

京尼平衍生物对硝普钠诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用

王日康¹, 张浪², 沈明¹, 郑文华^{3*}, 陈河如^{4*}

1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330000

2. 解放军第 94 医院 药学科, 江西 南昌 330000

3. 澳门大学 健康科学学院, 澳门 999078

4. 暨南大学 药学院 中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632

摘要: **目的** 探讨京尼平及其衍生物对硝普钠诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及其作用机制。**方法** 通过 62.5~1 000 $\mu\text{mol/L}$ 硝普钠处理 PC12 细胞 24 h 建立细胞损伤模型, 造模前 2 h 给予京尼平衍生物预处理, 采用噻唑蓝比色法 (MTT) 考察京尼平衍生物对 PC12 细胞存活率的影响。Hoechst 染色后观察细胞形态, 以 DCFH-DA 探针和丙二醛 (MDA) 检测试剂盒分别检测 PC12 细胞内 ROS、MDA 水平, RT-PCR 法检测 PC12 细胞抗氧化应激基因水平。**结果** 与对照组比较, 硝普钠能剂量相关性地降低 PC12 细胞的存活, 在 750 $\mu\text{mol/L}$ 时具有统计学差异, 而 10 $\mu\text{mol/L}$ 1R-异丙基-6,7-二氢京尼平 (化合物 4)、1S-异丙基-6,7-二氢京尼平 (化合物 5) 能够明显增加硝普钠诱导 PC12 细胞损伤后的细胞存活率 ($P < 0.05$ 、0.01)。Hoechst 染色形态学证实化合物 4、5 能够明显减少 PC12 细胞的凋亡。硝普钠诱导 PC12 细胞内氧化应激水平, 化合物 4、5 能有效地降低 ROS、MDA 水平, 并促进抗氧化酶基因 GCLC、GPX、CAT mRNA 表达, 但对 HO-1、MnSOD 基因表达水平无明显影响。**结论** 京尼平衍生物可以抑制硝普钠诱导的 PC12 细胞损伤和细胞内氧化应激水平, 其作用机制可能是通过影响抗氧化酶 GCLC、CAT、GPX mRNA 表达水平而实现。

关键词: 京尼平衍生物; PC12 细胞; 硝普钠; 氧化应激; 抗氧化酶; ROS; MDA

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)01-0004-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.01.002

Protection of genipin derivatives against damage of PC12 cells induced by sodium nitroprusside

WANG Ri-kang¹, ZHANG Lang², SHEN Ming¹, ZHENG Wen-hua³, CHEN He-ru⁴

1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

2. Department of Pharmacy, NO.94 Hospital of PLA, Nanchang 330002, China

3. Faculty of Health Sciences, University of Macau, Macau 999078, China

4. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: **Objective** To study the protective effect of genipin derivatives against sodium nitroprusside-induced PC12 cells damage and its mechanisms. **Methods** PC12 cells were treated with 62.5 — 1 000 $\mu\text{mol/L}$ sodium nitroprusside for 24 h to evaluate damage, then pre-treated by genipin derivatives for 2 h. Effect of genipin derivatives on cell survival rate of sodium nitroprusside-induced PC12 cells was evaluated by MTT assay. Morphological changes of PC12 cells were observed by Hoechst 33258 nuclear and DCFH-DA staining. ROS and MDA production levels were measured using commercial assay kits. Meantime, the expression of anti-oxidant enzyme gene was determined by RT-PCR. **Results** Compared with the control group, cell survival rate of sodium nitroprusside-induced PC12 cells decreased in a dose-dependent manner at the dose of 750 $\mu\text{mol/L}$. Compounds 4 and 5 with concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ significantly decreased the cell apoptosis rate induced by sodium nitroprusside ($P < 0.05$ and 0.01). Hoechst

收稿日期: 2016-11-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560662); 江西省卫生计生委中医药科研课题 (2015A050) 江西中医药大学博士启动基金项目 (2014BS012)

作者简介: 王日康 (1986—), 博士研究生, 从事药物筛选和作用靶点研究。E-mail: wrk168ok@163.com

*通信作者 郑文华 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 从事神经药理学研究。E-mail: wenhuazheng@umac.mo

陈河如 (1967—), 男, 教授, 博士生导师, 新药设计合成及作用机制/天然产物结构修饰。E-mail: thrchen@jnu.edu.cn

staining showed that compounds **4** and **5** could significantly decrease the apoptosis of PC12 cells. The level of oxidative stress in PC12 cells were induced by sodium nitroprusside. Compounds **4** and **5** could effectively reduce ROS and MDA levels, and promote the mRNA expression of anti-oxidant enzyme genes GCLC, GPX, and CAT, but it showed no significant effect on mRNA levels of HO-1 and MnSOD. **Conclusion** Genipin derivatives can inhibit level of oxidative stress damage in PC12 cells induced by sodium nitroprusside, which may be related to the change of mRNA expression of anti-oxidant enzyme GCLC, CAT, GPX gene.

