细培养箱中培养所需时程。

1.2.2 慢病毒感染实验 将 PC12 细胞接种至 24 孔板中,约 0.5×10^5 个/孔,按照 0、10、20、40 和 80 的感染复数(multiplicity of infection, MOI)计算每孔需要的病毒量。待细胞贴壁后更换新鲜完全培养基,按照计算好的病毒量加入到培养基中,混匀后放入培养箱继续培养。12 ~ 16 h 后更换新鲜完全培养基。72 h 可在荧光显微镜下观察病毒感染状态,确定最佳 MOI,后续实验选择最佳 MOI 感染细胞。

1.2.3 细胞凋亡实验 将 PC12 细胞消化重悬后清洗 2 遍,加入流式管中,800 r/min 离心 3 min 后弃

去上清液,每管中加入 500 μL Annexin V Binding Buffer 工作液重悬细胞。然后加入 Annexin V-APC 和 7-AAD solution 各 5 μL ,混匀后室温避光孵育 20 min。将 DMSO 或等体积 50 $\mu\text{mol/L}$ GC 分别加入到感染了阴性对照病毒的细胞和过表达 BMP-7 细胞中进行处理,分别记为 DMSO-NC 组、DMSO-oe BMP-7 组、GC-NC 组和 GC-oe BMP-7 组;将 DMSO 或等体积 50 $\mu\text{mol/L}$ GC 分别加入到感染了阴性对照病毒的细胞和敲低 BMP-7 细胞中进行处理,分别记为 DMSO-NC 组、DMSO-shBMP-7 组、GC-NC 组和 GC-shBMP-7 组。反应完成后立即上机检测。

1.2.4 Western blotting 检测蛋白表达 PC12 细胞经匀浆、裂解、离心后提取上清液,用 BCA 法测定蛋白浓度。25 μg 总细胞蛋白提取物在 10% SDS-PAGE 上分离,并通过硝化纤维膜电转移。将膜在 5% 脱脂牛奶中室温封闭 1 h,然后分别用 BMP7 (1:1 000)、Cleaved-Caspase-3 (1:1 000) 或 β -actin (1:5 000) 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,洗净后 HRP 标记二抗 (1:5 000) 孵育 2 h。用 ECL 化学发光试剂曝光显影后,使用 Image J 软件对条带的像素点数进行统计分析,得到的数据可间接反映蛋白表达水平。

1.2.5 RNA 提取及实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 采用 TRIzol 试剂说明书提取大鼠海马和 PC12 细胞总 RNA,利用分光光度计检测 RNA 浓度和纯度,按照 ABScript II RT Master Mix 逆转录试剂盒说明书,将每个样品中总共 1 000 ng 的总 RNA 逆转录为 cDNA。qRT-PCR 按照 TB Green Premix Ex Taq™ II 试剂盒说明书进行。PCR 反应体系 10.0 μL : cDNA 样品、正、反向引物、TB Green II 和 DEPC 水分别为 1.0、0.2、0.2、5.0 和 3.6 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,循环 40 次。所有实验重复进行 3 次。内参基因 β -actin,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。Bax 引物序列:正向 5'-CTGCAGAGGATGATT GCTG-3',反向 5'-GTCTGCAAACATGTCAGCT-3',引物长度 19 bp; β -actin 引物序列:正向 5'-CTTCCTGG GTATGGAATCCT-3',反向 5'-TCTTTACGGATGTCAA CGTC-3',引物长度 20 bp。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。

1.3 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 8 和 SPSS 24.0 统

计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或中位数 (下四分位数,上四分位数) $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,比较采用方差分析或秩和检验 (H 检验),两两比较采用 LSD- t 检验或 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高浓度 GC 诱导大鼠神经元样 PC12 细胞凋亡率升高

