

# $\beta$ -淀粉样蛋白寡聚体对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞 Munc-18 表达的调节

钱淑文 冯 琼 朱粹青\*

(复旦大学上海医学院医学神经生物国家重点实验室, 上海 200032)

**摘要** 为了观察阿尔茨海默病(AD)起始因素 $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )对 Munc-18 表达的调节作用, 采用 Zn<sup>2+</sup> 诱导制备 A $\beta$  寡聚体, 分化的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞经纳摩尔浓度 A $\beta$  寡聚体作用后用免疫印迹和流式细胞术的方法检测 SH-SY5Y 细胞的 Munc-18 蛋白水平, 用 MTT 法分析纳摩尔浓度 A $\beta$  寡聚体的细胞毒性。结果发现, 1 nmol/L A $\beta$  寡聚体作用 1 天后, SH-SY5Y 细胞的 Munc-18 蛋白水平明显下调, 随后逐渐增加。高浓度的 A $\beta$  寡聚体也有相似的作用效应, 但抑制 Munc-18 蛋白表达的效应更明显。另外, 相同浓度 A $\beta$  单体对 Munc-18 表达没有明显的影响, 纳摩尔浓度的 A $\beta$  寡聚体也没有对细胞代谢产生显著的抑制。结果表明, 纳摩尔水平 A $\beta$  寡聚体对 Munc-18 的表达有调节作用。

**关键词**  $\beta$ -淀粉样蛋白; 寡聚体; Munc-18

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的主要病理变化是脑内老年斑(senile plaque, SP)和神经元纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)大量形成, 神经元减少, 神经递质系统受损。AD 脑病理机制中, 一般认为 $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )是 AD 的起始因素<sup>[1]</sup>。以前对 A $\beta$  毒性的研究集中在纤维状的 A $\beta$  (fibrillar A $\beta$ ), 认为其是 A $\beta$  的毒性形式。以后有许多实验证明了 A $\beta$  聚集为寡聚体时就已具有神经毒性作用, 并且 A $\beta$  寡聚体与 AD 脑神经元功能损害可能具有更为直接的联系<sup>[2]</sup>。Munc-18 是 Sec1 蛋白的哺乳动物同源物, Munc-18 在突触部位与 Syntaxin1 相互作用参与膜融合<sup>[3]</sup>, 调节递质释放。其次, Munc-18 也是 Tau 蛋白激酶 Cdk5 的激活物, 也参与淀粉样蛋白前体蛋白( $\beta$ -amyloid precursor protein, APP)代谢<sup>[4]</sup>。有研究发现在早期 AD 脑内就有 Munc-18 表达和分布的异常<sup>[5]</sup>, 提示 Munc-18 可能参与早期 AD 脑内的病理改变的机制。本实验旨在探讨 A $\beta$  寡聚体是否可引起 Munc-18 表达的改变, 以期对认识 AD 的病理机制有进一步的提示。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SH-SY5Y 细胞株购自 ATCC 公司, DMEM 干粉培养基购自 Gibco BRL 公司, A $\beta$ <sub>1-40</sub> 肽段、 $\beta$ -肌动

蛋白抗体和视黄酸(retinoid acid, RA)购自美国 Sigma 公司, 兔抗 Munc-18 抗体购自 Calbiochem-Novabiochem 公司, FITC 和辣根过氧化物酶标记二抗均购自 Santa Cruz 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 A $\beta$ 寡聚体的制备和鉴定** 参照 Bush 等<sup>[6]</sup>的方法, A $\beta$ <sub>1-40</sub> 肽段贮存液和 ZnCl<sub>2</sub> 溶液混合, A $\beta$  终浓度为 1.6  $\mu$ mol/L、Zn<sup>2+</sup> 为 25  $\mu$ mol/L、pH 7.4, 37  $^{\circ}$ C 温育 30 min, 使其聚集。经 Zn<sup>2+</sup> 诱导聚集的 A $\beta$  和未经处理的 A $\beta$  用 15% 的 Tricine-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 胶用银染法显色鉴定。

**1.2.2 细胞培养** SH-SY5Y 细胞, 接种于 50 ml 培养瓶中, 置于 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。培养液为 DMEM 培养液, 含 10% 的新生牛血清, 100 UI/ml 青霉素, 100  $\mu$ g/ml 链霉素。细胞按 1  $\times$  10<sup>5</sup> 个/孔的密度接种在 6 孔板上, 24 h 后加入 RA, 终浓度为 10  $\mu$ mol/L, 诱导分化, 每隔 2 天更换一次培养液。7 天后加入不同浓度的 A $\beta$  寡聚体、A $\beta$  单体或 Zn<sup>2+</sup> 温育, 在不同时间点收集细胞, 进行分析。

