

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.17.009

杞归八味口服液对鱼藤酮诱导 PC12 细胞损伤的防护作用*

傅若秋, 李 斌, 王显凤, 张 琳, 王林丽, 陈剑鸿[△]

(中国人民解放军陆军军医大学大坪医院药剂科, 重庆 400042)

摘要:目的 探讨杞归八味口服液对鱼藤酮诱导 PC12 细胞损伤的防护作用及作用机制。方法 通过 4 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮作用 PC12 细胞 24 h 构建细胞损伤模型, 将建模成功的细胞分为杞归 1 组、2 组、3 组、4 组、5 组(相当于杞归八味口服液原液的 0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%), 鱼藤酮 1 组、2 组、3 组、4 组、5 组(相当于鱼藤酮 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 $\mu\text{mol/L}$), 另取正常细胞作为空白对照组(水), 各组细胞均予相应药物。采用 CCK-8 检测细胞活性, 并计算细胞存活率; 采用 AnnexinV-FITC/PI 双染及流式细胞术检测细胞凋亡率; 采用蛋白质印迹(Western blotting)法检测聚腺苷二磷酸-核糖多聚酶(PARP)、cleaved-Caspase3(c-Caspase3)、蛋白激酶 B(AKT)、磷酸化 AKT(p-AKT)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化 mTOR(p-mTOR)、c-Jun 氨基端蛋白激酶(JNK)、磷酸化 JNK(p-JNK)、磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)细胞的蛋白表达水平。结果 与空白对照组比较, 杞归 3 组、4 组、5 组的细胞存活率均显著升高, 鱼藤酮 1 组、2 组、3 组、4 组、5 组的细胞存活率均显著降低, 且均呈量效依赖趋势($P < 0.05$); 与鱼藤酮 4 组比较, 杞归 3、4、5 + 鱼藤酮 4 组的细胞存活率均显著升高, 且呈量效依赖趋势($P < 0.01$); 与空白对照组比较, 鱼藤酮 4 组的细胞凋亡率、c-Caspase3 和 p-JNK 蛋白表达水平均显著升高, PARP, p-AKT, p-mTOR 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$); 与鱼藤酮 4 组比较, 杞归 4 + 鱼藤酮 4 组的细胞凋亡率、c-Caspase3 和 p-JNK 蛋白表达水平均显著降低, PARP, p-AKT, p-mTOR 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结论 杞归八味口服液能减轻鱼藤酮对 PC12 细胞的损伤作用, 可能与减弱了鱼藤酮对 AKT/mTOR 及 JNK 信号通路的影响有关。

关键词:杞归八味口服液; 鱼藤酮; PC12 细胞; 凋亡; 神经保护; 蛋白激酶 B; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; c-Jun 氨基端蛋白激酶; 作用机制

中图分类号: R932; R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)17-0030-05

Protective Effect of Qigui Bawei Oral Liquid on PC12 Cell Injury Induced by Rotenone

FU Ruofu, LI Bin, WANG Xianfeng, ZHANG Lin, WANG Linli, CHEN Jianhong

(Department of Pharmacy, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing, China 400042)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of Qigui Bawei Oral Liquid on PC12 cell injury induced by rotenone. **Methods** PC12 cells were induced by 4 $\mu\text{mol/L}$ rotenone for 24 h to construct the cell injury model. The cells successfully modeled were divided into Qigui groups 1, 2, 3, 4, 5 (equivalent to 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.6% and 0.8% of the original solution of Qigui Bawei Oral Liquid), rotenone groups 1, 2, 3, 4, 5 (equivalent to 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 $\mu\text{mol/L}$ of rotenone), and the normal cells were taken as the blank control group (water), all the cells in each group were given corresponding drugs. CCK-8 assay was used to detect cell viability and calculate the cell survival rate. AnnexinV-FITC/PI double staining and flow cytometry were used to detect the apoptosis rate. Western blotting was used to detect the expression levels of poly adenosine diphosphate ribose polymerase (PARP), cleaved Caspase3 (c-Caspase3), protein kinase B (AKT), phosphorylated AKT (p-AKT), mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphorylated mTOR (p-mTOR), c-Jun NH₂-terminal protein kinase (JNK), phosphorylated JNK (p-JNK) cells and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). **Results** Compared with those in the blank control group, the cell survival rates of Qigui groups 3, 4 and 5 significantly increased in a dose-dependent manner, and the cell survival rates of rotenone groups 1, 2, 3, 4 and 5 significantly decreased in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with those in the rotenone group 4, the cell survival rates of Qigui groups 3, 4 and 5 + rotenone group 4 significantly increased in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). Compared with those in the blank control group, the apoptosis rate, the expression levels of c-Caspase3 and p-JNK protein significantly increased, while the expression levels of PARP, p-AKT and p-mTOR protein significantly decreased in the rotenone group 4 ($P < 0.05$). Compared with those in the rotenone group 4, the apoptosis rate, the expression levels of c-Caspase3 and p-JNK protein significantly decreased, while the expression levels of PARP, p-AKT and p-mTOR protein significantly increased in Qigui group 4 + rotenone group 4 ($P < 0.05$). **Conclusion** Qigui Bawei Oral Liquid can reduce the PC12 cell injury induced by rotenone, which may be related to reducing the effects of rotenone on AKT/mTOR and JNK signal pathway.

