

硫化氢对 MPP⁺ 诱导 PC12 细胞氧化 应激损伤的保护作用

尹蔚兰¹, 何剑琴¹, 唐国华², 张恺芳¹, 唐小卿¹

(1. 南华大学 生理学教研室, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学 生命科学研究中心)

摘要: **目的** 探讨硫化氢对 MPP⁺ 诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用。**方法** 以 MPP⁺ 损伤 PC12 细胞作为帕金森病的细胞模型, 甲氮甲唑蓝 (MTT) 法检测细胞存活率; 丙酮酸二硝基苯胺比色法检测细胞上清液乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出量; 硫代巴比妥法检测细胞上清液中丙二醛 (MDA) 浓度; 双氢罗丹明 123 染色 FCM 检测细胞内活性氧水平变化; 应用硫化氢钠 (sodium hydrosulfide, NaHS) 作为 H₂S 的供体。**结果** 200 μmol/L 和 400 μmol/L 硫化氢钠呈浓度依赖性阻断 MPP⁺ 引起 PC12 细胞存活率的降低; 400 μmol/L 硫化氢钠能明显抑制 400 μmol/L MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞 LDH 的漏出, 以及抑制 MDA 和活性氧的产生。**结论** 硫化氢对 MPP⁺ 诱导 PC12 细胞的氧化应激损伤具有保护作用。

关键词: 硫化氢; MPP⁺; PC12 细胞; 氧化应激

中图分类号: R338

文献标识码: A

文章编号: 2095-1116(2011)01-0007-03

Protective Effect of Hydrogen Sulfide on MPP⁺-Induced Oxidative Stress Damage in PC12 Cells

YIN Wei-Lan, HE Jian-Qin, TANG Guo-Hua, et al

(Department of Physiology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To study the protective effect of hydrogen sulfide (H₂S) on rat PC12 cells oxidative stress damage induced by 1-Methyl 4-phenylpyridinium (MPP⁺) in vitro. **Methods** Using MPP⁺ induced PC12 cells damage as the cell model of Parkinsons disease; The viability of PC12 cells was observed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay; The transudation content of lactate dehydrogenase (LDH) was measured by colorimetrically; The level of malondialdehyde (MDA) in supernatant-conditioned media was monitored by thiobarbituric acid reaction (TBA). The level of reactive oxygen species (ROS) in PC12 cells was tested by dihydrohodamine 123 stain FCM; Sodium hydrosulfide (NaHS) was used as H₂S donor. **Results** NaHS (200 and 400 μmol/L) dose-dependently blocked the inhibition of cell viability induced by MPP⁺; 400 μmol NaHS significantly inhibited the loss of LDH, the overproduction of MDA and ROS in PC12. **Conclusion** H₂S has the protective effect on PC12 cells oxidative stress damage induced by MPP⁺.

Key words: hydrogen sulfide; PC12 cells; MPP⁺; oxidative stress

帕金森病 (parkinsons disease, PD) 是一种进行性神经系统退行性疾病, 其病因仍不清楚, 许多因素如年龄、遗传、易感性、毒素 (内源性或外源性)、氧

化应激等均被认为参与了发病。氧化应激是自由基在体内产生的一种负面作用, 并被认为是导致衰老和疾病的一个重要因素。研究表明, PD 患者大脑黑

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30770740); 湖南省衡阳市科技局资助项目 (2009HKJ12)。

通讯作者: 唐小卿, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: txq01001@163.com.

质中表现出明显的氧化应激征象,氧化应激被认为在 PD 的发病机制中起着中心地位^[1],因此,如何减轻神经细胞氧化应激损伤,提高神经细胞活性氧的耐受性,对控制 PD 的发展具有重要意义。现已把减轻氧化应激作为神经保护的重要靶点,把抗氧化作为 PD 等神经退行性疾病的重要防治策略^[2]。