0、10、20、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ GC 处理后 PC12 细胞凋亡率分别为 (6.52 \pm 1.63)%、(14.54 \pm 3.19)%、(17.87 \pm 3.01)%、(18.96 \pm 5.15)%、(25.97 \pm 2.44)%。经单因素方差分析,不同浓度 GC 处理组细胞凋亡率比较,差异有统计学意义 ($F = 18.400, P = 0.000$);与 0 $\mu\text{mol/L}$ GC 比较,当 GC 浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$),并且随着 GC 浓度的升高,细胞凋亡率升高(见图 1)。

2.2 不同浓度 GC 处理后 PC12 细胞的 Cleaved-Caspase-3 蛋白和 Bax 基因表达比较

不同浓度 GC 处理后 PC12 细胞的 Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F = 17.350, P = 0.000$)。不同浓度 GC 处理后 PC12 细胞的 Bax mRNA 相对表达量比较,差异有统计学意义 ($H = 11.230, P = 0.002$)。与 0 $\mu\text{mol/L}$ GC 比较,GC 浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,Cleaved-Caspase-3 蛋白和 Bax 基因表达显著增加。见表 1 和图 2。

2.3 过表达和敲低 BMP-7 细胞系结果

感染预实验结果显示,MOI=20 时 PC12 细胞感染慢病毒达到最佳感染效率(见图 3)。LV-NC 组和 LV-oe BMP-7 组 PC12 细胞 BMP-7 蛋白相对表达量分别为 (1.000 \pm 0.076) 和 (3.789 \pm 0.455),经 LSD- t 检验,差异有统计学意义 ($t = 10.470, P = 0.001$);LV-oe BMP-7 组较 LV-NC 组明显升高(见图 4)。构建 3 个靶点的敲低 BMP-7 慢病毒,选择 MOI=20 对 PC12 细胞感染 3 种敲低慢病毒及对照病毒。Western blotting 结果显示,LV-NC 组、LV-sh1 组、LV-sh2 组、LV-sh3 组 BMP-7 蛋白相对表达量分别为 (1.000 \pm 0.076)、(0.342 \pm 0.062)、(0.508 \pm 0.026)、(0.969 \pm 0.016),各组比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F = 124.900, P = 0.000$);与 LV-NC 组比较,LV-sh1 和 LV-sh2 PC12 细胞 BMP-7 蛋白表达显著降

