

# 梓醇对氧糖剥夺诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用

汪卓 安利佳 段延龙 李亚晨 姜波

(大连理工大学生物科学与工程系 大连 116024)

**摘要目的:**观察梓醇对氧糖剥夺(OGD)诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用。**方法:**采用 Hoechst 33258 DNA 染色法,四甲基偶氮唑盐(MTT)检测细胞活性;化学比色法测定乳酸脱氢酶(LDH)的释放量,用流式细胞技术检测细胞凋亡比例以及 P53 和 Bcl-2 蛋白。**结果:**OGD 可导致 PC12 细胞活力明显下降,LDH 释放量增加,P53 蛋白表达上升,Bcl-2 蛋白表达下降。梓醇可明显改善细胞形态结构,显著降低 LDH 释放量、降低 P53 蛋白的表达,提高 Bcl-2 蛋白的表达,降低细胞凋亡率。**结论:**梓醇通过调节细胞凋亡相关基因的表达而抑制细胞凋亡。

**关键词:**梓醇;PC12 细胞;细胞凋亡;基因

**中国分类号:**R743.3;R285.6 **文献标识码:**A

## Catalpol Protects Rats' Pheochromocytoma Cells Against Oxygen-glucose Deprivation-induced Injury

WANG Zhuo, AN Li-jia, DUAN Yan-long, LI Ya-chen, JIANG Bo

(Department of Bioscience and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of catalpol in apoptosis in PC12 cells induced by oxygen-glucose deprivation (OGD). **Methods:** The morphological changes were observed by Hoechst 33258 staining assay; the cell viability was analyzed by MTT; the apoptosis rate, the protein of P53 and Bcl-2 were measured by flow cytometry analysis (FCM). **Results:** OGD could result in the decrease of cell viability, the increase of release of LDH, the dropping of Bcl-2 protein expression of PC12 cell, the rising of P53 protein expression of PC12 cell. Catalpol could improve the morphology of cells. It could increase bcl-2 protein expression, decrease P53 protein expression and the release of LDH, and reduce apoptotic rate. **Conclusion:** Catalpol could inhibit PC12 cells apoptosis by regulating related genes of apoptosis.

**Key words:** Catalpol; PC12; Apoptosis; Gene

### 前言

缺氧缺糖是缺血性神经损伤的主要原因,氧糖剥夺(Oxygen and Glucose Deprivation, OGD)是常用的体外缺血模型,可导致线粒体功能障碍和凋亡的发生<sup>[1]</sup>。但其具体机制尚未完全明了。梓醇是一个小分子环烯醚萜类化合物,体外实验表明其具有抑制细胞凋亡作用<sup>[2]</sup>。已有的研究还显示,梓醇有抗炎,拮抗细胞内 Ca<sup>2+</sup> 活性的功能<sup>[3,4]</sup>。本实验用具有神经元结构和功能特性的 PC12 细胞,建立 OGD 损伤模型,来探讨梓醇对培养 PC12 细胞在缺血再灌注损伤中的作用及其可能的机制。

PC12 细胞是从大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤中分离出来的,分化的 PC12 细胞在形态和功能上具有典型的神经细胞特征,作为体外模型被广泛地用于神经细胞凋亡<sup>[5]</sup>。因此,本研究采用 PC12 细胞的缺血模型,来研究梓醇对缺血导致 PC12 细胞损伤的保护作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂与设备

大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞(上海细胞库);精制胎牛血清、DMEM 培养基(Gibco 公司);二甲基亚砜(DMSO)(东方科技公司);青霉素、链霉素(大连制药厂);MTT(Sigma 公司);LDH 试剂盒(南京建成生物工程研究所);P53、Bcl-2 抗体(Santa Cruz 生物技术公司);无糖 DMEM(Gibco),密闭缺氧箱(自制)。

#### 1.2 细胞培养

PC12 细胞培养于含体积分数 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。选取对数生长期细胞实验。

#### 1.3 实验分组及氧糖剥夺模型制备

细胞以 5×10<sup>4</sup>/ml 的密度接种于 24 孔板,培养 24 h 后进行实验。实验分为 3 组:(1)正常对照组(Control 组);(2)氧糖剥夺模型组(OGD 组);(3)梓醇治疗组(Catalpol 组)。每组设 11 孔,氧糖剥夺在厌氧培养箱进行。将 OGD 组的培养液换为无糖的 DMEM 液,将培养物放入缺氧罐内,向罐内通入含 95% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的混合气体,当罐内氧浓度低于 1% 时,关闭罐的出口与入口,37℃ 培养 3 h,氧糖剥夺结束,将培养物从缺氧罐中取出,将无糖 DMEM 液换为无血清培养液,置于正常条件培养箱中,继续培养 18 h。梓醇组用同样的方法造模,在培养物开始

