

姜黄素对 MPP⁺诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用 及其与 iNOS 的关系

陈 静¹, 唐二虎¹, 潘渊明², 唐小卿³, 职君利¹, 余惠旻¹, 冯鉴强¹, 陈培熹¹

(中山大学中山医学院 1. 生理学教研室; 2. 麻醉学专业, 广东 广州 510080;

3. 南华大学医学院生理学教研室, 湖南 衡阳 421001)

摘 要:【目的】观察姜黄素(curcumin, Cur)对 MPP⁺诱导的 PC12 细胞凋亡的保护作用, 并且探讨其与 iNOS 关系。【方法】采用碘化丙啶(PI)染色流式细胞术(FCM)检测 PC12 细胞凋亡, 间接免疫荧光 FCM 检测 PC12 细胞 iNOS 的表达。【结果】PC12 细胞自然死亡率为(1.5±0.1)%, 0.5 mmol·L⁻¹ MPP⁺作用 24 h 后, PC12 细胞凋亡率为(59.5±2.7)%; 20 μmol·L⁻¹ Cur 和 0.1 mmol·L⁻¹ 特异性 iNOS 抑制剂氨基胍(aminoguanidine, AG)对 PC12 细胞作用 24 h 后无明显凋亡诱导作用, 但分别使 0.5 mmol·L⁻¹ MPP⁺处理组细胞凋亡率由(59.5±2.7)%下降到(15.9±5.3)%和(39.7±8.7)% ($P < 0.01$); PC12 细胞经 0.5 mmol·L⁻¹ MPP⁺处理 24 h 后, 其 iNOS 表达率由正常对照的(13.5±1.5)%增加到(71.9±4.0)% ($P < 0.01$), 加入 20 μmol·L⁻¹ Cur 同时处理 24 h 后, 其 iNOS 蛋白表达率由(71.9±4.0)%下降到(40.0±3.0)% ($P < 0.01$)。【结论】Cur 可以抑制 MPP⁺诱导的 PC12 细胞凋亡, 其作用机制之一可能与抑制 iNOS 高表达有关。

关键词: 姜黄素; MPP⁺; 凋亡; 诱导型一氧化氮合酶**中图分类号:** R338.2**文献标识码:** A**文章编号:** 1672-3554(2005)04-0424-04

Protective Effect of Curcumin Against Apoptosis of PC12 Cells Induced by MPP⁺ and Its Relationship with iNOS

CHEN Jing¹, TANG Er-hu¹, PAN Yuan-ming², TANG Xiao-qing³, ZHI Jun-li¹, YU Hui-min¹,FENG Jian-qiang¹, CHEN Pei-xi¹

(1. Department of Physiology, 2. Faculty of Anesthesiology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Physiology, Medical College of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

Abstract: 【Objective】To explore the relationship between iNOS and curcumin(Cur) protective effect against apoptosis of PC12 cells induced by MPP⁺. 【Methods】The apoptosis of PC12 cells was observed by flow cytometry (FCM). The expression of iNOS was determined by FCM assay. 【Results】Compared with the control group[(1.5±0.1)%], the proportion of apoptosis of PC12 cells was(59.5±2.7)% after exposure to 0.5 mmol·L⁻¹ MPP⁺ for 24 h; 20 μmol·L⁻¹ curcumin and 0.1 mmol·L⁻¹ aminoguanidine (AG) didn't induce apoptosis in PC12 cells, however, the proportion of apoptosis of PC12 cells induced by 0.5 mmol·L⁻¹ MPP⁺ was decreased from (59.5±2.7)% to (15.9±5.3)% and (39.7±8.7)% ($P < 0.01$) respectively after treated with 20 μmol·L⁻¹ curcumin and 0.1 mmol·L⁻¹ AG; Compared with the control group, the rate of iNOS expression in PC12 cells was increased from (13.5±1.5)% to (71.9±4.0)% ($P < 0.01$) after treated with 0.5 mmol·L⁻¹ MPP⁺, and 20 μmol·L⁻¹ curcumin can inhibit this up-regulation [(40.0±3.0)%]. 【Conclusion】Curcumin can prevent apoptosis of PC12 cells induced by MPP⁺, and one of the mechanisms may be associated with inhibition of iNOS expression.

