

傅增辉,姜岩,刘晶,等. 白桦脂醇对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞氧化应激和凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 54-61.

Fu ZH, Jiang Y, Liu J, et al. Effects of Betula alcohol on oxidative stress and apoptosis induced by $A\beta_{25-35}$ in PC12 cells [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(6): 54-61.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.06.008

白桦脂醇对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞氧化应激和凋亡的影响

傅增辉*, 姜岩, 刘晶, 林再红, 杜姝, 张广萍, 陈团团

(齐齐哈尔医学院附属第三医院神经内科, 黑龙江 齐齐哈尔 161002)

【摘要】 目的 探讨白桦脂醇对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞氧化应激和凋亡的影响。**方法** 以 40 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 作用于 PC12 细胞, 实验随机分对照组、 $A\beta_{25-35}$ 组、N-乙酰半胱氨酸组 (NAC 组) 和白桦脂醇 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组, 采用 MTT 法检测细胞的存活率, Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测凋亡情况, JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位, LDH、MDA、SOD 试剂盒分别检测 LDH、MDA 和 SOD 水平, 比色法检测 caspase3、caspase8、caspase9 和 Cyt c 的酶活性, Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Bcl2、Bax、caspase3、caspase8、caspase9 和 Cyt c 的活性和表达。**结果** 与 $A\beta_{25-35}$ 组比较, 白桦脂醇和 NAC 均对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞可提高细胞存活率和 SOD 活性 ($P < 0.01$), 并降低 LDH 释放率和凋亡率 ($P < 0.01$), 抑制 caspase3、caspase8、caspase9 和 Cyt c 酶活性 ($P < 0.01$), 同时下调 Bax、caspase3、caspase8、caspase9 和 Cyt c 表达水平 ($P < 0.01$), 并上调 Bcl2 的活性和表达 ($P < 0.01$)。**结论** 通过预防给予有效剂量的白桦脂醇能够抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导产生的细胞凋亡, 其机制可能与减少 ROS 生成从而降低氧化应激水平, 继而抑制细胞凋亡途径有关。

【关键词】 白桦脂醇; β 淀粉样蛋白; 细胞凋亡; 氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 06-0054-08

Effects of Betula alcohol on oxidative stress and apoptosis induced by $A\beta_{25-35}$ in PC12 cells

FU Zenghui*, JIANG Yan, LIU Jing, LIN Zaihong, DU Shu, ZHANG Guangping, CHEN Tuantuan
(Department of Neurology, the Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161002, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of betulin on $A\beta_{25-35}$ -induced oxidative stress and apoptosis of PC12 cells. **Methods** PC12 cells were treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ of $A\beta_{25-35}$. The cells were randomly divided into control group, $A\beta_{25-35}$ group, NAC group, and betulin 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ groups. Apoptosis was detected by V-FITC/PI double staining flow cytometry; mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 kit; LDH, MDA and SOD levels were detected by LDH, MDA and SOD kits, respectively; the enzyme activity of caspase-3, caspase-8, caspase-9 and Cyt c was detected by colorimetry; the activity and expression of Bcl 2, Bax, caspase-3, caspase-8, caspase-9 and Cyt C were detected by western blotting. **Results** Compared with the $A\beta_{25-35}$ group, betulin and NAC improved the cell survival rate and SOD activity ($P < 0.01$), reduced the LDH release rate and apoptosis rate ($P < 0.01$), inhibited caspase-3,

[基金项目] 黑龙江省教育厅基本科研业务费基础研究项目 (2017-KYYWF-0700)。

[作者简介] 傅增辉 (1992—), 男, 医学硕士, 医师, 研究方向: 老年痴呆和认知功能障碍的基础与临床、神经免疫等。

E-mail: fzh92@foxmail.com

caspase-8, caspase-9 and Cyt c enzyme activity ($P < 0.01$), and downregulated Bax, caspase-3, caspase-8, caspase-9 and Cyt c enzyme activity ($P < 0.01$) and expression level ($P < 0.01$). In contrast, these treatments upregulated the activity and expression of Bcl2 ($P < 0.01$). **Conclusions** Betulin inhibited the $A\beta_{25-35}$ -induced apoptosis. The mechanism may be related to the reduction in ROS production, thus reducing the level of oxidative stress, and thereby inhibiting apoptosis.

【Keywords】 Betulin; β -amyloid protein; cell apoptosis; oxidative stress

阿尔兹海默病 (Alzheimer disease, AD), 又被称为老年性痴呆, 是老年期痴呆的最常见类型, 是中枢神经系统退行性病变中常见的, 表现为进行性认知功能障碍等的临床综合征^[1]。AD 发病机制尚不清楚, 迄今暂无特效的治疗方式。白桦脂醇 (Betulin) 为桦木皮提取物的主要活性成分, 具有一定的生物活性潜能, 且动物实验中表现低毒性, 其本身及衍生物的研究成为近年的热点^[2]。研究证实, 白桦脂醇在抗炎、癌症以及延缓衰老等治疗等方面表现出一定生物学活性^[3], 特别是在 β 淀粉样蛋白 (β amyloid protein, $A\beta$) 诱导的痴呆小鼠模型上显示出显著改善认知功能的作用^[4]。本研究, 将对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞提前进行白桦脂醇药物干预, 观察白桦脂醇对该模型的保护作用, 寻找其可能的作用机制, 为 AD 的治疗提供新的可能。

