

本文引用:吴苗苗,王惠芹,冯聚玲,苑玉和,石建功,陈乃宏. 天麻联苳类化合物 32 对鱼藤酮损伤 PC12 细胞的保护作用[J]. 湖南中医药大学学报,2022,42(7): 1076-1081.

天麻联苳类化合物 32 对鱼藤酮损伤 PC12 细胞的保护作用

吴苗苗^{1,2},王惠芹³,冯聚玲³,苑玉和¹,石建功¹,陈乃宏^{1*}

(1.中国医学科学院药物研究所 & 天然活性物质与功能国家重点实验室,北京 100050;2.河北北方学院,河北 张家口 075000;
3.湖南中医药大学湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心,湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 观察天麻提取的联苳类化合物 32 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤的影响。**方法** 4 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮损伤 PC12 细胞 48 h 建立帕金森病体外模型。实验分为对照组、模型组、天麻联苳类化合物 32 不同浓度(0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$)组,共 5 组。噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]法检测 PC12 细胞存活率,Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测 PC12 细胞凋亡,JC-1 染色后,倒置显微镜下观察细胞线粒体膜电位水平,DCFH-DA 荧光探针标记检测细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平。**结果** 与对照组相比,模型组能明显抑制细胞存活率($P<0.001$),诱导细胞凋亡,同时降低线粒体膜电位,增加 ROS 含量($P<0.001$)。与模型组相比,天麻联苳类化合物 32 不同浓度(0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$)组的 PC12 细胞存活率显著增加($P<0.01$, $P<0.001$),凋亡细胞比例减少,线粒体膜电位水平增高,细胞内 ROS 含量减少($P<0.001$)。**结论** 天麻联苳类化合物 32 对鱼藤酮损伤的 PC12 细胞具有保护作用,与其维持线粒体膜电位水平、减少氧化应激、抑制细胞凋亡有关。

[关键词] 天麻;帕金森病;鱼藤酮;细胞凋亡;氧化应激

[中图分类号]R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.07.004

Protective effect of a bibenzyl compound 32 from *Gastrodia elata* against rotenone damaged PC12 cells

WU Miaomiao^{1,2}, WANG Huiqin³, FENG Juling³, YUAN Yuhe¹, SHI Jianguo¹, CHEN Naihong^{1*}

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicine, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China; 2. Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine & Hunan Engineering Technology Center of Standardization and Function of Chinese Herbal Decoction Pieces, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of a bibenzyl compound 32 from *Gastrodia elata* against rotenone damaged PC12 cells. **Methods** A cell model of Parkinson disease was established in PC12 cells by exposure to rotenone (4 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h. A total of five groups: control group, model group and the different concentrations (0.1, 1.0, 10.0 $\mu\text{mol/L}$) of bibenzyl compound 32 from *Gastrodia elata* groups were set up. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to measure the survival rate of the PC12 cells. Flow cytometry with Annexin V-FITC/PI staining was used to assess the apoptosis of PC12 cells. After JC-1 staining, mitochondrial membrane potential was observed under an inverted microscope. The intracellular reactive oxygen species (ROS) level was examined using DCFH-DA fluorescent probe. **Results** Compared with the control group, the

[收稿日期]2021-11-21

[基金项目]国家自然科学基金项目(U1402221,81773924,81803500);湖南中医药大学中药一流学科(201803)。

[第一作者]吴苗苗,女,硕士,讲师,研究方向:神经药理学。

[通信作者]* 陈乃宏,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:chennh@imm.ac.cn。

model group could significantly inhibit cell survival rate ($P<0.001$), induce cell apoptosis, decrease mitochondrial membrane potential, and increase ROS content ($P<0.001$). Compared with model group, the survival rate of PC12 cells in the different concentrations (0.1, 1.0, 10.0 $\mu\text{mol/L}$) of bibenzyl compound 32 from *Gastrodia elata* groups was significantly increased ($P<0.01$, $P<0.001$), the proportion of apoptotic cells decreased; mitochondrial membrane potential increased, intracellular ROS content decreased ($P<0.001$). **Conclusion** The bibenzyl compound 32 from *Gastrodia elata* has protective effect on PC12 cells damaged by rotenone, which may be related to the maintenance of the mitochondrial membrane potential, reducing oxidative stress and inhibiting apoptosis.

