

原花青素抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 分泌 $A\beta_{1-42}$

李 琪^{1,2}, 张小强^{1,2*}, 陶一凡^{1,2}, 朱孟雯^{1,2}, 崔丹丹^{1,2}, 孙腾腾^{1,2}

(东南大学 1. 公共卫生学院; 2. 环境医学工程教育部重点实验室, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 研究原花青素(PC)对 β -淀粉样肽($A\beta_{25-35}$)诱导的人神经母细胞瘤细胞系(SH-SY5Y)淀粉样肽产生的影响及可能的作用机制。方法 以 $A\beta_{25-35}$ 体外处理 SH-SY5Y 细胞诱导细胞损伤模型,应用 PC 和(或)Wnt/ β -catenin 信号通路的内源性抑制剂分泌型蛋白 Dickkopf-1(Dkk1)干预。设立对照组、 $A\beta_{25-35}$ 组、不同浓度 PC+ $A\beta_{25-35}$ 组、Dkk1 组和 Dkk1+PC+ $A\beta_{25-35}$ 组。MTT 法检测细胞活力;Western blot 检测 β -catenin、GSK-3 β 和 p-GSK-3 β 蛋白表达水平;ELISA 检测 $A\beta_{1-42}$ 分泌水平。结果 与对照组相比, $A\beta_{25-35}$ 可使细胞活力降低($P<0.05$),可降低细胞中 β -catenin 蛋白和 p-GSK-3 β 蛋白表达水平($P<0.05$),增加细胞中 $A\beta_{1-42}$ 分泌($P<0.05$)。PC 干预可改善 $A\beta_{25-35}$ 导致的细胞活力降低($P<0.05$),增加细胞中 β -catenin 蛋白和 p-GSK-3 β 蛋白表达水平($P<0.05$),减少 $A\beta_{1-42}$ 分泌($P<0.05$)。应用 Dkk1 后,PC 提高细胞中 β -catenin 蛋白和 p-GSK-3 β 蛋白表达水平及降低 $A\beta_{1-42}$ 分泌水平的能力下降($P<0.05$)。结论 PC 可抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 $A\beta_{1-42}$ 生成,该作用可能与 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

关键词: 原花青素; $A\beta_{1-42}$;Wnt/ β -catenin

中图分类号:R749.16 文献标志码:A

Proanthocyanidins inhibit the secretion of $A\beta_{1-42}$ induced by $A\beta_{25-35}$ in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y

LI Qi^{1,2}, ZHANG Xiao-qiang^{1,2*}, TAO Yi-fan^{1,2}, ZHU Meng-wen^{1,2}, CUI Dan-dan^{1,2}, SUN Teng-teng^{1,2}

(1. School of Public Health; 2. Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering of Ministry of Education, Southeast University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of proanthocyanidins (PC) induced by amyloid-beta peptide ($A\beta_{25-35}$) in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y and its possible mechanism. **Methods** SH-SY5Y cells were exposed to $A\beta_{25-35}$ to establish a cell injury model *in vitro*. PC and(or) secretory protein Dickkopf-1 (Dkk1), the endogenous inhibitor of Wnt/ β -catenin signaling pathway were used for intervention. The cells were divided into control group, $A\beta_{25-35}$ group, PC(different concentrations)+ $A\beta_{25-35}$ groups, Dkk1 group, Dkk1+ PC+ $A\beta_{25-35}$ group. The cell viability was evaluated by MTT assay. The expressions of β -catenin, GSK-3 β , p-GSK-3 β were measured by Western blot. The secreted $A\beta_{1-42}$ was detected by ELISA. **Results** Compared with the control group, the cell viability, the expression of β -catenin and p-GSK-3 β were reduced in $A\beta_{25-35}$ treated group($P<0.05$), while the secreted $A\beta_{1-42}$ was increased ($P<0.05$). PC improved the cell viability, increased the expression of β -catenin and

