

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2024.02.019

β -细辛醚通过抑制 TRPV4 的表达 缓解谷氨酸诱导的 Ca^{2+} 超载

蒋兰兰¹, 陈向涛¹, 储涛¹, 蔡静雯^{1,2}, 刘浩宇¹, 尹兰香¹

(1. 安徽医科大学药学院, 安徽合肥 230022; 2. 中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)药剂科, 安徽合肥 230001)

摘要:谷氨酸处理会导致 Ca^{2+} 超载, 瞬时受体电位香草素受体 4 (transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4) 在其中的作用及可能机制尚不清楚。 β -细辛醚能快速透过血脑屏障, 对兴奋性毒性具有较强的神经保护作用。文章以高分化的 PC12 细胞为研究对象, 探究 β -细辛醚 (15, 30, 60 μ mol/L) 预处理 4 h, 40 mmol/L 谷氨酸处理实时记录对 PC12 细胞 Ca^{2+} 浓度的影响, 采用钙成像技术检测 Ca^{2+} 浓度的变化; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)、Western Blot 及免疫荧光技术检测 TRPV4 的 mRNA 和蛋白的表达; 采用 Lipofectamine 2000 脂质体实验转染 TRPV4-siRNA 和 pEX-3-TRPV4, 观察沉默和过表达 TRPV4 对谷氨酸引起 Ca^{2+} 超载的影响。结果表明: 与正常对照组相比, 谷氨酸处理 5 min 可诱导 Ca^{2+} 超载, 显著提高 TRPV4 的 mRNA 和蛋白的表达; 与模型组相比, β -细辛醚能够剂量依赖性地降低谷氨酸诱导的 Ca^{2+} 超载和 TRPV4 的表达; 沉默 TRPV4 抑制细胞 Ca^{2+} 超载; 过表达 TRPV4 则部分逆转 β -细辛醚抑制谷氨酸诱导的 Ca^{2+} 超载。该研究证明, 谷氨酸处理 PC12 细胞 5 min 通过上调 TRPV4 的表达诱导 Ca^{2+} 超载, β -细辛醚作为 TRPV4 的拮抗剂, 是一种潜在的抑制兴奋性毒性的药物。

关键词:谷氨酸; 兴奋性毒性; β -细辛醚; 瞬时受体电位香草素受体 4 (TRPV4); Ca^{2+} 超载

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2024)02-0263-07

β -Asarone alleviates glutamate-induced Ca^{2+} overload by inhibiting TRPV4 expression

JIANG Lanlan¹, CHEN Xiangtao¹, CHU Tao¹, CAI Jingwen^{1,2}, LIU Haoyu¹, YIN Lanxiang¹

(1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230022, China; 2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China (Anhui Provincial Hospital), Hefei 230001, China)

Abstract: Glutamate treatment can lead to Ca^{2+} overload, and the role and possible mechanism of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in Ca^{2+} overload are still unclear. β -Asarone can quickly penetrate the blood-brain barrier and has a strong neuroprotective effect on excitotoxicity. In this study, taking highly differentiated PC12 cells as the research object, the effect of β -asarone (15, 30, 60 μ mol/L) pretreatment for 4 h, 40 mmol/L glutamate treatment on the Ca^{2+} concentration of PC12 cells was recorded in real time, and the change of Ca^{2+} concentration was detected by calcium imaging technology; TRPV4 mRNA and protein expression was detected by fluorescent quantitative polymerase chain reaction, Western Blot, and immunofluorescence techniques; Lipofectamine 2000 liposome experiment was used to transfect TRPV4-siRNA and pEX-3-TRPV4 to observe the effect of silencing and overexpression of TRPV4 on glutamate-induced Ca^{2+} overload. The results showed that compared with the control group, glutamate treatment for 5 min could induce Ca^{2+} overload, and the mRNA and

收稿日期: 2022-11-28; 修回日期: 2023-02-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274124); 安徽省高校自然科学研究重点资助项目 (KJ2021A0234)

作者简介: 蒋兰兰 (1995—), 女, 安徽六安人, 安徽医科大学硕士生;

陈向涛 (1969—), 男, 安徽宿州人, 博士, 安徽医科大学副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: chenxt@ustc.edu.cn.

protein expression of TRPV4 was significantly increased; compared with the model group, β -asarone could reduce glutamate-induced Ca^{2+} overload and TRPV4 expression in a dose-dependent manner; silencing of TRPV4 inhibited Ca^{2+} overload in cells; overexpression of TRPV4 partially reversed the inhibition of glutamate-induced Ca^{2+} overload by β -asarone. This study demonstrated that glutamate treatment of PC12 cells for 5 min induced Ca^{2+} overload by up-regulating the expression of TRPV4, and β -asarone, as an antagonist of TRPV4, is a potential drug to inhibit excitotoxicity.

