

长春西汀对帕金森病细胞模型保护作用的研究

郑伟锋¹, 黄际薇¹, 刘珠英¹, 徐乐加¹, 许良葵², 黄海潮^{2*} (1.中山大学附属第三医院药学部, 广州 510630; 2.广东食品药品职业学院实验实训中心, 广州 510520)

摘要: 目的 研究长春西汀对帕金森病细胞模型的保护作用和机制。方法 以 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-羟基多巴胺损伤 SH-SY5Y 细胞构建帕金森病模型, 分为模型组和给药组, 给药组在模型组的基础上分别加入不同浓度的长春西汀孵育 24 h, 另设空白组仅加入维生素 C 平行操作。以 CCK-8 法检测细胞存活率摸索长春西汀的有效浓度, 流式细胞法检测细胞的凋亡率, Hoechst 33258 染色观察细胞的凋亡状况, 比色法检测过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量, ELISA 法检测白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症因子的含量。Western blotting 检测 *N*-甲基-D-天冬氨酸受体 1(*N*-methyl-D-aspartate receptor 1, NMDAR1), α -突触核蛋白, cleaved caspase-9 的表达量。结果 与模型组相比, 给药组细胞随着长春西汀浓度的增加, 存活率逐渐上升而凋亡率随之下降且可观察到的凋亡小体数量逐渐减少, 细胞中 CAT、SOD 含量随药物浓度增加而递增, MDA 生成量则相应降低, IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量随药物浓度增加而递减($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Western blotting 结果表明, 与模型组相比, 给药组细胞的 NMDAR1、cleaved caspase-9 的含量均降低而 α -突触核蛋白的表达量显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 长春西汀可通过下调 NMDAR1 和上调 α -突触核蛋白的表达, 抑制 caspase-9 的激活, 降低氧化应激和炎症因子的生成, 对帕金森病模型的神经细胞产生保护作用。

关键词: 长春西汀; 帕金森模型; 6-羟基多巴胺

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2021)03-0274-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.03.004

引用本文: 郑伟锋, 黄际薇, 刘珠英, 等. 长春西汀对帕金森病细胞模型保护作用的研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(3): 274-280.

Study on Protective Effect of Vinpocetine on Parkinson Disease Cell Model

ZHENG Weifeng¹, HUANG Jiwei¹, LIU Zhuying¹, XU Lejia¹, XU Liangkui², HUANG Haichao^{2*} (1.Department of Pharmacy, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2.Experimental Training Center, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protective effect and mechanism of vinpocetine on Parkinson disease cell model.

METHODS The Parkinson disease model was established with SH-SY5Y cells injured by 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-hydroxydopamine, they were divided into model group and administration groups. Vinpocetine of different concentrations were added to the administration groups and incubated for 24 h on the basis of model group, while vitamin C was added to the blank group under parallel operation. The cell survival rate was detected by CCK-8 kit to define the suitable concentration of vinpocetine. The apoptosis rate and apoptotic morphology were detected by flow cytometry and Hoechst 33258 staining. The content of catalase(CAT), superoxide dismutase(SOD) and malondialdehyde(MDA) were measured by colorimetry. The content of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured by ELISA. Western blotting was used to measure the expression of *N*-methyl-D-aspartate receptor 1(NMDAR1), α -synuclein and cleaved caspase-9. **RESULTS** Compared with the model group, with the increase of vinpocetine concentration, the survival rate of cells in the administration groups increased, while the apoptosis rate decreased along with number of apoptotic bodies decreased gradually; the content of CAT and SOD increased while the production of MDA decreased regularly due to the increase of vinpocetine concentration; the content of IL-1 β , IL-6 and TNF- α decreased regularly when the vinpocetine concentration enhanced($P<0.05$ or $P<0.01$). The results of Western blotting showed that, compared with model group, the content of NMDAR1 and cleaved caspase-9 in the administration groups was lower while the expression of α -synuclein was increased($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSION** Vinpocetine can protect the nerve cells of Parkinson disease model by downregulating NMDAR1, upregulating α -synuclein, inhibiting the activation of caspase-9, mitigating the injury of oxidative stress and the production of inflammatory factors.

