

橘皮素对 PC-12 细胞 A β 水平的影响及机制研究

欧阳新平¹, 郑 莉², 周寿红¹, 陆素青³, 陈 歆⁴, 张 敏⁵, 何平平^{6*}, 唐朝克^{5*}

(1. 南华大学医学院神经科学研究所、生理学教研室, 湖南 衡阳 421001; 2. 北京航天总医院 ICU; 3. 桂林医学院附属医院广西桂林; 4. 湖南中医药高等专科学校湖南株洲; 5. 南华大学医学院心血管疾病研究所; 6. 南华大学护理学院)

摘要: **目的** 观察橘皮素对 PC-12 细胞 β 淀粉样蛋白 (A β) 水平的影响并探讨其可能的机制。 **方法** 不同浓度 (0.1、1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 的橘皮素, 作用不同时间 (0 h、6 h、12 h、24 h、48 h) 处理 PC-12 细胞后, 采用 ELISA 检测细胞培养液 A β_{40} 和 A β_{42} 水平, Western blot 检测 PC-12 细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ABCA1) 蛋白水平, RT-PCR 检测 PC-12 细胞 ABCA1 mRNA 水平。ABCA1 siRNA 抑制 ABCA1 蛋白表达。 **结果** 10 $\mu\text{mol/L}$ 及 100 $\mu\text{mol/L}$ 橘皮素组 A β_{40} 和 A β_{42} 水平显著下降, ABCA1 蛋白水平明显增加, 而所有组 ABCA1 mRNA 水平没有改变。使用 100 $\mu\text{mol/L}$ 橘皮素处理 PC-12 细胞, 处理后 ABCA1 mRNA 表达与对照组比较差异无显著性, 24 h 及 48 h 组 ABCA1 水平显著增加, A β_{40} 和 A β_{42} 水平显著下降。使用 ABCA1 siRNA 抑制 PC-12 细胞 ABCA1 蛋白表达后, ABCA1 siRNA 处理组与对照组比较, A β_{40} 和 A β_{42} 水平显著增加。 **结论** 橘皮素可通过增加 ABCA1 蛋白来降低 PC-12 细胞 A β_{40} 和 A β_{42} 水平。

关键词: 橘皮素; PC12 细胞; ABCA1; β 淀粉样蛋白; 阿尔茨海默病
中图分类号: R741.05 文献标识码: A

The influence and mechanism research of tangeretin on the PC-12 cell beta amyloid protein levels

OUYANG Xinping, ZHENG Li, ZHOU Shouhong, et al

(Department of Physiology, The Neuroscience Institute, Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect that the Tangeretin on the PC-12 cell beta Amyloid (A β) protein levels and discuss the possible mechanism. **Methods** Using different concentrations (0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$) of the Tangeretin to treat PC-12 cells at different time (0h, 6h, 12h, 24 h, 48 h), the level of A β_{40} and A β_{42} in the cell culture were detected by the method of ELISA, the levels of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) protein in the PC-12 cells were detected by western blot, the levels of ABCA1 mRNA in the PC-12 cells were detected by RT-PCR. After using ABCA1 siRNA to inhibit the expression of ABCA1 protein. **Results** A β_{40} and A β_{42} levels decreased significantly in 10 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ Tangeretin group, ABCA1 protein level increased significantly, and ABCA1 mRNA level of all groups didn't change. With the treatment of 100 $\mu\text{mol/L}$ Tangeretin on PC-12 cells, ABCA1 mRNA expression hadn't significant difference compared with the control group, ABCA1 protein level of 24 h and 48 h group increased significantly, A β_{40} and A β_{42} levels decreased significantly. **Conclusion** The Tangeretin can reduce A β_{40} and A β_{42} levels through increasing ABCA1 protein level.