作者简介:汪卓,女,(1982-),硕士研究生,

研究方向:天然药物的神经保护作用。

E-mail:luckzhuo1982@yahoo.com.cn;

通讯作者:姜波,E-mail:bojiang0411@yahoo.com.cn;

Tel:0411-84706355

通讯地址:大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系,  
116024

(收稿日期:2006-08-10 接受日期:2006-09-02)

氧糖剥夺前,将梓醇加入培养孔中,使其终浓度分别为 0.1,1,10,100 μg/ml,正常对照组不进行氧糖剥夺,而是换为无血清的 DMEM 液,置于正常条件培养箱中培养。

### 1.4 细胞形态学观察

细胞以 5×10<sup>4</sup>/ml 的密度接种于 24 孔板,培养 24 h,加入终浓度为 10 μg/ml 梓醇于 OGD 结束后,以 4% 的多聚甲醛磷酸缓冲液固定细胞 30 min,吸去多聚甲醛后用 PBS 洗 3 次,加入终浓度为 5 μg/ml Hoechst 33258 在暗处染色 1 h,在荧光显微镜下观察凋亡细胞核的变化。

### 1.5 PC12 细胞活性和 LDH 释放量测定

PC12 细胞活性检测按文献<sup>[5]</sup>进行 MTT 比色分析。LDH (lactate dehydrogenase, LDH) 释放量(release)测定,取实验 24 孔培养板的培养上清液 50 μl,按试剂盒说明书操作。

### 1.6 流式细胞仪分析细胞凋亡比例

收集各种处理的细胞及对照细胞,1 000 r/min 离心 10 min, PBS 洗 3 次。用 70%乙醇固定单细胞悬液,4℃保存。染色前用 PBS 漂洗,离心沉淀除去固定液,加入 RNase 至终浓度 50 mg/L,37℃水浴 30 min。加入碘化丙啶(PI)至终浓度为 50 mg/L,4℃避光 30 min 后,用流式细胞仪进行检测<sup>[6]</sup>。

### 1.7 流式细胞仪分析 P53、Bcl-2 蛋白

流式细胞仪分析 P53、Bcl-2 蛋白水平按文献<sup>[7]</sup>介绍的方法操作。收集细胞,用冷 PBS 洗三次,然后用 2%多聚甲醛固定 20 min,用 0.5% Triton X-100 处理后加入 1:100 稀释的 P53、Bcl-2 一抗孵育 1 h,随后用荧光标记的相应二抗在室温下暗处孵育 45 min。用 PBS 洗,流式细胞仪测定、分析光密度。

### 1.8 统计学处理

将对照组、缺血组和梓醇治疗组所测得的数据进行单因素方差分析和 q 检验,比较各组间的差异显著性,结果用表示。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态学的观察

Hoechst 33258 荧光染色表明,OGD 损伤组的细胞发生了明显的凋亡特征,染色质固缩,细胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染,产生凋亡小体。梓醇不仅可以降低染色体的浓缩程度,而且也可以减少凋亡小体的数量。表明梓醇对 OGD 诱导的 PC12 细胞凋亡有抑制作用(图 1)。

### 2.2 梓醇对氧糖剥夺诱导 PC12 细胞损伤的保护作用

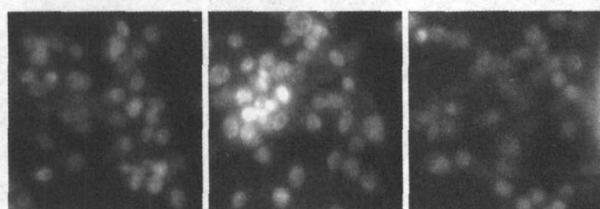
由表 1 结果可见 OGD 损伤组的细胞活力下降,LDH 释放量升高,表明细胞明显损伤。而梓醇在 0.1,1,10,100 μg/ml 浓度可减少细胞活力的下降和 LDH 的释放量,其中以 100 μg/ml 浓度组保护作用最强,与 OGD 组比较差异有显著性,而 0.1 μg/ml 组虽可减少细胞活力的下降,但与 OGD 组比较差异无显著性(P>0.05)。提示梓醇对 OGD 诱导 PC12 细胞的损伤有显著的保护作用。