[**Keywords**] *Gastrodia elata*; Parkinson diseases; rotenone; apoptosis; oxidative stress

帕金森病(Parkinson diseases, PD)是一种慢性进行性神经退行性疾病,以静止震颤、肌肉强直、运动迟缓和共济失调等为主要临床表现,这些运动症状严重影响了患者的生活质量^[1-2]。流行病学调查研究发现,PD患病率在过去的20年内增加了一倍多,已经成为增长速度最快的神经系统退行性疾病^[3]。目前,临床治疗PD的大多数药物能很好地控制3~6年的症状,但不能阻止疾病的进程,过了这一时期,疾病发展加速,药物治疗往往达不到理想效果^[2-4]。因此,研究开发治疗PD的新药成为迫切需要解决的问题。

天麻为兰科多年生寄生草本植物天麻 *Gastrodia elata* Blume 的块茎,首载于《神农本草经》,被列为上品,具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络的功效。现代研究发现,天麻钩藤饮对PD患者具有较理想的疗效^[5-6]。天麻主要活性成分天麻素对体内、体外PD模型具有改善作用^[7-9]。天麻联苕类化合物32是从天麻中提取分离得到的新型联苕类化合物,结构式如图1。对天麻联苕类化合物32的生物活性研究尚未见报道,但有研究报道其同类型化合物20C显示出很好的神经保护作用,具有抗凋亡、抗炎、调节免疫、抗内质网应激等生物活性^[10-13]。本文研究天麻新型联苕类化合物32对鱼藤酮诱导PC12细胞损伤模型的影响。

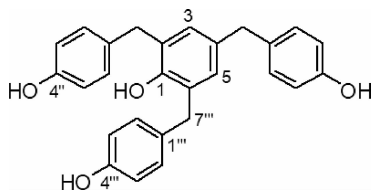


图1 天麻新型联苕类化合物32的结构式

1 材料与仪器

1.1 细胞株

PC12细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心,由中国医学科学院药物研究所药理室传代并保存。

1.2 试剂和药品

DMEM(美国Gibco公司,批号:12800-017-90482);马血清(美国Hyclone公司,批号:16050-122-979412);鱼藤酮(批号:R8875)、噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,MTT](批号:11465007001)均购自美国Sigma公司;Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(批号:556547)、JC-1线粒体膜电位检测试剂盒(批号:C2006)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(批号:S0033S)均购自碧云天生物技术研究。天麻联苕类化合物32由中国医学科学院药物研究所植物化学合成室提供。

1.3 实验仪器

MultiskanGo型酶标仪(美国Thermo公司);IX70-142型倒置显微镜(日本Olympus公司);2K15型通用台式冷冻离心机(德国Sigma公司);FACS Calibur型流式细胞分析仪(美国Becton Dickinson公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及实验分组

PC12细胞常规培养于含5%胎牛血清、5%马血清的高糖DMEM培养基中,置于37℃、5%CO₂的孵育箱中孵育,每隔48h更换培养基,当单层培养细胞汇合80%以后,进行传代培养或实验。实验时将PC12细胞传入96孔或6孔培养板中,培养24h,倒置显微镜下观察到细胞贴壁且生长状态良好时,更换培养基。将细胞分为对照组、模型组、天麻联苕类化合物32不同浓度(0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$)组,共5组。对照组更换正常培养基,模型组通过加入含有4 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮的培养基损伤PC12细胞48h建立PD体外模型,天麻联苕类化合物32不同浓度(0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$)组更换含有4 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮和天麻联苕类化合物32不同浓度(0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$)的