Key words: Qigui Bawei Oral Liquid; rotenone; PC12 cells; apoptosis; neuroprotection; protein kinase B; mammalian target of rapamycin; c-Jun NH₂-terminal protein kinase; mechanism

*基金项目: 重庆市卫生计生委中医科技项目 [ZY201801004]。

第一作者: 傅若秋, 男, 博士研究生, 主管药师, 研究方向为药物新制剂与药理学, (电子信箱) zxmfrq@163.com。

[△]通信作者: 陈剑鸿, 女, 博士研究生, 主任药师, 研究方向为新药研发与药理学, (电子信箱) chenjh_110@263.net。

神经退行性疾病是中老年人的常见疾病,如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、多发性硬化等^[1],发病原因较复杂,大多机制不明,其共同点为大脑和脊髓的神经元细胞发生病变,出现损伤,常用的治疗策略为对神经元细胞进行保护^[2]。中药及中药单体在调节神经系统、保护神经细胞方面有独特作用,如半夏泻心汤、天麻钩藤饮、槲皮素、花青素等多种中药复方制剂或中药单体均可防护神经细胞免受损伤^[3-6]。杞归八味口服液(曾用名益精灵口服液)为我院特色自制制剂,由何首乌、枸杞子、菟丝子、牛膝、当归、补骨脂、茯苓、陈皮8味中药组方,具有健脑安神、滋补肝肾功效,用于治疗失眠多梦、健忘、腰膝酸软、神疲乏力等症,疗效显著,已在临床使用近30年。其组方中所含甜菜碱、 β -蜕皮甾酮、异鼠李素等活性成分具有神经保护作用^[7-9]。前期研究证实,其具有神经系统调节作用,可抗抑郁和增强小鼠的学习能力^[10]。本研究中探讨了杞归八味口服液对鱼藤酮诱导PC12细胞损伤的防护作用及其作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:3111型CO₂细胞培养箱(美国Thermo公司);GS-15KGS型高速冷冻离心机(美国Beckman公司);CKX41型光学倒置显微镜(日本Olympus公司);165-8001型蛋白电泳仪、转膜槽、Chem I Doc型超高灵敏度化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司);HR30-11A2型生物安全柜(青岛海尔股份有限公司);C6型流式细胞仪(美国BD公司);STNERGYH1型酶标仪(美国Agilent公司)。

试剂:杞归八味口服液(医院制剂,批号为200413);鱼藤酮(美国Selleck公司,批号为S2348);PRIM培养基(美国Hyclone公司,批号为SH30809.01);胎牛血清(天津康源生物技术有限公司,批号为20200408);Western细胞裂解液(批号为P0013),BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号为P0009),胰酶消化液(批号为C02010),均购自上海碧云天生物技术有限公司;细胞凋亡检测试剂盒(美国BD公司,批号为556547);CCK-8试剂盒(美国MCE公司,批号为HY-K0301);辣根酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号为ZB2305);预染蛋白Marker(美国Thermo公司,批号为26619型);蛋白激酶B(AKT)抗体(批号为ab200195),磷酸化AKT(p-AKT)抗体(批号为ab192623),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抗体(批号为ab2723),磷酸化mTOR(p-mTOR)抗体(批号为ab137133),c-Jun氨基端蛋白激酶(JNK)抗体(批号为ab179461),磷酸化JNK(p-JNK)抗体(批号为ab124756),均购自美国Abcam公司;磷酸

甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体(美国CST公司,批号为21185);聚腺苷二磷酸-核糖多聚酶(PARP)抗体(批号为13371-1-AP),cleaved-Caspase3(c-Caspase3)抗体(批号为19677),均购自武汉三鹰生物技术有限公司)。

细胞:鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤PC12细胞株(美国ATCC细胞库,批号为CRL-1721)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

PC12细胞用PRIM培养基(含10%胎牛血清)于37℃、5%CO₂条件下恒温培养箱中培养,隔天传代,取对数生长期细胞进行试验。

1.2.2 CCK-8 试验检测

取对数生长期的PC12细胞,经胰酶消化后得细胞悬液,按(5000个细胞,90 μ L)/孔接种于96孔板中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养24h,加入受试药物10 μ L。药物分组:1)杞归1组、2组、3组、4组、5组(以杞归八味口服液原液浓度为100%计,作用浓度分别为0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%),药物作用24h;2)鱼藤酮1组、2组、3组、4组、5组(相当于鱼藤酮0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μ mol/L),药物作用24h;3)杞归八味口服液联用鱼藤酮:空白对照组(水)、鱼藤酮4组,以及杞归1,2,3,4,5(0.2%、0.4%、0.6%、0.8%)+鱼藤酮4组,先给予杞归八味口服液预处理2h,再给予鱼藤酮作用24h。药物处理结束后,每孔加入CCK-8试剂10 μ L,置培养箱中孵育1h,用酶标仪于450nm波长处检测吸光度,并计算细胞存活率。

1.2.3 流式细胞仪检测

取对数生长期的PC12细胞悬液,按 2.0×10^5 个/孔接种于6孔板中,每孔培养基体积2mL,于37℃、5%CO₂培养箱中培养24h,给予杞归八味口服液及鱼藤酮药液作用24h。胰酶消化后收集于15mL离心管中,800r/min离心5min,弃上清液,用2mL磷酸盐缓冲液(PBS)混悬细胞,800r/min离心5min,弃上清液,加入凋亡检测染色液(含Annexin V-FITC染液2 μ L,PI染液5 μ L, Binding buffer 100 μ L),混匀,室温避光染色15min。用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,并计算凋亡率。

1.2.4 蛋白质印迹(Western blotting)法检测

取对数生长期的PC12细胞悬液,按 2.0×10^6 个/孔接种于100mm培养皿中,每孔培养基10mL,于37℃、5%CO₂培养箱中培养24h,给予杞归八味口服液预处理2h,然后给予鱼藤酮作用24h。提取全细胞蛋白,用BCA法测定蛋白含量。蛋白液中加入 $5 \times$ loading buffer混匀,于98℃加热使蛋白变性。变性后的蛋白样品用聚丙烯酰胺电泳进行分离,分离后的蛋白转至PVDF膜

上,5%脱脂牛奶封闭1 h,加一抗孵育过夜。次日回收一抗,TBST漂洗后于室温下孵育二抗1 h。TBST漂洗后加入发光底物,用凝胶成像系统进行曝光。WB条带用Image J 1.37C软件测量其灰度值,以目的蛋白与内参蛋白的灰度比值作为蛋白表达水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,组间比较行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对PC12细胞存活率的影响

与空白对照组比较,杞归3组、4组、5组的细胞存活率均显著升高,且呈量效依赖趋势($P < 0.05$);鱼藤酮1组、2组、3组、4组、5组的细胞存活率均显著降低,且呈量效依赖趋势($P < 0.01$)。详见表1。

表1 杞归八味口服液及鱼藤酮对PC12细胞存活率的影响
Tab.1 Effects of Qigui Bawei Oral Liquid and rotenone on the survival rate of PC12 cells

组别	浓度 (%)	细胞存活率 ($\bar{X} \pm s, \%$)	组别	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞存活率 ($\bar{X} \pm s, \%$)
空白对照组	0	100.00 $\pm$ 1.25	空白对照组	0	100.00 $\pm$ 1.02
杞归1组	0.1	101.34 $\pm$ 3.44	鱼藤酮1组	0.5	83.72 $\pm$ 3.09 **
杞归2组	0.2	103.81 $\pm$ 1.63	鱼藤酮2组	1.0	70.52 $\pm$ 2.37 **
杞归3组	0.4	106.39 $\pm$ 2.63 *	鱼藤酮3组	2.0	63.72 $\pm$ 1.79 **
杞归4组	0.6	108.34 $\pm$ 2.34 *	鱼藤酮4组	4.0	62.68 $\pm$ 1.49 **
杞归5组	0.8	108.03 $\pm$ 3.81 *	鱼藤酮5组	8.0	57.24 $\pm$ 3.77 **