Key words: glutamate; excitotoxicity; β -asarone; transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4); Ca^{2+} overload

随着人口老龄化的加剧,全球神经退行性疾病的负担正在以惊人的速度增加。虽然导致神经退行性疾病的分子机制还不完全清楚,但兴奋性毒性已被证明在其中起着关键的作用^[1]。

谷氨酸是中枢神经系统中最重要的兴奋性神经递质,在记忆、突触可塑性和神经元发育中发挥着重要的作用^[2],但是谷氨酸被认为是“双刃剑”,既是神经递质又可以作为神经毒素。谷氨酸过度释放会导致 Ca^{2+} 稳态失调,触发 Ca^{2+} 下游信号通路的改变,最终导致神经元死亡的过程称为兴奋性毒性,其中 Ca^{2+} 超载是兴奋性毒性的主要发病机制^[3]。由于谷氨酸损伤神经系统具有多靶点效应,谷氨酸导致的神经毒性机制是一个重要的研究课题。

瞬时受体电位香草素受体 4 (transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4) 是一种广泛表达、多模态门控^[4]、非选择性 Ca^{2+} 通道参与多种病理和生理反应^[5]。当它被内源性和外源性刺激激活时, Ca^{2+} 内流增加,导致细胞内游离 Ca^{2+} 超载^[6]。在许多类型的细胞中, TRPV4 的活性增加会导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和 NO 的产生^[7],在许多病理过程中会导致细胞凋亡^[8],是脑疾病^[9]发生的危险因素,包括脑出血^[10]、脑水肿^[11]、癫痫^[12] 和阿尔茨海默病^[13]。TRPV4 的激活上调参与脑缺血时的神经元损伤^[14],导致神经元 Ca^{2+} 超载^[15]。TRPV4 在细胞毒性方面的作用越来越受到研究者的关注,然而有关 TRPV4 是否参与谷氨酸诱导的 Ca^{2+} 超载报道并不多。

高分化的 PC12 细胞为小鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤克隆化的细胞株,具有丰富的神经元性质和特征,近年来,广泛用于细胞神经毒性和神经保护机制的研究。 β -细辛醚是石菖蒲的主要挥发油成分,具有抗炎、抗肿瘤等作用,对谷氨酸所致 PC12 细胞损伤具有神经保护作用^[16]。本实验深入探究 β -细辛醚对 40 mmol/L 谷氨酸诱导的神

经毒性的抑制作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

谷氨酸 (Sigma-Aldrich); β -细辛醚 (成都曼思特生物科技有限公司); 胎牛血清 (四季青), DMEM 不完全高糖培养基、EDTA 细胞消化液 (江苏凯基生物公司); Fluo-4 AM (上海同仁化学研究所); Cell Counting Kit-8 (碧云天); Axygen 小量制备总 RNA 试剂盒 (Axygen Silicon Valley); SYBR[®] Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (AG); 反转录试剂盒、化学发光显影液 (北京全式金生物技术有限公司); 脱脂牛奶 (伊利); PVDF 膜 (Millipore); Triton X-100、抗荧光猝灭剂 (索莱宝); DAPI (Invitrogen); Anti-TRPV4 (Alomone 公司); GAPDH、HRP-羊抗兔 IgG、羊抗兔 FITC (博士德); NC-siRNA、TRPV4-siRNA、pEX-3-Ctrl、pEX-3-TRPV4 试剂 (GenePharma); Lipofectamine 2000 (Invitrogen); 其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 仪器与设备

化学发光显影仪、CFX96 实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (Bio-Rad Company, USA); 恒温 CO_2 培养箱 (The Thermo Company); 倒置荧光显微镜 (奥林巴斯); 恒温摇床 (上海天能科技有限公司); 离心机 (Bio-Rad Company)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

PC12 细胞在 37 °C、5% CO_2 的湿度环境中培养,添加不完全高糖 DMEM 培养基 (10% 胎牛血清、1% 青霉素、1% 链霉素)。细胞培养 48 h 后, PC12 细胞分别用不同浓度的 β -细辛醚 (终浓度为 15、30、60 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 4 h 后去除溶液, 40 mmol/L 谷氨酸处理 PC12 细胞, 实时记录 Ca^{2+} 浓度的变化。在实验中, 谷氨酸溶解于 HB-

