

文章编号:1000-7423(2003)-06-0326-04

蒿甲醚引起线粒体跨膜电位下降在神经毒性中的作用

赵艳红 王京燕

【摘要】 目的 用嗜铬细胞瘤细胞(PC-12 细胞)、原代培养的大鼠神经元细胞和鼠脑线粒体作为体外模型观察线粒体跨膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)和细胞膜通透性改变在蒿甲醚引起的神经毒性中的作用。方法 用流式细胞仪测定蒿甲醚对线粒体跨膜电位和细胞膜通透性的影响,用分光光度法分析蒿甲醚对线粒体肿胀度的影响。结果 蒿甲醚能够降低两种细胞的 MMP,使其峰值左移,摄入的 Rh123 荧光强度降低,量效关系明显;能增加两种细胞的细胞膜通透性,使细胞内的 PI 摄入增加;能引起大鼠脑线粒体肿胀,有一定的时间-效应和剂量-效应关系。结论 MMP 下降是蒿甲醚引起神经毒性的重要环节,可通过影响线粒体膜通透性转运孔,改变线粒体跨膜电位和线粒体肿胀度,并能增加细胞膜通透性,引起细胞能量代谢障碍,最终导致神经毒性。

【关键词】 蒿甲醚;线粒体;MMP;膜通透性;膜肿胀

中图分类号:R978.6

文献标识码:A

Effect of Mitochondrial Membrane Potential in the Neurotoxicity of Artemether

ZHAO Yan-hong, WANG Jing-yan

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

【Abstract】 Objective To study the effect of mitochondrial membrane potential and cellular membrane permeability in the neurotoxicity of artemether. **Methods** Mitochondrial membrane potential and cellular membrane permeability in pheochromocytoma cell and primary cultured rat neuronal cell were measured by flow cytometry, using rhodamine 123(Rh123) and PI as fluorescent dye, respectively. Mitochondrial swelling was measured by spectrometer. **Results** Artemether could decrease the mitochondrial membrane potential and increase the cellular membrane permeability in both cell types in a dose-dependent manner. In addition, artemether led to mitochondrial swelling with dose-effect and time-effect relationships. **Conclusion** The decrease of mitochondrial membrane potential plays an important role in the neurotoxicity of artemether. The drug can change the mitochondrial membrane potential and mitochondrial swelling by affecting the permeability transition pore complex located in the mitochondrial membrane, increasing cellular membrane permeability, causing an obstruction and finally leading to neurotoxicity.

【Key words】 artemether, mitochondria, mitochondrial membrane potential, membrane permeability, membrane swelling

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39800119)

随着青蒿素类衍生物的广泛使用,对青蒿素类化合物和类似物的作用机制研究取得了不少进展,但在其毒性研究中提出了新的问题。国外有文献报道,大剂量肌肉注射蒿甲醚和蒿乙醚在犬、大鼠、恒河猴等动物模型上产生致死性神经毒性^[1,2]。这种毒性有高度选择性,主要损伤脑干神经元,对胶质细胞和其它部位的神经元影响较小。一些研究机构进行体外试验结果提示,青蒿素的其它衍生物也可能具有此类毒性。本文就其对线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)在神经毒性中的作用机制进行研究。

材料与方 法

1 动物

出生 12 h 内的 Wistar 大鼠,由军事医学科学院实验动物中心提供。

2 主要仪器与试剂

高速冷冻离心机(Beckman-15R),双波长分光光度计(Hitachi557),流式细胞仪(Becton-Dickinson FAC Scalibur),倒置显微镜(Olympus CK40)。蒿甲醚由昆明制药厂提供,用无水乙醇稀释至一定浓度;阿糖胞苷、DNA 酶 I、HEPES、荧光染料罗丹明 123(rhodamine 123)和碘化丙锭(PI)为 Sigma 公司产品;DMEM 低糖培养基和胰蛋白酶为 GibcoBRL 公司产品;马血清为 Hyclone 公司产品,其它均为市场所售分析纯试剂。

3 细胞和细胞培养

嗜铬细胞瘤细胞(pheochromocytoma cell, PC-12)从中科院药物所引进,培养体系以 DMEM 培养液为基础,加 100 kU/L 青霉素,100 mg/L 链霉素,3.7 g/L NaHCO₃,3.5747 g/L HEPES,按常规方法传代培养。

