

doi: 10.3969/j.issn.2095-0411.2023.03.011

地西洋保护黑色素细胞氧化损伤的作用及机制

张锡梅, 瞿琳, 孟朵, 邹坤, 吕金鹏

(常州大学药学院, 江苏常州 213164)

摘要: 构建了小鼠黑色素细胞 B16F10 的氧化应激模型, 研究了地西洋对 B16F10 细胞氧化损伤的保护作用及相关机制。选取生长状态良好的 B16F10 细胞, 采用细胞活力实验 (MTT) 确定氧化应激造模的双氧水浓度和地西洋的合适剂量范围, 通过荧光检测验证地西洋对 B16F10 细胞氧化损伤的保护作用, 采用免疫蛋白印迹方法 (Western blot, WB) 进一步探究地西洋产生保护作用的上游通路机制。实验结果发现, 地西洋能够显著逆转细胞的氧化损伤, 恢复细胞活力, 升高应激状态下抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 的表达, 降低促凋亡蛋白 Bax (Bcl2-Associated X) 的水平, 最终保护氧化应激状态下的 B16F10 细胞。

关键词: 氧化应激模型; 地西洋; 抗凋亡; 保护机制; 信号通路

中图分类号: TK 8

文献标志码: A

文章编号: 2095-0411(2023)03-0085-08

Protective effect and mechanism of diazepam on oxidative damage of melanocytes

ZHANG Ximei, QU Lin, MENG Duo, ZOU Kun, LYU Jinpeng

(School of Pharmacy, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: The oxidative stress model of mouse melanocytes B16F10 was established and the protective effect and mechanism of diazepam on oxidative damage of B16F10 cells were studied. B16F10 cells in good growth state were selected to determine the concentration of hydrogen peroxide and the appropriate dose range of diazepam by MTT method. The protective effect of diazepam on oxidative damage of B16F10 cells was observed by fluorescence detection. Western blot was used to further explore the upstream pathway mechanism of diazepam's protective effect. The experimental results showed that diazepam can significantly reverse cellular oxidative damage, restore cell vitality, increase the expression of anti apoptotic protein Bcl-2 under stress, reduce the level of pro apoptotic protein Bax, and ultimately

收稿日期: 2022-07-26。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82103752); 江苏省研究生科研与实践创新计划资助项目(SJCX22_1316)。

作者简介: 张锡梅(1998—), 女, 江苏南通人, 硕士生。通信联系人: 吕金鹏(1988—), E-mail: LvJinpeng1988@126.com

引用本文: 张锡梅, 瞿琳, 孟朵, 等. 地西洋保护黑色素细胞氧化损伤的作用及机制[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2023, 35(3): 85-92.

mately protect B16F10 cells under oxidative stress.

Key words: oxidative stress model; diazepam; anti-apoptosis; protecting mechanism; signal pathway

白癜风是一种病因极其复杂的色素紊乱疾病,通常表现为人体皮肤局部色素或全身性色素丢失^[1-2]。关于白癜风的发病机制已有氧化应激、自身免疫过度等研究报道,而氧化应激通常被认为是白癜风发生发展的始动因素,在应激条件下,黑色素细胞产生和释放损伤相关模式分子(活性氧、炎症因子等),激活自身免疫反应破坏黑色素细胞^[3]。值得关注的是,白癜风患者病变区域的黑色素细胞中积累了以双氧水(H_2O_2)为主的活性氧(ROS)^[4]。

