

[文章编号] 1000-4718(2019)07-1206-07

Trx-1 过表达通过 NF-κB 信号通路减轻 MPP⁺ 所致 PC12 细胞的氧化应激损伤*

陈伟巍[△], 王 敏, 吴明辉

(湖北江汉油田总医院神经内科, 湖北 潜江 433124)

[摘要] 目的: 探讨硫氧还蛋白 1 (Trx-1) 过表达通过 NF-κB 信号通路减轻 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) 诱导的大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞氧化应激损伤的作用, 探讨帕金森病的发病机制。方法: 采用 1、3 和 5 mmol/L MPP⁺ 损伤 PC12 细胞, MTT 法检测细胞活力, 商用试剂盒检测细胞上清液中氧化应激指标乳酸脱氢酶 (LDH) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及丙二醛 (MDA) 含量, Western blot 检测细胞中 Trx-1 蛋白的表达。以 3 mmol/L MPP⁺ 损伤 PC12 细胞, 以含 Ad-Trx-1-GFP 序列的慢病毒感染建立 Trx-1 过表达的帕金森病细胞模型, 采用 MTT 法、商用试剂盒和 Western blot 分别检测 Trx-1 过表达对 PC12 细胞活力、氧化应激反应和 NF-κB 信号通路的影响。给予 NF-κB 信号通路激活剂佛波酯 (PMA) 作用于经 MPP⁺ 处理的 PC12 细胞, 观察激活 NF-κB 信号通路对 PC12 细胞活力和氧化应激反应的影响; 给予 NF-κB 信号通路抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (PDTC) 作用于 Trx-1 过表达的 MPP⁺ 损伤 PC12 细胞, 观察 Trx-1 过表达通过 NF-κB 信号通路对 PC12 细胞活力和氧化应激反应的影响。结果: 1、3 和 5 mmol/L MPP⁺ 能够明显降低 PC12 细胞活力、细胞上清液中 SOD 活性和细胞内 Trx-1 蛋白的表达, 升高细胞上清液中 LDH 活性和 MDA 含量, 且 3 mmol/L MPP⁺ 和 5 mmol/L MPP⁺ 的作用明显大于 1 mmol/L MPP⁺ ($P < 0.05$), 而 3 mmol/L MPP⁺ 和 5 mmol/L MPP⁺ 间的差异无统计学显著性。Trx-1 过表达能够明显减弱 MPP⁺ 对 PC12 细胞活力的抑制作用及其诱导的氧化应激损伤和 NF-κB 信号通路活化。NF-κB 信号通路的激活促进了 MPP⁺ 对 PC12 细胞活力的抑制作用及其诱导的氧化应激损伤, 而抑制 NF-κB 信号通路则增强了 Trx-1 过表达对 MPP⁺ 损伤的 PC12 细胞的保护作用。结论: Trx-1 过表达可通过 NF-κB 信号通路减轻 MPP⁺ 作用下 PC12 细胞的氧化应激损伤。

[关键词] 帕金森病; 硫氧还蛋白 1; 氧化应激; NF-κB 信号通路

[中图分类号] R749.1⁺6; R363.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.07.009

Trx-1 over-expression attenuates oxidative stress injury in MPP⁺-induced PC12 cells by regulating NF-κB signaling pathway

CHEN Wei-wei, WANG Min, WU Ming-hui

(Neurology Department, Hubei Jiangnan Oilfield General Hospital, Qianjiang 433124, China. E-mail: zuo3233@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the inhibitory effect of thioredoxin 1 (Trx-1) over-expression on oxidative stress injury in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced rat pheochromocytoma PC12 cells by regulating NF-κB signaling pathway. **METHODS:** The PC12 cells were damaged by treatment with MPP⁺ at 1, 3 and 5 mmol/L, and the optimal concentration of 3 mmol/L was selected. The cell viability was measured by MTT assay. The oxidative stress indexes lactate dehydrogenase (LDH) activity, superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in the cell culture supernatant were detected, and the protein expression of Trx-1 was determined by Western blot. Lentiviral infection with Ad-Trx-1-GFP sequence was used to establish a model of MPP⁺-treated PC12 cells with Trx-1 over-expression. The effects of Trx-1 over-expression on the cell viability, oxidative stress responses and NF-κB signaling pathway were determined by MTT assay, commercial kits and Western blot. The effects of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), an activator of NF-κB signaling pathway, on the viability and oxidative stress of PC12 cells were observed. The NF-κB signaling pathway inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) was used in MPP⁺-treated PC12 cells with Trx-1 over-expression, and the cell viability and oxidative stress responses were measured. **RESULTS:** The viability of PC12 cells, SOD activity

[收稿日期] 2018-10-12 [修回日期] 2018-11-14

* [基金项目] 2017-2018 湖北省卫生计生委科研项目 (No. WJ2017Q0033)

