

染料木素对 A_β 诱导损伤的 PC12 细胞的保护作用

赵美顺, 陈敬荣, 郑尧杰, 杨 红*

(广东药学院基础学院, 广州 510006)

摘要 研究染料木素(genistein, Gen)对A_β诱导损伤的PC12细胞的保护作用及机制。采用RT-PCR检测Gen及其拮抗剂(Myrr)对PC12损伤细胞Bcl-2和Bax表达水平的影响,Hoechst 33342/PI双染检测细胞凋亡率的改变,并检测Gen及Myrr对蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)活性的影响。实验结果表明,Gen能上调A_β诱导损伤的PC12细胞Bcl-2基因和下调Bax基因的表达水平,增加Bcl-2/Bax的比值,降低细胞的凋亡程度,提高PKC活性,该作用被其拮抗剂Myrr所抑制。Gen对A_β诱导的PC12损伤细胞具有保护作用,其机制是通过激活PKC信号通路,调节Bcl-2/Bax凋亡基因表达,从而减少细胞损伤。

关键词 染料木素; Bcl-2/Bax; PKC 信号通路; 神经保护

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)02-0227-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140217

Protective effect of genistein on A_β₂₅₋₃₅-induced PC12 cells injury

ZHAO Meishun, CHEN Jingrong, ZHENG Yaojie, YANG Hong*

School of Basic Sciences, Guangdong Pharmaceutical College, Guangdong 510006, China

Abstract To investigate the inhibitory effect of Genistein(Gen) on A_β₂₅₋₃₅-induced neurotoxicity and to elucidate the underlying mechanism in cultured rat pheochromocytoma(PC12) cells. The injured PC12 cells were treated with Gen and its antagonist, Myrr. The influence on the expression of Bcl-2 and Bax mRNA levels was detected by RT-PCR. Cell viability was assessed by staining with Hoechst 33342/PI. Protein kinase C(PKC) activity was measured with the intervention of Gen and PKC inhibitor(Myrr). The results showed that Gen could increase the Bcl-2 expression, decrease the Bax expression, increase the ratio of Bcl-2/Bax, and significantly increase cell viability, as well as the activity of PKC in A_β₂₅₋₃₅-treated PC12 cells. Myrr, a PKC inhibitor, partially blocked the activation effect of Gen. Gen exerted protective effect on A_β₂₅₋₃₅-induced neurotoxicity via activating the PKC signalling pathway, which further regulated the Bcl-2/Bax expression.

Key words genistein; Bcl-2/Bax; PKC signaling pathway; neuroprotection

This study was supported by the Science and Technology Plan Projects of Guangdong Province (No. 2012B031800430, No. 2010B020312016)

β淀粉样蛋白(A_β)是脑神经细胞中淀粉样前体蛋白(APP)裂解产生的含有39~43个氨基酸的多肽,是形成老年斑(SP)和神经元纤维缠结(NFT)的主要因素,与阿尔茨海默病(AD)的发生密切相关^[1]。研究发现,A_β可以作用于线粒体外膜上的通透性转运孔(MPTP)孔道,通过影响Bcl-2/Bax凋亡基因的表达,诱发细胞色素C释放、从

而引起caspase-3级联反应,最终导致神经细胞凋亡^[2]。抑制A_β的沉积及其神经毒性,被认为是预防和治疗AD等神经退行性疾病的根本途径。

蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)是细胞肌醇磷脂信号通路的关键酶。研究报道^[3],抗凋亡蛋白Bcl-2是PKC的靶点之一,PKC可通过刺激Bcl-2表达来保护细胞,PKC信号途径在细胞凋亡和存活中

发挥着重要作用。近年研究显示雌激素可通过激活 PKC 信号途径,减少 A β 的形成与聚积,缓解 A β 诱导的神经细胞损伤,是其发挥神经保护作用的重要机制之一^[4-5]。染料木素(genistein, Gen)是大豆异黄酮的主要活性成分之一,其结构与雌激素相似,被称为植物雌激素,对 A β 诱导的细胞损伤具有明显的保护作用,对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)等神经系统退行性疾病具有一定的预防和治疗作用,但目前作用机制不清楚。本文探讨染料木素对 A β 诱导损伤的 PC12 细胞 Bcl-2/Bax mRNA 表达水平和细胞凋亡的影响及对 PKC 信号通路的调节作用与相关性,阐明其作用机制。

