

# 芦丁对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用

袁倩倩<sup>1,2</sup>, 赵海洲<sup>2</sup>, 马延红<sup>2</sup>, 龚记熠<sup>1</sup>, 乙引<sup>1\*</sup>, 刘文华<sup>2\*</sup>

(1. 贵州师范大学 生命科学学院, 贵阳 550025;

2. 肇庆学院 生命科学学院, 广东 肇庆 526061)

**[摘要]** **目的:**研究芦丁对 1-甲基-4-苯基-吡啶离子(MPP<sup>+</sup>)诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用,并探讨其作用机制。**方法:**体外培养 SH-SY5Y 细胞,建立 MPP<sup>+</sup> 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤模型,实验分为空白组,MPP<sup>+</sup> 损伤模型组,芦丁干预组。模型组用 1 mmol·L<sup>-1</sup> MPP<sup>+</sup> 处理细胞 48 h,干预组在 MPP<sup>+</sup> 损伤基础上,给予不同质量浓度芦丁(50,100,200,300 mg·L<sup>-1</sup>)。噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活性;Hoechst 33342 染色观察细胞核形态变化;2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)荧光探针标记法观察细胞内活性氧(ROS)的变化;流式细胞仪检测线粒体膜电位;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞色素 C(Cyt-C)和磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-ERK1/2)蛋白表达水平。**结果:**与空白组比较,模型组中细胞活性显著降低( $P < 0.01$ ),Hoechst 33342 染色下可见细胞胞体变小、核皱缩,细胞 ROS 显著升高( $P < 0.01$ ),线粒体膜电位显著降低( $P < 0.01$ )。Western blot 结果表明,模型组 Cyt-C 含量升高( $P < 0.01$ ),p-ERK1/2 水平降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,预先 4 h 给予不同浓度的芦丁(100,200,300 mg·L<sup>-1</sup>)能明显改善 SH-SY5Y 细胞的活性( $P < 0.05, P < 0.01$ ),抑制 ROS 升高( $P < 0.01$ ),并恢复线粒体膜高能电位( $P < 0.05$ )。Western blot 结果显示,芦丁能够抑制 MPP<sup>+</sup> 引起的 Cyt-C 蛋白升高( $P < 0.01$ )和 p-ERK1/2 蛋白降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**芦丁对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤具有显著的保护作用,其机制可能与抗氧化应激有关。

**[关键词]** 芦丁; 1-甲基-4-苯基-吡啶离子(MPP<sup>+</sup>); SH-SY5Y 细胞; 神经保护; 氧化应激

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)16-0109-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.20181622

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180523.1533.012.html>

**[网络出版时间]** 2018-05-24 10:41

## Protective Effect of Rutin on SH-SY5Y Cells Injured by MPP<sup>+</sup>

YUAN Qian-qian<sup>1,2</sup>, ZHAO Hai-zhou<sup>2</sup>, MA Yan-hong<sup>2</sup>, GONG Ji-yi<sup>1</sup>, YI Yin<sup>1\*</sup>, LIU Wen-hua<sup>2\*</sup>

(1. School of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550025, China;

2. School of Life Science, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of rutin on SH-SY5Y cells injured by 1-methyl-4-phenyl pyridinium (MPP<sup>+</sup>). **Method:** SH-SY5Y cells were exposed to various doses of rutin for 4 h, and then treated with 1 mmol·L<sup>-1</sup> MPP<sup>+</sup> for 48 h. The cell viability was detected with methye thiazdye telrazlium (MTT) assay, and the nuclear morphology was assessed with Hoechst 33342 staining. Reactive oxygen species (ROS) was measured with fluorescence microscope, and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was determined with flow cytometry. The protein levels of Cytochrome C (Cyt-C) and phosphorylated extracellular regulated protein kinases 1/2 (p-ERK1/2) were detected by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, the cell viability of the MPP<sup>+</sup>-treated group was reduced to 49.6%, the shrunk cell body and nuclear condensation were also observed

**[收稿日期]** 20180226(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(31271124);广东省教育厅重大项目(2014KZDXM075);广东省教育厅创新团队项目(2015KCXTD032);广东省教育厅青年创新人才项目(2016KQNCX178)

