

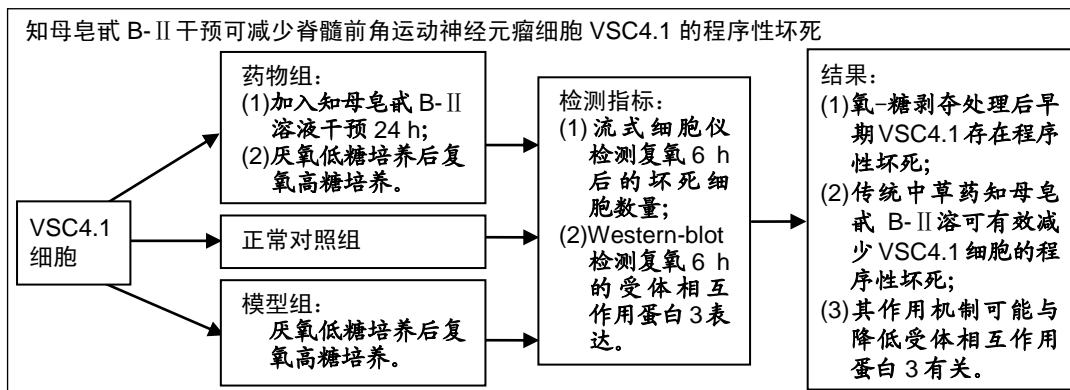
知母皂甙B- II可减少氧-糖剥夺脊髓前角运动神经元瘤细胞的程序性坏死

高俊彦¹, 曹燕飞², 张芸³, 刘学敏¹, 侯燕红¹, 李建斌¹, 王志兵¹ (长治医学院, ¹人体解剖学教研室, ²生物化学教研室, 山西省长治市 046000; ³长治医学院附属和平医院, 山西省长治市 046000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1777

ORCID: 0000-0001-8380-8600(高俊彦)

文章快速阅读:



高俊彦, 男, 1979年生, 山西省阳泉市人, 汉族, 2012年中南大学基础医学院毕业, 硕士, 讲师, 主要从事神经细胞损伤与再生修复方面的研究。

并列第一作者: 曹燕飞, 女, 1975年生, 山西省原平市人, 汉族, 2004年中南大学毕业, 硕士, 副教授, 主要从事肿瘤细胞分子免疫机制方面的研究。

通讯作者: 王志兵, 教授, 长治医学院人体解剖学教研室, 山西省长治市 046000

文献标识码: B

稿件接受: 2019-03-28



Gao Junyan, Master, Lecturer, Department of Anatomy, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi Province, China

Cao Yanfei, Master, Associate professor, Department of Biochemistry, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi Province, China

Gao Junyan and Cao Yanfei contributed equally to this work.

Corresponding author: Wu Zhibing, Professor, Department of Anatomy, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi Province, China

文题释义:

程序性坏死: 神经元死亡是许多神经系统疾病发生发展过程中所不可避免的, 传统认为细胞死亡有凋亡、自噬、坏死 3 种方式, 近年来发现一种可调控的细胞坏死, 被称为程序性坏死, 这种坏死可被特定的小分子抑制剂 Necrostatin-1(Nec-1)所阻断, 且细胞中受体相互作用蛋白 3 含量会发生改变。前期对于程序性坏死的研究主要集中在非神经元中, 近年来陆续发现在大脑皮质神经元、海马神经元等神经元中也发现细胞的程序性坏死, 说明程序性坏死是一种广泛存在于各种细胞内的普遍坏死现象。

知母皂甙: 知母为百合科植物知母的根茎, 其主要活性成分为甙体皂甙, 主要有知母皂甙 A-I、A-II、A-III、A-IV、B-I、B-II、C、D、E 等亚型, 现代研究发现知母皂甙在老年痴呆、改善记忆、清除氧自由基、抗氧化、抗炎、降低血糖等许多方面都有功效。

摘要

背景: 研究发现知母皂甙 B-II 具有神经保护作用, 可减少细胞的程序性坏死, 但其作用机制尚不明了, 有待深入研究。

目的: 分析知母皂甙 B-II 干预可减少氧-糖剥夺脊髓前角运动神经元瘤细胞 VSC4.1 程序性坏死的机制。

方法: ①取生长状态良好的 VSC4.1 细胞, 分 6 组培养: A 组为正常对照; B 组加入过氧化氢溶液干预 24 h; C-F 组分别加入 1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的知母皂甙 B-II 溶液干预 24 h, 之后各组均加入过氧化氢溶液干预 24 h; MTT 法检测细胞存活率, 选择细胞存活率最高组的药物浓度进行以下实验; ②将 VSC4.1 细胞分 3 组培养: 正常对照组常规培养; 模型组厌氧低糖培养 8 h 后复氧高糖培养 6 或 12 h; 抑制剂组加入程序性坏死抑制剂 Necrostatin-1 干预 24 h, 厌氧低糖培养 8 h 后复氧高糖培养 6 或 12 h。流式细胞仪检测复氧 6 h 后的坏死细胞数量; Western-blot 检测复氧高糖培养 6 或 12 h 的受体相互作用蛋白 3 表达; ③将 VSC4.1 细胞分 3 组培养: 正常对照组常规培养; 模型组厌氧低糖培养 8 h 后复氧高糖培养 6 h; 药物组加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 的知母皂甙 B-II 溶液干预 24 h, 厌氧低糖培养 8 h 后复氧高糖培养 6 h。流式细胞仪检测复氧 6 h 后的坏死细胞数量; Western-blot 检测复氧 6 h 的受体相互作用蛋白 3 表达。

