

· 基础研究 ·

离体 SH-SY5Y 细胞内酸化对早老素-1 表达的影响*

高芳峭¹, 方伯言^{2△}

(1. 辽宁医学院研究生学院, 辽宁锦州 121001; 2. 辽宁医学院附属第一医院神经内科, 辽宁锦州 121001)

摘要:目的 研究早老素-1(PS1)在细胞内 pH 值降低时的表达情况,探讨细胞内 pH 值变化对 γ -分泌酶活性的影响。方法 本研究抑制细胞表面酸碱调节基因 Na^+/H^+ 交换泵第一亚型(NHE1)的表达和酸化培养基,使细胞内 pH 值降低,构建细胞内酸化的 SH-SY5Y 细胞模型,将实验对象分为正常组、阴性对照组、NHE1 组和酸化培养基组,应用 ELISA 法及 western blotting,检测各组 PS1 的蛋白浓度及表达,分析细胞内 pH 值变化对 PS1 表达和活性的影响及其与 γ -分泌酶的关系。结果 检测胞膜离子交换蛋白 NHE1 组和酸化培养基组细胞内的 PS1 活性和蛋白表达较正常对照组和阴性对照组有显著增高($P < 0.05$),而 NHE1 组和酸化培养基组组间比较无明显差异,正常对照组和阴性对照组组间比较也无明显差异。结论 细胞内 pH 值降低可促使 PS1 表达量增加,活性增高,提示细胞内 pH 值降低可能促使 γ -分泌酶活性增高。

关键词:阿尔茨海默病; γ -分泌酶;早老素-1;细胞内 pH 值

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.12.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)12-1197-03

Effect of the intracellular acidification on presenilin-1 expression in SH-SY5Y cells*

Gao Fangqiao¹, Fang Boyan^{2△}

(1. Graduate School of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of PS1 when the pH descended in cells, and to explore the impact of variations of pH in cells on γ -secretases. **Methods** The model that acidulated in cells was constructed, and the expression and activity of PS1 was detected. The impact of variations of pH in cells on the expression and activity of PS1 was analyzed, and the relation of variations of pH in cells with γ -secretases was explored. **Results** Compared to normal control group and negative control group, the expression and activity of PS1 of Na^+/H^+ exchanger1 gene-knock-on low group and acidulated substrate group were significantly increased($P < 0.05$). There was no obvious difference between Na^+/H^+ exchanger1 gene-knock-on low group and acidulated substrate group. There was no significant difference between red to normal control group and negative control group. **Conclusion** The decrease of pH in cells can lead to the rise of expression and activity of PS1. So we can come to a conclusion that the decrease of pH in cells can result in the rise of activity of γ -secretases.

Key words: Alzheimer disease; γ -secretase; Presenilin 1; intracellular pH

阿尔茨海默病(alzheimer's disease, AD)是一种以进行性记忆力减退、认知功能障碍为特征的中枢神经系统退行性变性疾病。主要病理改变是在大脑中于记忆和认知相关区域出现 β 淀粉样蛋白($\text{amyloid protein } \beta, \text{A}\beta$)聚合产生的纤维沉积形成老年斑并引起神经受损等一系列相关的病理改变^[1]。 $\text{A}\beta$ 是由淀粉样前体蛋白($\text{amyloid precursor protein, APP}$)分别通过 β -分泌酶和 γ -分泌酶作用后生成^[2]。过去对 β -分泌酶研究的比较清楚,但对 γ -分泌酶的结构与特性却一直不甚清楚。近年来一些研究提示早老素-1(Presenilin 1, PS1)是 γ -分泌酶水解 APP 所必须的,起到重要的催化作用,甚至可以说 PS1 就是未知的 γ -分泌酶^[3-5]。AD 中神经细胞死亡是由细胞凋亡介导的,由于各种物理和化学刺激诱导的细胞凋亡都出现细胞内酸化,推断 AD 的神经细胞凋亡的同时也伴有细胞内酸化。有研究表明这些酶在酸性条件下具有较高的活性,但相关的研究和证据还比较少。酸碱调节基因-胞膜离子交换蛋白 Na^+/H^+ 交换泵(Na^+/H^+ exchanger, NHE)基因在维持细胞内环境中发挥重要作用^[7],因此作者应用 pAd-miR-NHE1 腺病毒颗粒感染 SH-SY5Y 细胞,抑制细胞表面酸碱调节基因 NHE1 的表