1 材料和方法

1.1 实验材料

高分化肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株 (PC12), 购自中科院上海生化所。将 PC12 细胞置于含 100 mg/L 链霉素、100 U/mL 青霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (Hyclone 公司生产) 的培养瓶中, 37℃, 5% CO_2 条件的培养箱内孵育。

1.2 主要试剂与仪器

白桦脂醇 (购自大兴安岭林格贝寒带生物科技股份有限公司, 纯度 > 96.9%, 货号: 2813820) 分子式 $C_{30}H_{50}O_2$, 相对分子质量 442.72, 为白色粉末, 无菌条件下, 用二甲基亚砜 (DMSO, Sigma 公司生产) 溶解至浓度 1000 μ mol/L 的母液, 使用时稀释成浓度为 5、10、20 μ mol/L 的工作液; $A\beta_{25-35}$ 冻干粉 (Alfa Aesar 公司生产, 40331), 无菌条件下, DMSO 溶解至浓度 40 μ mol/L 配制成 40 μ mol/L 溶液, -20℃ 保存; N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl-L-cysteine, NAC) (YOYOBIO 公司生产, Js20137-10 g); MDA 测试盒 (Zcibio 公司生产, ZC-S0651); 超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 测试盒 (Sinobestbio 公

司生产, Yx-C-A600); MTT 细胞增殖检测试剂盒试剂 (Sigma 公司生产, M2128-1G); 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测试剂盒 (IC/IBL 公司生产, 货号 IC-LDH-Hu); JC-1 检测试剂盒 (Adooq Bioscience 公司, A15135); caspase3、caspase8 和 caspase9 酶活力试剂盒 (百奥莱博公司生产, SNM513-IPX、SNM511-NAV、SNM510-DCX); 细胞色素 C (Cytochrome c, Cyt c) 酶活力试剂盒 (雅吉公司生产, A090); ECL 试剂盒 (YOYOBIO 公司生产, J-SW2010); 一抗兔抗大鼠 Bcl2、Bax、caspase3、caspase8、caspase9、Cyt c 和 GAPDH 多克隆抗体 (BD 公司生产, DXT-610538、DXT-610981、DXT-610322、DXT-559932、DXT-536731、DXT-523011、DXT-560792); 二抗羊抗兔 IgG-HRP (YOYOBIO 公司生产, J-SE134)。

HER Acell 240i CO_2 培养箱 (Thermofisher Scientific 公司生产, 51020241); GS15R 低温高速离心机 (Beckman Coulter 公司生产, 338475); RT6100 酶标仪 (Rayto 公司生产, 345678); PowerPac HV 电泳仪 (Bio Rad 公司生产, 164-5056); FACScan 流式细胞仪 (BD 公司生产, AMG0002073); 成像分析仪 (Syngene 公司生产, GBOXChemi-XT4)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

细胞分为: 对照组、 $A\beta_{25-35}$ 组、NAC 组和不同剂量白桦脂醇组。MTT 法测定细胞存活率时接种细胞于 96 孔板内, 将 Western blot 实验的细胞接种于 25 cm^2 培养瓶中。 $A\beta_{25-35}$ 组加入 40 μ mol/L $A\beta_{25-35}$ 进行诱导 24 h。NAC 组用 0.5 μ mol/L NAC 进行预保护 24 h, 再加入造模浓度的 $A\beta_{25-35}$ 。白桦脂醇组用不同浓度的白桦脂醇进行预保护 24 h, 再加入造模浓度的 $A\beta_{25-35}$, 通过检测细胞存活率, 确定最佳白桦脂醇的浓度。

1.3.2 MTT 实验检测细胞活力

在 96 孔板内, 按照 1×10^5 /mL 密度接种细胞, 无血清培养 24 h 使细胞同步化后, 选用终浓度分别为 5、10、20 μ mol/L 的白桦脂醇进行预处理 24 h

后,加入 40 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导 20 h。96 孔板各孔中加入 20 μL MTT 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 4 h。吸出各孔液体加入 200 μL DMSO,摇床震荡 10 min,于 490 nm 刻度测定其吸光度,最后计算细胞存活率。

1.3.3 LDH 释放实验

各组细胞培养结束后,吸取培养中上清液,加入 10 μL 细胞裂解液,LDH 活性检测采用 LDH 检测试剂盒。根据标准曲线算出酶活力单位,细胞 LDH 释放率(%)=培养基中酶活力单位/(裂解液酶活力单位+培养基酶活力单位) $\times 100\%$ 。

1.3.4 SOD 活性和 MDA 含量测定

白桦脂醇预处理和 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导后,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行离心(4 000 r/min)10 min,弃细胞培养上清,每孔加入 70 μL 裂解液,上摇床,于冰上裂解细胞 3 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行离心(4 000 r/min)10 min,小心吸取上清,BCA 法测定各孔细胞蛋白的浓度,严格按照试剂盒要求检测 SOD 和 MDA 含量。

