

左旋多巴联合丹参注射液对鱼藤酮致分化PC12细胞凋亡的影响^Δ

谢利霞*, 赵飞宇, 周 蓓, 杨万章(广东医学院附属南山医院药剂科, 广东深圳 518052)

中图分类号 R285;R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2501-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.02

摘要 目的:研究左旋多巴联合丹参注射液对鱼藤酮致分化PC12细胞凋亡的影响。方法:实验分为正常对照(正常细胞,等容培养液)组、联合用药对照(正常细胞,左旋多巴2 μmol/L+丹参注射液3.125 μg/ml)组、模型(模型细胞,等容培养液)组、神经生长因子(模型细胞,NGF,300 μg/L)组、左旋多巴(模型细胞,2 μmol/L)组、丹参注射液(模型细胞,3.125 μg/ml)组、联合用药(模型细胞,左旋多巴2 μmol/L+丹参注射液3.125 μg/ml)组。以鱼藤酮诱导分化PC12细胞凋亡作为帕金森病体外模型,通过水溶性四氮唑(WST-1)法测细胞相对增殖率,Hoechst 33342标记染色法观察细胞荧光强度改变,酶联免疫吸附(ELISA)法检测细胞3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)蛋白含量与20S蛋白酶体(PSM)活性。结果:与模型组比较,联合用药组细胞增殖率升高,细胞凋亡减小,GAPDH蛋白含量减少,20S PSM活性增强,且效果均优于左旋多巴组。结论:左旋多巴联合丹参注射液可拮抗鱼藤酮致分化PC12细胞凋亡,其机制与降低细胞内GAPDH含量及增强20S PSM活性有关,其效果优于左旋多巴单用。

关键词 左旋多巴;丹参注射液;凋亡;水溶性四氮唑法;酶联免疫吸附法;20S蛋白酶体;帕金森病

Effects of Levodopa Combined with Danshen Injection on the Apoptosis of Differentiated PC12 Cells Induced by Rotenone

XIE Li-xia, ZHAO Fei-yu, ZHOU Bei, YANG Wan-zhang (Dept. of Pharmacy, Nanshan Hospital Affiliated to Guangdong Medical College, Guangdong Shenzhen 518052, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of levodopa combined with Danshen injection on rotenone induced apoptosis of differentiated PC12 cells. METHODS: The experiment was divided into normal control group (normal cell, isovolumic culture solution), combination control group (normal cell, levodopa 2 μmol/L+Danshen injection 3.125 μg/ml), model group (model cell, isovolumic culture medium), NGF group (model cell, 300 μg/L), levodopa group (model cell, 2 μmol/L), Danshen injection group (model cell, 3.125 μg/ml) and combination group (model cell, levodopa 2 μmol/L+Danshen injection 3.125 μg/ml). Rotenone was used to induce the apoptosis of differentiated PC 12 cells to establish in vitro PD model. WST-1 method was used to measure the relative proliferation rate. Hoechst 33342 staining was applied to observe the intensity of cell fluorescence. Furthermore, ELISA method was adopted to measure the expression of GAPDH protein and the activity of 20S proteasomes (PSM). RESULTS: Compared with the model group, cell proliferation rate increased, apoptosis decreased, GAPDH protein concentration decreased, 20S PSM activity increased in combination group, and the effect was better than single use of levodopa. CONCLUSIONS: Levodopa combined with Danshen injection inhibits the apoptosis of differentiated PC 12 cells induced by rotenone, which may be associated with the down-regulation of the content of GAPDH and the activity enhancement of 20S PSM. Its effect is better than levodopa alone.