原代培养的神经元细胞^[3]:培养体系同 PC-12 细胞,培养方法如下:以 70% 乙醇浸泡消毒新生大鼠

基金项目:国家自然科学基金课题(No. 39800119)

作者单位:军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京 100071

2 min, 断头取脑分离出大脑皮层, 在加有 D-Hanks 液的青霉素小瓶内用眼科剪刀剪碎, 37 °C 静置 10 min, 吸去上清; 加入 30~50 倍体积的 0.125% 胰蛋白酶消化液和 200 μ l DNA 酶 I, 消化 15 min, 加入小牛血清终止消化(体积比为 10:1), 用吸管反复吹打, 至组织块基本消散为止, 用孔径为 75 μ m 的不锈钢网筛(200 目)过滤, 将滤过液于 1 000 g 离心 5 min, 吸去上清, 用 D-Hanks 液清洗两次后, 加入含血清的培养液制备成细胞悬液, 将细胞悬液计数后接种于培养瓶中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 1 d 后换液以去除悬浮的死亡细胞, 培养 2 d 后, 加入含有 3~5 μ g/ml 阿糖胞苷的培养液, 以抑制神经胶质细胞的生长, 然后 2 d 换一次新鲜的完全培养基, 细胞培养至 10~12 d 观察并开始以下实验。

4 流式细胞仪检测线粒体跨膜电位^[4]

将制备好的 PC-12 细胞和原代神经元细胞的含血清培养液换去, 加入不含血清的 DMEM 培养液, 分别加入终浓度为 0、100、200、400、800 μ mol/L 的蒿甲醚, 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 6 h, 用 0.125% 胰蛋白酶液将细胞消化下来, D-Hanks 液清洗 2 次后, 加 D-Hanks 液使每管内的液体体积为 0.5 ml, 加入浓度为 20 μ mol/L 的罗丹明 123, 37 °C、5% CO₂ 培养箱内孵育 30 min, 离心后用 PBS 清洗 2 次, 将细胞悬浮于 PBS 中, 终体积约 0.5 ml, 在流式细胞仪上检测罗丹明 123 的荧光强度。

5 流式细胞仪检测细胞膜通透性^[5]

将制备好的 PC-12 细胞和原代神经元细胞的含血清培养液换去, 加入不含血清的 DMEM 培养液, 分别加入终浓度为 0、100、200、400 μ mol/L 的蒿甲醚, 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 6 h, 用 0.125% 胰蛋白酶液将细胞消化下来, PBS 离心清洗 2 次, 用新鲜培养基重悬, 加入适量 PI(终浓度 50 μ g/ml) 37 °C 染色 30 min, 用流式细胞仪测定 PI 荧光强度。

6 大鼠脑皮层细胞线粒体的分离^[6]

整个制备过程均在 4 °C 下进行, 领取 200 \pm 10 g Wistar 雄性大鼠 1 只, 脱颈处死后断头取出脑组织; 分离大脑皮层, 加入匀浆缓冲液(体积比 9:1), 匀浆 15 次, 于 1 300 g 离心 10 min, 吸出上清液, 将沉淀再次匀浆, 离心后合并两次上清液, 于 1 300 g 离心 10 min; 收集上清液, 于 17 000 g 离心 15 min, 沉淀用匀浆缓冲液清洗 2 次, 重悬于匀浆缓冲液中; 用 Lowry 法测定线粒体蛋白质浓度, 将其浓度调至 1 mg/ml。

7 线粒体膜肿胀度的测定^[7]

新鲜制备线粒体, 未经冻融, 反应前 4 °C 放置, 设置 10、100、1 000 μ mol/L 蒿甲醚组和空白对照组, 每组 4 个线粒体样本, 每个样本中含线粒体蛋白 0.5 mg, 加入反应缓冲液(蔗糖 250 mmol/L, KH₂PO₄ 5 mmol/L, 琥珀酸钠 3 mmol/L, pH 7.2)至 3 ml, 记录 0、2、4、6、8、10、20 min 时 A₅₂₀ 值, 测定过程 25 °C 保持恒温。

8 数据处理

实验中数据用 SPSS 10.0 处理, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 图表用 Micro Origin 5.0 制作。

