

丝素肽对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及机制研究

尉海洋, 陈松, 徐政, 高向东, 姚文兵*

(中国药科大学生命科学与技术学院 江苏省生物药物成药性研究重点实验室, 南京 210009)

摘要 探讨丝素肽对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 所致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及其相关机制。建立 $\text{A}\beta_{25-35}$ 损伤 SH-SY5Y 细胞模型, 并以丝素肽干预。MTT 法检测丝素肽对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞损伤的干预作用; Western blot 检测丝素肽对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 致神经元 Tau 蛋白多位点过度磷酸化的影响及其作用机制; DCFH-DA 探针法检测丝素肽对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞胞内活性氧(ROS)异常升高的影响。结果表明, 丝素肽可改善 $\text{A}\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞损伤。丝素肽可通过抑制 GSK-3 β 活性、增强 PP2A 活性, 改善 $\text{A}\beta_{25-35}$ 引起的神经元 Tau 蛋白异常磷酸化水平, 提示丝素肽可通过调节 Tau 蛋白的磷酸化发挥神经保护作用。同时, 丝素肽可降低 $\text{A}\beta_{25-35}$ 引起的 SH-SY5Y 细胞内升高的 ROS 水平, 提示丝素肽还可通过调节氧化应激反应途径保护神经元。

关键词 丝素肽; 阿尔茨海默病; 神经保护活性; Tau 蛋白磷酸化; 活性氧

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)05-0609-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170517

引用本文 尉海洋, 陈松, 徐政, 等. 丝素肽对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(5): 609-613.

Cite this article as: YU Haiyang, CHEN Song, XU Zheng, et al. Protective effect of fibroin peptides on $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced injury in SH-SY5Y cells and its mechanism[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(5): 609-613.

Protective effect of fibroin peptides on $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced injury in SH-SY5Y cells and its mechanism

YU Haiyang, CHEN Song, XU Zheng, GAO Xiangdong, YAO Wenbing*

Jiangsu Key Laboratory of Druggability of Biopharmaceutical, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract This study aimed at exploring the molecular mechanism of fibroin peptide in preventing the $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced neuronal damages in SH-SY5Y cells. MTT was used to detect the effect of fibroin peptide on the changes of the $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced injuries in SH-SY5Y cells; Western blot was employed to detect the effect of fibroin peptide on the changes of the $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced hyperphosphorylation of Tau in SH-SY5Y cells; DCFH-DA probe method was used to detect the effect of fibroin peptide on the $\text{A}\beta$ -induced production of intracellular reactive oxygen species (ROS) in SH-SY5Y cells. The results indicated that fibroin peptide could improve the activity of the PP2A and inhibit the activity of GSK-3 β to decrease the hyperphosphorylation of Tau induced by $\text{A}\beta_{25-35}$. Fibroin peptide could significantly prevent the $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced neuronal damages and multisite Tau hyperphosphorylation. In addition, fibroin peptide could also reduce oxidative damage to protect neurons by significantly decreasing the $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced production of intracellular ROS.

Key words fibroin peptide; Alzheimer's disease; neuroprotective effect; Tau phosphorylation; reactive oxygen species

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81473216)

蚕丝是我国古代汉族文明的伟大发明之一。20世纪中叶,我国开始系统地开发桑蚕资源。近年来,蚕丝的应用逐渐由传统纺织业向化妆品、生物医药及医用材料等领域倾斜^[1]。丝素蛋白作为构成蚕丝的主要成分,约占蚕丝总重量的70%~80%。研究表明,丝素蛋白在生物医用材料、生物制药和医疗美容等诸多方面极具开发价值。但因相对分子质量大、结晶度高、难溶于水,丝素蛋白不易被人体吸收,生物利用度低^[2]。作为丝素蛋白的酶解产物,丝素肽(fibroin peptide, SFH)在兼具丝素蛋白的优良特性的同时,还具有相对分子质量小、易溶于水、易吸收等优点^[3]。已有报道,丝素肽具有抑制血管紧张素转化酶活性、抗肿瘤和降血糖等多种生物活性^[4-6]。