收稿日期:2020-12-09 修回日期:2021-03-20

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助和江苏省普通高校研究生科研创新计划资助项目(SJZZ16_0034)

* 通信作者 (corresponding author): zhangxq7843@126.com

p-GSK-3 β , and reduced the secreted $\text{A}\beta_{1-42}$ in SH-SY5Y cells induced by $\text{A}\beta_{25-35}$ ($P < 0.05$). After using Dkk1, the ability of PC was decreased on the enhancement of β -catenin expression, the improvement of p-GSK-3 β expression, and the reduction of the secreted $\text{A}\beta_{1-42}$ ($P < 0.05$). **Conclusions** PC may decrease $\text{A}\beta_{1-42}$ secretion in SH-SY5Y cells induced by $\text{A}\beta_{25-35}$ through Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: proanthocyanidins; $\text{A}\beta_{1-42}$; Wnt/ β -catenin

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以细胞外 β 淀粉样斑块沉积、细胞内神经原纤维缠绕形成以及神经细胞死亡为病理特征的神经退行性疾病^[1]。阿尔茨海默病患者人数的急剧上升给经济带来巨大负担, 预防和控制阿尔茨海默病有重要意义。

Wnt 信号通路对细胞增殖、分化、凋亡及细胞极性、肿瘤细胞的迁移和侵袭都有影响, 经典 Wnt 信号通路在维持神经系统和神经元发育中起着重要作用^[2-4]。大量研究显示 Wnt/ β -catenin 信号通路的失调在 AD 多种病因中发挥作用^[5-6]。

原花青素 (proanthocyanidins, PC) 是一种具有抗炎、抗氧化, 能够减缓衰老的多酚类物质, 对神经损伤有显著的保护作用^[1, 7-8]。关于 PC 对神经系统疾病保护作用的机制尚未完全阐明。本研究以 β 淀粉样肽 (amyloid- β peptide, $\text{A}\beta$) $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞, 探究 PC 对糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)、 β -连接蛋白 (β -catenin) 以及 $\text{A}\beta_{1-42}$ 表达水平的影响, 并观察应用 Wnt/ β -catenin 信号通路内源性阻断剂 Dickkopf-1 (Dkk1) 后各指标的变化情况, 旨在为拓展 PC 应用领域, 预防阿尔茨海默病提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系: 人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y (中国典型培养物保藏中心)。

1.1.2 药品及主要试剂: 原花青素 (纯度 > 95%) (上海阿拉丁生化科技有限公司); $\text{A}\beta_{25-35}$ (纯度 > 99%) (ApexBio 公司); 重组人 Dkk1 (Peprotech 公司); DMEM 高糖培养基 (Hyclone 公司); 胎牛血清 (ClarkBio 公司); MTT 试剂 (Sigma-Aldrich 公司); BCA 蛋白浓度试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 人淀粉样肽 ($\text{A}\beta_{1-42}$) ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); β -catenin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β

抗体和二抗 m-IgG κ BP-HRP (Santa Cruz 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养及分组处理: 将 SH-SY5Y 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素与链霉素的 DMEM 完全培养基中, 置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育, 当细胞汇合度达到 80%~90% 时进行传代。分为空白组、对照组、 $\text{A}\beta_{25-35}$ 组 (1、5、15、20、25 $\mu\text{mol/L}$)、原花青素组 (0.1、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 $\mu\text{g/mL}$)、原花青素 (1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 $\mu\text{g/mL}$) + $\text{A}\beta_{25-35}$ (15.0 $\mu\text{mol/L}$) 组、Dkk1 (100 ng/mL) 组和 Dkk1 (100.0 ng/mL) + 原花青素 (7.5 $\mu\text{g/mL}$) + $\text{A}\beta_{25-35}$ (15.0 $\mu\text{mol/L}$) 组。

