

PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 同步诱导 BV-2 小胶质细胞趋化及增殖活性的研究

涂 健^{1,2}, 杨利峰¹, 祁克宗², 周向梅¹, 尹晓敏¹, 赵德明^{1*}

(1. 中国农业大学国家海绵状脑病实验室, 北京 100193; 2. 安徽农业大学动物科学学院, 合肥 230036)

摘 要: 通过检测传染性海绵状脑病(TSEs)及阿尔茨海默病(AD)的 PrP 和 A β 毒性蛋白同步诱导小胶质细胞趋化与增殖活性, 旨在初步揭示 TSEs 及 AD 的致病机制及重新评估 TSEs 危害公共卫生安全的风险。以 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 和 A β ₁₋₄₂ 为研究对象, 以 BV-2 小胶质细胞为实验细胞, 构建 25~100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 和 2.5~10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 A β ₁₋₄₂ 以及两者不同浓度比例混合物侵染 BV-2 细胞的实验模型, 比较多肽及其混合物诱导 BV-2 的趋化指数(CI)、增殖指数(PI)以及 MCP-1、TGF- β 1 的表达水平, 同步进行上述参数的相关性分析。结果表明: 与 PBS 组及蛋白对照组相比, 25~100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 2.5~10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂ 均上调 BV-2 的 CI、PI 及表达 MCP-1、TGF- β 1 水平($P < 0.05$); 两种多肽不同浓度混合物同步诱导 BV-2 的 CI、PI 值及 MCP-1、TGF- β 1 表达水平均大于单一蛋白分别诱导相同参数值, 但却小于两种蛋白分别诱导相同参数值之和; 两者诱导 BV-2 CI、PI 及 MCP-1 表达水平均呈现多肽低浓度依赖性 & 处理时间依赖性, 但当多肽达到高浓度或长诱导时间(PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ > 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; A β ₁₋₄₂ > 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 诱导时间 > 12 h)时, 这 3 种参数都进入平台期, 但 BV-2 表达 TGF- β 1 水平持续上升; PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 对 BV-2 RCI 与 MCP-1 水平呈正相关。结果提示, 两种多肽均能上调 BV-2 的 CI、PI 及表达 MCP-1、TGF- β 1 水平, 并引起这些参数有规律的变化, 两者在蛋白水平同步诱导 BV-2 上述参数有明显的拮抗作用。

关键词: PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶; A β ₁₋₄₂; BV-2 小胶质细胞; 细胞趋化; 细胞增殖

中图分类号: S852.659.7

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)10-1699-12

PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ and A β ₁₋₄₂ Peptides Induce Simultaneously BV-2 Microglia Chemotaxis and Proliferation

TU Jian^{1,2}, YANG Li-feng¹, QI Ke-zong², ZHOU Xiang-mei¹, YIN Xiao-min¹, ZHAO De-ming^{1*}

(1. National Animal TSE Lab, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) and Alzheimer's disease (AD) belong to a growing family of neurodegenerative disorders that is characterized by the generation of toxic protein aggregates in affected brains (PrP^{Sc} and A β in TSEs and AD, respectively). At present, clinical and experimental evidence indicates the coexistence of PrP and A β amyloid deposits in affected brain tissues. Based on these pathological and mechanistic similarities, relationship between TSEs and AD should be further investigated. In this study, we examined the activation of BV-2 microglial chemotaxis and proliferation as well as BV-2 cell secretion of MCP-1 and TGF- β 1 after treatment with aggregated forms of PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ and A β ₁₋₄₂ (separately and together) *in vitro* in an attempt to understand how protein aggregates can modulate microglial processes in TSEs and AD. We treated BV-2 microglia with PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ or A β ₁₋₄₂ peptides individually at three different con-

收稿日期: 2014-07-01

基金项目: 国家自然科学基金(30771622; 31001048)

作者简介: 涂 健(1980-), 男, 安徽安庆人, 讲师, 博士, 主要从事动物疫病病理与生物防治研究, Tel: 0551-65786305, E-mail: tujian1980@126.com

* 通信作者: 赵德明, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

centrations ($25-100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ and $2.5-10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β_{1-42}) or with a mixture of PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ and A β_{1-42} peptides at specified concentrations for 6-24 h. BV-2 microglia chemotaxis, proliferation, and MCP-1 and TGF- β 1 secretion were measured and compared between treatments. The results demonstrate that PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ and A β_{1-42} peptides induce increases in all four parameters from 6-12 h. However, the measured indices plateaued beyond 12 h in BV-2 cells treated $>50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ or $>5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β_{1-42} , with the exception of TGF- β 1 secretion, which continued to increase gradually. Overall, the results of this study indicated that PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ and A β_{1-42} peptides induce increases in all four parameters from 6-12 h and these two peptides have obviously antagonistic effects in inducing microglial chemotaxis and proliferation simultaneously at the protein level.

Key words: PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶; A β_{1-42} ; BV-2 microglia; chemotaxis; proliferation

传染性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathies, TSEs)作为一类动物和人的神经退行性疾病,是危害畜禽产业发展及公共卫生安全的重要人畜共患病。TSEs的病原是异常的、致病性的朊蛋白(PrP^{Sc}),其由机体正常的朊蛋白(PrP^C)转变而来^[1-2]。在中国,基于公共卫生安全的考虑,尚无 PrP^{Sc} 毒性蛋白用于相关的研究,因此在国内如何开展 TSEs 的发病机制研究成为一个难点, PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 是一种人工合成的朊蛋白(prion protein) 106-126 残基的小肽,它位于朊蛋白的中心区,具有 PrP^{Sc} 类似的理化特性^[3],因此 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 可作为替代 PrP^{Sc} 研究 TSEs 发病机制的理想模型。

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)也称老年性痴呆,是一种以进行性痴呆为症状的神经退行性疾病^[4],其特征性的病理改变之一为大脑皮质和海马细胞外老年斑(senile plaque, SP)的形成,SP的核心成分为大量纤维状 β -淀粉样蛋白(beta-amyloid protein, A β), A β 是 β 淀粉样前体蛋白(APP)的正常代谢产物,APP在脑内经 A β 源途径加工产生39~43个氨基酸的 A β 片段,其中由1~42个氨基酸组成的蛋白质片段,称 A β_{1-42} ^[5],越来越多的证据表明 A β_{1-42} 的异常沉积是 AD 发病的初始因素,在其发病机制中具有核心和关键的作用,目前已广泛应用于研究 AD 的发病机制及治疗方案^[6-7]。

