

# 硫辛酸通过抑制 NF- $\kappa$ B-iNOS-NO 信号保护氧化应激诱导的 PC12 细胞损伤

匡荣<sup>1,2</sup>, 孙意国<sup>1</sup>, 郑筱祥<sup>1\*</sup>, 倪维芳<sup>2</sup>, 朱社敏<sup>2</sup> (1. 浙江大学生物医学工程学院, 教育部生物医学工程重点实验室, 杭州 310027; 2. 浙江省食品药品检验所, 杭州 310004)

**摘要:** 目的 研究硫辛酸对氧化应激的 PC12 细胞 NF- $\kappa$ B-iNOS-NO 信号通路的影响。方法 用终浓度为 0.4 mmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞, 用 MTT 法测定细胞存活率; 用激光共聚焦法(LSCM)检测细胞内一氧化氮的动态变化; 用 RT-PCR 法检测 iNOS mRNA 和 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达量的变化。结果 0.4 mmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 PC12 细胞 4 h, 细胞存活率为 27.9%( $P<0.01$ ), 硫辛酸 10 mg·L<sup>-1</sup> 可以提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 PC12 细胞存活率(65.4%,  $P<0.01$ ); LSCM 检测显示, DAF-2 荧光强度的比值( $F_t/F_0$ )的最大值由损伤模型组的 5.34 下降到 1.80; 和模型组比较, iNOS mRNA 和 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达明显下调 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。结论 硫辛酸可能通过抑制 NF- $\kappa$ B-iNOS-NO 信号减轻氧化应激诱导的 PC12 细胞损伤。

**关键词:** 硫辛酸; 过氧化氢; PC12 细胞; 一氧化氮; iNOS mRNA; NF- $\kappa$ B p65 mRNA

中图分类号: R977.22 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)07-0538-04

## Lipoic Acid Protected PC12 Cells from Oxidative Stress-induced Damage by inhibiting the NF- $\kappa$ B-iNOS-NO Signal Pathway

KUANG Rong<sup>1,2</sup>, SUN Yiguo<sup>1</sup>, ZHENG Xiaoxiang<sup>1\*</sup>, NI Weifang<sup>2</sup>, ZHU Shemin<sup>2</sup> (1. Department of Biomedical Engineering, Key Laboratory of Biomedical Engineering, Ministry of Education, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control Hangzhou, 310004, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the effect of lipoic acid(LA) on NF- $\kappa$ B-iNOS-NO signal pathway in oxidative stress-induced PC12 cells. **METHODS** After PC12 cells were treated with 0.4 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and different concentrations of LA, the cell viability was measured by MTT, the concentration of nitric oxide in intracellular cells was evaluated using laser-scanning confocal microscopy(LSCM) method and the expressions of NF- $\kappa$ B p65, iNOS mRNA were detected by RT-PCR. **RESULTS** Cell viability were significantly elevated by LA from 27.9% to 65.4%. Compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells, the concentration of nitric oxide was lowed by LA through judging the change of DAF-2  $F_t/F_0$  from 5.34 to 1.80. Meanwhile, the levels of NF- $\kappa$ B p65 and iNOS mRNA were decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **CONCLUSION** Lipoic acid could protect PC12 cells from oxidative stress-induced damage by inhibiting the NF- $\kappa$ B-iNOS-NO signal pathway.

**KEY WORDS:** lipoic acid; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; PC12 cells; NO; iNOS mRNA; NF- $\kappa$ B mRNA

---

作者简介: 匡荣, 男, 博士, 副主任药师 Tel: 13989899796 E-mail: kuangrongyjs@hotmail.com \*通信作者: 郑筱祥, 女, 教授, 博士生导师

硫辛酸(lipoic acid, LA)是1937年在马铃薯中发现的一种B族维生素,其化学名称是1, 2-二硫戊环-3-戊酸,在生物体内可以转化为还原型的二氢硫辛酸,并能够再生为内源性抗氧化剂,如维生素E、维生素C、辅酶Q、谷胱甘肽等,被誉为“万能抗氧化剂”,具有多种生物学活性,临床用于防治糖尿病及其并发症、保肝、抗衰老、防辐射等。近年来,其延缓脑和神经退化性疾病的作用越来越引起人们的重视<sup>[1]</sup>,为了探讨硫辛酸对神经细胞损伤的保护作用机制,本研究用大鼠嗜铬细胞瘤细胞株(pheochromocytoma cells, PC12)为研究对象,用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>复制PC12细胞损伤模型,研究硫辛酸对氧化应激的PC12细胞核因子κB-诱导型一氧化氮合成酶-一氧化氮(NF-κB - iNOS-NO)信号通路的影响,为硫辛酸用于神经退行性疾病的防治提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Spectra Max 190酶标仪(Molecular Devices);激光共聚焦显微镜(Zeiss 510德国);PCR仪(ABI PRISM 7000 Sequence System);硫辛酸、四甲基偶氮唑盐(MTT)(Sigma公司);PC12细胞(中国科学院上海细胞生物学研究所);DMEM培养基、马血清、胎牛血清(Gibco公司);TRIzol(Invitrogen公司);引物(上海生物工程公司);NO探针(DAF-2DA)(美国Molecular probes公司),其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 细胞培养

