

表没食子儿茶素没食子酸酯对乳胞素诱导 PC12 细胞损伤的影响

戴美芬[△] 胡丹 赵丹 唐兰英 竺飞燕 陈瑛 王小同 张雄

摘要 目的 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)对乳胞素(lactacystin)诱导的 PC12 细胞损伤的影响。方法 接种 PC12 细胞培养 24 h 后分别给予干预。实验分为 5 组:正常对照组, 10 $\mu\text{mol/L}$ 乳胞素损伤组, 不同浓度 EGCG 预处理组(终浓度 5、10、50 $\mu\text{mol/L}$)。分别用 MTT 比色法检测细胞活性, Hoechst 33 258 染色观察凋亡时细胞核形态的变化, 流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡率。结果 5、10、50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 对乳胞素诱导的 PC12 细胞损伤具有一定的保护作用。与乳胞素损伤组 [(61.22 \pm 1.02)%] 比较, 5、10、50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理组细胞活力明显上升, 分别为 (66.99 \pm 1.30)%、(66.67 \pm 0.65)%、(73.40 \pm 0.67)%。Hoechst 33 258 染色发现乳胞素损伤组较多胞核出现固缩凝集, 而 EGCG 预处理组则较少。FCM 检测也提示 EGCG 预处理可降低细胞的凋亡率, 正常对照组、乳胞素损伤组、EGCG 预处理组(5、10、50 $\mu\text{mol/L}$) 分别为 3.0%、60.4%、59.8%、57.5% 和 38.6%。结论 EGCG 可减轻乳胞素诱导的 PC12 细胞损伤。

关键词 表没食子儿茶素没食子酸酯; PC12 细胞; 乳胞素; 凋亡; 神经保护

Effect of Epigallocatechin Gallate on Lactacystin-Induced PC12 Cell Injury DAI Mei-fen, HU Dan, ZHAO Dan, et al *Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou (325027)*

ABSTRACT **Objective** To study the effect of epigallocatechin gallate (EGCG) against lactacystin induced PC12 cell injury. **Methods** The inoculated rat PC12 cells were cultured for 24 h, followed by intervention. The cells were divided into 5 groups, i. e., the normal control group, 10 $\mu\text{mol/L}$ lactacystin injury group, and the EGCG pretreated groups (at the final concentration of 5, 10, and 50 $\mu\text{mol/L}$, respectively). The cytoactivity was detected by MTT colorimetry. Morphological changes of the cell nucleus were observed by Hoechst 33 258 staining, and the apoptosis ratio was detected by flow cytometry (FCM). **Results** EGCG at different doses showed protective effect on lactacystin-induced PC12 cell injury. Compared with the lactacystin injury group [(61.22 \pm 1.02)%], the cytoactivity in EGCG pretreated groups at the final concentration of 5, 10, and 50 $\mu\text{mol/L}$, respectively increased obviously to (66.99 \pm 1.30)%, (66.67 \pm 0.65)%, and (73.4 \pm 0.67)%, respectively. Hoechst 33 258 staining found that more nuclear pyknosis and aggregation occurred in the lactacystin injury group, but less occurred in EGCG pretreated groups. FCM indicated that the apoptosis ratio was reduced by EGCG pretreatment. It was 3.0%, 60.4%, 59.8%, 57.5%, and 38.6%, respectively in the normal control group, the lactacystin injury group, and EGCG pretreated groups (at the final concentration of 5, 10, and 50 $\mu\text{mol/L}$, respectively). **Conclusion** EGCG could attenuate lactacystin induced PC 12 cell injury.

