

# 番茄红素对鱼藤酮所致 PC12 细胞线粒体损伤的影响

罗连响<sup>1</sup>, 李晓玲<sup>2</sup>, 朱少平<sup>3</sup>, 曾敏娟<sup>3</sup>, 鲍波<sup>1,3\*</sup>

(1. 广东医学院病理生理教研室, 广东 湛江 524023; 2. 广东医学院微生物学和免疫学教研室, 广东 湛江 524023; 3. 广东医学院实验动物学教研室, 广东 湛江 524023)

**[摘要]** 目的:研究番茄红素对鱼藤酮诱导 PC12 细胞线粒体损伤的保护作用。方法:采用鱼藤酮( $0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )诱导 PC12 细胞损伤模型,给予番茄红素( $3,10,30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )预处理 2 h 后,加入鱼藤酮,使终浓度达到  $0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,培养 24 h 后,CCK-8 法检测细胞存活率,倒置相差显微镜观察细胞形态改变、透射电镜观察细胞线粒体超微结构,罗丹明 123 染色检测线粒体膜电位,以观察番茄红素的保护作用。结果:CCK-8 结果显示与正常对照组比较,模型组细胞存活率下降为  $70.34\% \pm 2.81\%$  ( $P < 0.05$ ),与模型组比较,番茄红素( $3,10,30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )预处理后其细胞存活率分别提高到  $83.09\% \pm 3.15\%$ ,  $87.24\% \pm 2.15\%$ ,  $89.17\% \pm 2.26\%$  ( $P < 0.05$ );倒置相差显微镜观察显示鱼藤酮可导致 PC12 细胞凋亡,经番茄红素处理后,模型细胞凋亡情况明显改善;透射电镜观察显示鱼藤酮可导致 PC12 细胞线粒体超微结构发生改变,经番茄红素处理后,模型细胞凋亡情况明显改善;流式细胞仪检测结果显示与正常对照组比较,模型组细胞线粒体膜电位平均荧光强度下降为  $151.63 \pm 12.25$  ( $P < 0.05$ ),经番茄红素( $3,10,30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )预处理后线粒体膜电位平均荧光强度分别提高到  $202.24 \pm 26.28$ ,  $226.21 \pm 9.71$ ,  $238.83 \pm 10.29$  ( $P < 0.05$ )。结论:番茄红素对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞线粒体损伤有保护作用。

**[关键词]** 帕金森病; 番茄红素; PC12 细胞; 鱼藤酮; 线粒体  
**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0181-05  
**[doi]** 10.11653/syfy2013200181

## Effect of Lycopene on Mitochondrial Damage of PC12 Cells Induced by Rotenone

LUO Lian-xiang<sup>1</sup>, LI Xiao-ling<sup>2</sup>, ZHU Shao-ping<sup>3</sup>, ZENG Min-juan<sup>3</sup>, BAO Bo<sup>1,3\*</sup>

(1. Department of Pathophysiology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;  
2. Department of Microbiology and Immunology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;  
3. Department of Experimental Zoology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effects of lycopene against rotenone-induced mitochondrial damage in PC12 cells. **Method:** All the experiments were carried out with PC12 *in vitro*, which were divided into 5 group, control, model ( $0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), lycopene ( $3,10,30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) preincubation. Cell viability was determined by CCK-8 assay; inverted phase contrast microscope was used to observe the cell morphological was; the ultrastructural changes of neuronal mitochondria were viewed under transmission electron microscope. The flow cytometry was used to detect the mitochondrial membrane potential (MMP). **Result:** CCK-8 assay showed that rotenone had cytotoxicity in PC12 cells, compared with the cells in the control group, cell viability was declined to  $70.34\% \pm 2.81\%$  ( $P < 0.05$ ), the pre-treatment of lycopene ( $3,10,30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) could significantly increase the PC12 cell viability, cell viability was increased to  $83.09\% \pm 3.15\%$ ,  $87.24\% \pm 2.15\%$ ,  $89.17\% \pm 2.26\%$  ( $P < 0.05$ ). Compared with the cells in the model group, the number and

**[收稿日期]** 20130605(002)  
**[基金项目]** 广东省科技计划项目(2010B060500015); 广东医学院青年基金(XQ1309)  
**[第一作者]** 罗连响,硕士研究生,从事老年性神经系统疾病研究,Tel:0759-2388558,E-mail:luolianxiang321@163.com  
**[通讯作者]** \* 鲍波,硕士生导师,老年性神经系统疾病研究,Tel:0759-2388558,E-mail:you\_and\_me\_2008@yeah.net

morphology of neuronal mitochondria changed distinctly in the lycopene pretreated cells. Compared with the cells in the model group, the pre-treatment of lycopene (3, 10, 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) increased mean fluorescence intensity of mitochondrial membrane potential to  $202.24 \pm 26.28$ ,  $226.21 \pm 9.71$ ,  $238.83 \pm 10.29$  ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Lycopene can exert protective effects against rotenone-induced mitochondrial damage in PC12 cells.

