DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.022
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

文章编号:1000-5404(2003)18-1643-03

论著

川芎嗪对PC12细胞抗凋亡作用的实验研究

李志刚,臧 雷,刘松青 (第三军医大学附属西南医院药学部,重庆 400038)

提 要:目的 探讨川芎嗪对多巴胺诱导的PC12细胞凋亡的保护作用及机制。方法 用多巴胺(DA)刺激PC12细胞使其发生细胞凋亡,用流式细胞仪检测PC12细胞二倍体比率表征细胞凋亡率,用MTT法测定细胞活性,用Griess法间接测定NO的浓度,比较分析加入不同剂量的川芎嗪后对上述指标的影响。结果 加入0.30、0.60 mmol/L的DA两组的PC12细胞的凋亡率、培养上清NO含量均显著高于无DA组($P<0.05$),细胞活性显著低于无DA组($P<0.05$)。加入川芎嗪后,细胞凋亡率、NO含量均显著低于未加入川芎嗪组($P<0.05$)、细胞活性显著高于未加入川芎嗪组($P<0.05$)。结论 川芎嗪可抑制DA引起的PC12细胞凋亡,此作用可能与降低NO生成有关。

关键词:PC12细胞;多巴胺;川芎嗪;细胞凋亡
中图法分类号:R329.2+5;R282.71 文献标识码:A

Anti-apoptosis effect of ligustrazine on the apoptosis of PC12 cells induced by dopamine

LI Zhi-gang, ZANG Lei, LIU Song-qing (Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the protective effect of ligustrazine on the apoptosis of PC12 cells induced by dopamine (DA) and its mechanisms. **Methods** Apoptosis of PC12 cell was induced by dopamine at the concentrations of 0, 0.30, 0.60 mM. Ligustrazine at the concentrations of 0, 30, 60, 90 μg/ml was added to defect the effect of ligustrazine on apotosis. The subdiploid peaks showing cell apoptosis rate were detected by flow cytometry. The cell activity was determined by MTT. Concentration of nitric oxide (NO) was determined by the Griess reaction. **Results** Compared with those of the control, the apoptosis rate and the level of NO induced by 0.30 or 0.60 mmol/L DA were higher, but the activity of PC12 cells was lower. Compared with those of the groups without ligustrazine, the apoptosis rate and the level of NO increased, but the cell activity decreased in a dose-dependent manner. **Conclusion** Ligustrazine can inhibit the apoptosis induced by DA, which might be correlated with the decrease of NO production.

Key words: PC12 cells; cell apoptosis; nitric oxide; dopamine

川芎嗪(Ligustrazine, Lig)系中药川芎的有效生物碱成分。其具有抗自由基损伤,降低NO产生等多种生物学效果,对多种刺激引起的心脑损伤具有保护作用[1~3]。细胞凋亡是帕金森病(ParkinsonDisease, PD)发病机制中重要的方面[4~6],而氧化应激反应的增强可能是细胞凋亡的常见原因。多巴胺(Dopamine, DA)在代谢过程中产生活性氧、自由基等,这些均可造成黑质DA能神经元损害,引起细胞凋亡[7]。DA引起的神经细胞的凋亡可能与NO的产生有关。为了探讨川芎嗪对神经元细胞的保护作用,本研究拟以大鼠嗜铬细胞瘤细胞株(Pheochromocytoma cells, PC12)为对象,用DA造成细胞凋亡模型,观察不同浓度川芎嗪对PC12细胞的抗凋亡效果。同时通过测定NO水平深入研究川芎嗪抗凋亡作用的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与细胞

盐酸川芎嗪注射液,北京第四制药厂生产(批号990426),用细胞培养液稀释成相应所需浓度。PC12细胞(本室保存),用含10%胎牛血清和10%马血清的DMEM培养液置CO_2培养箱(37 ℃ 5%CO_2)培养,取对数生长期细胞分组进行实验。

1.2 分组及药物处理

依DA加入量分为3组:对照组(Control,无DA)、DA1组(DA1, DA终浓度为0.30 mmol/L)、DA2组(DA2, DA终浓度为0.60 mmol/L)。上述3组再依川芎嗪终浓度分为0、30、60、90 μg/ml 4小组。上述各组均在处理后继续培养24 h,再测定各相关实验指标。

