

利血平对脊髓小脑共济失调 3 型 (SCA3) 细胞模型的影响

王子见, 马芝薇, 何树妮, 任媛媛, 王琳琳, 石玉琪, 刘婷, 李子恒, 何凤琴

西安文理学院 西安市秦岭天然产物开发与创新药物研究重点实验室, 陕西 西安 710065

摘要: 目的 阐明利血平对脊髓小脑共济失调 3 型 (SCA3) 细胞模型的潜在作用。方法 通过核质分离、免疫荧光、Western blotting、微孔过滤和细胞活性等实验探索利血平对 SCA3 发病过程中 ataxin-3 核质转运、ataxin-3 可溶性蛋白水平、蛋白包涵体、细胞活性等一系列病理变化的影响。结果 利血平对 ataxin-3 核质转运和可溶性蛋白水平没有显著性影响, 但是增加了 ataxin-3 形成的包涵体数量, 并且增加了细胞毒性。结论 利血平通过增加包涵体数量导致 SCA3 细胞活性减弱, 为老药新用发现提供了理论依据。

关键词: 利血平; 脊髓小脑共济失调 3 型; ataxin-3; 蛋白包涵体; 核质转运; 可溶性蛋白

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)11-2672-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.11.004

Effect of reserpine on spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) cell model

WANG Zi-jian, MA Zhi-wei, HE Shu-ni, REN Yuan-yuan, WANG Lin-lin, SHI Yu-qi, LIU Ting, LI Zi-heng, HE Feng-qin

Key Laboratory of Natural Product Development and Anticancer Innovative Drug Research in Qinling, Xi'an University, Xi'an 710065, China

Abstract: Objective To clarify the potential effect of reserpine on spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) cell model. **Methods** The effects of reserpine on ataxin-3 nuclear and cytoplasmic transport, ataxin-3 soluble protein level, protein inclusion body and cell viability during the pathogenesis of SCA3 were investigated by nucleocytoplasmic separation, immunofluorescence, Western blotting, filter trap and CCK-8 methods. **Results** Reserpine had no significant effect on the nucleocytoplasmic transport and soluble protein level of ataxin-3, but increased the number of inclusion bodies formed by ataxin-3 and increased cytotoxicity. **Conclusion** Reserpine decreases the SCA3 cell viability by increasing the number of inclusion bodies, which provides a theoretical basis for the new discovery of old drugs.

Key words: reserpine; spinocerebellar ataxia type 3; ataxin-3; inclusion body; nuclear and cytoplasmic transport; soluble protein

脊髓小脑共济失调 3 型/马查多约瑟夫病(SCA3/MJD, 简称 SCA3)是一种常染色体显性遗传的神经退行性疾病,是仅次于亨廷顿舞蹈症的第 2 大类多聚谷氨酰胺 (polyQ) 疾病^[1-2]。该病是由 ATXN3 基因编码的 ataxin-3 蛋白 polyQ 异常扩增引起的。一般情况下,健康人群 polyQ 重复序列数目 12~43, SCA3 患者会增加至 51~91。正常 ataxin-3 蛋白是一种胞浆蛋白,含有异常扩增 polyQ 的 ataxin-3 蛋白在各种致病因素的刺激下进入细胞核,在核内募集其他多种组分包括转录因子、泛素蛋白酶、伴

侣蛋白或 RNA 等形成核内包涵体 (SCA3 标志性病理特征),从而导致核内转录异常、蛋白稳态失衡、能量代谢障碍、运输障碍等,最终导致神经细胞死亡^[3-4]。因此,与其他很多神经退行性疾病的致病蛋白一样,细胞核是关键病理位点,ataxin-3 的病理入核现象和核内包涵体的形成是 SCA3 早期重要的病理特征和发病机制^[5]。

利血平是从印度萝芙木属蛇根木 *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz 中提取的一种生物碱,是具有温和持久特点的抗高血压药物^[6-8]。但同时,

