

镇肝熄风汤载药脑脊液对 PC12 细胞损伤的保护作用

李成冲^{1,2}, 李佳鸣^{1,2}, 王刚^{1,2}, 邹德佳^{1,2}, 耿玉涛^{1,2}, 李强¹, 牛英才^{1*}

- (1. 齐齐哈尔医学院医药科学研究所, 黑龙江 齐齐哈尔 161042;
2. 佳木斯大学化学与药学院, 黑龙江省生物药制剂重点实验室, 黑龙江 佳木斯 154007)

[摘要] 目的: 探讨镇肝熄风汤载药脑脊液对甲基-苯基-吡 离子(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺) 诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用。方法: 不同浓度的镇肝熄风汤载药脑脊液预处理体外培养的 PC12 细胞后, 加入 MPP⁺ 诱导 PC12 细胞损伤模型。用 MTT 法检测 PC12 细胞活力, 实时定量 PCR 检测 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达, Western blot 检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达。结果: MPP⁺ 处理 72 ~96 h, 与空白对照组比较, 模型组细胞活力明显降低, Bcl-2 mRNA 和蛋白表达显著下调, Bax mRNA 和蛋白表达显著上调($P < 0.05$)。与模型组比较, 不同浓度的镇肝熄风汤载药脑脊液细胞活力明显升高, Bcl-2 mRNA 和蛋白表达显著上调, Bax mRNA 和蛋白表达显著下调, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 镇肝熄风汤载药脑脊液对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞具有保护作用, 可能是通过上调 Bcl-2 和下调 Bax 的 mRNA 和蛋白表达而发挥抑制 PC12 细胞凋亡的作用。

[关键词] 帕金森病; 镇肝熄风汤; 载药脑脊液; 1-甲基-4-苯基吡 离子; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0134-04

Protective Effect of Cerebrospinal Fluid Containing Zhenganxifeng Decoction on PC12 cell Injury Induced by MPP⁺

LI Cheng-chong^{1,2}, LI Jia-ming^{1,2}, WANG Gang^{1,2}, ZOU De-jia^{1,2}, GENG Yu-tao^{1,2},
LI Qiang¹, NIU Ying-cai^{1*}

(1. Institute of medicine, Qiqihaer Medical College, Qiqihaer 161042, China; 2. College of Chemistry and Pharmacy of Jiamusi University, Key Laboratory of Biological Medicine Formulation, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of cerebrospinal fluid containing Zhenganxifeng decoction (CSF-ZGXF) on pc12 cell induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺). **Method:** Neurotoxicity was induced by addition of MPP⁺ into PC12 cell cultures. And different doses of CSF-ZGXF were administrated 24 h before addition of MPP⁺ into PC12 cell culture. Cell viability, mRNA and protein of Bax and Bcl-2 expression was assayed by MTT, real-time PCR and western blot. **Result:** Optical density for PC12 cells treated with MPP⁺ for 48-96 h was lower than that of the control group. The mRNA and protein expression of Bcl-2 was down-regulated and those of Bax was up-regulated in MPP⁺ groups compared with the control group. The mRNA and protein expression of Bcl-2 were up-regulated and those of Bax were down-regulated in CSF-ZGXF group compared with the MPP⁺ group. **Conclusion:** The results suggest that protective effect of CSF-ZGXF on PC12 cells may correlate with down-regulation of mRNA and protein expression of Bax and up-regulation of those of Bcl-2.

[Key words] parkinson's disease; cerebrospinal fluid containing Zhenganxifeng decoction; 1-methyl-4-phenylpyridinium; apoptosis

[收稿日期] 2009-11-06

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金项目(ZA2006-1); 黑龙江省教育厅科学技术研究面上项目(11541413)

[通讯作者] * 牛英才, Tel: 0452-6720289, E-mail: nyc1968@sohu.com

帕金森病 (parkinson's disease, PD) 是以震颤、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。最近研究显示,细胞凋亡在 PD 的黑质多巴胺能神经元死亡中起重要作用^[1]。因此,寻找能够抑制神经细胞凋亡的药物就成为防治 PD 的热点。镇肝熄风汤出自医家张锡纯之《医学衷中参西录》,研究表明其能促进低氧诱导因子-1 表达,拮抗脑细胞缺氧,保护脑组织^[2]。本研究采用载药脑脊液体外实验方法,探讨镇肝熄风汤对 MPP⁺ 诱导 PC12 多巴胺能神经细胞损伤的保护作用及其机制。

