论著

文章编号:1000-5404(2014)01-0046-04

姜黄素对N2a/APP695细胞载脂蛋白E表达的影响

卢 茜,邓钰双,刘 莉,张玉平,郭秀明,余 刚 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科)

[摘要] **目的** 探讨姜黄素对N2a/APP695细胞载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)的影响及其可能机制。**方法** 体外培养野生型的N2a细胞与阿尔茨海默病模型细胞,即N2a/APP695细胞;以MTT比色法检测不同浓度姜黄素对N2a/APP695细胞存活率的影响;应用5、10、20 μmol/L姜黄素处理细胞48 h后,通过RT-PCR、Western blot分别检测ApoE、低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)的mRNA、蛋白水平的变化,采用免疫细胞化学检测ApoE分布情况及表达变化。**结果** MTT检测结果显示,姜黄素对N2a/APP695细胞具有明显的保护作用,其中,20 μmol/L时保护作用最显著($P<0.05$)。RT-PCR、Western blot检测结果显示,与对照组相比,N2a/APP695细胞ApoE的mRNA及蛋白水平显著增加($P<0.01$),而LDLR水平明显减少($P<0.01$);姜黄素处理N2a/APP695细胞后,ApoE的mRNA及蛋白水平显著减少,LDLR的mRNA及蛋白水平明显增加,均呈剂量依赖性($P<0.05$)。免疫细胞化学检测结果显示ApoE主要分布在胞质、胞膜;与对照组相比,N2a/APP695细胞ApoE阳性染色数增多并浓染;经姜黄素处理后,ApoE阳性染色数减少并浅染($P<0.01$)。**结论** 姜黄素可显著地抑制体外培养神经元中ApoE的产生,其机制可能与促进ApoE受体LDLR的表达有关。

[关键词] 阿尔茨海默病;载脂蛋白E;低密度脂蛋白受体;姜黄素
[中图法分类号] R282.71; R394.2; R745.7 [文献标志码] A

Curcumin suppresses ApoE expression in murine neuroblastoma Neuro2a/APP695 cells

Lu Xi, Deng Yushuang, Liu Li, Zhang Yuping, Guo Xuming, Yu Gang (Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of curcumin on the expression of apolipoprotein E (ApoE) in murine neuroblastoma Neuro2a (N2a) cells. **Methods** MTT assay was used to detect the effect of curcumin at the doses of 2.5, 5, 10, 20 and 40 μmol/L on the viability of N2a/APP695 cells, a cellular model of Alzheimer's disease. After the N2a/APP695 cells then were treated with curcumin at 5, 10 and 20 μmol/L for 48 h, the mRNA levels of ApoE and low density lipoprotein receptor (LDLR) in N2a cells were evaluated by RT-PCR, and their protein levels were determined by Western blotting. The cellular content of ApoE was measured by immunocytochemical staining. **Results** Curcumin treatment resulted in significant increase in the cell viability, especially at the dose of 20 μmol/L ($P<0.05$). Compared to normal cells, the mRNA and protein expression of ApoE were increased in N2a/APP695 cells, the LDLR expression, instead, were decreased ($P<0.01$). Treatment with curcumin distinctly decreased ApoE expression and increased LDLR production in a does-dependent manner ($P<0.05$). Further more, ApoE was mainly located in the cytoplasm and cell membrane, and the number of ApoE positive cells were increased and hyper-chromatic compared to normal cells. but the number of ApoE positive cells were decreased and the color grew pallid after the treatment of curcumin ($P<0.01$). **Conclusion** Curcumin inhibits the ApoE production in N2a/APP695 cells *via* facilitating the expression of LDLR.

