

- 7 崔 篙,刘学锋,吴 斌. NF- κ B 在肿瘤中的研究进展 (J). 现代肿瘤学 2009; 17(1): 134-7.
- 8 王少雄,王少元. 核因子 κ B 与恶性血液病 [J]. 国际内科学杂志, 2007; 34(8): 489-92.
- 9 Bolignano D, Donato V, Coppolino G *et al*. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage (J). Am J Kidney Dis 2008; 52(3): 595-605.
- 10 Michael K, Yumi Y, Wang QM. The IKK NF- κ B system: a treasure trove for drug development (J). Nat Rev Drug Discov 2004; 3(1): 17-26.
- 11 杨 怡,章恩明,郑筱祥. 淀粉样蛋白诱导神经元坏死和凋亡中的诱导型一氧化氮合酶和 NF- κ B 信号通路 (J). 中华神经医学杂志, 2005; 4(3): 29521-3.
- 12 Capiralla H, Vingtdoux V, Zhao H, *et al*. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and $A\beta$ -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- κ B/STAT signaling cascade (J). J Neurochem, 2012; 120(3): 461-72.

(2012-04-19 收稿 2012-12-12 修回)

(编辑 曹梦园)

$A\beta_{1-42}$ 寡聚体与纤维体的制备及鉴定

杨 帆 李东风¹ 徐书雯¹ (南方医科大学研究生院, 广东 广州 510080)

【摘要】 目的 探讨 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体和纤维体的制备及其鉴定方法, 进而比较两者的细胞毒性。方法 设定不同的环境条件将 $A\beta_{1-42}$ 单体分别聚集成寡聚体和纤维体两种状态, 利用原子力显微镜观察 $A\beta_{1-42}$ 的不同聚集状态。CCK-8 法比较 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体与纤维体对 BV-2 细胞存活率的影响。结果 原子力显微镜下观察 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体呈球状或椭圆球状颗粒, 高度为 5 nm 左右, $A\beta_{1-42}$ 纤维体在镜下呈现长条纤维状聚集, 高度约为 3 nm 左右, 长度 > 1 000 nm。CCK-8 法显示 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体和纤维体均对 BV-2 细胞具有损伤作用, 并成剂量-效应关系。在同一浓度水平条件下, $A\beta_{1-42}$ 寡聚体组的 BV-2 细胞存活率显著低于纤维体组 (P 值 < 0.05)。结论 原子力显微镜可直观地观察到 $A\beta_{1-42}$ 的不同聚集状态, $A\beta_{1-42}$ 寡聚体比纤维体更具细胞毒性。

【关键词】 阿尔茨海默病; β -淀粉样蛋白; 原子力显微镜

【中图分类号】 R749 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9202(2013)09-2076-03; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2013.09.040

β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 毒性学说是阿尔茨海默病 (AD) 发病的主流学说^[1,2]。大量的 $A\beta$ 沉积形成老年斑是 AD 最具特征性的病理改变^[3]。已知在 AD 老年斑周围聚集活化的小胶质细胞, $A\beta$ 可促进小胶质细胞产生如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 等炎症因子^[4,5] 从而对神经元在内的各种细胞造成损伤甚至凋亡。 $A\beta$ 以寡聚体或纤维体两种状态存在, 这两种状态的 $A\beta$ 对神经细胞功能损伤的强度不同^[6]。一般认为, $A\beta$ 寡聚体的毒性较纤维体更强, 因此, 近年来关于 AD 发病机制的研究一般以寡聚体刺激造模为主。但由于寡聚体的稳定性较差, 易向纤维体转化^[7], 体外研究操作时间窗相对较短, 所以使用寡聚体进行实验之前, 对其进行鉴定就显得尤为重要, 但目前关于 $A\beta$ 聚集状态的鉴定方法报道较少。为此, 本实验先制备不同聚集状态的 $A\beta_{1-42}$, 然后鉴定两种 $A\beta_{1-42}$ 形态, 进一步证实 $A\beta_{1-42}$ 聚集形态与神经毒性作用的关系。

1 材料与方 法

1.1 材料 小鼠小胶质细胞株 (BV2) 购自武汉大学的中国典型培养物保藏中心, DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司,