结 果

1 蒿甲醚对 PC-12 细胞和原代培养的大鼠神经元细胞线粒体跨膜电位的影响

流式细胞仪测定结果表明, 蒿甲醚 100、200、400、800 μ mol/L 与 PC-12 细胞和原代培养的神经元细胞共同孵育 6 h 后, 细胞荧光分析图与正常对照组相比左移(表示 MMP 下降), 荧光强度值和正常细胞数与对照组相比均有明显下降($P < 0.05$)(图 1)。

2 蒿甲醚对 PC-12 细胞和原代培养的神经元细胞膜通透性的影响

蒿甲醚 100、200、400 μ mol/L 与 PC-12 细胞和原代培养的神经元细胞共同孵育 6 h 后, 细胞荧光分析图与正常对照组相比右移(表示膜通透性增加), 荧光强度值与对照组相比明显增大, 正常细胞数减少(见表 1)。

3 蒿甲醚对大鼠脑线粒体肿胀度的影响

线粒体膜的肿胀度反映了线粒体膜瞬时孔道的开放程度, 是线粒体功能的反映, 线粒体肿胀导致其浊度降低, 表现为 520 nm 处吸光值的下降。蒿甲醚 10、100、1 000 μ mol/L 终浓度加入线粒体悬液后, 可引起线粒体肿胀, 在 20 min 观察时间内, A₅₂₀ 的变化与正常对照相比明显降低, 且有一定的剂量-效应关系。

讨 论

线粒体是真核细胞的重要细胞器, 能量转换的主要场所, 也是许多外来化合物最敏感、最早受到累及的靶点^[8]。神经细胞因其功能的特殊性, 对能量的减少极为敏感, 能量代谢障碍极易引起神经元的死亡。目前研究发现线粒体缺陷与多种神经退行性疾病的发生密切相关, 并广泛存在于神经退行性疾病中, 如阿耳茨

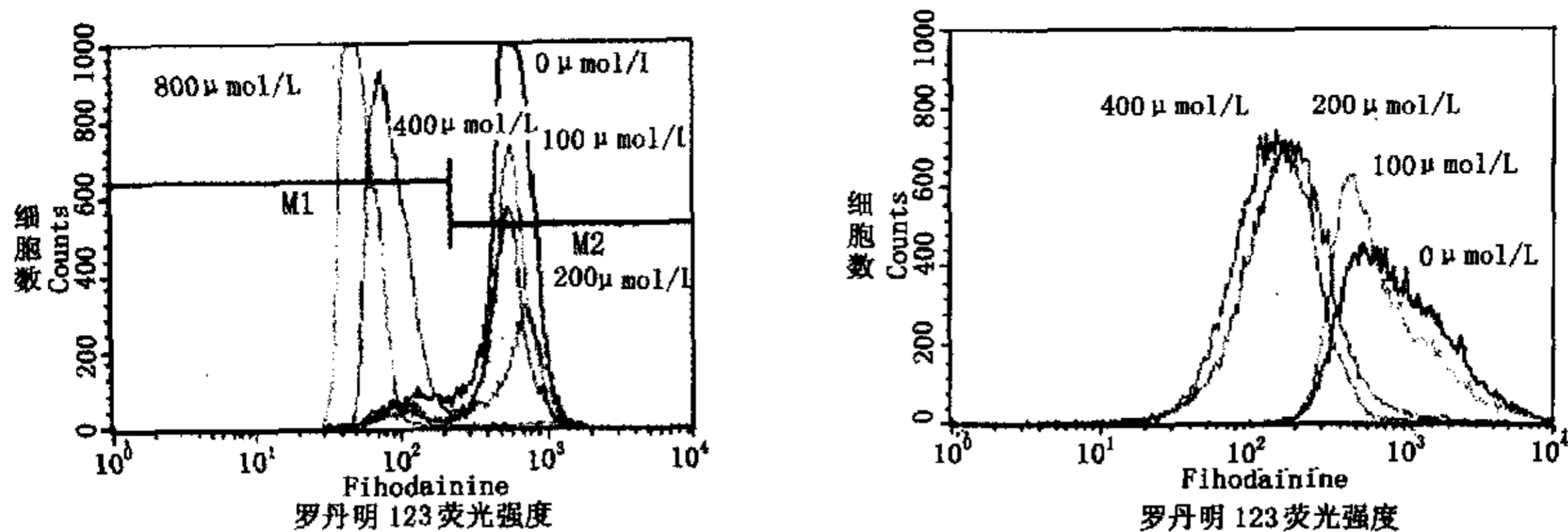


图 1 蒿甲醚对 PC-12 细胞(左)和原代培养的大鼠神经元细胞(右)线粒体跨膜电位的影响

Fig. 1 Effect of artemether on mitochondrial membrane potential in pheochromocytoma cell (left) and primary cultured rat neuronal cell (right)

