细胞损伤修复法和钙蛋白酶抑制法测定脑蛋白水解物注射液活性的比较研究*

蒋玉辉, 梁蔚阳

(广东省药品检验所, 广州 510180)

摘要　目的: 为脑蛋白水解物注射液活性检测方法的建立提供依据。方法: 采用 PC12细胞过氧化氢损伤修复法和钙蛋白酶抑制法对脑蛋白水解物注射液的活性进行检测。结果: 2种方法均可检测出样品的活性。结论: 2种方法各有优缺点, 尚需进一步验证。

关键词: 脑蛋白水解物注射液; 生物活性

中图分类号: R917　　文献标识码: A　　文章编号: 0254-1793(2011)01-0084-03

Comparison of repairing injured PC12 cells and inhibiting calpain for determining the bioactivity of cerebroprotein hydrolysate injection*

JIANG Yu-hui, LIANG Wei-yang

(Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

Abstract　**Objective**: To provide the foundation of developing the methods for determining bioactivity of cerebroprotein hydrolysate injection. **Methods**: The bioactivity of cerebroprotein hydrolysate injection was determined by repairing injured PC12 cells and inhibiting calpain. **Results**: The bioactivity of all the six samples could be determined by the both methods. **Conclusion**: The tow methods both have superiorities and deficiencies, and both need more validation.

Key words: cerebroprotein hydrolysate injection; bioactivity

脑蛋白水解物注射液为健康乳猪脑经酶水解制成的无菌制剂, 约含 75% ~ 80% 游离氨基酸和 20% ~ 25% 小分子肽。它具有良好的健脑、益智、修复脑损伤的功效, 临床上可用于神经系统疾病特别是阿尔茨海默病的治疗, 是近年来应用最多的生化药物之一[1,2]。目前脑蛋白水解物注射液质量标准中最重要的指标为总氮含量和氨基酸含量[3], 尚无其活性指标。PC12细胞为大鼠肾上腺嗜铬瘤细胞, 是体外神经细胞损伤及保护作用研究使用最为广泛的细胞系[4], 过氧化氢诱导的 PC12细胞氧化损伤模型常被用来研究药物抗氧化损伤的作用。钙蛋白酶活性近年来在神经细胞损伤中的作用也有报道[5]。本文采用 PC12细胞氧化损伤修复法[6]和钙蛋白酶抑制法[7]对脑蛋白水解物注射液的活性进行检测, 并对 2种方法进行了比较。

1　仪器与试药

1.1　仪器　美国 Nuaire公司生物安全柜; 日本 Sanyo公司二氧化碳培养箱; 日本 Olympus公司倒置相差显微镜; 奥地利 Tecan公司 infinite M200多功能酶标仪。

1.2　细胞株　大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12细胞株购自上海细胞生物所。

1.3　试剂　样品分别为来自 6个厂家的 6批脑蛋白水解物注射液 [1号(807900); 2号(081201); 3号(080801); 4号(20081109); 5号(20071208); 6号(20081101 01)]; 促肝细胞生长素原液 (批号 081122) 由广东阳江制药厂提供; RPMI 1640培养液, 美国 Gibco公司; 小牛血清, 广州鼎国生物技术有限公司; 噻唑蓝(MTT), 美国 Amersco公司; 人源钙蛋白酶及其抑制剂, 美国 Biovision公司; 蛋白稳

* 科技部"十一五"国家科技支撑计划项目(2008BAI55B04-3-3); 广东省药品检验所所内课题项目(SN20071212)

第一作者　Tel: (020) 81887684 E-mail: cinde@163.com.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

定剂 Prionex, 美国 Fluka公司; 发光检测试剂, 美国 Promega公司; 其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 细胞损伤修复法 分别取 6批脑蛋白水解物注射液样品以及促肝细胞生长素原液适量, 用 10%小牛血清 – RPMI 1640培养液制成每 1 mL中含样品总氮 60 μg的供试品溶液。将对数增长期的 PC12细胞配制成 (8~12) × 10^4个 • mL^{-1}的细胞悬液, 每孔 100 μL加入 96孔细胞培养板中, 分为正常细胞组、损伤细胞组、供试品组, 每组设 3个复孔。37 ℃, 5%二氧化碳培养 24 h。供试品组, 每孔加入供试品溶液 100 μL, 每批供试品均做 3个复孔。其余各组每孔加入 10%小牛血清 – RPMI 1640培养液 100 μL, 培养 24 h后, 供试品组、损伤细胞组加入 0.5 mmol• L^{-1}过氧化氢 50 μL, 其余各组加入 10%小牛血清培养液 – RPMI 1640培养液 50 μL, 继续培养 20 h。每孔加入 5 mg• mL^{-1} MTT溶液 20 μL继续培养 4 h后去掉上清, 加入二甲基亚砜 100 μL, 混匀后在酶标仪上以 550 nm的波长测定吸光度。