作者简介:李志刚(1969-),男,重庆市荣昌县人,主管药师,主要从事药理学方面的研究。电话:(023)68754442

收稿日期:2002-12-05;修回日期:2003-04-10

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

1.3 细胞凋亡率

各组细胞以PBS洗涤后，用胰酶消化，离心弃去胰酶液，用pH 7.4 PBS液制成单细胞悬液，调整细胞密度为5×10^5/ml。取100 μl样本液中加入500 μl荧光染色液（50 mg/L碘化丙啶，和50 mg/L核糖核酸酶），避光37 ℃孵育30 min，用流式细胞仪采集数据进行亚二倍体峰（即凋亡数）分析，以$G_0\sim G_1$期前特征性亚二倍体峰（subG1）所占比例计算细胞凋亡率。

1.4 MTT法分析

将细胞以150个/孔的密度接种于96孔板，按分组培养处理后，用PBS洗涤，加入20 μl的MTT（5 g/L）37 ℃继续孵育4 h，弃去上清液，每孔加入150 μl二甲亚砜，振荡10 min，以波长570 nm于酶标仪上测吸光度值。

1.5 NO测定

通过测定NO代谢产物NO_2^-的浓度以间接反映其产生量。采用Griess法。收集培养细胞上清液，先加入盐酸（4 mol/L）作用10 min，然后再加入2 mg/ml的对氨基苯磺酸和1 mg/ml N1萘基乙二胺，孵育30 min后置分光光度计中测吸光值（波长546 mm），测定管吸光值以标准管吸光值作参照。

1.6 统计学处理

结果以$\bar{x}\pm s$表示。用SPSS8.0进行处理，均数间显著性检验采用FISD法。

2 结果

2.1 不同浓度Lig对细胞凋亡率的影响

在发生细胞凋亡的细胞中，部分DNA被内源性核酸内切酶降解，降解成为寡核苷酸片段，在流式细胞检测时，在G_0-G_1期之前出现特征性二倍体峰。此峰10 000个细胞中出现的比例，可以反映细胞凋亡率。如表1所示，当未加入Lig时，两种剂量的DA均可引起明显的细胞凋亡，两种剂量的DA组的细胞凋亡率均显著高于对照组。在对照组（未加入DA）以及DA刺激组，随着Lig加入量的增加，细胞凋亡率逐渐降低，加入Lig后的各组细胞凋亡率均较未加入Lig组有显著降低（$P<0.05$）。同时加入DA和Lig的各组，仍较同剂量Lig的对照组（未加DA组）的细胞凋亡率高（$P<0.05$）。

表1 不同浓度川芎嗪对DA引起PC12细胞凋亡率的影响（$\bar{x}\pm s$，%，$n=6$）

Tab 1 Effects of different concentrations of ligustrazine on PC12 cell apoptosis rate induced by dopamine（$\bar{x}\pm s$，%，$n=6$）

Lig-content (μg/ml)	Control (0 mmol/L)	DA1 (0.30 mmol/L)	DA2 (0.60 mmol/L)
0	2.46±0.51	50.19±1.94#	71.56±1.57#
30	1.67±0.62*	25.19±1.77*#	52.38±1.14*#
60	1.44±0.74*	12.36±1.18*#	32.14±1.87*#
90	1.31±0.71*	14.33±1.54*#	33.85±1.69*#

*：$P<0.05$ *vs* "Lig-0 μg/ml" group with same content of DA1

#：$P<0.05$ *vs* control goup with same content of Lig

2.2 不同浓度Lig对细胞活性的影响

细胞线粒体琥珀酸脱氢酶还原四甲基偶氮唑蓝所形成的蓝紫色结晶与增殖的细胞数成正比，因此反映细胞活性。如表2所示，无DA刺激组及两种剂量的DA刺激组的细胞活性，随Lig加入量的增加而增加，加入Lig后的各组细胞活性均较未加入Lig时显著增强（$P<0.05$）。但是加入DA和Lig的各组，仍较同剂量Lig的对照组（未加AD组）的细胞活性低（$P<0.05$）。

