

JNK/Bim/Bax 途径在 TNF- α 诱导分化 PC12 细胞凋亡过程中的作用机制*

张 岚^{1)**} 邢 达²⁾

¹⁾ 广州医学院医学遗传与细胞生物学教研室, 广州 510182;

²⁾ 华南师范大学生物光子学研究院, 激光生命科学教育部重点实验室, 广州 510631)

摘要 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经系统退行性疾病, 近年来许多研究发现 AD 与细胞凋亡关系密切, 有研究证明肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的合成过量会造成神经细胞的凋亡从而导致 AD 等神经退行性疾病的发生, 然而人们对 TNF- α 造成神经细胞凋亡的分子机制并不了解. 采用激光共聚焦扫描成像技术和荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术在活细胞中实时对 TNF- α 诱导分化 PC12 细胞凋亡的信号通路进行了细致的研究. 实验结果证明, TNF- α 诱导的分化 PC12 细胞凋亡会经过线粒体和非线粒体途径, 并通过激活核转录因子(NF- κ B) 上调 Bcl-x_L 的表达来抑制经过线粒体的凋亡途径. 进一步的研究证明, Bim_L 会在线粒体上替换原来被 Bcl-x_L 抑制的 Bax, 从而让 Bax 寡聚化, 进而引发细胞凋亡, 而 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)抑制剂 SP600125 可以抑制 Bax 寡聚化. 此外, 在未分化 PC12 细胞中共表达 GFP-Bim_L 和 YFP-Bax 质粒, 发现 Bim_L 可以促进 Bax 发生聚集, 并且它们二者之间不是直接发生相互作用. 上述结果证明, Bim_L 在 TNF- α 诱导神经细胞凋亡过程中起到了重要作用, Bim_L 在 TNF- α 诱导分化 PC12 细胞凋亡的过程中间接激活了 Bax.

关键词 阿尔茨海默病 (AD), 肿瘤坏死因子 (TNF- α), 荧光共振能量转移 (FRET), Bax, Bim_L, 分化 PC12 细胞
学科分类号 Q632, Q28

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00591

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是能够引起肿瘤组织出血坏死、并具有多方面功能的细胞因子. 据报道, TNF- α 的合成过量会导致神经细胞凋亡发生紊乱, 出现病理性神经元凋亡, 包括 AIDS- 痴呆综合征、中风、水肿、多发性硬化症及阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)^[1-4], 然而人们对 TNF- α 造成神经细胞凋亡的分子机制并不了解.

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12 细胞)是一个常用的神经细胞株, 经神经生长因子 (NGF) 诱导后, PC12 细胞不仅在形态上向交感神经元分化, 同时伴有生理生化等许多方面的变化, 从而最终导致 PC12 细胞受诱导后呈现神经元样的状态^[5-7].

到目前为止, 与细胞凋亡诱发、调控、执行过程相关的许多蛋白质因子已被鉴定, 研究较为清楚的两条基本途径为死亡受体通路和线粒体通路. 过去的报道认为 TNF- α 诱导的凋亡通路只是通过死亡受体通路: TNF- α 首先与死亡受体 TNFR2 I 和 TN2FR2 II 结合, 再与接头蛋白 (FADD/TRADD)

结合, 之后再与 caspase-8 酶原结合形成了死亡诱导信号复合体, caspase-8 酶原自我剪切活化成活性 caspase-8. 活化的 caspase-8 可激活下游的 caspase-3、caspases-6 和 caspase-7, 剪切胞浆和核底物, 造成细胞凋亡^[8-10]. 最近几年的研究显示, TNF- α 诱导的凋亡也会通过线粒体途径, 但是具体的信号通路还有待研究^[11-12].

在线粒体凋亡途径中, Bax 被激活并从细胞质中转移到线粒体是非常重要的一个过程. 到目前为止, 凋亡过程中 Bax 的激活方式都是一个有争论的问题. 2007 年发表在 *Oncogene* 杂志上的一篇综述总结出了目前存在的两种 Bax 激活的模式^[9]:

* 教育部“长江学者与创新团队计划”创新团队项目(IRT0829), 国家自然科学基金(30870676, 30870658), 广东省自然科学基金(7117865)和广州医学院博士启动基金(295031)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 020-81340197, E-mail: zhanglan@gzhmc.edu.cn

收稿日期: 2009-10-12, 接受日期: 2010-01-21

a. 直接激活模式. 因为 Bax 与抗凋亡蛋白结构相似, 所以支持 BH3-only 蛋白直接结合 Bax 这一观点. Letai 等^[13]推测 BH3-only 蛋白可分为“敏感剂”和“活化剂”, “敏感剂”如 Bad, Bik 只结合抗凋亡蛋白, “活化剂”如 tBid 和 Bim 可结合抗凋亡蛋白, 也可作为凋亡配体结合 Bax/Bak. 通常“活化剂”被抗凋亡蛋白隔离, 随着细胞毒性刺激, “敏感剂”结合抗凋亡蛋白把“活化剂”从抗凋亡蛋白中释放出来, 使“活化剂”直接结合 Bax/Bak, 并触发 Bax 寡聚化, 诱导细胞凋亡. b. 间接激活模式. BH3-only 蛋白活化 Bax 和 Bak 是从隔离它们活化形式的 Bcl-2, Bcl-x_L 等抗凋亡蛋白中替代它们. 在这个模式中, BH3-only 蛋白能拮抗 Bcl-2 抗凋亡蛋白对 Bax/Bak 蛋白聚集的阻挡作用^[14-16]. 近期的报道认为 Bax 的激活方式趋向于间接激活模式^[17-18]. 但无论是哪种 Bax 的激活模式, BH3-only 蛋白都起了关键作用. BH3-only 蛋白是启动以线粒体途径为主的细胞凋亡的必要条件, 当细胞受到一些细胞毒信号刺激时, BH3-only 蛋白被活化, 并通过一定的方式活化 Bax, 使 Bax 在线粒体膜上形成寡聚物, 增加膜通透性, 释放促凋亡蛋白如 Cyt c, 驱使 caspases 活化从而介导细胞凋亡.

Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death) 是 Bcl-2 家族中 BH3-only 亚家族的主要成员, 是一种重要的凋亡调节蛋白, 在造血细胞的内环境稳定、防止自身免疫及肿瘤的发生中有着极其重要的作用. Bim 广泛表达于正常细胞, 其中包括造血细胞、上皮细胞、神经细胞以及生殖细胞^[19]. Bim 有 3 种不同剪接形式, 即: Bim_S、Bim_L 和 Bim_{EL}, 其编码蛋白分别含 110、140 和 196 个氨基酸. 其中 Bim_S 的致凋亡能力最强, 但是在正常细胞中很少被检测到^[20]. 在正常细胞中, Bim_{EL} 和 Bim_L 的动力蛋白结合区域的异构体与微管动力蛋白的轻链 LC8 结合, 定位于细胞器膜上, 其中也包括线粒体膜, 呈无活性状态; 一定的凋亡刺激(如撤除细胞因子、紫外线照射等)作用下, Bim_{EL}/Bim_L 会在 JNK 的作用下被磷酸化, 导致 Bim_{EL}/Bim_L 从微管中释放, 诱导细胞凋亡的发生, 但具体方式, 比如这个过程是否伴有 Bim_{EL}/Bim_L 的转位, 目前还存在着争论^[21-22].

