

$A\beta_{1-42}$ 寡聚体在非Caspase依赖性细胞凋亡通路中的作用机制*

杨梅^{1,2}, 任真奎^{1,2}, 官志忠^{1,2,3}, 禹文峰^{1,2,*}

(1. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 地方病与少数民族性疾病教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 观察 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体对凋亡诱导因子(AIF)在神经细胞线粒体或细胞核中表达的影响。方法: 将体外培养原代神经细胞分为对照组和 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理组, (分别用 0.1、0.2、0.5 及 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理 24 h), 采用 MTT 法测定神经细胞的相对生存率, Western blotting 检测凋亡诱导因子(AIF)在神经细胞的线粒体和细胞核中的表达。结果: MTT 结果显示, 与对照组比较, $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理组的 OD 值均有不同程度的下降, $A\beta_{1-42}$ 寡聚体为 0.1、0.2 及 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时的细胞相对生存率明显降低 ($P < 0.05$), 1 $\mu\text{mol/L}$ 时降低最明显 ($P < 0.01$); 与对照组比较, $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理组神经细胞线粒体中 AIF 蛋白表达减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而细胞核中 AIF 蛋白表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: $A\beta_{1-42}$ 寡聚体可能通过 AIF 介导的非 Caspase 依赖性细胞凋亡通路导致大鼠神经细胞的凋亡, 其机制可能与 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体促进 AIF 从线粒体向细胞核转移有关。

[关键词] 细胞凋亡; 阿尔茨海默病; 细胞; 神经; 大鼠, Sprague-Dawley; 凋亡诱导因子; $A\beta_{1-42}$ 寡聚体

[中图分类号] R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)03-0253-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.03.002

Study on the Mechanism of $A\beta_{1-42}$ Oligomers in Caspase-independent Apoptosis Pathway

YANG Mei^{1,2}, REN Zhenkui^{1,2}, GUAN Zhizhong^{1,2}, YU Wenfeng^{1,2}

(1. Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Pathology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of expression of $A\beta_{1-42}$ oligomers on AIF in mitochondrion or nucleus. **Methods:** Cortical neuronal cultures were divided into control and $A\beta_{1-42}$ oligomers group. $A\beta_{1-42}$ oligomers were prepared using chemically synthetic $A\beta_{1-42}$ *in vitro* (treated by 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{1-42}$ oligomers for 24h), and detected relative survival rate of neuronal cells by MTT. Western blotting was used to detect the expression of AIF in neuronal mitochondria and nucleus. **Results:** MTT indicated that OD value of $A\beta_{1-42}$ oligomers treated group showed decrease in various degree comparing with control group; with the $A\beta_{1-42}$ oligomers as 0.1, 0.2 and 0.5 $\mu\text{mol/L}$, relative survival rate of cells were obviously lowered ($P < 0.05$), while at 1 $\mu\text{mol/L}$ reached the most obvious decrease ($P < 0.01$); the protein level of AIF in the mitochondria of $A\beta_{1-42}$ oligomers group was significantly lower compared to control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the protein level of

*[基金项目] 国家自然科学基金(81360199); 教育部科学技术研究项目(213032A); 贵州省国际科技合作计划项目[黔科合外 G 字(2013) 7026]; 贵州省创新计划项目[黔教合协同创新中心(2014)06]; 贵州省教育厅项目(2015 年贵州省普通高等学校地方病和少数民族疾病防控创新团队); 贵州省科技厅计划课题[黔科合重大专项字(2014)6008]

** 通信作者 E-mail: wenfengyu2013@126.com

网络出版时间: 2017-3-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170318.2319.010.html>

AIF in the nucleus was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** It is possible that $A\beta_{1-42}$ oligomers caused apoptosis of rats neuronal cell via AIF induced Caspase independent cell apoptosis pathway. The mechanism is possible to be relevant with $A\beta_{1-42}$ oligomers enhancing AIF translocation from mitochondrial to nuclear.