**[第一作者]** 袁倩倩,在读硕士,从事生物化学与分子生物学研究,Tel: 0853-33746040,E-mail: 416160896@qq.com

**[通信作者]** \*乙引,博士,教授,从事植物生理与生物化学研究,Tel: 0851-83227351,E-mail: 100236417@qq.com;

\*刘文华,博士,教授,从事神经生物学研究,Tel: 0758-2716359,E-mail: wenhualiu@hotmail.com

after Hoechst 33342 staining. Meanwhile, the ROS level was significantly increased, and the membrane potential was obviously reduced. Western blot results showed that the expression of Cyt-C was increased, whereas p-ERK1/2 was decreased ( $P < 0.01$ ). However, pretreatment with rutin prior to MPP<sup>+</sup> exposure reduced the cell viability, ameliorated the cell morphology, inhibited the increasement of ROS and restored the membrane potential. Moreover, pretreatment with rutin can inhibit the increase of Cyt-C and the decrease of p-ERK1/2 induced by MPP<sup>+</sup> in SH-SY5Y cells ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Rutin can protect the SH-SY5Y cells against the damage induced by MPP<sup>+</sup>, which may be correlated with anti-oxidant activity and ERK activation pathway.

[**Key words**] rutin; 1-methyl-4-phenyl pyridinium (MPP<sup>+</sup>); SH-SY5Y cell; neuroprotective effect; oxidative stress

帕金森 (Parkinson's disease, PD) 是一种常见的神经系统退行性疾病,其主要病理改变是黑质致密部多巴胺能神经元变性、死亡以及路易小体形成。PD 的临床表现为静止性震颤、肌僵直、运动迟缓、姿势平衡、认知及睡眠障碍<sup>[1-2]</sup>。PD 的发病机制尚不清楚,研究表明,氧化应激、线粒体功能障碍、细胞凋亡及神经性炎症等因素参与了帕金森病的病理机制<sup>[3-4]</sup>。目前临床用于治疗 PD 的左旋多巴等药物,长期使用疗效减退,并且产生毒副作用。中药治疗 PD 有较多的实践经验,而且毒副作用相对较小,因此,对中药有效成分进行深入研究,具有重要意义<sup>[5]</sup>。

芦丁别名维生素 P,芸香苷,是黄酮类的代表化合物。芦丁广泛分布于自然界,尤以豆科植物的槐米、芸香科植物的芸香草等含量较高,常作为提取芦丁的原料<sup>[6]</sup>。芦丁具抗氧化、抗自由基、止血、降压、舒张血管、抗炎、抗病毒、神经保护等多种药理活性<sup>[7-9]</sup>。目前临床上芦丁主要用于止血、防出血、降压、舒张血管、改善微循环等心血管疾病的治疗<sup>[10-11]</sup>。

体外培养细胞模型常用于活性成分的药效、药理研究,是药物筛选的有力工具。建立 PD 细胞模型常用的神经毒素有 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA), 1-甲基-4-苯基-吡啶离子 (MPP<sup>+</sup>) 以及鱼藤酮等,常用的细胞株有 SH-SY5Y 和 PC-12 细胞。这 3 种神经毒素中,鱼藤酮的特异性和重复性较差,限制了其使用;6-OHDA 和 MPP<sup>+</sup> 都对多巴胺能神经元具有一定选择性,造模的重复性和效果较好,应用较广<sup>[12-13]</sup>。研究发现芦丁通过抑制 6-OHDA 引起的超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、以及谷胱甘肽水平的下降,来对 PC-12 细胞起到保护作用<sup>[14-15]</sup>;芦丁抑制鱼藤酮引起的 SH-SY5Y 细胞活性氧 (ROS) 增加、线粒体膜电位下降来增加细胞存活率<sup>[16]</sup>。另外,有两篇文献简单提到

芦丁对 MPP<sup>+</sup> 引起的 PC-12 细胞损伤具有保护作用,增加细胞存活率,但都没有详细报道芦丁的保护机制<sup>[17-18]</sup>。由于采用 MPP<sup>+</sup> 和 SH-SY5Y 建立的 PD 细胞模型效果较好,但芦丁对该 PD 细胞模型的保护作用尚未见报道,因此,本实验采用 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤模型,探讨芦丁的细胞保护作用,为 PD 新药物的研发提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** SH-SY5Y 细胞购自中国典型培养物保藏中心(武汉大学)。

