

## 利福平对鱼藤酮致分化 PC12 细胞氧化应激的影响

陈世文, 孙元林, 曾志芬, 陶恩祥\*

(中山大学附属第二医院神经内科, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】探讨利福平对鱼藤酮诱导的分化大鼠嗜铬细胞瘤细胞株(PC12)细胞形态、活性氧(ROS)、还原型谷胱甘肽(GSH)及细胞凋亡的影响。【方法】利用鱼藤酮诱导分化 PC12 细胞建立帕金森病体外细胞模型;显微镜下观察细胞形态,酶标仪检测细胞还原型谷胱甘肽,流式细胞仪检测细胞活性氧和凋亡。【结果】鱼藤酮组细胞内还原型谷胱甘肽含量低于两对照组,而活性氧含量及凋亡率均高于两对照组;经 100、200 和 300  $\mu\text{mol/L}$  各浓度利福平预处理后,利福平预防组 3 组细胞内活性氧含量及凋亡率均低于鱼藤酮组,而细胞内还原型谷胱甘肽含量高于鱼藤酮组,且存在浓度依赖性。【结论】利福平可能通过氧化应激途径减轻鱼藤酮诱导的分化 PC12 细胞的损伤作用,且存在浓度依赖性。

**关键词:** 利福平; 鱼藤酮; 活性氧; 还原型谷胱甘肽; 帕金森病

中图分类号: R74 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)04-0377-04

### Effects of Rifampicin on Rotenone-induced Oxidative Stress in Differentiated PC12 Cells

CHEN Shi-wen, SUN Yuan-lin, ZENG Zhi-fen, TAO En-xiang\*

(Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】 To explore the effects of rifampicin on cell morphology, intracellular reactive oxygen species (ROS), reduced glutathione (GSH), and cell apoptosis in rotenone-induced differentiated pheochromocytoma (PC12) cells. 【Methods】 Rotenone was added in rat PC12 cells to develop a model of Parkinson's disease *in vitro*. Cell morphology was observed by microscope. Intracellular GSH was determined by a microplate reader. The intracellular ROS and the apoptosis rate were measured by flow cytometry. 【Results】 Compared with control group and rifampicin control group, GSH significantly decreased but ROS and apoptosis rate significantly increased in rotenone group. Compared with rotenone group, GSH significantly increased but ROS and apoptosis rate significantly decreased in a dose-dependent manner in rifampicin control group (100, 200, and 300  $\mu\text{mol/L}$ ). 【Conclusion】 Rifampicin may reduce the damage of rotenone-induced differentiated PC12 cells through inhibiting oxidative injury in a dose-dependent manner.

**Key words:** rifampicin; rotenone; reactive oxygen species; reduced glutathione; Parkinson's disease

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2009, 30(4):377-380]

帕金森病(Parkinson's disease, PD)病理主要特征为黑质致密部多巴胺能神经元的变性、死亡,而细胞凋亡是其神经元死亡的主要机制<sup>[1]</sup>。目前认为 PD 发病与氧化应激、线粒体功能障碍及  $\alpha$ -突触核蛋白异常有关。因此减轻氧化应激可作为药物作用的靶点之一,用于神经保护药的筛选。研究表明,利福平(rifampicin)可能作为一种抗氧化剂起抗细胞凋亡和神经保护作用<sup>[2-3]</sup>,

但具体的机制尚不清楚。本课题组前期研究显示利福平在体内外具有神经保护作用<sup>[4-5]</sup>。为探讨利福平是否通过减轻细胞氧化应激减少细胞凋亡,本研究以大鼠嗜铬细胞瘤细胞株(rat pheochromocytoma, PC12)为对象<sup>[6]</sup>,利用鱼藤酮制作细胞氧化应激模型,检测利福平对分化 PC12 细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)及还原型谷胱甘肽(reduced glutathione,

收稿日期: 2008-11-07

基金项目: 广东省自然科学基金(7001599)

作者简介: 陈世文, 硕士生, 现在广东江门市中心医院神经内科(529030), E-mail: seven.3406@163.com; \* 通讯作者, 陶恩祥, 博士生导师, E-mail: taoenxiang@yahoo.com.cn