[**Key words**] cell apoptosis; Alzheimer's disease; cells; neuron; rats, Sprague-Dawley; apoptosis-inducing factor; $A\beta_{1-42}$ oligomers

阿尔茨海默病 (alzheimer's disease, AD) 是以进行性记忆和认知功能障碍为特征的中枢神经系统退行性疾病, 主要病理变化有老年斑 (senile plaque, SP)、神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 以及大量神经元丢失等^[1]。在 AD 中, 神经功能的退化被认为是 β -淀粉样蛋白 (amyloid- β , $A\beta$) 累积到一定程度引起细胞程序性死亡而造成的^[2-3]。 $A\beta$ 的聚集和沉积是 AD 的核心病理机制, 它不仅破坏突触结构和功能, 还可以导致神经元凋亡, 从而导致记忆和认知功能障碍^[4-5]。细胞凋亡有 2 条途径, 一条需要半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase) 和 Bcl 家族参与, 称为 Caspase 依赖性细胞凋亡通路; 另一条由凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF) 介导的非 Caspase 依赖性细胞凋亡通路 (Re)。研究证实, AIF 是 Caspase 非依赖性细胞凋亡通路的重要执行因子, 是第一个被发现的不依赖 Caspase 的凋亡因子^[6-9]。 $A\beta$ 可通过 Caspase 依赖性细胞凋亡通路, 诱导细胞凋亡, 但在非 Caspase 依赖性细胞凋亡通路是否也具有诱导细胞凋亡的作用尚不明确。本研究通过体外制备 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理原代培养的神经元, 观察线粒体或细胞核中 AIF 蛋白表达情况, 研究 $A\beta$ 在非 Caspase 依赖性细胞凋亡通路中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂

怀孕 20 d 左右的 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 (购于贵州医科大学动物实验中心), 主要试剂有细胞培养材料 (购于美国 Gibco 公司)、 $A\beta_{1-42}$ 和 AIF 抗体 (购于美国 Sigma 公司)、Histone 和 Cox-IV (购于美国细胞信号转导公司)、ECL 荧光试剂盒 (购于美国 Millipore 公司)、细胞线粒体提取试剂盒和细胞核提取试剂盒 (购于美国 Pierce 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠原代神经细胞培养及分组 麻醉状态

下处死怀孕约 20 d 的 SD 大鼠, 取胎鼠头分离皮质剪成泥状, 消化漂洗后, 加入 Neurobasal-A 完全培养基 (含 Neurobasal-A 培养基、2% B27、1% Gluta MAX 添加剂、100 000 U/L 青霉素及 100 g/L 链霉素) 2 mL, 轻轻吹打细胞, 待细胞自然沉淀后取上清, 再加入 Neurobasal 完全培养基 2 mL, 用 70 μ m 滤网过滤, 再加入 Neurobasal-A 完全培养基稀释细胞, 以 5×10^8 个/L 的密度将细胞接种于经左旋赖氨酸 (PLL) 包被的 6 孔板内, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 8 ~ 10 d, 每隔 3 d 用含 Neurobasal-A 完全培养基半量换液, 将纯度达到 85% 以上的神经元分为对照组和 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理组。

1.2.2 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体的制备及鉴定 参考文献 [10], 在 $A\beta$ 粉末中加入已预冷的六氟异丙醇 (hexafluoroisopropanol, HFIP), 使 $A\beta$ 粉末彻底溶解至终浓度为 1 mmol/L, 室温孵育 60 min。随后将其等量分装至离心管并在冰上静置 5 ~ 10 min, 室温过夜后, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。使用时用含 0.05% SDS 的 PBS 稀释 $A\beta$ 至 100 μ mol/L 的终浓度, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h, 继续用 PBS 稀释至 10 μ mol/L 的应用液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 周, 14 000 r/min 冰冻高速离心 10 min, 上清液即为 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体。选取 4% ~ 12% 的 Bis-Tris 预制梯度胶, 将制备好的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体与不含还原剂的上样缓冲剂混合后 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min, 加入预制胶的孔中进行电泳。电泳结束后, 取出凝胶, 以 120 V 稳压, 冰上转膜约 100 min, TBST 洗膜 5 min, 将膜封闭 2 h。用稀释后的 6E10 (1:1 000) 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后, TBST 洗膜 3 次 (10 min/次)。加入二抗在摇床上摇 1 h。TBST 洗膜 3 次 (10 min/次), 最后用 ECL 发光试剂观察表达情况。