收稿日期: 2023-07-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82202067, 32270530); 陕西省自然科学基金基础研究计划资助项目 (2020JM-620); 西安市科技计划创新基金“文理专项”项目 (2020KJWL04); 西安文理学院博士启动金 (06005026); 西安文理学院院长基金 (YZJJ202104); 国家级大学生创新创业项目 (S202011080012, S202311080020); 省级大学生创新创业项目 (S202011080058, S202111080043, S202111080031)

作者简介: 王子见,女,博士,副教授,研究方向为神经生物学。E-mail: wangzijian-136@163.com

利血平能够诱发帕金森综合征和抑郁症^[9-10]。研究表明,利血平能够促使人神经母细胞 SH-SY5Y 的凋亡和诱导自噬损伤,引发 α -synuclein 蛋白聚集体,并能影响 Ddc-GAL4 果蝇的运动能力^[11]。利血平作为单胺类抑制剂,可治疗运动机能亢进,已被广泛用于亨廷顿舞蹈症的抽动症^[12]。结合利血平对神经系统疾病的影响,本研究探讨利血平在 SCA3 致病过程中对一系列细胞水平病理变化的影响,分析最早期的病理变化 ataxin-3 核质转运,观察可溶性 ataxin-3 蛋白水平以及 ataxin-3 形成的包涵体数量,检测 SCA3 细胞活性,进而阐明利血平对 SCA3 细胞模型的影响,揭示老药新用的药理作用,为临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 药物和试剂

利血平(批号 83580)、阴性对照 DMSO 溶剂(批号 32160405)均购自 Sigma-Aldrich 公司。 β -半乳糖苷酶抗体(β -gal, 货号 200-4136, 稀释比例为 1:10 000)购自 Enzo Life Science 公司,为细胞质内参蛋白;LaminAC 抗体(货号 7293, 稀释比例为 1:500)购自 Santa cruz biotechnology 公司,为细胞核内参蛋白;1H9 抗体(货号 MAB5360, 稀释比例为 1:2 500)购自 Merck Millipore 公司,为检测 ataxin-3 蛋白;Actin 抗体(货号 A5441, 稀释比例为 1:10 000)购自 Sigma Aldrich 公司,为内参蛋白;辣根过氧化物标记二抗 Anti-Mouse IgG(货号 9597364, 稀释比例为 1:2 500; Anti-Rabbit IgG(货号 9596107, 稀释比例为 1:2 500)均购自 GE Healthcare Life Science 公司;荧光标记二抗 Anti-Mouse IgG(Alexa Fluor 488, 货号 A-21202, 稀释比例为 1:200)购自 Life Technologies 公司;Attractene 试剂(货号 301005)购自 Qiagen 公司;Prestoblue Cell Viability 试剂(货号 A13262)购自 Life technologies 公司。

1.2 细胞及质粒

中国仓鼠卵巢 CHO 细胞和人胚肾 HEK293T 细胞均由德国图宾根大学 Thorsten Schimdt 博士惠赠;野生型 peGFP-ataxin-3-15Q(正常)、polyQ 中度扩增型 peGFP-ataxin-3-77Q(中度患病)和 polyQ 中度扩增型 peGFP-ataxin-3-148Q(重度患病)质粒均由德国图宾根大学 Thorsten Schimdt 博士惠赠。

1.3 仪器

荧光显微镜(蔡司 Axioscope 5);酶标仪(Bio-

Tek Synergy HT microplate reader, 内含 Gen5 软件);Li-Cor C-DiGit®化学发光扫描仪,含 Image Studio 软件;96 孔 Bio-Dot 微孔过滤仪(Bio-Rad 公司)。

1.4 细胞培养及转染

CHO 细胞和 HEK293T 细胞培养在含有 10%胎牛血清、1%青链霉素的 DMEM 培养液中,在含有 5% CO₂ 的细胞培养箱中 37 °C 培养。转染前 1 天将细胞传代至 6 孔板,第 2 天使用 Attractene 转染试剂按照说明书进行质粒转染,将 1.2 μ g DNA 质粒(溶解在 TE 缓冲液中)稀释在总体积 100 μ L 的 DMEM 培养液(不含血清和双抗)中,加入 4.5 μ L 的 Attractene 转染试剂混匀,室温孵育 15 min,将转染混合物加入到 6 孔板中,按照倒八字摇匀后放回培养箱继续培养。转染 48 h 后进行后续实验。

