二苯乙烯苷通过抑制 NF-κ B 的激活减轻 MPP+ 诱导的 PC12 细胞凋亡 *

陶丽珍[1] 栗 艳[2] 李晓冰[1] 李晓峰[1] 孙 欣[1] 陈建宗[1△]

（第四军医大学西京医院：1 中医药研究中心，2 药剂科 陕西 西安 710032）

摘要 **目的：**探讨 2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-o-β -D- 葡萄糖苷(2，3，5，4'-tetrahydroxystibene-2-o-β -D-glucoside,TSG)对 1- 甲基 -4- 苯基吡啶离子(1-methy-4-phenylpyridinium，MPP+)诱导 PC12 细胞凋亡的影响及其可能机制。**方法：**四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色试验检测 PC12 细胞活性；Hoechst33258 染色法测定细胞凋亡；Western blotting 检测 NF-κ B(P65)和 Iκ Bα 蛋白的表达。**结果：**MPP+(300μ mol/L)作用于 PC12 细胞 24h 后，与正常对照组比较，细胞存活率降低(53.3± 3.4%)(P<0.01)；细胞染色质固缩，细胞核呈致密浓染。TSG(1,5,10μ mol/L)预处理 24h 后，细胞存活率增加(60.8± 1.9%),(70.1± 1.8%)(P<0.01),(81.2± 1.9%)(P<0.01)；细胞核凝聚明显减少，且具有量一效关系。另外，MPP+ 可使 PC12 细胞核中 NF-κ B (P65)蛋白表达升高，细胞浆中 Iκ Bα 蛋白表达降低；与 MPP+ 处理组细胞相比，TSG 预处理后，PC12 细胞核中高表达的 NF-κ B (P65)蛋白水平明显降低，细胞浆中低表达的 Iκ Bα 蛋白水平升高。**结论：**TSG 对 MPP+ 诱导的 PC12 细胞凋亡具有浓度依赖性的抑制作用，其作用机制可能与抑制 NF-κ B 的激活有关。

关键词：二苯乙烯苷；MPP+；PC12 细胞；凋亡；NF-κ B

中图分类号：Q95-3，R747.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2011)04-668-04

Effect of 2，3，5，4'-tetrahydroxystibene-2-o-β -D-glucoside in mitigation of MPP+-induced Apoptosis of PC12 Cells*

TAO Li-zhen[1], LI Yan[2], LI Xiao-feng[1], LI Xiao-bing[1], SUN Xin[1], CHEN Jian-zong[1△]

(1 Research Center of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032;

2 Pharmaceutical Preparation Section, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

ABSTRACT Objective: To explore the protective effect of TSG on MPP+ induced PC12 cells apoptosis. Methods: The PC12 cells viability was measured by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-y1]-2, 5-diphenyhetrazolium bromide(MTT).The morphological change of PC12 cells was observed by Hoechst 333258 staining. The expression level of NF-κ B (P65) and Iκ Bα protein was detected by Western blotting. Results: Compared with the control group, the ratio of cell survival decreased (53.3± 3.4%)(P<0.01); cyto-chromatin concentration; nucleus showing strong staining after MPP+ treatment with PC12 cells for 24h. The ratio of cell survival increased (60.8± 1.9%),(70.1± 1.8%)(P<0.01),(81.2± 1.9%)(P<0.01)after TSG (1, 5,10μ mol/L) pretreatment with PC12 cells for 24h; cyto-chromatin concentration reduced and show the relation between quantity and result. Moreover, MPP+ is able to increase the expression level of NF-κ B(P65)protein in the nucleus，decrease the expression level of Iκ Bα protein in the cytoplasm of PC12 cells. The high expression level of NF-κ B(P65) protein in the nucleus is decreased and the low expression level of Iκ Bα protein in the cytoplasm of PC12 cells is increased after TSG pretreatment with PC12 cells, compared with MPP+ treatment group. Conclusion: TSG plays a possible neuroprotective role in MPP+-induced apoptosis of PC12 cells by a concentration-dependent manner, and the mechanism of the effects of TSG may be involved in inhibiting NF-κ B activation.