1 材 料

1.1 试剂和细胞

染料木素、雌二醇、A β_{25-35} 、MTT(美国 Sigma 公司);十四酰蛋白激酶 C 抑制剂(Myri)、PepTag 非放射性蛋白激酶检测试剂盒(美国 Promega 公司);PKC α (H-7)(北京博奥森公司);Hoechst 33342/PI 双染试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);PrimeScriptTM RT reagent Kit With gDNA Eraser、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II(Takara 公司);引物[生工生物工程(上海)有限公司]。

PC12 细胞由中山大学药学院惠赠。

1.2 仪 器

荧光显微镜(德国 Leica 公司);MJ minioption 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);Vortex-2 混合器(美国 Scientific industries 公司);电泳槽(Baygene Biotech 有限公司);DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);TE77-转膜仪(美国 Amersham Biosciences 公司)。

2 方 法

2.1 PC12 细胞培养

PC12 细胞培养于 DMEM 培养基,其中加 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素,于 5% CO₂、37 ℃ 恒温培养箱中孵育培养。细胞生长至对数期,以每孔 3×10^5 细胞数接种于六孔培养板中,每孔 2 mL,继续孵育培养。

2.2 RT-PCR 法检测 Bcl-2、BaxmRNA 表达

实验分为对照组、A β 组、Gen 组、Gen + A β 组、E₂ 组、E₂ + A β 组、和 Myr + Gen + A β 组。待 PC12

细胞培养至对数生长期,各组分别加入相应药物,其中 A β_{25-35} 终浓度为 20 μ mol/L, Gen 终浓度为 25 μ mol/L, E₂ 终浓度为 10⁻⁶ μ mol/L, Myr 终浓度为 50 μ mol/L, Myr 比 Gen 和 E₂ 提前 1 h 加入, Gen 和 E₂ 比 A β_{25-35} 提前 2 h 加入, 孵育 24 h。(1) Trizol 法提取总 RNA,反转录合成 cDNA;(2) PCR 扩增:以上述 cDNA 为模板, β -actin 为内参照, 对 Bcl-2 和 Bax 进行扩增。 β -actin 上游引物:5'-CACCCGGACTAACACCTTC-3', 下游引物:5'-CCCATACCCACCACACACC-3'(扩增长度 207 bp); Bcl-2 上游引物:5'-ACGAGTGGATACTGGAGATG-3', 下游引物:5'-TAGCGACGAGAGAAAGTCATCC-3'(扩增长度 232 bp); Bax 上游引物 5'-GTGGTTGCCCTCTTCTACTTTG-3', 下游引物 5'-CACAAAGATGGTCACT-GTCT GC-3'(扩增长度 204 bp)。反应条件为:95 ℃ 预变性 30 s, 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火 30 s, 共 40 个循环。荧光定量 PCR 检测 Bcl-2、Bax mRNA 表达。

2.3 Hoechst 33342/PI 双染检测细胞凋亡

实验分为对照组、A β 组、Gen + A β 组、Myr + Gen + A β 组, 细胞培养与处理同“2.1”项。各组药物作用 24 h 后, 收集 1×10^5 ~ 1×10^6 个细胞悬浮于 1 mL 培养基中, 加入 Hoechst 33342 染液 10 μ L, 37 ℃ 孵育 5 ~ 15 min, 于 40 ℃, 500 ~ 1 000 r/min 离心 5 min 弃上清液; 加 Buffer A 工作液 1.0 mL 悬浮细胞, 加入 PI 染液 5 μ L, 室温避光放置 5 ~ 15 min, 荧光显微镜拍照, 每组随机选取 3 个视野, 计算细胞凋亡率。

