

1.2.1 细胞培养 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青链霉素混合液和 1% L-谷氨酰胺的 DMEM 高糖培养液,选取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 实验分组及加药 根据前期实验结果,各组药物作用时间为 48 h。实验分为 5 组,空白对照组:加入无血清培养基进行培养;MPP+处理的模型组;SchA 组:SchA 与 MPP+共同处理细胞,其中 SchA 终浓度分别为 1、3、5 μmol/L,MPP+终浓度为 1 mmol/L,每组重复 4 次。

1.2.3 NO 的检测 待细胞长至培养瓶底面积 70%之后按照 1.2.2 方法进行实验分组及加药。48 h 后,各孔细胞 PBS 洗 3 遍,加入 20 μL PBS,细胞刮刀刮取细胞置于 0.5 mL EP 管中,插入冰中。超声破碎细胞,离心取上清液,按照 NO 检测试剂盒说明书进行细胞中 NO 检测操作。

1.2.4 Western blot 检测 β-actin、总 Akt 蛋白及其 p-Akt 蛋白表达水平 接种细胞至 10 cm 平皿进行培养,至细胞长至培养瓶底面积 70%之后按照 1.2.2 方法进行实验分组及加药。48 h 后,洗涤细胞,加入含苯甲基磺酰氨(PMSF)的 RIPA 裂解液,刮取细胞置于 1.5 mL EP 管中,标记;超声破碎细胞,离心取上清,用 BCA 法进行蛋白定量。上样缓冲液标化各组浓度,95 ℃水浴 5 min。每泳道加总蛋白 45 μg 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳后转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,脱脂牛奶室温封闭 2 h 后分别加入一抗(β-actin、Akt、p-Akt 抗体,1:1 000)4 ℃过夜,洗膜后加入相应二抗(辣根过氧化物酶标记的二抗,1:2 000),室温缓摇 1 h。TBST 洗 3 次,ECL 发光,显影、定影。胶片经照相后采用美国 Image J 软件分析 Western blot 条带,以目的条带总 Akt、p-Akt 与内参条带 β-actin 的灰度值比值分别表示总 Akt 和 p-Akt 表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行统计处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本均数之间的比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SchA 对 MPP+处理的 SH-SY5Y 细胞 NO 含量的影响 1 mmol/L MPP+诱导后,SH-SY5Y 细胞 NO 含量明显增高(*P* < 0.05)。而经 SchA 共同处理后,NO 的含量降低,作用呈浓度依赖性,5 μmol/L SchA 组与模型组比较差异有统计学意义,见表 1。

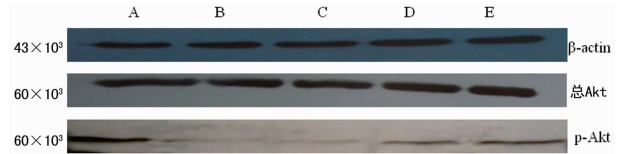
表 1 SchA 对 MPP+处理的 SH-SY5Y 细胞 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	细胞 NO 含量(μmol/L)
空白对照组	0.229 3 ± 0.153 9
模型组	0.599 5 ± 0.186 4 ^a
1 μmol/L SchA 组	0.509 3 ± 0.237 4
3 μmol/L SchA 组	0.426 4 ± 0.218 4
5 μmol/L SchA 组	0.373 9 ± 0.282 6 ^b

^a: *P* < 0.05,与空白对照组比较;^b: *P* < 0.05,与模型组比较。

2.2 SchA 对 MPP+处理的 SH-SY5Y 细胞总 Akt、p-Akt 蛋

白表达水平的影响 Western blotting 检测结果显示各个组别总 Akt 相对表达水平没有明显变化,见表 2;与空白对照组相比模型组 p-Akt 相对表达水平显著减小(*P* < 0.05),与模型组比较,SchA 各浓度组的 p-Akt 蛋白相对表达水平随浓度 SchA 的升高而升高,且差异有统计学意义(*P* < 0.05),图 1。