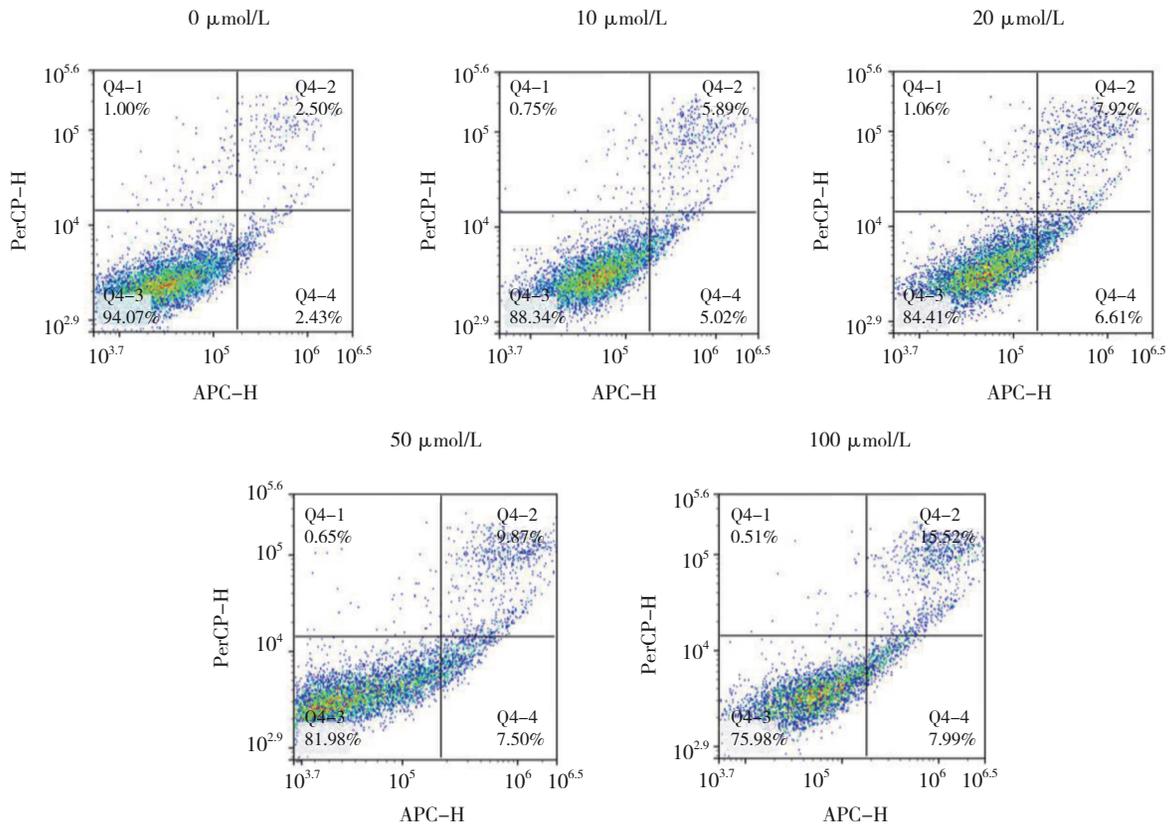


图 1 不同浓度 GC 处理后 PC12 细胞的流式细胞图

表 1 不同浓度 GC 处理后 PC12 细胞的 Cleaved-Caspase-3 蛋白和 Bax mRNA 相对表达量比较

组别	Cleaved-Caspase-3 蛋白	Bax mRNA
0 μmol/L	1.000 ± 0.350	1.007 ± 0.149
10 μmol/L	0.911 ± 0.213	0.863 ± 0.076
20 μmol/L	0.952 ± 0.128	1.176 ± 0.297
50 μmol/L	1.630 ± 0.060	3.696 ± 0.883
100 μmol/L	1.943 ± 0.062	4.979 ± 0.840
F/H 值	17.350	11.230
P 值	0.000	0.002

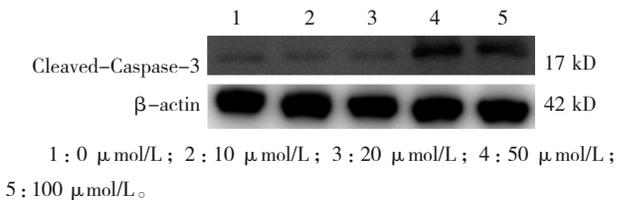


图 2 不同浓度 GC 处理后 PC12 细胞的 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达

低 ($P < 0.05$), 且 LV-sh1 组 BMP-7 蛋白降低效果最显著 (见图 5)。因此, 本研究选择 LV-sh1 作为敲低 BMP-7 慢病毒进行后续实验。

2.4 过表达 BMP-7 可以拮抗 GC 诱导的细胞凋亡增加

DMSO-NC 组、DMSO-oe BMP-7 组、GC-NC 组和 GC-oe BMP-7 组细胞凋亡率分别为 (6.71 ± 1.94)%、(6.10 ± 1.14)%、(14.57 ± 4.91)%、(7.61 ± 0.65)%，4 组比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 10.430, P = 0.001$), GC-NC 组细胞凋亡率较 DMSO-NC 组显著升高 ($P < 0.05$), 而 GC-oe BMP-7 组细胞凋亡率较 GC-NC 组显著减少 ($P < 0.05$), 与 DMSO-NC 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 6)。DMSO-NC 组细胞 Bax mRNA 相对表达量为 (1.001 ± 0.073)、DMSO-oe BMP-7 组为 (0.676 ± 0.141)、GC-NC 组为 (3.186 ± 0.659)、GC-oe BMP-7 组为 (1.114 ± 0.169), 4 组比较, 经 Kruskal-Wallis H 检验, 差异有统计学意义 ($H = 9.667, P = 0.001$)。GC-oe BMP-7 组细胞 Bax mRNA 相对表达量较 GC-NC 组明显下降 ($P < 0.05$), 与 DMSO-NC 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。DMSO-NC 组细胞 Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量为 (1.000 ± 0.265)、DMSO-oe BMP-7 组为 (0.846 ± 0.031)、GC-NC 组为 (1.992 ± 0.066)、GC-oe BMP-7 组为 (1.101 ± 0.005), 4 组比较, 经单因素

