

# 表达APP<sub>swe695</sub>基因细胞系的构建及A $\beta$ 分泌水平的分析

陶鹏飞 赵悦 宋喜君 黄汉昌\*

(北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100191)

**摘要** 为探究 $\beta$ -淀粉样前体蛋白(amyloid- $\beta$  precursor protein, APP)在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发病过程中的作用及构建应用于AD发病机理研究的实验细胞模型, 该研究构建了过表达APP<sub>695</sub>瑞典型突变体(APP<sub>swe695</sub>)的SH-SY5Y细胞系(APP<sub>swe695</sub>细胞)并分析了该细胞系中A $\beta$ 的分泌水平。采用慢病毒介导转染方法, 将APP<sub>swe695</sub>表达质粒转染至SH-SY5Y细胞, 抗性药物筛选阳性转染细胞。分别采用RT-PCR、Western blot技术验证APP<sub>swe695</sub> mRNA、APP蛋白的表达, ELISA分析A $\beta$ <sub>1-40</sub>和A $\beta$ <sub>1-42</sub>的分泌水平。结果显示, 转染慢病毒包装的APP<sub>swe695</sub>质粒后, 细胞的APP<sub>swe695</sub> mRNA表达呈现阳性; 与野生型细胞和转染质粒空白细胞相比, 转染APP<sub>swe695</sub>基因细胞表达APP<sub>695</sub>的瑞典型突变蛋白(APP<sub>swe695</sub>)。APP<sub>swe695</sub>具有与内源性APP<sub>770</sub>相同的细胞分布。转染APP<sub>swe695</sub>基因后, 细胞内分泌A $\beta$ 水平增加( $P < 0.05$ )而细胞外液中A $\beta$ 含量并没有显著变化。由此说明, APP<sub>swe695</sub>细胞能够表达被转染的APP<sub>swe695</sub>基因, APP<sub>swe695</sub>细胞倾向于产生更多的胞内而不是胞外A $\beta$ , APP<sub>swe695</sub>细胞可应用于阿尔茨海默病发病机理及药物治疗的研究。

**关键词** 阿尔茨海默病;  $\beta$ -淀粉样前体蛋白;  $\beta$ -淀粉样蛋白; 细胞模型

## Preparation of the Cells Transfected with Human APP<sub>swe695</sub> Gene and the Determination of A $\beta$ Production

Tao Pengfei, Zhao Yue, Song Xijun, Huang Hanchang\*

(Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Foods, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

**Abstract** Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder, and amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) precursor protein (APP) is related to AD development. In this study, we developed a cell line that stably expressed APP gene with Swedish mutation (APP<sub>swe695</sub> cells) and the production of amyloid- $\beta$  was investigated. The expression plasmid with expressing APP<sub>swe695</sub> gene was transfected into SH-SY5Y cells mediated by lentiviral vector. The gene expression of APP<sub>swe695</sub> was confirmed at the levels of transcription and translation. The location of APP was analyzed by the method of immunocytochemistry. A $\beta$  peptide, a product derived from APP by  $\beta$ -cleavage, was detected by the method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results indicated that APP<sub>swe695</sub> cells could transcribe the mRNA and translate the protein of the transfected APP<sub>swe695</sub> gene. The Swedish mutant protein of APP<sub>695</sub> (APP<sub>swe695</sub>) had the same cellular distribution as endogenous APP<sub>770</sub>. Interestingly, APP<sub>swe</sub> cells are in-

收稿日期: 2018-09-28 接受日期: 2018-11-27

国家自然科学基金面上项目(批准号: 31471587)、北京联合大学人才强校优选计划(批准号: BPHR2018CZ02)和北京联合大学“启明星”大学生科技创新项目(批准号: 201811417SJ093)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-62004534, E-mail: hanchang@buu.edu.cn

Received: September 28, 2018 Accepted: November 27, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31471587), the Premium Funding Project for Academic Human Resources Development in Beijing Union University (Grant No.BPHR2018CZ02) and Science and Technology Innovation Project of Beijing Union University (Grant No.201811417SJ093)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-62004534, E-mail: hanchang@buu.edu.cn

网络出版时间: 2018-12-28 17:15:23

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181228.1715.022.html>

clined to generate more intracellular but not extracellular A $\beta$ . In general, these results indicated that APP<sub>swe695</sub> cells can express the transfected APP<sub>swe695</sub> gene and that APP<sub>swe695</sub> is prone to generate more intracellular but not extracellular A $\beta$ . This study implied that the APP<sub>swe695</sub> cells can be used to investigate the pathogenesis and drug therapy of Alzheimer's disease.

**Keywords** Alzheimer's disease; amyloid- $\beta$  precursor protein (APP); amyloid- $\beta$  peptide; cell model

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病, AD典型的病理特征主要表现为胞外淀粉样蛋白沉积形成老年斑、胞内Tau蛋白高度磷酸化形成纤维缠结以及神经元大量凋亡<sup>[1-2]</sup>。 $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )是大脑皮质老年斑的主要成分, A $\beta$ 被认为是导致AD发生的重要物质。A $\beta$ 级联假说认为, 脑组织中淀粉样斑块沉积是导致AD神经元丢失的早期重要因素, A $\beta$ 的沉积可引发一系列级联病理过程, 这些病理过程反过来进一步促进A $\beta$ 的沉积<sup>[3]</sup>。A $\beta$ 是由其前体蛋白(amyloid- $\beta$  precursor protein, APP)通过 $\beta$ -裂解途径产生的<sup>[4]</sup>。人类的APP基因位于21号染色体长臂上, 翻译后产生一系列介于100~130 kDa的异构体, 其中APP<sub>695</sub>、APP<sub>770</sub>、APP<sub>751</sub>三种亚型能产生A $\beta$ , 大脑中APP亚型主要为APP<sub>695</sub><sup>[5]</sup>。APP瑞典型突变体(APP<sub>swe</sub>)是较早发现的一种APP突变体, 它是发生于APP第670和671位(APP<sub>770</sub>全长序列)氨基酸的串联双突变(Lys/Met $\rightarrow$ Asn/Leu), 发生错义突变后在A $\beta$ 序列的N末端前增强了 $\beta$ -分泌酶识别作用, 结果导致A $\beta$ 产生的增加<sup>[6]</sup>。

