

论著

β 淀粉样肽 31 - 35 介导的神经细胞线粒体损伤及机制研究

李 丽 张 杰 余焕玲 向 丽 封锦芳 苑林宏 肖 荣

(首都医科大学公共卫生与家庭医学学院,北京 100069)

摘 要:目的 研究 Aβ₃₁₋₃₅ 介导的神经细胞线粒体毒性作用,并探讨其可能的作用机制。方法 24 h 龄 Wistar 大鼠大脑皮质神经细胞原代培养,培养 48 h 后在培养基中分别加入 Aβ₃₁₋₃₅ 和 Aβ₂₅₋₃₅ 建立大脑神经细胞线粒体损伤模型。24 h 后,流式细胞术检测神经细胞线粒体通透性转变孔道 (PTP) 开放;酶法检测神经细胞线粒体氧化还原平衡体系 GSH/GSSG 比率的变化;激光共聚焦显微术检测神经细胞活性氧 (ROS) 水平。结果 与对照组相比, Aβ₃₁₋₃₅ 和 Aβ₂₅₋₃₅ 处理组神经细胞线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.05$),反映线粒体颗粒大小的前向光散射 (FSC) 和反映线粒体颗粒性状的侧向光散射 (SSC) 分布峰由低道数向高道数移动,表明线粒体肿胀、颗粒性状发生改变;Aβ₃₁₋₃₅ 和 Aβ₂₅₋₃₅ 处理组神经细胞线粒体 GSH/GSSG 比率显著降低,与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$);Aβ₃₁₋₃₅ 和 Aβ₂₅₋₃₅ 处理可以使神经细胞 ROS 水平显著增高,且与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 Aβ₃₁₋₃₅ 同 Aβ₂₅₋₃₅ 一样可引起神经细胞线粒体毒性作用,其作用机制与 Aβ 介导的神经细胞线粒体氧化损伤有关。

关键词:淀粉样β 蛋白;神经元;线粒体;毒性试验

Study on Damage and Mechanism of Mitochondria of Neurons Induced by Aβ₃₁₋₃₅

LI Li, ZHANG Jie, YU Huan-ling, XIANG Li, FENG Jin-fang, YUAN Lin-hong, XIAO Rong

(School of Public Health and Family Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: **Objective** To study the damage of mitochondria of neurons induced by Aβ₃₁₋₃₅ and explore its possible mechanism. **Method** Cerebral cortexes of newborn 24 h Wistar rats were dissected to get neurons for primary culture. The neurons were planted into 2 ml culture plate at a density of 2×10^5 cells/ml to grow for 48 h. Then, Aβ₃₁₋₃₅ and Aβ₂₅₋₃₅ were respectively added into the medium to establish mitochondria damaged model of neurons. After treating neurons with Aβ₃₁₋₃₅ or Aβ₂₅₋₃₅ for 24 h, the mitochondrial permeability transition pore (PTP) of neurons was investigated by flow cytometry. The relative value of GSH/GSSG in mitochondria of neurons was measured by assay kit; Confocal microscopy was used to detect the level of reactive oxygen species (ROS). Each experiment was repeated 3 times. **Results** Comparing with control group, Aβ₃₁₋₃₅ and Aβ₂₅₋₃₅ treatment group caused significant decrease of the mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$) and the relative

- [2] PERCH B, KRISTJANSEN P, SKADHAUGE K. Group B streptococci pathogenic for man[J]. Acta pathol Microbiol Scand, 1968, 74: 69-76.

[3] 万遂如. 我国猪链球菌 II 型流行情况与人们健康[J]. 动物科学与动物医学, 2005, 22 (4): 38-39.

[4] 曹三杰,段丽丽,肖驰,等. 猪 2 型链球菌毒力因子研究进展[J]. 中国人畜共患病学报, 2007, 23(1): 89-91.

[5] ANITA VERMA, DRUSILLA L BURNS. Requirements for assembly of PtiH with the pertussis toxin transporter apparatus of *Bordetella pertussis* [J]. American Society for Microbiology, 2007, 75(5): 2297-2306.