GSH)的影响,探讨利福平保护神经元细胞的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

分化PC12细胞由中山医学院生理教研室惠赠;DMEM/F12培养基购自美国Gibco公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;利福平、鱼藤酮、DCFH-DA购自美国Sigma公司;BCA-100蛋白质定量测定试剂盒及还原型谷胱甘肽检测试剂盒购自上海碧云天公司;流式凋亡检测试剂盒购自美国Bender MedSystems Inc公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理 分化PC12细胞置于含体积分数10%胎牛血清、 $\text{NaHCO}_3$  1.2 g/L的DMEM/F12培养基中培养,每48 h换培养液,培养细胞汇合后,传代培养。细胞传入96或6孔培养板中,待细胞长满70%~80%后加药,加入不同剂量利福平,使终浓度分别达到0、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ,2 h后根据分组加入鱼藤酮,终浓度为2.5  $\mu\text{mol/L}$ ,利福平及鱼藤酮用DMSO溶解,DMSO终浓度小于体积分数0.4%。实验分6组:①溶剂对照组(control组);②单纯300  $\mu\text{mol/L}$ 利福平对照组;③单纯2.5  $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮组(鱼藤酮组);④100  $\mu\text{mol/L}$ 利福平+鱼藤酮组;⑤200  $\mu\text{mol/L}$ 利福平+鱼藤酮组;⑥300  $\mu\text{mol/L}$ 利福平+鱼藤酮组。其中④、⑤、⑥三组为利福平预防组。

1.2.2 显微镜下观察细胞形态 药物处理后,继续培养24 h,普通显微镜下观察细胞形态改变,并在镜下计算各组带突起细胞百分数(每组细胞在放大200倍下计算5个不同视野)。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞活性氧 药物处理后,继续培养24 h或48 h,消化收集细胞,PBS漂洗后加入10  $\mu\text{mol/L}$  DCFH-DA无血清培养基,37  $^\circ\text{C}$ 培养箱内孵育30 min,PBS漂洗2次,用PBS重悬细胞上机检测,分析结果。

1.2.4 酶标仪检测GSH 药物处理后,继续培养24 h,消化收集细胞,按试剂盒说明书检测样品405 nm吸光度,依标准曲线测出样品GSH的浓度。另根据蛋白定量检测试剂盒说明测样品蛋白浓度。细胞内GSH以nmol/mg蛋白表

示。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 药物处理后,继续培养24 h,消化收集细胞,PBS漂洗,加入AnnexinV-FITC和7-AAD染液重悬细胞,室温避光反应10 min,加入结合缓冲液后上机检测和分

### 1.3 统计学处理

数据用均数 $\pm$ 标准差表示,SPSS 16.0统计软件进行单因素方差分析,处理组间的两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组细胞形态学改变

鱼藤酮组细胞形态突起消失、变圆,并有少量细胞发生脱壁(图1),带突起细胞百分数(1.00 $\pm$ 0.64)%,较control组(98.95 $\pm$ 0.63)%显著下降( $P < 0.05$ );而利福平预防组(100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ )各组细胞突起百分数分别为(7.55 $\pm$ 0.40)%、(8.31 $\pm$ 0.55)%、(10.14 $\pm$ 0.82)%,较鱼藤酮组逐渐升高( $P < 0.05$ )。

### 2.2 各组细胞内ROS含量

根据荧光强度越强表示细胞内ROS含量越高可见,鱼藤酮作用24 h或48 h后,鱼藤酮组细胞内ROS含量均分别较control组明显升高( $P < 0.05$ );利福平预防组(100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ )各组细胞内ROS含量均分别较鱼藤酮组逐渐下降( $P < 0.05$ ),且存在浓度依赖性(图2)。

### 2.3 各组细胞内GSH含量

鱼藤酮组细胞内GSH含量较control组降低10.66 nmol/mg,有统计学差异( $P < 0.05$ );利福平预防组(100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ )各组细胞内GSH含量较鱼藤酮组分别增加0.52 nmol/mg, 4.03 nmol/mg, 8.40 nmol/mg, 200和300  $\mu\text{mol/L}$ 利福平预防组和鱼藤酮组比较存在统计学差异( $P < 0.05$ ;表1)。