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种中枢神经系统退行性疾病,并逐渐成为威胁人类健康的重要疾病之一。已有文献表明,丝素肽具有提高学习与记忆能力的作用。Kim等^[7]利用丝素肽片段处理A_β致神经损伤动物模型,发现其可改善大鼠脑内乙酰胆碱的表达从而缓解AD的发生、发展;研究人员通过观察丝素肽对A_β损伤人神经母细胞瘤细胞的保护作用,证明丝素肽可改善神经元损伤^[8-9]。现有研究已表明丝素肽具有神经保护作用,但其分子机制尚不明确。本实验通过建立A_β₂₅₋₃₅损伤SH-SY5Y细胞模型,以丝素肽干预,对丝素肽发挥的神经保护作用及机制进行研究。

1 材 料

1.1 试 剂

丝素肽参照文献[7]制得;RPMI 1640培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);胰蛋白酶(中国Bio-sharp公司);A_β₂₅₋₃₅(美国Sigma公司);p-Tau(Thr 205)抗体、p-Tau(Ser 396)抗体、p-PP2A抗体、PP2Ac抗体(美国Santa Cruz公司);p-Tau(Thr 181)抗体、Tau(46)抗体、p-GSK-3β(Ser9)抗体、GSK-3β抗体、β-actin抗体(美国Cell Signaling Technology公司);ECL化学发光试剂、PVDF膜(德国Millipore公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒、Western及IP细胞裂解液、一抗稀释液、活性氧检测试剂盒(中国碧云天生物技术研究所);蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(德国Biovision公司);预染蛋白标准(美国Thermo公司)。

1.2 细胞株

SH-SY5Y细胞株购自美国菌种保藏中心(ATCC)。

2 方 法

2.1 细胞培养

SH-SY5Y细胞贴壁生长,采用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基、5%CO₂、37℃、饱和湿度下培养。

2.2 A_β₂₅₋₃₅寡聚体的制备

准确称取A_β₂₅₋₃₅4 mg溶于双蒸水4 mL中。无菌条件下,用0.22 μm微孔滤器过滤除菌后,置于37℃培养箱中老化4 d,取少量样品,用于蛋白浓度测定。

2.3 A_β₂₅₋₃₅致SH-SY5Y细胞损伤模型的建立

收集生长状态良好的SH-SY5Y细胞,制成细胞悬液,并调整为每毫升3×10⁴个细胞,接种于96孔板(每孔100 μL),培养24 h后,吸出上清液。在含0.2, 0.5, 1, 2, 4 μmol/L不同浓度A_β₂₅₋₃₅的培养基中孵育24、48 h。MTT法检测各实验组细胞损伤情况:每孔加入MTT溶液20 μL,37℃孵育4 h,弃去上清液,每孔加入DMSO 150 μL,充分溶解,酶标仪570 nm(参比波长630 nm)检测吸收度。

2.4 MTT法检测丝素肽对A_β₂₅₋₃₅致SH-SY5Y细胞损伤的干预作用

实验组分为正常对照组、A_β₂₅₋₃₅模型组、A_β₂₅₋₃₅+SFH(0.1 mg/mL)给药组。按“2.3”项方法接种96孔板。A_β₂₅₋₃₅模型组、A_β₂₅₋₃₅+SFH给药组加入A_β₂₅₋₃₅损伤6 h后,A_β₂₅₋₃₅+SFH给药组加入SFH,最终质量浓度为0.1 mg/mL。作用48 h,采用MTT法检测各组细胞损伤情况。

2.5 Western blot法检测丝素肽对A_β₂₅₋₃₅致SH-SY5Y细胞Tau蛋白多位点过度磷酸化的作用

实验分组及细胞培养同“2.4”和“2.1”项。细胞损伤48 h后,收集细胞总蛋白。Western blot检测各实验组p-PP2A、p-GSK-3β、总PP2A、总GSK-3β、p-Tau(Thr 205)、p-Tau(Ser 396)、p-Tau(Thr 181)、总Tau、β-actin等蛋白水平的变化。