**1.2 药物及试剂** DMEM 高糖培养基,胎牛血清,青链霉素和谷氨酰胺,磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 0.25% 胰酶 (美国 Gibco 公司,批号分别为 8117289, 42F6555K, 02622, AC11496277, 21307); MPP<sup>+</sup>, 噻唑蓝 (MTT), 二甲基亚砷 (DMSO) (美国 Sigma 公司,批号分别为 MKCF0652, MKCF0652, WXBC1590W); 芦丁 (美国 Ark Pharm 公司,批号 WG0032066-160818001, 纯度 > 98%); 活性氧 (ROS) 检测试剂盒, 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1), Hoechst 33342 活细胞染色液, BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 及 IP 细胞裂解液 (上海碧云天有限公司,批号分别为 011917170503, 041917170701, 050417170817, 070317170818, 061917170325); ECL 发光液 (上海天能科技有限公司,批号 180500); 细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2) 抗体, 磷酸化-ERK1/2 (p-ERK1/2) 抗体, 细胞色素-C (Cyt-C) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 10, 17, 3);  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,批号 L1616); Goat anti-Rabbit IgG 二抗, Gt X Ms IgG (H + L) 二抗 (美国 Merck Millipore 公司,批号分别为 2884131, 2475681); 三联液: H<sub>2</sub>O 100 mL 中加入十二烷基磺酸钠 10 g (广州瑞舒生物科技有限公司,批号 288420140306), 10 mol·L<sup>-1</sup> HCl 0.1 mL (衡阳

市凯信化工试剂有限公司,批号 00140112)及异丁醇 5 mL(广州化工试剂厂,批号 20160327);其余试剂均为国产分析纯。

**1.3 仪器** ELx800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);PICO 17 型离心机,HEARACELL 150i 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);ECLIPSE TS100 型倒置和 ECLIPSE Gi 型正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);CytoFLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);PowerP 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);DYCZ-40B 转膜仪(北京市六一仪器厂);Tanon 4200 型全自动化学发光成像分析系统(上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** SH-SY5Y 细胞用含 10% 血清,10 万 U·L<sup>-1</sup>青霉素,100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素和 1% 谷氨酰胺的 DMEM 高糖培养基,在恒温 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 以及饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养,每隔 2 ~ 3 d 传代 1 次,取对数期的细胞进行实验。

**2.2 MTT 比色法检测** 将细胞接种于 96 孔板,每孔细胞数约 1 × 10<sup>4</sup> 个,每孔 3 个重复,实验分为阴性组(无细胞,其余与空白组同),空白组,模型组(加入 1 mmol·L<sup>-1</sup> MPP<sup>+</sup>)及干预组(加不同浓度芦丁及 MPP<sup>+</sup>),细胞接种 24 h 后干预组分别加入 50, 100, 200, 300 mg·L<sup>-1</sup> 芦丁(溶于 DMSO,其体积分数不超过 0.3%),空白组及模型组加入相同体积 DMSO,4 h 后模型组和干预组加入 1 mmol·L<sup>-1</sup> MPP<sup>+</sup>,继续培养 48 h 后每孔加 MTT (5 g·L<sup>-1</sup>) 20 μL,孵育 4 h,每孔加入三联液 100 μL,置于摇床下低速振荡 12 h,随后用酶标仪检测吸光度 A,波长 490 nm,实验重复 3 次。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{药物组}} - A_{\text{阴性组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{阴性组}}) \times 100\%$$

**2.3 Hoechst 33342 染色** 将细胞接种于 24 孔板(接种前放入玻片),每孔细胞数约 6 × 10<sup>4</sup> 个,培养 24 h 后干预组分别加入 50, 100, 200, 300 mg·L<sup>-1</sup> 芦丁,空白组及模型组加入相同体积 DMSO,4 h 后干预组和模型组加入 1 mmol·L<sup>-1</sup> MPP<sup>+</sup>。培养 48 h 后每孔加入 Hoechst 33342 活细胞染色液 5 μL,37 °C 培养箱孵育 10 min,随后用 PBS 清洗 2 次,取出玻片,置于载玻片上,正置显微镜下观察、随机选取视野拍照,实验重复 3 次。