Key words: tetrahydroxystilbene glucoside；MPP+；PC12 cells；apoptosis；NF-κ B

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, 747.2 Document code:A

Article ID:1673-6273(2011)04-668-04

前言

帕金森病(Parkinson's disease，PD)是一种常见的神经退化性疾病，以包括静止震颤，肌肉僵硬，自主运动减少，姿势不稳等运动异常为临床特点，其主要的神经病理学特点为黑质致密部多巴胺(Dopamine，DA)能神经元的丢失[1]。目前，PD 的治疗主要以症状治疗为主，对于延缓或保护其病理进展过程的药物尚处于探索阶段。2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-o-β -D- 葡萄糖苷 (2，3，5，4'-tetrahydroxystibene-2-o-β -D-glucoside,TSG) 是从中草药何首乌中提取的主要有效成分[2]。我们以前的研究显示，在体内 TSG 可改善 PD 大鼠的行为学改变，增加黑质 - 纹状体 DA 及其代谢物含量并提高黑质 DA 能神经元的残存率[3]。在

* 基金项目：国家自然科学基金(30772743)

作者简介：陶丽珍(1982-)，女，硕士研究生，主要研究方向：中西医结合临床老年脑病。E-mail: taolizhen-8888@163.com

△通讯作者：陳建宗，电话：029-84775354，E-mail: jzchen57@fmmu.edu.cn

（收稿日期：2010-11-07 接受日期：2010-11-30）

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

体外,TSG 可减轻 MPP+ 诱导的 PC12 细胞损伤和凋亡[4]。但是对于 TSG 保护神经元凋亡可能的机制尚未研究。

本研究采用 MPP+ 诱导 PC12 细胞凋亡建立 PD 体外模型,观察 TSG 对 PD 体外模型的影响,探讨 NF-κ B 系统是否参与了 TSG 对 PC12 细胞的神经保护作用,为研究 TSG 对 PD 的治疗作用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

TSG 购买于中国药品生物制品鉴定所(标准对照品,批号:110844 -200 606,HPLC 法检测纯度 >98%);MPP+、4- 甲基偶氮唑蓝(MTT)、Hoechst33258 购自 Sigma 公司;马血清、胎牛血清、DMEM 干粉培养基为 Gibco 公司产品;兔抗鼠 NF-κ B (P65)抗体和兔抗鼠 Iκ Bα 抗体购自江苏碧云天生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PC12 是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株,购于日本科学技术基金会。培养于 DMEM 培养基(含 10%马血清,5%胎牛血清,2mmol/L 的 L- 谷氨酰胺,100kU/L 青霉素,100g/L 链霉素)中,置于 37℃,含 5%CO_2 的孵育箱中培养。每 2-3d 换液一次,单层细胞融合 70-80%时,用 0.25%的胰蛋白酶消化,传代培养,当传代细胞进入对数生长期时进行实验处理。

1.2.2 药物处理 分组如下:1,对照组,未加任何实验药物;2,MPP+ 诱导组,MPP+ 用培养液稀释(终浓度为 300μ mol/L),加入到培养孔中;3,TSG 组:先分别加入终浓度为 1,5,10μ mol/L 的 TSG,孵育 24 小时后加入 MPP+ (浓度同上),每组样本量为 6-8。

1.2.3 MTT 比色法检测细胞活性 PC12 细胞(1× 10^5 个 /L)接种于 96 孔板,每孔 100ul,按实验要求进行药物处理后,吸尽培养液,PBS 冲洗 3 遍,每孔加入 5mg/L 的 MTT 溶液 20ul,370C 下继续孵育 3-4 小时,小心去除培养液,加入 150ulDMSO,震荡 10min,使蓝色结晶充分溶解,上酶标仪以波长 490nm 检测每孔吸光度值。细胞活性以与对照组相比的百分数表示。

