DOI:10.16016/j.1000-5404.201507035

Beta-淀粉样蛋白对体外培养人神经母细胞瘤细胞的毒性作用

李霞绯,吴 娟 (400014 重庆,重庆市第三人民医院老年科)

[摘要] **目的** 观察 Beta-淀粉样蛋白(beta-amyloid,Aβ)对体外培养人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)的毒性作用。**方法** 将体外培养的人神经母细胞瘤细胞,分为 BSA 对照组(0.5 mg/mL)、Aβ 组($A\beta_{1-42}$寡聚体,50 μg/mL)和 Aβ + p75-FC 组(50 μg/mL $A\beta_{1-42}$ + 100 μg/mL p75-FC,p75-FC 为 p75NTR 胞外段与人 IgG FC 段的融合蛋白,能够竞争性阻断 p75NTR),分别干预 72 h,采用结晶紫染色法观测 SH-SY5Y 细胞轴突的生长长度,采用 MTT 法检测 SH-SY5Y 细胞存活率。**结果** 干预结束后,Aβ 组 SH-SY5Y 细胞轴突长度(42.83 ± 14.98)μm 明显短于 BSA 对照组[(69.76 ± 19.24)μm,P = 0.003];在同时给予 p75-FC 干预后,其轴突长度(65.37 ± 17.52)μm 与 BSA 对照组轴突长度比较差异无统计学意义(P = 0.600)。Aβ 组 SH-SY5Y 细胞 D(490)值(0.203 ± 0.068)明显低于 BSA 对照组(0.428 ± 0.094,P = 0.002);在同时给予 p75-FC 干预后,其 D(490)值(0.447 ± 0.103)与 BSA 对照组比较差异无统计学意义(P = 0.768)。**结论** Aβ 对人神经母细胞瘤细胞具有毒性作用,且通过 p75NTR 介导实现。

[关键词] 淀粉样蛋白;人神经母细胞瘤;神经毒性;神经营养因子受体
[中图法分类号] R341; R73-35; R730.264 [文献标志码] A

Neurotoxicity of beta-amyloid on neuroblastoma cells *in vitro*

Li Xiafei, Wu Juan (Department of Geriatrics, Chongqing Third People's Hospital, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of beta-amyloid (Aβ) on the viability of neuroblastoma cells *in vitro*. **Methods** Neuroblastoma SH-SY5Y cells were divided into BSA group (0.5 mg/mL), Aβ group (50 μg/mL $A\beta_{1-42}$) and Aβ + p75-FC groups (50 μg/mL $A\beta_{1-42}$ + 100 μg/mL p75-FC, fusion protein p75-FC is p75NTR extracellular domain of human IgG FC segment and able to competitively block p75NTR). All experimental groups were treated for 72 h. Crystal violet staining was performed to examine the axonal growth of the SH-SY5Y cells. MTT assay was conducted to detect the viability of SH-SY5Y cells. **Results** The axon length in SH-SY5Y cells was significantly shorter in the Aβ group than the BSA group (42.83 ± 14.98 *vs* 69.76 ± 19.24 μm, P = 0.003), but there was no difference observed when co-cultured with p75-FC (axon length: 65.37 ± 17.52 μm, P = 0.600, compared with BSA group). MTT assay indicated that the cell viability was lower in the Aβ group than the BSA group (0.203 ± 0.068 *vs* 0.428 ± 0.094, P = 0.002), but there was no difference observed when co-cultured with p75-FC (0.447 ± 0.103, P = 0.768, compared with BSA group). **Conclusion** Aβ exerts a toxic effect on SH-SY5Y cells, which might be mediated by p75NTR.

[**Key words**] amyloid; neuroblastoma; neurotoxicity; neurotrophic factor receptor

Supported by the Project of Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-2-222). Corresponding author: Wu Juan, E-mail: wujuan423@126.com

[基金项目] 重庆市卫生局科研项目(2012-2-222)
[通信作者] 吴 娟,E-mail:wujuan423@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151203.1310.006.html(2015-12-03)

随着老龄化社会的到来,痴呆发病率逐年升高。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是痴呆的最主要类型,典型病理改变为脑内大量老年斑形成、神经纤维缠结和皮层、海马等神经元丢失,临床上出现记忆、认知功能下降和人格改变等变化,严重危害患者的健康。有关AD的发病机制尚不完全清楚,临床上也缺乏有效的治疗手段[1]。Beta-淀粉样蛋白(beta-amyloid,Aβ)的异常沉积被认为是AD病理变化的起始环节和中心环节,是AD发生、发展中重要的致病因素[2]。目前认为,Aβ的大量沉积对神经元具有毒性作用[3],且这种毒性与p75神经营养因子受体(p75 neurotrophic factor receptor, p75NTR)的介导有关。但是,关于如何阻止Aβ的产生和消除Aβ的神经毒性作用鲜有研究报道。本研究采用体外培养的人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y),分析在$A\beta_{1-42}$寡聚体以及p75-FC(p75NTR胞外段与人IgG FC段的融合蛋白,能够竞争性阻断p75NTR)的干预下其神经突起生长和细胞存活的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

