

利用 FRET 技术在活细胞内研究红景天甙对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡的抑制作用

陈妙娟, 邢达, 陈同生

(华南师范大学激光生命科学研究所暨激光生命科学教育部重点实验室, 广州 510631)

摘要: 为研究红景天甙 (salidroside) 对 β 淀粉样肽 25-35 (β amyloid peptide 25-35, $A\beta_{25-35}$) 诱导 PC12 细胞凋亡的抑制作用, 采用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 分析细胞的存活率, 通过光镜检测细胞形态并配以 Hoechst 染色检测细胞核固缩, 利用荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术在单个活细胞中检测 caspase-3 和 caspase-8 活性的动态变化。结果表明, 红景天甙可剂量依赖性抑制 $A\beta_{25-35}$ 引起的细胞凋亡, 提高细胞的存活率; 红景天甙对 caspase-3 的活性有明显的抑制作用, 而且 $A\beta_{25-35}$ 诱导细胞凋亡不依赖于 caspase-8 的激活。这些结果提示抑制 caspase-3 的活性是红景天甙抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡的机制之一。

关键词: 红景天甙; PC12 细胞; 细胞凋亡; $A\beta_{25-35}$; 荧光共振能量转移

中图分类号: Q924.7

0 引言

细胞凋亡在神经系统的正常发育过程中起着重要作用。当神经细胞凋亡发生紊乱, 会出现病理性神经元凋亡, 如帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD)、阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 和肌萎缩性侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 等^[1]。AD 是以进行性痴呆为特征的神经系统退行性疾病, 其病理改变除经典的老年斑和神经元纤维缠结之外, 还有神经元的丢失。AD 神经元的丢失以凋亡的形式发生^[2,3]。近年来的研究表明, β 淀粉样肽 (β amyloid peptide, $A\beta$) 是各种因素诱发 AD 的共同通路, 是 AD 形成和发展的关键因素^[4]。 $A\beta$ 可能通过激活细胞自身基因程序引起神经元凋亡。 $A\beta$ 是由 β 淀粉样前体蛋白 (APP) 代谢而来的 β 淀粉样肽, 其中第 25~35 位氨基酸构成的肽—— $A\beta_{25-35}$ 在体外水溶液中可形成稳定的聚集, 呈 β -片层状二级结构, 具有神经毒作用, 常用来构建 AD 模型。红景天甙 (salidroside, Sal) 是藏药红景天属植物的主要成分之一^[5,6]。近年来的药理学研究表明, 红景天甙具有较强的抗氧化性和明显的抗衰老、抗病毒、抗辐射作用^[7,8], 已运用于临床并取得较好的治疗效果, 但对其作用机理缺乏深入研究。

本文利用 30 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡以建立阿尔茨海默病细胞模型, 采用荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer,

FRET) 技术在活细胞实时检测红景天甙对 PC12 细胞凋亡的抑制作用, 探讨红景天甙抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡的机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药物和试剂

PC12 细胞 (大鼠肾上腺嗜铬细胞株) 来源于广州中山医科大学细胞培养中心; 红景天甙由中山大学广州现代中药质量研究开发中心提供; 胎牛血清和马血清购自 Hyclone 公司; DMEM 购自 GIBCO 公司; Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 购自日本同仁化学研究所 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan); 荧光染料 Hoechst33258 和 $A\beta_{25-35}$ 购自 Sigma 公司; 转染试剂 Lipofectin reagent 购自 Invitrogen 公司, 质粒 pSCAT3 由 Dr. Miura 惠赠^[9], pFRET-Bid 由 Dr. Onuki 惠赠^[10]。

1.1.2 仪器

使用的仪器有酶联免疫检测仪 (DG5032, 中国南京华东电子集团医疗装备有限责任公司), 激

收稿日期: 2006-06-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (60378043, 30470494, 30670507), 广东省自然科学基金项目 (015012, 04010394) 及广东省科技计划项目 (2004B10401011)

通讯作者: 邢达, 电话: (020)852110089,

E-mail: xingda@scnu.edu.cn

光共聚焦显微镜 (LSM510/ConfoCor2, Zeiss, Germany), 微型 CO₂ 细胞培养箱 (Tempcontrol 37-2 digital, Zeiss, Germany) 和数码相机 (Nikon coolpix 4500, Japan)。

1.2 方法

1.2.1 质粒

质粒 pSCAT3 由 caspase-3 的切割底物 DEVD、Cyan Fluorescence Protein (CFP) 和 Yellow Fluorescence Protein-S175G (Venus) 融合构建^[9]。在 caspase-3 激活之前, CFP 和 Venus 联接在一起。当 CFP 被激发时, 能量可以从 CFP 转移到 Venus, 可以检测到来自 Venus 的黄色荧光。当 caspase-3 激活, 底物 DEVD 会被切割, CFP 和 Venus 分开, SCAT3 的荧光能量转移就会降低。质粒 pFRET-Bid 由全长基因 Bid、CFP 和 YFP 融合构建, 其设计原理与质粒 SCAT3 相同^[10]。