1.5 细胞质核分离

收集细胞,加入 200 μ L 的细胞质缓冲液(10 mmol/L HEPES pH 7.5, 10 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 0.5% NP40, 加入蛋白酶抑制剂),吹打混匀,置冰上 20 min,期间涡旋 2 次,每次 5 s。在 4 °C 条件下 13 000 r/min 离心 5 min,上清即为细胞质蛋白。向细胞沉淀中加入 80 μ L 的细胞核缓冲液(细胞质缓冲液+1% NP40),吹打混匀,置冰上 30 min,其间涡旋 3 次,每次 5 s。在 4 °C 条件下 13 000 r/min 离心 20 min,上清液即为细胞核蛋白。

细胞核分布百分比=细胞核 ataxin-3/laminAC/(细胞质 ataxin-3/ β -gal+细胞核 ataxin-3/laminAC)

β -gal 抗体为细胞质内参蛋白;laminAC 为细胞核内参蛋白

1.6 全蛋白提取

收集细胞,离心,在细胞沉淀中加入 100 μ L 的蛋白裂解缓冲液 TNES(1 mol/L Tris pH 7.5, 5 mol/L NaCl, 0.1%聚山梨醇酯 20, 加入蛋白酶抑制剂),吹打混匀,置冰上 15 min,其中涡旋 2 次,每次 5 s。在 4 °C 条件下 13 000 r/min 离心 5 min,上清即为细胞全蛋白。

1.7 蛋白印迹实验

采用 Bradford 方法测定蛋白浓度,每孔蛋白上样量为 30 μ g,加入一定量的上样缓冲液,煮沸 5 min 进行变性,离心,取蛋白上清上样,进行 SDS-PAGE 电泳,结束后转膜,电压 80 V 转膜 2 h,取出硝酸纤维素膜,采用含 5%脱脂奶粉的 1×TBST 进行室温封闭 2 h,加入一抗 4 °C 孵育过夜,使用 1×TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,加入二抗室温孵育 1 h,再

使用 $1 \times \text{TBST}$ 漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 底物进行显色, 在 LI-COR Odyssey 成像仪上拍照分析。一抗: 1H9 抗体用于检测 ataxin-3 蛋白; 稀释倍数为 $1:1\,000$ 。辣根过氧化物标记二抗稀释倍数均为 $1:2\,000$ 。

1.8 免疫荧光实验

将细胞接种在含有 4% 多聚赖氨酸预处理的盖玻片 (盖玻片放置于 6 孔板中) 上生长过夜。第 2 天弃掉培养液, 用 $1:1$ 的甲醇和丙酮固定 5 min, 用预冷的 PBS 洗 1 次, 加入封闭液室温封闭 20 min, 加入一抗室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 室温孵育二抗 1 h, 洗涤同上, 随后用 DAPI 染核 10 min, 洗涤后, 加入封片剂和盖玻片, 在荧光显微镜下观察拍照。采用 Image J 软件分析 ataxin-3 蛋白在细胞核和细胞质的荧光值, 计算 ataxin-3 在细胞核分布的百分比。

1.9 微孔过滤实验

该方法用于检测不溶于 SDS 的蛋白包涵体, 分析 ataxin-3 形成的包涵体数量。细胞转染 72 h 后, 收集细胞, $1\,500\text{ r/min}$ 离心 5 min, 将含有蛋白酶抑制剂的 PBS 加入到细胞沉淀中进行重悬, 用超声破碎仪裂解细胞和 DNA 片段。采用 Bradford 方法测定蛋白浓度, 在蛋白样品中加入 2% SDS, 煮沸 5 min 使蛋白质完全变性, 将醋酸纤维素膜在 $1 \times \text{TBST}$ (含 2% SDS) 中浸润预处理, 安装并打开微孔过滤仪, 在每孔中加入 $100\text{ }\mu\text{g}$ 的蛋白样品, 在抽

