

王立侠, 韩金芬. 枸杞多糖与 UCA1 siRNA 单用或合用对 MPP⁺诱导帕金森病细胞模型的干预作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 55-61.

Wang LX, Han JF. Mechanism of *Lycium barbarum* polysaccharide and UCA1 siRNA single or combined treatment in the MPP⁺-induced Parkinson's disease cell model [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(11): 55-61.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 11. 009

枸杞多糖与 UCA1 siRNA 单用或合用对 MPP⁺ 诱导 帕金森病细胞模型的干预作用及机制研究

王立侠^{1*}, 韩金芬²

(1.郑州市第七人民医院神经电生理室,郑州 450000;2.新乡医学院第三附属医院儿内科,河南 新乡 453003)

【摘要】 目的 探讨枸杞多糖与 UCA1 siRNA 单独或联合应用对 MPP⁺诱导的 SH-SY5Y 细胞增殖、凋亡的影响及机制。**方法** 使用 MPP⁺(终浓度为 0.25、0.5、1、2 mmol/L 的 MPP⁺处理细胞 24 h)、枸杞多糖(50、100、200、400 μg/mL 的枸杞多糖预处理细胞 1 h 后加 MPP⁺继续处理 24 h)处理 SH-SY5Y 细胞,选择最佳 MPP⁺(1 mmol/L)及枸杞多糖作用浓度(400 μg/mL)开展后续实验。实验分为对照组(细胞不经特殊处理)、MPP⁺组(1 mmol/L 的 MPP⁺处理细胞 24 h)、枸杞多糖组(LBP 组)(400 μg/mL 的枸杞多糖预处理细胞 1 h 后加 1 mmol/L 的 MPP⁺继续处理 24 h)、si-UCA1 组(1 mmol/L 的 MPP⁺处理细胞后转染 UCA1 siRNA)、枸杞多糖+si-UCA1 组。MTT 法检测细胞活力;流式细胞术检测细胞凋亡率、ROS 及膜电位水平。**结果** 与对照组比较,MPP⁺组细胞存活率、膜电位显著降低,细胞凋亡率、ROS 水平显著升高($P<0.05$)。与 MPP⁺组比较,LBP 组和 si-UCA1 组细胞存活率、膜电位显著升高,细胞凋亡率、ROS 水平显著降低($P<0.05$)。与 LBP 组或 si-UCA1 组比较,LBP+si-UCA1 组细胞存活率、膜电位显著升高,细胞凋亡率、ROS 水平显著降低($P<0.05$)。**结论** 枸杞多糖及抑制 UCA1 均可促进 MPP⁺诱导的 SH-SY5Y 细胞增殖,抑制凋亡,两者联合对细胞增殖、凋亡影响更显著,机制可能与抑制线粒体凋亡途径有关。

【关键词】 帕金森;枸杞多糖;长链非编码 RNA UCA1;凋亡;氧化应激;细胞模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 11-0055-07

Mechanism of *Lycium barbarum* polysaccharide and UCA1 siRNA single or combined treatment in the MPP⁺-induced Parkinson's disease cell model

WANG Lixia^{1*}, HAN Jinfen²

(1. Neuroelectrophysiology Room of Zhengzhou Seventh People's Hospital, Zhengzhou 450000, China.

2. Department of Pediatrics, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of *Lycium barbarum* polysaccharide and UCA1 siRNA individually, or in combination, on the proliferation and apoptosis of SH-SY5Y cells induced by MPP⁺ and its mechanism. **Methods** SH-SY5Y cells were treated with MPP⁺(0.25, 0.5, 1 and 2 mmol/L for 24 hours) and LBP (50, 100, 200 and 400 μg/mL *Lycium barbarum* polysaccharide pretreatment for 1 hour and then treated with MPP⁺ for 24 hours). The optimal concentrations of MPP⁺ (1 mmol/L) and LBP (400 μg/mL) were selected for subsequent experiments. The experiment was divided into four groups: control group (without treatment), MPP⁺ group (cells were treated with 1 mmol/L MPP⁺ for 24 hours), *Lycium barbarum* polysaccharide group (cells were pretreated with 400 μg/mL *Lycium*