1 材料

1.1 动物及细胞株 雄性 SD 大鼠 60 只,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2002-0003。PC12 细胞株购于中国科学院上海细胞库,用内含 3.7% 的碳酸氢钠、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素、100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素、10% 胎牛血清和 1% *L*-谷氨酰胺, pH 7.0 的 DMEM 高糖培养液,在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的孵育箱中体外培养。

1.2 药品与试剂 镇肝熄风汤由怀牛膝、生赭石、川楝子、生龙骨、生牡蛎、生龟甲、生白芍、玄参、天冬、生麦芽、茵陈、甘草组成,饮片购于齐齐哈尔齐泰药店,其水煎剂由医药科学研究所制备;DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司);胎牛血清 (hyclone 公司);MPP⁺ (Sigma 公司);蛋白提取试剂盒 (碧云天公司);Bax 兔抗鼠多克隆抗体、Bcl-2 抗鼠单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记 IgG 二抗 (Santa 公司)。RNA 抽提试剂 RNAiso 和 SYBR ExScriptTM RT-PCR 试剂盒 (TAKARA 公司);引物序列如下: GAPDH sense primer 5'-GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT G, antisense primer 5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA-3 (143 bp); Bax sense primer 5'-AGA CAC CTG AGC TGA CCT TGG AG-3, antisense primer 5'-GTT GAA GTT GCC ATC AGC AAA CA-3 (197 bp), Bcl-2 sense primer 5'-TGA ACC GGC ATC TGC ACA C-3, antisense primer 5'-CGT CTT CAG AGA CAG CCA GGA G-3 (116 bp), 由大连宝生物公司设计和合成。

1.3 仪器 2700 型 PCR System 扩增仪为 Applied Biosystems 公司产品,ABI 7300 荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司产品, JY200C 电泳仪为北京君意东方

电泳设备有限公司产品, UV-2550 型紫外分光光度计为日本岛津产品。

2 方法

2.1 镇肝熄风汤载药脑脊液 (CSF-ZGXF) 制备 取体重 (250 \pm 20) g 雄性 SD 大鼠 30 只,随机分为 2 组,给药组大鼠给予镇肝熄风汤水煎剂 (含生药 28.75 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),正常对照组给予同体积生理盐水。1 次/d, ig, 连续 3 d, 最后 1 次给药 1.5 h 后,以 3% 水合氯醛麻醉大鼠,颈后部备皮,75% 乙醇消毒,枕骨大孔无菌穿刺,缓慢抽出无色清亮脑脊液,4 条件离心 (3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}\times 10\text{ min}$),收集上清,0.22 μm 滤膜过滤, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

2.2 分组与处理 实验分空白对照组、模型组、空白脑脊液组、5% CSF-ZGXF 组、10% CSF-ZGXF 组、20% CSF-ZGXF 组。细胞经 0.125% 胰蛋白酶消化后接种于多聚赖氨酸包被的 96 孔板上,接种密度为 1×10^5 个细胞/mL,培养 24 h 后,加入相应的 CSF 或培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 饱和湿度孵育箱内培养 30 min 后,正常对照组加入培养基,其他 5 组分别加入含 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MPP⁺ 的 DMEM 培养基,继续培养 0~96 h。

2.3 细胞存活率检测 对数生长的 PC12 细胞经 0.125% 胰蛋白酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化,终止消化后接种于 96 孔板。CSF 组加入不同浓度的 CSF-ZGXF 和 MPP⁺,模型组加入含 MPP⁺ 的培养液,空白对照组加入培养液,放置培养一定时间。加入 MTT 溶液,作用 4 h 后,加入 DMSO,待蓝色颗粒溶解后,酶标仪 570 nm 测定吸光度 *A*,计算细胞存活率。

2.4 实时定量 PCR 检测 PC12 细胞 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达 采用 RNAiso Reagent 提取总 RNA,用 SYBR ExScriptTM RT-PCR Kit 进行 cDNA 合成,PCR 反应依照 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒说明进行。

2.5 Western blotting 检测 PC12 细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达 采用蛋白提取试剂盒提取蛋白质,提取的蛋白置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。用 BCA 法检测样品蛋白质浓度,取 50 μg 蛋白质加入 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液中,将样品经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (层积胶 60 V, 30 min, 分离胶 120 V, 1 h) 电泳分离。胶中蛋白质在 70 mA 恒流状态下 4 过夜电泳转移至硝酸纤维素膜。膜在 5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。加入一抗 Bax (1 500) 和 Bcl-2 (1 500) 分别与硝酸纤

纤维素膜 4 培育过夜。与辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG(1 5 000) 37 温育 1 h。用 Western blotting 印迹荧光发光检测试剂盒曝光、压片。

