

ERK1/2 信号通路介导大蒜素对 β -分泌酶亚基 Bace1 的调控作用

张浩^{1*}, 王玥², 潘海¹

¹沈阳医学院附属中心医院第二神经外科, 沈阳 110024; ²辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847

摘要: 本文应用细胞免疫荧光、Western blot、Real-Time PCR 和 ELISA 等实验方法检测 ERK1/2 信号通路介导大蒜素对 β -分泌酶亚基 Bace1 的调控作用。结果发现, SH-SY5Y 细胞经大蒜素处理后, Bace1 表达较对照组降低, 而给予大蒜素和 ERK1/2 通路抑制剂 PD98059 共同处理后的 SH-SY5Y 细胞中 Bace1 表达又明显升高, 表明大蒜素可以通过 ERK1/2 通路下调 Bace1 的表达; ELISA 结果显示, 大蒜素处理组 SH-SY5Y 细胞中 $A\beta$ 1-40 和 $A\beta$ 1-42 的表达减少, 而大蒜素和 PD98059 处理组的 SH-SY5Y 细胞中 $A\beta$ 1-40 和 $A\beta$ 1-42 的表达较单纯大蒜素处理组有所升高。基于此结果, 说明大蒜素可以抑制 β -分泌酶的活性, 下调 Bace1 的表达, 进而提示大蒜素通过减少 $A\beta$ 的生成, 对神经元起到一定的保护作用。

关键词: 大蒜素; SH-SY5Y; β -分泌酶; Bace1; ERK1/2 信号通路

中图分类号: R741.02

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.3.003

Regulation Effect of Allicin on Beta Secretase Subunit Bace1 Mediated by ERK1/2 Signaling Pathway

ZHANG Hao^{1*}, WANG Yue², PAN Hai¹

¹The second Department of Neurosurgery, the Affiliated Central Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China; ²Department of Tissue Culture, Liaoning University of Tradition Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Abstract: In this study, the regulation effect of ERK1/2 signal pathway mediated allicin on beta secretase subunit Bace1 was investigated by immunofluorescence, Western blot, Real-Time PCR and ELISA methods. It was found that the Bace1 expression in SH-SY5Y cells which treated with allicin was lower than control group, but treated with allicin and ERK1/2 pathway inhibitors PD98059, the expression of Bace1 was rose. The results showed that allicin can down-regulate Bace1 expression through ERK1/2 pathway. ELISA results showed that the expression of A beta 1-40 and A beta 1-42 were decreased in SH-SY5Y cells which treated with allicin, while the expressions were increased in SH-SY5Y cells which treated with allicin and PD98059, compared with allicin treatment group. These results prompted that allicin can inhibit the beta secretase activity, downregulate Bace1 expression, and suggested that allicin had protective effect on neurons by decreasing the production of $A\beta$.

Key words: allicin; SH-SY5Y; beta secretase; Bace1; ERK1/2 signal pathway

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 俗称老年痴呆, 是好发于老年人的一种神经系统退行性疾病, 临床上表现为进行性智力衰退、认知功能障碍、语言障碍、记忆障碍并伴有人格改变等。到目前为止, AD 发病原因仍然不是很清楚。但是几乎在所有 AD 病人的脑中都发现了 $A\beta$ 和老年斑块沉积, 在与学习记忆相关的关键区域斑块的数目直接与脑功能损害程度成正比, 并且最终导致了痴呆的临床

阶段。细胞内和细胞外的 $A\beta$ 可以分别通过不同的机制诱导神经元的损伤以及认知记忆功能受损, 其中 $A\beta$ 诱导的氧化应激反应和氧化应激诱导 $A\beta$ 和老年斑形成在阿尔茨海默病的发病机制中发挥重要作用^[1]。

老年斑的核心成分是一种由 39 ~ 43 个氨基酸残基构成的小神经肽- $A\beta$ (β -amyloid peptide)^[2,3], 在脑内可沉积于脑实质和脑血管中^[2,4]。 $A\beta$ 是淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的裂解产物, 脑内 APP 代谢有两条途径, 一条是 $A\beta$ 生成途径, 另一条是非 $A\beta$ 生成途径。非 $A\beta$ 生成途径是 α -