1.2.2 细胞培养和药物处理

PC12 细胞接种于含 10% 胎牛血清和 5% 马血清的 DMEM 培养液中, 置 5% CO₂、饱和湿度、37°C 培养箱中传代培养, 两天换液一次。

实验组分为空白组 (0 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅), Aβ₂₅₋₃₅ 处理组 (30 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅) 和药物处理组 (红景天甙+30 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅)。

Aβ₂₅₋₃₅ 溶解于无菌水配成母液, -20°C 条件下保存; 红景天甙溶解于无菌水配成母液, -4°C 条件下保存; 使用时皆用培养液稀释成不同终浓度的工作液。

1.2.3 Cell Counting Kit-8 测定不同浓度红景天甙的细胞毒性

用 0.25% 胰蛋白酶消化 PC12 细胞, 用含 10% 胎牛血清和 5% 马血清的 DMEM 配制成每毫升含 5×10³ 细胞的细胞悬液, 移入 96 孔板, 将培养板移入 CO₂ 培养箱中。在 37°C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 24 h 后, 移去旧培养液, 除一空白组, 分别加入含不同浓度红景天甙 (终浓度分别为 1、3、6、9、12 和 15 μmol/L) 的新鲜培养液。再培养 24 h 后, 用 Cell Counting Kit-8 分析细胞生长情况。检测前每孔加入 10 μl CCK-8 试剂, 置于 37°C、5% CO₂ 培养箱培养 2 h, 然后在 DG5032 型酶联免疫检测仪上测定吸光度, 主波长 450 nm 波长, 以不含细胞的培养孔液作空白对照。用酶联免疫检测仪读取 450 nm 时的光吸收值 (OD₄₅₀), OD₄₅₀ 的数值与细胞存活率成正比。

1.2.4 Cell Counting Kit-8 测定红景天甙提高 Aβ₂₅₋₃₅ 处理 PC12 细胞的存活率

用 0.25% 胰蛋白酶消化 PC12 细胞, 用含 10% 胎牛血清和 5% 马血清的 DMEM 配制成每毫升含 5×10³ 细胞的细胞悬液, 移入 96 孔板, 将培养板移入 CO₂ 培养箱中。在 37°C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下, 培养 24 h 后, 移去旧培养液, 除两空白组, 分别加入含不同浓度红景天甙 (终浓度分别为 1、3、6、9 μmol/L) 的新鲜培养液。再培养 24 h 后, 除一空白组, 每孔加 Aβ₂₅₋₃₅, 终浓度为 30 μmol/L。继续培养 48 h, 然后用 Cell Counting Kit-8 分析细胞生长情况, 操作步骤同上。

1.2.5 细胞形态变化的观测

用 0.25% 胰蛋白酶消化 PC12 细胞, 转于一次性培养皿, 在 37°C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 24 h, 药物保护组加入红景天甙, 终浓度为 6 μmol/L。培养 24 h 后, 在 Aβ₂₅₋₃₅ 处理组和药物处理组都加入 Aβ₂₅₋₃₅, 终浓度为 30 μmol/L 再培养 24 h。用倒置光学显微镜观察细胞的形态变化, 数码相机拍摄得到实验结果, 光学显微镜的放大倍数为 100 倍。

1.2.6 Hoechst33342 染色

用 0.25% 胰蛋白酶消化 PC12 细胞, 转于一次性培养皿, 在 37°C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 24 h 后, 药物保护组加入红景天甙, 终浓度为 6 μmol/L。培养 24 h 之后, 在 Aβ₂₅₋₃₅ 处理组和药物处理组都加入 Aβ₂₅₋₃₅, 终浓度为 30 μmol/L, 再培养 24 h, 分别在空白组, Aβ₂₅₋₃₅ 处理组和药物处理组加入 Hoechst 染料, 使其终浓度为 10 mg/L, 在 37°C 孵育 10 min, 用 PBS 清洗两遍, 在荧光显微镜下观察细胞核型, 激发光源为汞灯, 数码相机拍摄得到实验结果, 荧光显微镜放大倍数为 400 倍。

1.2.7 瞬时转染

按照转染试剂的说明书步骤, 利用转染试剂 Lipofectin reagent (Invitrogen, USA) 将质粒 SCAT3 或质粒 pFRET-Bid 转染 PC12 细胞, 培养 36 h 后, 进行荧光成像实验。

1.2.8 30 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 处理细胞和激光共聚焦扫描显微镜成像

将转染质粒 SCAT3 或 pFRET-Bid 的 PC12 细胞接种于 35 mm 培养皿, 经过不同的预处理后, 放在激光共聚焦扫描显微镜的 37°C、5% 微型 CO₂

培养箱中, 加入 30 $\mu\text{mol/L}$ A β_{25-35} 于细胞培养液。用放大率为 40 倍, 数值孔径为 1.3 的油镜对细胞进行激光共聚焦成像。为检测分别转染 SCAT-3 质粒和 pFRET-Bid 质粒在活细胞的 FRET 效应, 用 458 nm 的氩离子激光作为激发光源, NFT515 nm 的分束器分束, 选用带通 470~500 nm 的滤光片记录 CFP 通道的荧光图像, 长通 530 nm 的滤光片记录 YFP 通道的荧光图像。用 Zeiss Rel3.2 (Zeiss, Germany) 图像处理软件对图像上所选区域进行荧光发射密度定量。所有的成像实验我们都进行了多个细胞的重复。