选用人神经母细胞瘤细胞株(SH-SY5Y细胞株),使用PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)分组配制溶液:牛血清白蛋白组(bovine serum albumin,BSA,0.5 mg/mL,Sigma公司)、Aβ组($A\beta_{1-42}$寡聚体,50 μg/mL,Sigma公司)和Aβ + p75-FC组(50 μg/mL $A\beta_{1-42}$ + 100 μg/mL p75-FC)。实验细胞株由第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 SH-SY5Y的培养 SH-SY5Y细胞培养液使用90% Dulbecco Modified Eagle Medium-F12培养基(DMEM-F12,HyClone) + 10%胎牛血清(Fetal bovine serum,FBS,HyClone)。使用25 mL玻璃培养瓶在5% CO_2、37 ℃条件下进行培养,每72小时观察生长情况并换液,根据细胞融合度进行传代,当细胞生长活力良好时0.25%胰酶(Sigma)消化,24孔板或96孔板内进行分组干预72 h。

1.2.2 结晶紫染色和轴突测量 采用结晶紫染色方法对SH-SY5Y细胞进行染色和观察。24孔板进行培养和干预实验,每组3个复孔。分组干预72 h后,37 ℃ PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)清洗5 min,共2次;4%多聚甲醛室温下固定20 min,再次PBS清洗后用等量的0.1%结晶紫溶液进行染色(10 ~ 20 min),于倒置显微镜下观察并适时终止染色,照相(IX73,Olympus)。轴突长度采用Image J软件进行测量,高倍镜下随机10个视野内取最长轴突为测量数值。

1.2.3 MTT检测 采用MTT比色法对SH-SY5Y细胞存活进行检测。收集干预72 h后的细胞,调整细胞悬液浓度为10 000个/孔(96孔板),5% CO_2、37 ℃条件下孵育,倒置显微镜下观察细胞单层铺满孔底,进行MTT检测。每孔加入20 μL 5 mg/mL的MTT溶液,5% CO_2、37 ℃下培养4 h;加入200 μL二甲基亚砜(DMSO),振荡10 min使结晶物充分溶解,酶联免疫检测仪测量490 nm处光密度值[$D(490)$]。同时设调零孔和对照孔,每组5个复孔。

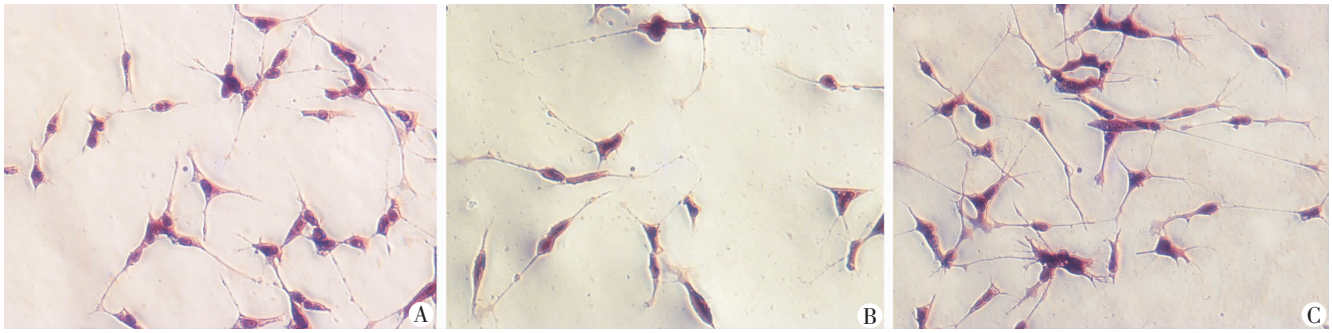
1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件,计量数据以$\bar{x} \pm s$表示,行t检验,$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SH-SY5Y细胞轴突生长情况

Aβ组SH-SY5Y细胞轴突长度(42.83 ± 14.98)μm明显短于BSA对照组[(69.76 ± 19.24)μm,$P = 0.003$];同时给予$A\beta_{1-42}$和p75-FC干预后,其SH-SY5Y细胞轴突长度(65.37 ± 17.52)μm与BSA对照组轴突长度比较差异无统计学意义($P = 0.600$,图1)。



A:BSA对照组;B:Aβ组;C:Aβ + p75-FC组

图1 各组SH-SY5Y细胞轴突生长情况 (结晶紫染色 ×200)

2.2 各组 SH-SY5Y 细胞的存活情况

Aβ 组 SH-SY5Y 细胞 $D(490)$ 值(0.203 ± 0.068)明显低于 BSA 对照组[0.428 ± 0.094,$P=0.002$];同时给予 $A\beta_{1-42}$ 和 p75-FC 干预后,其 SH-SY5Y 细胞 $D(490)$ 值(0.447 ± 0.103)与 BSA 对照组比较差异无统计学意义($P=0.768$)。

