

姜黄素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞线粒体内 细胞色素 C 表达的影响

肖韩艳¹, 刘颖¹, 张岩¹, 王冬梅², 张云^{3*}

(1. 牡丹江医学院 第二附属医院, 黑龙江 牡丹江 157011; 2. 牡丹江市第二人民医院,
黑龙江 牡丹江 157013; 3. 牡丹江医学院 附属红旗医院, 黑龙江 牡丹江 157011)

[摘要] **目的:**探讨姜黄素对 β 淀粉样蛋白 25-35 (β -amyloid protein 25-35, $A\beta_{25-35}$) 诱导的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 (PC12) 细胞凋亡及线粒体内细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 表达的影响, 探讨其抗 PC12 细胞凋亡的线粒体机制。**方法:**以 $A\beta_{25-35}$ 作用于 PC12 细胞, 建立阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 细胞模型, 分别以 0 (空白组), 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同浓度的姜黄素进行处理, 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测姜黄素对细胞存活率的影响。实验随机分为空白组, 模型组, 姜黄素低、高 (10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 浓度组, 采用 Annexin V FITC/PI 双染流式细胞仪检测凋亡情况; JC-1 染色分析检测线粒体膜电位 ($\Delta\psi\text{m}$) 的变化; 免疫荧光分析检测 Cyt C 的分布; 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测线粒体内 Cyt C 蛋白的表达。**结果:**与空白组比较, 模型组 PC12 细胞存活率显著降低, 凋亡率升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 姜黄素可显著升高 PC12 细胞存活率, 降低凋亡率 ($P < 0.01$)。与空白组比较, 模型组 PC12 细胞 $\Delta\psi\text{m}$ 降低, Cyt C 由线粒体释放至胞浆增多, 线粒体内 Cyt C 的表达下调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 姜黄素可显著升高 PC12 细胞 $\Delta\psi\text{m}$, 抑制 Cyt C 由线粒体释放至胞浆并上调线粒体内 Cyt C 的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**姜黄素可抑制线粒体凋亡途径, 从而抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡。

[关键词] 阿尔茨海默病; 姜黄素; 凋亡; 线粒体凋亡途径

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0116-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017230116

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1403.022.html>

[网络出版时间] 2017-09-12 14:03

Effect of Curcumin on Expression of Cytochrome C in Mitochondria of PC12 Cells Induced by $A\beta_{25-35}$

XIAO Han-yan¹, LIU Ying¹, ZHANG Yan¹, WANG Dong-mei², ZHANG Yun^{3*}

(1. The Second Affiliated Hospital of Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China;

2. Mudanjiang Second People's Hospital, Mudanjiang 157013, China;

3. Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the effect of curcumin on the apoptosis of adrenal pheochromocytoma (PC12) cells induced by β -amyloid protein 25-35 ($A\beta_{25-35}$) and the expression of cytochrome C (Cyt C) in mitochondria of rats, in order to analyze the mitochondrial mechanisms of anti-apoptosis. **Method:** $A\beta_{25-35}$ was used to treat PC12 cells, and the cellular model of Alzheimer's disease (AD) was established. The PC12 cells were treated with curcumin at concentrations of 0 (blank control group), 1, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The survival rate was measured by 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT). The PC12 cells were randomly divided into the blank control group, the model group, the low-

[收稿日期] 20170706(010)

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金项目 (H2015937)

[第一作者] 肖韩艳, 硕士, 主治医师, 从事神经病学基础临床研究, Tel:0453-8927665, E-mail:xiaohanyan1981@sina.com

[通讯作者] *张云, 副主任医师, 从事心脑血管基础临床, Tel:0453-06586352, E-mail:hxf111hxf222@126.com

dose ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) curcumin group and the high-dose ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) curcumin group. The effect of curcumin on the apoptosis, the changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi\text{m}$), the distribution of Cyt C and the expression of Cyt C in mitochondria were evaluated by Annexin V-FITC/PI flow cytometry, JC-1 staining assay, immunofluorescence analysis and Western blot analysis, respectively. **Result:** Compared with the blank control group, the survival rate of PC12 cells was decreased significantly, and the apoptosis rate was increased in model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, curcumin significantly increased the cell viability and decreased the apoptosis rate ($P < 0.01$). Compared with the blank control group, $\Delta\psi\text{m}$ decreased significantly, the release of mitochondrial Cyt C to cytosol increase, and the expression of Cyt C in mitochondria down-regulated in model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, curcumin significantly increased $\Delta\psi\text{m}$, inhibited the release of mitochondrial Cyt C to cytosol and Up-regulated the expression of Cyt C in the mitochondria ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Curcumin can inhibit the apoptosis of PC12 induced by $\text{A}\beta_{25-35}$ by suppressing mitochondrial apoptosis pathway.

