

二苯乙烯苷对过度表达  $\alpha$ -synuclein 蛋白的转基因 COS-7 细胞株的影响刘莹<sup>1</sup>, 李林<sup>1</sup>, 杨慧<sup>2</sup>, 李雅莉<sup>1</sup>, 张兰<sup>1</sup>

[摘要] 目的 观察二苯乙烯苷(TSG)在体外试验中对 COS-7 细胞株过度表达  $\alpha$ -synuclein 蛋白的影响。方法 将不同浓度的 TSG 与转染  $\alpha$ -synuclein 基因的 COS-7 细胞共孵育 24 h,应用二甲基噻唑蓝(MTT)法检测细胞存活率,免疫细胞化学和 Western 免疫印迹法检测  $\alpha$ -synuclein 蛋白的表达,观察 TSG 对其的影响。结果 TSG 在 12.5 ~ 200.0  $\mu$ mol/L 浓度范围内与 COS-7 细胞孵育 24 h 不影响细胞存活率,而在免疫细胞化学和 Western 免疫印迹分析中均显示 TSG 剂量依赖性地抑制  $\alpha$ -synuclein 蛋白表达和聚集。结论 TSG 在体外对 COS-7 细胞过度表达  $\alpha$ -synuclein 有明显抑制作用。

[关键词] 二苯乙烯苷;何首乌; $\alpha$ -synuclein;COS-7 细胞;体外试验

Effects of Tetrahydroxy stilbene Glycoside on Over-expression of  $\alpha$ -synuclein Protein in Transgenic COS-7 Cells LIU Ying, LI Lin, YANG Hui, et al. The Department of Pharmacology, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases of Ministry of Education, Beijing 100053, China

**Abstract:** Objective To explore the effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2- $\beta$ -D-glycoside (TSG) on the over-expression and aggregation of  $\alpha$ -synuclein in vitro. **Methods** TSG in different concentrations was incubated with  $\alpha$ -synuclein transgenic COS-7 cells for 24 h. The cell viability was measured by MTT method. The expression of  $\alpha$ -synuclein protein was determined by immunocytochemistry and Western blotting method. **Results** Incubation of TSG at the range of 12.5 ~ 200.0  $\mu$ mol/L with  $\alpha$ -synuclein transgenic COS-7 cells for 24 h did not influence cell viability, but a dose-dependently inhibition for the over-expression of  $\alpha$ -synuclein protein could be observed in the tests of immunocytochemistry and Western blotting. **Conclusion** TSG can inhibit the over-expression of  $\alpha$ -synuclein protein in COS-7 cells in vitro.

**Key words:** 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2- $\beta$ -D-glycoside (TSG); Polygonum multiflorum;  $\alpha$ -synuclein; COS-7 cell; in vitro

[中图分类号] R742.5 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)04-0338-03

[本文著录格式] 刘莹,李林,杨慧,等. 二苯乙烯苷对过度表达  $\alpha$ -synuclein 蛋白的转基因 COS-7 细胞株的影响[J]. 中国康复理论与实践,2008,14(4):338-340.

有研究显示,一些常染色体显性遗传的家族性帕金森病与  $\alpha$ -synuclein 的 3 种基因错义突变型相关;随后又发现, $\alpha$ -synuclein 是散发性帕金森病路易小体(Lewy body)的主要成分,而路易小体是帕金森病的病理学标志。正常的  $\alpha$ -synuclein 是不折叠并可溶解的,而病理状态下其构象发生变化,变成不可溶、聚集,从而不易被蛋白酶降解,导致泛素化  $\alpha$ -synuclein 在包涵体内聚集,形成胞浆包涵体。沉积的包涵体使细胞的氧化应激增强,引起细胞凋亡。

二苯乙烯苷(2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glycoside, TSG)是从中药何首乌中提取的一种活性成分,是我国药典中规定的何首乌的质控成分,为多羟基酚类化合物,具有较强的抗氧化作用<sup>[1]</sup>。我室前期的研究发现,TSG 具有较好的神经保护作用,可以明显保护体外培养细胞抵抗  $\beta$  淀粉样肽( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)或谷氨酸所致的神经细胞存活