△通讯作者 Tel: 0728-6503073; E-mail: zuo3233@163.com

in the supernatant and protein expression of Trx-1 were decreased, while LDH activity and MDA content in the supernatant were increased significantly by treatment with MPP⁺ at 1, 3 and 5 mmol/L. The effect of MPP⁺ at 3 mmol/L and 5 mmol/L was significantly greater than that at 1 mmol/L ($P < 0.05$), and no significant difference between 3 mmol/L and 5 mmol/L was observed ($P > 0.05$). The inhibitory effect of MPP⁺ on the viability of PC12 cells, and the oxidative stress injury and activation of NF- κ B signaling pathway induced by MPP⁺ were significantly attenuated by over-expression of Trx-1. The inhibitory effect of MPP⁺ on the viability of PC12 cells and the oxidative stress injury induced by MPP⁺ were promoted by the activation of NF- κ B signaling pathway, while the protective effects of Trx-1 over-expression on the MPP⁺-treated PC12 cells were enhanced by the inhibition of NF- κ B signaling pathway. **CONCLUSION:** Over-expression of Trx-1 protects MPP⁺-treated PC12 cells from oxidative stress injury by regulating NF- κ B signaling pathway.

[KEY WORDS] Parkinson disease; Thioredoxin 1; Oxidative stress; NF- κ B signaling pathway

帕金森病是一种发病率仅次于阿尔茨海默病的中枢神经系统变性疾病,其发病机制除了与遗传、年龄、脑中路易小体沉积和黑质多巴胺神经元退行性变有关外,还与氧化应激关系密切。氧化应激损伤被认为是帕金森病发病的重要环节^[1-2]。神经元进行性丢失被认为是神经退行性疾病的重要病理特征,而氧化应激在促进神经细胞凋亡过程中发挥着重要作用。神经元中含有较低的抗氧化活性的谷胱甘肽和较丰富的对自由基敏感的多不饱和脂肪酸,使其清除自由基能力减弱而遭受自由基攻击能力增强。因此,减轻氧化应激对神经元细胞损伤是控制和治疗帕金森病发生发展的重要策略。硫氧还蛋白1(thioredoxin 1, Trx-1)是一种广泛分布于生物体内的抗氧化蛋白,通过巯基-二硫键相互转换在维持和调节细胞的氧化还原过程中发挥着重要作用;核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)是细胞内重要的核转录因子,通过调控下游多种基因的表达参与细胞的生长发育、炎症反应、免疫调节和细胞凋亡等过程,与包括帕金森病在内的多种神经系统疾病的发生关系密切^[3-4]。已有研究^[5-7]发现,Trx-1可通过增强DJ-1基因的表达调节帕金森病中的自噬和内质网应激反应,Trx-1可调控NF- κ B活性参与细胞的氧化应激过程,但Trx-1通过NF- κ B信号通路调控帕金森病氧化应激损伤的机制并不明确。1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺)是一种可引起神经细胞氧化应激损伤的神经毒,作为氧化应激损伤细胞模型的诱导剂^[8-9]被用于研究帕金森病的发病机制。本研究以大鼠嗜铬细胞瘤PC12细胞为研究对象,通过MPP⁺刺激构建氧化应激损伤细胞模型,观察Trx-1通过NF- κ B信号通路对氧化应激损伤的影响,以期对帕金森病的发生发展机制及治疗提供新的线索。

材 料 和 方 法

1 主要材料

大鼠嗜铬细胞瘤PC12细胞株购自中国上海典

型培养物储备中心。MTT试剂(批号:M2128)和MPP⁺(批号:D048)购自Sigma;胎牛血清(批号:SH41289)购自Gibco-Brl;高糖DMEM培养基(批号:SH30022.01C)购自HyClone;抗NF- κ B p65抗体(批号:2459)和抗I κ B- α 抗体(批号:3465)购自美国凯基生物公司;RIPA裂解液(批号:P0013C)购自上海碧云天生物研究所;抗p-I κ B α 抗体(批号:ab7219)和抗p-NF- κ B p65抗体(批号:ab95022)购自Abcam;抗 β -actin抗体(批号:160916)购自Santa Cruz;辣根过氧化酶标记的II抗(批号:160915)购于北京中杉金桥公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测试剂盒(批号:20150816)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力检测试剂盒(批号:20150722)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活力检测试剂盒(批号:20150713)购于南京建成有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养 采用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基于37℃、5%CO₂条件的细胞培养箱中常规培养PC12细胞,选取第4代对数生长期细胞进行实验。