1.2.2 MTT 法检测细胞活力: 将 SH-SY5Y 细胞以 1×10^4 个/mL 的浓度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL 。测定原花青素对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 染毒的 SH-SY5Y 细胞活力的影响时, 原花青素干预组加入含 $\text{A}\beta_{25-35}$ 培养液预处理 2 h, 更换含原花青素培养液继续培养 24 h。MTT 法检测细胞活力。用酶标仪在波长 492 nm 处测定吸光度 (A 值), 计算各组细胞活力。

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{A(492)\text{实验组} - A(492)\text{空白组}}{A(492)\text{对照组} - A(492)\text{空白组}} \times 100\%$$

1.2.3 Western blot 检测相关蛋白表达: 将 SH-SY5Y 细胞以 1×10^4 个/mL 的浓度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL。Dkk1 提前 1 h 加入, 其他干预液添加同 1.2.2。用添加蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液提取蛋白, 冰浴操作, BCA 法定量蛋白浓度。取适量蛋白进行凝胶电泳分离、转膜、封闭, 分别以 β -catenin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜后二抗 m-IgG κ BP-HRP 室温孵育 2 h, 再次洗膜, 加超敏 ECL 化学发光试剂显影, 用 Image J 软件分析吸光度值。

1.2.4 ELISA 检测 $\text{A}\beta_{1-42}$ 的表达: 将 SH-SY5Y 细胞以浓度为 1×10^4 个/mL 接种于 12 孔板中, 每孔 1 mL。收集细胞上清液于灭菌离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 按照 ELISA 试剂

盒说明书操作,用酶标仪在波长 450 nm 处测定吸光度(A)值,根据标准曲线计算 $A\beta_{1-42}$ 表达水平。

1.3 统计学分析

实验结果用 SPSS 25.0 软件处理,实验数据以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间数据比较采用 one-way ANOVA 检验。线性相关分析结果以 Spearman 相关系数 r 表示。

2 结果

2.1 PC 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力及 $A\beta_{1-42}$ 分泌水平的影响

与对照组相比,实验剂量的 PC 对细胞增殖无明显影响(图 1A)。与对照组相比,15、20、25 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 使细胞活力降低($P<0.05$) (图 1B)。与 15 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 组相比,PC 干预 24 h 后细胞活力升高($P<0.05$) (图 1C)。

与对照组相比,用 15 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 诱导细胞后, $A\beta_{1-42}$ 的分泌水平升高($P<0.05$);以不同浓度 PC 干预, $A\beta_{1-42}$ 的分泌水平降低($P<0.05$)。在一定

