

文章编号:1000-5404(2014)17-1809-04

论著

原花青素对 PC12 细胞氧化应激损伤保护作用的细胞周期调控机制

梅寒芳^{1,2}, 李 荷², 朱家勇¹ (510006 广州, 广东药学院: 广东省药用生物活性物质研究重点实验室¹, 基础学院生物化学与分子生物学系²)

[摘要] 目的 观察原花青素对过氧化氢诱导体外培养大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞氧化损伤及细胞周期阻滞的保护作用, 并探讨细胞周期调控基因 c-Abl 和 plk1 在其中的作用。方法 采用 MTT 法观察不同浓度原花青素对 100 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢诱导 6 h 的 PC12 细胞增殖率的影响。采用流式细胞仪检测原花青素对诱导的 PC12 细胞周期分布的影响, Western blot 检测不同浓度原花青素对诱导的 PC12 细胞 c-Abl 和 plk1 基因蛋白表达水平的影响。结果 与对照组比较, 过氧化氢显著降低 PC12 细胞增殖率 ($P < 0.01$)、显著增高 PC12 细胞 S 期分布比例 ($P < 0.01$)、显著诱导 c-Abl 和 plk1 基因蛋白水平表达增强 ($P < 0.01$)。与过氧化氢诱导组比较, 原花青素剂量依赖性提高 PC12 细胞的增殖率 ($P < 0.01$)、缓解过氧化氢诱导的细胞周期 S 期阻滞 ($P < 0.01$)、降低 c-Abl 和 plk1 基因蛋白水平的表达 ($P < 0.01$)。结论 原花青素对过氧化氢诱导的 PC12 细胞氧化损伤具有保护作用, 其机制可能是通过缓解过氧化氢诱导的细胞周期 S 期阻滞、降低细胞周期调控相关基因 c-Abl 和 plk1 的蛋白表达水平来实现的。

[关键词] 原花青素; 过氧化氢; PC12 细胞; plk1 基因; c-Abl 基因

[中图分类号] R282.71; R329.28; R338.1

[文献标志码] A

Cell cycle regulation involved in protective effect of proanthocyanidins on PC12 cells damage from hydrogen peroxide

Mei Hanfang^{1,2}, Li He², Zhu Jiayong¹ (¹ Guangdong Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, ² Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510006, China)

[Abstract] **Objective** To determine the protective effect of proanthocyanidins on oxidative damage and cell cycle arresting in PC12 cells induced by hydrogen peroxide, and to investigate the role of cell cycle regulatory genes cellular-Abelson gene (c-Abl) and polo-like kinase-1 (plk1) in the protection. **Methods** PC12 cells were incubated with different concentrations of proanthocyanidins and induced by 100 $\mu\text{mol/L}$ hydrogen peroxide for 6 h, and then the cell viability was measured by MTT assay, and the distribution of cell cycle was measured by flow cytometry, and the protein expression of c-Abl and plk1 was detected by Western blotting. **Results** Compared with the PC12 cells in control group, hydrogen peroxide significantly decreased cell viability and increased S phase distribution in PC12 cells ($P < 0.01$), and the protein expression level of c-Abl and plk1 gene in PC12 cells was also increased significantly by hydrogen peroxide ($P < 0.01$); Compared with the group of PC12 cells induced by hydrogen peroxide, proanthocyanidins significantly increased cell viability of PC12 cells in the range of experimental doses ($P < 0.01$). Proanthocyanidins relieved the S phase arrest induced by hydrogen peroxide ($P < 0.01$), and the protein levels of c-Abl and plk1 in PC12 cells was also decreased by proanthocyanidins in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). **Conclusion** Proanthocyanidins can protect PC12 cells from the cytotoxic stresses induced by hydrogen peroxide, and the protective mechanism may be mediated by relieving the S phase arrest and decreasing the protein expressional level of c-Abl and plk1 gene.

[Key words] proanthocyanidins; hydrogen peroxide; PC12 cells; polo-like kinase-1; cellular-Abelson gene

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (S2012040007968) and the National Natural Science Foundation of China (81401150).