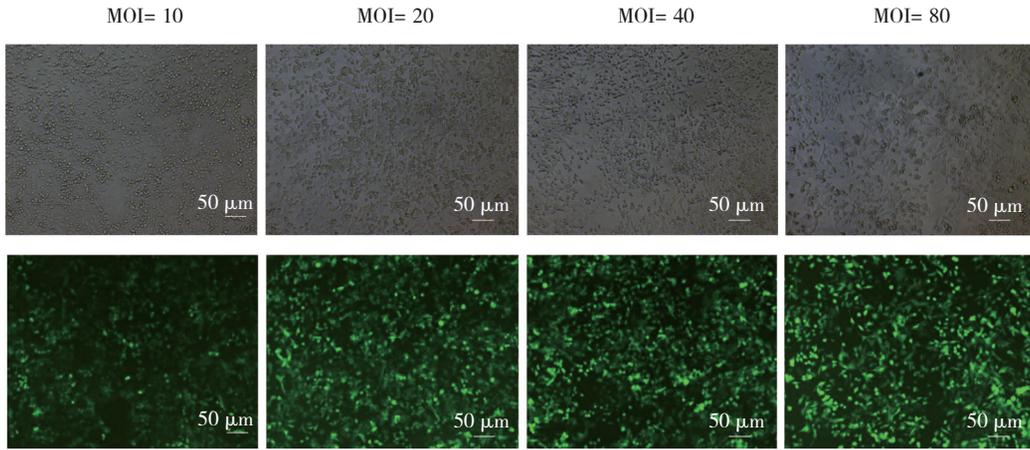
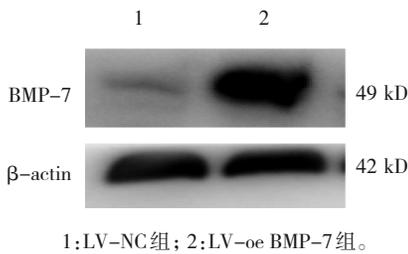
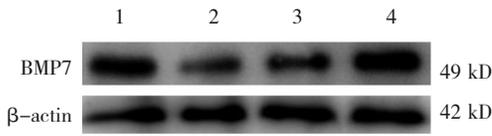


图3 过表达BMP-7病毒效果荧光图 (×10)



1:LV-NC组; 2:LV-oe BMP-7组。

图4 LV-NC组和LV-oe BMP-7组PC12细胞BMP-7蛋白表达



1:LV-NC组; 2:LV-sh1组; 3:LV-sh2组; 4:LV-sh3组。
图5 LV-NC组、LV-sh1组、LV-sh2组、LV-sh3组BMP-7蛋白表达

方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 42.110, P = 0.000$)。GC-oe BMP-7组细胞 Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量较 GC-NC 组明显下降 ($P < 0.05$), 且与 DMSO-NC 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 7。以上结果表明过表达 BMP-7 可以拮抗 GC 诱导的细胞凋亡增加。

2.5 敲低 BMP-7 诱导 PC12 细胞凋亡增加, 并加重 GC 诱导的细胞凋亡水平

DMSO-NC 组、DMSO-sh BMP-7 组、GC-NC 组和 GC-sh BMP-7 组细胞凋亡率分别为 $(11.22 \pm 0.56)\%$ 、 $(19.27 \pm 1.30)\%$ 、 $(23.37 \pm 2.09)\%$ 、 $(33.63 \pm 2.77)\%$ 。4 组比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 73.970, P = 0.000$), DMSO-sh BMP7 组细胞凋亡率较 DMSO-NC 组显著增加 ($P < 0.05$), GC-sh BMP-7 组细胞凋亡率较 GC-NC 组显著增加

