

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.11.005

白藜芦醇对 6-羟基多巴所致 SN4741 细胞损伤的保护作用和机制研究*

杨瑞鑫 高立 黄露 李玉骞 高国栋[△]

(第四军医大学附属唐都医院神经外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨白藜芦醇对 6-羟基多巴引起的细胞损伤的内在保护机制。**方法:**以 SN4741 细胞系为实验对象,分为对照组、6-羟基多巴处理组和白藜芦醇预处理、6-羟基多巴处理组。MTT 法测定细胞活性。Western blot 检测细胞内 DJ-1 表达水平。ROS 检测反映细胞的氧化应激水平和线粒体损伤情况。线粒体膜电位检测反映细胞线粒体功能。**结果:**白藜芦醇可以剂量依赖性方式提高 6-OHDA 诱导的 SN4741 细胞的存活率。白藜芦醇预处理显著逆转 6-OHDA 诱导的 SN4741 细胞 DJ-1 水平的下降,降低 6-OHDA 引起的氧化应激水平和线粒体损伤。**结论:**白藜芦醇预处理能够保护 6-羟基多巴所致的 SN4741 细胞损伤,可能与提高 DJ-1 的表达,减轻细胞内的氧化应激水平,改善线粒体功能有关。

关键词:白藜芦醇;DJ-1;帕金森病;氧化应激;线粒体功能

中图分类号:R-33;R742.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)11-2020-04

Resveratrol Protects the Impairment of SN4741 Cells Induced by 6-Hydroxy Dopamine*

YANG Rui-xin, GAO Li, HUANG Lu, LI Yu-qian, GAO Guo-dong[△]

(Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism underlying the protection effect of resveratrol against 1. cellular impairment induced by 6-hydroxy dopamine. **Methods:** SN4741 cells were divided into three groups: the control group, the 6-hydroxy dopamine treated group and the resveratrol pre-treated group. The cellular viability were measured by MTT assay. DJ-1 level were assessed by Western-Blot assay. ROS level, and MMP were detected to reflect cellular oxidative stress level and mitochondrial function. **Results:** Resveratrol alleviated 6-hydroxy dopamine induced cell death through a dose dependent manner. Pre-treatment of resveratrol significantly relieved the reduction of DJ-1 level induced by 6-hydroxy dopamine, which contributed to a lower oxidative stress level and milder mitochondrial injury. **Conclusions:** Pre-treatment of resveratrol protects cellular damage induced by 6-hydroxy dopamine. Moreover, it also alleviates cellular oxidative stress level and improves mitochondrial function. All these effects may due to promoting expression of DJ-1 protein induced by resveratrol.

Key words: Resveratrol; DJ-1; Parkinson's Disease; Oxidative Stress; Mitochondrial function

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R742.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)11-2020-04

前言

帕金森病(Parkinson's Disease, PD)又称震颤麻痹,主要临床症状表现为静止性震颤、姿势异常、运动迟缓和肌强直,主要病理表现是大脑黑质部多巴胺能神经元的特异性丢失和死亡以及路易式小体的形成^[1,2]。由于帕金森病临床治疗手段有限,预后差,对于老年人生活质量影响严重,因而寻找疗效确切、副作用小的药物愈来愈成为人们研究的焦点。6-羟基多巴(6-Hydroxy Dopamine, 6-OHDA)是一种广泛应用的 PD 模型的造模药物,以引起细胞氧化应激损伤为其主要的药理作用,而氧化应激正是帕金森病的潜在发病机制之一。白藜芦醇(Resveratrol, Res)是一种非黄酮类多酚化合物,主要存在于葡

萄属等 21 个科、31 个属的至少 72 种植物中,其中包括虎杖、决明、桑树等常见的药用植物以及葡萄、花生等农作物^[3]。白藜芦醇的生物学活性非常广泛^[4],具有包括抗衰老^[5]、抗肿瘤^[6,7]、预防心脑血管疾病^[8,9]、抗氧化^[10]等多种药理学作用。白藜芦醇的抗氧化作用是其中最重要的一环,因为氧化损伤是衰老、卒中、DNA 损伤的重要原因^[11]。氧化应激是最常见的细胞氧化损伤,并且被认为是帕金森病的重要发病机制之一^[12]。近年来,关于白藜芦醇抗氧化作用的研究很多,但其具体机制仍不明确。本研究以小鼠多巴胺能神经元细胞系 SN4741 为研究对象,体外建立 6-羟基多巴诱导的帕金森病模型,检测白藜芦醇对细胞氧化损伤的影响,并探讨白藜芦醇保护作用的潜在机制,以期为帕金森病的发病机制和白藜芦醇的临床应用提供更多的实验

