

蜗牛多肽混合物对过氧化氢诱导的 SH-SY5Y 细胞 PCNA 表达的影响

席守民^{1*}, 安君岭¹, 赵焕东², 温新丽¹, 高永忠²

¹河南科技大学医学院药理学与医学分子生物学重点实验室, 洛阳 471003; ²永城市中心医院, 永城 476600

摘要: 采用 H₂O₂ 诱导人神经母细胞瘤细胞株 (SH-SY5Y) 细胞损伤, MTT 法测定细胞存活率, 不同浓度蜗牛多肽混合物 (SPM) 处理后, Hoechst 染色检测细胞凋亡, 细胞免疫化学技术和 Western blot 技术检测细胞 PCNA 的表达。结果发现 1.54 mmol/L H₂O₂ 可诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡, PCNA 的表达明显降低。经用 39 mg/L (SPM-L 组) 和 156 mg/L (SPM-H 组) 浓度的 SPM 处理后, SH-SY5Y 细胞凋亡明显减少 (H₂O₂ VS. SPM-L; 58.39 ± 8.67% VS. 44.06 ± 4.35%, *P* < 0.05; H₂O₂ VS. SPM-H; 58.39 ± 8.67% VS. 32.45 ± 9.44%, *P* < 0.01), 同时 PCNA 的表达呈浓度依赖性升高。提示 SPM 可抑制 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡, 其作用机制可能与其增加细胞 PCNA 的表达有关。

关键词: 蜗牛多肽; 过氧化氢; SH-SY5Y 细胞; 凋亡; PCNA

中图分类号: R931.6/R932

文献标识码: A

Effect of Snail Polypeptide Mixture on Expression of PCNA in Injured SH-SY5Y Cells Induced by Hydrogen Peroxide

XI Shou-min^{1*}, AN Jun-ling¹, ZHAO Huan-dong², WEN Xin-li¹, GAO Yong-zhong²

¹The Key Laboratory of Pharmacology and Medical Molecular Biology, Medical College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; ²Yongcheng central Hospital, Yongcheng 476600, China

Abstract: In this study, hydrogen peroxide (H₂O₂) was used to induce SH-SY5Y cells damage. The viability of SH-SY5Y cells was then measured with MTT assay. Cell apoptosis was detected with Hoechst staining. The expression of PCNA was determined with immunocytochemistry and western blotting. The results showed that 1.54 mmol/L H₂O₂ can significantly induce apoptosis, and decrease expression of PCNA in SH-SY5Y cells. After treatment with 39 mg/L (SPM-L) and 156 mg/L (SPM-H) of snail polypeptide mixture (SPM), H₂O₂-induced apoptosis cells were attenuated (H₂O₂ VS. SPM-L; 58.39 ± 8.67% VS. 44.06 ± 4.35%, *P* < 0.05; H₂O₂ VS. SPM-H; 58.39 ± 8.67% VS. 32.45 ± 9.44%, *P* < 0.01), while there was a concentration-dependent increase of PCNA expression in the SPM groups. These results suggested that the SPM can protect against H₂O₂-induced SH-SY5Y cells apoptosis, which may be correlated with up-regulated PCNA expression.

Key words: snail polypeptide; hydrogen peroxide; SH-SY5Y cell; apoptosis; PCNA

氧自由基对神经神经细胞的氧化修饰作用是导致神经元损伤的主要途径之一, 在帕金森病和阿尔茨海默病的发生发展过程中具有重要的地位^[1]。H₂O₂ 是一种比较常用的细胞氧化诱导剂, 广泛用于诱导细胞氧化应激模型。有研究认为阿尔茨海默病与神经细胞凋亡有关, 而细胞凋亡与氧自由基密切相关^[2]。增殖细胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 在细胞增殖过程中起重要作用, 是评

价细胞增殖状态的重要指标^[3]。蜗牛提取物中的某些成分具有增强细胞活力、促进组织细胞修复和再生的作用^[4]。为了探讨蜗牛多肽混合物 (snail polypeptide mixture, SPM) 对神经元细胞的保护作用, 本文用 H₂O₂ 造成人神经母细胞瘤细胞株 (SH-SY5Y) 细胞氧化损伤模型, 观察 SPM 对 SH-SY5Y 细胞的抗凋亡效果, 为 SPM 神经保护作用的深入研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

