

APP N 端片段的神经营养作用

王 蓉 张景艳 姬志娟 杨 芳 盛树力

张 岱

(首都医科大学宣武医院 北京脑老化研究实验室 北京 100053) (北京医科大学精神卫生研究所 北京 100083)

APP 是 β -淀粉样肽 (β -Amyloid, A β 或 β /A4) 的前体蛋白 (Amyloid β /A4 Protein Precursor, APP), 由 695 - 770 个氨基酸组成, 是一个大分子跨膜糖蛋白^[1], 它可在 A β 16 和 17 位氨基酸之间被 α -分泌酶酶解, 其 N 端水解产物 sAPP- α 可分泌至细胞外环境, β -分泌酶酶切也可产生分泌型 APP (sAPP- β)^[2]。已有报道, sAPP- α 可促进神经细胞生长, 具有神经营养作用^[3,4], 其中 319 - 335 肽段即 APP17 肽 (APP 17-mer peptide) 能提高动物的学习记忆能力^[5]。本室近年来对 APP17 肽进行了免疫组织化学和细胞学方面的研究, 结果表明它能明显改善糖尿病脑病动物海马神经元的退变。但其他 APP 片段是否具有神经营养功能却尚未见报道。本研究观察了 APP N 端片段对人神经母细胞瘤株 (human neuroblastoma cells) SY5Y 生长的影响以及对实验性糖尿病动物行为的影响, 希望能发现 APP 促进神经细胞生长的其他肽段, 为进一步研究 APP 作用的构效关系打下基础。

材料和方法

1. 材料

(1) SY5Y 细胞株 由瑞典卡罗琳斯卡研究所 Bengt Winblad 教授和裴进京博士赠送。细胞培养条件为 MEM (Gibco BRL, 41500-034) 培养基中加入 10% 胎牛血清 (Hyclone, SH30070.03)、15mmol/L Hepes (DNN company)、青霉素 100IU/ml、链霉素 100IU/ml、5% CO₂, 37°C, 每周换液两次, 传代一次。

(2) 实验动物 昆明小鼠, 雄性, 体重 32 - 37 克, 购自医科院药研所。

(3) APP N 端肽段 APP64 肽由北京医科大学精神卫生研究所张岱教授赠送; APP29 肽、APP11 肽及其他 APP N 端肽段共 7 个, 由本室用固相法合成, 高效液相 (HPLC) 纯化, 纯度均 > 95% (图 1)。

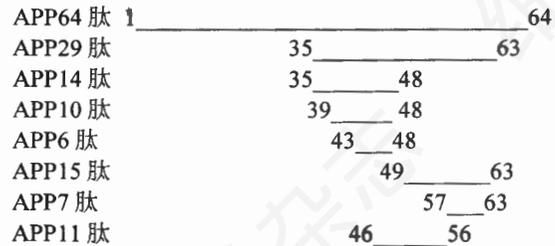


图 1 APP N 端片段示意图

(4) MTT Sigma 产品。

(5) 二甲基亚砜 (DMSO) 北京化工厂, 批号 810309。

(6) 乳酸脱氢酶 (LDH) 测定试剂盒 北京化工厂, 批号 981005。

(7) 链脲佐菌素 (STZ) Sigma 产品。

(8) 血糖仪 Accutrend alpha。

(9) 通道式 小鼠水迷宫。

2. 方法

(1) APP N 端片段对 SY5Y 生长的影响

1) MTT 代谢率测定 将 SY5Y 细胞以密度为 2.5×10^3 /ml 接种于 96 孔板 (Costar 产品), 每孔体积 200 μ l, 24 小时后将其分为对照组和实验组, 每组 8 - 12 孔。实验组中分别加入 APP64 肽 10 μ mol/L、APP29 肽 10 μ mol/L、APP11 肽 1 μ mol/L、10 μ mol/L 及其他 APP N 端肽段 10 μ mol/L。于加肽后第 20 小时, 每孔加 MTT (5mg/ml) 20 μ l, 37°C 孵育 4 小时, 吸出培养液, 每孔加入 DMSO 200 μ l, 振荡 10 分钟, 用酶标仪 (Diagnostic Pasteur LP400) 测定 550nm 处光密度值 (OD)。