2.2 氧化应激损伤细胞模型的建立 将PC12细胞以每孔 5×10^4 个种植于96孔细胞板上,将其随机分为control组(加入等量培养液)、1 mmol/L MPP⁺组(加入浓度为1 mmol/L的MPP⁺)、3 mmol/L MPP⁺组(加入浓度为3 mmol/L的MPP⁺)和5 mmol/L MPP⁺组(加入浓度为5 mmol/L的MPP⁺)。置于细胞培养箱内常规培养过夜。采用MTT法检测细胞活力,试剂盒检测细胞上清液中LDH和SOD的活性及MDA含量。后期,将PC12细胞随机分为control组(加入等量培养液)、3 mmol/L MPP⁺组(加入浓度为3 mmol/L的MPP⁺)和3 mmol/L MPP⁺ + 佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)组(加入浓度为3 mmol/L的MPP⁺和NF- κ B激活剂PMA),经MPP⁺和PMA作用24 h后,采用MTT法检测细胞活力,试剂盒检测细胞上清液中LDH和SOD的活性及

MDA 含量。

2.3 MTT 法检测细胞活力 将 MPP⁺ 处理 24 h 后的 PC12 细胞以每孔 3×10^4 个接种至 96 孔细胞板上, 孵箱内培养 24 h 后, 每孔加入 20 μ L MTT 试剂 (浓度为 5 g/L) 作用 24 h。弃培养液, 加入二甲基亚砷充分溶解 MTT 结晶。上酶标仪检测各组细胞在 490 nm 处的吸光度(A)值。以药物组 A 均值与对照组 A 均值的百分比计算各组细胞的相对活力。

2.4 细胞上清液中 LDH 和 SOD 活性及 MDA 含量的检测 收集培养结束的 PC12 细胞上清液, 根据试剂盒说明书步骤分别检测 LDH 和 SOD 活性及 MDA 含量。

2.5 Western blot 检测蛋白水平 采用 RIPA 细胞裂解液提取 PC12 细胞的总蛋白, 并采用 BCA 法定量总蛋白。向蛋白样品中加入等体积的上样缓冲液于沸水浴中变性 3 ~ 5 min 后, 采用微量加样器以每孔 50 μ g 蛋白样品上样至 SDS-PAGE 凝胶孔中行分离。待电泳结束后电转至 PVDF 膜上。以脱脂奶粉浓度为 5% 的 TBST 溶液封闭 1 h 后, 加入封闭液稀释的 I 抗 (1:1 000) 于 4 $^{\circ}$ C 下孵育 24 h。弃培养液后, 采用封闭液洗涤 10 min, 洗涤 3 次后, 加入封闭液稀释的 II 抗 (1:2 000) 于 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h。封闭液再次洗涤后, 加入化学发光剂暗室内显影曝光, 凝胶成像系统扫描分析。

2.6 慢病毒感染 将对数生长期的 PC12 细胞以每孔 1×10^5 个细胞接种至 6 孔细胞板上, 将其随机分为 control 组 (加入等量培养液)、3 mmol/L MPP⁺ 组 (加入 3 mmol/L MPP⁺ 作用 48 h)、3 mmol/L MPP⁺ + NC 组 (Ad-GFP 空载体的阴性对照慢病毒感染 24 h 后, 加入 3 mmol/L MPP⁺ 作用 24 h) 和 3 mmol/L MPP⁺ + Trx-1 组 (以含 Ad-Trx-1-GFP 序列的慢病毒感染 24 h 后, 加入 3 mmol/L MPP⁺ 作用 24 h), 于培养箱中培养至 60% 融合度时更换培养液, 加入 6 mg/

L polybrene, 并按照实验分组以 MOI = 10 加入慢病毒进行感染。其中, Ad-GFP 空载体的阴性对照慢病毒和含 Ad-Trx-1-GFP 序列的慢病毒载体是由武汉转导生物实验室设计完成, 慢病毒载体系统购于上海吉凯基因公司。感染 48 h 后, 分别采用 Western blot 检测细胞中 Trx-1、NF- κ B p65、I κ B α 、p-NF- κ B p65 和 p-I κ B α 的蛋白水平, MTT 法检测细胞的存活率, 试剂盒检测细胞上清液中 LDH 和 SOD 活性及 MDA 含量。后期实验另设 3 mmol/L MPP⁺ + Trx-1 + 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) 组 (以含 Ad-Trx-1-GFP 序列的慢病毒感染 24 h 后, 加入 3 mmol/L MPP⁺ 和 NF- κ B 信号通路抑制剂 PDTC 作用 24 h), 经慢病毒感染和给药处理结束后, 采用 MTT 法和试剂盒分别检测细胞存活率和细胞上清液中 LDH 和 SOD 活性及 MDA 含量。

3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 进行统计学分析。实验数据以均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较使用单因素方差分析, 组间多重比较采用 SNK-*q* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 MPP⁺ 对 PC12 细胞氧化应激的影响

