

- [10] Chung E, Yoon T G, Kim S, *et al.* Intravenous administration of substance P attenuates mechanical allodynia following nerve injury by regulating neuropathic pain-related factors[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2017, 25(3): 259-265.
- [11] Wang J A, Niu S N, Luo F. Pulsed radiofrequency alleviated neuropathic pain by down-regulating the expression of substance P in chronic constriction injury rat model[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2020, 133(2): 190-197.
- [12] Kanda H, Kobayashi K, Yamanaka H, *et al.* Localization of prostaglandin E2 synthases and E-prostanoid receptors in the spinal cord in a rat model of neuropathic pain[J]. *Brain Res*, 2021, 1750: 147153.
- [13] De Logu F, Nassini R, Materazzi S, *et al.* Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1887.
- [14] Wei Z Y, Fei Y, Su W F, *et al.* Emerging role of schwann cells in neuropathic pain: receptors, glial mediators and myelination [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 116.

灵芝提取物对帕金森病模型细胞凋亡的保护作用

黄 茜¹, 任志丽^{2*}

(1. 重庆城市管理职业学院智慧康养学院, 重庆 401331; 2. 首都医科大学宣武医院, 国家老年疾病临床医学研究中心, 北京 100053)

摘要:目的 研究灵芝提取物对帕金森病模型细胞凋亡的保护作用。方法 采用 CCK-8 法检测细胞活性, JC-1 染色倒置显微镜检测细胞线粒体膜电位, 试剂盒检测细胞 ROS 水平, 细胞免疫荧光双重染色方法观察细胞色素 C 的表达与定位情况, Western blot 法检测 caspase-3、caspase-9 活化和前体形式蛋白表达。结果 灵芝提取物不影响 neuro-2a 细胞的生长与增殖。采用 1 mmol/L MPP⁺ 损伤作用持续 48 h, 当灵芝提取物浓度为 800 μg/mL 时, 细胞活性增加 ($P < 0.05$)。MPP⁺ 可造成 neuro-2a 细胞线粒体膜电位下降, 而灵芝提取物可以改善 MPP⁺ 对 neuro-2a 细胞线粒体膜电位造成的影响, 并抑制 ROS 的聚集。与模型组比较, 灵芝提取物能抑制 MPP⁺ 诱导的细胞色素 C 从线粒体的释放, 降低相同时间段内 cleaved-caspase-3/pro-caspase-3、cleaved-caspase-9/pro-caspase-9 比值。结论 灵芝提取物能抑制 MPP⁺ 诱导的 neuro-2a 细胞凋亡, 其作用机制可能与维持线粒体正常膜电位, 稳定线粒体功能, 降低 cleaved-caspase-3/pro-caspase-3、cleaved-caspase-9/pro-caspase-9 比值有关。

关键词: 灵芝; 帕金森病; 细胞凋亡; 神经保护

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-1973-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.045

帕金森病是中老年人常见的神经退行性疾病之一,也是中老年人最常见的运动功能障碍性疾病,其主要病理特点为黑质纹状体通路的多巴胺能神经元发生退行性病变减少和死亡,使神经递质多巴胺水平下降,主要临床表现为运动功能障碍,包括静止性震颤、运动迟缓、肌张力增高和姿势不稳等^[1]。目前治疗帕金森病的药物大多通过增加脑内多巴胺水平或模拟多巴胺效应来控制症状,但长期服用存在较大的不良反应,并在使用一定时间后会出现疗效减退及远期副作用。

我国传统中药灵芝,被历代医药家尊为“滋补强壮、扶正固本”的神奇珍品,对人体具有双向调节作用,涉及

心脑血管、消化、神经、内分泌、呼吸、运动等系统,尤其对肿瘤、肝脏病变、失眠、衰老的防治作用最为显著^[2-4]。研究发现,灵芝多糖的抗氧化作用,可以减轻神经毒素对多巴胺能神经元的损伤^[5-6]。

