

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001410

姜黄素改善 N2a/APP695swe 细胞线粒体功能和抑制细胞凋亡的作用

梁洁¹, 康清梅¹, 张雄², 周凡琳¹, 高敏娜¹, 李昱¹

(重庆医科大学 1.基础医学院病理学教研室; 2.神经科学研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察姜黄素(curcumin)对 N2a/APP695swe 细胞线粒体形态和功能及细胞凋亡的影响;探讨其可能的神经保护机制。**方法:**实验细胞分为 4 个组:N2a/APP695 组(WT)、N2a/APP695swe 组(APP)、溶剂对照组(DMSO, 5 μ mol/L)、姜黄素组(Curcumin, 5 μ mol/L)。流式细胞术分别检测细胞凋亡、活性氧水平和膜电位水平、免疫细胞化学检测细胞色素 C 的表达、电镜观察细胞线粒体形态的改变, Western blot 检测 Caspase3、Caspase9 蛋白表达, 分光光度检测 Caspase3、Caspase9 酶活性。**结果:**流式细胞术结果显示, Curcumin 组细胞的凋亡率、活性氧水平较 APP 组明显降低[(0.05 $\pm$ 0.01) vs. (0.18 $\pm$ 0.01), $P=0.000$; (49.67 $\pm$ 4.16) vs. (197.67 $\pm$ 8.08), $P=0.000$];而 Curcumin 组线粒体膜电位较 APP 组升高[(1.00 $\pm$ 0.03) vs. (0.64 $\pm$ 0.03), $P=0.000$]。电镜结果发现姜黄素可以减轻线粒体的肿胀, 改善其形态。同时免疫细胞化学结果显示姜黄素减少了细胞色素 C 的释放。Western blot 检测发现, 与 APP 组相比, Curcumin 组 Caspase3、Caspase9 蛋白的表达均降低[(0.62 $\pm$ 0.12) vs. (1.39 $\pm$ 0.10), $P=0.000$; (0.64 $\pm$ 0.20) vs. (1.78 $\pm$ 0.03), $P=0.000$];并且 Curcumin 组较 APP 组的 Caspase3 与 Caspase9 的活性明显降低[(0.66 $\pm$ 0.04) vs. (2.12 $\pm$ 0.06), $P=0.000$; (0.58 $\pm$ 0.04) vs. (0.93 $\pm$ 0.03), $P=0.000$]。**结论:**姜黄素能抑制 N2a/APP695swe 细胞的凋亡, 其机制可能与改善线粒体功能有关。

【关键词】姜黄素; 线粒体; 阿尔茨海默病; 凋亡**【中国分类号】**R741.02**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-05-18

Curcumin improved mitochondrial function of N2a/APP695swe cells and inhibited apoptosis

Liang Jie¹, Kang Qingmei¹, Zhang Xiong², Zhou Fanlin¹, Gao Minna¹, Li Yu¹

(1. Teaching and Research Section of Pathology, College of Basic Medicine;

2. Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the effects of curcumin on the mitochondrial morphology and functions, and on the apoptosis in N2a/APP695swe cells, and to explore the underlying mechanisms. **Methods:** The experimental cells were divided into four groups: N2a/APP695 group (WT), N2a/APP695swe group (APP), dissolvent control group (DMSO, 5 μ mol/L) and Curcumin group (5 μ mol/L). Flow cytometry (FCM) method was used to investigate apoptosis, the level of cytosolic ROS and the change of mitochondrial membrane potential. Immunocytochemistry technique was performed to analyze changes of cytochrome C in experimental cells. The morphology of mitochondria was observed by electron microscope. Western blot was carried out to detect the expression of caspase3 and caspase9 protein. And the activities of caspase3 and caspase9 were assessed by spectrophotometry. **Results:** Apoptosis and cytosolic ROS were significantly lower in the curcumin group than in the APP group (0.05 $\pm$ 0.01 vs. 0.18 $\pm$ 0.01, $P=0.000$; 49.67 $\pm$ 4.16 vs. 197.67 $\pm$ 8.08, $P=0.000$), and the mitochondrial membrane potential was higher in the curcumin group than in the APP group (1.00 $\pm$ 0.03 vs. 0.64 $\pm$ 0.03, $P=0.000$). The electron microscopy found that curcumin could reduce the swelling of the mitochondria and improve its shape. Furthermore, curcumin could reduce the release of cytochrome C and the expression of caspase3 and caspase9 protein in the curcumin group than in the APP group (0.62 $\pm$ 0.12 vs. 1.39 $\pm$ 0.10, $P=0.000$; 0.64 $\pm$ 0.20 vs. 1.78 $\pm$ 0.03, $P=0.000$). Similarly, the activity of caspase3 and caspase9 was significantly lower in the curcumin group than in the APP group (0.66 $\pm$ 0.04 vs. 2.12 $\pm$ 0.06,

 $P=0.000$; 0.58 $\pm$ 0.04 vs. 0.93 $\pm$ 0.03, $P=0.000$). **Conclusions:** Curcumin could reduce the apoptosis of the N2a/APP695swe cell, and its mechanism may be associated with improved mitochondrial function.**【Key words】**curcumin; mitochondrial; Alzheimer's disease; apoptosis