KEYWORDS: vinpocetine; Parkinson disease model; 6-hydroxydopamine

基金项目: 广东省中医药局科研项目(20161035)

作者简介: 郑伟锋, 男, 主管药师 Tel: 13824449446
(020)28854990 E-mail: 1271934745@qq.com

E-mail: nero2000@qq.com

*通信作者: 黄海潮, 男, 硕士, 高级实验师

Tel:

帕金森病(Parkinson disease, PD)是常见的老年人神经退行性疾病之一, 主要症状为运动迟缓、僵硬、震颤和伴随认知障碍, 并可随年龄增长而不断恶化^[1]。大量组织学研究证实, 中脑黑质部位发生大量多巴胺能神经元凋亡是 PD 的主要病因, 导致多巴胺能神经元凋亡的机制主要有兴奋性神经损伤、氧化应激、线粒体功能障碍以及炎症反应等^[2]。目前, 左旋多巴仍是缓解 PD 症状最为有效的一线药物, 但持续服药超过一段时间后常出现疗效逐渐降低的现象, 导致病情复发、恶化, 因此备选更多药物应对治疗 PD 过程中产生的耐药性是提高疗效、改善患者生活质量的必经之路^[3]。

长春西汀是生物碱长春胺的衍生物, 可选择性地作用于脑血管系统, 抑制血管平滑肌磷酸二酯酶对环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)的降解作用, 从而使血管平滑肌舒张, 促进脑组织的血液循环和供应。长春西汀药物制剂在临床上主要用于改善急性脑梗死、脑动脉硬化、脑出血后遗症等各种症状^[4]。研究表明长春西汀的药理作用除了上述以扩张血管为基础的机制, 还可以抑制氧化应激反应和降低谷氨酸介导的神经兴奋性毒性^[5], 在动物模型中可有效下调脂多糖诱导的多种炎症因子的释放^[6]。由此推测, 长春西汀可通过影响多个神经病变的机制而对 PD 产生治疗作用。目前长春西汀的适应证尚未包括 PD, 有临床研究指出其可作用于 Toll 样受体对 PD 产生治疗作用^[7], 而 PD 的发生和治疗涉及多方面病理因素和药理作用, 当前的研究报道尚未能完全阐明长春西汀治疗 PD 的机制。本研究利用 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)损伤 SH-SY5Y 细胞构建 PD 模型, 研究长春西汀对于病变神经细胞的药效及药理作用, 为进一步开展临床试验, 优化 PD 治疗方案提供参考。

1 材料

1.1 细胞株

SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞, 购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

1.2 试剂

长春西汀(河南润弘制药股份有限公司, 批号: 1811012; 规格: 2 mL : 10 mg); 6-OHDA(批号: H4381)、Hoechst 33258(批号: B2883)购自美国 Sigma Aldrich 公司; CCK-8 试剂盒(日本同仁化学公司, 批号: AR1164); DMEM 培养基(批号:

0030034DJ)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号: 10100147)购自 Gibco 公司; BCA 法蛋白定量试剂盒(批号: P00125)、细胞凋亡检测试剂盒(染色剂: Annexin V/7-AAD, 批号: C10625)、过氧化氢酶(catalase, CAT, 批号: S0051)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, 批号: S0109)、丙二醛(malondialdehyde, MDA, 批号: S0131M)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β , 批号: PI301)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6, 批号: PI326)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , 批号: PT512)检测试剂盒均购自碧云天生物技术研究; 鼠抗人 N-甲基-D-天冬氨酸受体 1(N-methyl-D-aspartate receptor 1, NMDAR1)抗体(批号: ab134308)、鼠抗人 α -突触核蛋白抗体(批号: ab27766)、鼠抗人 β -actin 抗体(批号: ab8226)、兔抗人 cleaved caspase-9 抗体(批号: ab2324)、兔抗鼠二抗(批号: ab6728)和羊抗兔二抗(批号: ab6721)均购自美国 Abcam 公司。

1.3 仪器

HERAcell 240i 细胞培养箱(美国 Thermo 公司); Axio Observer A1 荧光显微镜(德国蔡司公司); CytoFLEX 流式细胞仪、DTX880 酶标仪、Allegra X-30R 离心机(美国 Beckman 公司); Western blotting 转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 SH-SY5Y 细胞的培养

以含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液在 37 °C、5% CO₂、95%饱和湿度条件下培养细胞。细胞生长覆盖培养瓶底约 80%时, 弃去旧培养液, 用 PBS 洗涤后加入 0.25%胰酶消化 2~3 min, 再加含血清培养液终止消化, 用滴管轻轻吹打至细胞从皿底完全脱落, 然后按大约 $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于培养板内待用。