本文采用慢病毒介导转染的方法, 将人APP<sub>695</sub>瑞典型突变(APP<sub>swe695</sub>)基因转染至人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)中, 在转录和翻译水平的验证表明, 该转染细胞能够稳定表达瑞典型突变APP<sub>695</sub>转录本蛋白(APP<sub>swe695</sub>蛋白)。本研究构建的细胞模型可应用于在AD病理条件下APP表达及代谢、生物活性物质调节APP表达及A $\beta$ 分泌的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和试剂

SH-SY5Y细胞购自中国医学科学院。PRMI 1640培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司。链霉素-青霉素、G418抗生素购自Genview公司。细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂)购自碧云天生物技术研究。TRIzol™ Reagent、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit、PowerUp™ SYBR™ Green Master试剂盒购自美国Invitrogen公司。BCA蛋白定

量试剂盒购自北京鼎国昌盛生物科技有限公司。兔抗 $\beta$ -actin抗体和兔抗APP抗体购自美国Cell Signaling Technology公司。A $\beta$ <sub>1-40</sub>、A $\beta$ <sub>1-42</sub> ELISA试剂盒购自美国Invitrogen公司。

### 1.2 转染APP<sub>swe695</sub>基因SH-SY5Y细胞制备

APP<sub>swe695</sub>表达质粒采用哺乳动物细胞慢病毒表达载体pLV-eGFP:T2A:Neo-EF1 $\alpha$ 构建, 在多克隆位点插入APP<sub>swe695</sub> cDNA序列(APP转录本NM\_201414.2的编码序列中突变G1785T和A1786C)。将APP<sub>swe695</sub>表达质粒与表达gag/pol、Rev、VSVG的包装质粒混合, 转染293T细胞, 48 h后收集上清液。通过定量PCR法测定病毒滴度为 $3.0 \times 10^8$  TU(TU, 每毫升中含有具生物活性的病毒颗粒数量)。

将SH-SY5Y细胞按 $2 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板, 培养于含抗生物的完全培养液(RPMI1640+10% FBS)中培养24 h。在转染前2~4 h, 换成1 mL的不含抗生物的完全培养液。按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)为10加入经慢病毒包装的APP<sub>swe695</sub>质粒。置于含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中于37 °C继续培养24 h。通过荧光显微镜观察GFP蛋白表达水平。培养36~48 h后换成含抗性筛选药物的完全培养基(RPMI1640+10% FBS+0.5 g/L G418)继续培养24~48 h, 具有筛选药物抗性的细胞为潜在的转染APP<sub>swe695</sub>基因细胞。

### 1.3 qRT-PCR分析mRNA表达水平

细胞按 $5 \times 10^5$ 个/孔的密度培养于6孔板中, 含血清培养基培养24~36 h后, 用1 mL PBS洗涤细胞2次, 按照Trizol法提取细胞总RNA, 将总RNA逆转录为cDNA。实时荧光定量PCR扩增目的mRNA的cDNA。PCR程序设定: 每个循环95 °C 30 s, 55 °C 30 s; 72 °C 45 s; 总共35个循环。循环结束后, 记录70~95 °C的温度-荧光强度曲线。所用引物如表1所示。

### 1.4 Western blot分析蛋白表达水平

细胞按 $5 \times 10^5$ 个/孔的密度培养于6孔板中, 含血清培养基培养24~36 h后, 用1 mL PBS洗涤细胞2次, 加入100  $\mu$ L含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液, 冰

表1 qRT-PCR的引物序列  
Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequences (5'→3')	产物长度(bp) Products (bp)
APP <sub>swe695</sub> F	CTC TGA AGT GAA TCT GGA TG	201
APP <sub>swe695</sub> R	TGA TGA ATG GAT GTG TAC TG	
APP <sub>total</sub> F	CCC GCT GGT ACT TTG ATG TGA	157
APP <sub>total</sub> R	AGA GGT TCC TGG GTA GTC TTG AGT	
GAPDH F	ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG	210
GAPDH R	CCT GGA AGA TGG TGA TGG GAT T	

APP<sub>swe695</sub> F/R为APP<sub>swe695</sub>突变转录本的上下游引物, APP<sub>total</sub> F/R为所有APP转录本的上下游引物, GAPDH F/R为内参基因的上下游引物。

The APP<sub>swe695</sub> F/R is the upstream and downstream primer set for the mutation transcript of APP<sub>swe695</sub>, and the APP<sub>total</sub> F/R is the upstream and downstream primer set for all transcripts of APP. GAPDH F/R is the upstream and downstream primer set of the internal reference gene.