分泌酶在 α 位点将 APP 水解成 sAPP α 和 C83 两个片段,C83 接着被 γ -分泌酶生成 P3 片段,并没有 β 的形成;另一条途径是 APP 被 β -和 γ -分泌酶连续裂解从而产生产生难溶有毒的 β 1-40 和 β 1-42^[5],进而聚集形成老年斑。在 β 形成的过程中, β -位点 APP 剪切酶(β -site of APP cleaving enzyme 1, Bace1)是调节 β 生成的关键限速酶^[6]。那么,就此而言,调节 APP 代谢,增强 α -分泌酶活性,抑制 β -分泌酶和 γ -分泌酶的活性,成为了研究治疗 AD 的一个热点。

大蒜素(Diallyl trisulfide, DATS)是大蒜的主要成分,又名大蒜新素,其结构式为 $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}-\text{S}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH} = \text{CH}_2$,DATS 具有较好的脂溶性,可通过血脑屏障,具有消炎^[7]、清除自由基^[8]、抗肿瘤^[9-11]等多种生物学功能。然而,大蒜素是否对 β -分泌酶亚基 Bace1 有调控作用尚未见报道,为此,本研究采用过度表达 APP_{sw} 基因的 SH-SY5Y 细胞模拟 AD 的发病机制,观察一定浓度的大蒜素处理对 β -分泌酶 Bace1 的调控作用,进一步探讨大蒜素影响 AD 发病的证据及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品

大蒜素(江苏正大清江制药有限公司);胎牛血清(Invitrogen);DMEM/高糖培养液(Invitrogen);胰蛋白酶(Invitrogen);DMSO(Sigma);青霉素、链霉素德国均为国产分析纯试剂;兔抗 β -actin、ERK1/2、Bace1、Alexa Fluor 555-labeled goat anti-rabbit IgG、HRP-labeled goat anti-rabbit IgG 等抗体(Cell Signaling Technology);PVDF 膜、蛋白 marker(NEB 公司);ECL 发光试剂盒(Pierce 公司)。

1.1.2 实验仪器

Olympus 倒置相差显微镜,生物安全柜,CO₂ 培养箱,高压蒸汽消毒锅,Olympus MVX10 荧光显微镜,Leica TCS-SP2 共聚焦激光扫描显微镜,低温离心机,紫外分光光度计,BIO-RAD 凝胶图像分析系统,水平摇床,恒温水浴箱,Bio-RAD 酶标仪等。

1.1.3 细胞与药物处理

实验采用 SH-SY5Y 细胞用含 10% FBS、1% 青/链霉素、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM/高糖培养液,于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。隔天换液 1 次,3~4 d 传代 1 次,取对数生长期

细胞进行实验,且细胞存活百分率在 95% 以上。药物处理方法为:根据 MTT 实验检测 DATS 的最适浓度为 20 μM ,ERK1/2 信号通路的特异性抑制剂为 PD98059,PD98059 的最适浓度为 10 μM 。SH-SY5Y 细胞根据要求分为以下几组(为了使各组细胞在加药前能同步化,加药前要进行无血清培养基饥饿处理 12 h,饥饿处理不会影响细胞的存活):(1)正常对照组:吸出无血清培养基后,加入 4 mL 无抗生素的无血清培养基,在无血清培养基中加入 DMSO 2 μL ;(2)加药组 a:吸出无血清培养基后,加入 4 mL 无抗生素的无血清培养基,DATS 终浓度为 20 μM ;(3)加药组 b:吸出无血清培养基后,加入 4 mL 无抗生素的无血清培养基,DATS 终浓度为 20 μM ,PD98059 最适浓度为 10 μM ,各组细胞药物作用时间为 12 h。

1.2 实验方法

1.2.1 Western blot 检测

用含 1% PMSF 的蛋白裂解液提取蛋白,并按 BCA 蛋白测定说明书对每组蛋白含量进行测定,10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品,4 °C 转膜过夜,5% 脱脂奶粉封闭,Bace1、ERK1/2 抗体(1:3300)4 °C 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,ECL 发光(ECL 试剂盒,Pierce,CA),Kodak-XAR 胶片曝光、显影。洗膜重新封闭后, β -actin 抗体(1:10000)孵育,二抗孵育,发光,胶片曝光显影。以 β -actin 作为上样量参照标准。胶片扫描后,用 Image-pro Plus 6.0 软件包分析。

