

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.02.006

黄连素预处理对 6-羟基多巴胺所致 PC12 细胞损伤的影响*

鲍和¹ 王晨^{2Δ} 张津铭³ 王志刚⁴ 逯星竹¹ 郭琪⁵

(1 西安交通大学第二附属医院药学部 陕西 西安 710004; 2 空军军医大学附属唐都医院药剂科 陕西 西安 710038;

3 西安交通大学药学院 陕西 西安 710061; 4 西安交通大学第一附属医院肾内科 陕西 西安 710061;

5 西安交通大学附属广仁医院药剂科 陕西 西安 710004)

摘要 目的:观察黄连素(Berberine, BBR)预处理对 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)诱导的 PC12 细胞的影响,并探讨二型超氧化物歧化酶(Mn-SOD, SOD2)是否介导了 BBR 的保护作用。**方法:**将 PC12 细胞分为 5 组,分别为正常培养的对照组(Control)、25 μ M 的 6-OHDA 损伤组、1 μ M 的 BBR 预处理 24 h 组 (BBR+6-OHDA)、SOD2-siRNA 干扰组 (SOD2-siRNA+BBR+6-OHDA) 和乱序 siRNA 处理组 (SC-siRNA+BBR+6-OHDA), 孵育 24 h 后, 采用噻唑蓝法(Methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT)检测细胞活力,试剂盒检测培养乳酸脱氢酶(Lactic Dehydrogenase, LDH)、细胞内活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)、还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)的含量,使用流式细胞仪检测凋亡率,Western blot 检测 SOD2 和凋亡蛋白 Cleaved caspase-3 的表达。**结果:**与 Control 组相比,6-OHDA 诱导 PC12 细胞 24 h 后, 细胞活力显著降低,SOD2 表达、GSH 和 CAT 的含量明显减少, 培养基上清液 LDH 活力、细胞凋亡率、Cleaved caspase-3 表达和 ROS 水平显著增加 ($P<0.05$), 而 BBR 预处理可显著恢复 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞活力、SOD2 表达、GSH 和 CAT 水平,并降低细胞凋亡率、凋亡蛋白表达和细胞 ROS 水平($P<0.05$),而 SOD2-siRNA 显著逆转了 BBR 预处理产生的上述保护作用($P<0.05$),SC-siRNA 则未对 BBR 预处理产生的上述作用造成明显影响($P>0.05$)。**结论:**黄连素预处理可减轻 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞损伤,而 SOD2 分子介导了 BBR 预处理对暴露于 6-OHDA 的 PC12 细胞的保护作用。

关键词:黄连素;预处理;二型超氧化物歧化酶;PC12 细胞;帕金森病

中图分类号:R-33;R742.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)02-231-06

Effects of Berberine Preconditioning on PC12 Cells Exposed to 6-OHDA*

BAO He¹, WANG Chen^{2Δ}, ZHANG Jin-ming³, WANG Zhi-gang⁴, LU Xing-zhu¹, GUO Qi⁵

(1 Department of Pharmacology, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

2 Department of Pharmacology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

3 School of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

4 Department of Nephrology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

5 Department of Pharmacology, Guangren Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of berberine (BBR) preconditioning on the PC12 cells exposed to 6-hydroxydopamine (6-OHDA), and investigate whether type 2 superoxide dismutase (SOD2) is involved in the protective effect of BBR. **Methods:** PC12 cells were divided into 5 groups, including the normal cultured control group, 25 μ M 6-OHDA injury group (6-OHDA), 1 μ M BBR preconditioning for 24 h group (BBR+6-OHDA), SOD2-siRNA interfering group (SOD2-siRNA+BBR+6-OHDA) and scrambled siRNA treatment group (SC-siRNA+BBR+6-OHDA), after 24-h incubation, methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) was used to assess cell viability, reagent kits were taken to evaluate lactic dehydrogenase (LDH), intracellular reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH) and catalase (CAT) levels, flow cytometry was used to measure cell apoptosis rate, and western blot was taken to evaluate SOD2 and cleaved caspase-3 expression. **Results:** Compared with the control group, 6-OHDA exposure for 24 h significantly reduced the cell viability, markedly decreased the SOD2 protein expression, intracellular GSH and CAT levels, meanwhile, increased LDH activity in the medium, up-regulated cell apoptosis rate and intracellular ROS level ($P<0.05$); however, the BBR preconditioning restored cell viability, SOD2 expression, intracellular GSH and CAT levels, and decreased LDH release, cell apoptosis, cleaved caspase-3 expression and ROS levels ($P<0.05$); however, SOD2-siRNA reversed the BBR preconditioning-induced cytoprotective effects ($P<0.05$), but the SC-siRNA did not induce significant effects on the BBR preconditioning-induced effects mentioned above ($P>0.05$). **Conclusion:** BBR preconditioning reduces 6-OHDA-induced injury in PC12 cells, and SOD2 mediates BBR preconditioning-induced protection in PC12 cells exposed to 6-OHDA.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(8170644)

作者简介:鲍和(1985-),男,硕士,主管药师,主要研究方向:神经保护药物,E-mail: baohexjtu@163.com

Δ 通讯作者:王晨,女,主管药师,主要研究方向:神经损伤机制,E-mail: foxx911@163.com,电话:13991291955

(收稿日期:2019-04-28 接受日期:2019-05-24)

Key words: Berberine; Preconditioning; SOD2; PC12 cells; Parkinson's disease

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R742.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)02-231-06