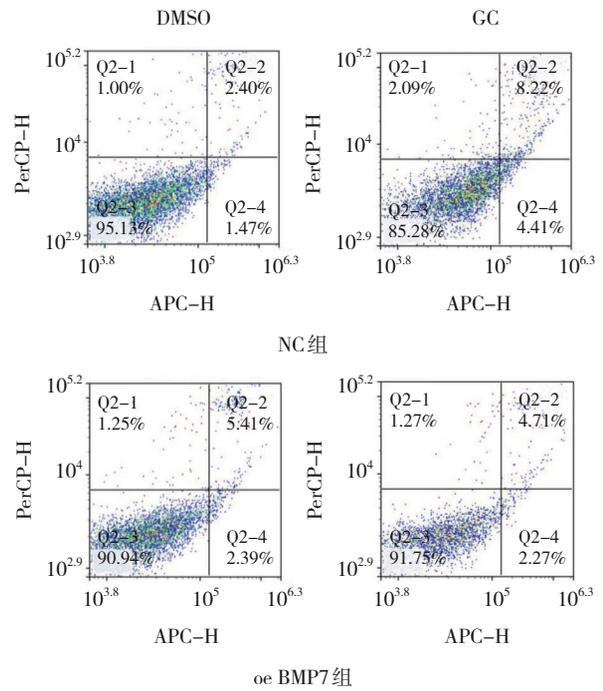
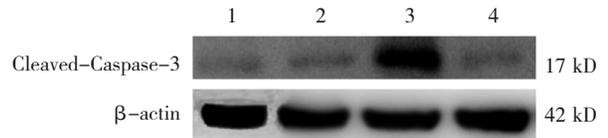


图6 DMSO-NC、DMSO-oe BMP-7、GC-NC 和 GC-oe BMP-7 组细胞凋亡的流式细胞图



1: DMSO-NC 组; 2: DMSO-oe BMP-7 组; 3: GC-NC 组; 4: GC-oe BMP-7 组。

图7 DMSO-NC组、DMSO-oe BMP-7组、GC-NC组和 GC-oe BMP-7组细胞 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达

($P < 0.05$) (见图 8)。DMSO-NC 组细胞 Bax mRNA 相对表达量为 (1.016 ± 0.224) 、DMSO-sh BMP-7 组为 (1.818 ± 0.172) 、GC-NC 组为 (2.828 ± 0.569) 、GC-sh BMP-7 组为 (3.535 ± 0.068) , 4 组 Bax mRNA 相对表达

量比较,经 Kruskal-Wallis H 检验,差异有统计学意义 ($H = 10.380, P = 0.000$)。DMSO-NC 组细胞 Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量为 (1.000 ± 0.265)、DMSO-sh BMP-7 组为 (1.480 ± 0.058)、GC-NC 组为 (1.526 ± 0.064)、GC-sh BMP-7 组为 (2.134 ± 0.053),4 组比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F = 32.090, P = 0.000$)。与 DMSO-NC 组比较, DMSO-sh BMP-7 组细胞 Bax mRNA 相对表达量和 Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量显著增加 ($P < 0.05$)。与 GC-NC 组比较, GC-sh BMP-7 组细胞 Bax mRNA 相对表达量和 Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量显著增加 ($P < 0.05$) (见图 9)。以上结果表明,敲低 BMP-7 表达诱导 PC12 细胞凋亡水平增加,并加重 GC 诱导的细胞凋亡水平。