滤真空泵的作用下, 小分子蛋白通过醋酸纤维素膜, 而大分子蛋白包涵体会留在膜上, PBS 冲洗 3 次, 待样品全部吸附在滤膜上, 将滤膜取出放置在含 5% 脱脂奶粉的 $1 \times \text{TBST}$ 进行 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 之后进行一抗、二抗孵育以及 ECL 显色等步骤进行 Western blotting 实验。

1.10 细胞活性检测实验

PrestoBlue 细胞活性检测试剂盒是一种以 resazurin 为基础的用于检测细胞活性的试剂。将细胞铺板至 96 孔板, 每孔 5×10^4 个细胞, 利血平或 DMSO 处理后, 加入 PrestoBlue 试剂孵育 10 min, 采用酶标仪进行检测 (激发光: 535 nm , 发射光: 615 nm)。

1.11 统计学方法

每个实验至少进行 3 次以上独立性重复实验, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Graphpad Prism 9 软件进行统计学分析, 细胞活性分析涉及 2 个因素影响不同处理组之间进行比较采用双因素方差分析 (Two-Way ANOVA), 其他实验分析涉及 2 个不同处理组的比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 利血平对 ataxin-3 核质转运的影响

结果表明, 与 DMSO 组相比, 利血平组对野生型和突变型 ataxin-3 核质分布没有影响, 差异均无统计学意义 (图 1), 表明利血平对 ataxin-3 核质转运没有影响。同时, 本研究采用免疫荧光实验进一步验证利血平对 ataxin-3 入核的影响。结果表明, 与

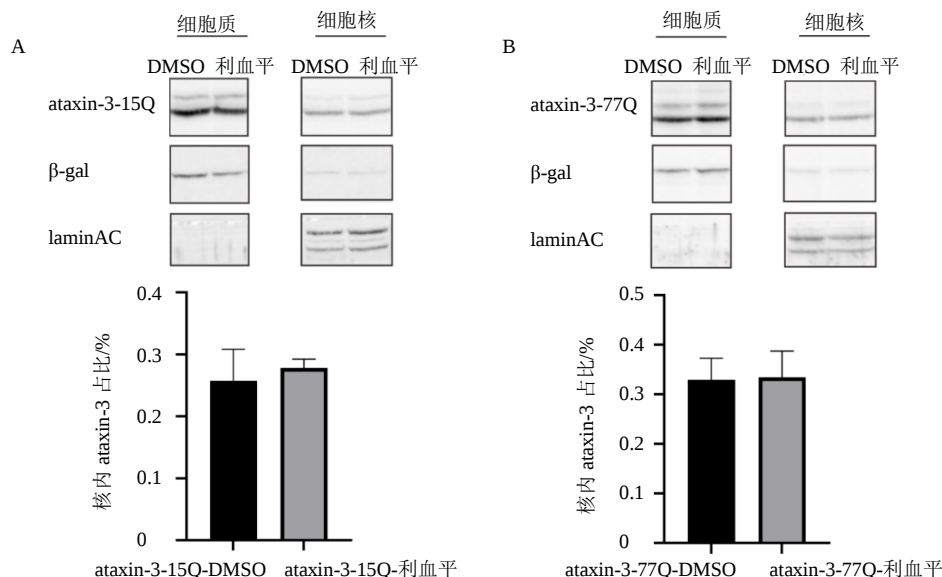


图1 Western blotting 实验探索利血平对野生型 (A) 和突变型 ataxin-3 (B) 核质转运的影响 ($n=3$)

Fig. 1 Effects of reserpine on translocation of wild-type (A) and mutant ataxin-3 (B) investigated by Western blotting ($n=3$)