2.6 结果分析 Bax 和 Bcl-2 mRNA 相对含量采用 2^{-Ct} 值表示。分别扩增 GAPDH, Bax 和 Bcl-2, 使用 Sequence Detection software version 1.2.3 软件 (Applied Biosystems 公司) 分析 PCR 过程各检测样本的 Ct (Threshold cycle) 值, 2^{-Ct} 值^[3] 计算公式如下:

$$Ct_{blank} = Ct_{blank Bcl-2} - Ct_{blank GAPDH}, \quad Ct_{intervention} = Ct_{intervention Bcl-2} - Ct_{intervention GAPDH}, \quad Ct = Ct_{intervention} - Ct_{blank}$$

western blotting 检测结果采用 AlphaImagerTM 图像分析系统扫描, 利用 AlphaEaseFC 软件中 SpotDenso 功

能测定积分吸光度。

2.7 统计学分析 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 MTT 法检测 PC12 细胞活力的变化 (表 1) 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MPP^+ 损伤 PC12 细胞 0 ~ 96 h, 细胞活力逐渐下降, 在 72 ~ 96 h 内呈时效依赖关系。在 MPP^+ 处理 PC12 细胞前 30 min 加入不同浓度的 CSF-ZGXF 后, 细胞活力较单纯 MPP^+ 处理组显著升高, 表明 CSF-ZGXF 对 MPP^+ 诱导 PC12 细胞损伤具有一定的抑制作用。

表 1 含药 CSF 对 PC12 细胞活力 (A) 的影响 (柳 ± s)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照	0.475 ± 0.001 5	0.467 ± 0.003 6	0.460 ± 0.005 1	0.462 ± 0.005 1 ¹⁾	0.452 ± 0.004 3 ¹⁾
模型对照	0.468 ± 0.001 6	0.464 ± 0.004 2	0.456 ± 0.002 1	0.414 ± 0.003 0	0.391 ± 0.003 3
空白脑脊液	0.469 ± 0.002 1	0.462 ± 0.006 3	0.456 ± 0.001 6	0.413 ± 0.002 0	0.393 ± 0.002 0
5% CSF-ZGXF	0.473 ± 0.002 5	0.461 ± 0.002 7	0.462 ± 0.003 4	0.435 ± 0.002 5 ¹⁾	0.415 ± 0.001 5 ¹⁾
10% CSF-ZGXF	0.471 ± 0.005 7	0.461 ± 0.003 3	0.454 ± 0.003 7	0.440 ± 0.002 5 ¹⁾	0.425 ± 0.002 1 ¹⁾
20% CSF-ZGXF	0.471 ± 0.003 7	0.463 ± 0.002 6	0.457 ± 0.008 0	0.446 ± 0.002 5 ¹⁾	0.433 ± 0.001 3 ¹⁾

注: 与同时点模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 RT-PCR 检测 PC12 细胞 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达 (图 1) 结果显示, 与空白对照组比较, 模型组 Bcl-2 mRNA 的表达均明显下调, Bax mRNA 表达明显上调。与模型组比较, 各浓度的 CSF-ZGXF 组 Bcl-2 mRNA 的表达均明显升高, Bax mRNA 的表达明显降低, 并呈浓度依赖性。

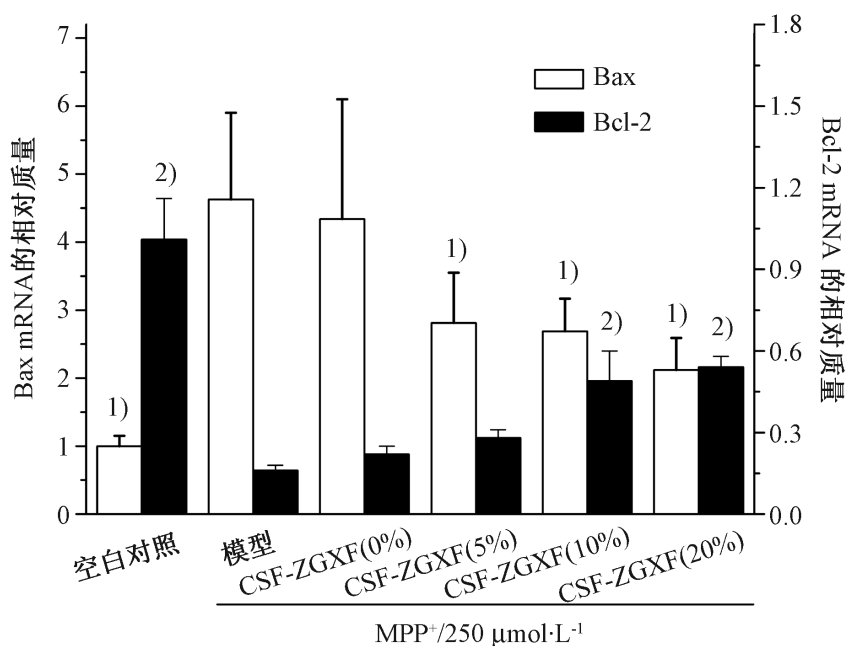


图 1 CSF-ZGXF 对 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响

与模型 Bax mRNA 表达比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 MPP^+ 处理组 Bcl-2 mRNA 表达比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 Western blotting 检测 PC12 细胞 Bax 和 Bcl-2

