

## 地骨皮甲素对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用

刘文武<sup>1,2</sup>, 宋琪<sup>1,2</sup>, 祖宇欣<sup>1,2</sup>, 蒋晓文<sup>1,2</sup>, 杨玥<sup>1,2</sup>, 高欢<sup>1</sup>, 赵庆春<sup>1,2\*</sup>

1. 中国人民解放军北部战区总医院 药学部, 辽宁 沈阳 110840

2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

**摘要:** 目的 考察地骨皮甲素(kukoamine A, KuA)对鱼藤酮诱导的PC12细胞损伤的保护作用并对其作用机制进行初步研究,为发现具有抗帕金森病的活性先导化合物提供依据。方法 通过体外建立鱼藤酮诱导的帕金森模型,运用MTT、LDH、Hoechst33342染色等方法对KuA体外抗鱼藤酮诱导的PC12细胞损伤进行初步确认。利用比色法和荧光染色分别考察KuA对超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)及活性氧(ROS)含量、线粒体膜电位(MMP)的影响。采用Western blotting探讨KuA体外抗鱼藤酮诱导PC12细胞损伤的作用机制。结果 0.5 μmol/L鱼藤酮可降低PC12细胞存活率,不同浓度KuA可减轻鱼藤酮诱导的PC12细胞损伤。与模型组相比,KuA可降低细胞内ROS及MDA含量,并提高SOD活性。此外,KuA可提高基质金属蛋白酶(MMP)水平,下调Bax/Bcl-2值、抑制细胞色素C释放以及下调Caspase-3、Caspase-9、α-synuclein的蛋白表达。结论 KuA对鱼藤酮诱导的PC12细胞帕金森病模型具有保护作用,其可能的机制与抑制ROS生成、保护MMP、调控线粒体凋亡途径相关蛋白表达和降低α-synuclein蛋白表达有关。

**关键词:** 地骨皮甲素; 鱼藤酮; PC12细胞; 帕金森病; 线粒体凋亡途径; 活性氧

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)24-6302-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.020

## Neuroprotective effects of kukoamine A against rotenone-induced neurotoxicity in PC12 cells

LIU Wen-wu<sup>1,2</sup>, SONG Qi<sup>1,2</sup>, ZU Yu-xin<sup>1,2</sup>, JIANG Xiao-wen<sup>1,2</sup>, YANG Yue<sup>1,2</sup>, GAO Huan<sup>1</sup>, ZHAO Qing-chun<sup>1,2</sup>

1. Department of Pharmacy, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110840, China

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

**Abstract: Objective** To investigate the neuroprotective effects of kukoamine A (KuA) on rotenone-induced PC12 cells damage and to preliminary verify its potential action mechanisms. The present study may lay the foundation for finding leading compounds with anti-Parkinson's disease (PD) effects. **Methods** A PD model induced by rotenone was established *in vitro*, and MTT, LDH, and Hoechst33342 staining were used for preliminary confirmation of KuA resistance to rotenone-induced PC12 cell injury *in vitro*. The effects of KuA on superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) content, and mitochondrial membrane potential (MMP) were investigated by colorimetric method and fluorescence staining, respectively. Western blotting was applied to explore the underlying mechanisms of protective effects of KuA against rotenone-induced PC12 cells damage. **Results** The PC12 cell viability was significantly decreased after exposure to 0.5 μmol/L rotenone, whereas pretreatment with different concentrations of KuA could attenuate the cell injury induced by rotenone. Compared with the rotenone-treated group, KuA could decrease the ROS production and MDA level, while increase the SOD activity. In addition, KuA could effectively increase the MMP, decrease the cytochrome c release and the Bax/Bcl-2 ratio as well as inhibit caspase-3, caspase-9, and α-synuclein protein expressions. **Conclusion** KuA showed neuroprotective ability on rotenone-induced PC12 cells PD model and the potential protective mechanisms of KuA can be related with inhibition of ROS generation, protection of MMP, regulation of protein expressions involved in the mitochondrial apoptosis pathway and reduction of α-synuclein expression.

**Key words:** kukoamine A; rotenone; PC12 cells; Parkinson's disease; mitochondrial apoptosis pathway; reactive oxygen

收稿日期: 2020-04-10

基金项目: 国家科技重大专项: 新概念武器损伤防治药物SZ516的研究(2014ZX09J14101-05C); 国家自然科学基金资助项目(81673328, 81973209)