Key words: genipin derivatives; PC12 cell; sodium nitroprusside; oxidative stress; antioxidant enzyme; ROS; MDA

京尼平是从栀子中提取的环烯醚萜化合物,是化学结构不稳定的天然产物。很多研究旨在寻求稳定而又能保留甚至增加其生物活性的京尼平衍生物。已证实,京尼平及其稳定衍生物栀子酰胺 A 均能激活神经元型一氧化氮合成酶的活性,调控神经细胞中一氧化氮(NO)的平衡,从而发挥其神经保护作用^[1-2]。众所周知,NO 是一种较小的生物活性分子,能参与脑内许多生理功能的调节,尽管其化学结构简单,却能以相对特异的方式控制神经元的功能或生理功能,但过量 NO 的存在却能产生神经毒性。前期工作发现,1-*O*-异丙基京尼平衍生物 CHR20、CHR21 与京尼平一样都是一氧化氮合成酶激活剂,然而却可以对硝普钠诱导的 PC12 细胞损伤起保护作用^[3]。作为外源性 NO 供体,过量硝普钠的存在将产生 NO 神经毒性,是研究 NO 毒性的体外模型^[4]。因此,京尼平衍生物是否都具有这个特点以及其结构规律是本研究关注的科学问题。本研究针对 5 个京尼平衍生物开展相关研究,旨在筛选京尼平衍生物对抗硝普钠诱导细胞损伤作用,并从抗氧化酶基因表达的变化探讨京尼平衍生物的保护作用机制。

1 试剂和仪器

1.1 细胞株

高分化的 PC12 细胞株购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂

二甲基亚砜(DMSO,编号 D2650)、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA,编号 D6883)荧光探针为 Sigma 公司产品;Goldview I 型核酸染色剂(Solarbio 公司);DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、马血清(HS)购于美国 Gibco 公司;硝普钠(编号 S0015)、胰蛋白酶(编号 C0201)、PSA(编号 C0222)、Hoechst 33258(编号 C1011)购自碧云天生物科技有限公司;TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂(编号 DP424)、RT-PCR(编号 KR108-01)试剂、PCR 试剂(编号 KT207-01)购于天根生化科技有限责任公司;丙二醛(MDA)检测试剂盒购于南京建成生

物科技有限公司;京尼平衍生物(4a*S*,7a*S*)-7-甲酰基-1-氧代-1,4a,5,7a-四氢环戊烯[c]吡喃-4-羧酸甲酯(化合物 **1**)、(4a*S*,7a*S*)-2-丁基-7-(羟甲基)-1-氧代-1,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊烯[c]吡喃-4-羧酸甲酯(化合物 **2**)、(4a*S*,7a*S*)-2-苄基-7-(羟甲基)-1-氧代-2,4a,5,7a-四氢-1*H*-环戊烯[c]吡喃-4-羧酸甲酯(化合物 **3**)、1*R*-异丙基-6,7-二氢京尼平(化合物 **4**)、1*S*-异丙基-6,7-二氢京尼平(化合物 **5**)由暨南大学药学院陈河如课题组合成,质量分数均>90%,结构见图 1。