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with those in the blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2 对鱼藤酮降低PC12细胞存活率的影响

与鱼藤酮4组比较,杞归3、4、5+鱼藤酮4组的细胞存活率均显著升高,且呈量效依赖趋势($P < 0.01$)。可见,联用杞归八味口服液可明显减弱鱼藤酮导致的细胞存活率下降。详见表2。

表2 杞归八味口服液对鱼藤酮降低PC12细胞存活率的影响

Tab.2 Effect of Qigui Bawei Oral Liquid on rotenone reducing the survival rate of PC12 cells

组别	浓度	细胞存活率 ($\bar{X} \pm s, \%$)
空白对照组		100.00 $\pm$ 2.40
鱼藤酮4组	4 $\mu\text{mol/L}$	60.39 $\pm$ 2.92
杞归1+鱼藤酮4组	0.1% + 4 $\mu\text{mol/L}$	61.18 $\pm$ 3.84
杞归2+鱼藤酮4组	0.2% + 4 $\mu\text{mol/L}$	67.98 $\pm$ 6.29
杞归3+鱼藤酮4组	0.4% + 4 $\mu\text{mol/L}$	77.73 $\pm$ 3.33 *
杞归4+鱼藤酮4组	0.6% + 4 $\mu\text{mol/L}$	81.87 $\pm$ 3.25 *
杞归5+鱼藤酮4组	0.8% + 4 $\mu\text{mol/L}$	81.28 $\pm$ 4.97 *

注:与鱼藤酮4组比较,* $P < 0.01$ 。

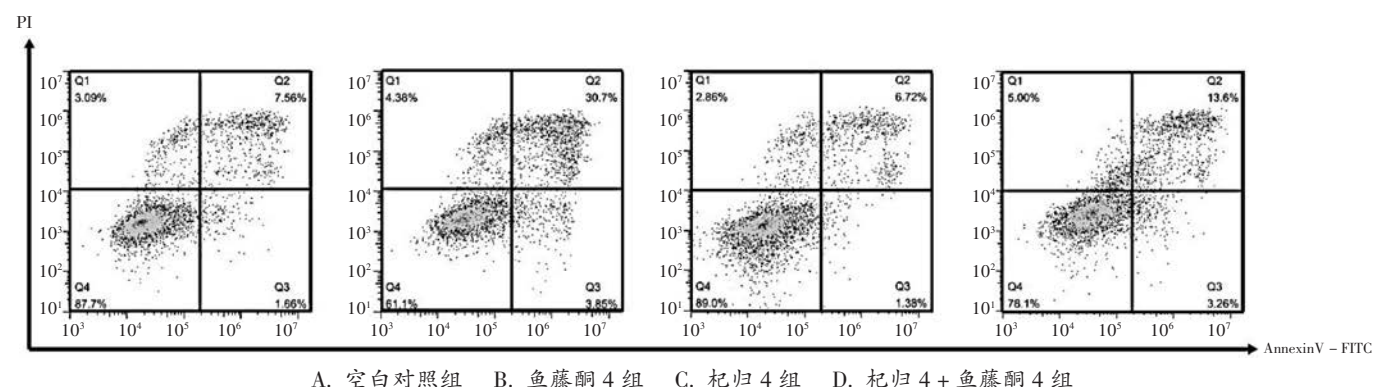
Note: Compared with those in the rotenone group 4, * $P < 0.01$.

2.3 对鱼藤酮诱导细胞凋亡的影响

与空白对照组比较,鱼藤酮组细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$);与鱼藤酮组比较,杞归4+鱼藤酮4组细胞凋亡率显著降低($P < 0.01$)。可见,鱼藤酮能明显诱导PC12细胞凋亡,但杞归八味口服液能阻止鱼藤酮诱导的PC12细胞凋亡。详见图1和表3。

2.4 对鱼藤酮激活凋亡相关蛋白和AKT/mTOR及JNK信号通路的影响

与空白对照组比较,鱼藤酮4组PARP蛋白表达水平显著降低,c-Caspase3蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与鱼藤酮组比较,杞归4+鱼藤酮4组PARP蛋白表达水平显著升高,c-Caspase3蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。可见,鱼藤酮能明显激活凋亡相关蛋白,但联用杞归八味口服液可明显减弱鱼藤酮对凋亡蛋白的激活。与空白对照组比较,鱼藤酮4组p-AKT和p-mTOR蛋白表达水平均显著降低,p-JNK蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与鱼藤酮4组比较,杞归4+鱼藤酮4组p-AKT和p-mTOR蛋白表达水平均显著升高,p-JNK蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。可