3 讨论

研究表明,慢性应激会诱导大鼠海马区神经细胞发生不可逆性凋亡^[11],应激反应的核心是 HPA 轴和交感神经系统的活化,当机体处于慢性应激状态下时随着 HPA 轴的过度激活,糖皮质激素分泌增多,导致海马细胞凋亡水平增加,从而出现抑郁症状,最终导致学习能力下降和认知障碍^[6,12]。流行病学研究发现,长期处于高强度应激下的人群,罹患轻度认知障碍、阿尔茨海默病、抑郁症等认知相关疾病的概率明显增加^[13-15]。海马作为第一个被认为是应激靶标的高级大脑中心,主要负责学习、记忆、认知和情感,由于糖皮质激素受体在海马内富集,极易受到糖皮质激素的影响^[7]。研究显示,海马原代神经元暴露于浓度大于 $10 \mu\text{mol/L}$ 糖皮质激素后细胞凋亡水平明显增加^[16],本研究也发现,当糖皮质激素浓度大于 $10 \mu\text{mol/L}$ 时 PC12 细胞凋亡水平显著增加。随着现代经济社会的快速发展,越来越多的人群承受着高强度的工作负荷、复杂的工作环境以及睡眠不良等带来的精神和社会压力,加之频繁的自然灾害和社会突发公共事件的影响,机体长期处于应激源的刺激之下,罹患应激相关疾病的发生几率明显升高。因此,积极探寻一种神经保护剂以拮抗糖皮质激素的负性作用显得十分必要。

BMP-7 是 TGF- β 超家族的一员,在全身各个组织中均有存在,在中枢神经系统中发挥重要功能^[17]。BMP 主要通过 BMP 受体激活 Smad 信号通路发挥效应,此外, BMP 还激活不依赖于 Smad 的信号通路,如 MAP 激酶通路^[18]。研究表明, BMP-7 可以保护少突胶质细胞免受肿瘤坏死因子 α 诱导的凋亡^[19],在针对 $A\beta$ 的一项神经毒性实验中, BMP-7 可以明显改善 $A\beta$ 诱导的神经毒性,改善 $A\beta$ 诱导的细胞活力降低^[20]。此外, BMP-7 可以显著减弱过氧化氢诱导的乳酸脱氢酶活性增加和神经元密度降低^[21]。在脑缺血、脑卒中以及脊髓损伤等模型中, BMP-7 均发挥良好的神经保护作用^[22-23]。因此, BMP-7 作为一种保护性细胞因子,其在慢性应激诱导的神经损伤过程中的潜力值得进一步挖掘。

本研究结果显示, PC12 细胞凋亡水平与糖皮质激素呈剂量依赖性。细胞凋亡的发生一般通过触发细胞内凋亡级联反应来介导,包括海马神经元中的 Caspase-3 和 Bax 基因激活^[24]。为了探究 BMP-7