2.6 DCFH-DA探针法测A_β₂₅₋₃₅及丝素肽对SH-SY5Y细胞胞内ROS的影响

实验分组及细胞培养同“2.4”和“2.1”项。细胞损伤48 h后,DCFH-DA探针对细胞进行标记,

流式细胞仪检测各组荧光强度。

2.7 统计学分析

数据采用GraphPad统计软件进行处理,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用One-way ANOVA检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 A₂₅₋₃₅致SH-SY5Y细胞损伤模型的建立

如图1所示,采用不同浓度的A₂₅₋₃₅与SH-SY5Y细胞共孵育24,48 h后,MTT法检测细胞活性。其结果表明,不同浓度的A₂₅₋₃₅作用于细胞后,细胞明显受损($P < 0.01$)。后续实验选用的A₂₅₋₃₅浓度为0.5 μmol/L,损伤时间为48 h。

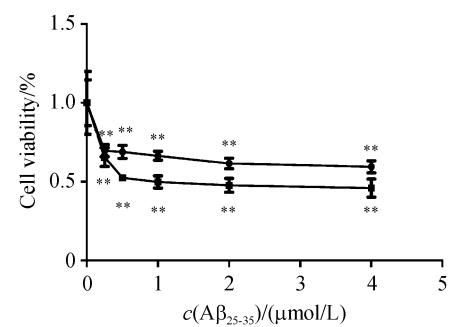
3.2 SFH对A₂₅₋₃₅致SH-SY5Y细胞损伤的干预作用

如图2所示,与空白组相比,A₂₅₋₃₅模型组细胞活性显著下降,而SFH干预后可改善A₂₅₋₃₅所致的SH-SY5Y细胞的损伤。

3.3 SFH对A₂₅₋₃₅致SH-SY5Y细胞Tau蛋白过度磷酸化水平的影响

如图3所示,SFH能显著调节A₂₅₋₃₅引起的神经细胞Tau蛋白多个位点的异常磷酸化水平($P < 0.05$),但对Tau总蛋白含量没有明显增加作用,说明SFH能够改善A₂₅₋₃₅导致的神经细胞Tau蛋白

异常磷酸化的病理改变。



—●— 24 h; —■— 48 h

Figure 1 Establishment of SH-SY5Y cell damage model induced by A₂₅₋₃₅ ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

* * $P < 0.01$ vs control group

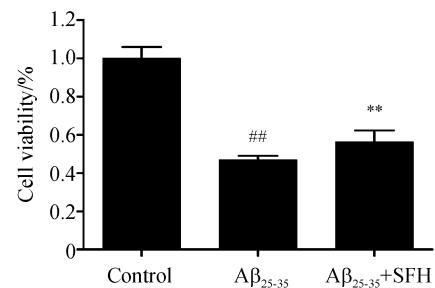


Figure 2 Neuroprotective effect of fibroin peptide (SFH) against A₂₅₋₃₅-induced toxicity. Exposure to SFH (0.1 mg/mL) for 6 h and exposure to A₂₅₋₃₅ (0.5 μmol/L) for 48 h, cell viability was increased compared with SFH untreated group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