收稿日期: 2004-06-21 接受日期: 2004-10-25

国家自然科学基金(No.739830450)和国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No.G199905400)资助

\* 通讯作者。Tel: 021-54237224, E-mail: cqzhu@shmu.edu.cn

**1.2.3 免疫印迹** SH-SY5Y细胞用裂解液RIPA 缓冲液(50 mmol/L Tris-Cl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% 去氧胆酸钠, 5 mg/ml 胃抑肽, 10 mg/ml 亮抑肽, and 1 mg/ml PMSF)处理, 收集裂解液 12 000 r/min、4 °C离心 10 min, 取上清液, 考马斯亮蓝结合法蛋白质定量。取等量总蛋白质进行 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 50 g/L 的脱脂奶粉封闭 1 h, Munc-18 抗体(1:500) 4 °C温育过夜, 抗兔 IgG-HRP 的二抗(1:1000)室温作用 1 h, ECL 显影。用同样的方法显示  $\beta$ -肌动蛋白(1:1000)作为参照。每组实验重复 3 次, 对 ECL 显色的阳性条带进行灰度分析。

**1.2.4 流式细胞术检测** 以 1 nmol/L  $A\beta$ 寡聚体温育细胞 1 天、2 天和 3 天, 用胰蛋白酶/EDTA 消化液将细胞分散成、吹打成单细胞悬液, PBS 洗涤 1 次, 将细胞悬于预冷的 4% 多聚甲醛, 固定 30 min, 1500 r/min 离心 5 min, 弃固定液, PBS 洗涤 2 次, 细胞重悬, 加兔抗 Munc-18 一抗(抗体稀释液: PBS/5% 牛血清白蛋白/0.1% Triton X-100), 冰上温育 30 min, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 含 5% 牛血清白蛋白的 PBS 洗涤 1 次, 细胞重悬, 加兔抗 IgG-FITC, 冰上温育 30 min, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, PBS 洗涤 2 次, 每份细胞用 200 ml PBS 重悬, 流式细胞仪(FACS-Calibus B.D.)检测。计算门内细胞的荧光强度, 荧光强度 = 样品荧光强度 - 阴性对照荧光强度。

**1.2.5 MTT 测定** SH-SY5Y 细胞按  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中, 每组 6 孔, 24 h 后 RA 分化 7 天, 含 1 nmol/L 和 5 nmol/L  $A\beta$ 寡聚体的培养液 100 ml 分别处理 1 天和 3 天。然后加入 10 ml 5 mg/ml MTT, 继续培养 4 h, 吸弃上清液, 裂解液(20% SDS, 50% 二甲基甲酰胺, 3.3 mmol/L HCl)充分裂解细胞, Bio-Rad Model 450 酶标仪测  $A_{570}$  值。

**1.2.6 统计学处理** 量化数据进行  $t$  检验分析,  $P < 0.05$  为有统计学显著性差异, 图表中数据以平均数  $\pm$  标准误差显示。

## 2 结果

### 2.1 $A\beta$ 聚合

$A\beta_{1-40}$  多肽溶解后与  $Zn^{2+}$  溶液混合,  $A\beta$  终浓度为 1.6  $\mu$ mol/L、 $Zn^{2+}$  为 25  $\mu$ mol/L、pH 7.4, 37 °C 共温育 30 min。 $A\beta$  肽经 15% Tricine-SDS-PAGE 电泳分离, 用银染法显示蛋白质, 见经  $Zn^{2+}$  处理

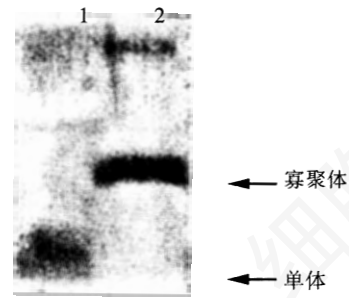


图 1  $A\beta$  聚集状态分析

新鲜配置的  $A\beta$  (1) 和  $Zn^{2+}$  诱导聚集的  $A\beta$  样品 (2) 经 15% Tricine-SDS-PAGE 电泳后银染显色。