DMSO 组相比, 利血平组对野生型和突变型 ataxin-3 的核质分布的影响差异均无统计学意义 (图 2)。通

过以上方法得出利血平对 SCA3 早期的病理变化 ataxin-3 核质转运没有显著影响。

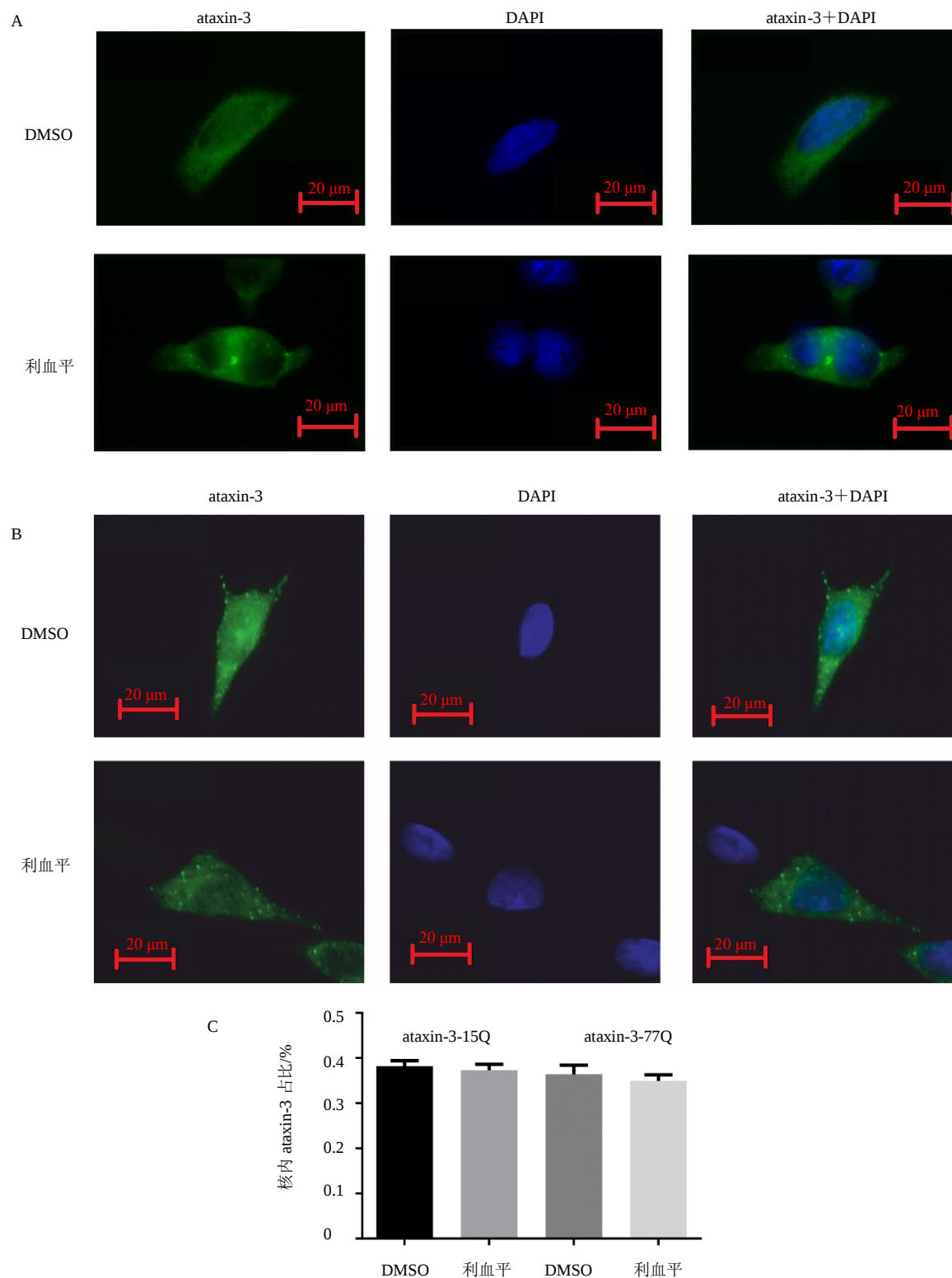


图 2 转染 ataxin-3-15Q (A) 或 ataxin-3-77Q (B) 的 CHO 细胞和 ataxin-3 在细胞核分布的百分比 (C)