A. 空白对照组 B. 鱼藤酮4组 C. 杞归4组 D. 杞归4+鱼藤酮4组

图1 流式细胞仪检测PC12细胞凋亡情况

A. Blank control group B. Rotenone group 4 C. Qigui group 4 D. Qigui group 4 + rotenone group 4

Fig.1 The apoptosis of PC12 cells detected by flow cytometry

表3 细胞凋亡率及蛋白表达水平比较($\bar{X} \pm s$)
Tab.3 Comparison of apoptosis rate and protein expression level($\bar{X} \pm s$)

组别	浓度	细胞凋亡率(%)	PARP/GAPDH	c-Caspase3/GAPDH	p-AKT/AKT	p-mTOR/mTOR	p-JNK/JNK
空白对照组		9.78 ± 2.47	0.347 ± 0.029	0.151 ± 0.031	1.422 ± 0.094	0.431 ± 0.038	0.376 ± 0.071
鱼藤酮4组	4 μmol/L	33.63 ± 2.04**	0.069 ± 0.024*	0.362 ± 0.031**	0.887 ± 0.031**	0.329 ± 0.028*	2.126 ± 0.084**
杞归4组	0.6%	8.51 ± 2.48	0.313 ± 0.023	0.154 ± 0.035	1.400 ± 0.037	0.480 ± 0.042	0.379 ± 0.039
杞归4+鱼藤酮4组	0.6% + 4 μmol/L	17.40 ± 3.34 ^{△△}	0.256 ± 0.038 ^{△△}	0.165 ± 0.031 ^{△△}	1.426 ± 0.057 ^{△△}	0.639 ± 0.076 [△]	1.291 ± 0.062 ^{△△}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与鱼藤酮4组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

Note:Compared with those in the blank control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;compared with those in the rotenone group 4, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$.

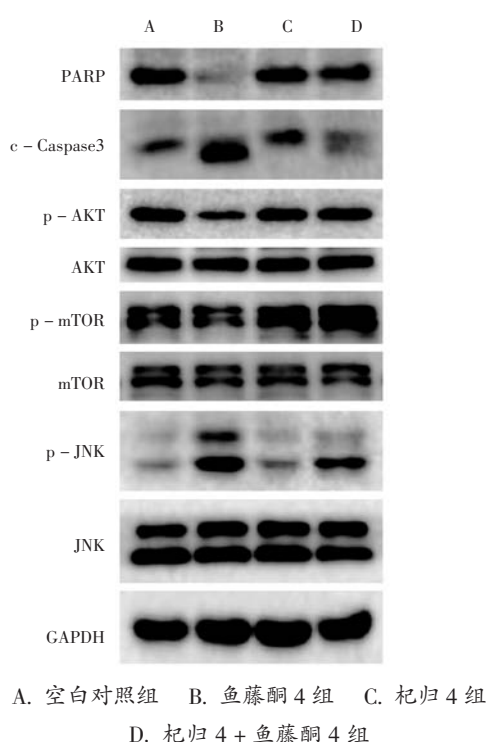


图2 Western blotting 法检测 PC12 细胞的蛋白表达水平

A. Blank control group B. Rotenone group 4 C. Qigui group 4
D. Qigui group 4 + rotenone group 4

Fig.2 The protein expression of PC12 cells detected by Western blotting

见,鱼藤酮抑制了 AKT/mTOR 信号通路,并激活了 JNK 信号,但联用杞归八味口服液可明显减弱鱼藤酮对 AKT/mTOR 及 JNK 信号通路的影响。详见表 3 和图 2。

3 讨论

PC12 细胞是一种大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤细胞株,具有神经内分泌细胞的普遍特征,且可传代,广泛用于神经生理及药理学研究^[11]。鱼藤酮是一种从豆科鱼藤属植物中提取的异黄酮化合物,在农业上作为杀虫剂被广泛使用,因具有较强的神经毒性,也被作为神经细胞损伤的造模药物广泛应用^[12]。在构建鱼藤酮损伤的 PC12 细胞模型中,不同研究者所用的鱼藤酮剂量及作用时间不一致,作用浓度为 0.5 ~ 10 μmol/L,作用时间为 4 ~ 24 h^[13-15],这可能与各实验室所用培养条件、细

