

## 表没食子儿茶素没食子酸酯对鱼藤酮诱导 PC12 细胞损伤的保护作用

竺飞燕<sup>1</sup>, 陈 瑛<sup>1</sup>, 戴美芬<sup>2</sup>, 王 炼<sup>1</sup>, 包琼琼<sup>1</sup>, 庄晓赛<sup>1</sup>, 刘 云<sup>1</sup>, 胡 乔<sup>1</sup>, 张 雄<sup>1</sup>  
(温州医学院 1. 附属第二医院神经科, 浙江 温州 325027; 2. 附属东阳医院神经科, 浙江 东阳 322100)

**摘要:** **目的** 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及其可能机制。**方法** 将培养的大鼠 PC12 细胞分别加入 EGCG 1,5 和 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  预处理 30 min 后加入鱼藤酮 250  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  继续作用 24 h。MTT 比色法检测细胞存活率, Hoechst33258 染色观察细胞核形态的变化, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, JC-1 染色检测线粒体膜电位变化。**结果** 与鱼藤酮模型组存活率(77.0 $\pm$ 1.3)% 相比, EGCG 1,5 和 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组细胞存活率显著增加( $P < 0.05$ ), 分别为(79.8 $\pm$ 2.3)%, (82.4 $\pm$ 2.2)% 和(88.3 $\pm$ 2.0)%。Hoechst33258 染色发现, EGCG 组细胞核形态明显改善。与正常对照比较, 模型组细胞凋亡率增加 8.2 倍; 与鱼藤酮模型组比较, EGCG 组细胞凋亡率分别下降 46%, 25% 和 63%, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。流式细胞仪检测鱼藤酮组凋亡率为 33.8%, EGCG 1,5 和 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组的凋亡率下降至 30.6%, 14% 和 15.7%。与模型组相比, EGCG 1,5 和 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组线粒体膜分别增高了 2.48, 3.96 和 4.04 倍, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** EGCG 具有抑制鱼藤酮诱导的细胞凋亡作用, 其机制可能与其稳定线粒体膜电位有关。

**关键词:** 表没食子儿茶素没食子酸酯; 鱼藤酮; PC12 细胞; 细胞凋亡

**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2011)01-0052-05

**DOI:** 10.3867/j.issn.1000-3002.2011.01.010

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是绿茶中的主要活性成分。研究发现 EGCG 具有抗心血管疾病、抗炎症和抗肿瘤等多方面的生物学活性<sup>[1]</sup>。近年来, EGCG 对神经退行性疾病的作用逐渐受到关注。帕金森病(Parkinson disease, PD)的病因认为是由线粒体功能障碍、氧化应激、细胞凋亡和泛素-蛋白酶体功能失调等多种机制引起的<sup>[2]</sup>。因此, 寻找一种具有多方位神经保护效应的药物尤为重要。据报道 EGCG 具有抗氧化应激、抗凋亡、调节细胞信号转导途径和金属螯合等多方位保护作用<sup>[3]</sup>, 本实验室研究发现, EGCG 具有抗氧化应激、铁离子螯合及抗凋亡作用<sup>[4-6]</sup>, 为了进一步研究 EGCG 对线粒体功能障碍的影响, 采用线粒体呼吸链抑制剂鱼藤酮诱导大鼠 PC12 细胞凋亡模型, 探讨 EGCG 对线粒体功能障碍所致的多巴胺能神经元是否具有保护作用。

**基金项目:** 国家自然科学基金(30670748); 浙江省自然科学基金(Y207557); 浙江省科技厅钱江人才项目(2008R10040)

**作者简介:** 竺飞燕(1984-), 女, 硕士研究生, 主要从事帕金森病的基础和临床研究。

**通讯作者:** 张 雄, E-mail: zhangxiong98@gmail.com

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

高分化大鼠 PC12 细胞购自中国科学院上海生命科学院; EGCG 由浙江大学茶学院杨贤强教授惠赠, 纯度大于 95%; 鱼藤酮、噻唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司; Hoechst33258 染色液购自碧云天公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)均购自南京凯基生物有限公司。流式细胞仪购自美国 BD 公司; 荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