ROS 积累可破坏细胞内稳态,导致细胞凋亡,这被称为细胞死亡的经典方式^[5]。凋亡途径主要由 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 家族的促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白调控,该蛋白调节细胞色素 c (Cytochrome c, cyt c) 从线粒体释放到细胞质,继而激活下游促凋亡信号^[5-6]。凋亡蛋白 Bcl-2 家族以 Bcl-2 和 Bcl2-Associated X 蛋白质 (Bax) 为特征, Bcl-2 和 Bax 在细胞凋亡过程中起相反的作用,前者阻碍 Bax 的寡聚化形成孔道,抑制细胞色素 c 的释放^[5,7]。在含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Cysteiny l aspartate specific proteinase, Caspase) 家族中, Caspase 3 被认为是关键成员,激活后直接促进细胞凋亡^[8]。丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinases, MAPK) 家族的激活和氧化应激与细胞死亡有关^[9-10]。哺乳动物 MAPK 家族由细胞外信号调节激酶 (Extra-cellular regulated protein kinases, ERK)、p38 激酶和氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 组成^[11],相关的信号级联在多种细胞反应中发挥关键作用,如细胞增殖、分化和凋亡^[12]。

地西泮 (Diazepam, DI) 由于具有苯二氮杂卓的结构,主要通过与其中枢苯二氮杂卓受体 (Central benzodiazepine receptor, CBR) 结合,用于临床抗焦虑和催眠^[13]。但研究表明地西泮也作用于外周苯二氮杂卓受体 (Peripheral benzodiazepine receptor, PBR),该受体在炎症组织和内稳态调节的外周组织中大量表达^[14]。值得注意的是,有文献报道地西泮可以通过靶向 PBR 抑制脂多糖诱导的人肺细胞损伤^[15]。而现阶段未见有关地西泮对氧化损伤影响的相关研究。因此实验将建立 B16F10 细胞氧化应激模型,模拟白癜风患者皮肤受损区域,探究地西泮对氧化应激状态下细胞的作用及作用机制,为治疗白癜风提供新的思路。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

DMEM 高糖培养基 (11965092)、胎牛血清 (FBS, 12483020)、2.5% 胰蛋白酶 (15090046) 购自美国 Gibco 公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (P0001)、磷酸缓冲溶液 (PBS, C0221A)、Western 及 IP 细胞裂解液 (P0013)、MTT 试剂盒 (C0009S)、辣根过氧化物标记的山羊抗兔 IgG (A0208) 及山羊抗鼠 IgG (A0216)、Hoechst 33258 细胞核染色试剂 (C0003)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (C1026S) 购自上海碧云天生物技术有限公司; β -actin 抗体、p-ERK 抗体 (sc81492)、ERK 抗体 (sc514302)、p-p38 抗体 (sc166182)、p38 抗体 (sc398546) 购自美国 Santa Cruz 公司。抗体 Bcl-2 (ab32124)、Bax (ab32503) 购自英国 Abcam 公司; 二甲基砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自默克 sigma 公司; 二氧化碳细胞培养箱购自日本 Sanyo 公司; 微孔板分光光度计、多功能酶标仪购自美国 BioTek 公司; 化学发光成像仪购自上海天能科技有限公司。

1.2 细胞培养

B16F10 细胞在含有 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基中生长,置于恒温培养箱中进行培养,当细

胞生长至90%时进行传代,传3代后,细胞生长稳定,可用于进一步细胞造模和给药实验^[16-17]。选取不同浓度的H₂O₂对细胞进行氧化刺激,将细胞分为对照组和给药组,随后加入不同剂量地西洋药物(0, 5, 10, 20 μmol/L),观察对氧化损伤状态下黑色素细胞的作用,并继续进行下一步机制探究。

1.3 细胞活力实验(MTT)

1.3.1 MTT法筛选地西洋的浓度范围

使用MTT法测定B16F10的细胞活力,将细胞接种在96孔板上,密度为每孔 2×10^3 个细胞。用地西洋(0, 5, 10, 20 μmol/L)处理细胞24 h后,分别在地西洋处理后的每个孔中加入MTT溶液(20 μL),反应持续4 h。活性细胞形成的沉淀用DMSO(100 μL)溶解,用微孔板分光光度计在570 nm处测定吸光度^[18]。

1.3.2 MTT法建立B16F10氧化应激模型

将B16F10细胞按每孔 2×10^4 个细胞的密度接种于96孔板24 h后,加入0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol/L H₂O₂孵育24 h,按照上述方法加入MTT溶液,选择诱导黑色素细胞氧化应激模型的最佳剂量^[18]。