SS 溶液中 (136.9 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 1.3 mmol/L CaCl_2 , 0.4 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.4 mmol/L KH_2PO_4 , 5.6 mmol/L 葡萄糖, 4.2 mmol/L NaHCO_3 , 调节 pH 值为 7.2 ~ 7.4), 对照组给予等量的 HBSS 溶液。 β -细辛醚溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 形成 100 mmol/L 储备液, 保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 。DMSO 的最终体积分数小于 0.1%。实验分为对照组 (A 组)、谷氨酸模型组 (B 组)、谷氨酸 + 15 $\mu\text{mol/L}$ β -细辛醚组 (C 组)、谷氨酸 + 30 $\mu\text{mol/L}$ β -细辛醚组 (D 组) 和谷氨酸 + 60 $\mu\text{mol/L}$ β -细辛醚组 (E 组)。

1.3.2 CCK-8 实验检测细胞活力

PC12 细胞置于 DMEM 高糖培养基中, 细胞以 10^4 个/孔的密度接种在 96 孔板, 培养 12 h 后, 用 β -细辛醚 (15、30、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂和 90 μL 无血清培养基, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 90 min, 用酶标仪在 450 nm 处测定 A 值。

1.3.3 钙成像技术检测胞内 Ca^{2+} 浓度

细胞培养 48 h, β -细辛醚孵育 4 h, 用 Ca^{2+} 荧光探针 Fluo-4 AM 测定细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。加入 HBSS 溶液稀释的 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-4 AM 在培养箱中孵育 40 min, 用 HBSS 溶液洗涤细胞 3 次。加入 HBSS 溶液覆盖细胞, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱孵育 25 min, 弃除 HBSS 溶液。使用倒置荧光显微镜, 在 488 nm 波长下激发 PC12 细胞, 10 倍物镜将激发光聚焦于细胞。每组至少圈出 85 个细胞, 40 mmol/L 谷氨酸处理 PC12 细胞实时记录 Ca^{2+} 浓度的变化。利用 MetaFluor 软件对图像进行采集和分析。计算 Ca^{2+} 浓度时, 每个荧光中减去非特异性 Ca^{2+} 荧光。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 检测 TRPV4 的表达

PC12 细胞培养在 6 孔板 48 h, β -细辛醚孵育 4 h, 谷氨酸处理 5 min; 将培养板置于冰上, 预冷的 $1\times\text{PBS}$ 洗 3 次后弃去; 加入 300 μL Buffer R-1, 反复吹打后转移至 1.5 mL EP 管并加入 150 μL Buffer R-II, 涡旋混匀 30 s, $12\text{ }000\text{g}$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 5 min; 取上清至 2 mL 离心柱中, 加入 200 μL 异丙醇, $6\text{ }000\text{g}$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 1 min; 弃滤液, 加入 500 μL Buffer W1A, $12\text{ }000\text{g}$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 1 min; 弃滤液, 加入 700 μL Buffer W2, $12\text{ }000\text{g}$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 1 min; 弃滤液, 重复上述加入 Buffer W2 步骤 1 次; 弃滤液, $12\text{ }000\text{g}$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心空转 1 min; 将离心柱放入新的 1.5 mL EP 管中并加入 30 μL

TE-Buffer, 室温静置 1 min, $12\text{ }000\text{g}$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心 1 min, 所得滤液为各组细胞 RNA。将制备好的 RNA 用 NanoDrop2000 分光光度计进行定量。使用反转录试剂盒按照说明书加样反转录为 cDNA。以此为模板, 在目标基因的上下游引物作用下, 加入热稳定的 DNA 聚合酶针对目标基因进行扩增。扩增完成后导出实验结果并进行分析。

GAPDH 作为内参基因, 引物上游序列为:

5'-AGCCCTCCCTTCTCTCGAAT-3';

下游序列为:

5'-CCCCACAACACTGCATTTCAC-3'。

TRPV4 作为目的基因, 上游序列为:

5'-GGAACCATCCACAGGGAAGA-3';

下游序列为:

5'-CACTGGGATGGTGTCTGTTTC-3'。

1.3.5 Western Blot 技术检测 TRPV4 的表达

PC12 细胞培养在 6 孔板 48 h, β -细辛醚孵育 4 h, 谷氨酸处理 5 min, 预冷的 $1\times\text{PBS}$ 洗涤 2 次。每组加入 150 μL Laemmli 裂解液, 得到全细胞蛋白提取液, 沸水中变性 10 min 得到蛋白样品。用 BCA 法测蛋白浓度, 蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳压缩并分离目的蛋白。将分离的蛋白质湿转移到 PDVF 膜上进行膜转移。在室温脱脂牛奶中阻断印迹 1 h, 一抗 (1:1 000) 覆盖, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱孵育过夜, PBST 洗涤 3 次后用二抗 (1:1 000) 覆盖, 室温孵育 1 h 广泛洗涤。采用化学发光法显影, 用 Image J 对样品条带进行量化分析。

