

神经疾病发病机制研究

DOI:10.11699/cyxb20130609

超表达 SorLA 对阿尔茨海默病 β 淀粉样蛋白的影响井丽娟¹, 张 军², 张锦巍¹, 孙亚平¹, 李 聪¹, 高 健¹, 董贵成¹

(1. 内蒙古科技大学包头师范学院生物化学实验室, 包头 014030; 2. 包头市第四医院病理科, 包头 014030)

【摘要】目的:探讨超表达 SorLA 对引发阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 的影响, 以揭示 SorLA 表达与 A β 之间的作用关系。**方法:**采用 Western blot 测定脑组织中 SorLA 蛋白的表达分布, SorLA cDNA 转染人胚胎肾细胞 (HEK-293), 以梯度浓度 G418 筛选 SorLA cDNA 细胞, 采用 Western blot 测定转染后淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 表达水平, 采用 ELISA 测定 A β 表达水平。**结果:**(1) 超表达 SorLA 转染组细胞提取物中的 APP 表达水平降低; (2) 超表达 SorLA 转染组中 A β 表达水平降低 ($21.6 \pm 12.1\%$) ($P < 0.01$)。**结论:**SorLA 显著影响引发 AD 的 A β 表达水平, 且两者呈负相关。

【关键词】阿尔茨海默病; 淀粉样前体蛋白; SorLA; β 淀粉样蛋白

【中国图书分类法分类号】R338.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-11-04

Effects of over-expressed SorLA on β -amyloid in Alzheimer's diseaseJING Lijuan¹, ZHANG Jun², ZHANG Jinwei¹, SUN Yaping¹, LI Cong¹, GAO Jian¹, DONG Guicheng¹

(1. Biochemistry Laboratory, Baotou Teachers' College, Inner Mongolia Science & Technology University,

2. Department of Pathology, the Fourth Hospital of Baotou)

【Abstract】Objective: To investigate effects of over-expressed SorLA on β -amyloid (A β) in Alzheimer's disease and to reveal the relation between SorLA expressions and the total amount of A β . **Methods:** Western blot was used to analyze the levels of SorLA protein in brain tissue. Human embryonic kidney cells (HEK-293) were transfected with the plasmids carrying the SorLA interfered by SorLA cDNA (screened by G418) and expression levels of amyloid precursor protein (APP) were analyzed by Western blot. Levels of A β were measured by ELISA. **Results:** (1) Western blot showed that levels of APP were significantly reduced in the over-expression SorLA transfected group than in control group. (2) ELISA showed that the total amount of A β was reduced by ($21.6 \pm 12.1\%$) obviously ($P < 0.01$). **Conclusions:** Total amount of A β is directly affected by levels of SorLA protein and they are negatively correlated.

【Key words】Alzheimer's disease; amyloid precursor protein; SorLA; β -amyloid

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是 1906 年由德国医生 Alois Alzheimer 发现的一种慢性神经退行性疾病, 主要的病理学特征为大脑皮质弥漫性萎缩, 大脑皮层和海马区呈现神经元纤维缠结、形成淀粉样蛋白斑块。其中淀粉样蛋白斑块是由 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 聚集沉淀形成的^[1-3]对神经毒性最强, 是引发阿尔茨海默病的中心环节。研究发现, 位于 11 号染色体上的 SorLA 基因是一种蛋白分类受体与淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 密切相关, SorLA 是 APP 固定的关键因

子, 直接与 APP 相互作用并参与 APP 的加工及运输过程^[4-6], 因此目前 SorLA 被认为是 AD 发病机制中的危险因素。本文探究超表达 SorLA 对引起阿尔茨海默病的 A β 影响, 揭示 SorLA 与 A β 表达水平的相互关系, 为研发治疗 AD 的靶位点药物提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人胚胎肾细胞 (HEK-293), 胰蛋白酶, DMEM, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 细胞裂解液, 蛋白酶抑制剂, SorLA 抗体均购自 Cell Signaling 公司, Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司, ECL 荧光染色试剂购自 GE. Healthcare 公司, A β 试剂盒购自 Biosource 公司。