1.2.2 免疫荧光染色和共聚焦激光扫描显微术

细胞种板药物处理 24 h 后,PBS 冲洗,4% 甲醛固定 30 min,0.3% triton X-100 通透 30 min,切片正常羊血清室温预孵育 30 min,Bace1 抗体(1:100)孵育,4 °C 过夜。经 0.01M 的磷酸盐缓冲液(pH7.4)充分漂洗后,用羊抗兔 IgG(1:200)室温孵育 2 h,漂洗后甘油封片剂封片。共聚焦激光扫描显微镜下观察实验结果并拍照,图片经 Photoshop 8.0 软件处理并打印。

1.2.3 Real-Time PCR

RNA 提取,收取各组细胞于 EP 管中,加 Trizol 500 μL ,加氯仿 250 μL ,涡旋混匀。离心 15000 rpm,5 min。取上清后加等体积的 70% 乙醇,离心 1000 rpm,1 min。加 buffer I 500 μL ,离心 1000 rpm。加 buffer II 500 μL ,离心 1000 rpm 1 min。加 dd H₂O 30 μL ,离心 12000 rpm 3 min。反转录 RT-PCR。提

取各组细胞的总 RNA 后,以 GAPDH 为内参,采用 Real-Time PCR 方法分析 Bace1 的表达水平。

1.2.4 ELISA

PBS 稀释细胞悬液,使细胞浓度约达到 1000000 /mL。通过反复冻融,以便使细胞破坏并且释放出细胞内的成分,3000 rpm,离心 20 min,收集上清。保存过程中如有沉淀形成,需再次离心。

1.2.5 统计分析

本实验所有数据均采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析处理,对数据进行 One-way ANOVA 分析,结果以均值 \pm 标准差表示 ($X \pm SD$), $P < 0.05$ 认为有

显著性差异。

2 实验结果

2.1 大蒜素下调 SH-SY5Y 细胞内 Bace1 表达

为了证实 DATS 可通过 ERK1/2 信号通路下调细胞内 Bace1 表达,我们应用免疫荧光双标和共聚焦激光扫描显微术观察 SH-SY5Y 细胞中 Bace1 的表达水平,结果显示,DATS 可通过 ERK1/2 信号通路下调 SH-SY5Y 细胞内 Bace1 的表达(图 1),而 DATS 与 ERK1/2 抑制剂 PD98059 共同处理细胞一组,Bace1 的表达较 DATS 处理组升高。