作者简介: 刘文武, 男, 博士研究生, 从事天然药物化学研究。E-mail: sunny961010@163.com

\*通信作者 赵庆春, 男, 博士生导师, 研究方向为基于靶点的天然活性产物的发现及作用机制研究。

Tel: (024)28856205 E-mail: Zhaoqingchun1967@163.com

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种神经系统退行性疾病, 其特征是运动迟缓、震颤、僵硬和姿势平衡障碍<sup>[1]</sup>。在大多数情况下, PD 的具体病因仍不十分明确。但研究显示, 多数致病因素最终均和氧化应激、线粒体功能障碍、炎症反应、调节细胞凋亡级联反应等过程有关<sup>[2]</sup>。临床上针对 PD 的治疗, 主要利用多巴胺补充剂、多巴胺受体激动剂、单胺氧化酶抑制剂等进行治疗, 虽然可以改善患者生活质量, 但无法根治, 且长期服药, 给患者带来运动障碍等严重不良反应, 临床效果仍不理想。因此, 寻找新的有效的神经保护方法仍然是当前 PD 防治研究的热点和难点。地骨皮甲素 (kukoamine A, KuA) 是茄科植物地骨皮中的活性成分。研究表明 KuA 具有多种生物活性, 其可抑制淀粉样蛋白  $\beta$  和人胰岛淀粉样蛋白多肽的聚集<sup>[3]</sup>; 抑制谷胱甘肽还原酶活力的下降, 从而产生抗氧化应激作用<sup>[4]</sup>。另外, KuA 具有脂氧化酶抑制活性, 从而抑制生物膜的脂质过氧化而发挥抗炎作用<sup>[5]</sup>。而且 KuA 可通过诱导细胞凋亡和降低上皮间质转化而发挥抑制恶性胶质瘤生长和迁移的作用<sup>[6]</sup>。课题组前期发现 KuA 在细胞水平上具有良好的抗天门冬氨酸 (NMDA) 兴奋性损伤及抗  $H_2O_2$  氧化损伤的活性, 而且大鼠脑缺血模型进一步验证了 KuA 抗脑缺血过程与这两方面有关<sup>[7-8]</sup>。此外, 进一步研究表明 KuA 可以发挥良好的抗放射性损伤的作用<sup>[9-10]</sup>, 不仅如此, KuA 在体内外均可以激活细胞自噬途径而发挥良好的抗 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP<sup>+</sup>) / 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 诱导的 PD 作用<sup>[11]</sup>。为了进一步研究 KuA 治疗 PD 的作用机制, 本研究结合现代药理学实验技术, 对 KuA 抗鱼藤酮诱导的细胞损伤的体外机制进行研究, 为开发高效、低毒的防治 PD 的候选化合物提供一定的理论依据。

## 1 材料

### 1.1 试剂

KuA 购自成都普瑞法生物技术有限公司, 批号 BP0833, 质量分数 >98%。大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 (PC12) 细胞株由中国医科大学陆可教授实验室惠赠; DMEM 培养液 (美国 Hyclone 公司); EDTA (美国 Sino 公司); 四甲基偶氮唑盐 (MTT, 美国 Sigma 公司); 鱼藤酮 (美国 Sigma 公司); 乳酸脱氢酶 (LDH) 释放量检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); Hoechst 33342 荧光染料 (美国 Sigma 公司); 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD)

检测试剂盒活性氧 (ROS) 检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)、RIPA 裂解液、苯甲基磺酰氟 (PMSF, 100 X)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型)、蛋白标准 (5 mg/mL BSA)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 X)、Western blotting 一抗二抗去除液 (强碱性)、超敏 ECL 化学发光试剂盒, 均为碧云天生物技术研究产品;  $\beta$ -actin 抗体、synuclein 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); Bax、Bcl-2 抗体 (英国 Abcam 公司); 细胞色素 C 抗体 (中杉金桥公司); Caspase-3 抗体、Caspase-9 抗体 (万类生物科技有限公司)。

### 1.2 仪器

$CO_2$  培养箱 (日本三洋电气公司); 液氮生物容器 (成都金凤液氮容器有限公司); 水平层流洁净工作台 (上海上净净化设备有限公司); 倒置生物显微镜 (日本 Olympus 公司); 低/高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); 电子天平 (奥豪斯仪器有限公司); 酶标仪 (伯乐生命医学产品有限公司); 立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂); 数显恒温水浴锅 (金坛市双捷实验仪器厂); 鼓风干燥箱 (上海跃进医疗器械厂); UV120D 电子分析天平 (日本岛津公司); XK 96-3 型微量振荡器 (江苏新康医疗器械有限公司); 双垂直电泳仪、转印电泳仪、水平摇床 (北京六一仪器厂); pH 计 (德国 Sartorius 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将 PC12 细胞用含 5% 马血清和 5% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液, 在 37 °C、5%  $CO_2$  的细胞培养箱中培养, 每天观察细胞形态且 2 d 更换培养液 1 次。

### 2.2 鱼藤酮和 KuA 对 PC12 细胞存活率的影响

取对数生长期的 PC12 细胞, 以  $5 \times 10^3$  个/mL 密度接种于 96 孔板, 每孔接种 100  $\mu$ L, 在 37 °C、5%  $CO_2$  条件下培养 24 h。然后, 按给药组和空白组分别给予终浓度为 5、10、20、40、80、120  $\mu$ mol/L 的 KuA 溶液或 0.10、0.25、0.50、0.75、1.00、1.50  $\mu$ mol/L 鱼藤酮溶液及空白培养液各 50  $\mu$ L (共 150  $\mu$ L/孔) 继续培养 4 h。药物处理结束后, 每孔避光加入终质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 15  $\mu$ L, 在培养箱中孵育 4 h。孵育结束后, 弃去上清液, 每孔加入 150  $\mu$ L DMSO, 震荡 5 min 至蓝紫色结晶完全溶解后, 于酶标仪 490 nm 处测定吸光度 (A)。每组设 6 个复孔, 实验平行重复 3 次。