达^[8],使细胞内 pH 值降低,另外降低细胞培养基 pH 值,同样降低细胞内 pH 值,观察分析 PS1 在 pH 值降低的细胞内的表达,进一步了解细胞内 pH 值对 PS1 功能和活性的影响,探讨 AD 的发病机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与 miRNA 腺病毒转染 SH-SY5Y 细胞 人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞(中国医科大学赠),采用 10% 的 FBS 的高糖 DMEM 培养基(GIBCO),在 37 °C、5% CO_2 培养箱内进行培养。对腺病毒 pAd-miR-NHE1 和 pAd-miR-NC 转染细胞进行鉴定后^[8],分别转染细胞,为 NHE1 基因抑制组(NHE1 组)和阴性对照组(NC 组)。将用正常培养基常规培养的 SH-SY5Y 细胞按 10^6 细胞密度接种于培养瓶中,当达到 80%~90% 融合时按 MOI 值为 160 进行转染(细胞的感染率在 90% 左右为最佳 MOI 值),将准备好的腺病毒与无血清无抗体的培养基按一定比例混合(取 50 μL 腺病毒和 2 950 μL 无血清无抗生素的培养基),混匀,放置 37 °C、5% CO_2 培养箱内吸附 1 h 后, PBS 洗涤后改用 2% 血清双抗培养基于 37 °C、5% CO_2 培养箱内培养 24~48 h 后收集细胞。

1.2 酸化细胞外环境, 选出最适细胞生长的酸性培养基 降低细胞培养基 pH 值, 以 pH 值 6.8 为基准, 依次降低 0.5 形成 5 个梯度 pH 值的培养基, 从接种开始每 12 小时计数 1 次, 至 72 h, 共 6 个时间点。细胞系以平均 1×10^4 个细胞密度接种于在 24 孔细胞板上, 各梯度每个时间点重复 3 个孔; 接种后 12 h 开始用 0.25% 胰蛋白酶消化每个梯度的第 1 组, 制成 1 mL 细胞悬液, 进行计数, 取 3 个孔的平均值, 至 72 h 结束, 通过光镜观察细胞生长, 根据测得的数值, 绘制生长曲线, 进行培养细胞的生长曲线分析, 确定最适细胞生长的酸性培养基。

1.3 细胞内 pH 值测定 用缓冲液求标准曲线, 制作高钾缓冲液, 将高钾缓冲液分装 6 只试管中, 每只 5 mL, 分别将 pH 值调至不同的值, 分别为 4.8、5.3、5.8、6.3、6.8、7.3, 6 只试管中分别加入 Nigericine 和 BCECF, 浓度分别为 $30 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.25 \mu\text{mol/L}$, 取正常 SH-SY5Y 细胞胰酶消化, 制成单细胞悬液, PBS 洗 2 次, 分别加入相同的细胞与上述试管中, 37°C 孵育 12 min, 应用荧光分光光度计记录 490 nm/440 nm 荧光强度比值(FIR), 求出 pH 值的标准曲线。将各组细胞胰酶消化, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 生理盐水洗 1 次, BCECF/AM/DMSO 浓度为 2 mg/mL 加入培养基中, 37°C 孵育细胞 12 min, 用荧光分光光度计记录 490 nm/440 nm 荧光强度比值, 根据标准曲线求出细胞内 pH 值。

1.4 ELISA 法定量分析细胞内的 PS1 各条件下的细胞系以 2×10^6 个细胞密度接种于培养瓶中, 分别培养 48 h, 贴壁细胞用冷 PBS 洗 2 次, 用预冷的 RIPA 裂解液 50 mmol/L , 刮下细胞, 冰上裂解 30 min, 将裂解产物以 14000 r/min 离心 5 min 收集上清液, 裂解液中 PS1 的含量用 ELISA 试剂盒(RD)测量, 所有操作按试剂盒说明书进行, 每组样品做 3 个复孔。