TSEs 及 AD 均属于神经退行性疾病,两者之间拥有很多共同的发病特征及相似的发病机理^[8-10],2009年 M. Cisse 等报道 PrP 蛋白是 AD 病程发展的重要介质^[11],另外很多临床证据也显示在感染 TSEs 或者 AD 的患者(畜)神经组织中有 PrP 和 A β 异常蛋白共存的现象^[12-15],这就暗示 TSEs 及 AD 这两种疾病可能存在某种联系,并产生了一种

新的推测:两种疾病是否会产生促进作用,导致感染风险的增加和病情的加剧,这将提高 TSEs 危害公共卫生安全的风险,可能会导致人们的恐慌和对畜牧业发展的阻碍,因此,急需开展一系列的试验探讨两者的联系,尤其是两者在发病学方面是否存在协同作用。

小胶质细胞(microglia, MG)是存在于中枢神经系统内具有免疫活性的巨噬细胞样细胞,在 TSEs 及 AD 的发病过程中,异常蛋白 PrP^{Sc} 及 A β 在患者(畜)脑中的出现,均能激活本处于休眠状态的该细胞,使其聚集在异常蛋白周围,这一过程的病理学意义尚待研究阐明。BV-2 细胞系为 E. Blasi 等在 1990 年应用携带癌基因 *v-raf/v-myc* 的反转录病毒 J2 感染原代培养的小鼠小胶质细胞而获得的永生细胞系^[16],该细胞系基本具备原代培养的小胶质细胞的形态学、表型以及各项功能特点。

TSEs 及 AD 病程中活化的小胶质细胞是疾病发生发展过程的重要参与者,通过释放一系列细胞因子介导脑内免疫反应,其中包括趋化因子及转化生长因子。趋化因子是细胞因子领域中结构同源的大家族,具有细胞趋化作用,其中单核细胞趋化因子(MCP-1/CCL2)是一种非常重要的 CC 类趋化因子,研究发现,在感染 TSEs 及 AD 的小鼠模型的脑组织中会出现该趋化因子的上调^[17-18],并被认为是神经组织损伤的标志。TGF- β 是一类多功能的多肽类转化生长因子,属于调节细胞生长和分化的超家族分子,其生物学活性极为广泛, TGF- β 家族包括 5 个成员,分别是 TGF- β 1~5, TGF- β 1 是神经组织对炎症及损伤反应的调节因子,不仅在 AD 发病模型中被发现与对照组相比有明显升高,同时在 TSEs 发病过程中可能是具有主导性的细胞调节因子^[19]。

基于以上分析,作者选择 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶及 A β ₁₋₄₂作为研究 TSEs 及 AD 的毒性多肽,建立不同浓度两种多肽侵染 BV-2 小胶质细胞不同时间的试验模型,通过体外试验比较两种多肽在诱导小胶质细胞趋化指数、增殖指数及表达 MCP-1、TGF- β 1 水平的差异及其关系,并设置不同浓度比例的两种多肽混合蛋白物同步侵染 BV-2 小胶质细胞的模型,探讨 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶及 A β ₁₋₄₂毒性多肽在诱导小胶质细胞上述参数方面是否存在协同或拮抗作用,以期为初步揭示两种疾病的致病机制提供支撑。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶及 PrP^{scr}多肽的处理 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶为人细胞型朊蛋白毒性多肽,氨基酸序列为 KT-NMKHMAGAAAAGAVVGGLG,同时合成 PrP^{scr}多肽片段(scramble prion protein106-126)作为蛋白对照,其氨基酸组成与 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶毒性蛋白相同,但顺序是随机排列,氨基酸序列为 AVGM-HAGKGLANTAKAGAMVG,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。多肽以 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶于纯洁无菌的 PBS(细胞用 pH=7.0)中,置于室温下 3~4 d 不定时轻微搅动,使其形成有毒性的纤维状多聚物^[20],存储于-20 $^{\circ}\text{C}$,备用。

1.1.2 A β ₁₋₄₂及 A β ₄₂₋₁多肽的处理 A β ₁₋₄₂毒性多肽片段及 A β ₄₂₋₁反序对照多肽片段均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。这两种多肽的处理方法参照参考文献^[21~22],将购买的 A β ₁₋₄₂及 A β ₄₂₋₁多肽悬浮于超纯水中配成 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 1 周,使其形成有毒性的纤维状多聚物,存储于-20 $^{\circ}\text{C}$,备用。

1.1.3 细胞 鼠骨髓来源的小胶质细胞系 BV-2 购自美国标准菌株及培养物保藏中心(ATCC)。细胞培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 (Hyclone),1 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸盐,100 U $\cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素,100 mg $\cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素。细胞培养在 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO₂ 培养箱中。

1.2 试验分组

将处理好的 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶及 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂毒性多肽用完全培养基[含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 (Hyclone),100 U $\cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素,100 mg $\cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素]按照不同的浓度倍比稀释后分成 20 个试验组,并将 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

PrP^{scr}及 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₄₂₋₁多肽按照相同倍比稀释作为对照组,试验分组及多肽浓度见表 1。

1.3 BV-2 小胶质细胞的处理

BV-2 小胶质细胞用 DMEM-F12 完全培养基悬浮成 1 $\times 10^5$ cells $\cdot \text{mL}^{-1}$,按照 3 $\times 10^4$ cells $\cdot (250 \mu\text{L} \cdot \text{孔})^{-1}$ 加入 96 孔板中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h。等到细胞完全贴壁后,吸取并弃去上层培养基,将 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ (25、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、A β ₁₋₄₂多肽(2.5、5、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)或者是两种多肽的混合物(25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ + 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂) 250 μL 加入每孔中,同时将 PrP^{scr}(100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、A β ₄₂₋₁多肽(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)最高浓度溶液及多肽混合溶液或毒性多肽非纤维混合物作为对照多肽(100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₄₂₋₁, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP^{scr} + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂, 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 非纤维化 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ + 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 纤维化 A β ₄₂₋₁, 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 纤维化 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ + 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 非纤维化 A β ₄₂₋₁), DMEM-F12 完全培养基作为阴性对照,每个试验组设 6 个重复($n=6$),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 6、12、24 h。经过不同的培养时间后,每个试验组的细胞培养上清液收集起来用于小胶质细胞间接趋化指数检测, MCP-1 及 TGF- β 1 表达水平的检测,而在 96 孔内贴壁的 BV-2 小胶质细胞则用于后续的 MTT 细胞增殖指数测定。

1.4 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶及 A β ₁₋₄₂同步诱导 BV-2 小胶质细胞的趋化活性测定