2) 细胞计数 将 SY5Y 细胞以密度为 5×10^4 /ml 接种于 24 孔板 (Costar 产品), 每孔体积 1ml, 24 小时后将其分为对照组和实验组, 每组 8 孔。实验组中分别加入 APP29 肽 1 μ mol/L、APP11 肽 1 μ mol/L、3 μ mol/L。加 APP29 肽后 24 小时、加 APP11 肽后第 1、2、3 天对各组进行细胞计数。

本文 1999 年 6 月 7 日收到, 2000 年 1 月 3 日接受。

3)LDH漏出率测定 将SY5Y细胞以密度为 1×10^4 /ml接种于24孔板,每孔体积1ml,24小时后将分为对照组和实验组,每组8孔。实验组中分别加入APP29肽 $1\mu\text{mol/L}$ 、APP11肽 $1\mu\text{mol/L}$ 、 $3\mu\text{mol/L}$ 。于加肽后第1、2、3天留取各组细胞培养液,按照LDH测定试剂盒所示方法(比色法),测定450nm处光密度值,并用细胞数进行标化,同时做LDH标准曲线。

4)统计学处理 应用SPSS软件做t检验统计。

(2)APP N端片段对实验性糖尿病动物行为的影响

1)实验性糖尿病动物模型的复制 将小鼠随机分为正常对照组(C组)、糖尿病对照组(DM组)、APP11肽治疗组(DM+11肽组),每组15只。用柠檬酸缓冲液(0.1mol/L , pH4.4)将STZ配制为 20mg/ml ,用前新鲜配制。DM组和DM+11肽组禁食12小时后,腹腔注射STZ(200mg/kg),三天后用血糖仪测定非禁食尾血血糖,大于 15mmol/L 者认为糖尿病模型复制成功。成模后两周开始,给DM+11肽组皮下注射APP11肽(每次 $0.2\mu\text{g}$,每日一次),C组和DM组每日皮下注射等体积的生理盐水,直至行为学实验完成。

2)水迷宫测试 成模后4周再次测定动物血糖,DM组和DM+11肽组仍大于 15mmol/L ,然后行水迷宫测试。实验水深15cm,水温 25°C ,将小鼠尾部朝向安全岛方向放入起始区,每天测试2次,共5天。第1天两个盲端,第2天三个盲端,第3、4、5天四个盲端,以头部碰到盲端为一次错误,记录每只小鼠游完全程的时间和错误反应次数,以判断小鼠学习、记忆能力。

3)统计学处理 应用SPSS软件做t检验统计。

结 果

1. MTT代谢率测定结果显示

APP64肽组、APP29肽组、APP11肽组MTT代谢率高于对照组,有显著性差异,其他

肽段MTT代谢率与对照组相比均不升高(表1)。

2. 细胞计数结果显示

APP29肽组24小时细胞数增加,与对照组相比, $P < 0.05$,有显著性差异(图2)。APP11肽组细胞数在第1、2、3天均高于对照组,有显著性差异(表2)。

表1 APP N端各片段对SY5Y MTT代谢率影响

APP N端片段	n	MTT代谢率
APP64肽 $10\mu\text{mol/L}$	12	$113.0 \pm 4.7\%$ *
APP29肽 $10\mu\text{mol/L}$	8	$113.1 \pm 2.8\%$ *
APP14肽 $10\mu\text{mol/L}$	8	$96.2 \pm 4.0\%$
APP10肽 $10\mu\text{mol/L}$	8	$98.6 \pm 3.0\%$
APP6肽 $10\mu\text{mol/L}$	8	$94.4 \pm 2.2\%$
APP15肽 $10\mu\text{mol/L}$	12	$91.1 \pm 1.3\%$
APP7肽 $10\mu\text{mol/L}$	12	$101.2 \pm 1.6\%$
APP11肽 $1\mu\text{mol/L}$	8	$109.3 \pm 3.4\%$ *
APP11肽 $10\mu\text{mol/L}$	8	$120.2 \pm 6.7\%$ *
对照组	8	100%