[6] PATEL J C, GALÁN J E. Differential activation and function of Rho
- GTPases during *Salmonella*-host cell interactions[J]. The journal of cell biology, 2006, 175(3): 453-463.

[7] DAISUKE TAKAMATSU, MAKOTO OSAKI, TSUTOMU SEKIZAKI. Thermosensitive suicide vector for gene replacement in *Streptococcus suis* [J]. Plasmid, 2001, (46): 140-148.

[8] INDRANIL BISWAS, ALEXANDRA GRUSS, DUSKO EHRlich, et al. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria[J]. Journal of bacteriology, 1993, 175(11): 3628-3635.

[收稿日期:2007 - 10 - 08]

中图分类号:R15;S855.11 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2008)02 - 0103 - 05

基金项目:国家自然科学基金 (30571560);北京市教育委员会科技发展计划资助项目 (KM200610025010);北京市教育委员会科技发展计划重点资助项目 (KZ200710025011)。

作者简介:李丽 女 硕士
通讯作者:肖荣 女 教授

value of GSH/GSSG ($P < 0.01$). The distribution of peaks of forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) shifted from low channel to high channel. It was indicated that mitochondria swelled and characters of particle changed. $A\beta_{31-35}$ and $A\beta_{25-35}$ increased the level of ROS in neurons and there was statistic significance when they were compared with the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Both $A\beta_{31-35}$ and $A\beta_{25-35}$ could induce the toxicity of mitochondria of neurons, and its mechanism might be related to oxidative damage of mitochondria of neurons induced by $A\beta$.

Key word: Amyloid beta-Protein; Neurons; Mitochondria; Toxicity Tests

研究证实 β 淀粉样肽 (β -amyloid peptides, $A\beta$) 是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 患者脑组织老年斑的主要组成成分^[1,2], 其在 AD 发病中起主导作用^[3]。大量研究表明, $A\beta_{25-35}$ 可引起神经细胞线粒体乳酸脱氢酶等代谢异常, 从而导致线粒体机能异常^[4]。我们前期研究证实, $A\beta$ 结构中的疏水性 5 肽片段 $A\beta_{31-35}$, 可诱导大脑皮质神经细胞出现细胞凋亡的形态学及相关基因表达的改变, 以及引起一系列损伤的表现^[5], 那么, $A\beta_{31-35}$ 是否作为功能片段通过引起线粒体结构和功能异常而导致神经细胞损伤? 它又是通过何种途径引起神经细胞线粒体损伤的呢? 目前研究较少。

线粒体参与机体许多代谢过程, 在机体生长、发育、代谢、衰老、疾病、死亡以及生物进化等多方面表现出重要作用^[6]。线粒体通透性转变孔道 (Permeability Transition Pore, PTP) 是线粒体参与细胞不同生理和病理活动的中心环节之一。有文献报道, 线粒体 PTP 高通透性开放可引起线粒体氧化磷酸化解偶联及三磷酸腺苷 (ATP) 水解加速, 与细胞的病理变化密切相关^[7]。那么, 神经细胞线粒体 PTP 是否是 $A\beta$ 毒性损伤的作用靶点呢?

本研究以大鼠大脑皮质神经细胞原代培养, 用 $A\beta_{31-35}$ 和 $A\beta_{25-35}$ 制备神经细胞线粒体损伤模型, 采用流式细胞术检测神经细胞线粒体 PTP 开放; 酶法检测神经细胞线粒体氧化还原状态; 激光共聚焦显微术检测神经细胞活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 水平, 研究 $A\beta$ 的神经细胞线粒体毒性作用及损伤机制, 为预防 AD 的发生发展提供一个新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

$A\beta_{31-35}$ 购自美国 ANASPEC 公司; $A\beta_{25-35}$ 、Rhodamine 123、2', 7'-二氯荧光素二酯 (DCFH-DA)、胰酶、多聚赖氨酸购自美国 sigma 公司; GSH/GSSG (还原型谷胱甘肽, GSH; 氧化型谷胱甘肽, GSSG) 检测试剂盒购自南京建成生物技术有限公司; DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司; 标准胎牛血清、供体马血清购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司; Tris 购自北京益利精细化学有限公