采用趋化小室进行趋化性迁移试验,PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ (25、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、A β ₁₋₄₂多肽(2.5、5、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)或是两种多肽的混合物(25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ + 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂)按照不同的浓度作为直接趋化溶液,分别加于 48 孔趋化小室的下层孔中,每孔 27 μL ,同时将 PrP^{scr}(100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、A β ₄₂₋₁多肽(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)最高浓度溶液及多肽混合溶液或毒性多肽非纤维混合物作为对照多肽, DMEM-F12 完全培养基作为阴性对照,同样加入下层孔中。每个样品设 6 个复孔($n=6$)。收获对数生长期的 BV-2 细胞,用含 0.1% FBS 的 DMEM-F12 培养基将细胞密度调整至 2 $\times 10^6$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,加于

表 1 试验分组及多肽浓度

Table 1 The peptides' concentration in each experimental group

 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别 Group	多肽浓度 Peptides' concentration							
	PrP ¹⁰⁶⁻¹²⁶ 蛋白	PrP ¹⁰⁶⁻¹²⁶	PrP ^{scr} 蛋白	PrP ^{scr}	A β_{1-42} 蛋白	A β_{1-42}	A β_{42-1} 蛋白	A β_{42-1}
a 组 Group a*	—	—	—	—	—	—	—	—
b 组 Group b	—	—	100	—	—	—	—	—
c 组 Group c	100(F)	—	—	—	—	—	—	—
d 组 Group d	50(F)	—	—	—	—	—	—	—
e 组 Group e	25(F)	—	—	—	—	—	—	—
f 组 Group f	—	—	—	—	—	—	—	10
g 组 Group g	—	—	—	—	10(F)	—	—	—
h 组 Group h	—	—	—	—	5(F)	—	—	—
i 组 Group i	—	—	—	—	2.5(F)	—	—	—
j 组 Group j	100(F)	—	—	—	—	—	—	10
k 组 Group k	—	—	100	—	10(F)	—	—	—
l 组 Group l	100(F)	—	—	—	10(F)	—	—	—
m 组 Group m	50(F)	—	—	—	5(F)	—	—	—
n 组 Group n	25(F)	—	—	—	2.5(F)	—	—	—
o 组 Group o**	25(N)	—	—	—	2.5(F)	—	—	—
p 组 Group p**	25(F)	—	—	—	2.5(N)	—	—	—

*. a 组作为空白对照,仅为 DMEM-F12 完全培养基; **. o 组、p 组即在协同诱导 BV-2 小胶质细胞的试验中设置的单个多肽未形成纤维化的蛋白对照组。F. 纤维化;N. 非纤维化

*. Group a has only DMEM-F12 complete medium (control); **. Group o or Group p has non-fibrillar PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ or A β_{1-42} peptides respectively (control peptides). F. Fibrillar;N. Non-fibrillar

上层孔中,每孔加 50 μL 。两层之间用 8 μm 孔径的聚碳酸膜隔开,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱孵育 3.5 h 后,收膜,70%乙醇固定,苏木素-伊红染液染色。在高倍镜(400 \times)下,随机选取 5 个视野,计数细胞,取平均值,计算趋化指数^[23-24],趋化指数(chemotactic index 简称 CI) = 试验组趋化细胞数/DMEM-F12 阴性对照趋化细胞数。同步将上述多肽与 BV-2 小胶质细胞共培养 6、12、24 h,收集上清液作为间接趋化物,按上述方法计算间接趋化指数,将 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β_{1-42} 毒性多肽诱导 BV-2 细胞直接或间接趋化指数做了一个增长率分析,即计算相对趋化指数(relative CI,RCI),RCI 的计算公式为 RCI = 间接趋化指数 CI/直接趋化指数 CI。

1.5 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β_{1-42} 同步诱导 BV-2 小胶质细胞增殖效应的 MTT 测定

如前所述,将 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶、A β_{1-42} 或者两种多肽的混合物 250 μL 加入含有贴壁 BV-2 3×10^4

cells $\cdot (250 \mu\text{L} \cdot \text{孔})^{-1}$ 96 孔板的每个孔中,同时将 PrP^{scr}、A β_{42-1} 最高浓度溶液及多肽混合溶液或毒性多肽非纤维混合物作为对照多肽,DMEM-F12 完全培养基作为阴性对照,每个试验组设 6 个重复($n=6$),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 6、12、24 h。经过不同的处理时间后,吸去培养基,加入 100 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 的 DMEM-F12 medium 培养基(不含血清)及 50 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 的 MTT 溶液,同时设放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中避光反应 4 h,取出后弃上清,每孔加入 150 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ DMSO 溶液作为反应终止液,在 570 nm 检测每孔的吸光度,BV-2 细胞增殖率(proliferation index,PI) = 试验组吸光度/阴性对照组吸光度^[25]。

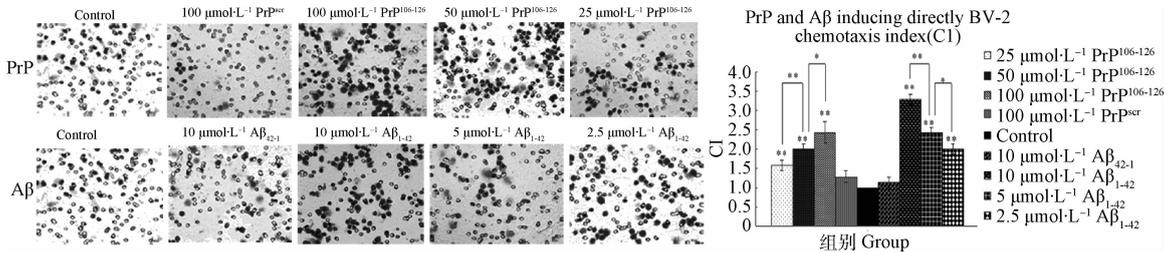
1.6 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β_{1-42} 同步诱导 BV-2 细胞表达 MCP-1、TGF- β 1 水平的测定

如前所述,将 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶、A β_{1-42} 多肽或两种多肽的混合物 250 μL 加入含有贴壁 BV-2 的每个孔中,

同时设对照组,每个试验组设 6 孔($n=6$),在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 6、12、24 h。收集上清液,使用 ELISA 检测试剂盒(中国武汉博士德生物工程有限公司)检测 MCP-1、TGF- β 1 水平,严格按照说明书的步骤操作,依据标准品质量浓度对应的吸光度建立标准曲线,根据样品的吸光值计算出样品的 MCP-1、TGF- β 1 质量浓度($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