*与对照组相比 $P < 0.05$

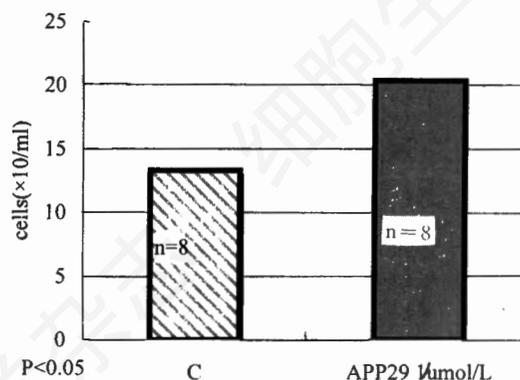


图2 APP29肽对SY5Y细胞增殖的影响

表2 细胞计数观察APP11肽对SY5Y生长的影响

细胞数 Mean \pm SD (1×10^4 /ml)	n	接种时	第一天	第二天	第三天
对照组	8	5	11.44 ± 3.89	43.88 ± 4.84	36.67 ± 9.93
APP11肽 $1\mu\text{mol/L}$	8	5	$19.03 \pm 4.20^{**}$	$61.25 \pm 6.01^{**}$	47.03 ± 13.09
APP11肽 $3\mu\text{mol/L}$	8	5	$19.06 \pm 3.46^{**}$	$52.68 \pm 7.62^*$	$50.63 \pm 10.69^*$

*与对照组相比: $P < 0.05$ **与对照组相比: $P < 0.01$ 。

3. LDH 漏出率测定结果显示

经细胞数标准化后,APP29 肽组和 APP11 肽组 LDH 与对照组相比均有高度显著性差异(表 3)。

4. 水迷宫测试结果显示

DM 组游完全程时间延长,错误反应次数

增多,与 C 组相比有非常显著性差异,与 DM+11 肽组相比有显著性差异(表 4、表 5)。水迷宫测试结果表明,DM 组存在学习、记忆功能障碍,APP11 肽对糖尿病小鼠的学习、记忆功能障碍有改善作用。

表 3 APP11 肽、APP29 肽对 SY5Y LDH 漏出率的影响

LDH (u/10 ⁴ 细胞)	n	对照组	APP11 肽 1 μ mol/L	APP11 肽 3 μ mol/L	APP29 肽 1 μ mol/L
第一天	8	79.33 \pm 5.12	46.07 \pm 2.34**	45.70 \pm 1.50**	47.58 \pm 4.32**
第二天	8	23.47 \pm 1.31	15.20 \pm 7.88**	20.68 \pm 7.38**	
第三天	8	31.18 \pm 1.76	24.76 \pm 0.56**	22.34 \pm 0.96**	

**与对照组相比 P<0.01。

表 4 游完水迷宫全程所需时间(秒)

N	C 组	DM 组	APP11 肽组 + DM 组
第一天 15	31.18 \pm 40.36	46.65 \pm 42.67	47.90 \pm 42.25
第二天 15	35.09 \pm 32.44	47.35 \pm 34.22	41.00 \pm 37.57
第三天 15	38.05 \pm 34.83**	87.95 \pm 40.80	59.70 \pm 32.99*
第四天 15	15.00 \pm 10.35**	57.05 \pm 41.49	32.90 \pm 27.58*
第五天 15	17.05 \pm 5.31**	31.50 \pm 3.27	20.45 \pm 17.69*

*与 DM 组相比 P<0.05 **与 DM 组相比 P<0.01。

表 5 水迷宫测试错误反应次数

n	C 组	DM 组	APP11 肽组 + DM 组
第一天 15	1.95 \pm 1.91	1.70 \pm 1.66	2.15 \pm 1.66
第二天 15	2.36 \pm 1.73	2.40 \pm 1.98	1.80 \pm 1.74
第三天 15	1.68 \pm 1.43**	4.55 \pm 3.14	2.85 \pm 1.63*
第四天 15	0.77 \pm 1.11**	2.60 \pm 2.34	1.45 \pm 1.99
第五天 15	0.14 \pm 0.35**	1.70 \pm 1.78	0.70 \pm 1.30**

*与 DM 组相比 P<0.05 **与 DM 组相比 P<0.01。

讨 论

sAPP- α 是由 597 个氨基酸组成的大分子蛋白,具有重要的生理功能。它能促进神经细胞存活和轴突生长,起到营养和保护神经细胞的作用^[3,4]。APP(319-335)17 肽是 sAPP- α 的活性片段,本室对实验性糖尿病脑病动物的研究中发现,此肽具有明显的改善神经元退变的作用^[6,7]。但关于 APP 中其他片段是否具