2.4 PKC 活性及表达水平测定

实验分为对照组、A β 组、Gen + A β 组、E₂ + A β 组和 Myr + Gen + A β 组。细胞培养与处理同“2.1”项。按非放射性 PKC 检测试剂盒说明书, 将酶-底物反应体系于 30 ℃ 孵育 2 min, 加入样品继续孵育 30 min, 于 95 ℃ 水浴 10 min 终止反应, 于凝胶成像仪中拍照扫描。按胞核胞浆胞膜制备试剂盒说明书提取纯化胞膜蛋白, 琼脂糖凝胶电泳, 电转膜至 PVDF 膜上(转膜条件 5 mA/cm²、35 min), 经抗体孵育, 显影定影, 即得 Western blot 图谱。

2.5 统计分析

实验数据采用 SPSS 17.0 统计学软件分析。实验数据以表示, 组间比较采用单因素方差分析和 t 检验, 两组间比较采用 LSD 检验。以 P < 0.05 为有统计学意义。

3 结 果

3.1 Bcl-2、Bax mRNA 表达水平比较

Table 1 Effects of genistein on Bcl-2, Bax mRNA expression and Bcl-2/Bax ratio of PC12 cells induced by A_β₂₅₋₃₅ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	Dose/(μmol/L)	Bcl-2	Bax	Bcl/Bax
Control	1.000 ± 0.005	1.001 ± 0.059	1.000 ± 0.054	
A _β	20	0.324 ± 0.035 **	6.199 ± 0.455 **	0.052 ± 0.002 **
Gen	25	0.953 ± 0.121 ##	1.327 ± 0.117 ##	0.717 ± 0.028 * ##
Gen + A _β	25 + 20	0.705 ± 0.007 * #	3.173 ± 0.171 * * #	0.222 ± 0.014 * * ##
E ₂	1 × 10 ⁻⁶	0.981 ± 0.077 ##	1.178 ± 0.081 ##	0.832 ± 0.008 * ##
E ₂ + A _β	1 × 10 ⁻⁶ + 20	0.818 ± 0.104 #	2.723 ± 0.333 * #	0.305 ± 0.075 * * #
Myr + Gen + A _β	50 + 25 + 20	0.488 ± 0.052 * * △	4.699 ± 0.368 * * △	0.104 ± 0.003 * * △

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs control group; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs A_β group; △ P < 0.05 vs Gen + A_β group

A_β: amyloid β-protein; Gen: genistein; E₂: estradiol; Myr: Myristoylated Protein Kinase C Peptide inhibitor

由表 1 可见,与 A_β 组比较,Gen + A_β 组、E₂ + A_β 组的 Bcl-2 表达显著升高,而 Bax 表达显著降低($P < 0.05$)。与 Myr + Gen + A_β 组比较,Gen + A_β、E₂ + A_β 组的 Bcl-2 表达明显降低,Bax 表达明显升高($P < 0.01$)。结果显示,Gen 能上调 Bcl-2 基因和下调 Bax 基因的表达水平,提高 Bcl-2/Bax 的比值,该作用被其拮抗剂 Myr 所抑制。

3.2 细胞凋亡检测结果

Hoechst 33342/PI 双染检测细胞凋亡,实验结果见图 1 及图 2。结果显示,与 A_β 组相比,Gen + A_β 组细胞凋亡率明显降低($P < 0.01$),而 Gen + Myr + A_β 组凋亡率无显著差异($P > 0.05$),表明 Gen 具有减少细胞凋亡和坏死,起到细胞保护作用,而 Myr 抑制剂可拮抗 Gen 的作用,增加细胞凋亡的程度。

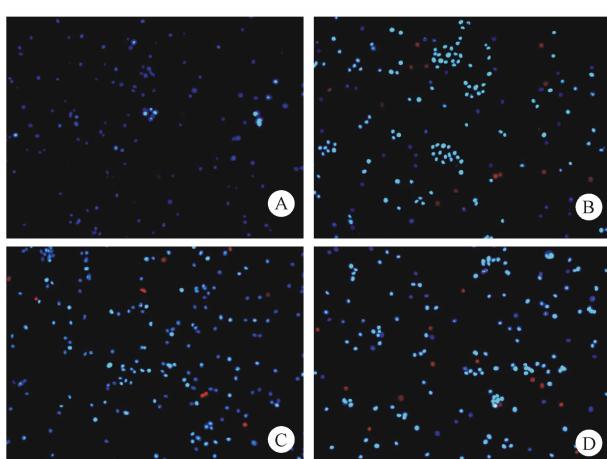


Figure 1 Effect of genistein on A_β₂₅₋₃₅-induced PC12 cells apoptosis using Hoechst 33342/propidium(PI) staining
A: Control; B: A_β(20 μmol/L); C: Gen(25 μmol/L) + A_β(20 μmol/L); D: Myr + Gen(25 μmol/L) + A_β(20 μmol/L)

