

神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002426

天青 B 对淀粉样前体蛋白代谢和 A β 生成的影响

燕 燕, 崔传举, 李艾帆

(郑州市第一人民医院神经内科, 郑州 450000)

【摘要】目的:探究天青 B 对淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)代谢及 β 淀粉样蛋白(amyloid- β , A β)生成的影响。**方法:**用天青 B 处理能稳定表达 APP695 基因的 Neuron-2a 细胞(N2a-APP695)。利用 Western blot 检测 APP、可溶性 APP α (soluble APP α , sAPP α)和 β -分泌酶 1(β -site APP cleaving enzyme 1, BACE1)的水平,利用 ELISA 检测 A β 的水平。采用 BACE1 酶活性检测试剂盒检测 BACE1 酶活性的抑制。采用 t 检验分析各组数据。**结果:**①天青 B 在 5、10、15、20 μ mol/L 的终浓度下不会影响 N2a-APP695 细胞的活力。②ELISA 检测结果显示天青 B 能够降低 A β_{1-40} ($P=0.002$)和 A β_{1-42} ($P=0.036$)的水平。③Western blot 检测结果显示天青 B 能够降低全长 APP ($P=0.018$)和 sAPP α ($P=0.006$)蛋白的水平,但不影响 BACE1 蛋白的水平 ($P>0.05$)。④BACE1 酶活性检测试剂盒检测结果显示天青 B 能降低 BACE1 的活性,其活性抑制率为 66.0% ($P=0.000$)。**结论:**天青 B 通过抑制 APP 的表达和 BACE1 的活性从而抑制 A β 的生成。

【关键词】天青 B;淀粉样前体蛋白;代谢; β 淀粉样蛋白

【中图分类号】R749

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-12-05

Effects of azure B on metabolism of amyloid precursor protein and generation of amyloid- β protein

Yan Yan, Cui Chuanju, Li Aifan

(Department of Neurology, The Medical Group of Zhengzhou First People's Hospital)

【Abstract】Objective: To explore the effects of azure B on metabolism of amyloid precursor protein (APP) and generation of amyloid- β (A β) protein. **Methods:** Neuron-2a cells that stably expressed APP695 gene (N2a-APP695) was treated with azure B. Levels of APP, soluble APP α (sAPP α) and β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) were measured by Western blot. A β levels were measured by ELISA. The BACE1 enzyme inhibition was determined by using BACE1 activity assay kit. Data were analyzed by t test. **Results:** ①Azure B was not able to influence the cell viability of N2a-APP695 cells with final concentration of 5, 10, 15 and 20 μ mol/L. ②According to ELISA results, azure B was able to decrease levels of A β_{1-40} ($P=0.002$) and A β_{1-42} ($P=0.036$). ③Western blot demonstrated that azure B was able to reduce levels of full length APP ($P=0.018$) and sAPP α ($P=0.006$), but not influence the protein level of BACE1 ($P>0.05$). ④BACE1 activity assaying results showed that the activity of the BACE1 enzyme was significantly inhibited by azure B, with inhibition rate of 66.0% ($P=0.000$). **Conclusion:** Azure B inhibits the generation of A β by inhibiting the expression of APP and the activity of BACE1.

【Key words】azure B; amyloid precursor protein; metabolism; amyloid- β protein

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以渐进性记忆丧失和其他认知功能障碍的神经退行性疾病。AD 患者大脑内的一个主要病理学特征就是神经元外淀粉样斑沉积,而淀粉样斑的主要

组成成分就是 β 淀粉样蛋白 (amyloid- β , A β)^[1]。A β 由 APP 通过 β -分泌酶和 γ -分泌酶切割产生^[2]。

亚甲蓝,化学名为 3,7-双(二甲氨基)吩噻嗪-5-磺氧化物,是一种芳香杂环化合物。亚甲蓝作为一种 β -分泌酶调节剂,能够在体外减少 A β 的产生^[3]。亚甲蓝在体内可以代谢生成天青 B 和天青 A,其中天青 B 是主要的代谢产物^[4]。截至目前,还没有文章

