DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.09.004
第26卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 9
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)09-0759-04

论著

一氧化氮在鱼藤酮诱导的PC12细胞凋亡中的作用

李云鹏[1],董兆君[1],曾 惠[1],乐 卫东[2] (第三军医大学预防医学系军事毒理学教研室,重庆 400038;[2]Department of Neurology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA)

提 要:目的 研究一氧化氮在鱼藤酮诱导的PC12细胞凋亡中的作用。方法 采用MTT法测定细胞增殖活力及鱼藤酮对PC12细胞的急性损伤效应,Greiss法测定NO_2^-含量,琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡。结果 MTT实验表明PC12细胞传代后7 d达到增殖高峰,低剂量L-NAME对PC12细胞有保护作用,在四个不同剂量L-NAME的比较试验中,100 μmol/L的L-NAME对PC12细胞的保护作用最强。鱼藤酮亦可诱导PC12细胞DNA梯带的形成。另外,一氧化氮合酶抑制剂L-NAME可以抑制鱼藤酮诱导的caspase-3蛋白酶的活力,L-NAME亦可抑制鱼藤酮诱导的NO的产生。结论 一氧化氮和caspase-3共同参与了鱼藤酮诱导的PC12细胞凋亡。

关键词:一氧化氮;caspase-3;鱼藤酮;细胞凋亡;PC12细胞
中图法分类号:R329.25;R73-354;R914.3 文献标识码:A

Effects of nitric oxide on PC12 cell apoptosis induced by rotenone

LI Yun-peng[1], DONG Zhao-jun[1], ZENG Hui[1], LE Wei-dong[2] ([1]Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; [2]Department of Neurology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA)

Abstract: **Objective** To investigate the roles of nitric oxide and caspase-3 in PC12 cell apoptosis induced by rotenone. **Methods** The acute injury effect of rotenone on PC12 cells and viability of the PC12 cells were detected by MTT assay. Nitrite (NO_2^-) was quantified by Greiss reaction. The activity of caspase-3 and the cell apoptosis were detected by fluoremetry and agarose gel electrophoresis, respectively. **Results** The MTT colorimetry indicated that PC12 cell viability reached a peak at 7 d after passage. L-NAME at the concentration of 100 μmol/L showed the strongest protective effect for PC12 cell in the four different doses. Rotenone also induced the formation of DNA ladder in PC12 cells. Additionally, the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME inhibited the activity of caspase-3 protease. L-NAME also inhibited the production of nitric oxide induced by rotenone. **Conclusion** Nitric oxide and caspase-3 are involved in the process of PC12 cell apoptosis induced by rotenone.

Key words: nitric oxide; caspase-3; rotenone; apoptosis; PC12 cell

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种多功能的气体分子,它在许多生物学活动中起着重要的调节作用。NO在生理浓度下,于不同的细胞中具有不同的功能。如信号转导、神经传递、细胞保护及调节作用[1,2]。而NO又具有双面刀效应。在中枢神经系统,过量的NO具有神经毒性[3]。在帕金森症、早老性痴呆及亨廷顿舞蹈症等神经退行性疾病中均伴随着特定种类的神经细胞凋亡,因此,NO引起的细胞损伤可能是中枢神经系统疾病的重要病因。鱼藤酮是一种来源于某些植物根茎的天然杀虫剂,常作为一种安全、有效的杀虫剂而广泛应用于果蔬除害、鱼塘清理,它也是线粒体呼吸链Complex I的特异性抑制剂。Complex I是线粒体内膜上涉及氧化磷酸化的5个酶复合物之一。研究表明鱼藤酮通过颈静脉插管输注可以在大鼠复制出类似帕金森病的动物模型,包括黑质多巴胺神经退行性变、路易小体形成,出现震颤、步态不稳等症状[4]。近期,Sherer等[5]采用皮下埋入渗透泵、以小剂量鱼藤酮长期给药的方法改进了帕金森病的动物模型。鱼藤酮帕金森病动物模型的建立推动了鱼藤酮的神经退变作用研究。而本研究以大鼠嗜铬细胞瘤PC12细胞株作为多巴胺神经元的体外细胞中毒模型以研究鱼藤酮的凋亡诱导作用,期望进一步阐明其神经退变作用机制。