[**Key words**] Alzheimer's disease, apolipoprotein E, low density lipoprotein receptor, curcumin

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2012JJA10044). Corresponding author: Yu Gang, E-mail: yugangw@yahoo.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2012JJA10044)
[通信作者] 余 刚,E-mail: yugangw@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130917.1441.001.html (2013-09-17)

载脂蛋白 E(apolipoprotein E,ApoE)是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)公认的主要危险因素,ApoEε4 基因多态性与 AD 密切相关[1],同时 ApoE 也广泛参与了 AD 病理特征如淀粉样蛋白 Aβ 沉积,Tau 蛋白异常磷酸化,胆固醇代谢紊乱等过程[2-3],提示了 ApoE 在 AD 发病机制中的重要作用。低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor,LDLR)作为 ApoE 的典型内吞受体,是调节脑内 ApoE、胆固醇代谢的重要靶点[4]。姜黄素作为一种从姜黄中萃取的酚性色素,是常用的 Aβ 强抑制剂,同时具有降低胆固醇、LDL-胆固醇及 LDLR 水平等调节血脂代谢的药理作用[5]。但姜黄素是否能调节神经细胞的 ApoE 表达及其可能机制尚少见报道。本研究采用体外 N2a/APP695 细胞模型,探讨姜黄素对 N2a/APP695 细胞中 ApoE,以及 ApoE 相关受体 LDLR 表达水平的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

姜黄素(Sigma 公司);OPTI-MEM、DMEM、胎牛血清(FBS)、胰酶等购自 Gibco 公司;RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、PCR 试剂盒均为 TaKaRa 产品;引物由上海生工设计并合成;ApoE 抗体、LDLR 抗体均购自 Abcam 公司;SABC 试剂盒及 DAB 显色试剂均购自武汉博士德公司。

1.2 细胞株及其培养

小鼠神经瘤 N2a(Neuro-2a)细胞,购自中国科学院上海细胞库;N2a/APP695 由清华大学公衍道教授馈赠。N2a/APP695 为稳定表达 Swedish 家族突变的人 APP695 基因的 N2a 细胞,能产生大量的淀粉样蛋白 Aβ,是常用的 AD 体外模型细胞。

N2a 细胞培养基为 47.5% OPTI-MEM,47.5% DMEM,5% FBS 的混合液。细胞在 37 ℃,5% CO_2 环境下培养,取生长良好的细胞用于实验。

1.3 MTT 法检测不同浓度姜黄素对 N2a/APP695 细胞存活率的影响

N2a/APP695 细胞接种于 96 孔板,每孔 200 μL 培养基约含 10 000 个细胞,以终浓度 2.5、5、10、20、40 μmol/L 姜黄素处理细胞 48 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT20 μL,作用 4 h 后弃上清,加入 DMSO 终止反应并测定每孔光密度值(570 nm),并计算细胞存活率。

1.4 实验分组

①对照组:N2a/wt 细胞;②模型组:N2a/APP695 细胞;③实验组:5、10、20 μmol/L 姜黄素处理的 N2a/APP695 细胞。

1.5 RT-PCR 法检测 N2a 细胞 ApoE、LDLR 的 mRNA 水平

上述各组细胞采用 Trizol 法提取细胞总 RNA 后检测 RNA 浓度及纯度,并逆转录为 cDNA,进行 PCR 扩增。目的基因引物序列分别为,ApoE 引物上游:5′-GAGGAACAGACCCAGCAAATAC-3′,下游:5′-GCAGGACAGGAGAAGGATACTC-3′;LDLR 引物上游:5′-TTCCTGTCCATCTTCTTCCCTA-3′,下游:5′-CGTCCTCTGTGGTCTTCTGGTA-3′;GAPDH 引物上游:5′-AGGCCGGTGCTGAGTATGTC -3′,下游:5′-TGCCTGCTTCACCACCTTCT -3′。扩增片段使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳成像。以 GAPDH 为内参照。

1.6 Western blot 检测 N2a 细胞 ApoE、LDLR 的蛋白质水平

提取上述各组细胞的总蛋白以及胞膜蛋白,蛋白定量后进行 SDS-PAGE 电泳并转膜,封闭后置于一抗稀释液中 4 ℃孵育过夜。二抗稀释液孵育 2 h 后,用化学发光法显色,曝光。以 β-actin 为参照。