KEYWORDS Levodopa; Danshen injection; Apoptosis; WST-1; ELISA; 20S PSM; Parkinson's disease

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见中老年人的慢性进展性中枢神经系统疾病,其病变与患者黑质纹状体多巴胺(DA)能神经元大量死亡,导致纹状体缺乏大量DA有关^[1]。左旋多巴为拟多巴胺类抗帕金森病药,本身并无药理活性,通过血脑屏障进入中枢,经多巴脱羧酶作用转化成DA而发挥药理作用,改善帕金森病症状。左旋多巴一直是治疗帕金森病的最有效药物,被誉为PD治疗药物的“金标准”。中药丹参*Salvia miltiorrhiza* bge.为唇形科鼠尾草属植物,其根可入药。其活性成分具有抗氧化作用,文献报道丹参素对缺糖-缺氧损伤后神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞的凋亡过程具有抑制作用,对神经细胞具有保护作用^[2],同时也有研究表明丹酚酸B可抑制6羟基多巴胺(6-OHDA)导致的SH-SY5Y细胞凋亡^[3]。

研究显示,鱼藤酮是继1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)之后所发现的第二个导致多巴胺(DA)神经元退变的外源性化合物。因此,鱼藤酮作为一种诱发PD的环境因素成为近来研究PD病因的热点之一。褐家鼠肾上腺嗜铬细胞瘤株(PC12)细胞因其在形态、生理、生化等功能特别是膜受体及递质合成上与中脑DA能神经元十分接近而被视为体外替代DA能神经元较好的细胞模型^[4-5]。因此,本研究选择PC12细胞作为鱼藤酮体外DA能神经毒性作用的研究模型。

笔者以前的研究表明,鱼藤酮可导致分化PC12细胞凋亡^[6-7]。本研究通过水溶性四氮唑(WST-1)法和Hoechst 33342标记染色法同样验证了上述结果,并发现左旋多巴和丹参联合作用可明显提高分化PC12细胞增殖率。

上述研究提示左旋多巴与丹参在治疗PD中具有潜在互补机制,联合用药的功效与机制有待进一步探讨。本研究选用左旋多巴与丹参注射液联用为研究对象,采用鱼藤酮诱导

Δ 基金项目:广东省中医药局科研基金面上项目(No.2010050)

* 副主任药师,博士。研究方向:药理学、临床药学。电话:0755-26553111-25308。E-mail:xlx163@163.com

PC12细胞凋亡作为PD体外模型,运用WST-1法检测细胞相对增殖率,免疫印迹(ELISA)法检测3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)蛋白含量与20S蛋白酶体(PSM)活性,进而研究左旋多巴联合丹参注射液对鱼藤酮诱导的分化PC12细胞的影响,探讨其作用机制,为中西医结合治疗PD提供依据。

1 材料

1.1 仪器

DFM80C型荧光显微镜(上海蔡康光学仪器厂);ELx800NB型多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司);3K15型离心机(德国Sigma公司)。

1.2 药品与试剂

丹参注射液(正大青春宝药业有限公司,批号:1203301,规格:10 ml/支,每1 ml含原儿茶醛不低于0.2 mg);DMEM/F12培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);鱼藤酮、碘化丙啶(PI)、神经生长因子(NGF)均购自美国Sigma公司;Hoechst 33342染色液(上海碧云天生物技术研究所);WST-1试剂、左旋多巴(美国罗氏公司);人3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH,上海亚培生物科技有限公司);人20S蛋白酶体(20S PSM)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司)。

1.3 细胞瘤株

PC12购自中国科学院上海生命科学研究院。

2 方法

2.1 细胞培养

DMEM培养基加体积分数为10%的胎牛血清(FBS)、青霉素 1×10^5 u/L、庆大霉素 8×10^4 u/L,5% CO₂,37 °C培养细胞。待细胞增长至90%融合时,用含0.1 g/L二胺二乙酸二钠盐的0.5 g/L胰蛋白酶消化传代,1:5分瓶传代,每4 d传代1次,细胞每隔1 d换1次液。