的  $A\beta$  较新鲜配置的  $A\beta$  单体(4 kDa)泳动速度减慢, 提示有  $A\beta$  寡聚体形成(图 1)。

### 2.2 $A\beta$ 寡聚体对 Munc-18 表达的影响

RA 诱导分化的 SH-SY5Y 细胞经低浓度  $A\beta$  寡聚体处理后, 细胞裂解液经免疫印迹检测。结果观察到 1 nmol/L  $A\beta$  寡聚体作用 1 天时, 67 kDa 的 Munc-18 蛋白水平明显下降, 以后逐渐增加, 第 3 天时 Munc-18 水平高于对照(图 2, A、C)。较高浓度  $A\beta$  寡聚体(5 nmol/L)作用后, Munc-18 蛋白量也有一个减少后升高的过程, 但高浓度  $A\beta$  对 Munc-18 表达的抑制作用更为显著, 第 3 天 Munc-18 表达量有所回复但仍低于对照(图 2, B、C)。不同浓度  $A\beta$  寡聚体(1、2、5、10 nmol/L)处理 SH-SY5Y 细胞 3 天后, 对 Munc-18 蛋白表达量进行比较显示, 用 1、2 nmol/L  $A\beta$  寡聚体处理的细胞 Munc-18 量已高于对照, 而 5、10 nmol/L  $A\beta$  寡聚体处理的细胞 Munc-18 表达量仍低于对照(图 3)。

为了解  $A\beta$  单体是否也有同样的效应, 用新鲜配置的 1 nmol/L  $A\beta$  单体处理细胞 1 天和 3 天, 结果未观察到 Munc-18 蛋白量先减少后增加的变化(图 4A)。由于本实验所用的  $A\beta$  寡聚体是经  $Zn^{2+}$  诱导形成的, 该样品中含有  $Zn^{2+}$ , 为排除  $Zn^{2+}$  的影响, 用终浓度 15 nmol/L  $Zn^{2+}$  处理细胞, 这个浓度等同于 1 nmol/L  $A\beta$  寡聚体处理细胞时所含的  $Zn^{2+}$  浓度。结果显示, 这一浓度的  $Zn^{2+}$  对细胞 Munc-18 水平没有明显影响(图 4B)。

另外, 用 1 nmol/L  $A\beta$  处理细胞后, 用流式细胞术对 Munc-18 的含量进行检测。FITC 标记的细胞内 Munc-18 荧光强度分析显示  $A\beta$  寡聚体处理后(图 5), Munc-18 表达的变化趋势与免疫印迹结果一致, 即先减少后增加。

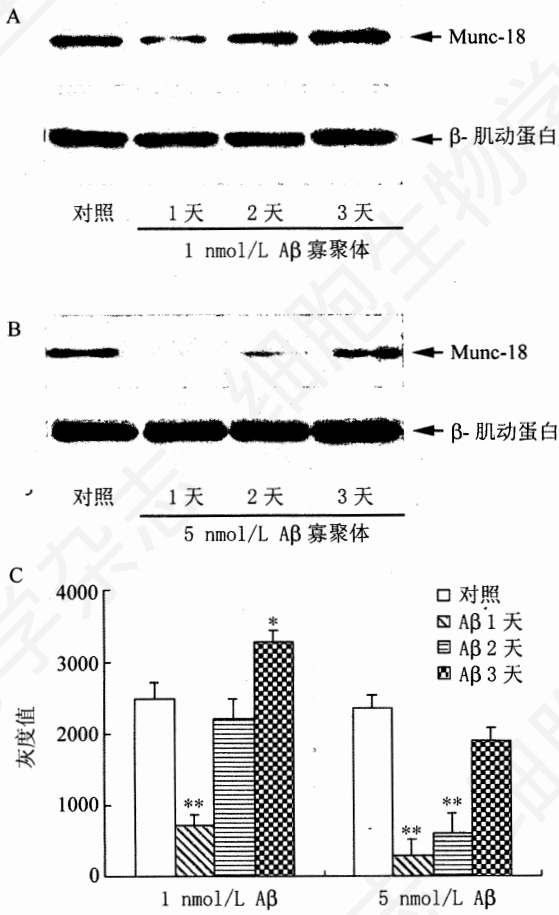


图2 免疫印迹分析 Aβ 寡聚体对 SH-SY5Y 细胞 Munc-18 表达的影响

SH-SY5Y 细胞经 Aβ 寡聚体 1 nmol/L (A)、5 nmol/L (B) 作用后, Western 印迹检测, 并进行灰度分析(C: 与对照相比, \*P<0.05, \*\*P<0.01)。

