

他克林和双他克林抗星形孢菌素致凋亡作用的比较*

彭芳芳 张百芳 章江洲 武栋成**

(武汉大学医学院生物化学教研室, 武汉 430071)

摘要 用星形孢菌素 (STS) 诱导 NG108-15 细胞和 HeLa 细胞凋亡, 观察他克林和双他克林是否具有抗凋亡作用. 相差显微镜和 Hoechst 33342 染色观察细胞及胞核形态; 噻唑蓝 (MTT) 测定分析细胞损伤状况; DNA 提取及琼脂糖凝胶电泳观察凋亡特征性梯带; 蛋白质印迹分析 Bcl-2 和 Bax 的表达水平. 结果表明, 经 0.1 mmol/L 他克林预处理后, 由 STS 诱导的 NG108-15 细胞凋亡受到明显抑制. 双他克林预处理无保护作用. 蛋白质印迹分析表明他克林可显著抑制 Bax 的表达, 同时还可促进 Bcl-2 的表达. 他克林和双他克林预处理对 STS 诱导的 HeLa 细胞损伤无明显的保护作用. 结论为: a. 他克林对 STS 诱导的神经细胞损伤有显著的保护作用, 但这种保护作用与其 AChE 抑制作用似乎没有明显关联. b. 他克林对 STS 损伤的保护作用有细胞选择性.

关键词 他克林, AChE 抑制剂, 细胞凋亡, 阿尔茨海默病

学科分类号 R965, R749.16

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是常见的神经退行性疾病之一. 其发病率较高, 主要表现为缓慢进行性记忆力和认知能力的下降. 目前临床上用于改善 AD 患者认知障碍的药物主要是乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 抑制剂. 最近的研究表明这些 AChE 抑制剂的药理作用相当复杂, 通常与中枢神经系统的几种神经递质受体相互作用, 部分 AChE 抑制剂对 AB 和谷氨酸诱导的神经细胞损伤也有保护作用^[1,2]. 目前对这些药物是否也能阻止诸如非特异性蛋白激酶抑制剂星形孢菌素 (staurosporine, STS) 这样的损伤因子诱导的神经细胞凋亡, 以及这些保护作用是否与它们对 AChE 的抑制有关等问题的研究, 国内外均未见报道. 本文拟就上述问题作进一步研究, 观察 AChE 抑制剂他克林 (tacrine) 是否有抗凋亡作用, 同时与另一 AChE 抑制剂双他克林 [bis (7)-tacrine] 进行比较, 探讨其作用机制, 为 AD 的治疗提供一定的依据.

1 材料和方法

1.1 材料

STS、Hoechst 33342、噻唑蓝 (MTT)、他克林、多聚赖氨酸均购自 Sigma 公司; 鼠抗人单克隆抗体 Bcl-2 (C-2, sc-7382) 和兔抗人多克隆抗体 Bax (P-19, sc-526) 均购自 Santa Cruz 生物技术公司; ECL 蛋白质印迹 Western blot 检测试剂盒购自 Amersham 公司; 胎牛血清 (FBS) 及 DMEM 购自

Gibco BRL 公司; DNA Marker (Gene Ruler™); RNase A 购自 NEC 公司; 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 细胞株培养及药物处理: NG108-15 (系小鼠神经母细胞瘤和大鼠神经胶质瘤杂交细胞株) 及人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞 (购自武汉大学细胞典藏中心) 作本次实验用细胞. 所有细胞均用含 10% FBS 的 DMEM 培养基 (含 100 mg/L 链霉素, 100 U/ml 青霉素), 在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下进行培养. 药物处理如下所述: 细胞分别用不同浓度的他克林和双他克林预处理 2 h 后加入 0.1 μmol/L STS 处理 12 h 或 24 h, 然后进行各指标检测.

