

研究简报

PXR 激活在拮抗 SH-SY5Y 细胞凋亡中的作用

孟春* 贾振华 陈俊 熊玉林 王航 李锋 郭养浩

(福州大学生物科学与工程学院, 福州 350108)

关键词 PXR 激活; SH-SY5Y 细胞; 细胞凋亡; G₀/G₁ 期阻滞

人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞可以表达神经元特异性的酪氨酸羟化酶、多巴胺-β-羟化酶以及多巴胺转运体等^[1,2], 因此可用于建立帕金森病的体外模型。虽然帕金森综合症发病的确切机制至今尚不清楚, 但众多的病理学资料证实该病患者存在中脑黑质多巴胺能神经元的凋亡^[3,4]。自由基、兴奋性氨基酸、线粒体功能障碍等多种诱导细胞凋亡的因素都可导致中脑黑质多巴胺能神经元死亡, 细胞凋亡可能是帕金森病细胞死亡的主要方式^[5]。

孕烷X受体(PXR), 是配体依赖性转录因子核受体(NR)家族的成员之一, 是药物代谢的关键转录调控因子, 能够响应许多临床药物的代谢。PXR 配基种类繁多, 包括内源性和外源性的许多化合物。当 PXR 被配基激活后, 与视黄醇 X 受体(RXR) 结合形成异源二聚体, 作用于靶基因调控序列, 参与目标基因表达的调控^[6]。本工作初步研究发现神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 表达一定水平的 PXR, 通过激活 PXR 可进一步影响神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 的活性。

PXRi-HepG2 细胞株的构建: 寡核苷酸序列 5'-AAA UGG GAG AAG GUA GUG UCA AAA G-3' (siRNA-76) 由上海生工合成, 转染试剂为 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen)。HepG2 细胞的具体转染程序参照转染试剂说明书。

目标产物半定量 Real-PCR 检测: 根据 Genbank 数据库中人类 PXR、CYP3A4、Actin 基因序列, 利用 Primer 5.0 设计 p53 基因上游引物和下游引物(表 1)。采用半定量 RT-PCR(SYBR Green I)检测基因表达量。

细胞凋亡检测: 采用罗丹明123检测线粒体跨膜电位变化, 用于检测细胞的早期凋亡^[7]。在细胞培

养物中加入终浓度为 10 μg/μl 的罗丹明 123, 避光孵育 30 min, 去除罗丹明染液, 预冷的 PBS 洗涤三次, 使用荧光显微镜镜检。激发波长为 470 nm~490 nm, 发射波长为 515 nm~565 nm。细胞凋亡后期检测采用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(流式细胞仪), 具体步骤根据试剂盒说明书进行。

细胞周期检测: 分别采用流式细胞仪(COULTER EPICS XL 流式细胞仪)检测。流式检测细胞周期根据试剂盒提供的程序进行。取对数生长期细胞, PBS 洗 2 次, 70%(预冷)乙醇固定, PBS 清洗后, 加入 50 μg/ml 溴化乙锭, 100 μg/ml RNase A, 0.2% Triton X-100, 4℃ 避光孵育 30 分钟, 用 300 目(孔径 40~50 微米)尼龙网过滤, 上机检测。

统计学分析: 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 组间差异比较采用 *t* 检验分析, 当 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 具有显著性差异。

SH-SY5Y 细胞中 PXR 表达水平及功能的检测

利福平是药物代谢酶 CYP3A4 的诱导剂, 对肝脏以及小肠中的 CYP3A4 的表达有很大的诱导作用, 但在 SH-SY5Y 细胞中, PXR 表达及对 CYP3A4 诱导表达情况还不清楚。我们通过添加利福平等药物刺激细胞 48 h 后, 检测 SH-SY5Y 细胞中 PXR 及 CYP3A4 的表达。结果发现, PXR 在 SH-SY5Y 细胞中存在一定水平的表达。

利福平、苯巴比妥等药物能通过 PXR 诱导 CYPs

收稿日期: 2010-09-21 接受日期: 2010-11-15

福建省自然科学基金(No.2010J01204)和福州大学人才基金(No.XSJRC2007-22)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0591-22866379, E-mail: mengchun@fzu.edu.cn

