

GLP-1 对阿尔茨海默病细胞模型保护作用的体外研究^{*}

刘人恺¹, 杨春水¹, 肖波^{2**}, 吴志国²

(1. 广东医学院附属南山医院 神经内科, 广东 深圳 518052; 2. 中南大学湘雅医院 神经内科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的: 探讨胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 对 APP 瑞典突变体转染构建的阿尔茨海默病 (AD) 细胞模型的保护作用及可能机制。方法: 将人肾上皮细胞系 HEK293 分为对照组、转染组、GLP-1 干预组, 对照组不予任何处理, 其他两组构建 APP 瑞典突变体转染的 AD 细胞模型, GLP-1 干预组分别加入不同浓度 (5、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 的 GLP-1; 3 组均在培养前及培养 6、12、24、48 及 72 h 收集细胞上清液, ELISA 检测 β 淀粉蛋白 ($\text{A}\beta$) 含量, QDs-SA 细胞免疫荧光染色检测 $\text{A}\beta$ 的变化, 运用 DCFH-DA 检测细胞内活性氧 (ROS)。结果: 与对照组比较, 转染组 $\text{A}\beta$ 含量及 ROS 水平明显升高 ($P < 0.05$); GLP-1 干预组不同浓度的 GLP-1 和培养时间增加均能减少 $\text{A}\beta$ 含量和 ROS 水平。结论: APP 瑞典突变体转染的 AD 细胞模型会使 $\text{A}\beta$ 含量明显升高, 产生氧化应激损伤, GLP-1 能通过降低氧化应激损伤减少细胞内 $\text{A}\beta$ 聚集, 并具有浓度-时间依赖性。

[关键词] 阿尔茨海默病; 胰高血糖素样肽; 氧化性应激; 淀粉样蛋白

[中图分类号] R742 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1000-2707(2013)02-0126-04

The Protective Effects of GLP-1 on AD Cell Model *in vitro*

LIU Renkai¹, YANG Chunshui¹, XIAO Bo², WU Zhiguo²

(1. Department of Neurology, the Affiliated Nanshan Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen 518052, Guangdong, China; 2. Department of Neurology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effects of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) on Alzheimer's disease (AD) cell model constructed by transfecting APP Swedish mutant plasmid. **Methods:** HEK293 cells were divided into control group, transfection group and GLP-1 groups. The control group didn't accept any treatment, and the other groups were transfected with APP Swedish mutant plasmid to construct AD cell model. GLP-1 groups were treated with different doses (5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) of GLP-1 respectively. β -amyloid ($\text{A}\beta$) content was measured with ELISA and QDs-SA immunofluorescence staining, and ROS level was detected with DCFH-DA. **Results:** $\text{A}\beta$ level and ROS level were higher in AD cell groups than those in control group ($P < 0.05$). GLP-1 at different concentrations, and with the increase of culture time could reduce $\text{A}\beta$ contents and ROS levels. **Conclusions:** Transfecting AD cell model with APP Swedish mutant plasmid leads to increase of $\text{A}\beta$ level and oxidative stress injury. GLP-1 can decrease $\text{A}\beta$ accumulation in dose and time dependent manner by reducing oxidative stress injury.

[Key words] Alzheimer's disease; glucagon-like peptide 1; oxidative stress

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种原因不明的, 以进行性认知功能障碍、行为和人格障碍等为主要临床特征的中枢神经系统退行性疾病, 是老年期痴呆中的最常见病因, 大脑皮层及

格障碍等为主要临床特征的中枢神经系统退行性疾病, 是老年期痴呆中的最常见病因, 大脑皮层及

^{*} [基金项目] 国家自然科学基金 (30770736), 深圳市科技项目 (201102126)。

^{**} 通信作者 E-mail: xiaobo62_xy@yahoo.com.cn

海马区的 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, $A\beta$) 的胞外沉积是其特征性的病理改变^[1-2]。胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 是由肠道内分泌 L 细胞分泌的肠促胰岛素, 在调节体内葡萄糖稳态中起重要作用^[3], 研究发现 GLP-1 对神经退行性疾病的神经元损伤有保护作用^[4]。本实验构建 pcDNA3.1/APP 质粒转染的 AD 细胞模型, 探讨 GLP-1 对 $A\beta$ 蛋白沉积的影响及可能的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