作者介绍: 井丽娟, Email: jlj1815@163.com,

研究方向: 神经分子生物学。

通信作者: 董贵成, Email: gc.medicine@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30960334); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”资助项目 (编号: NCET-09-0857); 内蒙古自治区“草原英才”工程。

1.2 方法

1.2.1 检测脑组织样本中 SorLA 蛋白分布 人脑组织样本的制备:在磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)溶液中加入 0.1%十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,SDS)和蛋白酶抑制剂配制成混合溶液。取 100 mg 冰冻脑皮质组织,放入玻璃匀浆器内,加入 2 ml PBS 混合溶液,摇匀,于 12 000 r/min 离心 30 min,取上清液,将提取的样本煮沸 5 min,加入上样缓冲液。进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,以从下至上为滤膜、硝酸纤维素膜、凝胶和滤膜的顺序进行恒压转膜。加入 5%的脱脂奶粉将转印膜封闭 2 h,加入 SorLA 抗体(1:1 000)孵育过夜,加入二抗(1:1 000)孵育 2 h。在转印膜上加 ECL 底物显色液,暗室显影。

1.2.2 SorLA cDNA 转染细胞 于 37 ℃,5%CO₂ 培养箱中培养人胚胎肾细胞(HEK-293)。当细胞长成致密单层时弃去旧培养基,加入 1 ml 0.25%胰蛋白酶消化细胞,观察直到细胞变圆并独立悬浮加入等体积的新鲜 DMEM 培养基终止消化过程,离心,加入新鲜培养基吹打成细胞悬液并分装于 3 个培养皿,细胞传代后继续培养。以 SorLA cDNA 转染细胞,首先在 50 μl DMEM 无血清培养基中加 2 μl SorLA cDNA 混匀,用 50 μl 无血清的 DMEM 稀释 1 μl Lipofectamine™2000 试剂,混匀,室温放置 5 min,将稀释好的 SorLA cDNA 和 Lipofectamine™2000 试剂混合,静置 30 min。将 100 μl 混合物加到覆盖 70%~80%的平板中并加入 10 ml 选择培养基。24 h 以后换成不含抗生素含 10% FBS 的培养基。培养 72 h 后可进行第 2 次转染,方法同上。在 37 ℃,5%CO₂ 培养箱中培养。对照组进行上述同步培养。

1.2.3 筛选 SorLA cDNA 细胞 将 SorLA cDNA 转染后的细胞接种到含 G418 的 10%DMEM 培养基中,分别加入 G418,从 100,200……1 000 μg/ml,低浓度的孔中细胞正常生长,中浓度的细胞生长比较缓慢,以确定最佳筛选浓度选用 600 μg/ml。72 h 后吸出培养液和上浮死细胞并更换新鲜培养液,1~2 周将细胞移至 96 孔板继续生长,筛选高表达的细胞,消化并收集转染组和对照组细胞,提取相关蛋白用于 Western blot 检验。

1.2.4 Western blot 测定蛋白表达量 将 SorLA cDNA 转染组与对照组的细胞分别置于冰上,加入 1 ml 预冷的 PBS 清洗细胞 3 次,弃 PBS。加入 1 ml 裂解液裂解细胞 30 min,收集液体到 1.5 ml 的离心管中,于 4 ℃,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液于-20 ℃保存备用。进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,将聚偏二氟乙烯膜和凝胶一起在转移缓冲液中平衡 30 min,以从下至上为滤膜、硝酸纤维素膜、凝胶和滤膜的顺序进行转膜。加入 5%脱脂奶粉将转印膜封闭 2 h,加入 SorLA 抗体(1:1 000)孵育过夜,加入二抗(1:1 000)孵育 2 h。在转印膜上滴加 ECL 底物显色液,暗室显影。

1.2.5 ELISA 测定 Aβ 的表达量 加入 β 淀粉样蛋白标准品 50 μl,待测样本 10 μl,再加样本稀释液 40 μl。加入一抗在 37 ℃温育 3 h。吸出上清液,重复洗涤 4 次。加入二抗 37 ℃反应 30 min,梯度洗脱 4 次后,分别加入显色剂 A 液与 B 液各 50 μl,于平板混匀器混匀 30 s,避光显色 15 min。加入终止液 50 μl,终止反应。在终止后 15 min 内,用 450 nm 波长检测产物的吸光度值。