1.2.4 Hoechst33258 染色检测细胞形态学变化 细胞接种于 24 孔板中,每孔内预置多聚赖氨酸包被的洁净玻片 1 张,接种密度为 2× 10^4 个 / 孔,24h 后进行药物干预;药物处理后,吸尽培养液,PBS 洗细胞 3min,2 次;用含 4%多聚甲醛的磷酸缓冲液(PB)固定 30min,去固定液,PBS 洗两遍;加入 Hoechst33258 染色液避光反应 5min,PBS 洗两遍;倒置荧光显微镜(Olympus,I× 71)下观察胞核形态,每组四张不同的玻片上各随机选取 4 个视野计数,凋亡细胞以占总细胞数的百分比表示。

1.2.5 Western blotting 检测 NF-κ B(P65)蛋白和 Iκ Bα 蛋白表达 提取的蛋白质先经 1000C 变性处理 5min,经聚丙烯酰胺凝胶(12%的分离胶、5%的堆积胶)电泳,然后转移至硝纤膜,分别加入一抗和 FITC 标记的二抗。膜与抗体反应 2h (室温),每次反应后,用 TBST 室温洗 5 次,每次 3min。最后进行 ECL 化学发光显影,全自动 X 光片洗片机洗片。结果采用凝胶图像分析仪进行分析。

1.3 统计学处理

结果 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示,统计分析采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析和 t 检验,p<0.05 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 TSG 对 MPP+ 引起 PC12 细胞活力下降的影响

1,5,10μ mol/L TSG 均可明显抑制 MPP+ 300μ mol/L 所引起的 PC12 细胞活性的降低,与 MPP+ 组相比具有显著性差异(P<0.01)。表明 TSG 具有对抗 MPP+ 诱导 PC12 细胞毒性的作用。与 MPP+ 组(53.3± 3.4)%相比,1,5,10 μ moL/L TSG 预处理组细胞活力分别上为(60.8± 1.9%), (70.1± 1.8%)(P<0.01), (81.2± 1.9%)(P<0.01),但高浓度 TSG(50,200μ mol/L)对细胞无保护作用(图 1)。因此选择 1,5,10μ mol/L TSG 3 个浓度进行下述实验。

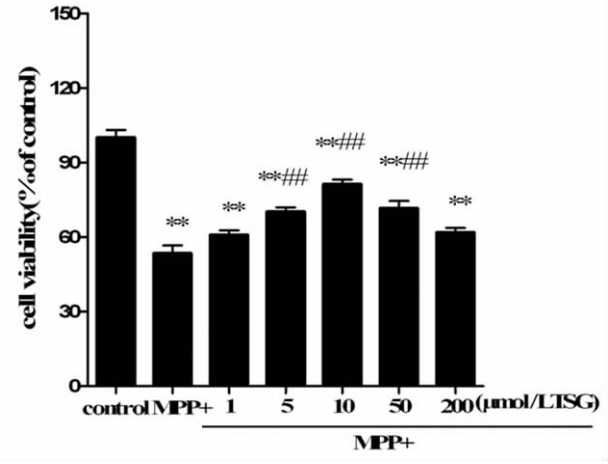

图 1 TSG 对 MPP+ 引起 PC12 细胞毒性的作用(n=6)

Fig1 Efects of TSG on MPP+ induced cytotoxicity in PC12 cells

**P<0.01,与对照组比;##P<0. 01,与 MPP+ 组比

**P<0.01, VS control; ##P<0. 01, VS MPP+ group

2.2 TSG 对 MPP+ 引起的 PC12 细胞核变化的影响

细胞核浓缩聚集是细胞凋亡的特征性表现之一。Hoechst33258 染色结果表明,对照组细胞为正常活性状态,细胞核呈蓝色,边缘光滑完整,均匀淡染(图 2 A)。MPP+ 处理 24h 后,大多数细胞核凝聚,细胞核呈致密浓染,显示较强荧光(亮蓝色)(图 2B)。1,5,10μ mol/LTSG 预处理可抑制 MPP+ 引起的细胞凋亡,细胞核凝聚明显减少,荧光强度依次减弱(图 2C-E)。表明 TSG 预处理可以浓度依赖的方式减少 MPP+ 诱导的 PC12 细胞凋亡。

