

铁皮石斛多糖对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞损伤的抑制作用

董 昕¹, 廖慧颖¹, 陆素青², 李国术³, 符 婉¹, 潘 思¹, 张 涛^{4*}

(1. 南华大学附属第一医院神经内科, 湖南 衡阳 421001; 2. 桂林医学院附属医院核医学科;
3. 衡阳市中心医院急诊科; 4. 南华大学附属第二医院泌尿外科)

摘 要: **目的** 观察铁皮石斛多糖对 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺)所致 PC12 细胞损伤的抑制作用及可能机制。**方法** 实验分为对照组、MPP⁺ 损伤模型组、铁皮石斛多糖组(50、100、200 和 400 μg/mL)。MPP⁺ 损伤模型组细胞用含 10 μmol/L MPP⁺ 的培养基处理细胞 24 h;铁皮石斛多糖组细胞用含 50、100、200 和 400 μg/mL 铁皮石斛多糖的培养基预处理 2 h 后,再加入 MPP⁺ (10 μmol/L)处理细胞 24 h;对照组细胞给予等量生理盐水处理。MTT 比色法检测细胞存活率,检测细胞内丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。**结果** 与对照组比较,MPP⁺ 处理显著降低了 PC12 细胞的存活率,显著升高了细胞培养液中 LDH 的水平和细胞中 MDA 的含量,显著降低了细胞中 SOD 的活性(均 $P < 0.05$);与损伤模型组比较,200 和 400 μg/mL 铁皮石斛多糖组 PC12 细胞的存活率显著升高,细胞培养液中 LDH 的活性和细胞中 MDA 的含量显著升高,细胞中 SOD 的活性显著降低(均 $P < 0.05$)。**结论** 铁皮石斛多糖抑制了 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞损伤,其机制可能与铁皮石斛多糖抑制氧化应激有关。

关键词: 铁皮石斛; 神经保护作用; 氧化应激; PC12 细胞

中图分类号:R741.05

文献标识码:A

Inhibitory Effect of Polysaccharides from *Candidum Dendrobium* on the Injury Induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in PC12 Cells

DONG Xin, LIAO Huiying, LU Suqin, et al

(Department of Internal Neurology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of polysaccharides from *candidum dendrobium* on the injury induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) in PC12 cells. **Methods** The PC12 cells were divided into control, injury model and polysaccharides from *candidum dendrobium* (50, 100, 200 and 400 μg/mL) group. The cells were incubated with 10 μmol/L MPP⁺ for 24 h to induce the injury in injury model group. After the cells were pretreated with polysaccharides from *candidum dendrobium* (50, 100, 200 and 400 μg/mL) for 2 hours, cells were incubated with 10 μmol/L MPP⁺ for 24 h in polysaccharides from *candidum dendrobium* group. The cells were incubated with the same volume of saline in control group. MTT assay was used to detect the survival rate of cells. The level of lactate dehydrogenase (LDH) in the medium, the level of malondialdehyde (MDA) in the cells and the activity of superoxide dismutase (SOD) in the cells were measured. **Results** Compared with the control group, the survival rate of cells was significantly decreased, the level of LDH in the medium and MDA in the cells were significantly increased, the activity of SOD in the cells was significantly decreased in the injury model group. Compared with the injury model group, the survival rate of cells was significantly increased, the level of LDH in the medium and MDA in the cells were significantly decreased, the activity of SOD in the cells was significantly increased in the polysaccharides from *candidum dendrobium* (200 and 400 μg/mL) group. **Conclusion**

Polysaccharides from candidum dendrobium inhibits the injury induced by MPP^+ in PC12 cells, of which the mechanism may be related to the inhibition of oxidative stress induced by polysaccharides from candidum dendrobium.

