

# 厚朴酚对 MPTP 诱导 PC12 细胞凋亡的抑制作用

鄢印根<sup>1\*</sup>, 林泉峰<sup>2</sup>, 徐焱<sup>1</sup>, 黄小丽<sup>1</sup>

(1. 江西医学院上饶分院, 江西 上饶 334000; 2. 江西省萍乡卫生学校, 江西 萍乡 337000)

**[摘要]** 目的: 探讨厚朴酚(magnolol, Mag)对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导 PC12 细胞凋亡的抑制作用及可能作用机制。方法: 将厚朴酚(终浓度 0.1, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )或/和 MPTP(终浓度 50, 100, 150, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )加入到培养的 PC12 细胞中。四甲基偶氮唑盐法(MTT 法)检测细胞增殖活性,用流式细胞仪检测细胞凋亡率,以及 Western-blot 法检测 Bax 和 Bcl-2 的蛋白表达变化。结果: 在加入不同浓度的 MPTP 处理细胞 24 h,细胞增殖活性渐次降低,而厚朴酚 0.1 ~ 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预处理 1 h 可明显减轻 MPTP 导致的 PC12 细胞的损伤,抑制细胞凋亡,以及 Bcl-2/Bax 比值的改变。结论: 厚朴酚对 MPTP 诱导的 PC12 细胞凋亡损伤有一定的抑制作用,其作用机制涉及到影响细胞内 Bcl-2/Bax 蛋白的表达。

**[关键词]** 厚朴酚; 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶; PC12 细胞; 帕金森病

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0223-03

## Inhibitive Effect of Magnolol Against MPTP-Induced Apoptosis in PC12 Cells

YAN Yin-gen<sup>1\*</sup>, LIN Quan-feng<sup>2</sup>, XU Yuan<sup>1</sup>, HUANG Xiao-li<sup>1</sup>

(1. Shangrao School, Jiangxi University of Medicine, Shangrao 334000, China;

2. Pingxiang Health School, Pingxiang 337000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibition of magnolol on the apoptosis of PC12 cell induced by MPTP and its mechanism. **Method:** Magnolol (final concentration 0.1, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and /or MPTP (final concentration 50, 100, 150, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were added into the culture of PC12 cells. The cell viability was detected with MTT method, apoptosis was measured by flow cytometry and Bcl-2/Bax ratio was detected by western blot. **Result:** Cell viability was declined sharply by MPTP with different concentrations, the pre-treatment of magnolol 0.1-10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  could significantly increase the PC12 cell viability, apoptosis and the decrease in the Bcl-2/Bax ratio. **Conclusion:** Magnolol may inhibit the cell damage induced by MPTP and the mechanism is likely related to inhibition to expression of Bcl-2/Bax.

**[Key words]** magnolol; MPTP; PC12 cell; Parkinson's disease

大量的研究表明,细胞凋亡在某些神经系统变性疾病中起着关键作用<sup>[1]</sup>。厚朴酚(magnolol)是传统中药厚朴中提取的一种含有酚羟基的生物活性成分。它具有抗炎、抗菌、抗氧化等多种药理作用<sup>[2-3]</sup>。但厚朴酚对多巴胺能神经元的保护作用尚未见报道,为进一步探讨厚朴酚对神经细胞的保护作用,本实验采用 MPTP 诱导 PC12 细胞凋亡模型,探讨厚

朴酚对 MPTP 诱导的 PC12 细胞凋亡的抑制作用及可能作用机制。

### 1 材料和方法

**1.1 药物和试剂** 厚朴酚(购自中国药品生物制品检定所,批号 110729);MPTP、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、胎牛血清(FBS)、DMEM 培养基(pH 7.4,高糖)均购自 Gibco 公司。

**1.2 仪器** XDY-1A 荧光显微镜(上海精密仪器有限公司),FACS can 型流式细胞仪(BD 公司),OG3022A 酶联免疫检测仪(国产)。

**1.3 细胞培养** PC12 细胞是大鼠肾上腺嗜铬瘤细

**[收稿日期]** 2011-03-18

**[通讯作者]** \*鄢印根,讲师,从事老年神经系统疾病研究,Tel: 15170385005, E-mail:yyg9922222@163.com

胞株,由中国科学院上海细胞生物研究所提供。细胞用含青霉素  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、链霉素  $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  以及 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养,隔天换液。细胞生长达 70% ~ 80% 时用于实验。

