

过表达 TRX-1 通过调控 Nrf2/HO-1 通路 影响帕金森病 PC12 细胞凋亡

甘露, 周弟弥, 张磊, 陈琳

摘要 目的 探讨过表达 TRX-1 在帕金森病 PC12 细胞中通过调控 Nrf2/HO-1 通路对细胞凋亡的影响。方法 用 1-甲基-4-苯基-吡啶离子 (MPP⁺) 诱导 PC12 细胞建立帕金森病细胞模型。将 pcDNA-hTRX-1 质粒转染至 PC12 细胞中, qRT-PCR 检测 TRX-1 mRNA 的表达。采用 MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡率以及细胞内活性氧水平, Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、细胞色素 c (Cyt-c)、裂解 Caspase-3 (cleaved Caspase-3) 和氧化应激相关蛋白 Nrf2 和 HO-1 的表达。结果 TRX-1 在帕金森病 PC12 细胞中低表达; 过表达 TRX-1 能提高帕金森病 PC12 细胞活力, 抑制细胞凋亡, 并且能激活 Nrf2/HO-1 通路。结论 过表达 TRX-1 能通过激活 Nrf2/HO-1 通路进而抑制帕金森病 PC12 细胞的凋亡。

关键词 TRX-1; 帕金森病; 细胞凋亡; Nrf2/HO-1 通路

中图分类号 R 741

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1079-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.018

2020-04-20 接收

基金项目: 湖南省医药卫生科研计划项目(编号: B2014-056)

作者单位: 南华大学附属第二医院神经内科, 衡阳 421001

作者简介: 甘露, 男, 硕士;

陈琳, 女, 副主任医师, 副教授, 责任作者, E-mail: chenlin6766@yeah.net

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是继阿尔茨海默病之后常见的与年龄相关的神经退行性疾病。PD在神经病理学上的特征是多巴胺能神经元的逐渐死亡和纹状体多巴胺含量降低^[1]。然而,多巴胺能神经元死亡的分子机制仍不清楚。有研究者提出了假设,神经细胞死亡的主要原因是线粒体功能障碍和随后的氧化应激^[2]。氧化应激下会过度产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)而导致脂质和蛋白质的过氧化、核酸的氧化及DNA的分解,进一步促进细胞损伤。转录因子核因子红系衍生的核因子相关因子2(nuclear factor-erythroid2 related factor 2, Nrf2)是调节细胞氧化应激反应的关键蛋白。在非应激条件下, Nrf2被细胞质中的Kelch样环氧丙烷相关蛋白-1(Kelch like ECH associated protein 1, Keap1)锚定,并被泛素-蛋白酶体途径降解。一旦细胞受到氧化损伤, Nrf2就会从Keap1释放并转移到细胞核,与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合,激活抗氧化基因的转录,其中血红素氧合酶-1(Heme oxygenase-1, HO-1)是关键抗氧化酶。Nrf2/HO-1信号通路是细胞氧化应激过程中的保护性分子机制^[3]。硫氧还蛋白-1

Caspase-3 and the expression of VEGF and Vimetin. The expression of Survivin and Bcl-2/Bax genes was detected by RT-PCR. The histopathological morphology of liver, lung and kidney was observed by HE staining. Western blot was used to detect the expression of motility and EMT markers E-cadherin, N-cadherin and Fibronectin, as well as phosphorylation of AKT and STAT3. **Results** Compared with the control group, the volume and weight of melanomas in the low, medium and high dose groups of Crocin decreased ($P < 0.05$); the number of Ki67, VEGF and Vimetin positive cells decreased ($P < 0.05$), while the number of Caspase-3 positive cells increased ($P < 0.05$); the expression of Survivin mRNA decreased ($P < 0.05$); the expression of Fibronectin protein decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of Bcl-2/Bax mRNA in the middle and high dose groups decreased ($P < 0.05$); the expression levels of E-cadherin and N-cadherin decreased ($P < 0.05$); the phosphorylation levels of AKT and STAT3 decreased ($P < 0.05$); Crocin alleviated the tissue damage of liver, lung and kidney. **Conclusion** By inhibiting the phosphorylation of AKT and STAT3, Crocin can reduce the pathomorphological changes of liver, lung and kidney tissues, and inhibit the growth and movement of A375 melanoma, suggesting that saffron has a relieving effect on A375 melanoma. Saffron can be used as an effective and safe non-toxic regulator to prevent and treat melanoma.

