

· 论 著 ·

不同聚集形式 β -淀粉样肽对人 SH-SY5Y 细胞发动蛋白 I 和突触素表达的影响*

曹颖^{1,2}, 廖媛¹, 肖雁³, Rivka Ravid⁴, 官志忠^{1,3,△}

(1. 贵阳医学院病理教研室 550004; 2. 贵州省人民医院病理科, 贵阳 550002;

3. 贵阳医学院分子生物学重点实验室 550004; 4. 荷兰神经科学研究所, 阿姆斯特丹 999025)

摘要:目的 探讨不同聚集形式的 β -淀粉样肽(A β)对人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y 细胞)发动蛋白 I (Dyn I)和突触素(Syn)表达的影响。方法 制备不同聚集形式的 A β_{1-42} 处理 SH-SY5Y 细胞,采用蛋白质印迹法检测细胞中 Dyn I 及 Syn 蛋白表达水平;采用免疫组织化学染色方法检测 10 例阿尔茨海默病(AD)患者及 8 例老年同龄对照者尸解后脑海马结构中 β -淀粉样肽寡聚体(A β O_s)表达水平。结果 A β 单体或 A β 纤维丝体处理 SH-SY5Y 细胞未见 Dyn I 及 Syn 蛋白表达水平显著变化, A β O_s 处理细胞可见 Dyn I 及 Syn 蛋白表达水平降低($P < 0.05$); AD 患者海马及内嗅区皮质神经元内 A β O_s 的表达显著高于老年对照者($P < 0.05$)。结论 细胞内表达的 A β O_s 可能是引起 AD 患者脑中网格蛋白内吞调节蛋白——发动蛋白 I 表达下降及突触丧失的主要 A β 神经毒性形式,该改变可能与 AD 发病机制中学习能力减退有关。

关键词:阿尔茨海默病;突触蛋白类; β -淀粉样肽寡聚体;发动蛋白 I

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.32.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)32-3227-03

Effects of different assembly forms of β -amyloid peptide on dynamin I and synaptophysin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells*

Cao Ying^{1,2}, Liao Yuan¹, Xiao Yan³, Rivka Ravid⁴, Guan Zhizhong^{1,3,△}

(1. Department of Pathology, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. Department of

Pathology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China;

3. Department of Molecular Biology, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, China;

4. Netherlands Institute for Neurosciences, Amsterdam 999025, Netherlands)

Abstract: Objective To investigate the effects of different assembly forms of β -amyloid peptide(A β_{1-42}) on dynamin I (Dyn I) and synaptophysin(Syn) in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Methods** The Dyn I and Syn protein levels were measured by western blotting in human SH-SY5Y neuroblastoma cells treated with different assembly forms of A β_{1-42} . β -amyloid oligomers (A β O_s) in the hippocampal formation of ten cases of postmortem brains with Alzheimer Disease (AD) and eight cases without any neuronal disorders as age-matched controls were detected by immunohistochemical method. **Results** The Dyn I and Syn protein levels were significantly declined in SH-SY5Y cells treated with A β O_s($P < 0.05$), but not A β monomer and fibril. The A β O_s-like immunoreactivity was significantly increased in the pyramidal cell of hippocampus and neuronal cells of the entorhinal cortex in AD patients as compared to controls($P < 0.05$). **Conclusion** Intracellular A β O_s may be the main toxic form of A β , which reduced clathrin endocytosis regulated protein Dyn I and synaptic loss, and might be a mechanism in connection with cognitive deficit of AD.

