

## 人参皂苷 Rg1 对 1-甲基-4-苯基吡啶离子诱导的 PC12 细胞凋亡的保护作用

叶晓莉<sup>1\*</sup>, 李晓峰<sup>2</sup>

1. 解放军 323 医院干部病房, 西安 710046

2. 第四军医大学西京医院中医药研究所中西医结合老年脑病研究室, 西安 710032

**[摘要]** **目的** 探讨人参皂苷 Rg1 对 1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP<sup>+</sup>)诱导的 PC12 细胞凋亡是否具有保护作用。**方法** 采用 MPP<sup>+</sup> 诱导的具有多巴胺能神经元特性的 PC12 细胞凋亡作为帕金森病(Parkinson disease, PD)的体外模型。实验分正常对照组、MPP<sup>+</sup> 损伤组、人参皂苷 Rg1(10、20、50  $\mu\text{mol/L}$ )3 个浓度预处理组。用 MTT 法测定细胞活性,流式细胞术检测细胞凋亡,TUNEL 法检测细胞凋亡断裂的 DNA 片段,蛋白质印迹法分析细胞色素 C(cytochrome C, Cyt C)蛋白含量。**结果** 10、20、50  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rg1 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞具有一定的保护作用。与 MPP<sup>+</sup> 损伤组 [(52±4.7)%] 相比,10、20、50  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rg1 预处理细胞活力分别上升为(64±3.4)%、(72±5.2)%、(83±6.2)% ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。经流式细胞术检测,正常组、MPP<sup>+</sup> 损伤组、人参皂苷 Rg1 预处理组(10、20、50  $\mu\text{mol/L}$ ) 细胞凋亡率分别为 1.8%、44.5%、32.9%、21.1% 和 14.2%。人参皂苷 Rg1 预处理后,细胞断裂的 DNA 片段明显减少。另外,蛋白质印迹分析也显示人参皂苷 Rg1 可抑制 MPP<sup>+</sup> 诱导的 Cyt C 的过表达。**结论** 人参皂苷 Rg1 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的细胞凋亡具有浓度依赖性的保护作用,其保护机制可能与下调线粒体内 Cyt C 的过表达有关。

**[关键词]** 人参皂苷 Rg1; PC12 细胞; 细胞凋亡; 细胞色素 C 类; 神经保护药

**[中图分类号]** R 282.71 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)09-0965-04

### Neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 on 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in PC12 cells

YE Xiao-li<sup>1\*</sup>, LI Xiao-feng<sup>2</sup>

1. Department of Cadres, No. 323 Hospital of PLA, Xi'an 710046, Shaanxi, China

2. Laboratory of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine of Elderly Encephalopathy, Research Center of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the neuroprotective effect of ginsenoside Rg1 against PC12 cell apoptosis induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>). **Methods** MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis in PC12 cells, with the characteristics of dopaminergic neuron, were taken as the model of Parkinson disease *in vitro*. The cells were divided into control group, MPP<sup>+</sup> group and 3 ginsenoside Rg1 pretreatment groups (concentrations 10, 20, and 50  $\mu\text{mol/L}$ ). MTT assay was used for detecting the cell viability, FCM for apoptosis ratio, TUNEL enzyme labelling for DNA fragment of the cell nuclear, and Western blotting analysis for cytochrome C protein. **Results** Ginsenoside Rg1 (10, 20, and 50  $\mu\text{mol/L}$ ) showed protective effect against MPP<sup>+</sup>-induced PC12 cells injury. Compared with MPP<sup>+</sup>-treated cells [(52±4.7)%], pretreatment with 10, 20, and 50  $\mu\text{mol/L}$  ginsenoside Rg1 increased the cell viability to (64±3.4)%, (72±5.2)% and (83±6.2)%, respectively ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). FCM analysis indicated that apoptosis rates decreased by ginsenoside Rg1 pretreatment, with the apoptosis rates in the control, MPP<sup>+</sup> and 3 ginsenoside Rg1 groups (10, 20, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) being 1.8%, 44.5%, 32.9%, 21.1% and 14.2%, respectively. We also found that ginsenoside Rg1 pretreatment greatly decreased DNA fragment of PC12 cells. Western blotting analysis indicated that the cytochrome C was depressed by the ginsenoside Rg1 pretreatment. **Conclusion** Ginsenoside Rg1 can protect PC12 cells against MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis in a concentration-dependent manner, which may be closely related to down-regulation of cytochrome C over-expression in the mitochondria.