1.3.5 细胞凋亡的检测

Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术分析细胞凋亡。PC12 细胞以每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,给药和 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导后使用不含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞,使用 1 $\times$ 的 Binding Buffer 重悬细胞,于室温下避光加入 Annexin V-FITC,染色 10 min 后,同样避光加入 PI 染色 5 min,最后采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.6 线粒体膜电位的检测

使用 JC-1 检测试剂盒检测。将细胞用胰蛋白酶处理,室温下在悬浮在 JC-1 buffer 中 15 min。然后通过流式细胞仪分析染色的样品。JC-1 在线粒体中表现出电位依赖性积累,并且红色/绿色荧光强度比降低。线粒体膜电位为 JC-1 绿色荧光/红色荧光比的比值。将 JC-1 绿色荧光设为横轴,将 JC-1 红色荧光设为纵轴。

1.3.7 酶活性的检测

采用 caspase3、caspase8、caspase9 和 Cyt c 活性测定试剂盒,按照说明书进行操作,以酶标仪于波长 405 nm 处的吸光度(A)表示活性变化。取每份样品检测 6 次的平均值。

1.3.8 Western blot 检测

用含 1% PMSF 的蛋白裂解液提取蛋白,并按 BCA 蛋白试剂盒要求对各组蛋白含量进行检测,

冰上行转膜反应,添加一抗(兔抗大鼠 Bcl2、Bax、caspase3、caspase8、caspase9 和 Cyt c 多克隆抗体 1:100,兔抗大鼠 GAPDH 多克隆抗体 1:100)室温下孵浴 2 h 并洗涤,将膜浸入以 1:1 000 体积比用封闭液稀释的二抗稀释液,室温孵浴 2 h 洗涤,将 ECL 试剂盒内的 detection reagent 1 与 detection reagent 2 等体积混合后,室温下孵育 2 h,ECL 发光显影后置于凝胶成像仪中,以 β -actin 为内参照,采用 Image-Pro Plus 软件对蛋白表达进行定量分析。

1.4 统计学方法

用 SPSS 17.0 软件进行数据处理和统计分析。计量数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析处理多组间均数比较,用 SNK- q 检验处理组间两两比较,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白桦脂醇对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞存活率的影响

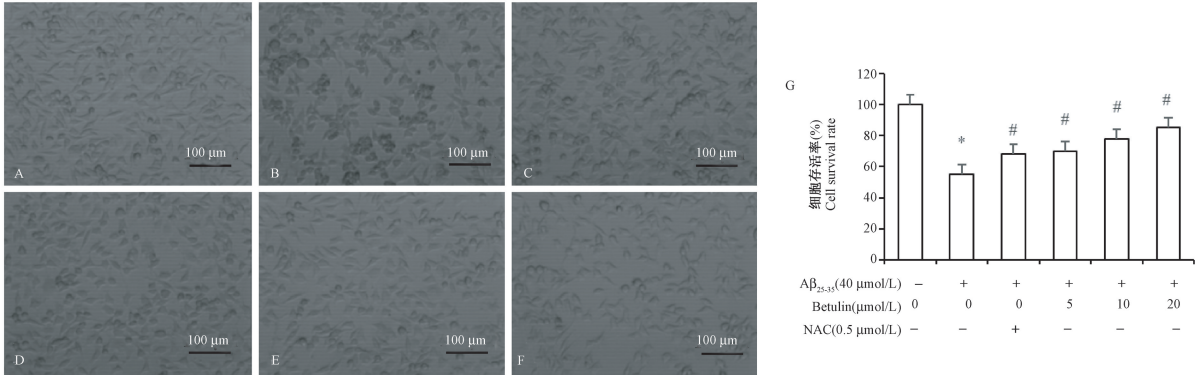
与对照组比, $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞存活率明显降低,差异显著($P < 0.01$);与 $\text{A}\beta_{25-35}$ 组比,预先加入 0.5 $\mu\text{mol/L}$ NAC 及 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 白桦脂醇可显著提高细胞存活率,差异具有统计学意义(均 $P < 0.01$),见图 1。

2.2 白桦脂醇对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞 LDH 释放率的影响

与对照组比较, $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞 LDH 释放率显著升高,差异显著($P < 0.01$);与 $\text{A}\beta_{25-35}$ 组比,预先加入 0.5 $\mu\text{mol/L}$ NAC 及 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 白桦脂醇可明显降低 LDH 释放率,差异具有统计学意义(均 $P < 0.01$),见图 2。

2.3 白桦脂醇对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞 SOD 活性、MDA 含量和线粒体膜电位的影响

与对照组比较, $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞内 MDA 含量均明显上升,而胞内 SOD 活力和线粒体膜电位水平均显著下降(均 $P < 0.01$);与 $\text{A}\beta_{25-35}$ 组比,预先加入 0.5 $\mu\text{mol/L}$ NAC 及 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 白桦脂醇 MDA 含量均显著下降,而胞内 SOD 活力和线粒体膜电位水平均明显上升(均 $P < 0.01$),见图 3A、3B。线粒体膜电位的损失是细胞凋亡的标志,如图 3C、3D、3E、3F、3G、3H、3I 所示,通过观察红绿荧光, $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导减少了细胞的线粒体膜电位