2.2 复制模型与分组、给药

鱼藤酮(50 μmol/L)培养细胞24 h以复制PC12细胞凋亡模型。实验分为7组,即正常对照(正常细胞,等容培养液)组、联合用药对照(正常细胞,左旋多巴2 μmol/L+丹参注射液3.125 μg/ml)组、模型(模型细胞,等容培养液)组、NGF(模型细胞,300 μg/L)组、左旋多巴(模型细胞,2 μmol/L)组、丹参注射液(模型细胞,3.125 μg/ml)组、联合用药(模型细胞,左旋多巴2 μmol/L+丹参注射液3.125 μg/ml)组。复制模型前6 h开始用药培养细胞,连续6 h。

2.3 WST-1实验

培养分化的PC12细胞,以每孔 1×10^5 细胞密度种于96孔板中,于培养箱中孵育24 h(在96孔板中生长至大于90%),孵育细胞,加10 μl WST-1孵育1 h,在酶标仪450/690 nm双波长处检测光密度(OD)。实验另设空白对照(无细胞,仅含培养液)和背景对照(含细胞,但不含WST-1,对照孔OD应小于0.11)。按标准计算细胞增殖率:细胞增殖率(%)=(实验组均值/正常对照组均值)×100%。实验结果为0级或1级反应是合格;实验结果为2级反应的,应结合细胞形态分析,综合评价;实验结果为3~4级反应是不合格。细胞毒性分级为0~4级,其细胞相对增殖率由小到大分别为≥100%、75%~99%、50%~74%、25%~49%、0~24%。

2.4 Hoechst 33342核染色分析

将各组细胞弃除培养基,用质量分数为40 g/L多聚甲醛在

室温下固定30 min,弃固定液后PBS(pH7.2)洗3遍,10 mg/L Hoechst 33342室温避光染色10 min,荧光显微镜下观察染色质形态。

2.5 GAPDH蛋白含量的测定

收集各组细胞,提取总蛋白。将定量后的蛋白样品(每孔20 μg)上样于聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)小孔,100 V电泳1 h,300 mA下转膜1.5 h。将转好的硝酸纤维素膜用封闭液室温振荡封闭2 h,然后加入1:500(V/V)GAPDH一抗,37 °C孵育2 h,TBS漂洗15 min×3次,再加入1:2 000(V/V)辣根过氧化物酶标记的二抗,37 °C孵育1 h,TBS漂洗15 min×3次,增强化学发光剂显影,胶片曝光。结果用UVP扫描仪扫描成像。

2.6 20S PSM表达的测定

各组药物,弃除原培养液,用1×PBS清洗1次,在冰上操作,常规胰酶消化细胞,4 °C下以离心半径为5.0 cm,1 000 r/min离心20 min,沉淀加入用蛋白提取液[10 mmol/L Tris-HCl,pH 7.8,0.5 mmol/L二硫苏糖醇(DTT),5 mmol/L三磷酸腺苷(ATP),0.035% SDS,5 mmol/L MgCl₂ 100 μl]超声匀浆,采用BCA法测定蛋白含量,按试剂盒说明书将样品稀释成1 μg/μl,37 °C下2.5 μl LLYV-AMC(5 mmol/L)避光反应1 h后,在连续波长扫描酶标仪上读数。结果,激发波长为380 nm,发射波长为410 nm。以空白对照组与背景对照组为标准调零。

2.7 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS13.0软件进行统计分析,采用单因素方差分析进行统计学处理。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 联合用药对模型细胞增殖率的影响

与正常对照组比较,模型组细胞增殖率降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,NGF组、左旋多巴组、联合用药组细胞增殖率升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。联合用药对模型细胞增殖率的影响见图1。