2.2 6-OHDA 溶液的配制

因 6-OHDA 容易氧化, 为防止其氧化失效, 实验储备液需加入维生素 C(Vit C)作为抗氧化剂。避光称取 5 mg 6-OHDA 和 20 mg Vit C, 以 10 mL PBS 配制成 0.2%Vit C 溶液备用。临实验前, 按每 2 mL PBS 含 5 mg 6-OHDA 比例吸取 0.2% Vit C 溶液, 配制为 $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 6-OHDA 溶液, 混匀后在超净台内以孔径为 0.22 μm 的灭菌过滤器过滤除菌, 稀释至实验浓度加入细胞培养液中。

2.3 长春西汀试验浓度的摸索

PD 模型组加入终浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的

6-OHDA, 给药组在模型组的基础上分别加入培养基稀释的长春西汀并使终浓度依次为 5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 空白组仅加入 0.2% Vit C 溶液平行操作。各组细胞均孵育 24 h 后检测细胞存活率, 摸索长春西汀的有效浓度。

2.4 细胞存活率的检测

将细胞接种于 96 孔板中, 按 CCK-8 试剂盒说明操作, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 酶标仪检测 490 nm 吸光度 OD 值。每组设 3 个复孔, 按细胞存活率(%)= $\frac{\text{OD}_{\text{处理组}}}{\text{OD}_{\text{空白组}}}\times 100\%$ 进行计算。

2.5 流式细胞仪检测凋亡率

将细胞接种于 6 孔板中, 按分组处理后, 弃去培养液, PBS 洗涤 2 次, 每孔加入不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶于 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 2~3 min, 随后以含血清的培养液终止消化。细胞消化后转移至离心管中, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃去上清, 重悬细胞后, 取 100 μL 至流式管中, 分别加入 5 μL Annexin V 及 5 μL 7-AAD, 室温避光孵育 15 min, 加入 400 μL Binding Buffer 混匀后进样检测, 凋亡率=右上象限晚期凋亡细胞比例+右下象限早期凋亡细胞比例。

2.6 Hoechst 33258 染色观察细胞的凋亡

将细胞接种于 6 孔板中, 按分组处理后, 弃去培养液, PBS 洗涤后, 以 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤后, 加入 0.1% Triton X-100 破膜 10 min, PBS 洗涤 3 次后, 加入 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Hoechst 33258 溶液, 室温轻摇 30 min 染色, 经 PBS 洗涤后用荧光显微镜在 346 nm 激发波长下观察染色情况, 并随机选取视野在进行拍摄。

2.7 蛋白表达量的检测

将细胞接种于 6 孔板中, 按分组处理后, 用预冷的 PBS 洗涤, 加入细胞裂解液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液, 按 BCA 试剂盒说明书操作检测总蛋白含量。配制 12% 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)分离各组总蛋白样品, 转移到 PVDF 膜后用 5% BSA 室温下封闭 90 min, 加入 NMDAR1、 α -突触核蛋白、cleaved caspase-9、 β -actin 稀释好的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。以 TBST 洗膜, 加入二抗, 室温孵育 1 h 后, 再次洗膜, 然后加入 ECL 化学发光液, 在暗室里曝光、显影及定影。采用 Image J 软件分析胶片上显影条带的灰度面积, 以对照组各蛋白与内参(β -actin)的比值为基准, 计算模型组与给药组的蛋白相对表达量。

2.8 氧化应激水平的检测

将细胞接种于 6 孔板中, 分组处理后, 去除细胞培养液, PBS 洗涤 2 次, 加入细胞裂解液作用 30 min 制作细胞匀浆, 按 CAT、SOD、MDA 检测试剂盒说明书操作检测, 按公式将吸光度值换算成每克样品中 CAT、SOD、MDA 的含量。

2.9 炎症因子的检测

将细胞接种于 6 孔板中, 按分组处理后, 取上清培养液与稀释液按 1:50 稀释。将系列浓度的标准品、质控样品、稀释的上清液加至板孔内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h; 洗涤后各孔加入抗体孵育 1 h, 再次洗涤后加入检测液和底物反应液室温下避光下孵育 10 min, 各孔加入反应终止液, 450 nm 紫外线下检测吸光度值并建立标准曲线, IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的标准曲线方程依次分别为: $Y=0.012X^2-0.0096X+0.025$ 、 $Y=0.0000057X^2+0.0048X-0.32$ 、 $Y=0.00013X^2-0.0024X-0.018$, 按方程计算上清液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的浓度。

2.10 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 组间两两比较采用 Tukey 检验, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组细胞的存活率