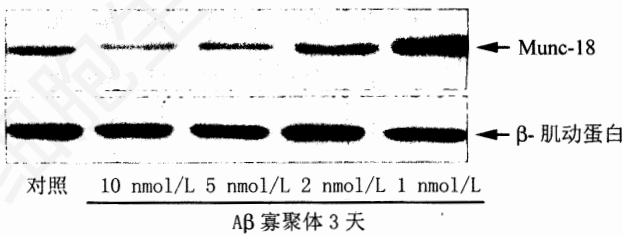


图3 不同浓度 Aβ 寡聚体作用 3 天时 SH-SY5Y 细胞 Munc-18 含量的免疫印迹分析

### 2.3 Aβ 寡聚体对细胞代谢的影响

为了解 Aβ 寡聚体是否通过影响细胞代谢, 进而影响 Munc-18 的表达。MTT 检测结果显示, 本实验所用的 1 nmol/L、5 nmol/L 浓度的 Aβ 寡聚体随作用时间的延长有一定的抑制细胞代谢的趋势, 但与正常对照相比没有显著性差异(图 6)。

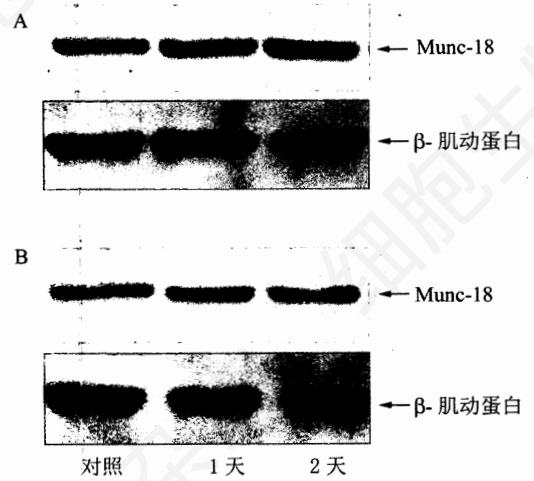


图4 SH-SY5Y 细胞经 Aβ 单体和 Zn<sup>2+</sup> 作用后 Munc-18 免疫印迹检测

A: 1 nmol/L Aβ 单体处理细胞; B: 15 nmol/L Zn<sup>2+</sup> 处理细胞。

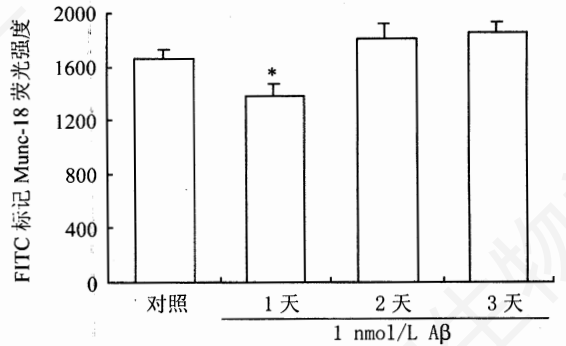


图5 Aβ 寡聚体作用后 SH-SY5Y 细胞 Munc-18 含量的流式细胞术检测

与对照相比, \*P<0.05。

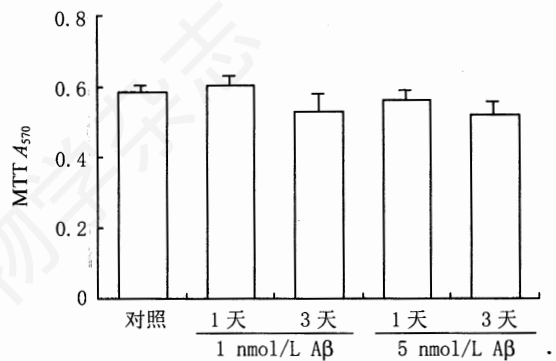


图6 MTT 法分析 Aβ 寡聚体对 SH-SY5Y 细胞代谢的影响

## 3 讨论

Aβ 是 AD 病理改变的重要起始因素<sup>[1]</sup>。Aβ 的过度生成或清除障碍导致 Aβ 聚集和沉淀, 产生毒性

作用, 导致其他 AD 相关的病理改变。以前对 A $\beta$  毒性作用的研究以纤维状 A $\beta$  为主, 但纤维状 A $\beta$  引起细胞死亡的浓度要达到微摩尔水平<sup>[7]</sup>。最近研究发现脑内存在可溶性非纤维状的 A $\beta$  寡聚体, 并且它在 AD 脑内明显增加<sup>[8]</sup>。Walsh 等<sup>[9]</sup>发现, 大鼠脑室内注射含人 A $\beta$  寡聚体的培养基能够抑制的海马突触传递的长时程增强(long-term potentiation, LTP), 其注入脑内的总 A $\beta$  浓度接近正常人脑脊液内 A $\beta$  的浓度 $[(4003 \pm 1873) \text{ pg/ml}]$ 。而本实验所用 A $\beta$  寡聚体的浓度为纳摩尔水平, 接近正常人脑脊液内的含量, 结果显示该浓度水平的 A $\beta$  寡聚体可影响 Munc-18 的表达, 提示 A $\beta$  寡聚体在低浓度水平就可发挥作用。