[基金项目] 二〇一八年度河南省医学科技攻关计划项目(2018020860)。

[作者简介] 王立侠(1975—),女,副主任医师,硕士,研究方向:神经电生理研究。E-mail: itj7wb@163.com

barbarum polysaccharide for 1 hour and then treated with 1 mmol/L MPP⁺ for 24 hours), si-UCA1 group (cells were treated with 1 mmol/L MPP⁺ and then transfected with si-UCA1) and *barbarum* polysaccharide+si-UCA1 group. MTT assays were used to assess cell viability and flow cytometry was used to measure the apoptosis rate, ROS level and membrane potential. **Results** Compared with the control group, the cell survival rate and membrane potential in the MPP⁺ group were reduced significantly and the apoptosis rate and ROS level were increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the MPP⁺ group, the cell survival rate and membrane potential in *Lycium barbarum* polysaccharide and si-UCA1 groups were increased significantly and the apoptosis rate and ROS level were decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with *Lycium barbarum* polysaccharide and si-UCA1 groups, the cell survival rate and membrane potential in the LBP+si-UCA1 group were increased significantly and the apoptosis rate and ROS level were decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** *Lycium barbarum* polysaccharide and inhibition of UCA1 expression promote the proliferation of SH-SY5Y cells induced by MPP⁺ and inhibit apoptosis. Their combination has a more obvious effect on cell proliferation and apoptosis. The mechanism may be related to inhibition of mitochondrial apoptosis.

【Keywords】 Parkinson's disease; *Lycium barbarum* polysaccharide; long-chain non-coding RNA UCA1; apoptosis; oxidative stress; cell model

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种神经退行性疾病,多发于老年群体,目前发病机制尚未完全清楚^[1]。有研究表明,细胞凋亡、线粒体功能障碍、氧化应激等多种因素参与了帕金森病的病理机制^[2-3]。枸杞多糖(*Lycium barbarum* polysaccharide, LBP)是从枸杞中提取出来的一种水溶性多糖,具有免疫调节、抗氧化、抗肿瘤等多种功能^[4-5]。有研究显示,枸杞多糖可降低帕金森小鼠中脑氧化应激损伤及对黑质致密部 DA 能神经元起保护作用^[6];枸杞多糖可通过 ROS-NO 途径降低 6-OHDA 诱导 PC12 细胞凋亡^[7]。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)尿路上皮癌相关转录本 1(urothelial cancer associated 1, UCA1)基因定位于 19p13.12 染色体,其表达高度体现在心脏、子宫和膀胱的胚胎发育过程中。目前 UCA1 在帕金森病中的研究较少,有研究显示, lncRNA UCA1 可通过调控 SNCA 促进帕金森病进展^[8]。1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺)可通过增强氧化应激及损伤线粒体两种方式选择性破坏中脑黑质多巴胺能神经元,目前广泛用于建立帕金森病实验模型^[9]。本研究使用 MPP⁺诱导人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 建立帕金森病体外细胞模型,旨在研究枸杞多糖及 lncRNA UCA1 单独或联合对 MPP⁺诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡保护作用及可能的分子机制,为帕金森病的治疗提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 细胞

人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 购自美国

ATCC。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基、胎牛血清、青链霉素双抗均购自美国 Gibco 公司;枸杞多糖(由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、鼠李糖 6 种单糖成分组成;纯度 $\geq 50\%$)购自上海源叶生物科技有限公司;MPP⁺、MTT 及 DMSO 均购自美国 Sigma 公司;Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒、PCR 试剂盒、Lipofectamine™ 2000 均购自美国 Invitrogen 公司;2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)活性氧检测试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒均购自中国碧云天生物技术有限公司;Cyt-C、caspase3、caspase9、Bcl-2 和 Bax 抗体均购自美国 Abcam;酶标仪(550 型)购自美国 Bio-rad 公司;流式细胞仪(FACSCanto II 型号)购自美国 BD 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

细胞使用含 10%胎牛血清、1%谷氨酰胺及 1%抗生素的 DMEM 培养基,放置于 37℃、5%体积分数 CO₂、饱和湿度的培养箱培养。倒置显微镜下定期观察细胞生长状态,细胞贴壁 80%~90%达到对数生长期时,胰酶消化细胞,按照 1:3 传代。选择生长状态良好的第 3 代对数生长期细胞进行实验。

1.3.2 MPP⁺及枸杞多糖作用浓度的筛选

以 5×10^3 个/孔接种生长至对数期的 SH-SY5Y 细胞于 96 孔板,于 37℃、5%体积分数 CO₂ 培养箱中培养 24 h,使用 MPP⁺(终浓度为 0.25、0.5、1、2 mmol/L 的 MPP⁺处理细胞 24 h)、枸杞多糖(50、100、200、400 μg/mL 的枸杞多糖^[7]预处理细胞 1 h 后加 MPP⁺继续处理 24 h),设置仅加入等体积培养