结果与结论: ①MTT 检测显示与 B 组比较, E 组细胞存活率最高, 所以后续实验选择 100 $\mu\text{mol/L}$ 的知母皂甙 B-II; ②模型组坏死细胞数多于正常对照组($P < 0.05$), 抑制剂组坏死细胞数少于模型组($P < 0.05$); 抑制剂组复氧高糖培养 6, 12 h 的受体相互作用蛋白 3 表达高于正常对照组($P < 0.05$), 且复氧 6 h 的该蛋白表达最高; ③模型组坏死细胞数与受体相互作用蛋白 3 表达均高于正常对照组($P < 0.05$), 药物组坏死细胞数与受体相互作用蛋白 3 表达均低于模型组($P < 0.05$); ④结果表明, 知母皂甙 B-II 可有效减少氧-糖剥夺脊髓前角运动神经元瘤细胞的程序性坏死, 可能与降低受体相互作用蛋白 3 有关系。

关键词:

VSC4.1 细胞; Necrostatin-1; 程序性坏死; 氧-糖剥夺; 细胞损伤; 受体相互作用蛋白 3; 坏死体; 知母皂甙 B-II

中图分类号: R459.9; R329.2+4

基金资助:

2016 年度山西省高等学校科技创新项目(2016175), 项目负责人: 张芸; 长治医学院校级创新团队支持项目(CX201414), 项目负责人: 曹燕飞

Timosaponin B-II reduces necroptosis of VSC4.1 cells induced by oxygen-glucose deprivation

Gao Junyan¹, Cao Yanfei², Zhang Yun³, Liu Xuemin¹, Hou Yanhong¹, Li Jianbin¹, Wu Zhibing¹ (¹Department of Anatomy, ²Department of Biochemistry, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi Province, China; ³Heping Hospital of Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Timosaponin B-II has neuroprotective effects and reduces necroptosis of cells, but its mechanism is still unknown and needs further study.

OBJECTIVE: To study the mechanism by which the extract of timosaponin B-II of *Anemarrhena asphodeloides* on necroptosis of VSC4.1 cells induced by oxygen-glucose deprivation.

METHODS: Firstly, VSC4.1 cells in good growth condition were cultured in six groups: group A as normal control; group B with hydrogen peroxide solution for 24 hours; groups C-F with 1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ timosaponin B-II solution for 24 hours, respectively, and then each group was cultured with hydrogen peroxide solution for another 24 hours. MTT assay was used to detect the cell survival rate, and the drug concentration of the group with the highest cell survival rate was selected for the following experiments. Secondly, VSC4.1 cells were cultured in three groups: routine culture in normal control group; anaerobic hypoglycemic culture for 8 hours followed by reoxygenation and hyperglycemic culture for 6 or 12 hours in model group; necrostatin-1, a necroptosis inhibitor, was added in inhibitor group for 24 hours, and anaerobic hypoglycemic culture for 8 hours followed by reoxygenation and hyperglycemic culture for 6 or 12 hours. Flow cytometry was used to detect the number of necrotic cells after 6 hours of reoxygenation, and western blot assay was used to detect the expression of receptor-interacting protein 3 after 6 or 12 hours of reoxygenation. Thirdly, VSC4.1 cells were cultured in three groups: routine culture in normal control group; anaerobic hypoglycemic culture for 8 hours followed by reoxygenation and hyperglycemic culture for 6 hours in model group; drug group was treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ timosaponin B-II solution for 24 hours, followed by anaerobic hypoglycemic culture for 8 hours and anaerobic hyperglycemic culture for 6 hours. Flow cytometry was used to detect the number of necrotic cells after 6 hours of reoxygenation and western blot assay was used to detect the expression of receptor-interacting protein 3 after 6 hours of reoxygenation.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The MTT assay showed that compared with group B, group E had the highest cell survival rate. Hence, 100 $\mu\text{mol/L}$ timosaponin B-II was selected for subsequent experiments. (2) The number of necrotic cells in the model group was higher than that in the normal control group ($P < 0.05$), and the number of necrotic cells in the inhibitor group was lower than that in the model group ($P < 0.05$). After 6 and 12 hours of reoxygenation culture the expression of receptor-interacting protein 3 in the inhibitor group was higher than that in the normal control group ($P < 0.05$), and the highest expression was observed at 6 hours after reoxygenation ($P < 0.05$). (3) The number of necrotic cells and the expression of receptor-interacting protein 3 in the model group were higher than those in the normal control group ($P < 0.05$), and the number of necrotic cells and the expression of receptor-interacting protein 3 in the drug group were lower than those in the model group ($P < 0.05$). All these results indicate that timosaponin B-II can effectively reduce the necroptosis of VSC4.1 cells deprived of oxygen-glucose, which may be related to the reduction of receptor-interacting protein 3.