修复率 = (供试品组平均吸光度 – 损伤细胞组平均吸光度) /(正常细胞组平均吸光度 – 损伤细胞组平均吸光度) × 100%

2.2 钙蛋白酶抑制法 取 4–羟乙基哌嗪乙磺酸 238.3 mg, 二硫苏糖醇 154.2 mg 用适量水溶解后, 加入 Prionex 1 mL, 调节 pH 7.1, 加水定容至 100 mL, 制成酶缓冲液。将钙蛋白酶抑制剂用缓冲液稀释成 5 nmol• L^{-1}的溶液, 调节 pH至 7.0~7.2, 即得供试品溶液。将 96孔化学发光检测白板分为标准组、阳性对照组、供试品组, 每组至少 2个复孔。标准组中加入钙蛋白酶 45.4 μL, 纯水 54.6 μL, 发光检测试剂 50 μL; 以酶抑制剂代替纯水作为阳性对照组, 以供试品代替纯水作为供试品组。采用 Tecan Magellan软件在多功能酶标仪上检测化学发光, 每隔 1 min检测 1次, 共测 25次。取每孔的最大发光值进行计算。

抑制率 = (标准组 – 供试品组或阳性对照组) /标准组 × 100%

供试品相对抑制值 = (供试品抑制率 ×阳性对照组浓度 5 nmol• L^{-1}) /阳性对照组抑制率

3 结果

3.1 细胞损伤修复法 结果见表 1, 可见脑蛋白水解物注射液对过氧化氢损伤的 PC12细胞具有修复作用, 测得 6批样品的修复率均大于 100%。促肝细胞生长素则几乎不能修复受损的 PC12细胞。

表 1 细胞损伤修复法测定结果

Tab 1 Results of repaiment for injured PC12 cells

样品(sample)	吸光度(absorbance)			平均修复率
	试验 1 (test 1)	试验 2 (test 2)	试验 3 (test 3)	(average repaiment percentage) /%
正常细胞组 (normal cell group)	0.182	0.175	0.196	
损伤细胞组 (injured cell group)	0.132	0.113	0.134	
1	0.198	0.189	0.207	124
2	0.286	0.323	0.319	315
3	0.200	0.218	0.219	147
4	0.224	0.245	0.234	186
5	0.213	0.197	0.211	141
6	0.209	0.206	0.220	148
促肝细胞生长素原液 (hepatocyte growth–promoting factor bulk)	0.135	0.116	0.137	5

3.2 钙蛋白酶抑制法 结果显示, 在中性环境中, 脑蛋白水解物注射液和促肝细胞生长素均能够抑制钙蛋白酶的活性。结果详见表 2。

表 2 钙蛋白酶抑制法检测结果 (nmol• L^{-1}, $n = 2$)

Tab 2 Results of inhibition for calpain

样品(sample)	相对抑制力 (relative inhibition for calpain)
1	4.3
2	6.7
3	9.9
4	10.7
5	9.3
6	9.2
促肝细胞生长素原液 (hepatocyte growth–promoting factor bulk)	13.7

4 讨论

脑蛋白水解物注射液主要用于治疗受损的脑组织, 本研究采用过氧化氢造成大鼠神经细胞氧化损伤后, 发现检测的样品对神经细胞均具有修复损伤的作用。此外, 用药用级氨基酸按照脑蛋白水解物注射液的氨基酸含量配制成单独氨基酸的溶液, 发现该溶液对 PC12细胞的损伤修复率仅为 5.7%, 几乎不具有修复作用, 说明脑蛋白水解物中具有生物学活性的主要是多肽, 这与前人的研究结果[8]一致。进一步的, 也发现同样是多肽的注射用促肝细胞生长素, 不能对 PC12细胞进行修复, 说明该方法对脑蛋白水解物注射液具有特异性。试验中所使用的 PC12细胞是低分化的, 在传代培养中可能会向