各实验组细胞 Bcl-2、Bax mRNA 表达水平检测结果见表 1。

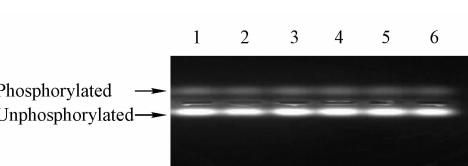


Figure 3 Agarose gel electrophoresis shows the phosphorylation activity of PKC

1: Control; 2: Gen; 3: E₂ + A_β; 4: Myr + Gen + A_β; 5: Gen + A_β; 6: A_β

Figure 2 Effect of genistein on A_β₂₅₋₃₅-induced PC12 cells apoptosis using Hoechst 33342/propidium(PI) staining($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Control; B: A_β(20 μmol/L); C: Gen(25 μmol/L) + A_β(20 μmol/L); D: Myr(50 μmol/L) + Gen(25 μmol/L) + A_β(20 μmol/L)

* * P < 0.01 vs control group; ## P < 0.01 vs A_β group; △ P < 0.05 vs Gen + A_β group

3.2.1 PKC 活性测定结果 各组 PKC 磷酸化产物的电泳结果以及 PKC 抑制剂 Myr 的影响作用见图 3。利用光密度扫描仪处理软件 GLyko Band-Scan 处理图像,得到各组读数见图 4。

图 3 及图 4 结果显示,A_β 组底物磷酸化水平较低,Gen 组、Gen + A_β 组、E₂ + A_β 组底物磷酸化水平明显升高($P < 0.05$),而 Myr + Gen + A_β 组底物磷酸化水平降低。结果表明,Gen 能激活 A_β 诱导损伤的 PC12 细胞的 PKC 活力,而 Myr 能阻断该活化作用。

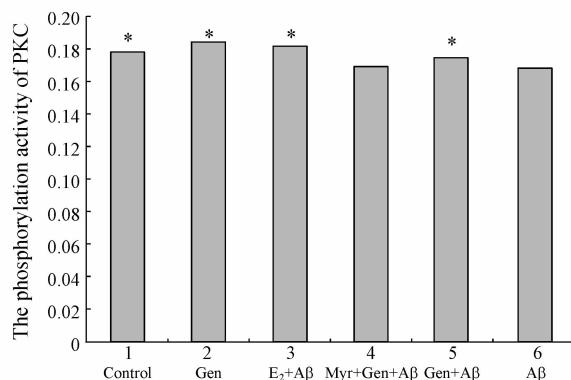


Figure 4 Comparison of the phosphorylation activity of PKC among groups. * $P < 0.05$ vs $A\beta$ group

3.2.2 PKC 表达水平测定结果 各实验组细胞 Western Blotting 检测结果见图 5。结果显示,用抗 PKC- α (H-7)作为一抗进行 Western Blotting 试验,出现相对分子质量为 79 kD 条带,表明为 PKC- α 酶。与 $A\beta$ 组相比,Gen 和 Gen + $A\beta$ 组 PKC- α 含量组升高,Myr + Gen + $A\beta$ 组 PKC- α 含量降低,结果表明 Gen 能提高 $A\beta$ 诱导损伤的神经细胞 PKC- α 表达水平,PKC 抑制剂 Myr 拮抗 Gen 的作用。

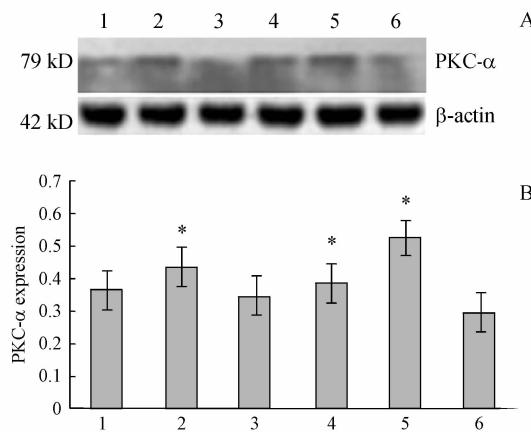


Figure 5 Agarose gel electrophoresis (A) and Western blot analysis shows the PKC- α expression