1.2.2 Hoechst 33342 染色: 收集药物或 STS 处理的细胞于预冷 PBS (含 4% 多聚甲醛) 中轻微搅拌, 固定 30 min. 然后用预冷 PBS 洗三次, 加入含 2 mg/L Hoechst 33342 的 PBS 并于室温放置 5 min. 随后用 PBS 洗涤两次, 在荧光显微镜下观察细胞核形态.

1.2.3 MTT 测定: 细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔接种 100 μl 培养液 (细胞密度为 7×10^4 /ml), 接种 48 h 后, 各培养细胞中加入不同浓度的 AChE 抑制剂并保温 2 h, 然后加入 STS 至终浓度为

* 国家自然科学基金资助项目 (30170335).

** 通讯联系人.

Tel: 027-87331907, E-mail: ffpeng66@hotmail.com

收稿日期: 2001-09-29, 接受日期: 2002-03-01

0.1 $\mu\text{mol/L}$. 24 h 后, 再加入 MTT (终浓度为 0.5 g/L) 并保温 4 h, 然后每孔加入 100 μL 10% SDS (0.01 mol/L HCl 配制) 终止反应. 最后, 培养板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度环境下过夜后, 测每孔在 570 nm 和 630 nm 处的吸光度值. 每批重复 3 管, 共重复 3 批.

1.2.4 DNA 提取及电泳: 用直径为 100 mm 的培养皿培养细胞, 当细胞分别用药物或 STS 处理后, 用橡皮铲刮除细胞. $1\,000\times g$ 离心 15 min 收集细胞, 重悬细胞于 100 μL 裂解缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 含 10 mmol/L EDTA 和 0.5% Triton X-100) 中, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 min, $15\,000\times g$ 离心 30 min. 上清液中加入 2 μL RNase A (20 g/L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h 后加入 20 μL 5 mol/L NaCl 和 120 μL 异丙醇, 混合物置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜. 次日 $15\,000\times g$ 离心 20 min, DNA 沉淀重悬于 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4, 含 1 mmol/L EDTA) 液中. 1% 琼脂糖凝胶电泳 (100 V) 30 min 分离 DNA, 溴化乙锭染色, 紫外透射光下照相.

1.2.5 蛋白质印迹: 参照文献 [3] 并稍做改动. 收集细胞样本, 加入不同体积的裂解缓冲液 (25 mmol/L HEPES, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 二

硫苏糖醇 (DTT), 1 mg/L 亮肽素, 1 mg/L 抑肽酶, 2 mg/L 抗蛋白酶, 0.3 mg/L 苯沙明, pH 7.2, 1% Triton X-100), 冰浴溶解 10 min, $10\,000\times g$ 离心 15 min, 收集上清并贮存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用. 电泳前先测定各组中的蛋白质浓度. 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离各样品中的蛋白质成分, 每孔上样 10 μg , 电泳结束后将蛋白质转印到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上 (转印缓冲液为 20 mmol/L Tris, 200 mmol/L 甘氨酸, 20% 甲醇), 加入不同的抗体 (2 mg/L) 在含 5% BSA 的封闭缓冲液中温育 1 h, 再与过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 或抗兔 IgG 在含 5% 脱脂乳的封闭缓冲液中室温振荡 1 h, 然后进行免疫检测. 结果由 BIO-RAD 公司 GS-670 型全能图像分析仪进行定量分析.

1.3 统计学分析

每个实验至少重复 3 次, 每次实验至少有 3 个重复值. 统计学分析采用单因素方差分析.