1.3 统计学处理

统计学处理数据由 SPSS 17.0 统计软件完成并以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,ELISA 测定分别进行 9 次独立实验所得数据,数据分析采用两独立样本 *t* 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检测 SorLA 蛋白脑组织样本中的表达分布

运用 Western blot 检测 SorLA 蛋白在脑组织样本中的表达分布情况,Western blot 结果显示,SorLA 蛋白在脑中灰质和白质区域表达分布不均匀,灰质区域相对存在较高的表达量(图 1)。

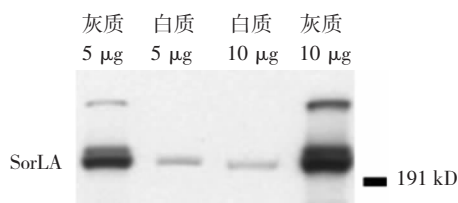


图 1 脑组织样本中 SorLA 蛋白的表达分布

Fig. 1 Expressions of SorLA protein in brain tissues detected by Western blot

2.2 Western blot 检测 SorLA cDNA 的表达水平

运用 Western blot 检测 SorLA cDNA 的表达情况,结果显示,与对照组细胞相比 SorLA cDNA 转染组中 SorLA 蛋白的表达水平明显升高(图 2),表明 SorLA cDNA 获得稳定的表达,超表达细胞模型构建成功。

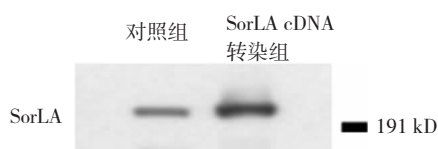


图 2 SorLA 超表达蛋白质印迹检测

Fig. 2 Over expressions of SorLA in HEK-293 cells detected by Western blot

2.3 Western blot 检测 APP 的表达水平

运用 Western blot 检测 APP 的表达水平,Western blot 结果显示,与对照组相比 SorLA cDNA 转染组的细胞提取物中 APP 的表达水平明显下降(图 3),表明 SorLA 对 APP 的表达水平具有调控作用。

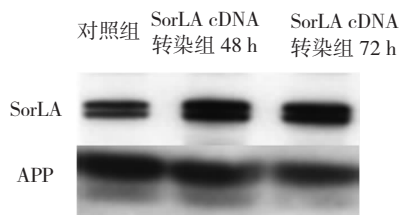


图 3 SorLA cDNA 转染组 APP 表达水平

Fig. 3 Expressions of APP in SorLA cDNA transfected group detected by Western blot

2.4 ELISA 检测 A β 的表达水平

运用 ELISA 检测 SorLA cDNA 转染细胞中 A β 表达水平, ELISA 结果显示, SorLA cDNA 转染细胞中 A β 表达水平明显下降(图 4), 与对照组相比 A β 表达量下降了 (21.6 $\pm$ 12.1)%($P < 0.01$), 表明 SorLA 的表达水平能够有效影响 A β 的表达量且两者呈负相关关系(表 1)。

表 1 对照组与实验组中 A β 的表达量及其比较分析

Tab.1 Expressions of A β in control and experiment groups and its comparison

组别	实验次数 (n)	A β_{1-42} (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)
对照组	9	15 896.4 $\pm$ 1 091.7
SorLA cDNA 转染组	9	12 438.9 $\pm$ 1 877.8
t 值		4.977 6
P 值		0.001 1

