

A β_{1-40} 三聚体分离分析及其对神经细胞内游离 Ca²⁺ 的影响

郑晓惠 王丽珺 张 岚 洪远凯 黄力新 沙印林*

(北京大学医学部生物物理系, 单分子与纳米生物学实验室, 北京 100083. * 联系人, E-mail: shyl@bjmu.edu.cn)

摘要 利用体积排阻色谱(SEC)和非变性凝胶电泳(native PAGE)分析了 A β_{1-40} 在溶液中的寡聚体存在形式, 并对三聚体进行了分离, 并利用荧光显微镜观察了 A β_{1-40} 可溶性三聚体对离体培养的大鼠海马神经元细胞内游离钙离子浓度的影响. 结果显示, 在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中, 0.231 mmol/L 的 A β_{1-40} 能在 24 h 内以稳定的低分子量寡聚体混合物的形式存在, 主要成分为可溶性三聚体. 通过 SEC 分离得到的 A β_{1-40} 三聚体, 可以明显升高神经元细胞内游离钙离子的浓度, 作用强度高于同浓度的 A β_{1-40} 纤维. 另外, A β_{1-40} 三聚体与 A β_{1-40} 纤维所引起的胞内钙升高的方式不同, 提示其作用机理可能存在差异.

关键词 可溶性 A β_{1-40} 三聚体 体积排阻色谱 细胞内钙离子

神经退行性疾病是一类与蛋白质的构象变化密切相关的疾病, 也称蛋白质构象病(protein conformational disorder)^[1]. 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是该类疾病的典型代表, 其典型病理学特征之一是脑组织中细胞外的 β 淀粉样蛋白(A β)沉积和细胞内形成神经纤维缠结(NFT)^[2]. 在 20 世纪, AD 领域的研究主要是针对由淀粉样纤维形成所导致的病理作用, 因而对纤维本身的结构进行了广泛深入的研究^[3-5]. 但是, 近年不断有研究报道, 在淀粉斑沉积出现之前, 可溶性的、呈寡聚状态的 A β 分子聚合物可以引起神经元功能失调, 并可能是主要的神经毒性物质^[6-8]. 有关 A β 可溶性寡聚体神经毒性的研究已引起越来越多的重视, 成为目前 AD 病因病理学研究中的热点问题之一. 在整体水平、转基因动物和体外研究方面都不断有相关的报道. 例如, 在通过组织形态学确认的 AD 病例中, Western 染色的定量研究发现可溶性 A β 比对照组增加 3 倍, 特别是可溶性 A β 与 NFT 密度有直接关系^[9]; 用 A β 特异性抗体被动免疫的 A β PP 转基因鼠能迅速恢复记忆损害, 而不影响脑组织中淀粉样沉积的总量^[10]; 此外, 发现 A β_{1-42} 的球形寡聚体能抑制海马神经元的长潜伏诱发电位, 说明它能损害神经信号传导功能^[11]. 但相比较而言, 对 A β 的各种聚集中间体, 尤其是低分子量寡聚体的存在条件、结构状态目前还了解甚少.

在 AD 的发病过程中, A β 分子经历了从可溶状态到不溶性纤维的转变. 各种中间体(intermediate), 既包括低分子量寡聚体, 如二聚体、三聚体和四聚体等

^[12-14], 也包括由 10~20 个甚至更多单体构成的球形寡聚体, 如 ADDLs (A β -derived diffusible ligands), 以及由寡聚体串连形成的原纤维(protofibrils)^[7,15,16], 但对它们的具体结构、聚集方式和相互关系及其与纤维形成的关系, 目前尚无明确的认识. 与此同时, 不同学者有关 A β 寡聚体对神经细胞毒性作用的研究结果也有很大差异, 这主要与制备高纯度、稳定的单体、寡聚中间体非常困难有关.

本文针对 A β 低分子量的寡聚体存在形式, 探究了 A β 分子在聚集起始阶段的结构和聚集状态, 并进一步观察了其在纤维聚合和神经细胞毒性中的作用. 结果显示, A β_{1-40} 能在一定条件下以稳定的可溶性三聚体形式存在, 分离得到的 A β_{1-40} 三聚体能明显升高神经元细胞内游离钙离子的浓度, 作用强度高于同浓度的 A β_{1-40} 纤维, 这为 A β_{1-40} 的毒性作用机理提供了新的线索.

1 材料与amp;方法

() 实验材料. 多肽 A β_{1-40} 购自上海吉尔生化有限公司, 经高效液相色谱和基质辅助激光解吸飞行时间质谱检验(纯度大于 95%, 除质荷比值(m/z)为 4329.34 的峰以外, 无其他杂质峰). 二甲基亚砜(DMSO)、三氟醋酸(TFA)、胰岛素、多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine)和 L-谷氨酰胺购自 Sigma 公司. 无血清培养基、B-27 添加剂、高糖 DMEM、胰蛋白酶和 HEPES 购自美国 Gibco 公司. 胎牛血清购自美国 HyClone 公司, Fluo-3/AM 购自 Molecular Probes 公司. 丙烯酰胺、甘油、甘氨酸等试剂均为国产分析纯. pH