前言

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种好发于 65 岁以上老年人的慢性神经退行性疾病,以中脑黑质纹状体中的多巴胺能神经元进行性凋亡,继而引起脑内多巴胺释放减少为特点,以运动迟缓、肌强直和静止震颤为主要临床症状^[1-4],目前,治疗 PD 以左旋多巴(L-DOPA)等药物替代治疗为主,临床上很难彻底逆转 PD 的发生发展过程^[5-7]。

黄连素(Berberine, BBR)是一种提取于黄连和黄柏等中药的一种生物活性物质,临床上常用于治疗细菌性胃肠炎。现代医学表明 BBR 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤和抑制神经退行性疾病发生发展的作用^[8-11]。最新研究表明 BBR 可减轻 PD 的发生与发展,但其详细作用机制尚不清楚^[12-14]。因此,在本研究中,我们以 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)作用于 PC12 细胞,模拟 PD 患者多巴胺能神经元的损伤^[15-17],使用 BBR 预处理细胞,观察 BBR 预处理对 6-OHDA 所致 PC12 细胞损伤的保护作用,并探讨二型超氧化物歧化酶(Mn-SOD, SOD2)是否介导了 BBR 预处理 PC12 细胞产生的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

PC12 细胞获赠于空军军医大学基础医学院, BBR、6-OHDA、噻唑蓝 (methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT)、DMEM 培养基、神经生长因子 (Nerve Growth Factor, NGF) 和胎牛血清购自美国 Sigma-Aldrich 公司, SOD2 和 Cleaved Caspase-3 一抗购自美国 Santa Cruz 公司,乳酸脱氢酶 (Lactic Dehydrogenase, LDH)、还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 和过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 检测试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。

1.2 细胞诱导分化及分组处理

PC12 细胞的培养基含 10 % 胎牛血清和 90 % 的 DMEM 培养基,培养基内含 100 U/mL 的青霉素和 100 μ g/mL 的链霉素,培养箱内温度为 37 $^{\circ}$ C,箱内空气含 95 % 空气和 5 % 的 CO₂。PC12 细胞分化:将 PC12 细胞在含 1 % 胎牛血清、100 U/mL 的青霉素、100 μ g/mL 的链霉素和 100 ng/mL 的 NGF 的 DMEM 培养基中孵育 3 天,待 PC12 细胞分化为神经元样细胞后,进行后续实验。

首先,为观察不同浓度 BBR 预处理的毒性,将 PC12 细胞分为 5 组,分别为正常培养的 Control 组和 0.1、1、10 和 100 μ M 的 4 个 BBR 暴露组,孵育 24 h 后,检测细胞损伤。随后,为寻找适宜 BBR 预处理浓度,将 PC12 细胞分为 6 组,分别为 Control 组、25 μ M 的 6-OHDA 损伤组和 0.1、1、10 和 100 μ M 的 4 个 BBR 预处理组, BBR 预处理 24 h 后,各组更换正常培养基或含 25 μ M 的 6-OHDA 的培养基,暴露 24 h 后,进行检测。

为进一步探索 SOD2 分子在 BBR 预处理 PC12 细胞中的

作用,将细胞分为 5 组,分别为对照组(Control):正常培养; 6-OHDA 损伤组:25 μ M 的 6-OHDA 损伤细胞 24 h; BBR+6-OHDA 组:1 μ M 的 BBR 预处理 24 h,再用 25 μ M 的 6-OHDA 损伤细胞 24 h; SOD2-siRNA+BBR+6-OHDA 组: SOD2-siRNA 处理细胞 6 h 后,使用 1 μ M 的 BBR 预处理 24 h,再用 25 μ M 的 6-OHDA 损伤细胞 24 h; SC-siRNA+BBR+6-OHDA 组:乱序 siRNA 处理 6 h,使用 1 μ M 的 BBR 预处理 24 h,再用 25 μ M 的 6-OHDA 损伤细胞 24 h,随后,进行检测。

1.3 细胞活力检测

将细胞接种于 96 孔细胞培养板,密度为 1×10^5 个/孔,处理完毕后,每孔加入 MTT 溶液 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 6 h 后,吸掉上层培养基,每孔内加入 150 μ L 的二甲基亚砜,震荡混匀 10 min 后,取 1 空白孔内加去离子水 150 μ L 作对照,使用分光光度计(TECAN, 瑞士)在 490 nm 波长处检测各孔吸光度。

1.4 培养基 LDH、胞内 GSH 和 CAT 检测

将细胞接种于 24 孔细胞培养板,密度为 1×10^5 个/孔,处理完毕后,吸取每孔内培养基上清液 50 μ L 离心,随后,取离心后的上清液 20 μ L 或培养板内细胞,根据试剂盒说明,分别检测培养基 LDH 或胞内 GSH 和 CAT 水平。

1.5 Western Blot 检测

将细胞接种于 6 孔细胞培养板,细胞诱导分化并处理完毕后,每孔内加入 600 μ L 细胞裂解液(Beyotime, 中国),培养板冰上裂解 10 min 后,将板内细胞用细胞刮刮下并收集于离心管内,低温(4 $^{\circ}$ C)离心 5 min 后,收集管内的蛋白上清液,使用 Bradford 法进行蛋白定量。随后,蛋白液经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至聚偏氟乙烯膜,再用 5 % 脱脂奶粉封闭膜上的非特异性抗原,4 $^{\circ}$ C 过夜。加入兔抗小鼠一抗 (SOD2 和 Cleaved Caspase-3, 1:250 稀释),在细胞培养箱内孵育 6 h 后,加入山羊抗兔二抗(1:500 稀释,世纪康为, 中国),4 $^{\circ}$ C 孵育 12 h 后,化学发光法显色,采用凝胶成像系统(Bio-Rad, 美国)量化图像,以 β -actin 作为内参,量化各条带。