[Key words] Parkinson's disease; lycopene; PC12; rotenone; mitochondria

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种以震颤、肌强直、运动减少和姿势异常为特征的慢性神经系统变性疾病,黑质和纹状体多巴胺能神经元缺失和变性死亡是 PD 主要病理特征,其病理改变的确切病因还不清楚<sup>[1]</sup>,但是线粒体功能障碍是 PD 的病理机制之一,已经得到人们的认可<sup>[2]</sup>。

线粒体 DNA 缺陷、氧化磷酸化异常及能量代谢障碍,通常能引起细胞结构、功能发生一系列渐进性,甚至不可逆性的病理改变,在脑组织中影响尤为明显,因为大脑虽然质量仅占身体总重的 2%,但对氧的消耗量却要占到身体总消耗量的 25%。资料显示<sup>[3]</sup>,许多神经退变病患者在出现神经元丢失、认知功能减退等明显的临床病理症状以前,大脑顶颞叶皮层和海马的糖代谢已出现异常,氧化磷酸化系统已受到损伤,暗示线粒体功能下降、能量代谢衰减可能是老龄化神经退变病发病的早期信号<sup>[4]</sup>,因此,找到一种药物可以对抗线粒体损伤有望对帕金森疾病的治疗带来新的突破。

番茄红素(lycopene)是植物中所含的一种天然色素,主要存在于茄科植物西红柿的成熟果实中,它是目前在自然界的植物中被发现的最强抗氧化剂之一,它具有很强抗氧化作用和清除自由基能力。另外,它可以被人体吸收,由于其为脂溶性物质,因而可以通过“血脑屏障”进入中枢神经系统发挥神经元的保护作用(本课题组另外研究已得到证实),本实验采用鱼藤酮诱导大鼠嗜铬细胞瘤细胞株(PC12)细胞建立帕金森病细胞模型,探讨番茄红素对鱼藤酮所致 PC12 细胞线粒体损伤的保护作用。

## 1 材料

**1.1 药品与试剂** 番茄红素(批号 L9879)、鱼藤酮(批号 R8875)、罗丹明 123(批号 83702)均购自美国 Sigma 公司, CCK-8 检测试剂盒(批号 C0038)购自碧云天生物技术研究,其他为国产分析纯试剂。番茄红素用二甲基亚砜(DMSO)溶解配成  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液,鱼藤酮用 DMSO 溶解配成  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液,  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存备用,临用时用完全培养液稀释至所用浓度, DMSO 的含量小于 0.1%。

**1.2 仪器** 透射电镜(日本,尼康),全自动酶标仪

(美国,伯乐),倒置显微镜(日本,尼康),流式细胞仪(美国, BD 公司)。

**1.3 细胞株** PC12 细胞(rat pheochromocytoma cells, PC12, 高分化型)由中山大学病理教研室惠赠。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 细胞培养于 RPMI 1640 培养基,内含 10% 胎牛血清,  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素,  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素,置于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养,隔天换液,传代培养,取对数生长期细胞用于实验。

**2.2 实验分组及药物处理细胞** 细胞接种于 96 孔板或 6 孔板中, 24 h 贴壁后,加入不同浓度的番茄红素,使终浓度分别达到 3, 10, 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 2 h 后根据分组加入鱼藤酮,使终浓度达到  $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 实验分组:正常对照组;  $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  鱼藤酮组; 3, 10, 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  番茄红素预处理组。

**2.3 CCK-8 检测细胞存活率** 细胞以  $10^5$  个/mL 接种于 96 孔板,每孔  $100 \mu\text{L}$ , 每组 6 个复孔,按上述分组方法处理后,细胞培养 24 h,培养结束后,每孔加入  $10 \mu\text{L}$  CCK-8,继续孵育 2 h,酶标仪 450 nm 测定各孔吸光度(A)。计算存活率。