Key words crocin; AKT; STAT3; melanoma; organ lesions

(thioredoxin-1, TRX-1) 具有调节氧化还原、激活转录因子和防治 PD^[4] 等多种生物学活性。在不同的抗氧化剂中, TRX 与 TRX 还原酶和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 共同构成了一个系统, 调节细胞的氧化还原状态^[5]。但 TRX-1 是否通过 Nrf2/HO-1 通路防治 PD 尚未明确。该研究探讨了过氧化 TRX-1 对 1-甲基-4-苯基-吡啶离子(1-methyl-4-phenyl-pyridine, MPP⁺) 处理的 PC12 细胞的抗凋亡作用以及 Nrf2/HO-1 信号通路在这一过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞(美国模式培养物集存库, American type culture collection, ATCC); 胎牛血清(杭州四季青公司); Lipofectamine 2000 脂质体(美国 Invitrogen 公司); 活性氧试剂盒(北京索莱宝公司); MTT 试剂盒(上海碧云天公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 Sigma-Aldrich); 逆转录试剂盒(大连宝生物公司); 电泳凝胶成像分析系统(美国 BIO RAD 公司)

1.2 细胞培养及实验分组 PC12 细胞培养在含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 加入 100 U/mL 青霉素和 100 μg/ml 链霉素以及 2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺, 置于 5% 湿度, 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中培养, 每隔 2~3 d 更换 1 次培养基, 每周传代 2 次。取对数生长期的细胞用于后续的实验检测。根据实验细胞分为 3 组: 对照组, 空载组以及过表达组。对照组的 PC12 细胞经 500 μmol/L MPP⁺ 处理 24 h, 空载组的 PC12 模型细胞经脂质体 Lipofectamine 2000 转入 pcDNA-EV 空载体, 过表达组的 PC12 模型细胞经脂质体 Lipofectamine 2000 转入 pcDNA-hTRX-1 过表达载体。

1.3 过表达 TRX-1 载体的制备及转染 在 NCBI 上选择将其克隆连接至载体 pcDNA 上, 形成 pcDNA-hTRX-1 载体质粒, 经 Lipofectamine 2000 脂质体转入 PC12 模型细胞中。同时, 将 pcDNA-EV 空载质粒也转染到 PC12 模型细胞中用作阴性对照组(EV 组)。

1.4 定量即时聚合酶链锁反应(qRT-PCR) 检测 TRX-1 mRNA 的表达 从 PC12 细胞中提取总 RNA。根据逆转录试剂盒的说明书操作, 使用逆转录试剂盒(美国 invitrogen 公司) 将每个样本中的 1 μg RNA 逆转录到 cDNA, 并通过聚合酶链反应

(PCR) 扩增目的片段。TRX-1 特异性引物序列: 正义引物 5'-CGGAATT CATGGTGAAG-CAGATCGAGAGC-3', 反义引物 5'-CGGGATC-CGATTAGACTA ATTCATTAATG-3', β-actin 引物序列: 正向引物 5'-ATGGGCCACAGTCCGAC-3', 反义引物 5'-GGTAGGGTATGGCGTGGG-3'。PCR 反应程序: 95 °C 持续 5 min; 然后 95 °C 持续 40 s, 58 °C 持续 40 s, 72 °C 持续 1 min, 共进行 35 个循环, 最后在 72 °C 延伸 10 min。将扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离检测。

1.5 MTT 比色法检测细胞增殖 将各组细胞置于 96 孔板上培养至 5 × 10⁴ 个/ml 细胞密度, 每孔加入 10 μl 5 mg/ml 的 MTT 溶液, 再在 37 °C 恒温培养箱下培养 4 h, 然后小心去除培养基。加入 100 μl DM-SO 溶液溶解被还原出的水不溶性的蓝紫色结晶甲瓨, 再用酶标仪检测每孔溶液在波长 490 nm 处的 OD 值。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡及 ROS 水平 取生长状态良好的 PC12 细胞, 按活性氧检测试剂盒说明书进行操作, 利用荧光探针 DCFH-DA 测量细胞过氧化物水平, 再用流式细胞术检测强绿色荧光物质 DCF 的荧光信号值变化。将对数期的 PC12 细胞在 4 °C 离心机中经 3 500 r/min 离心 5 min 后, 用预冷的磷酸盐缓冲液洗涤 3 次, 再用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡率。