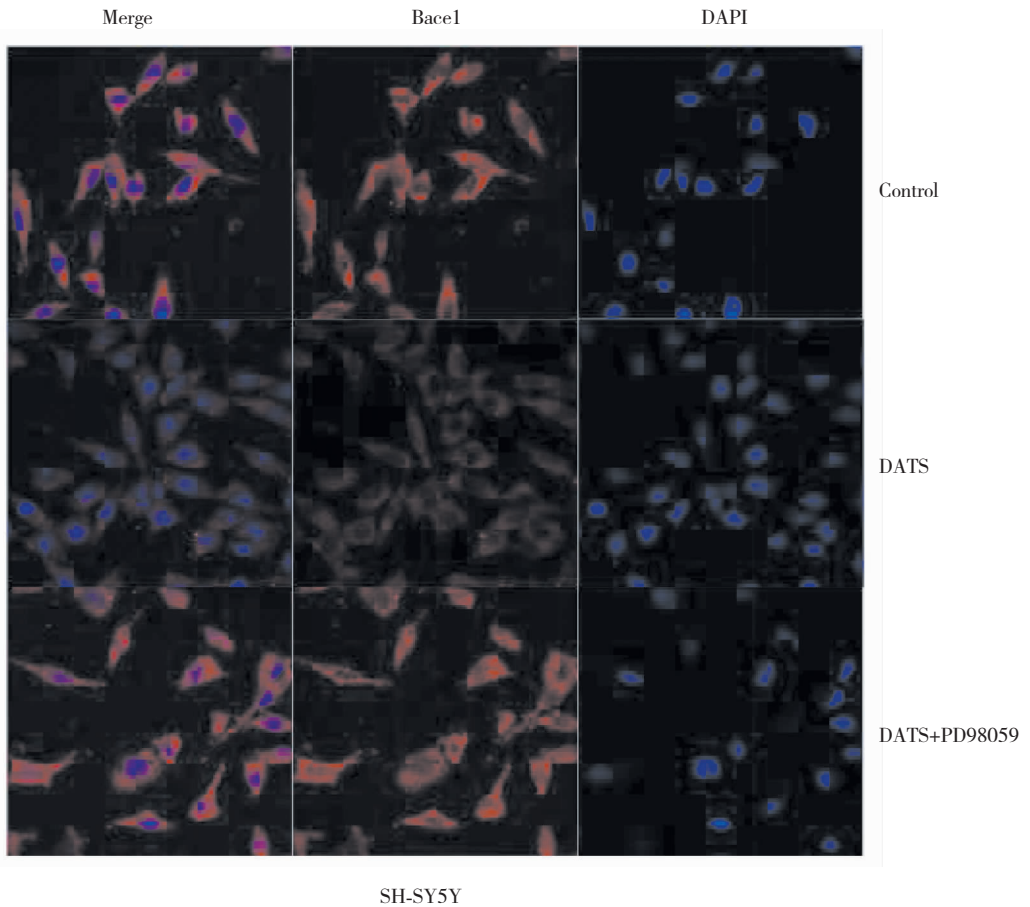


图 1 大蒜素下调 SH-SY5Y 细胞内 Bace1 的表达

Fig. 1 Allicin down-regulate Bace1 expression in SH-SY5Y cells

2.2 大蒜素下调 SH-SY5Y 细胞 Bace1 的 mRNA 和蛋白表达水平

Western blot(图 2A)及 Real-Time PCR(图 2B)实验结果显示,SH-SY-5Y 细胞经大蒜素处理后,Bace1 表达明显下降,而大蒜素和 ERK1/2 通路抑制剂 PD98059 共同处理的 SH-SY5Y 细胞中 Bace1 表达较为升高,说明大蒜素可以通过 ERK1/2 这一

通路下调 Bace1 的表达(与对照组相比, $*P < 0.05$;与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$),实验结果具有统计学意义。

2.3 大蒜素下调 SH-SY5Y 细胞内 Bace1 表达的 ELISA 结果

为了进一步验证大蒜素是否是通过下调 Bace1 表达进而调节 APP 代谢,抑制 β -分泌酶的活性,从

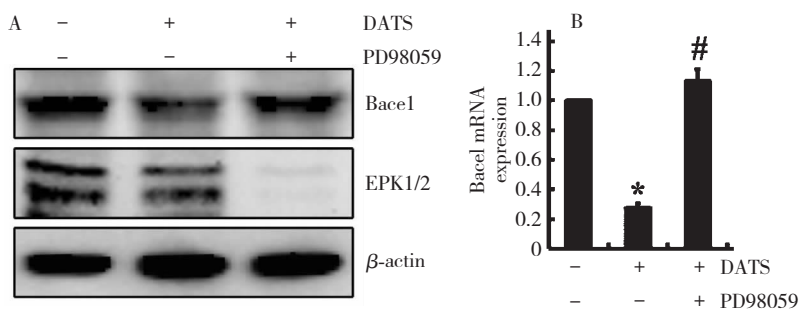


图2 大蒜素下调 SH-SY5Y 细胞 Bace1 的 mRNA 和蛋白表达水平

Fig. 2 Alllicin down-regulate the mRNA and protein expression level of Bace1 in SH-SY5Y cells

注:A:Western blot 法检测大蒜素及大蒜素和 ERK1/2 通路抑制剂共同处理后的 SH-SY5Y 细胞中 Bace1 蛋白水平的表达变化;B:Real-Time PCR 法检测大蒜素及大蒜素和 ERK1/2 通路抑制剂共同处理后的 SH-SY5Y 细胞中 Bace1 在 mRNA 水平的表达变化,与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