率下降和乳酸脱氢酶漏出增多<sup>[2,3]</sup>;还发现 TSG 可明显改善 A $\beta$ 1-40 脑室注射拟痴呆小鼠的学习记忆能力,提高模型小鼠脑组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性,减少脂质过氧化代谢产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量<sup>[4]</sup>。我室最近的研究发现,TSG 对 APP 转基因拟痴呆小鼠脑内  $\alpha$ -synuclein 的异常增多和聚集有明显抑制作用<sup>[5]</sup>。为进一步探讨 TSG 对  $\alpha$ -synuclein 是否有直接的抑制作用,本实验利用体外培养的转基因后过度表达  $\alpha$ -synuclein 的 COS-7 细胞为研究对象,检测 TSG 对模型细胞  $\alpha$ -synuclein 蛋白表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 TSG 购自中国药品生物制品检定所,从何首乌中提取,纯度 > 99%。二甲基噻唑蓝(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)、胰蛋白酶、PMSF、SDS(电泳级)和 TEMED 均购自 Sigma 公司; $\alpha$ -synuclein 抗体购自 Abcam 公司;胎牛血清购自 Gibco 公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)为北京化工厂产品。

1.1.2 仪器 Tc2323 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 SHELL 公司);TE300 型倒置显微镜(日本尼康公司);LP400 型全自动酶标仪(法国 Diagnostic Pasteur 公司);8453 型紫外分光光度计(美国惠普公司);PowerPac200 型电泳仪和 Trans-Blot 型电泳仪(美国 BIO-RAD 公

基金项目:1. 国家自然科学基金(No. 30701092, 30472184, 90709011);2. 北京市自然科学基金(No. 7072033, 7050001);3. 国家重点基础研究 973 计划项目(No. 2003CB517104)

作者单位:1. 首都医科大学宣武医院药物研究室,神经变性病教育部重点实验室,北京市 100053;2. 首都医科大学北京神经科学研究所,北京市 100069。作者简介:刘莹(1979-),女,河北深泽县人,硕士研究生,主要研究方向:神经药理学。通讯作者:张兰(1972-),女,北京市人,副研究员,硕士研究生导师,主要研究方向:神经药理学,中药药理学。

司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 转染  $\alpha$ -synuclein 基因并过度表达  $\alpha$ -synuclein 的非洲绿猴肾细胞 COS-7 细胞株由首都医科大学北京神经科学研究所杨慧教授馈赠。DME M(Gibco BRL) 培养基中加入体积分数为 0.1 的灭活胎牛血清、青霉素  $1 \times 10^5$  U/L、链霉素  $1 \times 10^5$  U/L, 在体积分数为 0.05  $\text{CO}_2$ , 37℃ 的培养箱中培养, 每周换液 2 次, 传代 1 次。

**1.2.2 细胞分组** 转染  $\alpha$ -synuclein 基因的 COS-7 细胞分为模型对照组(不加药), 以及 TSG 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0  $\mu\text{mol/L}$  组。

**1.2.3 MTT 法细胞检测存活率** 将 COS-7 细胞以每孔  $1 \times 10^4$  的密度接种于 96 孔培养板中(Costar 产品), 每孔体积 100  $\mu\text{l}$ , 于接种后第 3 天, 分为模型对照组与 TSG 用药组, 每组 6 个孔。孵育 24 h 后每孔加 MTT(5 g/L) 11  $\mu\text{l}$ , 37℃ 孵育 4 h, 吸出培养液, 每孔加入 110  $\mu\text{l}$  DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪测定 550 nm 处吸光度值(A)。

**1.2.4 免疫细胞化学检测  $\alpha$ -synuclein** 将 COS-7 细胞以  $1 \times 10^4$  个的密度接种于 6 孔板中, 加 TSG 后培养 24 h, 4% 多聚甲醛固定细胞 24 h, 4℃ 过夜; PBST 洗涤, 加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  除去非特异性染色, 5% 山羊血清室温封闭 30 min, 加鼠抗  $\alpha$ -synuclein 抗体(1:300 溶于抗体稀释液), 4℃ 过夜; 再加入鼠抗人 2 抗(1:300 溶于 PBST), 室温孵育 1 h, PBST 洗涤后加入 3 抗(1:300 溶于 PBST), 室温孵育 1 h, 最后 DAB 显色, 镜下控制显色程度, 倒置显微镜观察, 照相。