### 1.2 细胞培养及分组

PC12 细胞采用 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 添加青霉素 100  $\text{KU}\cdot\text{L}^{-1}$  和链霉素 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 置于培养箱中培养。选取对数生长期细胞进行实验。

根据预实验结果, 细胞分正常对照组, 鱼藤酮 250  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  组, EGCG 1,5 和 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组。EGCG 预孵育 30 min 再加入鱼藤酮继续培养 24 h。分别进行各指标检测, 每组实验至少重复 3 次。

### 1.3 MTT 比色法检测细胞存活率

培养 PC12 细胞于 96 孔板, 每组设 6 个平行孔,

药物处理结束,每孔加入 10 μl MTT 5 g·L<sup>-1</sup>,继续培养 4 h,吸尽培养液,加入二甲亚砜(DMSO) 100 μl。用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定吸光度(absorbance, A),并减去背景值,细胞存活率(%) =  $A_{\text{实验组}}/A_{\text{正常对照}} \times 100\%$ 。

### 1.4 Annexin V/PI 流式细胞仪分析细胞凋亡率

培养结束,消化 PC12 细胞制成单细胞悬液,结合液重悬细胞,加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀,再加入 5 μl PI,室温避光染色 30 min,流式细胞仪检测凋亡率。凋亡率为计数 10 000 个细胞中凋亡细胞所占百分比。

### 1.5 Hoechst33258 染色检测细胞核形态变化

盖玻片培养 PC12 细胞于六孔板,药物处理结束,4%多聚甲醛固定,PBS 洗涤,0.5 ml Hoechst33258 染色液避光反应 10 min,340 nm 波长紫外光激发,荧光显微镜下观察细胞核形态。每组 3 张不同的玻片上各随机选取 4 个视野计数,凋亡百分率(%) = 凋亡细胞数/细胞总数 × 100%。

### 1.6 JC-1 染色检测线粒体膜电位

盖玻片培养细胞于六孔板,药物处理结束,PBS 洗涤,加入 500 μl JC-1 工作液,培养箱中孵育 15 ~ 20 min,孵育液洗涤,取出盖玻片于荧光显微镜下观察拍照。当膜电位水平较高时,JC-1 主要以聚合体形式存在,呈红色荧光,当膜电位水平较低时,主要以单体形式存在,呈绿色荧光。通过 ImageProPlus 图像分析软件测定细胞内的红色和绿色荧光强度,相对定量线粒体膜电位水平。

### 1.7 统计学分析

所有实验结果数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS

13.0 统计软件包进行数据分析,采用单因素方差分析。组间比较采用 *t* 检验。 $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

### 2.1 EGCG 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞存活率的影响

表 1 结果显示,与正常对照组比较,鱼藤酮 250 nmol·L<sup>-1</sup> 模型组细胞存活率显著下降( $P < 0.05$ );与鱼藤酮模型组比较,EGCG 1,5 和 10 μmol·L<sup>-1</sup> 组细胞存活率显著升高,分别升高了 2.8%,5.4% 和 11.3% ( $P < 0.05$ )。

表 1 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞存活率的影响

Tab. 1 Effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on rotenone-induced cell survival in rat PC12 cells

组别	细胞存活率/%
正常对照	100.0 ± 2.9
鱼藤酮(模型)	77.0 ± 1.3*
EGCG 1	79.8 ± 2.3**
5	82.4 ± 2.2**
10	88.3 ± 2.0**

细胞加入 EGCG 1,5 和 10 μmol·L<sup>-1</sup> 预孵育 30 min 再加入鱼藤酮 250 nmol·L<sup>-1</sup> 继续培养 24 h.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ ,与正常对照组比较;#  $P < 0.05$ ,与鱼藤酮组比较。

