

药联合应用适用于偏头痛患者的治疗,且在治疗过程中未发现不良反应,充分发挥了中药标本兼治的功效,值得临床推广及应用研究,并为偏头痛的预防和治疗提供了临床资料。

References:

- [1] Olesen J, Steiner T J. The International classification of headache disorders, 2nd ed (ICDH- II) [J]. *J Neur Neuros Psychia*, 2004, 75(6): 808-811.
- [2] Vincent M B. Physiopathology of migraine [J]. *Arq-Neuropsiquiatr*, 1998, 56(4): 841-851.

- [3] Samsam M, Covenas R, Ahangari R, *et al.* Alterations in neurokinin A, substance P- and calcitonin gene-related peptide immunoreactivities in the caudal trigeminal nucleus of the rat following electrical stimulation of the trigeminal ganglion [J]. *Neurosci-Lett*, 1999, 261(3): 179-182.
- [4] Wang H X, Lie Y Y, Zhou S W. The correlation between calcitonin gene-related peptide and Migraine [J]. *J Brain Nerv Dis* (脑与神经疾病杂志), 2003, 11(1): 53.
- [5] Wang Y H, Cheng J, Shao F Y. The relationship between calcitonin gene-related peptide, its receptor and migraine [J]. *Foreign Med: Neurol Neurosurg* (国外医学:神经病学神经外科学分册), 2003, 30(4): 307-320.

雷公藤内酯醇对 β -淀粉样肽诱导的 PC-12 细胞凋亡的影响

沈悦娣¹, 姚杭平², 张力三³, 赵光树², 陈 炜^{3*}

(1. 杭州师范学院医学院, 浙江 杭州 310020; 2. 浙江大学医学院附属第一医院, 浙江 杭州 310003;

3. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310016)

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种老年人常见的神经退行性疾病, 其发病机制尚未完全阐明, 目前治疗手段如胆碱酯酶抑制剂着眼于临床症状的改善, 而不能从根本上阻断 AD 的发展^[1]。因此, 寻找新的抗 AD 药物迫在眉睫。

β -淀粉样肽 (β -amyloid, A β) 沉积在脑内引起炎症反应, 造成对神经元的损伤, 促成了 AD 的发生。因此干预炎症反应, 可能成为有效干预 AD 发病的方法之一。抗炎药是目前抗 AD 药物研发的热点之一。雷公藤内酯醇 (triptolide, TP) 是从药用植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 中分离得到的有效成分, 具有抗炎和免疫抑制的作用。以前的工作证明 TP 能抑制脂多糖诱导的 PC-12 细胞的炎症反应, 提示其具有抗 AD 作用^[2]。本研究试图从 AD 的根本发病机制上证实 TP 的抗 AD 作用。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂: 雷公藤内酯醇 (TP), Calbiochem 公司产品, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 645900。A β -43, 美国 ALEXIS 公司产品; 标准胎牛血清, 美国 Hyclone 公司; MTT, 美国 Sigma; DEME 高糖培养基, Hyclone; 重组鼠神经生长因子 (NGF), 美国 R&D 公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 上海生物工程有限公司; Annexin V-FITC Apoptosis Detection

Kit, 美国 BD 公司; RIPA Lysis Buffer Kit, ECL 化学发光显色试剂、caspase-3 P11 (K-19) goat polyclonal IgG, caspase-9 P10 (H-83) rabbit polyclonal IgG 和 Rabbit anti- β -actin polyclonal IgG, 美国 Santan Cruz; PVDF 膜, 美国 Milipore 公司。

1.2 PC-12 细胞的培养和诱导: PC-12 细胞 (引种自中国科学院上海细胞所, 浙江大学卫生部传染病重点实验室传代保存) 置于 15% 胎牛血清 (FCS) 的高糖 DMEM 培养液 (含 50 ng/mL 的 NGF、青霉素钠 100 U/mL、链霉素 100 U/mL、2 mmol/L L-谷氨酰胺, pH 7.4) 中, 2 d 更换 1 次培养液, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞长至 80% 生长面积时, 用 0.125% 胰酶消化细胞, 加含血清培养液终止反应, 1:3 分瓶传代, 每周换液 2 次, 传代 1 次。取对数生长期细胞用于实验。