作者简介:李云鹏(1971—),男,陕西省安康市人,硕士研究生,实验师,主要从事神经毒理学方面的研究。电话:(023)68752356
通信作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2003-10-10;修回日期:2004-02-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 PC12细胞株购自中国科学院上海细胞生物工程研究所。细胞培养于含有10%小牛血清的RMPI1640培养基，37 ℃，5%CO_2培养箱内培养。

1.1.2 主要试剂 鱼藤酮、L-NAME和MTT均购自Sigma公司。caspase-3活性检测试剂盒购自CLONTECH公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT法检测PC12细胞生长曲线 培养瓶中生长良好的PC12细胞以0.25%胰酶消化，RMPI1640培养液终止消化，调整细胞数为5×10^4个/ml，然后取10块96孔酶联板，每板第一孔加入0.2 ml细胞培养液作为对照，另加5孔细胞悬液，即细胞数为1×10^4个/孔，继续培养。

每2 d更换细胞培养液。每天取出一块96孔板以MTT法在BIO-RAD550型酶联检测仪上测定吸光度值，检测波长为490 nm，连续检测10 d，取5孔之吸光度均值，并以时间为横轴，吸光度为纵轴绘制PC12细胞生长曲线。

1.2.2 L-NAME对PC12细胞存活率的影响 选取培养于96孔板中的处于对数生长期的PC12细胞，分别加入以无菌生理盐水配制的L-NAME溶液10 μl，使L-NAME的终浓度分别为50、100、150、200 μmol/L，每个浓度各5孔，24 h后再加入20 μl MTT溶液，继续培养4 h，以吸管小心吸去上清，每孔加入150 μl DMSO，振荡10 min，在Bio-RAD550型酶标仪上490 nm比色。

1.2.3 鱼藤酮对L-NAME保护作用下PC12细胞的影响 本实验设两个组，即鱼藤酮中毒组及L-NAME+鱼藤酮组。PC12细胞以1×10^4个接种于96孔培养板中，每隔2 d更换细胞培养液。培养至第5天，L-NAME组加入10 μl L-NAME溶液，使L-NAME终浓度为100 μmol/L，继续培养24 h。然后，L-NAME组及鱼藤酮中毒组均加入鱼藤酮，使每孔鱼藤酮终浓度分别为0.5、1.0、1.5、2.0 μmol/L，每个浓度5孔，继续培养24 h，按照MTT法测定吸光度。

1.2.4 PC12细胞培养上清液中NO_2^-水平的检测 Greiss法测定NO_2^-的含量。步骤如下：PC12细胞培养上清液中加入4 mol/L的盐酸作用10 min，依次加入2 mg/L的对氨基苯磺酸和1 g/L的N-1-萘基乙二胺，孵育30 min，于日本岛津UV-2201紫外-可见分光光度计上测吸光值(波长546 nm)，公式计算如下：样品NO_2^-浓度(μmol/L)= A测定管/A标准管×2.5。

1.2.5 PC12细胞caspase-3活力测定 在960-CRT荧光分光光度计上检测7-氨基-甲基香豆素，用来确定caspase-3的活力。在PC12细胞溶解液中加入caspase-3酶作用底物Ac-DEVD-AMC，37 ℃孵育60 min，荧光分光光度计检测AMC的平均荧光强度(激发波长为380 nm，吸收波长为440 nm)，结果用平均荧光强度表示。

1.2.6 琼脂糖凝胶电泳检测细胞DNA损伤 按文献[6]的方法进行。

1.3 统计学分析

结果以$\bar{x}\pm s$表示，以SPSS11.0作方差分析及均数间多重比较检验。

2 结果

2.1 正常PC12细胞生长曲线

结果表明，正常PC12细胞传代后1~3 d生长缓慢，随后进入对数生长期，至第7天达到高峰，于第8天开始下降(图1)。

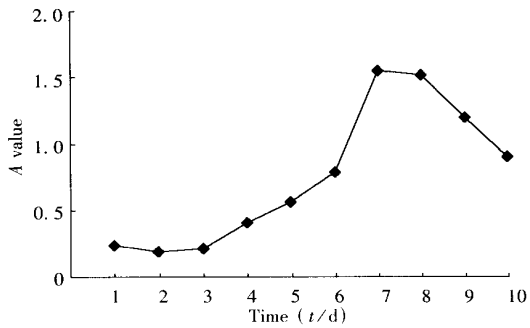
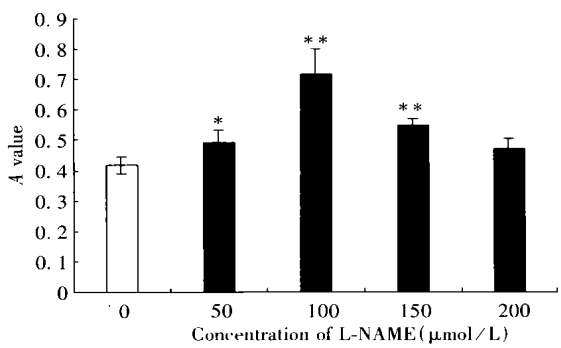