浓度为 1、3 和 5 mmol/L 的 MPP⁺ 处理 PC12 细胞 24 h 后, 与 control 组相比, PC12 细胞的活力和细胞上清液中 SOD 的活性明显降低, 而细胞上清液中的 LDH 活性和 MDA 含量明显升高 ($P < 0.05$); 且 3 mmol/L MPP⁺ 和 5 mmol/L MPP⁺ 的作用明显大于 1 mmol/L MPP⁺ ($P < 0.05$), 而 3 mmol/L MPP⁺ 和 5 mmol/L MPP⁺ 组间差异无统计学显著性 ($P > 0.05$), 见表 1。故后期采用 3 mmol/L MPP⁺ 进行实验。

表 1 MPP⁺ 对 PC12 细胞活力、上清液中 LDH 和 SOD 活性及 MDA 含量的影响

Table 1. The effect of MPP⁺ on the cell viability, the activity of LDH and SOD, and MDA content in the culture supernatant of PC12 cells (Mean \pm SD. $n = 3$)

Group	Cell viability (%)	LDH ($\times 10^3$ U/L)	MDA (μ mol/L)	SOD ($\times 10^3$ U/L)
Control	100.00 \pm 10.09	34.40 \pm 4.60	12.75 \pm 1.13	46.70 \pm 3.23
1 mmol/L MPP ⁺	82.60 \pm 7.30*	49.60 \pm 5.50*	17.31 \pm 1.24*	38.32 \pm 2.25*
3 mmol/L MPP ⁺	51.20 \pm 6.10**	78.20 \pm 6.40**	27.57 \pm 1.55**	27.13 \pm 2.31**
5 mmol/L MPP ⁺	48.70 \pm 6.80**	83.10 \pm 6.80**	29.73 \pm 1.79**	25.34 \pm 2.36**

* $P < 0.05$ vs control group; ** $P < 0.05$ vs 1 mmol/L MPP⁺ group.

2 MPP⁺ 对 PC12 细胞中 Trx-1 蛋白表达的影响

不同浓度 (1、3 和 5 mmol/L) 的 MPP⁺ 刺激 PC12 细胞后, Trx-1 蛋白的表达较 control 组明显降低 ($P < 0.05$); 且 3 mmol/L MPP⁺ 组和 5 mmol/L MPP⁺ 组细

胞中 Trx-1 蛋白的表达水平明显低于 1 mmol/L MPP⁺ 组, 而 3 mmol/L MPP⁺ 组和 5 mmol/L MPP⁺ 组间的差异无统计学显著性 ($P > 0.05$), 见图 1。

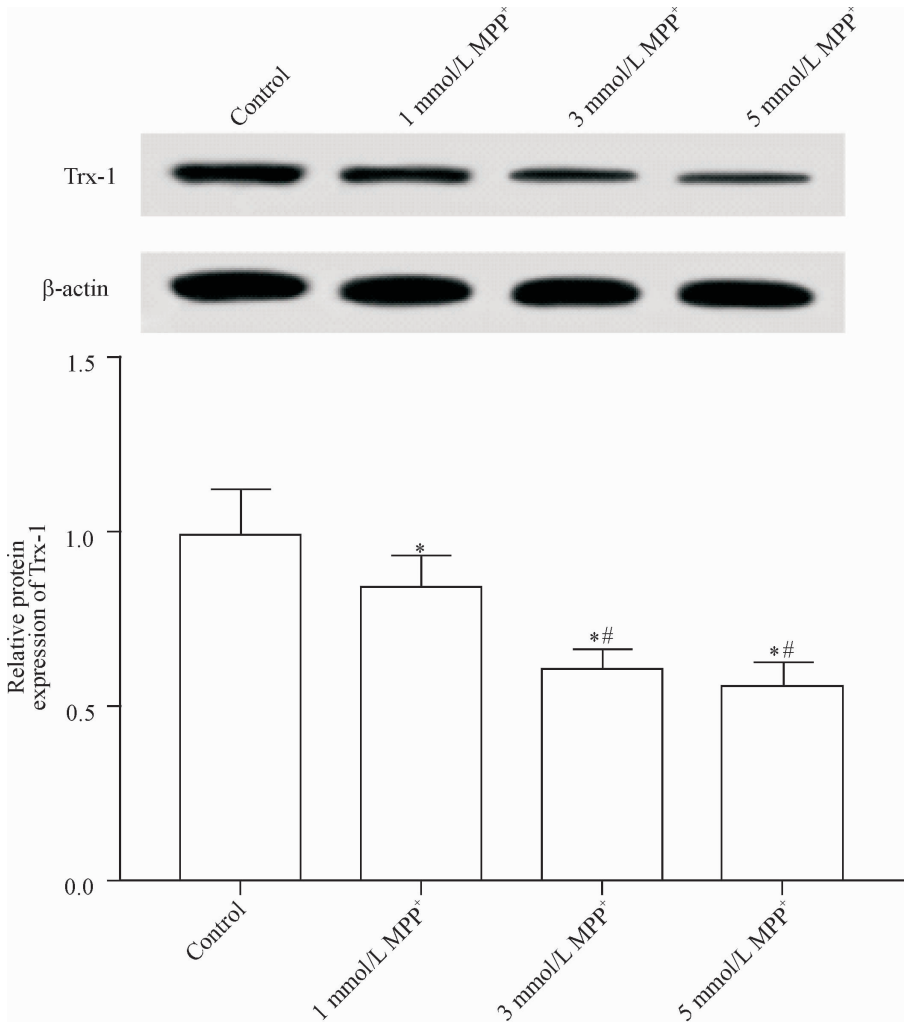


Figure 1. The protein expression of Trx-1 in PC12 cells was detected by Western blot. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 1 mmol/L MPP⁺ group.