### 2.4 各组细胞凋亡结果

鱼藤酮组细胞凋亡率较control组增加15.70%( $P < 0.05$ );利福平预防组(100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ )各组细胞凋亡率较鱼藤酮组分别降低6.67%、10.47%、12.30%,均存在统计学差异( $P < 0.05$ ),且随着利福平剂量的增加,凋亡率降低越明显(表1)。

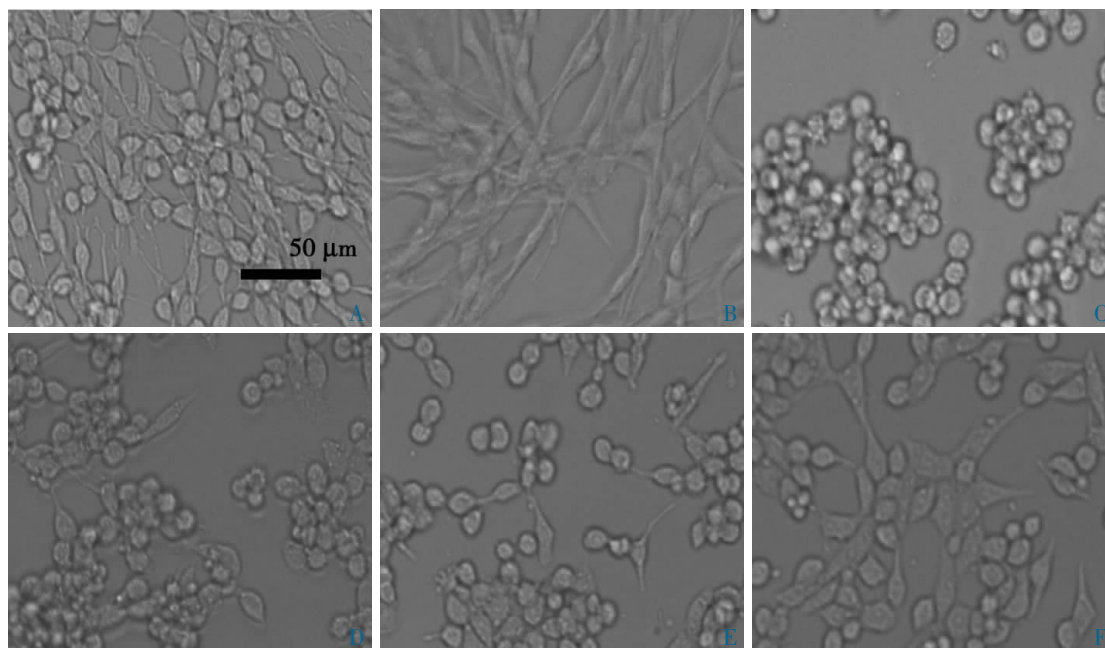


图 1 利福平对鱼藤酮诱导分化 PC12 细胞形态的影响

Fig.1 Effects of rifampicin on cell morphology in rotenone-induced differentiated PC12 cells

A: control; B: 300  $\mu\text{mol/L}$  rifampicin alone; C: 2.5  $\mu\text{mol/L}$  rotenone alone; D: 100  $\mu\text{mol/L}$  rifampicin + rotenone; E: 200  $\mu\text{mol/L}$  rifampicin + rotenone; F: 300  $\mu\text{mol/L}$  rifampicin + rotenone

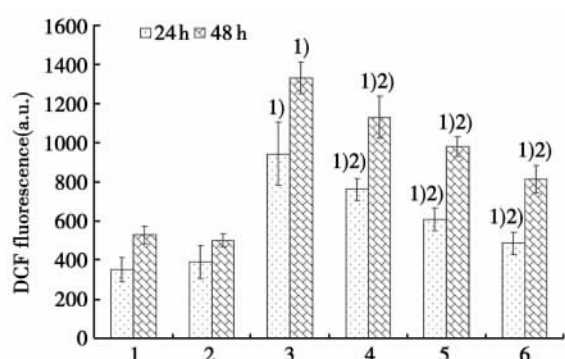


图 2 利福平分别对经鱼藤酮诱导 24 h 和 48 h 的分化 PC12 细胞胞内活性氧的影响

Fig.2 Effects of rifampicin on intracellular ROS at the time points of rotenone exposure for 24 h and 48 h in differentiated PC12 cells