Corresponding author: Li He, E-mail: lihe32@163.com; Zhu Jiayong, E-mail: Zhujiy@gdpu.edu.cn

[基金项目] 广东省自然科学基金(S2012040007968); 国家自然科学基金(81401150)

[通信作者] 李 荷, E-mail: lihe32@163.com

朱家勇, E-mail: Zhujiy@gdpu.edu.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140711.1719.004.html> (2014-07-11)

氧化应激所导致的神经元损伤是阿尔茨海默病、帕金森病、脑卒中、肌萎缩性侧索硬化症等多种神经性疾病的重要发病机制之一^[1-2]。正常细胞处于促氧化作用和抗氧化作用的动态平衡。当病理因素导致细胞内过氧化氢、超氧阴离子、羟自由基等产生过多,而抗氧化因素又不足以及时清除时,细胞就会处于氧化应激状态,这些自由基攻击细胞生物分子、损害细胞功能,导致细胞死亡^[2]。因此,过氧化氢作为一种重要的活性氧自由基,常被用于体外神经元毒性实验的氧化应激损伤模型^[3]。

发育成熟的神经元,在正常情况下应退出细胞周期,进入不分裂、不复制的终末分化状态,静止在G₀期^[4],但在多种病理因素导致神经元损伤时,常伴有神经元细胞周期紊乱(cell cycle redistribution, CCR),即:本应静止在G₀期的神经元脱离G₀期,表现出其他期细胞的特点,如:红藻酸和β淀粉样蛋白所诱导的神经元凋亡、中风和脑创伤、肌萎缩性侧索硬化症、癫痫、帕金森病、阿尔茨海默病等,因此,CCR甚至被认为是衰老性神经系统疾病神经元死亡的一种共同机制^[5]。但氧化应激与细胞周期紊乱这两种发病机制之间的关系,目前尚未有定论^[6]。

Polo-like kinase 1 (Plk1)属于丝/苏氨酸蛋白激酶家族,在细胞周期的S期开始表达、G₂期升高、M期达到高峰,是细胞周期运行的伴随性事件。Cellular Abelson gene (c-Abl)属于非受体酪氨酸激酶Abl家族,其编码产物激活后,可与底物相互作用来调控细胞周期^[7]。原花青素是一种天然的抗氧化物质,在本课题组前期工作中,已被证实对AD神经元具有保护作用,并从p53等凋亡相关分子表达变化的角度探讨了其保护机制^[8],但c-Abl和plk1等细胞周期调控基因是否参与了原花青素对神经元氧化应激损伤的保护作用,目前尚不清楚。

本研究采用过氧化氢诱导体外培养的大鼠嗜铬细胞瘤(PC12)细胞建立神经元氧化应激损伤模型,同时观察原花青素对神经元氧化应激损伤的保护作用,并从c-Abl和plk1等细胞周期调控基因的蛋白表达水平变化的角度,探讨原花青素对神经元氧化应激损伤保护作用的细胞周期调控机制。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

PC12细胞由广东药学院广东省药用生物活性物质重点实验室细胞库保存;胎牛血清、RPMI1640细胞培养基、胰蛋白酶购自美国Gibco公司;过氧化氢为广东省汕头市西陇化工厂分析纯试剂;原花青素(纯度>96%)购自天津尖峰天然产物研究开发有限公司;MTT购自美国Sigma公司;PVDF膜为美国