表2 不同浓度川芎嗪对DA作用后细胞活性的影响（$n=6$ $\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Effects of different concentrations of ligustrazine on cell activity induced by dopamine（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Lig-content (μg/ml)	Control (0 mmol/L)	DA1 (0.30 mmol/L)	DA2 (0.60 mmol/L)
0	1.43±0.14	0.51±0.09	0.44±0.04
5	1.79±0.21*	0.85±0.11*#	0.65±0.08*#
20	1.92±0.24*	1.17±0.12*#	0.89±0.06*#
50	2.37±0.17*	1.23±0.14*#	1.24±0.13*#

*：$P<0.05$ *vs* "Lig-0 μg/ml" group with same content of DA1

#：$P<0.05$ *vs* control goup with same content of Lig

2.3 不同浓度Lig对NO_2^-产生的影响

培养上清中NO_2^-的浓度间接反映了NO的分泌量。如表3所示，在未加入DA时，各组NO含量并没有显著性差异。无Lig时，在两种剂量DA刺激后细胞培养上清中NO含量均显著高于正常（无DA刺激组）（$P<0.05$）。加Lig后，随着加入量的增加，培养上清中NO含量逐渐降低，各组均较未加入Lig时显著降低（$P<0.05$），但仍显著高于同Lig剂量的对照组（$P<0.05$）。

表3 不同浓度川芎嗪对各组细胞培养液中NO含量的影响（μmol/L $n=6$ $\bar{x}\pm s$）

Tab 3 Effects of different concentrations of ligustrazine on NO level in culture solution in each group（μmol/L $n=6$ $\bar{x}\pm s$）

Lig-content (μg/ml)	Control (0 mmol/L)	DA1 (0.30 mmol/L)	DA2 (0.60 mmol/L)
0	2.05±0.24	9.54±1.14	23.14±1.54
5	2.15±0.66	7.25±1.08*#	19.31±1.64*#
20	2.14±0.51	6.31±0.94*#	12.45±1.99*#
50	2.26±0.43	5.11±0.76*#	8.24±1.32*#

*：$P<0.05$ *vs* "Lig-0 μg/ml" group with same content of DA1

#：$P<0.05$ *vs* control goup with same content of Lig

3 讨论

在中枢神经系统，多巴胺是最重要的神经递质之一，但是其儿茶酚胺基团不稳定，在体内可自动氧化生成活性氧、醌或自由基，进而造成黑质DA能神经元的损害，因此，DA又可能是一种内源性毒素，参与老年性痴呆等疾病的发病过程。PC12细胞是肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系，具有神经元细胞的诸多特征，成为研究神经元细胞常用的细胞模型，是研究PD发病机制的较为理想的细胞模型。文献[8,9]报道，不同浓度DA均可诱导PC12细胞发生凋亡，其细胞凋亡率高达40.60%~64.39%。NO在细胞凋亡中有双重作用，既可以诱

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

导细胞凋亡的发生, 也可以预防其发生, 这与 NO 浓度、细胞内氧化还原状态和细胞特殊类型等多种因素有关。高浓度的 NO 对神经细胞的毒性作用越来越引起人们重视, 它可介导从突触前膜释放的谷氨酸与 NMDA 受体结合, 开放 Ca^{2+} 通道, 促使 Ca^{2+} 内流, 造成神经细胞凋亡; 也能激活细胞凋亡蛋白酶级联反应的关键酶 CPP32, 从而诱导细胞凋亡[10]。实验结果表明, 不同浓度 DA 诱导可以显著增加培养上清中 NO 的含量, 同时细胞凋亡率增加、细胞活性降低。表明 NO 可能参与 PC12 细胞的细胞凋亡过程。韩燕等[8]的研究也证明了这一点。

整体实验表明, 川芎嗪对在缺血再灌注的脑组织有保护作用[11,12], 能增加血浆中 NO 水平[13], 但这可能与其它因素有关, 对视网膜的研究[14]指出其可以对抗缺血再灌注引起的组织中 NO 升高。本实验通过培养的 PC12 细胞模型, 排除了其它因素的影响, 结果表明, 川芎嗪可以剂量依赖性地降低两种剂量 DA 引起的高 NO 水平。同时细胞凋亡率下降、细胞活性回升。表明川芎嗪可以对抗 DA 引起细胞凋亡而且可能与其对抗 DA 引起的 NO 升高有关。但是, 在对照组, 即无 DA 刺激时, 川芎嗪对 NO 的产生没有影响, 对细胞凋亡和细胞活性却有改善作用, 提示川芎嗪的抗细胞凋亡作用还存在其它机制, 其具体细节还有待深入探讨。川芎嗪的在缺血再灌注中的保护作用及其抗细胞凋亡作用提示其对老年痴呆等以 DA 能神经元病理变化为基础的疾病可能有一定的疗效, 但是整体用药药量、药效等还需进一步全面研究。

参考文献:

[1] 王　晖. 急性缺氧状态下川芎嗪对心脑的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(6): 654－656.