1.7 免疫细胞化学检测 N2a 细胞 ApoE 分布情况及表达变化

取出细胞爬片,-20 ℃甲醇固定 10 min 后,按试剂说明书操作。光镜下观察 ApoE 的分布,并分析阳性细胞的平均光密度值,反应 ApoE 的表达量变化。

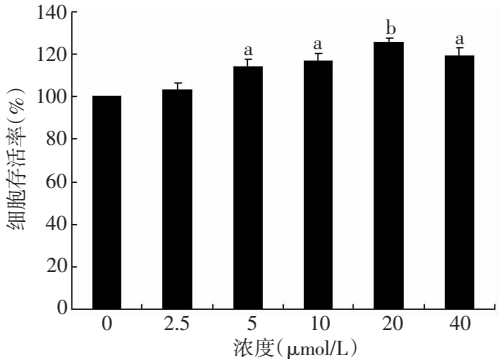
1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 14.0 统计软件,行单因素方差分析。

2 结果

2.1 姜黄素对 N2a/APP695 细胞存活率的影响

MTT 法检测 N2a/APP695 细胞存活率发现,不同浓度的姜黄素处理细胞 48 h 后,细胞的存活率均保持在 100% 以上,提示姜黄素对 N2a/APP695 细胞具有保护作用。其中,20 μmol/L 姜黄素的保护作用最显著($P<0.01$)。

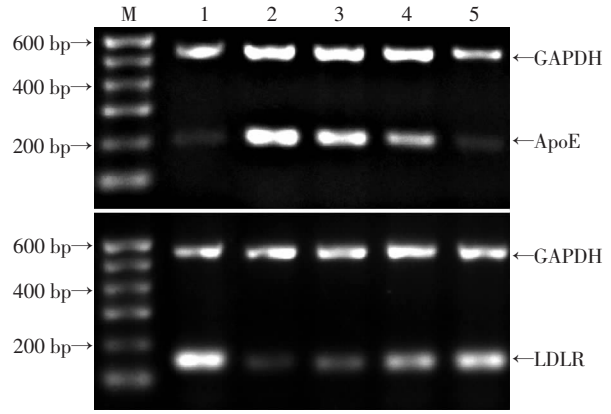


a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 0 μmol/L(模型组)比较

图 1 MTT 法检测不同浓度姜黄素对 N2a/APP695 细胞存活率的影响

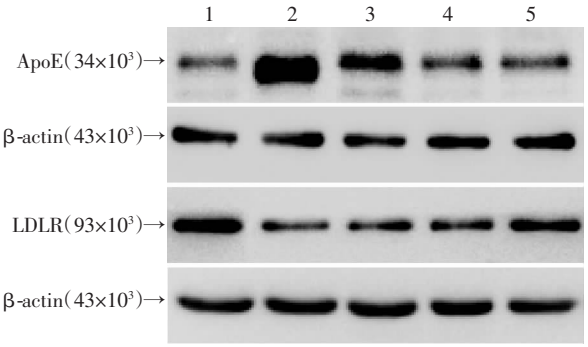
2.2 不同浓度姜黄素对 N2a/APP695 细胞 ApoE 和 LDLR 的 mRNA 与蛋白水平的影响

与对照组比较,模型组 ApoE 的 mRNA 与蛋白水平显著升高($P<0.01$);LDLR 的 mRNA 与蛋白水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,实验组的 ApoE 的 mRNA 与蛋白水平明显下降,并随着姜黄素浓度的增加而降低($P<0.05$);LDLR 的 mRNA 与蛋白水平明显增高,并随着药物浓度的增加而增加($P<0.05$)见图 2、3,表 1。



M：标准；1：N2a/wt；2：N2a/APP695；3：N2a/APP695 + 5 μmol/L 姜黄素；4：N2a/APP695 + 10 μmol/L 姜黄素；5：N2a/APP695 + 20 μmol/L 姜黄素

图2 不同浓度姜黄素对 N2a/APP695 细胞 ApoE、LDLR mRNA 水平的影响



1：N2a/wt；2：N2a/APP695；3：N2a/APP695 + 5 μmol/L 姜黄素；4：N2a/APP695 + 10 μmol/L 姜黄素；5：N2a/APP695 + 20 μmol/L 姜黄素