$A\beta_{1-42}$ 购自 ENZO 公司, 肿瘤收缩素-8 (CCK-8) 试剂盒购自日本同仁公司, 原子力显微镜 (AFM, 本原纳米仪器公司, 型号 CSPM5500)。

1.2 方 法

1.2.1 BV-2 细胞培养 将 BV-2 细胞株接种到含 10% 胎牛血清、高糖 DMEM 培养基中培养, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中孵育, 每 3 d 传代一次, 用 0.25% 胰酶 + 0.02% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 消化。

1.2.2 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体和纤维体的制备 将 1 mg $A\beta_{1-42}$ 粉末溶于冷却的六氟异丙醇 (HFIP) 220 μ l 中, 室温孵育 60 min 使 $A\beta_{1-42}$ 充分溶解, 将 $A\beta$ 肽-HFIP 放置在冰上 5 ~ 10 min 后移至通风橱内, 打开瓶盖以便 HFIP 挥发。风干后形成透明的 $A\beta$ 肽膜, 溶解于 44 μ l 新鲜无水 100% 二甲基亚砜 (DMSO), 制成 5 mmol/L $A\beta_{1-42}$ 合成肽。

(1) 寡聚体制备: 用无酚红的 F12 培养液将 5 mmol/L $A\beta_{1-42}$ 合成肽稀释成终浓度 50 nmol/L, 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后, 以 4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即为 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体, 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

(2) 纤维体制备: 将 5 mmol/L $A\beta_{1-42}$ 合成肽溶于 10 mmol/L HCl, 并稀释成终浓度 50 nmol/L, 然后放置在 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 24 h 即为纤维体, 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.2.3 AFM 鉴定 将 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体和纤维体成品分别滴于新鲜解离的云母片上, 室温下静置 5 min 后用去离子水轻柔冲洗, 干燥皿中干燥 10 min。将制备好的 $A\beta_{1-42}$ 样品在 AFM 下观察, 先用接触模式扫描到云母片上的生物制品, 再改用轻

基金项目: 广州市科技计划项目基金 (No. 2010Y1-C101)

¹ 广东省人民医院

通讯作者: 徐书雯 (1962-), 女, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事老年性痴呆研究。

第一作者: 杨 帆 (1981-), 女, 主治医师, 在读硕士, 主要从事老年性痴呆研究。

敲模式进行扫描。轻敲模式参数:力常数 40 N/m,共振频率 300 kHz,扫描频率 1 Hz。图像处理软件为 Imager 4.60。

1.2.4 CCK-8 细胞存活率测定 在 96 孔板上以每孔 10 000 个小胶质细胞种板,加入无血清 DMEM/F12 高糖培养基培养 24 h,然后加入不同浓度 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体和纤维体,共同作用 24 h 后吸除上清液,每孔加入 180 μ l 培养基 L + 20 μ l CCK-8 试剂避光共同孵育,待 2 h 后通过酶标仪测定 450 nm OD 值。重复 3 次。

1.3 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 BV-2 小胶质细胞形态 细胞呈两种形态:一种为圆形或椭圆形、折光性强的小细胞,是处于一定活化状态的小胶质细胞;另一种呈不规则胞体,且有细长突起,是处于静息状态的小胶质细胞。见图 1。

2.2 AFM 鉴定 $A\beta_{1-42}$ 的不同聚集状态 AFM 下不同聚集状态 $A\beta_{1-42}$ 的形态有差别。 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体呈球状或椭圆球状颗粒,高度为 5 nm 左右;而 $A\beta_{1-42}$ 纤维体在镜下呈现长条纤维状聚集,高度约为 3 nm 左右,长度 >1 000 nm。见图 2。