PC12细胞用含10%胎牛血清和5%马血清的DMEM培养液接种于细胞培养瓶中,置CO<sub>2</sub>培养箱(37℃, 5%CO<sub>2</sub>)培养,取大约覆盖瓶底80%即对数生长期细胞进行实验。

### 1.3 MTT法测定硫辛酸对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤的PC12细胞存活率的影响

取细胞,种入96孔细胞培养板中,培养至细胞大约覆盖孔底80%~90%进行分组实验,设立正常对照组、损伤模型组、两个受试药组和维生素E组,每组设立8个复孔。受试药组给予终浓度分别为5 mg·L<sup>-1</sup>和10 mg·L<sup>-1</sup>的硫辛酸,维生素E组给予终浓度为10 mg·L<sup>-1</sup>的维生素E,预孵育0.5 h再给予终浓度为0.4 mmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,共培养4 h后加入5 mg·mL<sup>-1</sup>的MTT 20 μL,再继续培养4 h,然后吸出培养液,加入二甲基亚砜200 μL,振荡10 min,在酶联免疫检测仪上于570 nm 波长处读取吸光度,各组的吸光度与正常对照组的吸光度比值作为细胞的存活率。

### 1.4 NO的测定(LSCM法)

按文献方法略加修改<sup>[2]</sup>。硫辛酸加入细胞中预孵育0.5 h, DAF-2DA探针终浓度为10 μmol·L<sup>-1</sup>,避光常温孵育20 min, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>终浓度为0.2 mmol·L<sup>-1</sup>, DAF-2的激发波长为488 nm,发射波长范围515~565 nm。扫描参数:分辨率为512×512, 8 bit,每隔30 s采集1次;图象经Zeiss LSM软件计算出细胞内荧光复合物的荧光强度。细胞内NO量的变化用绿色荧光的变化值来表示,计算公式如下:变化值=F<sub>t</sub>/F<sub>0</sub>。F<sub>t</sub>为给予H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后第t秒时荧光强度, F<sub>0</sub>为开始记录时的荧光强度。

### 1.5 iNOS mRNA 和 NF-κB p65 mRNA 的测定(RT-PCR法)

分组和给药同“1.3”项下方法,收集10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>个细胞,按TRIzol试剂说明书提取细胞总RNA。引物设计参照文献<sup>[3-4]</sup>:①iNOS引物:sense primer: 5'-GCCTCGCTCTGGAAAGA-3', antisense primer: 5'-TCCATGCAGACAACCTT-3'(扩增产物为477 bp);②NF-κB p65引物:sense primer: 5'-AAGATCAATGGCTACACAGG-3', antisense primer: 5'-CCTCAATGTCTTCTTTCTGC-3'(扩增产物为493 bp);③β-actin引物:Sense primer: 5'-GAGGGAAATCGTGCCTGAC-3', antisense primer: 5'-TTGGCATAGTAGGTCTTTACGG-3'(扩增产物为272 bp,为内参照)。采用一步法RT-PCR,反应体系:2×RT-PCR Mix 20 μL、RT-Taq酶0.6 μL、上下游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各1 μL、RNA 4 μL、DEPC-ddH<sub>2</sub>O 13.4 μL,总反应体系40 μL。反应体系混匀后于42℃进行逆转录30 min, 94℃ 3 min灭活逆转录酶,然后对cDNA进行扩增,参数为94℃ 20 s, 60℃ 60 s,扩增结束后于72℃终止延伸5 min, 4℃保存5 min, -20℃保存待用。取PCR产物各5 μL, 2%琼脂糖凝胶电泳, EB染色,紫外灯下观察结果,凝胶成像仪分析,用Imagine软件测定RT-PCR产物密度值。基因的相对表达量以目的基因片段密度值/β-actin基因片段密度值计算。