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81401044);陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2014JQ2-8052)

作者简介:杨瑞鑫(1991-),博士研究生,主要研究方向:帕金森病,线粒体功能失调与氧化应激, E-mail: yangruixinfmmu@126.com

[△] 通讯作者:高国栋(1954-),博士,主任医师,教授,主要研究方向:帕金森病,高血运肿瘤综合治疗, E-mail: gguodong@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2016-10-19 接受日期:2016-11-08)

依据。

1 材料与方法

1.1 材料

SN4741 细胞受赠于美国 Emory 大学药理学系毛子胥教授实验室, 培养于 DMEM 高糖培养液 (10 % FBS、2 mM L-Glu、1 % D-Glu)。白藜芦醇、6-OHDA 和 MTT 均购自 Sigma 公司, DJ-1 和 β -actin 抗体购自美国 Abcam 公司, CM-H2DCFDA 和 TMRE 购自 Invitrogen 公司。其余试剂均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 SN4717 细胞的培养 SN4717 细胞是一种小鼠多巴胺能神经元细胞系, 33 °C、5 % CO₂ 培养于 DMEM 高糖培养液 (10 % FBS、2 mM L-Glu、1 % D-Glu), 处理时将细胞融合至 90 %-100 % 的 100 mm 培养皿中培养液吸净, PBS 溶液洗一遍, 1 mL 0.25 % 胰酶 372 消化 1 min, 之后加入 1 mL 培养液, 吹洗细胞至悬浮状态, 800 rpm 离心 5 min, 弃去胰酶和培养液, 加入 1 mL 培养液重悬, 接种至 6 孔板。6 孔板每个孔加入细胞重悬液 50 μ L, 培养 12-18 h, 培养至细胞融合度 50 %-60 % 时即可进行下一步处理。

1.2.2 细胞活性的检测 本实验采用 MTT 法检测细胞活性。将 SN4741 细胞接种至 96 孔板, 按需处理后, 加入 MTT 染料, 37 °C, 反应 4 h, 之后加入 Dimethyl 溶解细胞内的 MTT, Bio-Rad 酶标仪检测吸光值。

1.2.3 Western-Blot 检测蛋白表达 PBS 冲洗细胞三次, 之后加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液提取蛋白。12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品蛋白, 之后用半干转法将凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜 (Millipore) 上, 2 % BSA、室温封闭 40-60 min, TBST 清洗一次后孵育一抗 4 °C 洗摇床过夜。TBST

洗三次, 室温孵育结合了辣根过氧化物酶的二抗 (Millipore) 1 h, TBST 再次清洗三次后 Bio-Rad 化学发光仪检测蛋白水平。

1.2.4 活细胞 ROS 水平检测 不同处理组的 SN4741 细胞处理结束后, 加入 CM-H2DCFDA 染料进行 ROS 染色。用终浓度为 5 μ M 的染料 33 °C 孵育细胞 30 min, 之后 PBS 清洗三遍后, 进行细胞计数, 取相同数量细胞用 Bio-Rad 酶标仪进行荧光水平检测。染料激发光波长 485 nm, 发射光波长 535 nm。

1.2.5 线粒体膜电位 (MMP) 的检测 采用 TMRE 检测线粒体膜电位。不同组细胞处理结束后, 用终浓度为 200 nM 的 TMRE 33 °C 孵育细胞 20 min, PBS 清洗三遍之后, 收集细胞, 流式细胞仪计数阳性细胞数目。

1.3 统计学分析

应用 SPSS19.0 进行统计学分析, 计算均值和标准差 ($\bar{x} \pm s$), 多组间差异采用单因素方差分析 (one way ANOVA), 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇提高 6-OHDA 诱导的 SN4741 细胞的存活率