KEYWORDS epigallocatechin gallate; PC12 cell; lactacystin; apoptosis; neuroprotection

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)占绿茶多酚的 25%~40% 左右, 是绿茶中的主要活性成分。许多实验及流行病学数据表

明 EGCG 具有抗心血管疾病、抗炎症、抗肿瘤、抗糖尿病及抗肥胖等作用^[1]。近年来, 其对神经退行性疾病的有益作用也逐渐受到人们关注。流行病学研究显示, 长期坚持每天饮用 2 杯或 2 杯以上的绿茶与帕金森病(Parkinson's disease, PD)患病率的下降有关^[2]。目前认为帕金森病患者存在蛋白质降解功能障碍, 其中泛素蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system, UPS)起着重要作用, 其功能损害很可能是散发性 PD 和家族性 PD 发病的共同分子通路^[3]。蛋白

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30670748); 浙江省自然科学基金资助项目(No. Y207557); 浙江省卫生厅资助项目(No. 2006A097); 温州市科技局对外合作项目(No. H20060030)

作者单位: 温州医学院附属第二医院神经内科(浙江温州 325027)

通讯作者: 张雄, E-mail: zhangxiang98@gmail.com

[△] 现在温州医学院附属东阳医院(浙江温州 322100)

酶体抑制剂的应用通过影响泛素蛋白酶系统而干扰细胞正常代谢过程。鉴于绿茶是广泛应用的安全性和大众接受度均很高的日常饮品,本研究拟采用蛋白酶体抑制剂乳胞素诱导 PC12 细胞凋亡建立 PD 细胞模型,探讨 EGCG 对损伤的多巴胺能神经元保护作用。

材料与方 法

1 材料 大鼠嗜铬瘤 PC12 细胞(高分化)购于中国科学院上海生命科学院研究院生物化学与细胞生物学研究所。高糖 DMEM 培养基、0.25% 胰酶、MTT 购于 Gibco 公司,无支原体胎牛血清购于杭州四季青生物有限公司,乳胞素购于 Alexis 公司, Hoechst 33258 试剂盒、Annexin V/PI 试剂盒购于南京凯基生物有限公司,6 孔板、96 孔板、25cm² 培养瓶购于 Corning 公司。实验用的 EGCG 由浙江大学茶学院杨贤强教授惠赠。

2 方法

2.1 细胞培养 采用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基,添加青霉素 100 U/mL、链霉素 100 mg/L,置于恒温 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞传代时,加入适量的 0.125% 胰蛋白酶消化后轻轻吹打,取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 药物处理 实验分为 5 组,接种细胞培养 24 h 后分别给予干预。正常对照组不加药,乳胞素损伤组加入乳胞素(终浓度 10 μmol/L),EGCG 预处理组加入 EGCG(终浓度 5、10、50 μmol/L)预孵育 1 h,然后加入乳胞素(终浓度 10 μmol/L)继续培养 24 h 后进行各指标测。

2.3 MTT 比色法检测细胞活性 取 PC12 细胞以约 6 × 10³ 个/孔的浓度接种于 96 孔板,培养 24 h 后,给予不同处理,每组设 6 个复孔,培养结束时每孔

加入 10 μL MTT (5 g/L),继续培养 4 h,弃培养液,每孔加入 DMSO 100 μL,微量振荡器轻轻震荡,使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪在 490 nm(参考波长 630 nm)波长处测定各孔吸光度(OD)值并减去背景 OD 值,取各孔均值,细胞存活率(%) = 实验组 OD 均值/阴性对照组 OD 均值 × 100%。

2.4 Hoechst 33258 染色 细胞接种于 6 孔板中,每孔内预置洁净盖玻片 1 张,接种密度约 1.5 × 10⁴ 个/孔,接种后 24 h 施加药物干预,药物处理后,吸尽培养液,PBS 漂洗细胞,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,去固定液,PBS 洗两遍,加入 Hoechst 33258 染色液避光反应 10 min,PBS 洗两遍,以紫外光 340 nm 波长激发,荧光显微镜下观察胞核形态变化。