**2.4 DCFH-DA 荧光探针检测细胞 ROS 水平** 按 2.3 项分组处理细胞(不加玻片),培养 48 h 后,吸去细胞培养液,每孔加入 10 μmol·L<sup>-1</sup> DCFH-DA 染

色液 500 μL,37 °C 培养箱中孵育 20 min,然后用 DMEM 高糖培养基清洗细胞 3 次,置于倒置显微镜下观察、随机选取视野拍照,Image J 计算荧光强度,实验重复 3 次。

**2.5 流式细胞仪检测线粒体膜电位** 按 2.3 项分组处理细胞(不加玻片),培养 48 h 后,0.25% 胰酶消化,取 2 × 10<sup>6</sup> 个细胞重悬于 DMEM 高糖培养基 0.5 mL 中,加入 JC-1 染色缓冲液 0.5 mL,混匀,37 °C 培养箱中孵育 20 min,然后用 JC-1 染色缓冲液清洗细胞 2 次,3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 去上清,细胞重悬后采用流式细胞仪检测分析,实验重复 3 次。

**2.6 Western blot 检测蛋白水平** 将细胞接种于 6 孔板,按 2.3 项分组处理细胞(不加玻片),培养 48 h 后,吸去细胞培养液,PBS 清洗 2 次,每孔加入细胞裂解液 200 μL,4 °C 摇床振荡 10 min,15 000 × g 离心 15 min 后吸取上清。BCA 蛋白浓度试剂盒测定总蛋白含量,加 5 × loading buffer,沸水浴 10 min,冷却后加入泳道(样品上样蛋白为 30 μg,根据蛋白浓度算出相应上样体积),电泳 3 h,随后将蛋白转至 PVDF 膜(200 mA,3 h)。转膜完成后将膜置于 5% 奶粉(溶于 1 × TBST)中封闭 1 h,加一抗(ERK, p-ERK, 1:2 000; Cyt-C, β-actin, 1:1 000)孵育,4 °C 过夜。1 × TBST 洗膜 3 次,然后加二抗(1:3 000)孵育 1 h,1 × TBST 洗膜 3 次后用天能化学发光成像系统对膜进行成像及分析,检测 Cyt-C, ERK1/2, p-ERK1/2 表达水平,用 β-actin 作内参。Image J 分析条带灰度值,蛋白相对表达水平为目标蛋白灰度值与 β-actin 灰度值之比。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA)和 t 检验,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 MPP<sup>+</sup> 细胞存活率的影响** 模型组 SH-SY5Y 细胞经 1 mmol·L<sup>-1</sup> MPP<sup>+</sup> 作用 48 h 后,细胞存活率下降至约空白组的 49.6% (P < 0.01),干预组中的 3 个质量浓度组(100, 200, 300 mg·L<sup>-1</sup> 芦丁)细胞存活率均高于模型组,分别约是 58.4% (P < 0.05), 73.0% (P < 0.01), 78.9% (P < 0.01),但 50 mg·L<sup>-1</sup> 质量浓度组细胞存活率均为 50.8%,与模型组无显著差异,结果提示芦丁在一定范围内能剂量相关地改善 MPP<sup>+</sup> 损伤的 SH-SY5Y 细胞活性。见表 1,图 1。

**3.2 对 SH-SY5Y 细胞核形态的影响** 空白组中细胞呈现出弥漫均匀的低强度荧光,模型组中部分细

表 1 芦丁对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的存活率影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 1 Effect of rutin on cell viability in SH-SY5Y cells injured by MPP<sup>+</sup> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	细胞存活率/%
空白	-	100
模型	-	49.58 ± 0.15 <sup>1)</sup>
芦丁	50	50.76 ± 2.03
	100	58.40 ± 1.02 <sup>2)</sup>
	200	73.01 ± 1.03 <sup>3)</sup>
	300	81.54 ± 0.94 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