2 结果

2.1 STS 诱导 NG108-15 细胞凋亡

图 1 和图 2 可见, 经 STS 处理的细胞, 其细胞损伤程度及 DNA 片段产生率对 STS 具有时间及

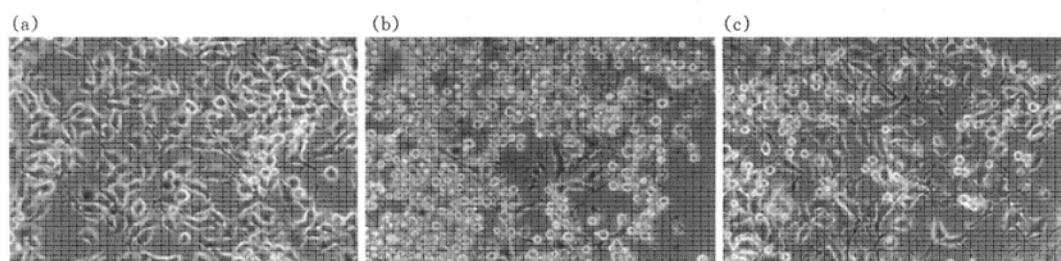
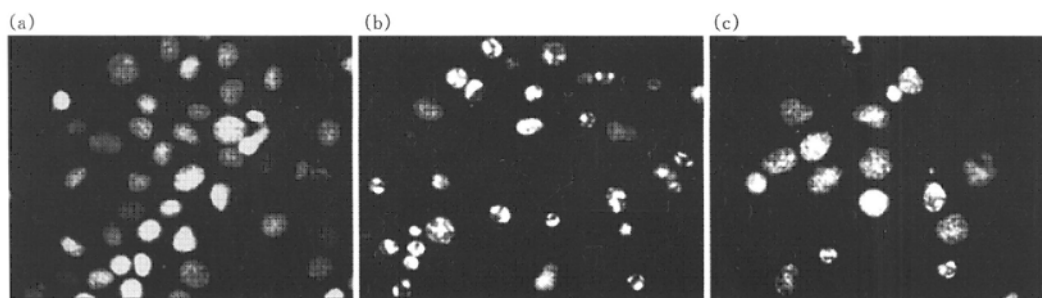


Fig. 1 Representative bright field micrographs (20 $\times$) of cultured NG108-15 cell line

(a) control; (b) 0.1 $\mu\text{mol/L}$ STS; (c) pre-treatment with 0.1 mmol/L tacrine for 2 h followed by exposure to 0.1 $\mu\text{mol/L}$ STS. Numerous cells lost neurites and became round following 12 h exposure to STS. In contrast, many cells appeared normal in cultures exposure to the same amount of STS



in the presence of tacrine.

Fig. 2 Protective effect of pre-treatment with tacrine against STS induced chromatin destruction

(a) control; (b) 0.1 $\mu\text{mol/L}$ STS; (c) pre-treatment with 0.1 mmol/L tacrine for 2 h followed by exposure to 0.1 $\mu\text{mol/L}$ STS. Nuclei were stained with Hoechst 33342. Numerous cells treated with STS showed apoptotic features (chromatin condensation and DNA fragmentation) (b). Many nuclei appeared normal in cells pretreated with tacrine (c).

剂量依赖性 (数据未出示). 采用 DNA 染料 Hoechst 33342 染色后, 经相差及荧光显微镜观察细胞形态及核形态的改变. NG108-15 细胞经 $0.1 \mu\text{mol/L}$ STS 处理 12 h 后, 可见轴突缺失, 细胞变圆 (图 1b), 细胞体积缩小及胞核皱缩, 同时伴有染色质凝聚及核碎片出现 (图 2b). 琼脂糖凝胶电泳可观察到 DNA 梯带 (图 3). 这些生物学及形态学改变均是细胞凋亡的典型特征.