### 2.2 EGCG 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞凋亡的影响

#### 2.2.1 流式细胞仪结果

如图 1 所示,左下象限为正常细胞,右下象限为

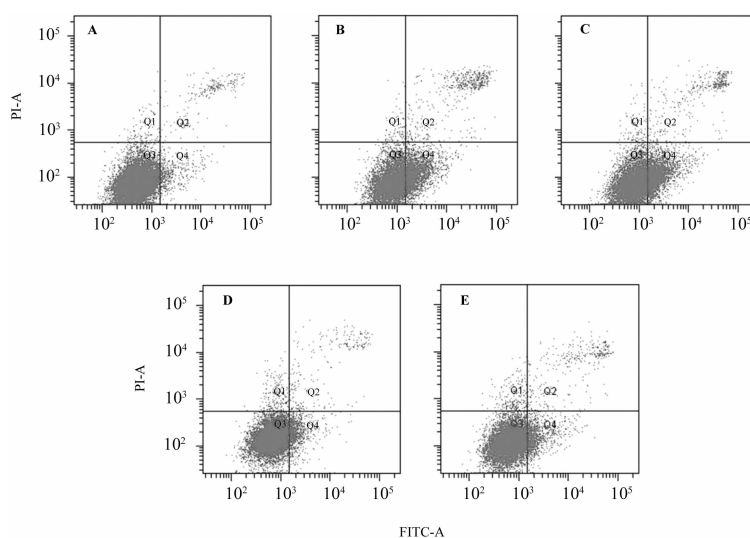


图 1 EGCG 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞凋亡率的影响。细胞分组处理见表 1。A: 正常对照组; B: 鱼藤酮模型组; C, D 和 E: 分别为 EGCG 1, 5 和 10 μmol·L<sup>-1</sup> 组。

Fig. 1 Effect of EGCG on rotenone-induced apoptotic rate detected by flow cytometry.

早期凋亡细胞,右上象限为晚期凋亡及坏死细胞。正常组,鱼藤酮组,EGCG 1, 5 和 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组细胞凋亡率分别为 6.4%, 33.8%, 30.6%, 14.0% 和 15.7%。由此可见, EGCG 预处理可降低鱼藤酮诱导的细胞凋亡率。

### 2.2.2 Hoechst33258 染色结果

荧光显微镜下观察发现,正常组细胞核呈蓝色,边缘光滑,均匀淡染(图 2A),鱼藤酮模型组部分细胞核固缩,呈致密浓染,显示较强荧光,甚至可见细胞核裂解,产生凋亡小体,这些均为细胞凋亡的特征性表现(图 2B),而 EGCG 组细胞核形态改善,荧光强

度减弱(图 2C, D, E)。鱼藤酮组细胞凋亡率( $38.7 \pm 3.2\%$ ),较正常组( $4.2 \pm 1.1\%$ )明显升高( $P < 0.01$ )。EGCG 1, 5 和 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组细胞凋亡率分别为( $26.5 \pm 1.9\%$ ), ( $31.0 \pm 2.8\%$ ) 和 ( $23.7 \pm 3.0\%$ ), 低于鱼藤酮组( $n = 3, P < 0.05$ )。这些结果提示 EGCG 能一定程度上抑制鱼藤酮诱导的 PC12 细胞的凋亡。