本研究将采用小鼠神经瘤细胞 neuro-2a,通过多巴胺能特异性神经毒素 MPP⁺ 损伤,抑制线粒体复合物 I,观察灵芝提取物对 MPP⁺ 损伤线粒体功能的影响,并从细胞凋亡的角度探究灵芝可能发挥的作用机制。

1 材料

1.1 细胞 neuro-2a 小鼠脑神经瘤细胞,购于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

收稿日期: 2021-07-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81903822)

作者简介: 黄 茜 (1982—),女,博士,讲师,从事血发生及其调控、老年医学基础研究。Tel: 13388984450, E-mail: 474488100@qq.com

* 通信作者: 任志丽 (1983—),女,博士,助理研究员,从事神经药理学研究。Tel: 18911628881, E-mail: renzhili2011@163.com

1.2 试剂与药物 灵芝提取物由培力(南宁)药业有限公司提供,批号为A1800775,其中灵芝多糖约为98.1 mg/g,占10%。1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺),购于美国Sigma公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)购于日本Dojindo公司;JC-1线粒体膜电位检测试剂盒,购于美国Biotium公司;活性氧检测试剂盒、ATP检测试剂盒,购于上海碧云天生物技术有限公司;Cytochrome C抗体,购于英国Abcam公司;caspase-3抗体、caspase-9抗体,购于美国Cell Signaling Technology公司。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 用含有10%胎牛血清的DMEM培养基培养neuro-2a小鼠脑神经瘤细胞,并置于37℃、5%CO₂的培养箱中培养。按照1:3比例传代,2~4 d传1代。利用细胞计数板调整细胞密度,将细胞接种于合适的培养皿或培养板中。实验共分3组,正常组(加入PBS和灵芝提取物溶解介质)、模型组(加入1 mmol/L溶于PBS的MPP⁺和相应体积的灵芝提取物溶解介质)、灵芝提取物组(加入1 mmol/L溶于PBS的MPP⁺和800 μg/mL溶解于相应培养基的灵芝提取物)。

2.2 细胞活性检测 收集对数生长期neuro-2a细胞,调整细胞密度为1×10⁵/mL,每孔100 μL接种于96孔板(边缘孔用相应培养基填充)。5%CO₂、37℃孵育至细胞稳定贴壁,细胞单层铺满孔底时,各孔加入相应药物,并设置3~5个复孔。同时设置调零孔(培养基),对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养基)。重新更换培养基,小心吸除孔内培养液,每孔加入100 μL用相应培养基新鲜配制的CCK-8溶液,于培养箱继续孵育2 h,采用1 mmol/L MPP⁺培养48 h,同时给予100、200、400、800 μg/mL灵芝提取物,使用酶标仪在450 nm波长处检测吸光度,计算细胞存活率。

2.3 线粒体膜电位检测 取对数生长期的neuro-2a细胞进行线粒体膜电位(MMP)观察,调整细胞密度为2×10⁵/mL,分组及培养方法同“2.1”项,置于37℃、5%CO₂培养箱培养12 h后,进行JC-1荧光染色。首先将含有10%FBS的DMEM高糖培养基预先平衡至室温,用相应培养基稀释荧光染料JC-1至1×,吸弃培养板中培养基,PBS清洗1次,每孔加入200 μL含有JC-1的培养基,放入培养箱孵育30 min,弃培养基,PBS清洗2次,去除未结合的荧光染料,荧光倒置显微镜下观察并采集图像。