1996 年, Abe 等^[3]首次通过实验证明,内源性 H₂S 可能作为一种神经活性物质而存在。最近又有学者发现生理浓度的 H₂S 具有抗氧化应激损伤的作用。MPP⁺ (1 - 甲基 4 - 苯基吡啶离子)是一种神经毒,能引起神经细胞的氧化应激损伤,阻碍线粒体呼吸链复合物的活动,最终导致多巴胺能神经元的死亡。人们常用 MPP⁺ 损伤神经元细胞来作为复制帕金森病的细胞模型。H₂S 既然具有抗氧化应激损伤的作用,其对 MPP⁺ 氧化应激损伤神经元是否具有保护作用尚不是很清楚。PC12 细胞由于其本身的特性常用作神经元模型^[4]。因此,本研究以 MPP⁺ 损伤 PC12 细胞为 PD 的细胞模型,应用硫化氢(sodium hydrosulfide, NaHS)作为 H₂S 的供体,观察 H₂S 对 MPP⁺ 抑制细胞生长、诱导细胞脂质过氧化和升高细胞内活性氧水平的影响,探讨 H₂S 对 MPP⁺ 氧化应激损伤神经元的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

硫化氢(NaHS)、甲氮甲唑蓝(MTT)、MPP⁺、PI、双氢罗丹明(DHR)、NaHS 购自美国 Sigma 公司;RPMI - 1640 培养基、新生牛血清购自美国 Gibco 公司;LDH 检测试剂盒和 MDA 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;流式细胞仪(德国 Beckman 公司);酶联免疫仪(Elx800)(美国 Bio - TEK 公司产品)。

1.2 细胞培养和分组

PC12 细胞是大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株,由中山大学中山医学院生理学教研室馈赠,源于美国典型培养物保藏中心(ATCC)。培养于含体积分数为 15% 新生牛血清的 RPMI1640 完全培养基中,于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。选取对数生长期细胞做实验。

实验分为空白对照组、损伤处理组和保护处理组。损伤处理组分别给予 200 μmol/L、400 μmol/L 和 800 μmol/L MPP⁺,保护组在 MPP⁺ 损伤前 30 min 分别给予 200 μmol/L 和 400 μmol/L NaHS

预处理,均培养 24 h。

1.3 MTT 法检测细胞增殖状况

取对数生长期细胞,以 0.5×10^4 mL 接种于 96 孔培养板,180 μL/孔。在 37℃ 5% CO₂ 条件下培养过夜后,按分组要求给予不同处理因素,每组设 8 个平行孔,培养 24 h 后,每孔加 5 mg/mL MTT 20 μL,再培养 4 h,倾去培养基,加 DMSO 100 μL/孔,待甲赞完全溶解后,用酶联免疫仪在波长 570 nm 处读取吸光度(OD)。按公式计算细胞存活率:细胞存活率(%) = (实验孔 OD 均值/对照组 OD 均值) × 100% 计算。

1.4 细胞上清液中 LDH 漏出量的测定

采用乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒进行测定,LDH 能催化乳酸生成丙酮酸,丙酮酸与 2,2 - 硝基苯胍反应生成丙酮酸二硝基苯腙,在碱性溶液中呈棕红色,通过比色可求出酶活性。实验时,取 100 μL 上清液,测定 LDH 活性。

1.5 细胞上清液 MDA 浓度测定

过氧化脂质降解产物中的丙二醛(malondialdehyde, MDA)可与硫代巴比妥酸结合,形成红色产物,在 532 nm 处有最大吸收峰,通过吸光度值计算 MDA 含量。实验时,按南京建成生物公司提供的 MDA 测定试剂盒说明书提供的操作方法测定。

1.6 细胞内活性氧的测定

取对数生长期细胞接种于 24 孔板内,500 μL/孔。在 37℃ 5% CO₂ 条件下生长至 80% 满,按分组要求分别给予不同药物处理,每组设 3 个平行孔,处理 24 h 后,倾去培养板内培养基,无血清的 RPMI - 1640 清洗 2 次,加入双氢罗丹明 123,于 37℃ 孵育 20 min 后,用流式细胞仪定量分析阳性细胞的平均荧光强度,该值代表细胞内活性氧水平。