表 1 逆转录 PCR 所用引物
Table 1 Forward and reverse primer sequences used for RT-PCR

名称 Name	引物 Primers	序列 Sequence	产物大小 Gene length
β-actin	Forward	5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3'	238bp
	Reverse	5'-GGG TCA GAA GGA CTC CTA TG-3'	
CYP3A4	Forward	5'-TTT GAC AGG GTG CTA ACA GAG C-3'	336bp
	Reverse	5'-ACG CTT CTA GTG ACG CAT ACA CC-3'	
PXR	Forward	5'-GGT CCC CAA ATC TGC C-3'	375bp
	Reverse	5'-AGG TTT TCA TCT GAG CGT C-3'	

酶的表达,特别是CYP3A4酶的表达。从图1中我们观察到相较于未加利福平细胞组,CYP3A4的表达量增加,这说明加入利福平后,CYP3A4的表达量在SH-SY5Y细胞中有明显增加,证明在SH-SY5Y细胞中,利福平能诱导CYP3A4大量表达。结果表明,PXR在SH-SY5Y细胞中能起到相应的转录调控功能。

PXR激活对细胞凋亡的影响

为了进一步研究PXR激活对SH-SY5Y细胞的影响,我们在培养物中添加脂多糖LPS,通过添加利福平研究PXR激活对LPS诱导的细胞凋亡的影响。

罗丹明123是一种阳离子荧光探针,主要用于检测线粒体膜电位的变化,当细胞发生凋亡时,线粒体膜被破坏,线粒体基质的膜电位崩溃,线粒体摄取的罗丹明123的量和摄取速率都明显降低,是细胞凋亡事件早期检测的方法之一。实验分别用不同试剂处

理细胞24h,然后检测细胞凋亡特性。结果表明,SH-SY5Y细胞中添加利福平,细胞的膜电位相比于正常细胞有所上升。在LPS诱导情况下,线粒体膜电位明显降低,线粒体可能出现裂解的现象,而利福平的加入能有效阻滞细胞膜电位的降低(图2A)。

实验中采用Annexin V-FITC和PI染色,进一步检测PXR激活对细胞凋亡中后期的影响。流式分析结果(图2B)显示,正常细胞中后期凋亡细胞较少(3.7%),大部分细胞处于正常水平(88.3%);培养物中添加20 μg/ml利福平对细胞凋亡水平没有发生明显影响,正常细胞占93.5%。当培养基中添加LPS诱导72h后,大部分细胞处于凋亡后期(89.6%);但是在LPS与利福平同时加入的情况下,凋亡后期细胞数量降低,正常细胞数量显著增加。这表明PXR的激活可以有效抑制SH-SY5Y细胞的凋亡。

为了探讨PXR激活抑制细胞凋亡的机理,我们进一步研究了PXR在细胞生长周期中的作用。首先我们通过向细胞中转染siRNA-76,以期降低细胞中PXR的表达。48h后的分析结果显示,siRNA-76有效地降低了细胞中PXR的表达,利福平的添加对CYP3A4的诱导效果显著下降(图3)。

药物处理24h后的检测实验结果表明(图4),利福平的加入能阻滞SH-SY5Y细胞周期,使得G₀/G₁期细胞的数量明显增加。没有利福平时,SH-SY5Y细胞G₀/G₁的比例为53.31%,G₂为13.22%;但是加入利福平以后,G₀/G₁期细胞比例增加到72%,G₂期和S期都明显下降。而在PXR表达抑制的细胞中,PXR表达水平降低后利福平的阻滞水平明显降低,利福平的添加只使G₀/G₁期的比例提高不到10%。