1.3 培养细胞分组及药物处理: 为了检测 caspase 的表达, 将培养的 PC-12 细胞分为 3 组, 单纯 A β 处理组、A β 与不同质量浓度药物处理组 (A β +药物)、对照组 (正常对照)。对照组加等量无血清 DMEM 培养基; 单纯 A β 处理组换以新鲜无血清培养基后加入终浓度为 5 μ mol/L 的 A β ; A β +药物处理组: 用不同质量浓度的药物预处理细胞 24 h, 弃原培养基, 用无血清 DMEM 培养基洗 3 次, 再加入终浓度为 5 μ mol/L 的 A β 的 DMEM 培养基, 继续培养 24

收稿日期: 2006-02-22

作者简介: 沈悦娣 (1969—), 女, 浙江慈溪人, 讲师, 研究生, 主要研究方向为痴呆、白血病的分子生物学研究, 已发表相关论文 20 余篇。

Tel: (0571) 28865507 Fax: (0571) 28865512 E-mail: shenyd5@hotmail.com

* 通讯作者 陈 炜 Tel: (0571) 86006096 E-mail: srrcw@zju.edu.cn

h 后,细胞用预冷的 0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS,pH 7.2) 冲洗 2 次后,用 0.125% 胰酶消化 1 min,加入适量含血清的培养基终止消化,用吸管轻轻吹打制成细胞悬液,用于各项实验,各实验组设 3 个平行对照。

1.4 药物剂量确定(MTT 法):细胞以 1×10^4 /100 μ L 接种于 96 孔板,设正常细胞生长对照组及不同质量浓度药物实验组。每孔加入含药培养基 100 μ L,每个药物质量浓度设 6 个平行孔。正常对照孔加入培养液 100 μ L。培养 72 h 后,每孔加入 MTT (2 mg/mL) 50 μ L,继续在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下孵育 4 h,吸去培养液,每孔加入 DMSO 150 μ L 振摇 15 min,静置 0.5 h,待蓝紫色结晶完全溶解后,用酶标仪检测各组细胞的 570 nm 处吸光度 (A_{570}) 值,以 A_{570} 间接反映细胞活性。

1.5 不同质量浓度药物对 A β 诱导的 PC-12 细胞存活的影响 (MTT 法):细胞以每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板,每孔 50 μ L,药物组每孔加入 50 μ L 含不同质量浓度药物的培养基,每种药物浓度重复 3 孔,与 PC-12 细胞预孵育 24 h 后,除正常对照组外,其他组每孔加入 100 μ L 含 A β 的培养基 (A β 的终浓度为 5 μ mol/L),继续培养 72 h 后,作 MTT 比色分析。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率:PC-12 细胞以密度 1×10^5 /mL 接种于 24 孔板,每孔 1 mL,按 1.3 项分组培养处理后,收集细胞于离心管中。细胞用 PBS 洗 2 次;将细胞重悬于 195 μ L 的 1 $\times$ 加样缓冲液中,加入 5 μ L Annexin V-FITC,混匀,室温下避光孵育 15 min;用 1 $\times$ 加样缓冲液洗细胞 1 次,并重悬细胞;加 5 μ L 的质量浓度为 20 μ g/mL 的碘化丙啶 (PI),避光孵育 5 min。1 h 内流式细胞仪上机检测细胞凋亡率。

1.7 以 Western Blotting 分析药物对细胞 caspase-3,caspase-9 蛋白表达的影响:收集各组药物处理的细胞及对照组细胞,用细胞裂解液 (RIPA Lysis Buffer) 100 μ L 裂解细胞,冰浴 30 min,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,蛋白定量后加入等体积的加样缓冲液,混匀,煮沸 5 min。按蛋白定量测定结果每孔上样 40 μ g 蛋白,以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上,用封闭液 (含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 液) 室温封闭 2 h 后,与相应的一抗 (分别为 caspase-3,caspase-9 多克隆抗体 1:200) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBS-T 液洗 15 min $\times$ 4 次,与辣根过氧