Key words: VSC4.1 cell; necrostatin-1; necroptosis; oxygen-glucose deprivation; cell damage; receptor-interacting protein 3; necrosome; timosaponin B-II

Funding: the Scientific Innovation Project of Shanxi High Education in 2016, No. 2016175 (to ZY); the Innovation Team Supporting Project of Changzhi Medical College, No. CX201414 (to CYF)

0 引言 Introduction

细胞的死亡机制日益被科学研究所重视并不断深入探索,传统的细胞死亡观点日渐被新的观点所替代,程序性坏死(Necroptosis)观点在近年来的科研中产生。程序性坏死这一观点指出:细胞的死亡与传统细胞凋亡不同,其坏死过程中受到特定因子的启动与执行,且可被特定的小分子抑制剂Necrostatin-1(Nec-1)所阻断^[1],这种坏死具有形态学改变且可受调控。因此,科研者期望可通过人为调控来减少细胞的程序性坏死。以往对程序性坏死的研究主要集中于非神经元^[2-4],近年来发现在神经元中也存在程序性坏死现象,如海马神经元损伤^[5]、皮质神经元损伤^[6]、神经胶质细胞损伤中均存在程序性坏死^[7]。因此,程序性坏死不仅参与了非神经元的死亡,也是神经元早期坏死的重要组成部分。

脊髓前角运动细胞是中枢神经系统中具有重要作用的细胞,其功能正常与否直接关系到躯体运动功能,脊髓神经的伤往往会引起四肢躯体的运动功能受限。知母是中国传统的中草药,主要活性成分为甾体皂甙,包括众多亚型^[8],知母皂甙B-II为其中之一,研究发现知母皂甙B-II具有神

经保护作用^[9],且在不同的细胞内能有效减少程序性坏死^[10],其引起的分子机制尚未完全明了。在程序性坏死进程中,受体相互作用蛋白通路是目前研究较多的调控途径,其中受体相互作用蛋白3是关键靶点^[11],在受体相互作用蛋白通路中起着启动细胞程序性坏死的关键作用。此次实验选取脊髓前角运动神经瘤细胞VSC4.1来研究运动神经元-糖剥夺后是否存在程序性坏死,在此基础上研究知母皂甙B-II对VSC4.1细胞程序性坏死的作用,以期进一步深入探索知母皂甙B-II对神经细胞程序性坏死的可能存在机制,为中药治疗神经系统疾病做一些有益的研究。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对比观察细胞实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年2月至2018年8月在长治医学院中心实验室完成。

1.3 材料 知母皂甙B-II(药物纯度>95%,四川大学实验室);脊髓前角运动神经元瘤细胞系VSC4.1(上海弘顺生物科技有限公司);DMEM高糖培养基、DMEM低糖培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国GIBCO公司);Nec-1(美国

Sigma-Aldrich公司); 受体相互作用蛋白3抗体、GAPDH抗体、荧光二抗(武汉三鹰生物技术有限公司); Annexin V/PI双染试剂盒(江苏凯基生物制品股份有限公司); Western-Blot实验仪器(美国BIO-RAD公司); 流式细胞仪(BD公司); 显微镜(ZEISS公司); 500 mL厌氧产气袋(日本株式会社)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 将VSC4.1细胞置于10 cm细胞培养皿中,加入含有体积分数10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,在37 °C、体积分数5%CO₂条件下培养,实验中均选用细胞生长状态良好的细胞。

1.4.2 配置不同浓度的知母皂甙B-II 用生理盐水与1%二甲亚砷配制2 mmol/L的药物浓度,生理盐水与二甲亚砷的体积比为100:1,分装贮存于冰箱,用DMEM高糖培养基稀释为不同的浓度。

1.4.3 MTT检测细胞活力 将培养好的VSC4.1细胞加入96孔板,分6组培养,每组3复孔:A为正常对照组,B组单纯H₂O₂干预,C-F分别经1, 10, 100, 1 000 μmol/L的知母皂甙B-II干预24 h,再加入100 μmol/L H₂O₂继续培养24 h。每孔加入50 μL MTT溶液,培养箱中放置4 h,之后放置在摇床上震动15 min,酶标仪检测吸光度值,波长570 nm,取平均数。该实验是筛选知母皂甙B-II的有效浓度用于以下实验。

1.4.4 实验造模与分组干预 ①将VSC4.1细胞分3组培养:正常对照组常规培养;模型组制备氧-糖剥夺细胞模型,随后取出细胞,PBS清洗后更换为DMEM高糖培养基继续培养6 h或12 h;抑制剂组加入程序性坏死抑制剂Nec-1干预24 h,取出细胞,制备氧-糖剥夺细胞模型,随后取出细胞,PBS清洗后更换为DMEM高糖培养基继续培养6 h或12 h;②将VSC4.1细胞分3组培养:正常对照组常规培养;模型组制备氧-糖剥夺细胞模型,而后随后取出细胞,PBS清洗后更换为DMEM高糖培养基继续培养6 h;药物组加入100 μmol/L的知母皂甙B-II溶液干预24 h,然后制备氧-糖剥夺细胞模型,随后取出细胞,PBS清洗后更换为DMEM高糖培养基继续培养6 h。