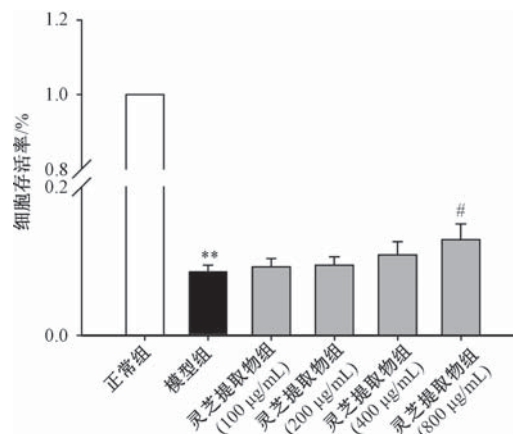
2.4 细胞免疫荧光染色 细胞按“2.1”项下方法进行分组给药培养12 h后,将培养基吸出后,PBS清洗3次,4%多聚甲醛固定15~30 min,0.3% Triton X-100和0.01 mol/L PBST清洗3次,滴加10%胎牛血清封闭液,室温封闭1 h,倾去,勿洗,滴加一抗[cytochrome C(1:400),LC3B(1:1 000)],4℃孵育过夜,PBS清洗3次,每次10 min;滴加二抗,37℃孵育1 h,PBS清洗3次,每次10 min,滴加DAPI复染,作用1 min,再滴加抗荧光淬灭封片剂。激光共聚焦扫描显微镜下观察并采集图像。

2.5 Western blot法检测相关蛋白表达 收集各组细胞,用RIPA裂解液提取蛋白,并测定蛋白浓度。采用SDS-PAGE凝胶电泳后,进行转膜,PVDF膜,200 mA恒电流转1.5 h,加入5%脱脂奶粉常温封闭2 h,去除封闭液,加入一抗,4℃过夜孵育,TBST洗膜,加入相应二抗,室温孵育1 h,使用ECL发光法显影,目的蛋白相对表达量以目的条带灰度值与β-actin灰度值的比值表示。

2.6 统计学分析 通过SPSS 11.5软件进行处理,SigmaPlot绘图软件作图,结果以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 灵芝提取物对MPP⁺诱导neuro-2a细胞活性的影响 与正常组比较,模型组neuro-2a细胞活性降低($P < 0.01$);与模型组比较,800 μg/mL灵芝提取物组neuro-2a细胞活性升高($P < 0.05$),见图1。提示灵芝提取物能够提高MPP⁺诱导的neuro-2a细胞活性。



注:与正常组比较,** $P < 0.01$,与模型组比较,# $P < 0.05$ 。

图1 灵芝提取物对MPP⁺诱导neuro-2a细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 灵芝提取物对MPP⁺诱导的neuro-2a细胞线粒体膜电位的影响 正常组除极少数细胞被染绿色外,红色荧光几乎布满整个视野,表明正常细胞线粒体膜电位较高,JC-1以聚合物的形式存在于线粒体膜内,红色荧光多且亮;与正常组比较,模型组neuro-2a细胞JC-1从线粒体内释放,浓度降低,逆转为发射绿色荧光的单体形式,线粒体跨膜电位去极化,并且随着损伤时间的延长,红色荧光逐渐减少,绿色荧光逐渐增加,最终几乎全部细胞都被染为绿色,表明线粒体膜电位降低,线粒体遭到严重破坏;与模型组比较,灵芝提取物组neuro-2a细胞线粒体膜电位水平升高,表现为红色荧光的增加和绿色荧光的减少,见图2。提示灵芝提取物可以增加MPP⁺诱导的neur-2a细胞线粒体膜电位。

3.3 灵芝提取物对MPP⁺诱导的neuro-2a细胞线粒体色素C的影响 正常组细胞内细胞色素C的绿色荧光与标记线粒体的红色荧光基本重叠,表明细胞色素C与线粒体共定位^[7];模型组细胞内细胞色素C的绿色荧光呈弥散状态,

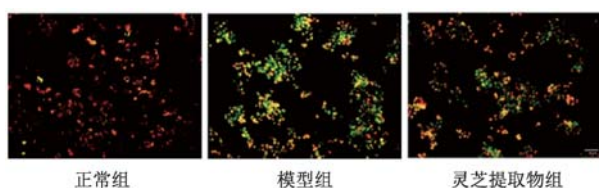


图 2 灵芝提取物对 MPP⁺ 诱导的 neuro-2a 细胞线粒体膜电位的影响 (×200)