表 1 蒿甲醚对 PC-12 细胞和原代培养的大鼠神经元细胞膜通透性的影响

Table 1 Effect of artemether on membrane permeability in pheochromocytoma cell and primary cultured rat neuronal cell

组别 Group	荧光强度(单位) Fluorescence intensity (units)		正常细胞数 No. normal cells	
	PC-12 细胞 PC-12 cells	原代细胞 Primary cultured cells	PC-12 细胞 PC-12 cells	原代细胞 Primary cultured cells
对照组 Control	4.13 ± 2.08	4.75 ± 1.96	9 965 ± 157	9 999 ± 113
100 μmol/L	176.28 ± 132.32 *	214.75 ± 182.59 *	9 229 ± 991 *	9 468 ± 870 *
200 μmol/L	471.15 ± 282.59 *	498.22 ± 375.55 *	8 840 ± 875 *	7 658 ± 750 *
400 μmol/L	820.38 ± 475.55 *	931.08 ± 538.98 *	2 382 ± 1224 *	1 892 ± 1029 *

n = 4, * P < 0.05

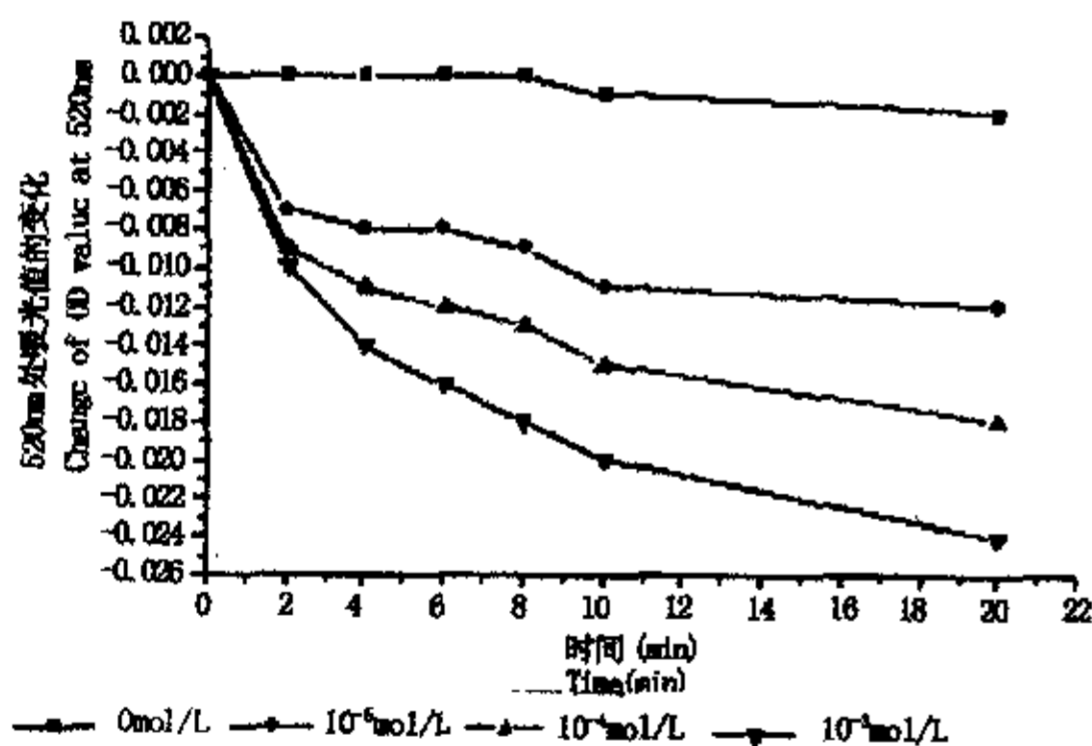


图 2 蒿甲醚对大鼠脑皮层细胞线粒体肿胀度的影响

Fig. 2 Effect of artemether on mitochondrial swelling of rat cerebral cortex cell