上裂解30 min, 用细胞刮分离、收集细胞, 在4 °C下12 000 ×g离心15 min, 吸取离心上清液, 二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法测量蛋白裂解液中蛋白浓度。1:4比例加上样缓冲液, 混匀后煮沸10 min, SDS-PAGE分离样品中不同分子量的蛋白质, 然后电转膜至PVDF膜上, 用含5%脱脂奶粉的PBST封闭1 h, 4 °C一抗孵育过夜, 用PBST漂洗2次, PBS漂洗1次, 二抗孵育2 h, 同上漂洗数次后用ECL发光液检测目标蛋白条带的光密度, Quantity One 4.62软件分析Western blot条带光密度灰度值。

### 1.5 免疫细胞化学分析

将细胞以4×10<sup>5</sup>个/孔的密度传代培养于6孔平板, 含血清培养基培养24~36 h后, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次, 室温下用4%多聚甲醛固定20 min, 经PBS洗涤后, 用0.5% Triton X-100处理20 min, 室温下用5%马血清处理20 min, 然后在4 °C下用抗APP羧基端抗体孵育过夜。PBS洗涤3遍后, FITC荧光染料标记的二抗体室温孵育2 h, Hoechst 33342染料染色30 min。PBS洗涤3遍后, 激光扫描共聚焦显微镜下记录细胞的荧光和微分干涉差(differential interference contrast, DIC)图像。采用INCell Developer Toolbox 1.9.1软件(GE Healthcare公司)对细胞核、细胞膜和细胞质进行分割(segmentation), 分析细胞核区、细胞膜和细胞质中绿色荧光强度, 计算细胞膜中荧光强度对总细胞荧光强度的比值。

### 1.6 酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)分析A $\beta$ 含量

采用抗体夹心法测定细胞培养上清和细胞裂解液中A $\beta$ <sub>1-40</sub>和A $\beta$ <sub>1-42</sub>的含量。将细胞以4×10<sup>5</sup>个/孔

接种于6孔板中, 含血清培养基培养24~36 h, 100 ×g离心后吸取培养上清液; 用1 mL PBS洗涤细胞3次, 加入100  $\mu$ L含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液, 冰上裂解30 min, 用细胞刮分离、收集细胞, 在4 °C下12 000 ×g离心15 min, 吸取离心上清液, BCA法测量蛋白裂解液中蛋白浓度。吸取30  $\mu$ L培养上清液或细胞裂解液, 在经抗A $\beta$ <sub>1-40</sub>或A $\beta$ <sub>1-42</sub>羧基端抗体包被的96孔板中分别与抗A $\beta$ 氨基端的游离一抗4 °C孵育过夜, 用缓冲液洗涤3次, 辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育30 min, 用缓冲液洗涤3次后加入100  $\mu$ L的生色反应液, 30 min后加入100  $\mu$ L的反应终止液终止生色反应。用酶标仪记录D<sub>450</sub>的数值。同时, 用标准A $\beta$ <sub>1-40</sub>或A $\beta$ <sub>1-42</sub>作D<sub>450</sub>—浓度标准曲线。培养上清液A $\beta$ <sub>1-40</sub>或A $\beta$ <sub>1-42</sub>含量表征为pg/mL, 细胞裂解液中A $\beta$ <sub>1-40</sub>或A $\beta$ <sub>1-42</sub>含量表征为pg/mg蛋白。

### 1.7 统计学分析

实验结果数据以平均值±S.D.表示, 采用Origin 8.0软件进行单因素方差分析, 组间数据比较采用独立样本t检验, P<0.05表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 APP<sub>swe695</sub>细胞形态

APP<sub>swe695</sub>表达质粒经慢病毒介导转染至SH-SY5Y细胞、G418药物筛选后得到稳定转染的阳性细胞。细胞的可见光及荧光图如图1所示, 与野生型SH-SY5Y细胞相比, 转染APP<sub>swe695</sub>基因的SH-SY5Y细胞(APP<sub>swe695</sub>细胞)绿色荧光强度明显增强, 提示质粒中的GFP蛋白在细胞中得到了表达, 暗示质粒能够整合到细胞基因组中, APP<sub>swe695</sub>基因也可能整

合到了基因组中, 同样APP<sub>Swe</sub>基因也可能表达。与野生型SH-SY5Y细胞相比, 转染APP<sub>Swe695</sub>细胞的突起变短, 胞体相对变小, 在光镜下可见的细胞内亮点(可能是细胞分泌泡)较多。

## 2.2 APP<sub>Swe695</sub>基因表达的验证

本研究进一步研究了APP<sub>Swe695</sub>基因的mRNA转录水平。如图2和图3所示, 与野生型SH-SY5Y细胞和转染空白质粒的Neo对照细胞的总RNA相似, APP<sub>Swe695</sub>细胞总RNA经qRT-PCR后, GAPDH和内源性APP mRNA有很强的扩增荧光信号。PCR扩增产

物的熔解曲线中只出现一个峰, 意味着扩增产物的唯一性。从图4可见, SH-SY5Y细胞和Neo对照细胞总RNA的cDNA在APP<sub>Swe695</sub>引物的PCR扩增过程中没有产生荧光信号, PCR产物熔解曲线中也没有扩增产物峰的出现, 说明SH-SY5Y和Neo对照细胞均不表达APP<sub>Swe695</sub> mRNA分子。而APP<sub>Swe695</sub>细胞总RNA的cDNA在APP<sub>Swe695</sub>引物的PCR扩增过程产生很强的荧光信号, 并且PCR产物熔解曲线中出现唯一信号峰。另外, 琼脂糖凝胶电泳分析结果表明, APP<sub>Swe695</sub>引物的扩增产物长度在200 bp附近, 与

