基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1300-05

姜黄素通过激活 PPARγ 和抑制 BACE1 减少神经细胞内 β 淀粉样蛋白的产生

斯 露[1,2],张 雄[2],张红梅[1],李 昱[1,2]
(1. 重庆医科大学病理教研室;2. 神经科学研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:本课题旨在研究姜黄素处理体外培养的神经细胞后 BACE1、PPARγ 及 Aβ40 和 Aβ42 的变化,探讨其抑制 β 淀粉样蛋白作用的可能机制。方法:通过 LipofectaminTM2000 将质粒 APPswe 与 BACE1-mychis 瞬时共转染入 SHSY5Y 细胞,然后用姜黄素分浓度组与时间组处理细胞,通过 RT-PCR 测定 BACE1 及 PPARγ 的 mRNA 水平;通过 Western Blotting 检测 BACE1 及 PPARγ 的蛋白表达;通过 ELISA 检测 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 的变化。结果:RT-PCR 及 Western blot 结果显示转染细胞经姜黄素处理后 BACE1 的 mRNA 及蛋白表达水平显著减少,呈浓度和时间依赖性($P<0.05$);而 PPARγ 的 mRNA 及蛋白表达水平增加,也呈浓度和时间依赖性($P<0.05$)。ELISA 结果显示 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 的产生随处理浓度及时间的增加显著降低($P<0.05$)。结论:姜黄素可显著抑制体外培养的神经元中 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 的产生,且该作用与其激活 PPARγ 和抑制 BACE1 密切相关。

【关键词】阿尔茨海默病;姜黄素;PPARγ;BACE1;Aβ
【中国图书分类法分类号】R749.1+6 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-01-04

Curcumin reduces Aβ generation of neurons by PPARγ activation and BACE1 inhibition

SI Lu, et al
(*Department of Pathology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibitory effects of Curcumin on Aβ generation in vitro and explore its potential mechanisms involing BACE1 and PPARγ. *Methods*: Plasmids APPswe and BACE1-mychis were transiently co-transfected into SHSY5Y cells by LipofectaminTM2000, then treated with Curcumin at 0 (control Group), 1.25, 5.0, 20.0 μmol/L for 24 hr, or with Curcumin at 5 μmol/L for 0, 12, 24 and 48 hrs for the time course assay. RT-PCR was performed to measure the endogenous levels of BACE1 mRNA and PPARγ. Western blot were used to detect the protein expression of BACE1 and PPARγ. The major cleavage product-- $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ was detected by β-amyloid 1-40 or 42 Colorimetric ELISA assay. *Results*: The mRNA level and protein level of BACE1 were decreased obviously in a dose- and time-dependent manner after treated with Curcumin in the cell line ($P<0.05$). Conversely, the expression of PPARγ increased at both mRNA and protein levels after treated with curcumin, also they were in a dose- and time-pendent manner ($P<0.05$). ELISA results showed that the generation of $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ reduced significantly, also in a dose- and time-dependent manner ($P<0.05$). *Conclusion*: Aβ generation could be obviously inhibited by Curcumin in co-transfected SHSY5Y cell lines and that the protective mechanism of Curcumin in AD involves activation of PPARγ and decreasing BACE1 at gene and protein levels.

【Key words】Alzheimer's disease; Curcumin; PPARγ; BACE1; Aβ

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性的认知障碍和记忆损害为主的中枢神经系统退行性病变,是引起老年痴呆最常见的原因之一。随着人口老龄化的快速发展,AD 的发病率日益增高,但目前仍无有效的药物治疗。因此,近年来 AD 发病机制与治疗的研究备受关注。研究发现,β-淀粉样蛋白(β-amyloid protein, Aβ)的产生与沉积是 AD 发病机制中最核心的因素,而姜黄素可以显著抑制 Aβ 的产生和聚集。本研究观察姜黄素处理

作者介绍:斯 露(1979-),女,硕士,
研究方向:阿尔茨海默病的分子机制及防治研究。
通讯作者:李 昱,女,教授,E-mail:liyu100@163.com。
基金项目:国家自然科学基金(30600196);重庆市自然科学基金资助项目(CSTC,2006BB5042);2007 年教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留[2007]1108 号)。