7.4 的 PBS 缓冲液组成为: 20 mmol/L 磷酸钠, 120 mmol/L 氯化钠, 0.02% 叠氮化钠。

() $A\beta_{1-40}$ 的预处理、纤维化和浓度测量。将 $A\beta_{1-40}$ 溶解在 TFA 中, 浓度 5 mg/mL, 室温静置 30 min, 完全溶解后用氮气吹干。再用 DMSO 配成 10 mg/mL 的溶液 (2.31 mmol/L), 于 -20°C 保存备用^[17]。使用时, 将 $A\beta_{1-40}$ 溶于 PBS, 使其终浓度为 0.231 mmol/L (1 mg/mL), 作为新鲜溶液用于 SEC 或 native PAGE 实验。

取 50 μL 0.231 mmol/L 的新鲜 $A\beta_{1-40}$ 溶液, 加入 450 μL PBS 缓冲液 (pH 7.4), 在 37°C 温箱中孵育 14 d。然后稀释 10 倍后取适量滴在云母表面, 经冲洗、干燥后用原子力显微镜 (NanoScope 型, 美国 Veeco 公司) 观察、确认纤维的形成。

配置浓度分别为 50, 25, 12.5, 6.25 和 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 的 $A\beta_{1-40}$ 溶液。用 ÄKTA prime 色谱分离系统 (Amersham Pharmacia Biotech, 瑞典) 得到不同浓度样品洗脱曲线面积积分值与蛋白浓度的直线相关关系, 据此计算待测样品中 $A\beta_{1-40}$ 的浓度。

() 利用 SEC 分离分析 $A\beta_{1-40}$ 寡聚体。ÄKTA prime 色谱分离系统的色谱柱内径 16 mm, 长 300 mm, 凝胶填料为 Superdex75, 其球蛋白分离范围为 3~70 kD, 检测波长为 UV 280 nm。洗脱液为 PBS 缓冲液 (pH 7.4)。上样体积 0.3 mL, 洗脱流速 1 mL/min, 操作温度为室温。标准蛋白包括: 牛血清白蛋白 (Albumin, 67 kD)、卵清蛋白 (Ovalbumin, 43 kD)、糜蛋白酶原 A (Chymotrypsinogen A, 25 kD)、核糖核酸酶 A (Ribonuclease A, 13.7 kD) 及用于测量空体积的蓝色葡聚糖 2000 (Blue Dextran 2000)。由于标准蛋白的最小分子量较大, 为增加标准曲线的可信度而引入胰岛素作为建立标准曲线的蛋白之一。所有样品上柱前 $10000\times g$ 离心 5 min, 除去不溶性聚集物。用回归分析建立标准曲线, 计算 $A\beta$ 待测样品中寡聚体的分子量。进行 $A\beta_{1-40}$ 可溶性寡聚体的分离时, 样品浓度为 0.231 mmol/L (1 mg/mL), 收集洗脱峰用于后续实验。观察 $A\beta_{1-40}$ 寡聚体形成的动态过程时, 将 $A\beta_{1-40}$ 原液加 PBS 缓冲液配制成浓度为 0.231 mmol/L 的溶液后, 置于 37°C 温箱中; 间隔 3, 6 h 和 1, 2, 3, 5 及 10 d 后, 每次取出 300 μL 做 SEC 分析。

() 非变性凝胶电泳分析 $A\beta_{1-40}$ 寡聚体。Hoefer miniVE 垂直电泳系统 (Amersham Biosciences, 瑞典), 浓缩胶浓度: 3.6%, 分离胶的浓度分为 10.4% 和

15.5% 两种情况, 胶体积: $100\times 100\times 1$ mm。20 μL 样品加 5 μL 上样缓冲液 (甘油, 40% (质量体积比); 溴酚蓝, 0.01% (质量体积比), 0.5 mol/L Tris-HCl, pH 6.8) 混匀后立即上样。电泳液为 tricine 缓冲液 (Tris 碱, 3.0% (质量体积比); 氨基乙酸, 1.44% (质量体积比), pH 8.3)。起始电压 80 V, 待样品进入分离胶后增加到 180 V, 溴酚蓝到达凝胶底部边缘时停止。电泳后用染色液 (乙醇, 25% (体积比); 醋酸, 10% (体积比); 考马斯亮蓝 R-250, 0.25% (质量体积比)) 染色 20 min, 固定 30 min, 脱色至背景清晰, 扫描成像。 $A\beta_{1-40}$ 的样品浓度为 0.231 mmol/L, 在观察聚集动力学变化时, 将其置于 37°C 温箱中; 间隔预定时间后混匀, 每次取 20 μL 先冻存于 -20°C 冰箱中, 待达到 6 个样品后同时电泳。