注:A:对照组;B:40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅;C:0.5 μmol/L NAC;D:40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 5 μmol/L 白桦脂醇;E:40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 10 μmol/L 白桦脂醇;F:40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 20 μmol/L 白桦脂醇;A、B、C、D、E、F 为细胞形态的影响;G:细胞存活率的影响。与对照组相比,**P*<0.01;与 Aβ₂₅₋₃₅ 组相比,#*P*<0.01。

图 1 白桦脂醇对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞存活率的影响 (*n*=4, $\bar{x} \pm s$)

Note. A, Control group. B, 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅. C, 0.5 μmol/L NAC. D, 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 5 μmol/L betulin. E, 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 10 μmol/L betulin. F, 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 20 μmol/L betulin. A, B, C, D, E, F is the effect of cell morphology. G, cell survival rate. Compared with the normal group, **P* < 0.01. Compared with the Aβ₂₅₋₃₅ group, #*P* < 0.01. The same as below.

Figure 1 Effects of Betulin on the survival rate of PC12 cells induced by Aβ₂₅₋₃₅

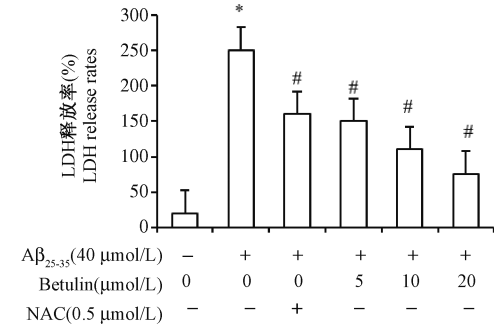


图 2 白桦脂醇对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞 LDH 释放率的影响 (*n*=4, $\bar{x} \pm s$)

Figure 2 Effect of Betulin on LDH release rate of PC12 cells induced by Aβ₂₅₋₃₅

水平 (*P*<0.01),而不同浓度白桦脂醇和 NAC 均减轻 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的改变 (*P*<0.01)。

2.4 白桦脂醇对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响

与对照组比,Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞凋亡率明显升高,差异显著 (*P*<0.01);与 Aβ₂₅₋₃₅ 组比较,预先加入 0.5 μmol/L NAC 及 5、10、20 μmol/L 白桦脂醇的细胞凋亡率明显降低,差异显著 (均 *P*<0.01),见图 4。

2.5 白桦脂醇对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞凋亡相关酶活性的影响

与对照组比,Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞 caspase3、caspase8、caspase9 和 Cyt c 的酶活性明显

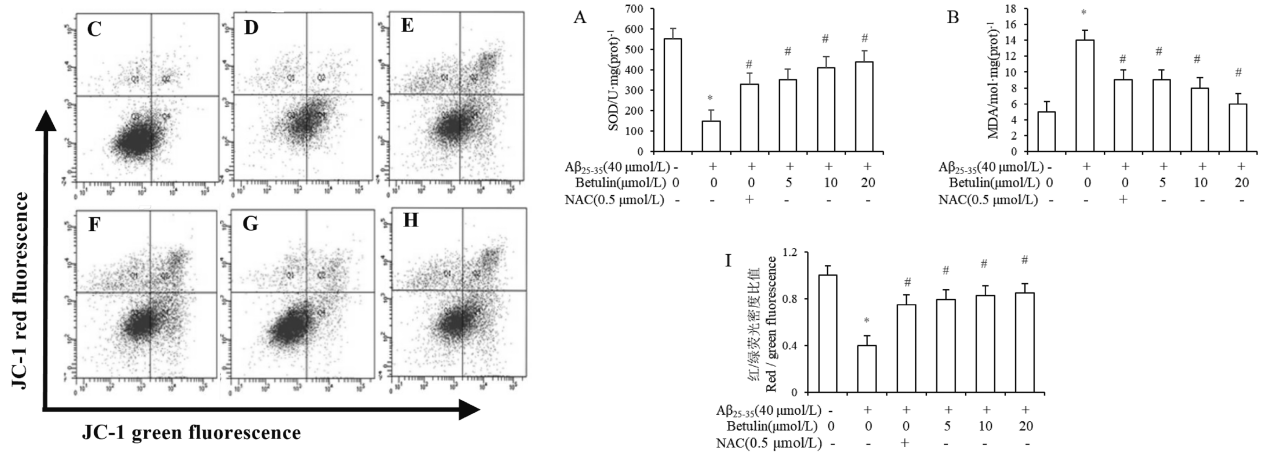
升高 (均 *P*<0.01);与 Aβ₂₅₋₃₅ 组比较,经 NAC 和 5、10、20 μmol/L 白桦脂醇预处理细胞的 caspase3、caspase8、caspase9 和 Cyt c 的酶活性显著降低,见图 5。

2.6 白桦脂醇对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞凋亡相关蛋白相对表达的影响

与对照组比,Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞 Bax、caspase3、caspase8、caspase9 和 Cyt c 蛋白相对表达水平显著升高,而抗凋亡蛋白 Bcl2 显著降低,差异显著 (*P*<0.01);与 Aβ₂₅₋₃₅ 组比较,给予 NAC 和 5、10、20 μmol/L 白桦脂醇预处理细胞的 Bax、caspase3、caspase8、caspase9 和 Cyt c 蛋白相对表达水平显著降低,而抗凋亡蛋白 Bcl2 显著升高,差异具显著 (*P*<0.01),见图 6。