1.7 Western blot 检测细胞相关蛋白的表达 取对数期细胞, 加入核蛋白裂解液后刮取蛋白, 然后用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度, 再将蛋白置于沸水浴中变性 10 min。制备合适浓度的 SDS-PAGE 胶, 将提取出的蛋白上样后电泳, 再湿转到 PVDF 膜上。用 5% 的牛奶封闭 30 min 后, 加入一抗 anti-Bcl-2、anti-Bax、anti-Cyt-c、anti-cleaved Caspase-3、anti-Nrf2、anti-HO-1、NAPDH, 置于 4 °C 孵育过夜。再加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 2 h 后, 加入 ECL 化学发光液曝光, 最后使用 Image J 软件分析膜上蛋白条带的灰度值。

1.8 统计学处理 本实验采用 SPSS 19.00 统计软件对数据进行统计分析, 所有的数据均用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 来表示。组间数据差异分析采用单因素方差分析方法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TRX-1 在 3 组 PC12 细胞中的表达 通过 qRT-PCR 检测 3 组 PC12 细胞中 TRX-1 mRNA 的表

达水平 结果显示与对照组 (0.96 ± 0.19) 和空载组 (1.03 ± 0.42) 比较,过表达组 (4.32 ± 0.61) 的 PC12 细胞中 TRX-1 的 mRNA 水平升高,差异有统计学意义 ($F = 55.93, P < 0.05$),该结果说明成功构建并转染了过表达 TRX-1 质粒。

2.2 过表达 TRX-1 对帕金森病 PC12 细胞增殖的影响 通过 MTT 法检测了 PC12 中过表达 TRX-1 对细胞增殖的作用。与对照组 (48 h: 157.32 ± 15.64 ; 72 h: 215.93 ± 9.78) 和空载组 (48 h: 155.70 ± 50.46 ; 72 h: 200.77 ± 8.43) 比较,过表达组 (48 h: 198.21 ± 16.72 ; 72 h: 277.15 ± 10.10) 的 PC12 细胞增殖率升高,差异有统计学意义 (48 h: $F = 5.54, P < 0.05$; 72 h: $F = 54.77, P < 0.05$)。见图 1。

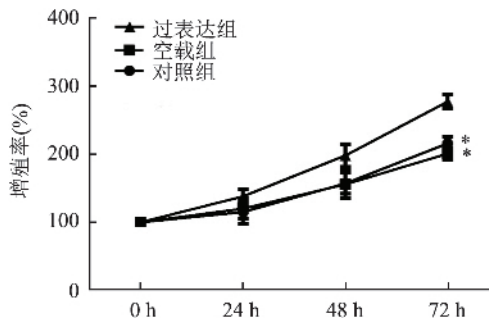


图 1 MTT 法检测过表达 TRX-1 对帕金森病 PC12 细胞增殖的影响
与过表达组比较: * $P < 0.05$

2.3 过表达 TRX-1 对帕金森病 PC12 细胞凋亡的影响 通过流式细胞术检测了过表达 TRX-1 对帕金森病 PC12 细胞凋亡的影响。与对照组 (33.92 ± 2.87) 和空载组 (32.75 ± 1.85) 比较,过表达组 (10.23 ± 2.03) 的细胞凋亡率降低,差异有统计学意义 ($F = 101.72, P < 0.05$)。并且通过 Western blot 检测了凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Cyt-c 及 cleaved Caspase-3 的表达水平 (图 2)。与对照组 (Bax/Bcl-2: 2.94 ± 0.21 ; Cyt-c: 0.84 ± 0.10 ; cleaved Caspase-3: 0.64 ± 0.072) 和空载组 (Bax/Bcl-2: 2.72 ± 0.31 ; Cyt-c: 0.79 ± 0.095 ; cleaved Caspase-3: 0.59 ± 0.065) 比较,过表达组的 Bax/Bcl-2 比值 (0.32 ± 0.15)、Cyt-c (0.12 ± 0.033) 以及 cleaved Caspase-3 (0.097 ± 0.023) 蛋白的表达均降低,差异有统计学意义 (Bax/Bcl-2: $F = 116.82, P < 0.05$; Cyt-c: $F = 72.32, P < 0.05$; cleaved Caspase-3: $F = 81.57, P < 0.05$)。

