

大黄素通过抑制 FOXO1 活性减轻 NO 对神经细胞的损伤

陈素领¹⁾ 周杰超²⁾ 张 杰²⁾ 庄江兴²⁾ 刘 娅^{1)*}

(¹⁾ 吉林大学公共卫生学院, 长春 130021; ²⁾ 厦门大学神经科学研究所, 厦门 361005)

摘要 氧化应激所产生的活性氧和一氧化氮(nitric oxide, NO)自由基在心脑血管疾病、神经退行性疾病中发挥着重要作用, 过量的 NO 可以导致自由基损伤, 并诱导神经元的凋亡。大黄作为中医传统药物具有重要的药用价值, 临床应用非常广泛。近年研究表明, 大黄素具有抗氧化、免疫调节、抗菌、抗炎等功能, 被广泛应用于肠道疾病、肾病、心血管疾病、胰腺炎等病症的治疗。Forkhead 转录因子 1(FOXO1)是 Forkhead 转录因子家族的一个重要成员, FOXO1 对于胰岛素信号通路、DNA 修复、清除活性氧损伤、细胞周期和凋亡的调控非常重要。而 NO 自由基对 FOXO1 的调控作用还不清楚, 我们研究发现, NO 的供体 GSNO(亚硝基谷胱甘肽)或者 L-Arg(L-精氨酸)可显著提高 FOXO1 的转录活性并促进其下游促凋亡基因 FasL、Bim 的转录表达, 进而诱导神经元死亡。我们进一步研究发现, 大黄素可以通过降低 FOXO1 的转录水平以及蛋白质水平, 缓解 NO 所诱导的神经元凋亡。该研究揭示了 NO 自由基诱导神经元损伤的新机制, 同时也为了解大黄素的抗氧化作用提供了新的实验依据, 对大黄素等中药有效成分的临床应用提供了重要参考。

关键词 NO, 天然抗氧化剂, 大黄素, FOXO1, 神经元凋亡

学科分类号 R15

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0244

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD) 是一种以认知功能障碍和进行性记忆下降为主要表现, 并伴有人格和行为异常的年龄相关神经退行性疾病, 且随人口老龄化, AD 的发病率也呈上升趋势^[1]。研究发现, AD 患者的两个主要病理学特征是淀粉样蛋白沉积斑在神经元周围的沉积, 以及神经细胞内 Tau 蛋白的神经元纤维缠结和神经元的凋亡^[2]。

近年来, 关于 AD 的发病机制有各种不同的假说, 如胆碱能神经元假说、A β 毒性假说、Tau 蛋白假说、能量代谢假说、氧化应激假说、基因突变假说等^[3]。但其具体机制尚未完全阐明, 且均无法解释其病因并提出有效的治疗方案^[4]。尽管在 AD 的认识和治疗上, 已经取得了很多的进展, 但目前还没有研制出可有效减缓或阻止其进展的药物。越来越多的研究表明, 氧化应激是 AD 发生、发展的致病因素之一^[5]。氧化应激是指活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)对人体内细胞组分的过度氧化。内源性和外源性 ROS 的产生是氧化应激的早期标志, 其通常是细胞代谢中氧化磷酸化的副产

品, 如 O₂⁻、H₂O₂、OH⁻、NO 等^[6]。氧化应激最早由美国 Sohal 教授等^[7-8]提出, 并认为自由基与衰老等疾病密切相关。氧化和抗氧化是人体固有的生理过程, 正常生理情况下机体的氧化水平和抗氧化水平在机体各种因素的参与下保持动态平衡, 对机体不构成伤害。在发生氧化应激损伤时, 可能导致神经系统功能紊乱和神经元凋亡, 与其他几种假说也存在密切联系。

氧化应激可损伤细胞内多种生物大分子。神经细胞对于氧化应激尤其敏感, 在 AD 患者脑中, 神经元长期处于氧化应激状态, ROS 可以氧化脂质、蛋白质、DNA、RNA 和糖类等多种生物大分子和生物膜。氧化应激也参与了老年斑的形成、神经原纤维的缠结以及神经元的凋亡等^[9-10]。值得一提的是, 天然抗氧化剂在这些疾病的预防和治疗中

* 通讯联系人。

Tel: 0431-85619455, E-mail: liuya@jlu.edu.cn

收稿日期: 2016-08-12, 接受日期: 2016-10-13

发挥了重要的作用. 天然抗氧化剂, 如茶多酚, 能够防止 6- 羟多巴胺诱导的细胞凋亡, 保护线粒体功能从而预防 6- 羟多巴胺诱导大鼠的帕金森疾病 (PD) 症状^[11-12]. 在 AD 模型小鼠海马 CA1 区的 A β 斑中, 铜、铁浓度比周围神经明显增高, 使用尼古丁处理可以显著下调海马 CA1 区的 A β 斑及其周围神经的铜、铁浓度, 尼古丁还可以抑制有丝分裂蛋白激酶 (MAPK) 的激活, NF- κ B 和致癌基因 C-Myc 的活化, 使一氧化氮合成酶和一氧化氮生成下调, 其所介导的神经信号通路同时也受乙酰胆碱酯受体调控^[13-16]. 因此, 抗氧化剂很可能成为 AD 治疗的一个重要潜在途径^[17-18].

一氧化氮 (NO) 广泛存在于哺乳动物体内, 由一氧化氮合酶 (NOS) 催化氧化 L- 精氨酸合成并释放至周围, 有着广泛的生理功能. 体内 NO 水平发生异常时, 可参与多种病理过程; NO 的过多产生和释放与一些炎症相关的疾病, 如早发性痴呆、帕金森病、肌萎缩侧索硬化等有密切联系^[19-21]. 这些疾病及生理状态的失控, 均与 NO 介导的相应器官和组织细胞凋亡的程度密切相关. 在细胞信号转导的过程中, NO 通过调控细胞凋亡信号通路影响细胞存活, 对多种细胞的凋亡具有双重影响, 通常高浓度的 NO 会增强细胞的凋亡, 低浓度时会延缓细胞凋亡. 在细胞凋亡相关疾病的治疗中, NO 越来越成为人们关注的焦点. 在神经系统中, 正常生理条件下产生的 NO 有利于神经系统的功能运行, 当内源性或外源性的 NO 过量产生和释放时会导致神经毒性, 进而导致神经元凋亡, 诱导疾病发生^[22].