Key words: candidum dendrobium; neuroprotective effect; oxidative stress; PC12 cells

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种好发于中老年人的神经退行性疾病,其主要临床症状包括运动迟缓、姿势步态异常、肌强直和静止性震颤等^[1]。PD的主要病理特征为中脑黑质致密部的多巴胺神经元的变性死亡^[2]。采用1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP^+)制备拟PD细胞模型是目前常用的方法,因为 MPP^+ 毒性对多巴胺神经元具有较强的选择性^[3]。

铁皮石斛(*dendrobium candidum*, DC)是我国传统的名贵中药材,具有滋阴补肾、健脾养胃和润肺生津等功效,可用于糖尿病和慢性萎缩性胃炎等的治疗^[4]。研究表明铁皮石斛能通过调节胰岛 α 和 β 细胞激素的分泌而发挥降血糖作用,可提高糖尿病小鼠的葡萄糖耐量水平,还具有血管内皮细胞保护作用 and 肝脏保护作用^[5-6]。但是铁皮石斛对神经损伤是否具有抑制作用以及作用机制尚不清楚。因此本文拟观察铁皮石斛对 MPP^+ 所致神经细胞损伤的抑制作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 铁皮石斛多糖由珍贵濒危药材湖南省工程研究中心提供;胎牛血清和DMEM高糖培养基购自Introgen公司;1-甲基-4-苯基吡啶离子、青霉素和链霉素购自Sigma公司;噻唑蓝(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)为武汉博士德生物工程有限公司产品。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malon-aldehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)为南京建成生物工程公司产品。

1.2 细胞培养和分组 高分化的PC12细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。细胞采用含10%灭活胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM高糖培养基常规培养,细胞置于37℃、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中,每两天换液一次,每四天传代一次。实验分对照组,损伤模型组,铁皮石斛多糖组(50、100、200和400 μ g/mL)。损伤模型组细胞用含10 μ mol/L MPP^+ 的培养基处理细胞24 h;铁皮石斛多糖组,根

据预实验的结果预处理2 h作用效果最好,因此细胞先用含50、100、200和400 μ g/mL铁皮石斛多糖的培养基预处理2 h后,再加入 MPP^+ (10 μ mol/L)处理细胞24 h;对照组细胞给予等量生理盐水处理。

1.3 MTT法细胞活力的检测 用胰酶消化后将PC12细胞制成细胞悬液,计数细胞密度,以 1×10^4 个细胞/孔接种到96孔培养板内。将细胞置于37℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养。在实验结束前4 h每孔加入100 μ L MTT,使MTT的终浓度为0.5 mg/mL,继续培养4 h后吸去培养液。每孔加入100 μ L DMSO,振荡10 min,待结晶完全溶解后,在Bio-Rad550酶标仪上测定570 nm波长的吸光度值(OD值)。计算各组PC12细胞的存活率,每组设3个重复孔。

1.4 LDH活性的测定 各组实验结束后,分别收集每组细胞培养液的上清液,测量各组细胞上清液中LDH活性,操作按LDH试剂盒说明书的要求进行。用酶标仪测定波长为450 nm的吸光度,每组设3个重复孔。

1.5 MDA和SOD水平的测定 各组实验结束后,分别收集每组细胞,制备细胞匀浆,按试剂盒说明操作分别检测细胞中MDA水平和SOD的活性。BCA法测定细胞培养液上清中蛋白浓度,MDA的水平以每克细胞蛋白所含MDA的 μ mol数(μ mol/gpr)表示;SOD的活性以每100 mg细胞蛋白所含SOD活性的U数(U/100 mgpr)表示。

1.6 统计学分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的比较采用单因素方差分析;组间的两两比较采用LSD-*t*检验,计数资料采用重复测量方差分析。采用SPSS 17.0统计软件处理实验数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MPP^+ 和铁皮石斛多糖对PC12细胞存活率的影响 采用MTT比色法检测PC12细胞活力,结果如图1所示:与对照组比较, MPP^+ 处理PC12细胞的存活率显著降低($P < 0.05$);与损伤模型组比较,200和400 μ g/mL铁皮石斛多糖组PC12细胞的

存活率均升高(均 $P < 0.05$)。50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖组 PC12 细胞的存活率与损伤模型组比较虽有升高,但差异无显著性(均 $P > 0.05$)。

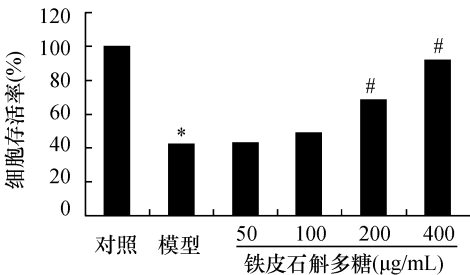


图1 MPP⁺和铁皮石斛多糖对PC12细胞存活率的影响
与对照组比较,* $P < 0.05$;与损伤模型组比较,# $P < 0.05$

2.2 铁皮石斛多糖对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞培养液中 LDH 活性的影响 图 2 所示:与对照组比较,MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞培养液中 LDH 活性显著性升高($P < 0.05$)。与损伤模型组相比,200 和 400 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖组,细胞培养液中 LDH 活性显著性降低($P < 0.05$)。50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖组细胞培养液中 LDH 活性与损伤模型组比较虽有降低,但差异无显著性(均 $P > 0.05$)。