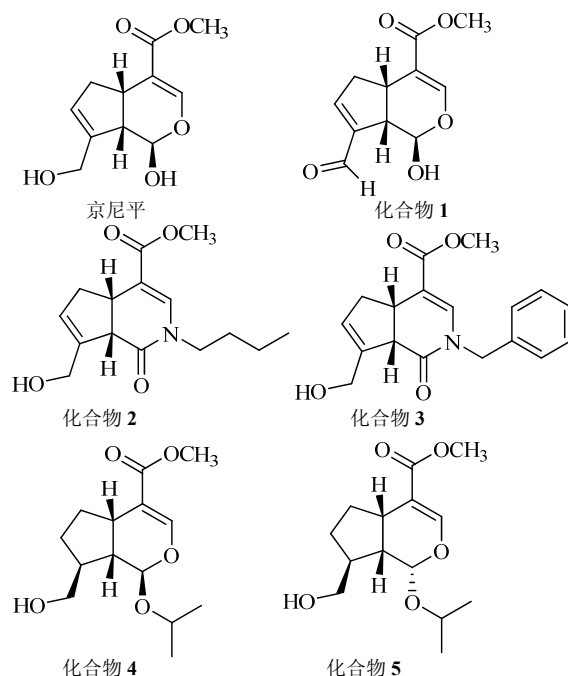


图 1 京尼平及其衍生物的化学结构

Fig. 1 Structure of genipin and its derivatives

1.3 主要设备

紫外分光光度计(Ultrospec 1100 pro); Heraeus Labo fuge 400R 高速离心机;TC-5000 型 PCR 仪(英国 Techne);奥林巴斯 IX71 荧光倒置显微镜;UVP 凝胶成像系统(美国 Upland CA 公司)。

2 方法

2.1 PC12 细胞的培养和传代^[5]

将水浴锅调至 37.0~37.5℃,待水浴温度稳定后,取出液氮中冻存的细胞迅速放入水浴锅,将细

胞液面浸至水面以下轻轻摇动至完全融化。然后 1 000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 加入适量的完全培养基重悬细胞, 吹打均匀后移入细胞培养瓶中, 以 10% FBS、5% HS、0.2% PSA 的 DMEM 高糖培养液置于 CO₂ 培养箱内培养复苏的细胞。每 2~3 天更换培养液 1 次。待细胞融合率达 80% 以上时, 即可进行传代和后续的细胞处理实验。

2.2 MTT 法检测细胞活力^[6-7]

PC12 细胞按每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板。每孔的培养基体积为 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 24 h 后, 换液为不含血清的 DMEM 培养基, 采用 62.5~1 000.0 μ mol/L 硝普钠处理 PC12 细胞 24 h, 考察硝普钠对 PC12 细胞的毒性作用。

将种板的细胞分为对照组、模型组 (750 μ mol/L 硝普钠) 和京尼平衍生物组。其中京尼平衍生物组用 750 μ mol/L 硝普钠预先处理 2 h 后, 分别加入终浓度分别为 0、0.3、1、3、10、30 μ mol/L 京尼平衍生物, 处理 24 h 后, 加 10 mg/mL MTT 10 μ L, 继续培养 4 h 后去上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 微振荡后, 用全自动酶标仪在 570 nm 波长处读取吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率。

细胞存活率 = 检测孔的 *A* 值 / 对照孔的 *A* 值

2.3 Hoechst 染色法检测细胞凋亡状态

细胞处理结束后, 吸出细胞培养基, 每孔加入 50 μ L 固定液固定 10 min。吸去固定液后, 用 PBS 洗涤 2 遍, 每孔加入 Hoechst 33258 染色液 50 μ L, 染色 10 min。吸去染色液, 用 PBS 洗涤 2 遍, 每孔加入 80 μ L PBS。通过荧光显微镜在激发波长 330~380 nm 观察凋亡细胞的形态学的变化。

2.4 DCFH-DA 法检测细胞内活性氧 (ROS) 水平

将处理好的 48 孔细胞培养板加 DCFH-DA 200 μ L (培养基配制, 终浓度 10 μ mol/L), 37 $^{\circ}$ C 避光处理 30 min, 抽掉培养基, PBS 洗 2 遍, ArrayScanVTI 高内涵细胞成像分析系统 (Thermo Fisher Scientific 公司) 随机检测 25 个视野下荧光强度。检测荧光激发波长设为 488 nm 和发射波长设为 525 nm。

细胞 ROS 水平 = 检测孔的平均荧光强度值 / 对照孔的平均荧光强度值

2.5 MDA 水平的测定

分别对 96 孔板 PC12 细胞预处理药物 2 h 进行硝普钠损伤共处理 12 h; 然后按组别收取 96 孔板中的处理组细胞和正常对照细胞。96 孔板中的细胞

2 500 r/min 离心 5 min 后, 分离上清, 用 ddH₂O 重悬后涡旋 1 min 使细胞充分破裂, 按照 MDA 试剂盒说明书分别测定培养液和细胞的 MDA 水平。

