

蛋白磷酸酯酶抑制剂冈田酸对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞系 tau 蛋白磷酸化水平的影响

褚燕琦 李 玮¹ 张 兰 艾厚喜 李雅莉 李 林*

(首都医科大学宣武医院药物研究室, 教育部神经变性病学重点实验室, 北京 100053;

¹河南省人民医院神经内科, 郑州 450000)

摘要 观察蛋白磷酸酯酶-1和蛋白磷酸酯酶-2A的抑制剂冈田酸(okadaic acid, OA)对人神经母细胞瘤系 SK-N-SH 细胞 tau 蛋白磷酸化水平的变化, 确定 tau 蛋白过度磷酸化细胞模型的合适剂量和时间。用不同剂量 OA 与 SK-N-SH 细胞共温育不同时间, 用显微镜观察细胞形态变化, 用 Western 印迹法检测磷酸化 tau 蛋白和非磷酸化 tau 蛋白在 Ser202 位点和 Ser404 位点磷酸化水平的变化。10~160 nmol/L OA 与 SK-N-SH 神经细胞温育 3~24 h, 可引起细胞形态损伤呈剂量依赖性和时间依赖性的变化, 起效剂量和时间为 10 nmol/L 和 3 h。10 nmol/L OA 与 SK-N-SH 细胞温育 6~24 h, 磷酸化 tau 蛋白 Ser199/Ser202 位点和 Ser404 位点的表达明显增高, 非磷酸化 tau 蛋白 Ser202 位点和 Ser404 位点的表达明显降低, 总 tau 蛋白含量无明显变化。OA 可以作为很好的研究 tau 蛋白过度磷酸化的工具药, 10 nmol/L OA 与 SK-N-SH 神经细胞共温育 6 h 可以作为制备细胞模型的适宜条件。

关键词 冈田酸; tau 蛋白磷酸化; 神经母细胞瘤细胞系; 阿尔茨海默病

脑内蛋白磷酸酶活性降低是导致阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) tau 蛋白过度磷酸化关键机制之一。已经有一些研究利用蛋白磷酸酯酶-2A (PP-2A) 和蛋白磷酸酯酶-1 (PP-1) 的抑制剂冈田酸(okadaic acid, OA) 来抑制细胞 tau 蛋白的去磷酸化, 使其产生过度磷酸化, 进行 AD 机制研究或者药理研究。但是文献报道 OA 的用法、剂量和时间相差很大, 尚没有系统的报道; 而且对 SK-N-SH 细胞系的研究报道也很少。SK-N-SH 细胞来源于人神经母细胞瘤细胞, 胞体呈锥形或梭形, 而且具有明显的轴突, 与 AD 有相似的 tau 蛋白, 有利于进行神经细胞骨架的研究。其生理功能亦与正常神经元相似, 是目前研究神经细胞形态和功能的一种较好的细胞系^[1]。本研究的目的是将 SK-N-SH 细胞作为神经元模型来探讨 OA 诱导 tau 蛋白过度磷酸化细胞模型建立的合适剂量和时间。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

SK-N-SH 人神经母细胞瘤细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究

所。RPMI1640 干粉培养基、胎牛血清均购自 Gibco BRL 公司; 胰蛋白酶、谷氨酰胺、多聚赖氨酸、冈田酸(OA)均为 Sigma 产品; 抗 P-tau (Ser404) 抗体(注: 特异性识别 tau 蛋白上磷酸化的 Ser404 位点)、抗 P-tau (Ser199/Ser202) 抗体(注: 特异性识别 tau 蛋白上磷酸化的 Ser199/Ser202 位点)、辣根过氧化物酶连接的抗体(二抗)及荧光试剂购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 抗 tau (paired 202) 抗体(注: 识别非磷酸化的 tau 蛋白 Ser202 位点)和抗 tau (paired 404) 抗体(注: 识别非磷酸化的 tau 蛋白 Ser404 位点)购自 Anaspec Inc 公司; Tau-5 抗体(识别总 tau 蛋白)购自 NeoMarker 公司。

1.2 仪器

倒置显微镜及照相系统 (TE300 F70 型, 日本尼康公司); 电泳仪 (PowerPac200, 美国 Bio-Rad 公司), 电转仪 (Trans-Blot, 美国 Bio-Rad 公司); 凝胶

收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2006-05-24

北京市自然科学基金 (No.7032013, No.7050001)、北京市科技计划项目 (No.D0204003000031)、北京市中医药重点学科项目 (2005)、北京市科技新星计划 (No.H020821390190) 资助