人神经母细胞瘤细胞株 (SH-SY5Y) 购自中国

科学院上海细胞生物学研究所;白玉蜗牛,洛阳绿尔农业科技有限公司惠赠;小牛血清、DMEM 购自美国 Gibco BRL 公司;Hoechst 染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗人单抗 PCNA;武汉博士德生物工程有限公司生产;SP 免疫组化试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司;DAB 显色试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.2 蜗牛多肽混合物的制备

参考文献^[5]中的方法,取新鲜白玉蜗牛 200 g,剁成小块;将蜗牛组织加到 500 mL 预冷的 pH 3.5 的冰醋酸溶液,胶体磨反复匀浆;匀浆液 4 °C,5500 rpm 离心 10 min,取上清;55 °C 真空旋转蒸发浓缩至体积为 100 mL;浓缩液冻干,交联葡聚糖凝胶 G-25 分离层析,得到 4 个峰,分别收集,MTT 法体外活性实验检测第 2 峰值活性最强。收集第 2 峰样品,浓缩冻干,BCA 法测定样品中蛋白质含量为 84.81%,氧化酶法测定样品中葡萄糖含量仅为 0.24%,即为蜗牛多肽混合物,-20 °C 保存备用。

1.3 细胞培养及药物处理

SH-SY5Y 用含 2 mmol/L 谷氨酰胺和 10% 小牛血清的 DMEM 培养基,在 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养。隔天传代细胞,当传代细胞在倒置显微镜下观察均匀贴壁生长时,可用于实验研究。

1.4 MTT 法检测 H₂O₂ 对 SH-SY5Y 细胞的损伤作用

将生长状态良好的 SH-SY5Y 细胞以 1 × 10⁴ 细胞/孔接种于 96 孔板,待细胞贴壁。细胞贴壁后弃去培养液,每孔加含不同浓度(0.25 ~ 6.0) mmol/L H₂O₂ 的培养液 200 μL,阴性对照组加不含 H₂O₂ 的培养液 200 μL,继续培养 24 h 后每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL,继续培养 4 h 后弃去培养液,每孔加入 200 μL 二甲基亚砷(DMSO),震荡 5 min 后酶标仪 490 nm 处检测每孔的吸光度(A)值。细胞存活率 = 给药组 A 值/阴性对照组 A 值 × 100%。Origin 软件计算半数抑制浓度 IC₅₀。

1.5 MTT 法测定 SPM 对 H₂O₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的抑制作用

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,以 1 × 10⁴ 细胞/孔接种于 96 孔板,待细胞贴壁。细胞贴壁后模型组以 1.54 mmol/L H₂O₂ 作用于 SH-SY5Y 细胞。治疗组分别以不同浓度(39 ~ 1250) mg/L SPM 和 1.54 mmol/L H₂O₂ 作用于 SH-SY5Y 细胞。对照组只加 SH-SY5Y 细胞,不加药物。细胞给药 24 h 后每孔加 20 μL 浓度为 5 g/L 的 MTT 溶液。继续培养 4 h 后弃去培养液,每孔加入 200 μL DMSO,震荡 5

min 后酶标仪 490 nm 处检测 A 值。

1.6 Hoechst 染色检测细胞凋亡

Hoechst 33342 可与凋亡细胞凝集的染色质结合,使其发出强蓝色荧光,从而与正常细胞加以区别^[6]。将 SH-SY5Y 细胞接种于 24 孔板,培养 24 h 后,分 4 组,H₂O₂ 组:加 1.54 mmol/L H₂O₂;对照组:正常细胞培养,不加药物;SPM-L 组:加蜗牛多肽混合物 39 mg/L 和 1.54 mmol/L H₂O₂;SPM-H 组:加蜗牛多肽混合物 156 mg/L 和 1.54 mmol/L H₂O₂。再培养 24 h 后,用 PBS 洗 3 次,加入新鲜配制的 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min,PBS 洗后用浓度为 10 mg/L 的 Hoechst 33342 染液作用于细胞,避光孵育 15 min,PBS 小心冲洗后荧光显微镜下观察摄片。每孔随机数 200 个细胞,计算凋亡细胞百分比。