Key words: alzheimer disease; synapsins; β -amyloid oligomers; dynamin I

阿尔茨海默病(alzheimer disease, AD)是一种神经元进行性变疾病,主要临床表现为进行性认知功能障碍。AD 患者脑中典型神经病理学特征是老年斑及神经原纤维缠结。研究显示,AD 患者认知功能障碍的病理学基础可能是突触病理改变^[1],但引起 AD 患者脑中突触病变的具体分子机制却并不十分清楚。目前,可溶性 β -淀粉样肽寡聚体(β -amyloid oligomers, A β O_s)被认为可能是引起 AD 患者脑神经元功能失调的主要神经毒性物质,并与突触丧失也存在很强的相关性^[2]。为了探讨 AD 患者脑中突触病变的可能机制,作者参照文献制备不同聚集形式 β -淀粉样肽(β -amyloid peptide, A β)处理人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y 细胞),采用蛋白质印迹法检测细胞内网格蛋白内吞调节蛋白——发动蛋白 I (dynamin I, Dyn I)和突触素(synaptophysin, Syn)的表达,免疫组织化学染色方法检测 AD 患者脑中海马组织 A β O_s 的表达。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 A β_{1-42} 肽、六氟异丙醇(hexafluoro-2-propanol, HFIP)购自 Sigma 公司;鼠抗人 Dyn I、兔抗人 Syn、兔抗人 β -actin、兔抗人 A11(A β O_s 特异性抗体)及鼠抗人 A β_{1-42} 抗体分别购自 Santa Cruz、Epitomics、Sigma、MBL 及 Dako 公司;Cy3 及 FITC 标记抗鼠、抗兔 IgG 荧光二抗购自碧云天生物技术研究所;SH-SY5Y 细胞购于 German Collection of Microorganisms and Cell Cultures 公司;胎牛血清及 DMEM 培养基购自 HyClone 公司;免疫组织化学染色 SP 法二抗试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;真空浓缩离心机购自 MBL 公司。

1.2 标本取材 由荷兰 Amsterdam 脑库提供,其中 AD 组 10 例,平均年龄为(81.8 \pm 7.3)岁,经临床和病理学诊断为 AD;老年同龄对照组(对照组)8 例,平均年龄为(79.8 \pm 12.8)岁,

表 1 各组大脑海马不同区域中 A β O_s 的表达 ($\bar{x} \pm s$, 灰度值)

组别	DG	CA4	CA3	CA1	EC	
					I~III	IV~VI
对照组	179 \pm 15	183 \pm 10	172 \pm 11	187 \pm 11	189 \pm 15	188 \pm 12
AD 组	176 \pm 12	156 \pm 11**	157 \pm 16*	156 \pm 17**	159 \pm 14**	162 \pm 16*

DG: 齿状回; EC: 内嗅区皮质; **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$, 与对照组相比。

经临床和病理学诊断排除神经系统疾患。AD 组和对照组死后尸解平均延迟时间分别为 (4.9 \pm 1.1)h 和 (7.1 \pm 2.8)h。脑组织固定于中性甲醛液, 脱水后石蜡包埋, 制作 4 μ m 石蜡切片。

1.3 不同聚集形式 A β_{1-42} 的制备及鉴定^[3] A β_{1-42} 室温平衡 1 h, 无菌条件下溶于 HFIP, 制备为 1 mmol/L 浓度, 真空浓缩离心机抽干后 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。用前加入二甲基亚砜反复吹打至 A β_{1-42} 充分溶解, 加入无血清无酚红的 DMEM 培养基稀释到 100 μ mol/L, 立即涡旋 30 s, 即为单体; 加入 10 mmol/L 盐酸稀释 A β 到 100 μ mol/L, 立即涡旋 30 s, 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 即为纤丝体; 加入无血清无酚红的 DMEM 培养基稀释到 100 μ mol/L, 立即涡旋 30 s, 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 即为寡聚体。采用抗体 A β_{1-42} 及 A11 对制备的 A β_{1-42} 单体、纤丝体及寡聚体进行免疫荧光染色鉴定, 一抗 A β_{1-42} 及 A11 工作浓度均为 1:50, 按照说明书进行操作。

1.4 细胞培养及实验分组 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养 SH-SY5Y 细胞; 待细胞生长稳定后, 改用不含血清的 DMEM 培养液继续培养 12 h。分别将 1 μ mol/L 的 A β_{1-42} 单体、纤丝体及寡聚体加入不含血清的 DMEM 培养液中处理细胞 48 h, 对照组用不含血清的 DMEM 培养液孵育细胞 48 h, 不加其他处理因素。