3 讨论

白桦脂醇是一种天然五环三萜,据报道,该化合物具有各种生物学特性,其抗炎作用在几种不同的模型中得到了证实^[5],而神经系统的炎症反应与 AD 发病中 Aβ 沉积密切相关。首先,BA 可抑制 LPS 刺激的 RAW 264.7 巨噬细胞中炎症细胞因子的释放,并在 LPS/多微生物诱导的败血症期间防止动物死亡和组织损伤^[6]。NAC 为谷胱甘肽的前体,具有清除氧自由基、抗细胞凋亡、调节免疫等作用,研究表明^[7],NAC 可以降低细胞氧化应激水平,减

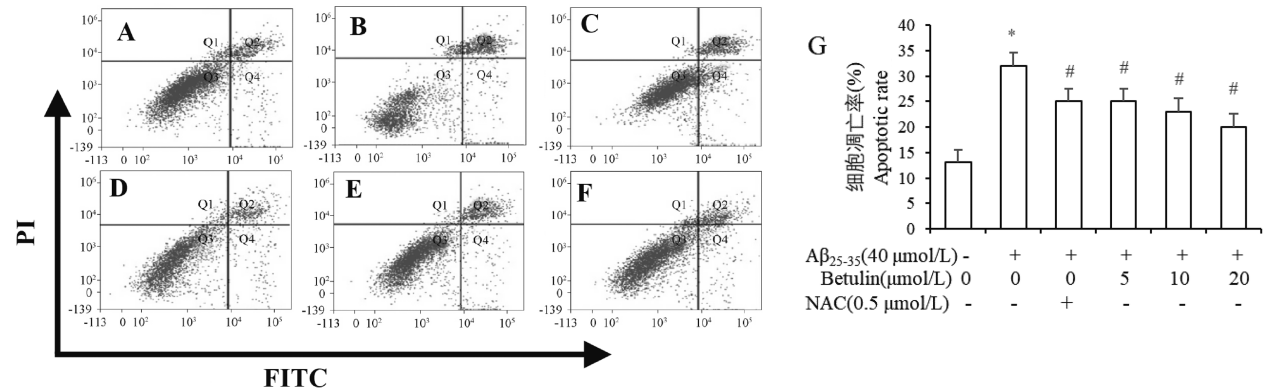


注: A: SOD 活性的影响; B: MDA 含量的影响; C: 对照组流式细胞图; D: 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 流式细胞图; E: 0.5 μmol/L NAC 流式细胞图; F: 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 5 μmol/L 白桦脂醇流式细胞图; G: 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 10 μmol/L 白桦脂醇流式细胞图; H: 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 20 μmol/L 白桦脂醇流式细胞图; I: 红/绿荧光密度比值的影响。

图 3 白桦脂醇对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞 SOD 活性和 MDA 含量的影响 (n = 4, $\bar{x} \pm s$)

Note. A, Influence of SOD activity. B, Influence of MDA content. C, Flow cytometry of control group. D, Flow cytometry of (40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅). E, Flow cytometry of (0.5 μmol/L NAC). F, Flow cytometry of (40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 5 μmol/L betulin). G, Flow cytometry of (40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 10 μmol/L betulin). H, Flow cytometry of (40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 20 μmol/L betulin). I, Effect of red / green fluorescence density ratio.

Figure 3 Effects of Betulin on SOD activity and MDA content in PC12 cells induced by Aβ₂₅₋₃₅

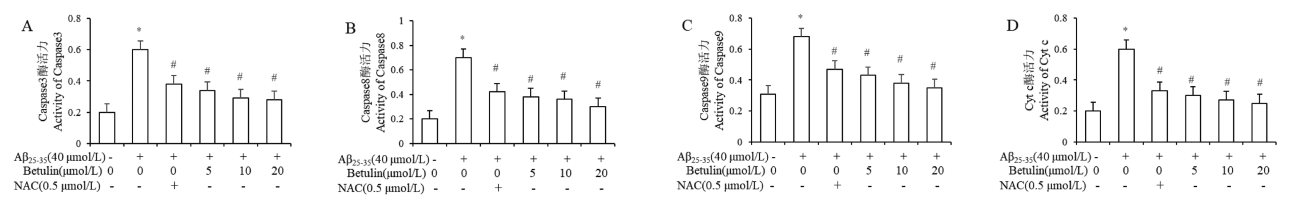


注: A: 对照组; B: 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅; C: 0.5 μmol/L NAC; D: 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 5 μmol/L 白桦脂醇; E: 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 10 μmol/L 白桦脂醇; F: 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 20 μmol/L 白桦脂醇; G: 细胞凋亡的影响; Q1 象限为坏死细胞, Q2 象限为晚期凋亡细胞, Q3 象限为正常细胞, Q4 象限为早期凋亡细胞。