[**Key words**] Alzheimer's disease; curcumin; apoptosis; mitochondrial apoptosis pathway

阿尔茨海默(Alzheimer's disease, AD)是临床上常见的好发于老年人群的脑神经退行性疾病,也称为老年性痴呆症,其特征表现为进行性记忆丧失和(或)认知能力受损^[1]。AD 主要病理标志物包括 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, $\text{A}\beta$)聚集成老年斑、突触受损、小胶质细胞活化、氧化应激和线粒体功能障碍等^[2]。研究发现, $\text{A}\beta$ 沉积引发的神经炎症反应在 AD 过程中起核心作用,最终导致突触和神经元的损害^[3]。现阶段,对于 AD 的治疗方法十分有限,随着对 AD 深入的研究,天然药物在预防和治疗 AD 中的作用日益受到重视^[4-5]。姜黄素(curcumin)是从传统中药姜黄、郁金等姜黄属植物的根茎中提取出来的一种低相对分子质量酚类化合物,因其毒副作用小和广泛的生物学活性等优势而受到关注,如具有抗炎、抗氧化、免疫调节、抗肿瘤、神经保护等多种药理作用^[6]。近年来,国内外关于姜黄素用于 AD 治疗的研究报道较多,提示其在预防和治疗 AD 方面具有潜在的疗效^[7-9]。也有研究报道,姜黄素可抑制 AD 模型 PC12 细胞凋亡,如可通过抑制抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)的表达下调抑制多巴胺诱导的 PC12 细胞凋亡,亦可通过上调 p21 的表达,下调 CDK4, E2F1, Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的表达,对 β 淀粉样蛋白 25-35 (β -amyloid protein 25-35, $\text{A}\beta_{25-35}$)诱导的 PC12 细胞凋亡起保护作用^[10-11],但是有关于线粒体凋亡途径是否参与姜黄素治疗 AD 的研究鲜见报道。本研究利用 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12)细胞,建立 AD 模型,观察姜黄素对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞存活率、凋亡、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, $\Delta\psi\text{m}$), 细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C)

分布和线粒体内 Cyt C 表达的影响,探讨线粒体凋亡途径在其抗 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡过程中的可能作用。

1 材料

1.1 细胞株 PC12 细胞购自上海中国科学院细胞库。

1.2 试剂 姜黄素, $\text{A}\beta_{25-35}$ 冻干粉, AnnexinV-FITC/PI 试剂盒, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI) (美国 Sigma 公司, 货号分别为 C1386, A4559-250UG, dw0001-25T, D9542); 二甲基亚砜(DMSO)和 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT) (美国 Amresco 公司, 货号分别为 0231, 0793); DMEM 培养基(美国 HyClone Thermo 公司, 货号 SH30022.01B); 胎牛血清(FBS, 美国 Gibco 公司, 货号 16000-044); 5,50,6,60-四氯-1,1,30,30-四乙基苯并咪唑羧花青碘化物(JC-1, 美国 Thermofisher Scientific 公司, 货号 T3168); 线粒体抽提试剂盒(法国 Biowest 公司, 货号 E1WP1031); FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(美国 GeneCopoeia 公司, 货号 L146A); 兔抗人 Cyt-C 抗体(美国 Santa Cruz 公司, 货号 P4887Rb-h); tublin 内参(英国 AbCam 公司, 货号 ab8229)。

1.3 仪器 HERAcell 240i 型 CO_2 培养箱(美国 Thermofisher Scientific 公司); RT-6100 型酶标仪(美国 Rayto 公司); ZEISS LSM 510 META 型激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司); PowerPac HV 型电泳仪和 ChemiDoc XRS 蛋白成像系统(美国 Bio-Rad 公司); FACScan 型 BD 流式细胞仪(美国 BD 公司); VE-186 型转膜仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 姜黄素配制 姜黄素溶于 0.1% DMSO, 配制

成 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。临用时以 0.1% DMSO 稀释到所需浓度。

2.2 $\text{A}\beta_{25-35}$ 配制(孵育) $\text{A}\beta_{25-35}$ 冻干粉溶于 DMEM 培养基, 配制成 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 7 d, 使之老化, 过滤分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。临用时以 DMEM 培养基稀释到所需浓度。