**[Key words]** ginsenoside Rg1; PC12 cells; apoptosis; cytochromes C; neuroprotective agents

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(9):965-968]

[收稿日期] 2011-04-28

[接受日期] 2011-06-02

[作者简介] 叶晓莉, 硕士, 主治医师。

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 029-84756217, E-mail: yexl2003@hotmail.com

帕金森病(Parkinson disease, PD)是一种发生在中老年期常见的神经系统变性疾病,其主要的病理特点是黑质、纹状体多巴胺(dopamine, DA)能神经元的选择性死亡、缺失,从而导致基底节神经调节功能的紊乱,病因与发病机制尚不明了。目前认为PD与遗传、内外环境毒素接触、氧化应激、线粒体功能障碍、细胞凋亡等有关<sup>[1]</sup>。1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP<sup>+</sup>)为神经毒素1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)的代谢产物,对DA能神经元具有选择性毒性作用,在体外产生类PD症状<sup>[2]</sup>。人参皂苷Rg1(ginsenoside Rg1)是传统中药人参主要的活性成分之一,研究发现人参皂苷Rg1具有提高学习能力、记忆力、免疫力及延缓衰老等功效,其神经保护作用受到人们的关注<sup>[3]</sup>。本研究通过MPP<sup>+</sup>诱导具有DA能神经元特性的PC12细胞的凋亡作为PD的体外模型,研究人参皂苷Rg1的神经保护作用及相关的机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人参皂苷Rg1购自中国药品生物制品检定所(标准对照品,HPLC法测定纯度>98%)。DMEM培养液、胎牛血清和马血清购自Gibco BRL公司。MPP<sup>+</sup>、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、Annexin V-FITC、PI、Rh123、Hoechst33258购自Sigma公司,TUNEL试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,兔抗细胞色素C(Cyt C)抗体购自上海碧云天生物技术有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养 PC12细胞系由第四军医大学神经生物实验室提供,培养于DMEM培养液(含5%胎牛血清、10%马血清、100 kU/L青霉素、100 g/L链霉素)中。培养细胞置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,2~3 d换液,待细胞长至70%~80%单层后,用0.25%胰蛋白酶消化传代培养。当传代细胞进入对数生长期时即可加药进行实验。

1.3 药物处理 实验分正常对照组、损伤组和预处理组。正常对照组不加药,损伤组只加MPP<sup>+</sup>,预处理组加入人参皂苷Rg1 24 h后再加入MPP<sup>+</sup>,各组均在加药24 h后进行检测。

1.4 MTT比色法检测细胞活性 细胞以 $2 \times 10^5$ /L密度接种于96孔板,每孔100  $\mu$ l,孵育24 h后进行药物处理,筛选出实验处理浓度。以所选的MPP<sup>+</sup>为终浓度来干预细胞,进行以下实验。设正常对照组、损伤组及10、20、50  $\mu$ mol/L人参皂苷Rg1预处理组,预处理组在加入人参皂苷Rg1 24 h

后,再加入MPP<sup>+</sup>,每组设8个复孔。干预结束后,每孔加入5 g/L MTT溶液20  $\mu$ l,继续孵育4 h,吸弃上清液,每孔加入150  $\mu$ l的DMSO,振荡10 min,在酶联免疫检测仪(美国Bio-Rad公司)上测定570 nm处光密度(D)值。细胞活力(%)=(实验组平均值/对照组平均值) $\times$ 100%。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 药物处理后,用0.25%胰蛋白酶消化细胞,制成单细胞悬液,调整细胞密度至 $1 \times 10^6$ /ml,取1 ml细胞, $150 \times g$  4℃离心10 min,弃上清液。加入1 ml冷的PBS,轻轻震荡使细胞悬浮, $150 \times g$  4℃离心5 min,弃上清液。将细胞重悬浮于200  $\mu$ l结合缓冲液,加入10  $\mu$ l Annexin V-FITC和5  $\mu$ l PI,轻轻混匀,避光室温反应15 min。加入300  $\mu$ l结合缓冲液,立即上机检测。