() 海马神经细胞的急性分离和原代培养。实验动物为出生 24 h 内的 SD 大鼠乳鼠 (北京大学医学部实验动物中心), 具体方法参照文献^[18]。

() 细胞内游离 Ca^{2+} 荧光探针的负载和检测。负载方法参考文献^[18]。将染色好的细胞放在 Olympus IX71 型倒置荧光显微镜的载物台上, 观察细胞的状态及负载情况。激发条件: Fluo-3/AM 激发波长为 488 nm, 发射波长为 530 nm。先拍摄加样前的荧光照片, 作为静态基线。然后加入样品, 立即开始检测细胞内 Fluo-3/AM 荧光强度的变化。每 15 s 扫描一张, 5 min 后每 1 min 扫描一张, 连续 30 min。图像采集设备为高灵敏度 CCD (DVC 1412-B/W, 美国)。荧光强度以积分光密度值 IOD (integrated optical density of fluorescence intensity) 表示。以相对荧光强度 (RFI) 表示加入样品前后荧光强度的变化, $\text{RFI} = F_m - F_0 / F_0$ (F_m : 加样后荧光强度; F_0 : 加样前荧光强度)。为了确定细胞的机能状态, 对每批细胞先观察加入 KCL 刺激细胞钙内流的反应。

() 资料分析及数据处理。使用 Image-Pro Plus 软件 (Version 4.5.0.29, Media Cybernetics Inc.) 对一个视野内所有细胞的荧光图像进行 IOD 分析。

2 结果与讨论

2.1 $A\beta_{1-40}$ 可溶性三聚体的存在

根据文献报道, 在水溶液中 $A\beta_{1-40}$ 的可溶性寡聚体结构包括从单体、二、三、四聚体到更高分子量的寡聚体^[3-5, 19, 20]。一般认为, $A\beta_{1-40}$ 寡聚体的形成与分布受多种因素的调控, 如缓冲液极性、离子强度、化

学配位、pH等;另外,肽的浓度和种子效应等也有很大影响^[12,21].由于 $A\beta_{1-40}$ 的不同盐形式对其聚集动力学具有很强的影响^[4],实验中对 $A\beta_{1-40}$ 多肽进行了预处理,保障样品均一性.采用SEC和native-PAGE电泳进行 $A\beta_{1-40}$ 可溶性寡聚体的分离分析可以最大程度地保障样品的原初状态,避免对寡聚体结构和分布的影响^[21-23].

图 1(a)为新配制的 $A\beta_{1-40}$ 溶液的SEC洗脱曲线,主要由主峰B和峰C组成(A峰与色谱柱空体积一致).峰B的洗脱容积平均为 20.86 mL,根据标准曲线(图 1(b))计算,峰B中寡聚体的分子量平均为 13.5 kD.由于胰岛素分子量与 $A\beta$ 相近,并且在中性溶液中主要以二聚体的形式存在,而在低浓度和酸性溶液条件下倾向于作为单体存在^[24].故我们将胰岛素分别溶解在 20 mmol/L的PBS缓冲液(pH 7.4)和 100 mmol/L的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 3.0)中(终浓度均为 0.2 mmol/L),进一步分析比较了胰岛素和 $A\beta_{1-40}$ 溶液洗脱峰的位置(图 2(a)).胰岛素在洗脱液为PBS缓冲液(pH 7.4)时,主峰的洗脱容积为 22.33 mL,大于 $A\beta_{1-40}$ B峰的洗脱容积.由于胰岛素在此种溶液条件下以二聚

体的形式存在^[24],提示 $A\beta_{1-40}$ B峰寡聚体的分子量大于胰岛素二聚体的分子量(11.6 kD).另一方面,B峰的洗脱容积又大于标准蛋白核糖核酸酶A (13.7 kD)的洗脱容积(19.1 mL),提示其组分中的分子量小于 13.7 kD.因此,B峰主要成分的分子量应介于 11.6~13.7 kD之间.此范围对应于 $A\beta_{1-40}$ 三聚体的分子量(12.9 kD),并与上述回归方程计算的结果接近.

图 2(b)为 $A\beta_{1-40}$ 和胰岛素的非变性蛋白电泳结果. $A\beta_{1-40}$ 新鲜溶液从电泳最前沿向后依次显示出比较清晰的四条等距离迁移带,各条带间距离基本一致,但含量不同,第 3 条带显色最深.经 SEC 分离的 $A\beta_{1-40}$ B 峰显示一条浅色的电泳带,迁移位置正好对应于 $A\beta_{1-40}$ 的第 3 条带.胰岛素二聚体只显示一条迁移带,位于 $A\beta_{1-40}$ 的第 2 和 3 条带之间.由于胰岛素的等电点(PI 5.30)与 $A\beta_{1-40}$ 的等电点(PI 5.31)非常接近,故二者迁移速度受电荷差异的影响较小.上述结果提示 4 个条带应分别对应于 $A\beta_{1-40}$ 的单体和二、三、四寡聚体,其中以三聚体的量为最多.此分析结果与 SEC 的结果一致,即 B 峰应是由 $A\beta_{1-40}$ 的三聚体组成.