基的为对照组,每组设置 5 个复孔。处理结束后,每孔加 20 μL MTT 液(5 g/L),常规孵育 4 h,弃掉上清,每孔加 150 μL DMSO,震荡数次使结晶能够充分溶解。全自动酶标仪测定 490 nm 各孔的光密度值,计算细胞存活率。实验重复 3 次。

1.3.3 qRT-PCR 检测 UCA1 基因表达

收集经 0.25、0.5、1、2 mmol/L 的 MPP^+ 处理 24 h 的 SH-SY5Y 细胞,TRIzol 法提取细胞总 RNA,按照试剂盒说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA。根据 UCA1 和内参 GAPDH 基因序列及引物设计原则设计引物,由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列如下:UCA1 F 5'-TTTGCCAGCCTCAGCTTAAT-3', R 5'-TTGTCCCCATTTTCCATCAT-3'; GAPDH F 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCa-3', R 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'。

按照试剂盒说明书配制 PCR 反应体系和设置 PCR 程序,设置 5 个复孔,GAPDH 作为内参基因。以所得 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式计算 UCA1 基因相对表达水平。实验重复 3 次。

1.3.4 实验分组、处理及 UCA1 siRNA 转染

实验分为对照组(细胞不经特殊处理)、 MPP^+ 组(1 mmol/L 的 MPP^+ 处理细胞 24 h)、枸杞多糖组(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的枸杞多糖预处理细胞 1 h 后加 1 mmol/L 的 MPP^+ 继续处理 24 h)、si-UCA1 组(1 mmol/L 的 MPP^+ 处理细胞后转染 UCA1 siRNA)、枸杞多糖 + si-UCA1 组。siRNA 转染参照 LipofectamineTM2000 说明书。转染前 1 d 接种生长至对数期的 SH-SY5Y 细胞于 6 孔板,接种密度为 10^5 个/孔,细胞生长达 70% 汇合度时,将 UCA1 siRNA (si-UCA1) 及阴性对照组 (si-NC 组) 转染 SH-SY5Y 细胞,转染 48 h,采用 qRT-PCR 检测 UCA1 基因表达。实验重复 3 次。

1.3.5 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率

收集上述分组处理后的细胞,预冷 PBS 洗涤 2 次,加入 300 μL 结合缓冲液重悬细胞,避光环境分别加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 和 10 μL 的 PI,室温孵育 15~20 min。上机前再加入 300 μL 的结合缓冲液,1 h 内通过流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

1.3.6 流式细胞术检测细胞 ROS 水平

收集按照上述分组处理后的细胞,弃掉细胞培养液。加入培养液悬浮细胞,离心,弃掉上清。加入终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 DCFH-DA500 μL ,避光孵育 20 min。加入培养液重悬细胞,PBS 洗涤细胞 3

遍,使用流式细胞仪检测各组细胞荧光强度值。实验重复 3 次。

1.3.7 流式细胞术检测线粒体膜电位

收集按照上述分组处理后的细胞,加入 500 μL 培养基重悬细胞,然后加入 500 μL 的 JC-1 染色工作液,混匀,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中常规孵育 20 min,离心,弃掉上清。1 $\times$ 的 JC-1 染色工作液清洗细胞 2 次,离心,去掉上清。500 μL 染色缓冲液重悬细胞,流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

1.3.8 Western blot 检测 Cyt-C、caspase3、caspase9、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

收集按照上述分组处理后的细胞,每孔加细胞裂解液 200 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床快速震荡 10 min,离心,取上清。BCA 法测定总蛋白含量。总蛋白与 5 $\times$ loading buffer 混匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅 10 min。在胶泳道中加 30 μg 变性蛋白,经电泳(恒压 100 V,3 h)、转 PVDF 膜(200 mA,3 h)后,将转好的膜浸泡在 5% 脱脂奶粉中,封闭 1 h。加入一抗(1:500),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗膜。加入 HRP 标记的二抗(1:1000),室温孵育 3 h,TBST 洗膜。化学发光成像系统对膜进行成像分析,Image J 软件分析灰度值。以目的蛋白 Cyt-C、caspase3、caspase9、Bcl-2 和 Bax 灰度值与内参 GAPDH 灰度值比值为各蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

所有实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行分析,计量资料用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组差异比较采用单因素方差分析,两两比较采 SNK- q 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MPP^+ 对 SH-SY5Y 细胞增殖及 UCA1 表达的影响

