·论著·

雷公藤单体 T_{10}对谷氨酸所致 PC12 细胞损伤的保护作用及机制研究

何其华,周慧芳,薛 冰,牛东滨,王晓民△
(北京大学神经科学研究所,北京 100083)

[关键词] 雷公藤属;免疫抑制剂;神经保护;帕金森病

[摘 要] 目的:以谷氨酸为工具药建立帕金森病(Parkinson disease, PD)的氧化应激模型,观察雷公藤内酯醇(triptolide, T_{10})的保护作用并初步探讨其作用机制。方法:分别用 10^{-10}、10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10}和/或 10、50 mmol·L^{-1}谷氨酸处理 PC12 细胞 24 h,MTT 法检测细胞的活力,并用 AnnexinV-FITC 和 PI 对活细胞进行双标,流式细胞仪检测凋亡细胞百分率。分别采用荧光探剂 2′,7′-二氯荧光素乙酰乙酸盐和 JC1 定量检测细胞内活性氧和线粒体膜电位水平以探讨其作用机制。结果:谷氨酸处理 PC12 细胞 24 h,可引起细胞的凋亡和坏死,细胞内活性氧形成明显增加,线粒体膜电位下降。而用 10^{-10}或 10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10}预保护 30 min 可明显减轻 PC12 细胞的损伤,并抑制细胞内活性氧的形成和线粒体膜电位下降。结论:10^{-10}或 10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10}能有效地拮抗谷氨酸对 PC12 细胞的损伤作用。其作用机制可能与抑制谷氨酸诱导的细胞内活性氧自由基的生成和线粒体膜电位下降有关。

[中图分类号] R742.5 [文献标识码] A [文章编号] 1671-167X(2003)03-0252-04

Neuroprotective effects of *Tripterygium Wilforddi Hook F* monomer T_{10} on glutamate induced PC12 cell line damage and its mechanism

HE Qihua, ZHOU Huifang, XUE Bing, NIU Dongbin, WANG Xiaomin△
(Neuroscience Research Institute, Peking University, Beijing 100083, China)

KEY WORDS Tripterygium; Immunosuppressive agents; Neuroprotection; Parkinson disease

SUMMARY **Objective:** To study the neuroprotective effect and related mechanisms of triptolide. **Methods:** After being treated with 10^{-10}, 10^{-9} mol·L^{-1} triptolide and/or 10, 50 mmol·L^{-1} glutamate for 24 hours, and the viability of PC12 was detected by MTT conversion, and the apoptosis rate was detected by AnnexinV-FITC and PI staining. In order to understand the underlying mechanism of the neuroprotective effect of triptolide, H_2DCFDA and JC1 were used to detect the reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential. **Results:** Glutamate could induce PC12 necrosis and apoptosis. T_{10} at 10^{-10} or 10^{-9} mol·L^{-1} inhibited glutamate-induced cell death, ROS formation and decrease of mitochondrial membrane potential. **Conclusion:** T_{10} at 10^{-10} or 10^{-9} mol·L^{-1} can protect PC12 from the death induced by glutamate; and the underlying mechanisms may be involved in the inhibition of ROS formation and decrease of mitochondrial membrane potential.

(*J Peking Univ [Health Sci]*, 2003, 35: 252-255)

帕金森病(Parkinson disease, PD)是一种多发于中老年人的中枢神经系统退变性疾病。PD 的主要病理特征为中脑黑质致密部(subtantia nigra pars compacta, SNpc)的多巴胺能(dopamine, DA)神经元的进行性丢失,导致纹状体 DA 的严重耗竭,从而造成运动机能障碍。

近来研究发现氧化应激和线粒体膜电位下降在 DA 能神经元的死亡过程中发挥了非常重要的作用。从而把减轻氧化应激作为药物作用的靶点之一,用于神经保护药物的筛选[1]。

本室以前的工作已经证实我国传统中药免疫抑制剂雷公藤内酯醇(triptolide, T_{10})具有与免疫抑制剂环孢菌素 A(cyclosporin A, CsA)相似的神经保护作用,但其机制尚不清楚。近来研究发现CsA的神

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目基金(G1999054008)和国家自然科学基金(30271494)资助 Supported by the Major State Basic Research Development Program of People's Republic of China(G1999054008) and the National Natural Science Foundation of China(30271494)

