

研究论文

雷公藤单体 T₁₀ 对 Aβ1-42 所致 PC12 细胞凋亡的抑制作用

顾 明, 周慧芳, 薛 冰, 牛东滨, 何其华, 王晓民*

北京大学神经科学研究所, 北京 100083

摘要: 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是发病率最高的中枢神经系统退变性疾病。目前 AD 的病因不清, 亦无有效的防治手段, 其重要的原因是尚无适宜的 AD 模型。因此, 本实验首先建立了 PC12 细胞系 β 淀粉样蛋白(β-amyloid, Aβ)细胞损伤模型, 在此基础上, 探讨了中药免疫抑制剂雷公藤单体 T₁₀ 对细胞的保护作用及其机制。首先用不同浓度的 Aβ (5×10^{-4} 、 5×10^{-3} 、 5×10^{-2} 、 5×10^{-1} 、5、50 μmol/L) 与 PC12 细胞共孵育 48 h, 用 MTT 法检测细胞存活率。选取 Aβ 致使细胞存活率降低的浓度 (0.5、5、50 μmol/L) 与 PC12 细胞共孵育 48 h, 通过流式细胞仪检测凋亡细胞百分比。用 1×10^{-11} mol/L 的 T₁₀ 预孵育 PC12 细胞 48 h 后, 加入 50 μmol/L Aβ 共孵育 48 h, 亦用流式细胞仪检测凋亡细胞百分比, 激光共聚焦显微镜检测细胞内钙离子浓度变化。结果显示, Aβ 的浓度在 50 μmol/L 时可使细胞存活率降低至 55.1%, 凋亡细胞比例显著增加, 而 1×10^{-11} mol/L 的 T₁₀ 可明显降低 50 μmol/L Aβ 诱导的 PC12 细胞死亡。50 μmol/L Aβ 可促进 PC12 细胞胞外钙离子内流, 1×10^{-11} mol/L 的 T₁₀ 对 Aβ 诱导的胞外钙离子内流有抑制作用。这些观察结果表明 T₁₀ 对 Aβ 导致的 PC12 细胞损伤具有明显的保护作用, 其机制可能与抑制 Aβ 诱导的胞内钙离子浓度升高和细胞凋亡有关。

关键词: 阿尔茨海默病; β-淀粉样蛋白; 雷公藤单体 T₁₀; 神经保护

中图分类号: Q421; R338

Effect of Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F monomer triptolide on apoptosis of PC12 cells induced by Aβ1-42

GU Ming, ZHOU Hui-Fang, XUE Bing, NIU Dong-Bin, HE Qi-Hua, WANG Xiao-Min*

Neuroscience Research Institute, Peking University, Beijing 100083, China

Abstract: Recent studies indicate that β-amyloid (Aβ) is the key factor to cause neuronal degeneration in Alzheimer's disease (AD). In the present study, we set up an Aβ induced PC12 cell damage model and studied the protective effect and related mechanisms of T₁₀, monomer extracted from Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F. PC12 cells were treated with different concentrations of Aβ (5×10^{-4} , 5×10^{-3} , 5×10^{-2} , 5×10^{-1} , 5, 50 μmol/L) for 48 h, cell viability was detected by MTT conversion. The apoptotic rate of PC12 cells was quantitatively determined using FACS assay. After PC12 cells were treated with 1×10^{-11} mol/L T₁₀ for 48 h and then co-treated with 50 μmol/L Aβ for 48 h, the apoptotic rate and the change in intracellular Ca²⁺ concentration of PC12 cells were analyzed by FACS assay and confocal, respectively. It was found that 5 μmol/L Aβ decreased the cell viability to 66.3% and 50 μmol/L Aβ decreased it to 55.1%, significantly different from that of the control group. After treatment with 50 μmol/L Aβ for 48 h, the apoptotic rate of PC12 cells increased obviously. The apoptotic rate was 5.37% in the control group, while after treatment with 0.5, 5 and 50 μmol/L Aβ for 48 h, the apoptotic rate of PC12 cells went up to 10.19%, 8.02% and 16.63%, respectively. At the same time, the concentration of intracellular Ca²⁺ increased greatly after treatment with 50 μmol/L Aβ for 48 h. At the concentration of 1×10^{-11} mol/L T₁₀

Received 2003-05-12 Accepted 2003-11-10

This work was supported by the National Basic Research Priorities Programme of China (G1999054008) and the National Natural Science Foundation of China (30271494).

