

吡咯喹啉醌对培养的海马神经元衰老的影响

童希文^{1a}, 韩艳酶^{1a}, 邓永辉^{1a}, 沈慧^{1a}, 熊顺华^{1b}

[摘要] 目的 观察吡咯喹啉醌(PQQ)对 D-半乳糖(D-gal)致培养大鼠海马神经细胞衰老损伤的影响。方法 体外原代培养新生大鼠海马神经元,用大剂量 D-gal 诱致海马神经元老化损伤,用 PQQ 做保护研究,镜下观察神经元的形态变化,测海马神经细胞自由基的水平,流式细胞仪测细胞的凋亡率,免疫组化测 Bax 蛋白的表达。结果 体外培养 8 d 的海马神经细胞用 D-gal 处理后,细胞自由基水平升高,细胞的死亡率增加,Bax 表达增强;预先给予 PQQ 处理后,细胞内自由基水平以及 Bax 的表达下降,细胞死亡率下降。结论 PQQ 能延缓 D-gal 引起的培养大鼠海马神经细胞的衰老。

[关键词] 吡咯喹啉醌(PQQ);海马;神经元;衰老;D-半乳糖(D-gal);大鼠

Effect of Pyrroloquinoline Quinone on Aging of Rat Hippocampal Neurons in Vitro TONG Xi-wen, HAN Yan-mei, DENG Yong-hui, et al. Department of Physiology, Yunyang Medical College, Shiyang 442000, Hubei, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of pyrroloquinoline quinone (PQQ) on the aging of rat hippocampal neurons induced by D-galactose (D-gal). **Methods** Hippocampal neurons were cultured in vitro. The aging of the hippocampal neurons was induced by high dose D-gal, PQQ protection were used 30 min before D-gal. The metamorphosis of hippocampal neurons was observed under the microscope. The contents of free radical was measured. The incidence of apoptosis of hippocampus cells was tested with the flow cytometry. The expression of Bax was detected with immunohistochemical staining. **Results** After the cells cultured in vitro exposed to D-gal, the content of free radical and the expression of Bax of the hippocampal neurons increased. After pretreatment of the cultured neurons with PQQ, the contents of free radical and the expression of Bax decreased, the survival of hippocampal neurons increased. **Conclusion** PQQ may slow the aging progress of hippocampal neurons induced by D-gal.

Key words: pyrroloquinoline quinone (PQQ); Hippocampus; neurons; Aging; D-galactose (D-gal); rats

[中图分类号] R742 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)09-0804-02

[本文著录格式] 童希文,韩艳酶,邓永辉,等.吡咯喹啉醌对培养的海马神经元衰老的影响[J].中国康复理论与实践,2008,14(9):804-805.

吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quinone, PQQ)作为氧化还原酶辅酶,参与生物体多种氧化还原反应;它存在于植物、动物体内,人体组织和体液中也微量存在^[1-2]。它具有多种重要的生物功能,如刺激微生物、人体细胞生长和动植物的发育^[3];具有很强清除自由基的能力^[3],PQQ 作用于 N-甲基-D-天冬氨酸盐(NMDA)受体,降低由谷氨酸引起的自由基产生^[4];降低由 6-羟基多巴胺介导的自由基产生以降低其神经毒性作用,降低由大脑中动脉阻塞引起的神经组织坏死和行为障碍,在离体的条件下,PQQ 连接于淀粉纤维上,防止神经淀粉纤维癍痕的形成^[5]。本研究观察 PQQ 对 D-半乳糖(D-gal)诱发海马神经元衰老损伤的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 吡咯喹啉醌:SIGMA 公司,以 Hanks 溶解;D-gal:上海化学试剂三厂;胎牛血清:杭州四季清公司;小牛血清和 DMEM/F12:Gibco 公司。培养液成分:85% DMEM/F12,含 5%小牛血清,10%胎牛血清。Wistar 大鼠:邵阳医学院动物中心。DNA 流式检

测试剂盒:Becman coulter,试剂 1:<0.1%氰化钾、<0.1% NaN₃、离子洗涤剂、盐和稳定剂,试剂 2:50 mg/L 碘定、RNA 酶 4 kU/ml、<0.1% NaN₃、盐和稳定剂。

1.2 海马神经元的培养 取新生 1 d 内 Wistar 大鼠,断头后取出两侧海马组织,置于 0.125%胰蛋白酶中消化,使其分散成单细胞悬液,加培养液,以 5×10^5 /ml 接种于培养板上,置于 37℃,5%CO₂ 培养箱中培养,每 3 d 换培养液 1 次,每次更换一半,于第 4 天加入阿糖胞苷 3 mg/L 以抑制非神经细胞的过度生长,48 h 后全部更换新鲜培养液。于培养 7 d 神经元之间突触联成网状,即用以实验。