体外培养的神经元后 BACE1、PPARγ 及 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 的变化，探讨其抑制 Aβ 的可能机制，为 AD 的药物治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

pBACE1-mychis 和 pAPPswe 质粒由加拿大不列颠哥伦比亚大学宋伟宏教授惠赠；姜黄素(Sigma)；Lipofectam-inTM2000 (Invitrogen,USA)；RT-PCR 反应试剂盒(TaKaLa)；PVDF 膜 (Millipore,USA)；BACE1 兔抗人单克隆抗体(Santa Cruz,USA)；PPARγ 兔抗人单克隆抗体(Cellsignal,USA)；β-Actin 小鼠抗人单克隆抗体(Santa Cruz,USA)；$A\beta_{40}/A\beta_{42}$ ELISA kit(Biosource,USA)；Protease Inhibitor Cocktail Set (Cal-bio-chem,USA)。

1.2 方法

1.2.1 药物配制 姜黄素用 75%乙醇溶解，用 RPMI1640 培养液稀释成终浓度分别为 1.25、5、20 μmol/L。处理组 0 h 和 0 μmol/L 用相同体积的 75%乙醇作对照。

1.2.2 细胞培养 用含 10%小牛血清的 1640 培养液培养 SH-SY5Y 细胞，条件是：37℃恒温，CO_2 浓度为 5%。

1.2.3 质粒转染 在细胞生长至 90%～95%融合时，利用 LipofectaminTM 2000 介导进行瞬时共转染 pBACE1-mychis 和 pAPPswe 质粒。

1.2.4 RT-PCR 检测 引物的设计与合成，PPARγ 上游引物：5'-AGGAGCAGAGCAAAGAGGTGGC-3'，PPARγ 下游引物：5'-TGTGAGGACTCAGGGTGGTTCA-3'。BACE1 上游引物：5'-GCCTAAGGCTGCTGTAAAGTTGAG-3'，BACE1 下游引物：5'-GGCATCTTGTAGGGTGATTGGAGT-3'。内参 beta-actin 上游引物：5'-CTC GTCATACTCCTGCTTGCTG-3'，下游引物：5'-CGGGACCTGACTGACTACCTC-3'。按照 BioFlux 公司提供的 Bizol 试剂盒中说明的步骤提取 RNA，然后按照 TaKaLa 试剂盒的说明进行逆转录和 PCR 扩增：①逆转录条件为：30℃，10 min；42℃，30 min；99℃，5 min；5℃，5 min，一个循环。②PCR 的条件为：94℃，5 min，一个循环；94%℃，30 s，60℃，30 s，72℃，30 s，35 个循环；72℃，10 min，一个循环。产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳，并在 Bio-Rad 凝胶成像仪上进行分析。终产物片段长度为分别为 478、230、546 bp。

1.2.5 Western blot 检测 收集细胞进行蛋白的提取，并按照 Bradford 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳、转膜后，封闭，加入一抗[BACE1 抗体(1∶300)、PPARγ 抗体(1∶500)、β-actin 抗体(1∶200)]4℃孵育过夜，洗涤后孵二抗(羊抗鼠和羊抗兔的抗体 1∶2 000)，ECL 底物化学发光显色后曝光显影。通过 Bio-rad ChemiDocXRS 化学发光成像系统，进行曝光分析。

1.2.6 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ Sandwich ELISA 分析 收集细胞，蛋白抑制剂和 AEBSF 同时加入其中防止 Aβ 蛋白的降解。根据 Aβ Colorimetric ELISA 试剂盒 (Biosource International, Inc, CA)上的说明测定 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$。

1.3 统计学处理

所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，用 SPSS10.0 软件对各组数据进行正态检验以及方差齐性检验，多组数据参数间比较采用单因素方差分析，组内两两比较采用 SNK-q 检验分析；$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 姜黄素对转染后 SHSY5Y 细胞 BACE1 mRNA 和蛋白表达的影响

姜黄素处理细胞后，BACE1 mRNA 和蛋白的含量随其浓度-时间的增加而显著减少；当浓度梯度为 5 μmol/L，处理时间为 12 h 时，BACE1 mRNA 和蛋白的光密度值在转染后 SHSY5Y 细胞差异具有显著统计学意义($P<0.05$)(图 1)。用图像分析系统分析计算 BACE1/β-actin 的光密度比值，结果如(表 1~2)。