1.3.6 免疫化学技术检测 TRPV4 的表达

PC12 细胞接种在 24 孔板多聚赖氨酸包被的盖玻片上, 培养 48 h 后, β -细辛醚孵育 4 h, 谷氨酸处理 5 min, 预冷的 $1\times\text{PBS}$ 清洗 2 遍。4% 多聚甲醛固定 15 min, $1\times\text{PBS}$ 慢速清洗 3 次。0.5% Triton X-100 通透 10 min, 清洗 3 次, 5% BSA 封闭 1 h 并清洗, 200 μL anti-TRPV4 (1:100) 覆盖, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱孵育过夜, 次日取出, 室温复温 1 h, 荧光二抗 (1:1 000) 覆盖, 室温孵育 1 h, 加入 300 μL DAPI 原液, 室温避光静置 20 min, 洗涤细胞 2 次。在载玻片上滴一小滴抗荧光猝灭剂, 将盖玻片倒扣在载玻片上。透明指甲油封片, 40 倍物镜进行荧光成像。

1.3.7 Lipofectamine 2000 脂质体转染实验

当细胞密度达 60% 时转染 NC-siRNA、TRPV4-siRNA、pEX-3-Ctrl 和 pEX-3-TRPV4 试剂, 将 Lipofectamine 2000 和 Opti-MEM 混匀配制转

染混合液,将 NC-siRNA、TRPV4-siRNA、pEX-3-Ctrl、pEX-3-TRPV4 和 Opti-MEM 混匀配制稀释液,将转染混合液与稀释液混合静置 20 min,转移至对应组别中继续培养 6 h 后,将培养液更换成高糖 DMEM,过夜培养。当细胞再次进入对数生长期且密度合适时,对细胞加药处理。沉默 TRPV4 实验分为 NC-siRNA 组(A1 组)、Ctrl+TRPV4-siRNA 组(B1 组)、谷氨酸+NC-siRNA 组(C1 组)、谷氨酸+TRPV4-siRNA 组(D1 组)和谷氨酸+NC-siRNA+60 $\mu\text{mol/L}$ β -细辛醚组(E1 组);过表达 TRPV4 实验分为 pEX-3-Ctrl 组(A2 组)、Ctrl+pEX-3-TRPV4 组(B2 组)、谷氨酸+pEX-3-Ctrl 组(C2 组)、谷氨酸+pEX-3-TRPV4+60 $\mu\text{mol/L}$ β -细辛醚组(D2 组)和谷氨酸+pEX-3-Ctrl+60 $\mu\text{mol/L}$ β -细辛醚组(E2 组)。NC-siRNA 上游序列为:

5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3';

下游序列为:

5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。

TRPV4-siRNA 上游序列为:

5'-GGAGUCCUGUUCUUCUUUATT-3';

下游序列为:

5'-UAAAGAAGAACAGGACUCCTT-3'。

1.3.8 数据分析

实验结果运用 GraphPad Prism 6 软件进行处理和分析,实验结果用(平均值 \pm 标准差)表示。以 $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***) , $P < 0.0001$ (****) 作为显著性水平进行分析。

2 结果与分析

2.1 β -细辛醚对 Ca^{2+} 浓度的影响

本文采用高分化的 PC12 细胞培养 48 h,用 β -细辛醚预先培养 PC12 细胞 4 h,再用谷氨酸实时处理 PC12 细胞,测定 Ca^{2+} 浓度和 TRPV4 的表达;沉默和过表达 TRPV4 检测 PC12 细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。