Key words: curcumin; MPP⁺; apoptosis; inducible nitric oxide synthase

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26 (4):424-427]

帕金森病(Parkinson disease, PD)是一种好发于
中老年的慢性神经系统退变性疾病。研究表明

PD 病人脑内多巴胺(DA)能神经元呈凋亡样改变,
提示细胞凋亡可能参与了 PD 的发病过程^[1], 但其

收稿日期: 2004-11-03

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(C03030307)

作者简介: 陈 静(1979-), 女, 湖北荆州人, 硕士生, 现在在三峡大学医学院解剖教研室工作(湖北宜昌, 443002); 冯鉴强, 教授, 博士

生导师, 通讯作者. Email: fengjq-sums@163.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

具体机制尚未完全明瞭。目前认为可能与脑内氧化应激反应增强导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)过多密切相关^[2]。ROS是具有很高生物学活性的含氧分子,如H₂O₂、NO、OH⁻、O₂⁻、脂质过氧化物等,其中NO是一种细胞信号分子,参与神经传导、记忆等重要生理功能,但过量的NO具有神经毒性作用,可能在神经退行性疾病的发生发展中起重要作用。NO由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化产生。NOS分为3型,即神经型NOS(neuroal nitric oxide synthase, nNOS),诱生型NOS(inducible nitric oxide synthase, iNOS),内皮源型NOS(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)。其中iNOS为钙非依赖性,在正常状态下不表达,一旦表达则催化持续产生大量的NO。Hunot等^[3]观察PD患者脑内iNOS表达与神经损伤的关系,推测中脑部反应性胶质细胞过度表达iNOS是黑质DA能神经元损伤的重要原因。姜黄素(curcumin, Cur)是从姜黄中提取的酚性色素,为姜黄的主要有效成分,体内外实验证明它具有抗氧化,清除自由基的作用^[4]。Pan等^[5]发现Cur明显降低LPS激活的巨噬细胞iNOS的产生。本实验室的前文报道^[6]Cur可以抑制氧化应激(H₂O₂)诱导的PC12细胞凋亡,其机制可能与降低细胞内ROS的含量有关。但是Cur对PD的细胞模型是否具有保护作用,罕见文献报道。1-甲基-4-苯基-吡啶(1-methyl-4-phenylpyridium, MPP⁺)是公认的可以诱导PD的神经毒物,MPP⁺的神经毒作用可能与产生过量NO有关^[7]。本实验应用MPP⁺处理具有神经元结构和功能特性的PC12细胞,建立PD细胞模型^[8],探讨Cur对MPP⁺诱导的PC12细胞凋亡的保护作用及其与iNOS的关系,为防治PD提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 试剂与设备

Cur、PI、RNase A、AG和MPP⁺购自美国Sigma公司;RPMI-1640培养基、马血清和胎牛血清购自美国GibcoBRL公司;特异性兔抗鼠iNOS单克隆抗体购自美国SantaCruz公司;羊抗兔IgG-FITC购自武汉博士德公司。流式细胞仪,美国BECKMAN-COULTER公司产品(ELITE,激光波长488 nm,功率15 mW);离心机,上海安亭科学仪器厂产品(型号80-2B,容量20 mL×12)。

1.2 细胞培养

PC12细胞由我校实验动物中心引入,培养于含体积分数10%马血清、体积分数5%胎牛血清的

RPMI-1640培养基中,于37℃、体积分数5%CO₂条件下培养。选取对数生长期细胞实验。

1.3 分组与处理

PC12细胞(数密度为1×10⁵/L)根据要求分为:①空白对照组(control):在细胞培养基中不加入任何药物;②Cur组:在细胞培养基中加入20 μmol·L⁻¹姜黄素;③iNOS抑制剂组:在细胞培养基中加入0.1 mmol·L⁻¹AG;④MPP⁺组:在细胞培养基中加入0.5 mmol·L⁻¹MPP⁺;⑤Cur加MPP⁺组:在细胞培养基中加入20 μmol·L⁻¹姜黄素和0.5 mmol·L⁻¹MPP⁺;⑥MPP⁺加iNOS抑制剂组:在细胞培养基中加入0.1 mmol·L⁻¹AG和0.5 mmol·L⁻¹MPP⁺。