表 1 不同浓度的姜黄素处理细胞 24 h 后 BACE1 mRNA 及蛋白表达的 OD 值统计学分析

浓度分组	BACE1mRNA 表达	BACE1 蛋白表达	P
0 μmol/L	1.005±0.002	0.905±0.003	
1.25 μmol/L	0.984±0.003	0.892±0.003	($P>0.05$, 1.25 μmol/L vs 0 μmol/L)
5 μmol/L	0.719±0.006	0.663±0.006	($P<0.05$, 5 μmol/L vs 1.25 μmol/L)
20 μmol/L	0.499±0.006	0.478±0.009	($P<0.05$, 20 μmol/L vs 5 μmol/L)

表 2 5 μmol/L 姜黄素处理细胞不同时间后 BACE1 mRNA 及蛋白表达的 OD 值统计学分析

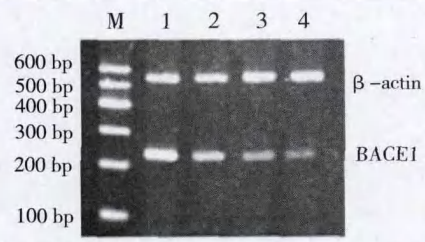
时间分组	BACE1 mRNA 表达	BACE1 蛋白表达	P
0 h	1.000±0.003	0.907±0.004	
12 h	0.895±0.004	0.847±0.002	($P<0.05$, 12 h vs 0 h)
24 h	0.717±0.005	0.660±0.006	($P<0.05$, 24 h vs 12 h)
48 h	0.528±0.002	0.429±0.004	($P<0.05$, 48 h vs 24 h)

表 3 不同浓度姜黄素处理细胞 24 h 后 PPARγ mRNA 及蛋白表达的 OD 值的统计学分析

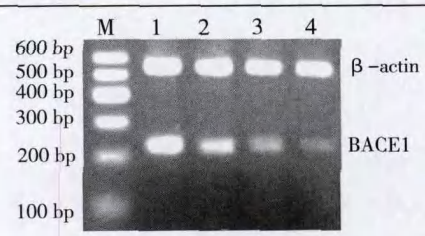
浓度组	PPAR γ mRNA 表达	PPAR γ 蛋白表达	*P*
0 μmol/L	0.437 ± 0.002	0.225 ± 0.001	
1.25 μmol/L	0.551 ± 0.004	0.278 ± 0.004	(*P*>0.05, 1.25 μmol/L vs 0 μmol/L)
5 μmol/L	0.813 ± 0.001	0.634 ± 0.005	(*P*<0.05, 5 μmol/L vs 1.25 μmol/L)
20 μmol/L	0.932 ± 0.005	0.715 ± 0.007	(*P*<0.05, 20 μmol/L vs 5 μmol/L)

表 4 5 μmol/L 姜黄素处理细胞不同时间后 PPARγ mRNA 及蛋白表达的统计学分析

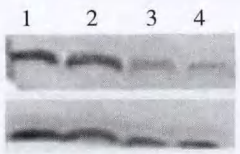
时间组	PPAR γ mRNA 表达	PPAR γ 蛋白表达	*P*
0 h	0.375 ± 0.001	0.245 ± 0.003	
12 h	0.516 ± 0.005	0.514 ± 0.007	(*P*<0.05, 12 h vs 0 h)
24 h	0.584 ± 0.003	0.658 ± 0.004	(*P*<0.05, 24 h vs12 h)
48 h	0.893 ± 0.004	0.803 ± 0.003	(*P*<0.05, 48 h vs 24 h)