图1 正常PC12细胞生长曲线

Fig 1 Growth curve of PC12 cells

2.2 L-NAME对PC12细胞存活率的影响

如图2所示，处于对数生长期的PC12细胞在4个不同浓度的L-NAME作用24 h后，相对于正常对照，其吸光度均升高，说明在一定的浓度范围下，L-NAME对PC12细胞具有保护作用。而100 μmol/L的L-NAME对PC12细胞的保护作用最强($P<0.01$)。



*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* 0 μmol/L

图2 L-NAME对PC12细胞存活率的作用

Fig 2 Effects of L-NAME on PC12 cell viability

2.3 鱼藤酮对L-NAME保护作用下的PC12细胞的影响

表1所示，与鱼藤酮中毒0 μmol/L组相比，单纯鱼藤酮中毒各组吸光度值均下降。即随着鱼藤酮浓度的升高，吸光度值下降。鱼藤酮浓度为2.00 μmol/L时，其吸光度值为正常对照的43.41%，相差非常显著($P<0.01$)。而L-NAME保护组当鱼藤酮浓度为0.50 μmol/L和1.00 μmol/L时，与单纯L-NAME对照相比较无显著性差异，而鱼藤酮浓度为1.50 μmol/L及2.00 μmol/L时，吸光度值下降明显($P<0.01$)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　L-NAME 对鱼藤酮作用下的 PC12 细胞的保护作用 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Protective effect of L-NAME on PC12 cells induced by rotenone ($\bar{x}\pm s$)

Group	Concentration of rotenone (μmol/L)				
	0	0.50	1.00	1.50	2.00
Rotenone	0.417±0.029	0.253±0.020 **	0.216±0.012 **	0.204±0.022 **	0.181±0.023 **
Rotenone+L-NAME	0.715±0.029	0.721±0.051	0.702±0.057	0.369±0.031 **	0.217±0.017 **

* *: $P<0.01$, *vs* rotenone group

2.4　PC12 细胞培养上清 NO_2^- 水平

不同浓度的鱼藤酮作用 24 h 后, 鱼藤酮单纯中毒组的 PC12 细胞培养上清 NO_2^- 水平随着鱼藤酮中毒浓度的升高而升高, 且相差非常显著($P<0.01$); 预先加入 L-NAME, 0.5 μmol/L 和 1.0 μmol/L 组升高不明显, 而 1.5 μmol/L 和 2.0 μmol/L 组 NO_2^- 水平升高显著($P<0.01$, 见表 2)。

表 2　PC12 细胞培养上清 NO_2^- 水平(μmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The level of NO_2^- in the cultured PC12 cell supernatant (μmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Group	Concentration of rotenone(μmol/L)				
	0	0.50	1.00	1.50	2.00
Rotenone	4.1±0.2	10.3±0.5 **	15.4±0.7 **	23.6±1.5 **	34.4±1.3 **
Rotenone+L-NAME	3.9±0.3	4.0±0.4	4.2±0.6 **	13.5±0.9 **△△	15.2±1.2 **△△

**: $P<0.01$, *vs* 0 μmol/L rotenone group;
△△: $P<0.01$, *vs* rotenone group

2.5　PC12 细胞 caspase-3 活性检测

表 3 所示, 与无鱼藤酮对照组相比, 单纯鱼藤酮中毒 PC12 细胞的 caspase-3 活性升高, 并与鱼藤酮中毒剂量呈正相关, 鱼藤酮浓度为 2.0 μmol/L 时其 caspase-3 活性升高了 2.1 倍。而鱼藤酮+L-NAME 组当鱼藤酮浓度为 0.5 μmol/L 时 caspase-3 活性未见显著性变化($P>0.05$), 1.0、1.5、2.0 μmol/L 组 caspase-3 活性升高明显($P<0.01$), 但低于单纯鱼藤酮中毒组。

