

丙戊酸钠对抗鱼藤酮诱导的SH-SY5Y细胞损伤的线粒体机制

邱晶¹ 高静¹ 熊御云² 夏娟¹ 马瑞³ 钱进军^{4*}

(¹江苏大学药学院, 镇江 212013; ²江苏大学基础医学与医学技术学院, 镇江 212013; ³江苏大学临床医学院, 镇江 212013; ⁴江苏大学附属第四医院, 镇江 212013)

摘要 研究丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)对抗鱼藤酮(Rotenone)诱导的SH-SY5Y细胞损伤的作用及线粒体机制。以1, 10 $\mu\text{mol/L}$ VPA预处理SH-SY5Y细胞3 h, 再加入400 nmol/L Rotenone作用24 h。MTT法检测与相差显微镜观察相结合, 分析VPA对抗Rotenone损伤的作用; JC-1染色法与Mito-Tracker染色法分析线粒体膜电位及线粒体数量的变化; Clark氧电极法检测细胞呼吸功能; DCFH-DA探针法检测细胞中ROS的含量; 并在离体线粒体上观察VPA对 Ca^{2+} 诱导的线粒体肿胀的影响。结果发现, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ VPA预处理SH-SY5Y细胞3 h可对抗400 nmol/L Rotenone引起的细胞损伤, 并且可以提高损伤细胞中线粒体的膜电位, 增加线粒体的数量, 此外, 还可以增强损伤细胞的呼吸功能, 降低细胞中ROS的含量, 但VPA并不能直接作用于离体的线粒体发挥神经保护作用。由此, VPA具有良好的神经保护作用, 其机制与增强线粒体功能和数量、从而改善细胞功能有关, 这为其应用于帕金森病的预防与治疗提供了实验依据。

关键词 鱼藤酮; 丙戊酸钠; 线粒体; 帕金森病

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种与年龄有关的慢性进行性神经退变疾病^[1]。随着受累神经元的进行性变性死亡, 其症状不断加重, 极大地加重了家庭和社会的负担。目前, 帕金森病的发病机制尚未阐明, 因而对该疾病的防治有待进一步研究。

PD的发病机理与氧化应激、线粒体缺陷、兴奋性氨基酸毒性、 Ca^{2+} 超载等有关^[2-4]。作为细胞“能量工厂”的线粒体在其中所起的作用逐渐被人们所重视。越来越多的研究发现, 在PD的发病中, 氧化应激、线粒体缺陷等因素的变化加剧了毒性作用的恶性循环, 导致神经元损伤并最终导致了细胞死亡^[5-6]。

Rotenone是线粒体复合物I的特异性抑制剂, 能够在大鼠体内产生类似于PD的症状^[7], 并且该模型能够比其他毒性物质更好地模拟人类PD发生和恶化的过程^[7-10], 因此, 该模型被广泛应用于PD的研究。

目前, 临床上使用的治疗PD的药物并不能彻底治愈PD, 并有严重的并发症, 因此研制新型抗PD药物十分迫切。能够提高线粒体功能, 保护线粒体对抗氧化损伤的一类药物被称为线粒体营养素^[11-12]。近年来, 已经有很大一部分工作都围绕在开发以线粒体为靶向或者能够调控线粒体功能的药物上来^[13]。最近的

研究表明^[14-19], 由8个碳原子和脂肪酸支链组成的简单化合物丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)具有神经保护作用, 如Kidd等^[14]研究发现, VPA可以对抗 MPP^+ 诱导的毒性作用, 但其具体机制尚不明确。因此, 本实验探讨VPA能否通过调节线粒体的功能从而达到神经保护的作用, 为抗PD药物的研发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