1.3 统计学分析

所有的实验至少重复 3 次, 所有的数据均采用 *t*-test 分析。P<0.05 为统计学上有显著性差异。

2 结 果

2.1 红景天甙抑制 A β_{25-35} 的神经毒性

2.1.1 不同浓度红景天甙的细胞毒性

用 Cell Counting Kit-8 分析不同浓度红景天甙的细胞毒性。不同处理组的 OD₄₅₀ 值如图 1 所示。与空白组 (图 1, Control) 相比, 红景天甙终浓度范围为 1~12 $\mu\text{mol/L}$ 的药物处理组 (图 1, Salidroside 1-12 $\mu\text{mol/L}$), 细胞存活率没有下降, 而是略微上升, 终浓度为 6 $\mu\text{mol/L}$ 的上升较为显著;

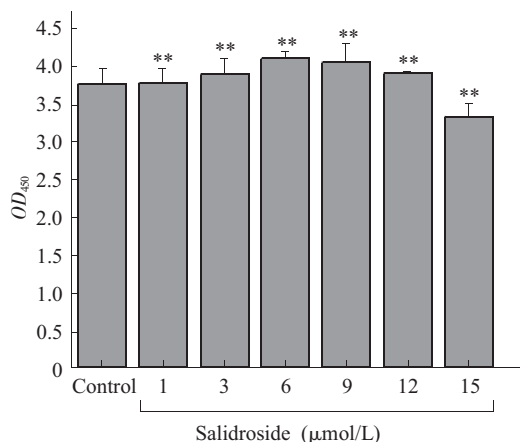


Fig.1 The Cytotoxicity of Salidroside on PC12 Cell at Different Concentrations. PC12 cells exposed to Salidroside at concentrations of 1~15 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. Results were mean \pm SD. Statistical analysis was performed with student's paired *t*-test. At least three independent experiments were carried out, each in triplicate. There was a significant difference between the Salidroside treatment group and the untreated control group. **P<0.01 compared to control group

红景天甙终浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ (图 1, Salidroside 15 $\mu\text{mol/L}$) 的药物处理组, 细胞存活率下降。结果表明, 当终浓度小于 12 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 PC12 细胞没有细胞毒性, 反而有一定的增殖作用; 当终浓度大于 12 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 PC12 细胞存在细胞毒性。

2.1.2 红景天甙提高 A β_{25-35} 处理 PC12 细胞的存活率

PC12 细胞经过不同的处理后, 用 Cell Counting Kit-8 分析红景天甙对 A β_{25-35} 刺激下 PC12 细胞存活率的影响。不同处理组的 OD₄₅₀ 值如图 2 所示。与空白组 (图 2, Control) 相比, 单纯 A β_{25-35} 处理组 (图 2, Vehicle) 的细胞存活率明显下降, 不同浓度的红景天甙药物处理组 (图 2, 1~9 $\mu\text{mol/L}$) 的细胞存活率呈剂量依赖性提高。此结果表明红景天甙对 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞凋亡有

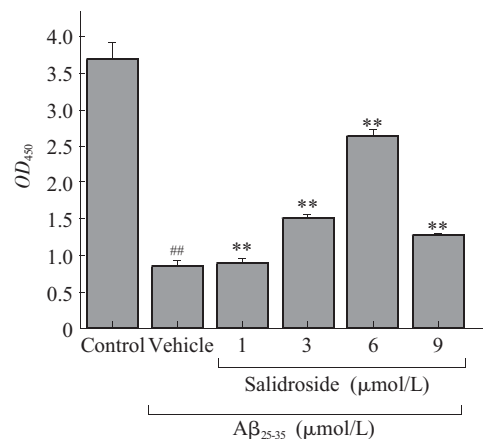


Fig.2 Effects of Salidroside on cell survival in A β_{25-35} -treated PC12 cells. PC12 cells exposed to A β_{25-35} for 24 h after pretreating Salidroside at concentrations of 1~9 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. Results were mean \pm SD. Statistical analysis was performed with student's paired *t*-test. At least three independent experiments were carried out, each in triplicate. There was a significant difference between the A β_{25-35} treatment group and the untreated control group. ##P<0.01 compared to control group. **P<0.01 compared to A β_{25-35} treatment group

显著的抑制作用。当红景天甙的终浓度为 6 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率的提高最显著。当红景天甙的终浓度为 9 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞的存活率则稍有下降, 表明红景天甙对凋亡的抑制作用存在剂量限制。不同浓度红景天甙药物保护组的细胞存活率与空白对照组比较仍然存在差异性, 表明红景天甙未能完全抑制 A β_{25-35} 诱导 PC12 细胞凋亡。基于此

实验的结果, 本研究其他实验所用的红景天甙终浓度为 $6 \mu\text{mol/L}$ 。

2.1.3 红景天甙抑制 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡的形态改变

在光镜下, 空白组的 PC12 细胞呈多边形, 单个细胞有细胞突触 (图 3A)。与空白组的 PC12 细胞比较, 单纯 $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理组的 PC12 细胞大多数呈圆形, 单个细胞突触消失, 大多细胞成团聚集在一起 (图 3B)。与单纯 $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理组比较, 红景天甙

