

菟丝子提取物对活性氧引起已分化的 PC12 细胞损伤的保护作用

王利华 卜鹏程 包永明*

(大连理工大学生物科学与工程系, 大连 116023)

摘要 以常用的神经嗜铬细胞瘤 PC12 细胞株为实验模型, 通过比较活性氧(ROS)作用细胞后的细胞活力、凋亡相关蛋白(p53、Bax)水平以及细胞中 SOD、GSH、MDA 的差异, 发现菟丝子提取物不仅能提高 ROS 损伤的已分化 PC12 细胞活力, 调节细胞中凋亡相关基因的表达, 而且还能提高细胞中 SOD 和 GSH 的含量, 降低 MDA 水平。由此表明, 菟丝子提取物对 ROS 造成的 PC12 细胞损伤有一定的保护作用。

关键词 菟丝子; 活性氧; 凋亡

机体在正常生理情况下总是不断地产生和清除各种各样的自由基, 使体内自由基维持于有利无害的低水平, 但是在某些病理条件下, 自由基产生的速率和稳态浓度有很大提高。据报道, 自由基与心血管疾病、缺血/再灌注综合症、神经系统退行性疾病如帕金森综合症(Parkinson's disease, PD)、阿尔采默氏病(Alzheimer's disease, AD)以及其他许多疾病都有一定联系。

PC12 细胞最初是从大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤中获得的。在含血清的培养基中, PC12 细胞能够继续分裂, 类似于肾上腺嗜铬细胞或交感样神经细胞的前体。在培养基中加入适当浓度的 NGF, 这些“原始(naive)”细胞逐渐分化成交感神经样细胞, 表现出神经细胞的形态和生物化学特性, 因此经常被人们用来代替神经细胞进行部分神经细胞功能和生物特性研究的实验^[1]。

据神农本草经记载, 菟丝子是一种上等中药, 在传统药方中主要用于壮阳、滋补肝肾。我们在过去的研究中发现菟丝子提取物在 PC12 细胞中具有神经营养因子样活性, 能抑制去血清引起的细胞损伤, 还能诱导 PC12 细胞延伸突起, 表现出神经分化特征, 并且初步探明了其作用机制^[2,3]。本文以常用的大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞为模型, 探讨菟丝子提取物对活性氧(ROS)引起 PC12 细胞损伤的保护作用。

1 材料与方

1.1 材料

菟丝子提取物(自备); 新生胎牛血清、马血清、Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)购自 Gibco BRL 公司; p53、Bax、Bcl-2 多克隆抗体购自 Santa Cruz 生物技术公司; MTT、黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶购自华美生物工程公司; LDH、SOD、MDA、GSH 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。实验用大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞购自中科院生化细胞所细胞库。

1.2 方法

1.2.1 菟丝子提取物的制备 主要成分为黄酮甙类化合物的菟丝子提取物的制备方法参阅文献[2]和文献[3]。

1.2.2 PC12 细胞培养 大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞在 37 °C、5%CO₂ 的培养箱中培养, 培养基是 DMEM 补加 10% 马血清、5% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素, 100 mg/L 链霉素。为了获得神经分化的 PC12 细胞, 在培养基中加入 100 μg/L 的 NGF, 连续培养一周后, 收集细胞、重新接种继续用 NGF 诱导 5~7 天, 用 PBS 洗尽残留的 NGF, 用于下步实验。

1.2.3 菟丝子提取物对 ROS 引起 PC12 细胞损伤的保护 产生 ROS 的黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶系统由 100 μmol/L 黄嘌呤和不同浓度的黄嘌呤氧化酶组成。

收稿日期: 2004-05-12 接受日期: 2004-09-20

* 通讯作者。Tel: 0411-84706309, Fax: 0411-84706365, E-mail: yongmingbao@sohu.com

为了考察菟丝子提取物对ROS造成的PC12细胞损伤的保护作用,在用ROS处理前2 h,在细胞培养孔中加入指定浓度的菟丝子提取物。随后观察细胞形态、测定细胞活力、SOD活性、GSH和MDA的含量变化。实验方法参照试剂盒使用说明进行。