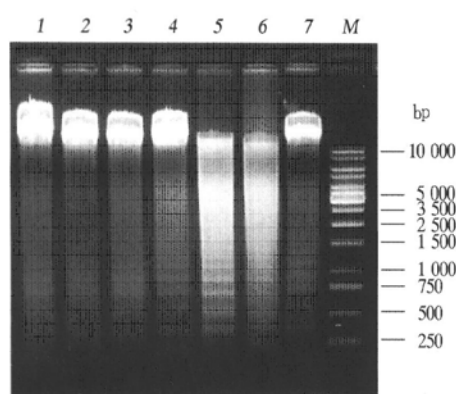


Fig 3 Protective effect of pretreatment with tacrine on STS induced DNA fragmentation

DNA fragmentation in 3×10^6 cells was assessed. 1: control; 2: STS exposure for 1 h; 3: STS exposure for 3 h; 4: STS exposure for 6 h; 5: STS exposure for 12 h; 6: STS exposure for 24 h; 7: STS exposure for 12 h after pre-treatment with 0.1 mmol/L tacrine. M: DNA size markers. Pre-treatment with tacrine markedly inhibited STS-induced DNA fragmentation.

2.2 AChE 抑制剂对神经细胞凋亡的保护作用

为确定不同的 AChE 抑制剂对细胞凋亡的保护作用是否不同, 我们首先将 NG108-15 细胞用两种 AChE 抑制剂预处理 2 h, 然后用 $0.1 \mu\text{mol/L}$ STS 处理细胞以诱导细胞凋亡. 图 4 显示 $0.1 \mu\text{mol/L}$ STS 对细胞 MTT 代谢有明显抑制作用. 0.1 mmol/L 他克林能提供近 40% 的保护作用 (图 4a), 而双他克林对 STS 诱导的细胞损伤无显著性保护作用 (图 4b).

相差显微镜观察可见正常 NG108-15 细胞呈多角形单层生长 (图 1a), 并形成不同形状的伪足. 细胞经 $0.1 \mu\text{mol/L}$ STS 处理 12 h 后, 大多数出现轴突缺失, 细胞变圆 (图 1b). 相反, 如果细胞先经他克林预处理 (图 1c), 则 STS 所致的细胞损伤程度明显减轻, 提示他克林对 STS 诱导的细胞损伤有保护作用. 而且细胞经他克林处理后, 其突起较对照组细胞突起变长 (图 1c), 表明他克林可能还促进了细胞的分化.

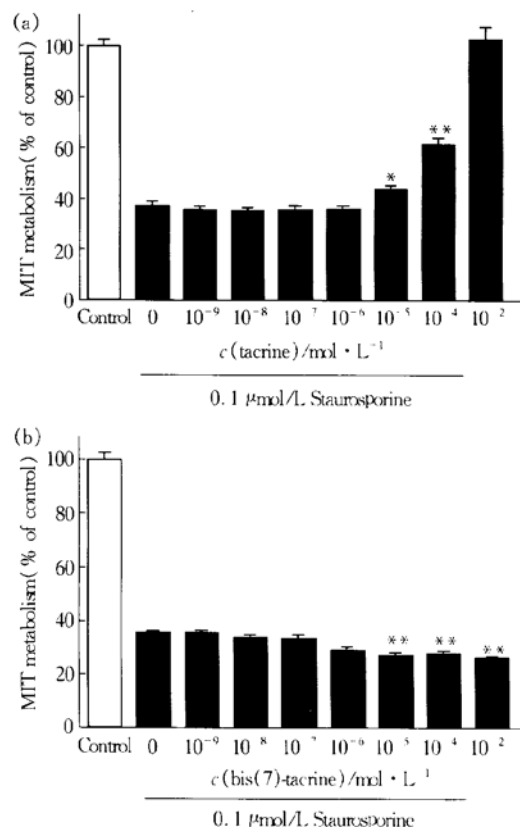


Fig 4 Protective effects of pretreatment with tacrine (a), and bis(7)-tacrine (b) on STS induced apoptosis

NG108-15 cells were pretreated for 2 h with different AChE inhibitors and then further treated with $0.1 \mu\text{mol/L}$ STS for 24 h. Cell survival was measured by MTT assay. Each value is the $\bar{x} \pm s$ of six determinations, based on the vehicle control as 100%. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus pretreatment with vehicle.