作者介绍: 梁洁, Email: joan417@foxmail.com,

研究方向: 神经退行性疾病。

通信作者: 李昱, Email: liyu100@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81671261)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171128.1649.004.html>

(2017-11-28)

线粒体功能障碍包括线粒体膜电位降低、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水平降低,以及氧化应激水平增加,这些损伤可以增加细胞的凋亡率。线粒体作为细胞的能量工厂,因神经元是永久性细胞,胞体大而轴突及树突分支细长,比起其他类型的细胞更易受到损伤。研究表明在神经退行性疾病中存在明显的线粒体功能障碍,且在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)等神经退行性疾病早期阶段就发现有线粒体功能障碍^[1]。现在认可的 AD 核心病理机制是异常 tau 蛋白形成的神经纤维缠结和 A β 沉积形成的老年斑。在家族性 AD 中,突变 APP 基因和早老素 PS1 基因使 γ 分泌酶异常剪切生成过多的 A β ^[2-3],而诱导线粒体功能障碍^[4],包括线粒体电子传递链、氧化应激等损伤,最终引起神经元功能障碍并诱导细胞凋亡^[5-6]。因此改善线粒体功能障碍的药物被认为是预防大脑衰老和神经退行性疾病的有效策略。有研究表明 APP 的 swedish 突变^[7](APP695swe)可以引起家族阿尔兹海默症,同样也在线粒体功能障碍,但完整全面的发生机制还需深入研究。

姜黄素(curcumin)是从姜科植物根茎中提取的一种二酮类化合物,最早用于临床是印度式草药疗法,经长期研究发现其具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化等多靶点作用^[8-9],并且毒副作用低,因此有广阔的临床应用前景。本课题组在对 AD 动物模型研究中,发现姜黄素有明显的抗 A β 沉积等神经保护作用^[10-11],但姜黄素对 AD 中线粒体功能的影响还有待进一步探讨。本实验拟纳入 N2a/APP695 及 N2a/APP695swe 细胞作为 AD 体外模型^[12-13],观察姜黄素对 N2a/APP695swe 细胞的线粒体功能的影响,进一步探讨其发挥作用的机制,为 AD 的研究和防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

小鼠成神经瘤(Neuro-2a, N2a)细胞稳定表达 APP695 基因(N2a/APP695)和 APP695 基因的 Swedish 家族突变的 N2a(N2a/APP695swe)细胞^[12-13]由厦门大学许华曦教授提供。Curcumin(C1386, lot#SLBN7214V, assay:65%HPLC)购自 Sigma 公司;OPTI-MEM(1811990)、DMEM(8116209)培养基均购自 Gibco 公司;胎牛血清(FBS, FSP500)购自 Excell 公司;G418(E859)购自 Amresco 公司;线粒体膜电位(JC-1, C-2000-

1)、活性氧(S0033-1)、Caspase3(C1115)、Caspase9(C1157)、bradford 蛋白浓度测定(P0006)等检测试剂盒和青霉素-链霉素溶液(100 $\times$, C0222)均购自碧云天生物技术有限公司;Western blot 试剂盒(P0012A)、即用型正常山羊血清(11A22C09)购自博士德生物公司;鼠单抗 β -actin(ICM001-100)、兔多抗 Caspase3(bs-1518)和 Caspase9(bs-1388)、细胞色素 C(PB0291)等抗体分别购自北京四正柏生物科技公司、bioworld 公司、博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将冻存的 1×10^6 个细胞(N2a/APP695 和 N2a/APP695swe)水浴 37 $^{\circ}\text{C}$ 复苏至 25 cm^2 培养瓶中,细胞汇合率约 40%,用每 100 mL 含 47 mL DMEM、47 mL OPTI-MEM、5 mL FBS、1 mL 青链霉素双抗组成的混合培养液(N2a/APP695 细胞培养液)和 47 mL DMEM、47 mL OPTI-MEM、5 mL FBS、1 mL 青链霉素双抗、20 mg G418^[12-13]组成的混合培养液(N2a/APP695swe 细胞培养液),置于细胞培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2)中培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 AnnexinV-FITC/PI 法检测细胞凋亡 取对数生长期的 WT 和 N2a/APP695swe 细胞传代(1 传 2)后种于 25 cm^2 培养瓶培养,24 h 后细胞汇合率约 60%,将分别各取 1 瓶 N2a/APP695swe 分别予以 curcumin(5 $\mu\text{mol/L}$)和 DMSO(5 $\mu\text{mol/L}$)处理 24 h^[14-15],细胞汇合率 80%~90%;0.5%胰蛋白酶消化细胞,分别收集 4 组细胞(WT 组、APP 组、DMSO 组、Curcumin 处理组),1 000 r/min 离心 5 min。离心完毕,去上清,1 mL PBS 溶液重悬细胞,送流式细胞工作室继续 Annexin V-FITC/PI 法染色,具体步骤按重庆医科大学生命科学院流式细胞工作室进行。独立重复试验 3 次。