TNF- α 诱导细胞凋亡的一个独特特征是同时激活核转录因子(NF- κ B)途径, 此途径可抑制 TNF- α 诱导的细胞凋亡过程^[9]. 前人的研究已经证明 NF- κ B 的活化能够抵抗 TNF- α 引起的细胞凋亡, 缺少 NF- κ B 活性时, 细胞对 TNF- α 诱导的凋亡敏

感性增加, 同样 NF- κ B 活性增强, 细胞就不容易发生凋亡^[23-24]. NF- κ B 是一个重要的转录因子, 可以增加多种基因的表达, 包括 IAPs (XIAP, cIAP1/2)、TRAF1、TRAF2、A20、Bcl-x_L、IEX-1L、iNOS、c-FLIP、Cyclin D1 及 Survivin^[25-26]. 然而, 由 NF- κ B 诱导表达的保护性基因似乎是组织特异性的, 并且在特异的情况下可能只有其中的某些基因参与 TNF- α 信号系统, 因此到目前为止, 在分化 PC12 细胞中 NF- κ B 抗 TNF- α 毒性的作用机制尚未完全清楚.

为了详细探讨 TNF- α 诱导神经细胞发生凋亡的信号通路以及凋亡过程中 Bax 的激活方式, 我们构建了在神经细胞凋亡中起重要作用的 Bim_L 的荧光蛋白, 采用实时荧光定量 PCR (QT-PCR)、激光共聚焦扫描显微镜成像、免疫共沉淀和 FRET 技术来研究 TNF- α 诱导分化 PC12 细胞凋亡的信号通路.

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

PC12 细胞(大鼠肾上腺嗜铬细胞株)购自广州中山大学细胞培养中心; DMEM 培养基购自 GIBCO 公司; 胎牛血清和马血清购自 Hyclone 公司; TNF- α 、蛋白质合成抑制剂放线菌酮(CHX)、JNK 抑制剂 SP600125 购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA); 神经生成因子(NGF)购自 R&D Systems 公司; Lipofectamine™ 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司; RNA 抽提试剂盒和 LC RNA Master SYBR Green I 试剂盒购自罗氏公司; caspases-3 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; β -actin 抗体购自 Santa 公司; 其他所有化学试剂均为国产分析纯. 质粒 GFP-Bim_L 由华南师范大学激光生命科学研究所构建^[27], 质粒 YFP-Bax 和 YFP-Bcl-x_L 惠赠于 Dr. Gilmore^[28], 质粒 DsRed-Mit 惠赠于 Prof. Gotoh^[29].

激光共聚焦扫描显微镜 (LSM 510/ConfoCor2) 购于德国 Zeiss 公司; 荧光定量 PCR 仪(LightCycler 1.2) 购于德国罗氏公司; 双色红外荧光系统 ODYSSEY® Infrared Imaging System 购于美国莱卡公司.

1.2 细胞培养

未分化的 PC12 细胞置于 DMEM 培养基中培养, 内含 10% 的胎牛血清, 5% 的马血清, 青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 mg/L. 根据实验要求接种不

同密度的细胞于培养瓶或者培养皿中, 置 37°C, 5% CO₂ 的培养箱中培养, 每隔 48 h 换液. 为了获得类神经元细胞, 将未分化的 PC12 细胞置于含有 0.5% 胎牛血清和 100 μg/L NGF 的 DMEM 培养基中培养 3~5 天, 每隔 48 h 换液.

1.3 细胞转染

取对数生长期的未分化 PC12 细胞接种在 35 mm 直径的特制细胞培养皿内(由华南师范大学激光生命科学研究所加工), 待细胞达到 70%~80% 融合时, 按说明书所述方法用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂将所需质粒转染至未分化 PC12 细胞, 转染 4 h 后换液, 培养 24 h 后再进行分化处理.

1.4 药物处理

为了加强 TNF-α 的凋亡作用, 除特别说明外所有实验的药物处理都加入了 15 mg/L CHX 与 40 μg/L TNF-α 共同诱导细胞发生凋亡.

1.5 CCK-8 试剂检测细胞活性

将未分化 PC12 细胞(100 μl, 1×10⁴ 个 / 孔)接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后再进行分化处理. 在分化的 PC12 细胞中分别或共同加入 15 mg/L CHX 及 40 μg/L TNF-α 处理不同时间后, 用 CCK-8 试剂检测细胞的活性. 检测前在 96 孔板的每个孔中加入 10 μl CCK-8 试剂, 置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养约 1.5 h 后, 在 DG5032 型酶联免疫检测仪上测定吸光度, 主波长 450 nm, 参比波长 650 nm, 以不加任何处理的细胞孔作为空白对照, 计算细胞存活率. 细胞存活率 = 处理组 A 值 / 对照组 A 值 × 100%

1.6 引物设计

通过查阅多篇文献和 GenBank, 并用 primer5.0 软件进行检测, 确定检测基因引物. GAPDH-1, 5' TGGAGTCTACTGGCGTCTT 3'; GAPDH-2, 5' GTCTTCTGAGTGGCAGTGAT 3'; *bim*-1, 5' TCCCTACAGACAGAATCGC 3'; *bim*-2, 5' CCTCTCGTGTAAGTCTCATT 3'; *bcl-xl*-1, 5' AGGCTGGCGATGAGTTTGAA 3'; *bcl-xl*-2, 5' CGGCTCTCGGCTGCTGCATT 3'; *bax*-1, 5' CTGCAGAGGATGATTGCTGA 3'; *bax*-2, 5' GAGGAAGTCCAGTGTCCAG 3' [30].

在 PC12 细胞中, 使用以上引物, 理想的 PCR 产物的长度为 GAPDH: 274 bp, *bim*: 222 bp, *bax*: 207 bp, *bcl-xl*: 337 bp.

1.7 RNA 抽提及 QT-PCR

未分化 PC12 细胞 (1×10⁶ 个 / ml) 传入培养皿中

培养 24 h 后进行分化. 分化的 PC12 细胞被 TNF-α 处理 8 h 后使用高纯度 RNA 抽提试剂盒(catalog No. 1828665; 罗氏, 曼海姆, 德国)按照试剂盒说明书抽提总 RNA. 抽提的 RNA 用 Eppendorf 核酸蛋白紫外分光光度仪测定吸收值, 估计核酸的浓度. 使用 LC RNA Master SYBR Green I 一步法 RT-PCR 试剂盒(catalog No. 3064760; 罗氏, 曼海姆, 德国)进行 cDNA 的合成以及 QT-PCR. 反应体系为每个毛细玻璃管中加入总 RNA 0.8 μl (0.8 μg), Mn(OAc)₂ (50 mmol/L) 溶液 0.65 μl, LightCycler RNA Master SYBR Green I 染料 3.75 μl, 上下游引物 (8.8 μmol/L) 各 0.75 μl, 纯水 3.3 μl. cDNA 的合成和 QT-PCR 均是使用罗氏公司 LightCycler 荧光定量 PCR 仪(罗氏, 曼海姆, 德国)完成. 反应条件: 61°C 逆转录 20 min, 95°C 变性 1 min; 打开 cDNA/RNA 杂交链后, 95°C 变性 5 s; GAPDH、*bcl-xl* 和 *bax* 55°C 退火 8 s, *bim* 53°C 退火 8 s; 72°C 延伸 15 s, 共进行 45 个循环. 纯水在所有的反应中作为阴性对照的模板, 反应体系为 10 μl.