**1.4 细胞活性的测定** 取对数生长期细胞,消化后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液配制成单个细胞悬液,调节细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL,接种于 96 孔板中,每孔  $200 \text{ } \mu\text{L}$ ,同时设空白对照组。培养 24 h 后,更换培养液,实验各组预先加入不同浓度的分别与 PC12 细胞共孵育作用 1 h 后,加入 MPTP  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作用 24 h,每组 8 个重复孔,在给药物处理 24 h 后观察结果。细胞经磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗,更换培养液,每孔加入终质量浓度  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MTT 溶液  $20 \text{ } \mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  继续孵育 4 h,终止培养后,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入  $200 \text{ } \mu\text{L}$  DMSO 溶解,振荡 10 min。用酶标仪于  $570 \text{ nm}$  处测定每孔吸光度 ( $A$ )。用  $A$  作为反映细胞增殖活性的参数,实验重复 3 次。

**1.5 细胞凋亡检测** 常规处理 PC12 细胞,调整细胞密度为  $(5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6) / \text{mL}$ ,用  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  预冷的 PBS 洗 2 次,取  $200 \text{ } \mu\text{L}$  细胞悬液,然后加  $10 \text{ } \mu\text{L}$  异硫氰荧光素 (Annexin-V-FITC) 和  $5 \text{ } \mu\text{L}$  碘化丙啶 (PI) 混匀后室温避光孵育 15 min,最后加 PBS 缓冲液保持终体积  $300 \text{ } \mu\text{L}$ ,用流式细胞仪检测分析。

**1.6 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达的测定** 用 Western blot 法。正常培养的细胞分别加药物处理后,继续孵育 24 h 后分别收取细胞,用  $50 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  三羟甲基氨基甲烷盐酸 (Tris-HCl),  $150 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠, pH 7.5 的缓冲液同时含 1% 乙基苯基聚乙二醇 (Nonidet P40), 0.5% 去氧胆酸钠,  $100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氟化钠,  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  正钒酸钠 ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ),  $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  苯基磺酰氟 (PMSF),  $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  4-(2-氨基乙基)苯磺酰氨,  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  抑肽酶,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  亮氨酸) 溶解提取蛋白。蛋白样品浓度用 Bradford 法测定,等量蛋白用

$8\%$  十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺变性梯度电泳,室温转 PVDF 膜,用 Tris-盐缓冲液含 0.05% 吐温-20 (TTBS) 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加一抗 Bcl-2 和 Bax,然后加辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h。膜上滴加增敏剂在暗室洗片,显示条带,用 Bio-Rad 软件分析蛋白表达,数值以处理样本与对照样本的比值表示。

**1.7 统计学方法** 用 SPSS 13.0 软件完成统计学处理,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 对 PC12 细胞增殖活性的影响** 加入不同浓度 MPTP 作用 24 h 后,PC12 细胞活性显著下降,当 MPTP 浓度为  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,其细胞活性仅为正常组的 49.3%,不同浓度厚朴酚 (0.1, 1.0,  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预处理可显著提高细胞增殖能力 ( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 厚朴酚或 MPTP 对 PC12 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$A_{570}$
正常对照	-	$0.941 \pm 0.071$
MPTP	50	$0.731 \pm 0.086$
MPTP	100	$0.464 \pm 0.105^{1)}$
MPTP	150	$0.295 \pm 0.092^{2)}$
MPTP	200	$0.240 \pm 0.103^{2)}$
MPTP + 厚朴酚	100 + 0.1	$0.353 \pm 0.107$
MPTP + 厚朴酚	100 + 1.0	$0.643 \pm 0.071^{1,3)}$
MPTP + 厚朴酚	100 + 10	$0.846 \pm 0.094^{4)}$
厚朴酚	10	$0.923 \pm 0.068$

注:与正常对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 MPTP  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 同)。

**2.2 对 MPTP 诱导 PC12 细胞凋亡的影响**  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MPTP 造成 PC12 细胞显著凋亡。预先加入不同浓度厚朴酚后,可明显抑制 PC12 细胞的凋亡率,并有剂量依赖作用 ( $P < 0.01$ ),见表 2。

表 2 厚朴酚对 MPTP 诱导 PC12 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

厚朴酚/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	-	-	0.1	1.0	10	10
MPTP/ $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	-	+	+	+	+	+
细胞凋亡率/%	$8.73 \pm 1.09$	$51.94 \pm 1.23^{2)}$	$43.94 \pm 1.23$	$34.94 \pm 0.83^{1,3)}$	$19.77 \pm 0.95^{4)}$	$10.27 \pm 1.52$