1.6 siRNA 干扰

将 PC12 细胞接种于 6 孔培养板内,细胞密度为 2×10^6 个/孔,次日,采用 SOD2-siRNA 干扰试剂盒或乱序(SC)-siRNA (TriFECTa Dicer-Substrate), 37 $^{\circ}$ C 孵育 6 h 后,采用 Western blot 检测 SOD2 蛋白下调程度,评价干扰效果。

1.7 细胞凋亡率检测

将细胞接种于 6 孔细胞培养板,密度为 5×10^6 个/孔,处理完毕后,每孔内加入 1 mL 胰蛋白酶,37 $^{\circ}$ C 消化 1 min 后,加入无血清 DMEM 培养基,吹打细胞成悬液,体积为每孔 5 mL,使用 Annexin V 标记悬浮细胞后,使用流式细胞仪(BD, 美国),检测各组细胞凋亡率。

1.8 胞内 ROS 检测

接种细胞于 6 孔板内,密度为 2×10^6 个/孔,处理完毕后,使用含 10 μ M 的 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐的无血清培养基,常温避光孵育 10 min,随后,使用磷酸盐缓冲液,避光清洗 3 次

后,再使用荧光显微镜(Leica DMI6000B,德国)随机选取视野并拍照,并计算各组细胞荧光强度。

1.9 统计学分析

实验数据采用 SPSS22.0(SPSS,美国)软件处理,所有实验数据采用均数 标准差(Means SD)表示,组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA)的 Tukey 多重比较(Tukey's Multiple Comparison)进行分析,以 $P<0.05$ 代表具有统计学差异。

2 结果

2.1 BBR 预处理减轻 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞损伤

为寻找适宜的 BBR 预处理浓度,我们将 PC12 细胞分为 5 组,分别为正常培养的 Control 组和 4 个不同浓度 BBR (0.1、1、10 和 100 μM) 预处理组,24 h 后,检测细胞活力和培养基 LDH 浓度,结果显示(图 1A-B):与 Control 组相比,0.1、1 和 10 μM 的 BBR 未对细胞活力和 LDH 释放产生显著影响 ($P>0.05$),而

100 μM 的 BBR 可显著降低细胞活力,并增加 LDH 释放($P<0.05$),表明 100 μM 的 BBR 预处理 24 h 可对 PC12 细胞产生细胞毒性。

随后,我们将细胞分为 6 组,分别为正常培养的 Control 组、25 μM 的 6-OHDA 损伤组和 4 个不同浓度 BBR (0.1、1、10 和 100 μM) 预处理组,Control 组正常培养,6-OHDA 损伤组经 25 μM 的 6-OHDA 暴露 24 h,4 个 BBR 预处理组经不同浓度 BBR 预处理 24 h 后,更换含浓度为 25 μM 的 6-OHDA 处理 24 h,随后检测细胞活力和 LDH 释放。结果显示(图 1C-D):与 Control 组相比,6-OHDA 可显著降低细胞活力、并增加 LDH 释放($P<0.05$),而 1 和 10 μM 的 BBR 预处理,可改善细胞活力,并降低 LDH 释放($P<0.05$),表明 1 和 10 μM 的 BBR 预处理可减轻 6-OHDA 的细胞毒性,产生细胞保护作用。因此,我们选取 1 μM 的 BBR 进行后续试验。

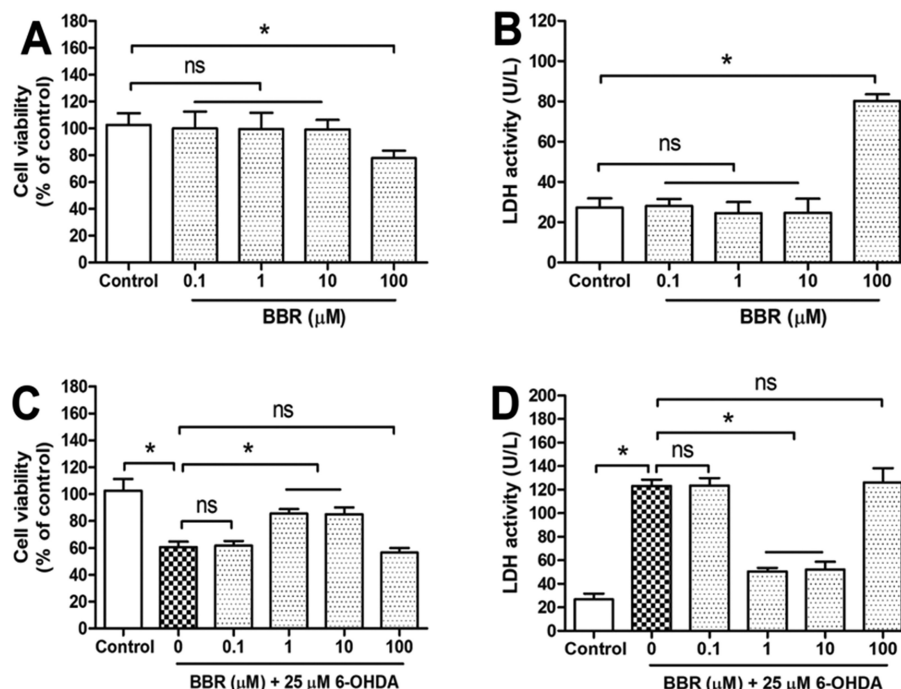


图 1 不同浓度 BBR 预处理的毒性分析和对 6-OHDA 所致 PC12 细胞损伤的影响

Fig.1 Effects of different doses of BBR preconditioning on cytotoxicity and cell injury induced by 6-OHDA in PC12 cells

Note: A: Different doses of BBR preconditioning on cell viability, $n=8$; B: Different doses of BBR preconditioning on LDH release, $n=8$; C: Different doses of BBR preconditioning on cell viability of PC12 cells exposed to 6-OHDA, $n=8$; D: Different doses of BBR preconditioning on LDH release of PC12 cells exposed to 6-OHDA, $n=8$; Data are expressed as means $\pm$ SD. * $P<0.05$; ns no significance.