培养基, 孵育箱中继续培养 48 h 后, 进行相关检测实验。

2.2 细胞于 MTT 法检测细胞存活率

细胞于 96 孔板培养 48 h 后, 于每孔加入 10 μL 的 MTT, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的孵育箱中继续培养 4 h, 弃去培养基, 每孔加入 100 μL DMSO, 震荡摇匀至晶体颗粒溶解, 静置 10 min, 570 nm 在酶标仪上测定吸光度 (A) 值。细胞存活率 = 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值 $\times 100\%$ 。

2.3 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测细胞凋亡

细胞于 6 孔板培养 48 h 后, 使用 0.25% 胰酶消化, 悬浮于无血清 DMEM 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、800 $\times g$ 离心 5 min, 预冷 PBS 清洗 1 次, 细胞重悬于 200 μL Binding Buffer 中, 加入 10 μL Annexin V-FITC 室温避光反应 15 min, 加入 5 μL PI 和 300 μL Binding Buffer, 室温反应 5 min, 流式细胞仪进行检测。

2.4 JC-1 染色检测细胞线粒体膜电位

细胞于 6 孔板培养 48 h 后, 用 37 $^{\circ}\text{C}$ 无血清 DMEM 洗涤 1 次, 每孔加入 1.5 mL 的 JC-1 (5 mg/L) 染料, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育箱中反应 20 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 无血清 DMEM 漂洗 2 次, 置于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.5 荧光探针法检测细胞内 ROS 含量

细胞于 6 孔板培养 48 h 后, 用 PBS 缓冲液漂洗一次, 每孔加入 15 mL 的 DCF-DA (终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$), 反应 30 min, 弃去上清液, 用 PBS 漂洗两次后在荧光显微镜下观察并拍照, 检测的激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm。

2.6 统计学分析

实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量资料以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示, 采用单因素方差分析进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 天麻联苳类化合物 32 对鱼藤酮损伤 PC12 细胞存活率的影响

与对照组相比, 模型组细胞存活率下降为 (59.83% \pm 5.27%), 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 在诱导同时给予天麻联苳类化合物 32 不同浓度 (1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$) 可明显增加鱼藤酮损

伤的 PC12 细胞的存活率, 分别达到 (67.22% \pm 4.08%) 和 (88.71% \pm 3.52%), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。详见图 2。

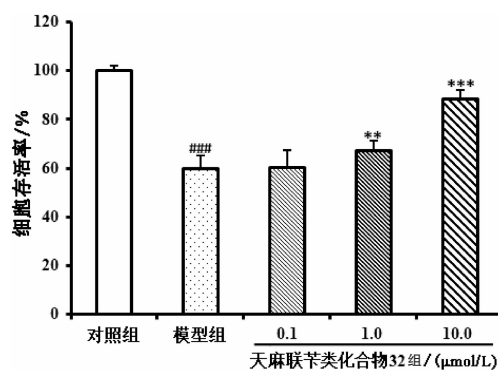


图 2 各组细胞存活率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

注: 与对照组相比, $###P < 0.001$; 与模型组相比, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

3.2 天麻联苳类化合物 32 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞凋亡的影响

在检测过程中对照组 PC12 细胞有少量的损伤凋亡, 模型组早期凋亡细胞数增加为 17.67%。在建模同时分别加入天麻联苳类化合物 32 不同浓度 (0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$) 后, 早期凋亡细胞下降为 11.02%、8.82%、9.63%, 从而使活细胞比例增加。上述结果提示天麻联苳类化合物 32 可在一定程度上抑制鱼藤酮诱导的 PC12 细胞早期凋亡, 保护细胞免受损伤。详见图 3。