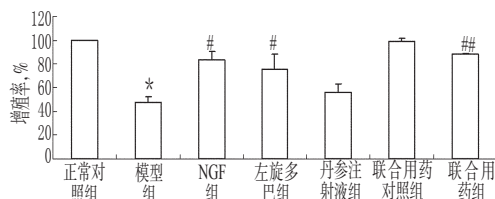


图1 联合用药对模型细胞增殖率的影响

与正常对照组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Fig 1 Effects of drug combination on the proliferation rate in model cells

vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.2 联合用药对模型细胞凋亡的影响

Hoechst 33342染色分化PC12细胞后,未呈现毒性,细胞无污染、过度死亡、衰老和分化等情况。细胞染色后,立即用倒置相差荧光显微镜观察,在紫外光激发下,细胞核呈现蓝色荧光。与正常对照组比较,模型组荧光强度增强;与模型组比较,联合用药组荧光强度减弱,且效果好于左旋多巴组。联合用药对模型细胞凋亡的影响见图2。

3.3 联合用药对模型细胞GAPDH蛋白含量的影响

鱼藤酮处理后细胞内GAPDH蛋白均随时间的延长呈增

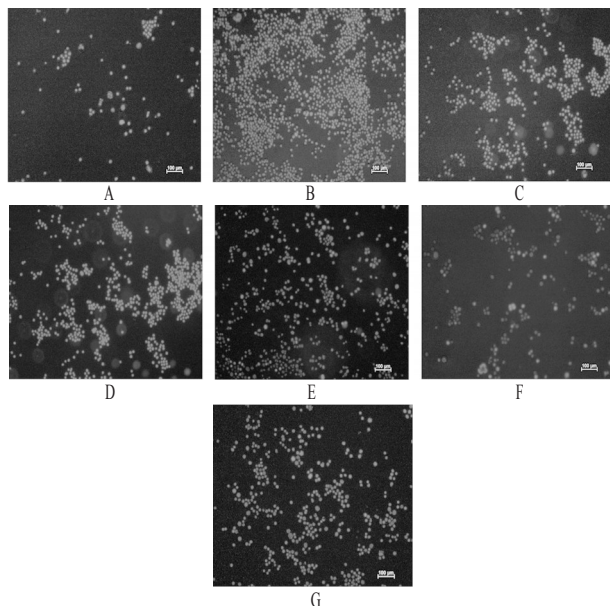


图2 联合用药对模型细胞凋亡的影响

A.正常对照组;B.模型组;C.NGF组;D.左旋多巴组;E.丹参注射液组;F.联合用药对照组;G.联合用药组

Fig 2 Effects of drug combination on apoptosis in model cells

A. normal control group; B. model group; C. NGF group; D. levodopa group; E. Danshen injection group; F. combination control group; G. combination group

加;而随处理时间的延长,GAPDH的糖酵解酶活性反而下降;亚细胞组分的分离及ELISA进一步证实,鱼藤酮处理后GAPDH主要在细胞核及线粒体组分内增多。根据各标准品质量浓度及其对应的OD,作标准曲线。通过标准曲线方程,根据测量的各组样品的吸光度 A_{450} 计算出各GAPDH质量浓度。结果显示,50 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮作用分化PC12细胞24 h,GAPDH蛋白含量明显增加,与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,联合用药组GAPDH蛋白含量减少,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),且效果好于左旋多巴组。联合用药对模型细胞GAPDH蛋白含量的影响见表1[OD小于空白OD(0.0603)的样品表示GAPDH质量浓度过低均按0 ng/ml处理]。

表1 联合用药对模型细胞GAPDH含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Effects of drug combination on the content of GAPDH in rotenone-induced differentiated PC12 cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	GAPDH,ng/ml
正常对照组	0
模型组	5.48 \pm 0.13*
NGF组	1.38 \pm 0.21**
左旋多巴组	2.43 \pm 0.24*
丹参注射液组	3.41 \pm 0.39
联合用药对照组	0
联合用药组	1.19 \pm 0.08**

与正常对照组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: ** $P<0.05$, *** $P<0.01$
vs. normal control group: * $P<0.01$; vs. model group: ** $P<0.05$, *** $P<0.01$

3.4 联合用药对模型细胞20S PSM活性的影响

与正常对照组比较,模型组细胞内20S PSM活性减弱,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,联合用药组细胞内