1.6 TUNEL法检测细胞凋亡DNA片段 PC12细胞以每孔 $5 \times 10^4$ /孔密度接种于24孔板内预置的多聚赖氨酸包被的玻片上,药物处理后,加入新鲜配制的4%多聚甲醛室温下固定1 h,PBS 2 $\times$ 2 min冲洗,室温下加入新鲜配制的3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 min后用蒸馏水洗3次,每次2 min,然后加入TDT和DIG-d-UTP置于湿盒中37℃1 h,然后再用PBS清洗。用DNase I预处理的细胞作为阳性对照细胞,阴性对照组用PBS代替TDT。用DAB染色后显色30 min,用蒸馏水洗3次后用苏木精轻度复染。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。荧光显微镜下每个样本随机选取5个视野,计算阳性细胞百分数。

1.7 Cyt C的检测 PC12细胞经人参皂苷Rg1或MPP<sup>+</sup>处理后,收集离心,加入裂解液,裂解5 min, $4^\circ\text{C}$   $10\,000 \times g$ 离心5 min,取上清,考马斯亮蓝法测各样本的蛋白含量,取蛋白样品40  $\mu$ g与等体积上样缓冲液混合,煮沸10 min,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭液室温下震荡2~3 h,加入兔抗鼠Cyt C抗体(1:1 000)4℃孵育过夜;TBST洗膜,加入生物素标记的羊抗兔IgG二抗,37℃孵育1 h,TBST洗膜,DAB显色,图像分析仪测定光密度,做定量分析。

1.8 统计学处理 采用SPSS 10.0软件进行统计学分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析,检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 人参皂苷Rg1对MPP<sup>+</sup>引起的细胞活力的影响 根据MTT预实验筛选MPP<sup>+</sup>作用时间及浓

度, 选定 500  $\mu\text{mol/L}$   $\text{MPP}^+$  作用 24 h 进行干预。为了确定人参皂苷 Rg1 是否能保护 PC12 细胞对抗  $\text{MPP}^+$  诱导的凋亡, PC12 细胞用不同浓度的人参皂苷 Rg1 (10、20、50  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理 24 h, 然后用 500  $\mu\text{mol/L}$   $\text{MPP}^+$  处理 24 h。结果显示, 与  $\text{MPP}^+$  损伤组  $[(52 \pm 4.7)\%]$  相比, 10、20、50  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rg1 预处理的细胞活力分别上升为  $(64 \pm 3.4)\%$  ( $P < 0.05$ )、 $(72 \pm 5.2)\%$  ( $P < 0.05$ )、 $(83 \pm 6.2)\%$

( $P < 0.01$ )。

2.2 人参皂苷 Rg1 对  $\text{MPP}^+$  诱导的 PC12 细胞凋亡的影响 用 Annexin V 和 PI 双标, 流式细胞术检测, 可区分出早期和晚期凋亡细胞、坏死细胞和正常细胞, 计算细胞凋亡百分率。正常组、 $\text{MPP}^+$  损伤组、人参皂苷 Rg1 (10、20、50  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理组细胞凋亡率分别为 1.8%、44.5%、32.9%、21.1% 和 14.2% (图 1)。