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

高分化发展,此时,细胞对过氧化氢的损伤不敏感,可能会影响实验结果。

钙蛋白酶(calpain)于 1964年首次分离,作为一种损伤因子,对其活性进行干预能在治疗和预防多种神经系统损伤中具有十分重要的意义。研究表明神经损伤后,钙蛋白酶处于激活状态,表达增强[9],此时应用钙蛋白酶抑制剂进行实验治疗,具有明显的神经保护作用[10]。因此脑蛋白水解物注射液能够抑制钙蛋白酶的活性,能够反映该药的生物活性。但是钙蛋白酶在机体组织中广泛存在,在心肌缺血/再灌注、运动性骨骼肌损伤、细胞凋亡中都会活性增加[11~13]。本研究中也发现注射用促肝细胞生长素同样能够抑制钙蛋白酶的活性,相对抑制值达到 13.7 nm,说明该方法对检测脑蛋白水解物注射液的活性不具有专属性。

现将细胞损伤修复法和钙蛋白酶抑制法的优缺点总结如下:细胞损伤修复法所用的细胞、试剂容易获得,而且成本低,专属性、重复性好,但是操作烦琐,耗时长;钙蛋白酶抑制法操作简单,耗时短,重复性好,但专属性差,所用试剂较昂贵,尤其是人源性的钙蛋白酶购买比较困难。2种方法均有待进一步的验证。

参考文献

1 Koroleva VI, Korolev OS, Mares V, *et al*. Hippocampal damage induced by carbon monoxide poisoning and spreading depression is alleviated by chronic treatment with brain derived polypeptides. *Brain Res*, 1999, 816: 618

2 Ruether E, Moessler H, Windisch M. The MAD B study-A randomized doubleblind placebo-controlled trial with cerebrolysin in Alzeimer's disease. *Eur Neuropsychopharm*, 2000, 10: S355

3 YANG Zhao-peng(杨昭鹏), ZENG Wen-shan(曾文珊), YANG Xiao-hui(杨晓辉), *et al*. Study on the qualities of cerebroprotein hydrolysate injection (Ⅱ) [脑蛋白水解物注射液的质量研究(Ⅱ)]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2003, 23(2): 106

4 Kadota T, Yamaai T, Saito Y, *et al*. Expression of dopamine transporter at the tips of growing neuritis of PC12 cells. *Histochem Cytochem*, 1996, 44(25): 989

5 LIU Qing-jun(刘清军), ZHANG Jian-ning(张建宁), ZHU Jun(朱军), *et al*. Effects of calpain activity on cognitive function and neuronal apoptosis in hippocampus of rats after traumatic brain injury (钙蛋白酶活性对颅脑创伤大鼠海马神经细胞凋亡和学习记忆的影响). *Tianjin Med J*(天津医药), 2010, 38(2): 127

6 Kuner R, Teismann P, Trutzel A, *et al*. Torsin A protects against oxidative stress in COS-1 and PC12 cells. *Neurosci Lett*, 2003, 350(3): 153

7 Mittoo S, Sundstrom LE, Bradley M. Synthesis and evaluation of fluorescent probes for the detection of calpain activity. *Anal Biochem*, 2003, 319(2): 234

8 Hartbauer M, Hutter-Paier B, Skofitsch G, *et al*. Antiapoptotic effects of the peptidergic drug cerebrolysin on primary cultures of embryonic chick cortical neurons. *J Neural Transm*, 2001, 108(4): 459

9 Wingrave JM, Schaecher KE, Sribnick EA, *et al*. Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria-mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res*, 2003, 73(1): 95

10 Ray SK, Matzelle DC, Wilford GG, *et al*. Inhibition of calpain-mediated apoptosis by E-64-d reduced immediate early gene (IEG) expression and reactive astrogliosis in the lesion and penumbra following spinal cord injury in rats. *Brain Res*, 2001, 916(1-2): 115

11 Kusuola H, Marban E. Cellular mechanisms of myocardial stunning. *Annu Rev Physiol*, 1992, 54: 243

12 Polster BM, Basañez G, Etxebarria A, *et al*. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem*, 2005, 280(8): 6447

13 Dedieu S, Mazres G, Poussard S, *et al*. Myoblast migration is prevented by a calpain-dependent accumulation of MARCKS. *Biol Cell*, 2003, 95(9): 615

(本文于 2010年 3月 11日收到)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net