Millipore公司产品;PI细胞周期染色试剂盒、蛋白裂解液、蛋白定量试剂盒、ECL显色盒购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗鼠c-Abl(K12)抗体和羊抗鼠plk1抗体均购自美国Santa Cruz公司;蛋白质分子量标准品购自上海生工生物工程有限公司;过硫酸铵、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)等购自Sigma公司;三羟甲基甘氨酸(Treine)为Amresco公司产品;其他试剂为国产分析纯。凝胶成像仪、垂直板电泳槽、电泳仪、酶标仪和半干转膜仪为美国Bio-Rad公司产品;倒置显微镜为日本奥林巴斯Olympus公司产品;CO₂细胞培养箱购自德国HERAS公司;台式高速冷冻离心机购自德国Hettich公司;流式细胞仪为美国BD公司产品;低速离心机购自湖南湘仪离心机仪器有限公司;超净工作台购自苏州净化设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理 PC12细胞用含100 mL/L胎牛血清、100 mg/L青霉素及1×10⁵ U/L链霉素的RPMI1640培养基,37℃、50 mL/L CO₂条件下常规培养。待细胞长至融合状态,常规胰酶消化,1:3传代培养。PC12细胞培养24 h后,采用不同浓度(100、50、25、0 mg/L)原花青素预处理1 h,再加入终浓度为100 μmol/L的过氧化氢处理6 h后,收集细胞进行下一步实验。每次实验分为对照组(0 mg/L原花青素+0 μmol/L过氧化氢组)、诱导组(100 μmol/L过氧化氢组)和药物保护组(各浓度原花青素+100 μmol/L过氧化氢组),每组至少重复3次实验。

1.2.2 MTT法测定细胞增殖率 对数生长期PC12细胞常规消化,调整细胞浓度为4×10⁴/mL,每孔100 μL接种于96孔板培养24 h后,每孔按终浓度为100、50、25、0 mg/L加入原花青素预处理1 h,再每孔加入终浓度为100 μmol/L过氧化氢继续处理6 h(0 mg/L原花青素组除外)。以0 mg/L原花青素组为对照组,每组重复8次。过氧化氢加入2 h后,加入MTT继续培养4 h,弃上清,DMSO溶解,酶标仪检测490 nm处光密度值[D(490)]表示细胞增殖活性。

1.2.3 流式细胞仪检测各细胞样品的细胞周期分布 各组细胞经相应药物处理后,弃上清,胰酶消化收集、PBS洗涤,70%乙醇-20℃固定24 h。样品处理参照试剂盒说明书,将固定好的各组细胞样品离心,去除乙醇,PBS洗涤2遍,去除PBS后,每组细胞样品加入0.5 mL PI染色液,37℃、避光染色30 min,流式细胞仪检测。

1.2.4 各组细胞蛋白质样品制备 对数生长期PC12细胞常规消化,调整细胞浓度为5×10⁸/L,每孔2 mL接种于3.5 cm培养皿培养24 h后,按照1.2.1方法处理细胞后,弃上清,PBS洗涤,每皿加入蛋白裂解液400 μL,充分吹打裂解细胞,4℃、14 000×g离心10 min,吸取上清即为所提蛋白质样品。

1.2.5 Western blot检测不同组细胞c-Abl和Plk1蛋白的表达变化 步骤简述如下:配制SDS-PAGE凝胶。各组蛋白质样品定量,每孔20 μg上样,80 V电泳20 min后,转变电压为120 V,电泳120 min停止。剥胶,切除不含目的蛋白的区域,转膜、封闭、一抗、二抗、ECL显色、暗室X线片曝光。将曝光后的X线片扫描、采用Image J软件分析结果。

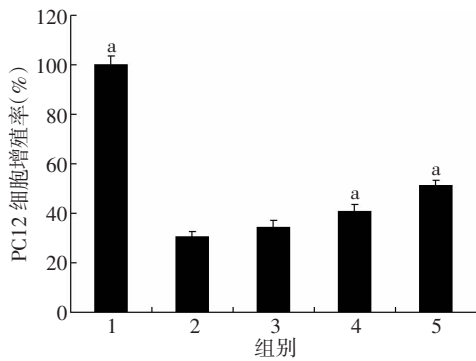
1.3 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件行单因素方差分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 不同浓度原花青素对过氧化氢诱导后PC12细胞增殖率的影响

与对照组相比,诱导组PC12细胞的增殖率显著降低($P < 0.01$);与诱导组相比,原花青素预处理1h后,可剂量依赖性提高PC12细胞的增殖率,其中50、100 mg/L原花青素保护组与诱导组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$,图1)。