*Corresponding author. Tel: +86-10-82802411; E-mail: xmwang@bjmu.edu.cn

remarkably inhibited the apoptosis induced by 50 $\mu\text{mol/L}$ A β . In the naïve group, the apoptotic rate was 4.83%. The apoptotic rate went up to 17.24% after treatment with 50 $\mu\text{mol/L}$ A β for 48 h. After co-treatment with 1×10^{-11} mol/L T₁₀ and 50 $\mu\text{mol/L}$ A β , the apoptotic rate decreased to 8.91%, significantly different from that of the control group. At the same time, at the concentration of 1×10^{-11} mol/L T₁₀ remarkably inhibited the increase of intracellular Ca²⁺ concentration induced by A β . The results indicate that T₁₀ has obvious protective effect on PC12 cells, which may be related to the inhibition of the cell apoptosis and increment of intracellular Ca²⁺ concentration induced by A β .

Key words: Alzheimer's disease; β -amyloid; T₁₀; neuroprotective effect

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 是一种多发于中老年的中枢神经系统退变性疾病。随着世界人口的老龄化, AD 发病率不断升高, 给家庭和社会带来沉重的负担。因而对 AD 发病机制和防治措施的研究迫在眉睫。

已往的研究已证明, 神经营养因子能有效防止AD 动物模型基底前脑胆碱能神经元的变性和凋亡。但神经营养因子分子量大, 外源性给药不易通过血脑屏障等因素限制了它的临床应用^[1]。自 1994 年起, 陆续有人报道免疫抑制剂 FK506 具有神经营养作用, 并能够放大神经生长因子 (neurogrowth factor, NGF) 的营养作用。我室系列工作发现中药免疫抑制剂雷公藤单体 T₁₀ 具有肯定的神经营养和保护作用, 可促进原代培养的中脑 DA 能神经元轴突生长, 并拮抗 MPP⁺ 对 PC12 细胞的毒性作用, 其机制可能与促进内源性神经营养因子表达有关^[2]。本实验旨在研究 T₁₀ 对 AD 细胞模型的保护作用及其作用机制。

目前对 AD 发病机制的认识以淀粉样蛋白学说占主导地位, 该学说认为 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 沉积是导致细胞损伤的关键环节^[3]。本实验以 A β 为工具药, 建立了 AD 的细胞模型, 并研究了中药免疫抑制剂雷公藤单体 T₁₀ 对细胞的保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 仪器 超净工作台, 北京半导体设备一厂; CO₂ 孵箱, NAPCO 产品; 倒置相差荧光显微镜, 德国 LEICA 产品; 激光共聚焦显微镜, 德国 LEICA 产品; 酶标仪, BIO-RID 产品。

1.2 药品 DMEM 高糖培养基、胰酶 (Trypsin), GIBCO 产品; 二甲基亚砜 (DMSO) 为北京化工厂分析纯试剂; 荧光探针 fluo-3 为 SIGMA 产品; β 淀粉样蛋白片段 A β ₁₋₄₂, Eli Lilly & Co, 杜燕生博士惠赠; 中药免疫抑制剂 T₁₀ 由北京大学药学院屠鹏飞教授提供。

1.3 细胞系 PC12 细胞系 (大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞

瘤细胞系), 购自上海细胞生物学研究所。

1.4 PC12 细胞系的培养 用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液培养细胞, 2 d 更换 1 次培养液, 待细胞长至 80% 接触时, 用 0.05% 胰酶消化细胞, 加含血清培养液终止反应, 1:3 分瓶传代。