氧-糖剥夺细胞模型的制备:从培养箱中取出密度达到70%左右的细胞,PBS清洗后更换为低糖DMEM培养基,放入密闭的乐扣盒子中,放入厌氧带和厌氧指示剂,封闭好后继续放入培养箱中培养8 h,制备氧-糖剥夺细胞模型。

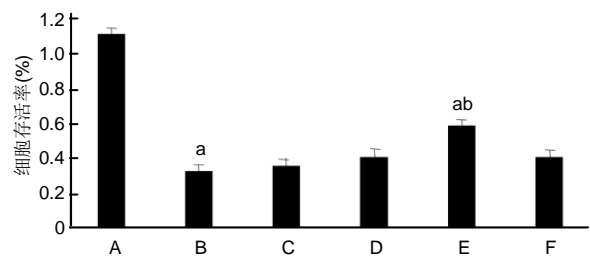
1.5 主要观察指标

流式细胞仪检测细胞程序性坏死:将各组细胞用不含EDTA的胰蛋白酶消化,DMEM高糖培养基终止反应,收集至2 mL离心管中,离心去上清,PBS清洗,离心去上清;每管加入1.5 mL Binding Buffer吹匀,过滤加入上样管中,每上样管加入500 μL Binding Buffer,每组3管,每管加入5 mL Annexin V-FITC和10 μL PI,流式细胞检测仪上样检测。

Western-blot检测受体相互作用蛋白3表达:收集各组细胞,用RIPA细胞裂解液裂解,BCA法测定蛋白浓度,用10%胶上样30 μg,电泳、湿转、封闭后加一抗:兔抗受体相互作用蛋白3(1:1 000),兔抗GAPDH(1:1 000),过夜加二抗荧光显色。采用ImageJ软件扫描和分析蛋白条带。
1.6 统计学分析 实验结果所得数据求得相应比值均采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义;所有实验结果均以均数±标准误表示。统计分析采用SPSS 20.0软件完成。

2 结果 Results

2.1 MTT检测结果 MTT结果显示:与A组相比,其余组VSC4.1细胞增殖活性明显降低,B组活性最低;知母皂甙B-II在一定范围内(小于100 μmol/L)可促进VSC4.1细胞的增殖活性逐渐增高,超过一定浓度其增殖活性降低,见图1。当知母皂甙B-II浓度为100 μmol/L时,VSC4.1细胞活性最高,后续实验选择此浓度。



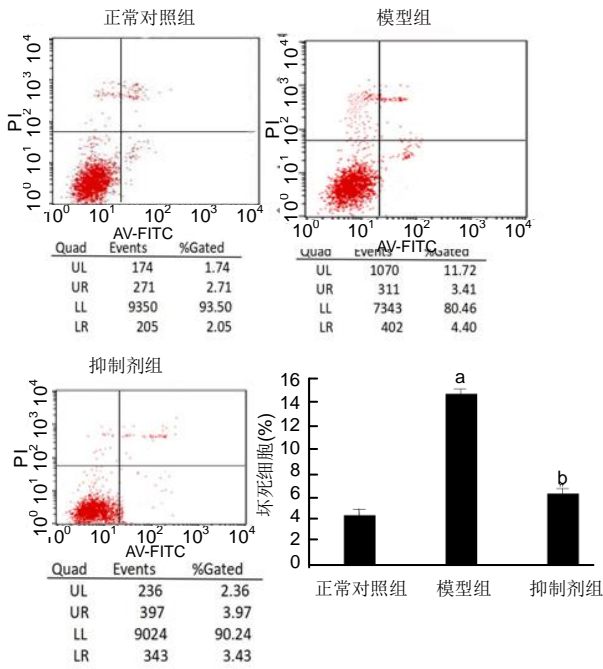
图注:A为正常对照组;B为加入过氧化氢溶液干预24 h;C-F分别加入1, 10, 100, 1 000 μmol/L的知母皂甙B-II溶液干预24 h,之后各组均加入过氧化氢溶液干预24 h。与A组相比,^a $P < 0.01$;与B组相比:^b $P < 0.05$ 。

图1 不同浓度知母皂甙B-II对H₂O₂干预脊髓前角运动神经元瘤细胞VSC4.1增殖活性的影响

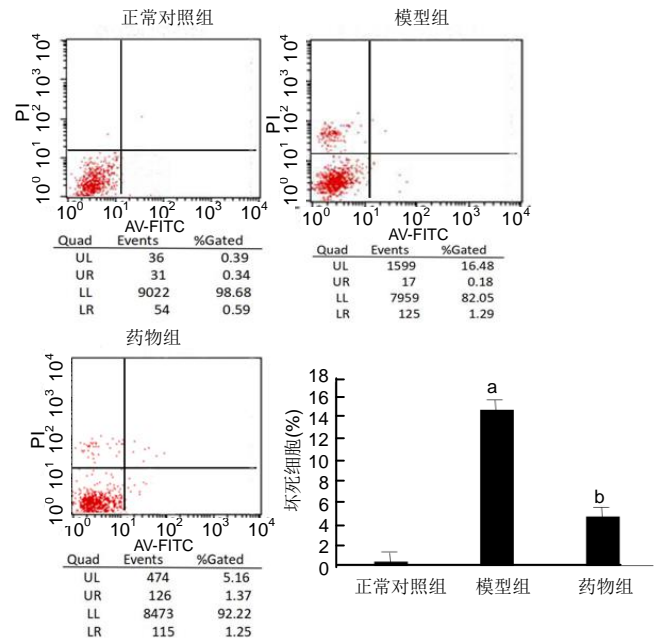
Figure 1 Effects of different concentrations of timosaponin B-II on the proliferation of VSC4.1 cells treated with H₂O₂