β -细辛醚对谷氨酸处理 PC12 细胞 Ca^{2+} 浓度的影响如图 1 所示。

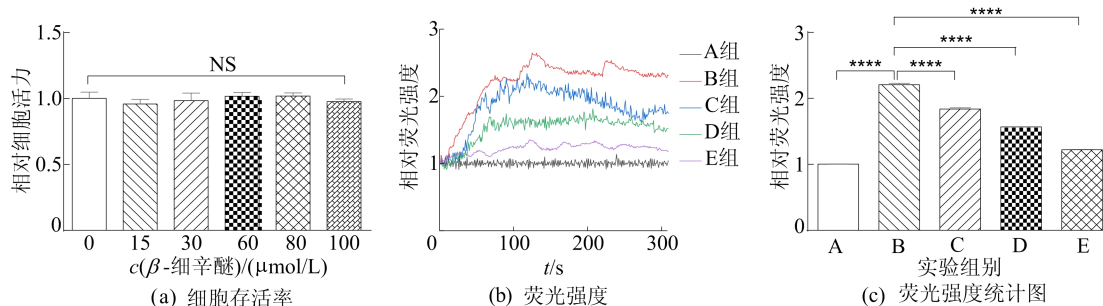


图 1 β -细辛醚对谷氨酸处理 PC12 细胞 Ca^{2+} 浓度的影响

图 1 中,NS 表示无显著差异。从图 1a 可以看出,PC12 细胞用不同浓度 β -细辛醚处理 24 h 后细胞活力没有降低;从图 1b、图 1c 可以看出,与正常对照组(A 组)相比,40 mmol/L 谷氨酸(B 组)处理 PC12 细胞导致 Ca^{2+} 浓度显著增加,说明细胞内钙稳态发生变化;与 B 组相比,谷氨酸+15 $\mu\text{mol/L}$ β -细辛醚组(C 组)、谷氨酸+30 $\mu\text{mol/L}$ β -细辛醚组(D 组)和谷氨酸+60 $\mu\text{mol/L}$ β -细辛醚组(E 组)分

别用不同浓度的 β -细辛醚预先处理 PC12 细胞 4 h 明显抑制 Ca^{2+} 浓度的增加,抑制效果具有剂量依赖性。结果表明, β -细辛醚能够抑制谷氨酸诱导的 PC12 细胞 Ca^{2+} 超载。

2.2 β -细辛醚对 TRPV4 表达的影响

采用实时荧光定量 PCR、Western Blot 和免疫荧光技术评估谷氨酸处理及不同浓度 β -细辛醚对 TRPV4 表达的影响,如图 2、图 3 所示。

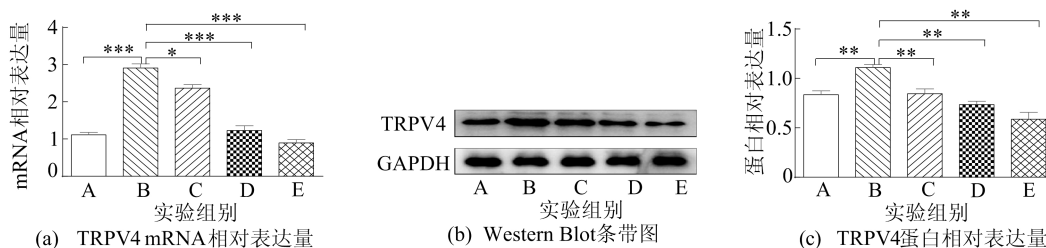


图 2 TRPV4 mRNA 和蛋白的表达

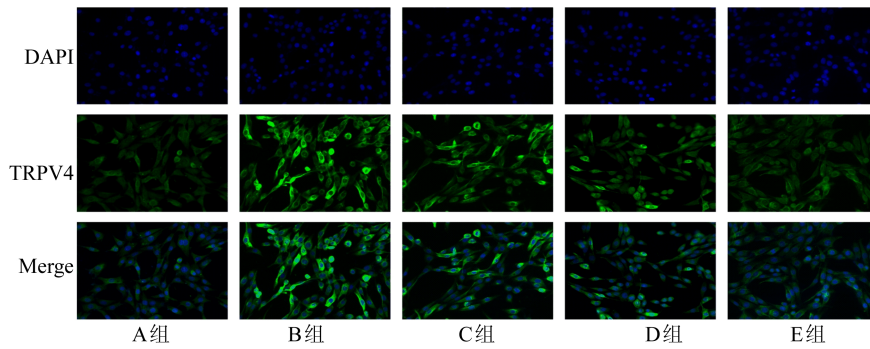


图3 TRPV4 荧光图

由图2、图3可知,与A组相比,B组 TRPV4 在 mRNA 和蛋白水平表达明显升高;与B组相比,C组、D组和E组有效地抑制 TRPV4 mRNA 和蛋白的表达,抑制效果呈剂量依赖性。结果表明,40 mmol/L 谷氨酸处理 PC12 细胞提高了 TRPV4 的表达, β -细辛醚预先处理 PC12 细胞 4 h 剂量依赖性地降低了 TRPV4 的表达。TRPV4 通道是否参与谷氨酸诱导的 Ca^{2+} 超载有待深入研究。