这表明,细胞中PXR的激活可以使细胞停滞在G₀/G₁期,通过减少细胞在分裂过程中受到的伤害,达到抑制细胞凋亡的目的。PXR作为一个重要的核受

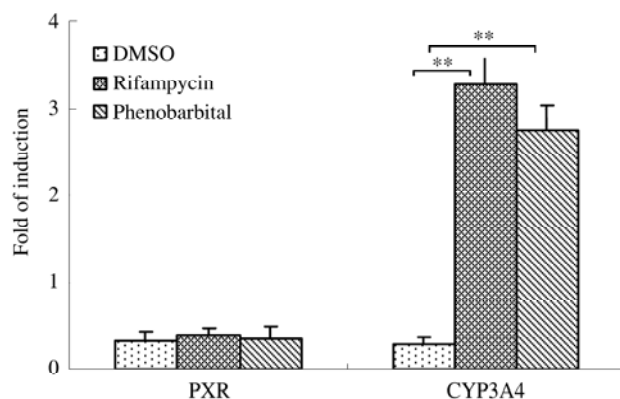


图 1 SH-SY5Y 细胞中 PXR 及 CYP3A4 基因转录水平检测
DMSO: 10 μl; 利福平: 20 μg/ml; 苯巴比妥: 20 μg/ml。每个实验重复三次, ** $P < 0.01$ 。

Fig.1 Expression level of PXR and CYP3A4 in SH-SY5Y cells
DMSO: 10 μl; rifampycin: 20 μg/ml; phenobarbital: 20 μg/ml. Each experiment was performed in triplicate. ** $P < 0.01$.