模型组的细胞存活率显著低于空白组($P<0.05$), 表明成功使用 6-OHDA 构建 PD 模型。给药组细胞存活率随长春西汀浓度的增加而递增, 当浓度在 10~30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 与模型组比较, 细胞存活率显著增加, 差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 但当药物浓度达到 40~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 尽管细胞存活率仍高于模型组, 但可见明显的下降, 表明此时药物浓度过高, 对细胞的正常生长环境产生影响, 因此后续实验仅以 10, 20, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为低、中、高 3 个浓度的给药组进行进一步研究, 结果见图 1。

3.2 流式细胞法检测凋亡率

模型组的细胞凋亡率为(39.4 $\pm$ 4.2)%, 显著高于空白组(4.8 $\pm$ 0.6)%($P<0.05$), 10, 20, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 长春西汀给药组细胞凋亡率依次为(28.1 $\pm$ 3.2)%, (21.7 $\pm$ 2.4)%, (13.5 $\pm$ 1.8)%, 均低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 表明长春西汀可降低 6-OHDA 引起的细胞凋亡, 结果见图 2。

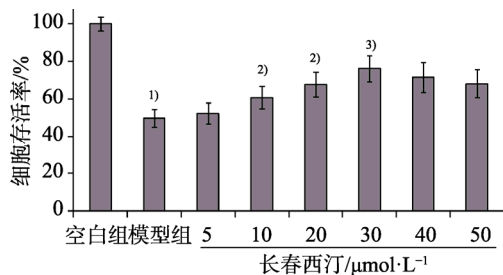


图 1 不同浓度长春西汀对细胞存活率的影响
与空白组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Fig. 1 Effect of vinpocetine on cell survival rate at different concentrations
Compared with the blank group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3.3 Hoechst 33258 染色观察细胞的凋亡

Hoechst 33258 染色后镜下可观察到空白组的细胞核呈均匀暗蓝色,而在模型组可观察到有大量致密光斑,表明在 6-OHDA 的作用下,细胞大量凋亡,细胞核出现变形、固缩和崩解,从而

生成大量的凋亡小体,随着长春西汀的浓度逐渐增加,各给药组的凋亡小体数量逐渐减少,见图 3。Hoechst 33258 染色从细胞形态方面验证了长春西汀可降低 6-OHDA 诱导的细胞凋亡。

3.4 Western blotting 检测蛋白表达水平

与空白组相比,模型组 NMDAR1、cleaved caspase-9 的含量增高而 α -突触核蛋白则减少 ($P<0.05$),表明 6-OHDA 可通过影响 NMDAR1、 α -突触核蛋白和 cleaved caspase-9 的表达模拟 PD 的病理状态。与模型组相比,给药组随着长春西汀的浓度增加,细胞中的 NMDAR1、cleaved caspase-9 含量逐渐降低而 α -突触核蛋白表达则逐渐上升 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明长春西汀可能通过下调 NMDAR1、cleaved caspase-9 和上调 α -突触核蛋白的表达产生药效作用。结果见图 4。