胞状态及细胞对药物的敏感度不一致有关。通过前期试验,选择鱼藤酮浓度为 4 μmol/L,作用时间为 24 h,成功构建了 PC12 细胞损伤模型,细胞凋亡率可达 33%,细胞活性下降约 40%。

通过预试验发现,0.5% 及 1.0% 浓度的杞归八味口服液可增强 PC12 细胞的活性,但 2.0% 浓度的杞归八味口服液反而使 PC12 细胞活性降低。进一步考察杞归八味口服液在 0.1% ~ 0.8% 浓度范围内对 PC12 细胞活性的影响,结果发现 0.4% ~ 0.8% 浓度的杞归八味口服液可增强 PC12 细胞的活性,可明显减弱鱼藤酮导致的 PC12 细胞活性下降,且 0.6% 浓度时作用即达到最大,故选择 0.6% 浓度作为后续药理机制研究的作用浓度。

细胞凋亡是细胞死亡的一种常见方式,也是鱼藤酮损伤 PC12 细胞的主要原因^[16]。PARP 蛋白可特异性地识别 DNA 断裂末端并结合,是一种重要的 DNA 修复酶,当凋亡发生时,可被上游的 Caspase-3 剪切降解而丧失 DNA 修复功能^[17]。Caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,通过自身剪切激活后,再催化 PARP 发生降解^[18]。因此,Caspase-3 剪切激活及 PARP 发生降解被认为是凋亡发生的标志^[19]。本试验结果证实,鱼藤酮诱导 PC12 细胞发生凋亡,Wester blotting 试验结果证实,鱼藤酮可导致 PARP 降解(PARP 蛋白表达水平降低)和 Caspase-3 剪切激活(c-Caspase3 蛋白表达水平升高)。同时,杞归八味口服液能减弱鱼藤酮诱导的细胞凋亡,并减弱鱼藤酮导致的 PARP 蛋白表达水平的降低及 c-Caspase3 蛋白表达水平的升高,表明杞归八味口服液减轻了鱼藤酮对 PC12 细胞的损伤作用。

常见的有 PI3K/AKT/mTOR, MAPK(JNK/ERK/P38), STAT3, Wnt/β-catenin, NF-κB 等^[20] 信号通路蛋白参与细胞凋亡的调控。而 AKT/mTOR 通路的抑制及 JNK 信号激活是鱼藤酮导致神经细胞损伤的常见机制^[21-22]。AKT 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,作用广泛,与细胞内许多信号通路有关;mTOR 是 AKT 的下游分子,属于一种不典型的丝氨酸/酪氨酸蛋白激酶。AKT/mTOR 信号通路对维持细胞存活、促进细胞增殖

和生长非常重要。在中枢神经诱导损伤的研究中发现,抑制 AKT/mTOR 通路可加重神经细胞的损伤作用,而激活该通路则可对神经细胞起保护作用^[23]。JNK 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于 MAPK 家族的一员,在细胞凋亡的调控中发挥重要作用,JNK 磷酸化激活后能介导多种细胞(如神经、心肌、肝、肿瘤等)的凋亡反应^[24]。本试验结果显示,鱼藤酮可抑制 AKT/mTOR 信号通路,并激活 JNK 信号;同时发现杞归八味口服液可减弱鱼藤酮对 AKT/mTOR 通路的抑制及对 JNK 的激活作用,表明杞归八味口服液通过 AKT/mTOR 及 JNK 途径保护了 PC12 细胞。