**1.2.5 Western 免疫印迹法检测  $\alpha$ -synuclein** 将 COS-7 细胞以  $5 \times 10^4/\text{ml}$  接种于 90 mm 培养皿中, 待细胞生长至 90% 密度时, 分为模型对照组和 TSG 用药组。模型对照组在无血清培养基中培养 24 h, 用药组分别在含 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0  $\mu\text{mol/L}$  TSG 的培养基中培养 24 h。弃去原培养液, 贴壁细胞用生理盐水洗 2 次, 加入预冷的裂解缓冲液(内含 pH 8.0 的 10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% NP-40, 1 mM PMSF, 10  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, 1 mM EDTA, 0.1% 脱氧胆酸钠), 刮下细胞, 在冰上裂解 2 h, 将裂解物以 12 000 r/min 4℃ 离心 2 次, 每次 20 min, 收集上清。用 Folin 酚法测定蛋白质含量。50~100 V 电压下 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭。常规方法加  $\alpha$ -synuclein 1 抗及 2 抗孵育后, 碱性磷酸酶显色系统显影。

**1.3 统计学处理** 所得数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件对组间比较进行方差分析中的 SNK 和 LSD 法分析。

## 2 结果

**2.1 TSG 对培养细胞无毒性范围的界定** 当 TSG 浓度在 12.5~200.0  $\mu\text{mol/L}$  范围内, 对 MTT 吸光值无明显影响; 但当浓度增至 400.0  $\mu\text{mol/L}$  时, MTT 吸光值低于模型对照组( $P < 0.05$ , 见表 1), 表明由于浓度过高, 产生了细胞毒性作用, 故选用 12.5~200.0  $\mu\text{mol/L}$  作为进一步实验的浓度。

表 1 不同浓度 TSG 对细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	MTT (A 595nm)
模型对照	6	0.2409 $\pm$ 0.0723
TSG(12.5 $\mu\text{mol/L}$ )	6	0.2274 $\pm$ 0.0645
TSG(25.0 $\mu\text{mol/L}$ )	6	0.2505 $\pm$ 0.0379
TSG(50.0 $\mu\text{mol/L}$ )	6	0.2642 $\pm$ 0.0664
TSG(100.0 $\mu\text{mol/L}$ )	6	0.2147 $\pm$ 0.0795
TSG(200.0 $\mu\text{mol/L}$ )	6	0.2039 $\pm$ 0.0596
TSG(400.0 $\mu\text{mol/L}$ )	6	0.1299 $\pm$ 0.0345 <sup>a</sup>

注: a. 与模型对照组比较,  $P < 0.05$ 。

**2.2 免疫细胞化学法检测 TSG 对  $\alpha$ -synuclein 蛋白表达的影响** 在光镜下, 转基因模型组(模型对照组) COS-7 细胞胞体较大, 呈多形性生长, 胞内有大量包涵体。与模型对照组相比, TSG 用药组(12.5、25.0、50.0、100.0、200.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 细胞胞浆中  $\alpha$ -synuclein 蛋白免疫阳性减弱, 着色变浅(见插图 1 图 3)。

**2.3 Western 免疫印迹法检测 TSG 对  $\alpha$ -synuclein 蛋白表达的影响** Western 免疫印迹法检测显示,  $\alpha$ -synuclein 为四聚体(聚集态)。与模型对照组比较, TSG 各剂量组(12.5、25.0、50.0、100.0、200.0  $\mu\text{mol/L}$ )  $\alpha$ -synuclein 条带面积明显变小, 灰度减低, 设模型对照的灰度比值为 100%, 则各剂量组的比值低于模型对照组, 即  $\alpha$ -synuclein 的表达及聚集减少(见图 1a)。对 3 次试验进行半定量统计学分析, 结果 TSG 12.5~200.0  $\mu\text{mol/L}$  组的  $\alpha$ -synuclein 表达低于模型对照组( $P < 0.05$ ), 见图 1b。