pcDNA3.1/APP 质粒由美国 Pittsburgh 大学的 Perez 博士惠赠, 人肾上皮细胞系 HEK293 细胞由中南大学肿瘤研究所提供。高糖 DMEM 培养基、胰酶及胎牛血清均购自美国 Gibco 公司, ROS 检测试剂盒 (DCFH-DA) 购自 Invitrogen 公司, Beta Amyloid antibody 购自美国 abcam 公司, 人 $A\beta$ 酶联免疫检测试剂盒购自美国 R&D 公司; QDs-SA (Qdots Streptavidin Conjugate) 量子点购自武汉珈源量子点公司, 含 CdSe/ZnS 量子点外壳包被链霉素亲和素复合物 (SA), 其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HEK293 细胞培养于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度下培养, 0.25% 胰酶消化传代。细胞呈上皮样贴壁生长, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 分组 细胞分为对照组、转染组、GLP-1 干预组, 对照组为不经任何处理的 HEK293 细胞, 其它 2 组为转染 pcDNA3.1/APP 质粒后的 HEK293 细胞 (步骤见 AD 转基因细胞模型制备), GLP-1 干预组于培养前添加浓度为 5、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 GLP-1 用 DMEM 培养液配制)。各组于培养前和培养 6、12、24、48、72 h 时进行观察。

1.2.3 AD 转基因细胞模型制备 取对数生长的 HEK293 细胞消化, Lipofectin 脂质体法将 pcDNA3.1/APP 质粒转染 HEK293 细胞, 待转染细胞生长接近融合时弃培养液, 按 1:5 密度传代至直径 60 mm 培养皿中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱过夜。同时, 将未转染的细胞同样处理作为空载体转染 (pcDNA3.1) 组; 次日用含 500 $\mu\text{g/mL}$ (最小致死质量浓度) G418 的选择培养液进行筛选; G418 抗性克隆形成长大后, 行克隆细胞转移和扩增。

1.2.4 ELISA 检测 $A\beta$ 蛋白 3 组均在培养前及培养 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 收集细胞上清液, 应用 ELISA 检测试剂盒测定 $A\beta_{1-42}$ 的水平, 按说明书步骤操作。最后用分光光度计在 450 nm 波长下测吸光度 (A) 值, 绘制标准曲线, 根据曲线计算 $A\beta_{1-42}$ 浓度。

1.2.5 QDs-SA 细胞免疫荧光染色检测 $A\beta$ 蛋白

超净台内将多聚赖氨酸处理过的灭菌盖玻片放入 24 孔培养板, 将 3 组细胞分别加入培养板, 置 37 °C、5% CO₂ 的培养箱过夜, 待细胞贴壁牢固后加固定液固定, TBS 洗 2 次, 加入通透液室温孵育 5~10 min; 封闭缓冲液 37 °C 湿盒孵育 30 min; 滴加一抗 (β amyloid antibody, 1:200, Abcam 公司), 37 °C 湿盒孵育 2 h; TBS-T (TBS + 0.05% 吐温 20) 振荡洗涤后滴加生物素化二抗 (1:200, 长沙鼎国生物技术有限公司), 37 °C 湿盒孵育 45 min; TBST 洗涤后滴加 QDs-SA (终浓度达到 15 nmol/L), 37 °C 湿盒孵育 45 min, TBST 振荡洗涤后在激光共聚焦显微镜下观察成像。

1.2.6 细胞内 ROS 以 2×10^4 个/孔的细胞密度进行铺板过夜培养后, GLP-1 干预组加入 GLP-1 (20 $\mu\text{mol/L}$) 共培养 24 h 后进行细胞内 ROS 检测。细胞在药物处理结束后洗涤一次与 10 μm 的 DCFH-DA 在 37 °C 暗处孵育 30 min 后上机检测, 检测方法参照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理

SPSS 13.0 统计软件处理实验数据, 数据采用均数 \pm 标准差的形式表示, 采用方差分析及 *t* 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 示差异有显著性。

2 结果

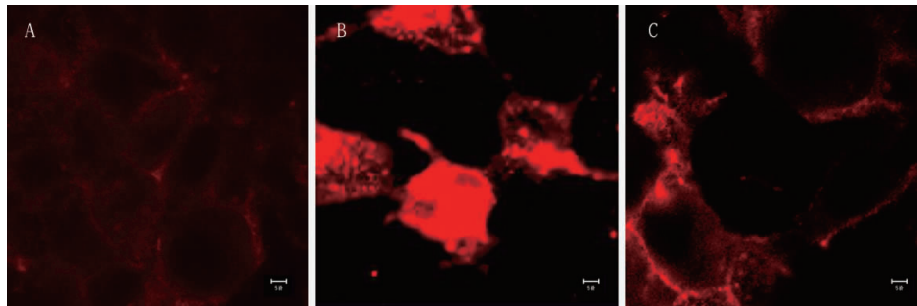
2.1 QDs-SA 细胞免疫荧光染色检测 $A\beta$ 蛋白

转染组细胞内可见 QDs-SA 特异标记的 $A\beta$ 蛋白, 主要分布在转染后细胞的胞膜和胞质, 胞质的 $A\beta$ 蛋白主要集中在胞膜周围, 有明显的趋膜趋势, 在激光共聚焦显微镜下显现出均匀分布的高密度橙红色强荧光, 胞核空染, 核膜边界清楚。GLP-1 干预组培养细胞内沉积的 $A\beta$ 蛋白颗粒明显减少, 见图 1。采用激光共聚焦显微镜荧光分析软件计算 QDs-SA 标记 $A\beta$ 蛋白的平均荧光强度, 见图 2, GLP-1 组细胞内的 $A\beta$ 含量降低较转染组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 ELISA 检测 $A\beta$ 蛋白