$P < 0.01$ vs control group; * * $P < 0.01$ vs A₂₅₋₃₅ group

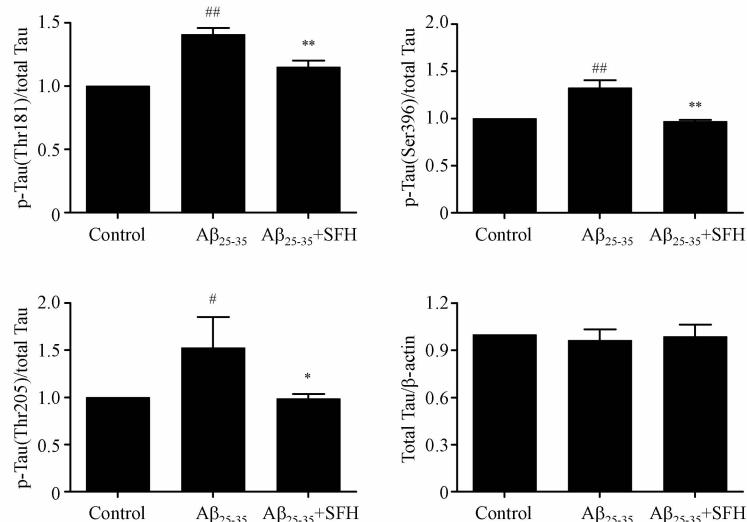
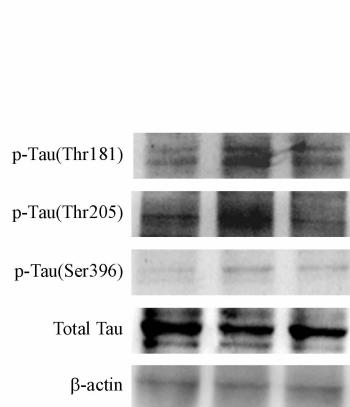


Figure 3 Effects of SFH on A₂₅₋₃₅-induced phosphorylated Tau estimated by Western blot. The p-Tau (Thr181), p-Tau (Thr205) and p-Tau (Ser396) were elevated by A₂₅₋₃₅, and were lowered by SFH -treatment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs A₂₅₋₃₅ group

3.4 SFH 对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞胞内 GSK-3 β 及 PP2A 活性的影响

各实验组 p-PP2A、p-GSK-3 β 、总 GSK-3 β 、总 PP2A 等蛋白表达变化如图 4 所示。结果表明，

$\text{A}\beta_{25-35}$ 可过度激活 GSK-3 β ，并抑制 PP2A 的活化，从而导致 Tau 蛋白的过度磷酸化。SFH 干预后可明显改善这种变化。

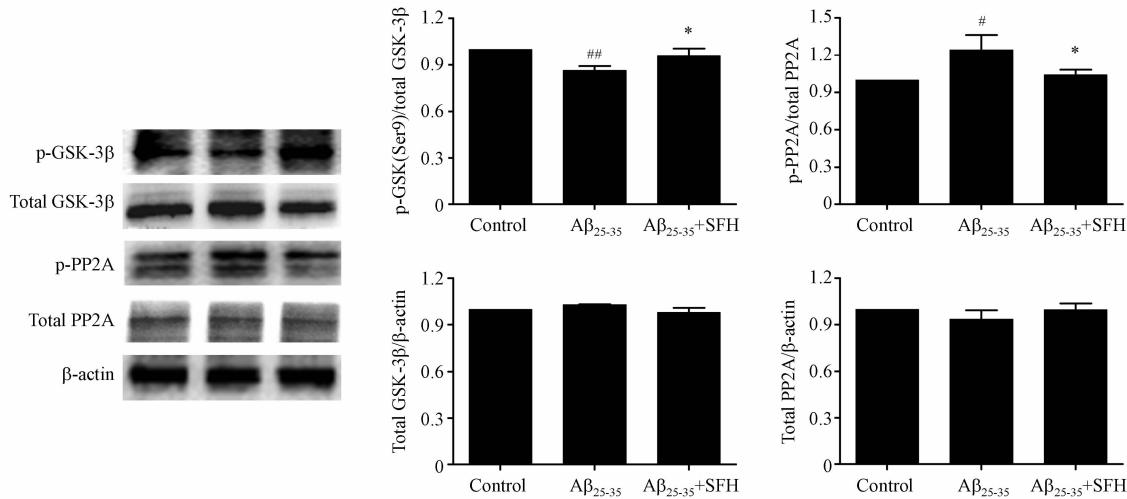


Figure 4 Effects of SFH on the activity of GSK-3 β and PP2A ($\bar{x} \pm s, n=3$)

$^*P < 0.05, ^{**}P < 0.01$ vs control group; $^*P < 0.05$ vs $\text{A}\beta_{25-35}$ group