2.3 TSG 对 MPP+ 引起的 PC12 细胞中 NF-κ B (P65) 蛋白和 Iκ Bα 蛋白表达的影响

由图可见(图 3),与对照组相比,MPP+ 处理 24 h 后细胞核内 NF-κ B(P65)蛋白表达水平明显增加(P<0.01),细胞浆中 Iκ -Bα 蛋白表达水平明显减少(P<0.01)。而 1,5,10μ mol/LTSG 预处理后,核内 NF-κ B(P65)蛋白表达水平明显降低,浆中 Iκ -Bα 蛋白表达水平明显上升。提示 TSG 预处理可明显降低 MPP+ 诱导的 PC12 细胞中 NF-kB 的激活,且这种降低具有剂量依赖性。

3 讨论

近年来,许多学者对 PD 做了大量的研究,然而由于其发

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

病机制十分复杂,至今尚未明了。但是,大量的证据已经表明不同因素引起 PD 发病,都是以神经元的凋亡为最终表现[5]。细胞凋亡有多种信号通路的参与, 如 ROS,NO,MAPK,PI3K,PCK, NF-kB 等信号通路。NF-κ B 在外周炎症反应中起着关键的作用[6],并且参与了调节细胞凋亡与抗细胞凋亡基因的表达[7]。在正常环境下,NF-κ B, 异源二聚体是由 50KD (P50) 和 65KD (P65)亚单位组成,NF-κ B 结合到一种抑制物蛋白 IkB 上,该蛋白隔离了 NF-κ B。NF-κ B 的激活是从 IkB 上解离, 接着 P50-P65 异源二聚体转录到核内,结合到相关的 DNA 序列上[8]。

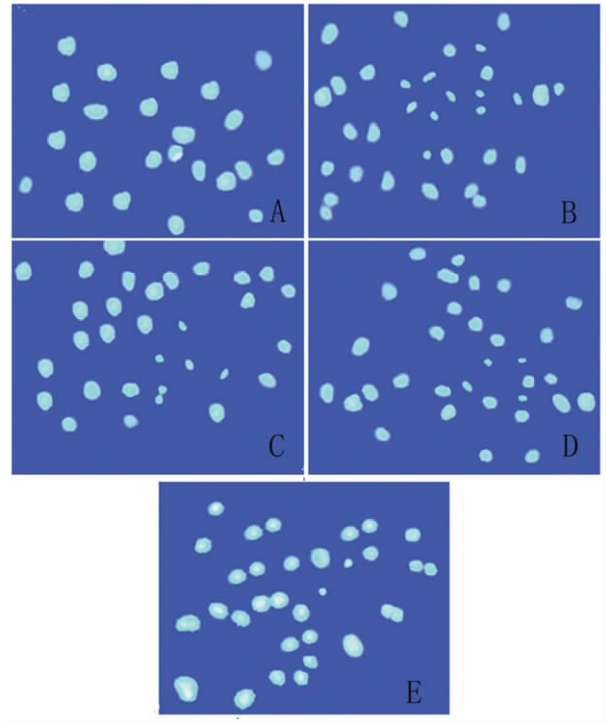

图 2 TSG 对 MPP+ 诱导的 PC12 细胞凋亡的保护作用(× 200)

Fig 2 The protective effect of TSG on MPP+ induced apoptosis in PC12 cells

A:对照组;B:MPP+ 组;C:1μ mol/LTSG+MPP+ 组;D: 5μ mol/LTSG+MPP+ 组;E: 10μ mol/LTSG+MPP+ 组

A:control;B:MPP+group;C:1μ mol/LTSG+MPP+ group;D: 5μ mol/LTSG+MPP+ group;E:10μ mol/LTSG+MPP+ group