Key words: tangeretin; PC-12 cells; ABCA1; amyloid beta; alzheimer's disease

收稿日期: 2016-12-25; 修回日期: 2017-03-01

基金项目: 湖南省研究生科研创新项目 (CX2014B393); 湖南省中医药管理局重点项目 (201524); 南华大学校内博士启动基金 (2014XQD36、2015XQD37)。

* 通讯作者, E-Mail: tangchaoke@qq.com; E-Mail: hpp-612@163.com。

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种在老年人群中发病率较高且危害性较大的一种神经退行性疾病。目前研究表明,脑内过量的 β 淀粉样蛋白(β -Amyloid protein, A β)聚集形成老年斑,从而对神经元产生毒性并导致其变性死亡^[1]。三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP binding cassette transporter A1, ABCA1)是一种跨膜蛋白,其主要作用之一是维持细胞内外胆固醇的动态平衡^[2]。研究显示,在 ABCA1 敲除小鼠其脑内 A β 水平增加^[3],而 ABCA1 过表达小鼠则其脑 A β 水平减少^[4-5]。因此,现在认为 ABCA1 可作为治疗 AD 的一个重要潜在靶点,因此寻找一种能有效上调 ABCA1 表达的物质变得至关重要。橘皮素(Tangeretin)是中国传统中药材橘皮中所含的有效成分之一,属于黄酮类化合物。大量研究表明黄酮类具有抑制细菌、抗肿瘤、抗病毒及抗氧化等广泛的药理作用,近年来研究表明同为黄酮类的花青素具有上调 ABCA1 蛋白的作用^[6-7],那是否橘皮素能通过增加 ABCA1 表达,进而降低 A β 水平,目前尚未见文献报道。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂 橘皮素购自 Sigma 公司; RPMI-1640 培养基、胎牛血清、胰酶购自杭州四季清公司;兔抗鼠 ABCA1、 β -actin 一抗、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗、小鼠特异性 ABCA1 小干扰 RNA(SiRNA)购自 Santa Cruz 公司;A β_{40} 和 A β_{42} ELISA 检测试剂盒采购自美国 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒购于芬兰 Finnzymes 公司;其他所有试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养 PC-12 细胞由中山大学生理教研室提供,使用 1640 培养液(含有 10%胎牛血清)在恒温细胞培养箱(37 °C、5% CO₂)内培养细胞。当细胞生长至 80%融合时,进行胰酶消化后传代。当细胞进入对数生长期时,更换培养液,24 h 加入 1 640 培养液(对照)或不同浓度(100 nmol/L、1 μ mol/L、10 μ mol/L、100 μ mol/L)的橘皮素,作用不同时间(0 h、6 h、12 h、24 h、48 h)后分别收取上清液冻存备用。使用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞,4 °C 12 000 rpm 离心 30 min,转移上清液至新 EP 管后冻存备用。

1.3 酶联免疫吸附实验(ELISA) 将收集到的细胞培养液离心(4 °C, 12 000 rpm, 10 min),取上清

液。使用 A β_{40} 或 A β_{42} 试剂盒进行测定,根据试剂盒说明书采用双抗体夹心酶标免疫法检测样本中 A β_{40} 或 A β_{42} 的水平。先把纯化后的抗体包被在 96 孔板中,制成为固相抗体后,再将 A β_{40} 或 A β_{42} 抗原、生物素化的抗体以及 HRP 标记的亲合素依次加入含有包被抗体的孔中,然后采用底物 TMB 显色,颜色的深浅和样本中的 A β_{40} 或 A β_{42} 呈正向相关。随后使用酶标仪(设定 450nm 波长)测定每个样本吸光度值(OD 值),最后计算出样本的浓度。

1.4 小干扰 RNA 转染 小鼠特异性 ABCA1 小干扰 RNA(siRNA)由圣克鲁斯生物技术公司提供。ABCA1 siRNA: sense 5'-GGAUUUUUGCUCAGAUUGTT-3', antisense 5'-CAAUCUGAGCAAAAAAUCCTT-3'。将 PC-12 细胞放入六孔板(2 \times 10⁶ 细胞/孔)24 h。使用脂质体 2000 分别进行转染 48 h。使用 Western blot 检测 ABCA1 siRNA 对相应蛋白抑制效果。