近代医学对中药的持续深入研究发现, 其多种有效成分都有重要的临床意义. 其中, 大黄素 (Emodin) 是中药大黄、虎杖、何首乌、望江南、沙仁及百合等多种中药的有效成分之一, 系蒽醌类化合物^[23]. 大量研究表明大黄素具有广泛药理活性, 如免疫抑制、抗癌、抗炎、抗动脉粥样硬化等^[24-25]. 近年来大黄素药理作用研究备受关注. 体外研究表明大黄素具有抗氧化及清除氧自由基的作用, 已有大量文献报道支持这一观点. 在利用 *E. coli* 的研究中, 蒽醌类具有通过细菌囊泡抑制 D- 乳酸盐和 NADH 氧化的作用^[25]. 也有文献报道, 大黄素可能通过阻断诱导型氮氧化物合酶 (iNOS) 和环加氧酶 2 (COX-2) 的 mRNA 水平而抑制炎症反应^[26]. 自由基诱导的血清过氧化脂质 (LPO) 是引起细胞损伤而造成许多病理状况的主要因素之一, 有研究表明, 大黄素可以防止 LPO 逸出微粒体进而造成对胞膜等

的损伤, 这也提示其具有抗氧化作用, 该作用可能与大黄素的酚结构有密切关系^[27].

FOXO 转录因子是进化上高度保守的叉头转录因子的一个亚家族^[28]. FOXO1 是这个家族的重要成员之一, 对于胰岛素信号通路、DNA 修复、清除活性氧损伤、细胞周期和神经元凋亡的调控非常重要^[29-33]. FOXO1 通过多种翻译后修饰, 穿梭于细胞核和细胞质之间, 在机体细胞抵抗氧化应激方面也发挥重要作用. 研究表明大量氧自由基产生导致细胞氧化损伤时, FOXO1 可以通过增强超氧化物歧化酶 MnSOD 和谷胱甘肽还原酶的表达发挥其抗氧化功能^[34].

基于前期的研究和文献报道, 我们使用 NO 供体 GSNO, L-Arg 探讨其在神经细胞凋亡中的作用, 发现 NO 供体能够提高 FOXO1 的转录活性, 并诱导其下游促凋亡靶基因 FasL、Bim 转录表达. 为了探讨天然产物或中药提取物对 NO 神经毒性的保护作用, 从几十种中药提取物中进行了 FOXO1 活性的筛选, 发现和确定了大黄素对 FOXO1 活性具有明显的抑制作用. 我们发现大黄素作为天然抗氧化剂能显著抑制 FOXO1 的转录活性及其蛋白质水平的表达, 进而缓解 NO 所诱导的神经元凋亡.

1 材料与方法

1.1 质粒

Bim-luciferase, 3 $\times$ IRS-luciferase、FasL-luciferase, 由中国科学院生物物理研究所袁增强教授提供. 大黄素购自生工生物工程(上海)股份有限公司.

1.2 抗体

FOXO1、FOXO1-S319 购买于 Santa cruz 公司, AKT1、AKT1-S473 购买于生工生物工程(上海)股份有限公司, GAPDH 购买于 Cell Signaling Technology.

1.3 原代神经元, HT22 细胞的培养

具体的方法参考文献^[35]. 简述为: 取 E16.5 的胎鼠大脑皮层, 去除血网膜, 使用胰酶消化, 获得神经元, 使用添加 B27 和 Glutamate Neurobasal 的培养基, 将神经元培养于已用多聚赖氨酸包被过的细胞培养皿. 原代神经元培养到 DIV 3 时使用 lipo2000 进行转染, 在 DIV 7 时进行药物处理并收集神经元.

HT22 细胞 (DMEM+10% 胎牛血清+1% 双抗为培养基): 培养于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 培养箱, 每天更换一次预热的培养基, 根据密度 2 天左右传代 1 次.

传代时, 吸尽培养基, 10 cm 培养皿加入 1 ml 0.25%胰酶消化, 待细胞变圆, 吸干净, 再加入 2 ml 培养基终止消化, 轻轻吹打混匀, 根据密度按 1:3~1:4 比例传代. 在细胞密度为 40%~60% 时进行转染, 转染 24 h 后收集细胞.

1.4 荧光素酶双报告检测

具体方法参考 Promega 的双萤光素酶报告基因检测系统操作手册. 将双报告基因质粒转染入细胞, 转染 24 h 后, 加药处理, 然后吸干细胞培养基, 使用 1×PBS 洗细胞 1 次, 加入 1×PLB 细胞裂解液, 裂解细胞 15~30 min. 吸取 20 μ l 细胞裂解液, 放入专用的 96 孔板, 加入底物 LAR 20 μ l, 使用多功能酶标仪测读值, 然后再加入底物 Stop&Glo, 再使用多功能酶标仪读值.

1.5 CCK-8 细胞活性检测

细胞活性检测使用 Cell Counting Kit-8(CCK-8 试剂盒), 是由同仁化学研究所(Dojindo)开发的检测细胞增殖、细胞毒性的试剂盒. 具体操作参考产品操作手册.

2 实验结果

2.1 NO 供体可激活 FOXO1 并诱导神经细胞死亡

NO 是一种不同于经典神经递质的气体型递质

分子. Garthwaite 等^[36]首先研究发现 NO 在脑内发挥细胞间信使的作用, 现已确定 NO 广泛地存在于中枢神经系统内. 在正常情况下, 中枢及周围神经系统内的 NO 是一种能调节细胞功能的信息分子, 参与记忆形成、脑血流协调、血脑屏障等. 在某些病理条件下, NO 是参与帕金森病、缺血损伤等疾病过程的重要物质. 而 L-精氨酸能够有效促进 NO 在体内的生成, 减轻体内氧化脂质对 NO 的降解, 从而提高体内的 NO 含量.

本次研究使用了 2 种不同的 NO 供体: 亚硝基谷胱甘肽(GSNO)和 L-精氨酸(L-Arg), 它们都可在生理条件下产生 NO, 参与正常的生命活动. 使用不同浓度的 GSNO 处理原代神经元, 我们发现随着 GSNO 浓度梯度的上升, FOXO1 的转录活性呈现上升趋势(图 1a). 为证实这种现象是不是 NO 供体所具有的普遍现象, 我们使用了另外一种 NO 供体 L-Arg. 同样地, 使用不同浓度梯度的 L-Arg 处理神经元, 如(图 1b)所示, 随着 L-Arg 浓度梯度的上升, FOXO1 的转录活性也呈现上升趋势. 结果表明, NO 供体 GSNO 和 L-Arg 在一定浓度下都能显著提高 FOXO1 的转录活性, 与 GSNO 相比 L-Arg 高浓度处理时更能显著提高 FOXO1 的转录活性.