△Corresponding author email, xmwang@bjmu.edu.cn

© 1995-2004 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

经保护机制为抗氧化和抑制线粒体膜电位下降,最终抑制细胞凋亡。为探讨 T_{10}是否具有同样的作用机制,本实验以谷氨酸为工具药建立氧化应激的细胞模型,研究 T_{10}对神经元的保护作用及作用机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　试剂　谷氨酸钠(glutamate, Glu)、胰蛋白酶(trypsin)、EDTA 和 4-甲基偶氮唑蓝(MTT)为 Sigma 公司产品;DMEM 培养基和胎牛血清为 GIBCO 公司产品;T_{10}由北京大学药学院屠鹏飞教授提取,为白色粉末,纯度 > 98 %,相对分子质量 360。检测细胞内自由基的荧光探针 2′7′-二氯荧光素乙酰乙酸盐 (2′7′-dichlorodihydroflurorescin diacetate, H_2DCFDA) 和线粒体膜电位的荧光探针 JC1 为 Molecular Probes 公司产品。荧光标记的钙结合蛋白(Annexin V- FITC)和碘化丙啶(propidum iodid, PI)为北京大学医学部基因中心产品。

1.1.2　细胞株　已分化 PC12 细胞(大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞,rat pheochromocytoma)为本所保存。

1.1.3　实验所用主要仪器　倒置荧光相差显微镜:德国 LEICA 公司;CO2 孵箱:SANYO 公司;ELISA 读板机:BIO-RAD 公司;图像分析系统:SPOT-2 Cooled CCD,配置 Metamorph 图像分析软件,德国 LEICA 公司;流式细胞仪:美国 BD 公司;激光扫描共焦显微镜:TCS SP2,德国 LEICA 公司;多功能读板机:美国 PE 公司。

1.2　方法

1.2.1　PC12 细胞的培养与传代　用含 10 %(体积分数)胎牛血清的 DMEM 培养液培养细胞,每 2～3 d 换液 1 次。待细胞增长至 80 %融合时,用0.125 %(质量分数)胰酶消化细胞,加含血清培养基终止反应。用滴管轻柔吹打使其成为单细胞悬液,1∶3 分瓶传代。

1.2.2　细胞的接种与药物处理　PC12 细胞接种于 Confocal 专用小皿内,接种密度为每皿 4×10^4,24 h 后在每个小皿内加入 10^{-10}或 10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10} 预孵育 30 min。然后加入 50 或 100 mol·L^{-1}的 Glu,24 h 后收获细胞。损伤对照组只加 Glu,空白对照组加入等体积 PBS。

1.2.3　MTT 法检测细胞活性　MTT 是一种四甲基偶氮唑盐,活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。助溶剂异丙醇能溶解细胞中的蓝紫色结晶物,测定在 570 nm 波长处的光吸收值可间接反应活细胞的数量和活性。

1.2.4　细胞凋亡检测方法　磷脂酰丝氨酸(PS)在非凋亡细胞中分布于细胞膜内侧,细胞凋亡一旦启动,PS 作为早期凋亡信号从细胞膜内侧转至外侧。钙结合蛋白(Annexin V)依赖 Ca^{2+}与 PS 结合,使用 Annexin V-FITC 可标记早期凋亡细胞。而 PI 不能穿透活细胞膜,可用来标记死亡细胞。所以用 AnnexinV-FITC 和 PI 对活细胞进行双标则可区分凋亡、坏死和正常活细胞。用流式细胞仪检测可得到早期凋亡、中晚期凋亡、坏死和正常活细胞百分率。

1.2.5　细胞内活性氧定量检测　细胞内活性氧的测定采用荧光探剂 H_2DCFDA,该荧光探剂在乙酰乙酸盐的帮助下进入细胞内,在胞内水解,氧化,脱氢后形成荧光素发光,荧光发光强度和细胞内活性氧的水平成正比,因此该荧光探剂可定量检测细胞内活性氧。

1.2.6　细胞内线粒体膜电位测量　细胞内线粒体膜电位的测定采用荧光探剂 JC1,化学全名为:5,5′,6,6′-tetrachloro-1,1′,3,3′-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine Iodide)。JC1 是一种阳离子荧光染料,可跨膜进入活细胞内定位在线粒体膜上。其聚集程度随线粒体膜电位升高而增加。JC1 激发光 505 nm,单体发射光 527 nm,为绿色荧光;聚集体发射光 590 nm,为红色荧光。当线粒体膜电位升高时,JC1 聚集体增多,红色荧光变强。因此红色荧光和绿色荧光的强度比值可代表膜电位高低。

1.2.7　数据处理和统计学检验　结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组数据间差异用单因素方差分析(ANOVAs)并继之以 Dunnett post-hoc 检验。$P<0.05$ 为差异有显著性。