1.2.3 DCFH-DA 法检测细胞活性氧 取对数生长期的 WT 和 N2a/APP695swe 细胞传代(1 传 2)后种于 25 cm^2 培养瓶培养,24 h 后细胞汇合率约 60%,将分别各取 1 瓶 N2a/APP695swe 分别予以 curcumin(5 $\mu\text{mol/L}$)和 DMSO(5 $\mu\text{mol/L}$)处理 24 h,细胞汇合率 80%~90%;消化收集 4 组细胞(WT 组、APP 组、DMSO 组、Curcumin 处理组),于 1 000 r/min 离心 5 min。重悬后,装载 DCFH-DA 探针(10 $\mu\text{mol/L}$),避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5 h,每 5 min 震荡 1 次,孵育结束后 PBS 洗涤 3 次,送流式细胞工作室检测。荧光水平反映细胞内活性氧含量。独立重复实验 3 次。

1.2.4 JC-1 法检测线粒体膜电位 采用流式细胞术,取对数生长期的 WT 和 N2a/APP695swe 细胞传代(1 传 2)后种于 25 cm^2 培养瓶培养,24 h 后细胞汇合率约 60%,将分别各取 1 瓶 N2a/APP695swe 分别予以 curcumin(5 $\mu\text{mol/L}$)和 DMSO(5 $\mu\text{mol/L}$)处理 24 h,细胞汇合率 80%~90%;0.5%胰蛋白酶消化细胞,分别收集 4 组细胞(WT 组、APP 组、DMSO 组、Curcumin 处理组),1 000 r/min 离心 5 min。离心完毕,去上清,1 mL PBS 溶液重悬细胞,按照试剂盒操作步骤做 JC-1 染色,送流式细胞工作室检测。在线粒体膜电位较高时,JC-1 聚集在线粒体的基质(matrix)中,形成聚合物(J-aggregates),可以

产生红色荧光(593/561);在线粒体膜电位较低时,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-1 为单体(monomer),可以产生绿色荧光(530/488)。绿色荧光强度和红色荧光强度的比率大小可以反映线粒体膜电位的强弱。独立重复试验 3 次。

1.2.5 Caspase3 和 Caspase9 的活性检测 取对数生长期的 WT 和 N2a/APP695swe 细胞传代(1 传 2)后种于 25 cm² 培养瓶培养,24 h 后细胞汇合率约 60%,将分别各取 1 瓶 N2a/APP695swe 分别予以 curcumin(5 μmol/L)和 DMSO(5 μmol/L)处理 24 h,细胞汇合率 80%~90%;0.5%胰蛋白酶消化细胞,分别收集 4 组细胞(WT 组、APP 组、DMSO 组、Curcumin 处理组),1 000 r/min 离心 5 min。去上清,加入裂解液冰上裂解 30 min,20 000 g 离心后,按照试剂盒说明测定 Caspase3 和 Caspase9 活性。独立重复试验 3 次。

1.2.6 电镜 取对数生长期的 WT 和 N2a/APP695swe 细胞传代(1 传 2)后种于 25 cm² 培养瓶培养,24 h 后细胞汇合率约 60%,将分别各取 1 瓶 N2a/APP695swe 分别予以 curcumin(5 μmol/L)和 DMSO(5 μmol/L)处理 24 h;24 h 后贴壁细胞融合率达 80%左右,常规胰蛋白酶消化细胞,将细胞转入离心管中,收集 4 组细胞(WT 组、N2a/APP695swe 组、溶剂对照组、Curcumin 处理组),于 1 000 r/min 离心 5 min。离心完毕,倒掉上清液,拍散细胞,加入 1 mL PBS 重悬细胞,吹打混匀,1 200 r/min 离心 5 min,反复 3 次。最后一次离心完毕,弃清液,缓慢加入电镜专用戊二醛 1 mL,于 4 ℃冰箱中固定 30 min 然后送电镜室常规电镜样本固定、脱水、包埋,超薄切片后在透射电镜下观察细胞自噬体并拍照。独立重复实验 3 次。

1.2.7 免疫细胞化学 取对数生长期的 WT 和 N2a/APP695swe 细胞进行传代种板(24 孔板)培养,5×10⁴ 个细胞接种于 24 孔板的每个细胞爬片上。培养 24 h,随机选取 6 个孔的 N2a/APP695swe 细胞予以 5 μmol/L 的 curcumin 处理 24 h,再选取 6 个孔 N2a/APP695swe 细胞予以 5 μmol/L 的 DMSO 处理 24 h。然后收集细胞爬片(WT 组、N2a/APP695swe 组、溶剂对照组、Curcumin 处理组)PBS (0.01 mol/L)清洗 3 次×3 min,4%多聚甲醛固定 20 min,PBS 漂洗 3 次×5 min,取出爬片固定于载玻片上晾干。然后按本实验室细胞免疫组化方法检测。

1.2.8 Western blot 取对数生长期的 WT 和 N2a/APP695swe 细胞传代(1 传 2)后种于 25 cm² 培养瓶培养,24 h 后细胞汇合率约 60%,将分别各取 1 瓶 N2a/APP695swe 分别予以 curcumin(5 μmol/L)和 DMSO(5 μmol/L)处理 24 h,用全蛋白提取试剂盒分别提取各组 1 瓶(WT 组、APP 组、DMSO 组、curcumin 处理组)细胞蛋白。BCA 法测定细胞浓度后,蛋白免疫印迹实验(Western blot)分别测定 Caspase3、Caspase9 的蛋白表达水平。选用 Image J 软件分析各组上述蛋白及内参(β-actin)的灰度值,相应蛋白表达水平用其与 β-actin 的比值表示。独立重复实验 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 进行统计学分析,所有数据均以均数 ±