CO_2 孵箱为美国HealForce公司产品; MD SpectraMax 190酶标仪为美国Molecular Device公司产品; MD Spectra Max Gemini荧光酶标仪为美国Molecular Device公司产品; Nikon eclipse TS100倒置式显微镜为日本Nikon公司产品; Nikon eclipse TE2000-5荧光显微镜为日本Nikon公司产品; Clark氧电极为英国Hansatech公司产品。MTT购自Amresco公司; JC-1荧光染料购自Molecular Probes公司; Mito-Tracker荧光染料购自Invitrogen公司; DCFH-DA探针购自碧云天动物药业

收稿日期: 2011-10-17 接受日期: 2012-02-02

江苏省自然科学基金(No. BK2008249)资助项目

*通讯作者。Tel/Fax: 0511-84448279, E-mail: qian-jinjun@163.com

公司; Rotenone为Sigma公司产品, 终浓度为400 nmol/L; VPA为Sigma公司产品, 终浓度为1, 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2 细胞株的培养及实验动物

SH-SY5Y(人神经母细胞瘤细胞)细胞由中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所柯尊记教授惠赠; 用含10%胎牛血清的F12:MEM(1:1)(Gibco公司)培养液在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养。小鼠购自江苏大学实验动物中心, SCXK(苏)2009-0002。

1.3 MTT法检测细胞活性

96孔板培养对数生长期细胞($3 \times 10^4/\text{mL}$), 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ VPA预处理3 h, 加入400 nmol/L Rotenone处理24 h, 加入MTT(1 mg/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h, 加入100 μL DMSO, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 酶标仪于570 nm处测吸光值。

1.4 JC-1染色法检测线粒体膜电位

37 $^{\circ}\text{C}$ 下JC-1(终浓度为5 $\mu\text{g/mL}$)溶于完全培养基中负载细胞30 min, 荧光显微镜下观察。

1.5 Mito-Tracker染色法检测线粒体数量

无血清培养基按1:1 000稀释成工作液(终浓度为1 $\mu\text{mol/L}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 下负载细胞15~45 min, 荧光酶标仪检测荧光强度。

1.6 Clark氧电极法检测细胞呼吸功能

收集6孔板中的细胞于离心管中, Clark氧电极法检测细胞呼吸功能。

1.7 DCFH-DA探针法检测细胞中ROS的含量

无血清培养液按1:1 000稀释DCFH-DA(终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$), 加入6孔板中。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min, 荧光酶标仪检测荧光强度。

1.8 VPA与线粒体的直接作用

依照Apprille法^[20]制备离体线粒体。各组肝脏线粒体肿胀程度由线粒体悬液在波长为540 nm处的吸光值反映。制备的线粒体按蛋白质含量为1.0 mg/mL重悬于线粒体缓冲液(125 mmol/L sucrose, 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L KH_2PO_4 , 5 mmol/L succinate acid, 5 $\mu\text{mol/L}$ Rotenone, 10 mmol/L HEPES, pH7.4)中, 分为对照组、 Ca^{2+} 组、 $\text{Ca}^{2+}+1 \mu\text{mol/L}$ VPA组、 $\text{Ca}^{2+}+10 \mu\text{mol/L}$ VPA组及 $\text{Ca}^{2+}+1 \mu\text{mol/L}$ CsA组, 对照组加入相同体积的线粒体缓冲液37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3 min, 检测7 min内吸光度的变化(每20 s检测一次吸光度)。线粒体肿胀度通过吸光度的降低测得, ΔD 值越大, 表明线粒体肿胀度越高。