图3 不同浓度姜黄素对 N2a/APP695 细胞 ApoE、LDLR 蛋白水平的影响

2.3 不同浓度姜黄素处理 N2a/APP695 细胞后 ApoE 的分布情况及表达变化

免疫细胞化学染色后发现，ApoE 主要分布在胞质与胞膜。对照组 ApoE 表达呈弱阳性，平均光密度值为(0.020 ± 0.004)；模型组 ApoE 表达呈强阳性，平均光密度值为(0.131 ± 0.033)，且呈棕黄色，二者比较具有统计学差异($P < 0.01$)。20 μmol/L 姜黄素处理组 ApoE 表达呈阳性，平均光密度值为(0.041 ± 0.013)；与模型组比较具有统计学差异($P < 0.05$)。可见 20 μmol/L 姜黄素可显著地抑制 ApoE 的表达(图4)。

3 讨论

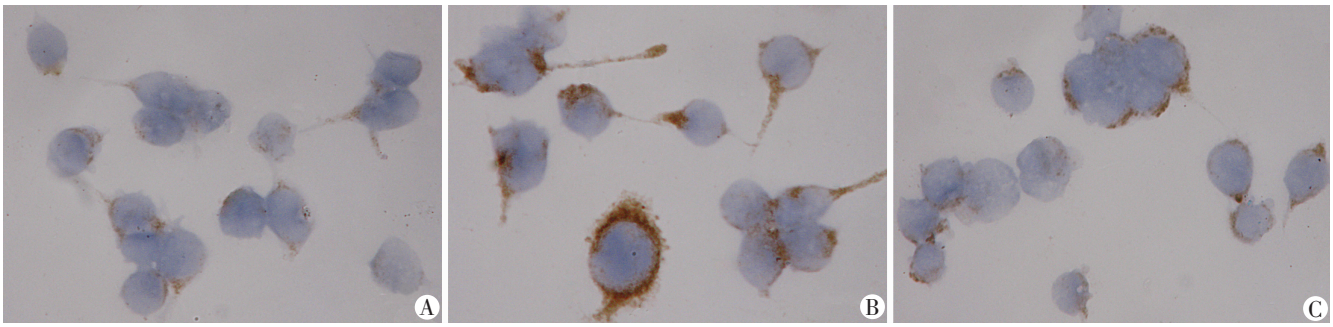
AD 是老年痴呆的主要类型，具有遗传异质性。现已证明，ApoE 等位基因 ε4 是散发性与家族性 AD 的遗传学高危因素。相对于正常人群，AD 患者及其家属中 ApoEε4 呈高频分布，同时，ε4 还可明显提高早发性 AD 的可能性[1]。另外，ApoE 也参与了 AD 各种病变过程，如淀粉样蛋白 Aβ 沉积，Tau 蛋白过度磷酸化，神经毒性，神经炎症，脑血管淀粉样变性等。近年来研究表明，ApoE 可与 Aβ 共存于 AD 病理特征老年斑中，并与 Aβ 的沉积量呈正相关，调节 Aβ 的积聚与清除[2-3]。由此可见，ApoE 在 AD 发病机制中具有重要作用。我们的实验结果显示，与对照组比较，N2a/APP695 细胞的 ApoE 水平明显升高。与 Akram 等[6]发现的结果一致。提示降低 ApoE 水平可能是防治 AD 的一个重要途径。

ApoE 作为载脂蛋白，与脑内胆固醇的转运降解、LDL 代谢密切相关，其中，胆固醇代谢紊乱在 AD 发病机制中也具有重要作用。流行病学表明，高胆固醇血

表1 不同浓度姜黄素处理 N2a/APP695 细胞后 ApoE，LDLR 的 mRNA 与蛋白表达水平的比较($n = 3$，$\bar{x} \pm s$)