表 3　PC12 细胞 caspase-3 的活力($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

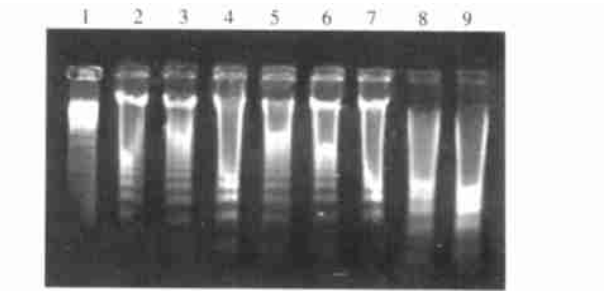
Tab 3　Activity of caspase-3 in the cultured PC12 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Group	Concentration of rotenone (μmol/L)				
	0	0.50	1.00	1.50	2.00
Rotenone	210.6±8.2	387.9±10.5△△	462±13.6△△	593.5±15.7△△	674.3±9.4△△
Rotenone+L-NAME	225.1±6.32	27.3±6.8	230.3±7.7 *	301.4±7.5 **	304.4±5.2 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* rotenone group;
△△: $P<0.01$, *vs* 0 μmol/L rotenone group

2.6　鱼藤酮对 PC12 细胞凋亡的影响

图 3 琼脂糖凝胶电泳显示 0.5、1.0、1.5、2.0 μmol/L 鱼藤酮中毒均可使 PC12 细胞出现明显的 DNA 梯状带, 表明鱼藤酮可使 PC12 细胞凋亡。



1: Control; 2, 3: 0.5 μmol/L; 4, 5: 1.0 μmol/L; 6, 7: 1.5 μmol/L; 8, 9: 2.0 μmol/L

图 3　鱼藤酮对 PC12 细胞凋亡的影响

Fig 3　Effects of rotenone on the apoptosis of PC12 cells

3　讨论

NO 是由 NO 合成酶以 L-精氨酸为原料合成的。L-NAME 是一氧化氮合酶特异性拮抗剂, 能够抑制 NO 合成。本研究结果显示: 单纯 L-NAME 可以促进 PC12 细胞生长, 不同浓度的 L-NAME 对 PC12 细胞生长的影响不同。当 L-NAME 浓度为 100 μmol/L 时最有利于 PC12 细胞生长。这可能是由于 L-NAME 抑制了内源性 NO 的产生所表现出的凋亡抑制作用。

然而, 持续长久的 NO 产生可以通过线粒体膜电位降低直接介导细胞色素 C 的释放, 而胞浆内的细胞色素 C 可以活化 caspase 依赖的细胞凋亡信号通道, 引起细胞凋亡[7]。我们的研究结果表明鱼藤酮中毒可引起线粒体膜电位降低(未发表)。本研究还表明, 单纯鱼藤酮中毒 PC12 细胞培养上清的 NO_2^- 水平显著升高, 预先加入 L-NAME 在鱼藤酮浓度较低时 NO_2^- 水平升高不明显, 当鱼藤酮浓度大于 1.0 μmol/L 时, PC12 细胞培养上清的 NO_2^- 水平升高明显($P<0.01$)。由此可见, L-NAME 对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞的保护作用与鱼藤酮的中毒剂量密切相关, 只有在鱼藤酮浓度小于 0.5 μmol/L 时, 才能避免鱼藤酮诱导的 NO_2^- 水平升高而产生的细胞毒害作用。Caspase-3 活性检测结果表明, 单纯鱼藤酮中毒, PC12 细胞 caspase-3 活性显著升高($P<0.01$), 并与鱼藤酮呈剂量反应关系。L-NAME 保护组 caspase-3 活性明显低于单纯鱼藤酮中毒组, 提示 NO 是在 caspase-3 的上游发挥作用。而在细胞凋亡信号通路中 caspase-3 起着承上启下的关键作用。

鱼藤酮处理 24 h 的 PC12 细胞琼脂糖凝胶电泳呈现明显的 DNA 梯状带, 表明鱼藤酮能够引起 PC12 细胞凋亡, 这可能是由于鱼藤酮诱导 PC12 细胞产生的过量 NO 而引起的。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

综上所述，一氧化氮及caspase-3在鱼藤酮诱导的PC12细胞凋亡中起着重要作用。L-NAME能够有效地阻止一氧化氮的产生，有可能抑制鱼藤酮诱导的细胞凋亡的发生。