* 通讯作者。Tel: 010-63132779, Fax: 010-63042809, E-mail: linli97@hotmail.com

图像分析扫描仪(GAS7001 B, 英国 Uvi 公司)。

1.3 SK-N-SH 的培养

用含 10% 的胎牛血清(FBS), 100 U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素, RPMI 1640 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱内进行培养, 每 3 天更换一次培养基, 待细胞达到 80% 汇合时, 胰蛋白酶消化 1~2 min, 培养液洗两次后, 将细胞从瓶壁上吹打下来, 制备成单细胞悬液。胎盘兰染色计数, 按照所需的细胞浓度接种培养。

1.4 细胞形态观察

神经细胞以 1×10^4 个/ml 浓度接种于 6 孔板, 每孔 3 ml, 温育 48 h, 细胞贴壁生长至 70%~80% 汇合, 吸去培养液, 加入不同浓度的 OA (10~160 nmol/L), 温育 3~24 h, 显微镜下观察细胞形态结构的变化, 对视野中所有细胞及胞体呈黑色铺展良好的细胞分别进行计数, 计算各组中状态良好的细胞占总细胞的比率为细胞形态良好率。

1.5 蛋白质免疫印迹法(Western 印迹)

将神经细胞的单细胞悬液以 2×10^4 个/ml 密度接种于直径为 90 mm 的培养皿中, 每个培养皿 7 ml。培养箱内温育至少 48 h 后, 再加入 10 nmol/L OA 温育 3~24 h。弃去培养基, 用 PBS 洗 3 次, 加入 1 ml 细胞裂解液^[2], 摇匀, 置于冰块上 1 h, 其间要间断摇动培养皿, 用细胞刮将培养皿上贴壁细胞刮下, 裂解后, 12 000 g 离心 3 min, 吸出上清液, 用福林酚法测定蛋白质浓度, 加入 4 倍变性液, 水浴锅中 100 $^{\circ}$ C、5 min 煮沸。在 12%SDS-PAGE 胶进行电泳, 将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 分别用 2 个抗磷酸化 tau 抗体(Ser199/Ser202 位点、Ser404 位点)、2 个抗非磷酸化 tau 抗体(Ser202 位点、Ser404 位点)和抗总 tau 蛋白抗体, 与硝酸纤

维素膜温育过夜, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 15 min, 加 HRP 连接的二抗在 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 用 TBST 洗涤 3 次, 在暗室将荧光剂 A 液 B 液等量混匀后, 立即加到膜上, 反应 1 min, 然后吸去多余荧光剂, 将膜固定到曝光盒中, 曝光 0.5~5 min; 依次显影定影; 比照曝光板上的膜记录下 marker 和各条带的位置。用凝胶图像分析扫描仪扫描条带。

2 结果

2.1 不同剂量 OA 作用于 SK-N-SH 细胞不同时间对细胞形态的影响

如图 1A 量效曲线图所示, 随着 OA 剂量的增大, 作用时间的延长, 细胞形态良好率逐渐下降, 在 10 nmol/L OA 和 20 nmol/L OA 作用 3 h 就可出现细胞形态的改变, 因此, 我们选择这两个剂量进行时效关系的研究。结果如图 1B 所示, 随着时间的延长, 细胞形态良好率下降, 不过 10 nmol/L OA 和 20 nmol/L OA 没有明显差别, 所以, 我们依据剂量从小原则, 选择 10 nmol/L 进行进一步研究。

图 2 展示了 10 nmol/L OA 作用不同时间时细胞形态的变化。正常细胞组的 SK-N-SH 细胞铺展良好, 突起有分枝且连续, 胞体为梭形或锥形, 胞体和突起呈黑色。OA 损伤 6 h 组细胞质回缩, 突起断裂变短, 不连续, 少数细胞胞体发亮; OA 损伤 12 h 组大部分细胞胞体发亮变圆; OA 损伤 24 h 时组细胞损伤更加严重, 细胞突起变短甚至消失。

2.2 OA 对 SK-N-SH 神经细胞 tau 蛋白磷酸化的影响

用 Western 印迹方法检测 tau 蛋白 Ser199/Ser202 和 Ser404 位点磷酸化水平的变化。从 Western 印迹条带(图 3)可以看出, 10 nmol/L OA 与 SK-N-SH 神