药物处理组的 PC12 细胞成团聚集比较少, 部分细胞还有细胞突触 (图 3C)。Hoechst 染色结果显示, 空白组 PC12 细胞的核呈圆形 (图 3D), 单纯 $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理组 PC12 细胞的核大多数明显固缩、凝聚, 还有断裂 (图 3E, 箭头所指细胞核断裂); 红景天甙药物处理组和空白组细胞的细胞核形态相似, 大多数呈圆形 (图 3F)。光镜和 Hoechst 染色结果表明, 红景天甙明显减少 $\text{A}\beta_{25-35}$ 作用下 PC12 细胞形态的改变和细胞核固缩。

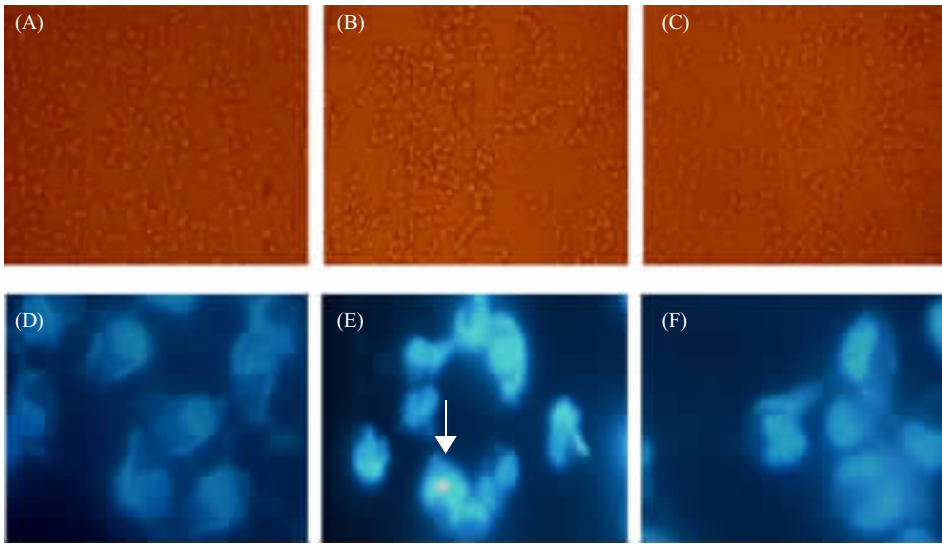


Fig.3 Effects of Salidroside on $\text{A}\beta_{25-35}$ -treated PC12 cells in morphology. (A)~(C): Observed with optical microscope ($\times 100$); (D)~(F): Nuclear morphology of apoptotic cells shown by Hoechst33258 staining ($\times 400$); (A), (D): Control PC12 cells; (B), (E): PC12 cells exposed to $\text{A}\beta_{25-35}$ for 24 h; (C), (F): PC12 cells pre-incubated 24 h with Salidroside $6 \mu\text{mol/L}$ and then treated with $\text{A}\beta_{25-35}$ for 24 h

2.2 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导 Caspase-3 活性的动态检测

荧光融合蛋白 SCAT3 由 caspase-3 的切割底物 DEVD、CFP 和 Venus 融合构建而成。当 caspase-3

激活, 底物 DEVD 被切割, CFP 和 Venus 分开, CFP 的荧光强度上升, Venus 的荧光强度下降, Venus/CFP 荧光发射强度比值下降 (图 4A)。

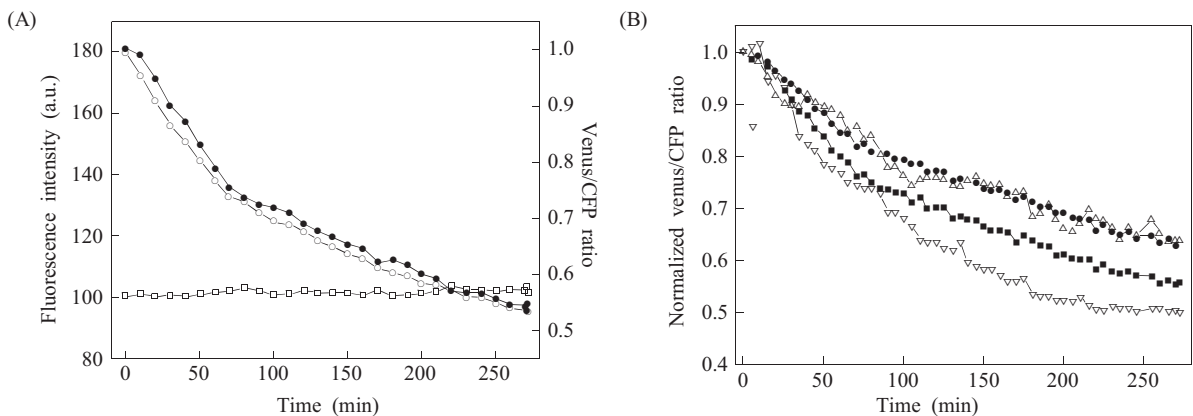


Fig.4 Dynamics of activation of caspase-3 in individual PC12 cells during $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced apoptosis. (A) Dynamics of Venus emission intensities and CFP emission intensities corresponding to the images of Venus and CFP from a single PC12 cell during $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced apoptosis. —○—: Venus; —□—: CFP; —●—: Venus/CFP. (B) The Venus/CFP ratio (normalized to 1.0 at $t=0$) was determined from single living-cell imaging measurements. —■—: Cell 1; —●—: Cell 2; —△—: Cell 3; —▽—: Cell 4