化物酶偶联的二抗 (1:2 000) 室温孵育 2 h,TBS-T 洗 15 min $\times$ 5 次,加入 ECL 显色试剂,暗室曝光,显影,定影。实验以 β -actin 作为内参照。

1.8 统计学方法:计量资料数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),所有数据均采用 SPSS 10.0 统计软件包统计。

2 结果

2.1 TP 对 PC-12 细胞的毒性作用 (MTT 法):TP 仅在高质量浓度时对正常 PC-12 细胞增殖产生影响。如表 1 所示,正常培养的 PC-12 细胞经 TP 处理 4 h 后,质量浓度为 200 和 100 ng/mL 的 TP 使 PC-12 细胞的 A_{570} 值明显降低 ($P < 0.01$ 、0.05);50 ng/mL 的 TP 尽管使 A_{570} 值有所降低,但无统计学意义 ($P > 0.05$);质量浓度 25 ng/mL 以下的 TP 处理过的 PC-12 细胞 A_{570} 值与未经处理的 PC-12 细胞 A_{570} 值相似甚至增高,但无统计学意义。因此选定 5、10、20 ng/mL 作为后续实验 TP 使用的质量浓度。

表 1 TP 对正常 PC12 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effects of TP on proliferation of normal PC12 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(ng $\cdot$ mL ⁻¹)	A_{570}
对照	0	2.45 $\pm$ 0.29
TP	200	1.28 $\pm$ 0.25**
	100	1.92 $\pm$ 0.24*
	50	2.34 $\pm$ 0.25
	25	2.42 $\pm$ 0.34
	10	2.48 $\pm$ 0.22
	5	2.44 $\pm$ 0.39
	2.5	2.52 $\pm$ 0.32
	1	2.54 $\pm$ 0.23

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

2.2 TP 对 A β 诱导的 PC-12 细胞存活的影响 (MTT 法):如表 2 所示,A β (5 μ mol/L) 处理 72 h 使 PC-12 细胞的 A_{570} 值明显降低 ($P < 0.01$)。用 TP 预处理 2 h,PC-12 细胞的 A_{570} 值增加,在质量浓度为 10 和 20 ng/mL 时具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01)。TP 的作用呈质量浓度依赖关系。

2.3 TP 对 A β 诱导的 PC-12 细胞凋亡的影响:对照组 PC-12 细胞只有极微量的细胞凋亡。A β (5 μ mol/L) 处理 72 h 后凋亡细胞明显增多,但用 TP 预处理 2 h 后,凋亡细胞减少,质量浓度为 10 和 20 ng/mL 时作用尤其明显。各组细胞凋亡率见表 3。TP 预处理组细胞凋亡率均高于对照组 ($P < 0.01$ 、0.05)。

表 2 TP 对 Aβ 诱导的 PC12 细胞存活的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of TP on survival of PC12 cells induced by Aβ ($\bar{x} \pm s, n=3$)		
组别	剂量/(ng · mL ⁻¹)	A ₅₇₀
对照	—	1.75 ± 0.12
Aβ	0	0.73 ± 0.35▲▲
Aβ+TP	5	0.88 ± 0.20
	10	1.46 ± 0.13*
	20	1.71 ± 0.23**

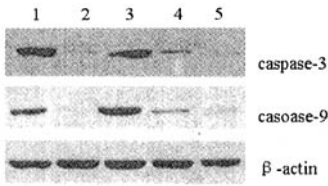
与对照组比较: ▲▲ $P<0.01$
与 Aβ 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
▲▲ $P<0.01$ vs control group
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs Aβ group