Note:A:Western Blot method was used to detect the expression of Bace1 protein in SH-SY5Y cells after treating by alllicin or alllicin and ERK1/2 pathway inhibitors;B:Real-Time PCR method was used to detect the mRNA level expression of Bace1 in SH-SY5Y cells after treating by alllicin or alllicin and ERK1/2 pathway inhibitors,Compare with control,* $P < 0.05$;Compared with model group,# $P < 0.05$ 。

而减少 $A\beta$ 的生成,我们通过 ELISA 的实验方法检测各组细胞中 $A\beta 1-40$ 和 $A\beta 1-42$ 的表达,结果发现,经大蒜素处理后,SH-SY5Y 细胞中 $A\beta 1-40$ 和 $A\beta 1-42$ 的表达减少,而大蒜素和 PD98059 处理组的 SH-

SY5Y 细胞中 $A\beta 1-40$ 和 $A\beta 1-42$ 的表达较单纯大蒜素处理组有所升高(与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$),实验结果具有统计学意义(图3)。

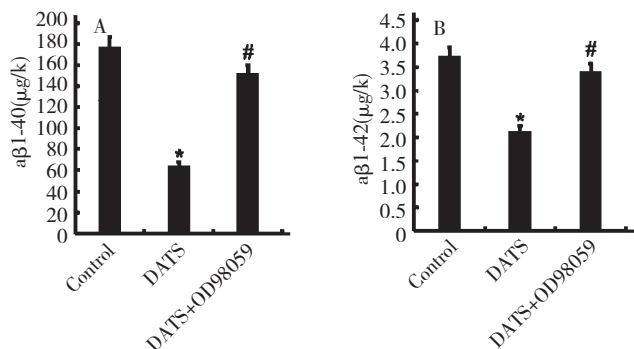


图3 大蒜素下调 SH-SY5Y 细胞内 $A\beta 1-40$ 和 $A\beta 1-42$ 的表达

Fig. 3 Alllicin down-regulate the expression of $A\beta 1-40$ and $A\beta 1-42$ in SH-SY5Y

注:A: $A\beta 1-40$ 的表达变化;B: $A\beta 1-42$ 的表达变化,与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

Note:A:The expression changes of A beta 1-40;B:The expression changes of A beta 1-42,Compared with control,* $P < 0.05$;Compared with model group,# $P < 0.05$ 。

3 讨论与结论

流行病学显示,AD 病死率随年龄增加而逐步增高^[12]。在发达国家,AD 是继心脏病、癌症、中风后的第四位死因;在我国,随着人口老龄化程度的加快,日趋增高的 AD 发病率对其治疗提出了重大挑战。目前对 AD 确切病因机制的认识尚不清楚,多种假说证明与 AD 的发病有关,包括 $A\beta$ 级联学说、Tau 蛋白学说以及氧化应激与自由基损伤学说,其中氧化应激与自由基损伤学说认为,细胞外 $A\beta$ 可

以诱导蛋白质、核酸以及脂质的过氧化,产生大量自由基,提示 $A\beta$ 可直接诱导氧化应激,而氧化应激又会促进可溶性 $A\beta$ 转换为不溶性 $A\beta$,促进老年斑的沉积^[13]。 $A\beta$ 由 β -淀粉样蛋白前体蛋白依次经 β -分泌酶和 γ -分泌酶酶切产生, $A\beta$ 生成增多,过量生成无毒的 $A\beta$ 单体可以发生凝聚,形成有毒的可溶性寡聚体,或者沉积形成老年斑。有研究显示, $A\beta$ 能够产生自由基^[14],并且 $A\beta$ 能导致星形胶质细胞线粒体膜电位下降,通过激活 NADPH 氧化酶导致氧化应激,进而导致神经元死亡。文献报道,大蒜素可

以通过上调多种抗氧化酶和解毒酶的表达,加速酶促反应,清除自由基等氧化物质,从而起到保护细胞的作用;研究资料显示,大蒜素可改善血液流变性、增加脑血流量、清除自由基、改善脑功能及减轻急性脑梗死时缺血再灌注损伤^[15],同时对脑缺血再灌注大鼠海马神经元具有保护作用^[16]。那么大蒜素是否可以减少 A β 形成并通过哪一途径影响 A β 形成呢?