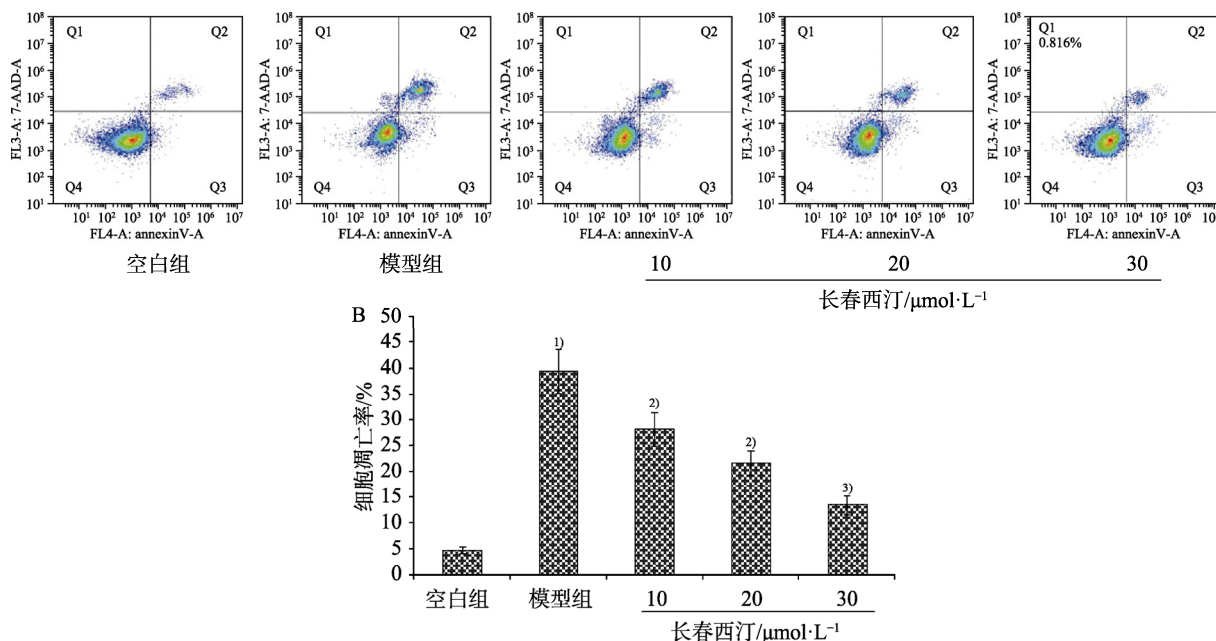


图 2 流式细胞法的检测各组细胞凋亡率
A-空白组; B-模型组; C-E-10, 20, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 长春西汀给药组; 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Apoptosis rate of cells in each group detected by flow cytometry

A-blank group; B-model group; C-E-10, 20, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vinpocetine group; compared with the blank group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

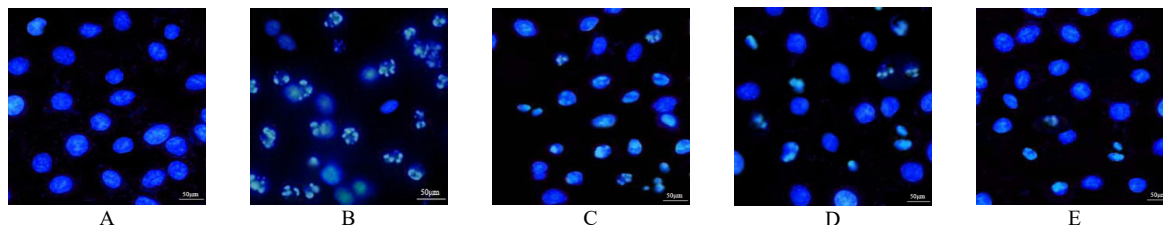


图 3 Hoechst 33258 染色观察细胞的凋亡情况(200×)
A-空白组; B-模型组; C-E-10, 20, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 长春西汀给药组。

Fig. 3 Hoechst 33258 staining to observe the apoptosis of cells(200×)

A-blank group; B-model group; C-E-10, 20, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vinpocetine group.

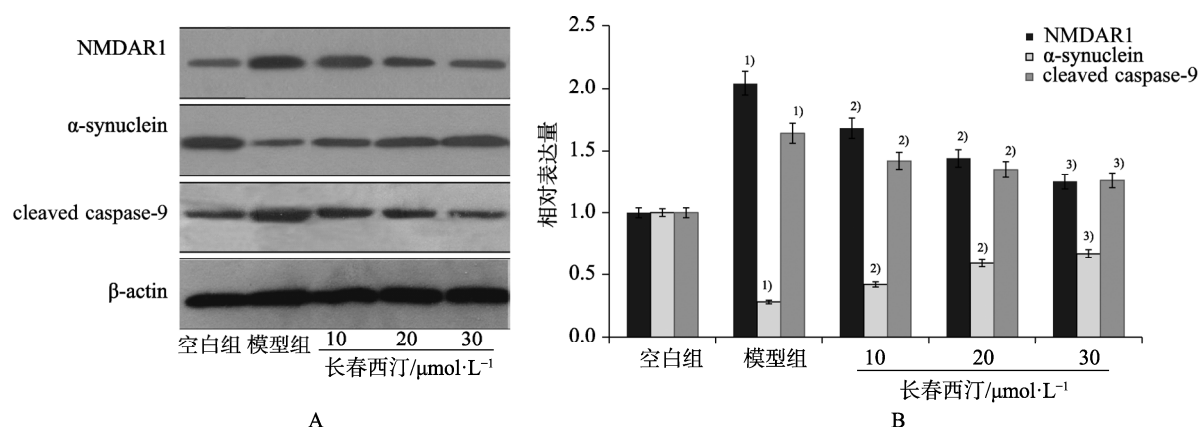


图4 各组细胞 NMDAR1、 α -突触核蛋白和 cleaved caspase-9 的表达

A-各组细胞 NMDAR1、 α -突触核蛋白和 cleaved caspase-9 表达的 Western blotting 条带; B-各组细胞 NMDAR1、 α -突触核蛋白和 cleaved caspase-9 的相对表达量比较分析; 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Expression of NMDAR1, α -synuclein and cleaved caspase-9 in each group of cells