图1 Western blot 检测 PC12 细胞中 Trx-1 蛋白的表达结果

3 Trx-1 过表达对 PC12 细胞氧化应激的影响

Western blot 结果显示, 3 mmol/L MPP⁺ 组细胞中 Trx-1 蛋白的表达水平明显低于 control 组 ($P < 0.05$), 3 mmol/L MPP⁺ + Trx-1 组明显高于 3 mmol/L MPP⁺ 组 ($P < 0.05$), 而 3 mmol/L MPP⁺ + NC 组与 3 mmol/L MPP⁺ 组间的差异无统计学显著性 ($P > 0.05$), 见图 2、表 2。与 control 组相比, 3 mmol/L MPP⁺ 能够明显降低 PC12 细胞的活力和细胞上清液中 SOD 的活性 ($P < 0.05$), 且显著升高细胞上清液中 LDH 活性和 MDA 含量 ($P < 0.05$); 与 3 mmol/L MPP⁺ 组相比, 3 mmol/L MPP⁺ + Trx-1 组细胞的活力和 SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$), 而 LDH 活性和 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$); 3 mmol/L MPP⁺ + NC 组与 3 mmol/L MPP⁺ 组间细胞活力、LDH 活性、SOD 活性和 MDA 含量的差异无统计学显著性 ($P > 0.05$), 见表 2。

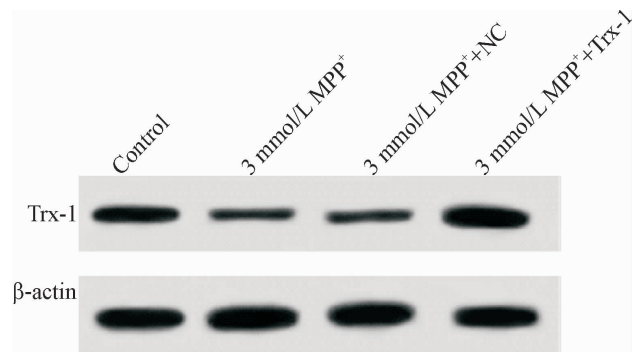


Figure 2. The infection efficiency of lentivirus was detected by Western blot.

图2 Western blot 检测慢病毒的感染效率

4 Trx-1 过表达对 PC12 细胞中 NF- κ B 信号通路的影响

Western blot 结果显示, 各组 PC12 细胞中 NF- κ B p65 和 I κ B α 蛋白表达的差异均无统计学显著性 ($P > 0.05$); 3 mmol/L MPP⁺ 组细胞中 p-NF- κ B p65 和

表2 Trx-1 过表达对 MPP⁺ 刺激下 PC12 细胞的活力、上清液 LDH 和 SOD 活性及 MDA 含量的影响

Table 2. The effect of Trx-1 over-expression on the cell viability, and the supernatant LDH and SOD activity and MDA content of the PC12 cells under MPP⁺ stimulation (Mean ± SD. n = 3)

Group	Trx-1 expression	Cell viability (%)	LDH (× 10 ³ U/L)	MDA (μmol/L)	SOD (× 10 ³ U/L)
Control	1.00 ± 0.12	100.00 ± 11.30	34.40 ± 4.60	12.75 ± 1.13	46.70 ± 3.23
3 mmol/L MPP ⁺	0.63 ± 0.05 *	50.60 ± 6.40 *	76.50 ± 6.80 *	24.51 ± 1.35 *	28.45 ± 2.71 *
3 mmol/L MPP ⁺ + NC	0.68 ± 0.06 *	52.30 ± 5.40 *	75.10 ± 7.20 *	25.30 ± 1.48 *	27.64 ± 2.94 *
3 mmol/L MPP ⁺ + Trx-1	1.74 ± 0.14 *#	82.30 ± 7.56 *#	57.18 ± 5.40 *#	19.11 ± 1.43 *#	37.16 ± 2.38 *#

* P < 0.05 vs control group; # P < 0.05 vs 1 mmol/L MPP⁺ group.