## 3 讨论

从一些早期发病的家族性帕金森病患者第 4 号染色体中发现, 两个单独的  $\alpha$ -synuclein 基因错译突变后,  $\alpha$ -synuclein 蛋白在帕金森病发病机制中的作用受到广泛关注。有试验表明, 突变的  $\alpha$ -synuclein 过度表达增加了神经细胞对氧化应激的易感性, 具有一定的细胞毒作用<sup>[6]</sup>。有研究证实, 在帕金森病的病理学标志物路易小体中存在广泛的硝基化  $\alpha$ -synuclein 蛋白<sup>[7]</sup>。由此推测, 存在于帕金森病患者黑质的氧化应激环境有助于  $\alpha$ -synuclein 的沉积, 从而促进多巴胺神经元变性。在帕金森病的发病中,  $\alpha$ -synuclein 异常积聚可破坏多巴胺储存与释放, 直接抑制线粒体功能, 提高氧化应激水平, 并参与路易小体的形成过程<sup>[8]</sup>, 因此认为  $\alpha$ -synuclein 异常积聚可能在帕金森病和其他神

经变性疾病的致病过程中起重要作用<sup>[9]</sup>。最近发现,  $\alpha$ -synuclein 蛋白的多种形式均有神经毒性, 其聚集体对神经退行性病变具有比单体更重要的作用<sup>[10]</sup>, 所以本实验重点观察  $\alpha$ -synuclein 蛋白的聚集形式—四聚体。

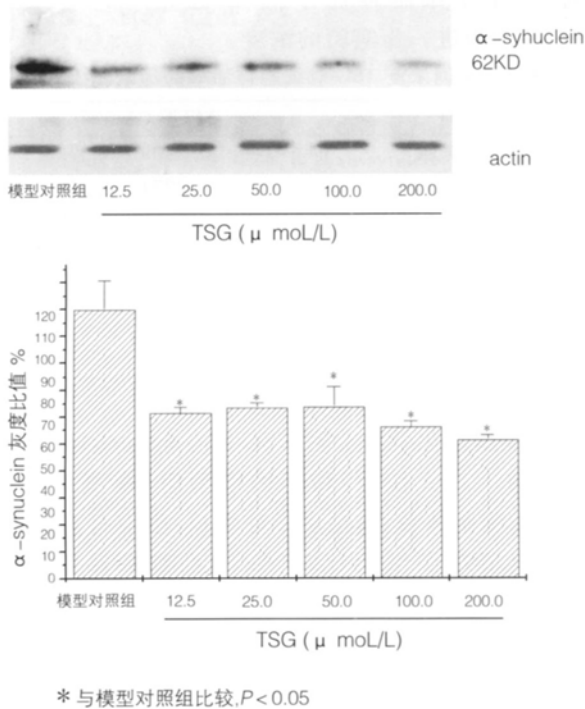


图 1 TSG 对转基因 COS-7 细胞  $\alpha$ -synuclein 蛋白表达的影响 (Western 免疫印迹法)

鉴于氧化应激、 $\alpha$ -synuclein 过度表达与帕金森病发病密切相关, 科学家正在研究和寻找与此途径相关的帕金森病治疗药物<sup>[11]</sup>。TSG 是中药何首乌的有效成分, 是一种多羟基酚类化合物, 具有抗氧化作用。本室前期的实验表明, TSG 在体外试验中可明显拮抗  $A\beta$ 、 $H_2O_2$ 、谷氨酸等引起的神经细胞存活率下降及乳酸脱氢酶漏出率增多<sup>[2,3]</sup>, 在动物实验中能够增强抗氧化酶活力, 抑制脂质过氧化, 并且对  $\alpha$ -synuclein 的异常增多和聚集有明显抑制作用<sup>[4,5]</sup>。

本实验所用的细胞为转染  $\alpha$ -synuclein 基因并过度表达  $\alpha$ -synuclein 蛋白的非洲绿猴肾细胞 COS-7 细胞株<sup>[12]</sup>。我们首先确定了 TSG 在细胞培养中的无毒性范围。在 MTT 试验中, 只有活细胞才能将 MTT 摄入细胞内, 经线粒体琥珀酸脱氢酶催化形成蓝色的甲瓞颗粒, 且形成量与活细胞的数量和功能状态呈正相关。甲瓞颗粒溶解后在 550 nm 处有最大吸收, 生成越多, 吸光度越大。本实验 MTT 检测结果显示, 当 TSG 浓度达到 400.0  $\mu$ mol/L 时, 细胞存活率降低, 产生细胞毒性作用。由于当药物对细胞有损伤时也可以导致  $\alpha$ -synuclein 蛋白表达下降, 产生假阳性结果, 因此, 我