以对照组细胞存活率为 100% 及 UCA1 基因表达为 1 计算,随着 MPP^+ 作用浓度增加,当细胞处理 24 h 后,细胞存活率呈现出下降趋势,UCA1 基因表达升高,其中 0.5~2 mmol/L 的 MPP^+ 与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。0.25 mmol/L MPP^+ 处理后的细胞存活率及 UCA1 基因表达与对照组差异均无统计学意义($P>0.05$)。由于在 MPP^+ 作用浓度为 1 mmol/L 时,细胞存活率为 $(49.02 \pm 4.23)\%$,因此选择 1 mmol/L 为 MPP^+ 的最佳损伤浓度。见表 1。

2.2 枸杞多糖对 MPP⁺诱导的 SH-SY5Y 细胞增殖的影响

MPP⁺ 损伤后的细胞存活率显著低于对照组 [(49.23±1.88)% 比 (100.00±2.12)%, $P<0.05$]; 使用 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 枸杞多糖干预后, 细胞存活率显著升高 [(56.97±2.15)%、(65.18±2.23)%、(77.25±3.11)% 比 (49.23±1.88)%, $P<0.05$], 而 50 $\mu\text{g/mL}$ 枸杞多糖对 MPP⁺ 诱导的细胞存活率无显著影响 [(49.88±1.74)% 比 (49.23±1.88)%, $P>0.05$]. 选择 400 $\mu\text{g/mL}$ 的枸杞多糖进行后续研究。

2.3 枸杞多糖及 si-UCA1 单独或联合对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞增殖和凋亡的影响

SH-SY5Y 细胞转染 UCA1 siRNA 后, UCA1 表达显著低于对照组 (0.255±0.026 比 1.000±0.026, $P<0.05$), si-NC 组 UCA1 表达与对照组差异无统计学意义 (0.995±0.018 比 1.000±0.026, $P>0.05$)。与对照组比较, MPP⁺ 组细胞存活率显著降低, 细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$)。与 MPP⁺ 组比较, LBP 组和 si-UCA1 组细胞存活率显著升高, 细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$)。与 LBP 组或 si-UCA1 组比较, LBP+si-UCA1 组细胞存活率显著升高, 细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$)。见图 1、表 2。

2.4 枸杞多糖及 si-UCA1 单独或联合对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 ROS 水平的影响

DCF 荧光强度可间接反映 ROS 水平。与对照组比较, MPP⁺ 组 DCF 荧光强度显著升高 (88.67±4.32 比 45.12±2.01, $P<0.05$), 说明 MPP⁺ 可提高 SH-SY5Y 细胞中 ROS 水平。与 MPP⁺ 组比较, LBP 组和 si-UCA1 组 DCF 荧光强度显著降低 (63.56±2.81、68.74±3.13 比 88.67±4.32, $P<0.05$), 说明 LBP 或 UCA1 siRNA 可降低 MPP⁺ 诱导的 SH-

SY5Y 细胞中 ROS 水平。与 LBP 组或 si-UCA1 组比较, LBP+si-UCA1 组 ROS 水平显著降低 (52.34±2.71 比 63.56±2.81、68.74±3.13, $P<0.05$), 说明 LBP 及 UCA1 siRNA 联合可增强二者单独作用对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞中 ROS 水平的抑制作用。

2.5 枸杞多糖及 si-UCA1 单独或联合对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞膜电位影响

红/绿荧光比可直接的反映出线粒体膜电位的变化。与对照组比较, MPP⁺ 组红/绿荧光比显著降低 (0.44±0.04 比 1.62±0.11, $P<0.05$), 说明 MPP⁺ 可降低 SH-SY5Y 细胞膜电位。与 MPP⁺ 组比较, LBP 组和 si-UCA1 组红/绿荧光比显著升高 (1.01±0.08、0.82±0.07 比 0.44±0.04, $P<0.05$), 说明 LBP 或 UCA1 siRNA 可提高 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞膜电位。与 LBP 组或 si-UCA1 组比较, LBP+si-UCA1 组红/绿荧光比显著升高 (1.41±0.09 比 1.01±0.08、0.82±0.07, $P<0.05$), 说明 LBP 及 UCA1 siRNA 联合可增强二者单独作用对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞膜电位的促进作用。

表 1 MPP⁺ 对 SH-SY5Y 细胞增殖及 UCA1 表达的影响

Table 1 Effect of MPP⁺ on the proliferation of SH-SY5Y cells and the expression of UCA1

组别 Groups	细胞存活率(%) Cell survival rate	UCA1 基因表达 Expression of UCA1 gene
对照组 Control group	100.00±2.02	1.000±0.043
1-甲基-4-苯基吡啶离子组 MPP ⁺ group	49.02±2.23 [*]	5.171±0.369 [*]
枸杞多糖组 LBP group	99.18±1.33	1.009±0.032
si-UCA1 组 si-UCA1 group	84.15±3.11 [*]	3.462±0.223 [*]
枸杞多糖+si-UCA1 组 LBP+si-UCA1 group	33.36±1.74 [*]	7.283±0.544 [*]

注: 与对照组相比, $^*P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, $^*P<0.05$.