有神经营养作用,目前尚未见报道。本研究应用化学合成的 APP N 端多个片段,发现 APP64 肽、29 肽、11 肽在体外有促进神经细胞增殖和存活的作用;根据我们以往对 APP17 肽的研究方法,通过皮下注射给予糖尿病小鼠 APP11 肽,进行行为学测试,结果显示此肽能提高动物水迷宫测试成绩,改善学习记忆功能,且此作用并不是通过调节糖代谢、降低血糖而完成的。最近我们又发现 APP11 肽能恢复糖尿病小鼠

海马神经元神经原纤维蛋白(Neurofibril, NF)和神经生长因子(Neuron Growth Factor, NGF)的表达,并能使坐骨神经传导速度恢复正常(未发表资料)。以上结果说明,我们利用体外实验筛选的肽段,在糖尿病动物模型中应用,确有一定的改善神经元退变的作用,即除了 APP17 肽以外,在 APP N 端还存在一个与 17 肽无关的 APP11 肽,可能也具有神经营养作用。但 APP11 肽作用的确切机理以及能否改善正常动物的学习记忆功能,尚需大量研究。我们认为, sAPP- α 的 N 端可能具有神经营养活性的序列,其中 APP11 肽是保持此作用的最短片段,此肽段的发现为进一步研究 APP 的构效关系奠定了基础。

摘 要

APP 是 β -淀粉样肽的前体蛋白,由 695 - 770 个氨基酸组成,其 N 端水解产物可分泌至细胞外环境。APP 具有促进神经细胞生长作用,其中 319 - 335 肽段即 APP17 肽能提高动物的学习记忆能力,其他 APP 片段是否具有神经营养功能未见报道。本研究通过观察 APP N 端片段对人神经母细胞瘤株 SY5Y 生长的影

响以及对实验性糖尿病动物行为的影响,希望发现 APP 促进神经细胞生长的其他肽段。用化学合成 APP N 端多肽片段,以 SY5Y 细胞 MTT 代谢率、细胞计数、LDH 漏出率和实验性糖尿病小鼠水迷宫试验结果为观察指标。结果 APP64 肽、29 肽、11 肽均有促进 SY5Y 细胞生长的作用,APP11 肽可提高糖尿病动物水迷宫测试成绩。说明可溶性 APP 的 N 端可能具有神经营养作用,我们认为保持此作用的最短片段为 APP11 肽,此肽段的发现为进一步研究 APP 的构效关系奠定了基础。

关键词:APP N 端片段 APP11 肽 神经营养作用

参 考 文 献

- [1]Goldgaber, D. et al. ,1987, *Science*, **235**:8770 - 8780.
- [2]Esch, F. S. et al. ,1990, *Science*, **248**:1122 - 1124.
- [3]Wataru Araki. et al. , 1991, *Biochem. and Biophys. Res. Com.* , **181**(1):265 - 271.
- [4]Make, P. et al. , 1994, *Experi. Neuro.* , **129**: 112 - 119.
- [5]Jean-Marc, R. et al. , 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* , **91**(pp):7450 - 7454.
- [6]盛树力, 1999, *老年医学与保健*, **5**(1):4 - 6.
- [7]赵咏梅等, 1999, *中华内分泌代谢杂志*, **15**(1):38 - 40.

NEUROTROPHIC EFFECT OF APP N-TERMINUS FRAGMENTS

WANG Rong ZHANG Jing Yan JI Zhi Juan YANG Fang SHENG Shu Li

Beijing Brain Aging Research Laboratory, Xuan Wu Hospital,

Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053

ZHANG Dai

(Institute of Mental Health, Beijing Medical University, Beijing 100083)

ABSTRACT

APP is the precursor protein of beta amyloid peptide and composed of 695 - 770 amino acid residues with a soluble N terminus normally. It can enhance neuronal growth. APP 17 peptide which consists of APP 319 - 335 amino acid sequence, can improve learning and memory abilities, but it has not been reported whether other peptide fragments of APP has neurotrophic properties. By observing the effects of APP N-terminus fragments on the growth of SY5Y neuroblastoma cells, and on the behaviour of experimental diabetic animals, this study aims to find other APP fragments that may have neurotrophic actions.

Chemically synthesized APP N-terminus fragments were used; MTT metabolic rate of SY5Y cells, cells account, LDH

leakage rate, and performance of diabetic mice in the water maze test were taken as indicators. Our results show APP 64 peptide, 29 peptide and 11 peptide all showed effects in stimulating SY5Y cell growth, and improving performance of animals in the water maze test. The conclusion is that the neurotrophic action of soluble APP is lodged at the N terminus; APP 11 peptide is the shortest fragment that can preserve the neurotrophic action. This discovery will help towards further unraveling the structure-function relationship of APP.