1: control; 2: 300  $\mu\text{mol/L}$  rifampicin alone; 3: 2.5  $\mu\text{mol/L}$  rotenone alone; 4: 100  $\mu\text{mol/L}$  rifampicin + rotenone; 5: 200  $\mu\text{mol/L}$  rifampicin + rotenone; 6: 300  $\mu\text{mol/L}$  rifampicin + rotenone. Data are expressed as arbitrary units of fluorescence and represent  $\bar{x} \pm s_x$  ( $n = 3$ ); 1)  $P < 0.05$  in comparison to control; 2)  $P < 0.05$  in comparison to 2.5  $\mu\text{mol/L}$  rotenone alone.

### 3 讨 论

目前帕金森病的治疗虽有新的手段, 但大多

表 1 利福平对鱼藤酮诱导分化 PC12 细胞内还原型谷胱甘肽及凋亡率的影响

Table 1 Effects of rifampicin on intracellular reduced glutathione and apoptosis rate in rotenone-induced differentiated PC12 cells ( $\bar{x} \pm s_x$ ,  $n = 3$ )

Group	Reduced glutathione (nmol/mg)	Apoptosis rate (%)
Control	23.84 $\pm$ 1.54	0.87 $\pm$ 0.25
300 $\mu\text{mol/L}$ rifampicin alone	23.59 $\pm$ 1.11	0.53 $\pm$ 0.15
2.5 $\mu\text{mol/L}$ rotenone alone	13.18 $\pm$ 0.80 <sup>1)</sup>	16.57 $\pm$ 0.70 <sup>1)</sup>
100 $\mu\text{mol/L}$ rifampicin + rotenone	13.70 $\pm$ 0.75 <sup>1)</sup>	9.90 $\pm$ 1.21 <sup>1)2)</sup>
200 $\mu\text{mol/L}$ rifampicin + rotenone	17.21 $\pm$ 1.46 <sup>1)2)</sup>	6.10 $\pm$ 0.60 <sup>1)2)</sup>
300 $\mu\text{mol/L}$ rifampicin + rotenone	21.58 $\pm$ 1.81 <sup>2)</sup>	4.27 $\pm$ 0.40 <sup>1)2)</sup>

1)  $P < 0.05$  in comparison to control; 2)  $P < 0.05$  in comparison to 2.5  $\mu\text{mol/L}$  rotenone alone

数仍以内科药物治疗为主。外源性左旋多巴仍是最有效的抗 PD 药物, 然而只能控制症状而无法阻止疾病进展, 且长期使用往往会引起运动障碍等严重并发症。这驱使我们去探寻其他新的药物<sup>[7-8]</sup>。利福平作为结核病和麻风病治疗的一线药物, 近来研究发现其除具有杀菌作用外, 尚具有抗细胞凋亡和神经保护作用<sup>[2-5]</sup>。这一作用可能归因于利

福平化学结构中的脂肪链能使其透过血脑屏障和萘醌环使其成为一种自由基清除剂<sup>[2]</sup>。本实验中所用鱼藤酮是线粒体呼吸链复合物 I 选择性抑制剂,能阻碍线粒体超氧自由基代谢,增加细胞内 ROS 含量并促进 GSH 消耗<sup>[9-10]</sup>;且分化 PC12 细胞具有典型的神经内分泌特征,能够模拟多巴胺能神经元,因此本实验中鱼藤酮诱导分化 PC12 细胞可作为研究 PD 的氧化应激机制的理想细胞模型之一。