海默病、帕金森病和亨廷顿病等与脑内线粒体氧化磷酸化异常有关,这一观点已得到广泛认同,但不同疾病发生病变的部位也常位于各自疾病的相关脑区^[9]。

对于蒿甲醚的进一步病理研究发现这种神经毒的毒性具有高度的区域性和细胞特异性,病变分布在网状结构、前庭系统和听觉系统^[2],主要损伤脑干神经元,对胶质细胞和其它部位的神经元影响较小^[10]。透射电镜下发现另一种青蒿素类药物——双氢青蒿素可损伤 Nb2a 细胞的线粒体嵴和内质网^[11], McLean 等^[12]在电镜下观察到双氢青蒿素在神经元细胞中的靶点为线粒体膜和内质网,本实验室在进行蒿甲醚的

病理学研究中也发现蒿甲醚可损伤 PC-12 细胞和原代培养的神经元细胞的线粒体,提示线粒体可能是青蒿素类药物引进神经毒性的靶点。

线粒体基质的三羧酸循环酶系通过底物脱氢氧化生成 NADH。NADH 通过线粒体内膜呼吸链氧化,同时导致跨膜质子移位形成跨膜质子梯度和/或跨膜电位,线粒体内膜上的 ATP 合成酶利用跨膜质子梯度能量合成 ATP。合成的 ATP 通过线粒体内膜 ADP/ATP 载体与细胞质中 ADP 交换进入细胞质,参与细胞的各种需能过程^[13]。

MMP 的维持是其进行氧化磷酸化产生 ATP 的先决条件。线粒体膜通透性转运孔(MPTP)是一种跨膜多蛋白孔, MPTP 能通过小于 1 500 kDa 分子量的非特异物质,正常情况下允许质子自由通过线粒体膜,从而在线粒体内外造成电势差,形成稳定的 MMP。当某些因素的刺激时, MPTP 开放,造成离子和其他物质异常释放,线粒体内外电荷分布紊乱,线粒体膜除极化,最后 MMP 降低或丧失。因此可通过检测 MMP 来观察 MPTP 的变化^[14]。Rh123 是一种亲脂性荧光染料,在生理条件下带 1 个正电荷,能顺利通过活细胞的细胞膜和线粒体膜,进入细胞后,可以选择性地富集在线粒体上,线粒体富集 Rh123 的量随线粒体膜电位的变化而变化,因此测定线粒体 Rh123 的荧光强度,可以反映线粒体的膜电位及其变化情况^[15,16]。本研究结果显示,经蒿甲醚处理过的

PC-12 细胞和原代培养的大鼠神经元细胞中 Rh123 的荧光强度呈剂量依赖性的降低,提示蒿甲醚可引起神经元细胞线粒体膜电位的下降,进而导致神经元细胞损伤甚至死亡而引起神经毒性。

MPTP 的开放不仅可以改变线粒体跨膜电位,而且能使线粒体通透性发生改变,水进入线粒体基质,引起线粒体肿胀变大^[17]。线粒体膜的肿胀度反映了线粒体膜瞬时孔道的开放程度,是线粒体功能的反映。本研究中蒿甲醚能够引起线粒体肿胀,并有明显的时间-效应和剂量-效应关系。

外源性化合物对细胞质膜的损伤必然导致细胞质膜结构上的改变和功能上的异常,从而影响细胞的生命活动。当细胞膜受到损伤时,其完整性被破坏,通透性增高,对 PI 的摄入量增加,因此可通过测定 PI 荧光强度的变化来反映细胞膜通透性的变化。本研究显示,经蒿甲醚处理过的 PC-12 细胞和原代培养的大鼠神经元细胞中 PI 的荧光强度随药物浓度的升高而增强,说明蒿甲醚可破坏细胞膜完整性,使细胞膜通透性增高。

综上所述,体外实验研究中证明蒿甲醚在高剂量下有神经毒性,线粒体是蒿甲醚在神经元细胞的靶点,可通过影响线粒体膜通透性转运孔,改变线粒体跨膜电位和线粒体通透性,并能增加细胞膜通透性,最终导致神经毒性。但是,目前尚未发现临床治疗中该类药物对人有神经毒性。并且青蒿素类药物引起神经毒性的药物剂量远高于实验动物治疗剂量,说明临床剂量下使用蒿甲醚安全无毒性。