2.5 Annexin V/PI 双标记流式细胞仪分析法检测细胞凋亡 培养结束后,以 0.125% 胰蛋白酶消化收集细胞,制成细胞悬液,离心去上清,用 PBS 洗涤后加入 Binding Buffer 重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC,将其混匀后加入 5 μL PI,室温避光染色 30 min 后,用流式细胞仪检测凋亡率。凋亡率为计数 5 × 10³ 个细胞中凋亡细胞所占百分比。

3 统计学处理 实验数据 OD 值、细胞存活率以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计分析采 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

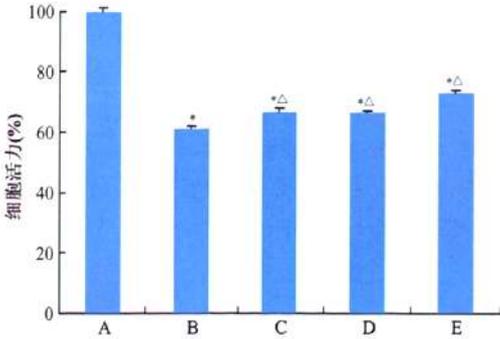
1 EGCG 对乳胞素诱导的 PC12 细胞形态的影响(图 1) 正常对照组培养 PC12 细胞梭型明显,细胞分布均匀(图 1A)。乳胞素损伤组 PC12 细胞形态发生变化,梭型细胞减少,出现球形或椭圆形细胞(图 1B)。而 EGCG 预处理组显示细胞多为梭型,球形和椭圆形细胞较乳胞素损伤组减少(图 1C)。



注:A 为正常对照组;B 为乳胞素损伤组;C 为 EGCG 预处理组

图 1 EGCG 对乳胞素诱导的 PC12 细胞形态变化的影响(×200)

2 EGCG 对乳胞素诱导的 PC12 细胞活力的影响 (图 2) 乳胞素损伤组加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 乳胞素后,细胞活力降至正常对照组的(61.22 \pm 1.02)%。与乳胞素损伤组比较, 5、10、50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理组细胞活力明显上升,分别为(66.99 \pm 1.30)%、(66.67 \pm 0.65)%、(73.40 \pm 0.67)%。



注:A 为正常对照组; B 为乳胞素损伤组; C 为 5 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理组; D 为 10 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理组; E 为 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理组;与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与乳胞素损伤组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

图 2 EGCG 对乳胞素诱导的 PC12 细胞活力的影响

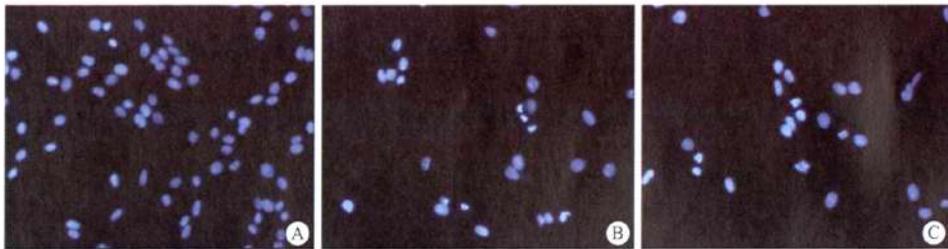
3 EGCG 对乳胞素诱导的 PC12 细胞核形态的影响 (图 3) 在荧光显微镜下观察,正常对照组细胞核呈蓝色,边缘光滑完整,均匀淡染 (图 3A),乳胞素损伤组部分细胞染色质固缩,细胞核呈致密浓染,显示较强

荧光,甚至可见细胞核裂解,出现致密的颗粒状荧光 (图 3B)。与乳胞素损伤组相比,EGCG 预处理后凋亡细胞比例降低,且胞核形态改善,荧光强度减弱 (图 3C)。

4 EGCG 对乳胞素诱导的 PC12 细胞凋亡率的影响 (图 4) 左下象限为正常细胞,右下象限为凋亡细胞。正常对照组,乳胞素损伤组,EGCG (5、10、50 $\mu\text{mol/L}$) 预处理组细胞凋亡率分别为 3.0%、60.4%、59.8%、57.5% 和 38.6%。