Venus/CFP 荧光发射强度比值的下降表示细胞内 caspase-3 的激活。利用 FRET 技术, 结合可以检测 Caspase-3 活性变化的荧光融合蛋白 SCAT3, 实时检测 $A\beta_{25-35}$ 诱导下单个活细胞内 Caspase-3 活性的动态变化。 $A\beta_{25-35}$ 诱导下, 不同 PC12 细胞的 Venus/CFP 荧光发射强度比值见图 4B。从图 4B 看, 不同 PC12 细胞的 Venus/CFP 荧光发射强度比值下降, 表明 $A\beta_{25-35}$ 诱导 caspase-3 的活化。

2.3 红景天甙抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导 Caspase-3 活性的动态检测

利用 FRET 技术, 结合荧光融合蛋白 SCAT3,

在活细胞内研究红景天甙对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 Caspase-3 活化的抑制作用。实验结果如图 5 所示, 从 FRET 比率图看 (图 5A-C), 与空白组相比, $A\beta_{25-35}$ 处理组 FRET 伪彩图的荧光强度逐渐减弱, 说明荧光融合蛋白 SCAT3 被切割, 表明细胞内的 caspase-3 活性上升, $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡的启动。红景天甙药物处理组的 FRET 图像的荧光强度基本无任何变化, 即荧光融合蛋白没有出现大量切割, 表明细胞内 caspase-3 的活性处于正常生理状态。Venus/CFP 荧光发射强度的比值曲线见图 5D, 曲线趋势与相应的 Venus/CFP 比率图像的荧光强度