1.5 各组细胞中 Dyn I 及 Syn 蛋白表达检测 采蛋白质印迹法检测各组细胞 Dyn I、Syn 及 β -actin 蛋白表达。结果用 GDS-8000 型 UVP 凝胶成像系统照像, 用 Labworks 软件分析结果时以 β -actin 蛋白条带作为内参照, 计算 Dyn I、Syn 蛋白条带与 β -actin 蛋白条带像素灰度的百分比值作为蛋白表达的相对水平。

1.6 各组大脑海马结构中老年斑和 A β O_s 的表达检测 采用免疫组织化学染色 SP 法, 按照说明书进行操作。一抗 A β_{1-42} 及 A11 工作浓度分别为 1:50 及 1:200, A β_{1-42} 采用 90% 甲醛浸泡 5 min 抗原修复, A11 采用高压 3 min 抗原修复。用已知阳性的 AD 患者海马作阳性对照, 磷酸二氢盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作阴性对照。A11 免疫表达通过 Biomias 2000 图像分析系统 (四川大学图像图形研究所开发) 计算平均灰度值进行蛋白半定量分析。

1.7 统计学处理 结果应用 SPSS15.0 统计软件进行统计学处理, 组间比较采用 t 检验或方差分析进行处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

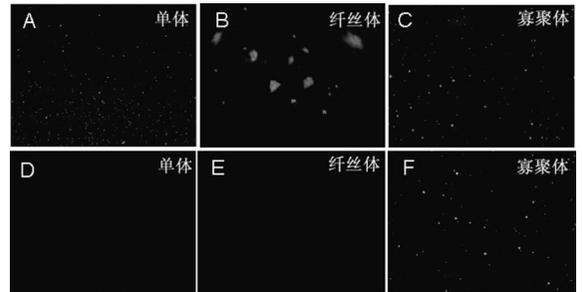
2 结果

2.1 不同聚集形式 A β_{1-42} 的鉴定 免疫荧光检测结果显示, 制备的 A β 单体可见细小颗粒状 A β_{1-42} 红色荧光, 见图 1A, 未见 A11 绿色荧光出现, 见图 1D; A β 纤丝体可见粗大的类球形或大颗粒状 A β_{1-42} 红色荧光, 见图 1B, 未见 A11 绿色荧光出现, 见图 1E; A β 寡聚体可见较小的圆形、颗粒状的 A β_{1-42} 红色荧光和 A11 绿色荧光, 见图 1C、F。

2.2 不同聚集形式 A β_{1-42} 对 SH-SY5Y 细胞 Dyn I 和 Syn 蛋白表达的影响 1 μ mol/L A β_{1-42} 单体及纤丝体处理 SH-SY5Y 细胞 48 h, Dyn I 和 Syn 蛋白表达略有降低, 与对照组比较差

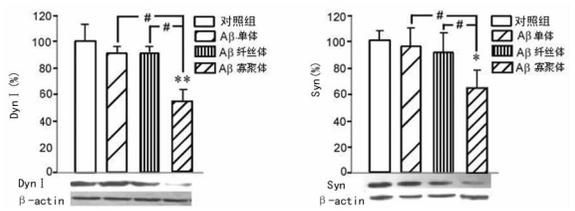
异无统计学意义 ($P > 0.05$); 1 μ mol/L A β_{1-42} 寡聚体处理 SH-SY5Y 细胞 48 h, Dyn I 和 Syn 蛋白表达水平显著降低, 较对照组分别降低 45% 和 36% ($P < 0.05$)。与 A β 单体或 A β 纤丝体处理组相比, A β 寡聚体处理组细胞 Dyn I 蛋白表达分别降低 41% 和 40% ($P < 0.05$), Syn 蛋白表达分别降低 33% 和 30% ($P < 0.05$)。各组细胞 Dyn I 与 Syn 蛋白表达水平, 见图 2。