### 2.3 流式细胞仪检测 PC12 细胞凋亡比例

如图 1 所示,由流式细胞仪检测 DNA 分布图谱可见,氧糖剥夺 3 h 复氧 18 h 后,PC12 细胞在 G0/G1 峰前有明显的亚二倍峰,说明 OGD 可诱导 PC12 细胞凋亡(图 2B);加入梓醇 100 μg/L 可显著减小亚二倍峰的峰面积,细胞凋亡比率由 (15.4±1.8)% (图.2B)降低到(6.3±0.16)% (图.2C),与 OGD 组比较 P<0.05。进一步表明梓醇能够明显抑制 OGD 诱导的 PC12 细胞凋亡。

### 2.4 梓醇对 PC12 细胞 P53 和 Bcl-2 蛋白的影响

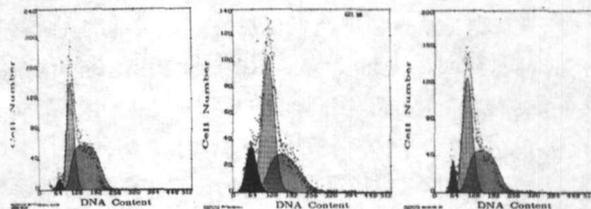
如表 2 所示,经流式细胞仪检测,对照组中 P53 染色阳性细胞比率为(0.8±0.03)%,在氧糖剥夺 3 h 复氧 18 h 后,P53 染色阳性细胞比率升高到 (5.9±0.07)%。在加入 0.1,1,10,100 μg/ml 梓醇后,P53 蛋白水平显著下降。



A 对照组 A control  
B OGD 损伤组 B OGD  
C 梓醇保护组 C Catalpol

图 1 Hoechst 33258 染色

Figure 1 Hoechst 33258 staining



A 对照组 A control  
B OGD 损伤组 B OGD  
C 梓醇保护组 C catalpol

图 2 流式细胞仪检测 PC12 细胞凋亡比例

Figure 2 The apoptosis rate was measured by flow cytometry analysis (FCM).

表 1 梓醇对 OGD 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用

Table 1 Protective action of catalpol on PC12 induced by OGD

Group	Dose( μg/ml)	OD570	LDH
Control	-	0.72±0.031	110.34±4.18
OGD	-	0.30±0.046*	225.91±7.35*
OGD+Catalpol	0.1	0.34±0.034	215.77±2.55
OGD+Catalpol	1	0.37±0.044**	171.38±3.26**
OGD+Catalpol	10	0.74±0.055**	115.75±2.66**
OGD+Catalpol	100	0.80±0.054**	96.50±2.96**

与 control 组相比 \*P<0.05,与 OGD 组相比 \*\*P<0.05.

\*P<0.05, as compared to control group; \*\*P<0.05, as compared to OGD

表 2 梓醇对 Bcl-2、P53 的影响

Table 2 Effect of catalpol on the protein of Bcl-2 and P53

Group	Dose( $\mu$ g/ml)	Levels of protein(%)	
		P53	Bcl-2
Control	-	0.8 $\pm$ 0.03	72.5 $\pm$ 4.7
OGD	-	5.9 $\pm$ 0.07*	35.7 $\pm$ 1.3*
OGD+Catalpol	0.1	5.1 $\pm$ 0.05**	40.2 $\pm$ 2.1**
OGD+Catalpol	1	4.8 $\pm$ 0.09**	49.3 $\pm$ 3.2**
OGD+Catalpol	10	4.6 $\pm$ 0.08**	58.9 $\pm$ 4.2**
OGD+Catalpol	100	1.1 $\pm$ 0.02**	64.8 $\pm$ 4.4**

与 control 组相比 \*P<0.05,与 OGD 组相比 \*\*P<0.05.

\*P<0.05, as compared to control group; \*\*P<0.05, as compared to OGD.

经流式细胞仪检测,对照组中 Bcl-2 染色阳性细胞比率为 (72.5 $\pm$ 4.7)%,在氧糖剥夺 3 h 复氧 18 h 后,Bcl-2 染色阳性细胞比率降低到(35.7 $\pm$ 1.3)%。在加入 0.1,1,10,100  $\mu$  g/mL 梓醇后,Bcl-2 蛋白水平显著上升。

### 3 讨论

本实验研究结果显示,缺血导致 PC12 细胞活性降低,LDH 大量释放,LDH 释放量可反映细胞膜对 LDH 的渗漏程度,既反映膜的通透性、完整性<sup>[9]</sup>。从结果可以看出梓醇各浓度组能明显减少细胞活力的降低和 LDH 的释放,通过 Hoechst 33258 染色法观察到蓝色荧光明显减弱,出现凋亡小体的细胞明显减少;通过流式细胞仪检测凋亡比例发现,PC12 细胞的凋亡比例明显降低,说明梓醇明显抑制缺血诱导 PC12 细胞凋亡。