2.2 SOD2-siRNA 逆转 BBR 预处理对 PC12 细胞的保护作用

为研究 SOD2 分子在 BBR 预处理产生神经保护中的作用,我们使用了 SOD2-siRNA 干扰细胞 SOD2 蛋白表达(图 2A),结果显示:与 Control 组相比,SOD2-siRNA 可显著下调 SOD2 蛋白表达($P<0.05$),而乱序 siRNA(SC-siRNA)未对细胞 SOD2 表达产生显著影响($P>0.05$),表明 SOD2-siRNA 干扰有效。随后,我们将细胞分为 5 组,分别为 Control 组、25 μM 的 6-OHDA 损伤组、BBR 预处理组(BBR+6-OHDA)、SOD2-siRNA 干扰组 (SOD2-siRNA+BBR+6-OHDA) 和乱组 siRNA 组 (SC-siRNA+BBR+6-OHDA),处理完毕后,与 Control 组相比(图

2B-C),6-OHDA 组细胞活力显著降低、培养基 LDH 释放量明显增加,SOD2 蛋白表达显著降低($P<0.05$);而与 6-OHDA 组相比,BBR+6-OHDA 组细胞活力明显增加、LDH 释放量显著降低,SOD2 表达明显增加 ($P<0.05$);SOD2-siRNA 可显著逆转 BBR 预处理产生的上述保护作用($P<0.05$),而 SC-siRNA 未对 BBR 产生的保护作用造成明显影响($P>0.05$),以上结果表明,SOD2 分子可能介导了 BBR 预处理在 PC12 细胞产生的保护作用。

2.3 SOD2-siRNA 逆转了 BBR 预处理对 PC12 细胞凋亡的降低作用

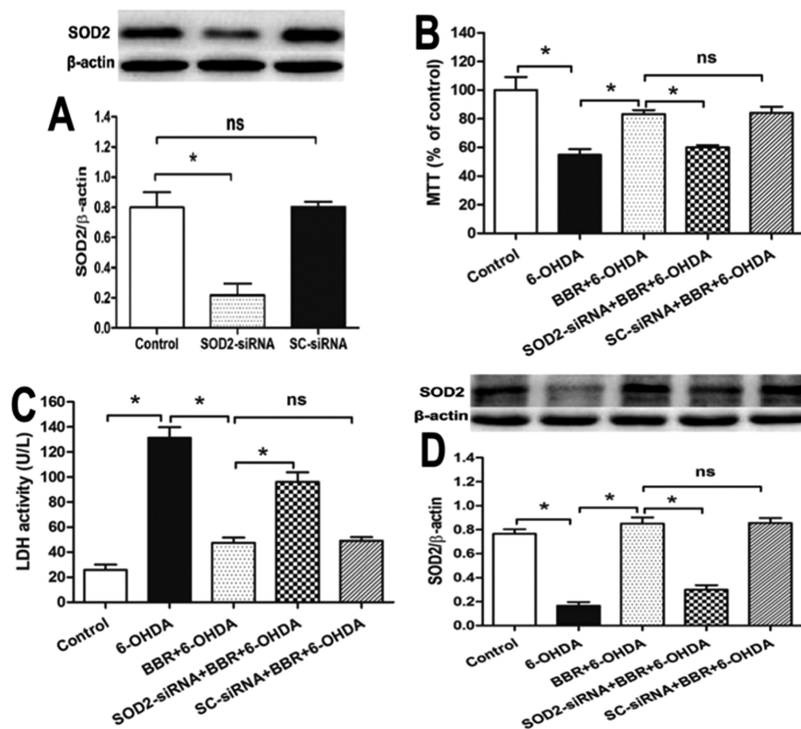


图2 SOD2-siRNA 逆转了 BBR 预处理对 -OHDA 所致 PC12 细胞损伤和 SOD2 表达的影响

Fig.2 SOD2-siRNA reversed BBR-induced effects on PC12 cells injury and SOD2 protein expression

Note: A: SOD2-siRNA reduced SOD2 protein expression, n=4; B-C: SOD2-siRNA reversed BBR-induced effects on cell viability and LDH release, n=8; D: SOD2-siRNA reversed BBR-induced effects on SOD2 expression, n=4; Data are expressed as means± SD. * $P < 0.05$; ns no significance.

为探讨 SOD2 分子在 BBR 预处理产生抗凋亡中的作用,我们检测了细胞凋亡率和凋亡相关蛋白 Cleaved caspase-3 表达,将细胞分为 5 组,分别为 Control 组、25 μ M 的 6-OHDA 损伤组、BBR 预处理组 (BBR+6-OHDA)、SOD2-siRNA 干扰组 (SOD2-siRNA+BBR+6-OHDA) 和乱组 siRNA 组 (SC-siRNA+BBR+6-OHDA),结果显示:与 Control 组相比,6-OHDA 可显著增加细胞凋亡率和 Cleaved caspase-3 蛋白表达 ($P < 0.05$),而 BBR 预处理明显降低了暴露于 6-OHDA 中的细胞凋亡率和 Cleaved caspase-3 表达 ($P < 0.05$),SOD2-siRNA 显著逆转了 BBR 预处理产生的抗凋亡作用 ($P < 0.05$),而 SC-siRNA 未对 BBR 产生的抗凋亡作用产生明显抑制 ($P > 0.05$)。以上结果表明:SOD2 分子可能介导了 BBR 预处理对 PC12 细胞产生抗凋亡作用。