2.3 各组大脑海马结构中老年斑及 A β O_s 的表达 对照组中仅 3 例出现少量老年斑, 均为弥散斑, 未见经典斑; 10 例 AD 组大脑海马结构细胞外间质中见大量的老年斑, 见图 3A, 以弥散斑多见。对照组及 AD 组齿状回颗粒细胞、海马 CA1-CA4 区锥体细胞及内嗅区皮质各层神经元胞体及突起内均见 A β O_s 呈棕黄颗粒状阳性表达; AD 组海马锥体细胞及内嗅区皮质各层神经元 A β O_s 表达较对照者明显增强, 见图 3B、C, 半定量分析结果显示平均灰度值显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。A β O_s 在对照组及 AD 组海马结构中平均灰度值见表 1。



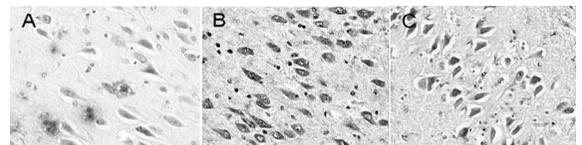
A、B、C: A β_{1-42} 免疫荧光染色; D、E、F: A11 免疫荧光染色。

图 1 不同聚集形式 A β_{1-42} 的免疫荧光鉴定 ($\times 400$)



** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$, 与对照组相比; # : $P < 0.05$, 与 A β 单体或纤丝体处理组相比。

图 2 经不同聚集形式 A β_{1-42} 处理的 SH-SY5Y 细胞 Dyn I 及 Syn 蛋白表达水平



A: AD 组细胞外间质老年斑; B: AD 组海马 CA1 锥体细胞 A β O_s 表达; C: 对照组海马 CA1 锥体细胞 A β O_s 表达。

图 3 两组大脑海马 CA1 区 A β O_s 表达 (SP $\times 200$)

3 讨论

突触结构的高度动力学可塑性及突触传递中相应结构改变是学习记忆的基础。突触前神经元通过突触终末突触囊泡

(SVs)的胞吐作用释放完神经递质后,再通过内吞重新吸纳 SVs 回突触内部,参与新一轮囊泡的形成和循环。实验已证实,网格蛋白介导的内吞机制是神经元回收 SVs 的主要方式^[4],Dyn 正是该内吞机制中已知的最关键的蛋白之一。Dyn 是一个相对分子质量 100 000 的三磷酸鸟苷(GTP),其主要作用是对已被网格蛋白的 SVs 进行机械挤压并剪切,将已被网格蛋白包被的 SVs 从突触前膜上脱离下来。Dyn 含 3 个成员,Dyn I 主要存在于神经组织内。Syn 是一种 38 kD 的钙结合蛋白,在神经元胞体合成后主要转运至轴突终末,特异性地位于脑内所有神经元轴突终末的突触前囊泡膜上,常作为突触前终末特异性标记物对突触含量进行定量分析。研究显示,AD 患者脑中 Dyn I 及 Syn 蛋白表达显著降低,提示 AD 患者脑中存在网格蛋白介导的内吞功能的低下和一定程度的突触联系丧失,最终导致学习记忆能力的减退^[5-6]。

目前,引起 AD 患者脑中网格蛋白内吞功能低下和突触丧失的原因并不十分清楚。近年来 A β 病因学说在 AD 发病机制中逐渐占据主流地位。体内外研究均已证实,A β 具有破坏细胞膜的完整性、扰乱细胞内环境的稳定、诱导细胞发生凋亡等方面的神经毒性作用,可能是引发 AD 一系列病理改变的关键因素。A β 细胞外间质沉积形成老年斑致 AD 是脑组织中典型神经病理学改变,老年斑主要由纤维状的 A β 构成。而临床研究却表明,老年斑的数目与 AD 患者病情严重程度间仅存在弱相关性;转基因动物脑内形成明显的淀粉样斑块前就已经出现了学习记忆功能的减退^[7]。A β 由 β 淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein,APP)通过 β -和 γ -分泌酶剪切产生,最初以可溶性单体形式存在,但在一定的条件下(如合适的 pH 值、温度、浓度、时间及某些金属离子的作用),A β 肽就会聚集,在最终形成老年斑的过程中,A β 分子经历了从可溶状态到不溶性纤维的转变。因此,AD 患者脑内的 A β 可以单体、可溶性寡聚体和不可溶性淀粉样纤维(纤维体)等多种形式存在。在过去的几年里,人们逐渐认识到发挥 A β 神经毒性作用的主要形式可能是其可溶性寡聚体形式^[2]。