1.8 溶解曲线分析

扩增完成后使用溶解曲线检测扩增的特异性, 特异性扩增的片段的溶解温度大于阴性对照的引物二聚体的溶解温度. 从 95°C 起, 以 20.0°C/s 的速度降温至 65°C; 65°C 孵育 15 s 后, 以 0.1°C/s 的速度升温至 95°C.

1.9 标准曲线的建立

将抽提的总 RNA 稀释, 作为标准品, 稀释倍数分别为 5, 25, 125, 625, 3 125 倍. 反应体系和反应条件同前, 以起始模板量的自然对数(lgCo)为横坐标, 以循环阈值(Ct)为纵坐标, 可以得出反应的 QT-PCR 定量标准曲线, 反应结束后使用 Real Quant 软件(罗氏, 曼海姆, 德国)进行分析. 经过相关系数分析, 标准曲线都符合要求.

QT-PCR 的结果通过使用罗氏公司提供的两个软件 LightCycler Software v.3.5 和 Real Quant Software 完成.

1.10 激光共聚焦扫描显微镜的使用

所有荧光图像由 Zeiss 公司 LSM 510/ConfoCor 2 型激光共聚焦扫描显微镜采集, 采用 40 倍油镜, 数值孔径 (NA) 为 1.3, 记录的图像和数据均用 Zeiss Rel3.2 软件系统进行分析. 在我们的实验条件下, GFP、YFP 均选用 488 nm 的氩离子激光作为激发光源, 吸收滤色镜选用 BP500-530 nm, DsRed 选用 543 nm 的氩氦激光作为激发光源, 吸

收滤色镜选用 BP600-650 nm.

1.11 YFP-Bax 和 GFP-Bim_L 转位线粒体的动态变化检测

在本实验中, 经过瞬时转染使 YFP-Bax/GFP-Bim_L 和 DsRed-Mit 在分化 PC12 细胞内共表达, 通过观察 YFP/GFP 的荧光来检测 Bax/Bim_L 的动态变化, 同时用 DsRed-Mit 标记线粒体形态, 根据 YFP/GFP 和 DsRed 的荧光重叠情况来判断 Bax/Bim_L 是否转位到线粒体. 具体实验操作如下: 未分化 PC12 细胞首先按照质粒瞬时转染的操作步骤共转染 YFP-Bax/GFP-Bim_L 和 DsRed-Mit 两种质粒, 分化 PC12 细胞在未分化 PC12 细胞转染质粒 24 h 后, 再进行分化. TNF- α /CHX 诱导细胞发生凋亡后, 为了检测活细胞中 YFP-Bax/GFP-Bim_L 转位线粒体的动态变化, 培养皿置于 LSM 510/ConfoCor 2 显微镜平台. 选择合适的激发光源和吸收滤色镜后进行成像. 在成像整个实验过程中, 利用温度调节仪 (Tempcontrol 37-2 digital, Zeiss) 维持细胞的环境在 37 $^{\circ}$ C, 温度浮动小于 $\pm 0.2^{\circ}$ C.

1.12 免疫共沉淀检测

细胞经过 TNF- α /CHX 共处理 12 h 后, 常规收集细胞, PBS 清洗 2 次, PMSF 裂解液加 1 \times protease inhibitor cocktail set I 裂解细胞, Bradford 法蛋白质定量. 用 PBS 将总蛋白稀释到约 1 g/L, 加入一定体积蛋白 1 的抗体到 500 μ l 总蛋白中, 抗体的稀释比例因兴趣蛋白在不同细胞系中的多少而异. 室温下缓慢摇动抗原抗体混合物 2 h 后, 加入 100 μ l Protein A 琼脂糖珠来捕捉抗原抗体复合物. 室温缓慢摇动抗原抗体混合物 1 h 后, 收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物, 去上清, 用预冷的裂解液洗 3 遍, 将上样样品煮 5 min, 以游离抗原、抗体、珠子, 离心, 将上清按照 Western blot 的技术介绍进行电泳和转膜, 最后加入蛋白 2 的抗体进行 Western blot 的检测.

1.13 FRET 技术检测 Bim_L 和 Bcl-x_L 及 Bim_L 和 Bax 的相互作用

转染了 GFP-Bim_L 和 YFP-Bcl-x_L 或 GFP-Bim_L 和 YFP-Bax 的细胞置于激光共聚焦扫描显微镜的 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中. 根据荧光共振能量转移 (FRET) 发生原理 (图 1)^[21-23], 为了检测两个蛋白质之间的 FRET 效应, GFP 用由氩离子激光器产生 458 nm 波长的激光激发, 激发光经过分光滤片 HFT458/514 后照射到样品上, 荧光信号经过分光片 NFT545 分成 GFP 和 FRET 两个通道, GFP 发

射光收集经过 BP500-550 nm 的滤光片, FRET 的信号经过 BP550-615 nm 的滤光片. 对于任何一个细胞荧光图像, 在选定了细胞中某个区域以后, 该区域的 GFP 和 FRET 的平均荧光强度会被自动记录, 同时选择没有细胞的区域为背景, 最终的 FRET 荧光曲线图用 FRET/GFP 的值来表示 FRET 的强度 (其中 FRET 和 GFP 强度均是减去背景、校正后的强度).

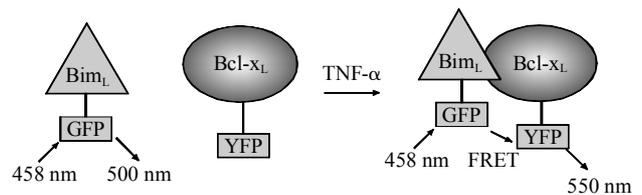


Fig. 1 Schematic diagram of the interaction between GFP-Bim_L and YFP-Bcl-x_L during TNF- α -induced apoptosis

1.14 Western blot 检测 caspase-3 的激活

分别收集对照组和 TNF- α /CHX 共处理 12 h 后的细胞, 常规收集细胞, 用预冷的 PBS 清洗 2 次, PMSF 裂解液加 1 \times protease inhibitor cocktail set I 于冰上振荡裂解细胞, Bradford 法蛋白质定量. 取适量蛋白质, 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳中电泳分离 (BIO-RAD 电泳及转膜装置, 美国) 2 h, 电转膜 (100 V, 1 h) 至硝酸纤维素膜 (Pall), 印迹膜在含有 5% 封闭蛋白的 TBS-T 缓冲液中封闭 1 h. 在 caspase-3 和 β -actin 的一抗溶液 (抗体用 5% 封闭蛋白的 TBS-T 缓冲液 1:1000 稀释) 中 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育. 次日加入偶联有 IRDye800 和 Alexa Fluor 680 的荧光二抗, 通过双色红外荧光系统进行 caspase-3 活性检测.