1.5 MTT 法检测细胞存活率 MTT 是一种四甲基偶氮唑盐, 在活细胞线粒体琥珀酸脱氢酶的作用下, 被还原成蓝色甲瓒颗粒, 形成量与活细胞数和线粒体琥珀酸脱氢酶的活性呈正相关。PC12 细胞接种于 96 孔板, 细胞稳定 12 h 后加入 A β , 37°C, 5% CO₂ 培养箱内孵育 48 h, 吸去培养液, 将细胞用 PBS 洗 1 次, 加入 0.4 mg/ml MTT 100 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C, 5% CO₂ 培养箱内孵育 4~6 h, 加入助溶剂异丙醇 100 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C 5 h, 使甲瓒颗粒完全溶解。酶标仪波长 490 nm 测定 OD 值。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 细胞凋亡的一个重要特点就是染色体基因组断片化。当细胞发生凋亡时, 细胞膜的通透性增加, 小分子 DNA 片段丢失, 因此, DNA 经特异性荧光染料染色后荧光强度下降, 用流式细胞仪检测时, 在正常二倍体之前出现亚二倍体, 对亚二倍体进行定量分析就可以鉴定出凋亡细胞的百分比。PC12 细胞接种于 24 孔板, 用不同浓度的 A β 孵育细胞 48 h, 收集细胞于离心管中。离心(800 转/min) 5 min, 弃上清, 用 PBS 洗 1 次, 将细胞重悬于 PBS 中, 用 300 目筛网过滤, 保留滤液并用 70% 乙醇固定。染色前用 PBS 洗去固定液, 加入 30 μl RNA 酶, 37°C 水浴 30 min, 加入 2 滴 100 mg/L 碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 染色液, 流式细胞仪检测细胞凋亡。观察 T₁₀ 对 A β 诱导的细胞凋亡的影响时, 用 1×10^{-11} mol/L 的 T₁₀ 与 PC12 细胞孵育 48 h 后加入 50 $\mu\text{mol/L}$ A β , 共孵育 48 h, 用流式细胞仪检测凋亡细胞百分比。同时设立正常对照组及单纯 T₁₀ 处理组。

1.7 激光共聚焦显微镜检测胞外钙离子内流 将细胞接种于 24 孔板, 用 1×10^{-11} mol/L 的 T₁₀ 与 PC12 细胞共孵育 48 h 后, 加入 50 $\mu\text{mol/L}$ A β 共孵育 48 h, 同时设

立正常对照组及单纯 T₁₀ 处理组, 48 h 后, 加入 fluo-3 至终浓度为 3 μmol/L 负载。37℃培养 40 min 后, 用 Hanks 液冲洗 3 次, Confocal 检测细胞内钙离子浓度。检测条件设定为: 激发波长为 488 nm, 检测波长为 dp 530-30。

1.8 统计学处理 在 Prism 软件中用 one-way Anova 分析继之以 Newman-Keuls post hoc 检测, 比较各组之间差别的显著性。

2 结果

2.1 50 μmol/L Aβ 可降低 PC12 细胞存活率

不同浓度 Aβ 与 PC12 细胞共孵育 48 h, MTT 法检测细胞存活率。从图 1 可以看出, 5 μmol/L Aβ 可明显引起活细胞线粒体琥珀酸脱氢酶活性的下降, 细

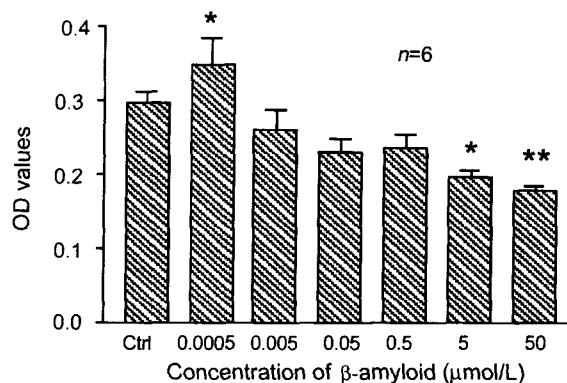


图 1. 不同浓度的 Aβ 对细胞存活率的影响

Fig.1. Concentration-dependent cell toxic effect of Aβ. PC12 cells were treated with Aβ of different concentrations for 48 h, and cell viability was detected by MTT conversion. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ vs control group.