1.2.3 MTT 法检测 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体细胞毒性 对照组不加入 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体, $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理组分别用浓度为 0.1、0.2、0.5 及 1 μ mol/L 的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理, 两组均于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中孵育 24 h, 弃上清, 加入 Neurobasal 完全培养基 180 μ L, 5 g/L MTT 20 μ L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中孵育 4 h, 弃上清, 加

入 DMSO 150 μ L, 摇床摇 10 min, 于 570 nm 波长处检测各孔光密度值(OD 值), 计算细胞的相对生存率, 相对生存率 = (实验组 OD 值 - 对照组 OD 值) / 实验组 OD 值 \times 100%。

1.2.4 细胞线粒体和细胞核的提取 对照组和不同浓度的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理组的神经元细胞用冰预冷的 Hanks' 平衡溶液洗涤 2 次, 再用 RIPA buffer 在冰上裂解 30 min。细胞裂解物于 4 $^{\circ}$ C 15 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为胞浆提取物。再用线粒体提取试剂盒提取线粒体, 用细胞核提取试剂盒提取细胞核。

1.2.5 AIF 蛋白水平检测 参考文献方法[11], RIPA buffer 沉淀细胞提取物, 并取含等量蛋白样品量, 加入 4%~20% 的 SDS-PAGE 凝胶中电泳, 将胶上的条带转移到 NC 膜上, 5% 脱脂牛奶 24 $^{\circ}$ C 下封闭 1 h, 再用 1:8 000 的 AIF 抗体 4 $^{\circ}$ C 冰箱里孵育过夜, 再加入二抗在摇床上摇 1 h, 用含 0.1% 的吐温-20 的 TBST 清洗 2 次, 每次 5 min。最后用 ECL 发光试剂盒化学发光显色, Cox-IV 作为线粒体蛋白的内参, Histone 作为细胞核蛋白的内参, Image J 软件分析 AIF 蛋白条带以及两个内参蛋白条带的灰度值。

1.3 统计学分析

数据用 SPSS 19.0 统计软件分析, 计数资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间数据比较采取单因素方差分析, 两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体鉴定

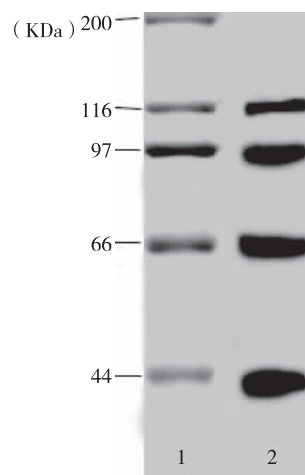
经 Western blotting 鉴定, 聚合的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体在 40、64、96 及 116 kDa 处有明显条带, 见图 1。

2.2 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体对神经细胞的毒性作用

不同浓度的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理神经细胞 24 h 后, MTT 实验结果显示, 与对照组比较, $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理组神经细胞生存率 OD 值均有不同程度的下降。 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理浓度为 0.1、0.2 及 0.5 μ mol/L 时, 细胞的相对生存率明显降低 ($P < 0.05$); 处理浓度为 1 μ mol/L 时降低最明显 ($P < 0.01$), 见图 2。

2.3 线粒体及细胞核中 AIF 表达

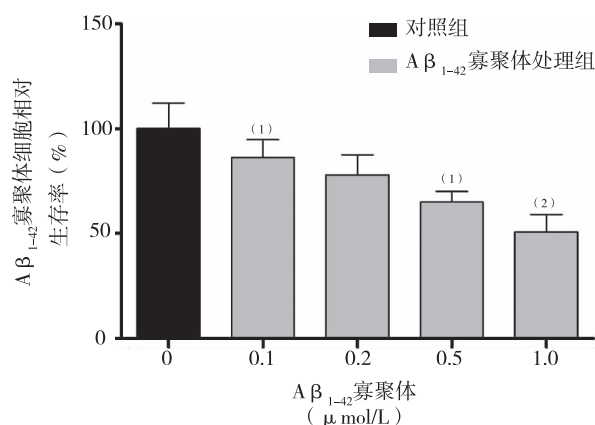
与对照组比较, $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理组神经细胞的线粒体中 AIF 蛋白表达减少, $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理浓度为 0.1、0.2、0.5 μ mol/L 时, AIF 蛋白表达