作者介绍:燕 燕, Email: yanyan840409@163.com,

研究方向:神经退行性疾病。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200409.1350.002.html>

(2020-04-10)

报道天青 B 是否会影响 APP 的代谢及 A β 的生成。本研究在阿尔茨海默病样细胞模型(N2a-APP695)中研究天青 B 是否会影响 APP 的代谢及 A β 的生成。

1 材料与方法

1.1 材料

天青 B 噻唑蓝(MTT)来源于美国 Sigma 公司,BACE1 抗体(3C1C3)来源于 Thermo Fisher Scientific 公司,sAPP α 抗体(22C11)来源于 Millipore 公司,抗 β -actin 抗体购自 CST 公司,N2a-APP695 细胞系和 APP 抗体(Ru369,厦门大学神经科学研究所自主研发)均由厦门大学神经科学研究所惠赠。DMEM 培养基及胎牛血清来源于 Gibco 公司,A β_{40} 和 A β_{42} 的 ELISA 试剂盒来源于 Invitrogen 公司,BACE1 酶活性检测试剂盒来源于 Pan Vera 公司,BACE1 抑制剂 IV 来源于 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 N2a-APP695 细胞的培养 将 N2a-APP695 细胞在含有 10%胎牛血清和 1%青链霉素双抗的 DMEM 培养基中,于 5%CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养,每天换液 1 次,隔日进行传代。

1.2.2 天青 B 处理细胞 首先将固态天青 B 溶解于 PBS 中,制备成浓度为 3 μ mol/L 的天青 B 溶液,然后用 0.2 μ m 过滤器进行除菌后待用。待 N2a-APP695 细胞培养至合适的密度(70%~80%)时,将培养基换成无血清的 DMEM,培养 0.5 h 待细胞贴壁生长后,加入天青 B 溶液或 PBS 溶液(空白对照),使得培养基中的天青 B 终浓度为 0~60 μ mol/L,继续培养 6 h。

1.2.3 ELISA 检测 分别用 ELISA 测定试剂盒对培养的 N2a-APP695 细胞上清液中 A β_{40} 和 A β_{42} 水平进行定量。操作步骤参考试剂盒说明书。最后测定每孔 620 nm 处的光密度值,所有样品的测试结果都在标准曲线线性范围内。

1.2.4 Western blot 检测 分别收取细胞培养基和细胞用于检测胞外蛋白和胞内蛋白的水平,并用细胞裂解液裂解细胞。将收集的样品用 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液(含 β -巯基乙醇)震荡混匀,于 95 °C、5 min 煮样变性。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳进行蛋白分离,然后进行转膜,牛奶封闭。将封闭好的 PVDF 膜裁取相应目的蛋白的位置,放入装有相应一抗的孵育盒中,4 °C 摇晃孵育过夜。将 PVDF 膜放入含有 0.1%PBST 缓冲液中,100 r/min 摇晃清洗 3 次,每次 10 min。加入二抗,室温孵育 1 h,洗膜 3 次后进行 ECL 显色。用 Image J 软件对显影后的蛋白条带进行灰度分析。

1.2.5 BACE1 酶活性检测 用荧光共振能量转移分析试剂盒测定天青 B 对 BACE1 酶活性的影响。该试剂盒由纯化的 BACE1 酶蛋白、BACE1 底物和 BACE1 反应终止液组成。首

先将 BACE1 酶(10 μ L)、BACE1 底物(10 μ L)和天青 B(终浓度为 10 μ mol/L)混合,室温孵育 60 min 后加入 BACE1 反应终止液。以 BACE1 抑制剂 IV(2 μ mol/L)作为阳性对照。按照试剂盒说明书进行检测。

1.2.6 细胞活力的检测 首先将 N2a-APP695 细胞接种至 96 孔板中,每孔 1×10^4 个细胞,正常培养 12 h 后将培养基更换成 DMEM,加入天青 B 或 PBS(培养基中天青 B 的终浓度为 0~60 μ mol/L),继续培养 6 h。然后每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L,孵育 4 h 后终止培养,吸去培养基,每孔加 150 μ L DMSO,脱色摇床振荡 10 min。选择 490 nm 波长在酶联免疫监测仪上测定各孔光密度(optical density, OD)值,记录结果。