标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 姜黄素降低细胞凋亡和活性氧水平

姜黄素可以降低细胞凋亡和活性氧水平(表 1,图 1)。如表 1 总凋亡率和图 1 A、B 所示,与 N2a/APP695swe 组(APP 组)相比,Curcumin 组和 WT 组的总凋亡率明显较低,差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$),DMSO 组差异无统计学意义($P=0.282$)。流式细胞术检测细胞内活性氧结果显示,如表 1 活性氧和图 1 C、D,与 APP 组相比,Curcumin 组明显降低且活性氧水平并接近 WT 活性氧水平,差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$),而 DMSO 组的细胞内活性氧水平相当($P=0.702$)。

表 1 各组总凋亡率和活性氧水平($n=3$)

Tab.1 Level of apoptosis and reactive oxygen species in each group ($n=3$)

组别	总凋亡率	活性氧
WT组	0.07 ± 0.00 ^a	49.00 ± 8.89 ^a
APP组	0.18 ± 0.01	197.67 ± 8.08
DMSO组	0.17 ± 0.00 ^b	195.33 ± 6.81 ^b
Curcumin组	0.05 ± 0.01 ^a	49.67 ± 4.16 ^a
<i>F</i> 值	424.490	416.560
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注:a,与 APP 组比较, $P<0.01$;b:与 APP 组比较, $P>0.05$

2.2 姜黄素改善 N2a/APP695swe 细胞中线粒体的形态

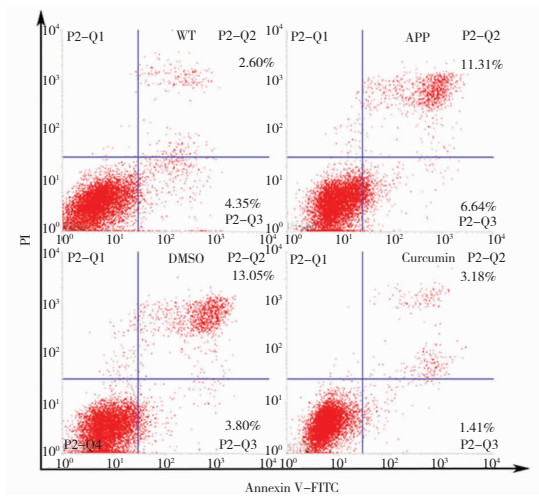
Curcumin 可以改善细胞内线粒体的肿胀。如图 2 所示,红色箭头所指是线粒体样结构,红色矩形框内结构放大为对应之下的结构。与 APP 组相比,Curcumin 组与 WT 组的线粒体结构清晰,可见线粒体脊样结构,无肿胀、固缩,形态正常,无线粒体空泡化结构,而 DMSO 组则表现出与 APP 相同的表现,白色箭头所示线粒体固缩,脊样结构错乱并消失,肿胀明显,并出现空泡样结构。

2.3 姜黄素升高线粒体膜电位、减少细胞色素 C 的释放

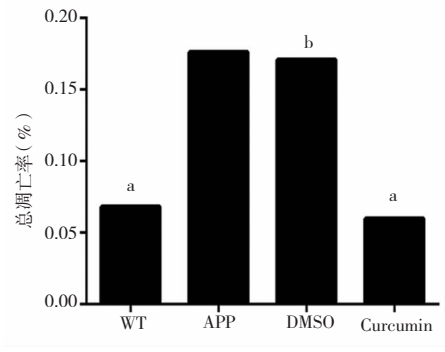
姜黄素可以降低细胞线粒体膜电位(表 2,图 3),并减少细胞色素 C 的释放(图 3)。如表 2 和图 3 A、B 所示,采用 JC-1 法流式细胞术检测线粒体膜电位,阳离子脂质荧光染料 JC-1 是检测线粒体跨膜电位指示剂。JC-1 有单体和多聚体 2 种存在状态,单体在流式细胞仪绿色(FL-1)通道检测出绿色荧光;多聚体发红色荧光,在流式细胞仪的红色(FL-2)通道检测到。线粒体膜电位降低,线粒体跨膜电位被去极化,JC-1 从线粒体内释放,红光强度减弱,以单体的形式存在于胞质内发绿色荧光。根据这一特征检测线粒体膜电位的变化。与 APP 组相比,Curcumin 组的红绿荧光比率明显升高,WT 组也增高,即线粒体膜电位升高,差异均有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$),DMSO 组差异无统计学意义($P=0.257$)。如图 3C 所

示,细胞爬片免疫组化结果显示,细胞核染色为苏木素染色呈蓝紫色,细胞色素 C 表达较多为阳性结果,呈着色较深的棕黄色颗粒,主要分布在细胞质,细胞色素 C 表达较少或不