### 2.3 MTT 法检测 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞存活率的影响

取对数生长期的 PC12 细胞, 以  $5 \times 10^3$  个/mL 密度接种于 96 孔板, 每孔接种 100  $\mu\text{L}$ , 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h。然后按空白组、模型组给予空白培养液, KuA 组不同浓度的 KuA 溶液各 50  $\mu\text{L}$  继续培养 4 h。药物处理结束后, 模型组和 KuA 组加入终浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  的鱼藤酮溶液, 空白组加入空白培养液各 100  $\mu\text{L}$  至上述 96 孔板中, 继续培养 24 h。培养结束后每孔避光加入终质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 25  $\mu\text{L}$ , 在培养箱中孵育 4 h。孵育结束后, 弃去上清液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 震荡 5 min 至蓝紫色结晶完全溶解后于酶标仪 490 nm 处测定吸光度 (A)。每组设 6 个复孔, 实验平行重复 3 次。按照下述公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{校正}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{校正}})$$

### 2.4 LDH 释放量检测

取对数生长期的 PC12 细胞, 以  $5 \times 10^3$  个/mL 密度接种于 96 孔板, 每孔接种 100  $\mu\text{L}$ 。培养 24 h 后按空白组、模型组给予空白培养液, KuA 组给予不同浓度的 KuA 溶液各 50  $\mu\text{L}$  继续培养 4 h。药物处理结束后, 模型组和 KuA 组加入终浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  的鱼藤酮溶液, 空白组加入空白培养液各 100  $\mu\text{L}$  至上述 96 孔板中, 继续培养 24 h 后, 取上清液按照 LDH 试剂盒要求进行操作。反应结束后, 在酶标仪 450 nm 处测定 A。实验平行重复 3 次。按照下列公式计算 LDH 释放率。

$$\text{LDH 释放率} = \text{给药组 LDH 活力} / \text{空白组 LDH 活力}$$

### 2.5 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡

取对数生长期的 PC12 细胞, 以  $2.2 \times 10^5$  /孔的密度接种于 6 孔板, 每孔接种 2 mL。培养 24 h 后按空白组、模型组给予空白培养液, KuA 组给予不同浓度的 KuA 溶液各 1 mL 继续培养 4 h。药物处理结束后, 模型组和 KuA 组加入终浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  的鱼藤酮溶液, 空白组加入空白培养液各 1 mL, 培养 24 h。弃去上清液并用预冷 PBS 清洗 2 次, 加入 1 mL 用无血清培养液配制的 Hoechst 33342 染液 (终质量浓度 10  $\mu\text{g/mL}$ ), 培养箱中孵育 15 min。孵育结束后, 预冷 PBS 清洗 2 次。在荧光显微镜下观察并拍照。

### 2.6 ROS 的检测

细胞培养和药物处理方法同“2.5”项。然后弃去旧培养液, 加入用无血清培养液配制的终浓度为

10  $\mu\text{mol/L}$  DCFH-DA 储备液 1 mL/孔。在培养箱内孵育 20 min, 用无血清培养液洗涤 2 次, 在荧光显微镜下观察并拍照。

### 2.7 线粒体膜电位 (MMP) 的检测

细胞培养和药物处理方法同“2.5”项。细胞培养 24 h 后, 弃去旧培养液, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入 1 mL 新培养液, 并加入 1 mL 按比例配制的 JC-1 染色工作液 (1X), 在培养箱内孵育 20 min, 孵育结束后, 吸去上清液, 用 JC-1 染色缓冲液 (1X) 洗涤 2 次, 然后加入 2 mL 细胞培养液, 在荧光显微镜下观察并拍照。

### 2.8 SOD 活性和 MDA 含量检测

细胞培养和药物处理方法同“2.5”项。细胞培养 24 h 后, 收集细胞。用预冷的 PBS 清洗 2 次, 加入 50  $\mu\text{L}$  含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液裂解细胞 30 min。每 10 分钟涡旋 1 次以充分裂解。裂解结束后, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 12 000 r/min 离心 15 min。SOD 活性和 MDA 含量的测定参照检测试剂盒说明书进行操作, 实验重复 3 次。

### 2.9 Western blotting 法检测相关蛋白的表达

取对数生长期的 PC12 细胞, 以  $2.2 \times 10^5$  /孔的密度接种于 6 孔板中, 每组样品设 3 个复孔。细胞培养 24 h 后, 按“2.5”方法分组和给药。用预冷的 PBS 清洗 2 次。用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液裂解细胞 30 min。每 10 分钟震荡 1 次以充分裂解。裂解结束后, 离心 15 min, 保留上清液, 提取细胞总蛋白。BCA 法定量后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 之后将分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜, 封闭液室温封闭 2 h, 以封闭液配制一抗稀释液, 按 0.1 mL/cm<sup>2</sup> 敷于膜上, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日 TBST 洗膜后, 加入二抗稀释液, 室温孵育 1 h。按 1:1 比例混匀发光液, 将 PVDF 膜的蛋白面向下浸入发光液中, 反应 1~2 min。取出 PVDF 膜, 用保鲜膜包裹后, 蛋白面向上置于暗盒中, 上方放置 X 光底片, 暗室曝光, 取出底片显影、定影。采用 Image J 灰度分析软件进行定量分析, 实验重复 3 次。