ELISA 结果显示,随着 GLP-1 药物浓度及作用时间的增加,A β 的含量呈直线下降趋势,见图 3、

图 4。20 $\mu\text{mol/L}$ 的 GLP-1 药物培养 24 h 时,细胞内的 A β 含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A:对照组 B:转染组 C:GLP-1 干预组

图 1 激光共聚焦显微镜下 QDs-SA 细胞免疫荧光染色显示各组细胞 A β 蛋白表达

Fig. 1 QDs-SA cellular immunofluorescence staining showing the expression of A β protein observed under laser scanning confocal microscope in the 3 groups

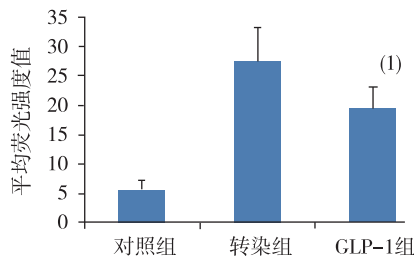


图 2 QDs-SA 标记 A β 蛋白平均荧光强度

Fig. 2 Mean fluorescence intensity of A β protein labeled by QDs-SA in the 3 groups

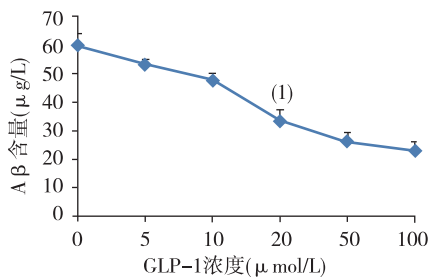


图 3 不同浓度的 GLP-1 对细胞内 A β 含量的影响

Fig. 3 The effects of GLP-1 at different concentrations on intracellular A β content

2.3 ROS 水平

细胞内的 ROS 水平是反映氧化应激的一个重要指标。转染组细胞内 ROS 水平增加到对照组水平的 222.7%,显示转染后细胞氧化应激水平增高。当 HEK293 细胞预先经 GLP-1 (20 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后,细胞内 ROS 水平与转染组相比显著下降($P < 0.01$),为对照组的 215.3%,说明 GLP-1 处理后能降低转染细胞氧化应激的水平,见图 5。

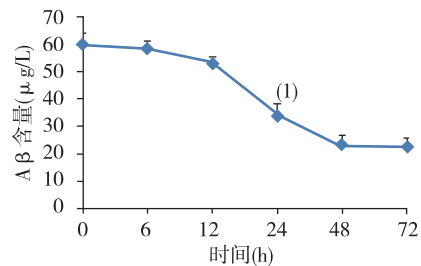


图 4 不同时间 20 $\mu\text{mol/L}$ GLP-1

对细胞内 A β 含量的影响

Fig. 4 The effects of different treating time with 20 $\mu\text{mol/L}$ GLP-1 on intracellular A β content

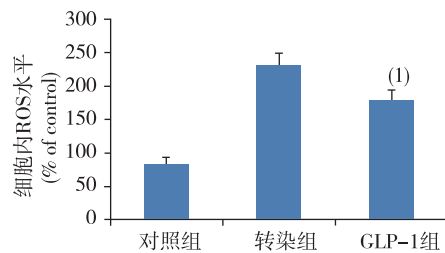


图 5 三组细胞 ROS 水平

Fig. 5 POS levels in the 3 groups of cells

3 讨论

AD 特征性的病理改变为大脑皮层及海马区的 A β 的胞外沉积,A β 在细胞内的聚集是启动 AD 病理过程的早期事件^[5]。本研究应用 pcDNA3.1/APP 质粒稳定转染 HEK293 细胞,最大程度地模拟了 AD 患者 A β 蛋白聚集的病理过程。共聚焦显微镜下观察 A β 蛋白不均匀分布于细胞质和细胞膜,

细胞形态异常,与国外学者的研究结果相一致^[6]。

AD 发病机制的学说很多,包括基因学说、胆碱能学说、自由基学说、氧化应激学说、铝中毒假说、病毒学说和免疫炎症学说等方面^[7]。近年来的诸多研究提示,氧化应激与神经退行性疾病关系密切,自由基介导的氧化应激参与了 AD 脑中老年斑和神经纤维缠结等病理结构的形成^[8]。许多实验证明,A β 可通过多种途径产生过氧化物和自由基,从而加剧过氧化损伤^[9]。

胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 是由肠道内分泌 L 细胞分泌的肠促胰岛素,其特异性受体广泛表达于各种类型细胞上,包括胰腺 α 和 β 细胞、胃小凹、小肠黏膜、心、肺及中枢神经系统。因此 GLP-1 除影响胰岛素分泌和胰岛细胞功能改善外,对其他器官和组织的代谢也有广泛影响。在中枢神经系统, GLP-1 和几种 GLP-1 类似物结合 GLP-1R,表现亲神经特性,能防护谷氨酸诱导的凋亡和氧化应激损伤。Perry 等^[10]在 AD 动物模型中发现 GLP-1 可以修饰 A β 蛋白前体,减少脑内 A β 的产生,保护海马神经元免受 A β 、铁离子、氧化应激、谷氨酸盐等所致的损伤,并可以减少基底前脑胆碱乙酰基转移酶的消耗,有类似乙酰胆碱抑制剂的作用。Qin Z^[11]制备 AD 细胞模型,发现 GLP-1 通过结合 GLP-1 受体增加细胞内 cAMP 的浓度,提示 GLP-1 有保护神经元的作用。其他研究显示, GLP-1 对中枢和周围神经亦有保护作用,可促进 PC12 细胞向神经元分化,并能减少因 NGF 缺乏引起的神经元变性^[12]。研究提示, GLP-1、GLP-1 衍生物或 GLP-1R 激动剂可能成为治疗 AD 的新武器。本实验 ELISA 和 QDs-SA 细胞免疫荧光染色检测显示, A β 随着 GLP-1 药物浓度的增加或者作用时间的延长而明显减少 ($P < 0.05$);同时发现, GLP-1 药物的作用与浓度和时间有密切关系,当浓度增加到 20 $\mu\text{mol/L}$ 、处理时间达到 24 h 时, A β 的减少具有统计学意义,并呈现明显的浓度 - 时间依赖性 ($P < 0.05$);转染组细胞内 ROS 水平明显增加,进一步证实氧化应激在 AD 发病过程中起到重要作用。GLP-1 预处理后 ROS 水平下降,从而降低细胞内的氧化应激水平,起到神经元保护作用,但其具体的调控机制需要进一步深入研究。

4 参考文献

[1] Cummings JL. Alzheimer's disease[J]. The New England

journal of medicine, 2004(1):56-67.

- [2] Checler F, Buee L. Fundamental data on the pathologies amyloid and Tau in Alzheimer's disease: Which therapeutic perspectives[J]. Annales Pharmaceutiques Francaises, 2009(2):136-153.
- [3] Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT. Hamster prepro-glucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides[J]. Nature, 1983(5910):716-718.
- [4] Perry T, Greig NH. Enhancing central nervous system endogenous GLP-1 receptor pathways for intervention in Alzheimer's disease[J]. Curr Alzheimer Res, 2005(3):377-385.
- [5] Yamamoto K, Ueta Y, Wang L, et al. Suppression of a neocortical potassium channel activity by intracellular amyloid β and its rescue with Homer1a[J]. Neurosci, 2011(31):11100-11109.
- [6] Citron M, Oltersdorf T, Haass C, et al. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increase beta-protein production [J]. Nature, 1992(360):672-674.
- [7] Jia JP, Jia JM, Zhou WD, et al. Differential acetylcholine and choline concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. Chin Med, 2004(117):1161-1164.
- [8] McDaid DG, Kim EM, Reid RE, et al. Parenteral antioxidant treatment preserves temporal discrimination following intrahippocampal aggregated A β (1-42) injections[J]. Behav Pharmacol, 2005(4):237-242.
- [9] Cao X, Wei Z, Gabriel GG, et al. Calcium-sensitive regulation of monoamine oxidase-A contributes to the production of peroxyradicals in hippocampal cultures: implications for Alzheimer disease-related pathology [J]. BMC Neurosci, 2007(8):73.
- [10] Perry T, Lahiri D K, Sambamurti K, et al. Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (A β) levels and protects hippocampal neurons from death induced by A β and iron [J]. J Neurosci Res, 2003(5):603-612.
- [11] Qin Z, Sun Z, Huang J, et al. Mutated recombinant human glucagon-like peptide-1 protects SH-SY5Y cells from apoptosis induced by amyloid-beta peptide (1-42) [J]. Neurosci Lett. 2008(3):217-221.
- [12] During MJ, Cao L, Zuzga D S, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection [J]. Nat Med, 2003(9):1173-1179.

(2013-03-18 收稿)

编辑:周 凌