

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.014.006  
文章编号: 1005-8982 (2018) 014-0031-04

## 美伐他汀降低 $\beta$ -淀粉样蛋白神经毒性的体外研究

黄美媚<sup>1</sup>, 黎宏庄<sup>1</sup>, 欧阳基鹏<sup>1</sup>, 李国兴<sup>1</sup>, 黎泳欣<sup>1</sup>, 甘育鸿<sup>2</sup>

(1. 南方医科大学顺德第一人民医院 神经内科, 广东 佛山 528300; 2. 广东医学院天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023)

**摘要: 目的** 通过美伐他汀降低  $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 神经毒性, 从机制角度探讨他汀类药物辅助治疗阿尔茨海默病的可能性。**方法** 在实验室培养神经细胞, 并加入美伐他汀, 观察美伐他汀是否具有活化 AMPK 的能力, 并观察在给予美伐他汀的同时,  $A\beta$  导致的过磷酸化现象是否得到抑制。**结果** 在样品中加入美伐他汀时, 人神经上皮瘤细胞 (SK-N-MC) 神经细胞数降低情况改善。Western blot 检测结果发现, 美伐他汀作用 24 h 后, SK-N-MC 神经细胞 AMPK 磷酸化。**结论** 美伐他汀可能通过提高 AMPK 活性, 对抗  $A\beta$  导致的神经毒性, 并进一步抑制蛋白质过磷酸化, 发挥保护神经的作用。

**关键词:** 美伐他汀; 阿尔茨海默病;  $\beta$ -淀粉样蛋白

**中图分类号:** R749.16

**文献标识码:** A

## Study on mechanism of Mevastatin protection from neurotoxicity induced by amyloid- $\beta$

Mei-mei Huang<sup>1</sup>, Hong-zhuang Li<sup>1</sup>, Ji-peng Ouyang<sup>1</sup>, Guo-xing Li<sup>1</sup>, Yong-xin Li<sup>1</sup>, Yu-hong Gan<sup>2</sup>  
(1. Department of Neurology, Shunde Hospital of Southern Medical University, Foshan, Guangdong 528300, China; 2. Key Laboratory of Natural Medicine Research and Development, Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

**Abstract: Objective** To explore the possibility of Mevastatin treatment for Alzheimer's disease from the perspective of the mechanism of reducing amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) neurotoxicity *in vitro*. **Methods** Neural cells were cultured in the laboratory and Mevastatin was added to observe whether Mevastatin could activate adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK), and the hyperphosphorylation induced by  $A\beta$  could be suppressed. **Results**  $A\beta$  reduced the number of SK-N-MC, the situation was improved after adding Mevastatin. Western blot revealed phosphorylation of AMPK in the SK-N-MC after exposure to Mevastatin for 24 h. **Conclusions** We hypothesized that Mevastatin may be against the toxicity of beta-amyloid protein through enhancing the activity of AMPK, and further inhibit the phosphorylation of Tau to achieve its neuroprotective effect.

**Keywords:** Mevastatin; Alzheimer's disease;  $\beta$ -amyloid peptide

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 已在全球造成 3 500 万人患病, 主要诊断依据为脑组织尸

检的中老年斑沉积, 以及包括神经纤维缠结和脑组织在内的萎缩程度<sup>[1]</sup>。在以淀粉样蛋白级联的假说中,

$\beta$ -淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$ -peptide, A $\beta$ ) 是造成 AD 的关键因素<sup>[2]</sup>。进一步研究指出,一种蛋白质被称为 Tau, 其形成与 AD 的发展密切相关<sup>[3-4]</sup>。相关报道证实,他汀类药物可能也具有治疗 AD 的效果<sup>[5-6]</sup>,但其作用机制仍需研究。本研究采用人类神经细胞株体外培养的实验方式,观察美伐他汀是否通过调控神经细胞的方式,达到治疗 AD 目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人神经上皮瘤细胞 (SK-N-MC) (美国 ATCC 细胞库), 人类神经细胞 (MC65) (源自 SK-N-MC 细胞, 广东医学院天然药物研究与开发重点实验室制备), 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) (美国 Sigma Chemical 公司), NaHCO<sub>3</sub> (上海瀚思化工有限公司), 羊抗兔抗体 (北京九州天瑞科技有限公司), 羊抗鼠抗体等购自美国 Biotium 公司, 最低基础培养基 (minimum essential medium, MEM)、青霉素双抗溶液、PBS 购自北京中国国药, 美伐他汀 (美国 Sigma 公司)。