### 2.3 EGCG 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞线粒体膜电位的影响

图 3 结果显示,鱼藤酮组细胞红色荧光弱,而绿色荧光较强(图 3),红/绿荧光强度比值为  $0.25 \pm 0.05$ ,

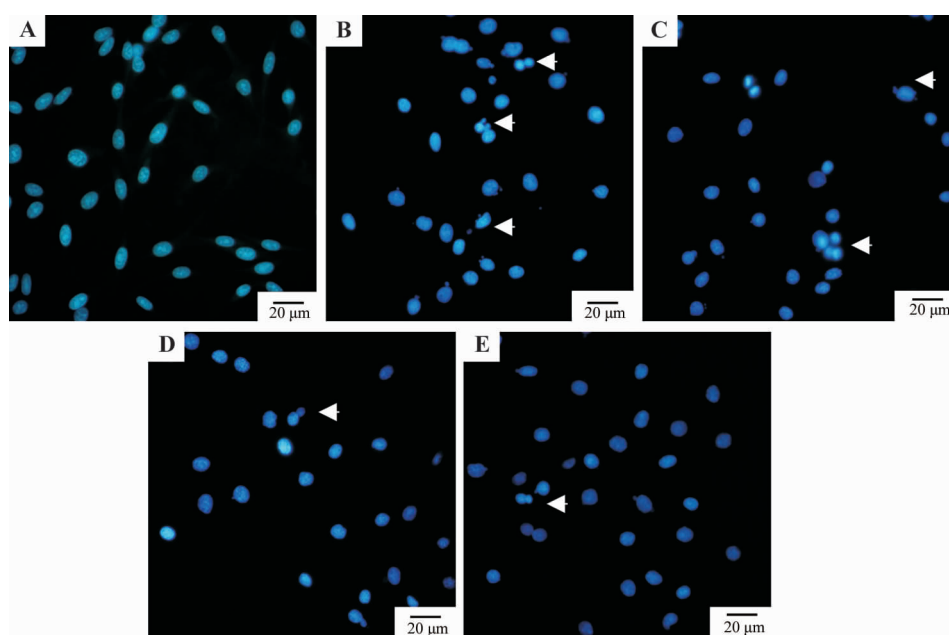


图 2 EGCG 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞核形态的影响 (Hoechst33258 染色  $\times 400$ )。A: 正常对照组; B: 鱼藤酮组; C, D 和 E: 分别为 EGCG 1, 5 和 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  预处理组。箭头所指为细胞核固缩、裂解。

Fig. 2 Effect of EGCG on rotenone-induced changes in nuclear morphology (Hoechst33258 staining  $\times 400$ ).

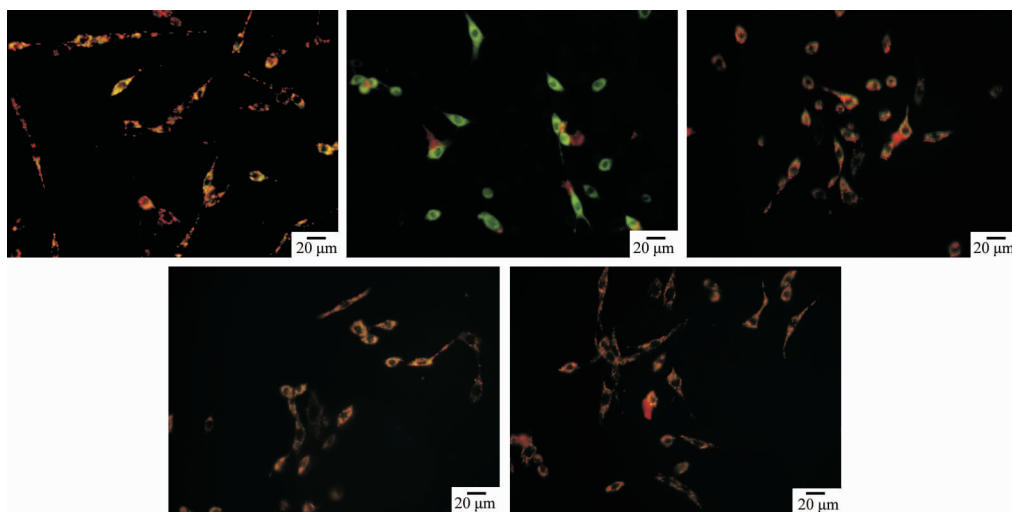


图 3 EGCG 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞线粒体膜电位的影响 (JC-1 染色  $\times 400$ )。A: 正常对照组; B: 鱼藤酮组; C, D 和 E: 分别为 EGCG 1, 5 和 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组。红色荧光表示线粒体膜电位较高,绿色荧光表示线粒体膜电位较低。

Fig. 3 Effect of EGCG on rotenone-induced mitochondrial membrane potential in PC12 cell (JC-1 staining  $\times 400$ ).

与正常对照组  $1.92 \pm 0.15$  相比明显下降 ( $n=3$ ,  $P<0.01$ ), 而 EGCG 1, 5 和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组细胞膜电位分别是鱼藤酮组和 2.48, 3.96 和 4.04 倍 ( $P<0.01$ )。表明鱼藤酮可导致 PC12 细胞的线粒体膜电位下降, 而 EGCG 能够抑制鱼藤酮诱导的线粒体膜电位下降。