3 讨论

Aβ 是由淀粉样前体蛋白 APP 经 β-分泌酶和 γ-分泌酶的蛋白水解作用而产生的多肽[4]。多种细胞能够产生 Aβ,大部分与伴侣蛋白分子相结合,其他以游离状态存在于血液、脑脊液和脑间质中。$A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 是人体内最常见的 Aβ 亚型。前者更容易聚集,从而形成 Aβ 沉淀的核心,较后者更容易引发细胞毒性作用。Aβ 的这种神经毒性作用被认为在阿尔茨海默病的病程进展中起着重要作用[5]。但是,Aβ 对神经元的毒性作用与其状态有密切关系,研究表明溶解状态的 Aβ 在短时间内具有促进神经突起生长和存活的作用;而聚集沉淀状态的 Aβ 则对神经元呈现相反的作用,并能引起神经突退缩和神经元变性,产生与阿尔茨海默病类似的病理改变[6]。我们通过对神经细胞株 SH-SY5Y 细胞给予 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体进行干预,结果显示其对神经细胞轴突的生长以及细胞存活具有一定的毒性作用,这与当前大多数研究结果一致。

p75NTR 是较早发现的膜表面糖蛋白和神经营养素受体,属于肿瘤坏死因子受体超家族,是神经营养素(NTs)家族成员如神经生长因子(NGF)、脑源神经营养因子(BDNF)的低亲和力受体[7]。p75NTR 具有诱导细胞凋亡的作用,在发育早期对调节神经细胞正常发育和程序化凋亡具有重要意义。近期研究发现,p75NTR 基因敲除的小鼠其背根神经元群的细胞凋亡明显减少,提示 p75NTR 在神经凋亡诱导方面发挥作用[8]。近期一项动物研究发现,转基因小鼠脑内 Aβ 增加的同时能够提高 p75NTR 的表达,且 p75NTR 阳性神经纤维早于附近老年斑的出现,甚至深入老年斑中,提示 p75NTR 可能促发 Aβ 沉积[9],说明 p75NTR 还可能在 AD 发展过程中发挥作用,是当前 AD 发病机制的研究热点[10]。本实验在给予 $A\beta_{1-42}$ 处理的同时给予 p75-FC 以竞争性阻断 p75NTR 的介导作用,发现 $A\beta_{1-42}$ 的神经细胞毒性被逆转,说明 $A\beta_{1-42}$ 对神经细胞的毒性作用是通过 p75NTR 介导而发挥作用的。

本研究表明,p75NTR 在 $A\beta_{1-42}$ 的神经毒性中的介导作用,为如何阻止 Aβ 沉积后神经毒性和神经元凋亡提供理论依据,并为 AD 等神经性疾病的防治提供新的靶点和治疗策略,但相关机制有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Selkoe D J. The molecular pathology of Alzheimer's disease [J]. Neuron, 1991, 6(4): 487 – 498.

[2] Karran E, Mercken M, De-Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics[J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(9): 698 – 712. DOI: 10.1038/nrd3505

[3] Walsh D M, Klyubin I, Fadeeva J V, *et al*. Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition [J]. Biochem Soc Trans, 2002, 30(4): 552 – 557. DOI: 10.1042/

[4] Sinha S, Lieberburg I. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(20): 11049 – 11053.

[5] Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease[J]. Trends Pharmacol Sci, 1991, 12(10): 383 – 388.

[6] Jones R. Neurological disorders: Two sides to β-amyloid[J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13(10): 666. DOI: 10.1038/nrn3336

[7] Dechant G, Barde Y A. The neurotrophin receptor p75NTR: novel functions and implications for diseases of the nervous system[J]. Nat Neurosci, 2002, 5(11): 1131 – 1136. DOI: 10.1038/nn1102-1131

[8] Ahmed Z, Dent R G, Suggate E L, *et al*. Disinhibition of neurotrophin-induced dorsal root ganglion cell neurite outgrowth on CNS myelin by siRNA-mediated knockdown of NgR, p75NTR and Rho-A[J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 28(3): 509 – 523. DOI: 10.1016/j.mcn.2004.11.002

[9] 王叶冉, 刘雨辉, 梁春荣, 等. 阿尔茨海默病患者脑内 p75 神经营养因子受体(p75NTR)的表达及与老年斑位置关系的研究[J]. 解放军医学杂志, 2014, 39(5): 379 – 382. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2014.05.10

[10] Zeng F, Lu J J, Zhou X F, *et al*. Roles of p75NTR in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a novel therapeutic target[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82(10): 1500 – 1509. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.06.040

(收稿:2015-07-06;修回:2015-07-27)

(编辑 王小寒)