20S PSM活性增强,差异有统计学意义($P<0.01$),且效果好于左旋多巴组。联合用药对模型细胞20S PSM活性的影响见表2。

表2 联合用药对模型细胞20S PSM活性的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Effects of drug combination on the activity of 20S PSM in model cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	PSM,U/L
正常对照组	975.7 \pm 112.3
模型组	377.2 \pm 89.4*
NGF组	797.2 \pm 103.1*
左旋多巴组	696.2 \pm 104.8
丹参注射液组	577.2 \pm 98.1
联合用药对照组	953.4 \pm 121.6
联合用药组	882.2 \pm 134.8*

与正常对照组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: ** $P<0.01$

vs. normal control group: * $P<0.01$; vs. model group: ** $P<0.01$

4 讨论

本研究以鱼藤酮作为诱导剂,通过WST-1细胞增殖率检测法和Hoechst 33342标记染色法再次验证上述结果,即鱼藤酮可导致分化PC12细胞凋亡^[6]。并发现左旋多巴和丹参联合作用较左旋多巴或丹参单独作用更能提高分化PC12细胞增殖率。

细胞、动物模型、流行病学研究以及临床病例报道鱼藤酮等是常见的与PD发病相关的神经毒素,在这些神经毒素诱导的神经元凋亡过程中均检测到GAPDH基因过度表达、GAPDH酶蛋白异常聚集和核转位,说明GAPDH基因过表达、GAPDH酶蛋白异常聚集和核转位是PD发病机制中的重要环节^[7-10]。众所周知,PD典型的神经系统变性疾病,其病理性标志是路易小体(LB),它是一种嗜酸性蛋白包涵体,主要的蛋白成分包括 α -synuclein、泛素、PSM亚单位、泛素羧基末端酶(UCH-L1)、Parkin等,所以近来(UPS)在PD发病机制中的作用成为研究热点^[11]。有研究表明,PSM抑制剂Lactacystin在环境中广泛存在,当易感人群通过生活接触、饮食等方式将其摄入体内时,抑制了20S/26S PSM功能,致使UPS功能缺陷。在这种情况下,错误折叠、突变及损伤的蛋白质(主要包括 α -synuclein)得不到有效降解而在细胞内堆积,会导致氧化应激水平的上升。当异常、突变、氧化修饰的蛋白超过了细胞的降解能力或者UPS本身功能受损都可以导致这些蛋白聚集,而聚集体内成分 α -synuclein过度表达或突变也能削弱UPS的功能,UPS功能缺失致蛋白聚集,最终导致PD的发生^[12]。文献报道,20S PSM是诊断PD的潜在生物标记物之一,能为早期诊断PD提供一定帮助^[13]。本实验研究结果显示,鱼藤酮作用于分化PC12细胞,可显著降低20S PSM含量,从而影响PSM功能。传统化学药左旋多巴可在一定程度上缓解鱼藤酮所致的分化PC12细胞20S PSM活性减弱,但左旋多巴和丹参注射液的联合应用可明显增强PC12细胞20S PSM活性。

综上所述,左旋多巴和丹参注射液联合用药通过降低细胞内GAPDH含量及增强20S PSM活性途径拮抗鱼藤酮诱导的分化PC12细胞凋亡,其效果优于左旋多巴单用,这一结果可为中西医结合治疗PD患者提供实验和理论依据。

参考文献

- [1] 黄凌,朱毅,邝少轶.益智仁挥发油抗帕金森模型小鼠黑质神经元凋亡的作用研究[J].中国药房,2011,22(47):4 430.
- [2] 张文生,朱陵群,牛福玲.丹参素对缺糖-缺氧损伤神经细

HPLC法同时测定人血浆中苦参4种生物碱的含量

李志红*(解放军第324医院药剂科,重庆 400020)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2504-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.03