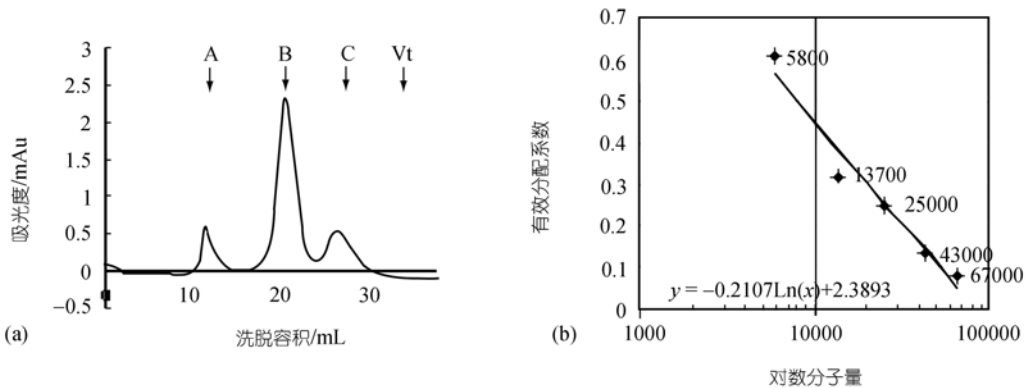


图 1 $A\beta_{1-40}$ 新鲜溶液中的寡聚体

(a) $A\beta_{1-40}$ 新鲜溶液的 SEC 洗脱曲线. 洗脱容积: A 峰(11.2 mL), B 峰(20.8 mL), C 峰(26.1 mL), 总容积 V_t (36 mL). (b) 蛋白质分子量的标准曲线

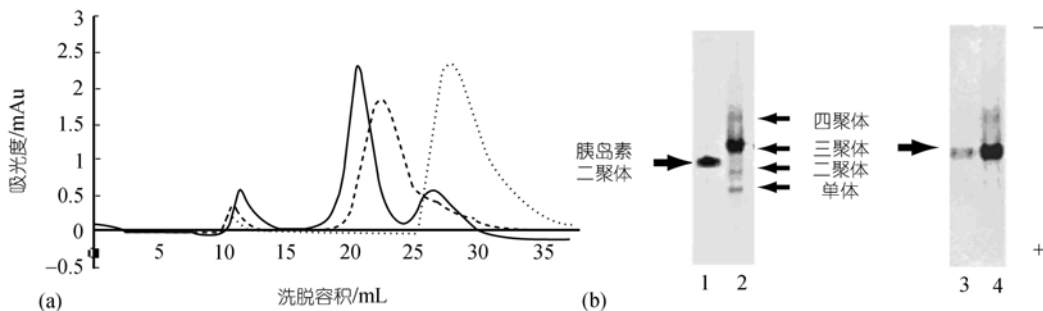


图 2 胰岛素和 $A\beta_{1-40}$ 新鲜溶液的结果对比

(a) SEC 色谱图. —, $A\beta_{1-40}$ 洗脱峰(B 峰为 20.8 mL); ---, 胰岛素(pH 7.4, PBS 缓冲液, 22.3 mL); ····, 胰岛素(pH 3.0, 柠檬酸盐缓冲液, 26.7 mL). (b) 非变性蛋白电泳图. 泳道 1, 胰岛素; 泳道 2 和 4, $A\beta_{1-40}$; 泳道 3, SEC 洗脱液 B 峰

胰岛素在柠檬酸盐缓冲液(pH 3.0)中洗脱时,其主峰后移到 26.7 mL,此时胰岛素的存在形式为单体^[24]. A β_{1-40} C峰洗脱容积的平均值为 26.52 mL (26.259~27.139 mL),与前者接近. 根据标准曲线推算C峰中寡聚体所对应的分子量为 4.8 kD (4.1~5.2 kD),略大于A β_{1-40} 单体的分子量(4.3 kD). 而非变性电泳结果显示在第3条带前有两条浅色的迁移带,再考虑C峰的峰型比较宽(图 3(a)). 因而,C峰有可能是单体和二聚体的混合物. 由于SEC中C峰的洗脱峰幅度均较低,A β 含量少,进行native-PAGE电泳时未能显示其迁移带. Bitan等人^[25]的结果表明,低分子量A β 在SEC分离的过程中,实际上是处于迅速解离和聚合状态下的小寡聚体的混合物,没有单一的成分. 这与本SEC实验结果一致.

2.2 三聚体在 A β_{1-40} 纤维形成中的动力学变化

图 3(a)的 SEC 结果显示,随着孵育时间延长,A β_{1-40} 溶液中各组分洗脱峰的位置没有明显变化,但 B 峰和 C 峰的强度却逐渐降低, B 峰的变化更明显. 直到孵育的第 10 天, A 峰和 B 峰间无新峰出现,提示没有新的寡聚体形成. 由于 Superdex75 凝胶颗粒有效分离的最大相对分子量为 70 kD,说明没有小于 70 kD 的其他寡聚体存在. A 峰对应于 SEC 的空体积位置,理论上只要能够进入凝胶颗粒间隙,分子量大于 70 kD 的 A β 聚合物都有可能在 A 峰中存在.

native-PAGE 的结果显示(图 3(b)),在最初的 10 h 内,4 条迁移带位置基本没有变化,也未出现新的条带. 2 d 后电泳条带出现明显的“脱尾”和“纹理”现象,提示有溶解性较差、甚至不溶性的物质存在,持续数天后逐渐减少. 三聚体条带在整个孵育的大部分时间内一直比较明显,随时间延长,它和整个条带一样

渐渐变淡,最后一同消失. 图 3(b)的(1)图中电泳使用的分离胶浓度为 10.4%,理论上的分子量分离范围为 15~100 kD^[26]. 因而,这些不溶性的颗粒有可能与 SECA 峰中大于 70 kD 的球形粒子相吻合,其最终减少和消失很可能聚合形成了更大的聚集产物.