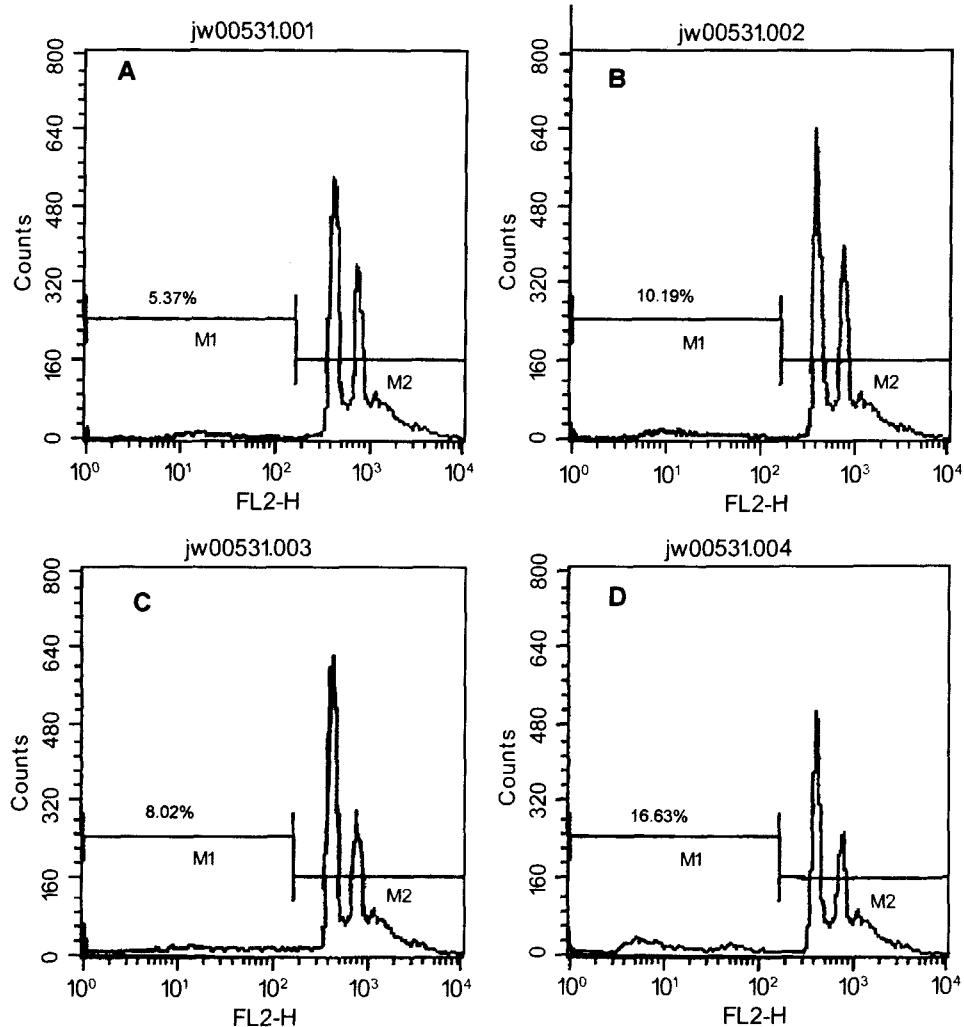


图 2. 不同浓度的 Aβ 对 PC12 细胞凋亡率的影响

Fig.2. Apoptotic rate of PC12 cells treated with Aβ for 48 h. M1 is the percentage of sub-diploid DNA, which indicates the apoptotic rate. A: Control group. B: 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Aβ group. C: 5 $\mu\text{mol/L}$ Aβ group. D: 50 $\mu\text{mol/L}$ Aβ group.

胞存活率降低至 66.3%，和对照组相比较差异有显著性($P<0.05$)； $A\beta$ 浓度上升至 50 $\mu\text{mol/L}$ 时，PC12 细胞存活率进一步降低，为对照组的 55.1% ($P<0.01$)。

2.2 50 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta$ 可诱导 PC12 细胞凋亡

用 0.5、5、50 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta$ 分别与 PC12 细胞共孵育 48 h 后，流式细胞仪检测细胞凋亡百分比。实验重复 4 次，以每次凋亡细胞所占细胞总数的百分比 (M1 所表示数值) 为一个数据点，进行重复测量的方差检测，从图 2 和图 3 可以看出，50 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta$ 可明显诱导 PC12 细胞凋亡，细胞凋亡百分比达 16.63%，与对照组相比，差异有统计学意义($P<0.05$)。

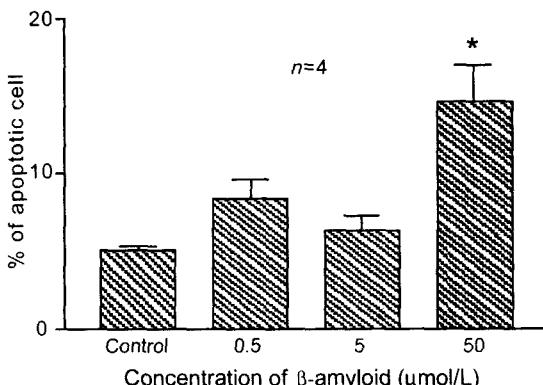


图 3. 不同浓度 $A\beta$ 对 PC12 细胞凋亡率的影响

Fig.3. Apoptotic rate of PC12 cells treated with $A\beta$ for 48 h. * $P<0.05$ vs control group.