1.3 实验分组 取培养 7 d 神经元随机为:①对照组:培养液 + Hanks;②D-gal 组:培养液 + 0.1 mmol/L D-gal;③PQQ + D-gal 组:于培养液中先加入 PQQ 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} mol/L,30 min 后再加入 0.1 mmol/L D-gal;④PQQ 组:培养液 + PQQ 10^{-5} mol/L。

1.4 形态学检测 取 D-gal 作用后 72 h 细胞,吸去培养液,用 Hanks 清洗 2 次,姬姆萨染色 8 min,显微镜下观察并拍照。

1.5 自由基测定 取 D-gal 作用后 72 h 细胞,去培养液,用 Hanks 洗 2 次,加蒸馏水使细胞破碎并脱离培养板,离心取上清,按试剂盒说明测定丙二醛(MDA)。

基金项目:邵阳医学院学生科研基金(2006XS2005)。

作者单位:1.邵阳医学院,a.药护学院 2004 级;b.生理学教研室,湖北十堰市 442000。作者简介:童希文(1985-),男,湖北黄冈市人,学生,主要研究方向:神经病理生理。通讯作者:熊顺华。

蛋白质质量按考马斯亮蓝法测定。

1.6 细胞凋亡峰 取 D-gal 作用 72 h 细胞,用 Hanks 清洗 2 次,0.125 %胰蛋白酶消化使细胞脱离培养板,收集细胞,将待测细胞加入 1 ml PBS 混匀,过滤后离心,去上清,加入试剂 1,混匀,静置 1 min 后,加入试剂 2,混匀,避光静置 20 min,上流式细胞仪检测。

1.7 MTT 代谢率测定 取 D-gal 作用后 72 h 细胞加入 MTT,每孔终浓度为 0.5 mg/ml,在孵育箱中放置 4 h,弃上清液,每孔加入 1 ml 无水二甲基亚砷,10 min 后用酶标仪于 570 nm 处读取吸光度值(OD),结果以样本 OD 值占对照组平均 OD 值的百分率表示。

1.8 Bax 的表达 取 D-gal 作用 72 h 后细胞,PBS 洗 2 次,加兔源抗 Bax 抗体(1:100)室温孵育 2 h,滴加羊抗兔 IgG 30 min,AEC 显色。

2 结果

2.1 形态学变化 对照组神经元呈双极或多极锥形四边体,胞体饱满,边缘光滑圆润,光晕轮廓明显,可见胞核及核仁,突起粗长,分叉形成致密网状。D-gal 组培养液中悬浮杂质明显增多,神经元数量明显减少,一些神经细胞膜上出现粗大的脂肪颗粒,无明显光晕,还有些细胞突起多处断裂,胞膜不完整,细胞碎裂,核碎裂;另一些细胞出现核固缩、凝聚、断裂、形成凋亡小体。PQQ + D-gal 组神经元存活率较 D-gal 组增多,细胞的密度增加,细胞脂肪颗粒明显减少,坏死和凋亡的细胞明显减少。PQQ 组神经元形态与对照无明显差异(封三彩图 1~3)。

2.2 MDA 的测定 对照组 MDA 浓度为 (2.36 ± 0.50) nmol/mg 蛋白,D-gal 组为 (6.52 ± 1.15) nmol/mg 蛋白,与对照组相比, $P < 0.05$;PQQ 10^{-5} mol/L + D-gal 组为 (4.77 ± 0.58) nmol/mg 蛋白,PQQ 10^{-6} mol/L + D-gal 组为 (3.87 ± 0.63) nmol/mg 蛋白,与 D-gal 组相比,均 $P < 0.05$ 。

2.3 细胞凋亡率 D-gal 组细胞的凋亡率 $(25.85 \pm 5.88)\%$,较对照组 $(6.85 \pm 2.88)\%$ 增加 ($P < 0.05$);经 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L PQQ 预处理后,细胞的凋亡率分别降到 $(20.47 \pm 2.85)\%$ 、 $(13.93 \pm 3.42)\%$ (均 $P < 0.05$)。

2.4 MTT 代谢率 D-gal 组 MTT 代谢率为对照组的 71%,经 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L PQQ 处理后,MTT 代谢率分别为对照组的 85%、93%、96%。