2.4 SOD2-siRNA 逆转了 BBR 预处理对 PC12 内 ROS、GSH 和 CAT 的影响

为探讨 SOD2 对 BBR 预处理后的 PC12 细胞内氧自由基 (ROS)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 和过氧化氢酶 (CAT) 含量的影响,我们将细胞分为 5 组,具体分组及处理同上,并检测细胞内 ROS、GSH 和 CAT 水平,结果显示:与 Control 组相比,25 μ M 的 6-OHDA 处理 24 h,可显著增加细胞内 ROS 水平,并降低细胞内 GSH 和 CAT 的含量 ($P < 0.05$);与 6-OHDA 组相比,BBR 可显著降低细胞内 ROS 水平,并增加 GSH 和 CAT 含量 ($P < 0.05$),而 SOD2-siRNA 则显著逆转了 BBR 预处理对细胞内 ROS、GSH 和 CAT 含量的影响 ($P < 0.05$),SC-siRNA 未对 BBR 产生的上述作用形成显著干扰 ($P > 0.05$)。以上结果表明:SOD2 分子介导了 BBR 预处理对暴露于 6-OHDA 中 PC12 细胞的保护作用。

3 讨论

帕金森病(PD)是一种临床常见的神经退行性疾病,其主要临床表现为运动迟缓、肌肉强直和静止性震颤。PD 患者一旦发展至后期,生活将不能自理,需专人照顾,给患者和家人造成沉重的经济负担。2016 年,全球 PD 患者已达 610 万人^[18],我国是人口大国,人口老龄化正不断加快,罹患 PD 的人数将逐年增加。因此,防治 PD 需要得到更多关注。目前,控制 PD 的药物主要有左旋多巴、多巴胺受体激动剂、单胺氧化酶抑制剂等,但长期应用会使患者出现恶心呕吐、食欲不振、心动过速和失眠等^[19-21]。PD 的手术治疗主要包括神经核团毁损和深部脑刺激等^[22-24],但手术治疗创伤明显且价格高昂,且疗效不确定。因此,亟待寻找防治 PD 的新方法。

BBR 是富含在中药黄连、黄柏和三颗针内的一种生物活性物质,常被应用于治疗细菌性腹泻。研究显示,BBR 具有抗氧化、抗炎、减轻组织缺血和神经保护等作用。最新研究表明 BBR 可缓解 PD 患者症状,并可在动物模型中减轻 6-OHDA 所引起的黑质纹状体神经元损伤,但 BBR 防治 PD 的详细机制尚不清楚。由于 PD 的重要损伤机制是神经元的氧化应激损伤和神经元线粒体功能异常,而氧化应激损伤在 6-OHDA 所引起的神经元损伤模型中也起重要作用。因此,在本研究中,我们观察了表达于线粒体的 SOD2 分子在 BBR 预处理产生神经保护中的作用。预处理指的是在损伤性刺激作用于细胞、组织或机体之前,预先给予亚致死性刺激,继而减轻随后的致死剂量刺激对细胞、组织或机体损伤程度的现象。该现象最早于 Murry 在狗的肝脏缺血损伤实验中发现^[25],继而在身体其他组织和器