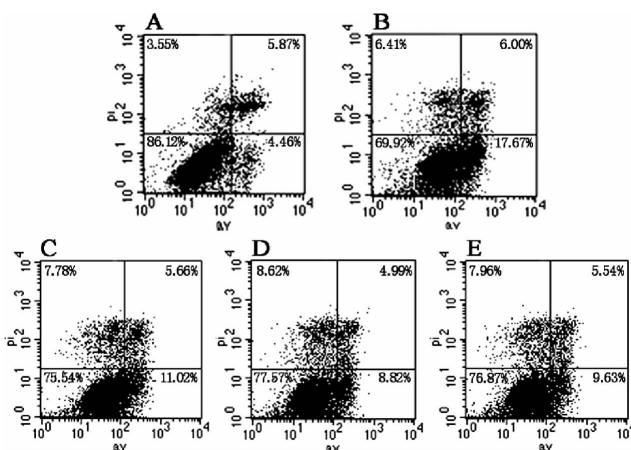


图 3 各组细胞凋亡情况

注: A. 对照组; B. 模型组; C、D、E 为天麻联苳类化合物 32 不同浓度 (0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$) 组。

3.3 天麻联苳类化合物 32 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞线粒体膜电位的影响

对照组 PC12 细胞呈均匀的强红色荧光 (99.29% \pm 0.88%), 线粒体膜电位水平较高, 呈正常的状态; 与

对照组相比,模型组红色荧光强度减弱至(8.88%±2.07%),绿色荧光显著增强至(91.12%±2.08%),细胞线粒体膜电位降低;与模型组相比,天麻联苳类化合物32不同浓度(0.1、1.0、10.0 μmol/L)组红色荧光增强,绿色荧光显著减弱,分别为(32.25%±6.80%)、(30.76%±7.31%)、(23.94%±2.12%),说明线粒体膜电位水平升高,提示天麻联苳类化合物32能抑制鱼藤酮损伤PC12细胞的线粒体膜电位降低,维持线粒体稳定,但不同浓度之间没有显著性差异。详见图4。

3.4 天麻联苳类化合物32对鱼藤酮损伤PC12细胞ROS含量的影响

对照组绿色荧光强度较弱,ROS含量较少,而与对照组相比,模型组绿色荧光强度明显增强,细胞内ROS含量显著增多($P<0.001$);与模型组相比,天麻联苳类化合物32不同浓度(0.1、1.0、10.0 μmol/L)组绿色荧光强度显著减弱,细胞内ROS含量均显著减少($P<0.001$)。结果表明天麻联苳类化合物32能显著降低鱼藤酮引起的ROS含量,具有一定的抗氧化作用。详见图5。

4 讨论

PD的主要病理变化为黑质致密区多巴胺能神经元进行性死亡或缺失,虽然其发病机制尚不十分清楚,但有研究表明线粒功能障碍、氧化应激、细胞凋亡等与PD的发生发展密切相关^[2,14]。鱼藤酮是实验室常用的一种神经毒制剂,能够通过引起线粒体功能障碍、氧化应激及诱导细胞凋亡等方式导致神经元损伤,广泛用于PD细胞模型的制备^[15-16]。PC12细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞克隆的细胞株,能表达酪氨酸羟化酶并合成多巴胺,是研究多巴胺能神经元常用的细胞系^[17-18]。因此,本实验以鱼藤酮损伤PC12细胞建立PD体外模型,研究天麻联苳类化合物32的神经保护作用。

在细胞凋亡过程中,许多事件的发生都与线粒体密切相关,包括线粒体膜的通透性改变和跨膜电位降低,造成电子的漏出和自由基的产生,特别是增加细胞内ROS生成,增加氧化应激,最终导致细胞凋亡^[19-20]。线粒体膜电位降低是发生在细胞凋亡早期的事件,因此改善线粒体功能可抑制细胞凋亡的