A: 空白对照组; B: 模型组; C: 1 mmol/L SchA 组; D: 3 mmol/L SchA 组; E: 5 mmol/L SchA 组。

图 1 SchA 对 MPP+诱导的 SH-SY5Y 细胞总 Akt 及 p-Akt 蛋白表达

表 2 SchA 对 MPP+处理的 SH-SY5Y 细胞总 Akt、p-Akt 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	总 Akt	p-Akt
空白对照组	0.958 ± 0.116	1.414 ± 0.092
模型组	0.955 ± 0.145	0.640 ± 0.084 ^a
1 μmol/L SchA 组	0.961 ± 0.128	0.654 ± 0.124 ^{ab}
3 μmol/L SchA 组	0.961 ± 0.083	0.688 ± 0.154 ^{ab}
5 μmol/L SchA 组	0.954 ± 0.131	0.766 ± 0.115 ^{ab}

^a: *P* < 0.05,与空白对照组比较;^b: *P* < 0.05,与模型组比较。

3 讨 论

NO 是一种普遍存在的信号分子和扩散性神经递质,涉及许多生理和病理过程^[5]。在中枢神经系统中 NO 调节神经细胞的增生、分化和生存,参与神经递质释放、神经元兴奋性,增强记忆和学习功能。但过量的 NO 表现出神经毒性,可引起细胞损伤。研究表明,在 PD 中产生过量的 NO^[6-7],会使多巴胺能神经元损伤增加。PD 发生过程中黑质多巴胺(DA)能神经元特异性变性的确切病因还不太清楚,但目前认为年龄老化、环境、遗传、氧化应激及自由基生成、兴奋性氨基酸毒性、线粒体功能障碍、外源性神经毒素等均可引起 DA 神经元的变性和死亡。而 NO 通路是参于这些机制的重要组成部分并且能通过许多机制导致多巴胺神经细胞的凋亡和死亡^[8-9]。本研究选择 MPP+作为干预药物建立 PD 细胞模型,MPP+处理的 SH-SY5Y 细胞中 NO 含量与空白对照组相比明显升高,与以上的研究结果一致。而经 SchA 与 MPP+共同处理后,NO 的含量降低,作用呈浓度依赖性,5 μmol/L SchA 组较模型组差异有统计学意义。实验结果及先期研究结果提示,在一定范围内 SchA 以浓度依赖方式对 MPP+诱导的 SH-SY5Y 细胞发挥保护作用,可能与抑制 NO 的生成有关。

Akt 又称蛋白激酶 B(protein kinase B,PKB)为原癌基因 c-Akt 表达编码的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是传递 PI3K 信号的核心。Akt 通过 PH 结构域与活化的 PI3K 激活产物相结合,自身发生磷酸化而被激活,调控下游靶基因 Bad、Caspase-9、NF-κB、Forkhead、mTOR、Par-4、P21 等,参与细胞的增殖、分化、凋亡。研究显示在 PD 患者的脑中黑质致密部 Akt 和 p-Akt 减少^[10]。在关于 PD 的多项研究中,Akt 活化发

挥神经保护作用。Timmons 等^[11]研究发现咖啡因使 6-羟基多巴胺(6-OHDA)诱导的人类多巴胺神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞模型 Akt 显著磷酸化,具有减轻神经毒素的作用,且这种作用可以被 P13K 抑制剂 LY294002 所抑制。丙炔苯丙胺可能通过激活 Akt 磷酸化,引起 Nrf2 核转位,最终发挥对 MPP+ 诱导的 PC12 细胞的保护作用^[12]。雷沙吉兰在啮齿类 MPTP 模型中通过激活 Akt,对 6-OHDA 诱导的细胞死亡有保护作用^[13]。红景天甙在 PD 小鼠模型中能使 P13K/Akt 信号转导途径中 Akt 在 ser473 位点以及 GSK-3 β 在 ser 9 位点的磷酸化程度增高,发挥神经保护作用^[14-15]。在本研究中,SchA 明显提高 MPP+ 诱导的 SH-SY5Y 细胞的 p-Akt 表达水平,提示 SchA 可能通过影响 PI3/Akt 通路来发挥神经细胞的保护作用。

综上所述,SchA 缓解 MPP+ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤与 NO 生产量及 p-AKT 蛋白表达改变有关。但 NO 的进一步影响机制及 Akt 信号转导途径下游参与调控凋亡和增殖的分子还需进一步明确。

参考文献:

- [1] Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, et al. Epidemiology of parkinson's disease[J]. *J Neurol*, 2008, 255(5): 18-32.
- [2] Lin S, Fujii M, Hou DX. Molecular mechanism of apoptosis induced by schizandrae-derived lignans in human leukemia HL-60 cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(2): 590-597.
- [3] 侯微, 魏忠宝, 高薇, 等. 五味子甲素·乙素及丙素对 HaCat 细胞氧化损伤的保护作用研究[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(3): 1047-1049.
- [4] 秦小清, 梁宇光, 高洪志, 等. 五味子甲素对 K562/ADR、HL60/ADR、MCF-7/ADR 多药耐药逆转机制的研究[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(3): 329-334.
- [5] Kavya R, Saluja R, Singh S, et al. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease[J]. *Nitric Oxide*, 2006, 15(4): 280-294.
- [6] Bashkatova V, Alam M, Vanin A, et al. Chronic adminis-

tration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain[J]. *Exp Neurol*, 2004, 186(2): 235-241.

- [7] 安丽凤, 刘树民, 董杨, 等. MPP+ 诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的实验研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2010, 37(11): 2243-2245.
- [8] Takata MK, Yamaguchi F, Nakanose K, et al. Neuroprotective effect of D-psicose on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells[J]. *J Biosci Bioeng*, 2005, 100(5): 511-516.
- [9] Zhang L, Dawson VL, Dawson TM. Role of nitric oxide in Parkinson's disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 109(1/2): 33-41.
- [10] Rose S, Mackenzie GM, Jenner P et al. Nitric oxide and basal ganglia degeneration[J]. *Adv Neurol*, 1999(80): 247-254.
- [11] Timmons S, Coakley MF, Moloney AM, et al. Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Neurosci Lett*, 2009, 467(1): 30-35.
- [12] Nakaso K, Ito S, Nakashima K. Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 432(2): 146-150.
- [13] 肖海兵. 丙炔苯丙胺对 MPP+ 诱导的帕金森病 PC12 细胞模型的保护机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [14] Sagi Y, Mandel S, Amit T, et al. Activation of tyrosine kinase receptor signaling pathway by rasagiline facilitates neurorescue and restoration of nigrostriatal dopamine neurons in post-MPTP-induced parkinsonism[J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 25(1): 35-44.
- [15] 张宇红, 叶民, 汪锡金, 等. 红景天甙对帕金森病模型小鼠 PI3K/蛋白激酶 B 信号转导途径的影响[J]. *临床神经病学杂志*, 2008, 21(2): 133-135.

(收稿日期: 2014-06-08 修回日期: 2014-07-14)

(上接第 3931 页)

重庆医学, 2013, 42(4): 361-362.

- [13] Ozbek E, Ilbey YO, Simsek A, et al. Rosiglitazone, peroxisome proliferator receptor-gamma agonist, ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats[J]. *Int Urol Nephrol*, 2010, 42(3): 579-587.
- [14] Gao C, Huan J, Li W, et al. Protective effects of ulinastatin on pancreatic and renal damage in rats following early scald injury[J]. *Burns*, 2009, 35(4): 547-552.
- [15] Cekmen M, Otunctemur A, Ozbek E, et al. Pomegranate extract attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats by reducing oxidative stress[J]. *Ren Fail*, 2013, 35(2): 268-274.
- [16] Karkar A. Modulation of renal inflammation: therapeutic strategies[J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2008, 19(1): 1-

19.

- [17] Bae EH, Kim IJ, Joo SY, et al. Renoprotective effects of sildenafil in POCA-salt hypertensive rats[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2012, 36(1): 248-257.
- [18] Cao YZ, Tu YY, Chen X, et al. Protective effect of Ulinastatin against murine models of sepsis: inhibition of TNF- α and IL-6 and augmentation of IL-10 and IL-13[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2012, 64(6): 543-547.
- [19] Tanaka R, Fujita M, Tsuruta R, et al. Urinary trypsin inhibitor suppresses excessive Generation of superoxide anion radical, systemic inflammation, oxidative stress, and endothelial injury in endotoxemic rats[J]. *Inflamm Res*, 2010, 59(8): 597-606.

(收稿日期: 2014-05-08 修回日期: 2014-06-12)