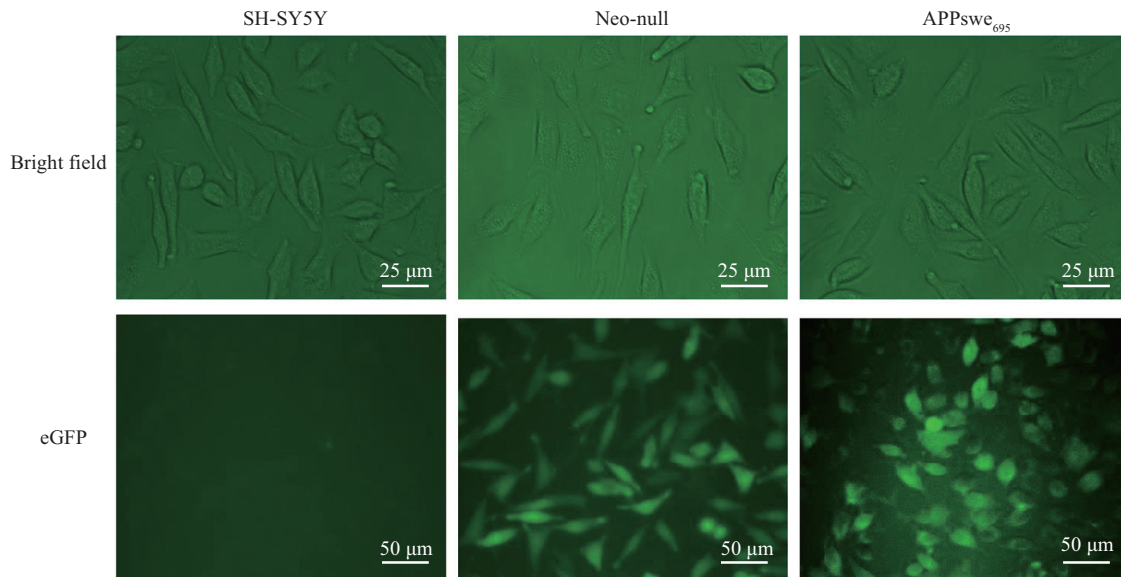
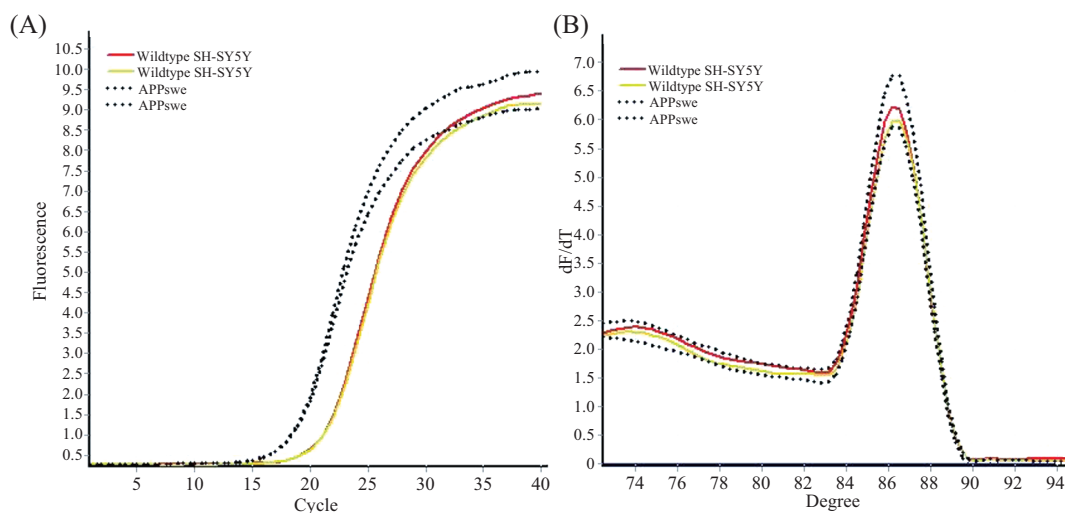


图1 转染基因前后细胞可见光及荧光图

Fig.1 Bright and fluorescence images before and after cells were transfected with target gene

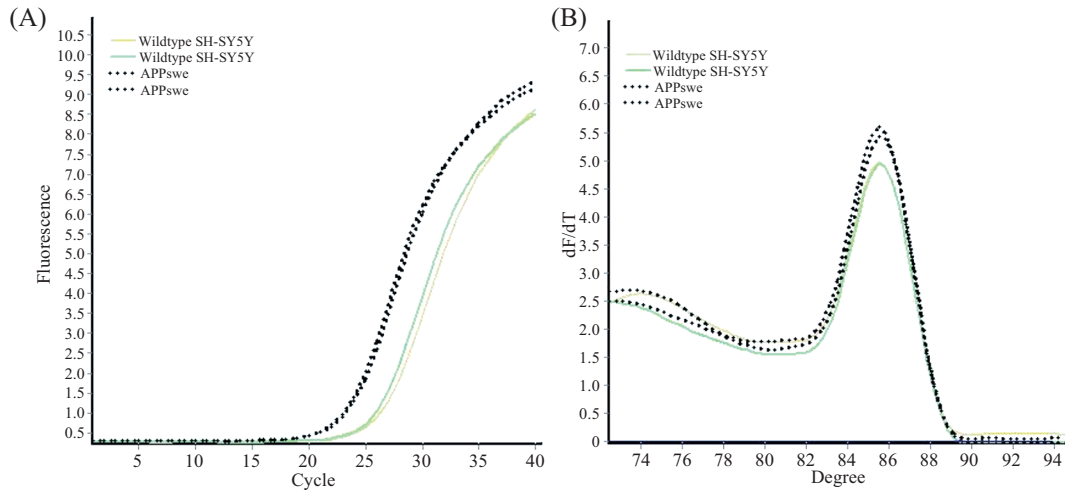


A: PCR扩增荧光曲线(荧光强度—循环); B: PCR产物熔解曲线(荧光强度微分/温度微分(dF/dT)—温度)。

A: curve of PCR amplification (fluorescence intensity vs cycle); B: PCR melt curve (differential fluorescence intensity (dF)/temperature (dT) vs temperature (degree)).