参 考 文 献

[1] Thomas GB, James OP. Neurotoxicity in animals due to arteether and

- artemether[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1994, 88(Suppl 1):33-36.
- [2] Petras JM, Kyle DE. Arteether: risks of two-week administration in *Macaca mulatta*[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, 56:390-396.
- [3] 郑健,董为伟. 新生大鼠皮质-基底神经细胞的分散培养观察[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19:459-460.
- [4] 张兰,李林,班立勤,等. 叠氮钠对 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞线粒体跨膜电位的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2000, 22:436-439.
- [5] 马靖,符乃阳,庞大本,等. 钙池排空操纵的外钙内流决定甘草诱导 MGC-803 细胞凋亡[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17:230-236.
- [6] Angeles A, Jose MM. A rapid method for the isolation of metabolically active mitochondria from rat neurons and astrocytes in primary culture[J]. *Brain Res Protocols*, 1998, 2:209-214.
- [7] 冯卫红,刘耕陶. N-甲基-4-苯基 1,2,3,6-四氢吡啶及多巴胺体外引起大鼠脑线粒体损伤作用[J]. 药学学报, 2000, 35:11-17.
- [8] Carni R, Parola M, Dianzani MU, et al. Mitochondrial damage and its role in causing hepatocyte injury during stimulation of lipid peroxidation by iron nitroacetate[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 297:110-118.
- [9] 张兰,李林,刘树森,等. 叠氮钠对培养神经细胞微管结构和细胞存活率的影响[J]. 中国神经科学杂志, 2000, 16:257-262.
- [10] Wesche DL, DeCoster MA, Tortella FC, et al. Neurotoxicity of artemisinin analogs *in vitro*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38:1813-1819.
- [11] Fishwick J, Edwards G, Ward SA, et al. Morphological and immunocytochemical effects of dihydroartemisinin on differentiating Nb2a neuroblastoma cells[J]. *Neurotoxicology*, 1998, 19:393-403.
- [12] McLean WG, Ward SA. *In vitro* neurotoxicity of artemisinin derivatives[J]. *Med Trop (Mars)*, 1998, 58(Suppl 3):28-31.
- [13] 林其谁. 线粒体与细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999, 31:116-118.
- [14] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death[J]. *Biochem J*, 1999, 341:233.
- [15] Roberta LG, Daniel A. A digitized fluorescence imaging study on the effect of local anesthetics on cytosolic calcium and mitochondrial membrane potential in cultured rabbit corneal epithelial cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994, 129:23-25.
- [16] Rahn CA, Bombick DW, Doolittle DJ. Assessment of mitochondrial membrane potential as an indicator of cytotoxicity[J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1991, 16:435-438.
- [17] 孟文彤. 线粒体膜通透性转运孔的研究进展[J]. 国外医学输血及血液学分册, 2001, 24:149-151.

(收稿日期:2002-12-23 编辑:伯韦)

《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》征稿征订启事

《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》是卫生部主管、中华预防医学会和中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所主办的寄生虫学与寄生虫病专业性学术期刊。1983 年创刊,主要报道有关人体寄生虫学与寄生虫病的研究成果和防治经验,介绍新理论、新技术和新进展,以推动寄生虫病防治科研工作,提高专业人员的业务水平及促进国内外学术交流。设立了论著、实验报道、临床研究、流行病学调查、综述、论著摘要、简报、病例报告等栏目。该刊被入选中国生物医学核心期刊、中国基础医学类核心期刊,并为中国科学引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库和中国科技论文统计源来源期刊,中国学术期刊(光盘版)全文收录。欢迎全国各地相关科研人员来稿或订阅并提出宝贵意见。

本刊为双月刊,大 16 开,64 页,每期定价 9.00 元,全年 54 元。国内统一刊号:CN31-1248/R,国际标准刊号 ISSN1000-7423。全国各地邮局订购,邮发代号:4-362。如错过征订机会,可直接向本编辑部邮购。

编辑部地址:上海市瑞金二路 207 号中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》编辑部。

邮编:200025

电话:021-64377008 转 1306,1305,021-54562376

传真:021-64332670

E-mail: jsczz@sh163.net, jsczz@yahoo.com.cn