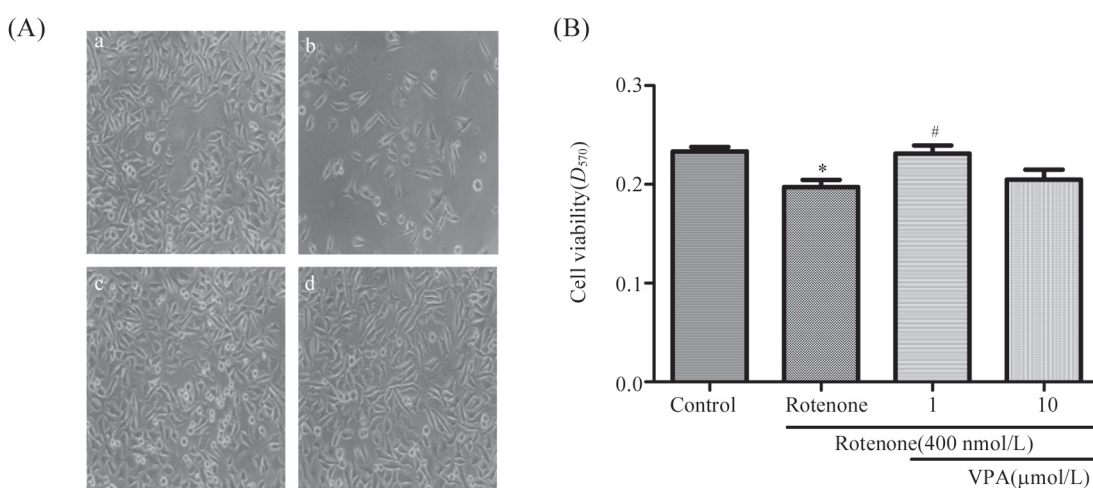
1.9 统计方法

采用SAS统计软件, ANOVA方差分析, 组间比较采用 q 检验, 数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为具有显著性差异。各实验至少重复三次。

2 结果

2.1 VPA对Rotenone诱导的细胞活性的影响

结果如图1所示, 在形态学上, 与对照组相比Ro-



A: 丙戊酸钠对抗鱼藤酮诱导的细胞形态改变(200 \times). a: 对照组; b: 400 nmol/L鱼藤酮; c: 1 $\mu\text{mol/L}$ 丙戊酸钠; d: 10 $\mu\text{mol/L}$ 丙戊酸钠; B: MTT法检测细胞活性($\bar{x} \pm s$, $n=5$, * $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与400 nmol/L鱼藤酮组比较)。

A: VPA against the morphological changes induced by Rotenone in SH-SY5Y cells (200 \times). a: control; b: 400 nmol/L Rotenone; c: 1 $\mu\text{mol/L}$ VPA; d: 10 $\mu\text{mol/L}$ VPA; B: cell viability was determined by MTT assay ($\bar{x} \pm s$, $n=5$, * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 400 nmol/L Rotenone group).

图1 VPA对Rotenone诱导的细胞活性的影响

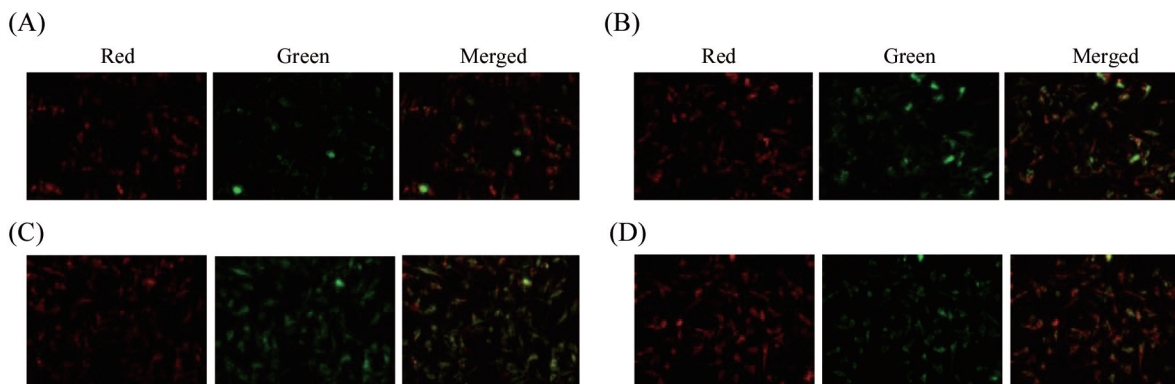
Fig.1 Effect of VPA on the cell viability induced by Rotenone

tenone损伤组细胞形态发生改变,胞体皱缩变圆,突起消失且细胞数量减少。与损伤组相比,VPA预处理组细胞形态有所恢复,细胞数量增加(图1A)。MTT检测结果显示,与对照组相比,400 nmol/L Rotenone处理组