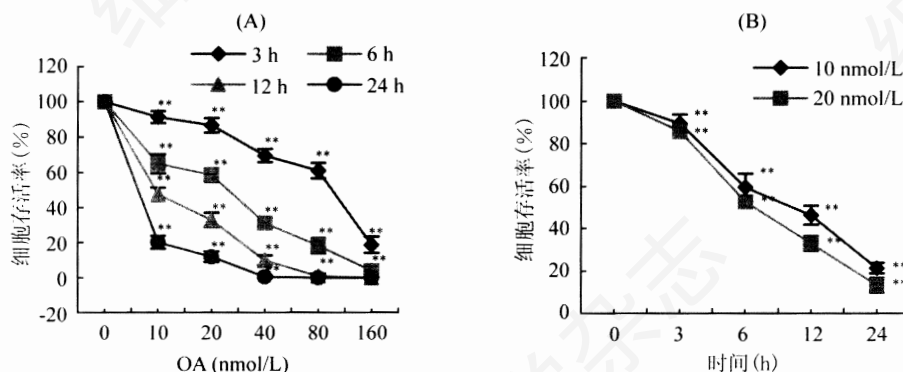


图 1 OA 对 SK-N-SH 神经细胞形态良好率的影响

A: 量效曲线; B: 时效曲线。细胞形态良好率: 为状态良好的细胞占总细胞的比率。每个剂量 6 个平行孔, 结果表示为均数士标准差, 与正常组相比, $**P < 0.01$ 。重复 3 次实验, 具有相同趋势。

经细胞温育不同时间在 tau 蛋白 Ser199/Ser202 位点和 Ser404 位点上有明显变化。磷酸化 tau 蛋白 Ser199/Ser202 位点的表达在 OA 与神经细胞温育 6 h

时增高最明显；非磷酸化 tau 蛋白 Ser202 位点的表达在 OA 温育 6 h 时开始降低，在 12 h 和 24 h 时降低更加明显。磷酸化 tau 蛋白 Ser404 位点的表达在

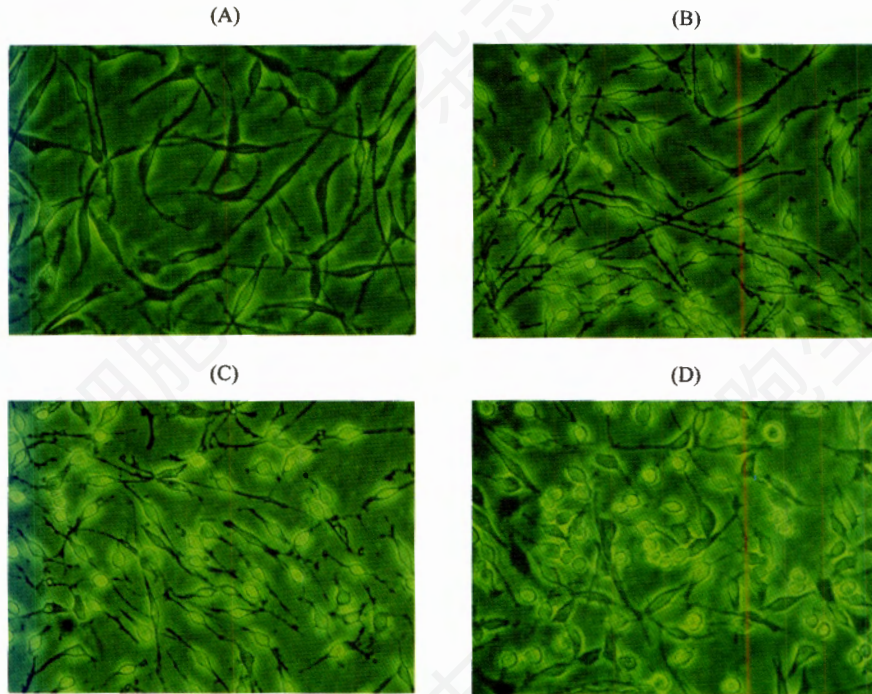


图 2 10 nmol/L OA 温育不同时间对 SK-N-SH 神经细胞形态影响

A: 正常 SK-N-SH 细胞; B: OA 温育 6 h; C: OA 温育 12 h; D: OA 温育 24 h。相差显微镜, 放大倍数 20 ×, N=0.45。