用 DNA 染料 Hoechst 33342 检测经上述不同处理后细胞核形态的变化. 由图 2a 可见, 正常 NG108-15 细胞核较大, 染色质呈均匀分散状. 而经 STS 处理的细胞, 其细胞核高度皱缩、边集, 同时伴随染色质凝聚和核碎片出现 (图 2b), 呈凋亡细胞的典型核形态学特征. 经 0.1 mmol/L 他克林 (图 2c) 预处理的细胞, 虽受 STS 损伤, 但核固缩细胞数目显著减少, 大多数细胞核形态正常.

DNA 凝胶电泳提示, STS 作用超过 12 h 会显著诱导 NG108-15 细胞 DNA 凋亡梯带的产生, 而用他克林预处理对 DNA 梯带有明显的抑制或延迟作用 (图 3).

2.3 他克林对 Bax 和 Bcl-2 表达水平的影响

图 5a 为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ STS 作用后 NG108-15 细胞 Bax 蛋白表达的时程变化图. 由图 5 可见, STS 作用 6 h 后, Bax 蛋白表达显著性增加, 12 h 达峰值并持续至 24 h. 其峰值处 Bax 蛋白表达几乎是对

照组的 20 倍。经 0.1 mmol/L 他克林预处理的细胞能显著延迟 STS 诱导的 Bax 蛋白表达水平增加。

图 5b 表明, 经 0.1 $\mu\text{mol/L}$ STS 处理的 NG108-15 细胞, 其 Bcl-2 蛋白表达水平显著增加, 并在经

STS 处理 3 h 后达到峰值, 然后逐渐下降, 但还是高于正常水平。经他克林预处理的细胞再经 STS 作用 3 h, Bcl-2 蛋白表达增加受到抑制, 但到 STS 作用 24 h 时, Bcl-2 蛋白表达显著性增加。

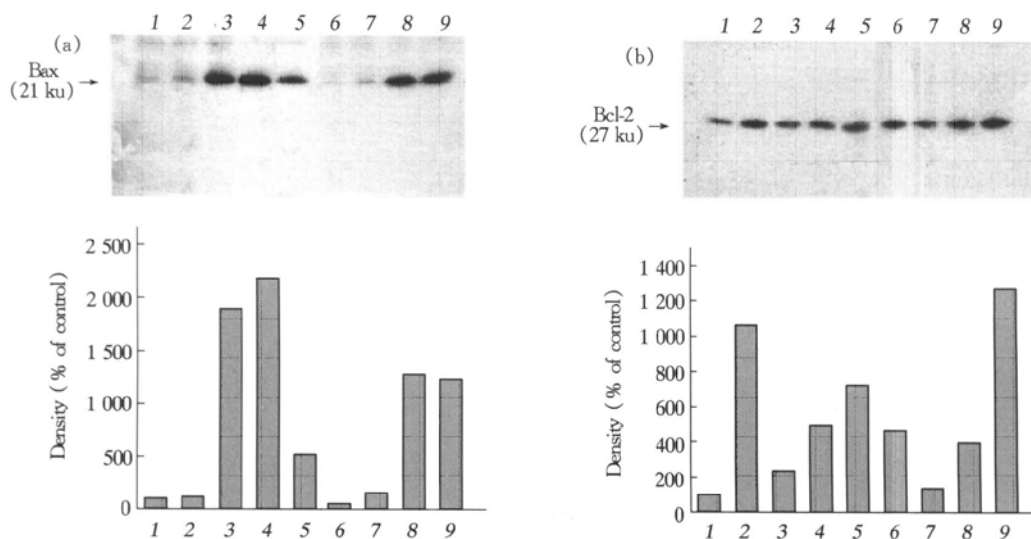


Fig 5 Changes in protein levels of proapoptotic Bax (a), anti-apoptotic Bcl-2 (b)

1: control; 2~5: exposure to 0.1 $\mu\text{mol/L}$ STS for 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, respectively; 6~9: pre-treatment with 0.1 mmol/L tacrine for 2 h followed by exposure to STS for 3 h, 6 h, 12 h, 24 h respectively. Samples (10 μg protein per lane) were subjected to immunoblotting with antibodies against Bax and Bcl-2. Protein levels of Bax and Bcl-2 were measured by densitometric analysis of the immunoblots based on the density of the band in the vehicle control as 100%.

