

# 天麻钩藤饮含药血清对 MPP<sup>+</sup> 诱导 PC12 细胞凋亡 JNK 通路的影响

王晓丽\*, 崔红霞, 李宏铃, 张宏莲, 马国芳  
(齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** 目的:观察天麻钩藤饮含药血清对 1-甲基-4-苯基-吡啶离子(1-methyl-4-phenyl pyridinium, MPP<sup>+</sup>)诱导的 PC12 细胞凋亡的影响,并且探讨其是否通过 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号通路发挥神经保护作用。方法:将 32 只 SD 大鼠随机分为空白组、天麻钩藤饮低、中、高剂量组,每组 8 只。天麻钩藤饮按照 5.7, 11.4, 22.8 g·kg<sup>-1</sup>灌胃,空白组灌胃等体积生理盐水,采血制备空白和含药血清。PC12 细胞常规培养并分为空白组、模型组、天麻钩藤饮含药血清低、中、高剂量组,空白组和模型组加空白血清,其他 3 组加 10%的天麻钩藤饮含药血清,孵育 30 min 后,模型组和含药血清组再加 500 μmol·L<sup>-1</sup> MPP<sup>+</sup> 共孵育 48 h 后收集细胞,采用 Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous MTS Reagent powder(MTS 法)检测细胞存活率。后续实验分为 5 组,即:空白组, MPP<sup>+</sup> 组, MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量组, MPP<sup>+</sup> + SP600125 组, MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量 + SP600125 组,采用 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡,分光光度法检测细胞半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)活性,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 JNK, p-JNK, c-Jun, p-c-Jun 蛋白表达水平。**结果:**与空白组比较,模型组细胞活力明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,10%的天麻钩藤饮低、中、高剂量含药血清组细胞活力显著增加( $P < 0.05$ )。后续试验中,与空白组比较, MPP<sup>+</sup> 组细胞凋亡率, Caspase-3 活性, p-JNK 和 p-c-Jun 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ )。与 MPP<sup>+</sup> 组比较, MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量组, MPP<sup>+</sup> + SP600125 组均能够使细胞凋亡率, Caspase-3 活性, p-JNK 和 p-c-Jun 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ),而 MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量 + SP600125 组的作用明显高于 MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量组( $P < 0.05$ ),但不高于 MPP<sup>+</sup> + SP600125 组。JNK 和 c-Jun 蛋白表达无明显变化。**结论:**天麻钩藤饮含药血清对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞的凋亡具有保护作用,其机制可能与 JNK 信号通路密切相关。

**[关键词]** 天麻钩藤饮; 血清药理; 神经保护; 细胞凋亡; 1-甲基-4-苯基-吡啶离子(MPP<sup>+</sup>); c-Jun 氨基末端激酶(JNK) 通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)21-0141-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017210141

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170809.1126.056.html>

**[网络出版时间]** 2017-08-09 11:26

## Effect of Tianma Gouteng Yin-containing Serum on 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) -induced PC12 Cell Apoptosis JNK Pathway

WANG Xiao-li\*, CUI Hong-xia, LI Hong-ling, ZHANG Hong-lian, MA Guo-fang  
(School of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To examine the effect of Tianma Gouteng Yin-containing serum on 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) -induced apoptosis of PC12 cells, and explore the neuroprotective effect of c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway. **Method:** A total of 32 male SD rats were randomly divided into control group and high, middle and low-dose Tianma Gouteng Yin-containing serum groups (22.8, 11.4, 5.7 g·kg<sup>-1</sup>). The rats were intragastrically given Tianma Gouteng Yin to prepare Tianma Gouteng Yin-containing serum. The control group was given the same volume of normal saline. The proliferation of PC12 cells was cultured and divided