有研究提出,NF-κ B 在 PD 的发病机制中起着一定的作用,尸体解剖证据表明在 PD 病人黑质 DA 能神经元中有很强的 RelA 核转录位。体外证据进一步表明,在神经退化疾病中,NF-κ B 激活可能和 DA 能神经元细胞凋亡有关,并表明 PD 病人细胞核内的免疫反应 NF-κ B 多巴胺能神经元所占的比例约为正常对照人群的 70 倍[8]。也有研究显示在 PD 病人黑质致密部中的反应性小神经胶质和 DA 神经元中,通过 Fenton 反应增加了 ROS,铁的增加启动了氧化应激,导致了 NF-κ B 的激活[9]。还有研究表明,在啮鼠动物 PD 模型中,通过一种 NF-κ B 依赖的 P53 信号通路,NF-κ B 的激活至少部分的对氧化应激引起的 DA 能神经元退化发挥了作用 [10]。另有研究显示,对 NF-κ B (P65) 选择性的抑制可以保护 MPTP 小鼠 PD 模型中 DA 能神经细胞的丢失[12]。

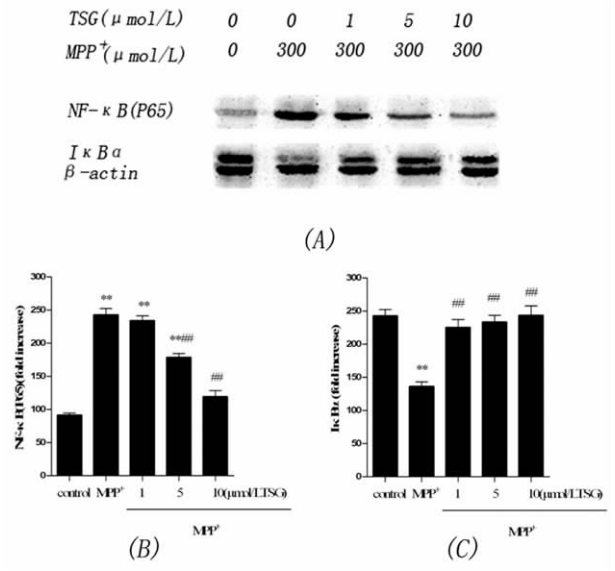

图 3 TSG 对 MPP+ 诱导的 PC12 细胞中 NF-κ B(P65)蛋白和 IK Bα 蛋白表达的作用

Fig3 The effect of TSG on MPP+- induced the expression of NF-κ B(P65) and IK Bα protein in PC12 cells.

**P<0.01, 与对照组相比;##P<0.05,与 MPP+ 组相比

**P<0.01,VS control; ##P<0.05,VS MPP+group

本实验采用 MPP+ 诱导的 PC12 细胞模型模拟 PD 体外损伤,通过实验我们发现,MPP+ 处理组细胞活性明显下降,凋亡增多,而用 TSG(1,5,10μ mol/L)预处理 24h 后,细胞活性明显增高,细胞凋亡减少。本研究还观察到 300μ mol/L MPP+ 处理 PC12 细胞 24h 后,细胞核内 NF-κ B(P65)蛋白水平增加,细胞浆中 Iκ Bα 蛋白水平明显降低。但是经 TSG (1,5, 和 10μ mol/L)预处理 24h 后,细胞内 NF-κ B(P65)蛋白水平增加依次降低,细胞浆中 Iκ Bα 蛋白水平依次增加。

上述实验结果表明,TSG 在一定浓度范围内对 MPP+ 诱导的 PC12 细胞凋亡具有保护作用。抑制 NF-κ B 的激活可能是其机制之一。

参 考 文 献(references)

[1] Cheng B,Yang X,Hou Z, et al. D-beta-hydroxybutyrate inhibits the apoptosis of PC12 cells induced by 6-OHDA in relation to upregulating the ratio of Bcl-2/Bax mRNA [J]. Auton Neurosci, 2007,134 (1-2):38-44