细胞活性显著降低($P<0.05$),与损伤组相比,1 $\mu\text{mol/L}$ VPA预处理组中细胞活性显著增高($P<0.05$)(图1B)。

2.2 VPA对Rotenone诱导的线粒体膜电位的影响

荧光显微镜下观察JC-1染色结果如图2所示,与



A: 对照组; B: 400 nmol/L Rotenone组; C: 400 nmol/L Rotenone+1 $\mu\text{mol/L}$ VPA组; D: 400 nmol/L Rotenone+10 $\mu\text{mol/L}$ VPA组。

A: control group; B: 400 nmol/L Rotenone group; C: 400 nmol/L Rotenone+1 $\mu\text{mol/L}$ VPA group; D: 400 nmol/L Rotenone+10 $\mu\text{mol/L}$ VPA group.

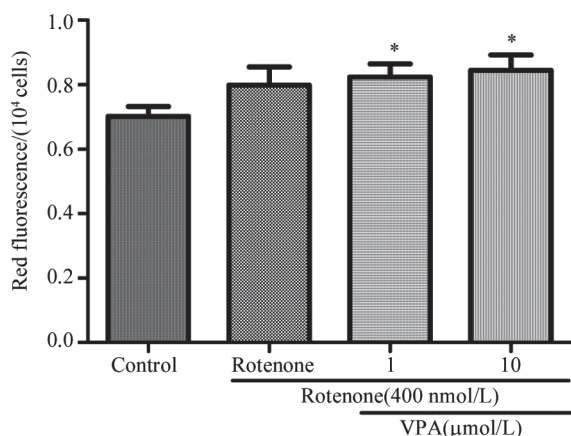
图2 VPA对Rotenone诱导的线粒体膜电位的影响(200 \times)

Fig.2 Effect of VPA on the dissipation of mitochondrial membrane potential induced by Rotenone(200 \times)

对照组相比, Rotenone损伤组红光减弱、绿光增强,表示线粒体膜电位降低,细胞出现损伤。而与损伤组相比,VPA预处理组中,红光逐渐增强、绿光逐渐减弱,表明线粒体膜电位有所回升,特别是10 $\mu\text{mol/L}$ VPA处理组,红光明显增强。

2.3 VPA对细胞中线粒体数目的影响

荧光酶标仪检测Mito-Tracker染色结果显示,与对照组相比, Rotenone损伤组细胞中线粒体数量有增高的趋势,但没有显著性差异,而1, 10 $\mu\text{mol/L}$ VPA预处理组中线粒体数量显著增加($P<0.05$)(图3)。



* $P<0.05$, 与对照组比较。

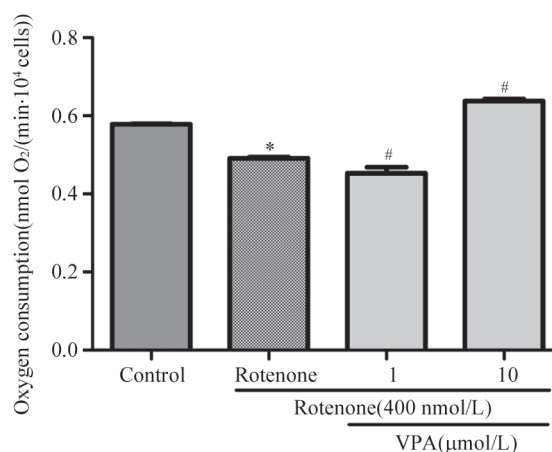
* $P<0.05$ vs control group.