1.7 统计学分析

所有实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,处理组间统计学差异显著性用 SPSS 13.0 统计软件作单因素方差分析及 LSD - *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结 果

2.1 H₂S 对 PC12 细胞活性的影响

200 μmol/L、400 μmol/L 与 800 μmol/L MPP⁺ 呈浓度依赖性地降低 PC12 细胞的存活率($P < 0.05$)。200 μmol/L 与 400 μmol/L NaHS 单独作用于 PC12 细胞 24 h 后,对 PC12 细胞的存活率无明显的影响,但分别呈浓度依赖性的抑制 200 μmol/L、

400 $\mu\text{mol/L}$ 与 800 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 引起的细胞存活率的降低($P<0.05$)(表 1)。

表 1 H_2S 抑制 MPP^+ 诱导的 PC12 细胞存活率的降低($\%, n=8$)

NaHS ($\mu\text{mol/L}$)	MPP($\mu\text{mol/L}$)			
	0	200	400	800
0	100 $\pm$ 6	78 $\pm$ 2 ^a	71 $\pm$ 2 ^b	67 $\pm$ 2 ^c
200	101 $\pm$ 7	83 $\pm$ 2 ^d	77 $\pm$ 3 ^d	71 $\pm$ 3 ^d
400	99 $\pm$ 8	88 $\pm$ 1 ^e	82 $\pm$ 2 ^e	76 $\pm$ 3 ^e

$P<0.05$, a: 与 0 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 组比较; b: 与 200 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 组比较; c: 与 400 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 组比较; d: 与 0 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组比较; e: 与 200 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组比较

表 2 硫化氢对 MPP^+ 诱导的细胞上清液 LDH 和 MDA 以及细胞内活性氧水平的影响($n=3$)

组 别	LDH 漏出量(U/mL)	MDA 含量(nmol/mL)	ROS 含量(荧光强度)
对照组	36.0 $\pm$ 5.5	0.77 $\pm$ 0.18	5.50 $\pm$ 0.7
400 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 组	74.0 $\pm$ 5.7 ^a	3.20 $\pm$ 0.29 ^a	14.53 $\pm$ 0.35 ^a
400 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ + 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组	55.0 $\pm$ 5.5 ^b	1.71 $\pm$ 0.19 ^b	9.70 $\pm$ 0.50 ^b
400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 组	35.3 $\pm$ 5.7	0.79 $\pm$ 0.20	5.10 $\pm$ 0.90

与对照组比较, a: $P<0.01$; 与 400 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 组比较, b: $P<0.01$

2.3 H_2S 对 PC12 细胞上清液中 MDA 含量的影响

400 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 处理 24 h 后, 细胞上清液中 MDA 水平升高, 与对照组相比差异具有显著性($P<0.01$), 表明 MPP^+ 具有升高细胞 MDA 水平的作用。但是, 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 预处理 30 min 后再用 400 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 处理 PC12 细胞 24 h 后, 上清液中 MDA 水平降低, 与单用 400 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 处理组比较差异具有显著性($P<0.01$), 表明硫化氢具有抑制 MPP^+ 诱导的细胞脂质过氧化的作用。400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 单独处理组与对照组相比差异无显著性(表 2)。

2.4 H_2S 对 PC12 细胞内活性氧水平的影响

应用 FCM 检测细胞内双氢罗丹明 123 (DHR) 的荧光强度能反映活性氧水平的改变。DHR 的平均荧光强度增大, 反映活性氧生成增多。表 2 显示, 应用 400 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 对 PC12 细胞作用 24 h 后, 胞内 DHR 的强度明显增多, 与对照组相比差异具有显著性($P<0.01$), 表明 MPP^+ 引起活性氧水平增高。400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 本身不影响 PC12 细胞胞内活性氧生成, 但当 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 与 400 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 共同作用 PC12 细胞 24 h 后, 胞内 DHR 的荧光强度明显减少, 表明 NaHS 能抑制 MPP^+ 引起的活性氧生成增多(表 2)。