Fig. 2 Percentage of the nuclear distribution of ataxin-3 (C) in CHO cells transfected with ataxin-3-15Q (A) or ataxin-3-77Q (B)

2.2 利血平对 ataxin-3 可溶性蛋白的影响

如图 3 所示, 利血平对野生型和突变型 ataxin-3

可溶性蛋白均没有影响, 说明利血平没有通过改变 ataxin-3 可溶性蛋白水平对 SCA3 致病过程产生影响。

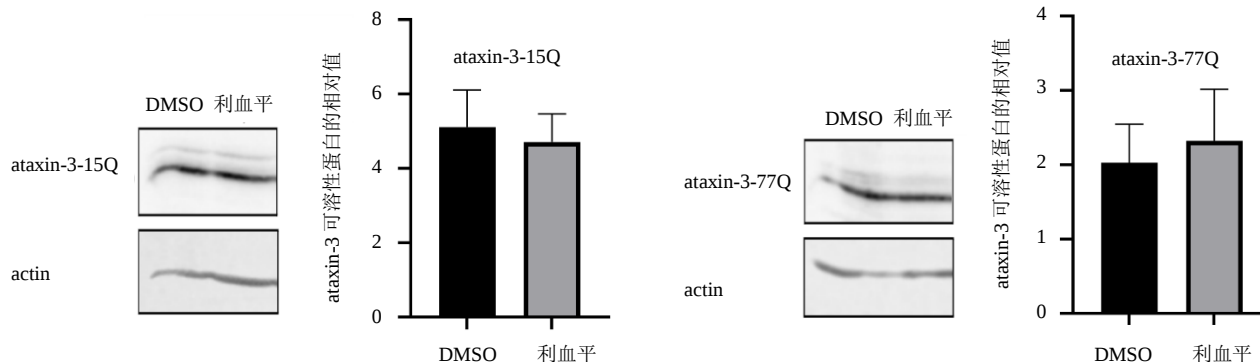


图 3 利血平对 ataxin-3 可溶性蛋白水平的影响 ($n=3$)

Fig. 3 Effect of reserpine on ataxin-3 soluble protein level ($n=3$)

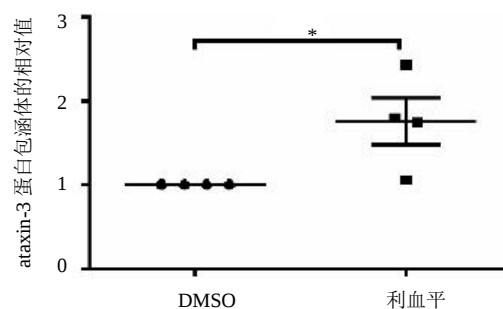
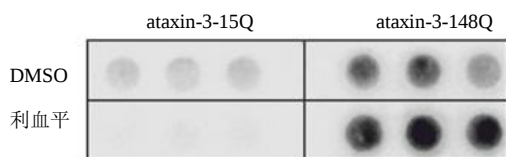
2.3 利血平对 ataxin-3 蛋白包涵体数量的影响

如图 4 所示, 在过表达野生型 ataxin-3 的细胞模型中, DMSO 组和利血平组均没有发现蛋白包涵体; 对于含异常扩展 ployQ 的突变 ataxin-3 在 DMSO 处理组和药物处理组均存在蛋白包涵体。而且, 与 DMSO 组相比, 利血平能够显著增加蛋白包涵体数量, 具有统计学意义 ($P<0.05$)。表明利血平能够

增加突变 ataxin-3 形成的蛋白包涵体数量。

2.4 利血平对 SCA3 细胞活性的作用

如图 5 所示, 与 DMSO 组相比, 利血平 ($100 \mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 时, 能够显著降低 SCA3 细胞的活性 ($P<0.01$)。但处理时间为 2 h, 利血平的毒性作用并不明显, 表明利血平长时间处理才会引起对细胞的毒性, 这和蛋白包涵体的结果相一致。