1.7 细胞免疫化学技术检测细胞 PCNA 的表达

取对数生长期 SH-SY5Y 细胞消化制备细胞悬液,调整细胞浓度为 1 × 10⁴ 个/mL,接种于内置无菌玻片的 6 孔板内。培养 24 h 后,分 4 组(同 1.6 分组),以上各组平行 3 孔,继续培养 48 h 后,爬片用 PBS 漂洗 2 遍,经 4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤后自然风干。检测方法按免疫组化试剂盒说明书进行。

1.8 Western blot 检测细胞 PCNA 的表达

取对数生长期 SH-SY5Y 细胞,接种于内置无菌玻片的 6 孔板内。培养 24 h 后,分 4 组,加入不同药物处理(同 1.6 分组)。以上各组平行 3 孔,继续培养 48 h 后,每孔分别加入 120 μL 蛋白裂解液裂解后,在冰浴下静置裂解 30 min,95 °C 加热 5 min 后,取 25 μL 品进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后取出凝胶,于 4 °C 下 60 mA 电流转印过夜至硝酸纤维素膜,脱脂奶粉封闭 1 h 后,分别加入 1:1000 稀释的 PCNA 单抗 4 °C 过夜,洗膜后用 1:2000 稀释的二抗-辣根过氧化物酶(HRP)交联物孵育 2 h,按照 Super Signal west pico chemiluminescent substrate 试剂盒(PIERCE 公司,美国)说明,加入显色剂后,X 光片于室温下自显影 20 s,使用凝胶分析系统摄像并分析。

1.9 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 分析软件,各组间比较采用单因素方差分析,成组数据的比较采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 实验

2.1 H₂O₂ 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

MTT 法检测分析显示,(0.25 ~ 6.0) mmol/L 不

同浓度的 H_2O_2 处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后,该细胞的存活率呈浓度依赖性降低。通过 Origin 软件计算可知, H_2O_2 对 SH-SY5Y 细胞 IC_{50} 为 1.54 mmol/L,见图 1。

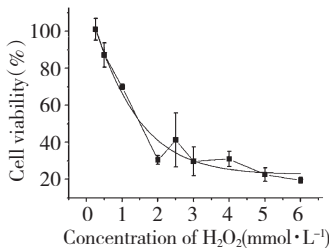


图 1 MTT 法检测不同浓度的 H_2O_2 处理后的 SH-SY5Y 细胞存活率

Fig. 1 Viability of SH-SY5Y cells in different concentrations of H_2O_2

2.2 MTT 法测定 SPM 抗 H_2O_2 诱导 SH-SY5Y 细胞毒性

图 2 显示采用 MTT 法检测 H_2O_2 及 SPM 处理后的 SH-SY5Y 细胞存活率结果。A 组(H_2O_2 组)显示,加入 1.54 mmol/L H_2O_2 作用 24 h 后,SH-SY5Y 细胞存活率仅为 $(47.65 \pm 3.52)\%$,而同时加入不同浓度的蜗牛多肽的治疗组的细胞生长力明显较 A 组好。B 和 C 组与 A 组比较差异有显著性意义($t_B = -7.41, P_B = 0.018, t_C = -7.85, P_C = 0.016$),D ~ G 组分别与 A 组比较差异有显著性意义($t_D = -21.30, P_D = 0.002, t_E = -186.20, P_E = 0.000, t_F = -54.54,$

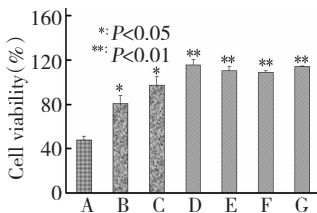


图 2 MTT 法检测 H_2O_2 及 SPM 处理后的 SH-SY5Y 细胞存活率

Fig. 2 Viability of SH-SY5Y cells in seven groups

A: H_2O_2 组; B: 39 mg/L SPM + H_2O_2 组; C: 78 mg/L SPM + H_2O_2 组; D: 156 mg/L SPM + H_2O_2 组; E: 312.5 mg/L SPM + H_2O_2 组; F: 625 mg/L SPM + H_2O_2 组; G: 1250 mg/L SPM + H_2O_2 组