1.4 流式细胞仪(FCM)检测PC12细胞凋亡

各实验组细胞按要求处理后,2.5 g/L胰蛋白酶消化贴壁的PC12细胞,1 000 r/min离心10 min,去上清,PBS漂洗2次,沉淀中加入体积分数70%乙醇固定。1 000 r/min离心10 min,去上清,PBS漂洗2次,调整细胞数密度为1×10⁶/mL。加50 μL RNase至终质量浓度1 g/L,37℃水浴30 min。加PI至终质量浓度50 mg/L,350目尼龙网滤膜过滤去除细胞团块,4℃避光染色30 min后,上FCM检测(激发波长:488 nm;发射波长:610 nm)各期细胞DNA的含量。测定数据按FCM所配置的软件进行数据处理,以DNA组方图出现低于G1期DNA含量的亚G1峰的大小代表凋亡细胞的多少,计算凋亡率。

1.5 FCM检测iNOS的表达

收集细胞,调整为1×10⁷/mL。每份标本分实验管和对照管,各加入100 μL细胞。用100 μL固定试剂(IC fixation buffer, eBioscience公司产品)固定1 h。加入破膜试剂(permeabilization buffer, eBioscience公司产品)500 μL,离心去上清后再加入300 μL破膜试剂,10 min后离心去上清。实验管加入50 μL按1:100用破膜剂稀释的一抗(对照管不加一抗),室温(18~25℃)孵育30 min。两管均用500 μL PBS洗两次后,加入按1:200用5 g/L牛血清白蛋白/磷酸缓冲溶液(BSA/PBS)稀释的二抗100 μL,室温(18~25℃)孵育30 min,用500 μL PBS洗两次上机检测。以对照管作为空白定标,计数10 000个细胞,记录阳性细胞百分率。

1.6 统计学处理

数据经SPSS 11.0统计软件进行统计分析,用 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验,后用最小有意义差异 t 检验(least significant difference- t , LSD- t)进行均数间的多重比较,取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 MPP⁺对 PC12 细胞凋亡的影响

采用 FCM 检测细胞凋亡状况,结果如图 1 所示,空白对照组 PC12 细胞的凋亡率为 $(1.5 \pm 0.1)\%$, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MPP⁺作用 24 h 后,PC12 细胞的凋亡率为 $(59.5 \pm 2.7)\%$ ($P < 0.01$),表明 MPP⁺可以显著诱导 PC12 细胞凋亡。

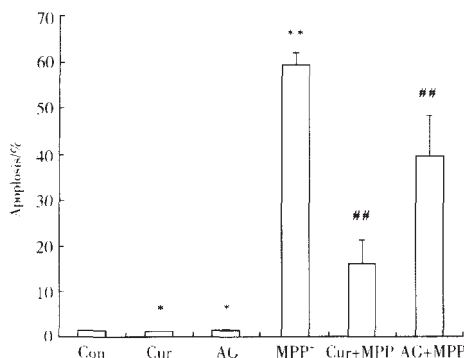


图 1 不同处理方式对 PC12 细胞凋亡的影响 ($n=3$)

Fig.1 Effect of different treatments on apoptosis of PC12 cells

Cur: $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ curcumin; AG: $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ AG; MPP⁺: $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MPP⁺; Cur+MPP: $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MPP⁺ and $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ curcumin; AG+MPP: $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MPP⁺ and $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ AG. The data are represented as mean $\pm$ SD from 3 independent experiment. One-way ANOVA was performed and revealed a significant effect ($F=97.1$, $P < 0.01$). Post hoc tests (least significant difference- t , LSD- t) showed: * $P > 0.05$ compared with control group; ** $P < 0.01$ compared with control group; ## $P < 0.01$ compared with MPP⁺ group

2.2 MPP⁺和 Cur 对 PC12 细胞 iNOS 表达的影响

用 FCM 检测细胞 iNOS 蛋白的阳性表达率,结果,PC12 细胞经 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MPP⁺ 处理 24 h 后,其 iNOS 蛋白表达率由正常对照的 $(13.5 \pm 1.5)\%$ 增加到 $(71.9 \pm 4.0)\%$,而同时加入 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cur,则表达率降至 $(40.0 \pm 3.0)\%$,3 组比较 $F=279.7$, $P < 0.01$,经 LSD- t 检验,两两之间 P 皆 < 0.01 ,表明 Cur 可抑制 MPP⁺诱导的 iNOS 蛋白表达。