A β 纤维化是一个自发的与“成核”密切相关的过程,而“种子”的形成,既可来自异质疏水界面,也可由 A β 分子本身聚合而成^[27,28]. 本研究结果表明,A β_{1-40} 三聚体在整个纤维的聚集过程中一直作为一个主要的成分存在,是 A β 纤维生成中的基本中间体之一,为纤维的形成和生长提供连续不断的基本成分. 因此,不排除三聚体本身作为种子或以其作为基本成分聚合形成球形种子,而引发纤维生成的可能. 武一等人^[29]曾观察 A β_{1-40} 在 37 °C 孵育时的聚集过程:首先出现被称为伪球状的聚集核心,然后再相互聚集出现宽度为 10 nm 呈条状的聚集物,同时也有长度为 200 nm 的长纤维. 条状聚集物和纤维的尺寸随着孵育时间的延长而沿着长轴的方向成长,典型长度为 400~500 nm. 继续孵育后形成宽度为 10 nm 长度超过 1 μ m 的成熟纤维. 这一聚合过程与纤维生成的理论一致,但缺少伪球状核心形成之前的观察. 而本研究的结果为种子的形成提供了更详细的实验资料.

2.3 A β_{1-40} 三聚体对神经细胞内游离 Ca²⁺浓度的影响

胞内游离钙浓度的变化常会导致细胞功能改变,甚至会引起细胞的死亡. 许多研究显示,在 AD 和其他淀粉样疾病中细胞内钙离子平衡的破坏,细胞内

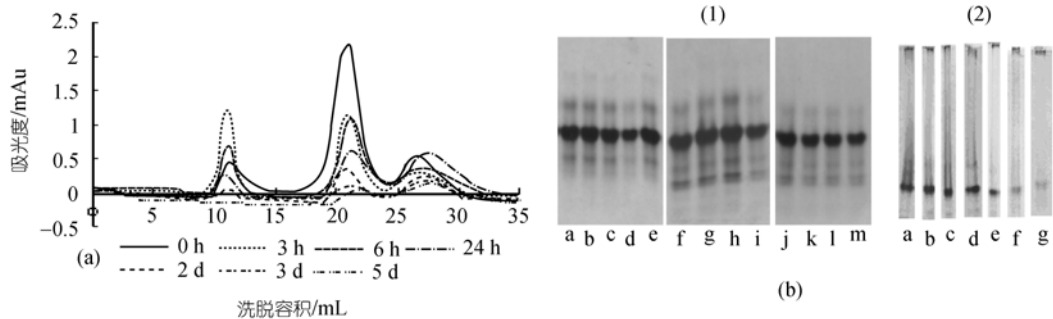


图 3 A β_{1-40} 孵育不同时间的各寡聚体的动态变化

(a) 体积排阻色谱图. (b) 非变性电泳结果,其中(1)是 15.4% 的分离胶, a~m 分别是孵育 0, 10, 20, 30, 40 min 及 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 h; (2)是 10.4% 的分离胶, a~g 分别为孵育 2, 3, 4, 6, 10, 12 和 13 d

游离钙水平的升高是引起神经细胞病理损害的关键因素和初始原因^[30,31]。为了观察细胞内钙离子变化模型的可行性,本实验首先观察了加入 PBS 缓冲液后细胞内静息钙离子荧光强度的变化。结果显示,在 25 min 内所有细胞钙离子荧光强度的平均值基本稳定。加入 90 mmol/L KCL 后,细胞内荧光强度在短时间内迅速增加,提示细胞机能状态良好^[18]。

图 4 和表 1 显示,向培养的海马神经细胞中加入 38 μmol/L Aβ₁₋₄₀ 纤维和 18 μmol/L Aβ₁₋₄₀ 的三聚体后,IOD 值的增加与加样前相比,有非常显著差异($P < 0.01$);在 10 μmol/L 三聚体组加样前后的差异也有显著性($P < 0.05$),而在加入 18 μmol/L 纤维组,差异无显著意义($P > 0.05$)。

从图 5 可见,纤维化的 Aβ₁₋₄₀ 在 38 μmol/L 时对神经元内钙离子浓度变化的影响明显大于在 18 μmol/L 时的作用,而且钙离子增加出现的时间很快。三聚体所引起的钙离子增加出现和增加缓慢;作用持续时间较长,钙离子一直维持在较高水平。而且,在同样浓度(18 μmol/L)条件下,Aβ₁₋₄₀ 三聚体所引起的相对荧光强度(RFI)的变化较其纤维组大,在观察期末没有降低。上述结果提示,Aβ₁₋₄₀ 三聚体所致钙离子增加的作用比其纤维要强。最近, Demura 等人^[32]报道了

有关 Aβ₁₋₄₂ 的单体、球形寡聚体(直径 2~5 nm,分子量 90 kD)及其纤维的研究,结果发现,加入球形寡聚体后,SH-SY5Y 细胞内钙离子水平在几秒内迅速升高,然后逐渐降低;而加入相同浓度的单体和纤维则无此作用。