1.4 Hoechst 33258核染色法

采用Hoechst 33258染色试剂盒检测细胞中细胞核状态。将B16F10细胞接种于含无菌载玻片的6孔板中,直到每张载玻片细胞生长长约50%,设置对照组和实验组,实验组提前给药地西洋进行处理,随后两组都用1 mmol/L H₂O₂刺激24 h。24 h后,用4%多聚甲醛固定细胞15 min, PBS冲洗3次, Hoechst 33258试剂染色5 min。在3次PBS清洗完成后,选用抗荧光淬灭剂封片,在荧光显微镜下观察(激发波长350 nm,发射波长460 nm)。发生凋亡的细胞因核固缩和碎裂而呈现明显的亮斑,而存活细胞的细胞核形态正常^[19]。

1.5 Annexin V-FITC/PI原位荧光检测

用地西洋预处理2 h,再加入1 mmol/L H₂O₂处理24 h,建立氧化应激细胞模型^[17]。为评估地西洋对B16F10细胞的影响,按照说明书使用Annexin V-FITC凋亡试剂盒。依次加入染色缓冲液, Annexin V-FITC染色液和碘化丙啶(PI)染色液,在室温避光条件下染色B16F10细胞20 min。染色后立即在荧光显微镜下观察^[20]。

1.6 免疫蛋白印迹法(Western blot, WB)检测相关凋亡蛋白的表达

对造模和给药处理后的细胞,使用细胞裂解液进行裂解,全程保持低温提取细胞中的蛋白。离心后获取蛋白上清,测定蛋白浓度,绘制浓度-吸光度标准曲线准确计算样品蛋白浓度。每组样品取40 μg来进行SDS-PAGE凝胶电泳,电泳结束后,将蛋白转移至硝酸纤维素纸膜进行湿转。随后用封闭液进行封闭,加入稀释的一抗在低温下进行过夜孵育,第2 d回收一抗,清洗后加入对应二抗,进行发光成像。发光成像的条带数据用ImageJ软件进行灰度值分析,计算目的蛋白相对表达量^[21]。

1.7 统计学分析

采用GraphPad Prism统计软件处理所有实验数据。研究数据采用SPSS软件进行检验, $P < 0.05$ 表明数据间的差异具有统计学意义,数据结果来自3组重复实验。

2 结果与讨论

2.1 氧化应激模型的建立

为了选择 H_2O_2 刺激的适宜范围, 用 MTT 法评估不同浓度的 H_2O_2 对 B16F10 细胞活力的影响。选取不同浓度的 H_2O_2 (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol/L) 对 B16F10 细胞进行氧化损伤, 建立氧化应激模型如图 1 所示。由图 1 可知, 细胞在给药刺激生长 24 h 后, 细胞活力被显著抑制, 且随 H_2O_2 浓度增加活力降低。不同浓度 H_2O_2 刺激对凋亡蛋白的影响如图 2 所示, 由图 2 可知, H_2O_2 (1.0 mmol/L) 显著抑制 B16F10 细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 增加促凋亡蛋白 Bax 的表达, 而 Bcl-2/Bax 的相对表达比的降低表明 H_2O_2 主要是通过激活 B16F10 细胞内凋亡通路蛋白发挥氧化损伤作用。