1.3 统计学处理

所有实验均独立重复 3 次以上,用 Image J 软件对 Western blot 结果进行灰度分析。采用 GraphPad Prism 5.0 统计学软件分析实验数据。所有数据均采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 天青 B 在一定浓度范围内不会影响 N2a-APP695 细胞活力

采用 MTT 试剂检测不同剂量的天青 B 对 N2a-APP695 细胞活力的影响,结果如图 1 所示。相比于 0 μ mol/L 的对照组,天青 B 在 5、10、15、20 μ mol/L 终浓度下均不会影响 N2a-APP695 细胞活力(均 $P>0.05$),而在 25、30、40、60 μ mol/L 终浓度下则具有一定的细胞毒性($P=0.025$ 、0.017、0.000、0.000),且细胞毒性与天青 B 的浓度呈正比。因此采用终浓度为 10 μ mol/L 的天青 B 进行后续实验。

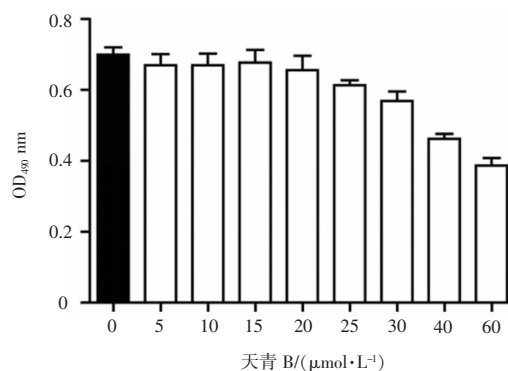


图 1 不同浓度天青 B 对 N2a-APP695 细胞活力的影响

2.2 天青 B 减少 N2a-APP695 细胞外 A β 多肽的水平

为了检测天青 B 对 N2a-APP695 细胞产生 A β 多肽的影响,采用 ELISA 检测培养基中 A β 多肽含量,结果如图 2 所示。相比于 0 μ mol/L 的对照组,天青 B 在 10 μ mol/L 终浓度下能够显著抑制胞外 A β_{1-40} ($P=0.002$)和 A β_{1-42} ($P=0.036$)的产生。

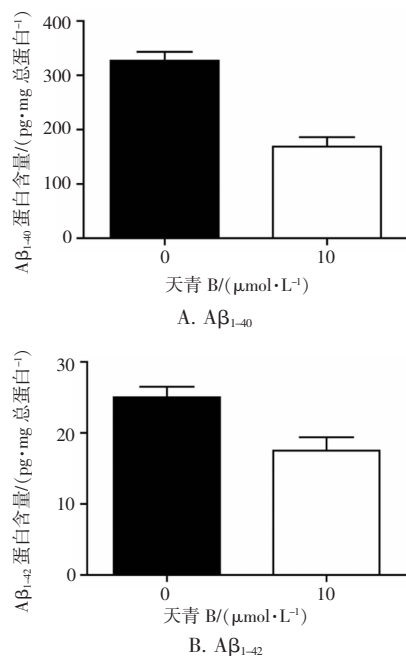


图2 天青 B 与 N2a-APP695 细胞外 Aβ 多肽水平的关系

2.3 天青 B 减少胞内 APP 和胞外 sAPPα 蛋白的水平

为进一步探究 Aβ 减少是否与 APP 代谢相关,首先检测细胞内总 APP 蛋白水平,结果如图 3 所示。相比于 0 μmol/L 的对照组,天青 B 在 10 μmol/L 终浓度下能够显著减少胞内 APP 蛋白水平 ($P=0.018$)。此外,本研究还检测了细胞外培养基中 sAPPα 蛋白的水平。同样,与胞内总的 APP 蛋白一致,天青 B 在 10 μmol/L 终浓度下也能够显著减少胞外 sAPPα 蛋白的水平 ($P=0.006$)。