司; 盐酸、氯化钠购自北京现代东方精细化学品有限公司; EDTA-2Na 购自北京化工厂; 蔗糖购自广州化工厂; 不锈钢纱网购自美国 BD 公司。

流式细胞仪 (Aria, 美国 BD 公司)、激光扫描共聚焦显微镜 (Leica TCS-NT, 德国)、WFJ7200 型分光光度计 (上海尤尼科仪器有限公司)、VCX130 型超声破碎仪 (美国 SONICS 公司)、BX50 型倒置相差显微镜 (日本 Olympus)。

健康 Wistar 大鼠 SPF 级别、24 h 龄, 由首都医科大学动物科学部提供。动物实验符合国家《实验动物管理条例》, 并经首都医科大学动物伦理委员会认可。

1.2 方法

1.2.1 大脑皮质神经细胞原代培养 参照 Xiao^[8] 等的方法略加改进: 无菌条件下切取新生大鼠的大脑皮质层, 剥净脑膜和血管, 剪碎; 加入 0.25% 胰酶, 37℃ 消化 10 min, 以 DMEM (含牛、马血清各 10%) 培养液终止反应; 以 DMEM (无血清) 清洗 3 次 (1 000 r/min, 5 min), 弃上清; 不锈钢纱网过滤, DMEM (含牛、马血清各 10%) 制成单细胞悬液, 接种于铺有多聚赖氨酸的培养皿中。

1.2.2 细胞分组与处理 选取培养后 48 h, 生长良好的同批次神经细胞, 随机分为 3 组, 即对照组、 $A\beta_{25-35}$ 和 $A\beta_{31-35}$ 组, 分别在培养基中加入 DMEM、凝聚态的 $A\beta_{31-35}$ (25 μ mol/L) 和 $A\beta_{25-35}$ (25 μ mol/L), 继续培养 24 h 后收集细胞, 处理并检测。

1.2.3 线粒体制备 参照 Wu^[9] 等的方法略加改进: 收集神经细胞, 用匀浆介质 (0.01 mol/L Tris-盐酸, 0.000 1 mol/L EDTA-2Na, 0.01 mol/L 蔗糖, 0.8% 氯化钠溶液, pH 7.4) 制成细胞悬液, 超声破碎仪使细胞破碎, 5 s/次, 间隔 5 s, 反复 4 次。1 000~2 000 r/min, 10 min, 弃沉淀, 取上清 8 000~10 000 r/min 离心 15 min, 沉淀物为神经细胞线粒体。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 $A\beta$ 对神经细胞线粒体 PTP 开放的影响 (流式细胞术检测) 大脑皮质神经细胞染毒 24 h 后收集神经细胞, 提取神经细胞线粒体, 制成悬液, 加入荧光探针 Rhodamine 123 (0.2 μ mol/L), 负载 5 min, 上机检测, 获取 10^5 个线粒体。记录反映神经细胞线