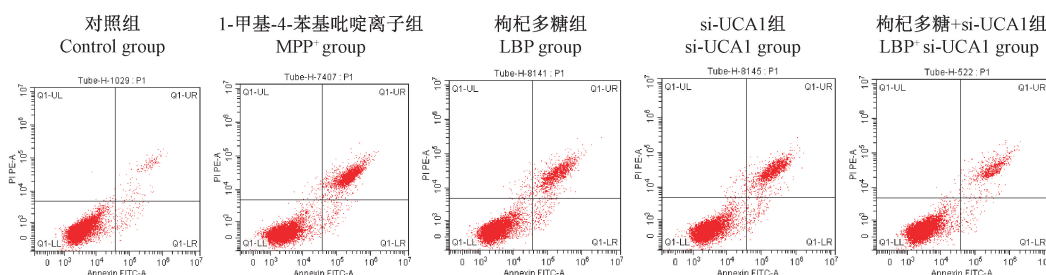


图 1 枸杞多糖及 si-UCA1 单独或联合对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞增殖和凋亡的影响

Figure 1 Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide and si-UCA1 alone or in combination on proliferation and apoptosis of SH-SY5Y cells induced by MPP⁺

2.6 枸杞多糖及 si-UCA1 单独或联合对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 Cyt-C、caspase3、caspase9、Bcl-2 和 Bax 表达影响

与对照组比较, MPP⁺ 组 Cyt-C、caspase3、caspase9 和 Bax 表达显著升高, Bcl-2 表达显著降低 ($P<0.05$)。与 MPP⁺ 组比较, LBP 组和 si-UCA1 组 Cyt-C、caspase3、caspase9 和 Bax 表达显著降低, Bcl-2 表达显著升高 ($P<0.05$)。与 LBP 组或 si-UCA1 组比较, LBP+si-UCA1 组 Cyt-C、caspase3、caspase9 和 Bax 表达显著降低, Bcl-2 表达显著升高 ($P<0.05$)。见图 2、表 3。

3 讨论

MPP⁺ 是一种神经毒素, 可通过抑制线粒体呼吸链复合物 I, 导致线粒体功能障碍、氧自由基大量产生及线粒体 ATP 缺失和膜电位降低, 引起细胞损伤, 最终导致神经元死亡, 目前常用于建立帕金森病细胞模型^[10-11]。SH-SY5Y 细胞是一种分化程度很低的肿瘤细胞, 与正常神经细胞有相似的细胞形态及生理生化功能, 且生长繁殖较快, 目前已广泛用于帕金森病、阿尔兹海默症等多种神经系统疾病

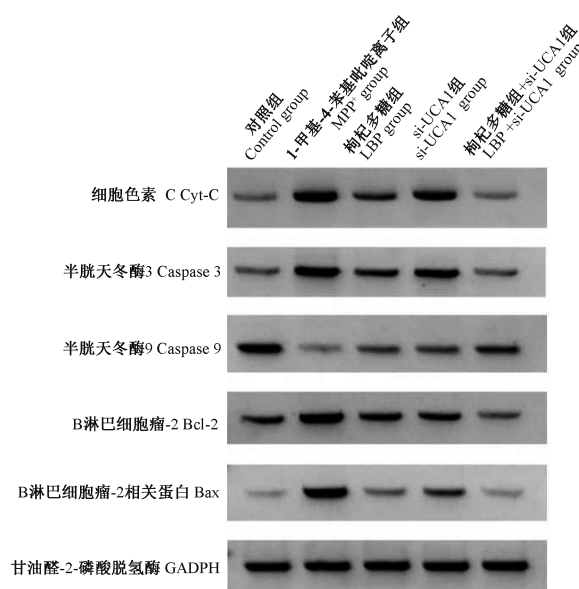


图 2 枸杞多糖及 si-UCA1 单独或联合对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞中 Cyt-C、caspase3、caspase9、Bcl-2、Bax 蛋白表达影响

Figure 2 Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide and si-UCA1 alone or in combination on the protein expression of Cyt-C, caspase3, caspase9, Bcl-2 and Bax in SH-SY5Y cells induced by MPP⁺

表 2 枸杞多糖及 si-UCA1 单独或联合对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞增殖和凋亡的影响

Table 2 Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide and si-UCA1 alone or in combination on proliferation and apoptosis of SH-SY5Y cells induced by MPP⁺