A-Western blotting bands of NMDAR1, α -synuclein and cleaved caspase-9 expressed in each group; B-comparison and analysis of NMDAR1, α -synuclein and cleaved caspase-9 expressed in each group; compared with the blank group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

3.5 氧化应激水平的检测

与空白组相比, 模型组 CAT、SOD 含量降低而 MDA 含量升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 表明 6-OHDA 可引起氧化应激反应模拟 PD 的病理状态。给药组与模型组比较, 随着长春西汀浓度的增加, CAT 和 SOD 含量逐渐升高, MDA 含量相应下降, 差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 表明长春西汀可减低 6-OHDA 引起的氧化应激损伤, 结果见表 1。

表 1 氧化应激指标的检测

Tab. 1 Detection of oxidative stress index

指标	CAT/U·g ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹
空白组	2.56±0.24	23.71±4.62	1.08±0.07
模型组	1.05±0.09 ¹⁾	9.84±1.63 ¹⁾	5.65±0.41 ¹⁾
10 μmol·L ⁻¹ 长春西汀组	1.45±0.11 ²⁾	12.37±2.35 ²⁾	3.94±0.32 ²⁾
20 μmol·L ⁻¹ 长春西汀组	1.93±0.17 ²⁾	17.25±3.87 ²⁾	2.74±0.29 ²⁾
30 μmol·L ⁻¹ 长春西汀组	2.29±0.25 ³⁾	21.76±4.28 ³⁾	1.60±0.18 ³⁾

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with the blank group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

3.6 细胞炎症因子含量的检测

模型组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量均高于空白组, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 表明 6-OHDA 可介导炎症反应模拟 PD 的病理状态。给药组与模型组比较, 随着长春西汀浓度的增加, 3 种炎症因子的含量逐渐下降, 均具有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 表明长春西汀可降低 6-OHDA 诱导产生的炎症因子含量, 结果见表 2。

表 2 炎症因子含量的检测

Tab. 2 Measurement of inflammatory factors pg·mL⁻¹

炎症因子	IL-1 β	IL-6	TNF- α
空白组	12.56±1.88	78.55±6.84	39.36±5.42
模型组	36.43±5.80 ¹⁾	257.39±25.80 ¹⁾	102.64±10.34 ¹⁾
10 μmol·L ⁻¹ 长春西汀组	30.86±5.23 ²⁾	204.57±20.45 ²⁾	84.19±11.82 ²⁾
20 μmol·L ⁻¹ 长春西汀组	24.38±4.95 ²⁾	183.72±15.97 ²⁾	68.04±9.57 ²⁾
30 μmol·L ⁻¹ 长春西汀组	17.08±2.19 ³⁾	155.68±12.34 ³⁾	49.06±6.27 ³⁾

注: 与空白组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with the blank group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

4 讨论

从 1817 年英国医师 James Parkinson 首先详细描述 PD 至今, 已约有 200 年历史。尽管 PD 的治疗有了长足的进步, 目前临床上的药物可有效改善静止性震颤、运动迟缓和四肢僵直等运动症状, 但尚不能治愈疾病使患者康复, 且长期用药的过程中可出现各种不良反应^[8]。众多临床研究证实, PD 的病理特征是中脑黑质致密部多巴胺神经元病变、缺失, 伴有路易小体的形成以及黑质纹状体乙酰胆碱和多巴胺的失衡^[9]。在研究 PD 病理的过程中, 由于取材困难、神经元的不可分裂增殖等原因, 对于 PD 的药理机制研究多采用体外细胞模型。6-OHDA 是神经递质多巴胺的羟基化衍生物, 是常用的 PD 模型诱导剂, 在体内外都能与多巴胺竞争结合多巴胺转运体进入神经元, 并可通过多种途径模拟 PD 的病理状态, 主要包括: ①促进氧自由基物质大量生成, 氧化胞内脂质膜结构导致神经元凋亡^[10]; ②上调 NMDAR1 的表达, 介导谷

氨酸引致的神经兴奋性毒性^[11]；③下调 α -突触核蛋白的表达，影响多巴胺转运，阻滞神经传导功能^[12]；④诱导受损的神经元释放炎症因子，引起炎症损伤^[13]，以上多种因素最终导致多巴胺神经元的凋亡、坏死。