[2] 蔡　晨, 韩之勋, 章伏生, 等. 川芎嗪对烫伤豚鼠血管内皮细胞保护作用的实验研究[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2000, (4): 11－14.

[3] 李建生, 李建国, 赵君玫, 等. 川芎嗪和参麦注射液对老龄大鼠脑缺血-再灌注多器官损伤的作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7(5): 289－294.

[4] Tompkins M M, Basgall E J, Zamrini E, *et al*. Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons[J]. Am J Pathol, 1997, 150(1): 119－131.

[5] Anglade P, Vyas S, Javoy A F, *et al*. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease[J]. Histol Histopathol, 1997, 12(1): 25－31.

[6] Mochizuki H, Goto K, Mori H, *et al*. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease[J]. J Neurol Sci, 1996, 137(2): 120－123.

[7] Luo Y, Umegaki H. Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway[J]. J Biol Chem, 1998, 273(6): 3756－3764.

[8] 韩　燕, 陈俊抛, 田时雨, 等. L-dopa 诱导 PC12 细胞凋亡及相关基因表达的实验研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2000, 17(5): 299－301.

[9] 周国庆, 周孝达, 李宁丽, 等. 多巴胺对大鼠嗜铬细胞瘤细胞凋亡的影响[J]. 中华老年医学杂志, 1998, 17(4): 232－234.

[10] Maiese K, Vincent A M. Group I metabotropic receptors down-regulate nitric oxide induced caspase-3 activity in rat hippocampal neurons[J]. Neurosci Lett, 1999, 264(1－3): 17－20.

[11] 汪远金, 申国明, 王钦茂. 川芎嗪对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 安徽中医学院学报, 2000, 19(1): 44－45.

[12] 岑德意, 陈志武, 宋必卫, 等. 川芎嗪对大鼠脑梗塞的保护作用[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(5): 464－466.

[13] 李德洋, 石义亭, 陈玉萍, 等. 川芎嗪对脑梗塞患者脑脊液及血浆中一氧化氮含量的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(6): 342－344.

[14] 施月欢, 邹秀兰. 川芎嗪对大鼠缺血再灌注视网膜 SOD, MD 和 NO 水平及细胞凋亡的影响[J]. 中国眼科杂志, 2002, 20(1): 25－27.

(编辑　陈聪连)

欢迎订阅《中华创伤骨科杂志》

《中华创伤骨科杂志》(CN44-1568/R, ISSN 1671-7600)是国家级创伤骨科学术性期刊, 国内外公开发行。本刊已于 2003 年 4 月 25 日被收录为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)。栏目设置包括: 院士论坛、专家论坛、述评、临床研究(四肢骨、关节、神经、血管、肌肉肌腱、皮肤软组织创伤、脊柱脊髓创伤、骨盆创伤、多发伤、显微外科及手外科等)、微创骨科、基础研究(应用解剖、生物力学、组织工程等)、AO 论坛、研究生园地、研究进展、综述、继续教育、骨科康复、临床经验、研究简报、病例报告、单位推介、名人名家、骨科新书、会议纪要、快讯、学术争鸣等。本刊以骨科、创伤外科及相关学科的临床、教学和科研人员为读者对象。

2004 年开始本刊将改为月刊, A4 开本, 每期 80 页, 105 g 铜版纸印刷, 每月 15 日出版, 每期定价 12 元, 由邮局发行, 国内邮发代码 46-248, 国际 Q1671。本刊编辑部全年接受征订邮购, 全年 168 元(含邮费)。

地址: 广州市广州大道北 1838 号第一军医大学南方医院《中华创伤骨科杂志》编辑部　　邮编: 510515

电话: (020)61641748　　传真: (020)61360066　　E-mail: cjot@fimmu.com

网址: http://www.chinjot.com

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