在 A β 形成的过程中, β -位点 APP 剪切酶 Bace1 是调节 A β 生成的关键限速酶^[17];因此,调节 APP 代谢,抑制 β -分泌酶的活性可能会抑制 A β 生成。本实验利用过度表达 APP^{sw} 基因的 SH-SY5Y 细胞模拟 AD 的发病机制,给予大蒜素或大蒜素和 ERK1/2 通路抑制剂共同处理,检测各组细胞中 β -分泌酶氨基 Bace1 的表达情况,结果发现,给予 SH-SY5Y 细胞大蒜素处理后,SH-SY5Y 细胞中 Bace1 的表达明显降低,而大蒜素和 ERK1/2 通路抑制剂 PD98059 共同处理后,Bace1 的表达又有所升高,提示大蒜素可以下调 SH-SY5Y 细胞中 Bace1 的表达,并且是通过 ERK1/2 通路降低 SH-SY5Y 细胞中 Bace1 表达的,就此结果而言,初步提示大蒜素可能通过其强大的抗氧化应激的作用参与 APP 代谢的调节,抑制 β -分泌酶的活性,从而减少 A β 的生成,对神经元起到了一定的保护作用。

参考文献

- Guadagna S, Esiri MM, Williams RJ, et al. Tau phosphorylation in human brain; relationship to behavioral disturbance in dementia. *Neurobiol Aging*, 2012, 21: 125-126.
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease; initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 120: 885-890.
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome; sharing of a Unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 122: 1131-1135.
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease; initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425: 534-539.
- Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 781-810.
- Ma QL, Lim GP, Harris-White ME, et al. Antibodies against beta-amyloid reduce Abeta oligomers, glycogen synthase kinase-3beta activation and tau phosphorylation *in vivo* and *in vitro*. *J Neurosci Res*, 2006, 83: 374-384.
- Ariga T, Seki T. Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds; A review. *Bio Factors*, 2006, 26: 93-103.
- Zhang JL(张久亮), Shi ZX(史载祥), Cao QF(曹启富), et al. 脑心速通清除自由基、减轻脑缺血-再灌注损伤的实验研究. *J Beijing Univ TCM* (北京中医药大学学报), 1997, 20: 43-44.
- Lee BC, Park BH, Kim SY, et al. Role of Bim in diallyl trisulfide-induced cytotoxicity in human cancer cells. *J Cell Biochem*, 2011, 112: 118-127.
- Iciek M, Kwiecien I, Chwatko G, et al. The effects of garlic-derived sulfur compounds on cell proliferation, caspase 3 activity, thiol levels and anaerobic sulfur metabolism in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Cell Biochem Funct*, 2012, 30: 198-204.
- Antosiewicz J, Herman-Antosiewicz A, Marynowski SW, et al. C-Jun NH(2)-terminal kinase signaling axis regulates diallyl trisulfide-induced generation of reactive oxygen species and cell cycle arrest in human prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2006, 66: 5379-5386.
- Ferr CP, Prince M, Brayne C, et al. Alzheimer's disease international global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 2005, 366: 2112-2127.
- Shao LJ(邵力钧), Shan WW(单文卫). 大蒜素的临床应用进展. *China Mod Doctor* (中国现代医生), 2009, 47: 45-48.
- Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 1997, 23: 134-147.
- Shi ZX(史载祥), Zhang JL(张久亮), Mao JS(毛建生), et al. Clinical studies on treatment with galic injection for 101 patients with acutely cerebral infarction. *Integr Tradit Chin Western Med Prac Crit Care Med* (中西医结合急救杂志), 1999, 6: 390-394.
- Guo LH(郭莉华), Li QJ(李清君), Hu YY(胡玉燕), et al. Protective effect of allitridion on hippocampus of rats with cerebral ischemia-reperfusion and P53 expression. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2009, 25: 264-267.
- Cheng HP, Vetrivel KS, Gong P, et al. Mechanism of disease; new therapeutic strategies for Alzheimer's disease-targeting amyloid precursor protein processing in lipid rafts. *Nat Clin Pract Neurol*, 2007, 3: 374-382.