### 1.6 统计学处理

所有数据均以平均值±标准差表示,组间比较采用t检验,以P<0.05为具有统计学意义。

## 2 实验结果

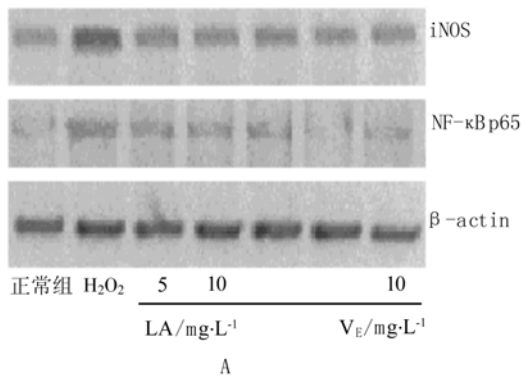
### 2.1 硫辛酸对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤的PC12细胞存活率的影响

0.4 mmol·L<sup>-1</sup>的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤PC12细胞4 h后,与正常对照组比较,细胞存活率明显下降(27.9%, P

<0.01), 但给予硫辛酸 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 细胞存活率明显升高( $65.4\%$ ,  $P<0.01$ ), 且有一定的剂量依赖性。**2.3 硫辛酸对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 损伤的PC12细胞NO生成的影响**如图1所示, 未经 $\text{H}_2\text{O}_2$ 刺激, PC12细胞内NO的量比较稳定, 30 min内荧光强度未见明显变化。用终浓度为 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 刺激后, 荧光强度明显增强,  $F_t/F_0$ 的值明显升高(从1.00升高到5.34)。硫辛酸 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 加入细胞中预孵育0.5 h后,  $F_t/F_0$ 的值明显降低(从5.34降到1.80), 说明硫辛酸可以明显减少氧化应激状态下NO的生成。

#### 2.4 硫辛酸对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 损伤的PC12细胞NF- $\kappa$ B p65、iNOS mRNA表达的影响

RT-PCR 检测结果显示,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 作用4~5 h后, 和正常细胞比较, NF- $\kappa$ B p65 和 iNOS mRNA 均上



**图2** 硫辛酸对氧化应激的PC12细胞iNOS和NF- $\kappa$ B p65 mRNA表达的影响

A-RT-PCR产物凝胶电泳图; B-对凝胶电泳图的定量分析结果; iNOS和NF- $\kappa$ B p65 mRNA的表达水平和 $\beta$ -actin mRNA进行比较并表示为平均值 $\pm$ 标准差, 正常组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$ 组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$

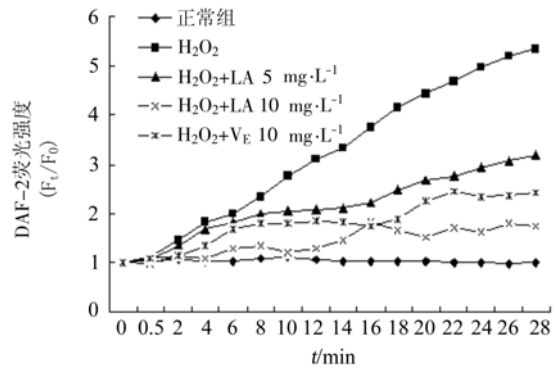
**Fig 2** Effects of LA on the expressions of iNOS and NF- $\kappa$ B p65 mRNA in oxidative stress -induced PC12 cells

A-photograph of agarose gel electrophoresis of RT-PCR results; B-quantification of photograph of agarose gel electrophoresis. Levels of iNOS and NF- $\kappa$ B p65 mRNA were normalized to  $\beta$ -actin level and expressed as the mean $\pm$ SD. Compared with Normal group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with  $\text{H}_2\text{O}_2$  group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$