ROS 一方面可以调节细胞的生理活动,另一方面又可以对重要细胞器和分子造成氧化损害。本实验结果中,经利福平预处理的各组再暴露于鱼藤酮 24 h 或 48 h 后细胞内 ROS 含量均明显低于鱼藤酮组,与 Böttcher 等<sup>[11]</sup>报道在兔实验性肺炎链球菌脑膜炎感染时利福平能减少脑脊液吞噬细胞 ROS 产生并抑制海马神经的凋亡的实验结果相一致的。GSH 是大脑中存在的最为丰富的可溶性抗氧化分子,其本身具有巯基结构,捕获未配对电子的能力强,能够直接清除自由基,是细胞内抗氧化屏障主要系统之一。研究发现 PD 患者黑质纹状体 GSH 水平降低,且 GSH 在黑质和纹状体区域的水平与 PD 症状的严重程度相关,GSH 丢失可能参与 PD 的发病<sup>[12]</sup>。本实验利福平预防组各组细胞内 GSH 含量较鱼藤酮组呈剂量依赖性升高;利福平预防组各组细胞形态与正常细胞较相似,且细胞凋亡率与鱼藤酮组相比,呈随利福平浓度上升逐渐下降的趋势,提示利福平可能通过提升细胞内 GSH 含量,发挥抗氧化作用,实验结果与国内周厚广等<sup>[13]</sup>报道 GSH 能减轻大鼠黑质区氧化应激损伤相符。综上所述,利福平作为自由基清除剂的机制可能是通过降低细胞内 ROS 含量和提高细胞内的抗氧化分子 GSH 含量这一途径,这为利福平应用于 PD 患者的治疗提供实验依据。

#### 参考文献:

[1] Okouchi M, Ekshyyan O, Maracine M, et al. Neuronal apoptosis in neurodegeneration [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007,9(8):1059-1096.  
 [2] Tomiyama T, Shoji A, Kataoka K, et al. Inhibition of amyloid beta protein aggregation and neurotoxicity by

rifampicin: Its possible function as a hydroxyl radical scavenger [J]. *J Biol Chem*, 1996,271(12):6839-6844.

- [3] Oida Y, Kitaichi K, Nakayama H, et al. Rifampicin attenuates the MPTP-induced neurotoxicity in mouse brain [J]. *Brain Res*, 2006,1082(1):196-204.  
 [4] Xu J, Wei C, Xu C, et al. Rifampicin protects PC12 cells against MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis and inhibits the expression of an  $\alpha$ -synuclein multimer [J]. *Brain Res*, 2007,1139(4):220-225.  
 [5] 陶恩祥,张国华,徐杰,等.利福平对鱼藤酮处理的大鼠多巴胺神经元的保护作用[J].*中国病理生理杂志*,2008,24(9):1751-1756.  
 [6] 杨海华,李毅,张丹桃,等.灵孢多糖对 MPP<sup>+</sup>损伤 PC12 细胞的保护作用[J].*中山大学学报:医学科学版*,2007,28(4):393-396.  
 [7] 谢安木,薛莉,刘敏.灵芝孢子粉对帕金森病黑质神经递质影响的实验研究[J].*热带医学杂志*,2007,7(11):1091-1093.  
 [8] 朱蔚文,刘焯霖,徐浩文,等.灵芝孢子油干预治疗 6-羟多巴帕金森病大鼠模型的实验研究[J].*中山大学学报:医学科学版*,2005,26(4):417-420.  
 [9] Testa CM, Sherer TB, Greenamyre JT. Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005,134(1):109-118.  
 [10] Vali S, Mythri RB, Jagatha B, et al. Integrating glutathione metabolism and mitochondrial dysfunction with implications for Parkinson's disease: a dynamic model [J]. *Neuroscience*, 2007,149(4):917-930.  
 [11] Böttcher T, Gerber J, Wellmer A, et al. Rifampin reduces production of reactive oxygen species of cerebrospinal fluid phagocytes and hippocampal neuronal apoptosis in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis [J]. *J Infect Dis*, 2000,181(6):2095-2098.  
 [12] Sian J, Dexter DT, Lees AJ, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia [J]. *Ann Neurol*, 1994,36(3):348-355.  
 [13] 周厚广,鲍远程,陆建明,等.还原型谷胱甘肽对黑质多巴胺能细胞保护作用的实验研究[J].*中国神经精神疾病杂志*,2004,30(3):218-220.

(编辑 刘清海)