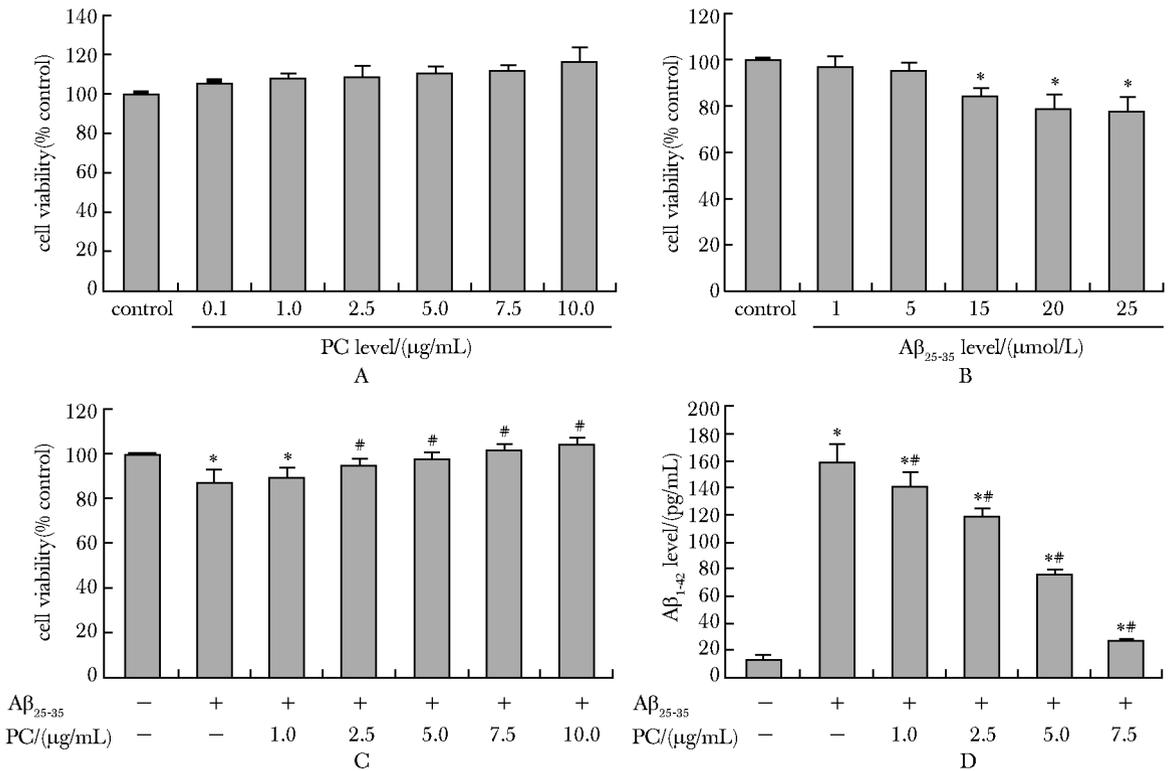
剂量范围内,PC 干预可降低 $A\beta_{1-42}$ 表达水平并呈现剂量-效应关系($r=0.990, P<0.05$) (图 1D)。

2.2 PC 对 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达水平的影响

与对照组相比,15 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 处理后,细胞中 β -catenin 蛋白及 p-GSK-3 β (Ser9) 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。用不同浓度 PC 干预后,细胞中 β -catenin 蛋白及 p-GSK-3 β (Ser9) 蛋白的表达水平升高($P<0.05$)。在一定剂量范围内,PC 干预可提高 β -catenin 蛋白的表达水平并呈现剂量-效应关系($r=0.932, P<0.05$) (图 2)。

2.3 PC 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路降低 $A\beta_{1-42}$ 的分泌

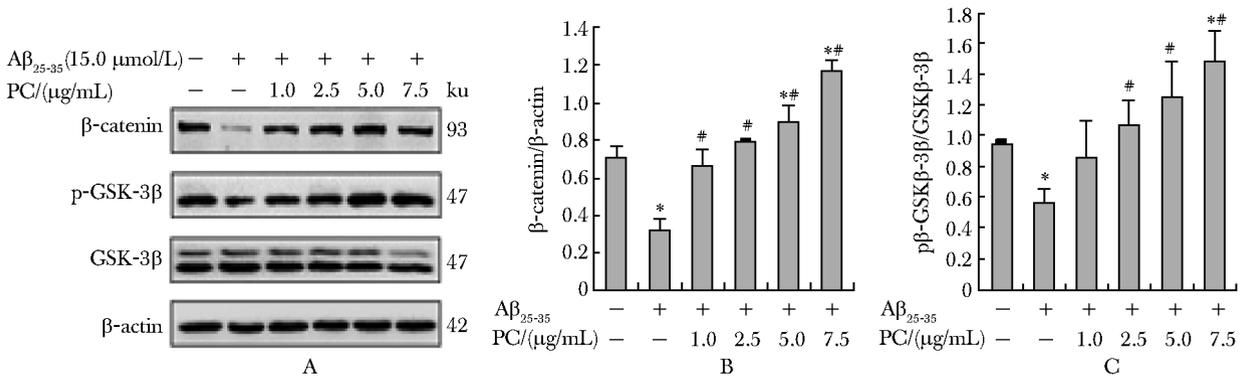
与对照组相比, $A\beta_{25-35}$ 组和 Dkk1 组 β -catenin 蛋白和 p-GSK-3 β (Ser9) 蛋白表达水平下降($P<0.05$),细胞分泌的 $A\beta_{1-42}$ 增多($P<0.05$)。预先加入 Dkk1 后,与 $A\beta_{25-35}$ + PC 组相比,细胞中 β -catenin 蛋白和 p-GSK-3 β (Ser9) 蛋白表达水平下降($P<0.05$), $A\beta_{1-42}$ 分泌增多($P<0.05$) (图 3)。