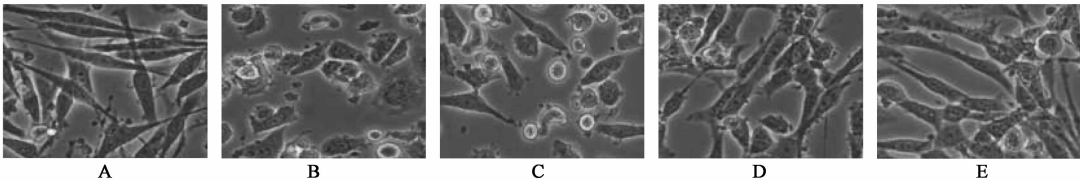
$$\text{细胞存活率} = \frac{(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}})}{(A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})} \times 100\%$$

**2.4 细胞形态观察** 取处于对数生长期的 PC12 细胞,以  $2 \times 10^5$  个/mL 细胞密度接种于孔内置有清洁盖玻片的 24 孔培养板,每孔 1 mL,待细胞贴壁后,按上述方法分组处理,24 h 后在倒置相差显微镜下( $400 \times$ )观察各组 PC12 细胞的存活及神经突触生长情况。

**2.5 细胞超微结构观察** 将对数生长期的 PC12 细胞以  $10^6$  个/mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL,待细胞贴壁后,按上述方法处理细胞后,结束培养, 2% 戊二醛 PBS 固定( $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ),  $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, PBS 重悬细胞,吸入有琼脂空槽的离心管中,  $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,切下尖槽内含细胞团的琼脂块, 1% 戊二醛固定( $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), PBS 漂洗 1 次, 1% 锇酸后固定 2 h, 30%, 50%, 70% 乙醇逐级脱水 10 min, 4% 醋酸双氧铀快染过夜, 80%, 95% 乙醇脱水 10

min,100% 乙醇脱水 10 min×2 次,环氧丙烷置换 10 min×2 次,环氧树脂梯度渗透,618 环氧树脂包埋 60℃,48 h,金刚刀超薄切片机切片,片厚70 nm,醋酸铅片染 2 min,透射电镜观察、摄片。

**2.6 线粒体膜电位检测** 细胞以 10<sup>6</sup>/mL 接种于 6 孔板待细胞贴壁后,药物处理 24 h,胰酶消化收集细胞,PBS 洗两次,将细胞重悬于 PBS 中,加罗丹明 123 染液,终浓度为 10 g·L<sup>-1</sup>,37℃,避光孵育 30 min 每隔(10 min 振摇 1 次),离心去掉未结合的罗丹明 123 染液,PBS 洗 2 次,然后 PBS 重悬,用流式细胞仪检测其荧光强度,计算 10 000 个活细胞,以阳性细胞的平均荧光强度表示线粒体膜电位。



A. 正常对照组;B. 鱼藤酮损伤组(0.5 μmol·L<sup>-1</sup>);C. 番茄红素预处理组(0.5 μmol·L<sup>-1</sup> 鱼藤酮 + 3 μmol·L<sup>-1</sup> 番茄红素);  
D. 番茄红素预处理组(0.5 μmol·L<sup>-1</sup> 鱼藤酮 + 10 μmol·L<sup>-1</sup> 番茄红素);E. 番茄红素预处理组(0.5 μmol·L<sup>-1</sup> 鱼藤酮 + 30 μmol·L<sup>-1</sup> 番茄红素)

图 1 番茄红素对 0.5 μmol·L<sup>-1</sup> 鱼藤酮诱导 24 h 的 PC12 细胞损伤的形态影响(倒置相差显微镜,×400)

**3.2 番茄红素对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞存活率的影响** 与正常组比较,模型组加入 0.5 μmol·L<sup>-1</sup> 鱼藤酮后,细胞活力降至正常对照组的 70.34% ± 2.81% ( $P < 0.05$ )。与鱼藤酮损伤组比较,3,10,30 μmol·L<sup>-1</sup> 番茄红素预处理组细胞存活率明显上升,分别为 83.09% ± 3.15%,87.24% ± 2.15%,89.17% ± 2.26% (均  $P < 0.05$ )。