本研究结果还显示,加入 Aβ₁₋₄₀ 后神经细胞的钙离子反应有不同的模式(表 2)。高浓度的 Aβ₁₋₄₀ 纤维在大多数神经元(70.9%)引起钙浓度明显迅速的增加,然后长时间保持在较高水平(M1 模式)。但在 2 个纤维浓度组,有小部分神经元(18%左右)的钙离子浓度在急剧上升后,又迅速下降到基值左右(M3 模式)。在三聚体组出现钙离子增加的神经元数(75%)少于纤维组(95.2%),并且没有快速增加和降低的表现。但在 18 μmol/L 时,三聚体比纤维引起更多神经元(37.5%)的钙离子浓度持续增加(M2 模式)。10 μmol/L 的三聚体虽然也引起许多神经元的细胞内钙离子增加,但其 RFI 比其他组的要小(图 5)。有些细胞(约 15%~25%)加入三聚体后,最初没有表现,在几分钟之后才缓慢出现荧光,并逐渐增加强度(M 模式),在纤维组则没有这种表现。这些现象与先前的报道类似^[17,18,32]。不同的反应方式可能与 Aβ 引起细胞内钙离子浓度升高的不同机制有关。

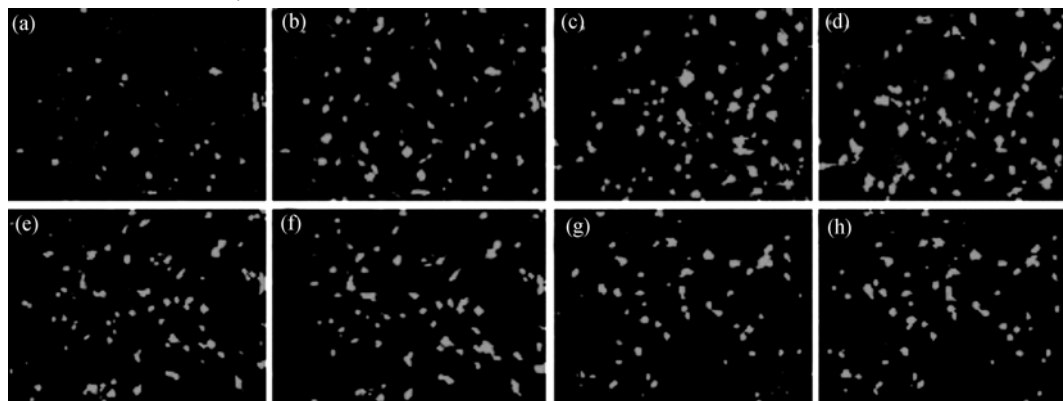


图 4 可溶性和纤维化的 Aβ₁₋₄₀ 对海马神经细胞内钙离子浓度的影响

(a)和(b) 38 μmol/L Aβ₁₋₄₀ 纤维 0 和 10 s; (c)和(d) 18 μmol/L Aβ₁₋₄₀ 纤维 0 和 5 s; (e)和(f) 18 μmol/L Aβ₁₋₄₀ 三聚体 0 s 和 15 min; (g)和(h) 10 μmol/L Aβ₁₋₄₀ 三聚体 0 s 和 6 min. 每组所选照片是加入 Aβ 后钙离子浓度变化最大者

表 1 Aβ₁₋₄₀ 纤维和三聚体对海马神经细胞内钙离子浓度(IOD)的影响^{a)}

组	样本数(n)	0 min	1 min	10 min	20 min
Aβ纤维 (38 μmol/L)	60	2.06±2.19	4.14±3.46**	4.57 ±3.45**	4.19±3.17**
Aβ纤维 (18 μmol/L)	48	3.83±2.07	4.74±3.42	4.14±2.74	4.05±3.05
Aβ三聚体 (18 μmol/L)	36	1.38±1.25	1.40±1.26	1.96±1.57**	2.44±2.24**
Aβ三聚体 (10 μmol/L)	39	1.65±1.31	1.81±1.12	2.07±1.31*	2.08±1.24

a) 平均值±标准差; 与样品加入前相比: *示 $P < 0.05$; **示 $P < 0.01$. IOD, 荧光强度积分光密度值

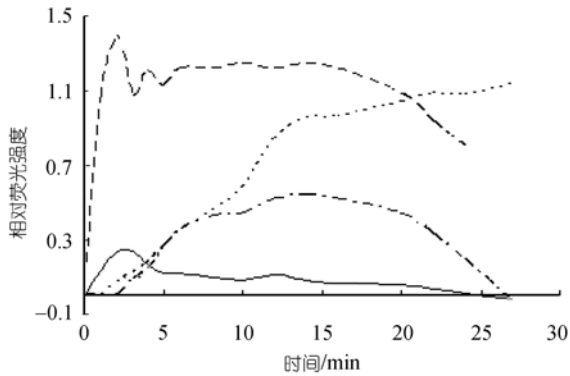


图5 Aβ₁₋₄₀ 纤维和三聚体引起的海马神经元细胞内钙离子浓度变化的典型过程
---, 38 μmol/L 纤维; —, 18 μmol/L 纤维; ···, 18 μmol/L 三聚体; -·-, 10 μmol/L 三聚体