选取不同浓度梯度的 6-OHDA 处理 SN4741 细胞 24 h, MTT 法检测细胞活性, 6-OHDA 对细胞活性影响呈剂量依赖性 (图 1A)。当 6-OHDA 浓度为 80 μ M 时, 细胞活性相比对照组表现出显著下降 ($P < 0.05$), 因此选取 80 μ M 作为后续实验处理浓度。不同浓度白藜芦醇预处理细胞 24 h, 之后加入 6-OHDA, 24 h 后 MTT 法检测细胞活性。结果显示: 单纯白藜芦醇处理并不显著影响细胞活性, 然而在 6-OHDA 引起的细胞活性下降方面, 终浓度为 100 μ M 的白藜芦醇表现出较为显著的保护作用 ($P < 0.05$), 并且呈明显的剂量效应关系 (图 1B)。此结果表明白藜芦醇可提高 6-OHDA 诱导的 SN4741 细胞的存活率。

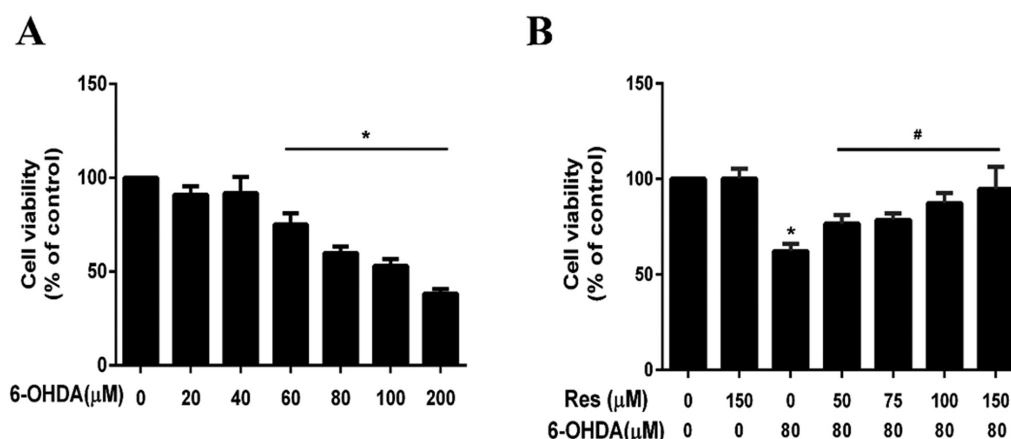


图 1 白藜芦醇提高 6-OHDA 诱导的 SN4741 细胞的存活率 (* 与对照组相比, # 与处理组相比)

Fig.1 Resveratrol enhanced the cell viability of SN4741 cells induced by 6-hydroxy dopamine (*Compared with control group, #compared with treated group)

2.2 白藜芦醇显著逆转 6-OHDA 诱导的 SN4741 细胞 DJ-1 水平的下降

DJ-1 作为细胞中重要的抗氧化分子, 在氧化应激中能保护线粒体的功能并减少线粒体损伤。DJ-1 的下调会导致多种线粒体功能障碍。为了检测白藜芦醇是否通过影响 DJ-1 的水平影响了细胞活性, 我们使用白藜芦醇预处理 SN4741 细胞 24

h, 之后再加入 6-OHDA 处理 24 h, Western blot 检测不同组的 DJ-1 水平。结果显示, 单独 6-OHDA 处理 SN4741 细胞时, DJ-1 水平明显下降。然而白藜芦醇预处理 24 h 后, DJ-1 水平较单独 6-OHDA 处理提高, 但仍较对照组偏低 ($P < 0.05$, 图 2)。实验结果表明白藜芦醇能够显著逆转 6-OHDA 诱导的 SN4741 细胞 DJ-1 水平的下降。