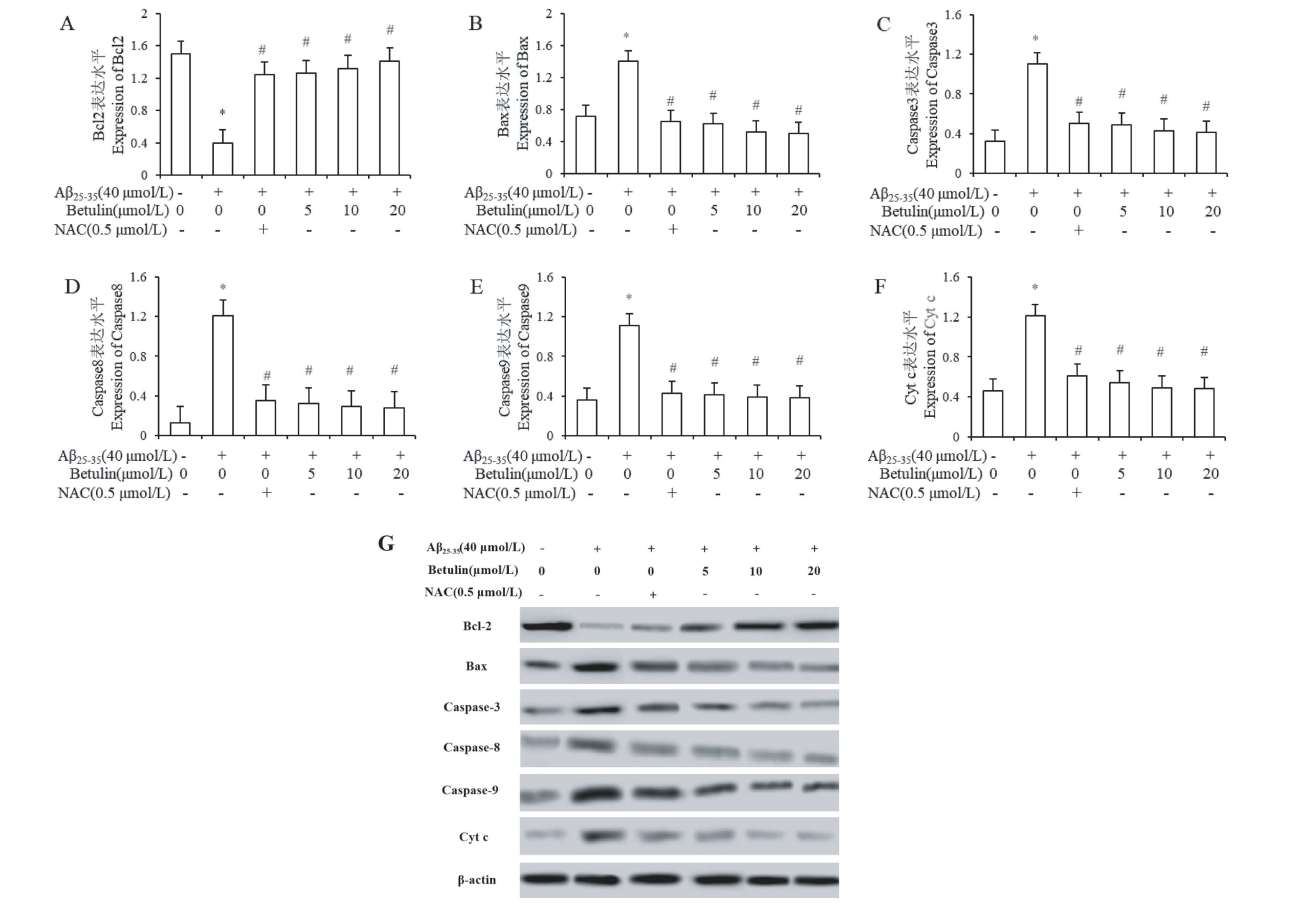
图 4 白桦脂醇对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响 (n = 4, $\bar{x} \pm s$)

Note. A, Control group. B, 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅. C, 0.5 μmol/L NAC. D, 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 5 μmol/L betulin. E, 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 10 μmol/L betulin. F, 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ + 20 μmol/L betulin. G, Result of apoptotic rate. Q1 area represents necrotic cells, Q2 area represents advanced apoptotic cells, Q3 area represents normal cells and Q4 area represents early apoptotic cells.

Figure 4 Effects of Betulin on apoptosis of PC12 cells induced by Aβ₂₅₋₃₅



注:A:caspase3 活性的影响;B:caspase8 活性的影响;C:caspase9 活性的影响;D:Cyt c 活性的影响。
图 5 白桦脂醇对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡相关酶活性的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s$)
Note. A, Effect of caspase3 activity. B, Effect of caspase8 activity. C, Effect of caspase9 activity. D, Effect of Cyt c activity.
Figure 5 Effects of Betulin on apoptosis related enzyme activity of PC12 cells induced by $\text{A}\beta_{25-35}$



注:A:Bcl2 表达的影响;B:Bax 表达的影响;C:caspase3 表达的影响;D:caspase8 表达的影响;E:caspase9 表达的影响;F:Cyt c 表达的影响;G:Western blot 结果。
图 6 白桦脂醇对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡相关蛋白相对表达的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s$)
Note. A, Effect of Bcl2 expression. B, Effect of Bax expression. C, Effect of Caspase3 expression. D, Effect of Caspase8 expression. E, Effect of Caspase9 expression. F, Effect of Cyt c expression. G, Result of Western blot.
Figure 6 Effects of Betulin on relative expression of apoptosis related proteins of PC12 cells induced by $\text{A}\beta_{25-35}$