A-C. effects of PC, $A\beta_{25-35}$ or PC+ $A\beta_{25-35}$ on cell viability; D. secreted $A\beta_{1-42}$ was measured by ELISA; * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with $A\beta_{25-35}$ group

图 1 PC 和 (或) $A\beta_{25-35}$ 对 SH-SY5Y 细胞活力及 $A\beta_{1-42}$ 分泌水平的影响

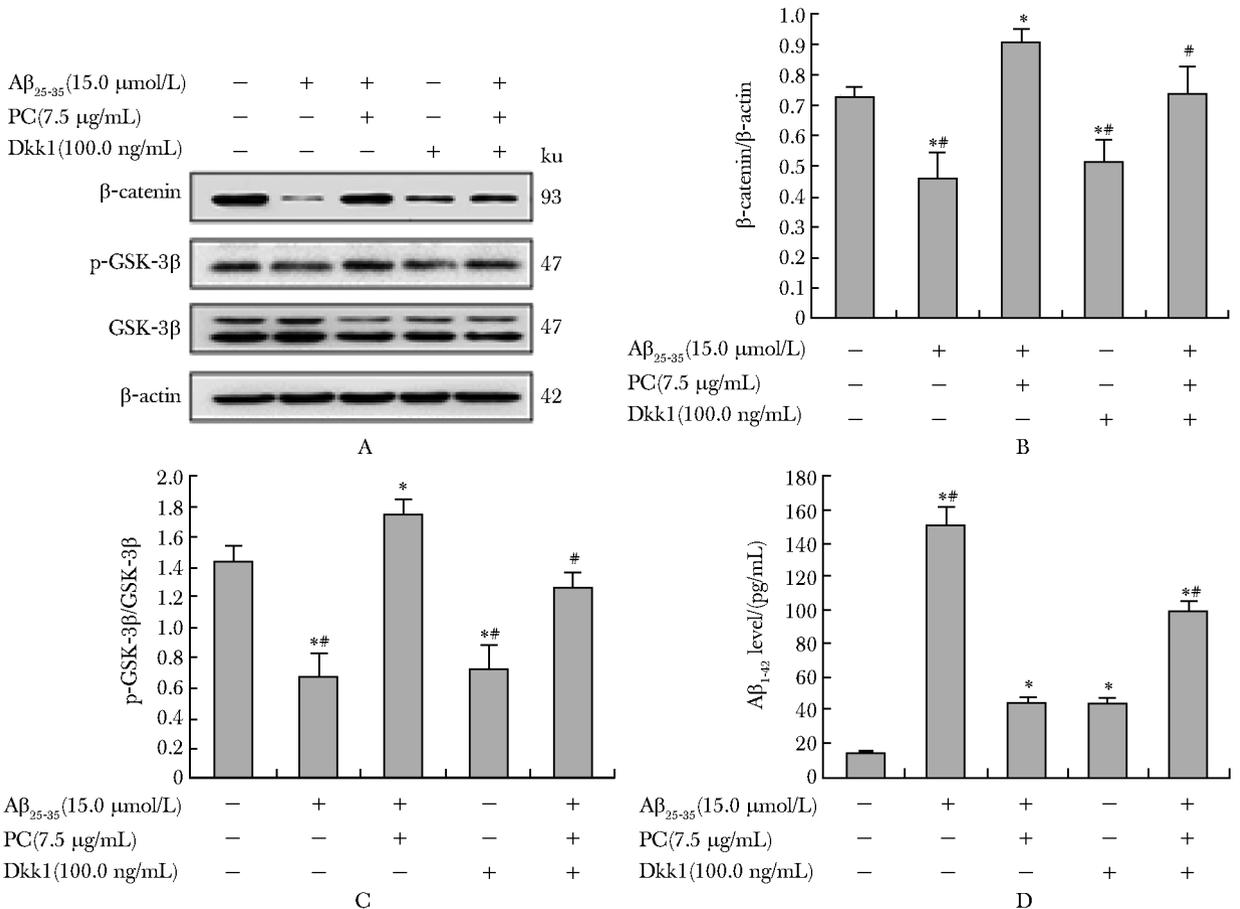
Fig 1 Effects of PC and (or) $A\beta_{25-35}$ on the cell viability or the secreted $A\beta_{1-42}$ in SH-SY5Y cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)