**3.3 细胞超微结构的观察** 透射电镜下观察,空白对照组:PC12 细胞线粒体结构完整,数目较多,嵴清晰可见。鱼藤酮损伤组:线粒体局部水肿,部分线粒体嵴排列紊乱、部分嵴消失,且发生空泡样变性,另一部分线粒体膜融合破损。番茄红素预处理组:线粒体数目多且形态正常,嵴清晰可见图 2。

**3.4 对线粒体膜电位的影响** 线粒体膜电位结果显示,单纯鱼藤酮 0.5 μmol·L<sup>-1</sup> 加入 24 h 后,与对照组相比,检测到细胞线粒体平均荧光强度降低 ( $P < 0.05$ ),表明细胞线粒体膜电位下降,提示鱼藤酮作为线粒复合酶 I 抑制剂可通过降低线粒体膜电位,而引起细胞功能障碍。3,10,30 μmol·L<sup>-1</sup> 番茄红素预处理 2 h 后,再加入 0.5 μmol·L<sup>-1</sup> 鱼藤酮作用 24 h,检测到细胞线粒体荧光强度明显增加 ( $P < 0.05$ ),表明细胞线粒体膜电位升高,提示番茄红素可以提高细胞线粒体膜电位,从而对线粒体

**2.7 统计学处理** 所有数据应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行处理,实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,数据采用单因素方差分析(ANOVA)各组间差异, $t$  检验分析两两间差异。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

3 结果

**3.1 番茄红素对鱼藤酮所致 PC12 细胞形态的影响** 正常对照组培养的细胞呈梭型,有较长突触。鱼藤酮处理组,梭型细胞减少,出现球形或椭圆形,细胞突触变短或者消失,有的细胞已经脱壁。而番茄红素预处理组显示细胞梭型细胞明显增加,突触较长球形和椭圆形细胞较鱼藤酮损伤组减少(图 1)。

的功能障碍起到保护作用。见表 1。

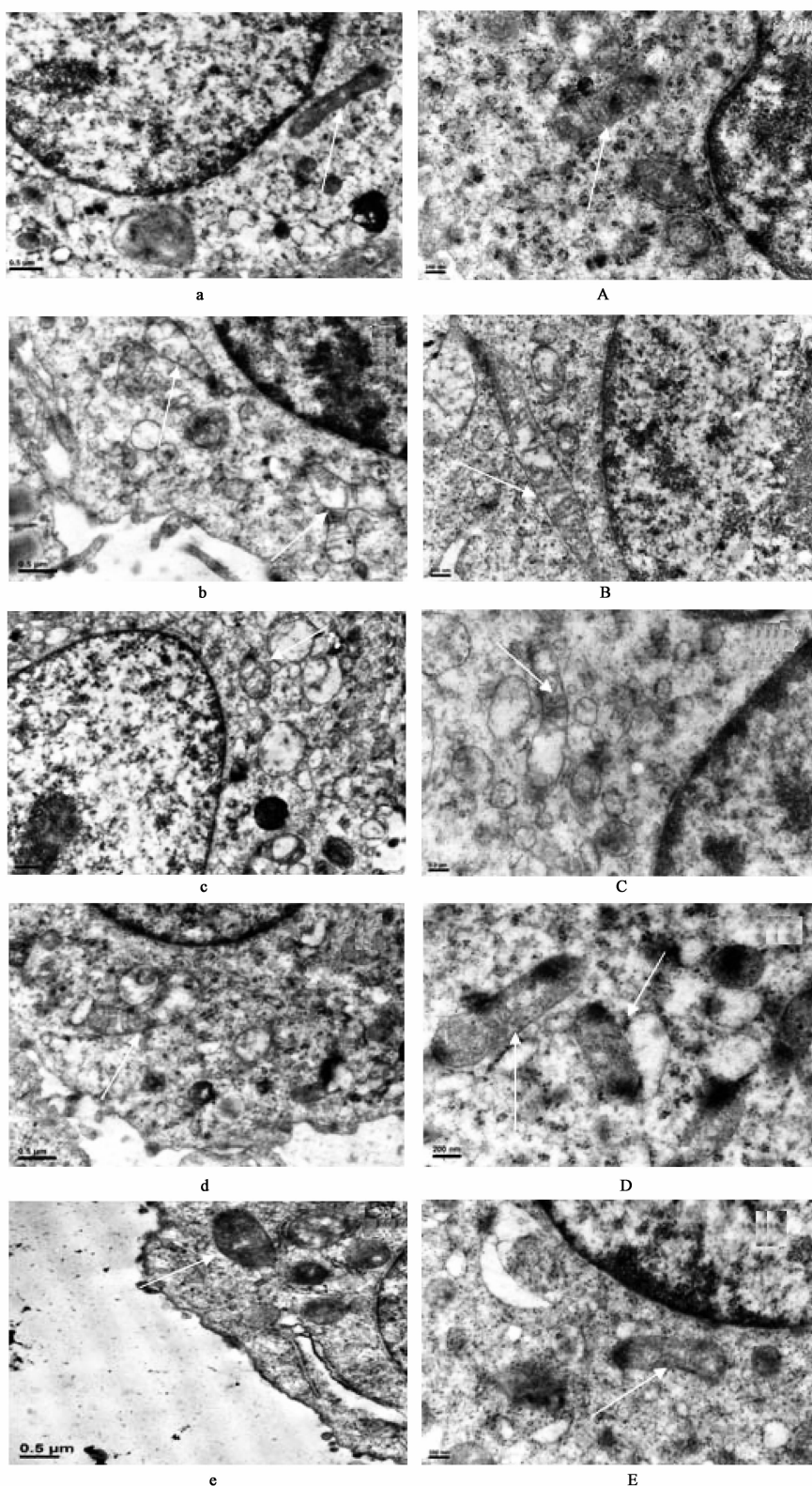
表 1 番茄红素对鱼藤酮所致 PC12 细胞线粒体膜电位的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 分组                    | 浓度/μmol·L <sup>-1</sup> | 平均荧光强度                       |
|-----------------------|-------------------------|------------------------------|
| 正常对照                  | —                       | 280.10 ± 4.81                |
| 鱼藤酮损伤                 | 0.5                     | 151.63 ± 12.25 <sup>1)</sup> |
| 番茄红素预处理 <sup>3)</sup> | 3                       | 202.24 ± 26.28 <sup>2)</sup> |
|                       | 10                      | 226.21 ± 9.71 <sup>2)</sup>  |
|                       | 30                      | 238.83 ± 10.29 <sup>2)</sup> |