3.5 SFH 对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 致 SH-SY5Y 细胞胞内 ROS 表达的影响

如图 5 所示, $\text{A}\beta_{25-35}$ 能够引起 SH-SY5Y 细胞胞内 ROS 显著升高, 而加入了 SFH 孵育的细胞与

$\text{A}\beta_{25-35}$ 模型组相比, 胞内 ROS 水平显著降低。实验结果表明, SFH 能够降低 $\text{A}\beta_{25-35}$ 引起的神经细胞胞内升高的 ROS 水平, 提示 SFH 能够调节氧化应激反应途径保护神经元。

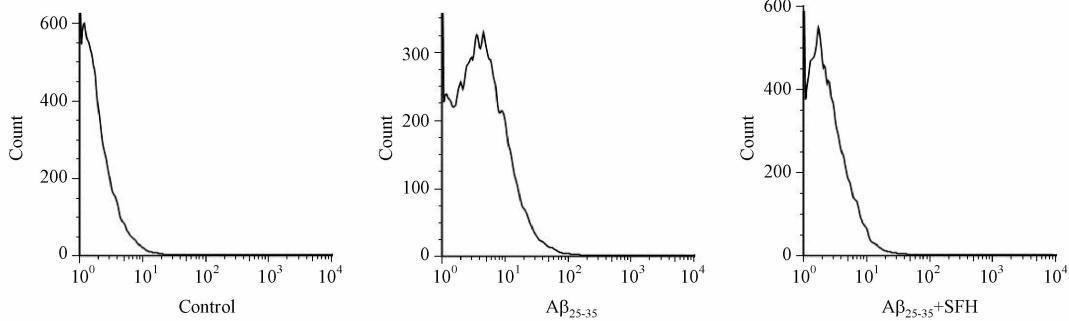


Figure 5 SFH prevents $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced ROS damage in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were exposed to DCFH-DA analyzing ROS generation by FACS method ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨 论

AD 患者脑中老年斑的主要成分为 $\text{A}\beta$ ^[10]。存在于神经元间的寡聚化 $\text{A}\beta$ 产生了一系列细胞毒性, 促进微管相关蛋白 Tau 的高度磷酸化, 异常磷酸化的 Tau 蛋白聚集则产生神经纤维缠结^[11]。本研究利用 $\text{A}\beta_{25-35}$ 建立认知障碍细胞模型, 模拟 AD 病理特征, 观察丝素肽对 Tau 蛋白磷酸化的影响。

本研究结果表明, 在对 Tau 总蛋白含量无显著影响的情况下, 丝素肽能显著下调 $\text{A}\beta_{25-35}$ 导致的神经元胞内 Tau 蛋白多位点的异常过度磷酸化。这提示丝素肽可通过下调 Tau 蛋白的过度磷酸化发挥神经保护作用。Tau 蛋白的磷酸化主要由蛋白激酶和磷酸酯酶活性的调控^[12]。当磷酸酯酶被抑制或蛋白激酶被过度激活时, Tau 蛋白发生过度磷酸化。蛋白磷酸酯酶 2A (protein phosphatase 2A,

PP2A)是调节Tau蛋白磷酸化最重要的磷酸酯酶,其活性增强能抑制Tau蛋白异常磷酸化^[13]。糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthetase kinase-3β, GSK-3β)作为调节Tau蛋白磷酸化最重要的蛋白激酶之一,其活化可促使Tau蛋白异常磷酸化,进而加速AD的发生^[14]。本研究表明,丝素肽能够通过上调PP2A活性,抑制GSK-3β的活性从而抑制Tau蛋白磷酸化水平。提示PP2A、GSK-3β是丝素肽干预Tau磷酸化水平、发挥神经保护作用的主要靶点。