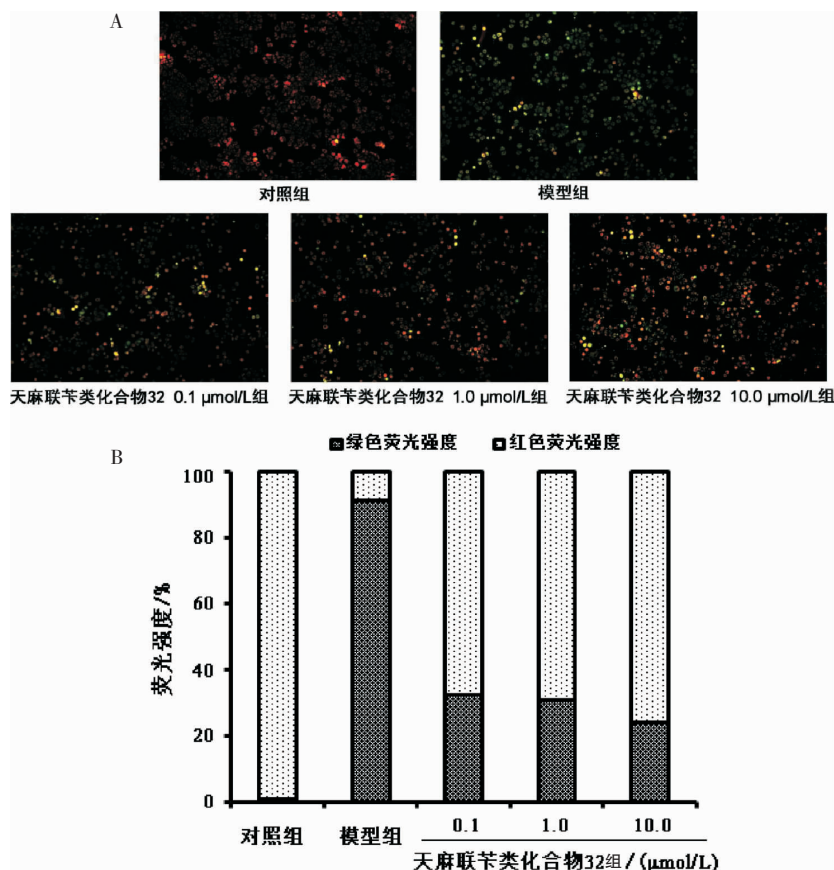


图4 各组细胞线粒体膜电位($\bar{x}\pm s, n=6$)