**[收稿日期]** 20170627(011)

**[基金项目]** 黑龙江省教育厅 2016 年度基本科研业务费项目(2016-KYYWF-0854)

**[通讯作者]** \* 王晓丽, 硕士, 讲师, 从事药理学工作, Tel: 18145322999, E-mail: wangxiaoli.01@163.com

into the blank group, the model group, and high, middle and low-dose Tianma Gouteng Yin-containing serum groups. The blank group and the model group were given blank serum, while the other three groups were given 10% Tianma Gouteng Yin-containing serum incubated for 30 min. The model group and Tianma Gouteng Yin-containing serum groups were additionally given  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  MPP<sup>+</sup> and co-cultured for 48 h. The cell viability was measured by Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous MTS Reagent powder (MTS). The follow-up experiment was divided into five groups, namely blank group, MPP<sup>+</sup> group, MPP<sup>+</sup> + high-dose Tianma Gouteng Yin-containing serum group, MPP<sup>+</sup> + SP600125 group, and MPP<sup>+</sup> + SP600125 + high-dose Tianma Gouteng Yin-containing serum group. Apoptosis was analyzed by flow cytometry. Cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3) activity was detected by spectrophotometry. The expressions of JNK, p-JNK, c-Jun, p-c-Jun protein were detected by Western blot. **Result:** Compared with the blank control, cell viability was significantly decreased in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, cell viability was significantly increased in high, middle and low-dose Tianma Gouteng Yin-containing serum groups ( $P < 0.05$ ). In the follow-up experiment, compared with blank control, apoptosis, Caspase-3 activity, and expressions of p-JNK and p-c-Jun protein were significantly increased in the MPP<sup>+</sup> group ( $P < 0.05$ ). Compared with the MPP<sup>+</sup> group, poptosis, Caspase-3 activity, and expressions of p-JNK and p-c-Jun protein were significantly decreased in the MPP<sup>+</sup> + high-dose Tianma Gouteng Yin-containing serum group and MPP<sup>+</sup> + SP600125 group ( $P < 0.05$ ). Co-treatment with SP600125 and high-dose Tianma Gouteng Yin-containing serum resulted in a slight increase in neuroprotection, which was significantly greater than high-dose Tianma Gouteng Yin-containing serum treatment alone ( $P < 0.05$ ), but not significantly greater than SP600125 treatment alone. The expressions of JNK and c-Jun protein showed no significant change. **Conclusion:** Tianma Gouteng Yin-containing serum has the neuroprotective effect against MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis, which may be closely related to the JNK signaling pathway.

**[Key words]** Tianma Gouteng Yin; serum pharmacology; neuroprotection; apoptosis; 1-methyl-4-phenglypyridinium (MPP<sup>+</sup>); JNK pathway

帕金森病 (Parkinson's diseases, PD) 是一种多发生于中老年的主要表现为进行性的锥体外系功能障碍的中枢神经系统退行性疾病。目前该病的发病原因及机制尚不清楚,但多项研究表明,在 PD 中选择性多巴胺能神经元损伤与细胞凋亡密切相关<sup>[1-3]</sup>。形态学的研究也表明多巴胺能神经元的凋亡可能参与了 PD 的发生<sup>[4]</sup>。目前美国 FDA 批准的抗 PD 新药均无神经保护作用,而中医药防治 PD 则具有独特优势<sup>[5]</sup>。

中医认为帕金森病的发病机制为“以肝肾阴虚为本,风火痰瘀为标”的本虚标实证,天麻钩藤饮出自近代胡光慈的《中医内科杂病证治新义》,具有平肝熄风、滋阴潜阳、补益肝肾、清热安神等功效,治以平肝熄风为主,佐以清热安神、补益肝肾之法<sup>[6]</sup>。天麻钩藤饮是临床治疗 PD 的常用方剂,颜建辉等<sup>[7]</sup>采用天麻钩藤饮原方,治疗组 UPDRS 评分<sup>[8]</sup> (国际通用统一帕金森病评价定量表)和 PDQ-39 评分与治疗前相比显著降低,明显低于对照组;观察组的临床疗效明显高于对照组,差异均具有统计学意义。

然而天麻钩藤饮含药血清对 PD 多巴胺能神经元凋亡的影响如何尚未见相关报道。因此,本研究初步探讨天麻钩藤饮含药血清对 1-甲基-4-苯基-吡啶离子 (1-methyl-4-phenyl pyridinium, MPP<sup>+</sup>) 损伤 PC12 细胞的保护作用及机制,为其应用于 PD 的临床治疗提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性 SD 大鼠 32 只,SPF 级,体重 180 ~ 200 g,由齐齐哈尔医学院实验动物中心提供,许可证号 SYXK(黑)2016-0001。本研究获得齐齐哈尔医学实验动物伦理委员会批准[(齐)伦审(2016)04 号]。