2.3 细胞培养 PC12 细胞在高糖 DMEM 培养基 [10% FBS + 1% 抗生素(青霉素和链霉素)] 中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度下过夜培养。次日以无糖 DMEM 培养基更换高糖 DMEM 培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度下培养。当汇合度 70% ~ 80% 时传代, 贴壁后细胞呈梭型, 并有较长的突触, 取对数期生长细胞用于后续实验。

2.4 MTT 检测细胞活力 将对数生长期 PC12 细胞按照密度 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔 $100 \mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度下培养 24 h。参照文献[12]及预实验结果, 每孔分别加入 0(空白组, 加入等体积 DMEM 培养基), 1.25, 2.5, 5, 10, 20, $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同浓度的姜黄素, 另设模型组(加入等体积 DMEM 培养基), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度下培养 2 h 后, 除空白组外每孔分别加入 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ ^[13], $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度下继续培养 24 h。PBS 洗涤 1 次, 每孔分别加入 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 溶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度下培养 1 h, 吸取上清液。每孔分别加入 DMSO $100 \mu\text{L}$ 以溶解紫色沉淀, 室温摇床 10 min, 待完全溶解紫色沉淀后, 于 Rayto RT-6100 酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度 A , Graphpad 5.0 计算细胞存活率。每个剂量组设 6 个平行孔, 取 6 孔平均值。

2.5 Annexin V FITC/PI 双染流式细胞仪检测凋亡

将对数生长期 PC12 细胞按照密度 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔 $100 \mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度下培养 24 h。参照 MTT 检测结果, PC12 细胞随机分为空白组, 每孔加入等体积 DMEM 培养基; 模型组每孔加入等体积 DMEM 培养基; 低剂量姜黄素组每孔加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素; 高剂量姜黄素组每孔加入 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素。各组均 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度下培养 2 h 后, 除空白组外每孔分别加入 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{A}\beta_{25-35}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度下继续培养 24 h。1 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集细胞, PBS 1 mL 冲洗 2 次, 结合缓冲液中重悬成单细胞悬液。最后加入 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Annexin V-FITC 和 PI 液各 $5 \mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度下培养 60 min, BD FACScan 流式细胞仪检测凋亡情

况。每个剂量组设 6 个平行孔, 取 6 孔平均值。

2.6 JC-1 染色分析检测 $\Delta\psi_m$ 变化 按 2.5 项方法分组培养细胞。用 PBS 洗涤后, 将细胞与 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ JC-1 培养 20 min。线粒体经 JC-1 染色后, 如 JC-1 聚集线粒体基质形成复合物, 则显示红色荧光, 表示 $\Delta\psi_m$ 较高; 如 JC-1 不能形成复合物, 而呈单体状态, 则显示绿色荧光, 表示 $\Delta\psi_m$ 较低。Gallios 流式细胞仪检测荧光信号。按照 JC-1 不同形式所发射的荧光不同, 以红色/绿色荧光比值 (FL2/FL1) 表示 $\Delta\psi_m$ 的变化。Image J 软件计算 FL2/FL1。每个剂量组测量 6 次, 取平均值。

2.7 免疫荧光分析 将对数生长期 PC12 细胞按照密度 5×10^4 个/mL 接种于载玻片, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度下孵育 24 h。按 2.5 项方法分组培养细胞。取出爬片, PBS 冲洗 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定 25 min, 0.4% triton-100 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 穿孔 10 min, 5% BSA 室温封闭 15 min, 加入兔抗人 Cyt-C 抗体 (1:50), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 1 mL 冲洗 2 次, 加入 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1:400) 避光室温放置 1 h, DAPI 染核液室温作用 10 min, 无色指甲油封片, ZEISS LSM 510 META 激光共聚焦显微镜观察荧光染色。

2.8 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测线粒体内 Cyt C 蛋白的表达 按 2.5 项方法分组培养细胞。严格按照线粒体抽提试剂盒说明书抽提线粒体内 Cyt C, BCA 法测定总蛋白浓度。取 $30 \mu\text{g}$ 蛋白上样后进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。当电泳完成后, 半干电转膜仪转膜, 5% 脱脂奶粉封闭。加入兔抗人 Cyt-C 抗体 (1:1 000) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBST 冲洗后, 加入 HRP 标记的二抗 (1:500) 室温孵育 2 h, ECL 化学发光试剂显色。Tublin 抗体孵育方法与上述方法相同。由 Bio-Rad 蛋白成像系统拍摄显影条带, IPWIN 32 软件对各条带进行进行灰度值分析。Cyt C 相对表达水平 = Cyt C 灰度值/tublin 灰度值。每个剂量组测量 6 次, 取平均值。