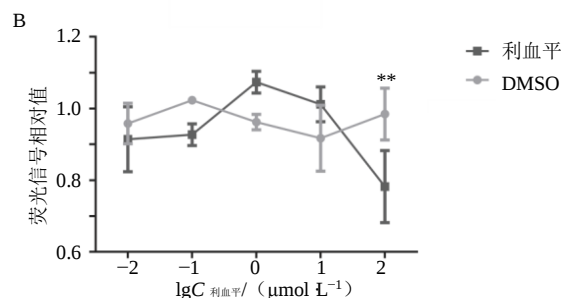
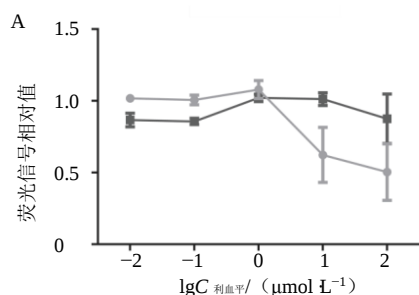


与 DMSO 组比较: $*P<0.05$

$*P < 0.05$ vs DMSO group

图 4 利血平对 ataxin-3 蛋白包涵体数量的影响 ($n=4$)

Fig. 4 Effect of reserpine on the aggregates formed by expanded ataxin-3 ($n=4$)



与 DMSO 组比较: $**P<0.01$

$**P < 0.01$ vs DMSO group

图 5 处理 2 h (A) 或 24 h (B) 利血平对 SCA3 细胞活性的作用 ($n=3$)

Fig. 5 Effect of reserpine on SCA3 cell viability after 2 h (A) or 24 h (B) ($n=3$)

3 讨论

利血平用于治疗高血压已经在临床应用很多年,通过阻断神经末梢内囊泡单胺转运体的形成,使突触前神经末梢产生的去甲肾上腺素等物质在未受保护的情况下被耗竭,缓解了应激损伤,对机体有保护作用。而且,利血平能够通过耗竭单胺类神经递质而改善亨廷顿舞蹈症的多动性运动障碍^[13]。但是,利血平的不良反应是会引起帕金森综合征和抑郁症。最新研究表明,利血平能够损伤自噬系统,并增加 α -synuclein蛋白聚集体^[11]。鉴于此,本研究通过分析利血平对 ataxin-3 核质转运、ataxin-3 可溶性蛋白水平以及蛋白包涵体的影响,进一步探究利血平对 SCA3 细胞活性的影响,阐明该药物对 SCA3 疾病的潜在作用。

研究表明,单给利血平对 PC12 细胞无毒性作用,但利血平与多巴胺共同作用后可明显增加多巴胺的毒性作用,从而诱发神经细胞的凋亡^[14]。另有研究表明,在秀丽隐杆线虫实验中,利血平在浓度为 60 $\mu\text{mol/L}$ 时会降低线虫的存活率^[15]。考虑到利血平的毒性作用,本研究采用小剂量(10 $\mu\text{mol/L}$)进行实验。在该浓度下,利血平虽然对 ataxin-3 核质转运和 ataxin-3 可溶性蛋白水平没有显著性影响,却增加了蛋白包涵体的形成,但是该浓度对细胞的活性影响不大。虽然 ataxin-3 核质转运是 SCA3 最早期的病理症状,入核后才会进一步诱发核内包涵体的形成,这是一个关键影响因素。但蛋白包涵体的形成是一个动态过程,还受到蛋白降解的影响。因此,利血平可能通过影响蛋白降解过程作用于蛋白包涵体的形成。另外,利血平是否通过已报道的自噬途径对 ataxin-3 蛋白包涵体产生作用,其具体分子机制可能需要阐明。本研究结果还发现,利血平在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时对 SCA3 细胞活性具有毒性,这种毒性可能是通过增加胞内包涵体的数量实现的,上述实验结果与文献报道结果部分一致^[16]。后续仍需要探索 10~100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度的利血平对细胞活性的影响。

另有一些研究表明,利血平作为多靶点药物,在阿尔茨海默症的小鼠模型和线虫模型中,能够减少 β 淀粉样蛋白沉积形成的老年斑,增加活动认知能力,但是在这些研究中并没有进行可靠的定量分析和科学的统计学分析,研究方法具有一定的局限性^[17-19]。重要的是,SCA3 疾病表现为认知行为丧失,由于脑中胆碱能神经元变性导致的血清素神经