1.2.4 菟丝子提取物对分化的PC12细胞中凋亡相关蛋白p53、Bcl-2和Bax的影响 流式细胞仪分析p53、Bcl-2和Bax的蛋白质水平根据文献[4]介绍的方法进行。收集细胞,用PBS洗3次,然后用2%多聚甲醛固定20 min,用0.5% Triton X-100处理后加入1:100稀释的p53、Bcl-2和Bax一抗温育1 h,随后用荧光标记的相应二抗在室温下暗处温育45 min。用PBS洗后,用流式细胞仪测定抗原密度和阳性细胞比例。

2 结果

2.1 ROS对PC12细胞损伤

在分化的PC12细胞培养基中加入黄嘌呤氧化酶后,随浓度的增加和作用时间的延长,细胞逐渐出现染色质浓缩、块状致密染色区、核裂解,形成凋亡小体等细胞凋亡症状。ROS对PC12细胞的损伤是通过测定在100 $\mu\text{mol/L}$ 黄嘌呤存在下,不同浓度的黄嘌呤氧化酶处理12 h后PC12细胞释放的LDH的比例来评价的。如图1所示,PC12细胞的存活率随黄嘌呤氧化酶浓度的增加而逐渐下降。在神经分化的PC12细胞中,当黄嘌呤氧化酶浓度达到10 mU/mL时,与对照组相比,LDH的释放率增加到(36.6 \pm 2.7)%;当黄嘌呤氧化酶浓度达到50 mU/mL时,LDH的释放率达到(69.8 \pm 3.1)%。通过比较ROS对分化和未分化的PC12细胞的影响,发现分化的PC12细胞ROS损伤更为敏感。在100 $\mu\text{mol/L}$ 黄嘌呤存在下,作用时间为12 h,黄嘌呤氧化酶对分化和未分化的PC12细胞的 LC_{50} 分别为18.9和47.6 mU/mL(图1)。

在用10或50 mU/mL黄嘌呤氧化酶处理分化的PC12细胞1、3、6和12 h后,通过测定LDH的释放率评价ROS处理时间对分化的PC12细胞活力的影响。如图2所示,神经分化的PC12细胞活力随ROS处理时间的延长而下降。在用10或50 mU/mL的黄嘌呤氧化酶处理3 h后,与对照组相比,LDH的释放率分别从2.1%增加到24.8%和54.5%。

2.2 菟丝子提取物对ROS引起的已分化的PC12细胞损伤的保护

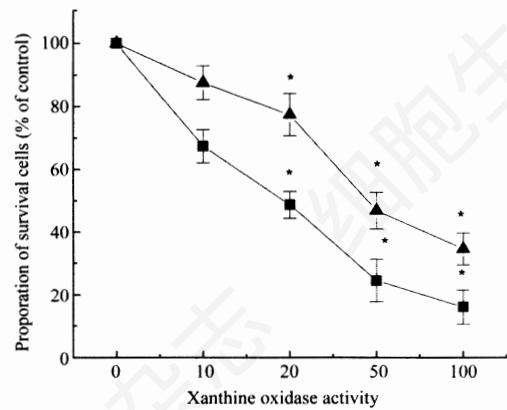


Fig.1 Effect of *Cuscuta chinensis* extract on the viability of undifferentiated and differentiated PC12 cells exposed to reactive oxygen species as indicated concentrations for 12 h The results, expressed as the percentage (%) of LDH leakage to the external medium, are $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. ■ and ▲ symbols show the % survivals of the differentiated and undifferentiated cells respectively. * $P < 0.01$ compared with the control.