1.5 蛋白质免疫印迹实验(Western Blot) 收集细胞,使用预冷的 PBS 洗涤 2 次,蛋白裂解液 500 μ L 裂解细胞,冰上孵育 30 min 后,将样本于 4 °C、15 000 rpm 离心 30 min,收集上清,即为细胞的总蛋白。采用 BAC 法测定蛋白含量。煮沸变性,上样后进行电泳,电压为 80 mV,在 6%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 1 h 分离蛋白质。将分离的蛋白质用湿转法转膜至硝酸纤维素膜上,10%脱脂牛奶室温下封闭 2~3 h 或 4 °C 封闭过夜,加入兔抗鼠 β -actin (1:200)、ABCA1(1:200)一抗孵育 4~6 h。使用 TBST 缓冲液洗膜 10 min \times 3 次,随后加入二抗,孵育 2~3 h, TBST 缓冲液洗膜 10 min \times 3 次。显影剂显影后,使用凝胶图像分析系统扫描,并进行半定量分析。

1.6 RNA 提取和实时定量 PCR(Real-time Quantitative PCR, Real-time PCR) 先提取 PC-12 细胞总 RNA,然后使用 SYBR 绿色荧光测定试剂盒,采用 Roche light Cycler Run 5.32 Real-Time PCR 系统进行 Real-time PCR 分析。合成小鼠 ABCA1 引物序列: 5'-GGGTGAACGAGTTTCGGTATG-3' 和 5'-CTGAAGATGCTTGGCTTTGCT-3'。最后采用 $\Delta\Delta$ Ct 方法进行定量测定。

1.7 统计学分析 使用均数 \pm 标准差表示所得的实验数据。两组间的比较采用 Student's *t* 检验,三组或多组之间的比较采用 one-way ANOVA 分析。所有数据均使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性标准。

2 结 果

2.1 橘皮素减少 PC-12 细胞 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平

ELISA 方法检测 PC-12 细胞培养液 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平 ($A\beta$ 由膜上剪切生成后进入细胞培养液)。结果

显示 10 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 组 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平显著下降,且 100 $\mu\text{mol/L}$ 组下降更明显(图 1A,图 1B);24 h 及 48 h 组 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平显著下降(图 1C,图 1D),说明橘皮素能减少 PC-12 细胞 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平。