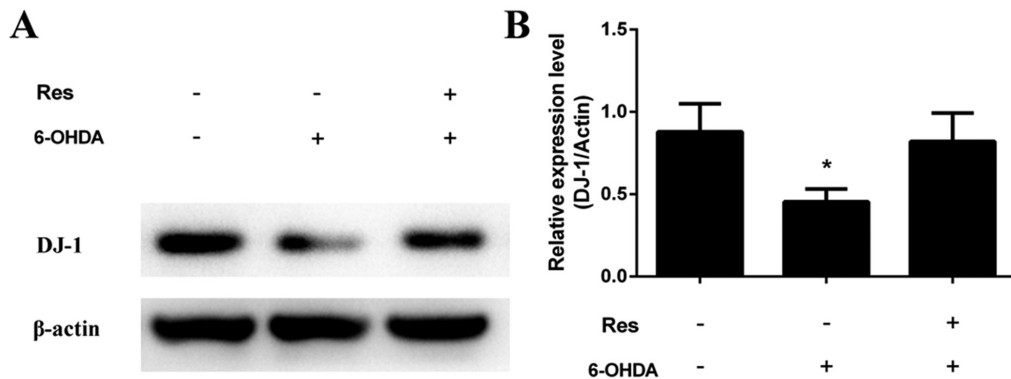


图2 白藜芦醇显著逆转 6-OHDA 诱导的 SN4741 细胞 DJ-1 水平的下降
Fig.2 Resveratrol significantly reversed 6-hydroxy dopamine induced decline of DJ-1 level

2.3 白藜芦醇能够减轻 6-OHDA 诱导的 SN4741 细胞线粒体损伤

有文献报道 DJ-1 能够保护线粒体功能^[13],在氧化应激条件下,调节线粒体,起到保护作用^[14]。上述实验结果表明白藜芦醇能够保护细胞内 DJ-1 的水平,那么在功能上面是否也能起到保护线粒体的作用? 我们同样使用白藜芦醇预处理 SN4741 细胞 24 h, 之后再加入 6-OHDA 处理 24 h。分别使用 CM-H₂DCFDA 和 TMRE 处理细胞,检测细胞内反应活性氧簇

(Reactive oxygen species,ROS) 水平和线粒体膜电位(Mitochondrial membrane potential,MMP)。白藜芦醇预处理组细胞内的 ROS 水平明显低于单纯 6-OHDA 组($P<0.05$),并且较接近对照组水平(图 3A)。同样,白藜芦醇预处理组细胞较单纯 6-OHDA 组拥有较高的 MMP 水平($P<0.05$,图 3B)。低水平的 ROS 和高水平的 MMP 均说明细胞线粒体功能较为完好,处于较低的氧化应激水平。因此,该实验结果表明白藜芦醇能够降低 6-OHDA 引起的氧化应激水平和线粒体损伤,保护线粒体功能。

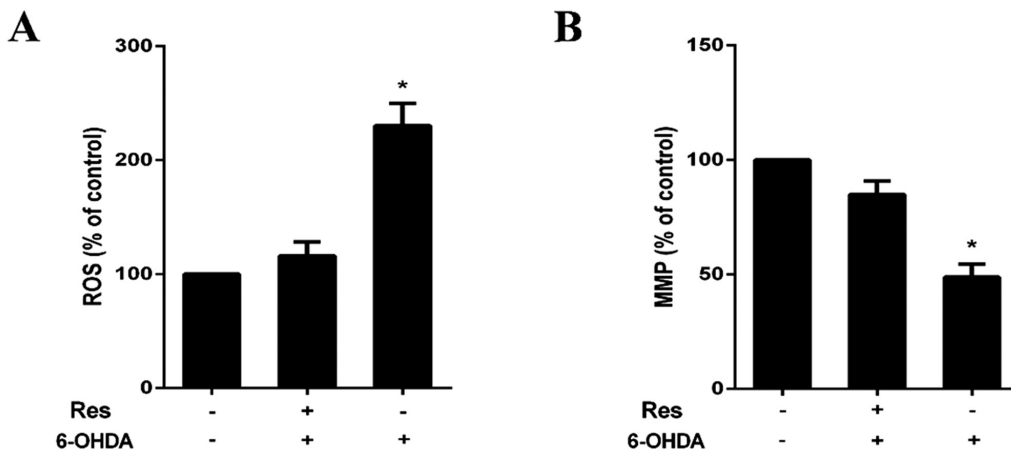


图3 白藜芦醇显著减轻 6-OHDA 诱导的 SN4741 细胞氧化应激水平和线粒体损伤

Fig.3 Resveratrol significantly relieves ROS level and protects mitochondrial function of SN4741 cells induced