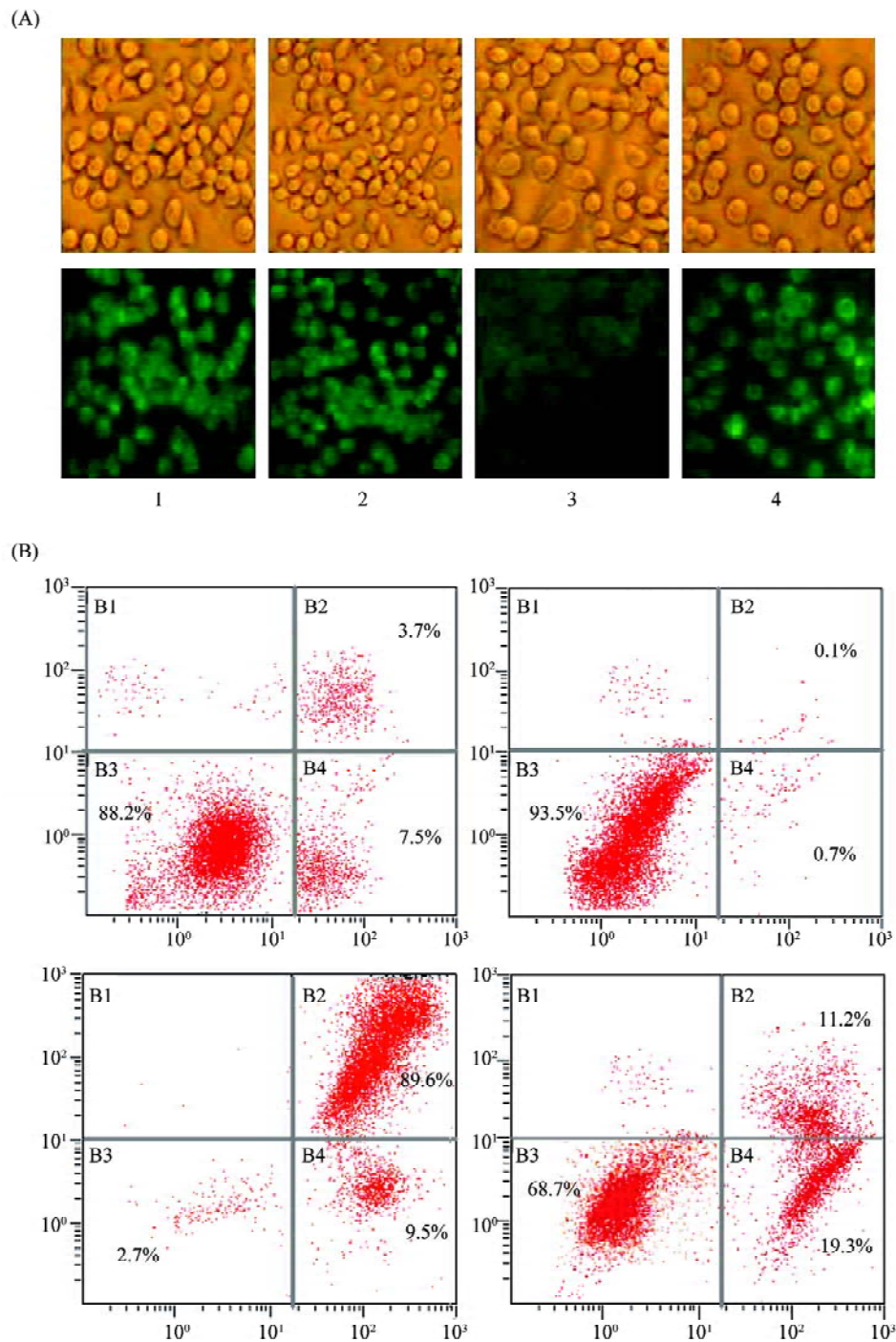


图2 PXR 激活对 LPS 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

A: SH-SY5Y 罗丹明 123 染色光镜观察结果; B: SH-SY5Y 细胞 Annexin V-FITC/PI 双染的流式检测结果(B1: PI 阳性; B2: Annexin V-FITC、PI 阳性; B3: Annexin V-FITC、PI 阴性; B4: Annexin V-FITC 阳性)。1: DMSO 样品组; 2: 20 $\mu\text{g/ml}$ 利福平; 3: 20 $\mu\text{g/ml}$ 脂多糖; 4: 20 $\mu\text{g/ml}$ 利福平 + 20 $\mu\text{g/ml}$ 脂多糖。每个实验重复三次。

Fig.2 Effect of activation of PXR on SH-SY5Y apoptosis

A: SH-SY5Y cells dyed with Rhodamine 123; B: SH-SY5Y cells dyed with Annexin V-FITC/PI (B1: PI positive; B2: PI and Annexin V-FITC positive; B3: PI and Annexin V-FITC negative; B4: Annexin V-FITC positive). 1: DMSO; 2: 20 $\mu\text{g/ml}$ rifampycin; 3: 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS; 4: 20 $\mu\text{g/ml}$ rifampycin + 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS. Each experiment was performed in triplicate.

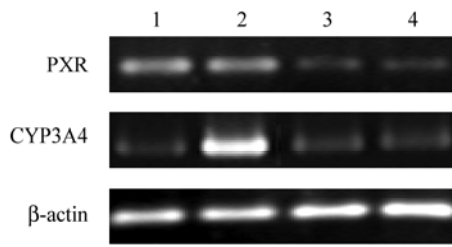


图3 PXR 和 CYP3A4 在 PXR 干扰的 SH-SY5Y 细胞中的表达
1: 10 µl DMSO 处理 SH-SY5Y; 2: 20 µg/ml 利福平处理 SH-SY5Y 细胞; 3: 10 µl DMSO 处理 PXR 干扰的 SH-SY5Y (siRNA-76) 细胞; 4: 20 µg/ml 利福平处理 PXR 干扰的 SH-SY5Y (siRNA-76)。每个实验重复三次。

Fig.3 PXR and CYP3A4 expression levels in PXR knockdown SH-SY5Y cells

1: SH-SY5Y treated with 10 µl DMSO; 2: SH-SY5Y treated with 20 µg/ml rifampycin; 3: SH-SY5Y (siRNA-76) treated with 10 µl DMSO; 4: SH-SY5Y (siRNA-76) treated with 20 µg/ml rifampycin. Each experiment was performed in triplicate.