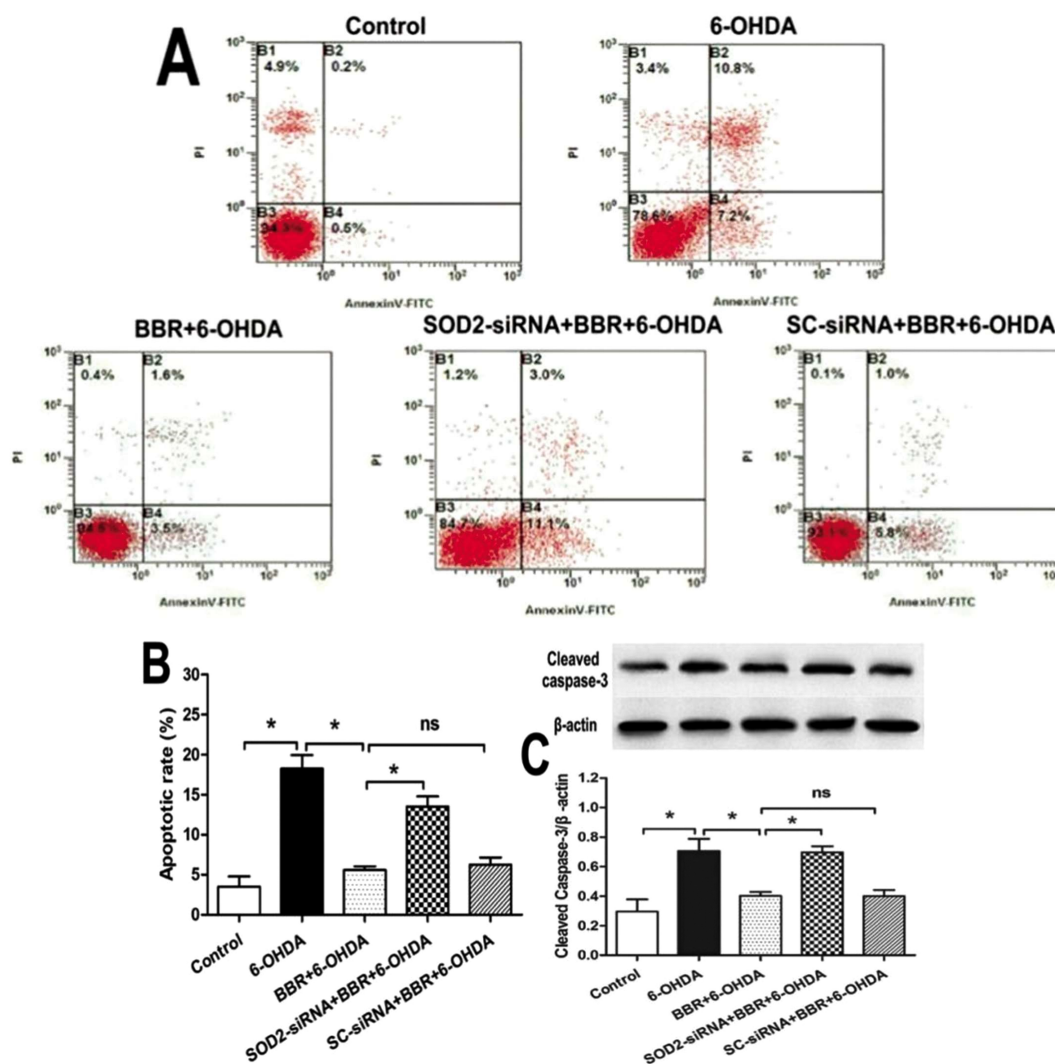


图3 SOD2-siRNA 逆转了 BBR 预处理对 6-OHDA 所致 PC12 细胞凋亡和 Cleaved caspase-3 表达的影响

Fig.3 SOD2-siRNA reversed BBR-induced effects on apoptosis and SOD2 expression in PC12 cells exposed to 6-OHDA

Note: A: Flow cytometry results of apoptotic PC12 cells; B: SOD2-siRNA reversed BBR-induced effects on apoptosis, n=6; C: SOD2-siRNA reversed BBR-induced effects on SOD2 expression, n=4; Data are expressed as means $\pm$ SD. * $P < 0.05$; ns no significance.

官(如脑、肾脏和肝脏等)广泛发现了预处理现象的存在^[26]。在本研究中,我们使用 6-OHDA 损伤 PC12 细胞模拟 PD 中的神经元损伤,使用 BBR 预处理 24 h 后,再给予 6-OHDA 损伤细胞,我们发现细胞损伤程度显著减轻,凋亡程度和凋亡蛋白表达明显降低,细胞内的氧化物 ROS 减少,同时抗氧化物 GSH 和 CAT 含量显著恢复,而细胞 SOD2 下调后,BBR 预处理产生的神经保护作用 and 抗氧化作用被逆转,表明 BBR 预处理在 PC12 细胞产生的保护作用,可能通过 SOD2 分子介导。SOD 是一个分子家族,除分布于线粒体的 SOD2 外,SOD1 分布于细胞质内,SOD3 分布在组织间隙^[27,28],由于本研究仅使用了细胞,且 6-OHDA 所引起的神经细胞损伤广泛存在线粒体的氧化应激损伤。因此,我们观察了 SOD2 分子在 BBR 产生保护机制中的作用。另有学者研究发现 BBR 可减轻 6-OHDA 对 PC12 细胞和斑马鱼产生的神经毒性,其机制主要是激活了神经细胞的 PI3K/AKT/BCL2 通路^[29]。另有研究表明 BBR 可减轻谷氨酸对 PC12 细胞产生的氧化应激损伤^[30]。但目前尚未有 SOD2 分子介导 BBR 产生抗氧化应激损伤的报道。然而,本研究还有一些不足之处。首先,我们使用的 PC12 细胞,是一种大鼠嗜铬细胞

瘤细胞系,虽然可通过 NGF 诱导成神经元样细胞,但该细胞并非原代培养神经元,因此,本研所得结论还需要在原代培养神经元中验证。其次,PD 除有神经元细胞损伤外,还伴有胶质细胞活化和炎症反应,BBR 产生的抑制 PD 损伤的作用是否还有其他机制参与,也需要在在体实验和临床研究中进一步探讨。

综上,本研究结果表明 BBR 预处理可显著减轻 6-OHDA 所致 PC12 细胞损伤,SOD2 可能介导了 BBR 产生的上述保护作用。

参考文献(References)

- [1] Harding Z, Wilkinson T, Stevenson A, et al. Identifying Parkinson's disease and parkinsonism cases using routinely collected healthcare data: A systematic review[J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0198736
- [2] Suppa A, Bologna M, Conte A, et al. The effect of L-dopa in Parkinson's disease as revealed by neurophysiological studies of motor and sensory functions [J]. Expert Rev Neurother, 2017, 17(2): 181-192
- [3] Grover T, Georgiev D, Kalliola R, et al. Effect of Low versus High Frequency Subthalamic Deep Brain Stimulation on Speech h