1.7 统计分析

所有数据用“ $\bar{x} \pm s_x$ ”表示各组数据,各试验组均设 6 个重复($n=6$),使用 SAS software version 9.2 软件,用 One-way 和 Two-way 分析法(ANOVA)对数据进行差异分析,两组数据时间的差异用 P 值表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。



使用 1.2.3 中的方法用趋化小室及显微镜(289 \times)计算 CI。数值用 $\bar{x} \pm s_x$ 表示($n=6$);各试验组与空白对照组(只含 DMEM-F12 完全培养基)、蛋白对照组(PrP^{scr}或 A β ₁₋₄₂)数值的差异性用对应柱上方的 * 或 ** 标示;同时各试验组间数值的差异性用对应柱之间连接线上方的 * 或 ** 标示。* , $P < 0.05$, 差异显著; ** , $P < 0.01$, 差异极显著。下同

CI_s were evaluated using a Micro-Chemotaxis Chamber (289 \times) and are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM, $n=6$). Significant differences of the data among the experimental peptide treatments and control (DMEM-F12 complete medium) or control peptides (PrP^{scr} or A β ₁₋₄₂) are marked by * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$ over the respective bars (comparisons between the experimental peptide treatments and the controls) or over the lines linking the respective bars (comparisons among the experimental peptide treatments). The same as below

图 1 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶及 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽直接诱导 BV-2 小胶质细胞趋化指数 (CI)

Fig. 1 The PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ or A β ₁₋₄₂ peptides inducing directly BV-2 chemotactic index (CI)

2.2 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶与 A β ₁₋₄₂不同培养时间间接诱导 BV-2 细胞趋化活性

为了检测 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶与 A β ₁₋₄₂毒性多肽对 BV-2 小胶质细胞的间接趋化作用,将 25 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶与 2.5 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂毒性多肽与 BV-2 细胞共培养 6、12、24 h,收集上清液作为间接趋化液计算其对 BV-2 小胶质细胞的趋化指数,并计算 RCI,结果见图 2。

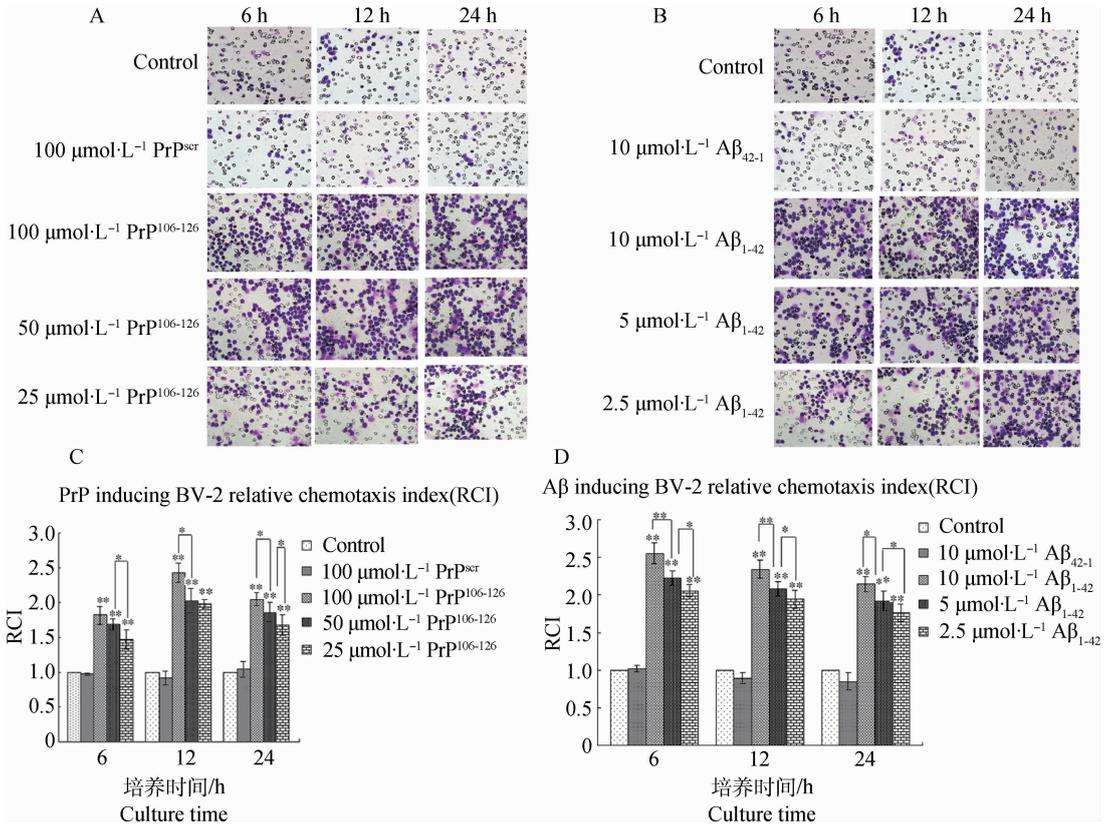
在 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶与 A β ₁₋₄₂间接趋化各试验组中,25 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶和 2.5 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂诱导 BV-2 小胶质细胞的间接趋化能力明显

2 结果

2.1 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶与 A β ₁₋₄₂直接诱导 BV-2 细胞趋化活性

将 25 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶与 2.5 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂毒性多肽作为直接趋化溶液计算其对 BV-2 小胶质细胞的 CI,结果如图 1。结果表明:在 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶与 A β ₁₋₄₂诱导 BV-2 各试验组中,与对照蛋白相比,PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶与 A β ₁₋₄₂毒性多肽对 BV-2 细胞都有明显的趋化效应,趋化指数差异显著($P < 0.01$),PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶与 A β ₁₋₄₂趋化指数毒性多肽对 BV-2 细胞的趋化指数有明显的剂量依赖性,PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶在 25 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内及 A β ₁₋₄₂在 2.5 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,均呈上升趋势。

高于直接趋化能力,因为 RCI 值均大于 1,提示这两种多肽有诱导 BV-2 细胞释放某些趋化因子或表达受体提升趋化能力的可能。25 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶和 2.5 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂诱导 BV-2 的 RCI 符合多肽低浓度依赖性,而在本试验中还发现其 RCI 值也符合短处理时间依赖性,即随着处理时间的延长,其 RCI 值持续升高。但试验结果还显示:PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶浓度大于 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 A β ₁₋₄₂浓度大于 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或在 12 h 处理时间之后,其 RCI 呈现出明显的平台期变化趋势,即 RCI 不再明显上升($P > 0.05$)。