### 2.10 数理统计

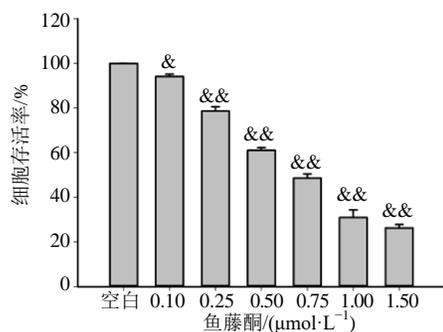
采用 SPSS 17.0 进行统计学分析, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA, Tukey's HSD-post hoc test)。

## 3 结果

### 3.1 鱼藤酮对 PC12 细胞存活率的影响

PC12 细胞培养 24 h 后, 分别给予 0.10、0.25、0.50、0.75、1.00、1.50  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮处理 4 h。结

果如图 1 所示, 鱼藤酮呈剂量相关性地抑制细胞存活率, 与空白组相比, 在 0.50、0.75  $\mu\text{mol/L}$  的浓度下, 细胞存活率分别为 (61.03 $\pm$ 1.25)%、(48.19 $\pm$ 1.76)%, 具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。一般选用致细胞损伤 50%~60% 的药物浓度作为最佳造模浓度, 因此, 选择 0.50  $\mu\text{mol/L}$  的浓度作为鱼藤酮诱导 PC12 细胞损伤的条件。



与空白组比较:  $\&P < 0.05$   $\&\&P < 0.01$ , 图 2 同  
 $\&P < 0.05$   $\&\&P < 0.01$  vs blank group, same as figure 2

图 1 鱼藤酮对 PC12 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of rotenone on survival rate of PC12 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.2 KuA 对 PC12 细胞存活率的影响

PC12 细胞培养 24 h 后, 分别给予 5、10、20、40、80、120  $\mu\text{mol/L}$  的 KuA 处理 4 h。结果如图 2 所示, 与空白组相比, 在 80、120  $\mu\text{mol/L}$  的浓度下, 细胞存活率分别为 (95.48 $\pm$ 1.54)% ( $P < 0.05$ )、(93.72 $\pm$ 0.83)% ( $P < 0.01$ ), 提示地骨皮甲素的浓度高于 80  $\mu\text{mol/L}$  时本身会对细胞造成损伤, 而低浓度对细胞存活率没有影响。因此, 选择 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  作为后续实验浓度。

### 3.3 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞存活率的影响

结果如图 3 所示, MTT 实验结果表明, KuA

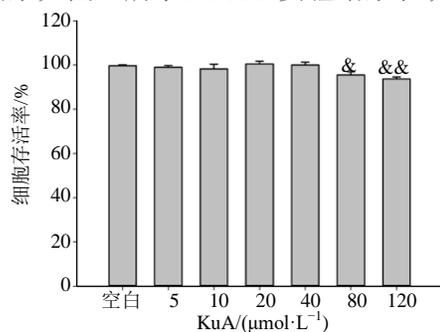
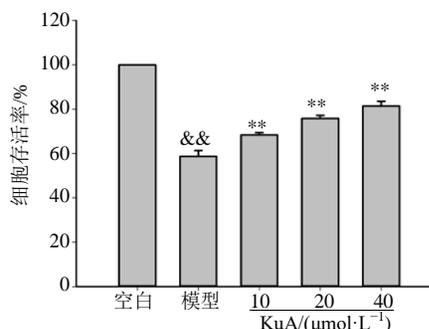


图 2 KuA 对 PC12 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of KuA on survival rate of PC12 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



与空白组比较:  $\&\&P < 0.01$ ; 与模型组比较:  $**P < 0.01$ , 图 4、9~11 同

$\&\&P < 0.01$  vs blank group,  $**P < 0.01$  vs model group, same as figures 4, and 9~11

图 3 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of KuA on survival rate of PC12 cells induced by rotenone ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤均表现出不同程度的保护作用。与模型组相比, 在 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  的浓度下, 细胞存活率显著提高, 分别为 (68.47 $\pm$ 1.01)%、(75.93 $\pm$ 1.33)%、(81.46 $\pm$ 2.15)%, 呈现剂量相关性 ( $P < 0.05$ )。表明 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞存活存在一定的保护作用。

### 3.4 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞 LDH 释放率的影响

如图 4 所示, 与空白组相比, 0.5  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮处理细胞 24 h 后, LDH 释放率增加至 (314.03 $\pm$ 6.54)%, 而预先给予 KuA (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞 4 h, LDH 释放率显著降低 ( $P < 0.01$ )。

### 3.5 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞形态的影响

为了进一步验证 KuA 抗鱼藤酮诱导神经细胞损伤的作用, 镜下形态观察和 Hoechst33344 荧光染

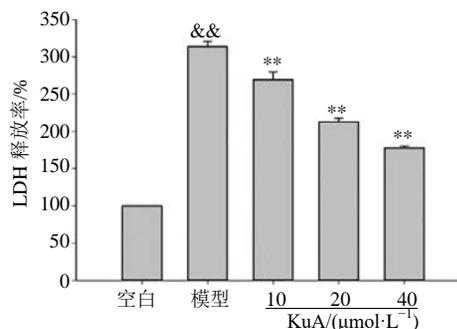


图 4 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞 LDH 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of KuA on LDH release of PC12 cells induced by rotenone ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