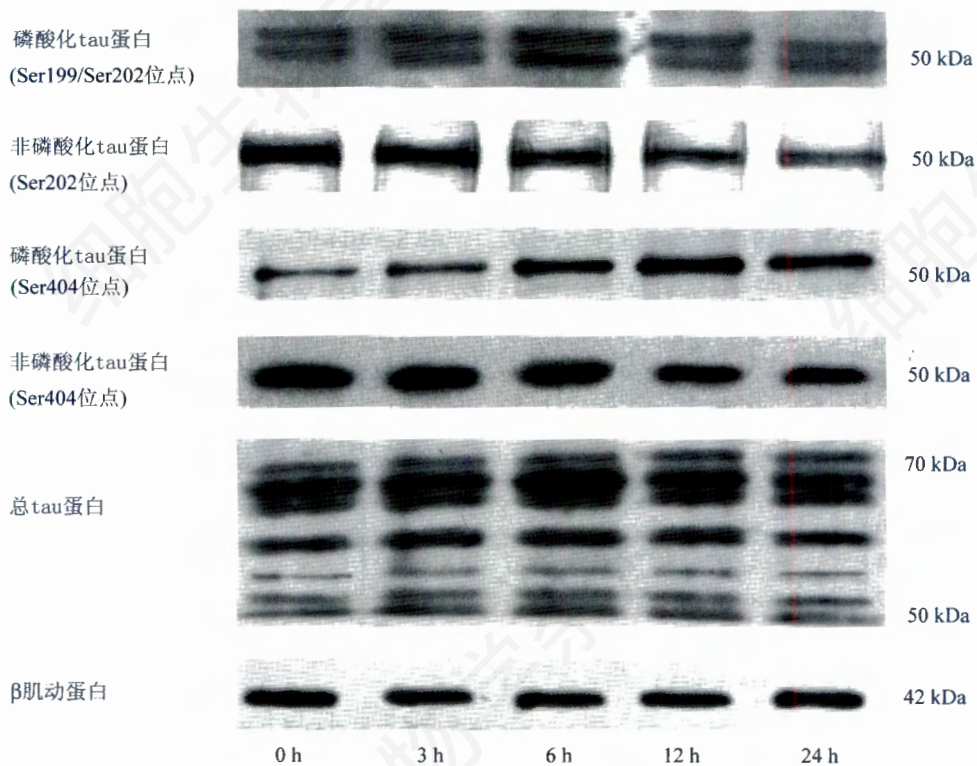


图 3 10 nmol/L OA 温育不同时间对 SK-N-SH 神经细胞 tau 蛋白磷酸化的影响

OA 温育 6~24 h 时均有明显增高, 在 12 h 增高最明显; 非磷酸化 tau 蛋白 Ser404 位点的表达在 OA 温育 6 h 时有所降低, 在 12 h 和 24 h 时降低最明显。总 tau 蛋白(包括磷酸化和非磷酸化 tau)在 OA 温育 6~24 h 则均无明显变化。结果表明, OA 与神经细胞温育 6 h 和 12 h, 可使 tau 蛋白 Ser202 位点和 Ser404 位点由非磷酸化状态转变为磷酸化状态。

3 讨论

对 AD 发病机制的探讨和治疗药物的开发是当前 AD 研究的热点。tau 蛋白的异常磷酸化可能是神经元纤维退变的早期事件。在 AD 患者脑中和体外实验中都发现许多蛋白激酶和磷酸酯酶共同调节 tau 蛋白的磷酸化。根据 PP-1、PP-2A 和 PP-2B 可以在体外使 tau 蛋白特定位点去磷酸化的研究结果^[3], 研究者推测 AD 患者 tau 蛋白的异常磷酸化与上述蛋白磷酸酯酶的缺陷有关, 其中 PP-2A 活性下降最为明显。

在各种蛋白磷酸酯酶中, PP-2A 催化活性、底物特异性和细胞内定位受到许多因素的调节, 如调节亚基、翻译后修饰、酶抑制剂、抑制性蛋白质和第二信使等。OA 作为蛋白磷酸酯酶 PP-1 和 PP-2A 的抑制剂, 在培养的细胞和体外实验中可以增加 tau 蛋白磷酸化的表达水平^[4-6]。但是 OA 的具体剂量和作用时间在文献报道中却差别较大, 如 Ludovic 等^[7]用 35 nmol/L OA 与人淋巴瘤细胞共温育 48 h, 细胞损伤达 50%, 而用 20 nmol/L OA 与 MNBN 细胞共温育 48 h, 就可以使细胞损伤达 50%。这可能与研究时所用细胞种系和研究目的不同有关。因此, 为了进一步寻找合适的方法, 我们选用人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-SH 细胞与不同浓度的(10~160 nmol/L)OA 共温育不同时间进行实验, 利用倒置显

