

• 基础研究 •

β 淀粉样肽前体蛋白 N 端 328-332(APP5 肽)类似物 神经营养作用的体外实验研究

姚洁 王蓉 姬志娟 张景艳 刘梦霞 盛树力

【摘要】 目的 研究 β 淀粉样肽前体蛋白 N 端 328-332(APP5 肽)及其类似物对人神经母细胞瘤株 SY5Y 生长的影响,在体外寻找具有神经营养作用又能抵抗胃蛋白酶消化能力的 5 肽类似物。方法 合成多个 5 肽类似物,以 MTT 代谢率进行筛选,选出最佳的 5 肽类似物,以人神经母细胞瘤株 SY5Y 作为体外实验模型,以 MTT 代谢率、细胞计数,LDH 漏出率,Western blotting 检测作为观察指标,进一步证实 5 肽类似物的神经营养作用。应用胃蛋白酶对 APP5 肽和类似物 165 进行消化实验,观察两者的酶解率。结果 (1)APP5 肽及在此基础上改造的多种类似物均可使 SY5Y 细胞 MTT 代谢率增高,而类似物 165 的效果最好,40 μ mol/L 为最佳有效浓度。(2)APP5 肽及类似物 165 可使 SY5Y 细胞 MTT 代谢率增高,LDH 漏出率减少,细胞数量增加,SY5Y 细胞 P-CREB、Bcl-2 蛋白表达增加。(3)胃蛋白酶消化实验显示,胃蛋白酶浓度为 40g/L 时,APP5 肽和类似物 165 的酶解率分别为 96.4% 和 16.9%;胃蛋白酶量为 100g/L 时,APP5 肽和类似物 165 的酶解率为 99.1% 和 58.6%,两者差异非常显著。5 肽类似物 165 的抗酶解能力明显大于 APP5 肽。结论 APP5 肽及类似物 165 对 SY5Y 细胞具有神经营养作用,而 APP5 肽类似物 165 具有更强的抗胃蛋白酶消化能力。

【关键词】 淀粉样 β 蛋白前体,神经营养因子,神经母细胞瘤

The *in vitro* experimental research on neurotrophic effect of the analogs of APP 5-mer peptide

YAO Jie, WANG Rong, JI Zhijuan, et al

Neurobiochemistry, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Education Ministry
Key Laboratory for Neurodegenerative Disease, Beijing 100053, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of APP 5-mer peptide and its analogs on the growth of human neuroblastoma strain SY5Y, and to find the best analog which has not only neurotrophic effect but also the ability to resist pepsin. Methods Several analogs of APP 5-mer peptide were synthesized and the best one was picked out by MTT metabolic rate screening. The human neuroblastoma strain SY5Y was used as the *in vitro* experimental model; and cell count, MTT metabolic rate, LDH leakage rate and Western blotting were used as indicators to confirm the neurotrophic action of this analog of APP 5-mer peptide. The digesting rates of the analogs of APP 5-mer peptide and the APP 5-mer peptide were observed by the digestion test of the pepsin. Results (1)APP 5-mer peptide and several analogs of APP 5-mer peptide could increase the MTT metabolic rate of SY5Y cells. The analog 165 was the best one among the analogs and 40 μ mol/L was the optimal concentration. (2)APP 5-mer peptide and the analog 165 enhanced MTT metabolic rate, the cell count, the expression of Bcl-2 and p-CREB of SY5Y cells, and reduced the LDH leakage rate. (3)The result of the digestion test indicated that the rate of digestion of APP 5-mer peptide was 96.4% and the rate of digestion of the analog 165 was 16.9% when the concentration of pepsin was 40g/L. When the concentration of pepsin was 100g/L, the rate of digestion of APP 5-mer peptide was 99.1% and the rate of digestion of the analog 165 was 58.6%, with statistical significance between them. The analog 165 of APP 5-mer peptide had higher ability to resist pepsin digestion than APP 5-mer peptide obviously. Conclusion APP 5-mer peptide and analog 165 had neurotrophic effect on SY5Y cells and could increase the livability of human neuroblastoma cells

收稿日期:2006-10-30

基金项目:北京市自然科学基金重点项目(7031003)

作者单位:100053,北京市,首都医科大学宣武医院神经生物化学研究室,教育部神经变性病重点实验室

作者简介:姚洁,女,1970年10月生,北京市人,医学硕士,主管技师。Tel:010-63198361,E-mail:021yao@sina.com

通讯作者:盛树力,Tel:010-83716773

SY5Y. The ability of the analog 165 to resist pepsin digestion was better than that of APP 5-mer peptide.