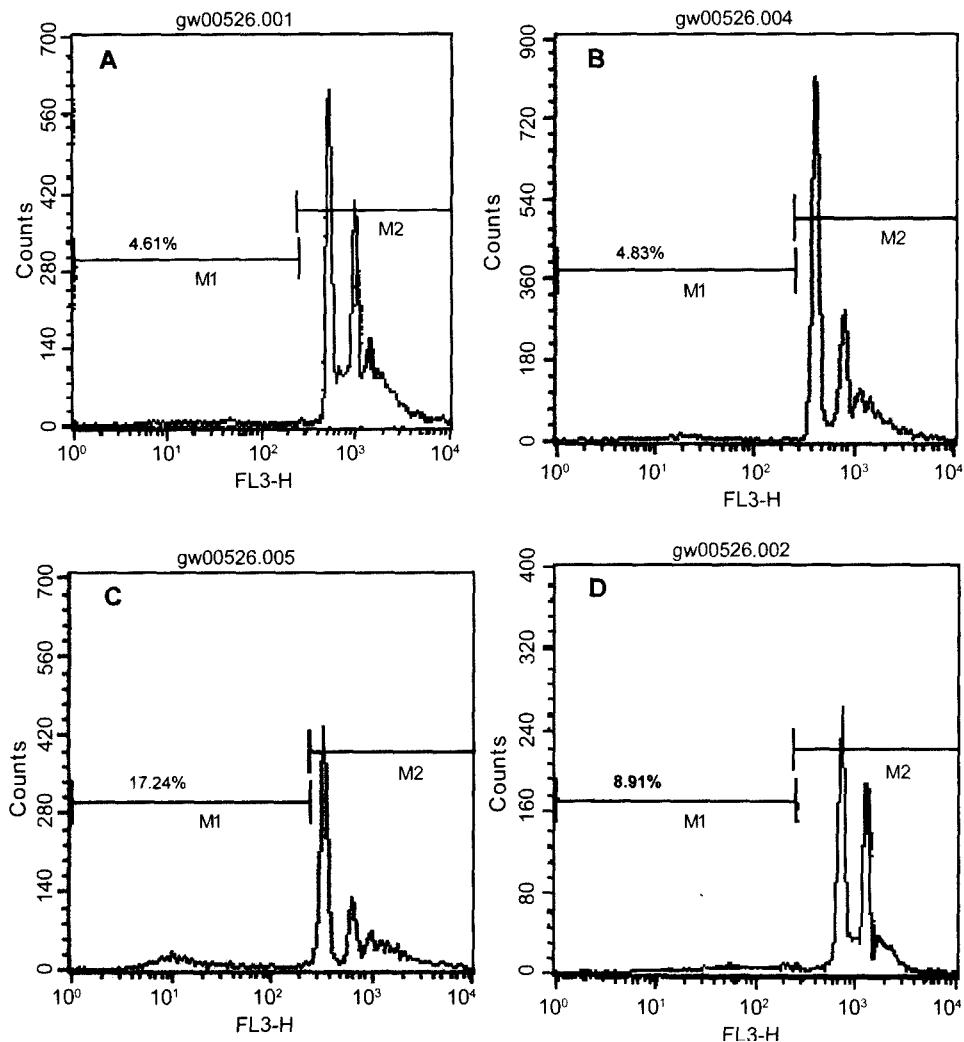


图 4. T_{10} 对 $A\beta$ 所致 PC12 细胞损伤的保护作用

Fig.4. Protective effect of T_{10} on PC12 cells treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta$ analyzed by FACS, repeated for three times. M1 is the percentage of sub-diploid DNA, which indicates the apoptotic rate. A: Control group; B: T_{10} group; C: $A\beta$ group; D: T_{10} and $A\beta$ group.