图3 VPA对SH-SY5Y细胞中线粒体数目的影响

Fig.3 Effect of VPA on the mass of mitochondria in SH-SY5Y cells

2.4 VPA对抗Rotenone诱导的细胞呼吸功能降低

Clack氧电极法检测细胞呼吸功能的结果表明,与对照组相比,400 nmol/L Rotenone损伤组细胞呼吸功能显著降低($P<0.05$),而与损伤组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ VPA预处理组中细胞呼吸功能明显增强($P<0.05$)(图4)。



* $P<0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与400 nmol/L Rotenone组比较。

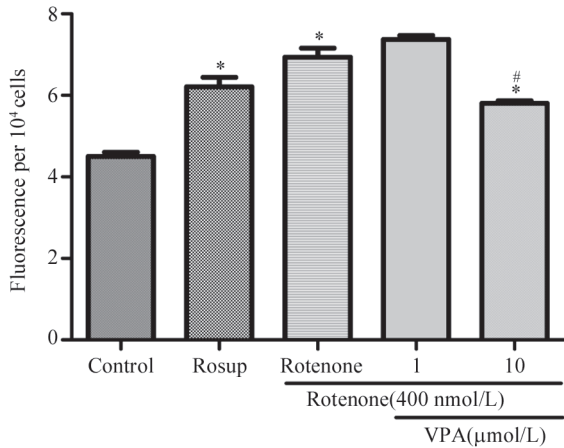
* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs 400 nmol/L Rotenone group.

图4 VPA对Rotenone诱导的细胞呼吸功能的影响

Fig.4 Effect of VPA on the cell respiratory function induced by Rotenone

2.5 VPA对Rotenone诱导的ROS含量的影响

采用DCFH-DA探针染色,荧光酶标仪检测荧光强度。Rosup为阳性对照。从图5中可以看出与对照



* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与400 nmol/L Rotenone组比较。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 400 nmol/L Rotenone group.

图5 VPA对Rotenone诱导的ROS含量的影响

Fig.5 Effect of VPA on the ROS generation in SH-SY5Y cells induced by Rotenone

组相比, Rosup组中ROS的含量显著增高。与对照组相比, Rotenone损伤组ROS含量显著增加($P < 0.05$), 而10 $\mu\text{mol/L}$ VPA预处理后可显著降低细胞中ROS的含量($P < 0.05$)。

2.6 VPA对Ca²⁺诱导的线粒体肿胀的影响

结果如图6所示, 正常线粒体中加入终浓度50 $\mu\text{mol/L}$

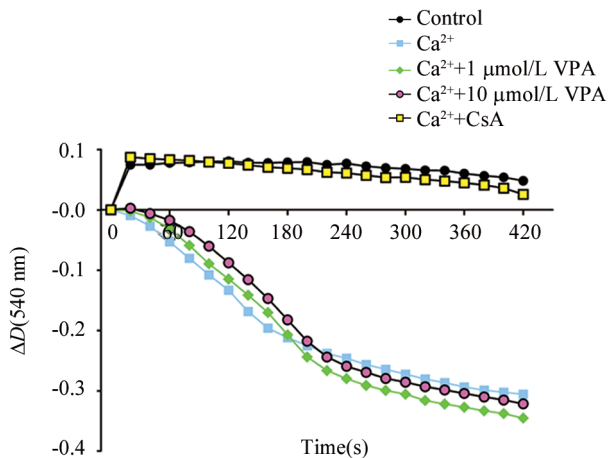


图6 VPA对Ca²⁺诱导的线粒体肿胀的影响

Fig.6 The effect of different concentrations of VPA against mitochondrial swelling induced by Ca²⁺

Ca²⁺后, 线粒体悬液在540 nm处吸光值显著下降, 表明Ca²⁺引起了线粒体明显肿胀。CsA在一定程度上抑制50 $\mu\text{mol/L}$ Ca²⁺诱导的线粒体肿胀, 而1, 10 $\mu\text{mol/L}$ VPA不能对抗Ca²⁺诱导的线粒体肿胀。