色考察 KuA 的神经细胞保护作用。如图 5-A 所示, 空白组 PC12 细胞具有良好的细胞形态, 细胞膜完整, 给予鱼藤酮 (0.5  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) 刺激后, 会出现凋亡的典型特征包括染色质凝、结核的收缩和凋亡小体。预先给予不同浓度的 KuA (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 4 h 可以有效减轻凋亡的发生。如图 5-B 所示, 与空白组相比, 单独给予鱼藤酮时 PC12 细胞蓝色荧光强度增加, 细胞核出现皱缩。而预先给予不同浓度的 KuA, 固缩形态和颗粒状荧光显著减少, 且具有剂量依赖性。表明 KuA 可以有效抑制鱼藤酮诱导的 PC12 细胞凋亡的发生。

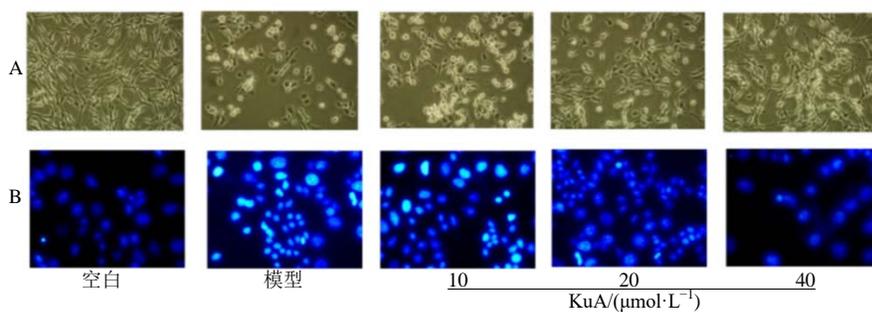
### 3.6 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞 MMP 的影响

鱼藤酮是特异性线粒体呼吸链复合体酶 I 抑制剂, 在鱼藤酮诱导的毒性损伤机制中, 线粒体的凋亡途径起到重要作用。线粒体膜电位的下降是细胞凋亡

早期的标志之一。进一步考察 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞 MMP 的影响。通过 JC-1 的红与绿荧光的比值, 判断 MMP 的变化。如图 6 所示, 与空白组相比, 给予鱼藤酮处理, 细胞的红色显著减少, MMP 显著下降。与模型组相比, 预先给予不同剂量 (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 的 KuA 处理以后, 细胞的红色显著增多, MMP 显著上升。表明 KuA 显著抑制鱼藤酮诱导的 PC12 细胞的早期凋亡而起到保护作用。

### 3.7 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞内 ROS 含量的影响

为了考察 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞内 ROS 变化, 应用荧光染料 DCFH-DA, 通过荧光显微镜拍照确定 KuA 对 ROS 产生的影响。结果如图 7 所示, 与空白组相比, 模型组细胞 DCF 荧光强度显著增加, 预先给予 KuA (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞, DCF 荧光强度即 ROS 含量显著降低。



A-镜下形态观察 B-Hoechst 33342 荧光染色实验

A-morphological observation under microscope B-Hoechst 33342 fluorescence staining experiment