为了比较各种聚集形式的 A β 对 AD 突触病变的影响,本研究参照文献体外制备不同聚集状态的 A β ,通过氟化的醇类(HFIP)处理打断原聚合状态的 A β 重新溶解于培养基,在生理 PH 值和盐离子浓度下,不经孵育呈现为均一的单体形式;经过 24 h 的低温孵育,大部分的 A β 变为不均一、较单体稍大的寡聚体形式;因为酸性的环境有利于纤维体的形成,HFIP 处理后重新溶解于 10 mmol/L HCl 的 A β ,37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后形成了较大的纤维状结构。经 A β_{1-42} 及 A11 抗体的免疫荧光检测,结果显示已经成功制备了 A β 3 种聚集形式。将 3 种聚集形式的 A β_{1-42} 孵育 SH-SY5Y 细胞 48 h,与对照组相比,A β 单体或 A β 纤维体形式均未能引起 Dyn I 和 Syn 蛋白表达水平发生显著改变,而 A β 寡聚体形式引起 Dyn I 和 Syn 蛋白表达水平的显著降低。上述结果提示:A β 寡聚体形式可能是影响网格蛋白内吞调节蛋白——Dyn I 表达降低和突触丧失的主要 A β 毒性形式。

Walsh 等^[8]的研究显示,寡聚化的 A β 开始出现在细胞内而非细胞外。本研究对 AD 患者的免疫组织化学检测结果也显示 A β O 主要在神经细胞内表达,与细胞外老年斑位置并不重叠,而 AD 组患者海马结构中海马神经元 A β O 表达显著高于对照组。Kokubo 等^[9]在电镜下观察到,AD 患者可溶性 A β O 的表达明显高于对照者,主要在神经元轴突及轴突终末

表达。A β O 在细胞内的高表达及超微结构上的定位提示 A β O 可能与神经元的突触功能不良有关,最终导致认知功能下降。有学者认为可溶性 A β O 可能在早期发挥了突触的毒性作用,构成老年斑的 A β 纤维体可能是 AD 病变过程中 A β 形成增加和清除障碍的结果,或者是机体为了对抗 A β O 的神经毒性作用而采取的将细胞内 A β 排到胞外的一种保护机制^[10]。

综上所述,本研究结果显示细胞内 A β O 可能是引起 AD 患者脑中网格蛋白内吞调节蛋白——Dyn I 表达下降及突触丧失的主要神经毒性物质。对 AD 患者脑内 A β O 突触毒性分子机制深入研究,以期对 AD 的治疗提供新的靶点。

参考文献:

- [1] Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, et al. A β oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(4): 796-807.
- [2] Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior[J]. *Behav Brain Res*, 2008, 192(1): 106-113.
- [3] Stine WB Jr, Dahlgren KN, Krafft GA, et al. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(13): 11612-11622.
- [4] Schweizer FE, Ryan TA. The synaptic vesicle: cycle of exocytosis and endocytosis[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2006, 16(3): 298-304.
- [5] Yao PJ. Synaptic frailty and clathrin-mediated synaptic vesicle trafficking in Alzheimer's disease[J]. *Trends Neurosci*, 2004, 27(1): 24-29.
- [6] 曹颖, Rivka Ravid, 官志忠. 阿尔茨海默病患者脑组织中突触蛋白表达改变[J]. *中华病理学杂志*, 2009, 38(12): 833-834.
- [7] Billings LM, Oddo S, Green KN, et al. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice[J]. *Neuron*, 2005, 45(5): 675-688.
- [8] Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, et al. The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(35): 10831-10839.
- [9] Kokubo H, Kaye R, Glabe CG, et al. Oligomeric proteins ultrastructurally localize to cell processes, especially to axon terminals with higher density, but not to lipid rafts in Tg2576 mouse brain[J]. *Brain Res*, 2005, 1045(1-2): 224-228.
- [10] Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(2): 101-112.