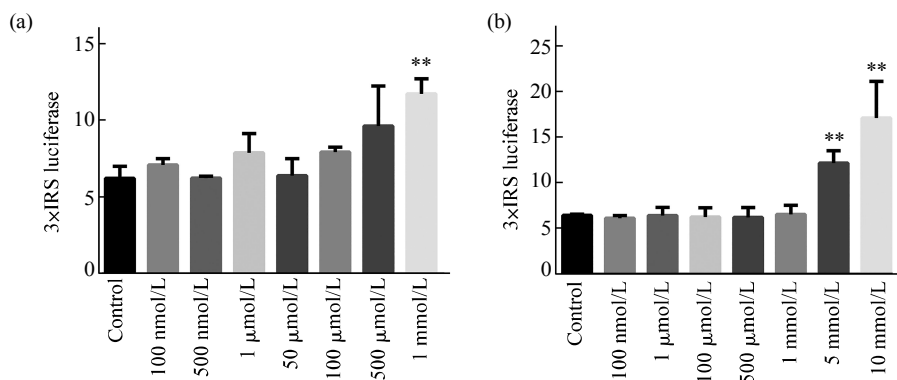


Fig. 1 Nitric oxide increased the FOXO1 transcriptional activity

Primary cortical neurons were transfected with the 3xIRS luciferase reporter system. On DIV7, the neurons were treated with GSNO(a) and L-Arg(b) at different concentration and then subjected to luciferase assay. Data are mean $\pm$ SEM, $n=3$; $P < 0.05$.

如图 1 所示, 使用高浓度的 NO 供体 GSNO 和 L-Arg 均可显著提高 FOXO1 的转录活性. 而 FOXO1 在生物代谢、氧化应激、衰老、生殖等方面发挥着重要的生物学功能. 特别需要指出的是, 大量氧自由基的产生导致了细胞氧化损伤. FOXO1 穿梭于核质当中, 在机体细胞抵抗氧化应激方面发挥重要作用. 进而我们探讨在 L-Arg 不同浓度的处理下, 原代神经元的细胞形态会发生什么变化? 如

(图 2a)所示, 高浓度的 L-Arg 引起了神经元的胞体固缩、神经元树突、轴突退化等一些和神经元凋亡相似的形态改变. 同时, 我们利用神经细胞系 HT22, 使用不同浓度的 L-Arg 处理, 可以发现 L-Arg 能够抑制细胞的生长, 而高浓度(50 mmol/L)的 L-Arg 能够诱导细胞凋亡(图 2b). 为了探讨多种条件下 L-Arg 对神经细胞的影响, 使用低浓度、长时间处理观察 L-Arg 对神经细胞的影响, 发现低浓

度长时间的 L-Arg 能够明显抑制神经细胞的生长, 但是并不会引起细胞大量凋亡(图 2c). 综上, 我们发现 L-Arg 处理下, 产生的 NO 所引发的氧化应激, 能够在一定程度上诱导神经细胞的凋亡.

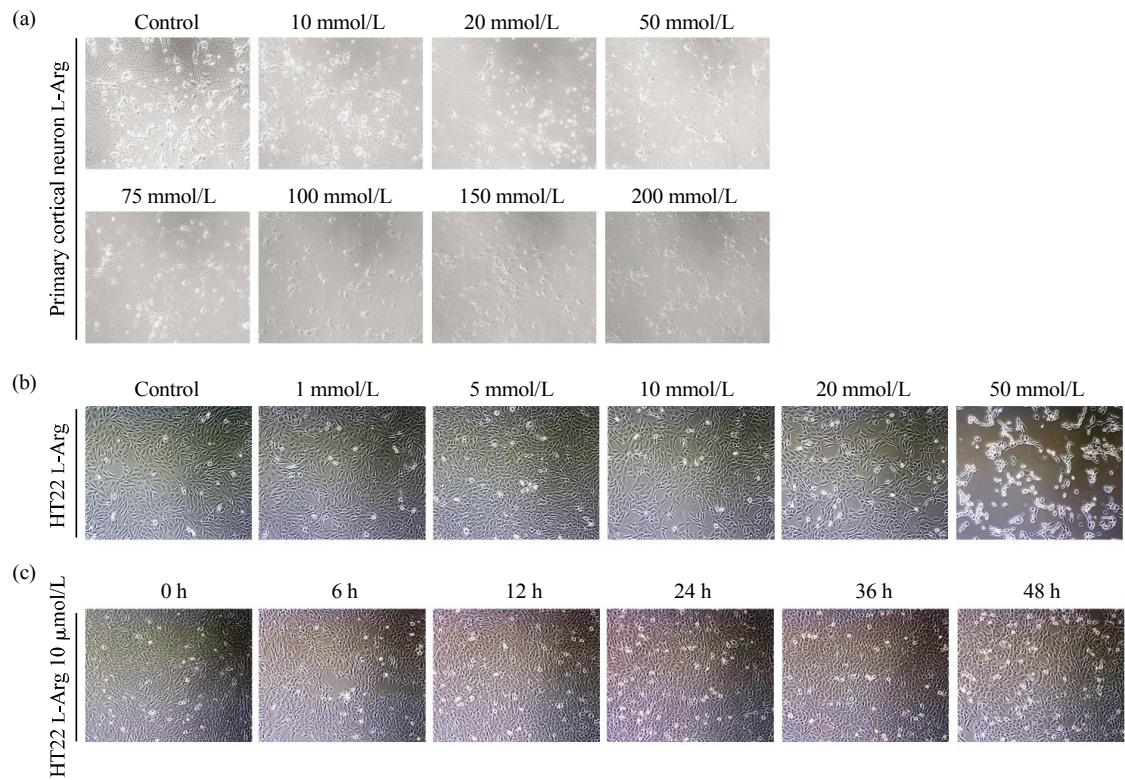


Fig. 2 Effects of the different concentrations of L-Arg on primary cortical neuron and HT22 cells
(a) Primary cortical neuron were treated with different concentrations L-Arg. Cells were imaged using Metamorph software and a Nikon at 20× magnification. (b) HT22 cells were treated with different concentrations L-Arg. Cells were imaged using Metamorph software and a Nikon at 20× magnification. (c) HT22 cells were treated with 10 μmol/L L-Arg different time. Cells were imaged using Metamorph software and a Nikon at 20× magnification.