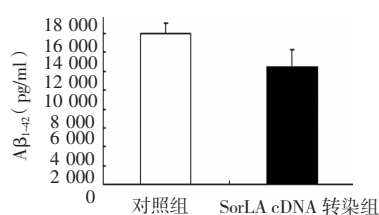


图 4 SorLA cDNA 转染后 A β 表达水平

Fig.4 Expressions of A β after SorLA cDNA transfection detected by ELISA

3 讨论

AD 是一种以进行性认知障碍和记忆力损害为主要病症的中枢神经系统退行性疾病。目前普遍认为, 发病关键节之一是 A β 在脑部神经元的异常沉积, 形成老年斑块, 引起神经元钙稳态失衡, 激活脑组织局部炎症因子, 继而导致神经元缺损, 突触减少, 神经网络破坏, 出现中枢整合功能病变, 因此有效调节 A β 的产生与沉积过程是关键环节, 将成为 AD 治疗研究的重要突破点。

最近研究发现 SorLA 对 A β 的沉积有明显地调控作用。SorLA 基因又称 SorL1 受体或 LR11, 是大小为 250 kD 的 I 型跨膜蛋白, 氨基端含有 Vps10p 家族同源序列, 胞质尾区含有 GCA 结合位点。高量表达于大脑皮层和海马区, 穿梭于质膜、内涵体和高尔基体之间, 在神经元细胞中发挥转运蛋白质的作用。根据基因组学数据分析得出 52 个 SorLA 基因位点, 其中有 29 个位点与 AD 患病相关。2004 年 Scherzer 等^[7]发现 AD 脑内 SorLA 表达水平显著降低并首次提示 SorLA 可能在 AD 的发病机制中发挥重要作用。2005 年 Anderson 等的研究提供数据显示 SorLA 和 APP 间的确存在相互作用, 并被证明

内含体是 A β 产生的主要位点, 内含体中 SorLA 与 APP 初期的共区域化表明 SorLA 对 APP 的转运密切相关^[8-11], SorLA 调控 APP 的加工及运输, 减少 APP 进入淀粉样物质的细胞加工区域, 从而减少 A β 的生成。APP 的运输途径较为复杂: 从分泌腺到细胞内吞小体, 加工处理成为有淀粉或无淀粉成分的生成物, 大部分新生成的 APP 分子, 在高尔基体或在细胞膜上被 α 分泌酶分解成可溶性的 APP。少部分 APP 被 β 分泌酶分解成为可溶性的 C99, 大部分的 APP 会再被 γ 分泌酶分解。SorLA 则可以与 γ 分泌酶结合, 对 APP 运输过程发挥作用。SorLA 主要集中在高尔基体内成熟的 APP 分子中, 延长 APP 在高尔基体中的运输时间, 造成 APP 分子在高尔基体中的累积, 即介导高尔基体保留 APP。因此, SorLA 通过参与并调节 APP 的运输途径, 引起 APP 再循环的重新分配, 使得 α 分泌酶作用的概率增加, β 、 γ 分泌酶作用的概率减少, 从而生成可溶性 APP 的途径增加, 生成不溶性淀粉样蛋白的途径明显减少, 从而有效抑制 A β 在脑部的生成与聚集。

据此推测, 神经元表达的 SorLA 是 AD 发病机制中的重要调节因素, 直接关系着疾病的发生与发展。本研究通过在 HEK-293 细胞中超表达 SorLA 基因, 发现 SorLA 超表达转染组细胞中 APP 的表达水平明显降低, A β 的表达水平显著下降, 揭示 SorLA 的表达水平显著影响 A β 的表达水平且两者呈负相关关系, 能够有效抑制 A β 在脑部的生成与沉积, 继而减缓由此引起的相关病症。本实验及相关数据都证明 SorLA 在 AD 发病机理中的发挥重要作用, 这为进一步探究以 SorLA 作为治疗 AD 的潜药物靶点奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. Science, 2002, 297(5580): 353-356.
- [2] Wolfe M S. The gamma-secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble[J]. Biochemistry, 2006, 45(26): 7931-7939.
- [3] Zimmermann M, Gardoni F, Di Luca M. Molecular rationale for the pharmacological treatment of Alzheimer's disease[J]. Drugs Aging, 2005, 22(s1): 27-37.
- [4] Offe K, Dodson S E, Shoemaker J T, et al. The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments[J]. J Neurosci, 2006, 26(5): 1596-1603.
- [5] Hampe W, Riedel I B, Lintzel J, et al. Ectodomain shedding, translo-