2.6 RT-PCR 检测京尼平衍生物诱导抗氧化基因表达

PC12 细胞按 6×10^5 /孔接种于 6 孔板, 每孔的培养基体积为 2 000 μ L, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 12 h 后, 用化合物 4 加硝普钠或不加硝普钠共处理 PC12 细胞 12 h, 按照 Trizol 试剂盒说明提取肝组织总 mRNA, mRNA 浓度通过紫外分光光度计测定。取 2 μ g 总 RNA 逆转录成 cDNA, 然后进行 PCR 扩增。采用 RT-PCR 法检测其对谷氨酰半胱氨酸合成酶 (GCLC)、锰超氧化物歧化酶 (MnSOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX)、血红素氧合酶 1 (HO-1) 等抗氧化基因 mRNA 表达的影响。选用核糖体蛋白 L19 (RPL-19) 作为内参, 循环温度为 55 $^{\circ}$ C, 循环数为 35 的 20 μ L 反应体系: 1.5 μ L cDNA, 10 $\times$ PCR buffer 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ L, 10 μ mol/L Random Primer 2 μ L, 上下游引物 (表 1) 20 μ mol/L 各加 0.5 μ L 及 Taq 酶 1 μ L, 纯水补容至 20 μ L。

表 1 抗氧化酶和内参基因引物序列

Table 1 Primer sequences of antioxidant genes and internal control

基因	引物序列
GCLC	上游: 5'-TCAAAGGCCTCTAAGCCAGA-3' 下游: 5'-AGATCTCCGTGTCGATGGTC-3'
MnSOD	上游: 5'-CTCCCTGACCTGCCT TACGACT-3' 下游: 5'-AAGCGACCTTGCTCCTTATTG-3'
CAT	上游: 5'-GAGGCAGTGTACTGC AAGTTCC-3' 下游: 5'-GGGACAGTTACAGGTAAGTGC-3'
GPX	上游: 5'-TCCACCGTGTATGCCTTCTCC-3' 下游: 5'-CCTGCTGTATCTGCG CACTGGA-3'
HO-1	上游: 5'-AGCATGTCC CAGGATTTGTC-3' 下游: 5'-ACCAGCAGCTCAGGATGAGT-3'
RPL-19	上游: 5'-ATCGCCAATGCCAACTCT-3' 下游: 5'-GAGAATCCGCTTGT TTTTGAA-3'

2.7 统计学处理

应用 SPSS 16.0 软件, 对各项数据进行统计学分析。全部计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较用方差分析 (单因素方差分析、LSD 法), 组间比较、组内比较用 *t* 检验。

3 结果

3.1 不同剂量硝普钠对 PC12 细胞存活率的影响

当硝普钠的剂量为 250 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞基本能正常生长; 当剂量 500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 开始显示神经毒性, 细胞存活率为 $(75.4 \pm 6.7)\%$ ($P < 0.05$); 从细胞毒性造模的角度考虑, 选择硝普钠剂量为 750 $\mu\text{mol/L}$ 造模, 见表 2。

表 2 硝普钠对 PC12 细胞的损伤作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Damage effects of sodium nitroprusside on PC12 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

剂量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞存活率/%
0 (对照)	100.0 $\pm$ 4.2
62.5	101.2 $\pm$ 9.9
125	93.3 $\pm$ 7.1
250	88.4 $\pm$ 3.1
500	75.4 $\pm$ 6.7*
750	59.8 $\pm$ 2.7**
1 000	36.7 $\pm$ 1.7**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 京尼平衍生物对 PC12 细胞存活率的影响

化合物 1、2、3 在所检测的浓度范围内均没有显示保护作用; 而化合物 4、5 在 3 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 开始对硝普钠诱导的细胞损伤具有显著的抑制作用; 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时, 作用效果达到最佳, 而且呈显著的剂量效应, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01), 见表 3。

3.3 Hoechst 染色法观察

分别比较化合物 4、5 处理后细胞形态上的差异, 见图 1。对照组细胞细胞核饱满, 染色均匀; 给予硝普钠处理后可见细胞核皱缩, Hoechst 染色亮度增加, 甚至可见核碎裂; 分别给予 10 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 4、5 处理后, 可以一定程度上逆转硝普钠的毒性作用, 细胞核浓染现象得到明显改善。