粒体膜电位的平均荧光强度值 (FITC)、反映神经细胞线粒体颗粒大小的前向光散射 (FSC) 和反映神经细胞线粒体颗粒性状的侧向光散射 (SSC) 分布峰。

1.3.2 Aβ 对神经细胞线粒体氧化还原体系的影响 (酶法检测神经细胞线粒体 GSH/GSSG 水平) 用试剂盒进行测定。

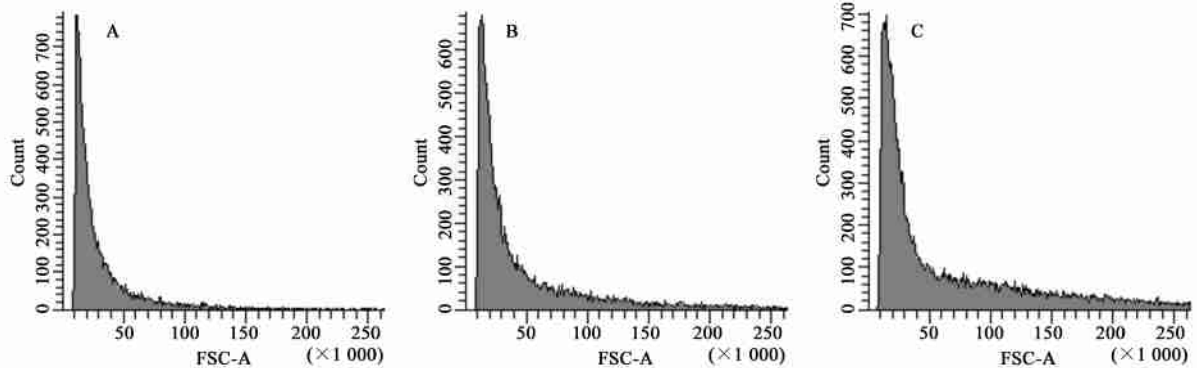
1.3.3 Aβ 对神经细胞 ROS 水平的影响 (激光共聚焦显微术检测) 大脑皮质神经细胞染毒 24 h 后, 加入 DCFH - DA (10 μmol/L), 37 °C 避光孵育 30 min, PBS 洗 2 次, 加入适量培养液。用激光扫描共聚焦显微镜观察神经细胞, 每个实验组随机选取 20 个活细胞。每个细胞间隔 1 s 扫描一次, 共扫描 8 次, 记录反映神经细胞 ROS 水平的平均荧光强度值。

1.4 数据处理
用 SPSS 11.5 统计软件包进行单因素方差分析 (ANOVA), 组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果
2.1 Aβ 对神经细胞线粒体 PTP 开放的影响 结果见表 1、图 1、2。

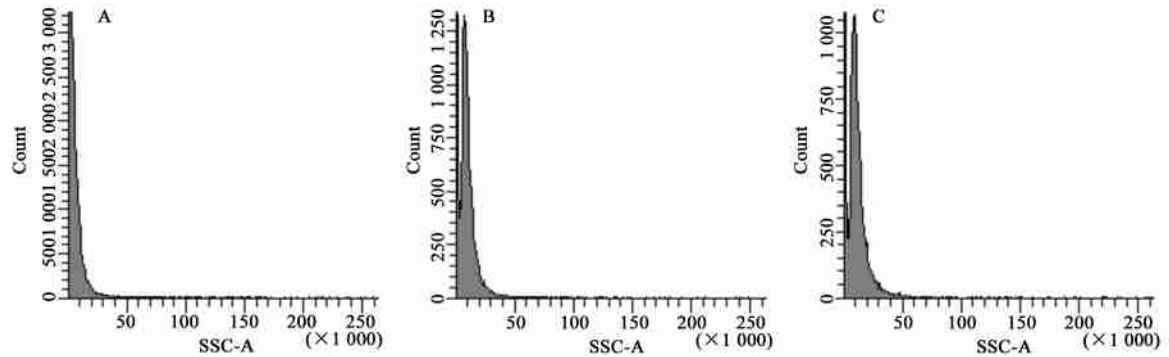
表 1 大脑皮质神经细胞线粒体膜电位 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)	
组别	平均荧光强度值 (FITC)
对照	417.67 $\pm$ 35.91
Aβ ₂₅₋₃₅	332.25 $\pm$ 28.35 ^a
Aβ ₃₁₋₃₅	339.50 $\pm$ 31.84 ^b

注: 与对照组相比, a 为 $P < 0.01$, b 为 $P < 0.05$ 。



A: 对照, B: Aβ₂₅₋₃₅, C: Aβ₃₁₋₃₅。

图 1 大脑皮质神经细胞线粒体前向光散射 (FSC)



A: 对照, B: Aβ₂₅₋₃₅, C: Aβ₃₁₋₃₅。

图 2 大脑皮质神经细胞线粒体侧向光散射 (SSC)