【Key words】 amyloid beta-protein precursor; neurotrophin; neuroblastoma

老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)是中枢神经系统退行性疾病,以老年斑、神经原纤维缠结、神经元凋亡并丢失以及炎症反应为主要病理特征,而老年斑以 β -淀粉样肽(β -amyloid, A β)沉积为核心^[1]。A β 的前体蛋白(amyloid precursor protein, APP),其N端水解产物分泌型APP- α (secrete APP- α)可促进神经细胞生长,具有神经营养作用^[2],其中第319~335位肽段即APP17肽(APP 17-mer peptide)能提高动物的学习、记忆能力,促进神经元轴突生长,增加突触密度、维持突触功能和脑内神经网络的稳定性,并保护缺血、缺氧引起的神经元损伤^[3,4],防治神经元退行性变。宣武医院神经生物化学研究室对其有大量研究,但APP17肽需皮下注射使用,限制了其临床应用,故拟研究可口服的药物来扩大临床应用范围。APP17肽的活性序列为APP5肽,328~332位精氨酸-谷氨酸-精氨酸-蛋氨酸-丝氨酸(RERMS),作者通过对其结构改造,使其既保留活性成分,又可抵抗消化酶消化,便于口服。本研究目的在于通过观察APP5肽及类似物对人神经母细胞瘤株SY5Y生长的影响,在体外寻找具有神经营养作用又能抵抗胃蛋白酶消化能力的5肽类似物,为进一步的细胞损伤保护及药体内研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞株 人神经母细胞瘤SY5Y细胞株由瑞典卡罗玉林斯卡研究所 Bengt Winblad 教授和裴进京博士赠送。

1.2 药物与试剂仪器 APP5肽及类似物由本室用固相法合成,高效液相(HPLC)纯化,其纯度接近100%。分别用MEM无血清培养基配制溶液。APP5肽是APP17肽的活性序列;类似物165,163,166,266,270,273,290分别是在APP5肽的结构基础上改变一些氨基酸的种类或顺序或在氨基端或羧基端加以保护,而形成的多肽。主要试剂:噻唑蓝(MTT, 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium broide), Sigma产品。乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒,北京化工厂产品,批号021005。胃蛋白酶(Pepsin, 1:2500),批号ZLI-9012,中杉金桥公司。倒置相差显微镜,日本OLYMPUS。DYY-III 2型28A稳压稳流电泳仪,北京六一仪器厂。

1.3 细胞分组 根据实验目的不同,分组处理如下

(每组12个平行孔):第一步为5肽类似物的筛选,分别用10, 20, 40 μ mol/L 3个浓度的肽作用于SY5Y细胞,即分为对照组、APP5肽、5肽类似物165、293、270、273、163、290、266 10 μ mol/L组; 20 μ mol/L组和40 μ mol/L组。将筛选出的类似物165以不同浓度作用于SY5Y细胞,分组为:对照组(未加肽)、5肽类似物165药物组(终浓度分别为2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 μ mol/L)。第二步为5肽类似物的神经营养作用试验,分为对照组、APP5肽40 μ mol/L组、5肽类似物165 40 μ mol/L组。第三步为观察类似物165的抗酶解能力,应用胃蛋白酶40g/L、100g/L对APP5肽和类似物165进行消化实验,观察其酶解率。

1.4 实验方法^[5] MTT代谢率测定,LDH漏出率测定,细胞计数观察细胞增长情况,Western blot法,一抗P-CREB、Bcl-2(1:5000稀释)。

1.5 胃蛋白酶消化(酶解)试验 APP5肽和类似物165各1mg,分别加入0.01mol/L的盐酸50 μ l,各组分别加入2mg或5mg胃蛋白酶,配成40g/L或100g/L的胃蛋白酶浓度,对照组用0.01mol/L的盐酸50 μ l取代胃蛋白酶,各管混匀后,25 $^{\circ}$ C作用4.5h。试验后,将各管肽用高效液相分析,观察两个肽的分解情况。