使用 1. 2. 3 中的方法用趋化小室及显微镜(315×)计算 RCI

Relative CIs (RCIs) were evaluated using a Micro-Chemotaxis Chamber (315×)

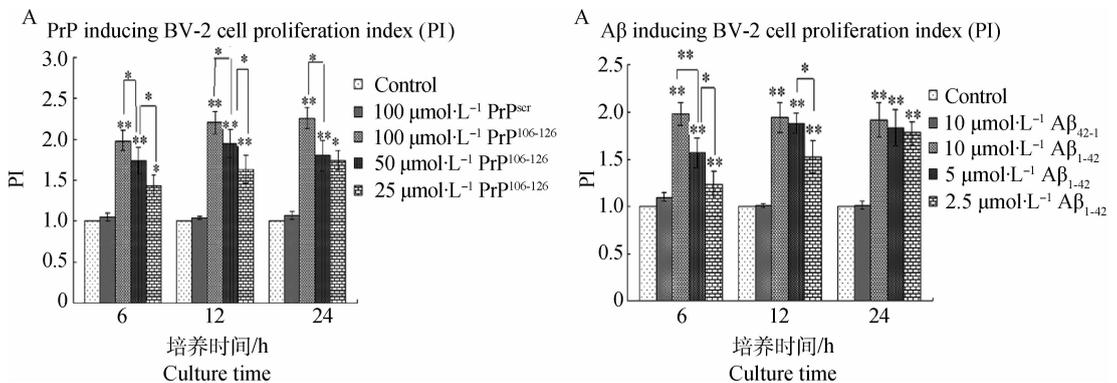
图 2 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 Aβ₁₋₄₂ 毒性多肽间接诱导 BV-2 小胶质细胞相对趋化指数 (RCI)

Fig. 2 The PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ or Aβ₁₋₄₂ peptides inducing indirectly BV-2 relative chemotactic index (RCI)

2.3 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 与 Aβ₁₋₄₂ 不同培养时间诱导 BV-2 细胞增殖活性

将 25 ~ 100 μmol · L⁻¹ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 2.5 ~ 10 μmol · L⁻¹ Aβ₁₋₄₂ 毒性多肽 250 μL 加入含有贴壁 BV-2 细胞的孔中,计算其对 BV-2 细胞增殖指数(PI)的影响(图 3)。结果表明:在 25 ~ 100 μmol · L⁻¹

PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 2.5 ~ 10 μmol · L⁻¹ Aβ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导 BV-2 小胶质细胞各试验组中,与对照蛋白相比,PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 与 Aβ₁₋₄₂ 毒性多肽处理细胞 6、12、24 h 后,BV-2 细胞均有明显的增殖现象(P < 0.01),从试验结果可以看出,两种毒性多肽诱导 BV-2 小胶质细胞增殖指数(PI)呈现多肽低浓度依赖性和处理时间



MTT 法计算相对增殖指数(PI)

The proliferation index (PI) were measured by MTT method

图 3 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 Aβ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导 BV-2 小胶质细胞增殖指数(PI)

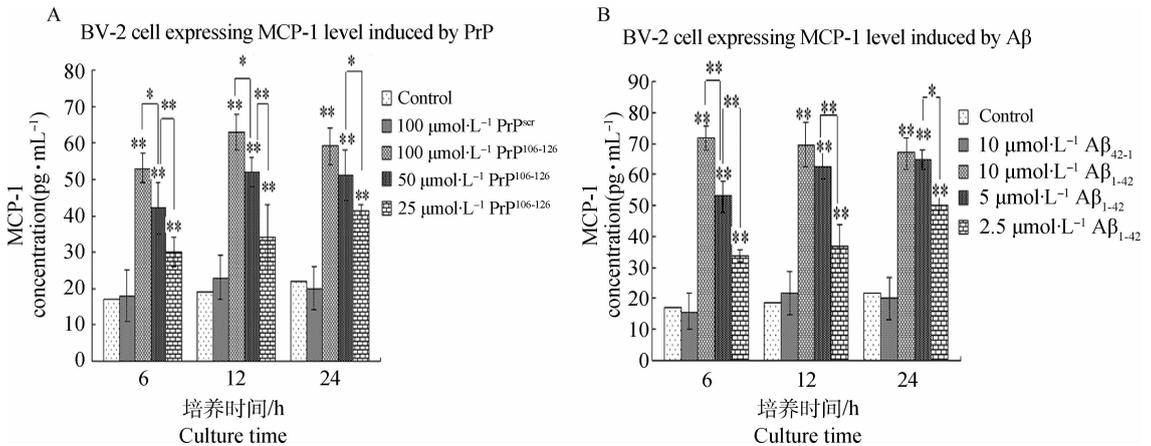
Fig. 3 The PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ or Aβ₁₋₄₂ peptides inducing BV-2 proliferation index (PI)

依赖性,当 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 浓度大于 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 A β ₁₋₄₂ 浓度大于 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,处理时间超过 12 h 之后,增殖指数(PI)值也进入了平台期,而无继续上升的趋势,这和 RCI 值变化的趋势相同。

2.4 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 与 A β ₁₋₄₂ 不同培养时间诱导 BV-2 表达 MCP-1 水平

25 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 与 2.5 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂ 毒性多肽与 BV-2 细胞共培养后收集上清液,使用 ELISA 检测试剂盒检测 MCP-1 质量浓度($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$),结果如图 4。结果表明:在所试验浓度范围内,PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽具有明显上调 BV-2 细胞表达 MCP-1 水平的作用,其细胞上清液中的 MCP-1 与 PrP^{scr}、A β ₁₋₄₂ 多肽的蛋白对照及 DMEM-F12 阴性对照组相比,差异显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。两种毒性多肽诱导 BV-2 小胶质细胞 6 ~ 12 h,其诱导 BV-2 小胶质细胞表达

MCP-1 水平同样具有明显的多肽低浓度依赖性及短处理时间依赖性,即随着毒性多肽浓度的提高,或者是处理细胞的时间延长,BV-2 表达的 MCP-1 水平呈现上升趋势,但当 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 多肽浓度大于 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或者 A β ₁₋₄₂ 多肽浓度大于 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时或在 12 h 多肽处理时间之后,其 MCP-1 表达水平上升趋势变缓,进入明显的平台期($P > 0.05$),这种趋势与 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 诱导 BV-2 小胶质细胞相对趋化指数(RCI)及增殖指数(PI)变化趋势一致,表明这三者之间可能存在某种联系。作者将 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导 BV-2 细胞不同共培养时间 RCI 与 MCP-1 的表达水平做了相关性分析,用 $\pm r$ 值表示。结果表明 RCI 值与 MCP-1 呈正相关关系(PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶: $r = +0.967$; A β ₁₋₄₂: $r = +0.990$),即 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽不同时间诱导趋化指数与 MCP-1 的表达水平正相关。