与线粒体红色荧光不能共定位,表明细胞色素 C 从线粒体释放;灵芝提取物组细胞内这种“不共定位”的情况有所改善,见图 3。提示 MPP⁺ 可以诱导 neuro-2a 细胞产生凋亡反应,并且灵芝提取物可以抑制 MPP⁺ 诱导的细胞色素 C 从线粒体的释放。

3.4 灵芝提取物对 MPP⁺ 诱导的 neuro-2a 细胞 cleaved-caspase-3/pro-caspase-3、cleaved-caspase-9/pro-caspase-9 表达的影响 与正常组比较,模型组 neuro-2a 细胞 cleaved-caspase-3/pro-caspase-3、cleaved-caspase-9/pro-caspase-9 表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,灵芝提取物组 neuro-2a

细胞 cleaved-caspase-3/pro-caspase-3、cleaved-caspase-9/pro-caspase-9 表达降低 ($P<0.01$),见图 4。

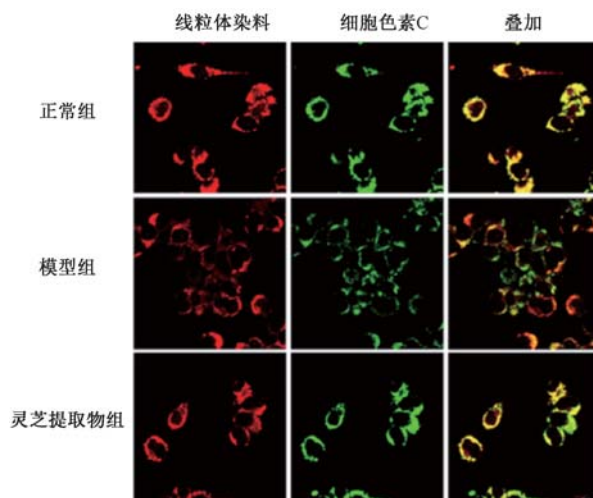
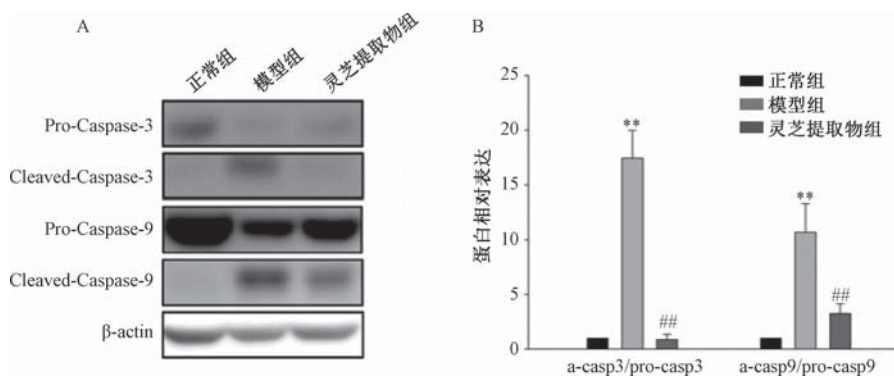


图 3 灵芝提取物对 MPP⁺ 诱导的 neuro-2a 细胞线粒体色素 C 的影响 (×400)



注:与正常组比较,** $P<0.01$,与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图 4 灵芝提取物对 MPP⁺ 诱导的 neuro-2a 细胞 caspase-3、caspase-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

MPP⁺能造成线粒体损伤^[8],因此本研究选用 MPP⁺ 诱导的细胞凋亡。ATP 的合成是线粒体功能的核心,起着至关重要的作用,特别是线粒体的产生及其生理功能在调节神经递质的传递以及维持突触可塑性方面尤为重要^[9-10]。帕金森病患者脑中多巴胺能神经元细胞的丢失程度与这些细胞组中 caspase-3 阳性神经元的百分比呈正相关,这种关联在帕金森病动物模型中亦可观察到,这表明表达 caspase-3 的神经元比那些不表达的神经元对病理损伤过程更敏感。另外,电子显微镜观察表明, caspase-3 激活先于帕金森病并且不是帕金森病中凋亡细胞死亡的结果^[11]。