### 1.2 主要试剂及仪器

薄层层析用硅胶 (青岛海洋公司), Western blot 检测仪 TE22 (Holliston, MA)、Thermo 310 细胞培养箱购自上海乐陈化工科技公司, 涡旋振荡器 (美国 Scientific Industries 公司), SDS-PAGE 电泳槽 (美国 Thermo Fisher 公司), 全波长酶免分析仪 (美国 Bio Pioneer Tech 公司), 低温离心机 (美国 Beckman 公司), 荧光显微镜 (日本岛津公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 神经细胞培养** 选取 SK-N-MC、MC65 细胞株, 用 MEM 培养液培养。用含 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 的培养基、1% 青霉素-链霉素双抗体溶液细胞培养基 (100  $\mu$ /ml 和 100  $\mu$ g/ml) 的培养皿置于 37  $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。当细胞生长至 90%, 进行抽滤, 使用无菌 PBS 冲洗, 在培养皿中加入 1 ml 0.05% Trypsin 和 0.02% EDTA, 缓慢摇匀后, 将培养皿置于 37  $^{\circ}$ C 保温箱中, 反应 1 min 后将细胞自培养皿表面冲洗下来, 1 000 r/min 离心 5 min, 取上清液。

**1.3.2 MTT 法** 将细胞平均分散至 24 孔盘中, 当细胞生长至 50% 时, 加入 0.5 ml/孔 MTT (0.5 mg/ml), 将 24 孔盘置于 37  $^{\circ}$ C 恒温中 30 min 等待 MTT 反应。反应结束后, 将 MTT 移除。加入 0.5 ml 二甲亚砜 (dimethyl sulphoxide, DMSO), 均匀摇动 3 min, 待细胞内的紫色结晶溶解后, 取至 96 孔盘, 用分光光谱仪在波长 550 nm 处测定吸光值, 比较细胞相对存活率。

**1.3.3 免疫荧光染色** 加入 BSA, 于 37  $^{\circ}$ C 轻摇 30 min, 分别加入一抗、二抗抗体, 各洗涤 3 次。En Vision™ 两步法流程参照文献 [7]。

**1.3.4 Western blot 检测** 采用 12% SDS-PAGE 分离 50  $\mu$ g 总蛋白质, 常温下采用醋酸纤维素膜封闭含有 3% BSA 的 TTBS [100 mmol/L Tris-HCl (pH=7.5), 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20]。在洗涤 1 次后, 分别 2 次加入相关抗体, 孵育 1 h。随后洗涤 3 次, 孵育 30 min。洗涤 3 次后, 将色源底物孵育 5 min 后显色。

## 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 美伐他汀可以减缓 A $\beta$ 导致的神经细胞死亡

10  $\mu$ mol/L A $\beta$  作用 48 h 后, SK-N-MC 神经细胞数降低; 同时加入 20  $\mu$ mol/L 美伐他汀, SK-N-MC 神经细胞数降低情况改善, 表明美伐他汀可以减缓 A $\beta$  导致的神经细胞死亡 (见图 1)。加入 10  $\mu$ mol/L A $\beta$ , SK-N-MC 神经细胞出现死亡, 36 h 后细胞活性下降至 (20  $\pm$  6) %; 同时加入美伐他汀, 神经细胞死亡情况改善, 36 h 后细胞活性下降至 (60  $\pm$  15) %, 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 12.6491$ ,  $P = 0.012$ ) (见图 2)。

### 2.2 美伐他汀神经保护作用与 AMPK 活化作用的关系

在对照样品中加入 10  $\mu$ mol/L A $\beta$  时, AMPK 无磷酸化现象。而加入美伐他汀或 AMPK 的促进剂阿卡地新 24 h 后, SK-N-MC 神经细胞 AMPK 有明显的磷酸化。AMPK Thr172 磷酸化与其活性程度呈正相关, 结果显示, 美伐他汀可使 AMPK 进入活化状态。美伐他汀可能通过提高 AMPK 活性, 对抗 A $\beta$  毒性, 发挥保护神经的作用。见图 3。