传递减少是主要功能障碍,因此,利血平作为多巴胺系统的效应药物减少了血清素等神经递质对 SCA3 来说是不利的,而且利血平通过促进蛋白包涵体的形成而对 SCA3 细胞模型具有毒性作用,为老药新用提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hengel H, Martus P, Faber J, et al. Characterization of lifestyle in spinocerebellar ataxia type 3 and association with disease severity [J]. *Mov Disord*, 2022, 37(2): 405-410.
- [2] Leotti V B, de Vries J J, Oliveira C M, et al. CAG repeat size influences the progression rate of spinocerebellar ataxia type 3 [J]. *Ann Neurol*, 2021, 89(1): 66-73.
- [3] Schmidt T, Landwehrmeyer G B, Schmitt I, et al. An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients [J]. *Brain Pathol*, 1998, 8(4): 669-679.
- [4] Tait D, Riccio M, Sittler A, et al. Ataxin-3 is transported into the nucleus and associates with the nuclear matrix [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(6): 991-997.
- [5] 王子见, 李子恒, 常亦昆, 等. 核质转运异常与神经退行性疾病 [J]. *药学报*, 2021, 56(5): 1217-1228.
- [6] 黄丽萍, 余日跃, 李森, 等. 吴茱萸对利血平所致虚寒证大鼠肝脏能量代谢的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(3): 111-114.
- [7] 龚迪菲, 王冉冉, 袁天翊, 等. 复方利血平氨苯蝶啶片对离体胸主动脉血管环的舒张作用及机制研究 [J]. *药学报*, 2022, 57(11): 3339-3344.
- [8] 刘珊, 张雯, 王守宝, 等. 复方利血平氨苯蝶啶片降压作用机制的网络药理学分析及验证研究 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(10): 790.
- [9] Rijntjes M, Meyer P T. No free lunch with herbal preparations: Lessons from a case of Parkinsonism and depression due to herbal medicine containing reserpine [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 634.
- [10] Foudah A I, Alqarni M H, Alam A, et al. Rutin improves anxiety and reserpine-induced depression in rats [J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7313.
- [11] Li Y, Yin Q, Wang B, et al. Preclinical reserpine models recapitulating motor and non-motor features of Parkinson's disease: Roles of epigenetic upregulation of alpha-synuclein and autophagy impairment [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 944376.
- [12] Paleacu D. Tetrabenazine in the treatment of Huntington's disease [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2007, 3(5): 545-551.

- [13] Caroff S N. Risk of neuroleptic malignant syndrome with vesicular monoamine transporter inhibitors [J]. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 2020, 18(2): 322-326.
- [14] 董海蓉, 丁新生, 叶民. 利血平和多巴胺对大鼠嗜铬瘤细胞生长的影响 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2004, 24(1): 72-74.
- [15] Reckziegel P, Chen P, Caito S, *et al.* Extracellular dopamine and alterations on dopamine transporter are related to reserpine toxicity in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(3): 633-645.
- [16] Onselen R, Downing T G. Neonatal reserpine administration produces widespread neuronal losses and α -synuclein inclusions in a rat model [J]. *Neurotox Res*, 2021, 39(6): 1762-1770.
- [17] Saharia K, Arya U, Kumar R, *et al.* Reserpine modulates neurotransmitter release to extend lifespan and alleviate age-dependent A β proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Exp Gerontol*, 2012, 47(2): 188-197.
- [18] Saharia K, Kumar R, Gupta K, *et al.* A novel way of amelioration of amyloid beta induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Ann Neurosci*, 2016, 23(3): 149-154.
- [19] Kashyap P, Kalaiselvan V, Kumar R, *et al.* Ajmalicine and reserpine: Indole alkaloids as multi-target directed ligands towards factors implicated in Alzheimer's disease [J]. *Molecules*, 2020, 25(7): 1609.

[责任编辑 金玉洁]