### 3 讨论

尽管 PD 的病因和发病机制仍不明确, 但环境毒素在 PD 发病中的作用已得到广泛认可。已有流行病学研究结果显示, 居住在农村、饮用井水、从事农业和使用杀虫剂可能是 PD 的危险因素。鱼藤酮是一种线粒体呼吸链复合物 I 的特异性抑制剂, 目前广泛用作杀虫剂和水库清理剂<sup>[7]</sup>, 普遍存在于我们的生活环境中如土壤、花园、农田的水生环境等。有研究发现鱼藤酮可导致大鼠黑质多巴胺能神经元减少及  $\alpha$ -突触核蛋白的聚集<sup>[8]</sup>, 能较好的复制 PD 的病理特征。PC12 细胞株源于大鼠嗜铬细胞瘤, 它在形态、生理和生化功能等方面很接近中脑多巴胺能神经元<sup>[9]</sup>, 因此, 本实验室选择鱼藤酮诱导大鼠 PC12 细胞损伤作为 PD 模型。

一项关于 PD 发病率与饮茶的荟萃分析研究发现, 饮茶能够明显降低 PD 的发病率, 尤其在人群中这种作用相当明显<sup>[10]</sup>。绿茶的主要组分为绿茶多酚, 其占绿茶干重的 30% ~ 40%, 属黄烷醇类化合物, 其主要活性成分是 EGCG。据报道 EGCG 对神经变性疾病如 PD 具有保护作用<sup>[3]</sup>。本实验研究发现, EGCG 预处理后细胞存活率提高、细胞核固缩、裂解现象减少、细胞核形态改善以及细胞凋亡率降低, 表明 EGCG 能拮抗鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤。最新在纹状体脑片培养的一项研究中也发现, EGCG 能够减少一氧化氮的产生, 从而抑制鱼藤酮诱导的多巴胺神经元的死亡<sup>[11]</sup>。此外, 笔者课题组研究发现, EGCG 对 lactacystin、脂多糖及 1-甲基-4-苯基吡啶离子诱导损伤的 PD 模型具有保护作用<sup>[5-6]</sup>, 推测 EGCG 对多巴胺能神经元损伤具有保护作用。

越来越多的研究表明, PD 的发病与线粒体损伤密切相关<sup>[12]</sup>, 同时提出线粒体功能障碍是多巴胺能神经元死亡的关键环节<sup>[13]</sup>。当线粒体呼吸链受抑制时, 跨膜电位发生改变, 细胞色素 c 及多种凋亡诱导因子释放, 引起细胞凋亡的级联反应, 最终导致细胞凋亡。线粒体功能的改变往往表现为膜电位降低和膜的不稳定性。本实验研究发现, 鱼藤酮可导致 PC12 细胞的线粒体膜电位下降, 而 EGCG 能够抑制

鱼藤酮诱导的线粒体膜电位下降。

本实验研究发现, 鱼藤酮能够诱导 PC12 细胞发生凋亡, EGCG 具有抑制鱼藤酮诱导的 PC12 细胞凋亡的作用, 其机制可能部分与其稳定线粒体膜电位、保护线粒体功能有关。在 PD 的体内及体外实验中已证实了 EGCG 具有抗氧化应激、铁离子螯合及抗凋亡作用<sup>[4-6]</sup>, 结合本实验研究结果提示, EGCG 是一种具有多方位神经保护效应的药物, 这与人们目前寻找一种具有多方位神经保护效应的药物的帕金森病药物治疗和预防策略相符合, 在 PD 防治尤其是预防上具有潜在的应用价值。

### 参考文献:

- [1] Chen D, Milacic V, Chen MS, Wan SB, Lam WH, Huo C, *et al.* Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets [J]. *Histol Histopathol*, 2008, **23**(4):487-496.
- [2] Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2009, **373**(9680):2055-2066.
- [3] Mandel SA, Amit T, Kalfon L, Reznichenko L, Weinreb O, Youdim MB. Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG) [J]. *J Alzheimers Dis*, 2008, **15**(2):211-222.
- [4] Zhang X, Xie W, Qu S, Pan T, Wang X, Le W. Neuroprotection by iron chelator against proteasome inhibitor-induced nigral degeneration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **333**(2):544-549.
- [5] Pan T, Fei J, Zhou X, Jankovic J, Le W. Effects of green tea polyphenols on dopamine uptake and on MPP<sup>+</sup>-induced dopamine neuron injury [J]. *Life Sci*, 2003, **72**(9):1073-1083.
- [6] Li R, Huang YG, Fang D, Le WD. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits lipopolysaccharide-induced microglial activation and protects against inflammation-mediated dopaminergic neuronal injury [J]. *J Neurosci Res*, 2004, **78**(5):723-731.
- [7] Greenamyre JT, Betarbet R, Sherer TB. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2003, **9** (Suppl 2):S59-S64.
- [8] Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2009, **34** (2):279-290.
- [9] Shafer TJ, Atchison WD. Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies [J]. *Neurotoxicol-*