2　结果

2.1　T_{10}可明显拮抗 Glu 对 P12 细胞的毒性作用

10^{-10}或 10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10} 预孵育细胞 30 min 后分别加入 10 或 50 mmol·L^{-1} Glu,共孵育 24 h,MTT 法检测细胞活性。10 或 50 mmol·L^{-1}的 Glu 可使 PC12 细胞的活力降低,和空白组相比差异有显著性($P<0.01$),而 10^{-10}或 10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10}预保护 30 min 明显拮抗 Glu 的毒性作用(表 1)。

2.2　T_{10}可抑制 Glu 诱导的 P12 细胞凋亡

10^{-10}或 10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10} 预孵育细胞 30 min 后加入 50 mmol·L^{-1} Glu,共孵育 24 h,AnnexinV-FITC 和 PI 双标活细胞,流式细胞仪检测可得到早期凋亡、中晚期凋亡、坏死和正常活细胞百分

© 1995-2004 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

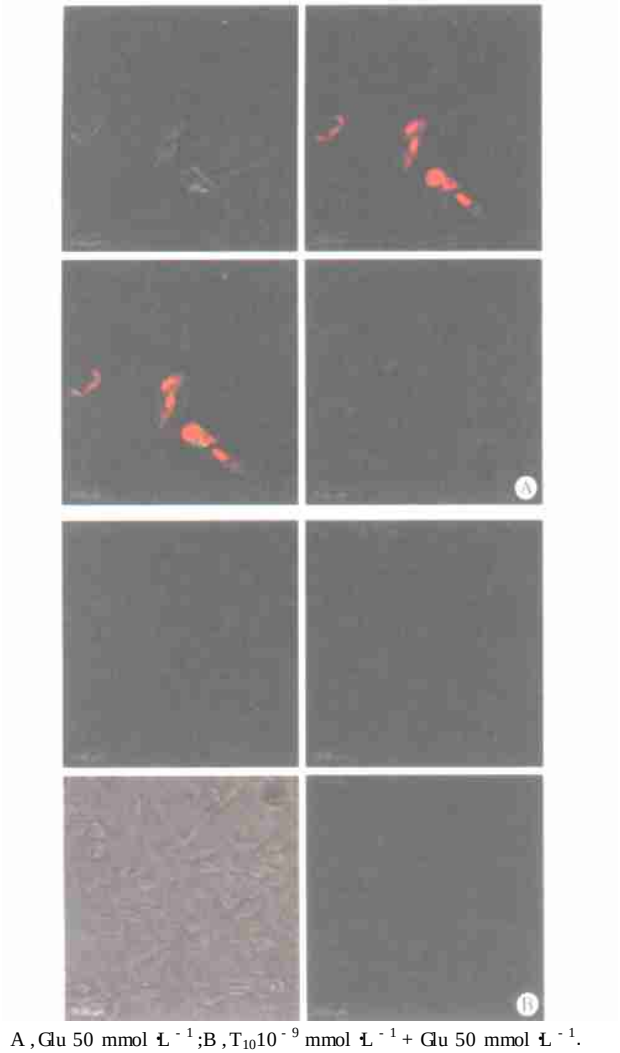
率。50 mmol·L^{-1} Glu 可诱导 PC12 细胞凋亡,而 10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10}可有效地抑制 Glu 诱导的 PC12 细胞凋亡(图 1)。将空白对照组、模型组和加 T_{10}保护组的细胞凋亡率进行了统计分析后发现,50 mmol·L^{-1} Glu 处理细胞 24 h 可使细胞凋亡率升高,而 T_{10}预保护可明显降低细胞凋亡率(表 2)。

表 1 T_{10}可抑制谷氨酸所致的细胞活力下降($n = 7$)

Table 1 Effect of T10 on Glu-induced decrease of cell viability($n = 7$)

c(Glu)/(mmol·L^{-1})	Naïve	Control	T_{10}(10^{-10} mol·L^{-1})	T_{10}(10^{-9} mol·L^{-1})
10	0.39 ±0.03 **	0.35 ±0.02	0.40 ±0.05 **	0.38 ±0.03 *
50	0.39 ±0.03 **	0.34 ±0.02	0.40 ±0.03 **	0.36 ±0.03 *

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *vs* control.



A, Glu 50 mmol·L^{-1}; B, T_{10} 10^{-9} mmol·L^{-1} + Glu 50 mmol·L^{-1}.