综上所述,杞归八味口服液可减轻鱼藤酮对 PC12 细胞的损伤作用,可能与其减弱了鱼藤酮对 AKT/mTOR 及 JNK 信号通路的影响有关。由于杞归八味口服液成分复杂,其发挥神经保护作用的具体物质基础(有效单体化合物)还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 周洪莉,张 祚,周吉银. GABA 能神经系统与神经退行性病变的研究进展[J]. 中国实用神经疾病杂志,2019,22(1): 86-92.
- [2] PURANIK N, YADAV D, YADAV SK, et al. Proteomics and Neurodegenerative Disorders: Advancements in the Diagnostic Analysis[J]. Curr Protein Pept Sci, 2020, 21(12): 1174-1183.
- [3] 郭园园,郑 琴,胡鹏翼,等. 中药调控能量代谢治疗神经退行性病变的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(11): 1384-1388.
- [4] 王晓丽,崔红霞,李宏铃,等. 天麻钩藤饮含药血清对 MPP⁺ 诱导 PC12 细胞损伤保护作用的研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(6): 10-13.
- [5] 刘 菡,罗永杰. 槲皮苷对帕金森病细胞模型中 PC12 细胞的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(15): 2286-2289.
- [6] 杨丽嫔,朱珍珠,雷 红,等. 花青素对神经退行性疾病保护作用的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2021, 27(2): 40-45.
- [7] IM AR, KIM YH, UDDIN MR, et al. Betaine protects against rotenone-induced neurotoxicity in PC12 cells[J]. Cell Mol Neurobiol, 2013, 33(5): 625-635.
- [8] WEN F, YU J, HE CJ, et al. B-ecdysterone protects against apoptosis by promoting autophagy in nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(3): 2440-2448.
- [9] GUO YQ, WEN TH, CHEN J, et al. The Chinese Herb *Codonopsis pilosula* Isolate Isorhapontigenin protects against oxidative stress injury by inhibiting the activation of PI3K/Akt signaling pathway[J]. J Integr Neurosci, 2020, 19(2): 333-340.
- [10] 王林丽,李卓恒,吕金胜,等. 益精灵口服液的主要药效学研究[J]. 中国药业, 2014, 23(3): 13-14.
- [11] WIATRAC B, KUBIS A, PIWOWAR A, et al. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions[J]. Cells, 2020, 9(4): 958.
- [12] RADAD K, AL-SHRAIM M, AL-EMAM A, et al. Rotenone: from modelling to implication in Parkinson's disease[J]. Folia Neuropathol, 2019, 57(4): 317-326.
- [13] 刘文武,宋 琪,祖宇欣,等. 地骨皮甲素对鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中草药, 2020, 51(24): 6302-6309.
- [14] 谭会洁,宋俊科,石 峰,等. 异鼠李素激活 PI3K/Akt/GSK-3 β /CREB 信号通路减轻鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(2): 272-276.
- [15] BURATTA S, CHIARADIA E, TOGNOLONI A, et al. Effect of Curcumin on Protein Damage Induced by Rotenone in Dopaminergic PC12 Cells[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2761-2774.
- [16] VERMA DK, SINGH DK, GUPTA S, et al. Minocycline diminishes the rotenone induced neurotoxicity and glial activation via suppression of apoptosis, nitrite levels and oxidative stress[J]. Neurotoxicology, 2018, 65: 9-21.
- [17] HENNING RJ, BOURGEOIS M, HARBISON RD. Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and PARP Inhibitors: Mechanisms of Action and Role in Cardiovascular Disorders[J]. Cardiovasc Toxicol, 2018, 18(6): 493-506.
- [18] SHALINI S, DORSTYN L, DAWAR S, et al. Old, new and emerging functions of caspases[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(4): 526-539.
- [19] SAIRANEN T, SIEPESI R, KARJALAINEN-LINDSBERG ML, et al. Neuronal caspase-3 and PARP-1 correlate differentially with apoptosis and necrosis in ischemic human stroke[J]. Acta Neuropathol, 2009, 118(4): 541-552.
- [20] 梁小娜,单 淇,周福军,等. 双氢青蒿素诱导肿瘤细胞凋亡的信号通路研究进展[J]. 药物评价研究, 2019, 42(4): 775-780.
- [21] ZHANG Y, GUO H, GUO XY, et al. Involvement of Akt/mTOR in the Neurotoxicity of Rotenone-Induced Parkinson's Disease Models[J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(20): 3811.
- [22] KAMALDEN TA, JI D, OSBORNE NN. Rotenone-induced death of RGC-5 cells is caspase independent, involves the JNK and p38 pathways and is attenuated by specific green tea flavonoids[J]. Neurochem Res, 2012, 37(5): 1091-1101.
- [23] 匡 巍,余昌胤. 磷脂酰肌醇-3 磷酸激酶/AKT/雷帕霉素靶蛋白信号通路参与中枢神经损伤保护与修复的研究进展[J]. 安徽医药, 2018, 22(2): 215-219.
- [24] 魏 娜,贺海波,张长城,等. JNK 信号通路与细胞凋亡关系的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(7): 807-812.

(收稿日期:2020-04-02)