既然高浓度的 L-Arg能够在很大程度引起神经元细胞形态发生了和凋亡相类似的变化, 为了进一步验证 L-Arg 能够诱导神经细胞凋亡, 我们使用了 CCK-8 检测神经细胞活力. 如图 3b 所示, 使用不同浓度的 L-Arg处理神经细胞, 观察到在高浓度的 L-Arg处理下, 神经细胞活力明显下降. 综上所述, 我们发现, 高浓度的 NO 供体 L-Arg、GSNO 能够

显著提高 FOXO1 的转录活性, 并且在很大程度使细胞形态发生与凋亡相类似的变化, 提示高浓度的 NO 供体诱导细胞凋亡很可能是由于上调了 FOXO1 的转录活性, 从而诱导了 FOXO1 下游促凋亡基因 FasL、Bim 的表达(图 3a). 因此, 高浓度的 NO 供体具有一定的细胞毒性, 能够在一定程度上氧化损伤细胞.

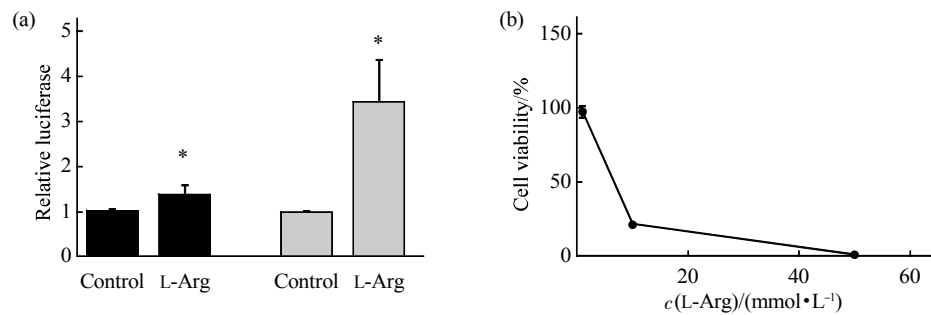


Fig. 3 L-Arg induce neuron death
(a) Primary cortical neurons were transfected with the Bim luciferase and FasL-luciferase system. On DIV 7, the neurons were treated with L-Arg and then subjected to luciferase assay. Data are mean ± SEM, n=3; P < 0.05. ■: Bim luciferase; □: FasL luciferase. (b) Primary cortical neurons treated with L-Arg and survival measured by CCK-8.

2.2 以 FOXO1 为靶点，探究延缓神经元凋亡的潜在药物

大量研究报道表明，FOXO1 可以介导神经元的凋亡，如细胞周期依赖性激酶 5(Cdk5)可以通过调节 FOXO1 的亚细胞定位调控皮层神经元的凋亡^[35]，细胞周期依赖性激酶 1(Cdk1)也可以通过磷酸化调控 FOXO1 的转录活性，调控小脑颗粒神经元的存活^[37]。鉴于 FOXO1 在神经元存活中有如此重要的生物学功能，我们尝试以 FOXO1 为靶点，

研究具有抗氧化作用的药物处理对其转录活性的影响，从而调控神经元的存活。我们对 58 种相关药物进行了试验筛选(表 1)，包括人参皂苷、肉桂酸、单宁、大黄素等不同类型的复方药物和中药的有效成分。结果发现 58 种药物对 FOXO1 的转录活性有不同程度的影响，其中有几种能够显著抑制 FOXO1 的转录活性，而大黄素(编号 6)的抑制作用最为明显(图 4)。

Table 1 List of different drugs used for FOXO1 activity screen

No.	Name	No.	Name	No.	Name
1	Berberine hydrochloride	21	Dracorhodin perochlorate	41	Synephrine
2	Glycyrrhetic acid	22	Fangchinoline	42	Gastrodin
3	Ginsenoside Rb1	23	Notoginsenoside R1	43	Aesculetin
4	Platycodin D	24	(+)-Tetrandrine	44	Ursodesoxycholic acid
5	Panaxadiol	25	Phillyrin	45	Geniposide
6	Emodin	26	Berberine Tannate	46	p-Hydroxybenzoic acid
7	Patchouli alcohol	27	Moroxydine hydrochloride	47	Cinnamic acid
8	2, 3, 5, 4-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-O-β-D-glucoside	28	Menthol	48	4-methoxycinnamic acid
9	Prim-glucosylcimifugin	29	Cholic acid	49	4-methoxysalicylic acid
10	Jujuboside A	30	Chlorpheniramine Maleate	50	Salic acid
11	Deoxyschizandrin	31	1E-10-hydroxy-2-decyle-nic acid	51	Tannic acid
12	Astragaloside IV	32	Panaxatriol	52	Gallic acid
13	Ginsenoside Rg1	33	Propyl 4-hydroxybenzoate	53	5-methoxysalicylic acid
14	Cinnamic acid	34	Borneol	54	4-hydroxy-cinnamic acid
15	Dehydroandrographolide	35	Curcumin	55	3-hydroxybenzoic acid
16	5-O-Methylvisammioside	36	Madecassoside	56	3-hydroxy-4-methoxybenzene
17	Hesperetin	37	Isoimperatorin	57	2, 4-dihydroxy benzoic acid
18	Sinapine thiocyanate	38	Sodium taurocholate hydrate	58	2, 3-dihydroxy benzoic acid
19	Diosgenin	39	Ferulic acid		
20	Oleanolic acid	40	Scopoletin		

2.3 在神经细胞中大黄素对 FOXO1 的调控作用

为缓解 NO 的神经毒性，我们尝试以大黄素作为抗氧化剂，进而探讨了其在抵抗 NO 氧化应激中的作用。前面结果显示，NO 供体 GSNO、L-Arg 能够显著提高 FOXO1 的转录活性。因此，我们以 FOXO1 为作用靶蛋白，首先探讨大黄素对 FOXO1 转录活性的影响。使用不同浓度梯度的大黄素处理神经母瘤细胞 HT22，检测其对 FOXO1 转录活性的影响。实验结果表明，大黄素能够显著抑制 FOXO1 的转录活性(图 5a)。同时我们还观察了 FOXO1 下游基因 Bim 的转录活性，发现大黄素也能够显著抑制促凋亡基因 Bim 的转录表达(图 5b)。