2.2 程序性坏死抑制剂干预后的细胞流式检测结果 根据文献报道选取恢复供氧时间为6 h^[12],因此选用此时间点Nec-1预处理条件下进行Annexin V/PI双染的流式细胞检测。结果可见:正常对照组细胞大部分都出现在左下象限(代表活细胞),模型组左上象限的PI染色阳性细胞较多(代表死细胞较多),而加入Nec-1预处理后,左上象限的PI染色阳性细胞数量明显减少;对PI染色阳性计数进行统计学分析显示:与正常对照组相比,模型组坏死细胞较多;抑制剂组坏死细胞明显少于模型组($P < 0.05$),见图2,提示Nec-1预处理可减少氧-糖剥夺诱导的VSC4.1早期细胞程序性坏死。

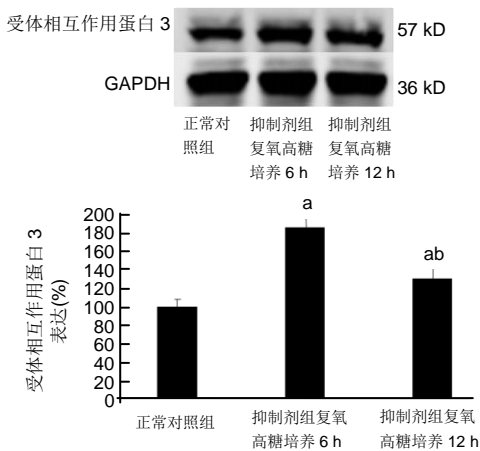
2.3 程序性坏死抑制剂干预后的受体相互作用蛋白3检测结果 与正常对照组相比,抑制剂组复氧高糖培养6, 12 h后的受体相互作用蛋白3阳性条带都明显增粗,且以6 h表现最明显,见图3,提示Nec-1预处理细胞后,VSC4.1细胞在氧-糖剥夺诱导恢复供氧6 h时程序性坏死亡量最多。



图注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。
图 2 流式细胞仪检测程序性坏死抑制剂干预对 VSC4.1 细胞程序性坏死的影响
Figure 2 Effect of programmed necrosis inhibitor intervention on necroptosis of VSC4.1 cells detected by flow cytometry

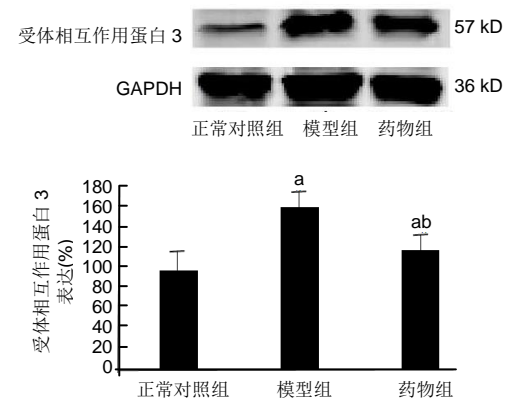


图注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。
图 4 流式细胞仪检测知母皂甙 B-II 预处理对 VSC4.1 细胞程序性坏死的影响
Figure 4 Effect of pretreatment with timosaponin B-II on necroptosis of VSC4.1 cells detected by flow cytometry



图注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与抑制剂组复氧高糖培养 6 h 相比, ^b $P < 0.05$ 。
图 3 程序性坏死抑制剂干预对氧-糖剥夺 VSC4.1 细胞复氧高糖培养不同时间受体相互作用蛋白 3 表达的影响
Figure 3 Effect of programmed necrosis inhibitor on the expression of receptor-interacting protein 3 in VSC4.1 cells under oxygen-glucose deprivation followed by reoxygenation and hyperglycemic culture

2.5 知母皂甙 B-II 预处理后的受体相互作用蛋白 3 检测结果 与正常对照组相比, 模型组、药物组受体相互作用蛋白 3 蛋白条带明显增粗; 与模型组相比, 药物组受体相互作用蛋白 3 蛋白条带变细, 见图 5, 提示知母皂甙 B-II 预处理后, 氧-糖剥夺诱导的 VSC4.1 细胞程序性坏死减少。



图注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$ 。
图 5 知母皂甙 B-II 预处理对氧-糖剥夺 VSC4.1 细胞复氧高糖培养 6 h 受体相互作用蛋白 3 表达的影响
Figure 5 Effect of pretreatment with timosaponin B-II on expression of receptor-interacting protein 3 in VSC4.1 cells under oxygen-glucose deprivation followed by reoxygenation and hyperglycemic culture for 6 hours