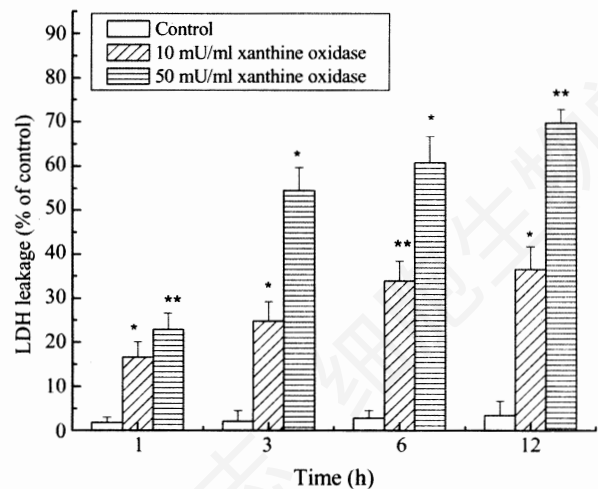


Fig.2 LDH leakage of neuronal differentiated PC12 cells induced by 10 or 50 mU/mL xanthine oxidase at indicated time The results, expressed as the $\bar{x} \pm s$ of triplicate determinations in three distinct experiments. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, significantly different compared to control at the same incubation period.

上述实验结果表明100 $\mu\text{mol/L}$ 黄嘌呤/50 mU/mL黄嘌呤氧化酶处理细胞3 h,可以引起半数以上的已分化的PC12细胞凋亡。为了考察菟丝子提取物对ROS引起的细胞凋亡的影响,在用ROS诱导前2 h,在培养孔中加入不同浓度的菟丝子提取物(0~50 mg/L),随后用100 $\mu\text{mol/L}$ 黄嘌呤/50 mU/mL黄嘌呤氧化酶处理细胞3 h,用MTT法测定细胞活力。实验发现,菟丝子提取物能明显地抑制ROS诱导的细胞损伤,结果如图3所示。

2.3 菟丝子提取物对分化的PC12细胞氧化还原

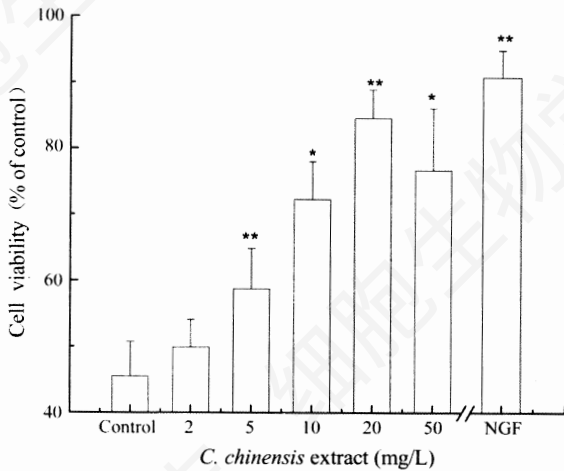


Fig.3 *C. chinensis* extract prevented neuronal differentiated PC12 cells from ROS injury in a concentration-dependent manner

Values represent the $\bar{x} \pm s$ ($n=5$ from four separate cultures). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control.

状态的调节

SOD 和 GSH 都是细胞中重要的抗氧化剂, 它们的活性大小或含量反映了细胞的抗氧化能力。MDA 是脂质过氧化的产物, 所以人们经常用它作为评价脂质过氧化的标准之一。本实验中, SOD、GSH 和 MDA 的测定都是根据 Kosenko 等^[5]介绍的方法来完成的。在对照实验中, 未用 ROS 处理的

SOD、GSH 和 MDA 的活力分别(9.8 ± 3.2) U/mg、(211 ± 14) mg/L 和(6.5 ± 1.1) $\mu\text{mol/L}$, 但用 50 mU/mL 黄嘌呤氧化酶作用 2 h 后, SOD、GSH 和 MDA 分别为(4.8 ± 1.1) U/mg、(108 ± 9) mg/L 和(12.7 ± 2.0) $\mu\text{mol/L}$ 。实验结果显示, 菟丝子提取物能明显地缓解 ROS 引起的分化的 PC12 细胞的氧化压力, 降低细胞损伤, 增加存活细胞的比例(表 1)。

2.4 菟丝子提取物对已分化的 PC12 细胞中凋亡相关蛋白的影响

实验证明, 当预先用菟丝子提取物(0~20 mg/L)温育细胞 2 h 后在用 ROS 处理时, 凋亡细胞的比例明显降低。流式细胞仪检测结果发现, 20 mg/L 菟丝子提取物能使 p53 染色阳性的细胞比例从 58.1% 下降到 18.6%。