1.5 Western Blotting 取各条件下稳定表达 PS1 的贴壁细胞用冷 PBS 洗 1 次, 加入预冷的 RIPA 裂解液, 刮下细胞, 在冰上裂解 30 min, 将裂解物离心收集上清液。蛋白 $20 \mu\text{g/孔}$ 上样于 10% SDS-PAGE, 每组样品重复两个孔, 电泳分离后, 转至 PVDF 膜上, 分别与一抗兔抗 PS1 单克隆抗体(Bioworld Technology, USA) (1:800), 兔抗 β -actin 单克隆抗体(碧云天公司) (1:500) 孵育 4°C 过夜。二抗用辣根过氧化物酶 HRP 标记的羊抗兔 Ig(碧云天公司) (1:500) 孵育 1 h, 加入适量的 BCIP/NBT(碧云天公司) 染色液显色。

1.6 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 SPSS17.0 统计软件包进行统计分析, 统计方法采用单因素方差分析, 组间比较 PS1 表达量采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 选出适合细胞生长的酸性培养基 当 pH 值为 6.3 时 SH-SY5Y 细胞很快贴壁, 接种后 24 h 内培养细胞的增殖速度不甚活跃, 大约 36 h 开始, 倒置显微镜下可以观察到贴壁细胞增殖迅速, 48~72 h 这些细胞增殖进一步扩大, 铺满瓶底, 镜下细胞呈多角形。当 pH 值为 6.8 或 5.8 时, 情况类似, 仅增殖速度稍慢, 于 72 h 后细胞数约为前者的 50%。当 pH 值为 5.3 时, 细胞却贴壁不牢, 部分悬浮, 12 h 观察细胞数减为接种时的一半, 以后细胞数量不增加或稍增加后随即停止, 形态极不规则。当 pH 值为 4.8 时, 12 h 观察镜下细胞成为圆球形悬浮细胞, 飘荡在培养液中, 大部分细胞死亡。通过观察, 适合细胞生长的酸性培养基 pH 值为 6.3。

2.2 细胞内 pH 值降低的 SH-SY5Y 细胞模型建立 根据荧光分光光度计测得的缓冲液 490 nm/440 nm 荧光强度比值,

计算出 pH 值标准曲线的直线回归方程为 $Y = 0.4641X + 4.0887$ ($r = 0.94$), 再根据各组细胞的 490 nm/440 nm 荧光强度比值在回归方程上计算出对应的细胞内 pH 值(表 1)。正常对照组细胞内 pH 值为 7.27 ± 0.02 , 而 NHE1 组和酸化培养基组细胞内 pH 值分别为 6.62 ± 0.02 和 6.99 ± 0.02 , 差异有统计学意义。NHE1 组和酸化培养基组细胞内 pH 值明显降低, 说明模型成功建立, 正常对照组和 NC 组细胞相比细胞 pH 值无明显差别。

表 1 各组细胞内 pH 值情况

| 组别 | 每次测得的细胞内 pH 值 | | | 细胞内 pH 值 ($\bar{x} \pm s$) |
|--------|---------------|------|------|---------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 正常对照组 | 7.29 | 7.26 | 7.25 | 7.27 ± 0.02 |
| NC 组 | 7.22 | 7.28 | 7.23 | 7.24 ± 0.03 |
| NHE1 组 | 6.62 | 6.60 | 6.64 | $6.62 \pm 0.02^*$ |
| 酸化培养基组 | 7.02 | 6.98 | 6.98 | $6.99 \pm 0.02^*$ |

*: $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

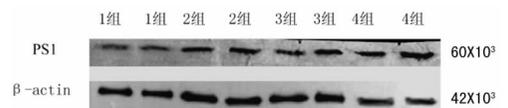
2.3 PS1 含量测定 根据标准品的浓度及对应的 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程为 $Y = 0.001X + 0.419$ ($r = 0.87$), 再根据样品的 OD 值在回归方程上计算出对应的样品浓度(表 2)。从结果中可以看出, 细胞内 PS1 的含量受细胞内 pH 值影响: 正常对照组和 NC 组胞浆内 PS1 含量表达较低, NHE1 组和酸化培养基组细胞内 PS1 含量均较正常对照组和 NC 组明显增多, 但 NHE1 组与酸化培养基组细胞内 PS1 含量变化无明显差异 ($P > 0.05$), 正常对照组与 NC 组细胞内 PS1 含量变化无明显差异 ($P > 0.05$)。此结果表明, PS1 含量与细胞内 pH 值呈依赖关系, SH-SY5Y 细胞内 pH 值降低可使胞浆内 PS1 生成量增加。