2.4 知母皂甙 B-II 预处理后的流式检测结果 正常对照组细胞绝大部分都出现在左下象限(代表活细胞), 模型组左上象限的 PI 染色阳性细胞较多(代表死细胞较多), 药物组左上象限的 PI 染色阳性细胞数量明显减少; 对 PI 染色阳性计数进行统计学分析显示: 与正常对照组相比, 模型组、药物组坏死细胞较多 ($P < 0.05$), 见图 4, 提示知母皂甙 B-II 预处理可有效减少 VSC4.1 细胞的程序性坏死。

3 讨论 Discussion

细胞坏死机制一直是研究的热点。近年有学者发现了一种新的细胞死亡模式, 称为程序性坏死^[13-15], 这种坏死

的典型特征是可被小分子抑制剂Nec-1所阻断^[16-17]。目前尚未发现程序性坏死细胞在形态学改变上的特异性标志物, 研究中多以Nec-1作为检测程序性坏死的重要指标^[18-19]。在多种非神经细胞内发现程序性坏死后, 科研人员也陆续在一些神经细胞内发现程序性坏死^[20]。在人体组织中, 器官的缺血再灌注是常见引起器官组织损伤的原因之一; 而到达细胞水平, 器官组织缺血会引起细胞缺血缺氧, 进而引起细胞坏死^[21]。在此, 作者选择使用Nec-1预处理细胞之后制造氧糖剥夺模型, 模拟外界环境对细胞造成缺血缺氧来研究细胞的坏死情况, 正是基于此种原因。

脊髓前角运动细胞是中枢神经系统中在脊髓前角灰质中起重要作用的一群细胞, 其功能的正常与否直接关系到躯体的运动功能, 脊髓前角的损伤往往会引起其所支配的肢体运动功能障碍, 在此选取脊髓前角运动神经瘤细胞VSC4.1来研究运动神经元氧糖剥夺后是否存在程序性坏死^[22], 在此基础上研究知母皂甙B-II对VSC4.1细胞程序性坏死的作用。

作为中国传统中草药之一的知母在医学界被广泛应用, 其主要活性成分为甾体皂甙, 它的众多亚型A-I、B-I、B-II、C、D、E等已被发现具有抗炎、抗氧化应激、神经保护等作用^[23-25]。有研究表明, 知母皂甙B-II可在一定浓度之内对大鼠神经细胞起到有效抗氧化损伤作用^[26-27]; 大量研究表明, 知母皂甙B-II具有神经保护作用, 可抑制多种炎症因子的生成, 从而发挥抗氧化作用^[28]。近年来的研究发现, 知母皂甙B-II在一定浓度范围之内可抑制神经元的程序性坏死^[29-30]。目前认为在调控细胞程序性坏死中, 有多种分子可能单独或者共同参与其中, 例如线粒体外膜蛋白与铁硫域蛋白的表达上调, 可导致肿瘤坏死因子诱导的L929细胞发生程序性坏死^[31]; 在小鼠胚胎成纤维细胞中发现, 钙蛋白酶上调使凋亡因子表达增加, 导致细胞出现程序性坏死等^[32]。在众多细胞程序性坏死通路的研究中, 受体相互作用蛋白通路是目前研究较多的调控途径^[33-34]。

研究发现, 在细胞程序性坏死中均有受体相互作用蛋白3水平表达上调, 其发生与受体相互作用蛋白3磷酸化密切相关。受体相互作用蛋白3磷酸化可促使受体相互作用蛋白1/受体相互作用蛋白3复合体形成, 这一复合体被称之为“坏死体”, 可促使细胞破裂发生程序性坏死, 在此时使用阻断细胞凋亡的试剂时并不能抑制程序性坏死的发生^[35-37]; 而使用受体相互作用蛋白3抑制剂后, 细胞的程序性坏死明显减少。这一结果说明受体相互作用蛋白3在受体相互作用蛋白通路中起着启动细胞程序性坏死的关键作用^[38-41]。因此, 实验选择受体相互作用蛋白3为观察细胞程序性坏死的指标, 在Nec-1与知母皂甙B-II预处理细胞后, 均选用受体相互作用蛋白3的表达变化来观察细胞程序性坏死的变化。

由于程序性坏死的典型特征是可被Nec-1所阻断, 因此实验中使用Nec-1来检测程序性坏死的发生^[42-43]。实验确定了Nec-1预处理VSC4.1细胞经氧-糖剥夺后的早期存在

程序性坏死, 之后在此基础上观察细胞内受体相互作用蛋白3的表达变化, 取得了与前人一致的报道结果^[12]。随后将细胞分为6组, 加入不同浓度的知母皂甙B-II, 使用MTT来确定对细胞程序性坏死起最佳作用的药物浓度, 得到用100 μmol/L知母皂甙B-II预处理细胞对细胞程序性坏死的减少作用最大。随后在此药物浓度条件下(100 μmol/L)来观察药物对细胞中受体相互作用蛋白3表达的改变, 发现知母皂甙B-II可有效减少细胞内受体相互作用蛋白3的表达, 起到减少程序性坏死的作用。