Key words: APP N-terminus fragments APP 11 peptide Neurotrophic effect

人 NK 细胞克隆化培养条件的初步探讨*

张 彩

田志刚

(山东省医学科学院基础医学研究所 山东肿瘤生物治疗研究中心 济南 250062)

NK 细胞是机体十分重要的细胞群体,是机体天然免疫的主要承担者。它几乎参与了免疫系统的发生、发展及效应等重要环节的调节过程。其来源于骨髓,能促进造血细胞的发育分化,预防异基因骨髓移植的移植物抗宿主反应,促进骨髓植入和造血重建^[1,2]。因此,NK 细胞的基础及其临床应用研究已成为近年研究的热点^[3]。NK 细胞的克隆化培养技术是进行 NK 发育、识别机制及其功能研究的基础。我们对人外周血 NK 细胞进行了初步纯化,并对其克隆化培养的条件进行了初步摸索,现报告如下。

材料与方 法

1. 主要试剂及设备

小鼠抗人 CD3 单抗,小鼠抗人 CD56 单抗,本室自制腹水,离子交换层析纯化,纯度 > 95%;小鼠抗人 CD3-FITC/CD56-PE, Pharmingen 公司;FITC 标记羊抗小鼠 IgG,北京挚诚生物技术研究所;rhIL-2,新鲜兔血清,本室自制;丝裂霉素 C,日本协和发酵工业株式会社;PHA,广州医工所;PMA, Sigma 公司;流式细胞仪 FACSscan, Becton Dickinson 产品;荧光显微镜, OLYMPUS。

2. NK 细胞的纯化

取健康人外周血,用淋巴细胞分离液常规分离单个核细胞(PBMC),以 rhIL-2 1000u/ml 诱导培养 7-10 天,使 NK 细胞的数量得以扩增后,用补体依赖的细胞毒法去除 T 细胞,即将细胞与鼠抗人 CD3 单抗作用,

4℃30 分钟,加新鲜兔血清(1:2 稀释)37℃作用 1 小时,用淋巴细胞分离液分离活细胞,并经流式细胞仪(FACS)鉴定为 CD3⁻ CD56⁺ NK 细胞。

3. 淋巴细胞条件培养液(LCM)的制备^[4]

用 PHA 5μg/ml, PMA 5ng/ml 及丝裂霉素 C 25μg/ml 处理后的 PBMC(0.5 × 10⁶/ml)刺激另一个体的 PBMC(2.5 × 10⁶/ml)2 小时,将细胞洗四次,重悬于含 10% FCS 的 RPMI1640, 37℃培养 40 小时,收集上清, 0.22μm 滤膜过滤备用。

4. NK 细胞的克隆化培养

首先制备饲养细胞,即常规分离同种异体或自身的外周血单个核细胞,用丝裂霉素 C(25μg/ml)或阿糖胞苷(5-20μg/ml)或经 γ 射线照射(3000rad)抑制其增殖后,洗涤,调细胞数至 1 × 10⁶/ml,加至 96 孔板, 1 × 10⁵/0.1ml/孔。上述纯化的 NK 细胞经有限稀释至每 ml 含 5 个或 10 个细胞,加至含饲养细胞的 96 孔板, 0.1ml/孔,相当于每孔含 0.5 个或 1 个细胞,培养液为 RPMI1640(Gibco 公司),内含 20% 新生小牛血清、rhIL-2 100u-200u/ml(终浓度)和/或 PHA 10μg/ml 及 10% 的淋巴细胞条件培养液(LCM)。隔天换液,并及时补充 rhIL-2、PHA 及 LCM,每周补充新鲜的饲养细胞。观察克隆形成情况,选择单个克隆孔,待细胞长至足够数量,收集细胞,适当稀释后置 Φ35mm 带方格刻度的培养皿(Nunc, Inc.),镜下计数,计算每个克隆所含细胞数,并用间接免疫荧光法鉴定 NK 细胞表型。

本文 1999 年 8 月 17 日收到,2000 年 1 月 4 日接受。

* 本项目受国家自然科学基金资助(No. 39870729)。