体, 目前对其的研究还主要集中在药物代谢方面, 在细胞调控等其他方面的研究还少见报道。关于 PXR 对细胞周期的影响作用的分子机理, 以及 PXR 在神经细胞中的作用, 有待于进一步深入探讨。

参考文献(References)

- 1 Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Nat Cancer Inst* 1983; 71(4): 741-9.
- 2 Takahashi T, Deng Y, Maruyama W, Dostert P, Kawai M, Naoi M. Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. *J Neural Transm Gen Sect* 1994; 98(2): 107-18.
- 3 Tompkins MM, Basgall EJ, Zamrini E, Hill WD. Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal

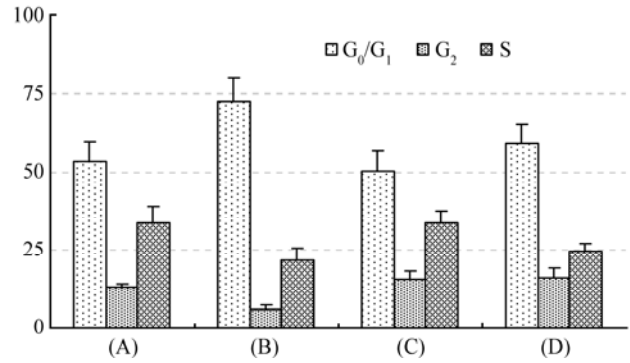


图4 利福平对 SH-SY5Y 细胞生长周期的影响

A: 10 µl DMSO 处理 SH-SY5Y; B: 20 µg/ml 利福平处理 SH-SY5Y 细胞 24 小时; C: 10 µl DMSO 处理 PXR 干扰的 SH-SY5Y (siRNA-76) 细胞; D: 20 µg/ml 利福平处理 PXR 干扰的 SH-SY5Y (siRNA-76) 24 小时。每个实验重复三次。

Fig.4 Effect of rifampicin on the process of SH-SY5Y cell growth phase

A: SH-SY5Y cells treated with 10 µl DMSO; B: SH-SY5Y cells treated with 20 µg/ml rifampicin for 24 h; C: PXRi-SH-SY5Y cells treated with 10 µl DMSO; D: PXRi-SH-SY5Y cells treated with 20 µg/ml rifampicin for 24 h. Each experiment was performed in triplicate.

aging in substantia nigral neurons. *Am J Pathol* 1997; 150(1): 119-31.

- 4 Mochizuki H, Goto K, Mori H, Mizuno Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1996; 137(2): 120-3.
- 5 Burke R, Kholodilov N. Programmed cell death: does it play a role in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998; 44(1): 160-6.
- 6 Xu DX, Wei W, Sun MF, Wu CY, Wang JP, Wei L Z, *et al.* Kupffer cells and reactive oxygen species partially mediate lipopolysaccharide-induced downregulation of nuclear receptor pregnane x receptor and its target gene CYP3a in mouse liver. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(1): 10-22.
- 7 Ferlini C, Scambia G. Assay for apoptosis using the mitochondrial probes, Rhodamine123 and 10-N-nonyl acridine orange. *Nat Protoc* 2007; 2(12): 3111-4.

Effect of PXR Activation on Neuroblastoma Cells SH-SY5Y Apoptosis

Chun Meng*, Zhen-Hua Jia, Jun Chen, Yu-Lin Xiong, Hang Wang, Feng Li, Yang-Hao Guo
(College of Biological Science and Bioengineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

Abstract In this work we studied the specific antagonistic effect of PXR activation on neuroblastoma cell SH-SY5Y apoptosis induced by LPS. The expression level of PXR and CYP3A4 was measured by RT-PCR. Apoptosis of SH-SY5Y stained with Rhodamine 123, Annexin V-FITC/PI and growth phase of SH-SY5Y were detected by flow cytometry. The results showed that PXR activated by rifampycin significantly enhanced the expression levels of CYP3A4 and inhibited the apoptosis of SH-SY5Y cells. The analysis of cycle phase of cells indicated that rifampycin could arrest the cells at G₀/G₁ phase. The arresting efficiency of rifampycin decreased when PXR expression level was knockdown mediated with RNAi. PXR might inhibit the apoptosis of SH-SY5Y cells through arresting the cell cycle at G₀/G₁ phase.

Key words PXR activation; SH-SY5Y cells; apoptosis; G₀/G₁ phase arrest

Received: September 21, 2010 Accepted: November 15, 2010

This work was supported by the Natural Science Research Grants of Fujian Province (No.2010J01204) and Special Foundation for Young Scientists of Fuzhou University (No.XSJRC2007-22)

*Corresponding author. Tel: 86-591-22866379, E-mail: mengchun@fzu.edu.cn