表 2 ELISA 法检测各组细胞内 PS1 蛋白浓度值

| 组别 | 每次测得的细胞内 PS1 含量 (ng/L) | | | 细胞内 PS1 含量 ($\bar{x} \pm s$) |
|--------|------------------------|------|------|-----------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 正常对照组 | 9.7 | 9.0 | 8.6 | 9.1 ± 0.6 |
| NC 组 | 7.7 | 6.7 | 8.9 | 7.8 ± 1.1 |
| NHE1 组 | 31.2 | 23.7 | 24.0 | $26.3 \pm 4.2^*$ |
| 酸化培养基组 | 27.9 | 20.0 | 22.5 | $23.5 \pm 4.0^*$ |

*: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; 与 NC 组比较。

2.4 PS1 的表达 利用抗 PS1 单克隆抗体进行 Western Blotting 检测各组细胞内 PS1 的表达, 可识别相对分子质量大约为 60×10^3 的 PS1。在所检测的 4 组中, PS1 都可显现(图 1), 前两组的条带很模糊, 可能由于蛋白含量较少的缘故, 后两组条带清晰显现。后两组细胞内 PS1 表达量与前两组细胞比较统计学分析有显著差异, 正常细胞组和 NC 组 PS1 表达量无明显差异 ($P > 0.05$), NHE1 组与酸化培养基组细胞内 PS1 表达量无明显差异 ($P > 0.05$), 结果显示与 ELISA 结果相一致。见表 3。



1 组: 正常对照组; 2 组: NC 组; 3 组: NHE1 组; 4 组: 酸化培养基组。

图 1 PS1 的 Western Blotting 检测

表 3 Western Blotting 检测各组细胞 PS1 蛋白

表达净 OD 值

| 组别 | 每孔细胞 PS1 蛋白表达净 OD 值 | | 净 OD 值 ($\bar{x} \pm s$) |
|--------|---------------------|-----------|-------------------------------|
| | 1 | 2 | |
| 正常对照组 | 0.53±0.03 | 0.55±0.02 | 0.54±0.01 |
| NC 组 | 0.51±0.01 | 0.58±0.03 | 0.55±0.05 |
| NHE1 组 | 0.69±0.05 | 0.71±0.04 | 0.70±0.01* |
| 酸化培养基组 | 0.67±0.03 | 0.68±0.04 | 0.68±0.08* |

*: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; 与 NC 组比较。

3 讨 论

随着人口老龄化,老年痴呆越来越引起人们的关注。现在虽然认识到 AD 的发病机制是由于患者体内产生过多 $A\beta$ 并在大脑中形成纤维沉积所致,但对 $A\beta$ 如何过多产生的机制还并不清楚。 β -分泌酶和 γ -分泌酶的活性异常可能是导致 $A\beta$ 增多的原因。细胞凋亡被认为与 AD 中神经元细胞退化过程中几个阶段有关,所以有些研究者认为 AD 中神经元细胞死亡是由细胞凋亡诱导的。细胞内酸化作为细胞凋亡的一个重要特征已被实验所证实,这些实验结果表明,应用各种外源性的物理和化学刺激诱导各种不同的细胞凋亡的同时都伴有出现细胞浆的酸化。也就是说 AD 的神经细胞呈细胞内酸化状态。

细胞内 pH 值是反映内环境稳定性的一项指标,它在调节细胞新陈代谢中起重要作用。体内众多的酶类同样受到最基本的化学调节—pH 值的调节,pH 值直接影响到酶的活性、表达及构象。这使作者产生一个设想,细胞内 pH 值的变化可能对 APP 裂解— γ -分泌酶的功能产生影响,即细胞内 pH 值降低使 γ -分泌酶裂解 APP 生成 $A\beta$ 的活性增高。