图 5 KuA 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞形态学变化的影响

Fig. 5 Effect of KuA on morphological changes of PC12 cells induced by rotenone

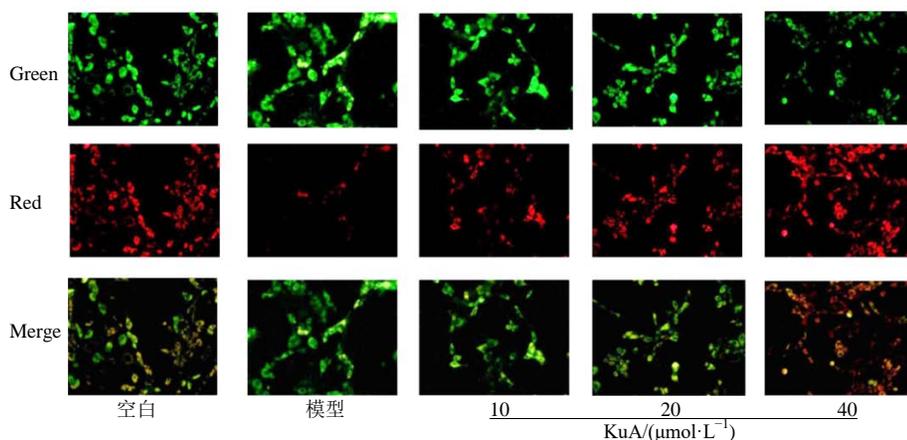


图 6 KuA 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞 MMP 的影响

Fig. 6 Effect of KuA on MMP in PC12 cells induced by rotenone

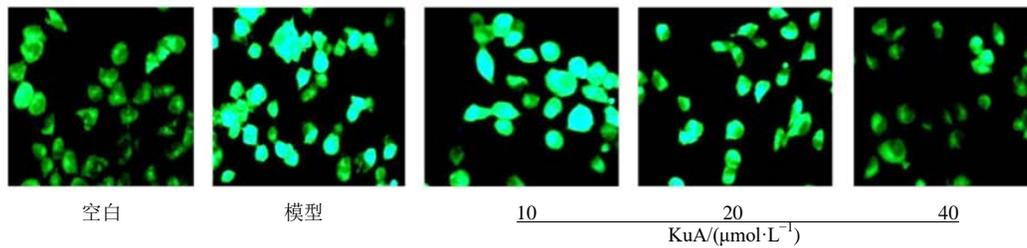


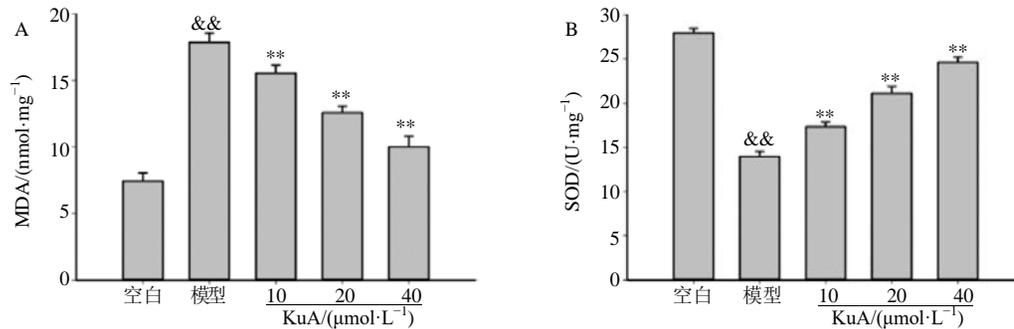
图 7 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞内 ROS 含量的影响

Fig. 7 Effect of KuA on ROS content in PC12 cells induced by rotenone

### 3.8 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞 MDA 含量和 SOD 活性的影响

TBD 法检测细胞内 MDA 含量。结果如图 8-A 所示，与空白组相比，模型组 MDA 含量升高 ( $P < 0.01$ )。而预先给予不同浓度 (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) KuA 可以显著降低 MDA 含量 ( $P <$

0.01)。采用 NBT 检测 SOD 活性。结果如图 8-B 所示，与空白组相比，模型组 SOD 活性显著下降 ( $P < 0.01$ )，预先给予不同浓度 (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) KuA 时可以显著提高 SOD 活性 ( $P < 0.01$ )。结果表明，KuA 可以逆转由鱼藤酮造成的 SOD 活性降低。



与空白组比较: && $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$

&& $P < 0.01$  vs blank group; \*\* $P < 0.01$  vs model group

图 8 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞 MDA 水平 (A) 和 SOD 活性 (B) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Effects of KuA on MDA level (A) and SOD activity (B) in PC12 cells induced by rotenone ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.9 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞 Bax 和 Bcl-2 表达的影响

Bax 和 Bcl-2 是细胞内与凋亡密切相关的蛋白。发生凋亡时，促凋亡蛋白 Bax 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量的比例增加。如图 9 所示，与空白组相比，模型组 Bax/Bcl-2 显著增加 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比，预先给予 KuA (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞 4 h 后 Bax/Bcl-2 值显著下降 ( $P < 0.01$ )。

### 3.10 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的细胞色素 C 释放量和 Caspase-3、Caspase-9 表达的影响

促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的比例决定了细胞色素 C 是否从线粒体中释放，释放到胞质的细胞色素 C 可激活 Caspase-9，进而激活 Caspase-3 导致细胞凋亡。结果如图 10 所示，与空白组相比，模型组细胞色素 C 释放量和 Caspase-3 表达显著增

加 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比，预先给予 KuA (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞，细胞色素 C 释放量和 Caspase-3、Caspase-9 表达显著下降 ( $P < 0.01$ )。

### 3.11 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞 $\alpha$ -synuclein 表达的影响

$\alpha$ -Synuclein 蛋白是一种神经元特异性突触前膜蛋白，也是 Lewy 小体的重要组成成分，其在体内异常增多并聚集被认为与多巴胺能神经元的变性、缺失密切相关。为考察 KuA 抗鱼藤酮诱导的毒性是否对  $\alpha$ -synuclein 的表达产生影响，本实验对在鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞中  $\alpha$ -synuclein 的水平进行了检测。如图 11 所示，与空白组相比，模型组细胞  $\alpha$ -synuclein 水平明显升高 ( $P < 0.01$ )，而预先给予 KuA (10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞， $\alpha$ -synuclein 蛋白水平呈剂量依赖性下降 ( $P < 0.01$ )。

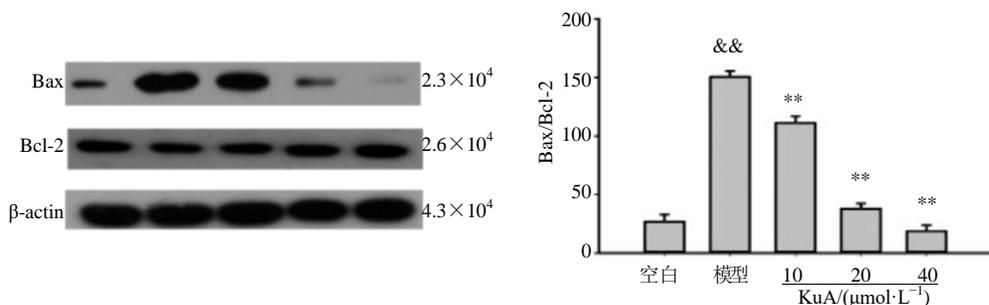


图 9 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞 Bax 和 Bcl-2 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 9 Effect of KuA on Bax and Bcl-2 expression in PC12 cells induced by rotenone ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