3.4 京尼平衍生物对 ROS、MDA 水平的影响

过量硝普钠的存在将提升细胞内 ROS、MDA 水平, 进而对细胞造成损伤。利用荧光探针 DCFH-DA、MDA 检测试剂盒分别检测硝普钠处理、化合物 4、5 预处理后硝普钠再处理情况下细胞内 ROS、MDA 水平, 见表 4。以对照组细胞内 ROS、MDA 水平为 100% 计算, 单独用硝普钠处理的模型组 ROS 水平是对照组的 1.95 倍, 分别用 10 $\mu\text{mol/L}$ 化

表 3 京尼平衍生物对硝普钠诱导的 PC12 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Effect of genipin derivatives on cell survival rate of sodium nitroprusside-induced PC12 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	100.0 $\pm$ 5.7
模型	—	57.6 $\pm$ 2.5 ^{##}
化合物 1	0.3	60.8 $\pm$ 3.6
	1	62.0 $\pm$ 5.8
	3	69.4 $\pm$ 5.3
	10	67.1 $\pm$ 5.3
	30	68.3 $\pm$ 3.4
化合物 2	0.3	67.6 $\pm$ 1.8
	1	69.1 $\pm$ 3.9
	3	68.2 $\pm$ 2.8
	10	65.2 $\pm$ 1.4
	30	65.8 $\pm$ 7.2
化合物 3	0.3	60.7 $\pm$ 4.0
	1	69.5 $\pm$ 3.2
	3	65.2 $\pm$ 3.5
	10	69.8 $\pm$ 4.3
	30	62.7 $\pm$ 4.0
化合物 4	0.3	63.5 $\pm$ 0.9
	1	66.5 $\pm$ 0.6
	3	72.7 $\pm$ 1.2*
	10	85.7 $\pm$ 1.5**
	30	82.3 $\pm$ 2.1**
化合物 5	0.3	64.4 $\pm$ 1.9
	1	65.0 $\pm$ 1.6
	3	79.3 $\pm$ 2.2*
	10	89.1 $\pm$ 2.1**
	30	73.6 $\pm$ 3.3

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

合物 4、5 预处理后能显著减弱硝普钠诱导的 PC12 细胞内 ROS 水平, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01)。

不同处理组细胞内 MDA 水平变化情况与 ROS 类似。与对照组比较, 模型组细胞内 MDA 水平是对照组的 3.82 倍, 而 10 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 4、5 预处理能显著降低硝普钠诱导的 PC12 细胞内 MDA 水平 ($P < 0.05$ 、0.01), 见表 4。

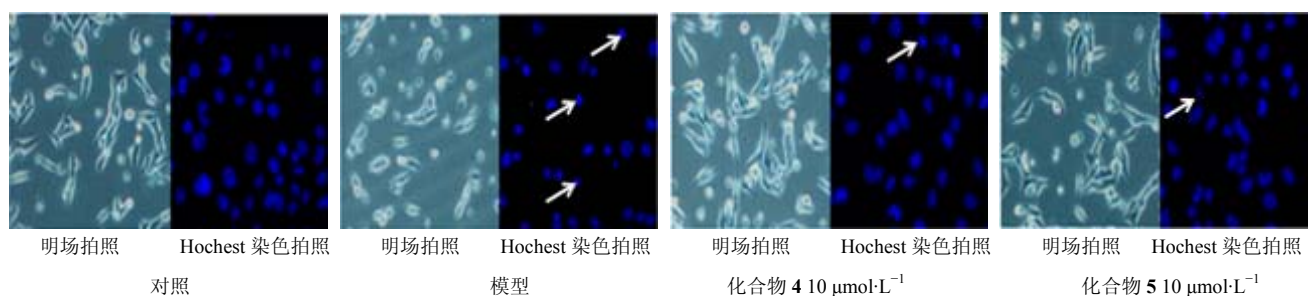


图 1 PC12 细胞形态改变 (Hoechst 染色)

Fig. 1 Morphological changes of PC12 cells (Hoechst staining)