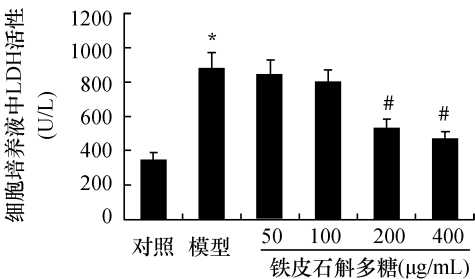


图2 铁皮石斛多糖对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞培养液中 LDH 活性的影响
与对照组比较,* $P < 0.05$;与损伤模型组比较,# $P < 0.05$

2.3 铁皮石斛多糖对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞中 MDA 和 SOD 水平的影响 表 1 所示:与对照组比较,MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞中 MDA 的含量显著升高,而 SOD 活性显著下降(均 $P < 0.05$)。与损伤模型组相比,200 和 400 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖组细胞中 MDA 的含量显著降低,而 SOD 活性显著增加(均 $P < 0.05$)。但 50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 铁皮石斛多糖组细胞中 MDA 水平和 SOD 活性与损伤模型组比较差异无显著性(均 $P > 0.05$)。

表1 铁皮石斛多糖对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞中 MDA 和 SOD 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA($\mu\text{mol/gpr}$)	SOD(U/100 mgpr)
对照组	45.64 $\pm$ 7.82	328.75 $\pm$ 42.78
损伤模型组	134.71 $\pm$ 12.45 ^a	85.72 $\pm$ 10.15 ^a
铁皮石斛多糖(50 $\mu\text{g/mL}$)	128.25 $\pm$ 9.04	91.26 $\pm$ 11.92
铁皮石斛多糖(100 $\mu\text{g/mL}$)	117.86 $\pm$ 11.38	105.55 $\pm$ 15.78
铁皮石斛多糖(200 $\mu\text{g/mL}$)	91.34 $\pm$ 7.25 ^b	186.24 $\pm$ 18.33 ^b
铁皮石斛多糖(400 $\mu\text{g/mL}$)	52.17 $\pm$ 6.89 ^b	276.91 $\pm$ 23.69 ^b

与对照组比较,a; $P < 0.05$;与损伤模型组比较,b; $P < 0.05$

3 讨 论

目前的研究认为黑质的多巴胺能神经元的变性是 PD 的核心病理变化。如何防止多巴胺能神经元的变性和损伤从而延缓甚至逆转 PD 的进程,已成为国内外有关 PD 治疗的研究重点和热点。由于 MPP⁺ 毒性对多巴胺能神经元具有较强的选择性,因此是制备 PD 模型的经典药物。MPP⁺ 可通过干扰呼吸链引起线粒体功能障碍,还可导致氧化应激和激活 caspase 和蛋白激酶 C 影响快速轴浆运输并导致神经元突触功能失常,产生逆向性死亡的病理过程^[7-8]。氧化应激在黑质的多巴胺能神经元的变性中发挥着重要的作用^[9],因此抑制氧化应激是保护多巴胺能神经元的重要途径。

石斛可分为黄草、金钗、马鞭等数十种,铁皮石斛为石斛中的极品,它因表皮呈现铁绿色而得名。铁皮石斛是我国传统的名贵中药材,为多年生兰科附生草本植物。主要生于海拔达 1 600 米的山地半阴湿的岩石上,喜温暖湿润气候和半阴半阳的环境,不耐寒。一般均能耐 -5 $^{\circ}\text{C}$ 的低温。铁皮石斛具有独特的药用价值,以其茎入药,属补益药中的补阴药。从药理学和植物化学成分分析表明铁皮石斛中主要的生物活性物质是多糖类化合物,且含量较高。据《中药志》记载铁皮石斛多糖具有“养阴益胃和生津止渴”的功效,在许多治疗糖尿病的中药方剂中也有大量采用铁皮石斛^[10-11]。现代药理研究表明铁皮石斛多糖有提高机体抵抗力和免疫力、抗肿瘤和防治白内障等功能^[12-13]。研究显示石斛类多糖具有抑制胰岛细胞凋亡和坏死,保护胰岛细胞而起到预防治疗糖尿病,并具有抵抗钙超载,抑制视网膜