图2 GAPDH cDNA PCR扩增和熔解曲线

Fig.2 GAPDH cDNA PCR fluorescence intensity and melt curve

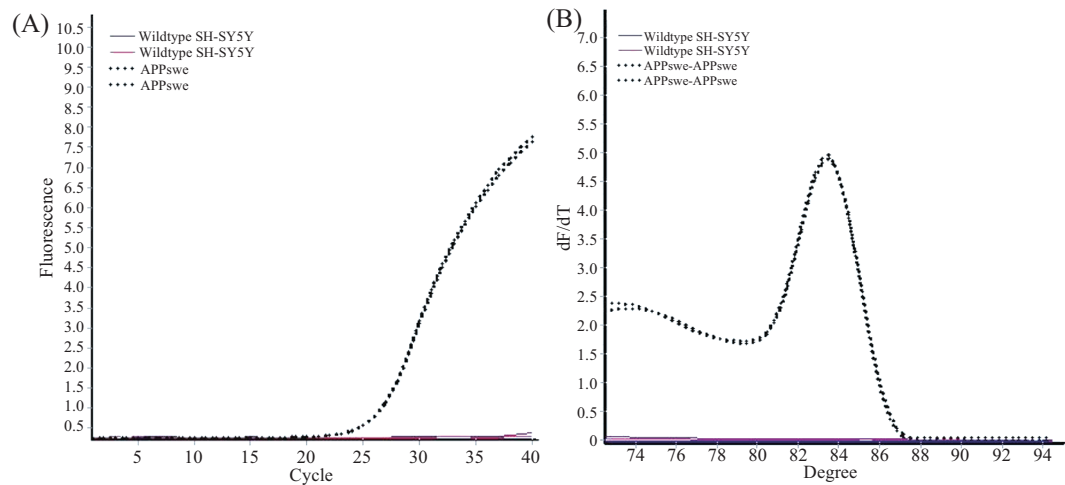


A: PCR扩增荧光曲线(荧光强度—循环); B: PCR产物熔解曲线(荧光强度微分/温度微分(dF/dT)—温度)。

A: curve of PCR amplification (fluorescence intensity vs cycle); B: PCR melt curve (differential fluorescence intensity (dF)/temperature (dT) vs temperature (degree)).

图3 内源性APP cDNA PCR扩增和熔解曲线

Fig.3 Endogenous APP cDNA PCR fluorescence intensity and melt curve



A: PCR扩增荧光曲线(荧光强度—循环); B: PCR产物熔解曲线(荧光强度微分/温度微分(dF/dT)—温度)。

A: curve of PCR amplification (fluorescence intensity vs cycle); B: PCR melt curve (differential fluorescence intensity (dF)/temperature (dT) vs temperature (degree)).

图4 APPswe<sub>695</sub> cDNA PCR扩增和熔解曲线

Fig.4 APPswe<sub>695</sub> cDNA PCR fluorescence intensity and melt curve

APPswe<sub>695</sub>引物设计产物长度相符(图5)。以上实验结果提示, APPswe<sub>695</sub>细胞能够在转录水平上表达APPswe<sub>695</sub>基因。

### 2.3 Western blot分析APP蛋白的表达水平

为了检验APPswe<sub>695</sub>基因在被转染的细胞中能否表达出目的蛋白, 本研究进一步考察了APPswe<sub>695</sub>基因的蛋白翻译水平。结果如图6所示, 野生型SH-SY5Y和转染空白质粒的Neo对照细胞仅表达了APP<sub>770</sub>转录本蛋白而不表达APP<sub>695</sub>转录本蛋白, 而转染APPswe<sub>695</sub>质粒的APPswe<sub>695</sub>细胞则同时表达了

APP<sub>770</sub>和APP<sub>695</sub>蛋白。这些结果表明, APPswe<sub>695</sub>细胞能够在翻译水平上表达APPswe<sub>695</sub>基因。

### 2.4 免疫荧光分析APP细胞分布

本研究进一步考察了转染表达的APPswe<sub>695</sub>蛋白与细胞内源表达的APP<sub>770</sub>蛋白在细胞分布的差异性, 经免疫荧光分析表明, 与野生型SH-SY5Y细胞相比, APPswe<sub>695</sub>细胞的APP荧光强度明显增强(图7)。APPswe<sub>695</sub>细胞的细胞膜中APP的荧光强度与SH-SY5Y细胞相比也明显增强, 但是在细胞膜中APP的荧光强度所占细胞总荧光强度与野生型SH-SY5Y

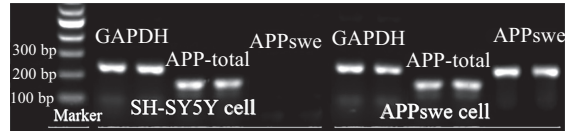


图5 PCR产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.5 Bands of PCR products separated by agarose gel electrophoresis