1: 对照组;2: 诱导组;3: 25 mg/L 原花青素保护组;4: 50 mg/L 原花青素保护组;5: 100 mg/L 原花青素保护组;a: $P < 0.01$,与诱导组比较

图1 原花青素对过氧化氢诱导PC12细胞增殖率的影响

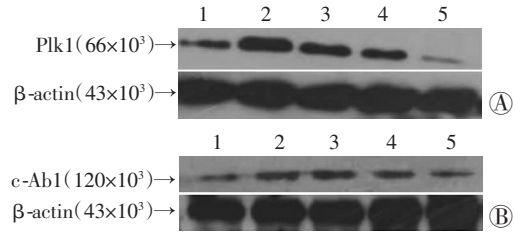
2.2 不同浓度原花青素对过氧化氢诱导后PC12细胞周期分布的影响

与对照组相比,诱导组PC12细胞S期的比例显著增多($P < 0.01$);与诱导组相比,不同浓度原花青素预处理1h,可剂量依赖性降低PC12细胞S期的比例(图2),对照组,诱导组,25、50、100 mg/L原花青素保护组的S期细胞分别占(55.61 ± 1.74)%、(63.36 ± 2.17)%、(59.32 ± 1.91)%、(55.17 ± 3.02)%、(49.68 ± 3.95)%,3个保护组与诱导组比较差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 不同浓度原花青素对过氧化氢诱导PC12细胞c-Abl和Plk1蛋白表达的影响

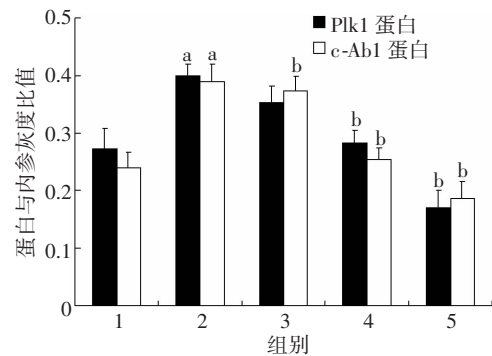
与对照组相比,诱导组c-Abl和Plk1蛋白分子的表达显著提高;与诱导组相比,不同浓度原花青素预处理1h,可剂量依赖性降低过氧化氢诱导的c-Abl和Plk1蛋白的表达增强(图3)。Image J软件灰度扫描分析提示:与对照组比较,诱导组中Plk1

蛋白与c-Abl蛋白表达都显著升高;与诱导组比较,各个原花青素保护组可剂量依赖性降低Plk1蛋白与c-Abl蛋白表达,差异均具有统计学意义($P < 0.01$,图4)。



1: 对照组;2: 诱导组;3: 25 mg/L 原花青素保护组;4: 50 mg/L 原花青素保护组;5: 100 mg/L 原花青素保护组

图3 Western blot检测原花青素对过氧化氢诱导PC12细胞Plk1(A)和c-Abl(B)蛋白表达的影响

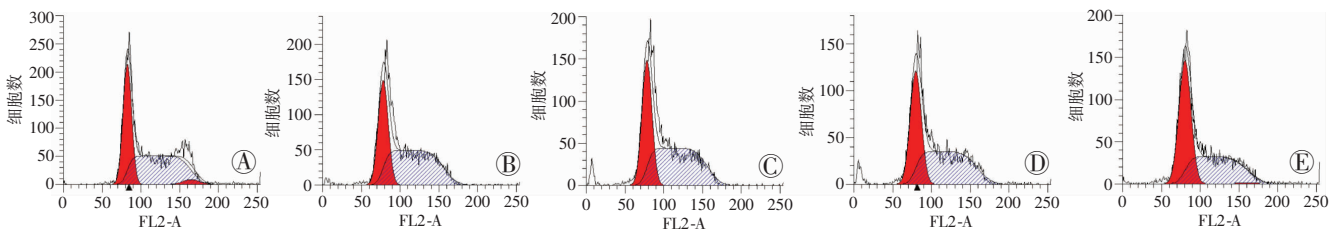


1: 对照组;2: 诱导组;3: 25 mg/L 原花青素保护组;4: 50 mg/L 原花青素保护组;5: 100 mg/L 原花青素保护组;a: $P < 0.01$,与对照组比较;b: $P < 0.01$,与诱导组比较