2.2 H_2S 对 PC12 细胞上清液 LDH 漏出量的影响

400 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 处理 24 h 后, 细胞上清液中 LDH 漏出量升高, 与对照组比较差异具有显著性($P<0.01$), 表明 MPP^+ 损伤 PC12 细胞, 从而导致 LDH 漏出增多。但是, 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 预处理 30 min 后再用 400 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 处理 PC12 细胞 24 h 后, 上清液中 LDH 漏出量降低, 与单用 400 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 处理组比较差异具有显著性($P<0.01$), 表明硫化氢具有抑制 MPP^+ 诱导的 PC12 细胞的损伤作用。400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 单独处理组与对照组相比差异无显著性(表 2)。

3 讨 论

H_2S 是体内的第三种气体信号分子, 具有调节突触活动^[3]、舒张血管^[5]及抑制红细胞氧化^[6]等重要的生理功能。 H_2S 与神经系统疾病关系密切, 研究表明, 脑内 H_2S 水平明显降低(约 55%)可能是 AD 的病理机制之一^[7]; 外源性地给予生理浓度的 H_2S 可显著减轻次氯酸^[8]、 ONOO^- ^[9] 和谷氨酸^[10] 介导的对神经细胞的氧化应激损伤; 本室之前的研究也表明, H_2S 对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的损伤具有保护作用^[11]。

H_2S 对 MPP^+ 诱导 PC12 细胞的氧化应激损伤是否具有保护作用? 本研究结果显示, H_2S 可以明显降低 MPP^+ 对 PC12 细胞的生长抑制率($P<0.05$), 减少 MPP^+ 诱导的 PC12 细胞 LDH 的漏出($P<0.01$), 表明 H_2S 对 MPP^+ 损伤 PC12 细胞具有保护作用。同时, 本实验结果显示, H_2S 处理后, 细胞上清液中 MDA 含量显著降低($P<0.01$), 细胞内 ROS 水平显著降低($P<0.01$), 表明 H_2S 抑制 MPP^+ 损伤 PC12 细胞的作用在于其对抗 MPP^+ 的氧化应激损伤效应。上述结果表明, H_2S 对 MPP^+ 诱导 PC12 细胞的氧化应激损伤具有保护作用。

(下转第 17 页)

(上接第9页)

这些实验结果在某种意义上可能为 PD 的治疗提供新的发展方向,但由于 PD 的病因及发病机制尚还不十分清楚,而本文只是对 H_2S 抗氧化损伤作用做了初步研究,对 H_2S 抗氧化作用的靶点还有待进一步深入研究。另外,还要进一步探讨在整体水平如何增加脑内内源性 H_2S 的含量,为 PD 的治疗提供重要的科学依据。

参考文献:

- [1] Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association [J]. J Clin Invest, 2003, 111(2): 163-169.
- [2] Moreira PI, Smith MA, Zhu X, et al. Oxidative stress and neurodegeneration [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1043: 545-552.
- [3] Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator [J]. J Neurosci, 1996, 16(3): 1066-1071.
- [4] Shafer TJ, Atchison WD. Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neuro-

- toxicological studies [J]. Neurotoxicology, 1991, 12(3): 473-492.
- [5] Zhao W, Zhang J, Lu Y, et al. The vasorelaxant effect of $H(2)S$ as a novel endogenous gaseous $K(ATP)$ channel opener [J]. EMBO J, 2001, 20(21): 6008-6016.
- [6] Searcy DG, Lee SH. Sulfur reduction by human erythrocytes [J]. J Exp Zool, 1998, 282(3): 310-322.
- [7] Eto K, Asada T, Arima K, et al. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293(5): 1485-1488.
- [8] Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, et al. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(4): 794-798.
- [9] Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, et al. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite scavenger [J]. J Neurochem, 2004, 90(3): 765-768.
- [10] Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress [J]. FASEB J, 2004, 18(10): 1165-1167.
- [11] 杨春涛, 郭瑞鲜, 杨丝丝, 等. 硫化氢对抗过氧化氢对 PC12 细胞的损伤作用 [J]. 解剖学研究, 2008, 30(1): 35-38, 46.

(此文编辑 朱雯霞)