2.3 沉默 TRPV4 对 Ca^{2+} 浓度的影响

为了研究 TRPV4 通道在谷氨酸诱导 PC12 细胞 Ca^{2+} 超载中的作用,实验构建 TRPV4-siRNA 载体来沉默 TRPV4 的表达,采用实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 确定转染效率,结果如图4所示。

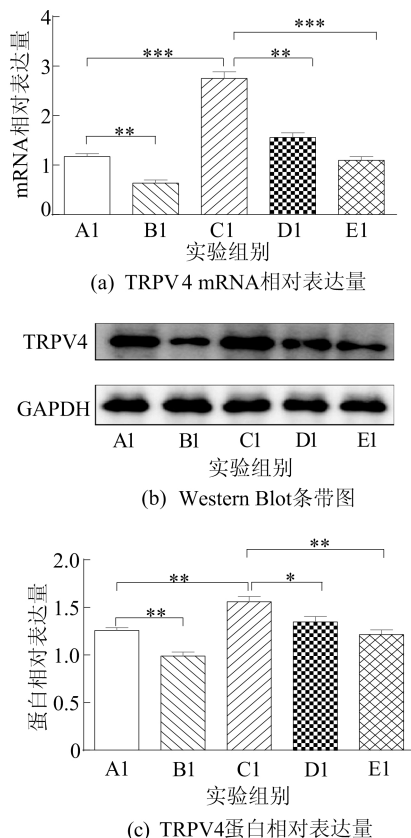


图4 TRPV4-siRNA 载体沉默 TRPV4 的表达

从图4可以看出,与 NC-siRNA 组(A1组)相比,Ctrl+TRPV4-siRNA 组(B1组)中 TRPV4 mRNA 和蛋白表达显著降低;与谷氨酸+NC-siRNA 组(C1组)相比,谷氨酸+TRPV4-siRNA 组(D1组)中 TRPV4 mRNA 和蛋白的表达显著降低。因此,TRPV4-siRNA 载体构建成功。与C1组相比,谷氨酸+NC-siRNA+60 μ mol/L β -细辛醚组(E1组)中 β -细辛醚预先处理 4 h 显著降低 TRPV4 的表达。

随后对转染后的细胞进行钙成像实验,结果如图5所示。从图5可以看出,与A1组相比,C1组 Ca^{2+} 浓度明显上升;与C1组相比,D1组和E1组都显著降低 Ca^{2+} 浓度水平。实验结果表明沉默 TRPV4 和预先给与 60 μ mol/L β -细辛醚处理两者均能明显降低谷氨酸诱导的 Ca^{2+} 超载。

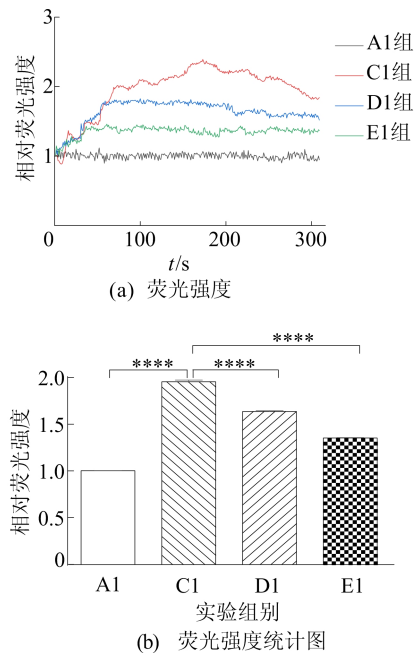


图5 沉默 TRPV4 对 Ca^{2+} 浓度的影响

2.4 过表达 TRPV4 对 Ca^{2+} 浓度的影响

为进一步探究 β -细辛醚降低谷氨酸诱导

Ca²⁺ 超载的靶点, 实验构建 pEX-3-TRPV4 载体过表达 TRPV4, 采用荧光定量 PCR 和 Western Blot 技术确定转染效率, 如图 6 所示。

从图 6 可以看出: 与 pEX-3-Ctrl 组 (A2 组) 相比, Ctrl+pEX-3-TRPV4 组 (B2 组) 的 TRPV4 mRNA 和蛋白表达明显增加; 与 A2 组相比, 谷氨酸+pEX-3-Ctrl 组 (C2 组) 的 TRPV4 表达明显增加; 与谷氨酸+pEX-3-Ctrl+60 μmol/L β-细辛醚组 (E2 组) 相比, 谷氨酸+pEX-3-TRPV4+60 μmol/L β-细辛醚组 (D2 组) 部分逆转了 β-细辛醚抑制 TRPV4 的表达。因此实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 结果表明, pEX-3-TRPV4 载体构建成功。