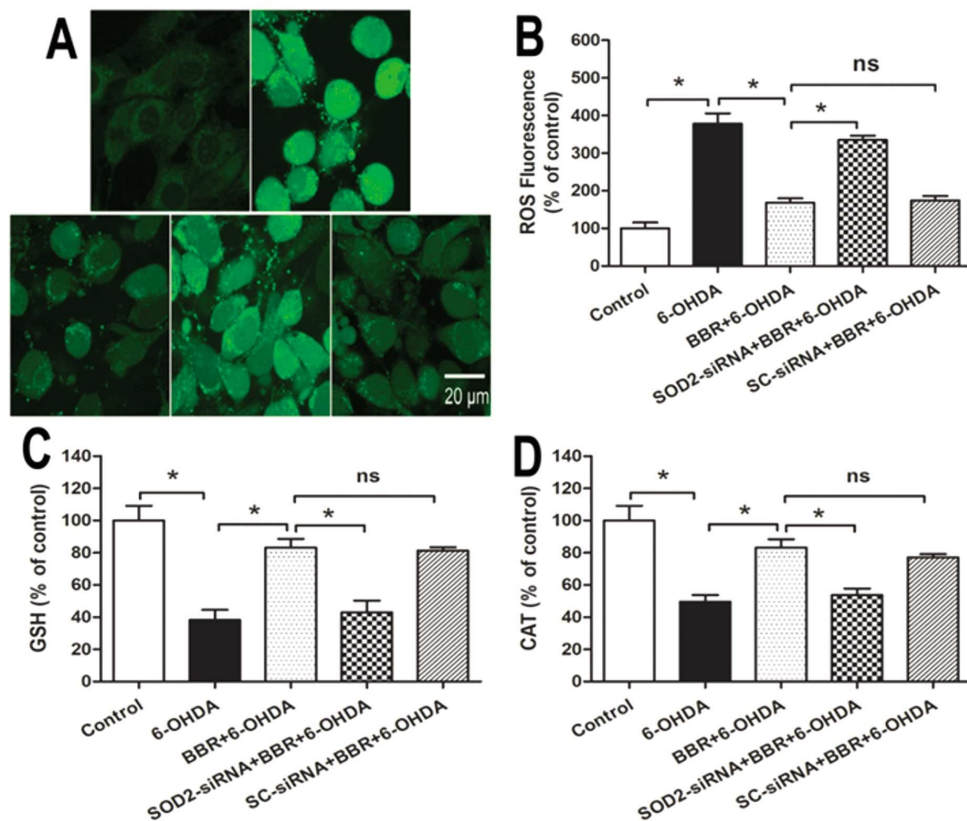


图4 SOD2-siRNA 逆转了 BBR 预处理对 PC12 细胞内 ROS、GSH 和 CAT 水平的影响

Fig.4 SOD2-siRNA reversed BBR-induced effects on intracellular ROS, GSH and CAT in PC12 cells

Note: A: ROS fluorescence photos results of PC12 cells; B: SOD2-siRNA reversed BBR-induced effects on ROS, n=6; C-D: SOD2-siRNA reversed BBR-induced effects on GSH and CAT, n=6; Data are expressed as means $\pm$ SD. * $P < 0.05$; ns no significance.

- Intelligibility and Verbal Fluency in Parkinson's Disease: A Double-Blind Study[J]. *J Parkinsons Dis*, 2019, 9(1): 141-151
- [4] Nonnekes J, Nieuwboer A. Towards Personalized Rehabilitation for Gait Impairments in Parkinson's Disease[J]. *J Parkinsons Dis*, 2018, 8 (s1): S101-S106
- [5] Lin MM, Laureno R. Less Pulsatile Levodopa Therapy (6 Doses Daily) Is Associated with a Reduced Incidence of Dyskinesia [J]. *J Mov Disord*, 2019, 12(1): 37-42
- [6] Reich SG, Savitt JM. Parkinson's Disease [J]. *Med Clin North Am*, 2019, 103(2): 337-350
- [7] Pessoa RR, Moro A, Munhoz RP, et al. Apomorphine in the treatment of Parkinson's disease: a review[J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2018, 76(12): 840-848
- [8] Liu YM, Niu L, Wang LL, et al. Berberine attenuates depressive-like behaviors by suppressing neuro-inflammation in stressed mice [J]. *Brain Res Bull*, 2017, 134: 220-227
- [9] Chen DL, Yang KY. Berberine Alleviates Oxidative Stress in Islets of Diabetic Mice by Inhibiting miR-106b Expression and Up-Regulating SIRT1[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(12): 4349-4357
- [10] Dai W, Mu L, Cui Y, et al. Berberine Promotes Apoptosis of Colorectal Cancer via Regulation of the Long Non-Coding RNA (lncRNA) Cancer Susceptibility Candidate 2 (CASC2)/AU-Binding Factor 1 (AUF1)/B-Cell CLL/Lymphoma 2 (Bcl-2) Axis[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 730-738
- [11] Jiang W, Li S, Li X. Therapeutic potential of berberine against neurodegenerative diseases [J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58 (6): 564-569
- [12] Friedemann T, Ying Y, Wang W, et al. Neuroprotective Effect of *Coptis chinensis* in MPP [Formula: see text] and MPTP-Induced Parkinson's Disease Models[J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(5): 907-925
- [13] Xiao CW, Ji QA, Wei Q, et al. Digital gene expression analysis of *Microsporium canis* exposed to berberine chloride [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124265
- [14] Kim M, Cho KH, Shin MS, et al. Berberine prevents nigrostriatal dopaminergic neuronal loss and suppresses hippocampal apoptosis in mice with Parkinson's disease[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(4): 870-878
- [15] Real CC, Garcia PC, Britto LRG. Treadmill Exercise Prevents Increase of Neuroinflammation Markers Involved in the Dopaminergic Damage of the 6-OHDA Parkinson's Disease Model[J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 63(1): 36-49
- [16] Ferrazzo S, Gunduz-Cinar O, Stefanova N, et al. Increased anxiety-like behavior following circuit-specific catecholamine denervation in mice[J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 125: 55-66
- [17] Casarrubea M, Di Giovanni G, Crescimanno G, et al. Effects of Substantia Nigra pars compacta lesion on the behavioral sequencing in the 6-OHDA model of Parkinson's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 362: 28-35