组别 Groups	细胞存活率 (%) Cell survival rate	细胞凋亡率 (%) Apoptosis rate
对照组 Control group	100.00±2.08	1.54±0.11
1-甲基-4-苯基吡啶离子组 MPP ⁺ group	49.56±1.83 [*]	29.43±1.02 [*]
枸杞多糖组 LBP group	76.78±3.33 [#]	17.44±0.85 [#]
si-UCA1 组 si-UCA1 group	62.41±3.02 [#]	18.67±0.92 [#]
枸杞多糖+si-UCA1 组 LBP+si-UCA1 group	87.11±4.41 ^{&}	9.41±0.55 ^{&}

注: 与对照组相比, ^{*} $P<0.05$; 与 MPP⁺ 组相比, [#] $P<0.05$; 与 LBP 组或 si-UCA1 组相比, [&] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the MPP⁺ group, [#] $P<0.05$. Compared with the LBP group or si-UCA1 group, [&] $P<0.05$.

表 3 Cyt-C、caspase3、caspase9、Bcl-2 和 Bax 的蛋白相对表达量

Table 3 Relative protein expression of Cyt-C, caspase3, caspase9, Bcl-2 and Bax

组别 Groups	细胞色素 C Cyt-C	半胱天冬酶 3 Caspase3	半胱天冬酶 9 Caspase9	B 淋巴细胞瘤-2 Bcl-2	B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白 Bax
对照组 Control group	0.055±0.008	0.031±0.005	0.117±0.016	0.746±0.075	0.105±0.012
1-甲基-4-苯基吡啶离子组 MPP ⁺ group	0.688±0.072 [*]	0.164±0.018 [*]	0.502±0.048 [*]	0.182±0.027 [*]	0.256±0.031 [*]
枸杞多糖组 LBP group	0.225±0.023 [#]	0.091±0.009 [#]	0.253±0.028 [#]	0.303±0.025 [#]	0.144±0.014 [#]
si-UCA1 组 si-UCA1 group	0.326±0.034 [#]	0.106±0.011 [#]	0.242±0.026 [#]	0.301±0.024 [#]	0.147±0.015 [#]
枸杞多糖+si-UCA1 组 LBP+si-UCA1 group	0.096±0.011 ^{&}	0.048±0.007 ^{&}	0.132±0.015 ^{&}	0.415±0.036 ^{&}	0.062±0.008 ^{&}

注: 与对照组相比, ^{*} $P<0.05$; 与 MPP⁺ 组相比, [#] $P<0.05$; 与 LBP 组或 si-UCA1 组相比, [&] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the MPP⁺ group, [#] $P<0.05$. Compared with the LBP group or si-UCA1 group, [&] $P<0.05$.

模型^[12-13]。本研究使用 0.25~2 mmol/L 的 MPP⁺ 处理 SH-SY5Y 细胞,发现 1 mmol/L 的 MPP⁺ 可抑制近一半的细胞增殖,因此选择 1 mmol/L 的 MPP⁺ 为最佳损伤浓度。50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 的枸杞多糖处理经 1 mmol/L 的 MPP⁺ 损伤的 SH-SY5Y 细胞,细胞存活率呈剂量依赖升高,选择 400 $\mu\text{g/mL}$ 的枸杞多糖作为研究浓度。

越来越多的研究发现,帕金森病发病与线粒体损伤密切相关^[14]。当线粒体呼吸链受到抑制时,可引起跨膜电位的改变、Cyt-C 及凋亡相关的 caspase 家族蛋白、Bcl-2 家族蛋白释放,最终引起细胞凋亡^[15]。Cyt-C 是一种信号物质,正常情况下存在于线粒体内外膜的腔中,当有凋亡信号刺激时,可从线粒体中释放至胞浆,引起 caspase9、caspase3 活化,从而触发凋亡级联反应^[16]。Bcl-2 是一个抑凋亡蛋白,Bax 为促凋亡蛋白,Bcl-2 主要存在于线粒体外膜上,可通过直接或间接阻止 Cyt-C 从线粒体中释放出来,从而抑制 caspase9 的活化^[17-18]。当 Cyt-C 缺乏时,可引起 ATP 合成减少及 ROS 产生过度。ROS 有氧化活性,病理条件下,胞内大量的 ROS 堆积可引起 DNA 损伤,引起代谢系统及神经系统疾病的发生。本研究结果显示,MPP⁺ 可抑制 SH-SY5Y 细胞增殖,促进细胞凋亡,诱导 ROS 产生,降低细胞膜电位,上调促凋亡蛋白 Cyt-C、caspase3、caspase9 和 Bax 表达,下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,这与 Ramalingam 等^[12] 研究吻合,表明帕金森病细胞模型构建成功。枸杞多糖处理可显著逆转 MPP⁺ 诱导的上述改变,与 Cao 等^[19] 报道对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤和凋亡的保护作用一致。UCA1 已被证与多种细胞损伤相关,Tian 等^[20] 研究显示缺氧诱导的神经细胞中 UCA1 表达增加,UCA1 siRNA 可提高细胞活力、抑制细胞凋亡,减轻缺氧损伤;Zhao 等^[21] 证实 UCA1 siRNA 可增强脂多糖诱导的人胚肺 WI-38 细胞活力,缓解细胞凋亡和炎症损伤。本研究发现,UCA1 siRNA 可抑制 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 ROS 产生和凋亡,且枸杞多糖和 UCA1 siRNA 联用的保护作用更明显。以上研究表明,枸杞多糖及 UCA1 siRNA 通过线粒体凋亡途径降低 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡。然而,本文仅是细胞模型研究,这与整体动物特别是人体间可能存在一定差异,枸杞多糖及 UCA1 siRNA 的作用尚需进一步的观察验证。