图4 灰度扫描分析原花青素对过氧化氢诱导PC12细胞Plk1蛋白、c-Abl蛋白表达的影响

3 讨论

葡萄,又称山葫芦,具有补气益血,滋阴生津等功效,据《神农本草经》记载:“益气倍力强志,久食轻身不老延年”。葡萄籽中富含的原花青素是植物王国中广泛存在的聚多酚类化合物,是一种天然的抗氧化剂^[9],其抗氧化活性是维生素C的20倍、是维生素E的50倍。本课题组前期已探讨了原花青素对AD神经元损伤保护作用的抗凋亡机制^[8],本研究进一步采用商品化的葡萄籽原花青素探讨其对神经元氧化应激损伤保护作用的细胞周期调控机制。



A: 对照组;B: 诱导组;C: 25 mg/L 原花青素保护组;D: 50 mg/L 原花青素保护组;E: 100 mg/L 原花青素保护组

图2 原花青素对过氧化氢诱导PC12细胞周期分布的影响

c-Abl 是一种非受体型酪氨酸激酶,在细胞中受到严格控制,保持低活性。正常情况下,c-Abl 通过对 $G_1 \sim S$ 检查点的调节来调控细胞周期。但当细胞处于应激状态时,c-Abl 被异常激活导致细胞增殖抑制、细胞周期阻滞和细胞凋亡^[10]。Plk1 是丝/苏氨酸蛋白激酶家族成员,在细胞周期的 G_2/M 检查点恢复、中心体成熟、有丝分裂、纺锤体安装等过程中均发挥重要作用^[11]。多项研究表明,plk1 基因表达抑制或 Plk1 蛋白抑制剂可引起细胞周期 G_2/M 期阻滞^[12-14];c-Abl 基因体内过表达可导致鼠脑嗅球区神经元 BrdU 掺入实验阳性增强^[15],提示 c-Abl 表达增强可导致神经元细胞周期紊乱,并进入 S 期。

本课题组前期研究发现 Plk1 也参与了过氧化氢对 PC12 细胞的毒性作用^[16]。本研究仍然利用过氧化氢诱导体外培养的 PC12 细胞 6 h 建立神经元氧化应激损伤模型,发现 100 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢显著降低 PC12 细胞的增殖率,同时诱导 PC12 细胞 S 期比例显著增高,导致细胞周期分布与正常对照组比较发生紊乱;c-Abl 和 Plk1 等细胞周期调控蛋白的表达显著增强。采用不同剂量原花青素对 PC12 细胞预处理 1 h 后,与 100 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢诱导组比较,原花青素可剂量依赖性提高 PC12 细胞的增殖率、显著降低 PC12 细胞 S 期比例,缓解过氧化氢诱导的细胞周期紊乱;同时,c-Abl 和 Plk1 等细胞周期调控蛋白的表达显著降低。本课题组前期研究已探讨了原花青素对 $A\beta$ 诱导的 PC12 损伤保护作用的抗凋亡分子机制^[8],本研究在前期工作的基础上,进一步证明原花青素除了对过氧化氢诱导的 PC12 细胞损伤具有保护作用外,同时对过氧化氢诱导的细胞周期紊乱也具有缓解作用,并且细胞周期调控相关蛋白 c-Abl 和 Plk1 等均参与其中。目前,氧化应激与细胞周期紊乱是多种神经退行性疾病发病的重要机制,但两者之间究竟孰因孰果,仍未定论^[6]。本研究为氧化应激可诱导神经元细胞周期紊乱提供了实验依据,同时也为原花青素保护神经元氧化应激损伤的细胞周期调控机制提供了实验依据。