1.6 统计学分析 应用SPSS11.0统计软件。采用F检验方法。胃蛋白酶消化试验结果为酶解率,采用两样本率的比较^[6]。

2 结果

2.1 APP5肽类似物的筛选 本室共合成7个APP5肽类似物:163、165、166、266、273、270、290。它们均为APP5肽结构基础上改造的5肽类似物,改造点及方法各异。利用MTT代谢率初筛,选用5肽类似物163、165、166、266、270、273、290和未改造的APP5肽进行比较实验。

2.1.1 利用MTT代谢率测定 由表1中可看出,加入肽的SY5Y细胞的MTT代谢率大都增加,和对照组相比,具统计学意义,而10 μ mol/L的5肽类似物273,20 μ mol/L的5肽类似物290组的MTT代谢率增加不明显,和对照组相比,无统计学意义。由表中数值看出3个浓度时,APP5肽及5肽类似物165处理组的MTT的OD值高于其他肽处理组,故认为APP5肽及5肽类似物165的效果最好。

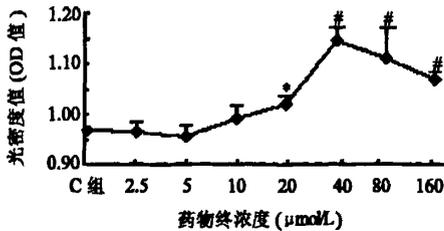
表1 APP5肽及类似物对SY5Y细胞MTT代谢率的剂量反应曲线影响(MTT OD值, $\bar{x} \pm s$)

组别	APP5肽的加药浓度($\mu\text{mol/L}$)		
	10	20	40
C组(对照组)	0.695 \pm 0.004	0.550 \pm 0.004	0.709 \pm 0.007
5肽类似物163	0.677 \pm 0.004 \downarrow *	0.665 \pm 0.006 \uparrow *	0.767 \pm 0.006 \uparrow *
5肽类似物270	0.672 \pm 0.009 \downarrow *	0.765 \pm 0.006 \uparrow *	0.818 \pm 0.004 \uparrow *
5肽类似物266	0.720 \pm 0.007 \uparrow *	0.849 \pm 0.010 \uparrow *	0.845 \pm 0.006 \uparrow *
5肽类似物273	0.695 \pm 0.003	0.887 \pm 0.008 \uparrow *	0.842 \pm 0.005 \uparrow *
5肽类似物166	0.685 \pm 0.004 \downarrow *	0.929 \pm 0.005 \uparrow *	0.930 \pm 0.004 \uparrow *
5肽类似物165	0.710 \pm 0.004 \uparrow *	0.965 \pm 0.006 \uparrow *	0.933 \pm 0.006 \uparrow *
5肽类似物290	0.721 \pm 0.005 \uparrow *	0.571 \pm 0.006 \uparrow *	0.899 \pm 0.026 \uparrow *
APP5肽	0.704 \pm 0.007 \uparrow *	0.919 \pm 0.009 \uparrow *	0.898 \pm 0.038 \uparrow *

注:和对照组相比, \uparrow OD值增加, \downarrow OD值降低;*和对照组相比, $P < 0.05$

根据以上结果,作者筛选出5肽类似物165具有较好促进神经细胞SY5Y生长的作用,并和APP5肽相比较进行以下其他实验。

2.1.2 不同浓度类似物165对SY5Y细胞的影响见(图1)20 $\mu\text{mol/L}$ 是类似物165的最小有效浓度,40 $\mu\text{mol/L}$ 达到最佳有效浓度,故选用40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度作为下一试验浓度。



注:与对照组(C组)比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$

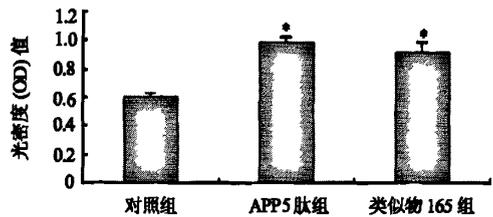
图1 APP5肽类似物165对SY5Y细胞MTT代谢率剂量反应曲线

2.2 APP5肽及类似物165对SY5Y细胞生长的影响

2.2.1 对SY5Y细胞MTT代谢率的影响 APP5肽及类似物165 40 $\mu\text{mol/L}$ 加药组OD值为0.9741 \pm 0.0047,0.9042 \pm 0.0081,而对照组OD值为0.6001 \pm 0.0019,组间比较差异有显著性($P < 0.01$),见图2。