注:与 H_2O_2 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: H_2O_2 Group; B: 39 mg/L SPM + H_2O_2 Group; C: 78 mg/L SPM + H_2O_2 Group; D: 156 mg/L SPM + H_2O_2 Group; E: 312.5 mg/L SPM + H_2O_2 Group; F: 625 mg/L SPM + H_2O_2 Group; G: 1250 mg/L SPM + H_2O_2 Group

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with H_2O_2 group

$P_F = 0.000, t_G = -42.65, P_G = 0.001$),但 B 组与 C 组比较以及 D ~ G 组之间比较均无明显差异性。提示低剂量 39 mg/L (SPM-L) 和高剂量 156 mg/L (SPM-H) 蜗牛多肽均可显著降低 H_2O_2 引起 SH-SY5Y 细胞毒性。

2.3 Hoechst 染色检测细胞凋亡结果

Hoechst33342 染色结果显示,正常对照组细胞核呈弥漫均匀的低强度荧光,凋亡率仅为 3.5%; 1.54 mmol/L H_2O_2 处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 后,SH-SY5Y 细胞呈现明显的凋亡特征,如细胞质浓缩、细胞核碎裂等,凋亡率高达 $(58.39 \pm 8.67)\%$; SPM-L (1.54 mmol/L H_2O_2 + 39 mg/L SPM) 组和 SPM-H (1.54 mmol/L H_2O_2 + 156 mg/L SPM) 凋亡率分别为 $(44.06 \pm 4.35)\%$ 和 $(32.45 \pm 9.44)\%$,提示 SPM-H 能使 H_2O_2 引起的具有凋亡特征的细胞数目明显减少,与 H_2O_2 组比较差异有显著性意义($t = 4.312, P = 0.013$),见图 3。

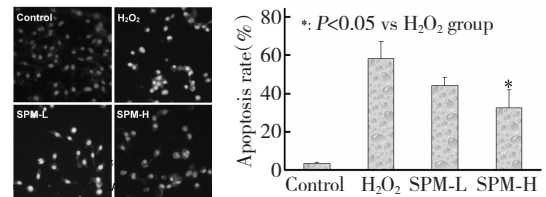


图 3 Hoechst 染色观察 3 组间 SH-SY5Y 细胞凋亡的结果 ($\times 200$)

Fig. 3 The results of SH-SY5Y cell apoptosis of three groups by Hoechst staining ($\times 200$)

2.4 SH-SY5Y 细胞 PCNA 的表达结果

PCNA 表达于细胞核中,染色阳性信号呈棕黄色。与正常对照组相比, H_2O_2 组 SH-SY5Y 细胞 PCNA 的表达明显减少; SPM-L 组和 SPM-H 组 PCNA 表达显色则较 H_2O_2 组明显增强,呈强阳性染色,且阳性细胞数明显增加。见图 4。

2.5 Western blot 检测 SH-SY5Y 细胞 PCNA 的表达结果

由图 5 可见, H_2O_2 组 SH-SY5Y 细胞 PCNA 的表达明显较正常对照组减少;而 SPM-L 组和 SPM-H 组细胞中 PCNA 表达均较 H_2O_2 组明显升高,即呈剂量依赖性,与 H_2O_2 组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

脑神经元损伤的机制包括自由基损伤、细胞内钙离子超载和炎症反应等。脑神经元损伤是由自由基损伤环节触发,钙离子超载为中间环节,炎症反应

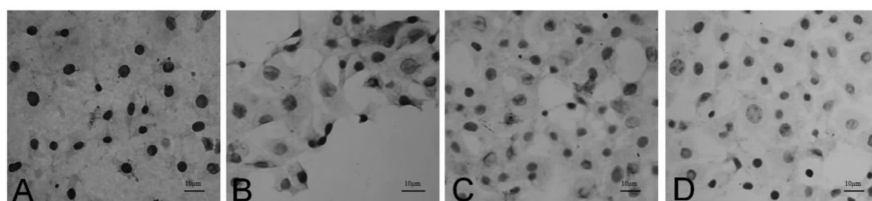


图4 免疫组化检测 PCNA 在 4 组 SH-SY5Y 细胞中的表达 ($\times 200$)

Fig. 4 The expression of PCNA in the SH-SY5Y cell of four groups by immunohistochemistry ($\times 200$)

A: Control 组; B: H_2O_2 组; C: SPM-L 组; D: SPM-H 组; A: Control group; B: H_2O_2 group; C: SPM-L group; D: SPM-H group