1.15 统计学处理

每个实验至少重复 3 次, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验确定不同处理组和对照组之间的差异. **P* < 0.05 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 TNF- α 和 CHX 诱导分化 PC12 细胞的凋亡

分化 PC12 细胞经过不同处理后, 用 CCK8 分析细胞存活率. 实验结果如图 2 所示, TNF- α 和 CHX 分别单独处理后的前 12 h 细胞没有明显的凋亡, 但当 TNF- α 和 CHX 共同处理 12 h 后, 细胞的存活率有了明显的下降, 随着处理时间的延长,

细胞存活率不断下降, 到 30 h 后凋亡百分率达到最大. 在单独处理 18 h 后 TNF- α 诱导分化 PC12 细胞发生明显的凋亡, 而 CHX 诱导的凋亡则发生在单独处理 24 h 左右, TNF- α 和 CHX 单独处理诱导细胞凋亡的速度明显慢于共同处理. 因为 CHX 是一种蛋白质合成抑制剂, 所以我们推测, CHX 的加入抑制了原本可以在 TNF- α 诱导细胞凋亡过程中表达的抑制凋亡蛋白的表达, 从而使得 CHX 的加入促进了 TNF- α 的凋亡作用.

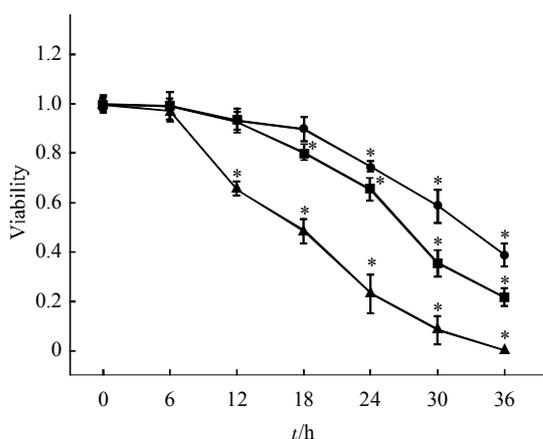


Fig. 2 TNF- α and CHX induced differentiated PC12 cell apoptosis

Cell proliferation measured with CCK8 assay. The data is normalized to that of control (no treatment) ($n = 3$; * $P < 0.05$ versus control). ■—■: TNF- α ; ●—●: CHX; ▲—▲: TNF- α +CHX.

2.2 QT-PCR 检测 *bim*, *bax* 和 *bcl-xl* 的 mRNA 表达

为了研究 TNF- α 诱导分化 PC12 细胞发生凋亡过程中是否激活了抑制凋亡蛋白的表达, 我们用 QT-PCR 的方法定量检测了 TNF- α 处理 8 h 后 *bim*, *bax* 和 *bcl-xl* 的 mRNA 表达. 实验结果表明, 经过 TNF- α 处理后的分化 PC12 细胞 *bcl-xl* 的 mRNA 表达有明显的上升, 而 *bim* 和 *bax* 的 mRNA 表达则没有太大的变化(图 3). 由于 *Bim* 和 *Bax* 是典型的促凋亡蛋白, *Bcl-x_L* 是典型的抗凋亡蛋白, 因此这个实验结果表明, 在 TNF- α 诱导的分化 PC12 细胞凋亡过程中, TNF- α 通过上调抗凋亡蛋白基因的表达来拮抗凋亡, 促凋亡蛋白则可能是直接通过相互作用来诱导细胞凋亡.

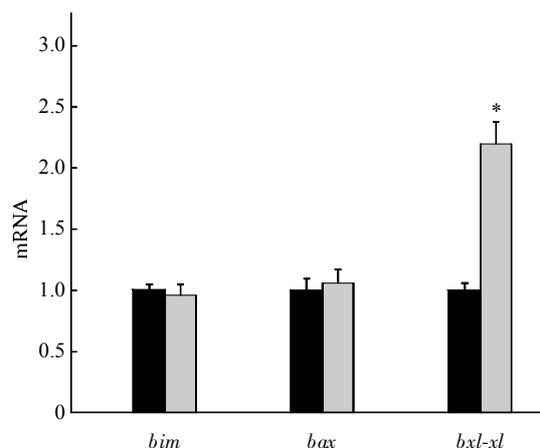


Fig. 3 Expression of *bim*, *bax* and *bcl-xl* mRNA in differentiated PC12 cells measured by QT-PCR during TNF- α -induced apoptosis

The amount of each product was normalized to the reference gene GAPDH and data were normalized to that of mRNA in control cells (no treatment). The data is normalized to that of control (no treatment) ($n=3$; * $P < 0.05$ versus control). ■: Control; □: TNF- α .

2.3 JNK 抑制剂抑制 TNF- α /CHX 诱导凋亡过程中 *Bax* 的转位

为了具体研究 TNF- α 诱导凋亡的信号通路, 我们首先利用激光共聚焦扫描显微镜实时监测了 *Bax* 的活化. 在许多药物诱导的凋亡过程中, *Bax* 从细胞质转位到线粒体是凋亡经过线粒体途径的一个重要步骤. 为了直接观测 TNF- α 诱导分化 PC12 凋亡过程中 *Bax* 的活化, 分化 PC12 细胞共转染质粒 YFP-*Bax* 和 DsRed-Mit, 用 TNF- α /CHX 共处理诱导细胞凋亡. 利用激光共聚焦扫描显微镜实时监测 TNF- α 诱导细胞凋亡中 *Bax* 的定位. 在 TNF- α 诱导细胞凋亡之前, 分化 PC12 的 *Bax* 均匀地分布在细胞质和细胞核中(图 4a, 0 h, 绿色荧光). TNF- α 处理 250 min 后, 分化 PC12 细胞的 YFP-*Bax* 转位到了线粒体, 并在线粒体上发生了寡聚化(图 4a)^[33]. 结果证明了 TNF- α 诱导分化 PC12 凋亡的过程中有 *Bax* 的参与. 为了进一步确定 TNF- α 诱导的分化 PC12 细胞的凋亡途径, 以及在这个过程中是否与 *Bim* 有关, 我们检测了在 JNK 抑制剂 (SP600125) 与 TNF- α 共处理下 *Bax* 的转位情况. 激光共聚焦扫描显微镜结果发现 SP600125 和 TNF- α 共处理后, YFP-*Bax* 直到细胞凋亡也没有发生定位的改变(图 4b). 根据实验结果, 我们推测在 TNF- α 诱导分化 PC12 细胞凋亡的过程中, *Bim* 起了重要作用.