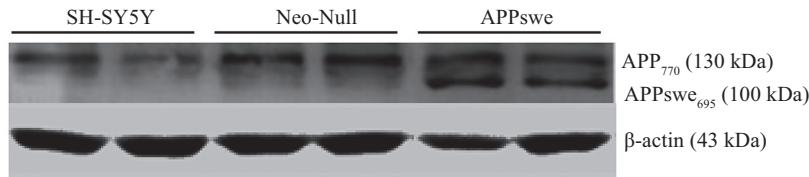
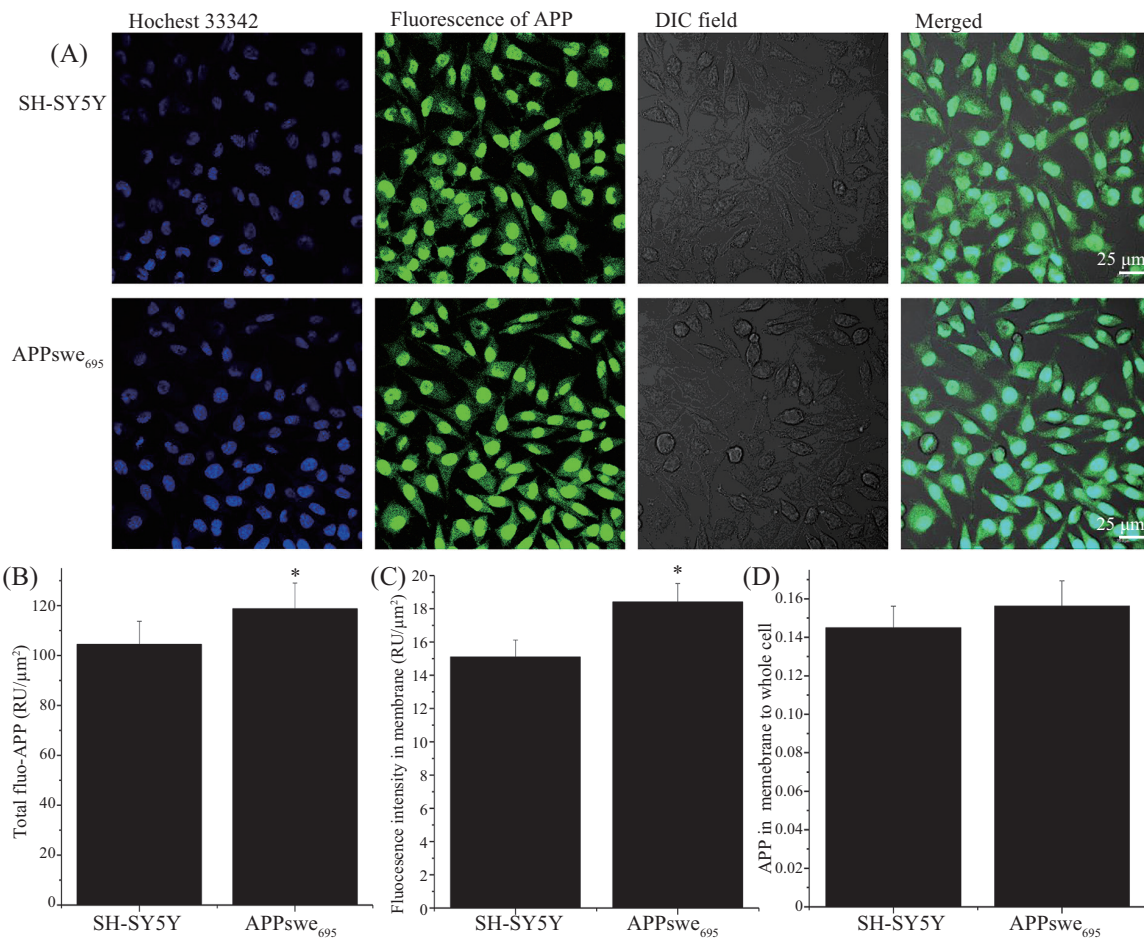


图6 Western blot验证APP蛋白表达

Fig.6 Bands of APP separated by Western blot



A: 细胞核染色、免疫荧光及DIC成像; B: 细胞总APP的免疫荧光密度; C: 细胞膜上APP的免疫荧光密度; D: 膜上APP与总APP免疫荧光密度的比值。\* $P < 0.05$ , 与野生型SH-SY5Y细胞相比较。

A: nucleus stained with Hoechst 33342, fluorescence images of APP and DIC filed images; B: immunofluorescence intensity of total APP; C: immunofluorescence intensity of APP in membrane; D: the ratio of membrane APP to the total APP. \* $P < 0.05$ , APPswe<sub>695</sub> cells vs wild-type SH-SY5Y cells.