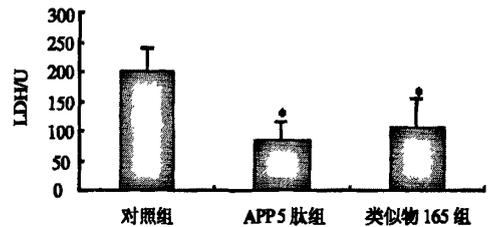
2.2.2 对SY5Y细胞LDH漏出率的影响 APP5肽及类似物165 40 $\mu\text{mol/L}$ 加药组LDH漏出率为84.9135 \pm 31.5759和106.8224 \pm 47.6852明显低于对照组199.6252 \pm 40.7273,组间比较差异有显著性意义($P < 0.01$),见图3。

2.2.3 细胞计数 结果显示,从接种第4天始,APP5肽及类似物165组细胞数增加,与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$),见表2。



注:与对照组比较,* $P < 0.01$

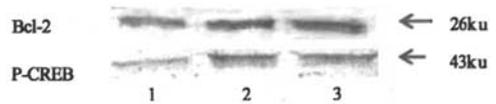
图2 APP5肽及类似物165对SY5Y细胞MTT代谢率的影响



注:与对照组比较,* $P < 0.01$

图3 APP5肽及类似物165对SY5Y细胞LDH漏出率的影响

2.2.4 Western blotting 结果显示,APP5肽及类似物165 40 $\mu\text{mol/L}$ 组P-CREB、Bcl-2表达高于对照组(图4)。



1:对照组;2:APP5原5肽40 $\mu\text{mol/L}$ 组;
3:5肽类似物165 40 $\mu\text{mol/L}$ 组;
第一抗体:(1:5000稀释)

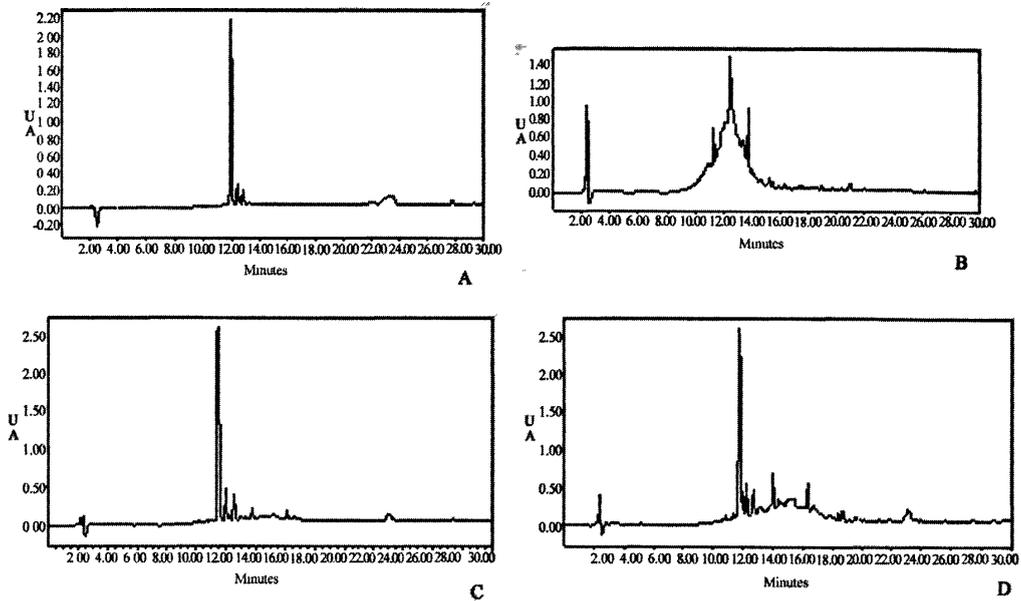
图4 APP5肽及类似物165对SY5Y细胞Bcl-2, P-CREB表达的影响