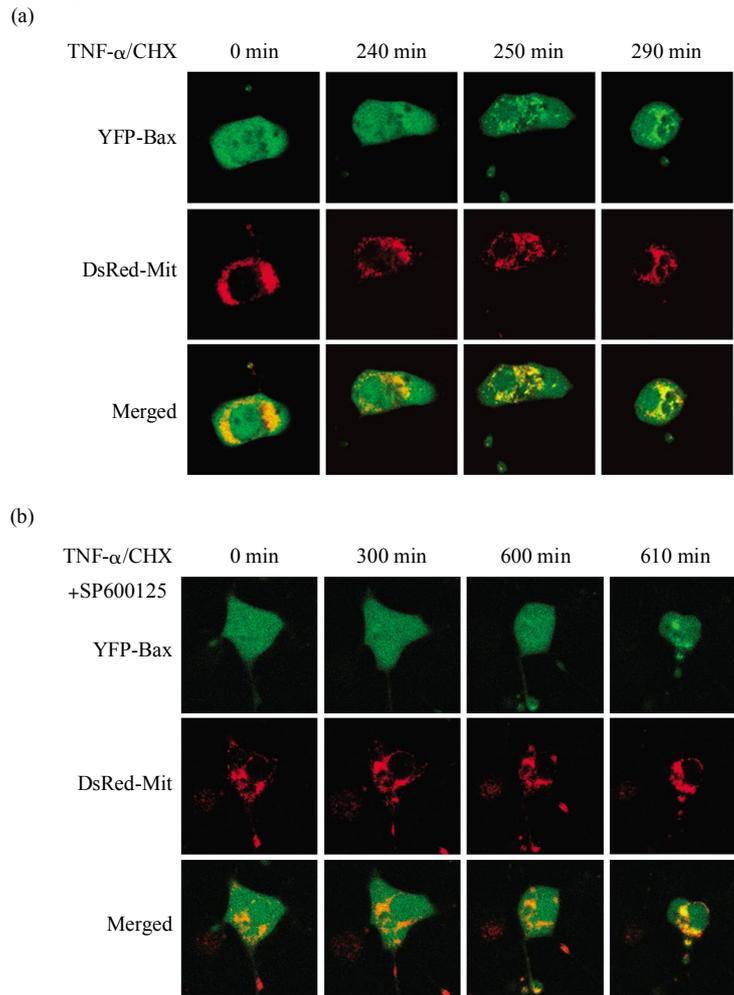


Fig. 4 Translocation of YFP-Bax in differentiated PC12 cells, co-expressing YFP-Bax and DsRed-Mit

Translocation of YFP-Bax was performed by laser fluorescence confocal microscopy. (a) Differentiated PC12 cells treated with TNF- α /CHX for 240 min, YFP-Bax translocated to mitochondria noticeably within 10 min and the cell apoptosis after 50 min. (b) Differentiated PC12 cells co-treated with TNF- α /CHX and SP600125 for 610 min, YFP-Bax didn't translocate to the mitochondria until the cell apoptosis. Data are representative of three independent experiments.

2.4 Bim_L 和 Bcl-x_L 相互作用

为了进一步证明 Bim 在 TNF- α 诱导细胞凋亡过程中起了作用, 以及是如何激活 Bax 的, 我们分别做了 Bim_L 和 Bcl-x_L, Bim_L 和 Bax, Bcl-x_L 和 Bax 的免疫共沉淀. 实验结果显示 (图 5), TNF- α /CHX 共处理后 Bim_L 和 Bcl-x_L 的相互作用比空白对照组的增强了, 而 Bim_L 和 Bax 之间无论是 TNF- α /CHX 共处理前还是处理后, 都没有检测到二者的相互作用. 根据文献报道, 我们推测 Bim_L 的作用是通过替代了原来和 Bcl-x_L 结合的 Bax, 使得 Bax 在线粒体上激活, 结合游离在细胞质中无活性的 Bax 形成寡聚化. 为了证实这个推测我们又检测了 Bcl-x_L 和 Bax 之间的相互作用. 实验结果显示 TNF- α /CHX 共处理后 Bcl-x_L 和 Bax 之间的

相互作用确实减少了.

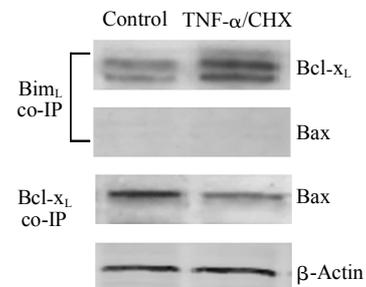


Fig. 5 Interactions between Bim_L and Bcl-x_L, Bim_L and Bax, Bcl-x_L and Bax after TNF- α /CHX treatment

Differentiated PC12 cells were incubated with TNF- α /CHX for 12 h, then the cell lysates were prepared and co-immunoprecipitation was performed to analyze the interactions. Data are representative of three independent experiments.

2.5 实时动态监测 Bim_L 和 Bcl-x_L 的相互作用

为了更准确地检测 Bim_L 和 Bcl-x_L 的直接相互作用, 我们采用了 FRET 技术对活细胞进行实时动态的监测. 用 TNF-α/CHX 共处理表达 GFP-Bim_L 和 YFP-Bcl-x_L 质粒的分化 PC12 细胞后, 通过共聚焦显微镜的记录, 得到了 GFP 和 FRET 两个通道的图像, 并将得到的图像进行量化. 实验结果表明, TNF-α/CHX 共处理后细胞 FRET 的荧光强度逐渐升高, 而 GFP 的荧光强度逐渐降低(图 6a). 未处理的空白对照组则没有变化. 为了更清楚地分析实验结果, 用 FRET/GFP 的比例来表示, TNF-α/CHX 共处理后的 FRET/GFP 比例下降(图 6b).

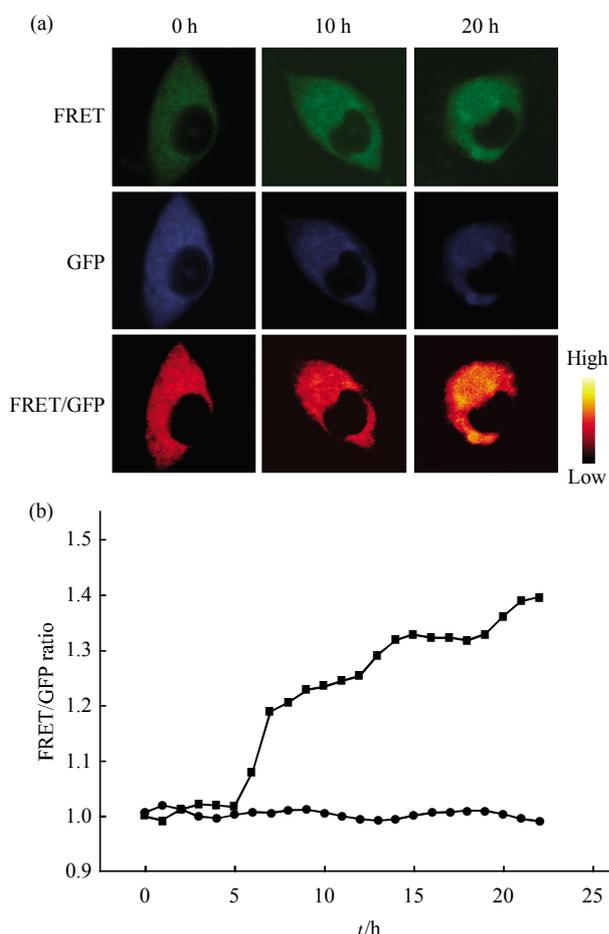


Fig. 6 Dynamic interaction between Bim_L and Bcl-x_L in TNF-α/CHX treated differentiated PC12 cells, which were co-expressed with YFP-Bcl-x_L and GFP-Bim_L

Cells were treated with TNF-α/CHX after transfection and imaged by confocal microscopy. (a) Bcl-x_L and Bim_L distribution were imaged simultaneously in a single cell. The images of FRET/GFP ratio were recorded with LSM microscope and processed with pseudocolor technique. (b) Dynamics of FRET/GFP ratio correspond to the images of FRET/GFP ratio. The FRET/GFP ratios at the first time point were normalized to 1. Similar results were obtained from three separate experiments. ■—■: TNF-α/CHX; ●—●: Control.