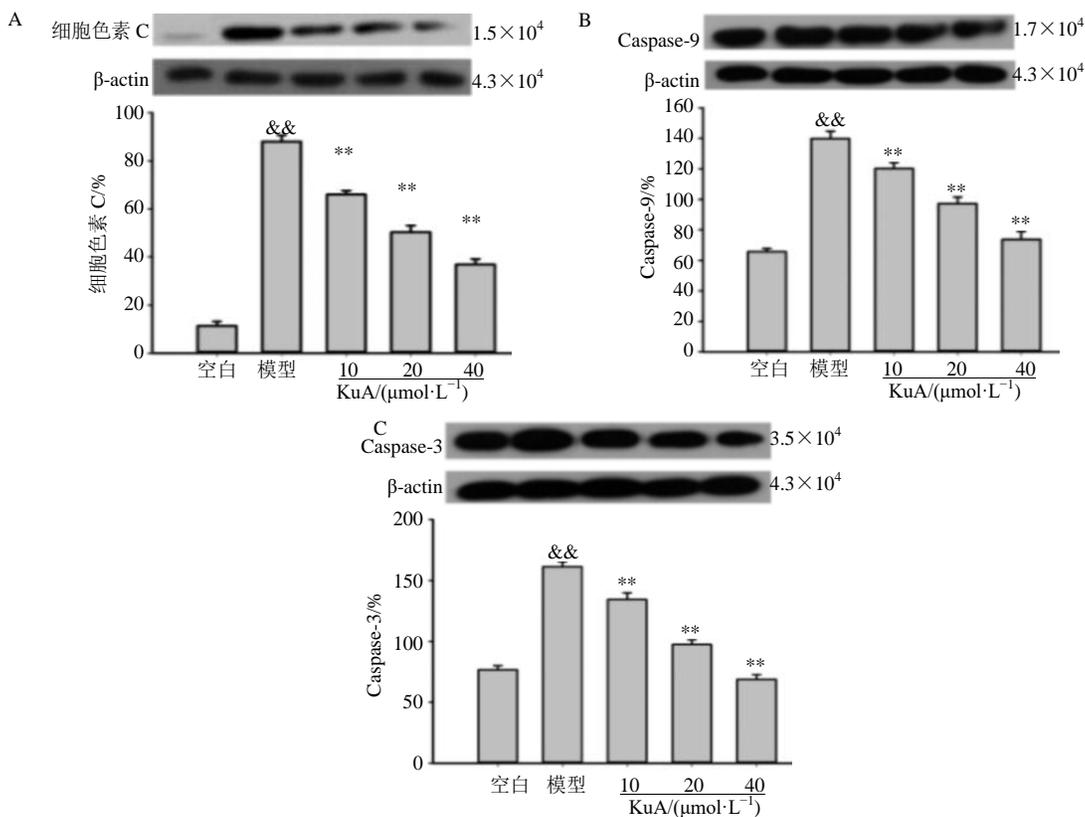


图 10 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞色素 C 释放量 (A) 和 Caspase-9 (B)、Caspase-3 (C) 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Effects of KuA on cytochrome C release (A), expression of Caspase-9 (B), and Caspase-3 (C) in PC12 induced by rotenone ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

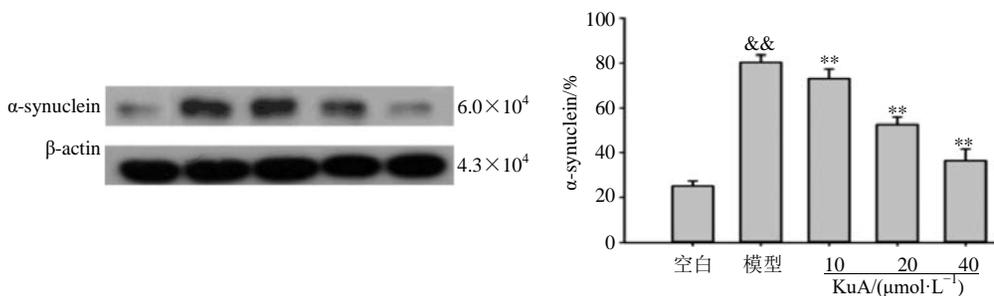


图 11 KuA 对鱼藤酮诱导损伤的 PC12 细胞  $\alpha$ -synuclein 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 11 Effect of KuA on expression of  $\alpha$ -synuclein in PC12 induced by rotenone ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