综上所述, 程序性坏死是一种存在于非神经细胞与神经细胞急性损伤后的早期死亡类型。VSC4.1细胞在氧-糖剥夺后早期存在程序性坏死现象, 加入知母皂甙B-II可有效减少程序性坏死的产生, 其作用机制可能与知母减少细胞内受体相互作用蛋白3表达有关, 但其引起程序性坏死减少的具体机制还有待进一步探索。

作者贡献: 第一作者构思并设计文章, 所有作者共同起草, 经通讯作者审核, 第一作者对文章负责。

经费支持: 该文章接受了“2016年度山西省高等学校科技创新项目(2016175)、长治医学院校级创新团队支持项目(CX201414)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经长治医学院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Kim SJ, Li J. Caspase blockade induces RIP3-mediated programmed necrosis in Toll-like receptor-activated microglia. *Cell Death Dis.* 2013;4:e716.
- [2] Wu YT, Tan HL, Huang Q, et al. zVAD-induced necroptosis in L929 cells depends on autocrine production of TNFα mediated by the PKC-MAPKs-AP-1 pathway. *Cell Death Differ.* 2011;18(1):26-37.
- [3] Hu Y, Xia Z, Sun Q, et al. A new approach to the pharmacological regulation of memory: Sarsapogenin improves memory by elevating the low muscarinic acetylcholine receptor density in brains of memory-deficit rat models. *Brain Res.* 2005;1060(12):26-31.
- [4] Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T, et al. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis.* 2013;4:e465.
- [5] Zhang M, Li J, Geng R, et al. The inhibition of ERK activation mediates the protection of necrostatin-1 on glutamate toxicity in HT-22 cells. *Neurotox Res.* 2013;24(1):64-70.