综上所述,枸杞多糖及抑制 UCA1 表达均可促

进由 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞存活率,抑制细胞凋亡,两者联合对细胞存活率及凋亡率影响更明显,机制可能与抑制线粒体凋亡途径有关,提示枸杞多糖及 UCA1 基因联合使用可能是帕金森病治疗的新途径。

参考文献:

- [1] Jiang H, Yu Y, Liu S, et al. Proteomic study of a Parkinson's disease model of undifferentiated SH-SY5Y cells induced by a proteasome inhibitor [J]. Int J Med Sci, 2019, 16(1): 84-92.
- [2] Sarbishegi M, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Heidari Z, et al. The protective effect of celecoxib on CA1 hippocampal neurons and oxidative stress in a rat model of Parkinson's disease [J]. Acta Med Iran, 2019, 57(2): 94-102.
- [3] Sara B, Diego A, Raffaella R, et al. DJ-1 modulates α -Synuclein aggregation state in a cellular model of oxidative stress; relevance for Parkinson's disease and involvement of HSP70 [J]. PLoS One, 2008, 3(4): e1884-e1894.
- [4] Feng L, Jia Z, Zongqin X, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides protect retina in RD1 mice during photoreceptor degeneration [J]. Invest Oph Vis Sci, 2018, 59(1): 597-611.
- [5] 姜鸣, 李卓能. 枸杞多糖诱导自噬抑制人舌鳞状癌细胞增殖 [J]. 临床口腔医学杂志, 2017, 33(11): 656-659.
- [6] 陈浩, 张皓洁, 师亮, 等. 枸杞多糖对帕金森病小鼠的抗氧化作用和神经保护效应 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2018, 44(10): 613-618.
- [7] Gao K, Liu MY, Cao JY, et al. Protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells through the ROS-NO pathway [J]. Molecules, 2014, 20(1): 293-308.
- [8] Lu M, Sun WL, Shen J, et al. LncRNA-UCA1 promotes PD development by upregulating SNCA [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(22): 7908-7915.
- [9] Shindo Y, Yamanaka R, Suzuki K, et al. Intracellular magnesium level determines cell viability in the MPP⁺ model of Parkinson's disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1853(12): 3182-3191.
- [10] Wang L, Li X, Han Y, et al. Quantum dots protect against MPP⁺-induced neurotoxicity in a cell model of Parkinson's disease through autophagy induction [J]. Sci Chin Chem, 2016, 59(11): 1486-1491.
- [11] Wang S, He H, Chen L, et al. Protective effects of salidroside in the MPTP/MPP⁺-induced model of Parkinson's disease through ROS-NO-related mitochondrion pathway [J]. Mol Neurobiol, 2015, 51(2): 718-728.
- [12] Ramalingam M, Kim SJ. The neuroprotective role of insulin against MPP⁺-induced Parkinson's disease in differentiated SH-SY5Y cells [J]. J Cell Biochem, 2015, 117(4): 917-926.
- [13] Wu X, Kosaraju J, Zhou W, et al. Neuroprotective effect of SLM, a novel carbazole-based fluorophore, on SH-SY5Y cell