蛋白表达 (图 2 ~ 3) 结果显示, 与正常对照组比较, 模型组 Bcl-2 蛋白的表达显著下调, Bax 蛋白的表达显著上调。与模型组比较, CSF-ZGXF 组的 Bax 蛋白的表达显著降低, Bcl-2 蛋白的表达显著上调。

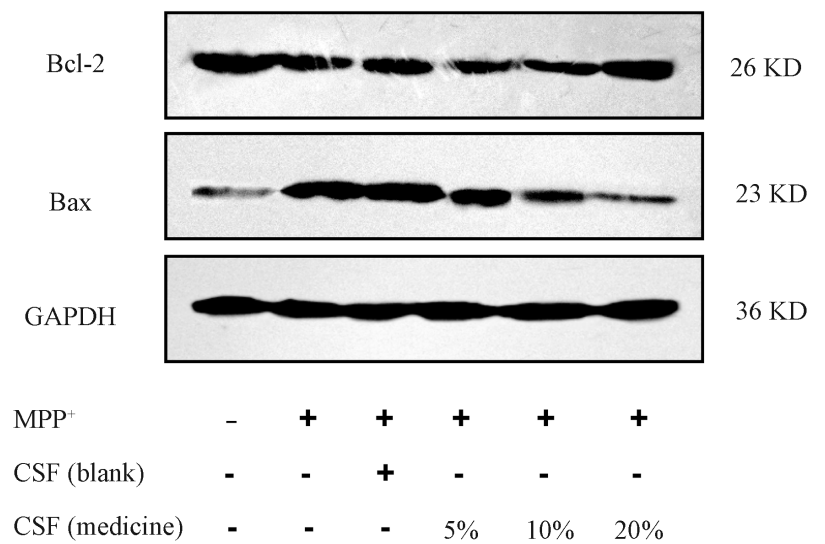


图 2 Western blotting 检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

4 讨论

PD 主要的病理改变是中脑黑质致密部多巴胺神经元选择性变性和丢失, 导致纹状体 DA 匮乏, 但其病因及发病机制目前尚不完全清楚。有研究表明选择性 DA 神经元损伤和丧失与神经元凋亡密切相关^[3-4]。Kingsbur Y 等^[5] 研究表明, PD 患者中脑黑

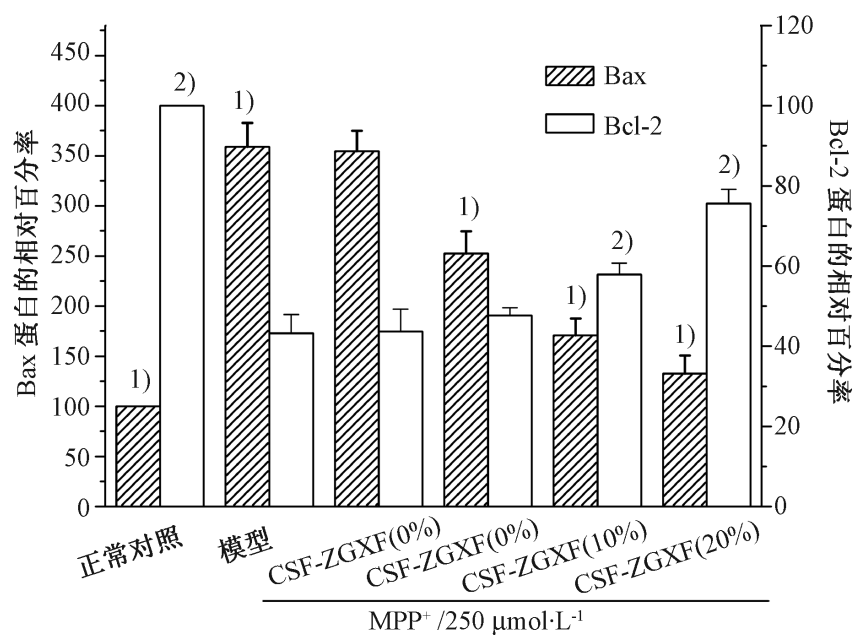


图 3 CSF-ZGXF 对 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达影响

与模型组 Bax 蛋白表达比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组 Bcl-2 蛋白表达比较²⁾ $P < 0.05$ 。