脑缺血再灌注后细胞凋亡呈一个动态发展过程,缺血再灌注加速了细胞凋亡的发展,细胞凋亡的发展伴随着促凋亡基因表达的增加及抗凋亡基因表达的减少。bcl-2 与 P53 是缺血性脑损伤中重要的凋亡调控基因。P53 是促凋亡基因,它是导致脑局灶性缺血后大脑皮质神经元死亡的主要原因<sup>[10]</sup>。正常情况下,P53 于组织中有广泛而极低量的表达,这是非诱导状态 P53,在稳定染色体 DNA、防止基因突变方面起重要作用。如果细胞 DNA 遭受缺血损伤时,P53 可作为转录因子诱导其下游基因表达如对 bcl-2 的表达有抑制作用,引起细胞周期停滞或细胞凋亡<sup>[11]</sup>。bcl-2 为抗凋亡基因,定位于线粒体上,其功能是维持线粒体膜的完整性,控制着线粒体的深透转换(Permeability Transition)和离子、蛋白的外流。阻止线粒体膜整合蛋白的释放,尤其是细胞色素 C 的释放。而细胞色素 C 可激活 caspase 家族,进而激活下游信号通路,导致细胞凋亡。因此 bcl-2 通过抑制细胞色素 C 的释放,从而阻断 caspase 的激活,最终表现出凋亡抑制活性<sup>[12]</sup>。

本实验结果表明,缺血能导致 PC12 细胞 bcl-2 蛋白水平降低,梓醇对缺血后 bcl-2 蛋白的表达有明显升高作用,从而对缺血后细胞凋亡起到了一定的抑制作用。缺血可使 PC12 细胞中 P53 蛋白的表达增高,而梓醇可使缺血后升高的 P53 蛋白的表达有所下降。提示 P53 蛋白的高表达参与细胞凋亡的发生,梓醇对 P53 蛋白的高表达有明显的抑制作用,所以其拮抗缺血后的细胞凋亡的作用,可能是通过抑制 P53 基因蛋白高表达实现。因此我们可以判断,梓醇通过调节细胞凋亡相关基因的表

达而抑制细胞凋亡,具有良好的保护脑缺血再灌注损伤的功效。

### 参考文献

- [1] Lushnikova IV, Voronin KY, Malyarevskyy PY, et al. Morphological and functional changes in rat hippocampal slice cultures after short-term oxygen-glucose deprivation [J]. J. Cell. Mol. Med.,2004,8 (2):241-248
- [2] Jiang B, Liu JH, Bao YM, et al. Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide induced PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade[J]. Toxicon, 2004,43(1):53-59
- [3] Ismailoglu UB, Saracoglu I, Harput US, et al. Effects of phenylpropanoid and iridoid glycosides on free radical-induced impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aortic rings [J]. J. Ethnopharmacol, 2002,79(2):193-197
- [4] Ortiz de Urbina AV, Martin ML, et al. In vitro antispasmodic activity of peracetylated penstemonoside, aucubin and catalpol[J]. Planta Med, 1994,60(6):512-515
- [5] 李爱红,柯开富.人参皂甙 Rb1、Rb3、Rg1 对培养小鼠皮层细胞缺血损伤的保护作用及浓度-效应关系[J]. 脑与神经疾病杂志,2003,11 (2):72-74
- [6] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci M C, et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry [J]. J Immunol Methods, 1991,139(2): 271-279
- [7] Liu X, Zhu XZ. Role of P53, C-myc, Bcl-2, Bax and caspase in glutamate-induced neuronal apoptosis and the possible neuroprotective mechanism of basic fibroblast growth factor [J]. Mol. Brain Res., 1999,70(2):201-206
- [8] Rukenstein A, Rydel RE, Greene LA. Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation- and transcription-independent mechanisms[J]. J Neurosci, 1991,11(8):2552-2563
- [9] Keilhoff G, Wolf G. Comparison of double fluorescence staining and LDH-test for monitoring cell viability in vitro[J]. Neuroreport, 1993,5 (2):129-132
- [10] 任非,樊淑英,智丽敏,等.黄芪治疗缺血性脑损伤的有效性[J]. 中国临床康,2006,10(3):149-151
- [11] 王冬梅,贾春梅,楚文英.脑缺血时 p53 表达的意义[J]. 医学综述, 2005,12(9):539-541
- [12] 彭洪涛,刘淑萍.bcl-2 基因与细胞凋亡关系的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志, 2006,38(4):349-351