### 3 讨论

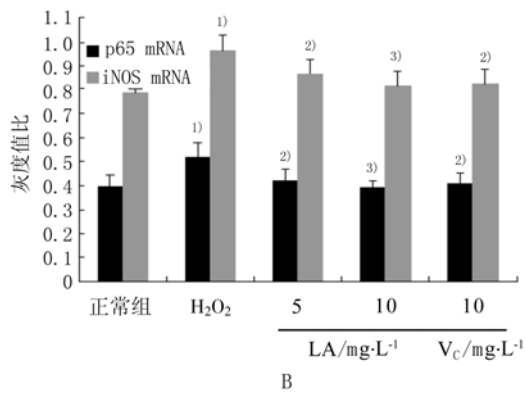
在氧化应激诱导的细胞损伤的通路中, 人们通常关心线粒体损伤的凋亡通路, 如细胞膜电位下降, Caspase-3激活、CytC释放、Bax和Bcl-2等的表达等。近年来, NF- $\kappa$ B-iNOS-NO通路已引起广泛关注, 研究表明, 炎症反应和氧化应激相互影响, 参与细胞损伤过程, 其共同的枢纽可能是NF- $\kappa$ B<sup>[5-6]</sup>。NF- $\kappa$ B是普遍存在于细胞浆中以p50/p65异二聚体形式的一种快反应转录因子, 与其抑制性蛋白(inhibitor kappa B, I $\kappa$ B)结合而呈非活性状态, 它可以被TNF- $\alpha$ 、氧化剂、脂多糖和自由基等多种刺激剂激活转位入核与靶基因的 $\kappa$ B位点结合, 诱导许多因子如iNOS、MnSOD、COX-2等的转录, 高表达的iNOS可以催化L-精氨酸产生NO, 高浓度的NO能

调( $P<0.01$ )。但给予 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  LA后, NF- $\kappa$ B p65 和 iNOS mRNA 均下调( $P<0.01$ ), 见图2。



**图1** 硫辛酸对氧化应激的PC12细胞内一氧化氮动态变化的影响

**Fig 1** The effect of LA on time course of intracellular NO in oxidative stress -induced PC12 cells



抑制多种与线粒体电荷传递系统及柠檬酸循环有关的酶, 作用于这些酶共有的催化活性中心-非血红素硫铁复合物, 最终抑制线粒体呼吸。另外, NO分子可以与超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )反应, 生成超氧亚硝酸阴离子( $\text{ONOO}^-$ ), 并降解为OH、 $\text{NO}_2$ 自由基, 从而引起强烈的神经毒性, 甚至导致神经细胞的死亡<sup>[7]</sup>。

本试验用 RT-PCR 的方法检测氧化应激时PC12细胞内NF- $\kappa$ B p65和iNOS基因的表达来间接说明NF- $\kappa$ B和iNOS的活性, 用激光共聚焦技术检测细胞内NO的浓度, 结果定量准确。研究表明, 氧化应激时NF- $\kappa$ B p65和iNOS基因明显上调, 细胞内NO的浓度明显升高, 说明三者密切相关。但在氧化应激时给予硫辛酸, NF- $\kappa$ B p65和iNOS基因明显下调, 细胞内NO的浓度明显下降, 说明硫

辛酸可以通过下调 NF- $\kappa$ B p65 和 iNOS 基因, 减少 NF- $\kappa$ B 和 iNOS 的表达来抑制 NO 的生成, 最终减轻氧化应激诱导的 PC12 细胞损伤, 有关硫辛酸对线粒体损伤的凋亡通路的影响将另文发表。

## REFERENCES

- [1] HOLMQUIST L, STUCHBURY G, BERBAUM K, et al. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias [J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 113(1): 154-164.
- [2] ZHANG X H, ZHANG S M, ZHANG L, et al. A study of the neuroprotective effect of the phenolic glucoside gastrodin during cerebral ischemia *in vivo* and *in vitro* [J]. *Planta Med*, 2006, 72(1):1-7.
- [3] SANDEEP C, SARVESH J, DEBASHREE M, et al. Activation of the adenosine A<sub>1</sub> receptor inhibits HIV-1 tat-induced apoptosis by reducing nuclear factor- $\kappa$ B activation and inducible Nitric-Oxide Synthase [J]. *Molecular Pharmacology*, 2007, 72(4): 855-867.
- [4] QU X Y, MEI H F, ZHU Q F. Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on expression of the PC12 cell gene par-4 and NF- $\kappa$ B P65[J]. *J Apoplexy and Nervous Diseases*(中风与神经疾病杂志), 2004, 21(4): 335-337.
- [5] BALDWIN A J. Series introduction:the transcription factor NF-kappaB and human disease[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(1): 3-6.
- [6] MCCABE C, SAMALI A, O'BRIEN T. Beta cell cytoprotective strategies: establishing the relative roles for iNOS and ROS [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(4): 1240-1248.
- [7] LIPTON S A, CHOI Y B, Pan Z H, et al. A redox-based mechanism for neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds [J]. *Nature*, 1993, 364(6438): 626-632

收稿日期: 2008-09-01