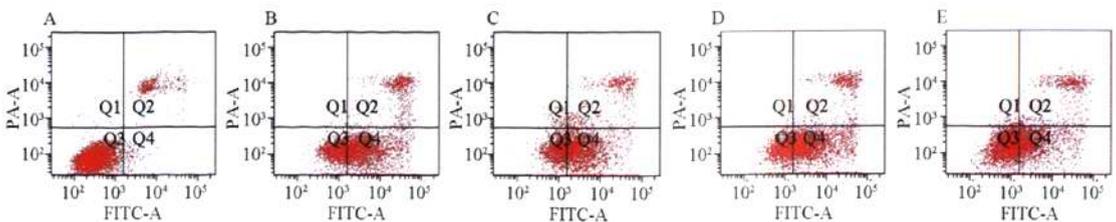
讨论

许多证据表明 PD 以及其他神经变性病可能是一类蛋白降解障碍疾病^[3]。泛素蛋白酶体系统是选择性降解聚集的蛋白质的重要途径之一。UPS 在细胞内负责清除突变的、损伤的和错误折叠的蛋白,它的功能异常或衰竭导致细胞内异常蛋白蓄积、细胞功能障碍,甚至细胞死亡。目前认为 UPS 在 PD 发病过程中占据非常重要的地位,其功能障碍很可能是散发性 PD 和家族性 PD 发病的共同分子通路^[3]。蛋白酶体抑制剂的应用通过影响泛素蛋白酶体系统而干扰细胞正常代谢过程,能同时复制 PD 的两大病理特征,因此可能更接近于人类 PD 的病理基础,为 PD 发病机制的研究提供了新的思路。本实验组以蛋白酶体抑制剂乳胞素注射于 C57/BL6J 小鼠成功复制出了 PD 两大病理特征:纹状体-黑质通路选择性多巴胺能神经元变性及 Lewy 小



注:A 为正常对照组; B 为乳胞素损伤组; C 为 EGCG 预处理组

图 3 EGCG 对乳胞素诱导的 PC12 细胞核形态的影响 (Hoechst 33258 染色, $\times 200$)



注:A 为正常对照组; B 为乳胞素损伤组; C 为 5 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理组; D 为 10 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理组; E 为 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理组

图 4 EGCG 对乳胞素诱导的 PC12 细胞凋亡比例的影响

体样物质形成^[4]。在此基础上,我们以乳胞素作为干预药物诱导 PC12 细胞凋亡建立了离体 PD 细胞模型。已有实验表明, EGCG 对 6-羟基多巴胺(6-OHDA)^[5]、过氧化氢(H₂O₂)、一氧化氮(NO)^[6]、MPP⁺^[7]、百草枯^[8]等因素诱导帕金森病细胞凋亡模型具有抗凋亡作用。那么, EGCG 对蛋白酶体功能障碍的多巴胺能神经元的损伤是否也具有同样的保护作用,为解决此问题,故设计了此实验。本实验选择蛋白酶体抑制剂乳胞素作为干预药物诱导 PC12 细胞凋亡建立离体 PD 细胞模型,研究 EGCG 对蛋白酶体功能障碍的多巴胺能神经元损伤的保护作用。