其次，我们观察大黄素的处理是否会对 HT22 细胞的形态产生影响。如图 5c 所示，在图示浓度处理条件下，基本不会对细胞的形态产生影响，因此我们认为大黄素的处理不会具有细胞毒性的影响。

大黄素是如何抑制 FOXO1 转录活性的？大量研究证实，FOXO1 是 PI3K-AKT/PKB 信号转导途径下游重要的靶基因，FOXO1 在很大程度上受到 AKT 激酶的调控，活化的 AKT 能够磷酸化 FOXO1 的 Thr24、Ser256 和 Ser319 三个位点，磷酸化的 FOXO1 能够和分子伴侣蛋白 14-3-3β 相互作用，使 FOXO1 大量定位于细胞质当中，抑制 FOXO1 入核，从而降低 FOXO1 的转录活性^[38]。为

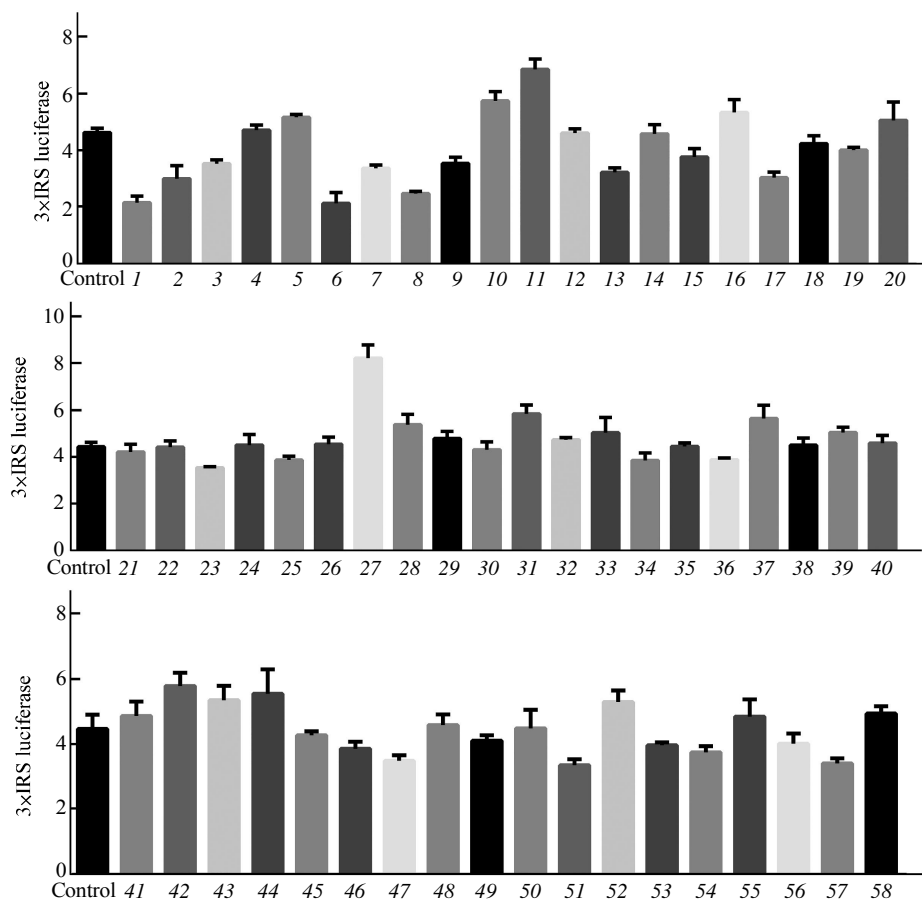


Fig. 4 Different drugs effect on FOXO1 transcriptional activity
Primary cortical neurons were transfected with the 3×IRS luciferase reporter system. On DIV 7, the neurons were treated with different drugs and then subjected to luciferase assay. Data are mean ± SEM, *n*=3; *P* < 0.05.

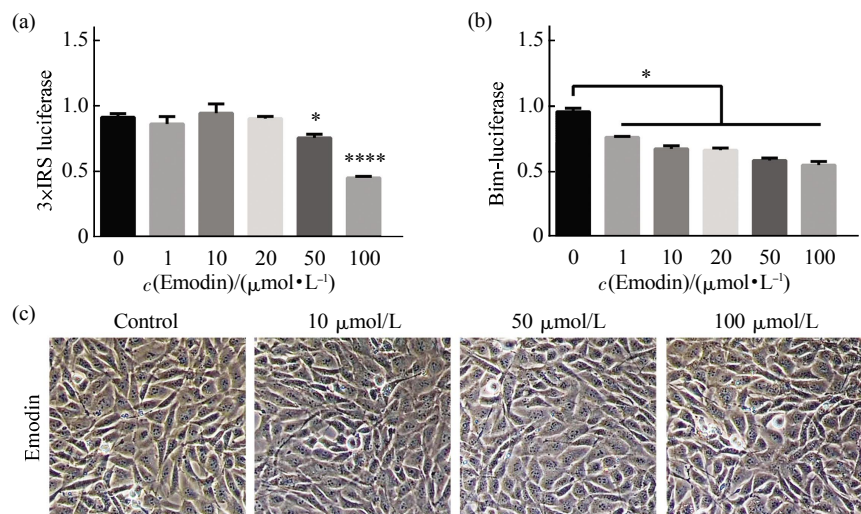


Fig. 5 Emodin decrease FOXO1 transcriptional activity
(a) HT22 cells were transfected with the 3×IRS luciferase reporter system, the cells treated with Emodin at different concentration after 24 h transfected and then subjected to luciferase assay. Data are mean ± SEM, *n*=3; *P* < 0.05. (b) HT22 cells were transfected with the Bim luciferase reporter system, the cells treated with Emodin at different concentration after 24 h transfected, and then subjected to luciferase assay. Data are mean ± SEM, *n*=3; *P* < 0.05. (c) HT22 cells were treated with different concentrations of Emodin. Cells were imaged using Metamorph software and a Nikon at 20×magnification.