质区域中胶质细胞可见凋亡小体。Malkinshaw G^[6] 研究认为凋亡是导致 PD 神经元变性的基础, 细胞凋亡可能是各种病因导致 PD 的共同路径。

PC12 细胞是大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤克隆化的细胞株, 被广泛用于研究神经细胞的分化, 在细胞形态、结构和功能上与神经元极其相似, 可产生 DA 并且具有 DA 摄取系统, 因而可以作为多巴胺能神经细胞模型用于 PD 的研究。MPP⁺ 是 MPTP 在体内的代谢产物, 以 MPP⁺ 作用于 PC12 细胞建立的细胞模型已得到国内外学术界公认, 并被广泛用于 PD 的试验研究^[7]。采用脑脊液药理学方法^[8] 防止了中药粗制剂本身对试验的干扰, 克服了中枢神经系统存在血脑屏障的问题, 为进一步开展中药复方防治 PD 的基础研究和药物干预提供了一条行之有效的途径。

Bcl-2 基因家族在细胞凋亡过程中起着重要作用。Bcl-2 可分为 Bcl-2 和 Bax 两大亚族, 前者抗细胞凋亡, 而后者促细胞凋亡。Bcl-2 基因是从滤泡性淋巴细胞中分离出来的一种癌基因, 它不影响细胞的增殖率, 而是作为细胞凋亡的一个潜在抑制因子调节细胞死亡。Bcl-2 蛋白能阻止 Cyt C 从线粒体向胞质释放, 抑制多种细胞凋亡^[9]。Bax 与 Bcl-2 有很高的同源性, 两者可形成同源或异源二聚体, Bax 可插入线粒体膜并形成 Bax 蛋白通道, 增加线粒体膜通透性, 同时 Bax 还可以促进 Cyt C 从线粒体中释放, 然后与凋亡蛋白酶激活因子相连形成凋亡酶体, 促进细胞凋亡。

本研究发现, 与空白对照组比较, 模型组 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达降低, Bax mRNA 和蛋白表达升高; 与模型组比较, CSF-ZGXF 组 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达升高, Bax mRNA 和蛋白表达降低, 表明 CSF-ZGXF 对 MPP⁺ 诱导的 Bcl-2 分子降低和 Bax 分子表达升高具有一定抑制作用。因此, 我们推测, 镇肝熄风汤可能通过抑制 Bax 和促进 Bcl-2 分子的表达而起到对 PC12 细胞损伤的保护作用, 进而发挥抗 PD 作用。

[参考文献]

- [1] Iwatsubo T, Ito G, Takatori S, et al. Pathogenesis of Parkinson's disease: implications from familial Parkinson's disease [J]. *Rinsho Shinkeigaku*, 2005, 45 (11): 899.
- [2] 夏芙蓉, 吴颢昕, 姜惟. 镇肝熄风汤对实验性脑出血大鼠低氧诱导因子-1 的影响 [J]. *中华实用中西医杂志*, 2005, 7 (18): 958.
- [3] Karunakaran S, Diwakar L, Saeed U, et al. Activation of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) and translocation of death-associated protein, Daxx, in substantia nigra pars compacta in a mouse model of Parkinson's disease: protection by alpha-lipoic acid [J]. *FASEB J*, 2007, 21(9): 2226.
- [4] 王丹巧, 王巍, 景富春. 应用脑微透析技术建立 L2DOPA 引起的 PD 大鼠脑氧化损伤的模型 [J]. *中国药理学通报*, 2007, 23 (11): 1527.
- [5] Kingsbury A E, Mardsen C D, Foster O J. DNA fragmentation in human substantia nigra: apoptosis or perimortem effect [J]. *Mov Disord*, 1998, 13(6): 877.
- [6] Xiao-Qing T, Jun-Li Z, Yu C, et al. Hydrogen peroxide preconditioning protects PC12 cells against apoptosis induced by dopamine [J]. *Life Sci*, 2005, 78(1): 61.
- [7] Chiasson K, Daoust B, Levesque D, et al. Dopamine D2 agonists, bromocriptine and quinpirole, increase MPP⁺-induced toxicity in PC12 cells [J]. *Neurotox Res*, 2006, 10(1): 31.
- [8] 张均田. 神经药理学研究进展 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 19.
- [9] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked [J]. *Science*, 1997, 275(5303): 1129.

[责任编辑 何伟]