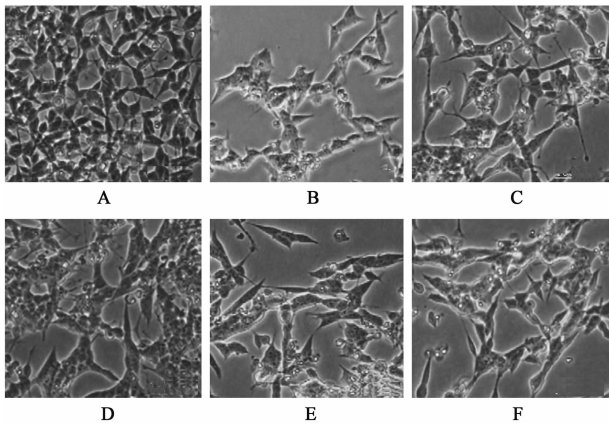


图 1 芦丁对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的存活率影响(倒置显微镜, ×100)

Fig.1 Effect of rutin on cell viability in SH-SY5Y cells injured by MPP<sup>+</sup> (inverted microscope, ×100)

胞呈现颗粒状亮蓝色荧光,细胞破碎、缩小,细胞核凝结固缩,凋亡现象明显,而干预组中荧光强度较低,其中高浓度组的细胞形态与空白组形态更为接近。见图 2。

**3.3 对 SH-SY5Y 细胞活性氧的影响** 与空白组比较,模型组细胞内二氯荧光素(2',7'-dichlorofluorescein,DCF)信号增强,荧光强度大,表明活性氧水平增加,与模型组比较,干预组(50,100,200,300 mg·L<sup>-1</sup>芦丁)荧光强度降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),胞内活性氧水平减少,结果提示芦丁在一定浓度范围内能抑制 MPP<sup>+</sup> 引起的 SH-SY5Y 细胞内活性氧水平上升。见表 2,图 3。

**3.4 对 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的影响** 空白组红绿色荧光比值为 1.55,与空白组比较,模型组中红绿色荧光比值降低为 0.50( $P < 0.01$ ),而干预组(100,200,300 mg·L<sup>-1</sup>芦丁)的红绿色荧光比值

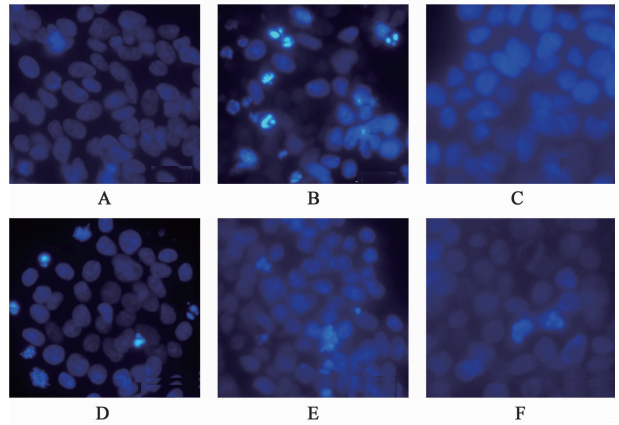


图 2 芦丁对 SH-SY5Y 细胞细胞核形态的影响(Hoechst 33342, ×40)

Fig.2 Effect of Rutin on nuclear morphology in SH-SY5Y cells injured by MPP<sup>+</sup> (Hoechst 33342, ×40)

表 2 芦丁对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的 ROS 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of rutin on ROS levels in SH-SY5Y cells injured by MPP<sup>+</sup> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	绿色荧光强度
空白	-	2.49 ± 0.46
模型	-	19.57 ± 0.74 <sup>1)</sup>
芦丁	50	15.21 ± 0.40 <sup>2)</sup>
	100	9.53 ± 0.96 <sup>3)</sup>
	200	7.97 ± 1.95 <sup>3)</sup>
	300	5.61 ± 0.70 <sup>3)</sup>

逐渐增大且均高于模型组,分别是 0.82( $P < 0.05$ ), 1.30( $P < 0.05$ ), 1.34( $P < 0.05$ ),但 50 mg·L<sup>-1</sup>干预组比值为 0.50,与模型组无差异,结果提示芦丁在一定浓度范围内能抑制 MPP<sup>+</sup> 引起的膜电位下降,从而修复损伤的线粒体。见图 3,表 3。