1: Control; 2: Gen; 3: Myr + Gen + $A\beta$; 4: Gen + $A\beta$; 5: $E_2 + A\beta$; 6: $A\beta$

* $P < 0.05$ vs $A\beta$ group

4 讨论

近年来,越来越多的凋亡调节因子被证实参与 AD 神经细胞的调控,其中 Bcl-2/Bax 在细胞凋亡信号转导通路中起关键作用。Bcl-2 基因是一个公认的抑制凋亡基因,其表达产物可抑制多种细胞的凋亡,促进神经元存活。Bax 为凋亡促进因子,其基因产物为细胞凋亡的启动子,Bax 表达上调后可

作用于 caspase 基因的上游,介导细胞凋亡^[6]。Sun 等^[7]研究表明神经营养因子可通过降低 Bax/Bcl-2 比率来阻止由 $A\beta$ 诱导的细胞凋亡。Wang 等^[8]研究显示在 $A\beta$ 毒性模型中,可通过减少 Bax 表达,增加 Bcl-2 表达来改善大鼠的认知能力。

蛋白激酶 C 是一种磷脂依赖的、钙激活的蛋白激酶,广泛分布在各种组织细胞中,其可通过调控蛋白磷酸化而发挥作用,如信号传递、神经元兴奋性调节、神经递质释放、基因表达和突触塑形等。因此,PKC 的活化与细胞的增殖、分化、凋亡等多种生物学效应有着密切关系。引起细胞凋亡的因素很多,研究发现 PKC 在细胞凋亡发生过程中起着信号传导作用。研究显示^[9-10],抗凋亡蛋白 Bcl-2 是 PKC 的靶点之一,PKC 能通过刺激 Bcl-2 表达发挥保护作用。Wang 等^[11]研究发现 PKC- β 抑制剂 LY333531 能进一步促进晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 诱导的内皮细胞凋亡,其可通过上调 Bax、Bad 表达,下调 Bcl-2 表达,降低 Bcl-2/Bax 比率,起到促进细胞凋亡进程的作用。黄河清等^[12]研究发现,PKC 抑制剂 Calphostin C 的浓度和 Bcl-2 的表达呈负相关,而与细胞凋亡呈正相关,且均具有剂量依赖性,表明神经元胞膜 PKC 的移位激活在缺氧神经细胞损伤中具有保护作用,且这种作用通过抑制 Bcl-2 表达实现。

Cordey 等^[13-15]研究提示雌激素可快速、短效地增加 PKC 活性,从而显著降低 $A\beta$ 的神经毒性,提高神经细胞的存活率。作为植物雌激素的染料木素是否也是通过 PKC 信号转导通路发挥细胞保护作用? 本论文研究显示,Gen 能显著上调 $A\beta$ 诱导的 PC12 细胞 Bcl-2 基因和下调 Bax 基因的表达水平,增加 Bcl-2/Bax 的比值,降低损伤细胞的凋亡程度,同时有效提高 PC12 细胞 PKC 活性和表达水平,且该激活作用被其拮抗剂 Myr 所抑制。研究结果揭示,Gen 对 $A\beta$ 诱导的 PC12 损伤细胞具有保护作用,其机制可能是通过激活 PKC 信号转导通路,调节抗凋亡基因 Bcl-2 和促凋亡基因 Bax 的表达水平,从而抑制 $A\beta$ 诱导的细胞凋亡,发挥神经保护作用。本研究为染料木素用于老年退行性神经病变的预防和治疗提供实验依据。