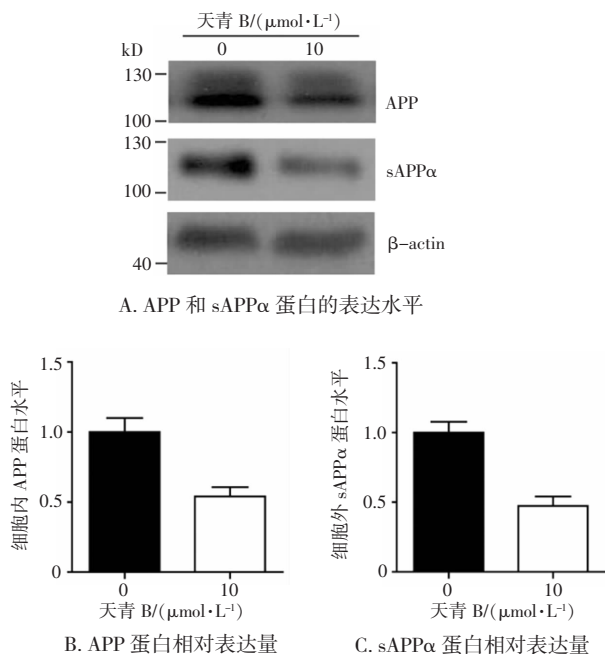


图3 天青 B 与 N2a-APP695 细胞内 APP 蛋白和细胞外 sAPPα 蛋白水平的关系

2.4 天青 B 不影响 BACE1 的表达水平

为了探究天青 B 导致 Aβ 的减少是否与 BACE1 的表达相关,本研究检测了胞内 BACE1 的水平,结果如图 4 所示。相比于 0 μmol/L 的对照组,天青 B 在 10 μmol/L 终浓度下不影响 BACE1 的蛋白表达水平 ($P>0.05$)。

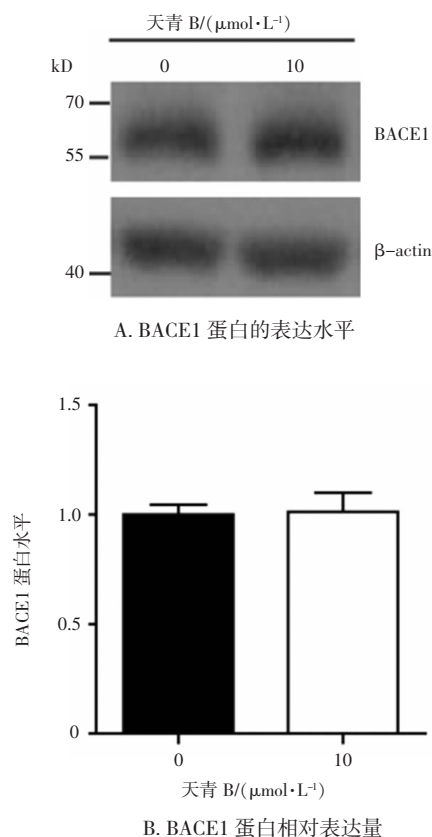


图4 天青 B 与 N2a-APP695 细胞内 BACE1 蛋白表达水平的关系

2.5 天青 B 抑制 BACE1 的活性

为了探究天青 B 是否通过抑制 BACE1 的活性来减少 Aβ 的产生,采用 BACE1 酶活性检测试剂盒检测酶的活性,结果如图 5 所示。相比于 0 μmol/L 的阴性对照组,天青 B 和 BACE1 抑制剂 IV (阳性对照)在 10 μmol/L 终浓度下能够抑制 BACE1 的活性,其活性抑制率分别为 66.0%和 75.7% (均 $P=0.000$)。

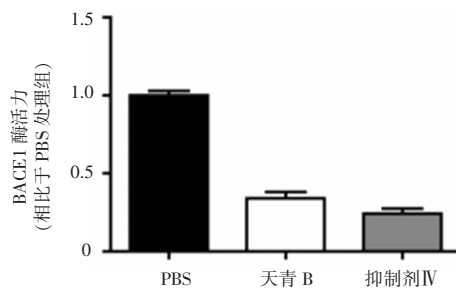


图5 天青 B 与 BACE1 蛋白活力的关系

3 讨论

目前用于治疗或预防阿尔茨海默病的药物主要有胆碱酯酶抑制剂(包括多奈哌齐、加兰他敏及利伐司他明)和部分 N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂(即美金刚胺),临床试验表明以上这些药物并没有发挥出很好的治疗或预防作用^[5]。亚甲蓝作为一种新的胆碱酯酶抑制剂,能够影响 APP 的代谢和 A β 的产生,从而有望阻止该疾病的发展^[3,6]。天青 B 作为亚甲蓝去甲基化的主要产物之一,在多种生物体内具有很强的药理活性^[7]。因此,本文旨在研究天青 B 是否会影响 APP 的代谢。