2.4 AChE 抑制剂对非神经细胞凋亡的影响

STS 已被证实能诱导各种神经及非神经细胞株的凋亡, 为确定他克林和双他克林是否对 STS 诱导的非神经细胞凋亡具有保护作用, 我们选用

HeLa 细胞做了实验。图 6 显示 0.1 $\mu\text{mol/L}$ STS 可明显地诱导 HeLa 细胞损伤 (MTT 分析), 用他克林和双他克林预处理对该细胞损伤均无任何明显的保护作用。

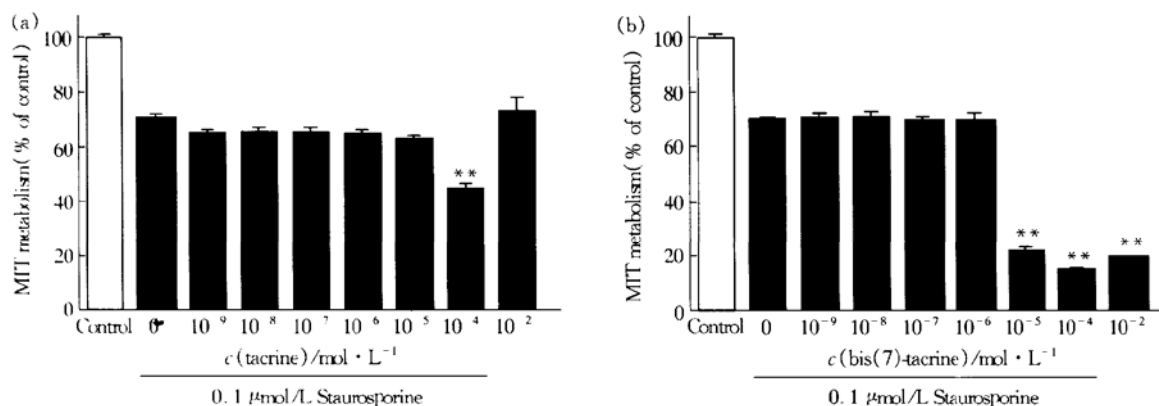


Fig 6 The effect of pretreatment with tacrine (a) and bis(7)-tacrine (b) on STS induced non-neuronal cell apoptosis

HeLa cells were pretreated for 2 h with different AChE inhibitors and then further treated with 0.1 $\mu\text{mol/L}$ STS for 24 h. Cell survival was measured by MTT assay. Each value is the $\bar{x} \pm s$ of six determinations, based on the vehicle control as 100%. Pre-treatment with two AChE inhibitors do not have significant protective effects against STS induced HeLa cell injury.

3 讨 论

AD 是神经退行性疾病, 发病年龄主要在 60 至 70 岁. 最普遍的表征为痴呆. 患者的主要病理特征为神经元间 AB 沉积并最终导致神经元死亡^[4]. 为了阐明 AD 神经元凋亡的机制, 已在体外建立了各种神经细胞凋亡模型, STS 诱导的神经元凋亡模型即是其中之一^[5]. STS 是一种非选择性蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂, 它能抑制 PKC 及酪氨酸激酶活性并导致神经及非神经细胞凋亡^[6]. 我们的实验表明, NG108-15 细胞经 STS 诱导后出现了 DNA 断裂、染色质凝集、核碎片等凋亡特征.