参考文献

- [1] Fong TG, Jones RN, Marcantonio ER, et al. Adverse outcomes

- after hospitalization and delirium in persons with Alzheimer disease [J]. *Ann Intern Med*, 2012, **156**(12):848–856.
- [2] Crouch PJ, Harding SM, White AR, et al. Mechanisms of A_β mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, **40**(2):181–198.
- [3] Lu N, Wang W, Liu J, et al. Protein kinase C epsilon affects mitochondrial function through estrogen-related receptor alpha [J]. *Cell Signal*, 2011, **23**(9):1 473–1 478.
- [4] Yang HQ, Li X, Yang WM. Neuroprotective effects of new protein kinase C activator TPPB against A_β(25–35) induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. *Neurochem Res*, 2012, **37**(10):2 213–2 221.
- [5] Aimeida M, Han L, Ambrogini E, et al. Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF-kappa B in osteoblastic cells via a PKCbeta/p66shc signaling cascade: counter regulation by estrogens or androgens [J]. *Mol Endocrinol*, 2010, **24**(10):2 030–2 037.
- [6] Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system [J]. *Nature*, 2000, **407**(6 805):802–809.
- [7] Sun ZK, Ma XR, Yang HQ, et al. Brain-derived neurotrophic factor prevents beta-amyloid-induced apoptosis of pheochromocytoma cells by regulating Bax/Bcl-2 expression [J]. *Neu Regen Res*, 2012, **7**(5):347–351.
- [8] Wang YL, Yin HL, Lou JY, et al. Effects of curcumin on hippocampal Bax and Bcl-2 expression and cognitive function of a rat model of Alzheimer's disease [J]. *Neu Regen Res*, 2011, **6**(24):1 845–1 849.
- [9] Amoult D, Gaume B, Karbowski M, et al. Mitochondrial release of A IF and Endo G requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization [J]. *EMBO J*, 2003, **22**(17):4 385–4 399.
- [10] Wang C, Wang MW, Tashiro SI, et al. Effect of protein kinase C on human melanoma A375-S2 cell death induced by evodiamine [J]. *Acta Pharm Sin (药学学报)*, 2005, **40**(11):1 033–1 036.
- [11] Wang SS, Xu YH, Feng L, et al. A PKC-beta inhibitor prompts the HUVECs apoptosis- induced by advanced glycation end products [J]. *Pharmazie*, 2011, **66**(11):881–887.
- [12] Huang HQ, Chen KN, Tu YH, et al. Relationship between activity of protein kinase C and apoptosis of cultured neurons after hypoxia [J]. *Acta Acad Med Mil Tert(第三军医大学学报)*, 2002, **24**(12):1 399–1 401.
- [13] Cordey M, Gundimeda U, Gopalakrishna R, et al. Estrogen activates protein kinase C in neurons: role in neuroprotection [J]. *Neurochem*, 2003, **84**(6):1 340–1 348.
- [14] Cordey M, Gundimeda U, Gopalakrishna R, et al. The synthetic estrogen 4-estren-3 alpha,17 beta-diol (estren) induces estrogen-like neuroprotection [J]. *Neurobiol Dis*, 2005, **19**(1/2):331–339.
- [15] Cordey M, Pike C. Conventional protein kinase C isoforms mediate neuroprotection induced by phorbol ester and estrogen [J]. *Neurochem*, 2006, **96**(1):204–217.

• 新趋势 •

2014 年药物市场展望(2)

4 其他药物

Eli Lilly 公司期望投放其治疗糖尿病的长效 GLP-1 模拟药 dulaglutide, 以及其治疗胃癌的 ramucirumab。这两类药物有望在 2019 年销售额分别达到 9.742 亿和 9.044 亿美元, 且去年 10 月份已经向美国和欧盟递交了申请。MannKind 公司针对其吸入性胰岛素产品——Afrezza 递交了申请, 并且确定了 PDUFA 时间为 2014 年 4 月 15 日, 或有可能于 2014 年投放市场。不过 Afrezza 自 2009 年 3 月向 FDA 递交药物申请共 3 次, 被 FDA 以需要补充数据为由拒绝两次。如果该药物能投放市场, 预计销售额在 2019 年将达 7.462 亿美元。

2014 年, 新药研发的重点将转向更加个性化新药研发上去。总之, 随着突破性药物研发数量的下降, 一些目前正在临床使用的药物专利到期, 2014 年将是制药企业面临更大挑战的一年。

(生命科学研究快报, 本刊有删节)