p-IκBα 的蛋白水平明显高于 control 组 (P < 0.05), 3 mmol/L MPP⁺ + Trx-1 组中 p-NF-κB p65 和 p-IκBα 的蛋白水平较 3 mmol/L MPP⁺ 组明显降低 (P < 0.05), 而 3 mmol/L MPP⁺ + NC 组与 3 mmol/L MPP⁺ 组间的差异无统计学显著性 (P > 0.05), 见图 3、表 3。

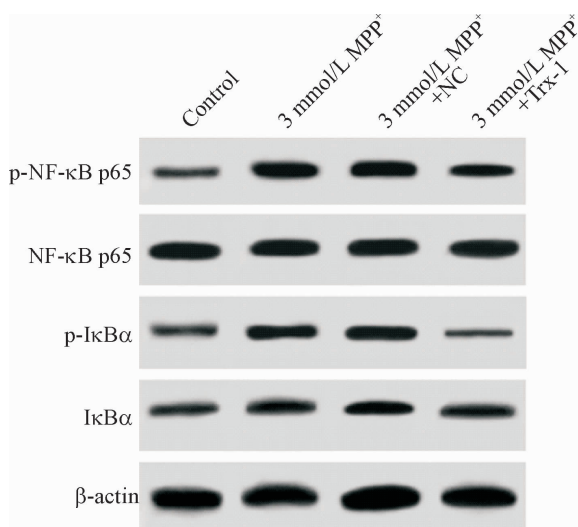


Figure 3. The protein levels of NF-κB signaling pathway-related molecules detected by Western blot.

图3 Western blot 检测 NF-κB 信号通路相关蛋白的水平

5 NF-κB 信号通路对 PC12 细胞氧化应激的影响

与 control 组相比, 3 mmol/L MPP⁺ 组和 control + PMA 组细胞的活力和 SOD 活性均明显降低 (P < 0.05), 而 LDH 活性和 MDA 含量均明显升高 (P <

0.05); 给予 100 μg/L NF-κB 信号通路激活剂 PMA 处理后, 明显增强了 MPP⁺ 对 PC12 细胞活性的抑制作用并加重了细胞的氧化应激损伤 (P < 0.05), 见表 4。

6 Trx-1 通过 NF-κB 信号通路减轻 MPP⁺ 对 PC12 细胞的氧化应激损伤

3 mmol/L MPP⁺ 组细胞的活力和 SOD 活性明显低于 control 组 (P < 0.05), LDH 活性和 MDA 含量则明显高于 control 组 (P < 0.05); 给予 100 μmol/L NF-κB 信号通路抑制剂 PDTC 或 Trx-1 过表达后, MPP⁺ 对 PC12 细胞的上述作用均明显减弱 (P < 0.05); 同时, 给予 PDTC 后, Trx-1 过表达恢复 MPP⁺ 刺激下 PC12 细胞的活力和减轻氧化应激损伤的作用明显增强 (P < 0.05), 见表 5。

讨 论

本研究中以 1、3 和 5 mmol/L MPP⁺ 处理大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞 24 h 后, PC12 细胞的存活率和细胞上清液中 SOD 活性明显降低, 而细胞上清液中 LDH 活性和 MDA 含量明显升高。SOD 是一种可将超氧阴离子转化为过氧化氢的抗氧化酶, 其活力的高低可间接反映机体清除自由基的能力大小; MDA 是一种脂质过氧化物, 其含量的高低可间接反映机体遭受自由基攻击的程度; LDH 是活细胞胞浆内酶, 在细胞损伤时, 细胞膜通透性发生改变使 LDH 释放到培养液中, 细胞液中 LDH 活性大小可较好地反映出细胞膜的损伤程度; 三者常被作为反映细胞氧化

表3 Trx-1 过表达对 MPP⁺ 刺激下 PC12 细胞中 NF-κB 信号通路相关蛋白水平的影响

Table 3. The effect of Trx-1 over-expression on the protein levels of NF-κB signaling pathway-related molecules in the PC12 cells stimulated with MPP⁺ (Mean ± SD. n = 3)

Group	p-NF-κB p65	NF-κB p65	p-IκBα	IκBα
Control	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.08
3 mmol/L MPP ⁺	1.89 ± 0.15 *	0.94 ± 0.09	1.48 ± 0.13 *	0.94 ± 0.10
3 mmol/L MPP ⁺ + NC	1.81 ± 0.14 *	0.97 ± 0.08	1.52 ± 0.17 *	1.35 ± 0.15 *
3 mmol/L MPP ⁺ + Trx-1	1.31 ± 0.12 *#	1.05 ± 0.11	0.76 ± 0.06 *#	1.25 ± 0.14

* P < 0.05 vs control group; # P < 0.05 vs 3 mmol/L MPP⁺ group.