- ogy, 1991, **12**(3):473-492.
- [10] Barranco Quintana JL, Allam MF, Del Castillo AS, Navajas RF. Parkinson's disease and tea: a quantitative review[J]. *J Am Coll Nutr*, 2009, **28**(1):1-6.
- [11] Moldzio R, Radad K, Krewenka C, Kranner B, Duvigneau JC, Wang Y, et al. Effects of epigallocatechin gallate on rotenone-injured murine brain cultures [J]. *J Neural Transm*, 2010, **117**(1):5-12.
- [12] Abeliovich A. Parkinson's disease: Mitochondrial damage control [J]. *Nature*, 2010, **463**(7282):744-745.
- [13] Yao Z, Wood NW. Cell death pathways in Parkinson's disease: role of mitochondria [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, **11**(9):2135-2149.

## Effects of epigallocatechin gallate on rotenone-induced injury in rat PC12 cells

ZHU Fei-yan<sup>1</sup>, CHEN Ying<sup>1</sup>, DAI Mei-fen<sup>2</sup>, WANG Lian<sup>1</sup>, BAO Qiong-qiong<sup>1</sup>,  
ZHUANG Xiao-sai<sup>1</sup>, LIU Yun<sup>1</sup>, HU Qiao<sup>1</sup>, ZHANG Xiong<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China;

2. Department of Neurology, The Dongyang Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Dongyang 322100, China)

**Abstract: OBJECTIVE** To investigate protective effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on rotenone-induced injury in rat pheochromocytoma (PC12) cells and to explore potential mechanisms. **METHODS** EGCG 1, 5 and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  were added to cultivated rat PC12 cells, and 30 min later, rotenone 25  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  was added and then coincubated for 24 h. The cell viability was assessed by MTT assay. Hoechst33258 was employed to observe morphological changes of cell nucleus. Apoptosis rate was detected by flow cytometry using Annexin V and PI. Mitochondrial membrane potential was measured by JC-1 staining. **RESULTS** Compared with (77.0  $\pm$  2.9)% in rotenone-treated group, cell survival in EGCG 1, 5 and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  groups were significantly higher (79.8  $\pm$  2.3)%, (82.4  $\pm$  2.2)% and (88.3  $\pm$  2.0)%, respectively ( $P < 0.05$ ). Hoechst33258 staining demonstrated that EGCG improved the nuclear changes morphologically. Compared with control group, the apoptosis rate was significantly increased in rotenone-model cells by 8.2 folds which was significantly reduced by 46%, 25% and 63% in EGCG 1, 5 and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  groups ( $P < 0.01$ ). Comparison with 30.6% in rotenone group, in EGCG 1, 5 and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  apoptosis rate reduced to 30.6%, 14%, 15.7% respectively by FCM analysis. Meanwhile, the mitochondrial membrane potential of EGCG 1, 5 and 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  groups increased 2.48-, 3.96- and 4.04-fold compared with rotenone-treated group ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** EGCG exhibits inhibitory effect on rotenone induced apoptosis in rat PC12 cells, which is possibly due to its ability to stabilize mitochondrial membrane potential.

**Key words:** epigallocatechin-3-gallate; rotenone; PC12 cells; apoptosis

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China (30670748); National Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y207557); and "Qianjiang" Talents Program of Science & Technology Agency in Zhejiang Province (2008R10040)

**Corresponding author:** ZHANG Xiong, E-mail: zhangxiong98@gmail.com

(收稿日期: 2010-05-06 接受日期: 2010-08-19)

(本文编辑: 乔虹)