2.3 Cur 和 AG 对 MPP⁺诱导 PC12 细胞凋亡的影响

采用 FCM 检测细胞凋亡状况,结果如图 1 所示, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cur 和 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ AG 并不诱导 PC12 细胞凋亡,上述浓度的 Cur 和 AG 作用 PC12 细胞 24 h 后,PC12 细胞的凋亡率分别为 $(1.3 \pm 0.1)\%$ 和 $(1.7 \pm 0.1)\%$,与对照组 $[(1.5 \pm 0.1)\%]$ 比较无明显差异 ($P > 0.05$);但是可以分别使 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MPP⁺ 处理的 PC12 细胞的凋亡率由 $(59.5 \pm 2.7)\%$ 下降到 $(15.9 \pm 5.3)\%$ ($P < 0.01$) 和 $(39.7 \pm 8.7)\%$ ($P <$

0.01)。结果表明 Cur 和 AG 均能抑制 MPP⁺诱导的细胞凋亡。

3 讨论

PD 是一种严重影响中老年人身体健康的慢性神经系统退变性疾病,迄今其确切病因和发病机制尚不清楚,近年来诸多证据表明脑内氧化应激在 PD 发病机制中起重要的作用。NO 作为氧自由基的一种,大量的证据表明它的神经毒性在 PD 发病中起重要的作用^[9]。在中枢神经系统中,高浓度的 NO 可透过细胞膜、线粒体膜等生物膜,修饰某些蛋白质的巯基、血红素辅基及铁硫中心,从而抑制各种线粒体呼吸链复合体的活力;另一方面,NO 与超氧阴离子 (O_2^-) 发生快速反应,生成强氧化性的过氧化亚硝基 (peroxynitrite, ONOO⁻),而引起蛋白质、类脂质及 DNA 氧化,或分解转化为 OH⁻ 自由基对细胞有不可逆的氧化损伤^[10]。

病理状态下 iNOS 一旦表达后,则可持续存在,产生大量的 NO 引起神经损伤。PD 大鼠受损侧黑质有明显的 iNOS 基因表达;未损侧仅有轻度表达;对照组大鼠两侧黑质均无 iNOS 基因表达^[11]。Hunot 等^[12]发现 PD 患者黑质中表达 iNOS 的胶质细胞密度与健康对照组相比明显增高。Iravani 等^[9]研究发现,iNOS 抑制剂可以保护 DA 能神经元变性。本实验在 MPP⁺诱导的 PD 细胞模型中观察到,MPP⁺可明显诱导 PC12 细胞凋亡,并引起 iNOS 表达上调,iNOS 的特异性抑制剂 AG 可抑制 MPP⁺诱导的 PC12 细胞凋亡,在细胞研究水平上,进一步证实 iNOS 表达可能在 PD 的发病过程中起着重要的作用。

姜黄是一种多年生的草本植物,在亚洲的热带地区广为栽培,其根茎广泛用于食品上色和调味剂,其粉末称之为姜黄根粉,也作为医用。Cur 是从姜黄根茎中提取的一种酚性色素,是姜黄的重要活性成分,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、降血脂等广泛的药理作用。近年 Cur 的抗氧化作用日益受到重视,本实验室最近证实,Cur 对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞凋亡有保护作用^[6]。本实验在 MPP⁺诱导的 PD 细胞模型中也观察到,Cur 不仅可以抑制 MPP⁺诱导的 PC12 细胞凋亡,还可以明显抑制 iNOS 表达,提示 Cur 的神经保护作用机制之一可能与其降低 iNOS 的产生有关。

参考文献:

[1] Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, et al.

- Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation[J]. *Ann Neurol*, 2003, 53(Suppl 3):S61-70.
- [2] Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease[J]. *Ann Neurol*, 2003, 53(Suppl 3): S26-36.
- [3] Hunot S, Boissiere F, Faucheux B, *et al.* Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease[J]. *Neuroscience*, 1996, 72(2):355-63.
- [4] Wen H C, Chih C W, Jau S Y. Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells[J]. *Cell Biochem*, 2003, 90(2):327-38.
- [5] Pan MH, Lin-Shiau SY, Lin J K. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NFkappaB activation in macrophages[J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60(11): 1665-76.
- [6] 唐小卿, 聂亚雄, 冯鉴强, 等. 姜黄素对 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(6): 672-6.
- [7] Cleeter MWJ, Cooper JM, Schapira AHV. Nitric oxide enhances MPP⁺ inhibition of complex I [J]. *FEBS Letters*, 2001, 504(1-2):50-2.
- [8] Quigney DJ, Gorman AM, Samali A. Heat shock protects PC12 cells against MPP⁺ toxicity[J]. *Brain Res*, 2003, 993(1-2):133-9.
- [9] Irvani MM, Kashefi K, Mander P, *et al.* Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammatory-induced dopaminergic neurodegeneration[J]. *Neuroscience*, 2002, 110(1):49-58.
- [10] Wei TT, Chen C, Zhao BL, *et al.* EPC-K1 attenuates peroxynitrite-induced apoptosis in cerebellar granule cells[J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1998, 46(1):89-97.
- [11] 周国庆, 陈光辉, 张隽, 等. 帕金森病大鼠模型诱导型一氧化氮合酶基因表达的研究[J]. *医学研究生学报*, 2000, 13(4):224-7.
- [12] Hunot S, Dugas N, Faucheux B, *et al.* FcepsilonR II/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, *in vitro*, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glia cells [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(9): 3440-7.

(编辑 张敏瑞)

(上接第423页 from page 423)

心肌细胞内与未行转染的心肌细胞类似,只有微量的 *bcl-xL* 蛋白表达;而正向插入的重组腺病毒 rAd-*bcl-xL*/s(真核启动子在目的基因的上游)在心肌细胞内得到高效表达,表明心肌细胞能够高效表达外源性 *bcl-xL* 基因,同时提示只有将外源基因正向导入靶细胞,才能使目的基因正常表达,而反向插入的基因无法表达功能蛋白。

心肌对缺血缺氧异常敏感,心肌细胞遭受缺血缺氧后会有大量的细胞凋亡^[9]。本实验以缺氧培养成功诱导出心肌细胞凋亡,并以重组腺病毒为载体用 *bcl-xL* 基因来抑制细胞凋亡,保护体外培养的心肌细胞。实验发现将 *bcl-xL* 基因正确导入细胞后,心肌细胞缺氧诱导的凋亡指数明显降低,荧光显微镜下未见凋亡小体,而未转染 *bcl-xL* 基因的心肌细胞因缺氧出现大量的凋亡细胞,表明心肌细胞通过转染 *bcl-xL* 基因,虽然没有完全阻断细胞凋亡,但大大提高了抗凋亡能力。同时心肌细胞的抗缺血、缺氧和抗损伤能力明显增强,提示转染 *bcl-xL* 基因通过其抗凋亡作用能明显提高心肌细胞在缺氧条件下的生存能力。因此 *bcl-xL* 基因对缺血性心脏病具有潜在的治疗价值。

参考文献:

- [1] Norihiro M, Hiroyuki Y, Kazuhiro I, *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of Bcl-xL prevents cell death in

primary neuronal culture of the rat [J]. *Neurosci Lett*, 1999, 270 (3): 177-80.

- [2] 廖洪映, 熊利华, 陈波, 等. 人类抗凋亡基因 *bcl-xL* 的克隆及其在大鼠心肌细胞内的高效表达[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2005, 26(3S):印刷中
- [3] Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, *et al.* Apoptosis in human acute myocardial infarction [J]. *Circulation*, 1997, 95 (2): 320-3.
- [4] Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, *et al.* Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 45 (3): 651-60.
- [5] Olivetti G, Abbi R, Quaini F, *et al.* Apoptosis in the failing human heart [J]. *N Engl J Med*, 1997, 336 (16): 1131-41.
- [6] Xu B, Sakka LI, Slachta CA, *et al.* Apoptosis in chronic rejection of human cardiac allografts [J]. *Transplantation*, 2001, 71 (8): 1137-46.
- [7] 易成腊, 陈安民, 徐卫国, 等. *bcl-xL* 基因转染对脊髓损伤细胞凋亡的影响[J]. *中华创伤杂志*, 2004, 20 (8): 474-8.
- [8] Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, *et al.* Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106 (12): 1511-9.
- [9] Donna MV, Timothy JK, Angela C, *et al.* Regulation of *bcl-xL* expression by H₂O₂ in cardiac myocytes [J]. *J Bio Chem*, 2003, 278(28): 25542-7.

(编辑 张敏瑞)