2.4 过表达 TRX-1 对帕金森病 PC12 细胞氧化应激的影响 采用流式细胞术检测过表达 TRX-1 对帕金森病 PC12 细胞 ROS 的作用。与对照组

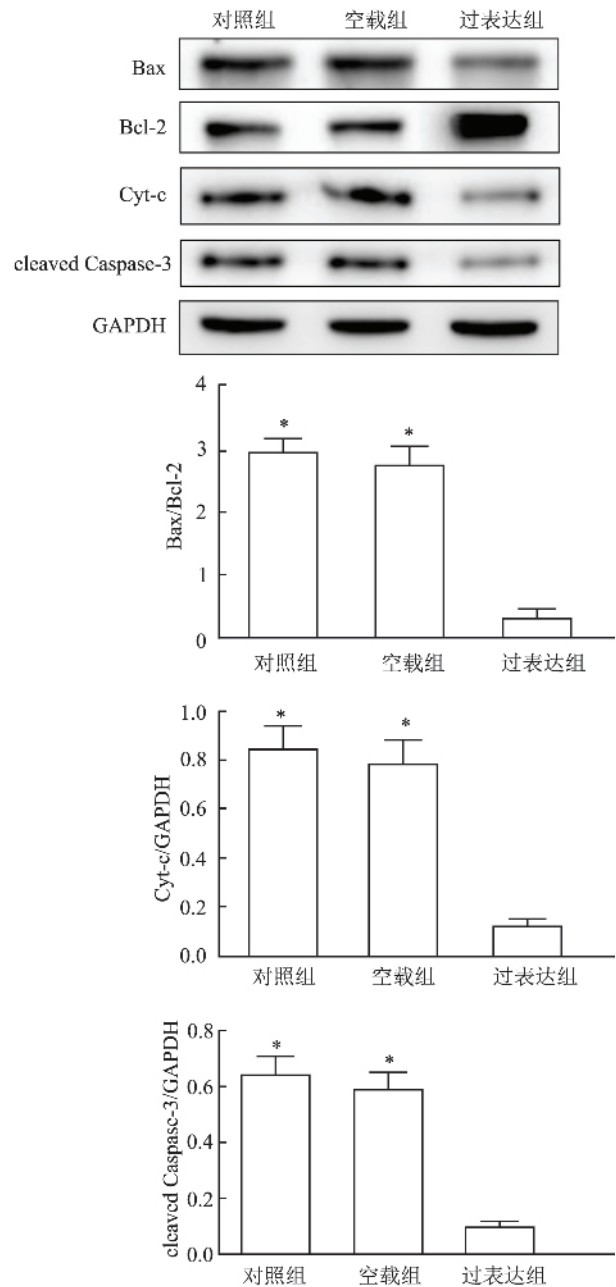


图 2 Western blot 检测过表达 TRX-1 对帕金森病 PC12 细胞凋亡相关蛋白的影响
与过表达组比较: * $P < 0.05$

(100.00 ± 3.42) 和空载组 (97.25 ± 5.30) 比较,过表达组 (38.33 ± 4.78) 的 PC12 细胞内 ROS 含量下降,差异有统计学意义 ($F = 185.53, P < 0.05$)。并且通过 Western blot 检测氧化应激相关 Nrf2/HO-1 通路蛋白的表达 (图 3)。与对照组 (Nrf2: 0.48 ± 0.11 ; HO-1: 0.88 ± 0.33) 与空载组 (Nrf2: 0.44 ± 0.16 ; HO-1: 0.91 ± 0.28) 比较,过表达组的细胞核 Nrf2 (1.35 ± 0.24) 和 HO-1 (1.73 ± 0.12) 蛋白的表达水平上升,差异有统计学意义 (Nrf2: $F = 24.97, P$

<0.05; HO-1: $F = 10.38$, $P < 0.05$)。

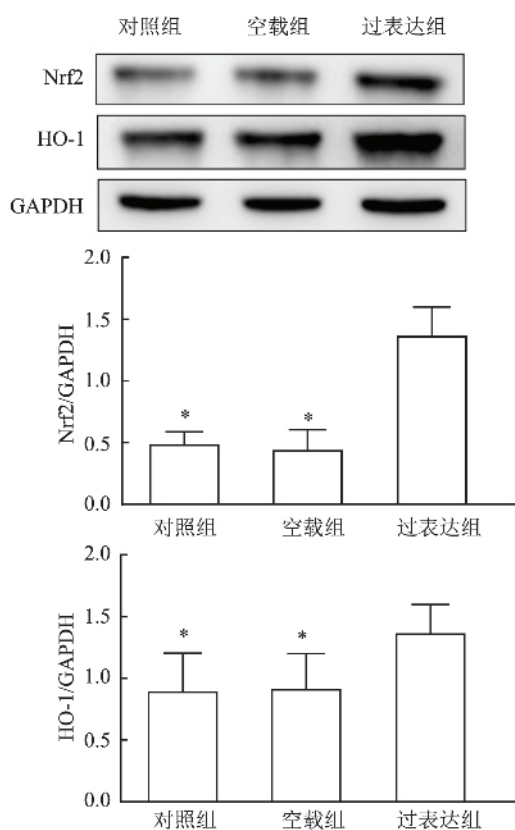


图3 Western blot 检测过表达 TRX-1 对帕金森病 PC12 细胞氧化应激 Nrf2/HO-1 通路相关蛋白的影响与过表达组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