图 1 T_{10}可拮抗谷氨酸诱导的 PC12 细胞凋亡

Figure 1 Effect of T_{10} on Glu-induced apoptosis

2.3 T_{10}抑制 Glu 诱导 PC12 细胞活性氧的产生

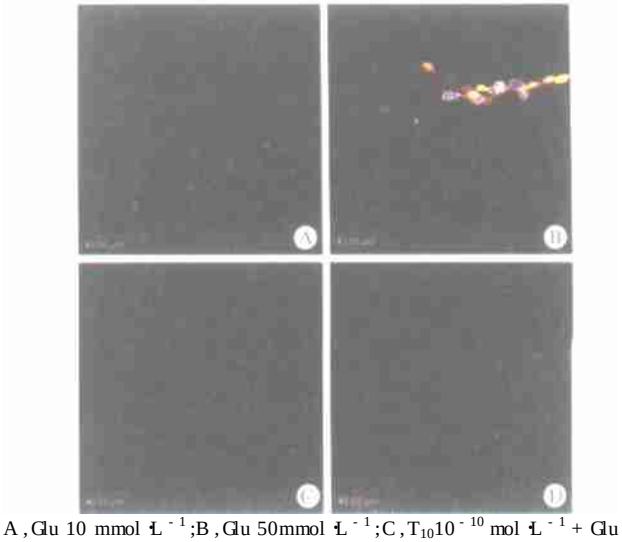
10 或 50 mmol·L^{-1}的 Glu 孵育细胞 24 h,可使细胞内产生大量的活性氧,荧光强度增加。而 10^{-10}或 10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10}预处理细胞 30 min 可拮抗活性氧的形成,荧光强度明显降低(图 2,表 3)。

表 2 T_{10}可拮抗谷氨酸诱导的 PC12 细胞凋亡($n = 3$)

Table 2 Effect of T10 on Glu-induced apototosis of PC12 cells($n = 3$)

Group	Glu (50 mmol·L^{-1})
Naïve	14.21 ±0.73 *
Control	27.83 ±1.80
T_{10}(10^{-10} mmol·L^{-1})	12.10 ±1.95 *
T_{10}(10^{-9} mmol·L^{-1})	12.69 ±1.69 *

* $P < 0.01$, *vs* control.



A, Glu 10 mmol·L^{-1}; B, Glu 50mmol·L^{-1}; C, T_{10} 10^{-10} mol·L^{-1} + Glu 10 mmol·L^{-1}; D, T_{10} 10^{-9} mol·L^{-1} + Glu 50 mmol·L^{-1}.

图 2 T_{10}可拮抗谷氨酸诱导的活性氧自由基水平升高

Figure 2 Effect of T_{10} on Glu-induced the increase of ROS in PC12 cells

2.4 T_{10}抑制 Glu 诱导 PC12 细胞线粒体膜电位的下降

10 或 50 mmol·L^{-1}的 Glu 孵育细胞 24 h,可使细胞线粒体膜电位明显下降。而 10^{-10}或 10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10}预处理细胞 30 min 可抑制线粒体膜电位的降低(表 4)。

3 讨论

3.1 Glu 对 PC12 细胞的损伤及损伤机制

Glu 是脑内主要的兴奋性神经递质,但细胞外 Glu 水平过高,将导致神经毒性作用。Glu 的神经毒性作用机制有两种——兴奋性毒性和非兴奋性依赖的神经毒性作用。在缺乏完整兴奋性通路的细胞系,如:HT4、HT22、PC12 和 C6,Glu 诱导的细胞死亡伴随着细胞内谷胱甘肽的丢失、活性氧的堆积和线粒体膜电位的丢失,而抗氧化剂可以防止 Glu 诱导的细胞死亡[2],表明氧化应激是 Glu 非兴奋性神

© 1995-2004 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

经毒性作用的主要机制。

本研究发现,10 或 50 mmol·L^{-1}的 Glu 处理 PC12 细胞 24 h,可引起细胞活性明显下降,同时伴有细胞内活性氧自由基的大量堆积和线粒体膜电位的下降,表明氧化应激在 Glu 非兴奋毒性中起着非常重要的作用,提示 Glu 损伤的 PC12 细胞模型是研究氧化应激机制及筛选抗氧化药物的理想模型。

表 3　T_{10}可拮抗谷氨酸诱导的活性氧自由基水平升高

Table 3　The effect of T_{10} on Glu-induced the increase of ROS in PC12 cells

%

c(Glu)/(mmol·L^{-1})	Naïve	Control	T_{10}(10^{-10} mol·L^{-1})	T_{10}(10^{-9} mol·L^{-1})
10	18.69 ±11.8 *	55.22 ±24.07	12.41 ±12.15 *	11.76 ±14.79 *
50	18.69 ±11.88 *	99.92 ±81.98	34.48 ±19.77 *	33.38 ±34.65 *

* $P<0.01$ *vs* control, n = 115 - 222.