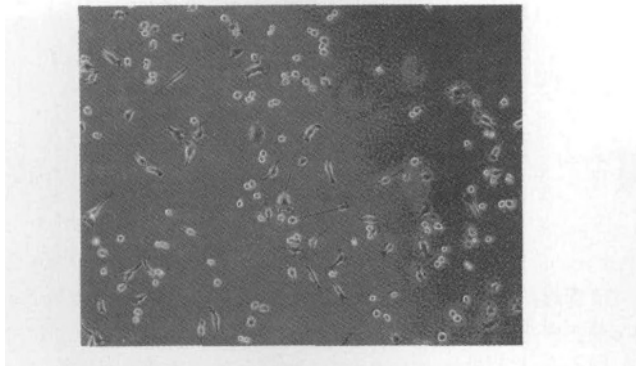


图 1 BV-2 细胞形态($\times 400$)

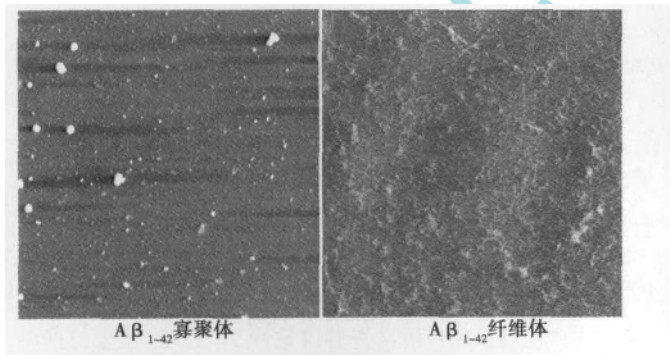


图 2 AFM 鉴定 $A\beta_{1-42}$ 的聚集状态

2.3 CCK-8 法比较不同聚集状态 $A\beta_{1-42}$ 对 BV-2 细胞存活率的影响 无论纤维体还是寡聚体, $A\beta_{1-42}$ 对 BV-2 细胞均有损伤作用,并且呈剂量-效应关系。同时,在同样浓度水平的条件下,自 0.1 μ mol/L 浓度起,寡聚体的毒性作用均比纤维体更显著($P < 0.05$)。见图 3。

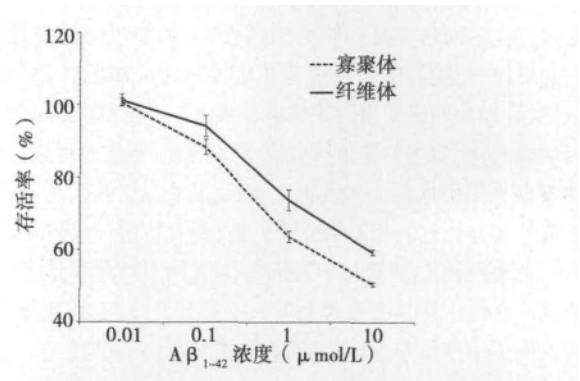


图 3 不同聚集状态 $A\beta_{1-42}$ 对 BV-2 细胞存活率的影响

3 讨论

AD 的发病机制迄今未完全清楚,而 $A\beta$ 毒性学说最受关注。 $A\beta$ 是由淀粉样前体蛋白水解所产生的多肽,有两种主要存在形式: $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$,共存于老年斑中。在正常情况下, $A\beta$ 的产生和降解过程保持平衡,但在 AD 患者脑中,这种平衡状态受到破坏,导致 $A\beta$ 的异常聚集沉积形成老年斑⁽⁸⁾。 $A\beta_{1-42}$ 毒性较 $A\beta_{1-40}$ 强,更易发生聚集沉积形成老年斑。

研究发现 $A\beta_{1-42}$ 的聚集状态与其神经毒性关系密切, $A\beta_{1-42}$ 形成可溶性寡聚体时的神经毒性强于其他不可溶性 $A\beta$ 物质⁽⁹⁾。