表2 Aβ₁₋₄₀ 纤维和三聚体引起的细胞内钙离子浓度变化的不同模式^{a)}

钙离子反应模式	Aβ ₁₋₄₀ 纤维		Aβ ₁₋₄₀ 三聚体	
	38 μmol/L n = 62	18 μmol/L n = 56	18 μmol/L n = 48	10 μmol/L n = 53
M1	70.97%	42.86%	22.92%	50.94%
M2	6.45%	25.0%	37.5%	-
M3	19.35%	17.86%	-	-
M4	-	-	14.58%	22.64%
M5	4.84%	14.29%	25.0%	26.42%

a) 钙离子变化的不同模式: M1, 迅速增加后缓慢降低; M2, 增加后不降低; M3, 迅速增加后快速明显降低; M4, 延迟后缓慢增加和降低; M5, 无变化

目前就此现象已提出的几种解释: Aβ与细胞膜发生直接作用而破坏了膜结构的稳定^[33,34]; Aβ插入膜内形成阳离子通道^[35,36]; Aβ激活了细胞膜表面受体引起钙内流^[37,38]; 由于继发的氧化作用使线粒体钙平衡调节失调^[2]等。由于在许多研究中, 钙离子的增加很快出现, 故可排除基于代谢损害、钙泵功能障碍引起的继发作用。我们曾报道钙离子浓度升高主要是由细胞外钙内流所致^[18]。因为螯合细胞外液中钙离子后, 可溶性和纤维化Aβ₁₋₄₀对细胞内钙离子浓度均无影响, 使用电压依赖型钙通道特异阻断剂和Aβ自身通道特异阻断剂后的结果提示, 可溶性Aβ₁₋₄₀引起的钙离子内流与电压调控的钙通道有部分关系, 而纤维化Aβ₁₋₄₀自组装形成的钙通道是其导致钙升高的主要原因。Demuro等人^[32]使用钙通道非特异阻断剂后, 未发现Aβ对钙离子升高有影响, 因而不支持钙内流是通过膜上钙通道进入的。而且, 他们还证明Aβ₁₋₄₂的球形寡聚体可通过直接对膜的作用引起荧光

染料Fluo-3从细胞内漏出, 而Fluo-3是多阴离子分子, 不可能通过阳离子通道, 因此Aβ本身在细胞膜上形成阳离子通道的解释难以成立。另外, Demuro等人的研究也证明去除细胞外液中钙离子时, Aβ₁₋₄₂的球形寡聚体仍会引起小幅度的钙离子浓度增加, 提示存在细胞内钙的缓慢释放, 其表现为延迟、缓慢、幅度低。概括本研究中钙离子的反应模式可见, 纤维化的Aβ₁₋₄₀引起的钙离子增加迅速, 而Aβ₁₋₄₀三聚体的作用出现较慢。虽然浓度有一定影响, 但这种趋势还是较明显的, 提示二者增加钙内流的机制不同。后者可能是通过影响钙泵功能或自组装钙通道而起作用的, 并且由于其所引起的钙离子浓度升高也呈现一定的可逆性, 因此通过直接破坏膜结构发生作用的可能性较小。当然, 对于Aβ₁₋₄₀三聚体生物效应的分子机制, 有待进一步的实验研究。

3 结论

研究利用SEC和非变性凝胶电泳, 分析了Aβ₁₋₄₀在溶液中的存在状态, 并初步确定了Aβ₁₋₄₀在聚集发生的早期以可溶性三聚体结构形式为主, 同时也包含部分二聚体和单体形式; 随聚集过程的发展, 没有监测到其他可溶性寡聚体形式, 表明三聚体结构形式可能为Aβ₁₋₄₀聚集的基本结构单元之一。在此基础上, 利用SEC分离得到Aβ₁₋₄₀三聚体, 细胞实验表明其可以显著促进神经细胞内钙离子浓度升高, 并强于聚集纤维的影响, 但与Aβ₁₋₄₀聚集纤维所导致的钙升高模式有所不同; 暗示Aβ₁₋₄₀聚集过程中各种结构形式可能以不同模式影响细胞正常功能。研究为深入探索Aβ₁₋₄₀聚集的分子机理、了解AD发生的分子基础提供了一定的理论依据。

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 20273002, 20103001)。

参 考 文 献

- 1 Kaye R, Head E, Thompson J L, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 2003, 300: 486-489 [DOI]
- 2 Mattson M P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 2004, 430: 631-639 [DOI]
- 3 Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, et al. Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid β peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol*, 1991, 218: 149-163 [DOI]
- 4 Barrow C J, Yasuda A, Kenny P T M, et al. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid β-peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol*, 1992, 225: 1075-1093 [DOI]