**1.2 细胞株** PC12 细胞购自中国科学院细胞库,目录号 TCR 9。

**1.3 药物与试剂** 麻钩藤饮组成为天麻 9 g,钩藤 12 g(后下),石决明 18 g(先煎),栀子 9 g,黄芩 9 g,川牛膝 12 g,杜仲 9 g,益母草 9 g,桑寄生 9 g,夜交藤 9 g,茯苓 9 g(上海康桥饮片厂,批号分别为 080401, 080502, 080509, 080427, 080606, 080417, 080711, 080709, 080619, 080505, 080521)。经齐

哈尔滨医学院天然药物抗肿瘤研究所所长牛英才研究员鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》规定。根据临床成人每日服用量,水提浓缩至每 1 mL 含生药 1 g, 4 °C 保存备用。DMEM 高糖培养基、胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号分别为 SH30022.01B, NWK0489); MPP<sup>+</sup> iodide (美国 Sigma 公司,批号 D048); 特异性;c-Jun 氨基末端激酶(JNK)抑制剂 SP600125 (德国 Merck 公司,批号 420119); Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous MTS Reagent powder (Promega 公司,批号 0000095765); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(康为世纪,批号 CW2574S); 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 分光光度法检测试剂盒(凯基生物,批号 KGA203); JNK, p-JNK, c-Jun, p-c-Jun, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(Cell Signaling, 批号分别为 2305, 4306, 9165, 2361, 2118)。

**1.4 仪器** 3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(德国 Thermo 公司), SAFIRE II-BASIC 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司), FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司), UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司), JY200C 型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司), 3706-11S 型凝胶成像分析仪(美国 Syngene 公司), 1658001 型半干转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 含药血清的制备**<sup>[9]</sup> SD 大鼠随机分为 3 个含药血清剂量组(每组 8 只),即天麻钩藤饮低剂量组(5.7 g·kg<sup>-1</sup>,相当于临床成人等效剂量的 3 倍),中剂量组(11.4 g·kg<sup>-1</sup>,相当于临床成人等效剂量的 6 倍),高剂量组(22.8 g·kg<sup>-1</sup>,相当于临床成人等效剂量的 12 倍),同时设空白组(8 只)用等量生理盐水灌胃。适应性喂养 3 d 后,所有大鼠灌胃 2 次/d,连续灌胃 3 d,于最后一次灌胃后 1 h(灌胃前禁食 12 h,不禁水),乙醚麻醉,腹主动脉采血。静止 2 h 以上,3 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 15 min,分离血清,置入无菌试管中,-20 °C 冰箱冻存备用。使用前 56 °C 恒温 30 min 灭活,用无血清培养基稀释,过滤除菌。

**2.2 分组与处理** 将常规培养的 PC12 细胞分为 5 组,正常组应用含 10% 空白血清的 DMEM 培养液,模型组应用含 10% 空白血清和 MPP<sup>+</sup> (500 μmol·L<sup>-1</sup>)<sup>[7]</sup> 的 DMEM 培养液。天麻钩藤饮含药血清高、中、低剂量组分别应用含 10% 的高、中、低剂量天麻钩藤饮含药血清(通过其他中药方剂对 PC12 细胞损伤保护作用研究中的含药血清应用浓度<sup>[5]</sup>及预实验结果显示天麻钩藤饮含药血清

的药物浓度可设定为 10%) 和 MPP<sup>+</sup> (500 μmol·L<sup>-1</sup>) 的 DMEM 培养液,药物处理时间为 48 h。后续实验分为 5 组,即空白组, MPP<sup>+</sup> 组, MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量组, MPP<sup>+</sup> + SP600125 (100 nmol·L<sup>-1</sup>)<sup>[10]</sup> 组, MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量 + SP600125 组。

**2.3 Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous MTS Reagent powder (MTS 法) 检测细胞存活率** 各组样品分别培养 48 h 后,在 96 孔板中加入 Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous MTS Reagent powder 20 μL, 孵育 2 h,在酶标仪 490 nm 处测定吸光度 A,计算细胞相对存活率。

$$\text{相对存活率} = \frac{(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}})}{(A_{\text{阳性组}} - A_{\text{空白组}})} \times 100\%$$

**2.4 流式细胞术检测细胞早期凋亡率** 各组样品分别培养 48 h 后,收集细胞。操作按 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,流式细胞仪进行检测,分析各组细胞早期凋亡率。