**3.5 对 SH-SY5Y 细胞 p-ERK 和 Cyt-C 蛋白含量的影响** 与空白组比较,模型组 p-ERK1/2 的表达显著减少( $P < 0.01$ ),Cyt-C 蛋白水平显著增加( $P < 0.01$ )。经 50,100,200,300 mg·L<sup>-1</sup>芦丁预处理后,除 50 mg·L<sup>-1</sup>剂量组外,后 3 个剂量的芦丁都能够明显抑制 MPP<sup>+</sup> 引起的 p-ERK1/2 下降( $P < 0.05, P < 0.01$ ),并呈现剂量依赖性;而这 4 个剂量的芦丁都能抑制 MPP<sup>+</sup> 引起 Cyt-C 水平增加( $P < 0.01$ )。ERK1/2 表达水平在各组间无显著差别。见图 4,表 4。

#### 4 讨论

PD 的主要病理改变是黑质多巴胺能神经元变性、死亡,其发病机制尚不完全清楚,现有研究表明,

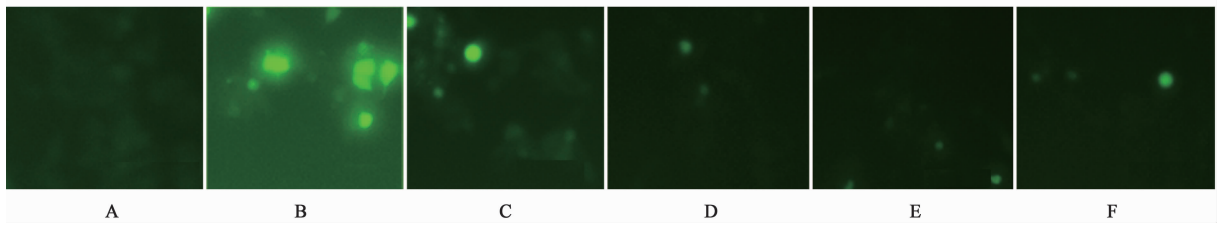


图 3 芦丁对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的 ROS 水平的影响 (荧光显微镜, ×200)

Fig. 3 Effect of rutin on ROS levels in SH-SY5Y cells injured by MPP<sup>+</sup> (fluorescence microscope, ×200)

表 3 芦丁对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的线粒体膜电位的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of rutin on mitochondrial membrane potential (MMP) in SH-SY5Y cells injured by MPP<sup>+</sup> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	红绿色荧光比
空白	-	1.55 ± 0.04
模型	-	0.50 ± 0.02 <sup>1)</sup>
芦丁	50	0.50 ± 0.07
	100	0.82 ± 0.11 <sup>2)</sup>
	200	1.30 ± 0.07 <sup>2)</sup>
	300	1.34 ± 0.09 <sup>2)</sup>

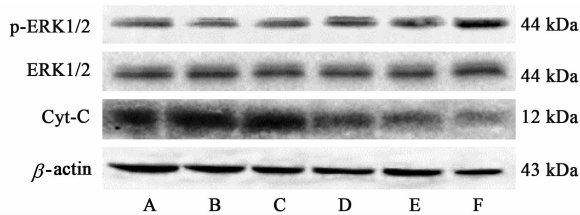


图 4 各组 SH-SY5Y 细胞 p-ERK 与 Cyt-C 蛋白的表达

Fig. 4 Protein expression levels of p-ERK and Cyt-C in SH-SY5Y cells

表 4 芦丁对 SH-SY5Y 细胞 p-ERK 与 Cyt-C 蛋白表达含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of rutin on protein expression levels of p-ERK and Cyt-C in SH-SY5Y cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	p-ERK/β-actin	Cyt-C/β-actin
空白	-	1.50 ± 0.11	0.73 ± 0.17
模型	-	0.74 ± 0.14 <sup>1)</sup>	1.70 ± 0.03 <sup>1)</sup>
芦丁	50	0.83 ± 0.27	1.12 ± 0.05 <sup>3)</sup>
	100	1.12 ± 0.18 <sup>2)</sup>	0.82 ± 0.09 <sup>3)</sup>
	200	1.19 ± 0.17 <sup>2)</sup>	0.71 ± 0.08 <sup>3)</sup>
	300	1.38 ± 0.14 <sup>3)</sup>	0.69 ± 0.05 <sup>3)</sup>