氧化应激反应(oxidative stress)在AD的发生中发挥着重要作用。正常情况下,机体内的氧化系统与抗氧化系统保持相对平衡状态。机体内部代谢异常会产生大量的自由基,而这些过剩的自由基难以被抗氧化系统清除,则导致机体处于氧化应激状态^[15]。研究表明,高浓度的Aβ寡聚体与突触连接,能够迅速引起钙离子内流加快,导致大量神经元凋亡;低浓度时,能引起线粒体结构的改变,产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)。较高浓度的ROS进一步促使线粒体功能障碍,而受损的线粒体继续加剧ROS的产生,二者相互加强,循环促进。ROS的过量累积引起细胞内环境紊乱,加剧蛋白质间的异常作用,而使NFTs更易于形成,最终导致AD的发生^[16]。因此,如何有效地维持细胞内ROS稳态,恢复机体抗氧化平衡已成为AD研究的又一热点。本研究初步证明,丝素肽减少ROS的产生,降低A_β₂₅₋₃₅的细胞毒性,抵抗A_β₂₅₋₃₅造成的氧化应激反应,进而保护神经元。

参 考 文 献

- [1] Guziewicz NA, Massetti AJ, Perez-Ramirez BJ, et al. Mechanisms of monoclonal antibody stabilization and release from silk biomaterials[J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(31): 7766–7775.
- [2] Zhu Z, Wang D P, Ma Y, et al. Optimization of antioxidant silk fibroin peptide hydrolysis process[J]. *Adv Mater Res*, 2015, **1073-1076**: 1789–1792.
- [3] Yeo JH, Lee KG, Kweon HY, et al. Fractionation of a silk fibroin hydrolysate and its protective function of hydrogen peroxide toxicity[J]. *J Appl Polym Sci*, 2006, **102**(1): 772–776.
- [4] Park DS, Lee SH, Choi YJ, et al. Improving effect of silk peptides on the cognitive function of rats with aging brain facilitated by D-galactose[J]. *Biomol Ther*, 2011, **19**(2): 224–230.
- [5] Zhou F, Xue Z, Wang J. Antihypertensive effects of silk fibroin hydrolysate by alcalase and purification of an ACE inhibitory dipeptide[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, **58**(11): 6735–6740.
- [6] Kang YK, Lee W, Kang B, et al. Memory-enhancing effects of silk fibroin-derived peptides in scopolamine-treated mice[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2013, **23**(12): 1779–1784.
- [7] Kim DK, Kang YK, Lee MY, et al. Neuroprotection and enhancement of learning and memory by BF-7[J]. *J Health Sci*, 2005, **51**(3): 317–324.
- [8] Lee MY, Lee SH, Lee JS, et al. BF-7 improved memory function and protected neuron from oxidative stress[J]. *Korean J Phys Anthrop*, 2004, **17**: 313–320.
- [9] Chen S, An FM, Yin L, et al. Glucagon-like peptide-1 protects hippocampal neurons against advanced glycation end product-induced tau hyperphosphorylation[J]. *Neuroscience*, 2014, **256**: 137–146.
- [10] Miklossy J. Bacterial amyloid and DNA are important constituents of senile plaques: further evidence of the spirochetal and biofilm nature of senile plaques[J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, **53**(4): 1459–1473.
- [11] Tramutola A, Triplett JC, Di Domenico F, et al. Alteration of mTOR signaling occurs early in the progression of Alzheimer disease (AD): analysis of brain from subjects with pre-clinical AD, amnestic mild cognitive impairment and late-stage AD[J]. *J Neurochem*, 2015, **133**(5): 739–749.
- [12] Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbali I, et al. Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration[J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, **33**(s1): S123–S139.
- [13] Martin L, Latypova X, Wilson C M, et al. Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A[J]. *Ageing Res Rev*, 2013, **12**(1): 39–49.
- [14] Llorens-Maríñ M, Jurado J, Hernández F, et al. GSK-3β, a pivotal kinase in Alzheimer disease[J]. *Front Mol Neurosci*, 2014, **7**: 46.
- [15] Yu WP, Qian ZY, Xu GL, et al. Effects of crocetin on the myocardial cell damages due to oxidative stress[J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2003, **34**(5): 452–455.
- [16] Butterfield DA, Swomley AM, Sultana R. Amyloid β-peptide (1–42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, **19**(8): 823–835.