摘要 目的:建立同时测定人血浆中苦参4种生物碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法。色谱柱为Agilent ZORBAX NH₂(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-无水乙醇-3%磷酸溶液(81:10:9, V/V/V),流速为1 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为室温。结果:槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱的进样量分别在0.034 72~0.258 60、0.012 84~0.113 65、0.023 77~0.240 93、0.452 48~4.520 63 μg范围内与待测物峰面积积分值呈良好线性关系($r \geq 0.999 3$);槐定碱、槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱精密度的RSD均小于2.0%;短期、长期、循环稳定性的RSD均小于3.20%;重复性试验的RSD均小于3.0%;提取回收率分别为1.14%~2.35%、1.45%~2.32%、1.29%~2.51%、1.62%~2.47%。结论:该方法灵敏度高、精密度高,可用于苦参中4种生物碱的药动学研究。

关键词 苦参;高效液相色谱法;生物碱;血浆

Content Determination of 4 Kinds of Alkaloids in *Sophora flavescens* in Human Plasma by HPLC

LI Zhi-hong(Dept. of Pharmacy, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of 4 kinds of alkaloids in *Sophora flavescens* in human plasma. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent ZORBAX NH₂(4.6 mm×150 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-absolute alcohol-3% phosphoric acid solution (81:10:9, V/V/V) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 210 nm, and column temperature was room temperature. RESULTS: The linear ranges were 0.034 72-0.258 60 μg for sophoridine, 0.012 84-0.113 65 μg for sophocarpine, 0.023 77-0.240 93 μg for matrine and 0.452 48-4.520 63 μg for oxymatrine ($r \geq 0.999 3$). RSDs of precision tests of them were all lower than 2.0%. RSDs of short-term stability test, long-term stability test and cyclic stability test were less than 3.20%; RSD of repeated test was lower than 3.0%; extraction recoveries were 1.14%-2.35%, 1.45%-2.32%, 1.29%-2.51% and 1.62%-2.47%. CONCLUSIONS: The method is sensitive and accurate, and can be used for the pharmacokinetic study of 4 kinds of alkaloids in *S. flavescens*.

KEYWORDS *Sophora flavescens*; HPLC; Alkaloid; Plasma

- 胞的保护作用[J].中草药,2004,35(8):921.
- [3] 田琳琳.复方丹参有效成分对神经细胞氧化损伤的保护作用机制[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2009.
- [4] Bannon MJ, Michelhaugh SK, Wang J, et al. The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychiatric disorders[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2001(11):449.
- [5] Gu H, Wall SC, Rudnick G. Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(10):7 124.
- [6] 谢利霞,赵飞宇,李晖,等.左旋多巴与丹参注射液联合用药对鱼藤酮诱导的分化PC12细胞凋亡的保护作用[J].今日药学,2013,23(7):404.
- [7] Katsube N, Sunaga K, Aishita H, et al. ONO-1603, apotential antidementia drug, delays age-induced apoptosis and suppresses overexpression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured central nervous system neurons[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 288(1):6.
- [8] 皮荣标,颜光美.3-磷酸甘油醛脱氢酶与神经元凋亡[J].中国神经学杂志,2000,16(1):73.
- [9] Huang J, Hao L, Xiong N, et al. Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rotenone-induced cell apoptosis: relevance to protein misfolding and aggregation[J]. *Brain Res*, 2009, 1 279.
- [10] 陈春暖,王涛.3-磷酸甘油醛脱氢酶与帕金森病[J].中国临床神经科学,2011,19(5):539.
- [11] 陈生弟,周海燕.帕金森病的发病机制研究进展[J].中国实用内科杂志,2006,26(4):246.
- [12] 杨丽,吕娥,付文玉,等.泛素蛋白酶体系统功能缺陷致帕金森病的机制研究[J].国际病理科学与临床杂志,2009,29(4):324.
- [13] 郑华平.20S蛋白酶体对帕金森病的诊断意义[D].重庆:重庆医科大学,2012.

(收稿日期:2013-08-27 修回日期:2013-10-17)

* 主管药师。研究方向:医院药学。电话:023-68762848。
E-mail:hu_shili0831@sina.com