PD 的发病机制复杂,其中线粒体功能紊乱、氧化应激和  $\alpha$ -synuclein 在 PD 发病和进展过程中扮演着重要的角色<sup>[12]</sup>。鱼藤酮为线粒体复合酶 I 抑制剂,可以诱导机体发生 PD 样症状,因此科研中常应用鱼藤酮模拟 PD 的发病过程<sup>[13]</sup>。本研究主要从鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤入手,运用现代药理学方法,探讨 KuA 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用以及相关作用机制。KuA 可以减轻鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤并减少 LDH 释放量,证实 KuA 具有较好的抗鱼藤酮诱导的毒性作用。在细胞发生凋亡的过程中,细胞色素 C 的释放可以激活 Caspase-9,活化的 Caspase-9 继而活化 Caspase-3,这些活化的 Caspase 可以导致一系列凋亡相关的生化改变和形态特征的出现,促进细胞凋亡。与此同时,线粒体功能紊乱还会导致线粒体产生大量 ROS,形成氧化损伤的“恶性循环”<sup>[14]</sup>。KuA 可以提高 SOD 活性及降低细胞内 MDA 及 ROS 含量,说明 KuA 的抗鱼藤酮的毒性作用与清除 ROS 相关。Hoechst33342 和 JC-1 染色结果显示, KuA 可以显著抑制 PC12 细胞凋亡的发生,同时可以显著提高 MMP 水平。Western blotting 检测结果显示, KuA 可以升高 Bcl-2/Bax 值、减少细胞色素 C 释放量、降低 Caspase-9 和 Caspase-3 凋亡蛋白的表达。 $\alpha$ -synuclein 作为路易小体的主要成分,近年来研究表明,当给予线粒体电子传递链抑制剂,能引起  $\alpha$ -synuclein 的异常沉积<sup>[15]</sup>。同时  $\alpha$ -synuclein 表达增多造成细胞内环境氧化应激,加重细胞凋亡。本研究结果表明, KuA 可以显著降低  $\alpha$ -synuclein 的蛋白表达水平,从而发挥抗鱼藤酮诱导细胞损伤的保护作用。该结果提示, KuA 的抗鱼藤酮毒性作用机制可能与抑制线粒体凋亡通路以及降低  $\alpha$ -synuclein 蛋白表达相关。本研究发现 KuA 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤具有保护作用,为阐明 KuA 抗鱼藤酮诱导的细胞损伤作用机制奠定基础,为开发具有抗 PD 作用的先导化合物提供理论和实践依据。

#### 参考文献

[1] Dickson, Dennis W. Neuropathology of Parkinson disease [J]. *Parkinson Relat Disord*, 2017, 46(Suppl 1): S30-S33.  
 [2] Riederer P, Lange K W. Pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Curr Opin Neurol Neurosurg*, 2013, 28(1): 24-30.  
 [3] Jiang G, Takase M, Aihara Y, et al. Inhibitory activities of

kukoamines A and B from *Lycii Cortex* on amyloid aggregation related to Alzheimer's disease and type 2 diabetes [J]. *J Nat Med*, 2020, 74(1): 247-251.

- [4] Ponasik J A, Strickland C, Faerman C, et al. Kukoamine A and other hydrophobic acylpolyamines: Potent and selective inhibitors of *Crithidia fasciculata* trypanothione reductase [J]. *Biochem J*, 1995, 311(2): 371-375.  
 [5] Hadjipavlou-Litina D, Garnelis T, Athanassopoulos C M, et al. Kukoamine A analogs with lipoxygenase inhibitory activity [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2009, 24(5): 1188-1193.  
 [6] Wang Q, Li H, Sun Z, et al. Kukoamine A inhibits human glioblastoma cell growth and migration through apoptosis induction and epithelial-mesenchymal transition attenuation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 36543-36556.  
 [7] Hu X L, Gao L Y, Niu Y X, et al. Neuroprotection by kukoamine A against oxidative stress may involve N-methyl-D-aspartate receptors [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850(2): 287-298.  
 [8] Liu J, Jiang X, Zhang Q, et al. Neuroprotective effects of kukoamine A against cerebral ischemia via antioxidant and inactivation of apoptosis pathway [J]. *Neurochem Int*, 2017, 107: 191-197.  
 [9] Zhang Y, Gao L, Cheng Z, et al. Kukoamine A prevents radiation-induced neuroinflammation and preserves hippocampal neurogenesis in rats by inhibiting activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 [J]. *Neurotox Res*, 2016, 31(2): 1-10.  
 [10] Zhang Y, Cheng Z, Wang C, et al. Neuroprotective effects of kukoamine a against radiation-induced rat brain injury through inhibition of oxidative stress and neuronal apoptosis [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(10): 2549-2558.  
 [11] Hu X L, Song Q, Li X, et al. Neuroprotective effects of kukoamine A on neurotoxin-induced Parkinson's model through apoptosis inhibition and autophagy enhancement [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 117: 352-363.  
 [12] Buhidma Y, Rukavina K, Chaudhuri K R, et al. Potential of animal models for advancing the understanding and treatment of pain in Parkinson's disease [J]. *NPJ Parkinson's Dis*, 2020, 6(1): 1-7.  
 [13] Elmazoglu Z, Yar Saglam A S, Sonmez C, et al. Luteolin protects microglia against rotenone-induced toxicity in a hormetic manner through targeting oxidative stress response, genes associated with Parkinson's disease and inflammatory pathways [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2020, 43(1): 96-103.  
 [14] Kuroda J, Ago T, Matsushima S, P, et al. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2010, 107(35): 15565-15570.  
 [15] Sun Y, Zhang G, Xu J, et al. Effect of rifampicin pre- and post-treatment on rotenone-induced dopaminergic neuronal apoptosis and alpha-synuclein expression [J]. *Neural Regen Res*, 2010, 5(2): 85-91.