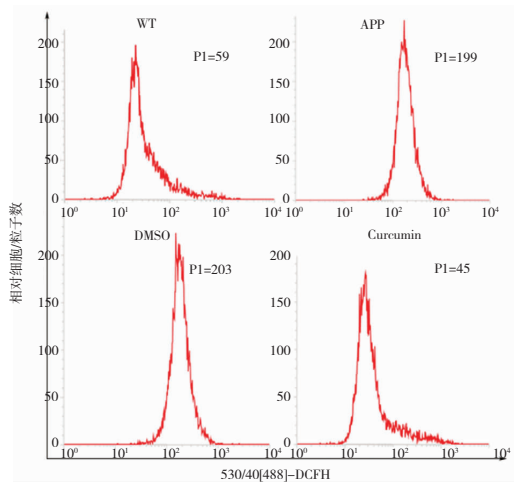
表达为阴性结果,棕黄色颗粒不明显,着色较浅。以 APP 组为对照,WT 组与 Curcumin 组均为阴性结果,而 APP 组与 DMSO 组为阳性结果,且细胞色素 C 阳性表达于胞质中。



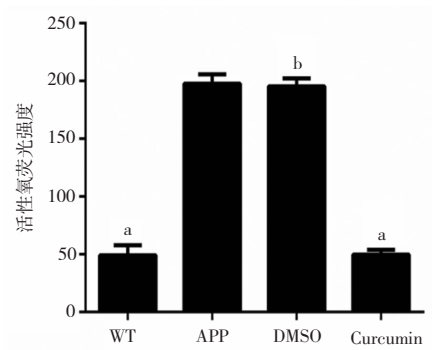
A. 各组细胞凋亡率比较



B. 各组细胞总凋亡率统计图



C. 各组细胞活性氧荧光强度比较



D. 各组细胞活性氧荧光强度统计图

a: 与 APP 组相比, $P < 0.01$; b: 与 APP 组相比, $P > 0.05$

图 1 姜黄素对细胞凋亡和活性氧水平的影响

Fig.1 Apoptosis and reactive reactive oxygen species in different groups were confirmed by FCM

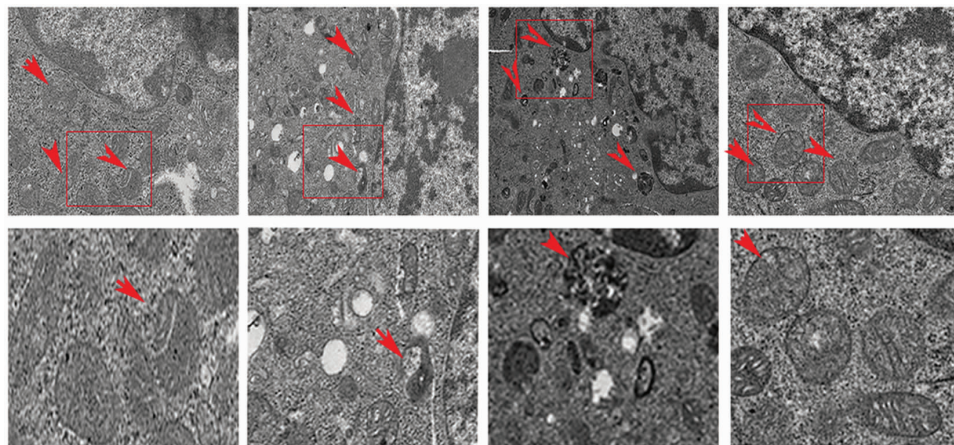


图 2 透射电镜观察不同处理组的线粒体的形态

Fig.2 The morphology of mitochondrias in different groups were observed by transmission electron microscope

表 2 各组线粒体膜电位水平($n=3$)

Tab.2 Mitochondrial membrane potential in each group($n=3$)

组别	红绿比
WT组	1.01 ± 0.08^a
APP组	0.64 ± 0.03
DMSO组	0.69 ± 0.07^b
Curcumin组	1.00 ± 0.03^a
F 值	35.570
P 值	0.000

注:a,与 APP 组比较, $P<0.01$;b:与 APP 组比较, $P>0.05$

2.4 姜黄素降低 N2a/APP695swe 细胞中 Caspase3、Caspase9 蛋白的表达,同时降低 Caspase3、Caspase9 的活性

姜黄素降低 APP 组细胞中的 Caspase3 和 Caspase9 的蛋白表达,并降低 Caspase3 和 Caspase9 酶的活性(表 3,图 4)。如表 3 和图 4A、B 所示,APP 组细胞中 Caspase3、Caspase9 蛋白均大量表达;与 APP 组相比,DMSO 组细胞中 Caspase3、Caspase9 蛋白的表达量差异不明显($P=0.060$, $P=0.991$);Curcumin 组较 APP 组细胞中 Caspase3、Caspase9 蛋白的表达量均明显降低,差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$);WT 组与 APP 组相比,细胞中 Caspase3 和 Caspase9 的表达量明显