组别	ApoE/GAPDH	LDLR/GAPDH	ApoE/β-actin	LDLR/β-actin
对照组(N2a/wt)	0.126 ± 0.014	2.169 ± 0.052	0.560 ± 0.008	1.668 ± 0.088
模型组(N2a/APP695)	4.381 ± 0.195^{a}	0.290 ± 0.019^{a}	1.556 ± 0.023^{a}	0.561 ± 0.032^{a}
N2a/APP695 + 5 μmol/L 姜黄素组	1.395 ± 0.032^{b}	0.419 ± 0.013^{b}	1.150 ± 0.055^{b}	0.677 ± 0.024^{b}
N2a/APP695 + 10 μmol/L 姜黄素组	0.722 ± 0.010^{bc}	1.064 ± 0.016^{bc}	0.953 ± 0.004^{bc}	0.711 ± 0.014^{bc}
N2a/APP695 + 20 μmol/L 姜黄素组	0.229 ± 0.025^{bcd}	1.349 ± 0.048^{bcd}	0.724 ± 0.003^{bcd}	1.538 ± 0.103^{bcd}

a：$P < 0.01$，与对照组比较；b：$P < 0.05$，与模型组比较；c：$P < 0.05$，与 5 μmol/L 姜黄素组比较；d：$P < 0.05$，与 10 μmol/L 姜黄素组比较



A：对照组；B：模型组；C：20 μmol/L 姜黄素组

图4 免疫细胞化学检测 N2a 细胞 ApoE 分布情况及表达变化 (SABC ×200)

症是 AD 的高危因素,胆固醇可与 Aβ 沉积、tau 过度磷酸化等相互作用,加速 AD 病变的进程[7-8]。在正常成人脑内,胞外的胆固醇-ApoE 复合体,通过 LDL 受体家族内吞入胞,经溶酶体水解后,伴随着 ApoE 蛋白的分离降解,胆固醇释放入胞内,为细胞所需[9]。在 LDL 受体家族中,LDLR 是典型的 ApoE 受体,调节 ApoE、胆固醇的内吞与降解,更为重要的是,LDLR 也参与了 AD 的发病机制。Kim 等[4]发现,在小鼠脑内 LDLR 过表达可显著的促进 ApoE 分解,同时,海马区胞外 Aβ 沉积也明显减少。相反,在低表达 LDLR 的小鼠脑内,ApoE 水平明显升高,并伴有脑内 Aβ 积聚增加的趋势[10]。由此可见,LDLR 可通过下调脑内 ApoE 水平,以及减少 Aβ 沉积,最终在 AD 脑内起到保护作用。尽管如此,目前并无数据表明内源性 LDLR 在 AD 病理状态下的表达水平。我们的实验结果显示,与 N2a/wt 细胞比较,N2a/APP695 细胞的 LDLR 水平显著降低。提示 LDLR 有可能成为治疗 AD 的潜在靶点。

姜黄素是一种从姜黄中萃取的酚性色素,是常用的 Aβ 强抑制剂,有望成为 AD 防治的重要植物源性药物。我们使用不同浓度姜黄素处理 N2a/APP695 细胞后,细胞的存活率明显升高,也进一步证明了姜黄素对 AD 细胞的保护效用。

另外,姜黄素还具有降血脂、抗动脉硬化等广泛的药理效用。姜黄素对胆固醇代谢的调节作用早有报道,Alwi 等[11]发现对急性冠脉综合征患者给予低剂量的姜黄素,可明显降低总胆固醇和 LDL-胆固醇水平。在糖尿病,高脂饮食,动脉硬化等病变模型中,也进一步验证了姜黄素下调胆固醇水平的作用[12]。而关于姜黄素调节胆固醇代谢的机制,则可能与上调 LDLR 水平有关。在血浆中首先证明了姜黄素可通过上调 LDLR 进而减少胆固醇水平;之后在胆固醇的主要合成场所,即肝细胞中,也证明了姜黄素可增加 LDLR 的 mRNA 与蛋白水平,调节胆固醇代谢,并呈剂量依赖性,其机制可能与 SREBPs 通路有关[5,13];另外,姜黄素还可明显上调小鼠巨噬细胞中 LDLR 表达水平[14]。然而,神经细胞中的姜黄素对胆固醇代谢的调节作用及机制尚少见报道。