[2] 张兰,李林,李雅莉.何首乌有效成分二苯乙烯甙对神经细胞保护作用的机制[J].中国临床康复,2004,8(1):118-120
Zhang Lan, Li Lin, Li Ya-li, et al. Mechanism of the protection of stilbene glycoside which is the effective component of tuber fleeceflower root on nerve cells [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2004,8(1): 38-44(In Chinese)

[3] 贾新,陈建宗,杨志福,等.二苯乙烯苷对帕金森病模型大鼠行为学及多巴胺能神经元的影响[J].中国新药杂志,2008,17(9):748-752
Jia Xin, Chen Jian-zong, Yang Zhi-fu, et al. Neuroprotective effect of tetrahydroxystilbene glucoside on the rat model of Parkinson's disease [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2008, 17(9): 748-752.(In Chinese)

[4] 孙欣,顾宜,李晓峰,等.二苯乙烯苷对抗 MPP+ 诱导的 PC12 细胞凋亡的作用[J]. 第四军医大学学报,2009,30(24):2910-2913

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Sun Xin, Gu Yi, Li Xiao-feng, et al. Efect of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β -D -glucoside against MPP induced apoptosis in PC12 cells[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2009, 30(24):2910-2913(In Chinese)

[5] Battisti C, Formichi P, Radi, E, et a1. Oxidative stress induced apoptosis in PBLs of two patients with Parkinson disease secondary to a-synudein mutation[J]. J Neurol Sci, 2008, 267(1-2):120-124

[6] Makarov SS. NF-kappaB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent Advances [J]. Mol Med Today, 2000, 6(11):441-448

[7] Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerativedisorders[J]. J Clin Invest, 2001,107(3):247-254

[8] Thanos D, Maniatis T.NF-kappaB: a lesson in family values[J]. Cell, 1995,80(4):529-532

[9] Hunot S,Brugg B,Ricard D,et al. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997,94(14):7531-7536

[10] Youdim MB, Grunblatt E, Mandel S. The pivotal role of iron in NF-kappaB activation, and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. Prospects for neuroprotection in Parkinson's disease with iron chelators[J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 890: 7-25

[11] Liang ZQ, Li YL, Zhao XL, et al. NF-kappaB contributes to 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of nigral dopaminergic neurons through p53[J]. Brain Res, 2007, 1145:190-203

[12] Ghosh A, Roy A, Liu X, et al. Selective inhibition of NF-kB activation Prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease [J]. Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 2007, 104(47): 18754-18759

(上接第 676 页)

[7] Ulmer, J.B., B. Wahren, and M.A. Liu, Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances [J]. Trends Mol Med, 2006, 12(5): 216-22

[8] Hege, K.M., K. Jooss, and D. Pardoll, GM-CSF gene-modifed cancer cell immunotherapies: of mice and men [J]. Int Rev Immunol, 2006, 25(5-6): 321-52

[9] Eager, R. and J. Nemunaitis, GM-CSF gene-transduced tumor vaccines [J]. Mol Ther, 2005,12(1): 18-27

[10] Soiffer, R., et al., Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(17): 3343-50

[11] Simons, J.W., et al. Phase I/II trial of an allogeneic cellular immunotherapy in hormone-naive prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(11 Pt 1): 3394-401

[12] Nemunaitis, J., et al., Phase 1/2 trial of autologous tumor mixed with an allogeneic GVAX vaccine in advanced-stage non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2006,13(6): p. 555-62

[13] 张维红, et al., Gm-Csf 基因修饰同种异体肺癌细胞疫苗诱导 cd8^+T 细胞的免疫反应[J]. 免疫学杂志, 2008. 24(5): 545-548.
Zhang Wei-hong, et al. Gm-Csf gene-modified allogeneic lung cancer cell vaccine induced cd8 ^ + T cells in the immune response[J]. Immunology, 2008,24 (5): 545-548

[14] Chen, S., et al. Absence of CD83-positive mature and activated dendritic cells at cancer nodules from patients with hepatocellular carcinoma: relevance to hepatocarcinogenesis [J]. Cancer Lett, 2000. 148 (1): 49-57

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net