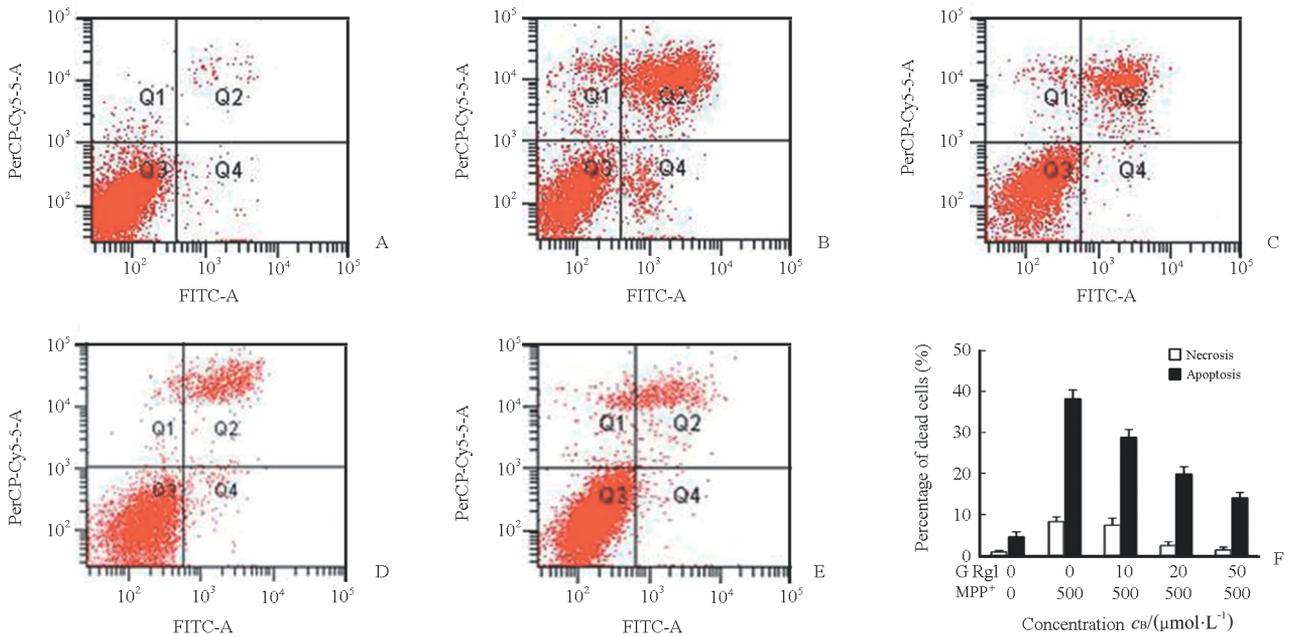


图 1 流式细胞仪检测细胞凋亡和坏死变化

Fig 1 Cell apoptosis and necrosis as detected by flow cytometry

PC12 cells were incubated in drug-free medium (A), 500  $\mu\text{mol/L}$   $\text{MPP}^+$  (B) for 24 h, 10  $\mu\text{mol/L}$  (C), 20  $\mu\text{mol/L}$  (D) or 50  $\mu\text{mol/L}$  (E) of ginsenoside Rg1 (G Rg1). Histograms showing the percentage of dead cells (F).  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 人参皂苷 Rg1 对  $\text{MPP}^+$  诱导的 PC12 细胞凋亡 DNA 片段的影响 在细胞凋亡的过程中有 DNA 片段的断裂, 可以用 TUNEL 法检测到 DNA 分子断裂的缺口。本实验中用 TUNEL 法检测人参皂苷 Rg1

对  $\text{MPP}^+$  诱导的 PC12 细胞凋亡 DNA 片段的作用。  $\text{MPP}^+$  损伤组 (图 2B) TUNEL 阳性细胞比正常对照组 (图 2A) 细胞增多, 而 50  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rg1 组 (图 2C) TUNEL 阳性细胞则降低 ( $P < 0.01$ )。

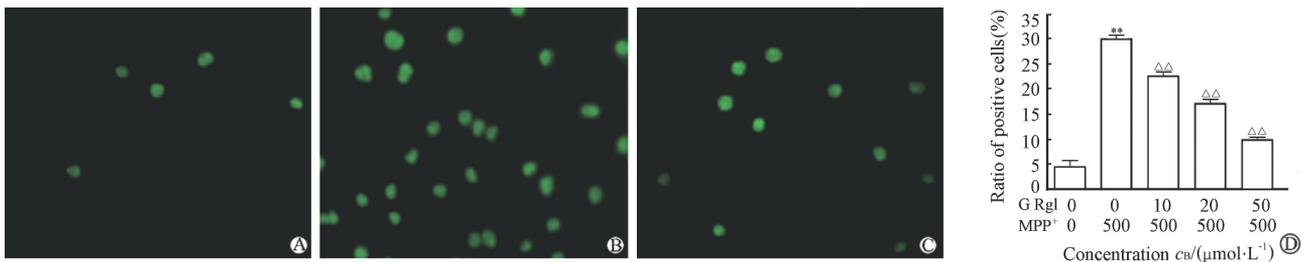


图 2 人参皂苷 Rg1 对  $\text{MPP}^+$  诱导的 PC12 细胞凋亡 DNA 片段的影响

Fig 2 Effect of ginsenoside Rg1 on  $\text{MPP}^+$ -induced DNA fragmentation

Fluorescence micrographs of PC12 cell DNA fragmentation from untreated cells (A), cells exposed to  $\text{MPP}^+$  (B) for 24 h, cells pretreated with 50  $\mu\text{mol/L}$  ginsenoside Rg1 (C). Histograms showing the ratios of TUNEL-positive cells to the total cells (D).  $** P < 0.01$  vs control cells;  $\triangle\triangle P < 0.01$  vs  $\text{MPP}^+$ -treated cells.  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . Original magnification:  $\times 100$  (A-C)