表 4 京尼平衍生物对硝普钠诱导的 PC12 细胞内 ROS、MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Table 4 Effect of genipin derivatives on levels of ROS and MDA in sodium nitroprusside-induced PC12 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	ROS/%	MDA/%
对照	—	100.0 $\pm$ 7.8	100.0 $\pm$ 13.5
模型	—	195.0 $\pm$ 13.5 ^{###}	382.7 $\pm$ 28.1 ^{###}
化合物 4	3	165.0 $\pm$ 8.3	237.9 $\pm$ 17.1 [*]
	10	132.3 $\pm$ 5.3 [*]	128.1 $\pm$ 20.0 ^{**}
化合物 5	3	135.0 $\pm$ 12.5 [*]	224.4 $\pm$ 16.3 [*]
	10	124.3 $\pm$ 7.2 ^{**}	104.6 $\pm$ 14.6 ^{**}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.5 京尼平衍生物诱导抗氧化蛋白基因表达

硝普钠诱导的 ROS、MDA 水平升高可能与细胞内调控氧化态的抗氧化蛋白有关。化合物 4、5 对 ROS、MDA 的调控作用可能通过调控细胞抗氧化蛋白水平来实现。实验通过 RT-PCR 法检测氧化应激相关基因水平的变化来揭示相关作用, 结果见图 2、表 5。结果表明, 硝普钠增加了 GCLC、GPX、HO-1 的 mRNA 表达水平, 降低了 CAT 的 mRNA

表达水平 ($P < 0.05$); 10 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 4、5 显著增加硝普钠诱导的 GPX mRNA 表达 ($P < 0.05$)。但 30 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 4、5 明显抑制 GPX mRNA 表达; 在同等条件下却进一步升高 GCLC mRNA 表达水平; 另外 30 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 4、5 预处理明显提升被硝普钠下调的 CAT mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。各药物组对硝普钠提升的 HO-1 mRNA 表达水平没有影响; 硝普钠、化合物 4、5 处理组均对 PC12 细胞的 MnSOD mRNA 表达水平无明显影响。

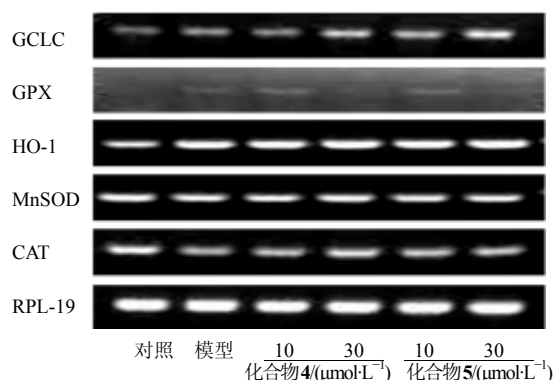


图 2 京尼平衍生物对 PC12 细胞抗氧化酶基因表达的影响

Fig. 2 Effects of genipin derivatives on antioxidant expression in sodium nitroprusside-induced PC12 cells

表 5 京尼平衍生物对硝普钠诱导的 PC12 细胞损伤抗氧化酶基因表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Table 5 Effects of genipin derivatives on antioxidant expression levels in sodium nitroprusside-induced PC12 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	GCLC	GPX	HO-1	MnSOD	CAT
对照	—	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.0
模型	—	1.5 $\pm$ 0.1 [#]	2.6 $\pm$ 0.1 [#]	1.7 $\pm$ 0.2 [#]	0.8 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1 [#]
化合物 4	10	1.5 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.1 [*]	1.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.2
	30	2.9 $\pm$ 0.1 [*]	0.7 $\pm$ 0.2 [*]	1.8 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1 [*]
化合物 5	10	2.8 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.2 [*]	1.8 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0
	30	3.8 $\pm$ 0.2 [*]	0.7 $\pm$ 0.0 [*]	1.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1 [*]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ [#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

4 讨论

神经退行性疾病包括阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈病等,氧化应激、线粒体损伤、泛素-蛋白酶体功能障碍、兴奋性毒性、炎症反应都可能是神经退行性疾病的致病原因。在正常生理状态下,NO 主要是一种神经信使分子,其在神经组织、细胞内的浓度通过神经元型一氧化氮合成酶(nNOS)来调控^[8-9]。当发生病理变化时,NO 大量产生,能够像谷氨酸一样启动一个神经毒性级联反应,过量谷氨酸通过 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)受体作用在脑缺血中介导细胞死亡,NMDA 受体的激活和由此产生细胞内 Ca^{2+} 水平的增加可能引起更多形式的谷氨酸神经毒性,从而导致精神性疾病。NO 主要通过还原型亚硝酸离子和超氧阴离子形成过氧化亚硝酸阴离子导致神经毒性作用。