2.5 Bax 蛋白表达 免疫组化染色后,可见免疫反应物呈红色密集于细胞胞浆中,与对照组相比,D-gal 组 Bax 蛋白的表达明显增强;经 PQQ 处理后,Bax 表达降低(见封三彩图 4~6)。

3 讨论

D-gal 在醛糖还原酶催化下还原成为半乳糖堆积在细胞内,形成高渗透压;D-gal 经氧化酶催化氧化,分解为 CO_2 和木酮糖,伴有 O_2^- 和过氧化氢的产生,大量的自由基与细胞的生物大分子发生反应,改变细胞代谢过程,诱发细胞衰老和死亡。

本研究显示,经 D-gal 处理后,海马神经元自由基产生增加,MTT 代谢率降低,细胞凋亡率增加;经 PQQ 处理后,海马神经细胞自由基含量降低,MTT 代谢率增加。这表明,PQQ 能清除自由基,提高了细胞的代谢率。

已有文献报道,PQQ 能预防哺乳动物细胞线粒体的氧化损伤,防止呼吸链的非激活状态^[8],促进线粒体的生物氧化;PQQ 可增加线粒体 mtDNA 的含量,增强细胞色素 C 的活力,促进机体的代谢作用^[4]。PQQ 还能促进神经细胞和神经胶质细胞产生神经生长因子^[8],对神经元胞体和突起的生长、存活、功能的维持发挥营养作用。

bax 是与细胞凋亡有密切关系的基因,Bax 增加时,易于形成 Bax 同二聚体,促细胞凋亡^[9]。本研究结果显示,D-gal 组 Bax 表达增强,细胞凋亡率增加;而 PQQ 可降低由 D-gal 引起的 Bax 过表达,降低细胞的凋亡,延缓海马神经元的衰老。

[参考文献]

- [1]Steinberg F, Stites TE, Anderson P, et al. Pyrroloquinoline quinone improves growth and reproductive performance in mice fed chemically defined diets[J]. Exp Biol Med, 2003, 228(2):160-166.
- [2]Zhang Y, Rosenberg PA. The essential nutrient pyrroloquinoline quinone may act as a neuroprotectant by suppressing peroxynitrite formation[J]. Eur J Neurosci, 2002, 16(6):1015-1024.
- [3]Scanlon JM, Aizenman E, Reynolds IJ. Effects of pyrroloquinoline quinone on glutamate-induced production of reactive oxygen species in neurons[J]. Eur J Pharmacol, 1997, 326(1):67-74.
- [4]Hara H, Hiramatsu H, Adachi T. Pyrroloquinoline quinone is a potent neuroprotective nutrient against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity[J]. Neurochem Res, 2007, 32(3):489-495.
- [5]Zhang Y, Feustel PJ, Kimelberg HK. Neuroprotection by pyrroloquinoline quinone (PQQ) in reversible middle cerebral artery occlusion in the adult rat[J]. Brain Res, 2006, 1094(1):200-206.
- [6]Kobayashi M, Kim J, Kobayashi N, et al. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) prevents fibril formation of alpha-synuclein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 349(3):1139-1144.
- [7]He K, Nukada H, Urakami T, et al. Antioxidant and pro-oxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ): implications for its function in biological systems[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 65(1):67-74.
- [8]Stites T, Storms D, Bauerly K, et al. Pyrroloquinoline quinone modulates mitochondrial quantity and function in mice[J]. J Nutr, 2006, 136(2):390-396.
- [9]Bishop A, Gallop PM, Karnovsky ML. Pyrroloquinoline quinone: a novel vitamin? [J]. Nutr Rev, 1998, 56(10):287-293.

(收稿日期:2008-03-24)