2.2.5 APP5肽及类似物165的胃蛋白酶消化(酶解)实验结果(图5,6) 测定结果显示,胃蛋白酶的

表 2 细胞计数观察 APP5 肽及类似物 165 对 SY5Y 生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

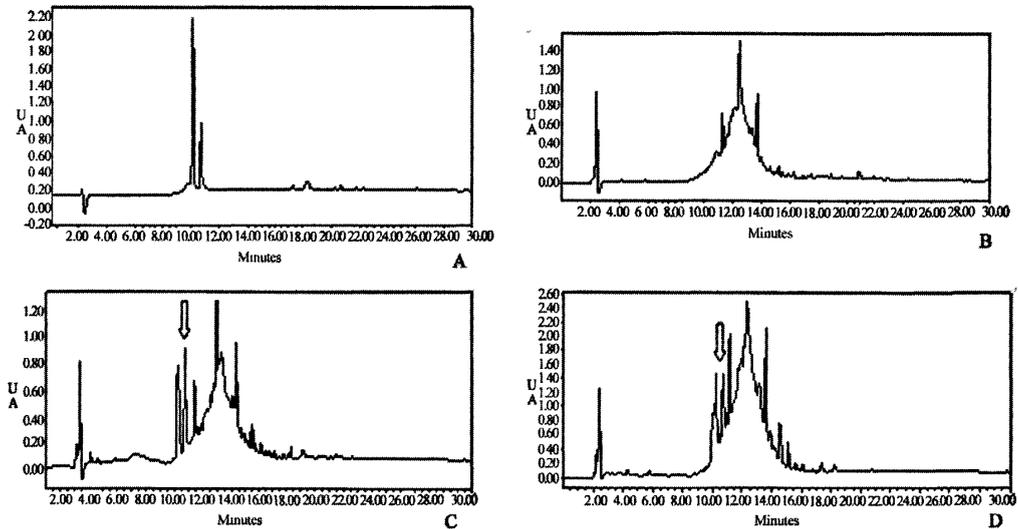
细胞数 ($\times 10^7$ /L)	n	接种时	第 4 天	第 6 天
对照组	8	1.00	1.94 \pm 0.53	12.5 \pm 4.01
APP5 肽 40 μ mol/L	8	1.00	4.01 \pm 1.97 *	25.56 \pm 4.97 #
类似物 165 40 μ mol/L	8	1.00	3.22 \pm 1.33 #	20.91 \pm 3.44 #

注:与对照组相比 * $P < 0.05$, # $P < 0.01$



注:UA;电压信号。A;5肽类似物 165 的高效液相分析;B;胃蛋白酶的高效液相分析;C;5肽类似物 165 + 40g/L 胃蛋白酶作用后的高效液相分析;D;5肽类似物 165 + 100g/L 胃蛋白酶作用后的高效液相分析

图 5 5肽类似物 165 胃蛋白酶消化作用的高效液相分析



注:UA;电压信号。A;APP5 肽的高效液相分析;B;胃蛋白酶的高效液相分析;C;APP5 肽 + 40g/L 胃蛋白酶作用后的高效液相分析;D;APP5 肽 + 100g/L 胃蛋白酶作用后的高效液相分析。↓ 所指为酶解后的 APP5 肽波峰

图 6 APP5 肽蛋白酶消化作用的高效液相分析

波峰出现在 12min 之后,APP5 肽的波峰出现时间为第 10 分钟左右,加入胃蛋白酶后,波峰明显下降,峰面积明显减小,难以找到 APP5 肽的主峰;类似物 165 的波峰出现时间接近第 12 分钟,加入胃蛋白酶后,波峰和峰面积无明显减小,主峰明显存在。在胃蛋白酶量为 40g/L 时,APP5 肽的酶解率为 96.4%,类似物 165 的酶解率为 16.9%,两者差异非常显著($P < 0.01$);在胃蛋白酶量为 100g/L 时,APP5 肽的酶解率为 99.1%,类似物 165 的酶解率为 58.6%,两者差异非常显著($P < 0.01$)。