细胞凋亡的作用^[14]。铁皮石斛多糖还具有血管内皮细胞保护作用和肝脏保护作用^[6,15]。

本文结果显示铁皮石斛显著抑制了 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞的损伤,表现为显著增加了 PC12 细胞的存活率和显著降低了细胞培养液中 LDH 的水平。铁皮石斛也显著抑制了 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞中的氧化应激,表现为显著降低了细胞中 MDA 的含量和显著增加了细胞中 SOD 的活性。这些结果表明铁皮石斛对神经细胞的损伤具有抑制作用,其神经保护的机制可能是通过抑制氧化应激。

总之,铁皮石斛多糖对 MPP⁺ 诱导的神经细胞的损伤具有抑制作用,其机制可能与铁皮石斛多糖的抗氧化作用有关。本文结果为延缓或逆转 PD 疾病进程开辟了新途径。

参考文献:

- [1] Seppi K, Weintraub D, Coelho M, et al. The movement disorder society evidence-based medicine review update: treatments for the non-motor symptoms of Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2011, 26 (3): 42-80.
- [2] Lee JY, Jeon BS. Maladaptive reward-learning and impulse control disorders in patients with Parkinson's disease; a clinical overview and pathophysiology update [J]. *J Mov Disord*, 2014, 7(2): 67-76.
- [3] Kook YH, Ka M, Um M. Neuroprotective cytokines repress PUMA induction in the 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) model of Parkinson's disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(2): 370-374.
- [4] 李强翔, 杨芳, 蔡光先. 铁皮石斛在糖尿病研究中的应用进展[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(1): 427-429.
- [5] Xiao L, Ng TB, Feng YB, et al. *Dendrobium candidum* extract increases the expression of aquaporin-5 in labial glands from patients with Sjögren's syndrome [J]. *Phyto-medicine*, 2011, 18(2-3): 194-198.
- [6] Li GJ, Sun P, Wang Q, et al. *Dendrobium candidum* Wall.

ex Lindl. attenuates CCl₄-induced hepatic damage in imprinting control region mice [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8 (3): 1015-1021.

- [7] Asci R, Vallefuoco F, Andolfo I, et al. *Trasferrin receptor 2* gene regulation by microRNA 221 in SH-SY5Y cells treated with MPP⁺ as Parkinson's disease cellular model [J]. *Neurosci Res*, 2013, 77(3): 121-127.
- [8] Visanji NP, Orsi A, Johnston TH, et al. PYM50028, a novel, orally active, nonpeptide neurotrophic factor inducer, prevents and reverses neuronal damage induced by MPP⁺ in mesencephalic neurons and by MPTP in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *FASEB J*, 2008, 22(7): 2488-2497.
- [9] Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease [J]. *J Parkinsons Dis*, 2013, 3(4): 461-491.
- [10] 吴昊妹, 徐建华, 陈立钻, 等. 铁皮石斛降血糖作用及其机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(2): 160-163.
- [11] 陈云龙, 何国庆, 张铭, 等. 细茎石斛多糖的降血糖活性作用 [J]. *浙江大学学报: 理学版*, 2007, 34(6): 658-659.
- [12] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2001, 13(1): 70-75.
- [13] Zhao X, Sun P, Qian Y, et al. *D. candidum* has in vitro anticancer effects in HCT-116 cancer cells and exerts in vivo anti-metastatic effects in mice [J]. *Nutr Res Pract*, 2014, 8(5): 487-93.
- [14] 郑燕芳, 施红, 王晓宁, 等. 几种中药复方对胰岛细胞凋亡坏死的影响 [J]. *福建中医学院学报*, 2007, 17(7): 28-30.
- [15] 陈泳荪, 刘文洪. 铁皮石斛多糖提取工艺及其对高糖诱导血管内皮细胞 NF- κ B 表达干预的研究 [J]. *山西中医学院学报*, 2011, 12(2): 28-31.

(此文编辑: 蒋湘莲)