PD 可能与氧化应激损伤、免疫炎症反应、线粒体功能障碍及细胞凋亡有关<sup>[11]</sup>。在过度氧化应激情况下,细胞内产生大量 ROS,从而引起线粒体膜电位改变,线粒体功能失调,最终导致神经元变性死

亡<sup>[19]</sup>。芦丁在抗氧化、抗自由基、抗炎症等方面的药理活性已有较多文献报道,金越等<sup>[20]</sup>发现芦丁及其同系物槲皮素、异槲皮素都具有较强的抗自由基作用;周艳峰<sup>[21]</sup>的研究结果显示,芦丁通过减少 ROS 的生成来抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人晶状体上皮细胞的氧化损伤;Park 等<sup>[16]</sup>发现芦丁通过抑制鱼藤酮诱导产生 ROS 来对 SH-SY5Y 细胞起到保护作用。

MPP<sup>+</sup> 抑制线粒体呼吸链复合体 I,导致能量代谢紊乱,产生一系列氧化应激损伤。MPP<sup>+</sup> 对多巴胺能神经元具有较强的选择性,常用于 PD 细胞模型的诱导剂。本实验结果显示,1 mmol·L<sup>-1</sup> MPP<sup>+</sup> 作用 SH-SY5Y 细胞 48 h 后,细胞的存活率下降到空白组的 49.6%;MPP<sup>+</sup> 还引起细胞核皱缩,ROS 增加,以及线粒体膜电位下降。在加入 MPP<sup>+</sup> 4 h 前预先加入不同浓度的芦丁,结果表明,100, 200, 300 mg·L<sup>-1</sup> 的芦丁能够浓度依赖地提高细胞的存活率,改善细胞核形态,降低 ROS 水平,以及恢复线粒体正常膜电位。这与文献报道的芦丁能抗自由基、抗氧化,对细胞起到保护作用的结果一致<sup>[16,19]</sup>。

ERK1/2 为丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族成员之一,ERK1/2 参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞凋亡等生理过程。ROS 能激活 ERK1/2,然后 p-ERK1/2 活化环磷腺苷效应元件结合蛋白等转录因子,促进相关蛋白表达,反过来对 ROS 引起的细胞损伤起到保护作用<sup>[22]</sup>。对 MPP<sup>+</sup> 引起胞内 p-ERK1/2 水平的变化情况,文献报道不一,ZHU 等<sup>[23]</sup>用 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> MPP<sup>+</sup> 处理 SH-SY5Y 细胞,8 h 后 p-ERK 水平显著增加,并持续到加 MPP<sup>+</sup> 后 32 h;而 CAO 等<sup>[24]</sup>用 1 mmol·L<sup>-1</sup> MPP<sup>+</sup> 处理 SH-SY5Y 细胞,24 h 后 p-ERK 水平明显下降,两篇文献结果不一致的原因可能是处理的 MPP<sup>+</sup> 浓度不同。本实验结果显示,1 mmol·L<sup>-1</sup> MPP<sup>+</sup> 作用 SH-SY5Y 细胞 48 h 后,p-ERK1/2 水平显著下降,而 100, 200, 300 mg·L<sup>-1</sup> 芦丁能够剂量依赖地抑制 MPP<sup>+</sup> 引起的 p-ERK 水平下降,该结果与 CAO 等<sup>[24]</sup>报道的穗花杉双黄酮能抑制 MPP<sup>+</sup> 引起的 p-ERK 水平下降的结

果相似。

综上所述,芦丁对MPP<sup>+</sup>诱导的SH-SY5Y细胞损伤具有显著的保护作用,并在一定范围内呈现剂量依赖性。其机制可能与其减少ROS形成、恢复线粒体功能及ERK1/2信号通路有关。本研究有助于阐明芦丁的细胞保护作用机制,为帕金森病治疗药物的研发提供实验依据。

[参考文献]

[1] 褚玉霞,汪静. 帕金森病研究进展分析[J]. 医学综述,2006,12(18):1112-1113.