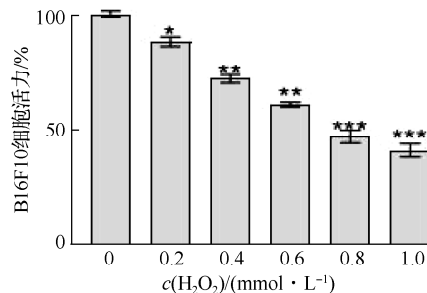
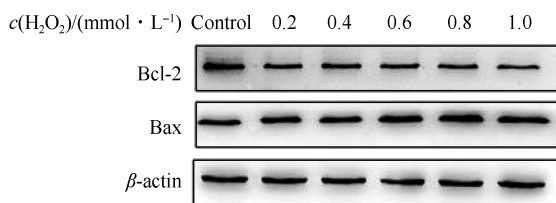
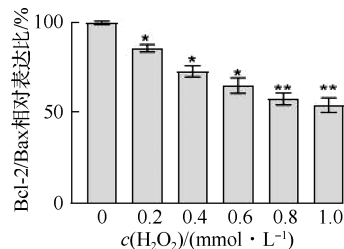


图 1 氧化应激模型的建立

Fig.1 Establishment of oxidative stress model



(a)



(b)

图 2 不同浓度 H_2O_2 刺激对凋亡蛋白的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of H_2O_2 on apoptotic proteins

2.2 地西泮对 B16F10 细胞活力的影响

图 3 探究了不同浓度地西泮 (0, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$) 是否对 B16F10 细胞有细胞毒性。与空白对照组相比, 地西泮浓度低于 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对细胞活力没有影响; 当地西泮浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活力有轻微下降, 细胞生长受到抑制。因此选择 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 作为合适的给药浓度进行下一步实验探究。

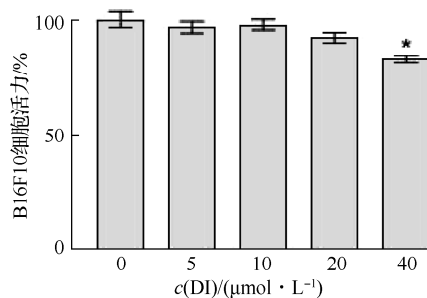


图 3 地西泮浓度对细胞活力的影响

Fig.3 Effect of diazepam concentrations on cellular viability

2.3 地西泮对 B16F10 细胞氧化损伤的保护作用

为了确定地西泮对 B16F10 细胞在氧化应激状态下的作用, 采用了几种经典的方法。首先, 用 Hoechst 33258 核染色法观察地西泮是否通过凋亡途径对 H_2O_2 刺激的细胞产生影响, 如图 4 所示。直接暴露于 1 mmol/L H_2O_2 下, B16F10 的细胞核出现了明亮的荧光, 而地西泮处理后, 明显抑制了 B16F10 细胞核的异常形态变化, 且随浓度增加异常细胞核减少 (图中箭头所示)。值得注意的是, 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 地西泮预处理后, 几乎逆转了核收缩, 细胞恢复正常形态, 细胞数量也恢复正常。接着用

Annexin V-FITC/PI 试剂原位荧光检测技术, 观察地西洋对 B16F10 的保护作用, 如图 5 所示。 H_2O_2 刺激显著增加 B16F10 细胞凋亡率, 而随着地西洋剂量升高, 凋亡和坏死细胞呈现递减趋势。单独使用地西洋对正常 B16F10 细胞似乎没有影响, 但其对细胞预处理后, 显著降低了 H_2O_2 损伤 B16F10 细胞的凋亡率, 两种经典实验现象一致, 再次证实了地西洋对黑色素细胞的保护作用。