注:与正常对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与鱼藤酮损伤组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; <sup>3)</sup> 鱼藤酮 0.5 μmol·L<sup>-1</sup> 加入作用 24 h。

4 讨论

线粒体是广泛存在于各种真核细胞中具有环状 DNA,可以进行独立复制的特殊的细胞器。它不仅为细胞的生命活动提供场所,而且是细胞内氧化磷酸化和形成 ATP 的主要场所,还具有多种其他极为重要的生理功能,包括产生超氧阴离子等活性氧、调节细胞氧化还原电势和信号传导、调控细胞凋亡和基因表达<sup>[5]</sup>。线粒体呼吸功能的障碍是许多神经退行性疾病发病早期共识的病理现象,研究表明<sup>[6]</sup>,线粒体功能障碍是 PD 发病机制之一,鱼藤酮通过抑制线粒体复合物 I 的活性,而导致电子传递链阻断,影响线粒体的产能过程,细胞缺少 ATP,导



a, A. 正常对照组; b, B. 鱼藤酮损伤组 ( $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ );  
c, C. 番茄红素预处理组 ( $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  鱼藤酮 +  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  番茄红素); d, D. 番茄红素预处理组  
( $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  鱼藤酮 +  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  番茄红素); e, E. 番茄红素预处理组 ( $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  鱼藤酮 +  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  番茄红素)  
上图中箭头所指为线粒体结构, 其中 a, b, c, d, e 放大倍数为 25 000 倍, A, B, C, D, E 放大倍数为 50 000 倍

图 2 番茄红素对  $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  鱼藤酮诱导 24 h 的 PC12 细胞损伤线粒体结构的影响

致线粒体发生一系列的结构的和功能的改变。在本研究中,电镜下观察到  $0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的鱼藤酮作用 PC12 细胞 24 h,导致线粒体局部水肿、空泡化,部分线粒体嵴排列紊乱、甚至发生嵴断裂或者消失,这严重影响线粒体能量的传递和转化,从而导致细胞出现病理状况,而番茄红素的预处理显然对细胞的形态有一定的保护作用,线粒体超微结构明显接近正常状态。