AD 相关病理改变涉及递质系统的改变、Tau 蛋白的异常磷酸化和 APP 代谢改变等。Munc-18 参与这些过程的研究均有报道<sup>[3-5]</sup>。本实验观察到纳摩尔浓度水平的 A $\beta$  寡聚体对分化的 SH-SY5Y 细胞 Munc-18 表达有调节作用, 随时间先抑制然后增加, 较高浓度的 A $\beta$  寡聚体作用后 Munc-18 也有这种变化趋势, 只是抑制作用更明显。应注意的是我们处理细胞所用的 A $\beta$  寡聚体内含有  $\text{Zn}^{2+}$ 。有研究发现  $\text{Zn}^{2+}$  对 A $\beta$  的细胞毒性作用有双重效果, 文献报道毫摩尔浓度  $\text{Zn}^{2+}$  可以增加 A $\beta$  的毒性作用<sup>[10]</sup>, 相反低浓度(微摩尔)  $\text{Zn}^{2+}$  直接或间接对抗 A $\beta$  的毒性作用<sup>[11]</sup>。但本实验含 A $\beta$  培养液中的  $\text{Zn}^{2+}$  浓度, 大大低于以前报道的影响 A $\beta$  毒性作用的  $\text{Zn}^{2+}$  浓度。为了进一步排除可能存在的  $\text{Zn}^{2+}$  作用, 用终浓度  $15 \text{ nmol/L}$   $\text{Zn}^{2+}$  处理细胞, 这一浓度与  $1 \text{ nmol/L}$  A $\beta$  寡聚体处理细胞时所含的  $\text{Zn}^{2+}$  浓度相同。结果未观察到 Munc-18 表达的明显变化。说明本实验 A $\beta$  寡聚体对 Munc-18 表达的调节与  $\text{Zn}^{2+}$  无关。另外, 用 A $\beta$  单体处理细胞, 同样未观察到与 A $\beta$  寡聚体类似的效应。提示低浓度的 A $\beta$  寡聚体作用效应有其特殊性。对于为什么 A $\beta$  寡聚体作用后 Munc-18 表达先抑制然后增加, 一个可能的解释是 A $\beta$  寡聚体先抑制细胞表达 Munc-18, 然后溶液中的 A $\beta$  寡聚体在细胞 A $\beta$  降解酶的作用下减少, 细胞恢复 Munc-18 表达过程中出现过表达。另一个解释是, 本实验所用的 A $\beta$  寡聚体是通过  $\text{Zn}^{2+}$  诱导形成的<sup>[6]</sup>,  $\text{Zn}^{2+}$  在脑内广泛存在并随递质释放同时在突触释放<sup>[12]</sup>, 这种  $\text{Zn}^{2+}$  诱导的 A $\beta$  寡聚体可能模拟了脑内 A $\beta$  聚集的早期形式,

有作者认为新形成的这种寡聚体中的 A $\beta$  肽以  $\alpha$  螺旋为主<sup>[13]</sup>, 以后随 A $\beta$  肽向  $\beta$  折叠构象转变, 其特性可能也随之改变。