**2.3 对 Bcl-2 Bax 蛋白表达影响** 用  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MPTP 处理后,Bax 表达增加,Bcl-2 表达减少。用厚

朴酚预处理后抑制 MPTP 导致的这种改变,且和  $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MPTP 处理组有显著差异。(厚朴酚为

0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时  $P < 0.05$ , 厚朴酚为 1.0, 10.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时  $P < 0.01$ )。见图 1。

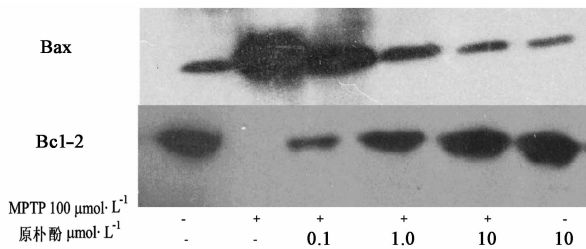


图 1 原朴酚对 Bcl-2 和 Bax 基因蛋白表达的影响

### 3 讨论

PC12 细胞来源于大鼠肾上腺髓质能分泌儿茶酚胺的嗜铬细胞瘤,其胞膜上的受体及其合成的递质接近中脑多巴胺能神经元,普遍应用于多巴胺能神经元死亡方式的研究<sup>[4]</sup>。MPTP 是体外实验研究多巴胺能神经元退变机制的最常用神经毒素之一,广泛用于帕金森症(PD)细胞模型和动物模型的神经毒剂<sup>[5-6]</sup>,可诱导大鼠黑质多巴胺能神经元和多巴胺细胞株 PC12 细胞的凋亡。在对 PD 患者死后尸检也发现黑质神经细胞存在着明显的凋亡样改变。本实验对 MPTP 导致 PC12 凋亡过程进行了研究,结果表明 MPTP 能够导致 PC12 细胞凋亡,在一定浓度范围内随浓度增高细胞凋亡数增多。

细胞凋亡是细胞在各种死亡信号刺激后发生的一系列瀑布式激活的主动性细胞死亡过程<sup>[7]</sup>。研究显示 Bcl 家族成员与细胞凋亡密切相关,是生理性或病理性神经元死亡的关键因子。Bcl-2 蛋白在 PD 患者基底节区比正常同龄人群明显增高,被认为是患者自身抗活性氧的一种防御机制。Bcl-2 基因作为 Bcl 家族中抗凋亡的代表,是近年来研究的热点之一。而 Bax 是蛋白质 Bcl-2 家族中的促凋亡成分,通过促进细胞色素 C 的释放从线粒体膜间隙进入细胞,导致 Caspase 激活细胞死亡而发挥主要作用。

抗凋亡蛋白 Bcl-2 可与促凋亡蛋白 Bax 拮抗,抑制细胞色素 C 自线粒体释放至胞质,阻止细胞色素 C 对 Caspase 蛋白酶的激活,从而抑制凋亡。Bcl-2 和 Bax 比值(Bcl-2/ Bax)能很好的提示是否发生凋亡。厚朴酚对 MPTP 诱导 PC12 细胞凋亡具有一定的抑制作用,其作用机制涉及抑制 MPTP 导致细胞内 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达失衡。

### [参考文献]

- [1] Cookson M R. The biochemistry of Parkinson's disease [J]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 29.
- [2] 梁统,周克元,李杰萍,等. 厚朴酚对大鼠中性白细胞花生四烯酸代谢酶的影响 [J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34(2):151.
- [3] Fong W, Tse A, Poon K, et al. Magnolol and honokiol enhance HL-60 human leukemia cell differentiation induced by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid [J]. *Biochem Cell Biol*, 2005, 37(2):427.
- [4] Tukov F F, Rimoldi J M, Matthews J C. Characterization of the role of glutathione in repin-induced mitochondrial dysfunction, oxidative stress and dopaminergic neurotoxicity in rat pheochromocytoma (PC12) cells [J]. *Neurotoxicology*, 2004, 25(6):989.
- [5] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models [J]. *Neuron*, 2003, 39(6):889.
- [6] Abe K, Taguchi K, Wasai T, et al. Biochemical and pathological study of endogenous 1-benzyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline-induced parkinsonism in the mouse [J]. *Brain Res*, 2001, 907(1/2):134.
- [7] Golstein P. Controlling cell death [J]. *Science*, 1997, 275(5303):1081.

[责任编辑 何伟]