2.3 T₁₀可保护Aβ诱导的PC12细胞发生凋亡

1×10^{-11} mol/L T₁₀与PC12细胞共孵育48 h后, 加入50 μmol/L Aβ共孵育48 h, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验重复3次, 以每次凋亡细胞所占细胞总数的百分比为一个数据点, 进行重复测量的方差检测, 从图4和图5可见, 空白对照组凋亡百分比为4.83%, 经Aβ处理后, 细胞凋亡百分比明显升高, 达17.24%。T₁₀加Aβ处理组凋亡百分比为8.91%, 与Aβ处理组相比, 细胞凋亡百分比显著降低($P < 0.05$), 说明T₁₀可明显抑制Aβ诱导的细胞凋亡。而单纯T₁₀处理组细胞的凋亡比例与空白对照组相似。

2.4 T₁₀可抑制Aβ诱导的PC12细胞胞外钙离子内流

从图6可见, 对照组几乎所有细胞为暗红色, 表明胞内钙离子水平较低; Aβ组所有细胞变亮甚至发蓝, 表明胞内钙离子浓度的明显增高; T₁₀加Aβ组部分细

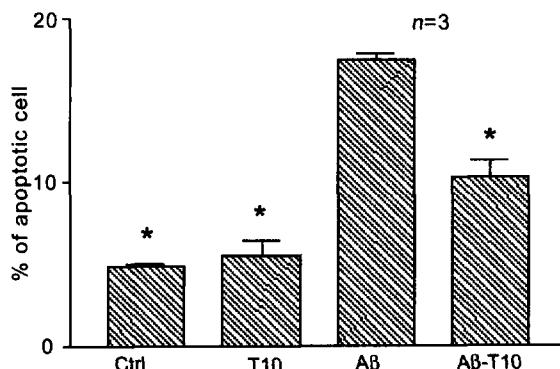


图5. T₁₀可抑制Aβ诱导的PC12细胞凋亡

Fig.5. Protective effect of T₁₀ on PC12 cells treated by 50 μmol/L Aβ analyzed by FACS, repeated for three times, * $P < 0.05$ vs Aβ group.

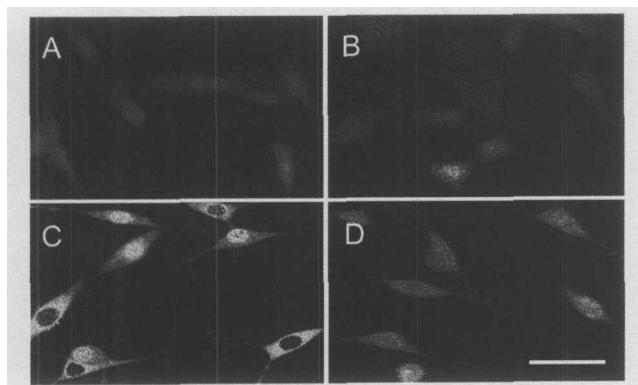


图6. T₁₀可抑制Aβ诱导的细胞内钙离子浓度增加

Fig.6. Effect of T₁₀ on calcium changes induced by 50 μmol/L Aβ for 48 h. A: Control group; B: T₁₀ group; C: Aβ group; D: T₁₀ and Aβ group. Bar, 20 μm.

胞变亮, 但明显暗于Aβ组, 仅是胞内钙离子浓度的轻度升高。表明T₁₀对Aβ诱导的胞内钙离子浓度的升高有抑制作用。单纯T₁₀处理组与对照组无明显差异。

3 讨论

随着世界人口的老龄化, 阿尔茨海默病困扰着越来越多的老年人, 带来了严重的社会、经济和家庭问题。因此, 积极研究AD的发病机制和寻找有效的防治措施是临床和基础医学面临的紧迫课题。本实验证实中药雷公藤单体T₁₀对Aβ导致的PC12细胞损伤具有明确的保护作用; 保护作用的机制与抑制Aβ诱导的钙离子内流和细胞凋亡有关。

由于AD的发病机制尚不清楚, 要研究其发病机制并寻找有效的治疗措施, 一个重要的突破口是建立可模拟AD病理改变的模型。老年斑(senile plaque, SP)和神经纤维缠结是AD的两大病理特征。研究表明, SP的核心成分为Aβ1-42, 具有很强的细胞毒性作用, 可导致细胞营养障碍, 代谢紊乱直至细胞死亡, 这是AD病人脑内老年斑周边神经元变性坏死的主要原因。因此, 在本实验中, 我们选用Aβ1-42作为建立AD模型的基础药物。根据文献报道, 我们选用了PC12细胞系, 这是由于PC12细胞具有与神经元相似的性状, 并且对Aβ1-42较其他细胞敏感^[4]。为了确定Aβ的毒性剂量, 本实验用MTT法观察了经不同浓度的Aβ处理后, 细胞活力的变化。结果显示, Aβ浓度为5 μmol/L时, 细胞存活率明显降低, 为对照组的66.3%。当浓度达到50 μmol/L时, 细胞存活率降低至对照组的55.1%。以上研究结果与相关文献报道一致。另外, MTT结果还表明, 极小浓度Aβ(0.5 nmol/L)可促进细胞生长, 具有细胞营养作用, 这与以往实验相符^[5]。因此, 在以上实验结果的基础上, 参考国际常用Aβ剂量和作用时间, 我们认为50 μmol/L Aβ作用48 h即可对细胞产生明显的毒性作用^[6]。