A. Western blot analysis of the β -catenin、GSK-3 β or p-GSK-3 β (Ser9) protein levels; B,C. effects of PC on β -catenin or p-GSK-3 β (Ser9) protein expressions; * P <0.05 compared with control group; # P <0.05 compared with A β_{25-35} group

图2 PC 干预对 A β_{25-35} 诱导的 SH-SY5Y 细胞 β -catenin 和 p-GSK-3 β (Ser9) 蛋白表达的影响

Fig 2 Effects of PC on β -catenin or p-GSK-3 β (Ser9) protein expressions in SH-SY5Y cells induced by A β_{25-35} ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



A. Western blot analysis of the β -catenin、GSK-3 β or p-GSK-3 β (Ser9) protein levels; B,C. effects of PC on β -catenin or p-GSK-3 β (Ser9) protein expressions; D. secreted A β_{1-42} was measured by ELISA; * P <0.05 compared with control group; # P <0.05 compared with A β_{25-35} +PC group

图3 PC 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路降低 A β_{25-35} 诱导的 SH-SY5Y 细胞 A β_{1-42} 的分泌

Fig 3 Effects of PC on the regulation of the secreted A β_{1-42} through Wnt/ β -catenin signaling pathway in SH-SY5Y cells induced by A β_{25-35} ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 讨论

Wnt 信号通路在神经系统发育期间就开始发挥功能,并影响成人脑中的突触可塑性,该途径在预防神经退行性疾病中有重要意义^[2]。激活 Wnt/ β -catenin 信号通路可以降低神经炎性反应的发生,减少抑郁行为的出现,阻止小胶质细胞活化等,该作用与 GSK-3 β 抑制以及 β -catenin 积累有关^[6]。

p-GSK-3 β (Ser9) 作为 GSK-3 β 蛋白磷酸化的抑制性位点,可抑制 GSK-3 β 表达^[9]。本研究结果显示,在一定剂量范围内,应用 PC 可逆转 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞中 p-GSK-3 β (Ser9) 蛋白表达下降,提高其介导的 GSK-3 β 抑制作用。GSK-3 β 作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的负调节因子,可参与氧化应激、炎性反应、细胞凋亡等大量分子和细胞功能的调节^[10]。GSK-3 β 激活通过调节 APP 的裂解参与 AD 脑中 $A\beta$ 的形成和积累,GSK-3 β 更是确定的 tau 蛋白主要激酶^[11]。

同时,实验结果还显示,PC 干预还可改善 $A\beta_{25-35}$ 诱导所致细胞 β -catenin 蛋白表达水平的降低。因此, β -catenin 可以看做是 Wnt 信号传导的下