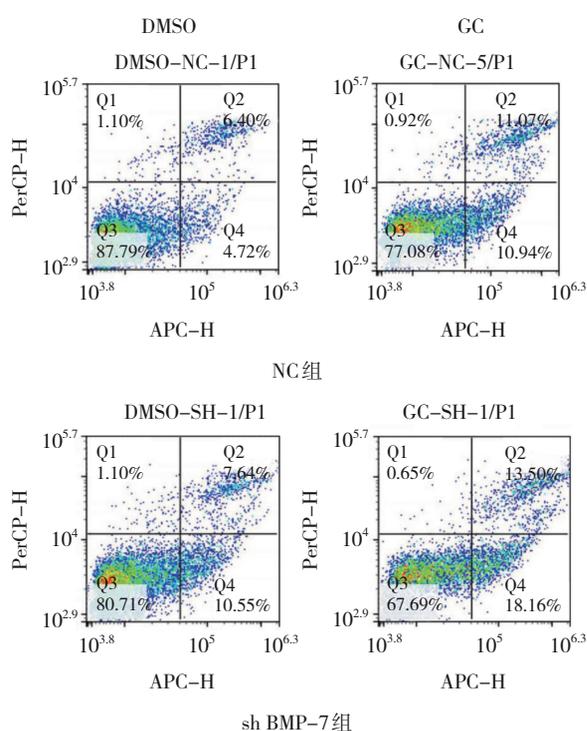


图 8 DMSO-NC 组、DMSO-sh BMP-7 组、GC-NC 组和 GC-sh BMP-7 组的流式细胞图

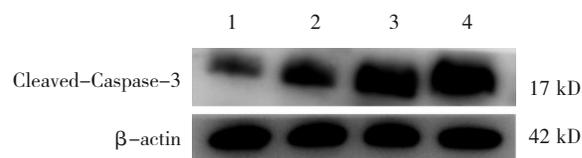


图 9 DMSO-NC 组、DMSO-sh BMP-7 组、GC-NC 组和 GC-sh BMP-7 组的 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达

对GC诱导的PC12细胞凋亡的保护作用,本研究使用流式细胞仪检测细胞凋亡率,采用qRT-PCR测定细胞Bax基因表达,Western blotting测定Cleaved-Caspase-3蛋白表达。Bax基因是Bcl-2相关X蛋白的基因,有报道称Bax可促进Caspase活化,而Caspase-3则是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶^[25],在细胞凋亡中发挥关键作用,被广泛用作细胞凋亡的生物标志物^[26]。Caspase-3经切割活化后就会变成Cleaved-Caspase-3,后者可以继续激活Caspase-6、Caspase-7和Caspase-9,形成凋亡级联反应^[27]。本研究结果显示,BMP-7可以降低Bax基因,进而降低下游的Caspase-3蛋白活化,阻止凋亡级联反应的发生,部分逆转GC诱导的细胞凋亡水平。而敲低BMP-7表达后,细胞内Bax基因表达增加,导致下游Caspase-3活化形成Cleaved-Caspase-3增多,细胞凋亡反应增多,诱导PC12细胞凋亡水平增加,并加重GC诱导的细胞凋亡水平。

综上所述,本研究观察了不同浓度糖皮质激素对PC12细胞凋亡水平的影响,发现BMP-7可以拮抗GC诱导的PC12细胞凋亡增加,进而为防治GC诱导的神经损伤提供新的思路和方法。鉴于GC激素对神经细胞的影响是多方面的,BMP-7是否可以从事其他方面发挥神经保护作用仍需要进一步研究。

参 考 文 献 :