显微镜观察 OA 对细胞结构的影响。结果发现, 正常 SK-N-SH 细胞中, 细胞突起连续有分支, 胞体为梭形或者锥形, 呈黑色。10 nmol/L OA 温育 6 h 就可以引起 SK-N-SH 细胞胞体变圆变亮, 突起回缩断裂等细胞形态的变化。

到目前为止, 已经发现 AD 脑中的 tau 蛋白异常磷酸化位点共有 21 个, 其中有 10 个位点的磷酸化水平比较高, 可能对 tau 的功能影响比较大。因此, 为了进一步探讨 OA 引起 tau 蛋白磷酸化的具体情况, 我们选择了 2 个最常见磷酸化位点的抗磷酸化和非磷酸化 tau 抗体进行研究。用 Western 印迹检测的结果显示, 10 nmol/L OA 与神经细胞温育 6 h 和 12 h, 可使 tau 蛋白 Ser202 位点和 Ser404 位点由非磷酸化状态转变为磷酸化状态。根据细胞形态和 Western 印迹的检测, 10 nmol/L OA 与 SK-N-SH 细胞共温育 6 h 就可以引起细胞形态和蛋白质表达明显变化。因此, 10 nmol/L OA 与神经细胞 SK-N-SH 共温育 6~12 h 可以作为制备细胞模型的最佳剂量和时间。

综上所述, OA 作为蛋白磷酸酯酶 PP-1 和 PP-2A 的抑制剂作用于 tau 蛋白, 可使其去磷酸化作用下降, tau 蛋白从非磷酸化转变为过度磷酸化状态, 导致细胞损伤, 从形态上表现为胞体变圆变亮, 突起断裂消失。通过此实验可以为 AD 的 tau 蛋白研究提供参考模型。

参考文献 (References)

- [1] 陆伟等. 医学文选, 2002, 21: 804
- [2] Giri RK *et al.* *J Immunol*, 2003, 170: 5281
- [3] Wang JZ *et al.* *Brain Res Mol Brain Res*, 1996, 38: 200
- [4] Arias C *et al.* *Exp Neurol*, 1998, 153: 242
- [5] Gong CX *et al.* *J Biol Chem*, 2000, 275: 5535
- [6] Ekinci FJ *et al.* *Brain Res Mol Brain Res*, 2003, 117: 145
- [7] Hegarat LL *et al.* *Mutat Res*, 2005, 578: 53

Effects of Protein Phosphatase Inhibitor Okadaic Acid on Phosphorylation of Tau Protein in Human Neuroblastoma SK-N-SH Cells

Yan-Qi Chu, Wei Li¹, Lan Zhang, Hou-Xi Ai, Ya-Li Li, Lin Li*

(Department of Pharmacology, Xuanwu Hospital of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China;

¹Department of Neurology, Renmin Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450000, China)

Abstract To investigate the effects of protein phosphatase (PP-1 and PP-2A) inhibitor okadaic acid (OA) on human neuroblastoma SK-N-SH cells, and to determine the best dosage and duration of OA treatment in this cell model. The diverse doses of OA were incubated with SK-N-SH cells for different periods of time. The changes in cell morphology were observed by microscope. The phosphorylation and non-phosphorylation level of tau protein at Ser202 site and Ser404 site were detected with Western blotting method. Incubation of 10–160 nmol/L OA with SK-N-SH cells for 3–24 h induced dose- and time-dependent changes in cell morphology, in which the starting dose and time of OA effect were 10 nmol/L and 3 h respectively. When 10 nmol/L OA was incubated with SK-N-SH cells for 6–24 h, the expression of phosphorylated tau protein at Ser199/Ser202 site and Ser404 site was increased, the expression of non-phosphorylated tau at Ser202 site and Ser404 site was decreased, and the total tau protein did not show obvious changes. OA is a good tool drug for studying hyperphosphorylation of tau protein, and 10 nmol/L OA incubation with human neuroblastoma SK-N-SH cells for 6 h can be taken as the proper conditions for developing the cell model of tau hyperphosphorylation.

Key words okadaic acid; phosphorylation of tau protein; neuroblastoma cell line; Alzheimer disease

Received: November 23, 2005 Accepted: May 24, 2006

This work was supported by the Natural Science Foundation of Beijing (No.7032013, No.7050001), the Science and Technology Program of Beijing (No.D0204003000031), the Chinese Traditional Medicine Program of Beijing (2005), the Scientific New Star Program of Beijing (No.H020821390190)

*Corresponding author. Tel: 86-10-63132779, Fax: 86-10-63042809, E-mail: linli97@hotmail.com