游效应器。在 N2a 细胞中,促进 β -catenin 与 TCF4 结合可抑制 BACE1 表达,降低 $A\beta$ 浓度^[12]。Wnt/ β -catenin 信号功能障碍时,在小鼠或者离体细胞水平细胞内 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 的含量会上升^[13]。 $A\beta$ 沉积和 tau 蛋白过度磷酸化是阿尔茨海默病的重要病理改变。Wnt/ β -catenin 信号通路有可能是未来预防和治理阿尔茨海默病治疗中的重要靶点。

本研究结果显示,给予 PC 干预后,能明显降低 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞中 $A\beta_{1-42}$ 分泌。预先加入 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 Dkk1 后,再用原花青素干预 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞,细胞中 β -catenin、p-GSK-3 β (Ser9) 的分泌水平较未加入 Dkk1 组均降低,而 $A\beta_{1-42}$ 分泌水平上升。说明 PC 对细胞的保护作用降低,PC 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路发挥对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用。

综上所述,PC 可抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 $A\beta_{1-42}$ 生成,该作用可能与 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。本实验结果可为以 Wnt/ β -catenin 信号通路为靶点开发阿尔茨海默病新药物提供实验依据,也为拓展 PC 应用范围,开发 PC 新功效提供新思路。

参考文献:

- [1] Vaiserman A, Koliada A, Lushchak O. Neuroinflammation in pathogenesis of Alzheimer's disease: phytochemicals as potential therapeutics [J]. *Mech Ageing Dev*, 2020, 189: 111259. doi: 10.1016/j.mad.2020.111259.
- [2] Garcia AL, Udeh A, Kalahasty K, et al. A growing field: the regulation of axonal regeneration by Wnt signaling [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13: 43-52.
- [3] 张遥,任秀智,韩金祥,等. Wnt 信号通路与人疾病相关性的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31: 81-86.
- [4] 王晓艳,杜虹,王伟,等. 乙型肝炎病毒 X 蛋白抑制肝癌细胞系中 DKK2 的表达 [J]. *基础医学与临床*, 2020, 40: 1348-1352.
- [5] Palomer E, Buechler J, Salinas PC. Wnt signaling deregulation in the aging and Alzheimer's brain [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 227. doi: 10.3389/fncel.2019.00227.
- [6] 许逢娟,蔡青,谭俊珍,等. Wnt/ β -catenin 信号通路在阿尔茨海默病神经元变性中的研究进展 [J]. *重庆医科大学学报*, 2019, 44: 419-423.
- [7] 王旭. 原花青素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞 Tau 蛋白磷酸化及 MAPK 和 GSK-3 β 信号通路的影响 [D]. 南京:东南大学, 2019: 6-40.
- [8] 周亚盼. 原花青素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的抑制作用及 APP 代谢途径的影响 [D]. 南京:东南大学, 2017: 16-25.
- [9] 董云虹. p16 蛋白、细胞分化抑制因子-1 (Id-1)、Cav3.1、Cav3.2、p-GSK3 β ser9 和 p-GSK3 β tyr216 在宫颈癌组织中的表达及其意义 [J]. *陕西医学杂志*, 2017, 46: 492-493.
- [10] Unal G, Dokumaci AH, Ozkartal CS, et al. Famotidine has a neuroprotective effect on MK-801 induced toxicity via the Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway in the SH-SY5Y cell line [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 314: 108823. doi: 10.1016/j.cbi.2019.108823
- [11] Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, et al. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 5541-5554.
- [12] Parr C, Mirzaei N, Christian M, et al. Activation of the Wnt/ β -catenin pathway represses the transcription of the beta-amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE1) via binding of T-cell factor-4 to BACE1 promoter [J]. *FASEB J*, 2015, 29: 623-635.
- [13] Lakshmanachetty S, Balaiya V, Johnson LK, et al. TRP63/TP63 loss accelerates skin tumorigenesis through activation of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *J Dermatol Sci*, 2018, 91: 325-328.