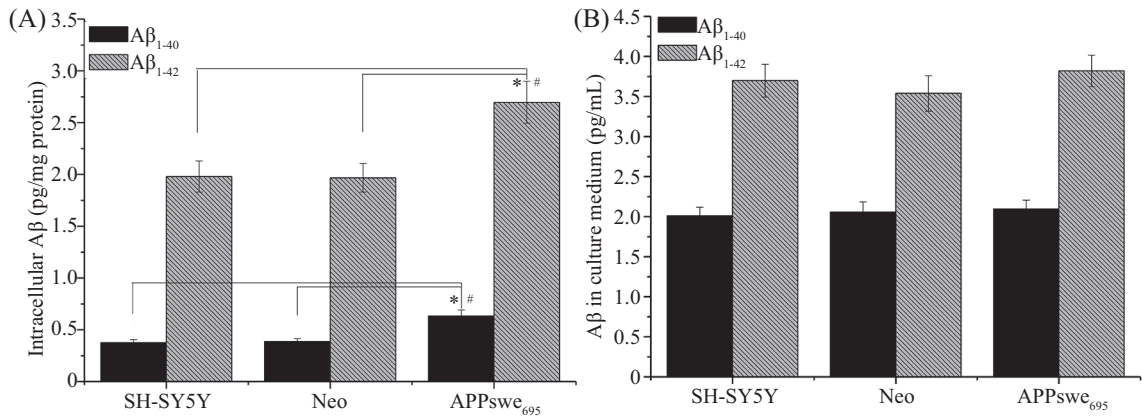
图7 APP在细胞膜和细胞质分布水平

Fig.7 APP distribution in membrane and cytoplasm

细胞相比并没有显示统计差异。这提示, 瑞典型APPswe<sub>695</sub>蛋白与APP蛋白在APPswe<sub>695</sub>细胞中有相似的细胞分布转运行为。

## 2.5 细胞A $\beta$ 蛋白分泌水平

为了进一步研究APP的裂解作用, 本研究进一步分析了胞内外A $\beta$ 的分泌水平。转染空质粒的Neo



A: 胞内 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 的含量; B: 培养液中 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 的含量; \* $P < 0.05$ , APPswe<sub>695</sub>细胞对SH-SY5Y细胞; # $P < 0.05$ , APPswe<sub>695</sub>细胞对转染空质粒SH-SY5Y细胞。

A: contents of intracellular  $A\beta_{1-40}$  and  $A\beta_{1-42}$ ; B: contents of  $A\beta_{1-40}$  and  $A\beta_{1-42}$  in culture medium; \* $P < 0.05$  vs wild-type SH-SY5Y cells and # $P < 0.05$  vs Neo-null cells.

图8 胞内和培养液中 $A\beta$ 的含量  
Fig.8 The content of  $A\beta$  by ELISA analysis

对照细胞与野生型SH-SY5Y相比, 细胞内和细胞培养液中 $A\beta$ 的含量并没有统计学差异。与野生型SH-SY5Y或转染空质粒的Neo对照细胞相比, APPswe<sub>695</sub>细胞的胞内 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 的含量明显上升, 而胞外培养液中的 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 含量却没有显著差异(图8)。这提示, 转染APPswe<sub>695</sub>基因后细胞产生更多的胞内 $A\beta$ , 而胞外的 $A\beta$ 分泌水平却没有明显变化。

### 3 讨论

APP是I型跨膜糖蛋白, 其生物学功能目前还有待研究。研究表明, APP是与AD发病机制密切相关的蛋白, 目前已经发现近30种APP基因的突变与家族性AD的发生密切相关<sup>[5]</sup>。APPswe突变是较早发现的一种与家族性AD相关的APP突变体, 患者在44岁开始就开始产生AD病征变化<sup>[7]</sup>。APP的 $\beta$ -裂解产物 $A\beta$ 是老年斑块的主要成分, 自1991年Hardy等<sup>[8]</sup>提出淀粉样 $\beta$ 级联假说以来,  $A\beta$ 在AD发病机制中的作用已成为AD发病机制及药物治疗研究的中心问题。

$A\beta$ 在神经炎斑块中的聚集导致神经元氧化损伤、神经纤维缠结和突触的丢失<sup>[9]</sup>。目前可以采用多种途径来研究 $A\beta$ 的神经毒性。例如, 在体外培养的细胞或者动物脑室带状海马中施加化学合成的 $A\beta$ , 观察细胞或受试动物的毒性反应。但是,  $A\beta$ 是如何诱导细胞损伤的? 目前仍存在争议。有观点认为,  $A\beta$ 可能通过与 $Cu^{2+}$ 结合而导致氧化应激损伤<sup>[10-11]</sup>, 或 $A\beta$ 可能形成 $Ca^{2+}$ 通道样离子通道而导致细胞 $Ca^{2+}$ 内流<sup>[12-13]</sup>。也有猜测认为, 细胞膜上可能存在 $A\beta$ 的

受体,  $A\beta$ 通过受体途径诱导神经毒性, 但是目前我们还没有在细胞膜上发现 $A\beta$ 的受体<sup>[9]</sup>。另外, 值得注意的是, 添加的化学合成 $A\beta$ 可能造成细胞内源性 $A\beta$ 分泌的异常, 如胞外施加的 $A\beta$ 可能会导致胞内 $A\beta$ 分泌的增强, 导致细胞损伤的发生。

细胞内 $A\beta$ 的神经毒性越来越受到研究者的关注,  $A\beta$ 的细胞内积累已被认为是AD发病的早期事件。在小鼠Thy1.2启动子的控制下能够表达人APP<sub>751</sub>瑞典和印第安纳突变体的McGill-R-Thy1-APP系转基因大鼠, 显示早期认知缺陷并且呈现渐进性严重变化; 体内可溶性 $A\beta_{1-42}$ 在淀粉样斑块沉积出现前几个月就明显升高<sup>[14]</sup>。将 $A\beta_{1-42}$ 注入培养神经元胞体后, 基底谷氨酸突触传递和长期增强(long-term potentiation, LTP)显著降低<sup>[15]</sup>。因此, 细胞内 $A\beta$ 在AD发病机制中可能起着关键性作用, 细胞过量分泌 $A\beta$ 可能是比较好的研究 $A\beta$ 神经毒性的途径。