AFM 是一种用来研究固体材料表面结构的显微镜,其横向分辨率为 23 nm,纵向分辨率为 0.5 nm。AFM 通过检测待测样品表面和一个微型力敏感元件(探针)之间的极微弱的原子间相互作用力来研究物质的表面结构及性质,可以纳米级分辨率获得直观的物体表面结构信息。AFM 已成为研究生物医学样品和生物大分子的重要工具之一。近年来,AFM 越来越多地被应用于核酸、多肽、蛋白质、微生物和细胞等方面研究。目前常用于鉴定 $A\beta_{1-42}$ 聚集状态的方法包括有硫磺素 T(ThT) 荧光光谱分析、电子显微镜等⁽¹⁰⁾。AFM 在分辨率方面较电子显微镜更具优势,原子力分辨率最高达到原子级 0.1 nm,而扫描电子显微镜达到 6~10 nm,且 AFM 成像可得到三维立体的图像,其样本制作要求比较简单,对环境要求也低。AFM 可以在自然状态(空气或者液体)下对生物医学样品直接进行成像。基于 AFM 的显著优点,本研究尝试应用该手段对 $A\beta_{1-42}$ 的聚集状态进行鉴定。

AFM 的扫描模式可分为非接触模式、接触模式和轻敲模式,因 $A\beta_{1-42}$ 为非常柔嫩、易变形的样品,故在本研究中,工作模式先选用接触模式在云母片上扫描到样品后再改用轻敲模式周期性地短暂地接触样品表面进行成像扫描,将对 $A\beta_{1-42}$ 形态改变的影响降至最小,最大程度呈现 $A\beta_{1-42}$ 的表面结构。在制备 $A\beta_{1-42}$ 聚集状态的过程中观察到: $A\beta_{1-42}$ 单体溶于 DMSO 后,先形成合成肽,经过 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后形成寡聚体,但随着孵育时间延长至超过 48 h 后,寡聚体状态渐聚集成纤维体状态,寡聚体在常温状态不稳定,需放置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。因为 BV-2 细胞表面有其他蛋白质存在,所以 AFM 无法在 BV-2 细胞表面直接观察到 $A\beta$ 的状态。

$A\beta_{1-42}$ 的神经毒性作用非常复杂,可通过多条途径对神经细胞造成不同程度及不同类型的损害,例如可通过氧化应激、炎症反应、干扰胆碱能系统等作用促进神经细胞的凋亡,造成记忆、认知功能的损害。本实验证实 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体比纤维体更具细胞毒性,与先前报道一致^[11,12]。然而,本实验所证实的 $A\beta$ 细胞毒性作用是基于体外研究结果,其在 AD 颅脑内对小胶质细胞的实际作用过程是否完全一致,尚有待进一步研究。

总之, $A\beta_{1-42}$ 寡聚体以及纤维体两种不同聚集形态对神经细胞的毒性作用具有显著差异。本研究介绍的 AFM 鉴定则为此提供了一种简单、直观又准确的手段。

4 参考文献

- 1 Teich AF, Arancio O. Is the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease therapeutically relevant (J)? *Biochem J* 2012; 446(2): 165-77.
- 2 陈祥, 钟翎. 阿尔茨海默病中 β 淀粉样蛋白神经毒性作用研究进展 (J). *中国神经精神疾病杂志* 2008; 34(5): 315-7.
- 3 刘元华, 茜, 雷洪涛, 等. 老年斑 β 淀粉样蛋白的清除机制 (J). *现代生物医学进展* 2008; 8(1): 152-4.
- 4 Mrak RE. Microglia in Alzheimer brain: a neuropathological perspective (J). *Int Alzheimer's Dis* 2012; 2012: 165021.
- 5 廖媛, 官志忠. 阿尔茨海默病发病机制中炎症反应的研究进展 (J). *中国老年学杂志* 2011; 31(2): 351-4.

- 6 Ladiwala AR, Litt J, Kane RS *et al.* Conformational differences between two amyloid β oligomers of similar size and dissimilar toxicity (J). *J Biol Chem* 2012; 287(29): 24765-73.
- 7 Lee J, Culyba EK, Powers ET *et al.* Amyloid- β forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers (J). *Nat Chem Biol* 2011; 7(9): 602-9.
- 8 Alvira-Botero X, Carro EM. Clearance of amyloid- β peptide across the choroid plexus in Alzheimer's disease (J). *Curr Aging Sci* 2010; 3(3): 219-29.
- 9 Kokubo H, Kaye R, Glabe CG *et al.* Soluble Abeta oligomers ultrastructurally localize to cell processes and might be related to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease brain (J). *Brain Res* 2005; 1031(2): 222-8.
- 10 Bruggink KA, Müller M, Kuiperij HB *et al.* Methods for analysis of amyloid- β aggregates (J). *J Alzheimer's Dis* 2012; 28(4): 735-58.
- 11 Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB *et al.* Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentially affect neuronal viability (J). *J Biol Chem* 2002; 277(35): 32046-53.
- 12 王建秀, 王德生, 段淑荣. $A\beta_{42}$ 与 $A\beta_{42}$ 寡聚体的生物学性质比较研究 (J). *中国现代医学杂志* 2009; 19(17): 2577-80.