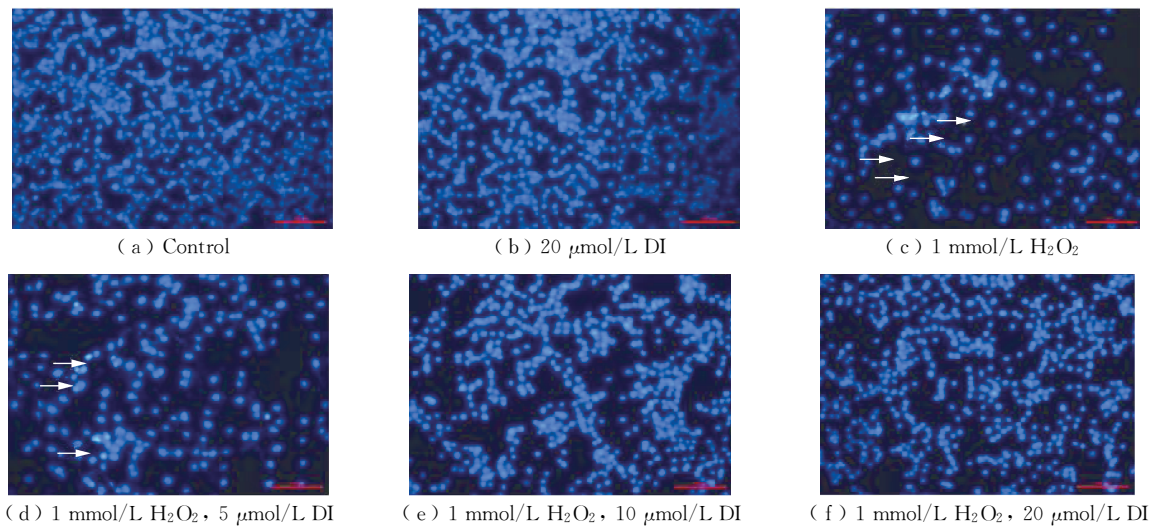


图 4 地西洋对细胞凋亡的影响
Fig.4 Effect of diazepam on apoptosis

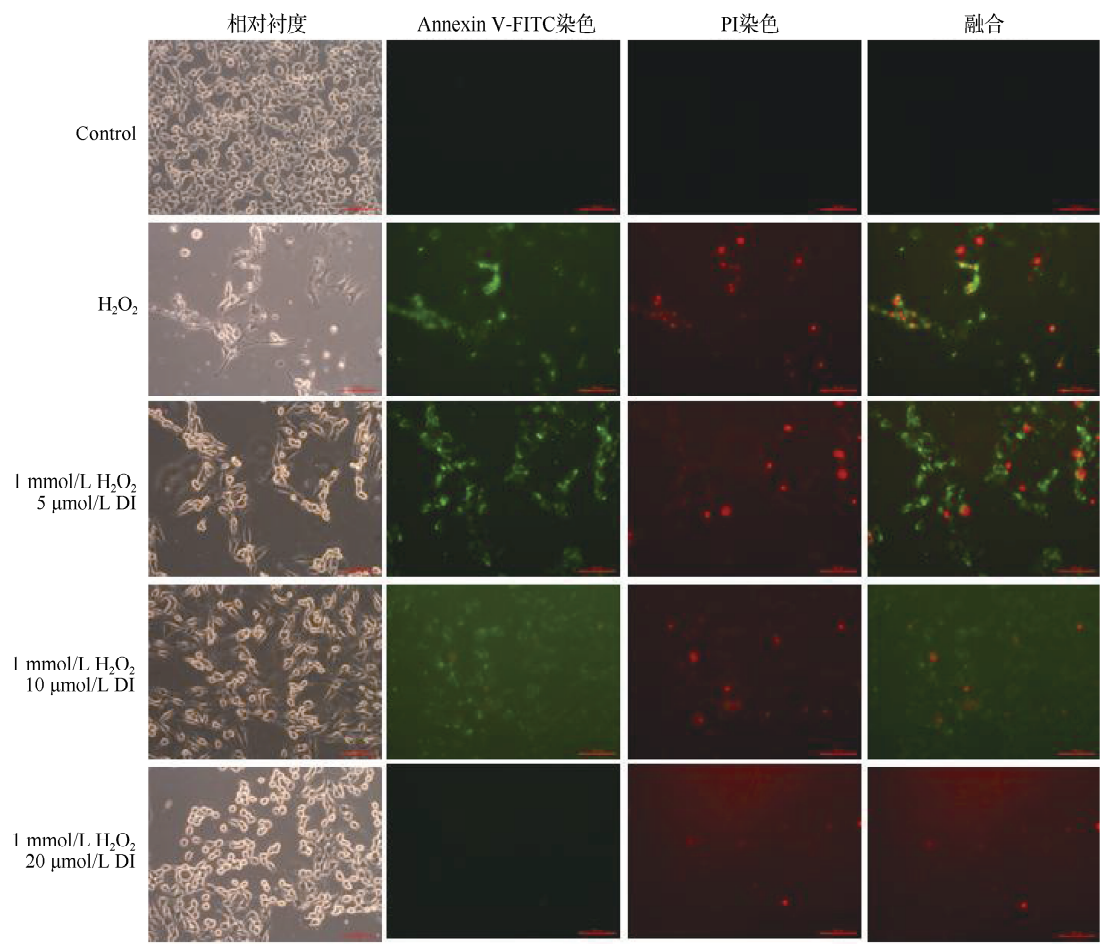


图 5 Annexin V-FITC 荧光双染检测地西洋对细胞凋亡的影响
Fig.5 Annexin V-FITC fluorescence double staining was used to investigate the effect of diazepam on apoptosis

2.4 地西泮保护 B16F10 细胞氧化损伤的机制研究

Bcl-2 家族的促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白在细胞凋亡调控中发挥重要作用。图 2 结果显示, H_2O_2 诱导黑色素细胞促凋亡蛋白 Bax 上升, 抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 呈现出 Bcl-2/Bax 相对表达比降低, 与之前的报道一致^[8]。在地西泮给药后, 继续检测 B16F10 细胞中 Bcl-2 家族关键蛋白的表达, 探讨地西泮是否通过该凋亡通路起作用。