此外, MTT 分析显示, 本实验所用的 A $\beta$  寡聚体浓度(1、5 nmol/L), 对分化的 SH-SY5Y 细胞, 没有明显的代谢抑制作用。因此, A $\beta$  寡聚体抑制 Munc-18 表达的作用, 并不是由于 A $\beta$  寡聚体抑制细胞代谢所致。对于 A $\beta$  寡聚体的细胞毒性作用, 不同的研究结果也有所差异。有研究用 5 nmol/L 的 A $\beta_{1-42}$  寡聚体作用 24 h 可引起海马脑片部分神经元死亡<sup>[14]</sup>; 但也有研究发现 50 nmol/L 的 A $\beta_{1-42}$  寡聚体才引起明显的原代培养皮层神经元死亡, 但这一浓度的 A $\beta_{1-42}$  寡聚体并不影响原代培养的小脑细胞<sup>[15]</sup>。我们与这些研究结果的差异, 首先可能由于所观察的细胞不同, 其次是制备 A $\beta$  寡聚体的方法不同, 不同的 A $\beta$  寡聚体可能存在不同的生物活性, 另外我们所用的是 A $\beta_{1-40}$ , 一般认为 A $\beta_{1-40}$  较 A $\beta_{1-42}$  细胞毒性较低。

A $\beta$  寡聚体的作用机制目前尚未完全明了。有报道认为 A $\beta$  寡聚体能非特异地插入脂质双分子层<sup>[6]</sup>; 而 Gong 等<sup>[15]</sup>发现 A $\beta$  寡聚体能特异地与神经细胞表面尤其是神经突起表面的某些位点特异结合。这些研究提示 A $\beta$  寡聚体作用的复杂性。A $\beta$  寡聚体对 Munc-18 的调节作用和机制目前尚没有报道。A $\beta$  寡聚体通过何种途径来调节 Munc-18 的变化、以及 Munc-18 的这种变化是否直接参与 AD 的发病机制有待于进一步的研究。

### 参考文献 (References)

- [1] Hardy JA et al. *Science*, 1992, **256**: 184
- [2] Lambert MP et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 6448
- [3] Yang B et al. *J cell Biol*, 2000, **148**: 247
- [4] Ho CS et al. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 27021.
- [5] Takahashi M et al. *J Neurol Sci*, 2000, **172**(1): 63
- [6] Bush AI et al. *Science*, 1994, **265**: 1464
- [7] Li YP et al. *Brain Res*, 1996, **738**: 196
- [8] McLean CA et al. *Ann Neurol*, 1999, **46**: 860
- [9] Walsh DM et al. *Nature*, 2002, **416**: 535
- [10] Lovell MA et al. *Brain Res*, 1999, **823**: 88
- [11] Yoshiike Y et al. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 32293
- [12] Howell GA et al. *Nature*, 1984, **308**: 736
- [13] Huang XD et al. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 26464
- [14] Lambert MP et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 6448
- [15] Gong Y et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 10417
- [16] Kourie JI et al. *Cell Biochem Biophys*, 2002, **36**: 191

## $\beta$ -Amyloid Oligomers Regulate Munc-18 Expression in the Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells

Shu-Wen Qian, Qiong Feng, Cui-Qing Zhu\*

(State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Shanghai Medical Center of Fudan University, Shanghai 200032, China)

**Abstract** This study is to explore whether the  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ), a pathogenic factor of Alzheimer's disease, could affect Munc-18 expression. The assembly of monomer  $A\beta$  to oligomeric form was induced with  $Zn^{2+}$ . The effect of oligomeric  $A\beta$  at low nanomolar concentration on Munc-18 expression of the differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells was analyzed with western blot and flow cytometry methods. In addition, the cytotoxicity of oligomeric  $A\beta$  was also studied with MTT method. Results showed that Munc-18 protein expression significantly decreased at 1 day after 1 nmol/L  $A\beta$  oligomers treatment and followed by an increase at 2 day and 3 day. Similar changes of Munc-18 expression were also observed with higher  $A\beta$  concentration, but inhibitive effect on Munc-18 expression was more obvious. Meanwhile, oligomeric  $A\beta$  at low nanomolar concentration did not significantly inhibit metabolism of SH-SY5Y cells. We concluded that  $A\beta$  oligomers at low nanomolar concentration could regulate the expression of Munc-18 in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells.

**Key words**  $\beta$ -amyloid; oligomer; Munc-18

Received: June 21, 2004 Accepted: October 25, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.739830450) and the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.G199905400)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-54237224, E-mail: cqzhu@shmu.edu.cn