迄今为止,PD 已经确定了几种遗传形式,PD 导致显性和隐性遗传性 PD,但环境因素也可能导致疾病风险。有证据表明氧化应激参与了 PD 病理学的进展^[6]。在 PD 大脑中观察到线粒体功能障碍和抗氧化能力下降,这些基础特性普遍用于模拟 PD 疾病相关的动物以及细胞实验^[7]。临床发现某些患者在意外遭到 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 中毒后,出现了帕金森病症状,随后研究发现了 1-甲基-4-苯基吡啶(1-methyl-4-phenyl-pyridine, MPP⁺) 是 MPTP 的代谢物,能进入黑质多巴胺能神经元中,抑制线粒体复合体和 ATP 的产生,最终导致多巴胺能神经元细胞凋亡^[8]。另外,大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞与原发性交感神经细胞具有许多共同细胞培养特性,在科研中常被用来建立 PD 细胞模型^[9]。本研究中采用了 MPP⁺ 诱导 PC12 细胞产生 PD 相关表型。

Bcl-2 蛋白家族是一个重要的细胞活性内源性调节因子,参与线粒体凋亡途径。Bcl-2 家族由抗凋亡蛋白(如 Bcl-2) 和促凋亡蛋白(如 Bax) 组成。在细胞凋亡过程中,细胞色素 c(Cyt-c) 从线粒体膜转移到胞质中,在胞质中激活 Caspase-3 (cleaved Caspase-3),其中 Caspase-3 是细胞凋亡的关键蛋白。在本研究中,过表达 TRX-1 调节了 Bcl-2 家族蛋白的水平(下调 Bax/Bcl-2 比值),抑制了 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞的 Cyt-c 释放和 cleaved Caspase-3 的产生。说明过表达 TRX-1 对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞具有保护作用,能有效促进 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞增殖,抑制凋亡。这与之前的研究^[10] 结果一致。线粒体参与细胞存活,并通过控制细胞能量代谢、ROS 的产生和凋亡因子释放到细胞质中,在细胞凋亡中起着中心作用。先前的研究^[11] 表明,ROS 参与了 MPP⁺ 诱导的神经细胞毒性及其相关凋亡机制。因此本研究也探讨了 TRX-1 与 ROS 在 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞凋亡中的关系。结果显示,过表达 TRX-1 可降低 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞凋亡中的 ROS 含量。

ROS 产生和抗氧化应激防御系统之间的不平衡可能对细胞产生高度有害的影响。Nrf2 作为参与细胞抗氧化反应的一种重要转录因子,与细胞中编码解毒酶的基因 HO-1 中的抗氧化反应元件结合。Nrf2 是抗氧化酶的重要介质,在细胞中提供了一种间接的方式来增强其抗氧化能力,从而防止细胞对自由基的反应功能障碍。在非氧化条件下,Nrf2 与 Keap1 结合,形成一个复合物,保留在细胞质中。在氧化损伤后,Nrf2 从 Keap1-Nrf2 复合物分离并转移到细胞核,结合并增强细胞对氧化应激的反应^[12]。在由 Nrf2 调控的靶基因中,HO-1 参与抗氧化反应。研究^[13] 表明,HO-1 在抗氧化损伤的神经保护功能中起着重要作用。此外,抗氧化酶 HO-1 的表达通过保护多巴胺能神经元发挥神经保护作用^[14]。因此,为了确定 Nrf2/HO-1 信号通路是否参与过表达 TRX-1 的神经保护作用,我们研究了过表达 TRX-1 处理的 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞中 Nrf2/HO-1 信号通路的变化。结果表明,在过表达 TRX-1 处理的 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞中,Nrf2 与 HO-1 蛋白表达水平均上调。

综上所述,本研究结果表明过表达 TRX-1 能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制 PD PC12 细胞的凋亡,进一步研究 TRX-1 可能成为治疗 PD 的潜在治疗靶点。