表4 PMA对MPP⁺刺激下PC12细胞活力、上清液LDH和SOD活性及MDA含量的影响Table 4. The effect of PMA on cell viability, the activity of LDH and SOD, and MDA content in the culture supernatant of PC12 cells with MPP⁺ stimulation (Mean ± SD. n = 3)

Group	Cell viability (%)	LDH (×10 ³ U/L)	MDA (μmol/L)	SOD (×10 ³ U/L)
Control	100.00 ± 9.20	31.40 ± 4.10	13.75 ± 1.57	44.78 ± 3.33
Control + PMA	63.31 ± 8.22*	54.76 ± 7.81*	21.83 ± 2.39*	23.79 ± 2.14*
3 mmol/L MPP ⁺	49.60 ± 6.10*	78.50 ± 6.50*	25.51 ± 1.48*	27.18 ± 2.64*
3 mmol/L MPP ⁺ + PMA	28.70 ± 9.56 [#]	96.18 ± 5.80 [#]	33.11 ± 1.54 [#]	18.12 ± 2.51 [#]

* P < 0.05 vs control group; [#] P < 0.05 vs 3 mmol/L MPP⁺ group.

表5 Trx-1调控NF-κB信号通路对PC12细胞活力、上清液中LDH和SOD活性及MDA含量的影响

Table 5. The effects of Trx-1-regulated NF-κB signaling pathway on the cell viability, LDH, SOD activities and MDA content in the culture supernatant of PC12 cells with MPP⁺ stimulation (Mean ± SD. n = 3)

Group	Cell viability (%)	LDH (×10 ³ U/L)	MDA (μmol/L)	SOD (×10 ³ U/L)
Control	100.00 ± 12.03	32.19 ± 4.60	12.47 ± 1.13	45.47 ± 3.07
3 mmol/L MPP ⁺	51.70 ± 5.60	75.58 ± 5.80	23.58 ± 1.35	26.24 ± 2.53
3 mmol/L MPP ⁺ + PDTC	65.42 ± 5.71*	66.24 ± 6.19*	19.49 ± 1.88*	35.07 ± 3.28*
3 mmol/L MPP ⁺ + NC	49.50 ± 5.10	77.61 ± 7.30	26.17 ± 1.42	24.37 ± 2.67
3 mmol/L MPP ⁺ + Trx-1	62.20 ± 7.83 [#]	63.45 ± 5.40 [#]	18.51 ± 1.43 [#]	38.64 ± 2.21 [#]
3 mmol/L MPP ⁺ + Trx-1 + PDTC	75.16 ± 6.13 [⊗]	48.81 ± 7.27 [⊗]	10.11 ± 2.17 [⊗]	43.36 ± 2.04 [⊗]

* P < 0.05 vs 3 mmol/L MPP⁺ group; [#] P < 0.05 vs 3 mmol/L MPP⁺ + NC group; [⊗] P < 0.05 vs 3 mmol/L MPP⁺ + Trx-1 group.

应激的重要指标^[10-11]。结果表明MPP⁺对PC12细胞有一定的毒性,并诱导PC12细胞的氧化应激损伤。

本研究以1、3和5 mmol/L MPP⁺处理后,PC12细胞中Trx-1的表达明显受到抑制,提示Trx-1可能在帕金森病的发生发展中发挥着重要作用。通过构建含Ad-Trx-1-GFP序列的慢病毒载体成功上调Trx-1表达后,3 mmol/L MPP⁺引起的PC12细胞存活率和SOD活性的降低以及LDH活性和MDA含量的升高这一系列变化均明显减弱。Trx-1是一种分子量为12 kD的多功能蛋白,广泛分布于原核和真核生物中,可催化蛋白质二硫键和巯基的转换,常作为抗氧化剂参与细胞的氧化还原反应^[12-13]。Trx-1表达的骨髓间充质干细胞可通过下调TGF-β表达减轻博莱霉素诱导的硬皮病皮肤纤维化和氧化应激^[14]; Trx1可通过维持Prdx的表达来抑制星形胶质细胞的氧化应激,从而发挥神经保护作用^[15];此外,上调Trx-1表达可降低活性氧的产生,增加抗氧化防御能力,进而减轻葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎^[16]。结果表明Trx-1过表达可减轻MPP⁺诱导的PC12细胞氧化应激损伤。结果提示,Trx-1在帕金森病的发生和发展过程中可通过增强抗氧化应激能力发挥神经保护作用。

采用NF-κB信号通路激活剂PMA处理PC12细胞后,MPP⁺诱导的PC12细胞氧化应激损伤明显加重;而给予NF-κB信号通路抑制剂PDTC处理PC12细胞后,Trx-1过表达对MPP⁺诱导的PC12细胞氧化