2.9 统计学分析 计量数据采用 SPSS 17.0 软件进行描述性统计。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较, 采用单因素方差分析, 组间两两比较, 采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 姜黄素对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞存活率的影响 为了确定姜黄素对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞存活率的影响, 采用 MTT 检测细胞存活率。结果显示, 模型组细胞存活率显著降低, 与空白组比较, 差

异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 预先加入 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素可显著提高细胞存活率, 与模型组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 虽然预先加入 1.25, 2.5, 5, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素可提高细胞存活率, 但是与模型组比较, 差异不具有统计学意义。见表 1。

表 1 姜黄素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of different concentrations of curcumin on survival rate of PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率/%
空白	-	100.00 \pm 0.00
模型	-	42.39 \pm 6.38 ²⁾
姜黄素	1.25	46.63 \pm 7.76
	2.5	48.50 \pm 7.78
	5	53.57 \pm 8.49
	10	79.29 \pm 9.44 ³⁾
	20	82.81 \pm 10.47 ³⁾
	40	56.04 \pm 9.03

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 姜黄素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪结果显示, 模型组 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡率显著升高, 与空白组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 低剂量姜黄素组和高剂量姜黄素组细胞凋亡率显著降低, 与模型组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 姜黄素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of curcumin on apoptotic rate of PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白	-	4.02 \pm 0.67
模型	-	50.71 \pm 9.29 ²⁾
姜黄素	10	32.13 \pm 3.68 ³⁾
	20	19.90 \pm 2.26 ⁴⁾

3.3 姜黄素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞 $\Delta\psi_m$ 的影响

JC-1 染色分析结果显示, 模型组 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞 FL2/FL1 显著较低, 说明 $\Delta\psi_m$ 显著较低, 与空白组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 低剂量姜黄素组和高剂量姜黄素组细胞 FL2/FL1 显著升高, 说明 $\Delta\psi_m$ 显著升高, 与模型组比较, 差异具

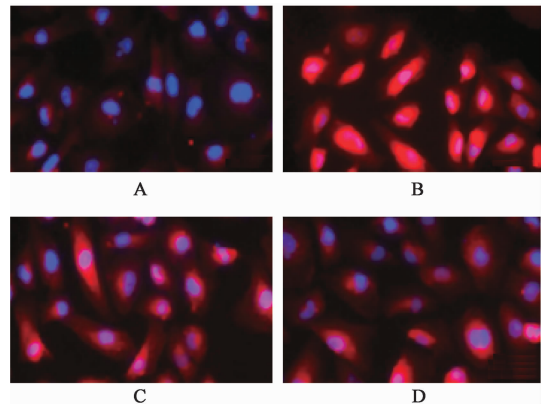
有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 姜黄素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞 $\Delta\psi_m$ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 3 Effect of curcumin on $\Delta\psi_m$ of PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	FL2/FL1
空白	-	3.80 \pm 0.57
模型	-	0.14 \pm 0.02 ²⁾
姜黄素	10	0.31 \pm 0.04 ³⁾
	20	0.93 \pm 0.14 ⁴⁾

3.4 姜黄素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞 Cyt C 分布的影响

免疫荧光分析结果显示, 空白组 PC12 细胞, 呈类圆形, 边界清晰, Cyt C 主要集中在核周胞浆中, 仅见微弱的荧光信号; 模型组 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞体积缩小, 呈抱团状, 胞膜破裂, 此时释放至胞浆的 Cyt C 明显增多, 弥散分布于全胞浆, 呈现强烈的荧光信号; 低剂量姜黄素组和高剂量姜黄素组细胞可见释放至胞浆的 Cyt C 明显减少, 胞浆内的 Cyt C 荧光信号显著减弱。见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C, D. 姜黄素 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 (图 2 同)
图 1 姜黄素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞 Cyt C 分布的影响 (免疫荧光, $\times 100$)

Fig. 1 Results of curcumin on distribution of Cyt C of PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$ (immunofluorescence staining, $\times 100$)

3.5 姜黄素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞线粒体内 Cyt C 表达的影响

模型组 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞线粒体内 Cyt C 的相对表达显著较低, 提示线粒体内 Cyt C 可能释放至胞浆中, 与空白组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 低剂量姜黄素组和高剂量姜黄素组细胞线粒体内 Cyt C 的相对表达显著升高, 提示姜黄素可能抑制线粒体内 Cyt C 释放至胞浆中, 与模型组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 4。