3 讨论

APP5 肽是 APP17 肽的活性序列,而 5 肽类似物是在其活性基础上对 APP5 肽加以改造,得到的多个肽类物质。本研究显示,宣武医院神经生物化学研究室改造合成的用于实验的 APP5 肽类似物及 APP5 肽均可使 SY5Y 细胞 MTT 代谢率增加,MTT 代谢率反映线粒体的活性状态,是细胞存活的标志。说明 APP5 肽及类似物可以刺激 SY5Y 细胞线粒体活性,促进细胞生长,作用原理与 APP17 肽相同^[5]。在若干类似物中,类似物 165 和 APP5 肽的作用较相似,效果优于其他 5 肽类似物。LDH(乳酸脱氢酶)是细胞膜损伤后逸出细胞的酶;LDH 增高是细胞死亡增加的指标。APP 5 肽和类似物 165 可以降低 LDH 漏出率,提高 SY5Y 细胞生长的数量,说明它们可以减少细胞死亡,促进细胞生长,具有神经细胞营养作用。本研究中 Western blotting 的结果显示,5 肽类似物 165 和 APP 5 肽作用于 SY5Y 细胞后,P-CREB 和 Bcl-2 的表达明显增加。P-CREB 和 Bcl-2 是重要的神经细胞存活信号转导通路相关蛋白和抑制细胞凋亡蛋白^[7]。这些蛋白分子通过抑制凋亡和促进细胞的分化、再生、细胞损伤后修复等使部分细胞在应激性损伤后得以存活。实验结果提示,5 肽类似物 165 及 APP 5 肽和 APP17 肽同样具有促进细胞信号转导和抑制细胞凋亡的作用,具有明显的神经细胞保护作用。APP 5 肽类似物 165 和 APP5 肽体外实验研究提示,二者均有神经营养作用,且作用机制相同,APP 5 肽

类似物 165 未因结构改造而降低活性。酶解实验显示,无论在胃蛋白酶用量是 100g/L 还是 40g/L,APP5 肽的酶解率都远高于 5 肽类似物 165,即 5 肽类似物 165 的抗酶解作用明显高于 APP5 肽。既往的 APP17 肽实验研究未考虑口服途径给药,而本实验结果显示 APP17 肽的活性序列 APP5 肽的抗胃蛋白酶消化能力较弱,可以推测出 APP17 肽如果口服,有效成分被分解,神经营养作用将大大减弱。目前实验证实了 5 肽类似物 165 的抗胃蛋白酶消化能力,扩大了进一步临床试验的可能性。5 肽类似物 165 的抗酶解能力来源于其对 5 肽的结构修饰,保护了有神经营养作用的 5 肽肽键不被酶解。本研究的创新之处在于 APP5 肽的研究重点即是口服给药的可能。故选用 5 肽类似物 165 进行进一步的体内实验,以观察其在模型动物体内是否仍然具有抗酶解功能,神经保护作用是否依然有效。

参考文献

- [1] Jung SS, Nalbantoglu J, Cashman NR. Alzheimer's beta-amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately *ex vivo* brain cells; a flow cytometric study. *J Neurosci Res*, 1996, 46: 336-339.
- [2] Oltersdorf T, Fritz LC, Schenk DB, et al. The secreted form of the Alzheimer's precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin II. *Nature*, 1989, 341:144-147.
- [3] 赵咏梅,张人玲,王蓉,等. β -淀粉样肽前体蛋白 N 端肽段对糖尿病鼠脑凋亡相关改变的作用. *中国药理学通报*, 2005, 21:42-44.
- [4] 闵嵘,秦川,赵志炜,等. APP17 肽对 APP 转基因小鼠突触相关蛋白表达的影响. *中国药理学通报*, 2006, 22:710-714.
- [5] 王蓉,张景艳,艾厚喜,等. APP17 肽对谷氨酸引起神经毒作用的影响. *中国药理学通报*, 2000, 16:313-315.
- [6] 马斌荣,主编. *医学科研中的统计方法*. 第 2 版. 北京:科学出版社, 2001. 120-121.
- [7] 盛树力. 神经存活因子及其相关的信号转导. 见:盛树力,主编. *临床神经科学前沿*. 北京:北京大学医学出版社, 2003. 316-402.