本研究发现,乳胞素对 PC12 细胞具有明显的毒性作用,可使细胞的形态发生改变,可明显降低细胞活力,具有细胞皱缩,胞核凝集等典型的凋亡表现,且使凋亡细胞比例明显增加。而 5、10、50 μmol/L EGCG 预处理对乳胞素诱导的 PC12 细胞凋亡具有有效的保护作用,可明显增强细胞活力,改善细胞形态,降低凋亡比例。研究表明, EGCG 在一定剂量范围内对蛋白酶体功能障碍的多巴胺能神经元损伤也具有一定的保护作用,这一结果与先前的实验研究一致^[5,7-9]。我们目前已经证实了 EGCG 在细胞水平上对蛋白酶体功能障碍的多巴胺能神经元损伤的保护作用,将进一步探讨 EGCG 在蛋白酶体功能障碍的在体动物实验模型上是否也具有同样的保护作用。本实验组采用蛋白酶体抑制剂乳胞素立体定向微量注射到小鼠黑质,已成功建立了乳胞素诱导的帕金森病在体动物模型^[4],目前本实验组已着手进行 EGCG 在在体动物实验模型上的保护作用研究。乳胞素为蛋白酶体抑制剂,它的毒性和细胞内多泛素化蛋白生成增加有关,推测 EGCG 可能通过提高蛋白酶体活性分解细胞内异常蓄积多泛素化蛋白从而起到保护作用,目前我们已进行蛋白酶体活性及多泛素化蛋白含量变化检测工作。

倘若能同时证实 EGCG 对乳胞素诱导的在体及离体 PD 模型具有同样的保护作用,结合先前的实验研究结果表明 EGCG 对 6-OHDA、NO、H₂O₂、MPTP、鱼藤酮诱导损伤的 PD 模型具有保护作用,将提示 EGCG 是一种具有多方位神经保护效应的药物,这与我们目前寻找一种具有多方位神经保护效应的药物的 PD 药物治疗和预防策略相符合^[10]。最近一项关于帕金森病和绿茶的 meta 分析结果证实饮用绿茶能防治帕金森病而且其保护作用在中国人群中是相当明显的^[11]。绿茶在 PD 防治尤其是预防上具有潜在的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Mandel SA, Amit T, Kalfon L, et al. Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG) [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2008, 15(2): 211-222.
- [2] Checkoway H, Powers K, Smith-Weller T, et al. Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake [J]. *Am J Epidemiol*, 2002, 155(8): 732-738.
- [3] McNaught KSP, Olanow CW. Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2006, 27(4): 530-545.
- [4] Zhang X, Xie W, Qu S, et al. Neuroprotection by iron chelator against proteasome inhibitor-induced nigral degeneration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(2): 544-549.
- [5] Nie GJ, Cao YL, Zhao BL. Protective effects of green tea polyphenols and their major component, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Redox Rep*, 2002, 7(3): 171-177.
- [6] Jung JY, Han CR, Jeong YJ, et al. Epigallocatechin gallate inhibits nitric oxide-induced apoptosis in rat PC12 cells [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 411(3): 222-227.
- [7] 郭晶,徐辰,黎秉富,等. 没食子儿茶素没食子酸酯对 1-甲基-4-苯基吡啶离子诱导的大鼠 PC12 细胞凋亡的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(4): 781-786.
- [8] Guo J, Xu C, Li BF, et al. Effects of epigallocatechin-3-gallate on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis in rat PC12 cells [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2009, 25(4): 781-786.
- [9] 厚荣荣,陈建宗,陈宏,等. 绿茶多酚主要成分对百草枯诱导 PC12 细胞损伤的保护作用 [J]. *神经解剖学杂志*, 2007, 23(1): 83-87.
- [10] Hou RR, Chen JZ, Chen H, et al. Protective effects of EGCG on paraquat-induced injury in PC12 cells [J]. *Chin J Neuroanat*, 2007, 23(1): 83-87.
- [11] Levites Y, Weinreb O, Maor G, et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration [J]. *J Neurochem*, 2001, 78(5): 1073-1082.
- [12] Youdim MBH, Geldenhuys WJ, Van der Schyf CJ. Why should we use multifunctional neuroprotective and neurorestorative drugs for Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Related Disord*, 2007, 13 (Suppl 3): 281-291.
- [13] Quintana B, Luis J, Allam MF, et al. Parkinson's disease and tea: a quantitative review [J]. *J Am Coll Nutr*, 2009, 28(1): 1.

(收稿:2010-01-22 修回:2011-01-20)