3 讨论

作为细胞“能量工厂”的线粒体在细胞生存和死亡中发挥着重要作用。在PD病人的黑质区, 线粒体复合物I的活性降低30%~40%^[21-27], 其他的脑区却没有明显的影响。目前, 线粒体缺陷已经被认为在PD发病过程中具有显著作用^[28]。因此, 本实验从药物对线粒体功能的调节入手, 研究新型的神经保护药物。

临床上应用VPA治疗双相精神障碍(bipolar disorder, BD)已有三十多年历史。本研究发现, 400 nmol/L Rotenone可以引起细胞形态发生改变, 降低细胞活性, 表现出细胞损伤作用; 而VPA预处理3 h可以对抗400 nmol/L Rotenone诱导的细胞形态及功能损伤。已有文献表明VPA可以通过MAPK-ERK通路调节褪黑素受体的功能及神经营养因子的表达, 增加中枢GABA活性及细胞有丝分裂能力, 达到神经保护作用^[29]。本实验结果与以往报道一致。

最近研究表明, VPA可通过调控多条细胞凋亡通路、影响核组蛋白乙酰化水平等达到神经保护的作用^[14]。线粒体膜电位的下降被认为是凋亡过程的第一步^[30]。本研究发现400 nmol/L Rotenone能够破坏线粒体膜电位, 这与以前的研究是一致的^[31], 而VPA能够对抗Rotenone诱导的线粒体膜电位降低, 从而保护线粒体、保护细胞。由于线粒体是真核细胞中最主要的进行氧化呼吸的细胞器, 它的损伤会影响细胞呼吸功能^[32], 通过检测细胞的呼吸功能发现400 nmol/L Rotenone可以引起细胞呼吸功能显著降低。而VPA预处理后, 能够对抗Rotenone诱导的细胞呼吸功能的下降。Bachmann等^[33]也发现, 长期使用VPA可通过影响Bcl-2通路增强细胞呼吸功能, 改善膜氧化过程。

当线粒体受到药物毒性作用时, 线粒体功能出现缺陷, 线粒体数目增多可能是为了补偿这种缺陷而产生的反馈机制^[34-35]。400 nmol/L Rotenone没有引起线粒体数量的明显降低, 反而有增加的趋势, 可能是细胞应激作用的结果。而VPA预处理3 h后, 与对照组相比, 同样增加了线粒体数目, 这说明VPA预处理后能够增加线粒体的数目。但是, Rotenone处理组线粒体膜电位低, 耗氧量低, 说明线粒体功能低下, 而VPA预处理组对抗了Rotenone诱导的线粒体功能缺陷, 保护了细胞。

此外, 由于线粒体既是细胞内产生ROS的场所, 又对ROS有特殊的敏感性, 为此, 本实验还检测了

ROS的含量,发现400 nmol/L Rotenone可以使细胞中ROS的含量增高。Mizutani等^[36]的研究发现,PD模型中Rotenone通过对线粒体电子传递链中NADH脱氢还原酶(即complex I)的抑制阻断了从NADH到辅酶Q的电子传递,继而产生大量的超氧阴离子。而VPA的神经保护作用还可能与清除细胞内ROS有关,它能够对抗Rotenone诱导的细胞内ROS水平的增高。因此,VPA对抗Rotenone诱导的神经毒性的原因可能与稳定线粒体功能和抗氧化有关。

Ca²⁺诱导线粒体肿胀的实验表明,VPA并不能够与离体线粒体直接作用。这说明,VPA可能通过其他机制间接调控线粒体的功能,从而达到神经保护的作用。如有研究发现VPA可通过改善细胞中组蛋白乙酰化水平^[14],增强细胞活力,大大延长细胞寿命^[15],对抗兴奋性毒素诱导的损伤^[16]。也有研究发现,VPA可通过其他调节因子如核受体过氧化酶体-增殖子激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)介导的细胞核与线粒体的cross-talk机制影响线粒体的功能,从而保护细胞^[17]。VPA还可以从对抗细胞凋亡^[33]方面达到保护神经元的目的。