老龄人是 PD 的高发人群，主流的老化理论认为由于机体衰老导致细胞抗氧化能力下降，使呼吸电子传递链中产生的氧自由基无法及时清除而大量堆积，从而氧化破坏线粒体等细胞器的脂质膜结构。线粒体的损伤是导致神经退行性疾病的关键因素之一，尤其是在多巴胺能神经元中，线粒体功能障碍会可触发多巴胺氧化加合物的积累，最终导致多巴胺能神经元的死亡^[14]。本研究结果表明，长春西汀在 PD 细胞模型中使 CAT 和 SOD 维持较高的含量，降低 MDA 的生成，抑制 6-OHDA 诱导的氧化反应对细胞结构的破坏。

谷氨酸是中枢神经系统重要的兴奋性神经递质，其在胚胎期神经发育、兴奋性突触传递、突触的可塑性等方面发挥重要作用。然而谷氨酸在突触间隙的过度聚集可引起神经元损伤甚至死亡，此称为兴奋性神经毒性^[15]。研究显示各种神经病理过程如脑缺血损伤、脑组织炎症和神经退行性疾病等均与兴奋性神经毒性有关，当脑组织间隙谷氨酸浓度迅速增高，导致突触后膜的 NMDAR1 过度激活，可引起一系列的神经病变^[16]。本研究结果表明，长春西汀可以抑制 6-OHDA 诱导的 NMDAR1 过度表达，由此可推测在临床应用中，长春西汀可降低谷氨酸对 NMDAR1 的过度激活，抑制 PD 的症状和延缓病情发展。

α -突触核蛋白是一种由 140 个氨基酸组成的突触蛋白，主要表达于突触前末梢和神经元核内，有 α 、 β 和 γ 等亚型，同时其也是 PD 患者 Lewy 小体的重要成分。研究表明，正常状态的 α -突触核蛋白具有重要的生理功能，对于维持多巴胺神经元的正常功能具有重要作用。有动物实验研究观察到，敲除了 α -突触核蛋白基因的大鼠表现出认知功能下降，原因是突触核蛋白敲除后黑质纹状体转运多巴胺的机制出现异常^[17]。本研究结果表明，长春西汀可上调 PD 模型细胞中 α -突触核蛋白的表达，维持神经细胞的正常功能。然而，此实验结果与 α -突触核蛋白过表达最终形成 Lewy 小体，导致多巴胺神经元损伤的理论相悖，原因可能是 α -突触核蛋白一定范围内的升高会起到保护

作用，但过度表达后会形成突触核蛋白聚集体，并连同其他一些蛋白形成了路易小体沉淀在神经元中，由此产生氧化应激反应和影响多巴胺转运，进而导致神经元凋亡^[18]。

Caspase 是一类与凋亡密切相关的蛋白水解酶家族，其成员在氨基酸序列、结构及酶的特性上相似，通常以无活性的酶原形式存在大多数动物细胞中。Caspase 酶原必须通过自身活化或相互激活，经过裂解和重新组装，形成活性复合物才能启动凋亡程序。目前，经典的细胞凋亡途径按涉及 3 种不同的 caspase 成员分为 caspase-4 介导的内质网凋亡途径，caspase-8 介导的死亡受体凋亡途径以及 caspase-9 介导的线粒体凋亡途径^[19]。研究表明，由于 6-OHDA 在细胞内产生的活性氧能够直接氧化损伤线粒体膜，引起细胞色素 C 释放，促使 caspase-9 酶解活化生成 cleaved caspase-9，从而启动线粒体凋亡途径^[20]。本研究结果表明，长春西汀可以降低 6-OHDA 所致的线粒体损伤，抑制 caspase-9 介导的凋亡反应，发挥保护神经细胞的作用。

除了多巴胺神经元的凋亡，黑质部位的慢性炎症也是 PD 重要的病理机制之一，其中炎症因子 TNF- α 是启动死亡受体凋亡途径的关键分子。研究发现神经性炎症可明显加重 PD 的病情，尤其是小胶质细胞的激活及 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的表达，均与 PD 患者多巴胺能神经元损伤有关^[21]。有研究观察到，非甾体类抗炎药能减少 PD 患者模型多巴胺能神经元的凋亡，并且流行病学研究表明 PD 患者长时间服用某些 NSAIDs 能降低 PD 症状加重的风险^[22]。本研究结果表明，长春西汀可以降低 6-OHDA 诱导细胞产生 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的含量，由此可推测在临床应用中，长春西汀可通过降低病变脑组织中炎症因子的含量，抑制免疫细胞活化和炎症反应对神经细胞的进一步损伤。