实验发现 Bax 和 Bcl-2 蛋白酶活性在用 ROS 处理 12 h 后达到最大, 所以我们在此时间收集细胞, 检测菟丝子提取物对 ROS 处理后 PC12 细胞中的 Bax 和 Bcl-2 着色细胞比例。测定结果发现菟丝子提取物能剂量依赖地减少 Bax 阳性着色的细胞比例, 但对 Bcl-2 没有明显影响(表 2)。

3 讨论

越来越多的研究结果表明, ROS 能诱导 PC12

Table 1 Effect of *C. chinensis* extract (mg/L) on SOD, GSH and MDA induced by ROS in neuronal differentiated PC12 cell cultures

Treatment	GSH (mg/L)	SOD(U/mg)			MDA($\mu\text{mol/L}$)
		Total SOD	MnSOD	CuZnSOD	
Control	211 ± 14	9.8 ± 3.2	2.4 ± 0.9	7.4 ± 1.6	6.5 ± 1.3
<i>C. chinensis</i> extract (mg/L)					
0	$108 \pm 9^{**}$	$4.8 \pm 1.1^{**}$	2.2 ± 1.2	$2.6 \pm 0.5^{**}$	$12.7 \pm 2.0^{**}$
2	$112 \pm 13^{**}$	$4.4 \pm 1.6^{**}$	2.1 ± 1.1	$2.3 \pm 2.0^{**}$	$10.8 \pm 2.3^{**}$
5	$159 \pm 15^*$	$6.5 \pm 2.0^*$	2.4 ± 1.3	$4.1 \pm 2.5^*$	$8.0 \pm 2.8^*$
10	$178 \pm 9^*$	7.8 ± 2.2	2.5 ± 1.0	5.3 ± 2.5	7.4 ± 2.1
20	202 ± 10	9.4 ± 2.1	2.4 ± 1.4	7.0 ± 1.3	6.6 ± 1.8
50	195 ± 11	9.1 ± 2.3	2.5 ± 1.0	6.6 ± 2.5	7.0 ± 1.7
Positive control (100 $\mu\text{g/L}$)					
NGF	198 ± 15	9.2 ± 3.3	2.5 ± 1.2	7.2 ± 3.5	6.7 ± 1.4

Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=12$ for SOD, GSH and MDA activity assays. Statistical significance was evaluated by one-Way ANOVA test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the control.

Table 2 Effect of *C. chinensis* extract on p53, Bcl-2 and Bax protein expression in neuronal differentiated PC12 cells treated with xanthine (100 mmol/L)/xanthine oxidase (50 mU/mL)

	Control	Xanthine/xanthine oxidase + <i>C. chinensis</i> extract (mg/L)			
		2	5	10	20
p53	8.6 ± 4.1	$58.1 \pm 14.1^{**}$	$38.9 \pm 6.7^{**}$	$28.2 \pm 9.1^*$	$18.6 \pm 4.1^*$
Bcl-2	1.1 ± 0.4	1.3 ± 0.7	1.8 ± 0.9	1.4 ± 0.5	1.2 ± 0.5
Bax	48.9 ± 8.7	$87.2 \pm 9.5^{**}$	$82.5 \pm 6.3^{**}$	$71.4 \pm 5.9^*$	$64.3 \pm 11.2^*$

Data are $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control group treated with xanthine/xanthine oxidase alone.