**2.5 分光光度法检测细胞 Caspase-3 活性** 各组样品分别培养 48 h 后,收集细胞。按照 Caspase-3 分光光度法检测试剂盒说明书,检测 Caspase-3 的活化程度。

**2.6 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法检测细胞 JNK, p-JNK 蛋白的表达** 各组样品分别培养 48 h 后,收集细胞,提取蛋白 -70 °C 保存备用。蛋白变性后,经电泳分离、转移,37 °C 封闭 2 h,加入一抗 [JNK (1 : 1 000), p-JNK (1 : 1 000), c-Jun (1 : 1 000), p-c-Jun (1 : 1 000), GAPDH (1 : 1 000)], 4 °C 孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG (1 : 2 000), 37 °C 孵育 1 h, PBS-T 洗膜后, ECL 发光试剂染色, X 射线胶片曝光成像。以 GAPDH 作为内参,应用图像分析软件定量分析各组蛋白相对表达量。

**2.7 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 SNK 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计意义。

## 3 结果

**3.1 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞的存活率的影响** MTS 检测结果显示,与空白组比较,模型组细胞活力明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较,10% 的低、中、高剂量天麻钩藤饮含药血清可使细胞活力明显增加 ( $P < 0.05$ )。表明天麻钩藤饮含药血清显著增加 MPP<sup>+</sup> 损伤 PC12 细胞的存活率,且具有浓度依赖性。见表 1。

**3.2 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞早期凋亡的影响** 流式细胞术结果显示,与空白组比较, MPP<sup>+</sup> 组细胞

表 1 天麻钩藤饮含药血清对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Effect of Tianma Gouteng Yin-containing serum on MPP<sup>+</sup>-induced cell viability ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别            | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | 细胞存活率/%                  |
|---------------|-----------------------|--------------------------|
| 空白            | -                     | 100.0 ± 0.0              |
| 模型            | -                     | 50.3 ± 4.7 <sup>1)</sup> |
| 10% 天麻钩藤饮含药血清 | 5.7                   | 64.6 ± 4.6 <sup>2)</sup> |
|               | 11.4                  | 75.9 ± 5.8 <sup>2)</sup> |
|               | 22.8                  | 85.4 ± 5.2 <sup>2)</sup> |

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

早期凋亡率明显升高 ( $P < 0.05$ )。与 MPP<sup>+</sup> 组比较, MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量组, MPP<sup>+</sup> + SP600125 组均能够使细胞早期凋亡率明显降低 ( $P < 0.05$ ), 而 MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量 + SP600125 组的作用明显高于 MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量组 ( $P < 0.05$ ), 但不高于 MPP<sup>+</sup> + SP600125 组, 表明天麻钩藤饮含药血清能够显著抑制 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞早期凋亡, 同时提示该药物的作用可能是通过 JNK 信号通路介导的。见表 2。

表 2 天麻钩藤饮含药血清对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞早期凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of Tianma Gouteng Yin-containing serum on MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别                                    | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | 早期凋亡率/%                    |
|---------------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 空白                                    | -                     | 8.4 ± 2.4                  |
| MPP <sup>+</sup>                      | -                     | 31.8 ± 3.7 <sup>1)</sup>   |
| MPP <sup>+</sup> + SP600125           | -                     | 15.1 ± 4.4 <sup>2)</sup>   |
| MPP <sup>+</sup> + 含药血清高剂量            | 22.8                  | 21.1 ± 3.6 <sup>2,3)</sup> |
| MPP <sup>+</sup> + 含药血清高剂量 + SP600125 | 22.8                  | 12.6 ± 3.6                 |

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与 MPP<sup>+</sup> 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与 MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量 + SP600125 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$  (表 3 ~ 4 同)。

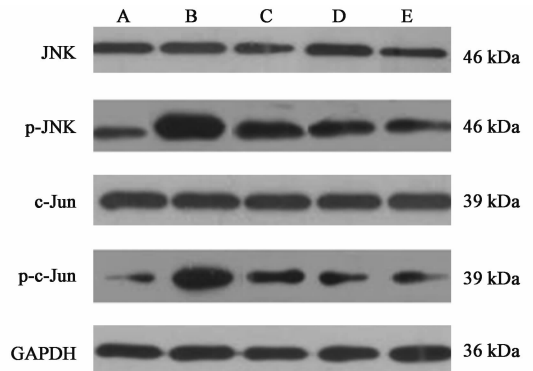
**3.3 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞 Caspase-3 活性的影响** 与空白组比较, MPP<sup>+</sup> 组细胞的 Caspase-3 活性明显升高 ( $P < 0.05$ )。与 MPP<sup>+</sup> 组比较, MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量组, MPP<sup>+</sup> + SP600125 组均能够使细胞 Caspase-3 活性明显降低 ( $P < 0.05$ ), 而 MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量 + SP600125 组的作用明显高于 MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量组 ( $P < 0.05$ ), 但不高于 MPP<sup>+</sup> + SP600125 组。表明天麻钩藤饮含药血清显著抑制了 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞的 Caspase-3 活性, 同时提示该药物的作用可能是通过 JNK 信号通路介导的。见表 3。