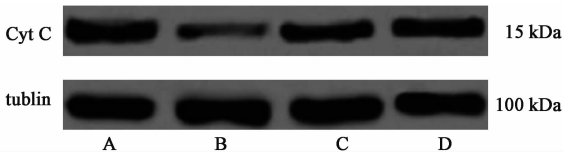


图 2 姜黄素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞线粒体内 Cyt C 表达的影响

Fig. 2 Result of curcumin on expression of Cyt C in mitochondria of PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$

表 4 姜黄素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞线粒体内 Cyt C 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of curcumin on relative expression of Cyt C in mitochondria of the PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cyt C/tubulin
空白	-	0.876 \pm 0.132
模型	-	0.182 \pm 0.026 ²⁾
姜黄素	10	0.691 \pm 0.101 ⁴⁾
	20	0.723 \pm 0.114 ⁴⁾

4 讨论

本研究发现,姜黄素可显著升高 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞存活率,提示姜黄素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞体现一定的神经保护作用。同时本研究也发现,姜黄素亦能抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡,这与以往研究相一致^[14-15]。

细胞凋亡又称细胞程序性死亡,是指机体为了维持细胞内环境稳定,由一系列复杂的信号传导通路和基因调控的一种生理性死亡过程,对机体组织和器官的发育及防御致病因素具有十分重要的作用。细胞凋亡途径根据启动过程包括线粒体途径、死亡受体途径和内质网途径 3 种途径,特别是线粒体途径在介导细胞凋亡中承担着重要角色^[16-17]。线粒体是凋亡信号转导途径中起关键调节作用的细胞器,在凋亡过程中具有重要的调控作用^[18]。凋亡信号可通过激活多条上游通路而作用于线粒体,线粒体将凋亡信息整合后,发生形态或功能的改变,导致线粒体膜间隙的促凋亡因子(如 Cyt C)释放。Cyt C 是一种水溶性小分子物质,位于线粒体中,是线粒体呼吸链中传递电子的载体,而且是细胞凋亡调控的主要蛋白,也是最早被发现的线粒体释放的促凋亡蛋白^[19-20]。

$\Delta\psi_m$ 是反映线粒体内膜通透性的最佳指标之一,细胞是否正常与线粒体 $\Delta\psi_m$ 有着密切关系,若 $\Delta\psi_m$ 下降则认为细胞必定凋亡至死^[21-22]。 $\Delta\psi_m$ 的破坏被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的

事件之一^[23]。当 $\Delta\psi_m$ 降低后,线粒体膜肿胀、发生形态或功能的改变、通透性增高、导致 Cyt C 从内膜脱落出来并释放到胞浆中,与凋亡蛋白酶激活因子-1(Apaf-1)结合并形成多聚物,进而通过 N 末端黏附及半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-9(Caspase-9)前体形成凋亡小体,Caspase-9 多聚化前体构象改变、裂解活化,最后激活 Caspase-3,而 Caspase-3 是细胞凋亡最终的执行因子,导致细胞凋亡^[24]。

本研究发现,姜黄素可通过升高 $\Delta\psi_m$ 从而具有抗 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡的作用,此结果表明姜黄素抗 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡可能是通过线粒体介导的细胞凋亡途径实现的。为了探讨姜黄素在抗 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡过程中是否与 Cyt C 有关,以及是否抑制 Cyt C 从线粒体释放至胞浆,本研究采用免疫荧光分析检测了 Cyt C 的分布以及 Western blot 分析检测了线粒体内 Cyt C 的表达。结果发现,低剂量姜黄素组和高剂量姜黄素组 Cyt C 在 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞胞浆内荧光强度较模型组显著较低,在线粒体内表达显著较高,说明姜黄素在抗 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡过程中存在 Cyt C 的参与,并且抑制其从线粒体释放至胞浆。

综上所述,姜黄素可升高 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞存活率,并且可抑制其凋亡,其抗凋亡机制可能与其抑制 Cyt C 从线粒体释放至胞浆从而抑制线粒体凋亡途径有关。

[参考文献]