[2] Chinta S J, Woods G, Demaria M, et al. Cellular senescence is induced by the environmental neurotoxin paraquat and contributes to neuropathology linked to Parkinson's disease [J]. Cell Rep, 2018, 22(4): 930-940.

[3] MA Y Y, YANG L F, MA J P. Rutin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating autophagy and apoptosis[J]. BBA Mol Basis Dis, 2017, 1863(8):1904-1911.

[4] 荣华,綦艳秋,孙影,等. 镇肝熄风汤对帕金森病大鼠易激惹程度和结膜充血及NQO-1,HT的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(5):119-123.

[5] 裴文慧,刘继馨,吴嘉瑞,等. 基于中医传承辅助系统的治疗帕金森病方剂组方规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(3):205-208.

[6] 马溶,庞广昌. 芦丁对现代文明病的作用[J]. 食品科学,2013,34(7):307-711.

[7] LIU H,OU R W,SHANG H F. Advances in mechanism research of pain in Parkinson's disease [J]. Chin J Contemp Neurol Neurosur,2017,17(8):586-589.

[8] Al-Dhabi N A, Arasul M V, Park C H, et al. An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities [J]. Excli J, 2015, 14(3): 59-63.

[9] 何国荣,成银霞,穆鑫,等. 木犀草素联合芦丁抗6-羟多巴胺诱导的帕金森病大鼠震颤及神经保护作用[J]. 中国药理学通报,2012,28(5):626-632.

[10] 苗建红,白静,李建成,等. 芦丁对糖尿病肾病大鼠肾功能及肾组织病理变化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(13):122-125.

[11] 臧志和,曹丽萍,钟铃. 芦丁药理作用及制剂的研究进展[J]. 医药导报,2007,25(7):758-760.

[12] 孙涛. 帕金森病实验动物模型的研究进展[J]. 中国新药杂志,2014,23(18):2155-2160.

[13] 王丹平,王丹丹,陆光临. 帕金森细胞模型的研究进展[J]. 海峡药学,2015,27(6):12-14.

[14] Magalingam K B, Radhakrishnan A, Haleagrahara N. A bioflavonoid antioxidant protects rat pheochromocytoma (PC-12) cells against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity[J]. Int J Mol Med,2013,32(1): 235-240.

[15] Magalingam K B, Radhakrishnan A, Haleagrahara N. Protective effects of quercetin glycosides, rutin, and isoquercitrin against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity in rat pheochromocytoma (PC-12) cells[J]. Int J Immunopathol Pharmacol,2016,29(1): 30-39.

[16] Park S E, Sapkota K, Choi J H, et al. Rutin from *Dendropanax morbifera* Leveille protects human dopaminergic cells against rotenone induced cell injury through inhibiting JNK and p38 MAPK signaling[J]. Neurochem Res,2014,39(4):707-718.

[17] Park T H, Kwon O S, Park S Y, et al. N-methylated beta-carbolines protect PC12 cells from cytotoxic effect of MPP<sup>+</sup> by attenuation of mitochondrial membrane permeability change [J]. Neurosci Res,2003,46(3): 349-358.

[18] 樊晓娜,林生,朱承根,等. 小花异裂菊中的芳香类化学成分及其活性[J]. 中国中药杂志,2011,36(1): 48-56.

[19] Park C B, Larsson N G. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging [J]. J Cell Biol, 2011, 193(5): 809-818.

[20] 金越,吕勇,韩国柱,等. 槲皮素及异槲皮素、芦丁抗自由基活性的比较研究[J]. 中草药,2007,37(3): 408-412.

[21] 周艳峰. 芦丁抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的人晶状体上皮细胞氧化损伤和凋亡及其机制研究[D]. 合肥:安徽医科大学,2016.

[22] LIN E, Cavanaugh J E, Leak R K, et al. Rapid activation of ERK by 6-hydroxydopamine promotes survival of dopaminergic cells[J]. J Neurosci Res,2008,86(1): 108-117.

[23] ZHU J H, Horbinski C, GUO F, et al. Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death[J]. Am J Pathol,2007,170(1):75-86.

[24] CAO Q, QIN L, HUANG F, et al. Amentoflavone protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease model mice through PI3K/Akt and ERK signaling pathways[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017,319(80):80-90.

[责任编辑 周冰冰]