参考文献：

[1] Bredt D S, Snyder S H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger[J]. Neuron, 1992, 8(1): 3—11.
[2] Lipton S A, Choi Y B, Pan Z H, *et al*. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds[J]. Nature, 1993, 364(6438): 626—632.
[3] Dawson V L, Dawson T M. Nitric oxide neurotoxicity[J]. J Chem Neuroanat, 1996, 10(3-4): 179—190.
[4] Betarbet R, Sherer T B, MacKenzie G, *et al*. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease[J]. Nat Neurosci, 2000, 12(3): 1301—1306.
[5] Sherer T B, Kim J H, Betarbet R, *et al*. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α-synuclein aggregation[J]. Exp Neurol, 2003, 179(1): 9—16.
[6] 彭黎明，王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京：人民卫生出版社，2000. 182.
[7] Chung H T, Pae H O, Choi B M, *et al*. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 282(5): 1075—1079.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)09-0762-01

老年患者经鼻管饲胃内营养40例效果观察

Observation of entogastric nutrition by nasal feeding in 40 senile patients

李媛媛 （第三军医大学西南医院老年科，重庆 400038）

经鼻管饲胃内营养是指经鼻留置胃管输入营养制剂的营养治疗方法，应用经鼻管饲胃内营养行营养支持是经济、简便、安全有效符合正常生理的营养方式[1]。我科采用此方法治疗老年患者40例，经观察效果显著，家属反映良好，现报告如下。

1 资料与方法

病例资料：40例患者，男25例，女15例，年龄72～91岁，平均(75.6±3.7)岁。老年性痴呆7例、脑血管意外19例(3例全身多处褥疮、4例合并糖尿病)、恶性肿瘤11例(1例合并肠易激综合征)、其他3例并存多种疾病。入选病例普遍特征为老年神志不清及昏迷、不能口服或口服不能满足常规营养需要的病人，其中3例为社区家庭病床患者，因家属喂养不当将食物误吸入肺，造成吸入性肺炎。

操作方法及护理：按护理常规置胃管及留置胃管的护理[2]。操作时应特别注意老年患者对外来刺激反射减弱，置管时先观察面部颜色，有无憋闷性红胀、表情是否平静，有无呛咳。痰多者置管前充分吸痰、高流量吸氧(1 min)后行置管术。回抽胃液时注意是否存在阻力并检查口腔里有无胃管盘曲，送至预定测量置管深度后妥善加固。临床上肥胖型老年患者居多，颈短而粗、软腭松弛、悬雍垂粗大、舌根上抬导致喉腔狭窄，置管时可以同时应用压舌板配合。

2 结果

7例老年痴呆患者减少了反复静脉穿刺和营养液的外渗引起的血管损害，避免了输液反应的发生。保持原有体重5例，体重增加2例，病情稳定。

19例脑血管意外患者未出现水肿及脱水，查血示白蛋白无明显下降，无肌肉萎缩。4例合并糖尿病患者行饮食加口服降糖药，血糖控制效果满意。11例恶性肿瘤患者未出现营养不良引起的恶病质(1例肠易激综合征患者制定要素饮食，腹泻缓解，未出现水、电解质失衡。)。

3 讨论

营养支持一直都是老年内科学重要治疗手段之一，有效合理的营养是提高机体免疫力，减轻和避免患者不良反应，减少潜在疾病发生，延长生命的重要条件。本组运用经鼻管饲胃内营养支持，证明是安全、有效的，未发生不良反应。符合生理需要，有效地配合了临床治疗，提高了患者自身免疫力，明显缓解以静脉用药行营养支持的不良反应，减少的经济支出。避免长期静脉置管引起的血管并发症，同时有助于预防老年病人最容易发生的吸入性肺炎。运用鼻饲胃内营养是临床危重病人营养治疗的一种可行的方法。

关键词：老年患者；鼻管饲胃内营养
中图法分类号：R459.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王全珍，徐小路. 现代老年护理学[M]. 北京：人民军医出版社，1999. 67.
[2] 仲剑平. 医疗护理技术操作常规[M]. 北京：人民军医出版社，1998. 266.

（编辑 薛国文）

作者简介：李媛媛(1981－)，女，重庆市人，护士，主要从事老年护理医学方面的研究。电话：(023)68754000-73068

收稿日期：2003-10-28；修回日期：2003-12-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net