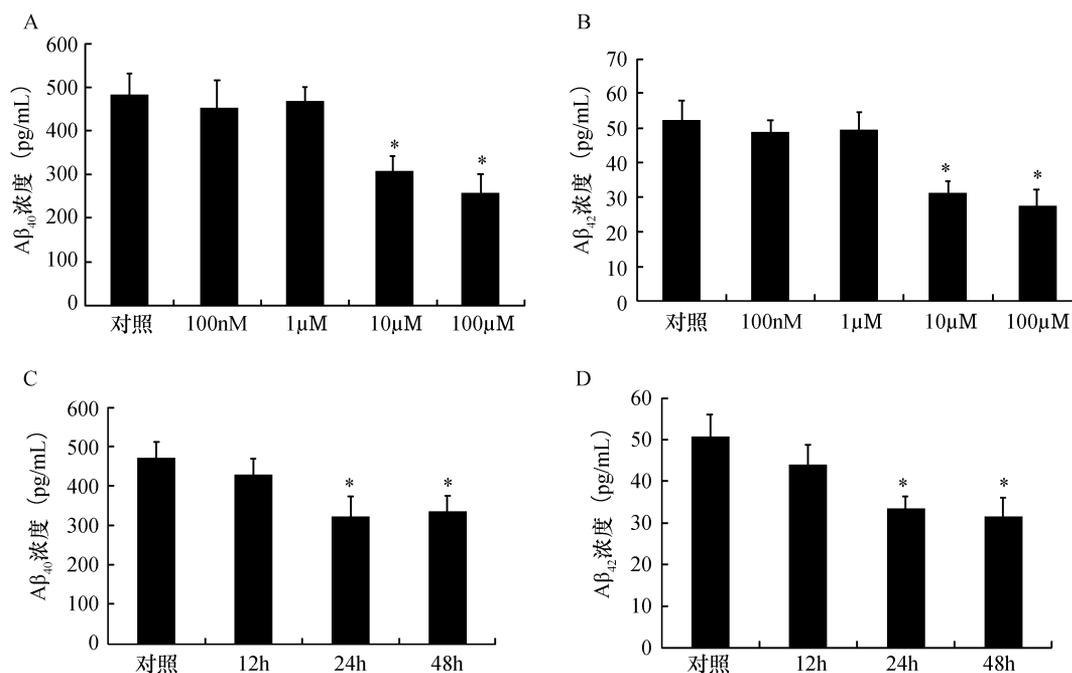


图 1 橘皮素对 PC-12 细胞 $A\beta_{40}$ 及 $A\beta_{42}$ 水平的影响 ($n=3$) 与对照组比较, * $P<0.05$

2.2 橘皮素增加 PC-12 细胞 ABCA1 蛋白水平

Western blot 和 RT-PCR 结果显示 10 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 橘皮素组与对照组相比, ABCA1 蛋白水平明显增加(图 2A), 而 ABCA1 mRNA 水平则没有改变(图 2C);24 h 及 48 h 组 PC-12 细胞 ABCA1 水平显著增加(图 2B), ABCA1 mRNA 表达与对照组比较差异无显著性(图 2D), 说明橘皮素增加 PC-12 细胞 ABCA1 蛋白水平, 但不影响 ABCA1 mRNA 水平。

2.3 橘皮素通过 PC-12 细胞 ABCA1 蛋白减少 $A\beta$ 水平

2.3.1 ABCA1 siRNA 抑制效果检测 Western blot 检测 ABCA1 siRNA 后 PC-12 细胞 ABCA1 蛋白水平, 结果显示 ABCA1 siRNA 能有效抑制 PC-12 细胞 ABCA1 表达(图 3)。

2.3.2 橘皮素通过 PC-12 细胞 ABCA1 蛋白减少 $A\beta$ 水平 ELISA 结果显示橘皮素处理组与对照组比较, $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平显著下降。ABCA1 siRNA 处理

组与对照组比较, $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平显著增加。橘皮素+ABCA1 siRNA 处理组与橘皮素处理组比较, $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平显著增加(图 4)。说明橘皮素通过 PC-12 细胞 ABCA1 蛋白减少 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平。

3 讨 论

橘皮素属于多甲氧基黄酮类 (polymethoxylated flavones, PMFs), 研究证明其具有很强的抗氧化、抗炎、抗癌、抗肿瘤、抗菌及降低胆固醇水平的功能^[8-11]。近年来研究表明同为黄酮类的花青素具有上调 ABCA1 蛋白的作用^[9], 那是否橘皮素能通过作用于 ABCA1, 进而降低 $A\beta$ 水平, 目前尚未见文献报道。因此, 本研究中观察橘皮素对 PC-12 细胞 ABCA1 及 $A\beta$ 水平的影响。

沉积的 $A\beta$ 是 AD 病变中老年斑的核心组成成分, 它在 AD 这种神经退行性疾病的病变过程中起关键作用^[12-13]。在 AD 中, $A\beta$ 可以导致线粒体功能