- [1] Carro E, Bartolomé F, Bermejo-Pareja F, et al. Early diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease based on salivary lactoferrin [J]. *Alzheimers Dement: Amst*, 2017, 8(3):131-138.
- [2] Kamat P K, Kalani A, Rai S, et al. Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease; understanding the therapeutics strategies [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(1): 648-661.
- [3] 安鹏远,王钦文,徐淑君.不同聚集状态的 $A\beta$ 寡聚体在阿尔茨海默病发生中的作用机制研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2016, 43(2):109-114.
- [4] Abuznait A H, Qosa H, Busnena B A, et al. Olive-oil-derived oleocanthal enhances β -amyloid clearance as a potential neuroprotective mechanism against Alzheimer's disease: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *CS Chem Neurosci*, 2013, 4(6):973-982.
- [5] Ansari N, Khodaghali F. Natural products as promising drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanism aspect [J]. *Curr Neuropharmacol*,

- 2013,11(4):414-429.
- [6] 周晶晶,郑昱辰,李明月,等. 姜黄素的药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2016,37(4):304-307.
- [7] 叶莉莎,韩园,刘启星,等. 姜黄素对阿尔茨海默病大鼠学习记忆及 HMGB1 和 JNK 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2014,30(6):1114-1118.
- [8] 陈鑫. 姜黄素对阿尔茨海默病小鼠学习记忆能力及海马细胞的影响[J]. 中国老年学杂志,2016,36(24):6056-6058.
- [9] GAO S, DUAN X, WANG X, et al. Curcumin attenuates arsenic-induced hepatic injuries and oxidative stress in experimental mice through activation of Nrf2 pathway, promotion of arsenic methylation and urinary excretion [J]. Food Chem Toxicol,2013,59(3):739-747.
- [10] 汪军兵,龚正,董军,等. 姜黄素对放线菌素 D/TNF- α 协同诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用及机制研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2012,28(5):484-487.
- [11] 王翔宇,杨红卫,梅元武,等. 姜黄素对多巴胺诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用[J]. 西安交通大学学报:医学版,2013,34(1):115-118.
- [12] 乔娜娜,王运良. 姜黄素对阿尔茨海默病细胞模型 miRNA106a 的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志,2015,18(2):41-43.
- [13] 李超,毕鹏翔,董妍,等. 姜黄素类似物对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 AD 细胞模型细胞凋亡的影响[J]. 中国现代医生,2017,55(10):1-4.
- [14] FAN C D, LI Y, FU X T, et al. Reversal of beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells by curcumin, the important role of ROS-mediated signaling and ERK pathway [J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(2):211-222.
- [15] ZHANG Y, YONG H Y, SHI X T, et al. Protective effect of curcumin against $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity in differentiated PC12 cells[J]. Natal Ned J China, 2013, 93(35):2826-2829.
- [16] Fujiwara N, Inoue J, Kawano T, et al. miR-634 activates the mitochondrial apoptosis pathway and enhances chemotherapy-induced cytotoxicity [J]. Cancer Res, 2015,75(18):3890-3901.
- [17] Arora S, Tandon S. Mushroom extracts induce human colon cancer cell (COLO-205) death by triggering the mitochondrial apoptosis pathway and G₀/G₁-phase cell cycle arrest[J]. Arch Iran Med,2015,18(5):284-295.
- [18] Thammasit P, Sangboonruang S, Suwanpairoj S, et al. Intracellular acidosis promotes mitochondrial apoptosis pathway:role of EMMPRIN down-regulation via specific single-chain Fv intrabody [J]. Cancer, 2015, 6(3):276-286.
- [19] 富苏,范吉平,王新志. 通络化痰胶囊对 H₂O₂ 所致的 PC12 细胞凋亡的保护作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):188-192.
- [20] 容婵,廖莉娅,林道建,等. 柚皮苷对地塞米松诱导的小鼠 MC3T3-E1 细胞凋亡及线粒体凋亡途径的影响[J]. 临床和实验医学杂志,2017,16(5):417-420.
- [21] 蒋时红,吴耀松,刘燕. 胃康舒宁促胃癌细胞凋亡机制与线粒体凋亡途径[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(21):203-206.
- [22] 范新风,王鹏龙,杜海渊,等. 新齐墩果酸衍生物抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖及诱导凋亡的研究[J]. 中国药学杂志,2016,51(24):2114-2118.
- [23] 齐一鸣,黄俊琪. 2 型登革病毒通过线粒体途径诱导 EA. hy926 细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(3):385-389.
- [24] 郭可,吴晓光,缪红,等. 半枝莲黄酮对复合 $A\beta$ 所致大鼠皮层细胞凋亡抑制作用及线粒体凋亡通路的调节机制 [J]. 中国医院药学杂志,2015,35(22):1994-1999.

[责任编辑 邹晓翠]