们选用对细胞活性无影响的剂量范围 (12.5 ~ 200.0  $\mu$ mol/L) 作为本实验的药物浓度。

本研究应用免疫细胞化学和 Western 免疫印迹法检测显示, TSG 在体外试验中能够明显抑制转基因 COS-7 细胞  $\alpha$ -synuclein 蛋白的过度表达和聚集, 但其作用机理究竟是通过抑制  $\alpha$ -synuclein 蛋白的生成, 还是通过增加其降解, 还有待后期的研究。近年来有关氧化应激与  $\alpha$ -synuclein 过度表达在帕金森病病程中的重要作用已成为研究的热点问题。鉴于 TSG 具有明显的抗氧化作用, 能够清除自由基<sup>[1]</sup>, 增强 SOD 活性和抑制脂质过氧化<sup>[4]</sup>, 因此我们推测 TSG 抑制  $\alpha$ -synuclein 的作用可能与其的抗氧化作用有某种联系。TSG 能够下调细胞内过度表达的  $\alpha$ -synuclein 可能是其具有神经保护作用的机制之一。

总之, 本实验显示 TSG 在体外试验中能抑制  $\alpha$ -synuclein 蛋白的过度表达, 提示该药在治疗多种神经变性病中可能具有一定的应用前景。

#### [参考文献]

- [1] Chen Y, Wang M, Rosen RT, et al. 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging active components from Polygonum multiflorum thunb[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(6): 2226—2228.
- [2] 张兰, 李林, 李雅莉. 何首乌有效成分二苯乙烯苷对神经细胞保护作用的机制[J]. 中国临床康复, 2004, 8(1): 118—120.
- [3] 李雅莉, 赵玲, 徐艳玲, 等. 二苯乙烯苷对谷氨酸致原代培养大鼠海马神经元损伤的保护作用[J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10(12): 751—753.
- [4] 楚晋, 叶翠飞, 李林. 二苯乙烯苷对痴呆小鼠学习记忆及自由基代谢的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2003, 9(11): 643—645.
- [5] 张兰, 于顺, 邢颖, 等. APP 转基因拟痴呆小鼠模型脑内  $\alpha$ -synuclein 的增龄改变[J]. 中国病理生理学杂志, 2007, 23(12): 2289—2294.
- [6] Glaser CB, Yamin G, Uversky VN, et al. Methionine oxidation,  $\alpha$ -synuclein and Parkinson's disease[J]. Neuroscientist, 2004, 10(1): 63—72.
- [7] 王尔松, 江澄川. 帕金森病相关蛋白的蛋白质组学研究进展[J]. 中国临床神经科学, 2007, 1(3): 330—333.
- [8] 张冬齐, 徐江平. 抗氧化剂对帕金森病的保护作用及机制的进展[J]. 医学综述, 2006, 12(2): 113—115.
- [9] 黄河, 任惠民. 神经系统重大疾病中蛋白质组学的应用[J]. 中国临床神经科学, 2007, 1(2): 189—194.
- [10] 张克忠, 蒋雨平.  $\alpha$ -synuclein 与帕金森病[J]. 中国临床神经科学, 2004, 12(4): 434—437.
- [11] Calne D, Schulzer M, Mak E, et al. Treatment for the progression of Parkinson's disease[J]. Lancet Neurol, 2005, 4(4): 206—207.
- [12] 鲁玲玲, 苏月, 段春礼, 等. 多巴胺合成酶相关基因治疗帕金森病的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(18): 1528—1532.

(收稿日期: 2008-02-14)



图 3.1 模型对照组



图 3.2 TSG 12.5  $\mu\text{mol/L}$  组



图 3.3 TSG 25.0  $\mu\text{mol/L}$  组

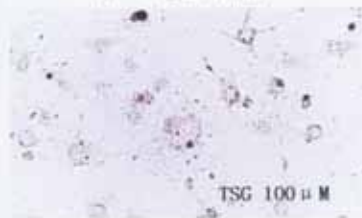


图 3.4 TSG 50.0  $\mu\text{mol/L}$  组

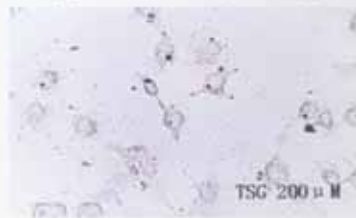


图 3.5 TSG 100.0  $\mu\text{mol/L}$  组



图 3.6 TSG 200.0  $\mu\text{mol/L}$  组