线粒体是一层双层膜围成的囊状结构,外膜通透性较大,可允许相对分子质量在 15 kD 以下的物质自由通过,内膜通透性较小,相对分子质量大于 1.5 kD 的物质不能自由通过,但可通过内膜上的一些载体蛋白与通道运输某些物质<sup>[7]</sup>。内膜上有质子泵,它将线粒体基质中的质子泵入外室,从而形成了横跨内膜的膜电位,以维持线粒体功能的正常发挥,当细胞受到鱼藤酮的损伤时,膜通透性改变<sup>[8]</sup>。线粒体复合物 I 活性下降,线粒体基质内氧化磷酸化反应减少,ATP 产生减少, $\text{H}^+$  生成受抑制,其电势发生改变,线粒体膜电位去极化,pH 值升高,最终导致细胞死亡<sup>[9]</sup>。Rh123 是一种为线粒体所吸收的荧光染色,其吸收值随 MMP 的改变而呈相应的变化,从而改变细胞的荧光强度,因此,可通过检测细胞 Rh123 的荧光强度反映细胞的 MMP<sup>[10]</sup>。本实验用鱼藤酮作用细胞后,荧光强度下降,线粒体膜电位降低,而番茄红素的预处理后,荧光强度上升,膜电位提高,提示番茄红素能够抑制鱼藤酮诱导的线粒体膜电位去极化,从而保护细胞。

研究线粒体在鱼藤酮损伤 PC12 细胞过程中的变化和作用,不仅能为神经退行性疾病病理机制的研究提供新视点,对新药开发及相关疾病的治疗也能提供新思路,番茄红素通过保护线粒体结构和功能来抑制鱼藤酮对 PC12 细胞的损伤,番茄红素作为自然界目前发现的最强抗氧化物质,对神经疾病尤其是帕金森疾病的治疗将会成为一个研究热点,番茄红素用于 PD 的治疗还有待进一步的研究。

[参考文献]

[ 1 ] Hui J, Tao L, Wang W X, et al. Protective effects of

[ Gly14 ]-Humanin on  $\beta$ -amyloid-induced PC12 cell death by preventing mitochondrial dysfunction [ J ]. *Neurochemistry International*, 2010, 56(3) :417.

[ 2 ] 乐亮,李晶洁,黎仕锋,等. 米诺环素抑制 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞凋亡和线粒体功能损伤 [ J ]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(5) :895.

[ 3 ] Liu W B, Zhou J, Qu Y. Neuroprotective effect of osthole on MPP<sup>+</sup>-induced cytotoxicity in PC12 cells via inhibition of mitochondrial dysfunction and ROS production [ J ]. *Neurochemistry International*, 2010, 57(3) :206.

[ 4 ] 马耀华,王雪晶,荆婧,等. 1-甲基-4-苯基吡啶离子调控线粒体自噬对线粒体氧化应激损伤的影响 [ J ]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2012, 39(6) :489.

[ 5 ] Liu W M, Jiang B, Bao Y M, et al. Protocatechuic acid inhibits apoptosis by mitochondrial dysfunction in rotenone-induced PC12 cells [ J ]. *Toxicology in Vitro*, 2008, 22(2) :430.

[ 6 ] Li X Y, Jing C Q, Zang X Y, et al. Toxic cytological alteration and mitochondrial dysfunction in PC12 cells induced by 1-octyl-3-methylimidazolium chloride [ J ]. *Toxicology In Vitro*, 2012, 26(7) :1087.

[ 7 ] Liu X Y, Xu X D, Yan M, et al. Protective effects of galantamine against A $\beta$ -induced PC12 cell apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress [ J ]. *Neurochemistry International*, 2010, 57(5) :588.

[ 8 ] Liu S C, Han Y G, Zhang T. Protective effect of trifluoperazine on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells [ J ]. *Brain Research Bulletin*, 2011, 84(2) :183.

[ 9 ] Kristin K B, Martine U, Anne C. The neurogenic basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD6 enhances mitochondrial biogenesis and bioenergetics to confer tolerance of neuronal PC12-NeuroD6 cells to the mitochondrial stressor rotenone [ J ]. *Experimental Cell Research*, 2012, 318(17) :2200.

[ 10 ] 范国华,陈生弟,戚辰. 热休克蛋白减轻 1-甲基-4-苯基-吡啶离子引起的线粒体功能障碍和氧化应激 [ J ]. *中华神经科杂志*, 2005, 38(12) :773.

[责任编辑 聂淑琴]