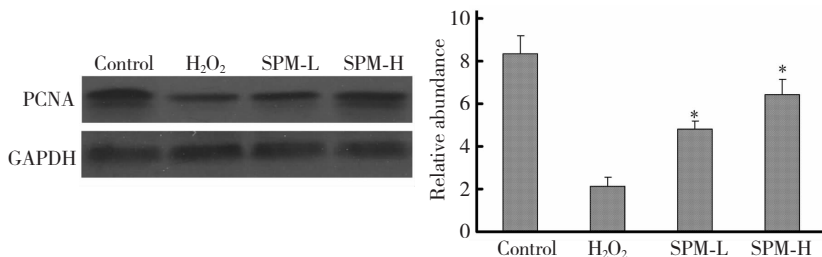


图5 4 组 SH-SY5Y 细胞中 PCNA 蛋白质的表达结果

Fig. 5 Expression of PCNA in SH-SY5Y cells of four groups

注:与 H_2O_2 组比较, * $P < 0.05$; Note: * $P < 0.05$ compared with H_2O_2 group

为最终通路的级联反应。氧化应激诱发的自由基损伤是导致神经元凋亡的基本原因之一,因此抗氧化是保护神经元的有效途径。 H_2O_2 是氧化应激反应密切相关的活性氧之一,其主要产物具有很强的氧化性并可自由进入细胞,在许多神经元细胞培养模型中可引起细胞损伤,且许多中枢神经系统疾病都涉及到氧化应激损伤^[7]。研究证明,用 1.54 mmol/L H_2O_2 处理 SH-SY5Y 细胞,可以引起细胞存活率降低,细胞凋亡等改变。

增殖细胞核抗原 PCNA 是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白,参与调节 DNA 的合成,与细胞的增殖周期密切相关。PCNA 是伴随细胞增殖而表达的一种核内蛋白,可作为一项评估细胞增殖状态的指标。Savio 等^[8]对静止的纤维母细胞应用甲磺酸甲酯和 H_2O_2 处理后,发现与细胞核结合的 PCNA 呈剂量依赖性增加,说明在静止期细胞 PCNA 同样参与了受损 DNA 的碱基修复过程^[9];通过将 1 周龄的小鼠海马脑片进行培养,并接受紫外线照射损伤后,发现能诱导 CA3 区锥体细胞 PCNA 表达增高,说明在神经系统中非增生细胞 PCNA 的表达与 DNA 的损伤修复有关;研究发现,用 1.54 mmol/L H_2O_2 处理 SH-SY5Y 细胞,细胞凋亡调控因子 PCNA 的表达较正常对照组明显减少,而 SPM 处理后的 SH-SY5Y 细胞 PCNA 明显增加,我们认为 SPM 可能是通过改善

DNA 的修复和细胞凋亡,增加细胞核 PCNA 表达,从而抑制 SH-SY5Y 细胞氧化损伤,起到抗氧化作用。

《本草纲目》中记载,蜗牛具有调节机体功能、促进人体新陈代谢、增强细胞活力及提高机体免疫力,对糖尿病、高血压、高血脂、恶疮和癌症等疾病有辅助治疗作用。研究发现,蜗牛提取物通过干扰病毒吸附和穿入宿主细胞等机制明显抑制 HBV 复制的作用,且无细胞毒性^[10]。Tsoutsos D 等^[4]采用蜗牛提取物用于治疗开放性创伤和面部深度烫伤,发现蜗牛提取物可以促进开放性创伤和深度烫伤的皮肤愈合,提示蜗牛提取物中某些成分可促进组织细胞修复和再生。研究发现,无论是低剂量还是高剂量的 SPM 均具有抗氧化作用,在 $(39 \sim 156) \text{ mg/L}$ 范围内呈浓度依赖性的抑制 H_2O_2 引起的细胞毒性作用,并且可明显提高细胞的存活率,显著降低 H_2O_2 诱导的细胞凋亡,提示 SPM 具有神经细胞保护作用,能对抗 H_2O_2 引起的细胞凋亡。

参考文献

- 1 Sun XH (孙向红), Sun W (孙伟), Li J (李静), et al. Effects of haikangling in serum on cultured neuroblastoma apoptosis induced by hydrogen peroxide. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2008, 43: 1781-1783.