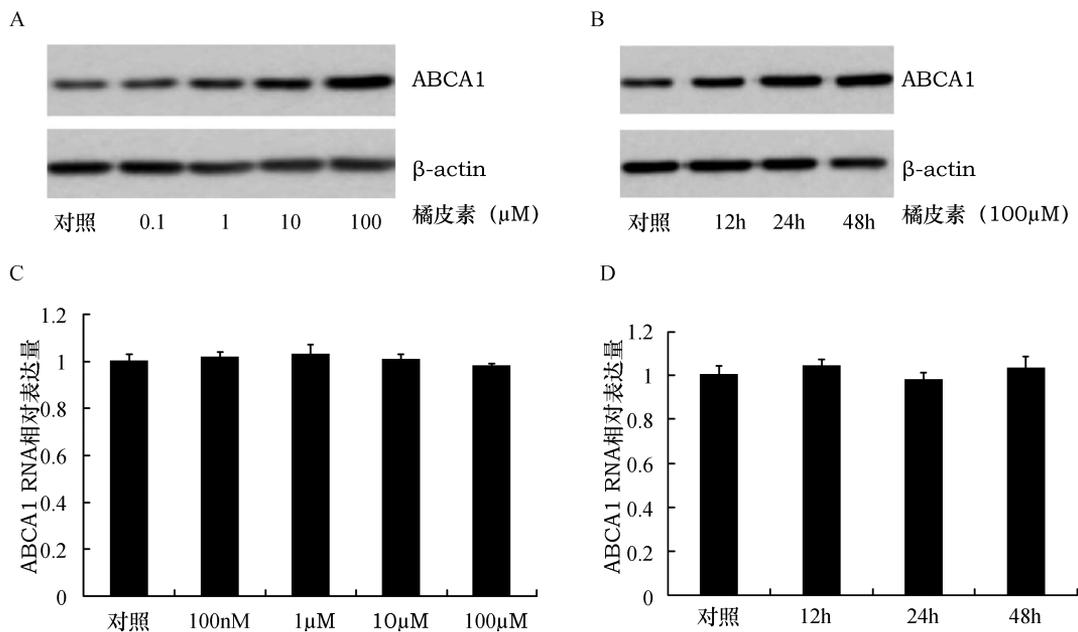


图 2.橘皮素对 PC-12 细胞 ABCA1 蛋白及 mRNA 的影响(n=3)

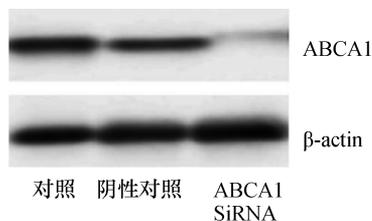


图 3 ABCA1 siRNA 对 PC-12 细胞 ABCA1 表达的影响

的破坏、氧化和应激、破坏细胞膜的完整性以及损伤神经轴突运输和突触传递,最终引起神经元的变性丢失^[13]。在这些病理生理过程中, A β 的产生是其中的关键步骤,因此,针对脑内 A β 代谢的调节是治疗 AD 的一种有效且至关重要的策略^[14]。

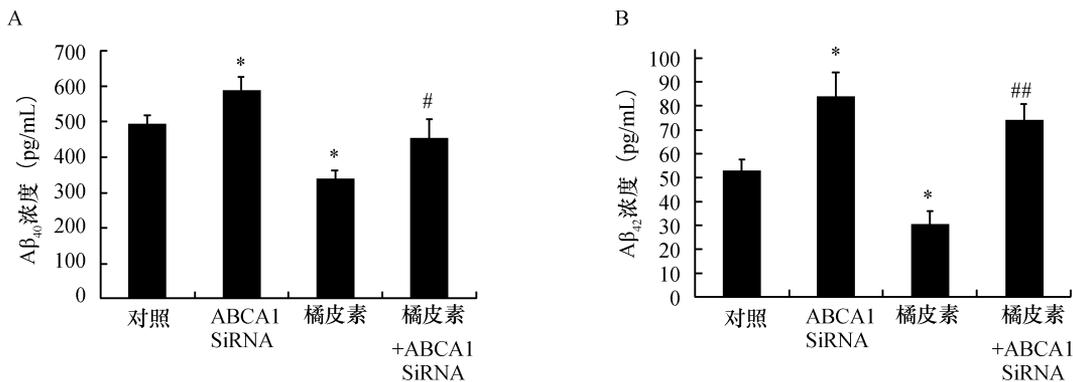


图 4 橘皮素通过 PC-12 细胞 ABCA1 蛋白影响 A β_{40} 及 A β_{42} 水平(n=3)

与对照组比较, * P<0.05;与橘皮素比较, #P<0.05, ##P<0.01

我们研究结果表明橘皮素处理 PC-12 细胞 24 h 后,PC-12 细胞培养液 A β_{40} 和 A β_{42} 水平显著降低。说明橘皮素能降低 A β_{40} 和 A β_{42} 水平。

研究表明,一些参与 AD 病理过程的关键因子,例如胆固醇代谢异常会影响淀粉样前体蛋白(β -

Amyloid protein, APP) 及 β 位淀粉样前体蛋白分解酶 1 (beta-site APP cleaving enzyme 1, BACE1) 的募集^[14]。胆固醇代谢的异常和 A β 沉积都与 AD 的发生发展有非常密切的联系,而且两者经常伴随存在,另外胆固醇代谢的异常会增加 A β 沉积^[15]。