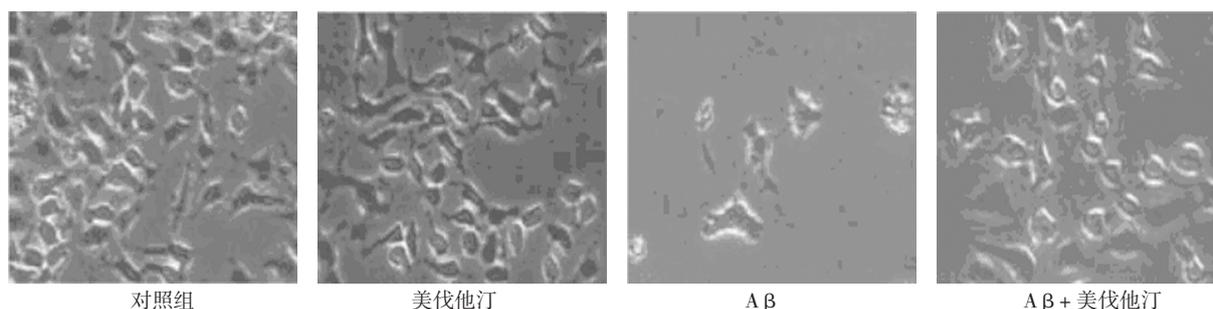


图 1 美伐他汀减缓 AD 导致的神经细胞死亡 (× 50 000)

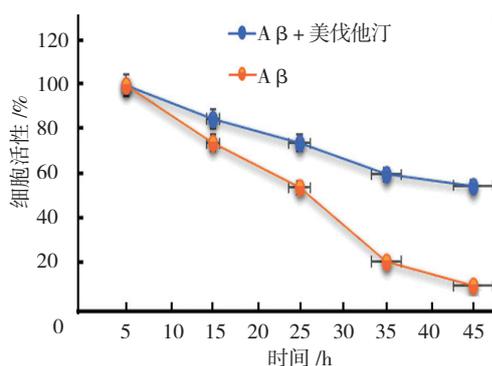


图 2 SK-N-MC 神经细胞死亡情况

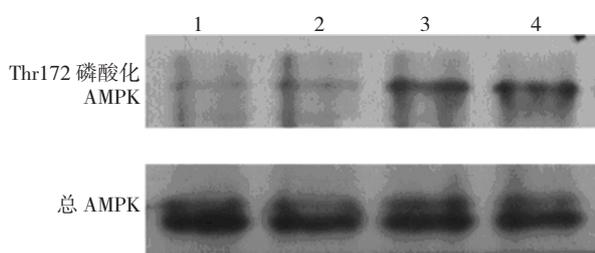
1: 对照组; 2: A $\beta$ ; 3: A $\beta$  + 阿卡地新; 4: A $\beta$  + 美伐他汀

图 3 美伐他汀诱发 AMPK Thr172 磷酸化

### 3 讨论

Tau 蛋白高度磷酸化是 AD 的主要病因, Tau 蛋白磷酸化由 AMPK 等一系列激酶调节<sup>[3]</sup>。多个研究证实, 激活 AMPK 可以抑制 Tau 蛋白磷酸化, 相反抑制 AMPK 可以增加 Tau 蛋白磷酸化。研究表明, AMPK 是 Tau 蛋白磷酸化的关键调节因素<sup>[8-9]</sup>。本实验结果发现, 加入美伐他汀后, 神经细胞具有明显活化 AMPK 的能力。此时 AMPK 的活性对于美伐他汀对抗 AD 的神经保护效果是必须的。在给予美伐他汀后, AD 所导致 Tau 蛋白过磷酸化现象被抑制。另有研究显示, AMPK 和 GSK-3 $\beta$  通过不同通路发挥作用, 两者可能存在协同效应<sup>[10]</sup>。笔者推测, 美伐他汀可能通过活化 AMPK 从而抑制 Tau 磷酸化, 发挥保护