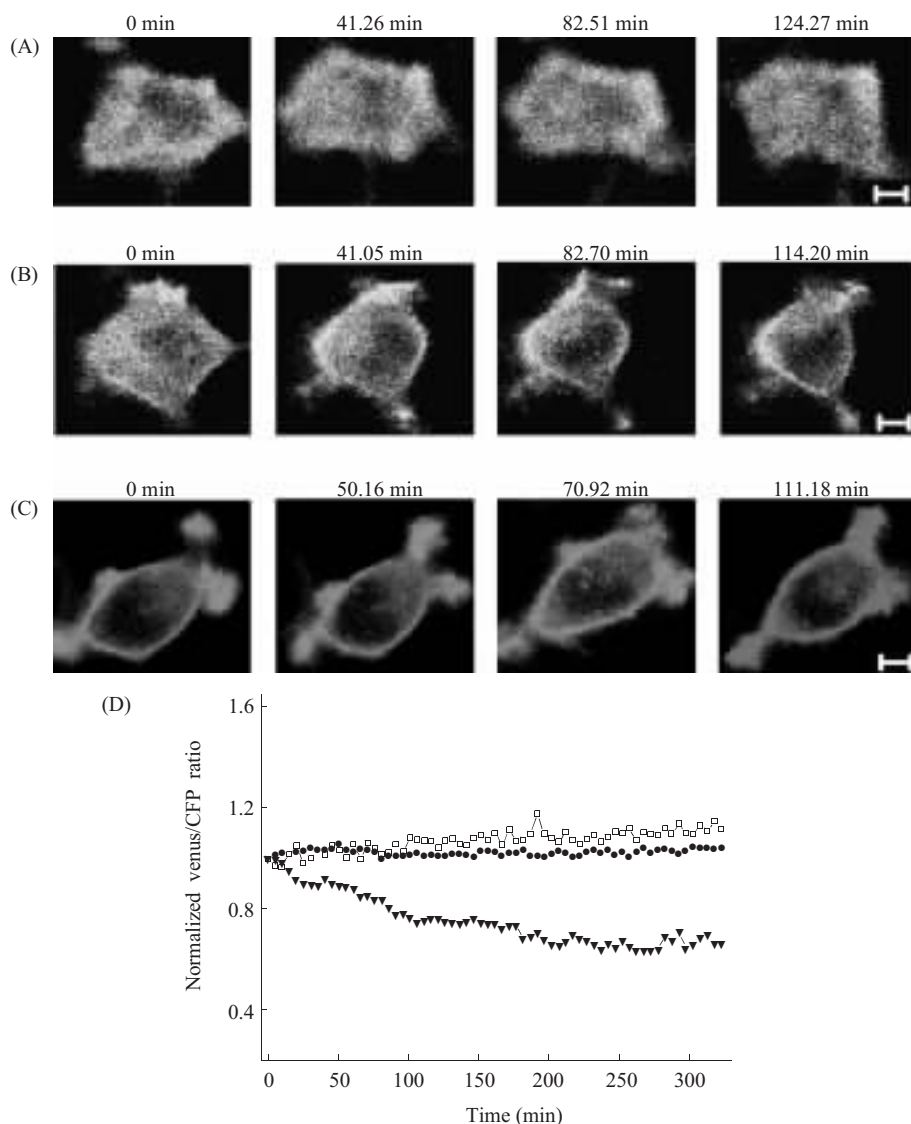


Fig.5 Dynamics of caspase-3 activation in living $A\beta_{25-35}$ -treated PC12 cells with or without Salidroside pretreatment. (A)~(C) Dynamic FRET ratio images of SACT 3 representing caspase-3 activity in response to environment (A), $A\beta_{25-35}$ treatment (B) and pre-treatment with 6 $\mu\text{mol/L}$ Salidroside for 24 h, then treatment with $A\beta_{25-35}$ (C). The images of fluorescence intensities (Venus/CFP) excited by Ar-Ion laser (458 nm) were recorded by LSM microscope. Scale bar, 5 μm . (D) The fluorescence intensity ratio plot of Venus/CFP according to the data from three groups above. —●—: Control; —▼—: $A\beta_{25-35}$; —□—: Sal+ $A\beta_{25-35}$

变化一致。FRET 比率图和 Venus/CFP 荧光强度的比值曲线的结果表明, 红景天甙抑制了 caspase-3 的活性, 阻碍了 PC12 细胞凋亡的发生。

2.4 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡不依赖 caspase-8 的激活

利用 pFRET-Bid 荧光融合蛋白作为 caspase-8 活性变化的报告蛋白, 检测活细胞内 caspase-8 的活性变化。pFRET-Bid 在正常细胞中是均匀分布的。凋亡因子刺激后, 如果活细胞内的 caspase-8 被激活, full-length Bid (FL-Bid) 会被切割, 生成 truncated Bid (tBid), tBid 发生聚集, 在细胞

内呈不均匀分布。活细胞内的 FRET 随着 tBid 的生成而下降。结果如图 6 所示, 空白组活细胞内的 Bid 自始至终都是均匀分布 (图 6A)。 $A\beta_{25-35}$ 处理组活细胞内的 Bid 在加入凋亡因子 $A\beta_{25-35}$ 前后无异, 在细胞内始终均匀分布, 直至细胞发生凋亡 (图 6B), 结果和空白组相似。结果表明, $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡不依赖 caspase-8 的激活, 提示了 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡不依赖 caspase-8 介导的途径, 是通过其他凋亡途径诱导细胞发生凋亡的。

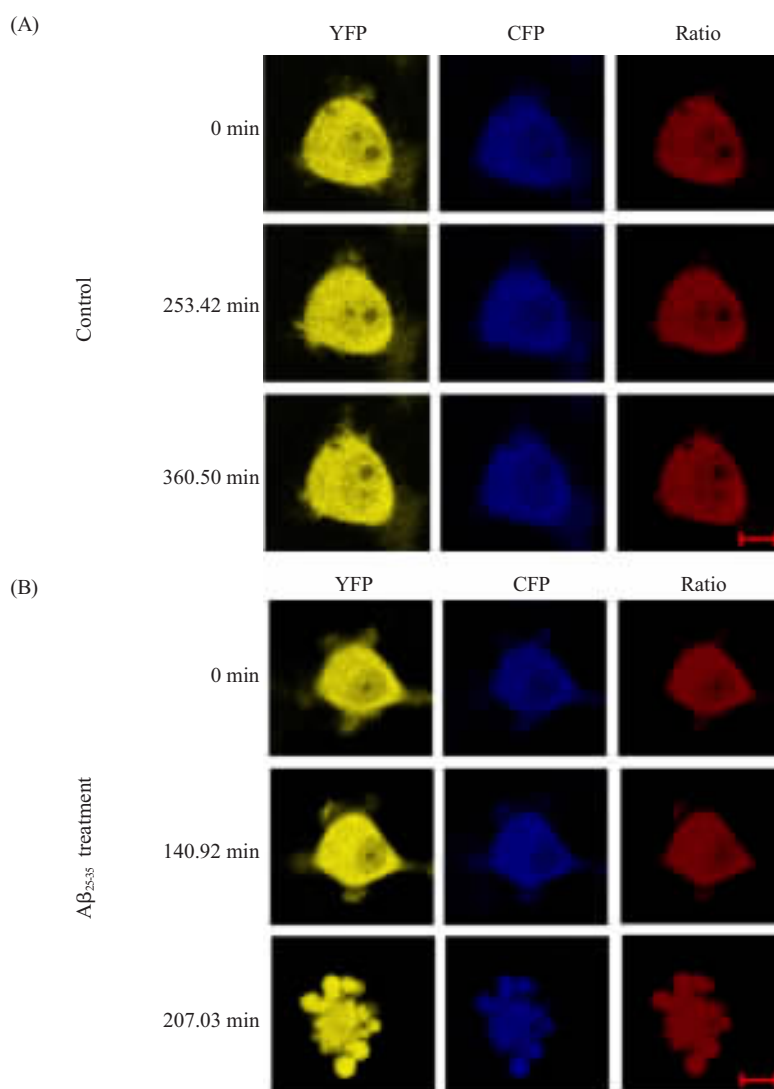


Fig.6 Dynamics of caspase-8 activation in living PC12 cell with or without $A\beta_{25-35}$ treatment . Dynamics of caspase-8 activation in response to environment (A) and $A\beta_{25-35}$ treatment (B) in living PC12 cell. Images of YFP and CFP emission channels excited by Ar-Ion laser(458 nm) were recorded by performing on LSM microscope. Scale bar, 10 μ m