另外,c-Abl 和 Plk1 等细胞周期调控蛋白在原花青素对神经元氧化应激损伤的保护作用中同步变化,似乎提示着两者之间存在某种关联。Schlatterer 等^[15]也研究发现 c-Abl 基因体内过表达可引起前脑神经元 Plk1 基因表达增强,但对两者之间的确切相互作用报道较为少见。仅见研究发现,c-Abl 和 Plk1 可相互作用,前者可通过调控 Plk1 的表达和激酶活性来影响 G_2/M 期转换,从而调控细胞周期^[17]。但在本研究的神经元氧化应激损伤模型中,c-Abl 和 Plk1 两者之间的相互作用是否发生变化,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lewerenz J, Letz J, Methner A. Activation of stimulatory heterotrimeric G proteins increases glutathione and protects neuronal cells against oxidative stress[J]. *J Neurochem*, 2003, 87(2): 522-531.
- [2] Vuong T, Matar C, Ramassamy C, et al. Biotransformed blueberry juice protects neurons from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and mitogen-activated protein kinase pathway alterations[J]. *Br J Nutr*, 2010, 104(5): 656-663.
- [3] Ansari N, Khodagholi F, Amini M. 2-Ethoxy-4, 5-diphenyl-1, 3-oxazine-6-one activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 658(2/3): 84-90.
- [4] Moh C, Kubiak J Z, Bajic V P, et al. Cell cycle deregulation in the neurons of alzheimer's disease[J]. *Results Probl Cell Differ*, 2011, 53: 565-576.
- [5] Hernandez-Ortega K, Quiroz-Baez R, Arias C. Cell cycle reactivation in mature neurons; a link with brain plasticity, neuronal injury and neurodegenerative diseases? [J]. *Neurosci bull*, 2011, 27(3): 185-196.
- [6] Swerdlow R H. Alzheimer's disease pathologic cascades; who comes first, what drives what[J]. *Neurotox Res*, 2012, 22(3): 182-194.
- [7] Chen X, Zhang J, Lee J, et al. A kinase-independent function of c-Abl in promoting proteolytic destruction of damaged DNA binding proteins[J]. *Mol Cell*, 2006, 22(4): 489-499.
- [8] 梅寒芳, 谢朝阳, 祝其锋. 原花青素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡的影响及其机制的研究[J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(2): 227-231.
- [9] 张小军, 夏春镗, 吴建铭, 等. 原花青素的资源研究[J]. *中药材*, 2009, 32(7): 1154-1160.
- [10] Schlatterer S D, Acker C M, Davies P. c-Abl in neurodegenerative disease[J]. *J Mol Neurosci*, 2011, 45(3): 445-452.
- [11] Strebhardt K. Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(8): 643-660.
- [12] Pezuk J A, Brassasco M S, Morales A G, et al. Polo-like kinase 1 inhibition causes decreased proliferation by cell cycle arrest, leading to cell death in glioblastoma[J]. *Cancer Gene Ther*, 2013, 20(9): 499-506.
- [13] Zhang G, Zhang Z, Liu Z. Scytonemin inhibits cell proliferation and arrests cell cycle through downregulating Plk1 activity in multiple myeloma cells[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(4): 2241-2247.
- [14] Ismail I A, Kang K S, Lee H A, et al. Genistein-induced neuronal apoptosis and G_2/M cell cycle arrest is associated with MDC1 up-regulation and PLK1 down-regulation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 575(1/3): 12-20.
- [15] Schlatterer S D, Suh H S, Conejero-Goldberg C, et al. Neuronal c-Abl activation leads to induction of cell cycle and interferon signaling pathways[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 208-211.
- [16] 薛淑燕, 吴心兰, 伍秋婵, 等. 过氧化氢对 PC12 细胞 plk1 基因表达的影响[J]. *广东药学院学报*, 2013, 29(6): 653-655.
- [17] 李伟. c-Abl 与 Plk1 相互作用及其生物学意义的研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所, 2013.

(收稿:2014-02-16;修回:2014-05-15)

(编辑 郭建秀)