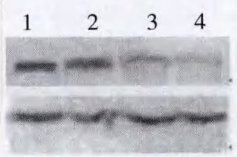
A. 不同浓度姜黄素处理细胞 24 h,其 BACE1 mRNA 的表达



B. 5 μmol/L 姜黄素处理细胞不同时间,其 BACE1 mRNA 的表达



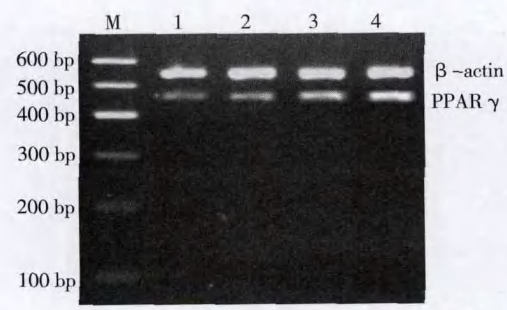
C. 不同浓度姜黄素处理细胞 24 h,其 BACE1 蛋白的表达



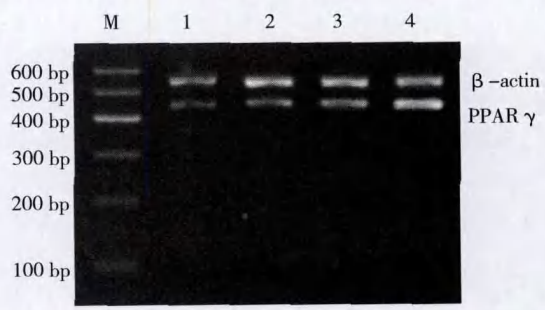
D. 5 μmol/L 姜黄素处理细胞不同时间,其 BACE1 蛋白的表达

(A, C: 1. 0 μmol/L group; 2. 1.25 μmo/L group; 3. 5 μmol/L group; 4. 20 μmol/L group; B, D: 1. 0 h; 2. 12 h; 3. 24 h; 4. 48 h)

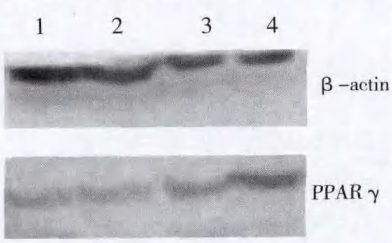
图 1 姜黄素对转染后的 SHSY5Y 细胞内 BACE1 mRNA 和蛋白的表达的影响



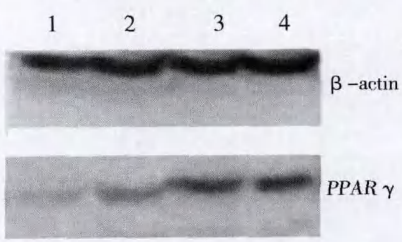
A. 不同浓度姜黄素处理细胞 24 h 后 PPAR γ mRNA 的表达



B. 5 μmol/L 姜黄素处理细胞不同时间后 PPAR γ mRNA 的表达



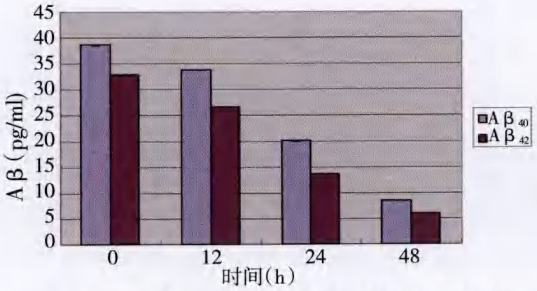
C. 不同浓度姜黄素处理细胞 24 h 后 PPAR γ 蛋白的表达



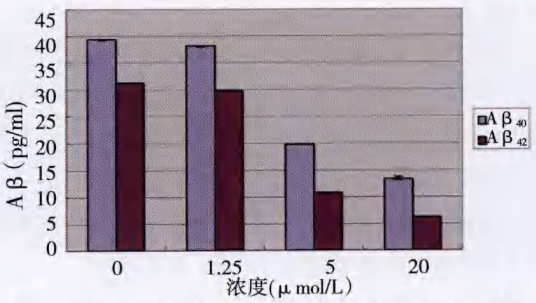
D. 5 μmol/L 姜黄素处理细胞不同时间后 PPAR γ 蛋白的表达

(A, C: 1. 0 μmol/L group; 2. 1.25 μmo/L group; 3. 5 μmol/L group; 4. 20 μmol/L group; B, D: 1. 0 h; 2. 12 h; 3. 24 h; 4. 48 h)

图 2 姜黄素对转染后的 SHSY5Y 细胞内的 PPARγ mRNA 和蛋白的表达的影响



A. 不同浓度的姜黄素对转染后的 SHSY5Y 细胞内生成 Aβ 的影响



B. 5 μ mol/L 姜黄素作用于转染的 SHSY5Y 细胞不同时间后 Aβ 的生成的影响

图 3 转染后的 SHSY5Y 细胞经姜黄素处理后 Aβ 的生成的影响

2.2 姜黄素对转染后的 SHSY5Y 细胞内 PPARγ mRNA 及蛋白的表达的影响

姜黄素处理经转染的细胞后，PPARγ 的 mRNA 及蛋白的表达蛋白含量随其浓度-时间的增加而递增，其中浓度 1.25 μmol/L 组与 0 μmol/L 对照组相比差异没有统计学上的意义($P>0.05$)(图 2)。图像分析系统分析，计算 PPARγ/β-actin 的光密度比值，结果如(表 3~4)。