与对照组相比, Aβ₃₁₋₃₅ 处理组神经细胞线粒体颗粒平均荧光强度值 (FITC) 显著降低 ($P < 0.05$); Aβ₂₅₋₃₅ 处理组的平均荧光强度值 (FITC) 显著降低 ($P < 0.01$), 表明神经细胞线粒体膜电位显著降低。

与对照组相比, 反映线粒体颗粒大小的前向光散射 (FSC) 和反映线粒体颗粒性状的侧向光散射 (SSC) 分布峰由低道数向高道数移动, 表明线粒体肿胀、颗粒性状发生改变。

2.2 Aβ 对神经细胞线粒体氧化还原体系的影响 结果见表 2。

表 2 大脑皮质神经细胞线粒体 GSH 和 GSSG 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)			
组别	GSH (μmol/L)	GSSG (μmol/L)	GSH/GSSG
对照	82.38 $\pm$ 3.46	45.31 $\pm$ 0.89	1.82 $\pm$ 0.11
Aβ ₂₅₋₃₅	77.25 $\pm$ 1.67	46.27 $\pm$ 0.80	1.67 $\pm$ 0.02 ^a
Aβ ₃₁₋₃₅	76.97 $\pm$ 1.63	47.68 $\pm$ 0.83	1.61 $\pm$ 0.06 ^a

注: 与对照组相比, a 为 $P < 0.01$ 。

与对照组相比, Aβ₃₁₋₃₅ 和 Aβ₂₅₋₃₅ 处理组的 GSH/GSSG 比率显著降低 ($P < 0.01$), 表明神经细胞线粒体还原型谷胱甘肽 (GSH) 比例降低, 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 比例升高。

2.3 Aβ 对神经细胞 ROS 水平的影响 结果见表 3。

表 3 大脑皮质神经细胞活性氧水平 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)	
组别	平均荧光强度值
对照	35.19 $\pm$ 20.14
Aβ ₂₅ - 35	56.24 $\pm$ 26.32 ^a
Aβ ₃₁ - 35	69.30 $\pm$ 30.39 ^a

注:与对照组相比,^a为 $P < 0.01$ 。

与对照组相比,Aβ₃₁ - 35 和 Aβ₂₅ - 35 处理组神经细胞平均荧光强度值显著升高 ($P < 0.01$),表明神经细胞 ROS 水平显著升高。

3 讨论

有研究表明,神经细胞线粒体结构与功能缺陷是导致阿尔茨海默病(AD)发病的重要因素。线粒体呼吸链是机体 ROS 产生的重要来源^[10]。正常状态下,线粒体内摄入的 O₂ 约有 1%~3% 由于不完全还原而形成各种 ROS^[11],机体 ROS 处于动态的产生、清除平衡之中。线粒体结构和功能损伤打破了这种动态平衡,使体内大量 ROS 积聚,而过多的 ROS 又可与线粒体膜脂蛋白、线粒体蛋白质和线粒体基因组相互作用进一步加重线粒体和细胞的损伤。本研究结果表明,Aβ₃₁ - 35 和 Aβ₂₅ - 35 可引起神经细胞 ROS 水平显著升高 ($P < 0.01$),提示 Aβ₃₁ - 35 介导的神经细胞损伤可能是通过线粒体结构和功能氧化损伤途径实现的。

线粒体通透性转变孔道(PTP)是一种位于线粒体内外膜交换处,受 Ca²⁺、线粒体膜电位、pH 等调控的蛋白性孔道。其结构包括:胞质中的己糖激酶 HK、外膜上的电压依赖性阴离子通道、内膜上的腺苷酸转运蛋白和线粒体基质中的亲环蛋白 D^[12]。线粒体 PTP 是线粒体参与细胞不同生理和病理活动的中心环节之一。PTP 开放不仅与线粒体 Ca²⁺ 转运相关,而且与临床上由肝毒素、兴奋性毒素、Ca²⁺ 失衡、ROS 以及缺氧等因素引起的肝细胞、神经细胞和心肌细胞死亡相关。本研究结果显示,神经细胞线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.05$)、反映线粒体颗粒大小的前向光散射(FSC)和反映线粒体颗粒性状的侧向光散射(SSC)分布峰由低道数向高道数移动,提示 Aβ 可引起由于神经细胞线粒体 PTP 开放增多而诱发的线粒体肿胀、膜电位消失、线粒体颗粒性状改变等线粒体结构损伤的表现。与前人研究结果^[7]相一致。