参考文献

- [1] Ozansoy M ,Başak A N. The central theme of Parkinson's disease: alpha-synuclein[J]. *Mol Neurobiol* ,2013 ,47(2): 460 - 5.
- [2] Islam M T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders[J]. *Neurol Res* ,2017 ,39(1): 73 - 82.
- [3] Barone M C ,Sykiotis G P ,Bohmann D. Genetic activation of Nrf2 signaling is sufficient to ameliorate neurodegenerative phenotypes in a *Drosophila* model of Parkinson's disease [J]. *Dis Model Mech* ,2011 ,4(5): 701 - 7.
- [4] Burke-Gaffney A , Callister M E , Nakamura H. Thioredoxin: friend or foe in human disease[J]. *Trends Pharmacol Sci* ,2005 , 26(8): 398 - 404.
- [5] Lu J ,Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system[J]. *Free Radic Biol Med* ,2014 ,66(8): 75 - 87.
- [6] Umeno A ,Biju V ,Yoshida Y. *In vivo* ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease , Parkinson's disease , and diabetes [J]. *Free Radic Res* ,2017 ,51(4): 413 - 27.
- [7] Segura-Aguilar J. On the role of aminochrome in mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in parkinson's disease[J]. *Front Neurosci* ,2019 ,13: 271.
- [8] Nakano M ,Imamura H ,Sasaoka N , et al. ATP maintenance *via* two types of ATP regulators mitigates pathological phenotypes in mouse models of parkinson's disease [J]. *EBioMedicine* ,2017 , 22: 225 - 41.
- [9] Dong H , Qin Y , Huang Y , et al. Poloxamer 188 rescues MPTP-induced lysosomal membrane integrity impairment in cellular and mouse models of Parkinson's disease [J]. *Neurochem Int* ,2019 , 126: 178 - 86.
- [10] Zhang X , Bai L , Zhang S , et al. TRX-1 ameliorates learning and memory deficits in MPTP-induced Parkinson's disease model in mice [J]. *Free Radic Biol Med* ,2018 ,124: 380 - 7.
- [11] Ko J H , Lee J H , Choi B , et al. Neuroprotective effects of gagam-sipjeondaebotang , a novel herbal formula , against MPTP-induced parkinsonian mice and MPP(+) -induced cell death in SH-SY5Y cells [J]. 2018 ,2018: 2420809.
- [12] Wakabayashi N , Dinkova-Kostova A T , Holtzclaw W D , et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,2004 ,101(7): 2040 - 5.
- [13] Liu Z , Yang C , Meng X , et al. Neuroprotection of edaravone on the hippocampus of kainate-induced epilepsy rats through Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Neurochem Int* ,2018 ,112: 159 - 65.
- [14] Quesada A , Ogi J , Schultz J , et al. C-terminal mechano-growth factor induces heme oxygenase-1-mediated neuroprotection of SH-SY5Y cells *via* the protein kinase CE/Nrf2 pathway [J]. *J Neurosci Res* ,2011 ,89(3): 394 - 405.

Overexpression TRX-1 affects apoptosis of PC12 cells in Parkinson's disease by regulating Nrf2/HO-1 pathway

Gan Lu , Zhou Dimi , Zhang Lei , et al

(Dept of Internal Medicine-Neurology ,The Second Affiliated Hospital of University of South China Hengyang 421001)

Abstract Objective To investigate the effect of TRX-1 overexpression on apoptosis in Parkinson's disease PC12 cells by regulating Nrf2/HO-1 pathway. **Methods** PC12 cells were induced by 1-methyl-4-phenyl-pyridine (MPP⁺) to establish Parkinson's disease cell model. The plasmid pcDNA-hTRX-1 was transfected into PC12 cells , and the expression of TRX-1 was detected by qRT-PCR. MTT assay was used to detect cell proliferation , flow cytometry was used to detect apoptotic rate and intracellular reactive oxygen species level. Then Western blot was used to detect the expression of apoptotic related proteins Bax , Bcl-2 , Cyt-c , cleaved Caspase-3 and oxidative stress related proteins Nrf2 and HO-1. **Results** TRX-1 was low expressed in Parkinson's disease PC12 cells , and over-expression of TRX-1 could improve the viability of Parkinson's disease PC12 cells , inhibit cell apoptosis , and significantly activate Nrf2/HO-1 pathway. **Conclusion** Over-expression of TRX-1 can inhibit the apoptosis of PC12 cells in Parkinson's disease by activating Nrf2/HO-1 pathway.

Key words TRX-1; Parkinson's disease; apoptosis; Nrf2/HO-1 pathway