- [6] Chen WW, Yu HL, Hong F, et al. RIP1 mediates the protection of geldanamycin on neuronal injury induced by oxygen-glucose deprivation combined with zVAD in primary cortical neurons. *J Neurochem*. 2012;120(1): 70-77.
- [7] Laird MD, Wakade C, Alleyne CH Jr, et al. Hemin-induced necroptosis involves glutathione depletion in mouse astrocytes. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(8):1103-1114.
- [8] 冯毅凡, 吉星, 等. 知母中皂甙类研究进展[J]. *中草药*, 2010, 41(4): 12-15.
- [9] 邓云, 徐秋萍, 刘振权. 知母皂甙化合物对脑缺血再灌注大鼠的保护作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2005, 28(2): 33-37.
- [10] Huang JF, Shang L, Liu P, et al. Timosaponin-BII inhibits the up-regulation of BACE1 induced by Ferric Chloride in rat retina. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:189.
- [11] Huang JF, Shang L, Xiong K, et al. Differential neuronal expression of receptor interacting protein 3 in rat retina: involvement in ischemic stress response. *BMC Neurosci*. 2013;14:16.
- [12] Ding W, Shang L, Huang JF, et al. Receptor interacting protein 3-induced RGC-5 cell necroptosis following oxygen glucose deprivation. *BMC Neurosci*. 2015;16:49.
- [13] Wang SC, Liao LS, Wang M, et al. Pin1 Promotes Regulated Necrosis Induced by Glutamate in Rat Retinal Neurons via CAST/Calpain2 Pathway. *Front Cell Neurosci*. 2018;11:425.
- [14] Nikseresht S, Khodaghohi F, Ahmadiani A. Protective effects of ex-527 on cerebral ischemia-reperfusion injury through necroptosis signaling pathway attenuation. *J Cell Physiol*. 2019;234(2):1816-1826.
- [15] Macchi B, Mastino A. Programmed cell death and natural killer cells in multiple sclerosis: new potential therapeutic targets? *Neural Regen Res*. 2016;11(5):733-734.
- [16] Li W, Liu J, Chen JR, et al. Neuroprotective Effects of DTIO, A Novel Analog of Nec-1, in Acute and Chronic Stages After Ischemic Stroke. *Neuroscience*. 2018;390:12-29.
- [17] Fang T, Cao R, Wang W, et al. Alterations in necroptosis during ALDH2 mediated protection against high glucose induced H9c2 cardiac cell injury. *Mol Med Rep*. 2018;18(3):2807-2815.
- [18] Yan JK, Yan WH, Cai W. Fish oil-derived lipid emulsion induces RIP1-dependent and caspase 8-licensed necroptosis in IEC-6 cells through overproduction of reactive oxygen species. *Lipids Health Dis*. 2018;17(1):148.
- [19] Chen R, Xu J, She Y, et al. Necrostatin-1 protects C2C12 myotubes from CoCl₂-induced hypoxia. *Mol Med*. 2018;41(5): 2565-2572.
- [20] Ni Y, Gu WW, Liu ZH, et al. RIP1K Contributes to Neuronal and Astrocytic Cell Death in Ischemic Stroke via Activating Autophagic-lysosomal Pathway. *Neuroscience*. 2018;371: 60-74.
- [21] Wang Z, Guo LM, Wang Y, et al. Inhibition of HSP90α protects cultured neurons from oxygen-glucose deprivation induced necroptosis by decreasing RIP3 expression. *J Cell Physiol*. 2018;233(6):4864-4884.
- [22] Hao J, Li S, Shi X, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells protect against n-hexane-induced neuropathy through beclin 1-independent inhibition of autophagy. *Sci Rep*. 2018;8(1): 4516.
- [23] Lu WQ, Qiu Y, Li TJ, et al. Timosaponin B-II inhibits proinflammatory cytokine induction by lipopolysaccharide in BV2 cell. *Ach Pharm Res*. 2009;32(9):1301-1305.
- [24] Xiao S, Xu M, Ge Y, et al. Inhibitory Effects of Saponins From *Anemarrhene asphodeloides* Bunge on the Growth of Vascular Smooth Muscle Cells. *Biomed Environ*. 2006;19(3): 185-189.
- [25] 邓云, 马百平. 知母皂甙B2对AB25-35诱导的原代大鼠神经细胞损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(2):244-247.
- [26] Xie Q, Zhao H, Li N, et al. Protective effects of Timosaponin B-II on oxidative stress damage in PC12 cells based on metabolomics. *Biomed Chromatogr*. 2018;10;32(10):e4321.
- [27] Li N, Liu B, Zhang J, et al. Acute toxicity, 28-day repeated-dose toxicity and toxicokinetic study of Timosaponin B-II in rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2017;90:244-257.
- [28] Yuan YL, Guo CR, Cui LL, et al. Timosaponin B-II ameliorates diabetic nephropathy via TXNIP, mTOR, and NF-κB signaling pathways in alloxan-induced mice. *Drug Des Devel Ther*. 2015; 9:6247-6258.
- [29] Jiang SH, Shang L, Xue LX, et al. The effect and underlying mechanism of Timosaponin B-II on RGC-5 necroptosis induced by hydrogen peroxide. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:459.
- [30] Zhao X, Liu C, Qi Y, et al. Timosaponin B-II ameliorates scopolamine-induced cognition deficits by attenuating acetylcholinesterase activity and brain oxidative damage in mice. *Metab Brain Dis*. 2016;31(6):1455-1461.
- [31] Shulga N, Pastorino JG. Mitonec mediates TNFα-induced necroptosis promoted by exposure to fructose and ethanol. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 4):896-907.
- [32] Cabon L, Galán-Malo P, Bouharrour A, et al. BID regulates AIF-mediated caspase-independent necroptosis by promoting BAX activation. *Cell Death Differ*. 2012;19(2):245-256.
- [33] Hou H, Wang Y, Li Q, et al. The role of RIP3 in cardiomyocyte necrosis induced by mitochondrial damage of myocardial ischemia-reperfusion. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2018;50(11): 1131-1140.
- [34] Cruz SA, Qin Z, Stewart AFR, et al. Dabrafenib, an inhibitor of RIP3 kinase-dependent necroptosis, reduces ischemic brain injury. *Neural Regen Res*. 2018;13(2):252-256.
- [35] Yang Z, Li C, Wang Y, et al. Melatonin attenuates chronic pain related myocardial ischemic susceptibility through inhibiting RIP3-MLKL/CaMKII dependent necroptosis. *Mol Cell Cardiol*. 2018;125: 185-194.
- [36] Wang S, Wu J, Zeng YZ, et al. Necrostatin-1 Mitigates Endoplasmic Reticulum Stress After Spinal Cord Injury. *Neurochem Res*. 2017;42(12):3548-3558.
- [37] Su X, Wang H, Lin Y, et al. RIP1 and RIP3 mediate hemin-induced cell death in HT22 hippocampal neuronal cells. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018;14:3111-3119.
- [38] Zhang L, Feng Q, Wang T. Necrostatin-1 Protects Against Paraquat-Induced Cardiac Contractile Dysfunction via RIP1-RIP3-MLKL-Dependent Necroptosis Pathway. *Cardiovasc Toxicol*. 2018;18(4):346-355.
- [39] Zhu C, Liu Y, Guan Z, et al. Hypoxia-reoxygenation induced necroptosis in cultured rat renal tubular epithelial cell line. *Basic Med Sci*. 2018;21(8):863-868.
- [40] Lu B, Wang Z, Ding Y, et al. RIP1 and RIP3 contribute to shikonin-induced glycolysis suppression in glioma cells via increase of intracellular hydrogen peroxide. *Cancer Lett*. 2018; 425:31-42.
- [41] Qiu X, Zhang Y, Han J. RIP3 is an upregulator of aerobic metabolism and the enhanced respiration by necrosomal RIP3 feeds back on necrosome to promote necroptosis. *Cell Death Differ*. 2018;25(5):821-824.
- [42] Chen Y, Zhang L, Yu H, et al. Necrostatin-1 Improves Long-term Functional Recovery Through Protecting Oligodendrocyte Precursor Cells After Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice. *Neuroscience*. 2018;371:229-241.
- [43] Yan B, Zhang H, Dai T, et al. Necrostatin-1 promotes ectopic periodontal tissue like structure regeneration in LPS-treated PDLSCs. *PLoS One*. 2018;13(11):e0207760.