细胞凋亡是导致黑质纹状体多巴胺能神经元丢失的主要原因^[12-13],与自噬对细胞存活的双向调节作用不同,凋亡对细胞死亡的调节是单向性的,它能及时主动清除机体衰老及异常细胞发挥清道夫作用^[14]。MPP⁺ 作用后,引起 caspase-3、caspase-9 活化,表现为活化亚基水平升高,因此,初步判断 caspase 家族在 MPP⁺ 介导的细胞凋亡过程中

起着重要作用,其中 caspase-3 为关键的执行分子,它在凋亡信号传导的许多途径中发挥功能。caspase-3 正常以酶原 (32 kDa) 的形式存在于胞浆中,在凋亡早期阶段被激活,活化的 caspase-3 由 2 个大亚基 (17 kDa) 和 2 个小亚基 (12 kDa) 组成,裂解相应的胞浆核底物,最终导致细胞凋亡。本研究通过采用 MPP⁺ 损伤线粒体,导致细胞内线粒体膜电位下降和细胞色素 C 释放,从而促进 caspase 通路介导的细胞凋亡。使用灵芝提取物干预后,不同程度、不同方面减轻了线粒体损伤,从而抑制了细胞凋亡,可能对于提高多巴胺能神经元生存率或者改善微环境具有特殊的意义^[15],也对于灵芝今后在帕金森病的应用和开发利用有着一定的借鉴作用。

参考文献:

- [1] Schapira A H, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2011, 26 (6): 1049-1055.
- [2] Boh B. *Ganoderma lucidum*: a potential for biotechnological

- production of anti-cancer and immunomodulatory drugs [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2013, 8(3): 255-287.
- [3] Kladar N V, Gavaric N S, Božin B N. Ganoderma: insights into anticancer effects[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2016, 25(5): 462-471.
- [4] Wang X, Lin Z B. Immunomodulating effect of *Ganoderma* (Lingzhi) and possible mechanism [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1182: 1-37.
- [5] Guo S S, Cui X L, Rausch W D. *Ganoderma lucidum* polysaccharides protect against MPP (+) and rotenone-induced apoptosis in primary dopaminergic cell cultures through inhibiting oxidative stress[J]. *Am J Neurodegener Dis*, 2016, 5 (2): 131-144.
- [6] Cui X Y, Zhang Y H. Neuropharmacological effect and clinical applications of *Ganoderma* (Lingzhi) [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1182: 143-157.
- [7] Zhu D H, Lai Y Z, Shelat P B, et al. Phospholipases A2 mediate amyloid-beta peptide-induced mitochondrial dysfunction [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(43): 11111-11119.
- [8] Liu Y J, Yue F, Tang R P, et al. Progressive loss of striatal dopamine terminals in MPTP-induced acute parkinsonism in cynomolgus monkeys using vesicular monoamine transporter type 2 PET imaging ([(18) F] AV-133) [J]. *Neurosci Bull*, 2014, 30(3): 409-416.
- [9] Perier C, Vila M. Mitochondrial biology and Parkinson's disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2 (2): a009332.
- [10] Beal M F. Therapeutic approaches to mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2009, 15 Suppl 3: S189-S194.
- [11] Hartmann A, Hunot S, Michel P P, et al. Caspase-3: a vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(6): 2875-2880.
- [12] Liu J, Liu W J, Yang H. Balancing apoptosis and autophagy for parkinson's disease therapy: targeting BCL-2 [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(2): 792-802.
- [13] Huang Q, Zhu X Q, Xu M. Silencing of TRIM10 alleviates apoptosis in cellular model of Parkinson's disease[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 518(3): 451-458.
- [14] Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders [J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 112: 24-49.
- [15] Jang Y C, Hwang D J, Koo J H, et al. Association of exercise-induced autophagy upregulation and apoptosis suppression with neuroprotection against pharmacologically induced Parkinson's disease [J]. *J Exerc Nutrition Biochem*, 2018, 22(1): 1-8.