γ -分泌酶是一个包含早老素在内的蛋白复合体,这是 $A\beta$ 产生所必须的一个酶。PS 包括 PS1 和 PS2,PS1 广泛分布于人的脑和外周组织,PS2 则主要表达于人的心肌、骨骼肌等外周组织,对 AD 的作用不大^[9-10]。因此,在本实验中选择的指标只包括了 PS1,而不包括对 AD 作用不大的 PS2。现在有越来越多的研究显示 PS1 可能就是预期的 γ -分泌酶,体内实验发现^[11],敲除编码 PS1 基因的小鼠 γ -分泌酶的活性降低 80%, $A\beta$ 含量大大降低,PS1 和 PS2 基因双敲除的小鼠,其 γ -分泌酶活性完全被抑制,这些均表明 PS1 是 γ -分泌酶水解 APP 所必须的,因此 PS1 是 γ -分泌酶的主要组成部分,起到重要的催化作用,是 γ -分泌酶活性基团。本研究通过建立细胞内酸化的 SH-SY5Y 细胞模型,探讨 γ -分泌酶主要成分 PS1 在胞浆 pH 值降低的细胞中的表达及其活性是否增高,进而分析细胞内 pH 值变化与 γ -分泌酶活性的关系。

结果显示细胞内 pH 值降低对 PS1 的表达及活性有一定影响作用。本实验结果表明,与正常 SH-SY5Y 细胞相比,NHE1 受抑制的细胞和用酸性培养基培养的细胞的胞浆内 PS1 含量及蛋白表达均显著增高,而 NHE1 未被抑制的 NC 组细胞的胞浆内 PS1 含量及蛋白表达则无显著变化,与预期的二者之间变化关系是一致的。

从本研究看,细胞内 pH 值降低的细胞胞浆内 PS1 浓度及蛋白表达是增加的,说明 PS1 的活性在酸化细胞中是明显升

高的,据此推测,细胞内 pH 值降低使 γ -分泌酶的活性升高,在 AD 患者脑内 γ -分泌酶的活性也是如此。因为 γ -分泌酶活性升高在 AD 发生中具有关键性的作用,所以作者认为 γ -分泌酶含量和蛋白水平的升高可能是高龄人群易发 AD 的一个关键性的生物学因素。

综上所述,本实验结果进一步支持了 AD 中 γ -分泌酶的活性异常是导致 $A\beta$ 增多的原因之一。

参考文献:

- [1] Clark CM, Karlawish JH. Alzheimer disease current concepts and emerging diagnostic and therapeutic strategies [J]. *Ann Intern Med*, 2003, 138(5): 400-410.
- [2] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, 297(5580): 353-356.
- [3] Herreman A, Serneels L, Annaert W, et al. Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(7): 461-462.
- [4] Esler WP, Kinberly WT, Ostaszewi BL, et al. Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 2(7): 428-434.
- [5] 梁平, 潘阳杏, 赵雪梅, 等. 早老素 1 基因在转染 CHO 细胞中的表达及其与 γ -分泌酶的关系 [J]. *中华病理学杂志*, 2005, 34(5): 297-301.
- [6] Li YM, Xu M, Lai MT, et al. Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1 [J]. *Nature*, 2000, 405(6787): 689-694.
- [7] 李华, 严虹, 潘金顺. 金雀异黄素抑制氧化钴诱导的人视网膜色素上皮细胞低氧诱导因子 1 α 表达的研究 [J]. *医学研究生学报*, 2004, 17(11): 973-979.
- [8] 黄美凤, 方伯言. 人 NHE-1 基因 miRNA 干扰载体构建、鉴定及干扰效应评价 [J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20(18): 2721-2724.
- [9] Cacabelos R, Fernandez-Novoa L, Lombardi V, et al. Molecular genetics of Alzheimer's disease and aging [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2005, 27(Suppl A): 1-573.
- [10] Panegyres PK, Toufexis K. Presenilin immunoreactivity in Alzheimer's disease [J]. *Eur J Neurol*, 2005, 12(9): 700-706.
- [11] Herreman A, Serneels L, Annaert W, et al. Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(7): 461-462.

(收稿日期: 2011-12-05 修回日期: 2012-01-04)