迄今为止, 治疗 AD 患者学习记忆障碍的有效措施主要在于提高中枢胆碱能系统的功能. 理论上已有几种乙酰胆碱 (ACh) 替代疗法, 但在临床上用于改善 AD 患者认知障碍主要是通过使用 AChE 抑制剂来提高中枢 ACh 的水平. 他克林 (tacrine) 是已通过美国食品药品监督管理局 (FDA) 认证并广泛用于 AD 临床治疗的 AChE 抑制剂. 双他克林 (bis(7)-tacrine) 是他克林的二聚体, 对 AChE 的抑制效率更高, 在体内与他克林相比较, 它具有较高的口服生物利用度及较低的外周胆碱能副作用^[7]. 我们以 NG108-15 细胞株模拟神经元研究发现, 他克林预处理对 STS 诱导的细胞损伤有显著性保护作用, 这种保护作用可能并非通过抑制 AChE 的活性来实现, 因为在相同的条件下, 对 AChE 抑制作用更强的双他克林对 STS 诱导的 NG108-15 细胞损伤并无显著性保护作用.

Bax 通常是细胞凋亡的激动剂, 许多诱导细胞凋亡的刺激均可使其水平上调从而促细胞凋亡. Bax 促神经细胞凋亡的机制尚不清楚, 但有研究表明, Bax 表达增加能降低神经元线粒体膜电位^[8]. 线粒体膜电位的破坏及胞内活性氧增加是凋亡过程的早期事件. 我们的研究表明, STS 作用细胞 3 h 后 Bax 蛋白表达显著性增加. 这一结果提示, Bax 参与了 STS 诱导的 NG108-15 细胞凋亡. 他克林能显著性延迟及减少 STS 诱导的细胞 Bax 蛋白表达水平的增加. 因此推测他克林是通过抑制或延迟 Bax 的表达来发挥神经保护作用.

原癌基因 Bcl-2 是细胞死亡的调节因子, 它能阻止培养的不含神经营养因子的神经元死亡. 在几种不同的系统中 Bcl-2 能阻止由各种不同刺激诱导的细胞凋亡和坏死性细胞死亡. 有研究证实, AD 患者脑区 Bcl-2 蛋白水平上调^[9]. 这可能是幸存神

经元对凋亡的补偿性应答, 以阻止其凋亡. 因此, Bcl-2 蛋白表达水平低的神经元可能更易凋亡. NG108-15 细胞 Bcl-2 蛋白表达水平在经 STS 诱导 3 h 后显著性增加, 然后逐渐降低. Bcl-2 蛋白表达的增加应是对 STS 损伤的补偿性应答. 他克林预处理能显著减少 STS 诱导的凋亡性细胞损伤, 虽然它没有增加 STS 诱导早期 (3~6 h) 的 Bcl-2 蛋白表达, 但增加了 STS 诱导 12~24 h 后 Bcl-2 蛋白的表达水平. 他克林的这种作用可能部分归因于它的神经保护作用. 由此可见, 促凋亡基因 (Bax) 和抗凋亡基因 (Bcl-2) 蛋白表达的平衡关系对于调控许多细胞包括神经元的生存有重要影响.

对于 HeLa 细胞株, STS 也能显著性诱导其凋亡, 但他克林和双他克林对这种细胞损伤无任何保护作用, 说明尽管他克林对神经细胞损伤的保护作用与抑制 AChE 活性无显著性相关, 但仍有细胞选择性.

综上所述, 我们的研究表明, 他克林对 STS 诱导的细胞损伤有显著性保护作用, 这种保护作用可能通过抑制或延迟 Bax 的蛋白表达及增加 12~24 h 后 Bcl-2 蛋白表达来实现, 与其对 AChE 的抑制作用无明显关联, 而且他克林对 STS 损伤的保护作用具有细胞选择性.