细胞内 $A\beta$ 是如何产生的? 目前认为, 细胞内 $A\beta$ 的产生有三种可能的途径。首先, 从细胞表面分泌的胞外 $A\beta$ 可能被内化到细胞内。其次, 细胞膜上的APP通过内吞体-溶酶体途径重新进入细胞质后在细胞内通过 $\beta$ -裂解途径产生 $A\beta$ <sup>[16-19]</sup>。再次, 当新生的APP通过内质网和高尔基体/反式高尔基体时, 被 $\beta$ -分泌酶裂解而产生 $A\beta$ <sup>[20-21]</sup>。本研究中, APPswe<sub>695</sub>细胞与野生型SH-SY5Y细胞相比产生更多的细胞内 $A\beta$ 而细胞外 $A\beta$ 产物没有差异。然而, 细胞内 $A\beta$ 的生成途径有待研究。例如, 当内质网应激导致蛋白质发生修饰或折叠错误时, 新生的APPswe<sub>695</sub>产生

A $\beta$ 的水平是否增强; 另外, 当细胞膜上成熟的APP<sub>swe695</sub>被内吞并进入内体/溶酶体时, 这些被内化的APP<sub>swe695</sub>是否更倾向于进一步经 $\beta$ -途径裂解而产生A $\beta$ 。

总的来说, 通过慢病毒介导转染的方法将APP<sub>swe695</sub>表达质粒成功转染到SH-SY5Y细胞内, 使APP<sub>swe695</sub>细胞能够转录和翻译转染的APP<sub>swe695</sub>基因。转染表达的APP<sub>swe695</sub>蛋白与内源性APP<sub>770</sub>蛋白具有相同的细胞分布行为。值得注意的是, APP<sub>swe695</sub>细胞倾向于产生更多的胞内A $\beta$ , 从细胞内A $\beta$ 集聚的角度看, APP<sub>swe695</sub>细胞适合应用于细胞内A $\beta$ 细胞毒性的研究。因此, 本研究所建立的表达APP<sub>swe695</sub>蛋白的APP<sub>swe695</sub>细胞可应用于基于淀粉样蛋白级联假说的AD发病机理及药物治疗的研究。

### 参考文献 (References)

- Li K, Wei Q, Liu FF, Hu F, Xie AJ, Zhu LQ, *et al.* Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: A $\beta$ , Tau, and epigenetic alterations. *Mol Neurobiol* 2018; 55(4): 3021-32.
- LaFerla FM, Oddo S. Alzheimer's disease: A $\beta$ , tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 2005; 11(4): 170-6.
- Hardy J. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal. *J Alzheimers Dis* 2006; 9(3 Suppl): 151-3.
- Coronel R, Bernabeu-Zornoza A, Palmer C, Muniz-Moreno M, Zambrano A, Cano E, *et al.* Role of amyloid precursor protein (APP) and its derivatives in the biology and cell fate specification of neural stem cells. *Mol Neurobiol* 2018; 55(9): 7107-17.
- Huang HC, Jiang ZF. Amyloid-beta protein precursor family members: a review from homology to biological function. *J Alzheimers Dis* 2011; 26(4): 607-26.
- Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, *et al.* Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP<sub>sw</sub>, Ind) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(36): 13363-7.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, *et al.* A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1992; 1(5): 345-7.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256(5054): 184-5.
- Huang HC, Jiang ZF. Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 16(1): 15-27.
- Ryan TM, Kirby N, Mertens HD, Roberts B, Barnham KJ, Cappai R, *et al.* Small angle X-ray scattering analysis of Cu<sup>2+</sup>-induced oligomers of the Alzheimer's amyloid beta peptide. *Metallomics* 2015; 7(3): 536-43.
- Sharma AK, Pavlova ST, Kim J, Kim J, Mirica LM. The effect of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on the A $\beta$ 42 peptide aggregation and cellular toxicity. *Metallomics* 2013; 5(11): 1529-36.
- Arispe N, Pollard HB, Rojas E. Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A $\beta$  P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(22): 10573-7.
- Arbor SC, LaFontaine M, Cumbay M. Amyloid-beta Alzheimer targets-protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale J Biol Med* 2016; 89(1): 5-21.
- Iulita MF, Allard S, Richter L, Munter LM, Ducatzenzeiler A, Weise C, *et al.* Intracellular A $\beta$  pathology and early cognitive impairments in a transgenic rat overexpressing human amyloid precursor protein: a multidimensional study. *Acta Neuropathol Commun* 2014; 2: 61.
- Ripoli C, Cocco S, Li Puma DD, Piacentini R, Mastrodonato A, Scala F, *et al.* Intracellular accumulation of amyloid-beta (A $\beta$ ) protein plays a major role in A $\beta$ -induced alterations of glutamatergic synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci* 2014; 34(38): 12893-903.
- Carey RM, Balez BA, Lopez-Coviella I, Slack BE. Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biol* 2005; 6: 30.
- Koo EH, Squazzo SL, Selkoe DJ, Koo CH. Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J Cell Sci* 1996; 109(Pt 5): 991-8.
- Yamazaki T, Koo EH, Selkoe DJ. Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *J Cell Sci* 1996; 109(Pt 5): 999-1008.
- Pasternak SH, Bagshaw RD, Guiral M, Zhang S, Ackerley CA, Pak BJ, *et al.* Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J Biol Chem* 2003; 278(29): 26687-94.
- Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, Hai B, Thinakaran G, Checler F, *et al.* Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(2): 742-7.
- Xu H, Sweeney D, Wang R, Thinakaran G, Lo AC, Sisodia SS, *et al.* Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(8): 3748-52.