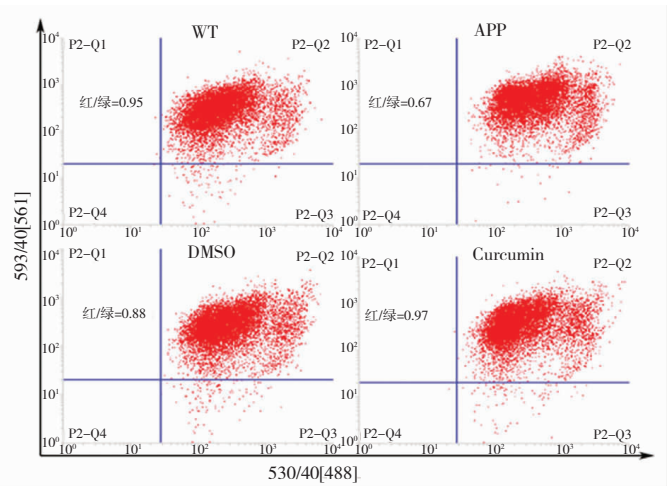
降低,差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$)。且如表 3 和图 3C 所示,APP 组和 DMSO 组细胞中 Caspase3、Caspase9 的活性检测均明显升高;与 APP 组相比,DMSO 组 Caspase3、Caspase9 的活性无明显差异,无统计学意义($P=0.179$, $P=0.968$),Curcumin 组的 Caspase3、Caspase9 的活性差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$),WT 组的 Caspase3、Caspase9 活性差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$)。

表 3 各组 Caspase3 和 Caspase9 蛋白和酶活性表达水平($n=3$)

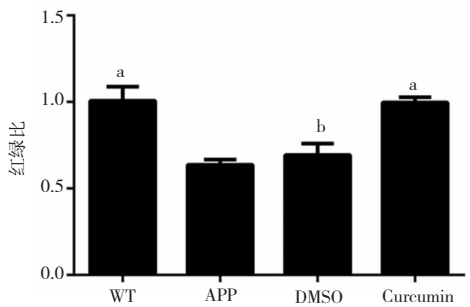
Tab.3 Expressions and activity of Caspase3 and Caspase9 in each group($n=3$)

组别	Caspase3 蛋白	Caspase9 蛋白	Caspase3 酶活性	Caspase9 酶活性
WT组	0.54 ± 0.13^a	0.85 ± 0.08^a	0.54 ± 0.04^a	0.48 ± 0.08^a
APP组	1.39 ± 0.10	1.78 ± 0.03	2.12 ± 0.06	0.93 ± 0.03
DMSO组	1.58 ± 0.07^b	1.78 ± 0.04^b	2.06 ± 0.05^b	0.93 ± 0.01^b
Curcumin组	0.62 ± 0.12^a	0.64 ± 0.20^a	0.66 ± 0.42^a	0.58 ± 0.04^a
F 值	76.330	87.320	948.360	69.240
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

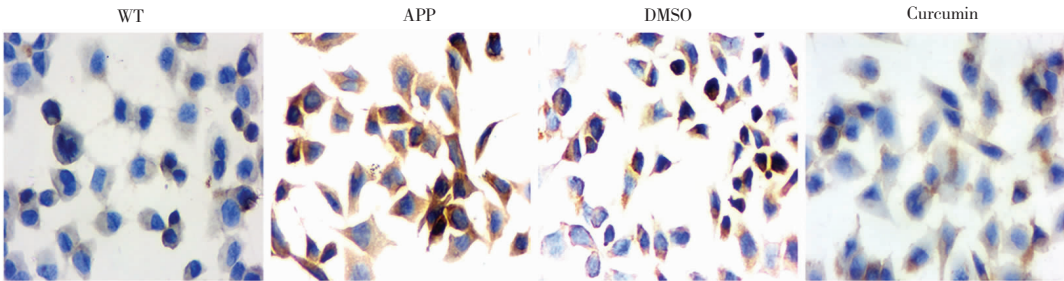
注:a,与 APP 组比较, $P<0.01$;b:与 APP 组比较, $P>0.05$



A. 各组细胞线粒体膜电位荧光强度分布图



B. 各组细胞线粒体膜电位荧光强度比值



a:与 APP 组相比, $P<0.01$;b:与 APP 组相比, $P>0.05$

C. 各组细胞中细胞色素 C 的表达水平

图 3 线粒体膜电位、细胞色素 C 在不同处理组的表达水平

Fig.3 Flow cytometry was used to detect the mitochondrial membrane potential changes and immunohistochemical staining was assayed the expression of cytochrome C