应激损伤的改善作用明显增强。氧化应激反应涉及到多种信号通路的调控,NF-κB信号通路就是其中之一。NF-κB是一种研究较多的核转录因子,正常情况下以无活性的p65/p50/IκBα三聚体复合物存在,其中IκBα是NF-κB抑制蛋白,当细胞受到氧化应激或炎症因子刺激时,IκBα磷酸化降解释放p65/p50二聚体进入细胞核,激活下游相关基因,进而参与调控细胞凋亡、炎症反应和免疫应答等^[17-18]。NF-κB信号通路激活可通过调控凋亡相关蛋白如Bcl-2、p53和Par-4等的表达诱导神经元细胞凋亡,造成细胞损伤,与帕金森病的发生和发展关系密切^[19-20]。结果表明,在MPP⁺诱导的PC12细胞氧化应激损伤过程中,NF-κB信号通路被激活,而Trx-1过表达可通过抑制NF-κB信号通路的活化减轻MPP⁺诱导的PC12细胞氧化应激损伤。

综上所述,Trx-1可抑制NF-κB信号通路增强细胞的抗氧化应激能力,减轻氧化应激诱导的神经细胞损伤,进而起到神经保护的作用。该结果为帕金森病发生发展的分子机制和治疗方向提供了新的线索和依据。

[参 考 文 献]

- [1] Medeiros MS, Schumacher-Schuh A, Cardoso AM, et al. Iron and oxidative stress in Parkinson's disease: an observational study of injury biomarkers [J]. PLoS One, 2016, 11(1):e0146129.

- [2] Guo JD, Zhao X, Li Y, et al. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4):1817-1825.
- [3] 李艳花, 和青, 尉杰忠, 等. 硫辛酸对LPS诱导的帕金森病小鼠黑质多巴胺能神经元损伤的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(2):201-206.
- [4] Jing H, Wang S, Wang M, et al. Isobavachalcone attenuates MPTP-induced Parkinson's disease in mice by inhibition of microglial activation through NF- κ B pathway[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1):e0169560.
- [5] 何子甜. 硫氧还蛋白-1调节帕金森病中自噬的分子机制研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2016.
- [6] Xu S, Yang X, Qian Y, et al. Parkinson disease-related DJ-1 modulates the expression of uncoupling protein 4 against oxidative stress[J]. *J Neurochem*, 2018, 145(4):312-322.
- [7] Jones DP, Go YM. Redox compartmentalization and cellular stress[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2010, 12(Suppl 2):116-125.
- [8] Shindo Y, Yamanaka R, Suzuki K, et al. Altered expression of Mg²⁺ transport proteins during Parkinson's disease-like dopaminergic cell degeneration in PC12 cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(8):1979-1984.
- [9] Gong P, Deng F, Zhang W, et al. Tectorigenin attenuates the MPP⁺-induced SH-SY5Y cell damage, indicating a potential beneficial role in Parkinson's disease by oxidative stress inhibition[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5):4431-4437.
- [10] Wang G, Liu Y, Hou XF, et al. Prevention effect of Ligusticum chuanxiong extraction against oxidative stress injury induced by myocardial ischemia through activation of Nrf2 signaling pathway[J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(24):4834-4840.
- [11] 王喜欢, 张金华, 胡亚南, 等. 紫草素对高糖诱导的血管内皮细胞凋亡和氧化应激的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(7):1222-1227.
- [12] 罗诚, 戴爱国, 蒋永亮. 硫氧还蛋白-1与衰老的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(4):492-495.
- [13] Chen B, Nelin VE, Locy ML, et al. Thioredoxin-1 mediates hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305(5):L389-L395.
- [14] Jiang M, Yu Y, Luo J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells expressing thioredoxin 1 attenuate bleomycin-induced skin fibrosis and oxidative stress in scleroderma[J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137(6):1223-1233.
- [15] Wang M, Zhu K, Zhang L, et al. Thioredoxin 1 protects astrocytes from oxidative stress by maintaining peroxiredoxin activity[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3):2864-2870.
- [16] Yue Z, Yang S, Youxiang D, et al. GL-V9, a new synthetic flavonoid derivative, ameliorates DSS-induced colitis against oxidative stress by up-regulating Trx-1 expression via activation of AMPK/FOXO3a pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28):26291-26307.
- [17] 姜恩平, 于春荣, 李贺, 等. 北五味子总木脂素对PC12细胞氧化应激损伤的保护作用及其抑制NF- κ B/iNOS/NO信号通路的机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2015, 41(3):532-536.
- [18] Serasanambati M, Chilakapati SR. Function of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in human diseases; a review[J]. *South Indian J Biol Sci*, 2016, 2(4):368-387.
- [19] 陶丽珍, 陈建宗. NF- κ B通路与帕金森病[J]. *国际老年医学杂志*, 2011, 32(1):32-35.
- [20] Zhang J, Zhang Z, Xiang J, et al. Neuroprotective effects of echinacoside on regulating the stress-activated p38MAPK and NF- κ B p52 signals in the mice model of Parkinson's disease[J]. *Neurochem Res*, 2016, 42(4):1-11.

(责任编辑: 卢萍, 罗森)