这个实验结果表明, 在 TNF-α/CHX 共处理后, Bim_L 和 Bcl-x_L 逐渐发生了相互作用, 并且细胞在转染了 YFP-Bcl-x_L 质粒后可以延长细胞存活的时间, 证明了 Bcl-x_L 的抗凋亡作用.

2.6 TNF-α 诱导的凋亡过程中 Bim_L 不转位

前面的结果已经证明了 Bim_L 参与了 TNF-α 诱导的凋亡过程, 但是 Bim_L 是怎样被激活的呢? 为了研究这个问题, 我们在分化 PC12 细胞中共转染了质粒 GFP-Bim_L 和 DsRed-Mit. 共聚焦显微镜的成像结果显示, Bim_L 在正常细胞中是定位于细胞器膜上的(图 7, 0 min, 绿色荧光), 当 TNF-α/CHX 共处理后, Bim_L 的定位并没有较大的改变, 直到细胞凋亡, Bim_L 也没有出现像 Bax 一样在线粒体聚集的现象(图 7).

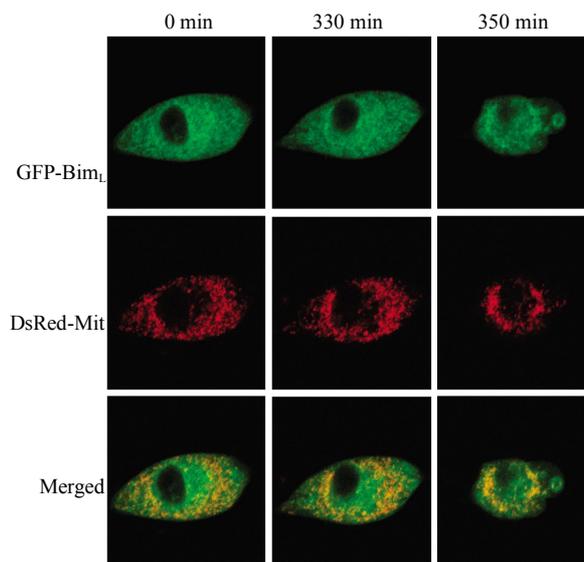


Fig. 7 Translocation of GFP-Bim_L in differentiated PC12 cells, co-expressing GFP-Bim_L and DsRed-Mit

Translocation of GFP-Bim_L was performed by laser fluorescence confocal microscopy. Differentiated PC12 cells had no evidence of Bim_L redistribution in respect to mitochondria until cell apoptosis. Data are representative of three independent experiments.

2.7 未分化 PC12 细胞加入 Bim_L 后 Bax 有聚集但不发生 FRET

为了更直接地证明 Bim_L 对 Bax 的聚集起了至关重要的作用, 我们用 TNF-α/CHX 共处理表达 GFP-Bim_L 和 YFP-Bax 质粒的未分化 PC12 细胞, 通过共聚焦显微镜的记录看 Bax 和 FRET 的情况. 之前我们的研究发现, 未分化 PC12 细胞在 TNF-α 处理后直到细胞凋亡都不会发生 Bax 的聚集^[33], 但是在共转染了 Bim_L 质粒后, Bax 在 TNF-α 处理

540 min 后发生了明显的聚集(图 8). FRET/GFP 的比例没有变化, 这一结果说明, 虽然 Bim_L 对 Bax 的聚集起了决定性的作用, 但是它们之间没有直接的相互作用, 再次证明了我们之前的实验结果.

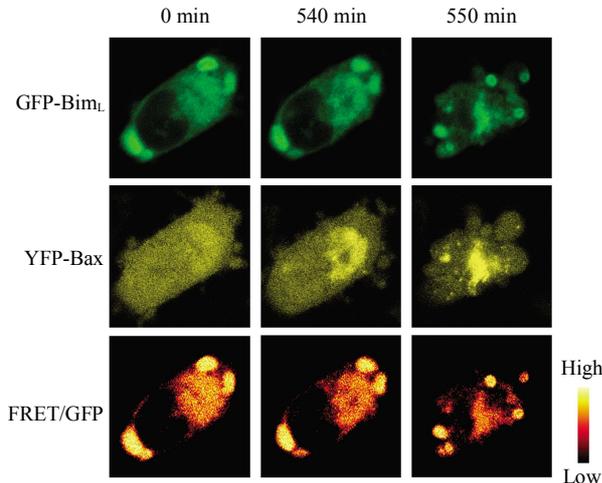


Fig. 8 Dynamic interaction between Bim_L and Bax after TNF- α /CHX treatment in naïve PC12 cells

Naïve PC12 cells were co-expressed with GFP-Bim_L and YFP-Bax. Bim_L and Bax distribution were imaged simultaneously in a single cell. The images of FRET/GFP ratio were recorded with LSM microscope and processed with pseudocolor technique. Naïve PC12 cells were treated with TNF- α /CHX for 540 min, YFP-Bax translocated to mitochondria noticeably, but FRET/GFP ratio didn't change until the cell apoptosis. Similar results were obtained from three separate experiments.

2.8 Caspase-3 活性检测

Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用, 其中 caspase-3 是关键执行分子, 它在凋亡信号传导的许多途径中发挥功能. Caspase-3 在正常情况下以酶原 (32 ku) 的形式存在于胞浆中, 在细胞凋亡的早期阶段, 它被激活, 活化的 caspase-3 由两个大亚基 (17 ku) 和两个小亚基 (12 ku) 组成, 裂解相应的胞浆胞核底物, 最终导致细胞凋亡. 为了进一步证明 TNF- α 诱导的凋亡过程, 用 Western blot 检测 caspase-3 的活性. 实验结果显示, 经 TNF- α /CHX 处理后, 分化 PC12 细胞 caspase-3 被切割了, JNK 的抑制剂 SP600125 不能抑制分化 PC12 细胞 caspase-3 的切割(图 9). 结合之前共聚焦的实验结果, Western blot 的结果证明 TNF- α 诱导的凋亡在分化 PC12 细胞中不仅仅经过线粒体途径.

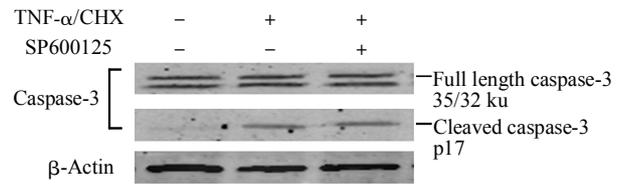


Fig. 9 Caspase-3 activation in differentiated PC12 cells induced by TNF- α /CHX alone or in the presence of SP600125

Differentiated PC12 cells were treated with TNF- α /CHX in the absence or presence of SP600125, then the cell lysates were prepared and Western blot was performed to analyze activation of caspase-3 using rabbit specific anti-caspase-3 monoclonal antibody. The positions of procaspase-3 and active subunits are indicated. Data are representative of three independent experiments.