2.4 人参皂苷 Rg1 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 Cyt C 蛋白表达的影响 蛋白质印迹法半定量结果显示,与对照组相比较,PC12 细胞经 MPP<sup>+</sup> 处理后 Cyt C 蛋白表达明显增加,而 PC12 细胞经人参皂苷 Rg1 处理后,Cyt C 蛋白表达降低(图 3)。

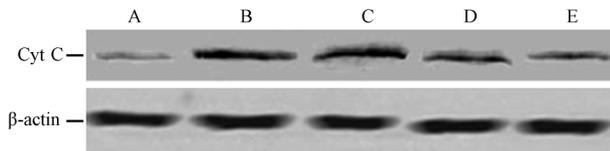


图 3 人参皂苷 Rg1 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 Cyt C 蛋白表达的影响

Fig 3 Effect of ginsenoside Rg1 on expression of cytochrome C (Cyt C)

A: Control group; B: MPP<sup>+</sup> group; C, D, E: 10, 20, and 50 μmol/L ginsenoside Rg1 groups, respectively

### 3 讨论

PD 是仅次于阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 的第 2 大神经退行性病变,它以 DA 能神经元变性、缺失导致的运动功能紊乱为主要特征,与神经元的过度凋亡有关<sup>[4-5]</sup>。目前,PD 的治疗仍以对症治疗为主,治疗策略主要为延缓 PD 的神经退化过程,还没有药物能对 PD 的预防起到神经保护作用<sup>[6-7]</sup>。

PC12 细胞是来源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤的细胞系,与黑质 DA 能神经元有许多相同的特征,被广泛用作研究黑质 DA 能神经元的细胞模型<sup>[6]</sup>。本实验选择神经毒素 MPTP 的代谢产物 MPP<sup>+</sup> 作为干预药物建立体外模型,研究发现, MPP<sup>+</sup> 对 PC12 细胞具有明显的毒性作用,可明显降低细胞活力,而且流式细胞术检测 MPP<sup>+</sup> 损伤组细胞凋亡率明显增加, TUNEL 染色发现 MPP<sup>+</sup> 损伤组 DNA 断裂明显增加。一定浓度的人参皂苷 Rg1 (10、20、50 μmol/L) 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞凋亡具有明显的保护作用,可增强细胞活力,改善细胞形态,降低凋亡率,减少细胞核 DNA 片段断裂。

线粒体途径是细胞发生凋亡的重要途径之一, MPP<sup>+</sup> 作用于 PC12 细胞后,引起线粒体膜通透性转运孔开放,外膜破坏,释放 Cyt C 等凋亡相关分子, Cyt C 的释放可激活 caspase 系统如 caspase-3,启动下游效应分子,诱导细胞凋亡。蛋白质印迹分析发现,PC12 细胞经 MPP<sup>+</sup> 干预后,胞质内 Cyt C 蛋白表达明显增强,而经人参皂苷 Rg1 预处理后可明显抑制 Cyt C 的表达。这说明人参皂苷 Rg1 的神经保护作用可能与维持线粒体功能及调节凋亡蛋白的表达有关。

本研究结果表明,人参皂苷 Rg1 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞的凋亡在一定浓度内呈剂量依赖性的保护作用,其相关保护机制可能与下调凋亡效应蛋白 Cyt C 在胞质中的过表达有关。

### [参考文献]

- [1] Hirsch E, Graybiel A, Agid Y. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease[J]. Nature, 1988, 334: 345-348.
- [2] Chiba K, Trevor A, Castagnoli N Jr. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1984, 120: 574-578.
- [3] 陈宏, 陈建宗, 厚荣荣, 康小刚, 李海龙, 李源莉, 等. 人参皂苷 Rg1 对百草枯所致 PC12 细胞凋亡保护作用及机制 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16: 692-697.
- [4] Ziv I, Melamed E, Nardi N, Lauria D, Achiron A, Offen D, et al. Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons—a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease[J]. Neurosci Lett, 1994, 170: 136-140.
- [5] Li X, Ye X, Li X, Sun X, Liang Q, Tao L, et al. Salidroside protects against MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis in PC12 cells by inhibiting the NO pathway[J]. Brain Res, 2011, 1382: 9-18.
- [6] Meissner W, Hill M P, Tison F, Gross C E, Bezard E. Neuroprotective strategies for Parkinson's disease: conceptual limits of animal models and clinical trials[J]. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25: 249-253.
- [7] 李晓峰, 陈建宗. 一氧化氮信号通路 with 帕金森病的发病机制 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30: 1836-1838.

[本文编辑] 尹茶