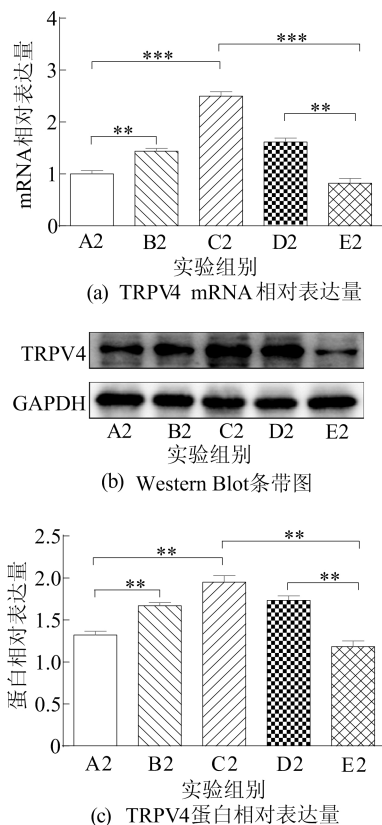


图 6 pEX-3-TRPV4 载体过表达 TRPV4

本文对 Ca²⁺ 浓度进行分析实验, 结果如图 7 所示。

从图 7 可以看出: 与 A2 组相比, C2 组 Ca²⁺ 浓度显著升高; 与 C2 组相比, E2 组 Ca²⁺ 浓度显著减少; 与 E2 组相比, D2 组过表达 TRPV4 部分逆转了 60 μmol/L β-细辛醚抑制谷氨酸诱导的 Ca²⁺ 浓度的增加。钙成像结果表明, 60 μmol/L β-细辛醚能够抑制谷氨酸诱导的 Ca²⁺ 超载; 过表达 TRPV4 能够促进谷氨酸诱导的 Ca²⁺ 超载。

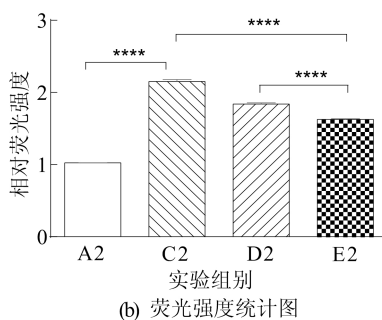
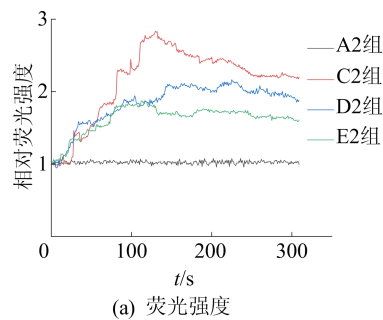


图 7 过表达 TRPV4 对 Ca²⁺ 浓度的影响

3 结 论

鉴于 Ca²⁺ 超载是导致兴奋性毒性细胞死亡的主要途径, 本研究表明谷氨酸可以引起 PC12 细胞 Ca²⁺ 稳态紊乱, β-细辛醚剂量依赖性地抑制谷氨酸诱导的 Ca²⁺ 超载; 谷氨酸促进 TRPV4 的表达, β-细辛醚剂量依赖性地抑制 TRPV4 的表达。为了探究 β-细辛醚降低谷氨酸诱导 Ca²⁺ 超载的作用靶点, 构建 TRPV4-siRNA 和 pEX-3-TRPV4 载体来沉默和过表达 TRPV4。结果表明: 沉默 TRPV4 显著缓解了谷氨酸诱导的 Ca²⁺ 超载; 过表达 TRPV4 促进了谷氨酸诱导的 Ca²⁺ 超载。

上调 TRPV4 的表达可增强 Ca²⁺ 超载, 促进谷氨酸毒性。下调 TRPV4 的表达可能间接作用于谷氨酸受体有效抑制 Ca²⁺ 超载。谷氨酸毒性是一种复杂的损伤, 研究表明, β-细辛醚作为 TRPV4 的拮抗剂, 是抑制兴奋性毒性的潜在药物。实验结果提高了人们对谷氨酸毒性发病机制的认识, 并为谷氨酸毒性的治疗提供了新的靶点。

[参 考 文 献]

- [1] OLLOQUEQUI J, CORNEJO-CRDOVA E, VERDAGUER E, et al. Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders; therapeutic implications[J]. Journal of Psychopharmacology, 2018, 32(3): 265-275.
- [2] KRITIS A A, STAMOULA E G, PANISKAKI K A, et al. Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell

- lines; a comparative/collective analysis/study[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2015(9):91.
- [3] 李春艳,赵洪庆,杨蕙,等. 谷氨酸兴奋毒性及其调节剂的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(5):645-649.
- [4] GRACE M S, BONVINI S J, BELVISI M G, et al. Modulation of the TRPV4 ion channel as a therapeutic target for disease[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2017 (177): 9-22.
- [5] 贾振华,黄渊,唐景峰,等. TRP 通道超家族的基本特征及其与疾病的关系[J]. *生命科学*, 2020, 32(9):903-914.
- [6] VETETO A B, PEANA D, LAMBERT M D, et al. Transient receptor potential vanilloid-4 contributes to stretch-induced hypercontractility and time-dependent dysfunction in the aged heart[J]. *Cardiovascular Research*, 2020, 116(11): 1887-1896.
- [7] HONG Z W, TIAN Y J, YUAN Y B, et al. Enhanced oxidative stress is responsible for TRPV4-induced neurotoxicity [J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2016(10):323.
- [8] LIU M Y, LIU X, WANG L, et al. TRPV4 inhibition improved myelination and reduced glia reactivity and inflammation in a cuprizone-induced mouse model of demyelination [J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2018(12):392.
- [9] LIU N, WU J L, CHEN Y X, et al. Channels that cooperate with TRPV4 in the brain[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2020, 70(11):1812-1820.
- [10] SHEN J J, TU L, CHEN D, et al. TRPV4 channels stimulate Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in mouse neurons and trigger endoplasmic reticulum stress after intracerebral hemorrhage[J]. *Brain Research Bulletin*, 2019(146):143-152.
- [11] JIE P H, TIAN Y J, HONG Z W, et al. Blockage of transient receptor potential vanilloid 4 inhibits brain edema in middle cerebral artery occlusion mice[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2015(9):141.
- [12] WANG Z Q, ZHOU L, AN D, et al. TRPV4-induced inflammatory response is involved in neuronal death in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(6):386.
- [13] BAI J, LIPSKI J. Involvement of TRPV4 channels in $\text{A}\beta_{40}$ -induced hippocampal cell death and astrocytic Ca^{2+} signalling[J]. *Neuro Toxicology*, 2014(41):64-72.
- [14] JIE P H, LU Z H, HONG Z W, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid 4 is involved in neuronal injury in middle cerebral artery occlusion in mice[J]. *Molecular Neurobiology*, 2016, 53(1):8-17.
- [15] RAKERS C, SCHMID M, PETZOLD G C. TRPV4 channels contribute to calcium transients in astrocytes and neurons during peri-infarct depolarizations in a stroke model [J]. *Glia*, 2017, 65(9):1550-1561.
- [16] 陈奕芝,方永奇,梁毅,等. β -细辛醚对谷氨酸所致 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. *中国中医药信息杂志*, 2007(6): 22-23.

(责任编辑 闫杏丽)

(上接第 256 页)

- [8] 袁鹏,陈莹,肖发,等. 姜黄素的生物活性及在食品中的应用 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(14):371-375.
- [9] TIAN M Y, LIU T T, WU X G, et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of the essential oil from the rhizomes of *Zingiber striolatum* Diels[J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(18):2621-2625.
- [10] 侯颖,徐建强,宋宇州,等. 三种杀菌剂对牡丹黑斑病菌菌丝生长及分生孢子萌发的影响[J]. *植物保护学报*, 2014, 41(3):367-372.
- [11] 李倩,赵颖,乔苏瑞,等. 二氢杨梅素抑制黄曲霉菌生长的机制[J]. *食品科学*, 2021, 22(6):1-11.
- [12] 王伟岗,强敏,端礼钦,等. 复合免疫亲和柱净化高效液相色谱同时测定谷物及其制品 9 种真菌毒素[J]. *色谱*, 2018, 36(12):1330-1336.
- [13] BERNDT P, HAHN M. Different signalling pathways involving a G protein, c AMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia [J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 59(3):821-835.
- [14] TANG X, SHAO Y L, TANG Y J, et al. Antifungal activity of essential oil Compounds (geraniol and citral) and inhibitory mechanisms on grain pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*) [J]. *Molecules*, 2018, 23(9):1-18.
- [15] 刘潇潇,张龙飞,甘钰培,等. 油炸花生米生产工艺及挥发性风味成分研究[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(24): 68-73.
- [16] HUA C Y, KAI K, WANG X F, et al. Curcumin inhibits gray mold development in kiwifruit by targeting mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades in *Botrytis cinerea* [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 151: 152-159.

(责任编辑 闫杏丽)