了探讨大黄素是不是通过改变 AKT 的活性来影响其对 FOXO1 的磷酸化水平, 我们使用大黄素处理神经细胞 HT22, 继而提取细胞蛋白, 通过蛋白质印迹(Western blot)检测, 如图 6 所示, 发现随着大黄素处理浓度的升高, AKT-Ser473 位点的磷酸化水平有所下调, 而 AKT 的活性受到 PI3K 的调控, 其能够磷酸化 AKT 的 Ser473、Ser308 位点, 从而激活 AKT. 因此大黄素能够在一定程度上抑制 AKT 的活性, 而 AKT 的总蛋白质水平没有显著变

化. 进而我们检测了 FOXO1-Ser319 这个位点的磷酸化水平, AKT 严格地调控着这个位点的磷酸化, 结果发现 FOXO1-Ser319 的磷酸化水平也明显受到抑制. 然而, 在检测 FOXO1 的总蛋白质水平时, 发现 FOXO1 的蛋白改变最为显著. 综上所述, 我们发现尽管大黄素能够在一定程度上下调 AKT 的活性进而调节 FOXO1, 但是其最为主要的影响是显著地降低 FOXO1 的蛋白表达, 从而抑制 FOXO1 的转录活性(图 6).

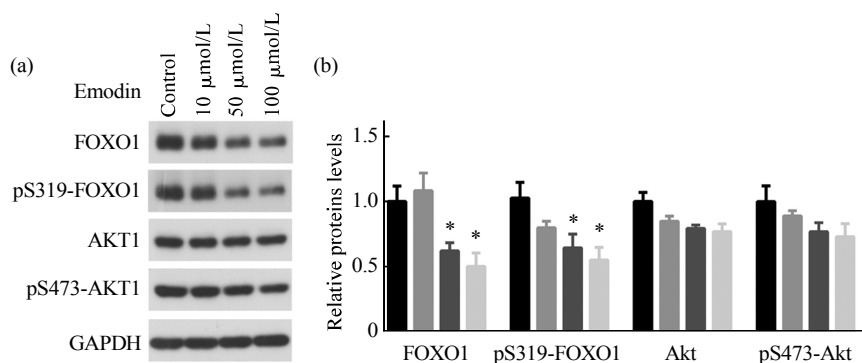


Fig. 6 Emodin downregulate FOXO1 protein levels

(a) HT22 cells were treated with Emodin for 24 h for the indicated concentration. Western blot analysis was performed for the indicated antibody. (b) Quantifications of the relative FOXO1, pS319-FOXO1, Akt, pS473-Akt1 intensities. Data are mean $\pm$ SEM, $n=3$; $P < 0.05$. ■: Control; ▨: 10 μ mol/L; ▩: 50 μ mol/L; □: 100 μ mol/L.

2.4 大黄素能够缓解 L-Arg 对 FOXO1 的过度激活

由于大黄素能够显著抑制 FOXO1 的转录活性以及促凋亡基因 Bim 的表达, 我们继续探究在 L-Arg 的处理条件下, 大黄素能否缓解其所造成的氧化损伤. 从图 7 的实验结果可以看出, L-Arg 能

够显著提高 FOXO1 的转录水平, 大黄素能够显著抑制 FOXO1 的转录水平, 而使用大黄素和 L-Arg 同时处理神经元时发现, 大黄素能够明显缓解 L-Arg 所诱导的 FOXO1 的转录活性.

3 讨 论

神经退行性疾病是一类严重影响人类健康的疾病, 伴随人口老龄化的加剧, 神经退行性疾病对社会和家庭造成了巨大的压力和负担.

研究发现, 自由基是引起老年退行性疾病的一个重要因素. 氧化应激产生的活性氧和一氧化氮(NO)自由基在诱导细胞凋亡和导致神经退行性疾病阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)和中风等疾病中发挥了重要作用. 近期研究表明, 天然抗氧化剂在预防和治疗神经退行性疾病中可发挥一定作用. 在中枢神经系统中, NO 是一种扩散快、寿命短的生物信使分子, 不仅参与神经系统的多种生理过程, 如学习、记忆形成以及脑血流量调节等, 而且还参与氧化应激调控, 对神经系统具有一定的毒性作用, 可能引起神经损伤^[39-40]. 在我们的研究中, 发现 NO 的供体 GSNO、L-Arg 能够在很大程度上

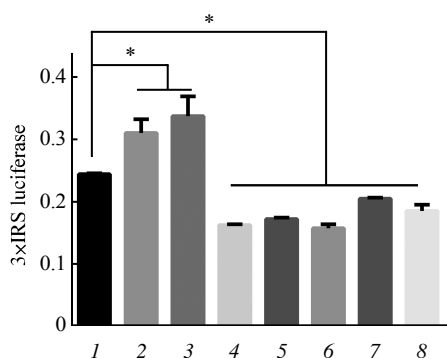


Fig. 7 L-Arg increased FOXO1 transcriptional activity was restored by Emodin

HT22 cells were transfected with the 3xIRS luciferase reporter system and then treated with Emodin or L-Arg at different concentration and then subjected to luciferase assay. Data are mean $\pm$ SEM, $n=3$; $P < 0.05$. 1: Control; 2: L-Arg 5 mmol/L; 3: L-Arg 10 mmol/L; 4: Emodin 50 μ mol/L; 5: Emodin 100 μ mol/L; 6: Emodin 100 μ mol/L + L-Arg 5 mmol/L; 7: Emodin 100 μ mol/L + L-Arg 10 mmol/L; 8: Emodin 50 μ mol/L + L-Arg 5 mmol/L.