GSH/GSSG 动态平衡体系形成体内有效的抗氧化系统。当细胞处于氧化应激时,GSH 氧化成 GSSG,引起 GSH/GSSG 比率下降,因此,GSH/GSSG 可

用以评估体内氧化应激状况,也是探讨神经细胞线粒体氧化还原状态的敏感指标。本研究结果显示,Aβ₃₁ - 35 和 Aβ₂₅ - 35 可导致 GSH/GSSG 比率显著降低 ($P < 0.01$),提示 Aβ 通过改变神经细胞线粒体氧化还原平衡状态,降低神经细胞线粒体抗氧化能力,进而加重神经细胞氧化损伤。

在本实验条件下,Aβ₃₁ - 35 同 Aβ₂₅ - 35 一样可引起神经细胞线粒体毒性,且可能是通过对神经细胞线粒体氧化损伤实现的。提示 Aβ₃₁ - 35 可能是 β 淀粉样肽发挥毒性作用较短的功能片段。

参考文献

[1] MCELLELLAN M E, KAJDASZ S T, HYMAN B T, et al. In vivo imaging of reactive oxygen species specifically associated with thioflavine S-positive amyloid plaques by multiphoton microscopy[J]. Neuroscience, 2003, 23: 2212-2217.

[2] FROST D, GORMAN P M, YIP C M, et al. Co-incorporation of A beta 40 and A beta 42 to form mixed prefibrillar aggregates[J]. Biochemistry, 2003, 270: 654-663.

[3] COLIN M. AM-10: Alzheimer's disease: Aβ-amyloid as the principal molecular therapeutic and diagnostic target[J]. Alzheimer's and Dementia, 2007, 3(3): S91.

[4] CASLEY C S, LAND J M, SHARP M A, et al. β-amyloid fragment 25-35 causes mitochondrial dysfunction in primary cortical neurons[J]. Neurobiology of Disease, 2002, 10(3): 258-267.

[5] YAN X Z, XIAO R, DOU Y, et al. Carbachol blocks β-amyloid fragment 31-35-induced apoptosis in cultured cortical neurons[J]. Brain Research Bulletin, 2000, 51(6): 465-470.

[6] 高欣,唐希灿.神经退行性疾病的早期信号:线粒体功能障碍[J].生命科学,2006,18(2):138-144.

[7] ARMSTRONG J S. The role of the mitochondrial permeability transition in cell death[J]. Mitochondrion, 2006, 6: 225-234.

[8] XIAO R, QIAO J T, ZHAO H F, et al. Sodium selenite induces apoptosis in cultured cortical neurons with special concomitant changes in expression of the apoptosis-related genes[J]. NeuroToxicology, 2006, 27(4): 478-484.

[9] WU L P, SHEN F, LIN L, et al. The neuroprotection conferred by activating the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel is mediated by inhibiting the mitochondrial permeability transition pore [J]. Neuroscience, 2006, 402: 184-189.

[10] CHEN Q, VAZQUEZ E J, MOGHADDAS S, et al. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III[J]. Biochemistry, 2003, 278(38): 36027-36031.

[11] BATANDIER C, FONTAINE E, KERIEL C, et al. Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects[J]. Cell Molecular Medicine, 2002, 6(2): 175-187.

[12] CROMPTON M. On the involvement of mitochondrial intermembrane junctional complexes in apoptosis[J]. Current Methods in Inorganic Chemistry, 2003, 10(16): 1473-1484.

[收稿日期:2007 - 12 - 13]