表 3 天麻钩藤饮含药血清对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞 Caspase-3 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of Tianma Gouteng Yin-containing serum on MPP<sup>+</sup>-induced Caspase-3 activity ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别                                    | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | Caspase-3 活性/%               |
|---------------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| 空白                                    | -                     | 99.9 ± 10.2                  |
| MPP <sup>+</sup>                      | -                     | 385.1 ± 12.0 <sup>1)</sup>   |
| MPP <sup>+</sup> + SP600125           | -                     | 180.5 ± 11.3 <sup>2)</sup>   |
| MPP <sup>+</sup> + 含药血清高剂量            | 22.8                  | 279.4 ± 13.4 <sup>2,3)</sup> |
| MPP <sup>+</sup> + 含药血清高剂量 + SP600125 | 22.8                  | 169.8 ± 13.6                 |

**3.4 对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞 JNK, p-JNK, c-Jun, p-c-Jun 蛋白表达的影响** 以 GAPDH 为内参, 与空白组比较, MPP<sup>+</sup> 组细胞 p-JNK 和 p-c-Jun 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ )。与 MPP<sup>+</sup> 组比较, MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量组, MPP<sup>+</sup> + SP600125 组均能够使细胞 p-JNK 和 p-c-Jun 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), 而 MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量 + SP600125 组的作用明显高于 MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量组 ( $P < 0.05$ ), 但不高于 MPP<sup>+</sup> + SP600125 组。JNK 和 c-Jun 蛋白表达无明显变化。表明天麻钩藤饮含药血清显著抑制了 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞 p-JNK, p-c-Jun 蛋白的表达, 同时提示该药物的作用可能是通过 JNK 信号通路介导的。见图 1, 表 4。



A. 空白组; B. MPP<sup>+</sup> 组; C. MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量组; D. MPP<sup>+</sup> + SP600125 组; E. MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量 + SP600125 组

图 1 天麻钩藤饮含药血清对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞 JNK, p-JNK, c-Jun, p-c-Jun 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Tianma Gouteng Yin-containing serum on MPP<sup>+</sup>-induced JNK, p-JNK, c-Jun, p-c-Jun protein expressions

#### 4 讨论

PD 的发病机制假说即“多巴胺学说”认为该病是因纹状体内多巴胺减少或缺乏所致, 其原发性因素是黑质内多巴胺能神经元退行性病变。其典型症状为静止震颤、肌肉强直、运动迟缓和共济失调等。PD 主要发生于中老年人, 随着人口老龄化问题日益

表 4 天麻钩藤饮含药血清对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞 JNK, p-JNK, c-Jun, p-c-Jun 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Effect of Tianma Gouteng Yin-containing serum on MPP<sup>+</sup>-induced JNK, p-JNK, c-Jun, p-c-Jun protein expressions( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别                                    | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | JNK/GAPDH   | p-JNK/GAPDH                  | c-Jun/GAPDH | p-c-Jun/GAPDH                |
|---------------------------------------|-----------------------|-------------|------------------------------|-------------|------------------------------|
| 空白                                    | -                     | 0.52 ± 0.13 | 0.44 ± 0.21                  | 0.61 ± 0.14 | 0.30 ± 0.14                  |
| MPP <sup>+</sup>                      | -                     | 0.45 ± 0.21 | 1.64 ± 0.15 <sup>1)</sup>    | 0.72 ± 0.13 | 1.47 ± 0.13 <sup>1)</sup>    |
| MPP <sup>+</sup> + 含药血清高剂量            | 22.8                  | 0.58 ± 0.14 | 1.02 ± 0.22 <sup>2, 3)</sup> | 0.62 ± 0.17 | 0.93 ± 0.17 <sup>2, 3)</sup> |
| MPP <sup>+</sup> + SP600125           | -                     | 0.49 ± 0.11 | 0.61 ± 0.18 <sup>2)</sup>    | 0.59 ± 0.23 | 0.62 ± 0.23 <sup>2)</sup>    |
| MPP <sup>+</sup> + 含药血清高剂量 + SP600125 | 22.8                  | 0.50 ± 0.24 | 0.52 ± 0.21                  | 0.56 ± 0.25 | 0.56 ± 0.25                  |