改变神经细胞的形态, 使其发生和凋亡相类似的形态变化(图 2), 而且 L-Arg 的处理还能够在很大程度上影响神经细胞的活力(图 3)。

以 FOXO1 蛋白为作用靶点, 我们进一步探讨了 NO 供体对神经细胞的毒性作用。FOXO1 转录因子是 Forkhead 转录因子家族的一个重要成员, 参与多种生命过程, FOXO1 对于胰岛素信号通路、DNA 修复、清除活性氧损伤、细胞周期和凋亡的调控非常重要。研究发现, GSNO、L-Arg 作为 NO 的供体能够显著提高 FOXO1 的转录活性, 促进其下游促凋亡基因 FasL、Bim 的转录表达(图 3), 进而诱导神经元死亡(图 2, 图 3)。因此, 过量的 NO 可以导致自由基损伤, 并诱导神经元凋亡。

NO 的上述作用提示抗氧化剂在缓解 NO 的神经毒性作用中可能发挥一定作用。近年研究表明, 中药成分中含有的多种天然抗氧化剂如茶多酚、大豆异黄酮、尼古丁和大黄素等, 能够抑制 6-羟多巴胺诱导的细胞凋亡^[41-43]。我们以 FOXO1 为靶点通过大量筛选不同种类的复方药物和中药的有效成分发现, 大黄素作为一种能够显著抑制 FOXO1 转录活性的药物, 在抗氧化方面可能发挥着重要的作用。进一步试验发现, 大黄素能够显著抑制 FOXO1 的转录水平和其下游促凋亡基因 Bim 的转录水平。试验还发现大黄素能够显著下调 FOXO1 的蛋白水平, 从而抑制其转录活性, 发挥保护神经元的功能。

大量文献研究表明, 大黄素的多种药理作用并非依赖单一作用途径, 而是有多种途径如对氧化还原剂的调节作用, 对激酶类的抑制作用, 抑制癌基因表达, 诱导肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤血管生成以及在不同细胞系统内对微粒体酶类和修复酶的活化作用等等。目前总的来说, 大黄素的药理作用分子机制研究仍不十分明确, 有必要对此进一步开展深入研究, 为临床用药提供理论参考。同时, 随着分子机制研究的深入, 有望发现大黄素更多新的药理功能, 为大黄素的开发应用提供更广阔的空间。

在中枢神经系统中, NO 具有“双刃剑”的性质。它作为一种重要的信使分子, 参与神经系统中许多生理调节过程如调节血压、参与学习和记忆等; 而过量的 NO 具有细胞毒性, 参与脑缺血损伤、老年性痴呆等多种神经系统疾病的发生发展过程。NO 对细胞的不同作用是复杂的, 不仅与其浓度有关, 而且与不同细胞、不同环境也有密切关系, 特别是与 ROS 的存在与否及浓度关系极为密

切。因为, NO 可以与 ROS 反应生成活性极强的过氧亚硝基, 对细胞造成很大损伤。抗氧化剂可以有效清除 ROS, 减少过氧亚硝基的产生, 这也是为什么抗氧化剂大黄素可以缓解 NO 损伤的一个重要原因。随着分子神经生物学技术的不断发展, NO 在神经退行性疾病中的作用机制将得到更深入的研究, 并为预防和治疗神经退行性疾病提供新的契机。中药有效成分含有多种天然抗氧化剂, 可缓解和抑制氧化应激所产生的神经退行性疾病模型中神经元的凋亡, 但由于自身的局限性, 其对神经系统的保护作用还需要进一步研究探讨。本研究结果为氧化应激和大黄素在神经系统的作用提供了研究基础, 为临床实验提供了新的思路和实验依据。

参 考 文 献

- [1] Misiak B, Cialkowska-Kuzminska M, Frydecka D, *et al.* European studies on the prevalence of dementia in the elderly: time for a step towards a methodological consensus. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 2013, **28**(12): 1211-1221
- [2] Himmelstein D S, Ward S M, Lancia J K, *et al.* Tau as a therapeutic target in neurodegenerative disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 2012, **136**(1): 8-22
- [3] Manczak M, Mao P, Calkins M J, *et al.* Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease neurons. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 2010, **20**(Suppl 2): S609-631
- [4] Jack C R, Jr., Knopman D S, Jagust W J, *et al.* Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *The Lancet Neurology*, 2013, **12**(2): 207-216
- [5] Yamada J, Jinno S. Spatio-temporal differences in perineuronal net expression in the mouse hippocampus, with reference to parvalbumin. *Neuroscience*, 2013, **253**: 368-379
- [6] Mamelak M. Alzheimer's disease, oxidative stress and gamma-hydroxybutyrate. *Neurobiology of Aging*, 2007, **28** (9): 1340-1360
- [7] Sohal R S, Allen R G. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Experimental Gerontology*, 1990, **25**(6): 499-522
- [8] Sohal R S, Allen R G, Farmer K J, *et al.* Iron induces oxidative stress and may alter the rate of aging in the housefly, *Musca domestica*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1985, **32**(1): 33-38
- [9] 储奔虹, 董文心. 氧化应激在阿尔茨海默病中的作用及相关药物研究进展. *中国新药杂志*, 2010, **19**(11): 940-948
Chu B H, Dong W X. *Chinese Journal of New Drugs*, 2010, **19**(11): 940-948
- [10] 应 侠, 吴 振, 雷 严, 等. 阿尔茨海默病的发病机制及治疗药物研究进展. *中国药房*, 2014, **25**(33): 3152-3155
Ying X, Wu Z, Lei Y, *et al.* *China Pharmacy*, 2014, **25** (33):