注: 1 为 Cruz Marker, 2 为 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体

图 1 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体的鉴定结果(western blotting)

Fig. 1 Identification of $A\beta_{1-42}$ oligomer with western blotting



与对照组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$

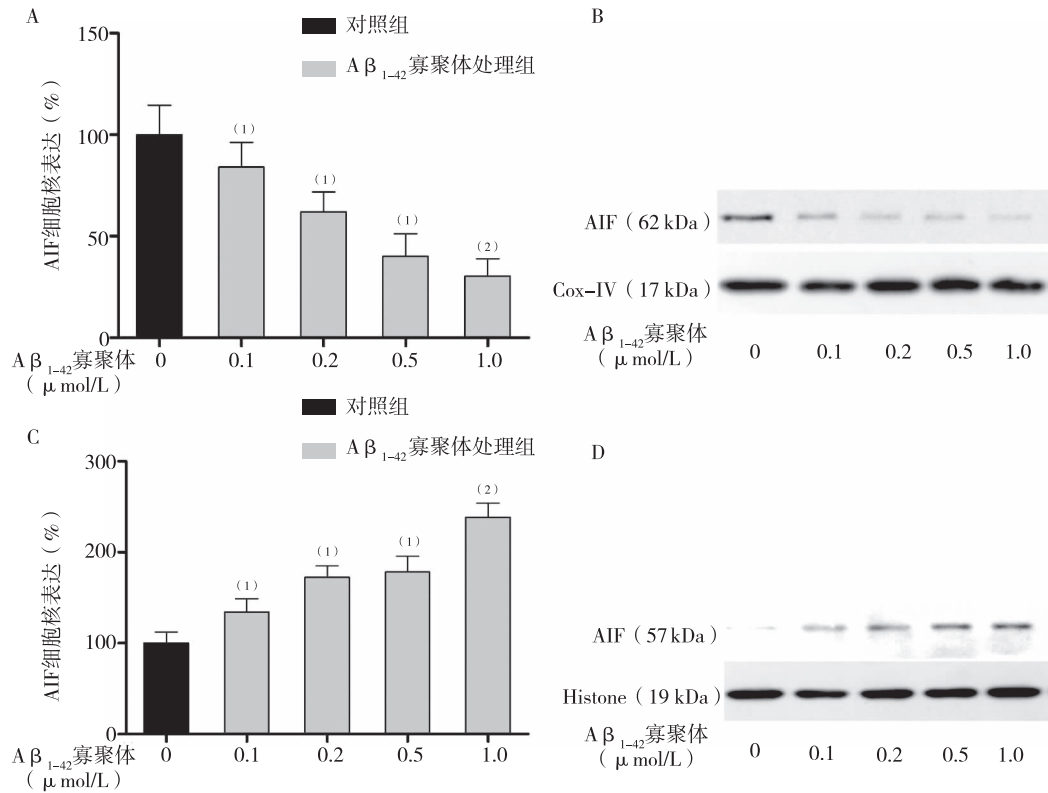
图 2 不同浓度的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体对神经细胞的毒性作用

Fig. 2 The cytotoxicity of different concentrations of $A\beta_{1-42}$ oligomer

减少明显 ($P < 0.05$); 1 μ mol/L $A\beta_{1-42}$ 寡聚体时, AIF 减少最明显 ($P < 0.01$); 与对照组比较, $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理组神经细胞核中 AIF 蛋白表达升高, 处理浓度为 0.1、0.2 及 0.5 μ mol/L 时, AIF 蛋白表达升高明显 ($P < 0.05$); 1 μ mol/L $A\beta_{1-42}$ 寡聚体时, AIF 升高最明显 ($P < 0.01$), 提示 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体可能促进线粒体中的 AIF 向细胞核内转移。见图 3。