3 讨论

帕金森病是世界第二大神经退行性疾病,其病理特征表现为:(1)黑质致密部多巴胺能神经元特异性的缺失和死亡,导致纹状体多巴胺水平减少,表现出一系列的锥体外系异常的表现^[15];(2)存活的多巴胺能神经元中路易氏小体的形成,即 α -Synuclein 的异常累积,导致存活的功能障碍,进一步影响纹状体的多巴胺水平^[16]。目前的观点认为帕金森病是基因易感性和环境因素双重作用的结果^[17]。不论是家族性还是散发性帕金森病,氧化应激、线粒体功能障碍和蛋白质代谢紊乱都与帕金森病的发病密切相关^[12,18]。

近年来,越来越多的表明白藜芦醇对神经退行性疾病的预防和治疗有着相当重要的作用^[19,20],但其保护作用潜在的分子机制尚不十分清楚。近期有研究显示白藜芦醇能够改善帕金森病小鼠模型的运动障碍和病理学改变^[21],还有研究提到在高脂

饮食引起的神经退行性病变中,白藜芦醇能够增进线粒体功能^[22]。本研究以小鼠多巴胺能神经元 SN4741 细胞系为实验对象,通过细胞活性、ROS 水平和线粒体膜电位检测等手段进一步探讨了白藜芦醇对于 6-OHDA 诱导的帕金森病模型的保护作用及其内在的机制。实验结果显示白藜芦醇能够保护 6-OHDA 引起的 SN4741 细胞损伤,并且能够降低 ROS 水平,维持线粒体膜电位,而这些保护作用我们认为可能与 DJ-1 有关。

DJ-1 即 PARK7,作为家族性帕金森病的突变基因之一,在帕金森病的发病中起到了重要的作用^[23,24]。DJ-1 自身作为一个细胞内的抗氧化分子,能够直接运用自身的还原性基团消除细胞内的 ROS,减轻细胞内的氧化应激水平,此外还能参与转录调控和调节线粒体功能^[25]。DJ-1 敲除小鼠对于帕金森病的造模药物如 MPTP 和 6-OHDA 引起的神经元死亡较野生型小鼠敏感的多,而在黑质致密部腺病毒过表达 DJ-1 则能减轻药物引起的神经元死亡^[26]。蔡志标等的研究显示 DJ-1 水平的提高可

以保护 MPTP 引起的细胞损伤,并且能够降低 ROS 水平,保护线粒体膜电位^[27]。这些结果都说明细胞内 DJ-1 水平的提高对于细胞的抗氧化反应和线粒体功能都有着良好的保护作用,而本实验结果也显示白藜芦醇能够提高细胞内的 DJ-1 水平,并且减少 6-OHDA 引起的氧化应激损伤。而白藜芦醇的这一保护作用究竟是通过上调 DJ-1 水平引起的,还是能够直接降低细胞内 ROS 水平、保护线粒体,这其中的具体机制还有待进一步阐明。