注:A.各组荧光图片;B.各组荧光强度统计。

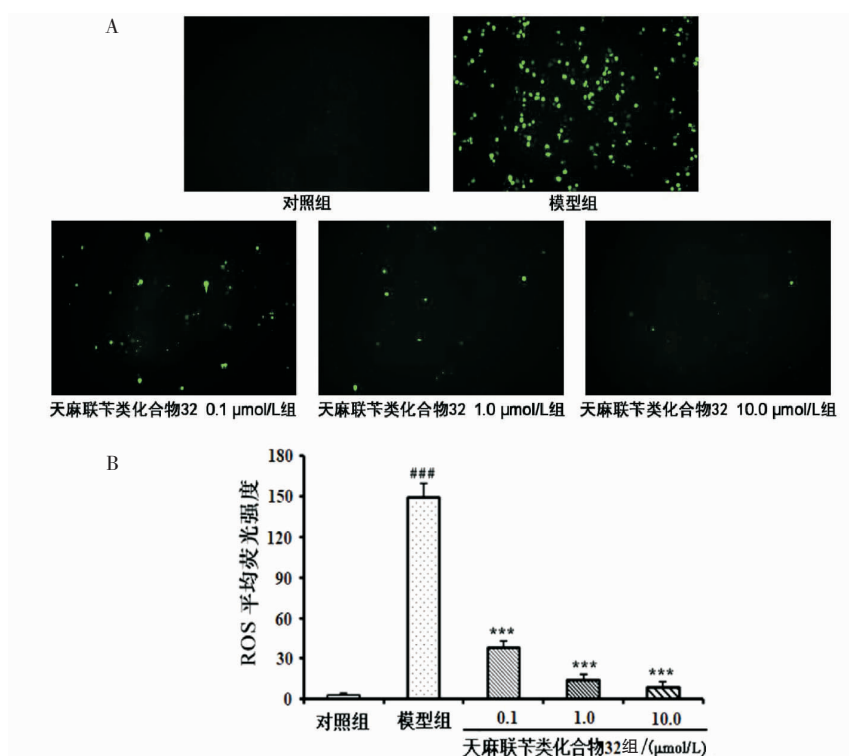


图 5 各组 ROS 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:A.各组荧光图片;B.各组荧光强度统计;与对照组相比,*** $P<0.001$;与模型组相比,### $P<0.001$ 。

发生^[21]。本研究首先通过 MTT 法检测细胞存活率、流式细胞术检测细胞凋亡,经鱼藤酮损伤后,PC12 细胞的存活率显著降低,出现大量细胞凋亡,而天麻联苜类化合物 32 能够提高损伤 PC12 细胞的存活率,抑制鱼藤酮诱导的细胞凋亡。但同时也发现不同浓度天麻联苜类化合物 32 对细胞凋亡影响的差异不明显,这可能与实验操作过程对细胞的损伤有关,或许细胞凋亡并不是天麻联苜类化合物 32 改善鱼藤酮损伤 PC12 细胞存活率的关键影响因素,这还需要进一步的研究。

JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位的特异性荧光染料,线粒体膜电位较高时,聚集在线粒体基质中,产生红色荧光;线粒体膜电位较低时,以单体形式存在于线粒体胞质中,产生绿色荧光,据此可判断线粒体膜电位的变化^[22]。本研究发现鱼藤酮损伤细胞后绿色荧光显著增强,红色荧光减弱,说明细胞线粒体膜电位水平显著下降;天麻联苜类化合物 32 能显著降低绿色荧光、增强红色荧光,提高线粒体膜电位水平,但各浓度组之间没有显著差异。

鱼藤酮抑制线粒体复合物 I,导致电子的泄露和 ROS 的产生,大量自由基可以损伤线粒体功能自身,线粒体功能障碍又会生成更多的自由基,二者互

为因果,最终导致细胞死亡^[23-25]。本研究利用荧光探针 DCFH-DA 检测细胞内 ROS 含量,绿色荧光增强说明细胞内 ROS 含量增加,鱼藤酮损伤后细胞绿色荧光显著增强,而天麻联苜类化合物 32 可以显著降低 ROS 的水平,具有较强的抗氧化作用。

综上所述,天麻联苜类化合物 32 对鱼藤酮损伤的 PC12 细胞具有保护作用,能降低线粒体膜电位水平,减少氧化应激,稳定线粒体功能,抑制细胞凋亡,是潜在的神经保护剂。天麻联苜类化合物 32 在本研究中显示出较强的抗氧化作用,或许与其神经保护作用相关,但还需进一步研究。

参考文献

- [1] 林杰,陈涛,苏佳丽,等.线粒体功能障碍在帕金森病发病机制研究中的新进展[J].中国医师杂志,2021,23(8):1269-1274.
- [2] BOURQUE M, SOULET D, DI PAOLO T. Androgens and Parkinson's disease: A review of human studies and animal models[J]. Androgens: Clinical Research and Therapeutics, 2021, 2(1): 294-303.
- [3] GBD PARKINSON'S DISEASE COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. The Lancet Neurology, 2018, 17(11): 939-953.