ELISA 法检测 MCP-1 表达水平($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

The concentration of MCP-1 in the supernatant was measured by ELISA

图 4 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导 BV-2 表达 MCP-1 水平($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

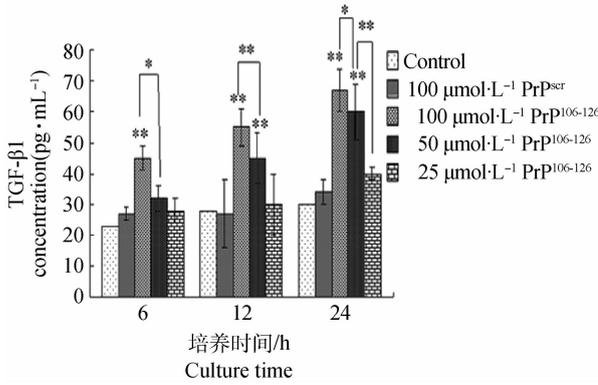
Fig. 4 BV-2 cell expressing MCP-1 level ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) induced by PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ or A β ₁₋₄₂ peptides

2.5 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 与 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导 BV-2 小胶质细胞表达 TGF- β 1 水平

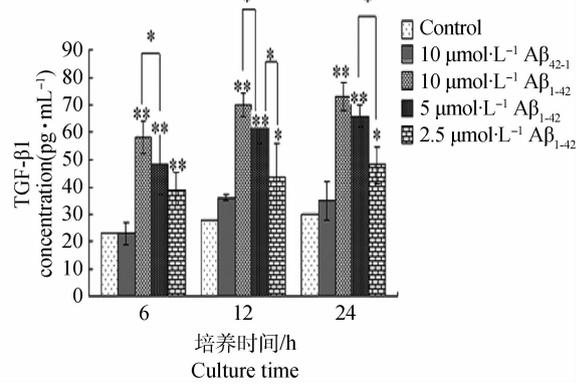
25 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 与 2.5 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂ 毒性多肽与 BV-2 细胞共培养后收集上清液,使用 ELISA 检测试剂盒检测 TGF- β 1 质量浓度($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$),结果如图 5。结果表明:50 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ (除 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养 6 h)及 2.5 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂ 毒性多肽具有明显上调 BV-2 细胞表达 TGF- β 1 水平的作用,其细胞上清液中的 TGF- β 1 浓度与 PrP^{scr} 及 A β ₁₋₄₂ 多肽的蛋白对照及与 DMEM-F12 培养基的阴性对照组相比差异显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。两种毒性多肽诱

导 BV-2 小胶质细胞 6 ~ 24 h 内,其诱导 BV-2 小胶质细胞表达 TGF- β 1 水平都具有明显的浓度依赖性及处理时间依赖性,即随着毒性多肽浓度的提高,或者是处理细胞的时间延长,其 BV-2 表达的 TGF- β 1 水平呈现持续上升趋势,这与 RCI、PI、MCP-1 表达水平进入平台期的变化趋势不同。将相同浓度 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导 BV-2 小胶质细胞相同时间后的趋化指数及 PI 值与 BV-2 细胞表达 TGF- β 1 水平之间关系进行相关性分析,用 $\pm r$ 值表示。结果显示 TGF- β 1 表达水平与相同浓度 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导 BV-2 小胶质细胞相同时间后的 CI 值、PI 值的相关性关系不明显($r < 0.5$)。

A BV-2 cell expressing TGF-β1 level induced by PrP



B BV-2 cell expressing TGF-β1 level induced by Aβ



ELISA 法检测 TGF-β1 表达水平 (pg · mL⁻¹)

The concentration of TGF-β1 in the supernatant was measured by ELISA

图 5 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 Aβ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导 BV-2 表达 TGF-β1 水平 (pg · mL⁻¹)

Fig. 5 BV-2 cell expressing TGF-β1 level (pg · mL⁻¹) induced by PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ or Aβ₁₋₄₂ peptides

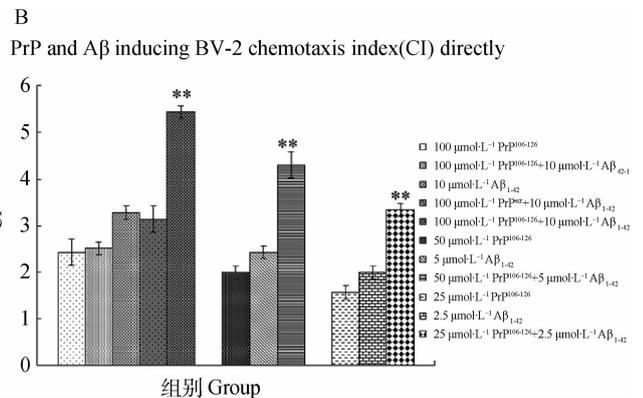
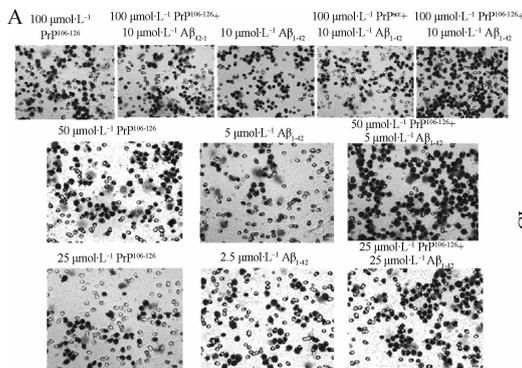
2.6 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 Aβ₁₋₄₂ 诱导 BV-2 小胶质细胞迁移、增殖活性及表达 MCP-1、TGF-β1 水平的比较

为了确定 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 Aβ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导 BV-2 小胶质细胞迁移、增殖活性及表达 MCP-1、TGF-β1 水平的差异,对 25~100 μmol · L⁻¹ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 2.5~10 μmol · L⁻¹ Aβ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导小胶质细胞趋化指数、PI 值及表达 MCP-1、TGF-β1 浓度进行差异分析,用 P 值表示。结果表明:被 Aβ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导的这四种参数与浓度高其 10 倍的 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 毒性多肽诱导的参数差异不显著(P>0.05)。