3 讨论

随着人口的老龄化, AD 的发病趋势越来越严重, 在 AD 的致病机制中 $A\beta$ 的聚集和沉积是其核



注: A、B 为在线粒体中的表达, C、D 为在细胞核中的表达; 与对照组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$

图3 AIF 蛋白在大鼠神经细胞线粒体和细胞核中的表达 (Western blotting)

Fig. 3 Expression of AIF in mitochondria and nucleus

心发病机制^[12]。Aβ 的聚集和沉积不仅可以导致神经细胞的凋亡,还对突触的结构和功能具有破坏作用,导致记忆和认知功能障碍^[13]。中枢神经元具有不可再生性,是一种高度特化的细胞,是神经系统的基本结构和功能单位之一,它具有感受刺激和传导兴奋的功能,实现信息交换作用。神经元凋亡是 AD 脑内神经元丢失的主要原因之一,当神经元丢失到一定程度,便会损伤脑的功能^[14]。在大量尸检报告中均发现 AD 脑组织中有明显的神经细胞凋亡现象。研究报道,神经细胞的凋亡在海马的 CA1 区达 20%,在海马回中的内嗅皮质达 50%~60%,大脑颞叶皮质处达 50%^[15]。Aβ 是从淀粉样前体蛋白 (APP) 的第 672 到 711 位残基间裂解产生的片段,在人体内维持一定的动态平衡主要由神经元产生^[16]。正常情况下,APP 主要是由 α-分泌酶与 γ-分泌酶共同切割,产生非致病性的片段 P3。病理情况下,APP 则易被 β-分泌酶与 γ-分泌酶共同切割产生 Aβ,主要包括 Aβ₁₋₄₀ 和 Aβ₁₋₄₂ 两种分子。Aβ₁₋₄₂ 较 Aβ₁₋₄₀ 疏水性强,更易聚集,导致 SP 的形成^[7]。可溶性的 Aβ 寡聚体在 AD 的

发病机制中起着重要作用,是产生神经毒性作用的重要来源^[17-18]。研究证实,Aβ 参与 Caspase 依赖性细胞的凋亡通路,使被诱导细胞发生凋亡^[19-20]。但关于 Aβ 是否参与非 Caspase 依赖性细胞凋亡通路,是否也具有诱导细胞凋亡的作用未见报道。AIF 是一种具有凋亡诱导活性的蛋白质,前体蛋白分子量为 67 kDa,细胞受到凋亡刺激时,前体蛋白裂解为 62 kDa 的成熟蛋白后易位至线粒体膜间空间并嵌入到线粒体内膜^[7-9]。在正常生理条件下,AIF 局限在线粒体膜之间,具有氧化还原酶活性;在病理条件下,由于线粒体外膜通透性增加,成熟的 AIF 进一步通过激活钙蛋白酶和(或)组织蛋白酶加工成 57 kDa 的形式,从线粒体内膜上代偿性释放,并转移至细胞核内,选择性地破坏大分子量的 DNA 核酸分子,导致细胞死亡。本课题组前期研究发现,在 AD 人脑组织中,AIF 的异常线粒体释放和细胞核转移可能是 AD 患者大脑中发生神经元凋亡的重要病理因素之一^[21]。

本研究中,采用胎鼠大脑皮质进行体外原代神经元培养,再用浓度为 0.1、0.2、0.5 及 1 μmol/L

的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理神经元 24 h 后,神经元均出现明显的细胞毒性反应,且细胞毒性呈浓度依赖性;通过蛋白印迹实验,检测到 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理组的 AIF 异常线粒体释放和细胞核转移,在线粒体中 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理组的 AIF 蛋白表达较对照组减少;而在细胞核中 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体处理组 AIF 蛋白表达反而较对照组升高,也呈明显的浓度依赖性。这也提示 AIF 蛋白细胞分布的异常改变与 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体的毒性作用可能具有相关性。

综上,在体外培养的原代神经元中, $A\beta_{1-42}$ 寡聚体通过 AIF 介导的非 Caspase 依赖性细胞凋亡通路导致大鼠神经元细胞的凋亡,可能与 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体可促进 AIF 异常线粒体释放和细胞核转移有关。