- [4] POEWE W, ANTONINI A, ZIJLMANS J C, et al. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: An old drug still going strong[J]. *Clinical Interventions in Aging*, 2010, 5(3): 229-238.
- [5] 王 峥,陈晴清,刘润妮.天麻钩藤饮对早期帕金森病运动症状与血浆氨基酸类神经递质水平的影响[J].*国际医药卫生导报*,2021, 27(12):1808-1810.
- [6] 王 峥,陈晴清,刘润妮.天麻钩藤饮对帕金森病患者血浆 Glu、GABA 水平及睡眠障碍的影响分析[J].*中国现代药物应用*,2021, 15(14):213-215.
- [7] 周红平,张三妮,曹 栋,等.天麻素对帕金森病小鼠多巴胺能神经元的保护作用[J].*现代药物与临床*,2020,35(6):1069-1075.
- [8] 席 暄,任小琼.天麻素注射液对帕金森病大鼠的保护作用[J].*中国老年学杂志*,2016,36(20):4996-4997.
- [9] 李晓明,荣 华,潘思文,等.天麻素联合异钩藤碱通过线粒体途径抑制 MPP+诱导 PC12 细胞凋亡[J].*天然产物研究与开发*,2021, 33(7):1096-1101.
- [10] SHAO Q H, ZHANG X L, CHEN Y, et al. Anti-neuroinflammatory effects of 20C from *Gastrodia elata* via regulating autophagy in LPS-activated BV-2 cells through MAPKs and TLR4/Akt/mTOR signaling pathways[J]. *Molecular Immunology*, 2018, 99: 115-123.
- [11] WANG S, HAN Q W, ZHOU T T, et al. A bibenzyl compound 20C protects rats against 6-OHDA-induced damage by regulating adaptive immunity associated molecules[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 91: 107269.
- [12] MOU Z, YUAN Y H, LOU Y X, et al. Bibenzyl compound 20c protects against endoplasmic Reticulum stress in tunicamycin-treated PC12 cells in vitro[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2016, 37(12): 1525-1533.
- [13] HUANG J Y, YUAN Y H, YAN J Q, et al. 20C, a bibenzyl compound isolated from *Gastrodia elata*, protects PC12 cells against rotenone-induced apoptosis via activation of the Nrf2/ARE/HO-1 signaling pathway[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2016, 37(6): 731-740.
- [14] KUNG H C, LIN K J, KUNG C T, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and neuroprotection of polyphenols with respect to resveratrol in Parkinson's disease[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(8): 918.
- [15] RADAD K, AL-SHRAIM M, AL-EMAM A, et al. Rotenone: from modelling to implication in Parkinson's disease[J]. *Folia Neuropathologica*, 2019, 57(4): 317-326.
- [16] CHIA S J, TAN E K, CHAO Y X. Historical perspective: Models of parkinson's disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(7): 2464.
- [17] FALKENBURGER B H, SARIDAKI T, DINTER E. Cellular models for Parkinson's disease [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2016, 139: 121-130.
- [18] 易鹏吉,张哲宇,彭伟军.槲皮素对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用及机制研究[J].*湖南中医药大学学报*,2021,41(6):821-826.
- [19] GRÜNEWALD A, KUMAR K R, SUE C M. New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease [J]. *Progress in Neurobiology*, 2019, 177: 73-93.
- [20] BOSE A, BEAL M F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2016, 139: 216-231.
- [21] YAN J Q, MA H X, LAI X Y, et al. Artemisinin attenuated oxidative stress and apoptosis by inhibiting autophagy in MPP+-treated SH-SY5Y cells[J]. *Journal of Biological Research*, 2021, 28(1): 6.
- [22] SIVANDZADE F, BHALERAO A, CUCULLO L. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe[J]. *Bio-protocol*, 2019, 9(1): e3128.
- [23] DORSZEWSKA J, KOWALSKA M, PRENDECKI M, et al. Oxidative stress factors in Parkinson's disease[J]. *Neural Regeneration Research*, 2021, 16(7): 1383-1391.
- [24] 曹玉成,王 哲,宋炜熙.补肾填髓方对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆能力及线粒体氧化应激的影响[J].*湖南中医药大学学报*, 2019,39(4):459-464.
- [25] PUSPITA L, CHUNG S Y, SHIM J W. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease[J]. *Molecular Brain*, 2017, 10(1): 53.

(本文编辑 周 旦)