表 4　T_{10}可拮抗谷氨酸诱导的线粒体膜电位下降

Table 4　Effect of T_{10} on Glu-induced the decline of mitochondria membrane potential of PC12 cells

c(Glu)/(mmol·L^{-1})	Naïve	Control	T_{10}(10^{-10} mol·L^{-1})	T_{10}(10^{-9} mol·L^{-1})
10	3.30 ±1.94 *	1.90 ±1.36	4.38 ±2.25 *	6.88 ±2.60 *
50	3.30 ±1.94 *	2.17 ±5.78	4.03 ±1.86 *	5.91 ±2.16 *

* $P<0.01$ *vs* control, n = 425 - 115.

3.2　T_{10}对 Glu 损伤的神经保护作用及相关机制

本实验采用 MTT 法和 AnnexinV-FITC 和 PI 双标活细胞的染色方法观察了 T_{10}对 PC12 细胞的神经保护作用。发现 10^{-10}或 10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10}对 Glu 的损伤都具有保护作用。在随后的作用机制研究中我们发现,T_{10}可明显抑制细胞内活性氧水平的升高,阻止线粒体膜电位的下降。

细胞内活性氧的大量堆积是 Glu 诱导细胞死亡过程的主要路径之一,10^{-10}或 10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10}能有效抑制由 Glu 诱导的活性氧堆积。DA 能神经元内活性氧的基础水平较高,所以在体内清除自由基的机制受损时,DA 能神经元最容易遭受自由基的攻击。DA 在正常的酶促代谢的过程中就可在 MAO-B 的催化作用下生成过氧化氢。另外,DA 在自动氧化过程中可产生神经黑色素,当神经黑色素与铁结合可形成毒性更大的羟自由基[3],提示清除细胞内的活性氧是 T_{10}神经保护作用的重要机制之一。

Glu 可以引起 PC12 细胞内线粒体膜电位的下降,而浓度为 10^{-10}或 10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10}能明显阻止线粒体膜电位的下降。线粒体活性受损可导致 ATP 生成障碍,细胞能量耗竭和死亡[4]。最近研究表明,线粒体活性受损特别是复合物 I的功能障碍参与了黑质 DA 能神经元的损伤。线粒体复合物 I位于线粒体内膜,是细胞氧化磷酸化系统的一个组分。线粒体复合体 I功能障碍的原因至今不明,可能与线粒体 DNA 突变有关[5]。另外,研究发现 MPTP 和其它外源性神经毒素也可以损伤线粒体复合物 I的功能[6]。线粒体功能障碍均可导致 ATP 水平的降低、质子泵功能受损,进而导致线粒体膜电位的降低[7],从而启动了细胞凋亡[8]。10^{-10}或 10^{-9} mol·L^{-1}的 T_{10}可逆转由 10 或 50 mmol·L^{-1}的 Glu 作用 24 h 造成的线粒体膜电位的下降,这可能是 T_{10}神经保护作用的重要机制。

本研究以谷氨酸为工具药,建立了 PC12 细胞的氧化应激模型,证实 T_{10}可拮抗 Glu 的损伤作用。进一步的研究发现,T_{10}可以抑制 Glu 诱导的 ROS 产生、线粒体膜电位的下降。提示抗氧化机制是 T_{10}的神经保护作用的重要机制。

参考文献

1 Blandini F, Greenamyre JT. Prospects of glutamate antag-onists in the therapy of Parkinson's disease[J]. Fundam Clin Pharmacol, 1998,12:4-12

2 Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease[J]. Prog Neurobiol, 1996, 48: 1-19

3 Kumar R, Agarwal ML, Seth PK. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine[J]. J Neurochem, 1995, 64: 1703-1707

4 Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis[J]. Trends Cell Biol, 2000, 10: 369-377

5 Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, *et al*. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 163: 1450-1455

6 Camins A, Sureda FX, Gabriel C, *et al*. Effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) on mitochondrial membrane potential in cerebellar neurons: interaction with the NMDA receptor[J]. J Neural Transm, 1997, 104: 569-577

7 Ramsay RR, Singer TP. Energy-dependent uptake of Nmethyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria[J]. J Biol Chem, 1986, 261: 7585-7587

8 Jacotot E, Costantini P, Laboureau E, *et al*. Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process[J]. Ann NYAcad Sci, 1999, 887: 18-30

(2003-03-14 收稿)
(本文编辑:赵　波)

© 1995-2004 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.