ABCA1 是调节细胞膜内外胆固醇平衡的一个非常重要的因子。在脑内, ABCA1 可转运细胞内的胆固醇和磷脂流出细胞外到载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE), 并且可以影响 apoE 的荷脂以及脑内 apoE 水平。许多研究表明, ABCA1 缺乏会增加 $A\beta$ 水平。Koldamova 等研究发现在过表达 APP 的 APP23 和 PDAPP 模型小鼠中, 敲除脑内 ABCA1 水平可降低 apoE 荷脂和 apoE 水平, 并增加脑内 $A\beta_{40}$ 及 $A\beta_{42}$ 的水平^[15]。脑内 ABCA1 高表达则降低 $A\beta$ 水平。研究发现使用促进 ABCA1 高表达的人工合成药物 T0901317 处理 APP23 转基因小鼠, 可以增加脑内 ABCA1 蛋白表达并且显著降低 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 的脑水平^[15]。本实验的研究结果也证实了这一点, 使用 ABCA1 siRNA 削弱 ABCA1 蛋白表达后, PC-12 细胞的 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平显著增加。因此, ABCA1 可以作为降低 $A\beta$ 水平以及治疗 AD 的一个潜在靶点。

我们使用橘皮素处理 PC-12 细胞 24 h 后, ABCA1 蛋白水平明显增加, 而 ABCA1 mRNA 水平则没有改变, 说明橘皮素能增加 ABCA1 蛋白表达的同时降低 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平。随后, 使用 ABCA1 siRNA 抑制 ABCA1 蛋白表达, 结果显示橘皮素降低 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平的能力显著减弱, 说明橘皮素能通过增加 ABCA1 蛋白表达来降低 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 水平。因此, 橘皮素有望对阿尔茨海默病的治疗提供一个方向, 其机制有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Morgan C, Colombres M, Nunez MT, et al. Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease[J]. Prog Neurobiol, 2004, 74 (6): 323-349.
- [2] Hirsch-Reinshagen V, Burgess BL, Wellington CL. Why lipids are important for Alzheimer disease[J]. Mol Cell Biochem, 2009, 326 (1-2): 121-129.
- [3] Kim J, Yoon H, Ramirez CM, et al. MiR-106b impairs cholesterol efflux and increases Abeta levels by repressing ABCA1 expression [J]. Exp Neurol, 2012, 235 (2): 476-483.
- [4] 欧阳新平, 张敏, 何平平, 等. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在脑疾病发生发展中的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41 (4): 317-323.
- [5] Donkin JJ, Stukas S, Hirsch-Reinshagen V, et al. ATP-binding cassette transporter A1 mediates the beneficial effects of the liver X receptor agonist GW3965 on object recognition memory and amyloid burden in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice [J]. J Biol Chem, 2010, 285 (44): 34144-34154.
- [6] Xia M, Hou M, Zhu H. Anthocyanins induce cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages: the role of the peroxisome proliferator-activated receptor γ -liver X receptor α -ABCA1 pathway [J]. J Biol Chem, 2005, 280(44): 36792-36801.
- [7] Wang D, Xia M, Yan X, et al. Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing miRNA-10b [J]. Circ Res, 2013, 111 (8): 967-981.
- [8] Funaro A, Wu X, Song M, et al. Enhanced anti-inflammatory activities by the combination of luteolin and tangeretin [J]. J Food Sci, 2016, 81(5): H1320-1327.
- [9] 源瀚祺, 黄庆华, 张小英, 等. 茶枝柑皮提取物中川陈皮素和橘皮素的大鼠肠吸收特性[J]. 食品科学, 2014, 35 (15): 263-265.
- [10] Lee YY, Lee EJ, Park JS, et al. Antiinflammatory and antioxidant mechanism of tangeretin in activated microglia [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2016, 11(2): 294-305.
- [11] Xu JJ, Liu Z, Tang W, et al. Tangeretin from citrus reticulate inhibits respiratory syncytial virus replication and associated inflammation in vivo [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(43): 9520-9527.
- [12] Frautschy SA, Baird A, Cole GM. Effects of injected Alzheimer beta-amyloid cores in rat brain [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88 (19): 8362-8366.
- [13] Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, et al. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease [J]. Science, 1989, 245 (4916): 417-240.
- [14] Citron M. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease [J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5 (9): 677-685.
- [15] Wang XF, Cao YW, Feng ZZ, et al. Quantitative assessment of the effect of ABCA1 gene polymorphism on the risk of Alzheimer's disease [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40 (2): 779-85.

(本文编辑: 秦旭平)