大量研究表明,部分胆碱酯酶抑制剂如他克林、苯丙氨酸和利伐司他明等化学制剂会引起毒性 A β 的减少^[8-10]。因此,文中首先分析了在 AD 发病过程中起关键作用的 A β 水平。研究结果显示,天青 B 能够明显减少细胞外 A β_{1-40} 和 A β_{1-42} 的生成。为了进一步探究天青 B 诱导 A β 减少是否与 APP 代谢相关,分析了胞内全长 APP 和胞外 sAPP α 水平,结果表明天青 B 能够显著减少胞内全长 APP 和胞外 sAPP α 水平,即天青 B 能够抑制 APP 蛋白的表达,进而导致 A β 的生成减少。进一步研究天青 B 对 α -分泌酶的影响也非常重要,因为它可以阐明 sAPP α 水平降低的原因。比如,毒蕈碱型受体能够偶联并激活蛋白激酶 C,进而增强 sAPP α 的表达^[11]。因此,研究天青 B 是否影响蛋白激酶 C 的表达也很有意义。此外,本研究还发现天青 B 能够显著抑制 BACE1 的活性,可作为一种 β -分泌酶调节剂影响 APP 蛋白的剪切过程,这也是导致 A β 生成减少的另一个因素。

综上所述,目前的体外研究表明亚甲蓝的主要代谢产物天青 B 通过降低 N2a-APP695 细胞内 BACE1 的活性和全长 APP 蛋白的表达,在降低 A β 多肽的水平上发挥了重要作用。因此,天青 B 有望

成为治疗或预防阿尔茨海默病的潜在药物。天青 B 对 APP 代谢的具体作用机制目前还未知,需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2006, 368(9533): 387-403.
- [2] Zheng H, Koo EH. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein[J]. Mol Neurodegener, 2011, 6(1): 27.
- [3] Necula M, Breydo L, Milton S, et al. Methylene blue inhibits amyloid A β oligomerization by promoting fibrillization[J]. Biochemistry, 2007, 46(30): 8850-8860.
- [4] Pfaffendorf M, Bruning TA, Batnik HD, et al. The interaction between methylene blue and the cholinergic system[J]. Br J Pharmacol, 1997, 122(1): 95-98.
- [5] Ray B, Lahiri DK. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: different molecular targets and potential therapeutic agents including curcumin[J]. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9(4): 434-444.
- [6] Mori T, Koyama N, Segawa T, et al. Methylene blue modulates β -secretase, reverses cerebral amyloidosis, and improves cognition in transgenic mice[J]. J Biol Chem, 2014, 289(44): 30303-30317.
- [7] Petzer A, Harvey BH, Petzer JP. The interactions of azure B, a metabolite of methylene blue, with acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2014, 274(3): 488-493.
- [8] Lahiri DK, Farlow MR, Sambamurti K. The secretion of amyloid beta-peptides is inhibited in the tacrine-treated human neuroblastoma cells[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1998, 62(2): 131-140.
- [9] Shaw KT, Utsuki T, Rogers J, et al. Phenserine regulates translation of beta-amyloid precursor protein mRNA by a putative interleukin-1 responsive element, a target for drug development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(13): 7605-7610.
- [10] Bailey JA, Balmiki R, Greig NH, et al. Rivastigmine lowers A β and increases sAPP α levels, which parallel elevated synaptic markers and metabolic activity in degenerating primary rat neurons[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21954.
- [11] Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, et al. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors[J]. Science, 1992, 258(5080): 304-307.

(责任编辑:张学颖)