综合本研究各项试验结果，可以推断长春西汀能够下调 NMDAR1 和上调 α -突触核蛋白的表达，抑制 caspase-9 介导的细胞凋亡，降低氧化应激的程度和 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子的生成，从而对 PD 的多巴胺能神经元产生保护作用，可为 PD 患者提供有效的备选用药。在实际应用中，可以展望长春西汀能够与左旋多巴等药物联合使用，达到进一步缓解 PD 症状和控制病情进展的目的。

REFERENCES

- [1] XIN C Q. The mechanism underlying pathogenesis of Parkinson's disease and the progress in its therapeutics[J]. J Med Postgraduates(医学研究生学报), 2019, 32(6): 646-651.
- [2] WEI H Y. Research progress of gene polymorphism in Parkinson's disease[J]. Pract Geriatr(实用老年医学), 2019, 33(7): 637-641.
- [3] TANNER C M. A second honeymoon for Parkinson's disease[J]. N Engl J Med, 2013, 368(7): 675-676.
- [4] FAN S Y, LIN N, SHAN G L, et al. Safflower yellow for acute ischemic stroke: A systematic review of randomized controlled trials[J]. Complementary Ther Med, 2014, 22(2): 354-361.
- [5] XIE J C. Progress of vinpocetine in treatment of neurological diseases[J]. J Tongji Univ Med Sci(同济大学学报(医学版)), 2015, 36(4): 124-127.
- [6] MEDINA A E. Vinpocetine as a potent antiinflammatory agent[J]. PNAS, 2010, 107(22): 9921-9922.
- [7] ZHANG P, WU X M, XIE X F, et al. Vinpocetine regulates levels of circulating TLRs in Parkinson's disease patients[J]. Neurol Sci, 2019, 40(1): 113-120.
- [8] YUE W, JI Y. A 100-year history of dementia with lewy bodies[J]. Chin J Contemp Neurol Neurosur(中国现代神经疾病杂志), 2015, 15(7): 514-517.
- [9] YAN F, WANG Y H. Pathophysiology of cardiovascular autonomic dysfunction in Parkinson's disease and its therapy [J]. World Clin Drugs(世界临床药物), 2018, 39 (7): 458-463.
- [10] DIAS V, JUNN E, MOURADIAN M M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease[J]. J Park Dis, 2013, 3(4): 461-491.
- [11] LIU Z G, GAN J, QI C, et al. Changes in surface expression of *N*-methyl-*D*-aspartate receptors in the striatum in a rat model of Parkinson's disease[J]. Drug Des Dev Ther, 2014(8): 165-173.
- [12] WANG D P. Proteomic study of Parkinson's disease model induced by 6-hydroxydopamine in SH-SY5Y cells[D]. Jilin University(吉林大学), 2010.
- [13] SHENG Y J, YANG Y, LI W Y, et al. Effect and mechanism of idebenone on behavioral improvement in mice with parkinson's disease[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(6): 686-691.
- [14] CAO G J, ZHANG X F, ZHENG K D. Effect of pramipexole on non-motor symptoms and oxidative stress in elderly patients with vascular parkinsonism[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(10): 1554-1559.
- [15] WANG X T, CHEN J H, LIU Y X. Study on the relationship between Parkinson's disease and glutamate metabolism[J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis(中西医结合心脑血管病杂志), 2017, 15(2): 180-182.
- [16] NIU M J, CHEN Z B. Progress on NMDA receptors and parkinson dyskinesia[J]. Chin J Clin Pharm(中华临床医师杂志), 2015, 9(10): 1922-1925.
- [17] LIU W X. Molecular dynamic simulation of α -synuclein misfolding and aggregation mechanisms and interaction mechanisms of small molecular inhibitors[D]. Lanzhou University(兰州大学), 2019.
- [18] ROCKENSTEIN E, NUBER S, OVERK C R, et al. Accumulation of oligomer-prone α -synuclein exacerbates synaptic and neuronal degeneration *in vivo*[J]. Brain, 2014, 137(5): 1496-1513.
- [19] TROY C M, JEAN Y Y. Caspases: therapeutic targets in neurologic disease[J]. Neurotherapeutics, 2015, 12(1): 42-48.
- [20] XIONG S B, MU T Y, WANG G W, et al. Mitochondria-mediated apoptosis in mammals[J]. Protein Cell, 2014, 5(10): 737-749.
- [21] XIAO X Y, PEI Y. Research progress on pathogenesis of glial cells and inflammatory factors associated with inflammation of Parkinson's disease[J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2018, 45(11): 2451-2454.
- [22] REN L, YI J, YANG J, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs use and risk of Parkinson disease: A dose-response meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore). 2018, 97(37): e12172.

收稿日期: 2019-12-14

(本文责编: 李艳芳)