3 讨 论

TNF- α 是一个多效性细胞因子, 可以启动与神经细胞凋亡及神经损伤相关的级联反应. 细胞凋亡的途径根据其启动与凋亡传导线路大致分为两类: 死亡受体途径和线粒体途径, 其中 TNF- α 诱导凋亡通过的线粒体途径是近期研究的重点. 在我们的研究中, 首先采用 CCK8 的方法验证了分化 PC12 细胞在 CHX 和 TNF- α 的共同处理下调亡速度最快(图 2), QT-PCR 的结果证明单独用 TNF- α 处理分化 PC12 细胞会引起抗凋亡蛋白 *bcl-xl* mRNA 表达有明显的上升, 而促凋亡蛋白 *bim* 和 *bax* mRNA 的表达则没有太大的变化(图 3). 根据我们的实验结果和以前的报道^[24, 26], *bcl-xl* mRNA 表达的上升可能是 TNF- α 诱导的分化 PC12 细胞凋亡时, 在启动凋亡通路的同时还可以激活 NF- κ B 途径来抑制凋亡. 为了更好地研究 TNF- α 诱导的分化 PC12 细胞凋亡的线粒体途径, 我们在后续的实验中加入了 CHX 和 TNF- α 来共同诱导分化 PC12 细胞凋亡.

为了准确探讨 TNF- α 诱导的凋亡过程中分化 PC12 细胞的凋亡通路, 我们首次采用激光共聚焦扫描显微镜在活细胞中进行了实时研究. 在研究中, 首先证明了在 TNF- α 诱导的分化 PC12 细胞凋亡过程中 Bax 会转位到线粒体上发生寡聚化, JNK 的抑制剂 SP600125 可以抑制 Bax 的转位. 由于 JNK 在凋亡过程中可以通过磷酸化 Bim 来起作用, 而 BH3-only 蛋白是 Bax/Bak 激活的上游调节因子^[22], 因此推测 Bim 在 TNF- α 诱导的细胞凋亡过程中起了重要作用. 之后我们用免疫共沉淀的方

法研究了 BH3-only 蛋白家族中 Bim_L 和 Bax 之间的作用方式. 实验结果显示, 在 TNF- α 诱导的细胞凋亡过程中 Bax 和 Bcl-x_L 的相互作用会减弱, Bim_L 和 Bcl-x_L 的相互作用会增加, 而 Bim_L 不会和 Bax 发生相互作用(图 5). 接着又采用 FRET 技术实时观测了 TNF- α 诱导细胞凋亡过程中 Bim_L 和 Bcl-x_L 的相互作用, 实验结果显示, Bim_L 和 Bcl-x_L 的相互作用在加入 TNF- α 后会逐渐增强, 并且由于 Bcl-x_L 的加入, Bax 的转位和随后发生的细胞凋亡被推迟了, 证明了 Bcl-x_L 的抗凋亡作用(图 6). 以上实验结果说明, Bax 的激活是通过和 Bim_L 发生间接作用来实现的, 具体作用方式是在 TNF- α 诱导的细胞凋亡过程中 Bim_L 会替换原来被 Bcl-x_L 抑制的 Bax, 从而让 Bax 活化, 使得细胞质中的 Bax 和活化的 Bax 寡聚化. 进一步的实验结果还证明, Bim_L 在 TNF- α 诱导的凋亡过程中并没有发生转位现象, 这个实验现象和我们以前发现的在紫外线(UV)诱导细胞凋亡过程中 Bim_L 会转位到线粒体上不太一致, 可能是由于刺激因子的不同导致凋亡通路的不同^[34]. 根据我们现在的实验结果, 推测 TNF- α 诱导的凋亡过程中 Bim_L 直接在线粒体上被激活, 然后再替换线粒体上被 Bcl-x_L 抑制的 Bax. 当然 TNF- α 的处理可能也会激活定位于其他细胞器膜上的 Bim_L, 并且这些 Bim_L 也参与了其他凋亡的通路, 但是我们推测并没有其他因子促使它们转位到线粒体. 此外, 通过在未分化 PC12 细胞中共表达 GFP-Bim_L 和 YFP-Bax 质粒, 再次证明了 Bim_L 对 Bax 的聚集起了至关重要的作用, 并且它们二者之间不是直接发生相互作用(图 8). 最后, 我们采用 Western blot 的方法检测了 TNF- α 诱导的凋亡过程中 caspase-3 的活性, 结果证明了 SP600125 不能抑制 caspase-3 的切割, 由此说明 TNF- α 诱导的分化 PC12 细胞凋亡不仅仅经过 JNK/Bax 依赖的线粒体途径. 根据我们之前的实验结果, TNF- α 诱导的分化 PC12 细胞凋亡还存在一个从 caspase-8 直接到 caspase-3 的途径.

综上所述, 我们在活的单细胞的研究中, 证明了在 TNF- α 诱导的分化 PC12 细胞凋亡过程中涉及线粒体凋亡途径的 Bim_L、Bax 和 Bcl-x_L 之间的相互作用. Bim_L 被激活后会替换在线粒体上原来被 Bcl-x_L 抑制的 Bax, 从而让 Bax 寡聚化, 进而引发细胞凋亡, 而被激活的 NF- κ B 可以通过上调 Bcl-x_L 的表达来抑制线粒体的凋亡途径(图 10). 了解 TNF- α 诱导的分化 PC12 细胞凋亡的信号通路问

题, 对将来治疗由 TNF- α 引起的 AD 等神经退行性疾病或者使用 TNF- α 治疗疾病都有重要的意义.

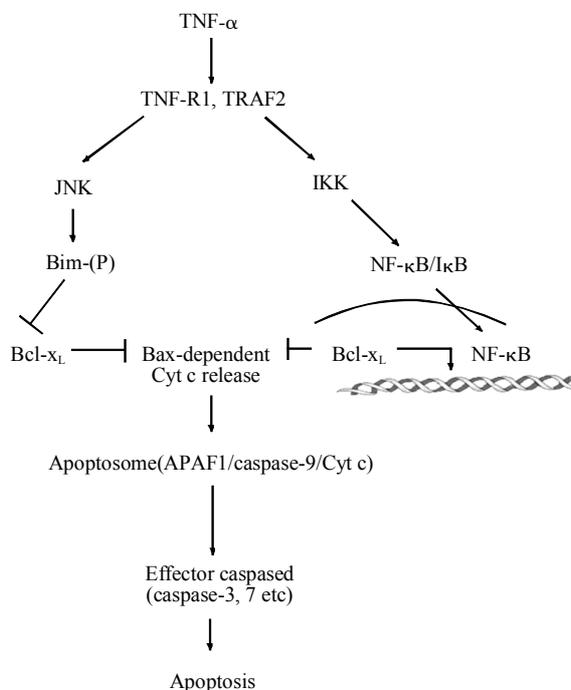


Fig. 10 A model of TNF- α -induced mitochondrial apoptosis pathways in differentiated PC12 cells

Bim_L displaces Bcl-x_L and promotes Bax translocation during TNF- α -induced apoptosis. NF- κ B inhibits apoptosis through up-regulation of Bcl-x_L by TNF- α induced.