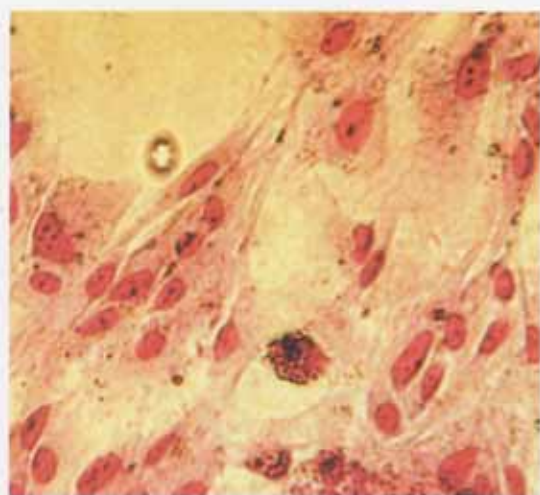


图1 对照组海马神经元

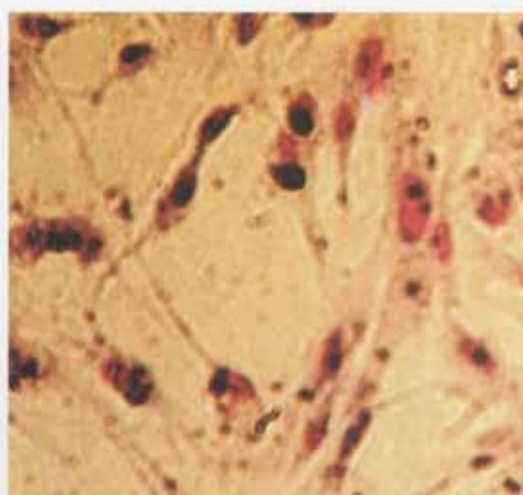


图2 D-gal组海马神经元

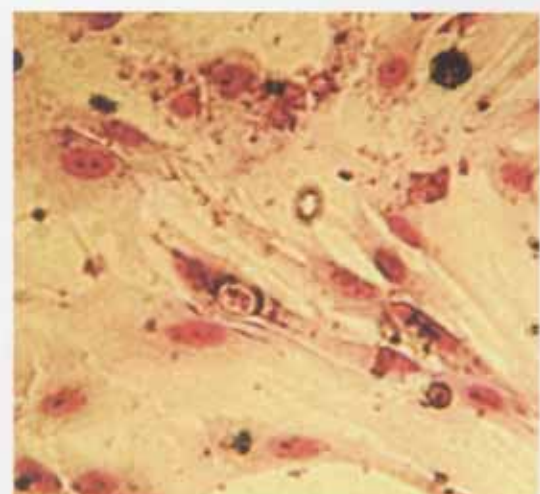


图3 D-gal+PQQ (10^{-6} mol/L) 组

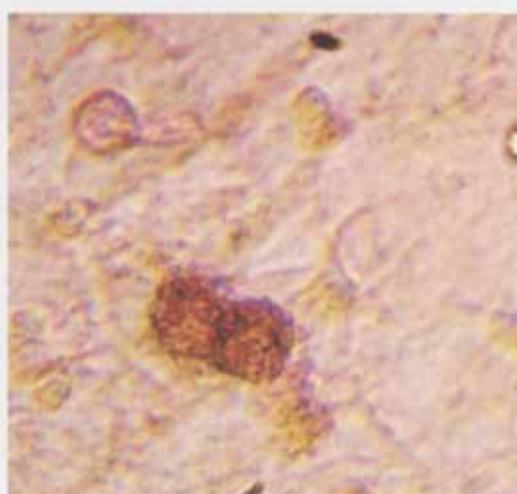


图4 对照组Bax蛋白的表达

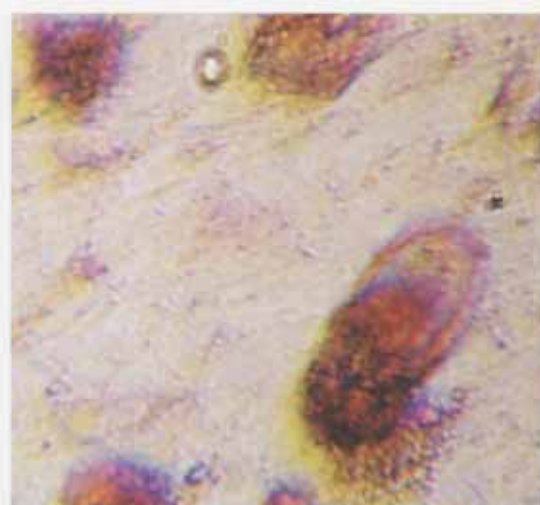


图5 D-gal组Bax蛋白的表达

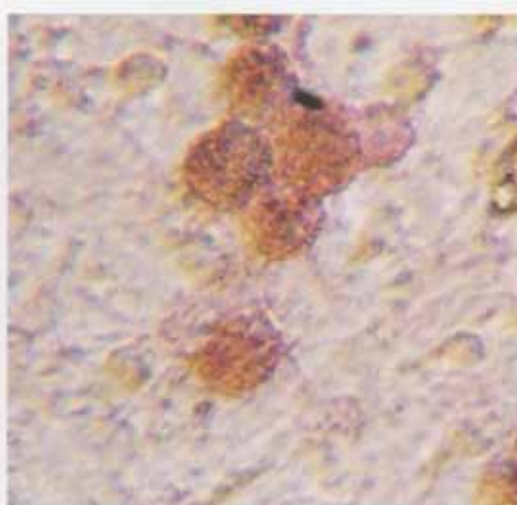


图6 D-gal+PQQ (10^{-6} mol/L) 组Bax蛋白的表达