- [1] 钱令嘉. 关于应激与认知的思考[J]. 军事医学, 2011, 35(9): 658-662.
- [2] TROUBAT R, BARONE P, LEMAN S, et al. Neuroinflammation and depression: a review[J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 151-171.
- [3] TIMKO OLSON E R, OLSON A A, DRISCOLL M, et al. Nature-based interventions and exposure among cancer survivors: a scoping review[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2023, 20(3): 2376.
- [4] SINHA R. Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1141: 105-130.
- [5] MCEWEN B S, BOWLES N P, GRAY J D, et al. Mechanisms of stress in the brain[J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(10): 1353-1363.
- [6] PARUL, MISHRA A, SINGH S, et al. Chronic unpredictable stress negatively regulates hippocampal neurogenesis and promote anxious depression-like behavior via upregulating apoptosis and inflammatory signals in adult rats[J]. *Brain Res Bull*, 2021, 172: 164-179.
- [7] PODGORNY O V, GULYAEVA N V. Glucocorticoid-mediated mechanisms of hippocampal damage: contribution of subgranular neurogenesis[J]. *J Neurochem*, 2021, 157(3): 370-392.
- [8] BANI-YAGHOUB M, TREMBLAY R G, AJJI A, et al. Neuroregenerative strategies in the brain: emerging significance of bone morphogenetic protein 7 (BMP7)[J]. *Biochem Cell Biol*, 2008, 86(5): 361-369.
- [9] LIU S X, ZHANG W, YANG L, et al. Overexpression of bone morphogenetic protein 7 reduces oligodendrocytes loss and promotes functional recovery after spinal cord injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(18): 8764-8774.
- [10] OPREA D, SANZ C G, BARSAN M M, et al. PC-12 cell line as a neuronal cell model for biosensing applications[J]. *Biosensors (Basel)*, 2022, 12(7): 500.
- [11] KIM E J, KIM J J. Neurocognitive effects of stress: a metaparadigm perspective[J]. *Mol Psychiatry*, 2023: 1-14. DOI: 10.1038/s41380-023-01986-4. Epub ahead of print.
- [12] BOLSHAKOV A P, TRET'YAKOVA L V, KVICHANSKY A A, et al. Glucocorticoids: Dr. jekyll and MR. Hyde of hippocampal neuroinflammation[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2021, 86(2): 156-167.
- [13] RAO R V, SUBRAMANIAM K G, GREGORY J, et al. Rationale for a Multi-Factorial approach for the reversal of cognitive decline in Alzheimer's disease and MCI: a review[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1659.
- [14] de SOUSA JÚNIOR GM, VARGAS H D Q, BARBOSA F F, et al. Stress, memory, and implications for major depression[J]. *Behav Brain Res*, 2021, 412: 113410.
- [15] GUO H M, ZHENG L X, XU H, et al. Neurobiological links between stress, brain injury, and disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 8111022.
- [16] 夏颖华, 孔晓冬, 雷平, 等. 神经生长因子对糖皮质激素诱导大鼠海马神经元凋亡的保护作用[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2017, 17(3): 209-213.
- [17] KUSAKAWA Y, MIKAWA S, SATO K. BMP7 expression in the adult rat brain[J]. *IBRO Rep*, 2017, 3: 72-86.
- [18] ONGARO L, SCHANG G, HO C C, et al. TGF- β superfamily regulation of follicle-stimulating hormone synthesis by gonadotrope cells: is there a role for bone morphogenetic proteins[J]. *Endocrinology*, 2019, 160(3): 675-683.
- [19] WANG X, XU J M, WANG Y P, et al. Protective effects of BMP-7 against tumor necrosis factor α -induced oligodendrocyte apoptosis[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2016, 53: 10-17.
- [20] SUN L, GUO C, LIU D, et al. Protective effects of bone morphogenetic protein 7 against amyloid-beta induced neurotoxicity in PC12 cells[J]. *Neuroscience*, 2011, 184: 151-163.
- [21] COX S, HARVEY B K, SANCHEZ J F, et al. Mediation of BMP7 neuroprotection by MAPK and PKC IN rat primary cortical cultures[J]. *Brain Res*, 2004, 1010(1-2): 55-61.
- [22] de RIVERO VACCARI J P, MARCILLO A, NONNER D, et al. Neuroprotective effects of bone morphogenetic protein 7 (BMP7) treatment after spinal cord injury[J]. *Neurosci Lett*,

- 2009, 465(3): 226-229.
- [23] GE M Y, YIN J W, QIN X L, et al. Isoflurane post-conditioning attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by reducing apoptotic through activating the BMP7/SMAD signaling pathway in rats[J]. J Chem Neuroanat, 2021, 112: 101916.
- [24] D'ARCY M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. Cell Biol Int, 2019, 43(6): 582-592.
- [25] WANG X X, ZHANG B, XIA R, et al. Inflammation, apoptosis and autophagy as critical players in vascular dementia[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(18): 9601-9614.
- [26] NAGATA S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells[J]. Annu Rev Immunol, 2018, 36: 489-517.
- [27] LOSSI L, CASTAGNA C, MERIGHI A. Caspase-3 mediated cell death in the normal development of the mammalian cerebellum[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12): 3999.
- (张蕾 编辑)
- 本文引用格式:** 李峰, 谢方, 王雪, 等. 骨形成蛋白 7 对糖皮质激素诱导 PC12 细胞凋亡的作用研究[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(3): 49-56.
- Cite this article as:** LI F, XIE F, WANG X, et al. Effect of BMP-7 on glucocorticoid-induced apoptosis in PC12 cells[J]. China Journal of Modern Medicine, 2024, 34(3): 49-56.