4 参考文献

- [1] 何建军,罗明佑. 老年痴呆症的病因及发病机制研究进展[J]. 中国老年学杂志,2014 (34):5924 - 5926.
- [2] Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG. et al. Apoptosis inducing factor is involved in the regulation of caspase - independent neuronal cell death [J]. Cell Biol, 2002 (158):507 - 517.
- [3] Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase - dependent and caspase - independent cell death [J]. Oncogene, 2004(23):2785 - 2796.
- [4] 徐菁,陈生弟. 阿尔茨海默病中 Tau 蛋白和 $A\beta$ 相互作用的研究进展[J]. 中国神经精神疾病杂志,2014(4):251 - 254.
- [5] 章正,罗焕敏. 阿尔茨海默病发病机制中相关因素的研究进展[J]. 中华老年医学杂志,2011 (3):256 - 259.
- [6] Leblanc AC. The role of apoptotic pathways in Alzheimer's disease neurodegeneration and cell death [J]. Current Alzheimer Research, 2005 (4):389 - 402.
- [7] Baritaud M, Cabon L, Delavallée L, et al. AIF - mediated caspase - independent necroptosis requires ATM and DNA - PK - induced histone H2AX Ser139 phosphorylation [J]. Cell Death & Disease, 2012 (9):e390.
- [8] Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, et al. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space[J]. EMBO J, 2005(24):1375 - 1386.
- [9] Krantic S, Mechawar N, Reix S, et al. Apoptosis - inducing factor: a matter of neuron life and death [J]. Prog Neurobiol, 2007(81):179 - 196.
- [10] 禹文峰,孔欣,官志忠,等. 一种改进的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体的制备与鉴定方法[J]. 贵州医科大学学报,2016 (8):878 - 881.
- [11] Bastianetto S, Yao ZX, Papadopoulos V, et al. Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against beta - amyloid - induced toxicity [J]. Eur J Neurosci, 2006(23):55 - 64.
- [12] 任真奎,何婧,吴昌学,等. 激活星型胶质细胞 $\alpha 7$ 胆碱能受体后内源性 Cryab 蛋白的表达[J]. 贵州医科大学学报,2016 (8):874 - 877.
- [13] Fu W, Shi D, Westaway D, et al. Bioenergetic mechanisms in astrocytes may contribute to amyloid plaque deposition and toxicity [J]. Journal of Biological Chemistry, 2015(20):98 - 105.
- [14] 张均田. 神经元 - 触丢失与老年痴呆[J]. 神经药理学报,2011 (1):1 - 15.
- [15] Leblanc AC. The role of apoptotic pathways in Alzheimer's disease neurodegeneration and cell death [J]. Curr Alzheimer Res, 2005 (4):389 - 402.
- [16] Bédier A, Joris P, Mosser S, et al. Detection of Alzheimer's disease amyloid - beta plaque deposition by deep brain impedance profiling [J]. Journal of Neural Engineering, 2015 (2):78 - 85.
- [17] Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future [J]. Neuropharmacology, 2014(76):27 - 50.
- [18] Dal PI, Chiarini A, Gui L, et al. Do astrocytes collaborate with neurons in spreading the "Infectious" $A\beta$ and tau drivers of Alzheimer's disease [J]. Neuroscientist A Review Journal Bringing Neurobiology Neurology & Psychiatry, 2014 (1):9 - 29.
- [19] Chang YJ, Linh NH, Shih YH, et al. Alzheimer's Amyloid - β Sequesters Caspase - 3 in Vitro via Its C - Terminal Tail [J]. ACS Chemical Neuroscience, 2016 (8):1097 - 1106.
- [20] Jana MK, Cappai R, Pham CL, et al. Membrane bound tetramer and trimer $A\beta$ oligomeric species correlate with toxicity towards cultured neurons [J]. Journal of Neurochemistry, 2016 (3):594 - 608.
- [21] 杨梅,任真奎,禹文峰,等. 凋亡诱导因子在阿尔茨海默病患者大脑中的表达及意义[J]. 贵州医科大学学报,2016 (8):869 - 873.

(2016-12-12 收稿,2017-02-23 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