综上所述,白藜芦醇能够减少 6-OHDA 引起的细胞死亡,增强细胞活性,上调细胞内 DJ-1 水平,并保护线粒体的功能,其确切机制还有待进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Lang A E, Lozano A M. Parkinson's disease. First of two parts [J]. N Engl J Med, 1998, 339(15): 1044-1053
- [2] Foltynie T, Kahan J. Parkinson's disease: an update on pathogenesis and treatment[J]. Journal of neurology, 2013, 260(5): 1433-1440
- [3] Bavaresco L, Lucini L, Busconi M, et al. Wine Resveratrol: From the Ground Up[J]. Nutrients, 2016, 8(4): 222
- [4] Kursvietiene L, Staneviciene I, Mongirdiene A, et al. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol [J]. Medicina (Kaunas, Lithuania), 2016, 52(3): 148-155
- [5] Gomez S S, Gacar N, Utkan T, et al. Protective effects of resveratrol on aging-induced cognitive impairment in rats [J]. Neurobiology of learning and memory, 2013, 23(Suppl 2): 131-136
- [6] Clark P A, Bhattacharya S, Elmayan A, et al. Resveratrol targeting of AKT and p53 in glioblastoma and glioblastoma stem-like cells to suppress growth and infiltration [J]. Journal of neurosurgery, 2016, 15: 1-13
- [7] Deus C M, Serafim T L, Magalhaes-Novais S, et al. Sirtuin 1-dependent resveratrol cytotoxicity and pro-differentiation activity on breast cancer cells[J]. Archives of toxicology, 2017, 91(3): 1261-1278
- [8] Huang H, Chen G, Liao D, et al. The effects of resveratrol intervention on risk markers of cardiovascular health in overweight and obese subjects: a pooled analysis of randomized controlled trials[J]. Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity, 2016, 17(12): 1329-1340
- [9] Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and Cardiovascular Diseases[J]. Nutrients, 2016, 8(5): 250
- [10] Malhotra A, Bath S, Elbarbry F. An Organ System Approach to Explore the Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Cytoprotective Actions of Resveratrol [J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2015, 2015, 803971
- [11] Sun A Y, Wang Q, Simonyi A, et al. Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases [J]. Molecular neurobiology, 2010, 41(2-3): 375-383
- [12] Sai Y, Zou Z, Peng K, et al. The Parkinson's disease-related genes act in mitochondrial homeostasis [J]. Neuroscience and biobehavioral reviews, 2012, 36(9): 2034-2043
- [13] Zhang Y, Gong X G, Wang Z Z, et al. Overexpression of DJ-1/PARK7, the Parkinson's disease-related protein, improves mitochondrial function via Akt phosphorylation on threonine 308 in dopaminergic neuron-like cells [J]. Eur J Neurosci, 2016, 43 (10): 1379-1388
- [14] Di Nottia M, Masciullo M, Verrigni D, et al. DJ-1 modulates mitochondrial response to oxidative stress: clues from a novel diagnosis of PARK7[J]. Clin Genet, 2016
- [15] Lang A E and Lozano A M. Parkinson's disease. Second of two parts [J]. N Engl J Med, 1998, 339(16): 1130-1143
- [16] Bartels T, Choi J G, Selkoe D J. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation[J]. Nature, 2011, 477(7362): 107-110
- [17] Costa F, Sousa Gomes P, Fernandes M H. Osteogenic and Angiogenic Response to Calcium Silicate-based Endodontic Sealers [J]. Journal of endodontics, 2016, 42(1): 113-119
- [18] Vilchez D, Saez I, Dillin A. The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases[J]. Nature communications, 2014, 5: 56-59
- [19] Fu W, Zhuang W, Zhou S, et al. Plant-derived neuroprotective agents in Parkinson's disease [J]. American journal of translational research, 2015, 7(7): 1189-1202
- [20] Ferretta A, Gaballo A, Tanzarella P, et al. Effect of resveratrol on mitochondrial function: implications in parkin-associated familial Parkinson's disease[J]. Biochimica et biophysica acta, 2014, 1842(7): 902-915
- [21] Guo Y J, Dong S Y, Cui X X, et al. Resveratrol alleviates MPTP-induced motor impairments and pathological changes by autophagic degradation of alpha-synuclein via SIRT1-deacetylated LC3 [J]. Molecular nutrition & food research, 2016, 60(10): 2161-2175
- [22] Palomera-Avalos V, Grinan-Ferre C, Puigoriol-Ilamola D, et al. Resveratrol Protects SAMP8 Brain Under Metabolic Stress: Focus on Mitochondrial Function and Wnt Pathway [J]. 2016 [Epub ahead of print]
- [23] Abdel-Salam O M. The paths to neurodegeneration in genetic Parkinson's disease[J]. CNS & neurological disorders drug targets, 2014, 13 (9): 1485-1512
- [24] Hanagasi H A, Giri A, Kartal E, et al. A novel homozygous DJ1 mutation causes parkinsonism and ALS in a Turkish family [J]. Parkinsonism & related disorders, 2016, 29: 117-120
- [25] Ariga H, Takahashi-Niki K, Kato I, et al. Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease [J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2013, 2013, 683920
- [26] Kim R H, Smith P D, Aleyasin H, et al. Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(14): 5215-5220
- [27] Cai Z, Zeng W, Tao K, et al. Myricitrin alleviates MPP(+)-induced mitochondrial dysfunction in a DJ-1-dependent manner in SN4741 cells [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2015, 458(2): 227-233