3 讨 论

细胞凋亡是细胞的正常生理过程,负责清除生理上不需要的细胞,以维持机体的自我稳定;细胞凋亡也是细胞对环境的生理、病理性信号刺激,以及环境条件的变化或缓和性损伤产生应答的有序变化的死亡过程。在细胞凋亡中,caspase 家族起着关键作用,被各种诱发因子激活的 caspase 是毁损细胞生存的必要分子和激活细胞自杀程序的媒介,决定了细胞凋亡的进展方向及细胞的最后归宿^[11,12]。一般认为,caspase-3 是哺乳动物细胞凋亡发生的关键酶^[13],一旦被激活,凋亡常难以避免,因此,caspase-3 被作为细胞凋亡的标志。抑制 caspase-3 的活性成为抗凋亡药物的靶点。本文结合荧光融合蛋白 SCAT3,利用 FRET 技术实时检测活细胞内 caspase-3 活性的动态变化,与 Western blot 等传统方法相比,FRET 技术避免了传统方法需要破碎细胞或对细胞造成损伤这一缺点,更正确地反映了活细胞在生理条件下 caspase-3 的动态变化过程^[14-16]。实验结果表明红景天甙抑制了 caspase-3 的活性,阻碍细胞凋亡的发生。为红景天甙抑制 caspase-3 的活性提供了直接的实时证据。

$A\beta$ 是各种因素诱发 AD 的共同通路,是 AD 形成和发展的关键因素^[2]。目前,有关 $A\beta$ 如何诱导细胞凋亡的具体途径仍不清楚。文献报道, $A\beta$ 诱导细胞凋亡不依赖 Caspase-8 介导的凋亡途径^[10]。本文利用 pFRET-Bid 这个荧光融合蛋白间接检测 PC12 细胞内 caspase-8 的激活情况。实验结果表明 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡不依赖 caspase-8 的激活。也有研究表明 $A\beta$ 通过 Fas 受体以及 Caspase-8 激活途径诱导神经细胞凋亡^[17]。 $A\beta$ 诱导细胞凋亡的途径除了通过死亡受体途径(此途径通过激活 caspase-8,传递凋亡信号给 caspase-3),还涉及线粒体途径和内质网途径,通过线粒体或内质网将凋亡信号传递给凋亡的下游,最后激活 caspase-3^[18];另一方面是不同片段的 $A\beta$ 由于形成聚合物的能力和跨膜能力不同^[19-21],致使其传递凋亡信号的途径不同。这些因素有可能造成了不同细胞系中 $A\beta$ 诱导细胞凋亡途径的差异。

红景天甙是藏药的一种,目前研究认为红景天甙具有抗氧化、抗疲劳、抗微波辐射作用,并且有研究表明该药能够抑制神经细胞的淀粉样变^[22]。研

究中药物浓度梯度参照相关文献^[23,24],结合研究所用的细胞模型 PC12 细胞和凋亡诱导因子 $A\beta_{25-35}$ 。CCK-8 检测的结果表明,当红景天甙的终浓度为 $6 \mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率的提高最显著。基于此实验的结果,其他实验所用的红景天甙终浓度为 $6 \mu\text{mol/L}$ 。利用 FRET 技术在细胞水平证实,红景天甙抑制了 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 caspase-3 激活,结果表明,抑制 caspase-3 的活性是红景天甙抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞凋亡的机制之一。同时,研究结果进一步证实 $A\beta$ 诱导 PC12 细胞凋亡不依赖 caspase-8 的激活。已有报道红景天甙具有稳定线粒体膜电位的作用^[23],这表明红景天甙抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞凋亡可能与线粒体途径有关。除此之外,红景天甙具有抗氧化作用,已有研究表明红景天甙能提高抗氧化酶,如 SOD、Cat、GSH2Px 的活性^[24],启动内源性抗自由基系统来消除过量产生的自由基。红景天甙可能通过其抗氧化作用消除了 $A\beta$ 产生的活性氧,防止大量活性氧的产生,阻碍活性氧的凋亡信号通路,并最终抑制了 caspase-3 的激活。有关红景天甙抑制细胞凋亡的详细作用机理仍需进一步的研究和探讨。

红景天作为一种珍贵的药用植物,其安全性、有效性、扶正固本以及适应原样作用越来越被人们所重视。红景天已被应用于临床上,并取得较好的治疗效果。利用 FRET 技术证实的实验结果为探讨红景天甙抗凋亡作用的机理提供了新的思路。随着红景天作用机理的进一步明确以及新的药理作用的不断发掘,红景天在医学上的应用将更加广泛。

参考文献:

- [1] Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000,1(2):120-129
- [2] Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton WE. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 1995,133(2):225-230
- [3] Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 2000,407(6805):802-809
- [4] Small DH, Mok SS, Bornstein JC. Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2(8):595-598
- [5] 王钢力,陈德昌.红景天属(Rhodiola L.)植物化学及药理研究进展.植物资源与环境,1994,3(3):54-57
- [6] 曲智成.红景天的研究进展.中华实用中西医杂志,2005,18: 1063-1066
- [7] 张莉,赵淑月,郑恺,赵春香.红景天植物的抗自由基作用研究.长春中医学院学报,2002,18(1):44

- [8] 郑志清, 叶于薇, 董妙珠, 肖萍, 郑勇英, 胡红, 施志冲, 仲伟鉴. 红景天抗辐射能力的初步实验研究. 上海预防医学杂志, 2002,2(2):69~70
- [9] Takemoto K, Nagai T, Miyawaki A, Miura M. Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J Cell Biol*, 2003,160(2): 235~243
- [10] Onuki R, Nagasaki A, Kawasaki H, Baba T, Uyeda T, Taira K. Confirmation by FRET in individual living cells of the absence of significant amyloid β -mediated caspase 8 activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,99(23):14716~14721
- [11] Wang J, Lenardo MJ. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Science*, 2000,113:753~757
- [12] Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, 2002,9(3):459~470
- [13] Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 2006,311:847~851
- [14] 王进军, 陈小川, 邢达. FRET技术及其在蛋白质-蛋白质分子相互作用研究中的应用. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(6):980~984
- [15] Xia ZP, Liu YC. Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophys J*, 2001,81:2395~2402
- [16] Richard MS, Francis KC, David AZ. Measurement of molecular interactions in living cells by fluorescence resonance energy transfer between variants of the green fluorescent protein. *Science's STKE*, 2000:1
- [17] Wei W, Norton DD, Wang XT, Kusiak JW. A β 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain*, 2002,125:2036~2043
- [18] Dickson DW. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect. *J Clin Invest*, 2004, 114: 23~27
- [19] Ji SR, Wu Y, Sui SF. Cholesterol is an important factor affecting the membrane insertion of β -Amyloid peptide (A β 1-40), which may potentially inhibit the fibril formation. *J Biol Chem*, 2002,277:6273~6279
- [20] Kremer JJ, Pallitto MM, Sklansky DJ, Murphy RM. Correlation of beta-amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes. *Biochemistry*, 2000,39(33):10309~10318
- [21] Li L, Darden TA, Bartolotti L, Kominos D, Pedersen LG. An atomic model for the pleated β -sheet structure of A β amyloid protofilaments. *Biophys J*, 1999,76:2871~2878
- [22] Mook-Jung I, Kim H, Fan W, Tezuka Y, Kadota S, Nishijo H, Jung MW. Neuroprotective effects of constituents of the oriental crude drugs, *Rhodiola sacra*, *R. sachalinensis* and Tokaku-joki-to, against Beta-amyloid toxicity, oxidative stress and apoptosis. *Biol Pharm Bull*, 2002,25(8):1101~1104
- [23] 张文生, 朱陵群, 邓瑞春, 牛福玲, 田蓉. 红景天甙对缺氧/缺糖损伤的SH-SY5Y细胞线粒体膜电位的影响. 中国病理生理杂志, 2004,22(7):1218~1221
- [24] 林树新, 刘亚玲, 赵贺玲, 张世苑. 红景天甙对低氧培养的兔肺动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用. 中国病理生理杂志, 2001,17(10):968~970
- [25] 姜文华, 王淑兰, 关桂梅. 红景天素对大鼠中枢神经系统的抗衰老作用实验研究. 白求恩医学大学学报, 1995,21(1):9

INHIBITIONS OF SALIDROSIDE ON THE $A\beta_{25-35}$ -INDUCED APOPTOSIS BY FRET IN LIVING PC12 CELLS

CHEN Miao-juan, XING Da, CHEN Tong-sheng

(MOE Key Laboratory of Laser Life Science & Institute of Laser Life Science, South China Normal University,
Guangzhou 510631, China)

Abstract: To investigate the inhibitions of salidroside on the apoptosis induced by $A\beta_{25-35}$ in PC12 cells, cell survival was analyzed with cell counting Kit-8 (CCK-8), cell morphology was observed by optical microscope, nuclear condensation was shown by Hoechst staining, the dynamics of caspase-3 and caspase-8 activation in single living cell were monitored by fluorescence resonance energy transfer (FRET) respectively. The results showed that salidroside elevated the cell survival by inhibiting the $A\beta_{25-35}$ -induced apoptosis in a dose-dependent manner, and that salidroside greatly inhibited the caspase-3 activation. Furthermore, the apoptosis induced by $A\beta_{25-35}$ was independent of the caspase-8 activation. In conclusion, these data indicate that salidroside can protect the PC12 cells from $A\beta_{25-35}$ -induced apoptosis by inhibiting the activation of caspase-3.

Key Words: Salidroside; PC12 cells; Apoptosis; $A\beta_{25-35}$; Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (60378043, 30470494, 30670507), and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (015012, 04010394, 2004B10401011)

Received: Jun 24, 2006

Corresponding author: XING Da, Tel: +86(20)852110089, E-mail: xingda@sncu.edu.cn