一些研究表明, 诱导细胞发生凋亡是Aβ细胞毒性作用的重要一环^[7]。流式细胞术在研究凋亡方面具有明显优势, 它可以快速、客观、高灵敏度、多参数地对群体细胞中的每个细胞的生物学变化进行测定, 定量测定凋亡率^[8]。因此, 我们选用这一方法进行了细胞凋亡率的测定。结果显示, 在DNA直方图上正常二倍体G1峰前出现一个小峰, 即凋亡峰, 门控通过粒子量亦相应增多, 统计结果表明, 经50 μmol/L Aβ处理后, 细胞凋亡率明显高于正常对照组, 从

而验证了前人的研究结果^[6]。本室前期工作已经证明 1×10^{-11} mol/L T₁₀ 可以明显减轻 MPP⁺ 对 PC12 细胞的损伤^[2]，为了研究 T₁₀ 对 Aβ 诱导的细胞凋亡的影响，我们用 1×10^{-11} mol/L T₁₀ 与 PC12 细胞预孵育 48 h 后，加入 50 μmol/L Aβ 共同处理 48 h，流式细胞仪检测细胞凋亡比例。结果显示： 1×10^{-11} mol/L T₁₀ 可以明显减轻 Aβ 诱导的细胞凋亡， 1×10^{-11} mol/L T₁₀ 单独作用 96 h 后，细胞凋亡百分比与对照组相似，说明 T₁₀ 可以有效地拮抗 Aβ 诱导的细胞凋亡，这可能是 T₁₀ 可以提高细胞存活率，具有细胞保护作用的机制之一。

为了进一步探讨 T₁₀ 神经保护作用的机制，我们用激光共聚焦显微镜技术检测了 T₁₀ 对 Aβ 诱导的胞内钙离子浓度增加的影响，分析结果表明，50 μmol/L Aβ 可使 PC12 细胞胞内钙离子浓度明显升高，说明促进胞内钙离子浓度升高是 Aβ 发挥细胞毒性作用的一个重要途径^[9]。 1×10^{-11} mol/L T₁₀ 可以明显减轻 Aβ 诱导的胞内钙离子浓度的升高，维持胞内钙离子稳态平衡，这可能是 T₁₀ 提高细胞存活率，具有细胞保护作用的重要机制之一。

本实验建立了 PC12 细胞系 -Aβ 细胞损伤模型，证实了 Aβ 的损伤机制与诱导细胞内钙离子浓度增加和导致细胞凋亡有关。并发现 T₁₀ 具有明确的细胞保护作用，其机制与拮抗 Aβ 诱导的细胞内钙离子增加和细胞凋亡有关。

参考文献

- [1] Olson L, Backman L, Ebendal T, Eriksdotter-Jonhagen M, Hoffer B, Humpel C, Freedman R, Giacobini M, Meyerson B, Nordberg A. Role of growth factors in degeneration and regeneration in the central nervous system; clinical experiences with NGF in Parkinson's and Alzheimer's disease. *J Neurol* 1994;242:12-15.
- [2] Li FQ, Cheng XX, Liang XB, Wang XH, Xue B, He QH, Wang XM, Han JS. Neurotrophic and neuroprotective effects of tripchlorolide, an extract of Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F, on dopaminergic neurons. *Exp Neurol* 2003;179:28-37.
- [3] Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E, Ball MJ. β-Amyloid-1-42 is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implication for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:10836-10842.
- [4] Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* 1994;77: 817-827.
- [5] Cotman CW, Pike CJ, Copani A. Beta-amyloid neurotoxicity: a discussion of *in vitro* findings. *Neurobiology* 1992;13:587-590.
- [6] Behl C, Davis J, Cole GM, Schubert D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid β protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;148:120-125.
- [7] Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7951-7955.
- [8] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992;13:795-808.
- [9] Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. β-amyloid peptide destabilizes calcium homeostasis and renders human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 1992;12:376-389.