参 考 文 献

- [1] Mattson M P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 2004, **430**(7000): 631-639
- [2] Munoz-Fernandez M A, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol*, 1998, **56**(3): 307-340
- [3] Shohami E, Ginis I, Hallenbeck J M. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1999, **10**(2): 119-130
- [4] Tewari M, Dixit V M. Recent advances in tumor necrosis factor and CD40 signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 1996, **6**(1): 39-44
- [5] Neet K E, Campenot R B. Receptor binding, internalization, and retrograde transport of neurotrophic factors. *Cell Mol Life Sci*, 2001, **58**(8): 1021-1035
- [6] Lee N H, Weinstock K G, Kirkness E F, *et al.* Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after nerve growth factor treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(18): 8303-8307
- [7] Rong P, Bennie A M, Epa W R, *et al.* Nerve growth factor

- determines survival and death of PC12 cells by regulation of the bcl-x, bax, and caspase-3 genes. *J Neurochem*, 1999, **72**(6): 2294–2300
- [8] Rath P C, Aggarwal B B. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol*, 1999, **19**(6): 350–364
- [9] Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis *via* two sequential signaling complexes. *Cell*, 2003, **114**(2): 181–190
- [10] Depuydt B, van Loo G, Vandenabeele P, *et al.* Induction of apoptosis by TNF receptor 2 in a T-cell hybridoma is FADD dependent and blocked by caspase-8 inhibitors. *J Cell Science*, 2005, **118**(Pt 3): 497–504
- [11] Zhu J, Liu M, Kennedy R H, *et al.* TNF-alpha-induced impairment of mitochondrial integrity and apoptosis mediated by caspase-8 in adult ventricular myocytes. *Cytokine*, 2006, **34**(1–2): 96–105
- [12] Venters H D, Dantzer R, Kelley K W. A new concept in neurodegeneration: TNFalpha is a silencer of survival signals. *Trends Neurosci*, 2000, **23**(4): 175–180
- [13] Letai A, Bassik M C, Walensky L D, *et al.* Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2002, **2**(3): 183–192
- [14] Chen L, Willis S N, Wei A, *et al.* Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*, 2005, **17**(3): 393–403
- [15] Willis S N, Chen L, Dewson G, *et al.* Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-x_L, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*, 2005, **19**(11): 1294–1305
- [16] 杨志英. BH3-only 蛋白的研究进展. *医学临床研究*, 2006, **23**(5): 801–803
Yang Z Y. *J Clin Res*, 2006, **23**(5): 801–803
- [17] Uren R T, Dewson G, Chen L, *et al.* Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak. *J Cell Biol*, 2007, **177**(2): 277–287
- [18] Willis S N, Fletcher J I, Kaufmann T, *et al.* Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 2007, **315**(5813): 856–859
- [19] O'Reilly L A, Cullen L, Visvader J, *et al.* The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am J Pathol*, 2000, **157**(2): 449–461
- [20] O'Connor L, Strasser A, O'Reilly L A, *et al.* Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J*, 1998, **17**(2): 384–395
- [21] Lei K, Davis R J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(5): 2432–2437
- [22] Putcha G V, Le S, Frank S, *et al.* JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron*, 2003, **38**(6): 899–914
- [23] Beg A A, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, 1996, **274**(5288): 782–784
- [24] Luo J L, Maeda S, Hsu L C, *et al.* Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell*, 2004, **6**(3): 297–305
- [25] Shishodia S, Aggarwal B B. Nuclear factor-kappaB: a friend or a foe in cancer?. *Biochem Pharmacol*, 2004, **68**(6): 1071–1080
- [26] Yin X M, Ding W X. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Curr Mol Med*, 2003, **3**(6): 491–508
- [27] Zhang L, Xing D, Chen M. Bim(L) displacing Bcl-x(L) promotes Bax translocation during TNFalpha-induced apoptosis. *Apoptosis*, 2008, **13**(7): 950–958
- [28] Valentijn A J, Metcalfe A D, Kott J, *et al.* Spatial and temporal changes in Bax subcellular localization during anoikis. *J Cell Biol*, 2003, **162**(4): 599–612
- [29] Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem*, 2002, **277**(16): 14040–14047
- [30] Zhou L J, Zhu X Z. Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, **293**(3): 982–988
- [31] Liu L, Xing D, Chen W R, *et al.* Calpain-mediated pathway dominates cisplatin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells as determined by real-time single cell analysis. *Int J Cancer*, 2008, **122**(10): 2210–2222
- [32] Zhang L, Xing D, Gao X, *et al.* Low-power laser irradiation promotes cell proliferation by activating PI3K/Akt pathway. *J Cell Physiol*, 2009, **219**(3): 553–562
- [33] Zhang L, Xing D, Liu L, *et al.* TNFalpha induces apoptosis through JNK/Bax-dependent pathway in differentiated, but not naive PC12 cells. *Cell Cycle*, 2007, **6**(12): 1479–1486
- [34] Chen M, Xing D, Chen T, *et al.* Bim_L involvement in Bax activation during UV irradiation-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **358**(2): 559–565

Molecular Mechanism of JNK/Bim/Bax Apoptotic Pathway Induced by TNF- α in Differentiated PC12 Cells*

ZHANG Lan^{1)**}, XING Da²⁾

¹⁾ Department of Medical Genetics and Cell Biology, School of Basic Science, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China;

²⁾ MOE Key Laboratory of Laser Life Science & Institute of Laser Life Science, College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease. Recent years, AD has been found closely related to cell apoptosis. It is reported that the synthesis of excessive tumor necrosis factor- α (TNF- α) has been widely considered as a potential inducer of apoptosis contributing to neurodegenerative disease such as AD. However, the molecular mechanism of TNF- α -mediated apoptosis in neuron remains unclear. The signaling pathways involved in TNF- α -induced apoptosis in living differentiated PC12 cells were investigated by using confocal microscope and FRET (fluorescence resonance energy transfer) technique for the first time. Experimental results show that the TNF- α induced apoptosis in differentiated PC12 cells through "extrinsic" or death receptor-initiated pathway, and the "intrinsic" or mitochondrial pathway. NF- κ B can inhibit mitochondrial pathway apoptosis through up-regulation of Bcl-x_L by TNF- α induced. Further results show that Bim_L displaces Bcl-x_L in the mitochondria and promotes Bax translocation during TNF- α -induced apoptosis. Furthermore, SP600125 (specific inhibitor of JNK) can inhibit the Bax translocation to mitochondria. Finally, Bax is found to translocate to mitochondria in Naïve PC12 cells with co-expressing of GFP-Bim_L and YFP-Bax. The research demonstrates the important role of Bim_L, and reveals that Bim_L activate Bax indirectly during TNF- α -induced apoptosis.

Key words Alzheimer's disease (AD), TNF- α , fluorescence resonance energy transfer (FRET), Bax, Bim_L, differentiated PC12 cells

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00591

*This work was supported by grants from The Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT0829), The National Natural Science Foundation of China (30870676, 30870658), The Natural Science Foundation of Guangdong Province (7117865) and The Doctoral Research Fund of Guangzhou Medical College (295031).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-81340197, E-mail: zhanglan@gzhmc.edu.cn

Received: October 12, 2009 Accepted: January 21, 2010