少细胞凋亡。

$\text{A}\beta$ 在神经元的沉积异常产生的老年斑,一般被认为是是 AD 的主要病理特征,与 AD 的发生发展变化关系密切^[8]。 $\text{A}\beta$ 级联假说依然占据着学术界的重要地位, $\text{A}\beta$ 沉积异常引发的最显著的特征之一就是神经元凋亡,进而引起认知功能障碍发

生。在本研究中,采用 MTT 法检测 $\text{A}\beta_{25-35}$ 对 PC 12 细胞的细胞活性影响,结果显示 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞的细胞存活率降低、凋亡水平上升,但 NAC 和白桦脂醇干预均可以提高细胞生存率并降低凋亡水平。

氧化应激在神经退行性疾病的发生发展中起

着重要作用, 大脑 $A\beta$ 异常沉积可触发氧化应激^[9-10], 细胞中抗氧化和氧化平衡失调导致 ROS 的累积高于内环境代谢是氧化应激的基础, 触发线粒体功能异常, 进而细胞凋亡^[11-12]。研究表明, 异常沉积的 $A\beta$ 可介导与线粒体内的乙醇脱氢酶 ($A\beta$ -binding alcohol dehydrogenase, ABAD) 异常结合, 引发呼吸链功能异常, 并产生 ROS 水平上升, 出现氧化和抗氧化机制异常。并且, ROS 的累积会损伤染色体及生物膜系统, 出现线粒体呼吸链紊乱、ROS 产生增加等表现, 加剧氧化和抗氧化失衡过程, 最终出现正反馈样的氧化应激—线粒体异常的循环^[13-15]。但白桦脂醇抑制凋亡是否与改善细胞内氧化应激水平有关尚不明确, 本研究进一步探讨其影响。SOD 和 MDA 水平是促进细胞程序性死亡的重要因素, 作为检测氧化应激的主要指标, 内源性抗氧化酶 SOD 可清除体内自由基。研究表明, AD 患者 ROS 水平升高, 随着 SOD 活性降低和 MDA 含量升高, 中枢神经氧化应激水平升高, 且 $A\beta$ 诱导的离体实验和载体实验中有氧化损伤的报道^[16-18]。根据本实验, $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞 SOD 活性降低, MDA 含量升高, 而 NAC 和白桦脂醇处理使 SOD 活性升高, MDA 含量降低。推测白桦脂醇可以发挥与 NAC 同样的作用, 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞的氧化应激能发挥保护作用。

$A\beta$ 增多对神经元的毒性作用是 AD 发病的重要途径, 将 $A\beta$ 注射入大鼠海马, 可模拟 AD 脑内 $A\beta$ 形成以后的毒性作用过程, 特别是氧化应激过程, $A\beta$ 介导凋亡的靶点存在于神经元内^[19-20]。线粒体引导的凋亡通路是关键的内源性凋亡信号转导途径, 并且有体外实验报道 $A\beta$ 能够激活线粒体介导的凋亡途径^[21-22]。线粒体介导的凋亡途径是受 Bcl2 家族蛋白调节的细胞内部信号触发的凋亡方式^[23-24]。本研究中, $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞的凋亡蛋白表达上调而抗凋亡蛋白则相反, 通过提前给予 NAC 和白桦脂醇可使凋亡蛋白表达下调而抗凋亡蛋白表达上调。提示 $A\beta_{25-35}$ 能够激活线粒体介导的凋亡途径, 而预防给药白桦脂醇能够有效的抑制线粒体凋亡通路的激活。同时, 为了确定线粒体膜通透性引起的凋亡因子外放是否激活了下游的凋亡蛋白, 本研究检测了 caspase3 和 caspase8 的活性和表达情况, $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞的 caspase3 和 caspase8 水平上升, 而通过提前给予白桦脂醇可降低细胞内 caspase3 和 caspase8 水平。Bcl2 和 Bax

表达的失调, 使细胞线粒体膜电位发生相应变化, 从而导致 Cyt c 成功穿透线粒体膜最终渗透到胞浆中, 激活 caspase9, 活化的 caspase9 进一步激活 caspase3, 从而提高 caspase3 活性, 最终促进细胞凋亡^[25-26]。本研究中, $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞的 caspase3、caspase8、caspase9 和 Cyt c 上调, 且线粒体膜电位下降, 通过提前给予 NAC 和白桦脂醇可使其表达下调, 并保护线粒体膜电位。因此, NAC 和白桦脂醇可能对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡和线粒体损伤具有一定的保护作用。

本研究发现, 有效剂量的白桦脂醇预处理, 可以明显抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导引起的细胞凋亡。考虑机制可能与通过减少 ROS 的生成而降低氧化应激水平, 并抑制细胞凋亡途径有关, 本实验为白桦脂醇延缓 AD 的发展提供了一定的药理学依据, 但也为白桦脂醇延缓了 AD 的发展提供了基础的药理学依据, 但是, 需通过进一步的分子生物学研究来明确其机制。

参考文献:

- [1] Kumar K, Kumar A, Keegan RM, et al. Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 20(98): 297-307.
- [2] de Melo CL, Queiroz MG, Arruda Filho AC, et al. Betulinic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(19): 8776-8781.
- [3] Ma C, Long H. Protective effect of betulin on cognitive decline in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats [J]. Neurotoxicology, 2016, 57(11): 104-111.
- [4] Cho N, Lee HK, Jeon BJ, et al. The effects of Betula platyphylla bark on amyloid beta-induced learning and memory impairment in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 74(11): 156-163.
- [5] Saaby L, Nielsen CH. Triterpene acids from rose hip powder inhibit self-antigen-and LPS-induced cytokine production and CD4⁺ T-cell proliferation in human mononuclear cell cultures [J]. Phytother Res, 2012, 26(8): 1142-1147.
- [6] Wan Y, Jiang S, Lian LH, et al. Betulinic acid and betulin ameliorate acute ethanol-induced fatty liver via TLR4 and STAT3 *in vivo* and *in vitro* [J]. Int Immunopharmacol, 2013, 17(2): 184-190.
- [7] 熊婷, 张贞祯, 郑睿, 等. N-乙酰半胱氨酸对脂多糖诱导的血管内皮细胞凋亡的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(1): 17-22.
- [8] Liu X, Xu K, Yan M, et al. Protective effects of galantamine against A β -induced PC12 cell apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress [J]. Neurochem Int, 2010, 57(5): 588-599.

- [9] Kaur N, Dhiman M, Perez-Polo JR, et al. Ginkgolide B revamps neuroprotective role of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 and mitochondrial oxidative phosphorylation against $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity in human neuroblastoma cells [J]. J Neurosci Res, 2015, 93(6): 938-947.
- [10] Wang X, Su B, Perry G, et al. Insights into amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease [J]. Free Radic Biol Med, 2007, 43(12): 1569-1573.
- [11] Gray NE, Sampath H, Zweig JA, et al. Centella asiatica attenuates amyloid-beta-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction [J]. J Alzheimers Dis, 2015, 45(3): 933-946.
- [12] Kawada H, Blessing K, Kiyota T, et al. Effects of multifunctional antioxidants on mitochondrial dysfunction and amyloid-beta metal dyshomeostasis [J]. J Alzheimers Dis, 2015, 44(1): 297-307.
- [13] 郭晓玲, 康丽霞, 任美芳. 苦参碱联合 Akt 信号通路抑制剂影响肾癌细胞的活力与凋亡 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 99-105.
- [14] Yao J, Du H, Yan S, et al. Inhibition of amyloid-beta (A β) peptide-binding alcohol dehydrogenase-A β interaction reduces A β accumulation and improves mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. J Neurosci, 2011, 31(6): 2313-2320.
- [15] Lustbader JW, Chilli M, Lin C, et al. ABAD directly links A β to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease [J]. Science, 2004, 304(5669): 448-452.
- [16] Gu F, Chauhan V, Chauhan A. Glutathione redox imbalance in brain disorders [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2015, 18(1): 89-95.
- [17] Sadhu A, Upadhyay P, Agrawal A, et al. Management of cognitive determinants in senile dementia of Alzheimer's type; therapeutic potential of a novel polyherbal drug product [J]. Clin Drug Investig, 2014, 34(12): 857-869.
- [18] Ding J, Yu HL, Ma WW, et al. Soy isoflavone attenuates brain mitochondrial oxidative stress induced by beta-amyloid peptides 1-42 injection in lateral cerebral ventricle [J]. J Neurosci Res, 2013, 91(4): 562-567.
- [19] Liu R, Wu CX, Zhou D, et al. Pinocembrin protects against beta-amyloid-induced toxicity in neurons through inhibiting receptor for advanced glycation end products (RAGE)-independent signaling pathways and regulating mitochondrion-mediated apoptosis [J]. BMC Med, 2012, 10: 105.
- [20] Takuma K, Fang F, Zhang W, et al. RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-beta and neuronal dysfunction [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(47): 20021-20026.
- [21] 王凯, 李强, 孙伟明, 等. 不同浓度 $A\beta_{(25-35)}$ 蛋白模拟阿尔茨海默病模型学习记忆的差异 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(3): 14-19.
- [22] 马涛, 辛文锋, 张文生, 等. 三七皂苷 R1 对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 303-307.
- [23] Napolitano M, Costa L, Piacentini R, et al. 17 β -estradiol protects cerebellar granule cells against beta-amyloid-induced toxicity via the apoptotic mitochondrial pathway [J]. Neurosci Lett, 2014, 561: 134-139.
- [24] Zeng KW, Wang XM, Ko H, et al. Hyperoside protects primary rat cortical neurons from neurotoxicity induced by amyloid beta-protein via the PI3K/Akt/Bad/Bcl(XL)-regulated mitochondrial apoptotic pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 672(1-3): 45-55.
- [25] Fuenzalida K, Quintanilla R, Ramos P, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis [J]. J Biol Chem, 2007, 282(51): 37006-37015.
- [26] 阮中繁, 谢明, 李艳, 等. 参麦对急性脑梗死小鼠脑组织的保护作用及相关机制的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 23-27.

[收稿日期] 2020-01-07