突出,该疾病是仅次于心血管疾病和癌症的严重影响人类健康的第三位因素<sup>[10]</sup>。近年来,虽然对 PD 发病机制的研究取得了很大进展,但目前对 PD 的治疗主要是多巴胺替代疗法,该疗法主要是改善 PD 症状,并不能阻止 PD 的病程进展<sup>[11]</sup>。

帕金森病可归属于中医“颤证”的范畴,其病因包括年老体弱、情志过极、饮食劳逸损伤,导致患者肝、脾、肾三脏受损,气血津液亏虚,不能濡养筋脉,或痰浊、瘀血等病理产物阻止气血运行,筋脉失养,其主要病机为肝风内动,筋脉失养,属于本虚标实之证。正所谓“诸风掉眩,皆属于肝”。天麻钩藤饮出自《中医内科杂病证治新义》,由天麻、钩藤、石决明、栀子、杜仲、桑寄生、牛膝、黄芩、夜交藤、茯神、益母草等组成,方中天麻、钩藤平肝潜阳熄风;石决明加强二者平肝熄风之效;牛膝引热下行,防止肝阳上亢,且能补肝肾,强筋骨,加强杜仲、桑寄生补益肝肾之功;夜交藤、茯神宁心安神,黄芩、栀子清热泻火除烦,热清则神自安,诸药合用,共奏平肝潜阳熄风之效。因而临床上多选用天麻钩藤饮加减治疗<sup>[12]</sup>。

本实验是以 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞作为 PD 体外细胞模型,来探讨天麻钩藤饮含药血清对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞凋亡的保护作用及机制。实验结果显示天麻钩藤饮含药血清可有效减少 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞凋亡。Caspase-3 是 Caspase 家族的重要成员,是细胞凋亡信号通路下游最主要的执行分子,被称为终结者<sup>[13]</sup>。本实验通过 Caspase-3 分光光度法检测了 PC12 细胞的 Caspase-3 活化程度,结果发现天麻钩藤饮含药血清显著抑制了 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞的 Caspase-3 活性,再次印证了天麻钩藤饮含药血清对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞凋亡具有保护作用。

JNK 是细胞内重要的应激调节蛋白,未激活时主要存在于细胞质,激活后则迅速表达并发生磷酸化,环境应激和细胞因子均能导致 JNK 的激活,激活的 JNK 发生磷酸化,p-JNK 在介导神经细胞死亡

中发挥着重要作用,此过程和 PD 发病密切相关;p-JNK 能通过两种途径介导多巴胺神经元凋亡:一条通路是死亡受体途径,有研究者在大鼠 PD 模型中发现,p-JNK 能通过促进 FasL 的表达介导死亡受体途径的多巴胺神经元凋亡,Fas 与 FasL 结合后引起 Fas 死亡结构域蛋白交联,通过细胞内的死亡功能区发挥作用启动死亡信号传导,导致细胞凋亡,Fas 和 FasL 表达的增加可促进细胞凋亡;另一条通路是线粒体途径,活化后的 JNK 通过参与介导 Caspase-3,促进环氧化酶 2 的表达,增加 Bim 蛋白的表达激活 Bax 表达增多,调节释放细胞色素 C,减少线粒体复合体 I,增加活性氧等途径来造成纹状体运动区多巴胺能神经元凋亡<sup>[14]</sup>。Ferrer 等<sup>[15]</sup>在 PD 患者尸检脑组织中发现 p-JNK;陈娜等<sup>[16]</sup>研究显示,异常蛋白质聚集可激活 JNK 通路,介导的细胞凋亡可能造成 PD 的发病,这些都说明 p-JNK 可能是造成 PD 发病的原因之一。本实验使用 JNK 通路的特异性抑制剂 SP600125 后,结果显示细胞早期凋亡率、细胞 Caspase-3 活性,p-JNK 及 c-Jun 蛋白的表达均明显降低,减少了 MPP<sup>+</sup> 对细胞的损伤。而 MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量 + SP600125 组的作用明显高于 MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量组,但不高于 MPP<sup>+</sup> + SP600125 组。提示天麻钩藤饮含药血清对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞凋亡的保护作用可能是通过 JNK 信号通路介导的。