- 3152–3155
- [11] Nie G, Jin C, Cao Y, *et al.* Distinct effects of tea catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, **397**(1): 84–90
- [12] Nie G, Cao Y, Zhao B. Protective effects of green tea polyphenols and their major component, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 2002, **7**(3): 171–177
- [13] Liu Q, Zhao B. Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *British Journal of Pharmacology*, 2004, **141**(4): 746–754
- [14] Liu Q, Zhang J, Zhu H, *et al.* Dissecting the signaling pathway of nicotine-mediated neuroprotection in a mouse Alzheimer disease model. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2007, **21**(1): 61–73
- [15] Zhang J, Liu Q, Chen Q, *et al.* Nicotine attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity by regulating metal homeostasis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2006, **20**(8): 1212–1214
- [16] 赵保路. 尼古丁预防帕金森氏综合症和老年痴呆症的分子机理研究. *生物物理学报*, 2007, **23**(2): 81–92
- Zhao B L. *Acta Biophysica Sinica*, 2007, **23**(2): 81–92
- [17] 赵保路. 自由基、天然抗氧化剂与神经退行性疾病. *生物物理学报*, 2010, **26**(4): 263–274
- Zhao B L. *Acta Biophysica Sinica*, 2010, **26**(4): 263–274
- [18] 赵保路. 自由基、营养、天然抗氧化剂与衰老. *生物物理学报*, 2010, **26**(1): 26–36
- Zhao B L. *Acta Biophysica Sinica*, 2010, **26**(1): 26–36
- [19] Murphy S, Gibson C L. Nitric oxide, ischaemia and brain inflammation. *Biochemical Society Transactions*, 2007, **35**(Pt 5): 1133–1137
- [20] Pannu R, Singh I. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. *Neurochemistry International*, 2006, **49**(2): 170–182
- [21] Chen K, Northington F J, Martin L J. Inducible nitric oxide synthase is present in motor neuron mitochondria and Schwann cells and contributes to disease mechanisms in ALS mice. *Brain Structure & Function*, 2010, **214**(2–3): 219–234
- [22] Meini A, Sticozzi C, Massai L, *et al.* A nitric oxide/Ca²⁺/calmodulin/ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the mitogenic effect of IL-1 β in human astrocytoma cells. *British Journal of Pharmacology*, 2008, **153**(8): 1706–1717
- [23] Sato M, Maulik G, Bagchi D, *et al.* Myocardial protection by protykin, a novel extract of trans-resveratrol and emodin. *Free Radical Research*, 2000, **32**(2): 135–144
- [24] Huang Z, Chen G, Shi P. Emodin-induced apoptosis in human breast cancer BCap-37 cells through the mitochondrial signaling pathway. *Archives of Pharmacal Research*, 2008, **31**(6): 742–748
- [25] Ubbink-kok T, Anderson J A, Konings W N. Inhibition of electron transfer and uncoupling effects by emodin and emodinanthrone in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1986, **30**(1): 147–151
- [26] Kuo Y C, Meng H C, Tsai W J. Regulation of cell proliferation, inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from *Polygonum hypoleucum* Ohwi. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society*, 2001, **50**(2): 73–82
- [27] Li Y P, Takamiyagi A, Ramzi S T, *et al.* Inhibitory effect of *Rumex Japonicus* Houtt on the porphyrin photooxidative reaction. *The Journal of Dermatology*, 2000, **27**(12): 761–768
- [28] Calnan D R, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene*, 2008, **27**(16): 2276–2288
- [29] Myatt S S, Lam E W. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nature reviews Cancer*, 2007, **7**(11): 847–859
- [30] Kenyon C, Chang J, Gensch E, *et al.* A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 1993, **366**(6454): 461–464
- [31] Lee S S, Kennedy S, Tolonen A C, *et al.* DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science*, 2003, **300**(5619): 644–647
- [32] Greer E L, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 2005, **24**(50): 7410–7425
- [33] Lin K, Dorman J B, Rodan A, *et al.* daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 1997, **278**(5341): 1319–1322
- [34] Subauste A R, Burant C F. Role of FoxO1 in FFA-induced oxidative stress in adipocytes. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2007, **293**(1): E159–164
- [35] Zhou J, Li H, Li X, *et al.* The roles of Cdk5-mediated subcellular localization of FOXO1 in neuronal death. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2015, **35**(6): 2624–2635
- [36] Garthwaite J, Boulton C L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annual Review of Physiology*, 1995, **57**: 683–706
- [37] Yuan Z, Becker E B, Merlo P, *et al.* Activation of FOXO1 by Cdk1 in cycling cells and postmitotic neurons. *Science*, 2008, **319**(5870): 1665–1668
- [38] Zhao Y, Wang Y, Zhu W G. Applications of post-translational modifications of FoxO family proteins in biological functions. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2011, **3**(5): 276–282
- [39] Grunewald T, Beal M F. NOS knockouts and neuroprotection. *Nature Medicine*, 1999, **5**(12): 1354–1355
- [40] Henshaw R, Jenkins B G, Schulz J B, *et al.* Malonate produces striatal lesions by indirect NMDA receptor activation. *Brain Research*, 1994, **647**(1): 161–166
- [41] S-H Guo, E Bezard, B-L Zhao. Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS-NO pathway. *Free Rad Biol Med*, 2005, **39**: 682–695
- [42] Shuhong Guo, Jingqi Yan, Erwan Bezard, *et al.* Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's

disease through inhibition of ROS-NO pathway. *Biological Psychiatry*, 2007, **62**: 1353–1362

[43] Zeng H Y, Chen Q, Zhao B L. Genistein ameliorated β -amyloid

peptide -induced hippocampal neuronal apoptosis. *Free Rad Biol Med*, 2004, **36**:180–188

Emodin Attenuates The Neurotoxicity Induced by Nitric Oxide Through Inhibiting FOXO1 Transcriptional Activity

CHEN Su-Ling¹⁾, ZHOU Jie-Chao²⁾, ZHANG Jie²⁾, ZHUANG Jiang-Xing²⁾, LIU Ya^{1)*}

(¹⁾ School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China; ²⁾ Institute of Neuroscience, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Reactive oxygen species (ROS) and NO free radicals generated from oxidative stress play an important role in the pathogenesis of neurodegenerative disease and cardiovascular and cerebrovascular diseases. Excessive NO production can cause free radical damage and induce neuron death. As one of the traditional Chinese medicine, Emodin have valuable and widely clinical applications. Recently, Emodin has been reported to have antioxidant, immunomodulatory, antibacterial, anti-inflammatory functions *etc.* FOXO1 is a vital member of the Forkhead family of transcription factors known to regulate the transcription of genes involved in cell cycle arrest, DNA repair in response to oxidative stress or apoptosis. However, it is unclear how the NO effect on FOXO1. In this study, we observed vital role of FOXO1 dependent transcriptional activation on neuronal death in response to Nitric oxide over-production. We found that NO donor GSNO or L-Arginine significantly increased the FOXO1 transcriptional activity, which induce the FOXO1 downstream proapoptotic genes (FasL, Bim) expression and finally induce neuronal death. In addition, we screen natural Chinese herb extracts targets to regulating FOXO1 activity. Emodin shows dramatically effect in suppression of FOXO1 transcription activity and protein levels. What's more, Emodin can attenuate neuronal death induced by L-Arg. The current study first demonstrate that Nitric Oxide could regulate FOXO1 transcriptional activity to damage neuronal cell, which will benefit to deep understanding the neurotoxicity of NO free radical. Secondly, by Chinese herb extracts and antioxidants screen, we identified Emodin as one FOXO1 activity modulator which can attenuate neurotoxicity induced by NO. The current study will also provide a new insight for explaining the mechanisms of pathology of neurodegenerative disease and neuroprotective effects of Emodin.

Key words nitric oxide, natural antioxidant, emodin, FOXO1, neuronal death

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0244

*Corresponding author.

Tel: 86-431-85619455, E-mail: liuya@jlu.edu.cn

Received: August 12, 2016 Accepted: October 13, 2016