此外, 在实验中我们还发现, NG108-15 细胞经他克林处理后, 其突起较对照组细胞突起变长, 表明他克林可能还促进了神经细胞的分化. 上述结果提示他克林除了抑制 AChE 活性之外, 尚有许多未知的作用, 有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Ito A, Uehara T, Tokumitsu A, *et al.* Possible involvement of cytochrome c release and sequential activation of caspases in ceramide-induced apoptosis in SK-N-MC cells. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1452** (3): 263~274
- 2 Zhou J, Fu Y, Tang X C. Huperzine A and donepezil protect rat pheochromocytoma cells against oxygen/glucose deprivation. *Neurosci Lett*, 2001, **306** (1~2): 53~56
- 3 Cinham R, Harrison D C, Facci L, *et al.* Upregulation of death pathway molecules in rat cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *Neurosci Lett*, 2001, **302** (2~3): 113~116
- 4 Miranda S, Opazo C, Larrondo L F, *et al.* The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid- β peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 2000, **62** (6): 633~648
- 5 Vickers J C, Dickson T C, Adlard P A, *et al.* The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 2000, **60** (2): 139~165
- 6 Narita Y, Asai A, Kuchino Y, *et al.* Actinomycin D and staurosporine, potent apoptosis inducers *in vitro*, are potentially effective chemotherapeutic agents against glioblastoma multiforme. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2000, **45** (2): 149~156

- 7 Wang H, Carlier P R, Ho W L, *et al.* Effects of bis (7) - tacrine, a novel anti- Alzheimer's agent, on rat brain AChE. *Neuroreport*, 1999, **10** (4): 789~ 793
- 8 Vekrellis K, McCarthy M J, Watson A, *et al.* Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Development*, 1997, **124** (6): 1239~ 1249
- 9 Kitamura Y, Shimohama S, Kamoshima W, *et al.* Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1998, **780** (2): 260~ 269

Protective Effects of Tacrine and *Bis*(7)-Tacrine on Staurosporine-induced Apoptosis^{*}

PENG Fang-Fang, ZHANG Bai-Fang, ZHANG Jiang-Zhou, WU Dong-Cheng^{**}

(Department of Biochemistry, School of Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract In order to study whether tacrine and *bis*(7)-tacrine can prevent cell apoptosis induced by staurosporine in NG108-15 and HeLa cell lines. Phase-contrast and fluorescence microscopes were used to examine cell morphological changes. MTT assay was used to examine if staurosporine impairs cell metabolism. DNA was isolated and electrophoretically separated on 1% agarose gel to observe if there were DNA fragments. Western blot was made to analyse protein levels of anti-apoptotic Bcl-2 and proapoptotic Bax. The results showed that NG108-15 cells treated with 0.1 mol/L staurosporine for 12~ 24 h exhibited marked cell death and DNA fragmentation. Pre-treatment with 0.1 μmol/L tacrine provided approximately 40% protective effect and resulted in obvious inhibition or delay DNA fragmentation. Moreover, NG108-15 cells treated with tacrine became elongated and polarized, and showed longer processes than control cells. Pretreatment with 0.1 mmol/L tacrine significantly increased the expression of Bcl-2 protein level and delayed the staurosporine-induced increase of Bax protein expression. However, *bis*(7)-tacrine did not show any protective effect on the cell impairment induced by staurosporine in NG108-15 cells. In HeLa cells 0.1 μmol/L staurosporine also induced significant cell injury, but pretreatment with tacrine and *bis*(7)-tacrine did not provide any obvious protective effect against this cell damage. These data suggest that tacrine markedly protect against apoptosis of NG108-15 cells but *bis*(7)-tacrine did not. Both tacrine and *bis*(7)-tacrine were not show to inhibit apoptosis of HeLa cells. It appears that the protective effects of tacrine against apoptosis not be mediated through AChE inhibition and has cell selective specificity.

Key words tacrine, AChE inhibitors, apoptosis, Alzheimer's disease

^{*} This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30170335).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-27-87331907, E-mail: ffpeng66@hotmail.com

Received: September 29, 2001 Accepted: March 1, 2002