如图 6 所示, 提前加入地西泮后, 逆转了 Bcl-2 和 Bax 的相对表达, 促使 Bcl-2/Bax 呈上升趋势, 该结果在上一步验证地西泮保护 B16F10 细胞免受氧化损伤的基础上, 确定了地西泮主要是通过调节凋亡通路相关蛋白发挥保护作用。

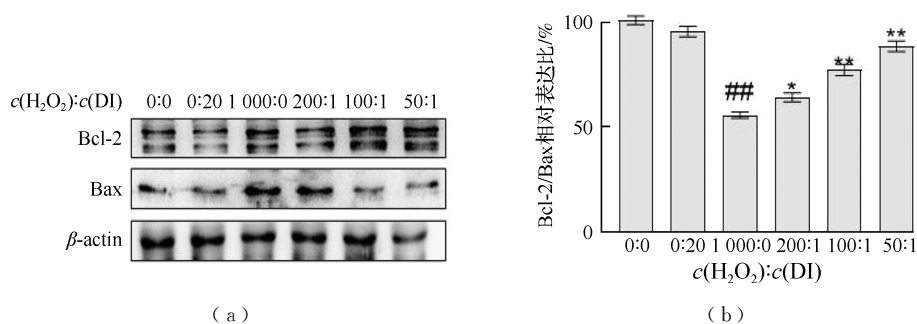


图 6 不同浓度地西泮对凋亡蛋白表达水平的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of diazepam on apoptosis protein expression level

2.5 地西泮对 B16F10 细胞氧化损伤后激活 MAPK 信号通路的影响

MAPK 家族中多种信号蛋白参与细胞氧化损伤的凋亡过程。这里选择关键通路蛋白 p38 和 ERK, 来探究在氧化应激状态下 B16F10 细胞内的激活程度, 如图 7 所示, p38 和 ERK 在氧化作用 30 min 后显著激活。而在地西泮提前给药保护后, 同样的时间, 可以观察到细胞被 H_2O_2 刺激后, p38, ERK 信号通路被明显抑制, 且随着地西泮浓度越大效果越显著 (图 8), 与上述实验结果相一致, 说明地西泮主要通过抑制氧化应激引起的 p38, ERK 信号通路来发挥保护作用, 逆转 B16F10 细胞因氧化损伤引起的凋亡。