(2012-12-03 收稿 2012-12-28 修回)

(编辑 袁左鸣)

低剂量雷帕霉素对糖尿病肾病大鼠 nephrin 表达的影响

邹琦 郑祥雄 (福建医科大学协和临床医学院肾内科, 福建 福州 350001)

摘要 目的 探讨低剂量雷帕霉素对糖尿病肾病大鼠足细胞超微结构及 nephrin 表达的影响。方法 将 22 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组 (C 组 $n=7$)、糖尿病组 (D 组 $n=7$)、雷帕霉素治疗组 (R 组 $n=8$)。造模后第 5 周起 R 组大鼠给予雷帕霉素 1 mg/kg/d 灌胃, C 组和 D 组给予等体积的羧甲基纤维素溶液灌胃。12 w 末, 观察各组大鼠血糖、24 h 尿蛋白量、体重校正的内生肌酐清除率 (Ccr), 以及透射电镜观察足细胞的超微结构; 并通过免疫组化、RT-PCR 检测 nephrin 的蛋白及其 mRNA 的表达。结果 至 12 w 末, 与 C 组相比, D 组大鼠血糖、Ccr、24 h 尿蛋白量增加 ($P < 0.01$), nephrin 蛋白及其 mRNA 表达下调 ($P < 0.01$); R 组 Ccr 及 24 h 尿蛋白量较 D 组降低 ($P < 0.01$), nephrin 蛋白及其 mRNA 表达增加 ($P < 0.01$)。结论 低剂量雷帕霉素可能通过上调 nephrin 表达改善足细胞超微结构, 从而延缓糖尿病肾病的进展。

关键词 糖尿病肾病; 雷帕霉素; nephrin

(中图分类号) R587.2 (文献标识码) A (文章编号) 1005-9202(2013)09-2078-03; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2013.09.041

糖尿病肾病是糖尿病的主要微血管并发症之一,是以早期发生蛋白尿,随后逐渐出现肾小球滤过率下降,并伴有肾小球硬化为特征。肾小球滤过屏障功能障碍可导致蛋白尿的发生。然而目前对于糖尿病肾病蛋白尿的发病机制尚未完全阐明。越来越多的证据表明足细胞对于肾小球滤过屏障选择渗透性的改变起到重要的作用,随着对足细胞研究的深入,也逐渐认识到足细胞在糖尿病肾病发病中的重要作用。本研究通过建立糖尿病肾病模型,观察低剂量雷帕霉素对大鼠肾脏病理改

变,以及足细胞特异的蛋白分子 nephrin 表达的影响,探讨低剂量雷帕霉素能否通过维持足细胞结构完整而发挥对早期糖尿病肾病的肾脏保护作用。

1 材料与方

1.1 实验动物 选择清洁级健康雄性 SD 大鼠 (由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供), 体重 200 ~ 250 g, 生长良好, 大鼠放置在通风良好, 18 ~ 22°C 恒温环境中分笼饲养 (每笼 3 只), 提供 12 h 交替照明, 给予标准饲料及饮用水。将大鼠分为正常对照组 (C 组 $n=7$)、糖尿病组 (D 组 $n=7$)、雷帕霉素治疗组 (R 组 $n=8$)。

1.2 主要试剂 兔抗大鼠 nephrin (SANTA CRUZ, 美国), 通用型二步法检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司),

通讯作者: 郑祥雄 (1956-), 男, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事自身免疫病学研究。

第一作者: 邹琦 (1981-), 女, 硕士, 住院医师, 主要从事自身免疫病学研究。