p-c-Jun 是 JNK 信号通路的活性底物,JNK 激酶在氧化应激、炎症介质、缺血/再灌注等刺激因素作用下被激活并磷酸化其特异性底物,使 p-c-Jun 进入细胞核内形成 AP-1,进而增加 AP-1 转录及细胞凋亡<sup>[17]</sup>。本实验中,MPP<sup>+</sup> 组的 p-c-Jun 蛋白表达水平高于空白组,可能由于在 MPP<sup>+</sup> 的神经毒性刺激下,JNK 激酶被激活并使其底物 c-Jun 磷酸化。MPP<sup>+</sup> + 含药血清高剂量组的 p-c-Jun 蛋白表达水平降低,提示天麻钩藤饮含药血清可能减轻了 MPP<sup>+</sup> 的神经毒性刺激,抑制 c-Jun 的磷酸化,干扰

JNK 信号通路,从而保护多巴胺能神经元。

综上所述,天麻钩藤饮含药血清对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 PC12 细胞凋亡具有保护作用,且这种保护作用可能与 JNK 信号通路密切相关。

[参考文献]

[1] Gaki G S, Papavassiliou A G. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. *Neuromol Med*, 2014, 16(2): 217-230.

[2] 冯娅,吴云成. 线粒体功能异常在帕金森病发病机制中的研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2014, 41(4): 349-352.

[3] 薛小燕,郭小华,李敏,等. 神经退行性疾病发病机制研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(11): 3149-3152.

[4] Tatton W G, Chalmers-Redman R, Brown D, et al. Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation[J]. *Ann Neurol*, 2003, 53 (Suppl 3): 61-70.

[5] 邹宇,董妙先. 镇肝熄风汤含药血清对 6-OHDA 诱导 PC12 细胞损伤保护作用的抗氧化机制分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(9): 112-116.

[6] 刘树民,张亚男,王秋月,等. 钩藤及其复方治疗神经退行性疾病的研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(1): 107-109.

[7] 颜建辉,梁勇. 天麻钩藤饮联合美多芭治疗临床疗效观察[J]. *亚太传统医药*, 2014, 10(14): 111-112.

[8] 洪雁. 帕金森病统一量表(UPDRS) [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2002, 2(5): 277-278.

[9] 钟广伟,万玲,王东生,等. 平肝潜阳方含药血清对血管紧张素 II 诱导血管平滑肌细胞增殖、迁移及 DNA 甲基化水平的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(5): 850-855.

[10] WANG G, ZHOU L, ZHANG Y, et al. Implication of the c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase pathway in the neuroprotective effect of puerarin against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)-induced apoptosis in PC-12 cells[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 487(1): 88-93.

[11] Kulisevsky J, Luquin M R, Arbelo J M, et al. Advanced Parkinson's disease: clinical characteristics and treatment Part II [J]. *Neurologia*, 2013, 28(9): 558-583.

[12] 杨凯,邹久利,吉永相. 天麻钩藤饮治疗帕金森病临床疗效观察[J]. *临床医学研究与实践*, 2017, 10(9): 97-98.

[13] 王晓丽,岳丽玲,周丽,等. 17-羟-岩大戟内酯 B 对 U251 细胞增殖及凋亡作用的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(18): 254-257.

[14] 陈娟,吴庆文,贾玉凤,等. 丁苯酞对帕金森病细胞模型 JNK 通路死亡受体途径相关凋亡因子的影响[J]. *医药导报*, 2017, 36(2): 145-149.

[15] Ferrer I, Blanco R, Carmona M, et al. Active, phosphorylation-dependent mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated protein kinase / c-Jun nterminal kinase (SAPK/JNK), and p38 kinase expression in Parkinson's disease and dementia with lewy bodies [J]. *J Neural Transm*, 2001, 108(12): 1383-1396.

[16] 陈娜,代丽芳,姜玉武,等. 内质网应激后未折叠蛋白反应在神经退行性疾病发病机制中的作用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 39(8): 764-770.

[17] 李巷,潘建青,康慧聪,等. p-JNK /p-c-Jun 通路参与大鼠杏仁核点燃癫痫模型[J]. *神经损伤与功能重建杂志*, 2016, 11(6): 473-475.

[责任编辑 邹晓翠]