细胞凋亡,降低细胞活力。通过比较相同剂量的 ROS 处理分化和未分化 PC12 细胞的细胞活力结果发现,分化后的 PC12 细胞对氧化压力更为敏感。用流式细胞仪对 ROS 处理后的神经分化 PC12 细胞进行定量分析,证实 ROS 能剂量和时间依赖地提高凋亡细胞的比例。这些现象说明在 ROS 处理 PC12 细胞后的细胞凋亡与环境氧化压力有很大关系。本文研究结果表明,在 ROS 损伤细胞前 2 h 加入菟丝子提取物能明显地减少 ROS 引起的细胞凋亡,提高细胞活力。

SOD 对机体的氧化和抗氧化平衡起着至关重要的作用,它能清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤。GSH 也能清除体内的自由基,稳定巯基酶,防止细胞受到氧化损伤,并能结合毒物,加速代谢。MDA 是脂质过氧化的产物,它的含量高可反映机体内脂质过氧化的程度。本文研究发现用 ROS 处理分化的 PC12 细胞后,细胞中的 Cu、ZnSOD 和 GSH 明显降低,MDA 含量增加。在预先用菟丝子提取物温育分化的 PC12 细胞后,培养细胞中的 Cu、ZnSOD 的活力和 GSH 的含量明显增加,MDA 含量明显减少,并有明显的剂量-效应关系。这说明菟丝子提取物能调节神经分化 PC12 细胞中的抗氧化系统,提高细胞清除自由基的能力。

为了检测 ROS 处理后 PC12 细胞中的凋亡相关基因的暂时变化,用流式细胞仪结合免疫细胞化学的方法定量分析了 p53 基因的表达。在对照组, p53 的阳性细胞比例仅为 8.6%,但是用 ROS 处理后, p53 的阳性细胞的比例大大提高。实验发现, p53

的表达在 ROS 处理后 3 h 达到最大,在大约 6 h 后即恢复到原来水平。p53 的短暂增加说明它在 ROS 诱导 PC12 细胞凋亡的早期阶段有重要作用。

研究发现在用 ROS 处理分化的 PC12 细胞 6 h 后 Bax 的表达也明显增加。但是 Bcl-2 的表达量无论在对照组和 ROS 处理的细胞中都很低。这一结果与其他研究小组的结果一致^[6,7]。PC12 细胞中另一个阻止凋亡的蛋白 Bcl-XL,也能抑制 ROS 引起的细胞凋亡^[5]。据文献报道^[8,9],在 ROS 诱导 PC12 细胞凋亡过程中, Bax 表达量明显增加;而在体外培养的大脑皮层神经元中,谷氨酸诱导的细胞凋亡时, Bax 的表达水平却没有多大变化。综合上述结论可知,在不同的细胞中,不同的刺激物、不同的环境条件下,细胞凋亡的机制是不一样的。研究结果表明菟丝子提取物在 PC12 细胞中不但具有神经营养因子样活性,而且具有对 ROS 引起 PC12 细胞损伤的保护作用;说明菟丝子在神经系统退行性疾病 PD、AD 的治疗方面具有良好的应用前景,其有效组分的分离及解析需要进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Greene LA et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, **73**: 2424
- [2] 刘建辉等. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30**: 226
- [3] Liu JH et al. *Int J Dev Neurosci*, 2003, **21**: 277
- [4] Zhou LJ et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, **293**: 982
- [5] Kosenko E et al. *Free Radical Biol Med*, 1999, **26**: 1369
- [6] Maroto R et al. *J Neurochem*, 1997, **69**: 514
- [7] Liu X et al. *Mol Brain Res*, 1999, **71**: 210
- [8] MAH SP et al. *J Neurochem*, 1993, **60**: 1183
- [9] Zhou LJ et al. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, **21**: 75

Neuroprotective Effect of *Cuscuta chinensis* Lam Extract on the Neuronal Differentiated PC12 Cells Damage Induced by Reactive Oxygen Species

Li-Hua Wang, Peng-Cheng Bu, Yong-Ming Bao*

(Department of Bioscience and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract The pharmacology and clinical application of traditional Chinese medicine has been extensively documented. In the present study, with the comparison of the expression of apoptosis proteins p53, Bax and Bcl-2, and the level of superoxidase, glutathione, malondialdehyde of neuronal differentiated PC12 cells in the absence and/or presence of *Cuscuta chinensis* Lam extract, we found that *Cuscuta chinensis* Lam extract, in a dose-dependent manner, prevents the neuronal differentiated PC12 cells damage from reactive oxygen species.

Key words *Cuscuta chinensis* Lam; reactive oxygen species; apoptosis