在本研究中,建立的确普钠诱导 PC12 细胞损伤模型中,确普钠产生过量 NO,导致神经毒性而使细胞凋亡^[10]。在此模型下,采用 MTT 法对京尼平衍生物进行筛选,得到化合物 **4**、**5** 能够剂量相关性对抗确普钠诱导的 PC12 细胞凋亡。通过 Hoechst 染色从形态学角度再次验证这一结果。ROS 连锁反应是脑神经元损伤的主要机制之一,确普钠可以诱导 ROS 产生造成神经细胞氧化损伤^[5]。MDA 是氧自由基作用于生物膜中的多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化反应的终产物,其水平的高低反映了受自由基攻击的严重程度,可以作为评价脂质过氧化反应强弱的指标。实验发现化合物 **4**、**5** 能剂量相关性降低确普钠处理后 PC12 细胞中 ROS、MDA 水平,明显减轻细胞氧化损伤程度。在正常情况下,机体中有抗氧化酶的广泛分布,如 SOD、CAT、GPX 等在防止氧化代谢物的损伤中具有重要作用。实验通过半定量 RT-PCR 法检测化合物 **4**、**5** 对各种抗氧化酶的基因水平的影响,结果证实确普钠增加细胞氧化应激水平的同时代偿性地增加了 GCLC、GPX、HO-1 mRNA 表达水平,而抑制 CAT mRNA 表达水平,对 PC12 细胞的 MnSOD mRNA 表达水平无明显影响。随着化合物 **4**、**5** 剂量增加,对 GPX mRNA 表达量先升高后降低,在同等条件下却进一步升高 GCLC mRNA 表达水平。另外化合物 **4**、**5** 明显提升被确普钠下调的 CAT mRNA 表达水平。因此化合物 **4**、**5** 可能通过促进

抗氧化酶 GPX、GCLC、CAT mRNA 的转录从而抵抗确普钠诱导的氧化损伤及凋亡,该作用可能与其增强细胞抗氧化酶系统、抗 ROS 的防御能力有关。

参考文献

- [1] Yamazaki M, Chiba K, Mohri T, *et al.* Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade through nitric oxide synthesis as a mechanism of neuritogenic effect of genipin in PC12h cells [J]. *J Neurochem*, 2001, 79(1): 45-54.
- [2] Luo J, Wang R K, Huang Z, *et al.* Synthesis of stable genipin derivatives and studies of their neuroprotective activity in PC12 cells [J]. *ChemMedChem*, 2012, 7(9): 1661-1668.
- [3] Wang R K, Yang J, Liao S F, *et al.* Stereoselective reduction of 1-*O*-isopropoxyloxygenipin enhances its neuroprotective activity in neuronal cells from apoptosis induced by sodium nitroprusside [J]. *ChemMedChem*, 2014, 9(7): 1397-1401.
- [4] 张浪, 赖永长, 汪海涛, 等. 芦丁对神经细胞氧化损伤的保护作用 [J]. *中药材*, 2014, 4(37): 640-644.
- [5] Liu J Z, Wang A H, Li L L, *et al.* Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus [J]. *Seizure*, 2010, 19(3): 165-172.
- [6] Parker G C, Li X, Anguelov R A, *et al.* Survival motor neuron protein regulates apoptosis in an *in vitro* model of spinal muscular atrophy [J]. *Neurotox Res*, 2008, 13(1): 39-48.
- [7] Zheng W H, Quirion R. Comparative signaling pathways of insulin-like growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons and the role of the PI3 kinase pathway in cell survival [J]. *J Neurochem*, 2004, 89(4): 844-852.
- [8] Jeong H S, Kim S W, Baek K J, *et al.* Involvement of Ras in survival responsiveness to nitric oxide toxicity in pheochromocytoma cells [J]. *J Neurooncol*, 2002, 60(2): 97-107.
- [9] Li C Q, Pang B, Kiziltepe T, *et al.* Nitric oxide promotes survival of cerebral cortex neurons with simultaneous addition of [Fe(II)(β -citryl-*L*-glutamate)] complex in primary culture [J]. *Chem Res Toxicol*, 2006, 19(3): 399-406.
- [10] Hamada-Kanazawa M, Narahara M, Takano M, *et al.* Nitric oxide promotes survival of cerebral cortex neurons with simultaneous addition of [Fe(II)(β -citryl-*L*-glutamate)] complex in primary culture [J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(7): 1068-1079.