本实验初步探索了VPA的神经保护作用,发现其保护作用的机制可能与抗氧化和稳定线粒体功能有关,但是VPA并不能通过直接作用于线粒体达到稳定线粒体功能的作用,详细机制有待进一步的研究。

参考文献 (References)

- Shastri BS. Parkinson disease: Etiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neurosci Res* 2001; 41(1): 5-12.
- Yuan H, Zheng JC, Liu P, Zhang SF, Xu JY, Bai LM. Pathogenesis of Parkinson's disease: Oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory processes. *Neurosci Bull* 2007; 23(2): 125-30.
- Ramsey CP, Giasson BI. Role of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease-Implications for treatment. *Drugs Aging* 2007; 24(2): 95-105.
- Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: Potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* 2007; 208(1): 1-25.
- Dranka BP, Benavides GA, Diers AR, Giordano S, Zelickson BR, Reily C, *et al.* Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(9): 1621-35.
- Bowling AC, Beal MF. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci* 1995; 56(14): 1151-71.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000; 3(12): 1301-6.
- Meredith GE, Sonsalla PK, Chesselet MF. Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol* 2008; 115(4): 385-98.
- Hoglinger GU, Feger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy P, *et al.* Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem* 2003; 84(3): 491-502.
- Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol* 2003; 179(1): 9-16.
- Liu J, Ames BN. Reducing mitochondrial decay with mitochondrial nutrients to delay and treat cognitive dysfunction, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. *Nutr Neurosci* 2005; 8(2): 67-89.
- Liu J. The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient alpha-lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: an overview. *Neurochem Res* 2008; 33(1): 194-203.
- Reddy PH. Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med* 2008; 10(4): 291-315.
- Kidd SK, Schneider JS. Protection of dopaminergic cells from MPP⁺-mediated toxicity by histone deacetylase inhibition. *Brain Res* 2010; 1354(1): 172-8.
- Jeong MR, Hashimoto R, Senatorov VV, Fujimaki K, Ren M, Lee MS, *et al.* Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spon taneous cell death: A role of histone deacetylase inhibition. *FEBS Lett* 2003; 542(1/2/3): 74-8.
- Kanai H, Sawa A, Chen RW, Leeds P, Chuang DM. Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons. *Pharmacogenomics J* 2004; 4(5): 336-44.
- López-Lluch G, Irusta PM, Navas P, de Cabo R. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol* 2008; 43(9): 813-9.
- Monti B, Gatta V, Piretti F, Raffaelli SS, Virgili M, Contestabile A. Valproic acid is neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: Involvement of alpha-synuclein. *Neurotox Res* 2010; 17(2): 130-41.
- Qing H, He G, Ly PT, Fox CJ, Staufenbiel M, Cai F, *et al.* Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* 2008; 205(12): 2781-9.
- Aprille JR, Hom JA, Rulfs J. Liver and skeletal muscle mitochondrial function following burn injury. *J Trauma* 1977; 17(4): 279-88.
- Bindoff LA, Birch-Machin MA, Cartlidge NE, Parker WD Jr, Turnbull DM. Respiratory chain abnormalities in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1991; 104(2): 203-8.
- Banerjee R, Starkov AA, Beal MF, Thomas B. Mitochondrial dysfunction in the limelight of Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(7): 651-63.
- Janetzky B, Hauck S, Youdim MB, Riederer P, Jellinger K, Pantucek F, *et al.* Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with

- Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1994; 169(1/2): 126-8.
- 24 Benecke R, Strumper P, Weiss H. Electron transfer complexes I and IV of platelets are abnormal in Parkinson's disease but normal in Parkinson-plus syndromes. *Brain* 1993; 116(pt 6): 1451-63.
- 25 Varghese M, Pandey M, Samanta A, Gangopadhyay PK, Mohanakumar KP. Reduced NADH coenzyme Q dehydrogenase activity in platelets of Parkinson's disease, but not Parkinson plus patients, from an Indian population. *J Neurol Sci* 2009; 279(1/2): 39-42.
- 26 Schapira AH. Complex I: Inhibitors, inhibition and neurodegeneration. *Exp Neurol* 2010; 224(2): 331-5.
- 27 Parker WD Jr, Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1989; 26(6): 719-23.
- 28 Reddy PH. Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med* 2008; 10(4): 291-315.
- 29 Castro LM, Gallant M, Niles LP. Novel targets for valproic acid: Up-regulation of melatonin receptors and neurotrophic factors in C6 glioma cells. *J Neurochem* 2005; 95(5): 1227-36.
- 30 Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, *et al.* Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995; 182(2): 367-77.
- 31 Mao YR, Jiang L, Duan YL, An LJ, Jiang B. Efficacy of catalpol as protectant against oxidative stress and mitochondrial dysfunction on rotenone-induced toxicity in mice brain. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007; 23(3): 314-8.
- 32 Hollingworth RM, Ahammadsahib KI, Gadelhak G, McLaughlin JL. New inhibitors of the mitochondrial electron transport chain with activity as pesticides. *Biochem Soc Trans* 1994; 22(1): 230-3.
- 33 Bachmann RF, Wang Y, Yuan P, Zhou R, Li X, Alesci S, *et al.* Common effects of lithium and valproate on mitochondrial functions: Protection against methamphetamine-induced mitochondrial damage. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009; 12(6): 805-22.
- 34 Nugent SM, Mothersill CE, Seymour C, McClean B, Lyng FM, Murphy JE. Increased mitochondrial mass in cells with functionally compromised mitochondria after exposure to both direct gamma radiation and by bystander factors. *Radiat Res* 2007; 168(1): 134-42.
- 35 Xia S, Laterra J. Hepatocyte growth factor increases mitochondrial mass in glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345(4): 1358-64.
- 36 Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Oikawa S, Kojima M, Kawanishi S. Mechanism of apoptosis induced by a new topoisomerase inhibitor through the generation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 2002; 277(34): 30684-9.

Neuroprotection of Sodium Valproate against Rotenone induced Mitochondrial Dysfunction in SH-SY5Y Cells

Qiu Jing¹, Gao Jing¹, Xiong Yuyun², Xia Juan¹, Ma Rui³, Qian Jinjun^{4*}

(¹School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; ²School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; ³School of Clinical Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; ⁴Fourth Affiliated Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract To approach the effect and mitochondrial mechanism of sodium valproate (VPA) in SH-SY5Y cells, after pretreatment with different concentrations of VPA for 3 h, SH-SY5Y cells were treated with Rotenone for 24 h, which is an inhibitor of mitochondrial complex I, to induce mitochondrial dysfunction. Cell viability was analysed by MTT assay; mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 staining and the mass of mitochondria was detected by Mito-Tracker staining; cell respiratory function was evaluated by Clark oxygen electrode; the quantity of ROS was evaluated by DCFH-DA staining; mitochondrial swelling induced by Ca²⁺ was also detected. We found that pretreatment of VPA for 3 h in SH-SY5Y cells could protect cells against the injury induced by 400 nmol/L Rotenone, increase mitochondrial membrane potential and elevate the mass of mitochondria, enhance the cell respiratory function and decrease the quantity of ROS. But VPA could not interact with mitochondria directly. Generally speaking, VPA has neuroprotective effect relating to enhance the function and the mass of mitochondria, against ROS generation, and recovery the function of cells subsequently.

Key words Rotenone; sodium valproate (VPA); mitochondria; Parkinson's disease (PD)

Received: October 17, 2011 Accepted: February 2, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No.BK2008249)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-511-84448279, E-mail: qian-jinjun@163.com