表 3 TP 对 Aβ 诱导 PC12 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of TP on apoptosis of PC12 cells induced by Aβ ($\bar{x} \pm s, n=3$)		
组别	剂量/(ng · mL ⁻¹)	细胞凋亡率/%
对照	—	1.77 ± 0.39
Aβ	0	47.28 ± 3.94▲▲
Aβ+TP	5	35.86 ± 2.34▲**
	10	11.74 ± 2.52▲**
	20	5.93 ± 2.26▲**

与对照组比较: ▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$;
与 Aβ 组比较: ** $P<0.01$
▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$ vs control group;
** $P<0.01$ vs Aβ group

2.4 TP 对 Aβ 诱导的 PC-12 细胞 caspase 蛋白表达的影响:如图 1 所示,Aβ (5 μmol/L) 处理 24 h 使 PC-12 细胞 caspase-3 和 caspase-9 表达明显升高 ($P<0.01$),用 TP 预处理 2 h,caspase-3 和 caspase-9 表达降低,作用呈浓度依赖性,在 10 和 20 ng/mL 时作用显著 ($P<0.01$)。



1-Aβ (5 μmol/L) 2-对照 3~5-Aβ+TP (5、10、20 ng/mL)
1-Aβ (5 μmol/L) 2-control 3~5-Aβ+TP (5、10、20 ng/mL)

图 1 TP 对 Aβ 诱导的 PC-12 细胞 caspase 蛋白表达的影响
Fig. 1 Effect of TP on protein expression of caspase of PC-12 cells induced by Aβ

3 讨论

AD 特征性病理改变包括老年斑、神经原纤维缠结和基底前脑胆碱能神经元丢失。其中老年斑的主要成分为 Aβ。AD 的发病机制至今尚未完全明了,有学者认为 Aβ 的沉积是 AD 的始发因素,Aβ 通过多种途径造成神经原纤维缠结和神经元缺失,其中神经元缺失主要表现为凋亡^[3,4]。

本研究建立 Aβ 对 PC-12 细胞的损伤作为 AD 的细胞模型,研究 TP 对细胞的保护作用及其机制。发现,TP 对 Aβ 造成 PC-12 细胞的损伤具有保护作用,表现为 MTT 法的 A₅₇₀ 值升高及细胞凋亡率的下降。TP 的保护作用是在单独应用时不影响 PC-12 细胞增殖的质量浓度范围内实现的,呈质量浓度依赖性。这表明,TP 可能是一种安全、有效的抗 AD 药物。

研究表明,Aβ 可以激活胶质细胞释放 IL-1β、TNF-α 等炎症因子,造成炎症损伤。TP 在 20 ng/mL 时具有抗炎作用^[5]。因此,推测 TP 的保护作用可能与其抗炎作用有关。进一步研究发现,TP 在其有效浓度时还明显抑制了凋亡相关蛋白酶 caspase-9 和 caspase-3 的激活。这些结果说明 TP 的保护作用与其抗凋亡作用有关。在实验中还发现了一个现象,即 MTT 法检测时,TP 的保护作用较完全,其 A₅₇₀ 值在 TP 为 20 ng/mL 时与对照组水平相当;但 20 ng/mL TP 组的细胞凋亡率仍明显高于对照组。这提示抗凋亡可能不是 TP 保护 Aβ 诱导 PC-12 细胞的唯一机制,其详细机制尚待进一步研究。

References:

[1] Knopman D. Pharmacotherapy for Alzheimer's disease; 2002 [J]. Clin Neuropharmacol, 2003, 26(2): 93-101.
[2] Chen W, Shen Y D, Yao H P, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of cyclooxygenase-2 in PC-12 cells by triptolide [J]. Chin Pharm J (中国药杂志), 2005, 40(4): 274-277.
[3] Ankarcrona M, Winblad B. Biomarkers for apoptosis in Alzheimer's disease [J]. Int J Geriatr Psychiatry, 2005, 20 (2): 101-105.
[4] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. Science, 2002, 297(5580): 353-356.
[5] Zhao G, Vaszar L T, Qiu D, et al. Anti-inflammatory effects of triptolide in human bronchial epithelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279 (5): L958-L966.