本研究结果显示,对 N2a/APP695 细胞给予不同浓度姜黄素处理后,可明显减低胞内 ApoE 水平,并呈剂量依赖关系;明确了姜黄素对 AD 细胞 ApoE 水平的抑制作用,进一步证明了姜黄素对老化神经细胞的保护效应,并提示姜黄素有可能参与 AD 脑内胆固醇代谢。其作用的可能机制是,姜黄素通过增加 LDLR 水平,促进 LDLR 介导的 ApoE 分解代谢,最终减少神经细胞的 ApoE 水平。本实验检测了姜黄素对神经细胞 LDLR 水平的影响,结果显示 N2a/APP695 细胞经姜黄素处理后,LDLR 的 mRNA 和蛋白水平明显增加,并随着姜黄素浓度的增加而增加,这提示姜黄素可以促进 AD 细胞中 LDLR 的表达,进而减少 ApoE 的产生,为姜黄素成为防治 AD 的重要保护剂提供了新的理论基础。然而,姜黄素与神经细胞内胆固醇代谢的关系,还需进一步的研究讨论。

总之,本研究表明姜黄素可以明显抑制 N2a/APP695 细胞的 ApoE 水平,其机制可能与上调 LDLR 有关,可为姜黄素防治 AD 提供了新的理论基础。

参考文献:

[1] Rhinn H, Fujita R, Qiang L, *et al*. Integrative genomics identifies APOE epsilon4 effectors in Alzheimer's disease[J]. Nature, 2013, 500(7460): 45-50.

[2] Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies [J]. Cell, 2012, 148(6): 1204-1222.

[3] Liu C C, Kanekiyo T, Xu H, *et al*. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy[J]. Nat Rev Neurol, 2013, 9(2): 106-118.

[4] Kim J, Castellano J M, Jiang H, *et al*. Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A bete clearance[J]. Neuron, 2009, 64(5): 632-644.

[5] Dou X, Fan C, Wo L, *et al*. Curcumin up-regulates LDL receptor expression *via* the sterol regulatory element pathway in HepG2 cells[J]. Planta Med, 2008, 74(11): 1374-1379.

[6] Akram A, Schmeidler J, Katsel P, *et al*. Association of ApoE and LRP mRNA levels with dementia and AD neuropathology[J]. Neurobiol Aging, 2012, 33(3): 628.e1-628.e14.

[7] Popp J, Meichsner S, Kolsch H, *et al*. Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86(1): 37-42.

[8] Di-Paolo G, Kim T W. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond[J]. Nat Rev Neurosci, 2011, 12(5): 284-296.

[9] Liu Q, Zerbinatti C V, Zhang J, *et al*. Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1[J]. Neuron, 2007, 56(1): 66-78.

[10] Elder G A, Cho J Y, English D F, *et al*. Elevated plasma cholesterol does not affect brain Abeta in mice lacking the low-density lipoprotein receptor[J]. J Neurochem, 2007, 102(4): 1220-1231.

[11] Alwi I, Santoso T, Suyono S, *et al*. The effect of curcumin on lipid level in patients with acute coronary syndrome[J]. Acta Med Indones, 2008, 40(4): 201-210.

[12] Feng D, Ohlsson L, Duan R D. Curcumin inhibits cholesterol uptake in Caco-2 cells by down-regulation of NPC1L1 expression[J]. Lipids Health Dis, 2010, 9: 40.

[13] Peschel D, Koerting R, Nass N. Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis[J]. J Nutr Biochem, 2007, 18(2): 113-119.

[14] Fan C, Wo X, Qian Y, *et al*. Effect of curcumin on the expression of LDL receptor in mouse macrophages[J]. J Ethnopharmacol, 2006, 105(1/2): 251-254.

(**收稿**:2013-07-06;**修回**:2013-08-06)

(编辑　王小寒)