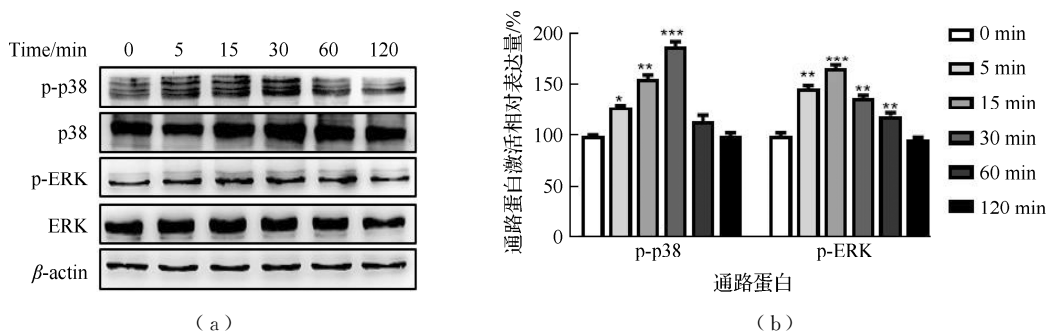


图 7 H_2O_2 激活 p38, ERK 信号通路

Fig.7 H_2O_2 activates p38 and ERK signaling pathways

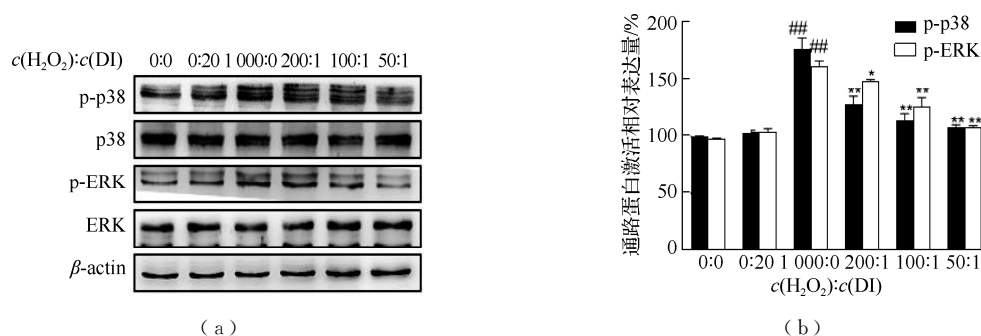


图8 地西洋对于 H_2O_2 激活的 p38 和 ERK 通路的影响

Fig.8 Effects of diazepam on p38 and ERK pathways activated by H_2O_2

3 结 论

研究建立了 B16F10 细胞的氧化应激模型,并确定了地西洋对氧化损伤细胞的保护作用及相关机制。研究表明, H_2O_2 损伤黑色素细胞主要表现在激活 MAPKA 家族的 p38, ERK 信号通路蛋白,从而诱导凋亡家族中关键蛋白 Bcl-2/Bax 相对表达比降低,最终促使细胞发生凋亡。通过 Hoechst 33258 核染色及 Annexin V 凋亡试剂双染荧光观察,确定了药物地西洋对氧化损伤状态下黑色素细胞的保护作用,并在进一步的机制研究中确定地西洋是通过抑制氧化应激状态下激活的 p38, ERK 信号通路,从而抑制 Bcl-2/Bax 相对表达比降低,最终逆转细胞凋亡状态,从而保护 B16F10 细胞免受氧化损伤。

实验成功构建了黑色素细胞氧化应激模型,在一定程度上模拟了白癜风患者受损区细胞的氧化应激状态,同时研究了药物地西洋对于 B16F10 细胞氧化损伤的保护作用及作用机制。地西洋除了经典的镇静催眠作用外,也在文献中报道过能够促进黑色素细胞和皮肤组织中的黑色素合成。因此,在促进黑色素生成能力和增强抗氧化应激方面,地西洋有望成为白癜风治疗的候选药物。

参考文献:

- [1] FRISOLIM L, ESSIEN K, HARRIS J E. Vitiligo: mechanisms of pathogenesis and treatment[J]. Annual Review of Immunology, 2020, 38: 621-648.
- [2] EZZEDINE K, ELEFThERiADOU V, WHITTON M, et al. Vitiligo[J]. The Lancet, 2015, 386(9988): 74-84.
- [3] HARRIS J E. Cellular stress and innate inflammation in organ-specific autoimmunity: lessons learned from vitiligo [J]. Immunological Reviews, 2016, 269(1): 11-25.
- [4] SCHALLREUTER K U, GIBBONS N C, ZOTHNER C, et al. Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress disrupts calcium binding on calmodulin: more evidence for oxidative stress in vitiligo[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 360(1): 70-75.
- [5] BERTHELOOT D, LATZ E, FRANKLIN B S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2021, 18(5): 1106-1121.
- [6] SUN X M, BRATTON S B, BUTTERWORTH M, et al. Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(13): 11345-11351.
- [7] 刘安恒, 曹亚南, 张卫卫, 等. DIDS 对 Bcl-2/Bax 在 staurosporine 诱导心肌细胞凋亡中表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(1): 47-50.

- [8] LIU B M, JIAN Z, LI Q, et al. Baicalein protects human melanocytes from H_2O_2 -induced apoptosis via inhibiting mitochondria-dependent caspase activation and the p38 MAPK pathway[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, 53(2): 183-193.
- [9] RAMAN M, CHEN W, COBB M H. Differential regulation and properties of MAPKs[J]. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3100-3112.
- [10] NAKANO H, NAKAJIMA A, SAKON-KOMAZAWA S, et al. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2006, 13(5): 730-737.
- [11] WANG X B, GAO H Y, HOU B L, et al. Nanoparticle realgar powders induce apoptosis in U937 cells through caspase MAPK and mitochondrial pathways[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2007, 30(5): 653-658.
- [12] LEE JR J, MCCUBREY J. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia[J]. *Leukemia*, 2002, 16(4): 486-507.
- [13] FERNÁNDEZ H N, ZANETTI S R, BÁEZ N S, et al. Diazepam treatment reduces inflammatory cells and mediators in the central nervous system of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2017, 313: 145-151.
- [14] GATLIFF J, EAST D A, SINGH A, et al. A role for TSPO in mitochondrial Ca^{2+} homeostasis and redox stress signaling[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(6): e2896.
- [15] LI Y, SONG D Y, BO F Y, et al. Diazepam inhibited lipopolysaccharide (LPS)-induced pyroptotic cell death and alleviated pulmonary fibrosis in mice by specifically activating GABA(A) receptor alpha 4-subunit[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 118: 109239.
- [16] 吕金鹏, 姜松周, 李思淇, 等. 甘草素对 B16F10 细胞中黑色素合成作用研究[J]. *常州大学学报(自然科学版)*, 2022, 34(4): 68-74.
- [17] YANG Y, JIA B Y, ZHANG X M, et al. Effect and mechanism of LED blue light phototherapy on melanin synthesis of B16F10[J]. *常州大学学报(自然科学版)*, 2022, 34(1): 86-92.
- [18] LYU J P, AN X H, JIANG S Z, et al. Protoporphyrin IX stimulates melanogenesis, melanocyte dendricity, and melanosome transport through the cGMP/PKG pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 569368.
- [19] 汪海涛, 林洁, 杨波, 等. 过氧化氢诱导人巨核细胞系 Dami 氧化应激模型的建立及评价[J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35(4): 349-352, 356.
- [20] WANG P, TIAN X Y, TANG J X, et al. Artemisinin protects endothelial function and vasodilation from oxidative damage via activation of PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. *Experimental Gerontology*, 2021, 147: 111270.
- [21] LYU J P, JIANG S Z, YANG Y, et al. FGIN-1-27 inhibits melanogenesis by regulating protein kinase A/cAMP-responsive element-binding, protein kinase C- β , and mitogen-activated protein kinase pathways[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 602889.

(责任编辑:李艳,周安迪)