- 5 Soreghan B, Kosmoski J, Glabe C. Surfactant properties of Alzheimer's A beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation. *J Biol Chem*, 1994, 269: 28551-28554
- 6 Klein W L, Krafft G A, Finch C E. Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci*, 2001, 24: 219-224 [DOI]
- 7 Selkoe H J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002, 297: 353-356 [DOI]
- 8 Wang J, Dickson D W, Trojanowski J Q, et al. The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol*, 1999, 158: 328-337 [DOI]
- 9 McLean C A, Cherny R A, Fraser F W. Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 1999, 46: 860-866 [DOI]
- 10 Dodart J C, Bales K R, Gannon K S. Immunizations reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci*, 2002, 5: 452-457
- 11 Lambert M P, Barlow A K, Chromy B A, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β ₁₋₄₂ are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 6448-6453 [DOI]
- 12 Lue L F, Kuo Y M, Roher A E, et al. Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 1999, 155: 853-862
- 13 Teller J K, Russo C, Debusk L M, et al. Presence of soluble amyloid A β -peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nat Med*, 1996, 2: 93-95 [DOI]
- 14 Harper J D, Wong S S, Lieber C M, et al. Assembly of A β amyloid protofibrils: An *in vitro* model for a possible early event in Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 1999, 38: 8972-8980 [DOI]
- 15 Gong Y S, Chang L, Lambert M P, et al. Nonfibrillar A β toxins in AD: Presence of ADDLs and ADDL-binding proteins in Alzheimer's disease brains. *Soc Neurosci Abstr*, 2001, 27: 322.10
- 16 Huang T H J, Yang D S, Plaskos N P. Structural studies of soluble oligomers of the Alzheimer β -amyloid Peptide. *J Mol Biol*, 2000, 297: 73-87 [DOI]
- 17 Zou P, Ding Y N, Sha Y L, et al. Humanin peptides block calcium influx of rat hippocampal neurons by altering fibrogenesis of A β ₁₋₄₀. *Peptides*, 2003, 24: 679-685 [DOI]
- 18 马晓翠, 沙印林, 林克春, 等. A β 对神经细胞膜通透性及胞内游离 Ca²⁺的影响. *科学通报*, 2003, 48(8): 802-806
- 19 Bush A I, Pettingell W H, de Paradis M, et al. Modulation of A β adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *J Biol Chem*, 1994, 269: 12152-12158
- 20 Zagorski M G A, Barrow C. NMR studies of amyloid-peptides: Proton assignments, secondary structure, and mechanism of an-helix-sheet conversion for a homologous, 28-residue, N-terminal fragment. *J Biochem*, 1992, 31: 5621-5631 [DOI]
- 21 Nichols M R, Moss M A, Reed D K. Growth of β -Amyloid₍₁₋₄₀₎ Protofibrils by monomer elongation and lateral association: Characterization of distinct products by light scattering and atomic force microscopy. *Biochemistry*, 2002, 41: 6115-6127 [DOI]
- 22 Walsh D M, Lomakin A, Benedek G B, et al. Amyloid beta-protein fibrillogenesis: Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem*, 1997, 272: 22364-22372 [DOI]
- 23 Jackson T H, Yang D S, Plaskos N P. Structural studies of soluble oligomers of the Alzheimer β -amyloid peptide. *J Mol Biol*, 2000, 297: 73-87 [DOI]
- 24 Ma X H, Chen W Z, Zhuang Y, et al. Effect of electrostatic and hydrophobic interaction on the stability of insulin dimer. *Acta Biophysica Sinica*, 2001, 17(2): 329-336
- 25 Bitan G, Lomakin A, Teplow D B. Amyloid β -protein oligomerization: Prenucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 35176-35184 [DOI]
- 26 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999. 123-124
- 27 Jarrett T, Berger E P, Lansbury P T. The carboxy terminus of beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implication for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 1993, 32: 4693-4697 [DOI]
- 28 Harper J D, Lansbury P T Jr. Model of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid protein. *Annu Rev Biochem*, 1997, 66: 385-407 [DOI]
- 29 武一, 吉尚戎, 蒋伍玲, 等. β 淀粉样蛋白 1-40 和 1-42 聚集性质比较. *电子显微学报*, 2003, 22(1): 21-24
- 30 Berridge M J, Bootman M D, Lipp P. Calcium-a life and death signal. *Nature*, 1998, 395: 645-648 [DOI]
- 31 Yankner B A, Duffy L K, Kirschner D A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, 1990, 250(4978): 279-282
- 32 Demuro A, Mina E, Kaye R, et al. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem*, 2005, 280: 17294-17300 [DOI]
- 33 El-Agnaf O M A, Mahil D S, Patel B P, et al. Oligomerization and toxicity of β -amyloid-42 implicated in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res*, 2000, 237: 1003-1007 [DOI]
- 34 Gibson G, Gunasekera N, Lee M, et al. Oligomerization and neurotoxicity of the amyloid ADan peptide implicated in familial Danish dementia. *J Neurochem*, 2004, 88: 281-290
- 35 Arispe, N. Architecture of the Alzheimer's A beta ion channel pore. *J Membr Biol*, 2004, 197: 33-48 [DOI]
- 36 Hirakura Y, Lin M C, Kagan B L. Alzheimer amyloid A β ₁₋₄₂ channels: Effects of solvent, pH, and Congo Red. *J Neurosci Res*, 1999, 57: 458-466 [DOI]
- 37 Garzon W, Sepulveda-becerra M, Milton S. Soluble amyloid A β ₁₋₄₀ exists as a stable dimer at low concentrations. *J Biol Chem*, 1997, 272: 21037-21044 [DOI]
- 38 Soreghan B. Surfactant properties of Alzheimer's A β peptides and the mechanism of amyloid aggregation. *J Biol Chem*, 1994, 269: 28551-28556

(2005-09-21 收稿, 2005-12-28 接受)