2.3 ELISA 方法检测表达 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 的表达

姜黄素处理经转染的细胞后，$A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 蛋白含量随其浓度-时间的增加而显著减少。其中在浓度 1.25 μmol/L 和处理时间为 12 h 时，差异没有显著统计学意义($P>0.05$)(图 3)。

3 讨 论

AD 是痴呆的最常见的形式，其典型的病理特征包括老年斑形成、神经纤维缠结及大脑皮层及海马的局部区域中神经元的缺失。其中 Aβ 导致老年斑的形成与老年性痴呆的发生关系最为紧密，在 AD 的发病机制中扮演重要角色，即：Aβ 聚集物触发一系列复杂的病理级联反应，从而导致神经退行性变[1]。因此，如何有效的减少 Aβ 的生成是治疗 AD 的关键因素。

Aβ 是一种含 40~43 氨基酸的多肽，由淀粉前体蛋白(Amyloid precursor protein，APP)经 β-分泌酶和 γ-分泌酶裂解产生[2]。而 BACE1，是体内主要的 β-分泌酶，它由 501 位氨基酸残基[3,4]组成，是生成Aβ 所必需的酶[5]。在 BACE1 基因敲除的小鼠模型中，Aβ 几乎完全消失；而过表达 BACE1 的 APP转基因小鼠中，Aβ 的生成却显著增加[6]。因此，BACE1 不仅触发了 APP 的淀粉样酶解途径的启动，而且还是这一过程中的限速酶、关键酶[7,8]。Fukumoto 等[9]认为，增加 BACE1 的表达对 AD 发病有影响。因此，抑制 BACE1 被认为是防治 AD，降低脑内 Aβ 水平的一个有效靶点。过氧化物酶体增生物激活受体-γ (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma，PPARγ)是一种核转录因子，属于 PPAR 家族成员。其生物学功能复杂，参与调节糖与脂质代谢、脂肪细胞分化、炎症反应及肿瘤细胞分化与凋亡等生理和病理过程。流行病学和实验证据表明，BACE1 基因的启动子含有 PPARγ 转录因子的结合位点，而 PPARγ 的活化剂非甾体抗炎药通过抑制 BACE1 启动基因活化而降低 Aβ 的水平，潜在地降低 AD 的发病风险[10,11]。近来发现 PPARγ 的激活在活体及体外皆可减轻炎症反应，在有明显炎性过程的神经系统疾病中，如 AD 中的作用更备受关注[12]，成为伴有炎性反应的神经系统疾病的药物作用靶点。

姜黄素提取自姜科植物姜黄，具有抗氧化[13,14]，抗炎[15]及降低胆固醇的作用[16,17]，这三点皆与 AD 发病机制密切相关。近年来研究发现，姜黄素可以显著抑制 Aβ 的产生和聚集从而减轻 Aβ 的神经毒性，减少老年斑的形成，但是其机制尚不完全清楚。流行病学研究一致显示，非甾体抗炎药的使用与随后 AD 发病风险的减小有关[18]，而与非甾体抗炎药相比，姜黄素具有非甾体抗炎药的多种功能，而且几乎没有副作用，对于 AD 的治疗更优于前者，成为目前 AD 防治药物国内外关注的焦点。

在我们的研究中，将 APPswe 和 BACE1-mychis 两种质粒共转染入 SHSY5Y 细胞中，成功构建了过表达 APP 与 BACE1 基因的 AD 的细胞模型。根据之前的实验设计用姜黄素处理转染细胞后，通过 RT-PCR 和 Western blot 的检测，我们可以明显地看到 BACE1 mRNA 和蛋白的表达都随着姜黄素浓度的增加或者作用时间的延长而明显地减少($P<0.05$)；同时，我们发现姜黄素的作用与浓度有着密切关

系,当浓度为 1.25 μmol/L 时,其 mRNA 的表达水平与 0 μmol/L 的对照组相比差异没有统计学上的意义($P>0.05$);当浓度梯度达 5 μmol/L,处理时间达 12 h 时,呈明显的浓度-时间依赖性($P<0.05$),这与Lim GP[19]等的研究结果是一致的。与之相反,PPARγ mRNA 和蛋白的表达水平却呈现增加的趋势,也呈浓度-时间依赖性。我们还注意到,姜黄素处理后,经 BACE1 水解作用淀粉样酶切途径产生的终产物 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 的生成也有显著减少,也呈浓度-时间依赖性($P<0.05$)。