- activation of GSK3 β promotes tau phosphorylation and impairs memory in type 2 diabetes[J]. *Neurobiol Aging*, 2017, 57: 75-83
- [6] 刘春翠. 糖尿病周围神经病发病机制及治疗现状[J]. *实用医院临床杂志*, 2006, (01): 90-92
- [7] 彭郁, 李莱, 刘冰, 等. 亚麻木酚素提取技术及其检测方法的研究进展[J]. *食品工业*, 2016, 37(05): 242-245
- [8] Socrier L, Quero A, Verdu M, et al. Flax phenolic compounds as inhibitors of lipid oxidation: Elucidation of their mechanisms of action[J]. *Food Chem*, 2019, 274: 651-658
- [9] Zhang M, Zhang L, Hu J, et al. MST1 coordinately regulates autophagy and apoptosis in diabetic cardiomyopathy in mice [J]. *Diabetologia*, 2016, 59(11): 2435-2447
- [10] 杜艳芳, 杨洋, 毕田田, 等. 行为箱形状对小鼠新物体识别实验结果的影响[J]. *实验动物科学*, 2019, 36(01): 22-25
- [11] 杨晓青, 王旭, 邵鑫. 糖脂清方通过保护海马神经元对提高 2 型糖尿病大鼠学习记忆能力的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(11): 144-149
- [12] 张卫华, 刘舟, 石富国, 等. 黄连温胆汤对 2 型糖尿病小鼠学习记忆及海马神经细胞形态的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(04): 948-949
- [13] Bishop N A, Lu T, Yankner B A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 529-535
- [14] 师林, 柯斌, 杨玉彬, 等. 加味苓桂术甘汤联合限食对脾虚痰湿型糖尿病脑病大鼠海马组织 PI3K/Akt/mTOR 通路的影响 [J]. *中药材*, 2018, 41(05): 1186-1190
- [15] Groeneveld O N, Moneti C, Heinen R, et al. The Clinical Phenotype of Vascular Cognitive Impairment in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus[J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 68(1): 311-322
- [16] 刘欣欣, 孙华磊, 葛惠娜, 等. 紫檀芪对 2 型糖尿病大鼠学习记忆能力及海马氧化应激水平的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2019, 54(01): 51-54
- [17] 孟德轩, 赵献民, 全君英, 等. 曲唑酮对脑卒中后抑郁大鼠学习记忆功能及海马区 BDNF、受体 TrkB 表达的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(09): 893-898
- [18] 白轩, 孙宏利, 卜岚. 急性应激对大鼠海马 BDNF 基因和蛋白表达及空间学习记忆的影响[J]. *临床医学研究与实践*, 2018, 3(33): 1-2
- [19] 李炯, 张吉凤, 赵波, 等. 稳定表达 α -氨基-3-羧基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体 GluA1 亚基单克隆细胞株的构建 [J]. *解剖学报*, 2018, 49(05): 591-597
- [20] 姚茂麓. α -氨基羧甲基恶唑丙酸受体介导长时程增强表达作用的研究进展[J]. *湖北民族学院学报(医学版)*, 2008, 25(04): 69-71
- [21] AMPA receptor trafficking in inflammation-induced dorsal horn central sensitization[J]. *Neuroscience Bulletin*, 2012, 28(02): 111-120

(上接第 236 页)

- [18] GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17: 939-953
- [19] Pessoa RR, Moro A, Munhoz RP, et al. Apomorphine in the treatment of Parkinson's disease: a review [J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2018, 76(12): 840-848
- [20] Vargas JY, Grudina C, Zurzolo C. The prion-like spreading of α -synuclein: From in vitro to in vivo models of Parkinson's disease[J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 50: 89-101
- [21] Schneider RB, Iourinets J, Richard IH. Parkinson's disease psychosis: presentation, diagnosis and management [J]. *Neurodegener Dis Manag*, 2017, 7(6): 365-376
- [22] Nathoo N, Sankar T, Suchowersky O, et al. Deep Brain Stimulation as a Rescue When Duodenal Levodopa Infusion Fails [J]. *Can J Neurol Sci*, 2019, 46(1): 130-131
- [23] Baertschi M, Flores Alves Dos Santos J, Burkhard P, et al. The burden of normality as a model of psychosocial adjustment after deep brain stimulation for Parkinson's disease: A systematic investigation [J]. *Neuropsychology*, 2019, 33(2): 178-194
- [24] Roberts DP, Lewis SJG. Considerations for general anaesthesia in Parkinson's disease[J]. *J Clin Neurosci*, 2018, 48: 34-41
- [25] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. *Circulation*, 1986, 74(5): 1124-1136
- [26] Clendenen N, D'Alessandro A. High Throughput Metabolomics in Clinical Studies: Review and New Applications to Remote Ischemic Preconditioning[J]. *Curr Top Med Chem*, 2018, 18(25): 2143-2153
- [27] van Zundert B, Brown RH Jr. Silencing strategies for therapy of SOD1-mediated ALS[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 636: 32-39
- [28] Kamiya T, Takeuchi K, Fukudome S, et al. Copper chaperone antioxidant-1, Atox-1, is involved in the induction of SOD3 in THP-1 cells[J]. *Biomaterials*, 2018, 31(1): 61-68
- [29] Zhang C, Li C, Chen S, et al. Berberine protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells and zebrafish through hormetic mechanisms involving PI3K/AKT/Bcl-2 and Nrf2/HO-1 pathways[J]. *Redox Biol*, 2017, 11: 1-11
- [30] Sadeghnia HR, Kolangikhah M, Asadpour E, et al. Berberine protects against glutamate-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 and N2a cells[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20(5): 594-603