- model and 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease [J]. Acs Chem Neurosci, 2017, 8(3): 676-685.
- [14] Giannoccaro MP, La Morgia C, Rizzo G, et al. Mitochondrial DNA and primary mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease [J]. Movement Disord, 2017, 32(3): 346-363.
- [15] Jiang W, Chen Y, Li B, et al. DBA-induced caspase-3-dependent apoptosis occurs through mitochondrial translocation of cyt-c in the rat hippocampus [J]. Mol BioSyst, 2017, 13(9): 1863-1873.
- [16] Qiao B, He B, Cai J, et al. Induction of oxidative stress and cell apoptosis by selenium; The cure against oral carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(69): 113614-113621.
- [17] Gao CK, Liu H, Cui CJ, et al. Roles of MicroRNA-195 in cardiomyocyte apoptosis induced by myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. J Genet, 2016, 95(1): 99-108.
- [18] Chen C, Liu TS, Zhao SC, et al. XIAP impairs mitochondrial function during apoptosis by regulating the Bcl-2 family in renal cell carcinoma [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(5): 4587-4593.
- [19] Cao S, Du J, Hei Q. *Lycium barbarum* polysaccharide protects against neurotoxicity via the Nrf2/HO1 pathway [J]. Exp ther med, 2017, 14(5): 4919-4927.
- [20] Tian J, Xu H, Chen G, et al. Roles of lncRNA UCA1-miR-18a-SOX6 axis in preventing hypoxia injury following cerebral ischemia [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(8): 8187-8198.
- [21] Zhao YJ, Chen YE, Zhang HJ, et al. LncRNA UCA1 remits LPS-engendered inflammatory damage through deactivation of miR-499b-5p/TLR4 axis [J]. IUBMB Life, 2021, 73(2): 463-473.

〔收稿日期〕2020-12-01

(上接第 54 页)

- [17] 宋华峰, 赵静, 陈慧, 等. 非结核分枝杆菌感染患者外周血免疫细胞改变及其临床意义 [J]. 国际免疫学杂志, 2020, 43(1): 7-14.
- [18] Sutiwisesak R, Hicks ND, Boyce S, et al. A natural polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* in the *esxH* gene disrupts immunodominance by the TB10.4-specific CD8 T cell response [J]. PLoS Pathog, 2020, 16(10): e1009000.
- [19] Wang Z, Xu H, Wei Z, et al. The role of non-coding RNA on macrophage modification in tuberculosis infection [J]. Microb Pathog, 2020, 149: 104592.
- [20] 程龙. miR-146a 在结核分枝杆菌感染肺泡 II 型细胞中对 TLRs 信号通路的免疫调控作用研究 [D]. 银川: 宁夏大学, 2015.
- [21] Nguyen H, Gazy N, Venketaraman V. A role of intracellular Toll-like receptors (3, 7, and 9) in response to *Mycobacterium tuberculosis* and co-infection with HIV [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(17): 6148.
- [22] Ferluga J, Yasmin H, Al-Ahdal MN, et al. Natural and trained innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Immunobiology, 2020, 225(3): 151951.
- [23] You J, Zhou O, Liu J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles alleviate lung injury in rat model of bronchopulmonary dysplasia by affecting cell survival and angiogenesis [J]. Stem Cells Dev, 2020, 29(23): 1520-1532.
- [24] Wang LK, Wu TJ, Hong JH, et al. Radiation induces pulmonary fibrosis by promoting the fibrogenic differentiation of alveolar stem cells [J]. Stem Cells Int, 2020, 2020: 6312053.
- [25] Tan C, Gurien SD, Royster W, et al. Extracellular CIRP induces inflammation in alveolar type II cells via TREM-1 [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 579157.
- [26] Liu X, Zhu X, Zhu G, et al. Effects of different ligands in the notch signaling pathway on the proliferation and transdifferentiation of primary type II alveolar epithelial cells [J]. Front Pediatr, 2020, 8: 452.
- [27] 李丹, 安娜, 柳璐, 等. 缺血性急性肾损伤大鼠 miR-214 介导的 HIF1 α /KIM1 信号通路作用机制 [J]. 海南医学院学报, 2019, 25(24): 1847-1851.
- [28] 田永彦, 苗劲柏, 侯生才, 等. 外源性 FGF9 对体外肺泡 II 型上皮细胞作用的实验研究 [J]. 军事医学科学院院刊, 2010, 34(6): 573-575.
- [29] Yuan C, Qu ZL, Tang XL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* mannose-capped lipoarabinomannan induces IL-10-producing B cells and hinders CD4⁺Th1 immunity [J]. iScience, 2019, 11: 13-30.
- [30] 彭文光, 张学璇, 谢汉彬, 等. 活动性结核病患者 T 淋巴细胞 PI3K-Akt-mTOR 信号通路活化状态研究 [J]. 国际医药卫生导报, 2018, 24(15): 2220-2226.

〔收稿日期〕2020-12-16