我们体外实验的结果表明,姜黄素可以抑制 BACE1 的表达和抑制 Aβ 的生成,从而保护神经系统,且该作用与其激活 PPARγ 密切相关。PPARγ 的活性一旦被激活,BACE1 的表达就会受到抑制,随之而来的结果就是其水解产物 Aβ 的生成显著减少。由此可见,PPARγ 的激活在抑制 AD 的发生发展中可发挥重要作用,可成为 AD 治疗的药物作用靶点。但是,由于 BACE1 基因的启动子还包括了其他可能的转录因子的结合位点,例如 NF-κB、P-1、AP-1 和 AP-2,而且 PPARγ 还可以调节不同的转录因子的活性,所以我们不能完全排除姜黄素还可能通过另外的途径调节其他的转录因子的活性从而影响 BACE1 基因启动子的活性,这也许是姜黄素抑制 Aβ 生成的另外的机制。而姜黄素又是通过何种机制调节 PPARγ 的表达,也还不清楚。这些都需要在以后的实验中进一步探索。

我们的研究结果表明姜黄素可显著抑制体外培养的神经元中 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 的产生,且该作用与其激活 PPARγ 和抑制 BACE1 密切相关。同时表明,姜黄素是一种 PPARγ 激动剂,而且 PPARγ 的激活与 APP 酶切途径密切相关,并最终抑制 Aβ 的产生。但姜黄素对 APP 酶切途径的作用的深入分子机理仍需进一步深入研究,更需要在以后的体内研究中得到进一步的证实。

参 考 文 献

[1] Golde T E, Dickson D, Hutton M. Filling the gaps in the abeta cascade hypothesis of Alzheimer's disease[J]. Curr Alzheimer Res, 2006, 3(5): 421-430.

[2] Blennow K, de Leon M J, Zetterberg H. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2006, 368(9533): 387-403.

[3] Vassar R, Bennett B D, Babu-Khan S, et al. Beta-Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE [J]. Science, 1999, 286(5440): 735-741.

[4] Hussain I, Powell D, Howlett D R, et al. Identification of a novel aspartic protease (Asp2) as beta-secretase [J]. Mol Cell Neurosci, 1999, 14(6): 419-427.

[5] Vassar R. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease [J]. J Mol Neurosci, 2004, 23(1-2): 105-114.

[6] Bodendorf U, Danner S, Fischer F, et al. Expression of human beta-secretase in the mouse brain increases the steady-state level of beta-amyloid [J]. J Neurochem, 2002, 80(5): 799-806.

[7] Luo Y, Bolon B, Kahn S, et al. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation [J]. Nat Neurosci, 2001, 4(3): 231-232.

[8] Cai H, Wang Y, McCarthy D, et al. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons [J]. Nat Neurosci, 2001, 4(3): 233-234.

[9] Fukumoto H, Rosene D L, Moss M B, et al. Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain [J]. Am J Pathol, 2004, 164(2): 719-725.

[10] Heneka M T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, et al. Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice [J]. Brain, 2005, 128(Pt 6): 1442-1453.

[11] Sastre M, Dewachter I, Rossner S, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma [J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 2006, 103(2): 443-448.

[12] Dehmer T, Heneka M T, Sastre M, et al. Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I kappa B alpha induction and block of NF kappa B and iNOS activation [J]. J Neurochem, 2004, 88(2): 494-501.

[13] Cole G M, Lim G P, Yang F, et al. Prevention of Alzheimer's disease: Omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant intervention [J]. Neurobiol Aging, 2005, 26(1): 133-136.

[14] Mancuso C, Bates T E, Butterfield D A, et al. Natural antioxidants in Alzheimer's disease[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2007, 16(12): 1921-1931.

[15] Menon V P, Sudheer A R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin [J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 595: 105-125.

[16] Kalvodova L, Kahya N, Schwille P, et al. Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro [J]. J Biol Chem, 2005, 280(44): 36815-36823.

[17] Sahlin C, Pettersson F E, Nilsson L N, et al. Docosahexaenoic acid stimulates non-amyloidogenic APP processing resulting in reduced Abeta levels in cellular models of Alzheimer's disease [J]. Eur J Neurosci, 2007, 26(4): 882-889.

[18] Andersen K, Launer L J, Ott A, et al. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk for Alzheimer's disease [J]. Neurology, 1995, 45(8): 1441-1445.

[19] Lim G P, Chu T, Yang F, et al. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse [J]. J Neuros, 2001, 21(21): 8370-8377.

(责任编辑:关蕴良)