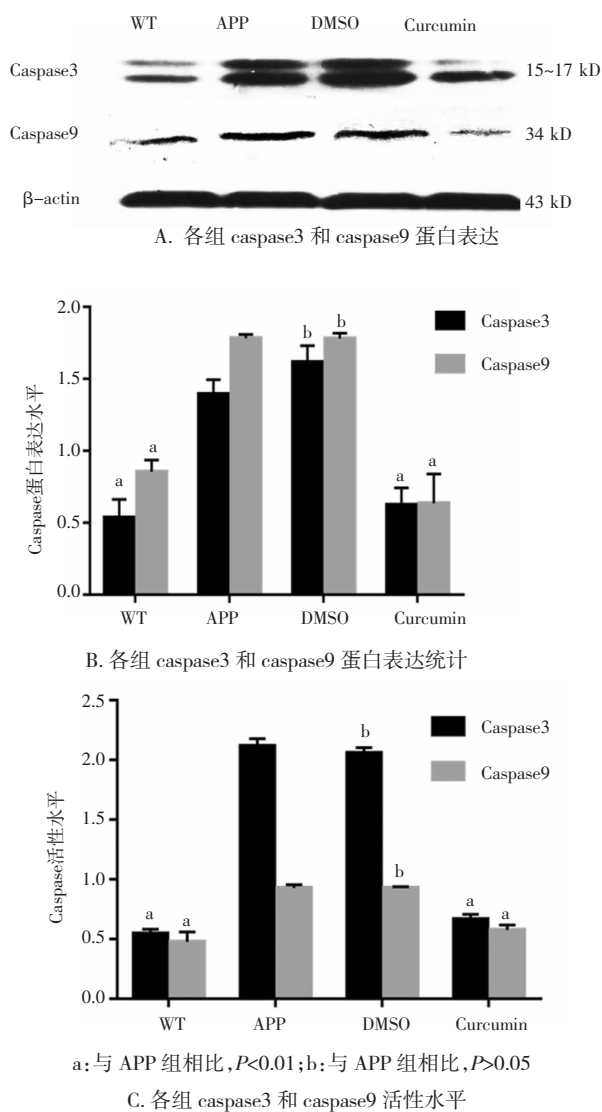


图 4 Caspase3、Caspase9 在不同处理组的表达水平及活性水平
Fig.3 Expressions and activity of Caspase3, Caspase9 at the level of protein in different groups

3 讨论

AD是常见的神经退行性疾病,以认知功能障碍为主要临床表现,其病理特征为神经纤维缠结和老年斑,并伴有轴突骨架蛋白和各个分子马达蛋白的异常^[16-17]。在AD的发病机制学说中“ $A\beta$ 级联假说”与“tau蛋白学说”得到学术界广泛认可,大量研究表明 $A\beta$ 的毒性作用可以诱导线粒体功能障碍,因此线粒体功能障碍与AD的病理过程密切相关^[18-19]。有证据表明,在AD中,线粒体功能障碍涉及的线粒体呼吸链的改变与活性氧增多,会产生氧化应激导致细胞凋亡^[5-6]。在AD的研究中,本课题组前

期研究发现 $A\beta$ 的产生可以被姜黄素所抑制,同时AD模型细胞的凋亡也可被姜黄素所抑制^[11]。但姜黄素是否能改善线粒体功能对细胞凋亡产生影响,还需进一步研究。并且姜黄素对N2a/APP695swe细胞模型的类似研究,尚未见报道。在本次研究中采用N2a/APP695swe作为AD的模型细胞,流式细胞术分析结果显示姜黄素可以抑制AD的模型细胞凋亡,并能降低活性氧水平,与本实验室前期结果一致^[11],且与Fan CD等^[22]研究发现的姜黄素可以抑制 $A\beta$ 诱导的PC12细胞凋亡的结果也相同,再次验证了姜黄素的神经保护作用。但与Fan CD等研究有所不同的是,本实验研究对象是稳定表达APP695swe基因的N2a细胞,能更好地模拟AD的体外状态,实验结果更具说服力。透射电镜观察发现,姜黄素处理组中线粒体的形态明显改善。因此,姜黄素可能通过改善N2a/APP695swe细胞中线粒体的功能,抑制细胞凋亡。

但姜黄素是否真的能逆转AD细胞中线粒体的病理损伤,从而改善细胞凋亡还需进一步实验证明。线粒体膜电位在线粒体功能障碍时会陡然降低,也是细胞早期凋亡的表现。本研究采用经典的JC-1方法检测线粒体膜电位,以观察线粒体功能的改变。结果发现姜黄素可以升高线粒体膜电位,从而改善线粒体功能。有学者研究发现在AD中,线粒体呼吸链中丙酮酸脱氢酶复合体、酮戊二酸脱氢酶复合体和细胞色素氧化酶^[20]均有改变,但是最核心的还是细胞色素氧化酶,因此细胞色素C作为细胞色素氧化酶的电子传递体,在线粒体功能障碍的初步研究中显得尤为重要,再者线粒体细胞色素C的释放增强与细胞凋亡密切相关。免疫组化分析发现,AD细胞中细胞色素C的表达明显增强,说明线粒体功能障碍是有线粒体呼吸链损伤发生的。而姜黄素组细胞色素C的表达减少,因此目前结果提示姜黄素确实可以减轻线粒体呼吸链的损伤,但对减轻细胞凋亡的机制还需更进一步的研究。

线粒体膜电位降低,细胞色素C的释放增强,这一系列线粒体损伤反应可进一步激活Caspase级联反应,最终导致细胞凋亡^[21]。Wang等^[23]在研究中,发现姜黄素可以降低脑缺血引起的神经元损伤,改善线粒体功能,抑制Caspase级联反应,Caspase是凋亡的核心部分,线粒体释放的细胞色素C能与Caspase9等凋亡因子形成凋亡体,然后Caspase9先