神经的作用。

有文献显示, A $\beta$  在 AD 的发病机制中具有重要作用。因此 A $\beta$  对神经细胞毒性的相关研究成为研究重点<sup>[11-13]</sup>。控制 A $\beta$  的生成和清除, 从而形成动态平衡, 对 AD 的预防起到重要作用<sup>[14]</sup>。有研究发现, 他汀类药物会造成 AMPK 活性上升, 并进一步改变细胞内能量平衡<sup>[15]</sup>。

在本实验证明, 美伐他汀可以减缓 A $\beta$  导致的神经细胞死亡。考虑 Tau 蛋白沉积, 交互聚集成神经原纤维缠结和有毒的可溶性蛋白片段是 AD 的主要病因。有研究进一步证实, AMPK 通过改变 Tau 蛋白微管结合在 Ser396 和 Ser262 位点磷酸化 Tau 蛋白, 并对其调控<sup>[16-17]</sup>。因此 AMPK 在 Tau 蛋白磷酸化中发挥重要作用。由此笔者推论, 美伐他汀可能通过提高 AMPK 活性, 对抗 A $\beta$  毒性, 发挥保护神经的作用, 抑制 Tau 蛋白磷酸化。

考虑通过抑制 A $\beta$  的异常聚集, 能阻断 AD 的发生、发展。因此, 无论是从预防, 还是治愈的角度考虑, 综合应用他汀类药物也是治疗 AD 的有效方法。

### 参 考 文 献:

- [1] ISHII-KATSUNO R, NAKAJIMA A, KATSUNO T, et al. Reduction of amyloid beta-peptide accumulation in Tg2576 transgenic mice by oral vaccination[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 399(4): 593-599.
- [2] THINAKARAN G, KOO E H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(44): 29615-29619.
- [3] RAFII M S. Targeting tau protein in Alzheimer's disease[J]. *Lancet*, 2016, 16: 32107-32109.
- [4] HE G, LUO W J, LI P, et al. Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 2010, 467(7311): 95-99.
- [5] SALLUSTIO F, STUDER V. Targeting new pharmacological approaches for Alzheimer's disease: potential for statins and

- phosphodiesterase inhibitors[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2016, 15(6): 647-659.
- [6] 朱天瑞, 李晓红. 他汀类药物对阿尔茨海默病的治疗作用 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(1): 77-79.
- [7] THOMPSON C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. *Science*, 1995, 267(5203): 1456-1462.
- [8] VINGTDEUX V, DAVIES P, DICKSON D W, et al. AMPK is abnormally activated in tangle- and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease and other tauopathies[J]. *Acta Neuropathol*, 2011, 121(3): 337-349.
- [9] 陈涛, 周颖君, 王传玲. AMPK 在阿尔茨海默病中的作用机制 [J]. *广东医学院学报*, 2015, 33(6): 621-626.
- [10] ZHANG L, JOURET F, RINEHART J, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) inhibition induce  $Ca^{2+}$ -independent deposition of tight junction components at the plasma membrane[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(19): 16879-16890.
- [11] CHO J K, RYU Y B, CURTIS-LONG M J, et al. Inhibition and structural reliability of prenylated flavones from the stem bark of *Morus lhou* on  $\beta$ -secretase (BACE-1)[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(10): 2945-2958.
- [12] ZLOKOVIC B V, DEANE R, SAGARE A P, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide elimination from the brain[J]. *J Neurochem*, 2010, 115(5): 1077-1089.
- [13] NEMIROVSKY A, FISHER Y, BARON R, et al. Amyloid betaHSP60 peptide conjugate vaccine treats a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Vaccine*, 2011, 29(23): 4043-4050.
- [14] 刘文娟, 戴雪伶, 姜招峰.  $\beta$ -淀粉样蛋白神经毒性及其防治策略 [J]. *生命科学*, 2011, 23(10): 1022-1026.
- [15] 李小霞, 夏勇, 汪道文. 辛伐他汀通过磷酸化作用增强内皮一氧化氮合酶活性 [J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2007, 7(5): 253-259.
- [16] MAIRET-COELLO G, COURCHET J, PIERAUT S, et al. The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of A $\beta$  oligomers through Tau phosphorylation[J]. *Neuron*, 2013, 78(1): 94-108.
- [17] THORNTON C, BRIGHT N J, SASTRE M, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid beta-peptide exposure[J]. *Biochem J*, 2011, 434(3): 503-512.

(童颖丹 编辑)