自我活化后^[24]再激活 Caspase3,促进细胞凋亡。Cihangir 等研究发现姜黄素对氧化应激、细胞内Ca²⁺水平的调节作用,以及抑制在 SHSY-5Y 细胞实验氧化应激模型中的 Caspase3 和 Caspase9 的活性。在本实验中,实验结果显示姜黄素可以降低 Caspase3 和 Caspase9 的蛋白表达水平,同时检测的 Caspase3 和 Caspase9 的活性水平也是类似的趋势,说明姜黄素可以抑制 AD 细胞模型线粒体损伤诱导的细胞的凋亡。

综上所述,姜黄素可以升高 AD 模型细胞 N2a/APP695swe 线粒体的膜电位,减少线粒体细胞色素 C 的释放从而改善线粒体功能,减少细胞活性氧的生成,同时降低 Caspase3 与 Caspase9 的表达与活性,减轻细胞凋亡,从而发挥神经保护作用。这对深入探讨姜黄素在 AD 中发挥保护作用的机制具有重要意义。进一步探讨可以对姜黄素在 AD 中改善线粒体功能发挥神经保护作用的分子机制有更加深入的了解。

参 考 文 献

- [1] Boveris A, Navarro A. Brain mitochondrial dysfunction in aging[J]. IUBMB Life, 2008, 60(5): 308–314.
- [2] Duff K, Eckman C, Zehr C, et al. Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1[J]. Nature, 1996, 383(6602): 710–713.
- [3] Shuaib S, Goyal B. Scrutiny of the mechanism of small molecule inhibitor preventing conformational transition of amyloid- β 42 monomer: insights from molecular dynamics simulations[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2017; 1–16.
- [4] Reddy PH, Beal MF. Amyloid β , mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease[J]. Trends in Molecular Medicine, 2008, 14(2): 45–53.
- [5] Hauptmann S, Keil U, Scherpin G I, et al. Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease[J]. Exp Gerontol, 2006, 41(7): 668–673.
- [6] Swerdlow RH, Koppel S, Weidling I, et al. Mitochondria, cybrids, aging, and Alzheimer's disease[J]. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2017, 146: 259–302.
- [7] Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease[J]. Nature, 1991, 349(6311): 704–706.
- [8] Venigalla M, Gyengesi E, Munch G. Curcumin and Apigenin—novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. Neural Regen Res, 2015, 10(8): 1181–1185.
- [9] Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin[J]. Curr Drug Targets, 2011, 12(3): 332–347.
- [10] Wang C, Zhang X, Teng Z, et al. Downregulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in curcumin-induced autophagy in APP/PS1 double transgenic mice[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 740: 312–320.
- [11] 王 晨, 滕志鹏, 张 雄. 姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠海马组织中酵母自噬相关基因 Beclin1 表达和淀粉样蛋白生成的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 11(26): 1625–1628.
- [12] Lin P, Li F, Zhang YW, et al. Calnuc binds to Alzheimer's β -amyloid precursor protein and affects its biogenesis[J]. J Neurochem, 2007, 100(6): 1505–1514.
- [13] Gouras GK, Xu H, Gross RS, et al. Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's β -amyloid peptides[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(3): 1202–1205.
- [14] Uguz AC, Oz A, Naziroglu M. Curcumin inhibits apoptosis by regulating intracellular calcium release, reactive oxygen species and mitochondrial depolarization levels in SH-SY5Y neuronal cells[J]. Journal of Receptors and Signal Transduction, 2016, 36(4): 395–401.
- [15] 许 可, 向 月, 孙洁芸. 姜黄素影响 N2a/APP695swe 细胞中 ABCA1 表达的机制研究[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(5): 677–681.
- [16] De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S, et al. Role of axonal transport in neurodegenerative diseases [J]. Annu Rev Neurosci, 2008, 31: 151–173.
- [17] De Vos KJ, Hafezparast M. Neurobiology of axonal transport defects in motor neuron diseases: opportunities for translational research? [J]. Neurobiol Dis, 2017, 105: 283–299.
- [18] Davis JN, Hunnicutt EJ JR, Chisholm JC. A mitochondrial bottleneck hypothesis of Alzheimer's disease[J]. Molecular Medicine Today, 1995, 1(5): 240–247.
- [19] Kumar A, Singh A. A review on mitochondrial restorative mechanism of antioxidants in Alzheimer's disease and other neurological conditions[J]. Frontiers in Pharmacology, 2015, 6(206): 1–13.
- [20] Moreira PI, Carvalho C, Zhu X, et al. Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology[J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)—Molecular Basis of Disease, 2010, 1802(1): 2–10.
- [21] Eckert A, Keil U, Marques CA, et al. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66(8): 1627–1634.
- [22] Fan CD, Li Y, Fu X T, et al. Reversal of β -Amyloid-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells by Curcumin, the Important Role of ROS-Mediated Signaling and ERK Pathway[J]. Cellular & Molecular Neurobiology, 2017, 37(2): 211–222.
- [23] Wang Q, Sun AY, Simonyi A, et al. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits[J]. Journal of Neuroscience Research, 2005, 82(1): 138–148.
- [24] Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation[J]. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15(6): 725–731.

(责任编辑:张辉洁)