2.7 不同浓度比 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 与 Aβ₁₋₄₂ 同步诱导 BV-2 直接趋化活性

将 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 Aβ₁₋₄₂ 毒性多肽按确定的比例混合使用 DMEM-F12 培养基稀释形成特定的浓度

(表 1),计算 CI,并与同浓度单一多肽诱导的 CI 值进行比较,同时设 100 μmol · L⁻¹ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 混合 10 μmol · L⁻¹ Aβ₁₂₋₁ 多肽混合溶液及 100 μmol · L⁻¹ PrP^{scr} 混合 10 μmol · L⁻¹ Aβ₁₋₄₂ 多肽混合溶液作为蛋白对照,DMEM-F12 培养基作为阴性对照(图 6)。结果表明:不同浓度比例混合的 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 Aβ₁₋₄₂ 混合毒性多肽直接诱发 BV-2 小胶质细胞迁移的 CI 比单一多肽诱导的趋化指数明显增高,差异极显著(P<0.01),但是从 CI 值来看,它也小于单一多肽诱导趋化指数之和。同时结果还显示 100 μmol · L⁻¹ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 混合 10 μmol · L⁻¹ Aβ₁₂₋₁ 多肽混合溶液及 100 μmol · L⁻¹ PrP^{scr} 混合 10 μmol · L⁻¹ Aβ₁₋₄₂ 多肽混合溶液作为蛋白对照诱导的 CI 与未混合时单一多肽诱导的趋化指数相比,差



“+”表示两种多肽按照一定的浓度比例混合溶解于 DMEM-F12 完全培养基。A. 340 ×

“+” denotes that the two peptides were dissolved together in complete medium at the respective concentrations, A. 340 ×

图 6 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 Aβ₁₋₄₂ 毒性多肽同步诱导 BV-2 小胶质细胞直接趋化指数 (CI)

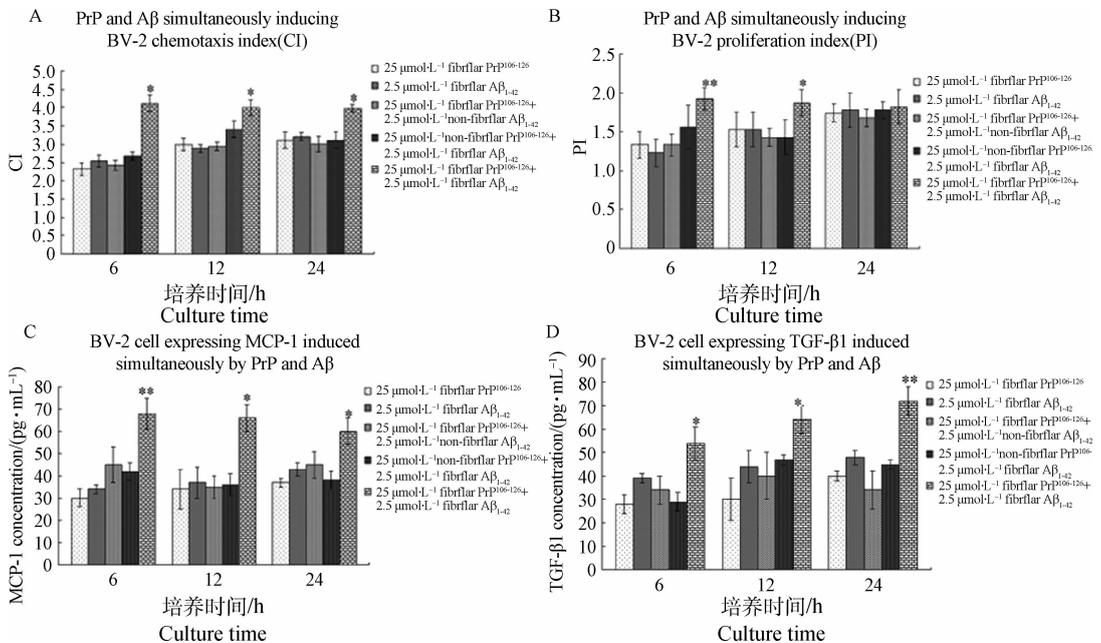
Fig. 6 The PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ or Aβ₁₋₄₂ peptides co-inducing directly BV-2 chemotactic index (CI)

异不显著($P>0.05$),这暗示从蛋白的水平来看,两种毒性蛋白诱导 BV-2 细胞的趋化能力存在明显的拮抗作用。

2.8 不同浓度比 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 与 A β ₁₋₄₂ 不同培养时间同步诱导 BV-2 趋化与增殖活性

将 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽用 DMEM-F12 培养进行稀释按确定的比例混合之后(此试验结果以 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 纤维化 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 混合 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 纤维化 A β ₁₋₄₂ 为例)加入培养了已贴壁 BV-2 小胶质细胞的 96 孔中,处理 6~24 h 收集培养液用于 CI、MCP-1 及 TGF- β 1 表达水平检测,结果见图 7。25

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂ 毒性多肽的混合多肽诱导 BV-2 小胶质细胞 6 h 内的 CI、PI 及表达 MCP-1、TGF- β 1 水平明显高于单因子诱导时的参数值,但是低于两种多肽单因子单独诱导时参数值之和,这与混合多肽作为直接趋化因子诱导的 CI 结果一致(见 2.7);超过 6 h 诱导时间之后至 24 h, BV-2 细胞的诱导后各项参数除 TGF- β 1 表达水平仍保持持续上升之外均进入明显的平台期,这一变化趋势与单一多肽诱导的三个参数进入平台期的变化趋势一致,但是出现的处理时间更短。



纤维化表示用 1.1 的方法处理多肽,非纤维化表示购买的多肽粉末直接溶解于溶剂中不处理。“+”表示两种多肽按照一定的浓度比例混合溶解于 DMEM-F12 完全培养基

Fibrillar peptides were prepared by the same methods used for the previous experiments, and non-fibrillar peptides were not treated and were dissolved as powder, “+” denotes that the two peptides were dissolved together in complete medium according at the respective concentrations

图 7 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽同步诱导 BV-2 CI、PI、MCP-1 和 TGF- β 1 表达水平

Fig. 7 The PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ or A β ₁₋₄₂ peptides co-inducing indirectly BV-2 CI, PI, MCP-1 and TGF- β 1

3 讨论

3.1 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 和 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽

TSEs 及 AD 均属于神经退行性疾病,两者之间拥有很多共同的显著发病特征及相似的发病机制,其中包括这两种疾病都会在神经组织中形成异常蛋白的聚集,造成神经组织的机能障碍。通过试验发现:25~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 2.5~10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导小胶质细胞趋化指数、PI 值及表达 MCP-1、TGF- β 1 浓度差异不显著

($P>0.05$)。因此,可以预测在相同的诱导浓度及诱导时间下, A β ₁₋₄₂ 比 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 更能诱导小胶质细胞激发强烈的免疫反应,毒性更强,这预示着在 TSEs 和 AD 两种神经退行性疾病的病程中, AD 可以引发神经组织更为强烈的炎症反应,但这一结果还有待体内试验证明。

在最近几年有许多研究发现 PrP^C 同 AD 病的重要前体蛋白淀粉样蛋白质 1 (amyloid precursor-like protein 1, APLP1) 以及淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 存在相互作用并对疾

病产生影响,但是具体是通过什么途径目前还不清楚。作者发现 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 在蛋白水平诱导小胶质细胞活性上存在拮抗作用,因此,推测 PrP^C 可能是 A β 异常蛋白积聚的重要因子,但是当其异构化成 PrP^{Sc},这种促进作用消失,说明两者可能存在共同的细胞调节信号通路。

3.2 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 和 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽与小胶质细胞

小胶质细胞存在于中枢神经系统,是脑内主要的免疫效应细胞,发挥免疫保护、结构支持、神经营养作用,对感染、受伤等因素很敏感,受到刺激后活化,获得一些特殊功能:增殖、迁移、吞噬、分泌促炎性介质等等,在 TSEs 及 AD 发病过程中,小胶质细胞会聚集在具有病理特征的异常蛋白周围,而这种小胶质细胞募集的现象对机体来说是有益的的还是有害的,目前还存在很多争议。

本试验中,25~100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 2.5~10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂ 毒性多肽直接诱导 BV-2 小胶质细胞迁移,在与 BV-2 共培养 6、12、24 h 后,其间接指数有明显升高,而其对 BV-2 细胞也有明显的促增殖作用,因此推断:在 TSEs 及 AD 病程中,聚集在 PrP^{Sc} 或 A β 异常蛋白周围的小胶质细胞可能既来源于异常蛋白周围的小胶质细胞增殖也来源于异常蛋白对外周小胶质细胞的趋化,但这一推论还需要体内试验证明。

本试验还发现:低浓度的 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ (< 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 A β ₁₋₄₂ (< 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导小胶质细胞较短时间内 (< 12 h),其趋化指数、PI 值、MCP-1 及 TGF- β 1 都符合浓度依赖性 & 处理时间依赖性,即随着毒性多肽的浓度增加或者同一浓度多肽处理 BV-2 小胶质细胞的时间延长,其趋化指数及 PI 均呈现上调趋势,因此可以推断在 TSEs 及 AD 的发病早期,随着异常蛋白的浓度提高,会诱导小胶质细胞大量聚集,引发级联炎症反应。但是在高浓度的 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 毒性多肽 (> 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽 (> 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理时间超过一定时限后 (> 12 h),其对小胶质细胞的指标数,除 TGF- β 1 持续升高外,趋化指数、PI 及 MCP-1 水平均呈现平台期变化趋势,因此,可以推断小胶质细胞在受毒性多肽激活的过程中不会一直活跃,在高浓度毒性多肽持续刺激下可能会启动自我保护,并出现类似免疫耐受反应,结合其他报道,如随着 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 或 A β ₁₋₄₂ 多肽浓度上升及处理时间的延长,其对神经组织的损伤会加剧^[26-30],当小胶质细胞被

药物抑制后,毒性多肽刺激神经细胞的凋亡率会增加^[31]的结果,本试验为在 TSEs 及 AD 病程中小胶质细胞聚集对机体有益的观点提供了又一支撑。

3.3 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 和 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽与 MCP-1 及 TGF- β 1

在 TSEs 及 AD 发病过程中,PrP^{Sc} 或 A β 异常蛋白能诱导小胶质细胞聚集,并启动炎症反应,其特征之一就是会释放一系列前炎症介质及抗炎症介质的细胞因子,在这些因子中,MCP-1 及 TGF- β 1 已证明与 TSEs 及 AD 的发病机制有非常重要的关系。本试验发现:1) 25~100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 2.5~10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂ 毒性多肽具有明显上调 BV-2 细胞表达 MCP-1 水平的作用,其与 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP^{Sc} 及 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₄₂₋₁ 多肽的蛋白对照及与 DMEM-F12 培养基的阴性对照组相比,差异显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 2) 25~50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 2.5~5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导 BV-2 小胶质细胞 6~12 h 内,其诱导 BV-2 小胶质细胞表达 MCP-1 水平同样具有明显的浓度依赖性 & 处理时间依赖性; 3) MCP-1 表达水平与相同浓度 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导 BV-2 小胶质细胞相同时间后的趋化指数及 PI 呈现显著的正相关关系。根据这些试验结果,可以推测,在 TSEs 及 AD 异常蛋白聚集过程中,MCP-1 可能发挥前炎症因子的潜在功能,激活小胶质细胞的迁移及增殖活性,因此通过对脑组织中 MCP-1 水平的监测,有望预判这两种神经性退行性疾病异常蛋白的聚集。当然,小胶质细胞的迁移受到趋化因子及细胞表面受体的双重调节,因此在 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 和 A β ₁₋₄₂ 毒性多肽及其混合物与 BV-2 小胶质细胞共培养过程中,对其细胞表面受体的调节还需要更深入的研究。

TGF- β 1(转化生长因子- β 1) 作为 TSEs 及 AD 病理过程中的重要细胞因子,可能在发病机制上发挥多重功能。本试验表明:1) 50~100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ (除 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养 6 h) 及 2.5~10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂ 毒性多肽具有明显上调 BV-2 细胞表达 TGF- β 1 水平的作用,其细胞上清液中的 TGF- β 1 浓度与 PrP^{Sc} 及 A β ₄₂₋₁ 多肽的蛋白对照及与 DMEM-F12 培养基的阴性对照组相比差异显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 2) 25~100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 2.5~10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ A β ₁₋₄₂ 毒性多肽诱导 BV-2 小胶质细胞 6~12 h 内,其诱导 BV-2 小胶质细胞表达 TGF- β 1 水平同样具有明显的浓度依赖性

及处理时间依赖性。因此可以推测在 TSEs 及 AD 发病过程中, TGF- β 1 可能发挥抗炎功能, 即发病早期上调, 在异常蛋白浓度增加并持续刺激时承担下调炎症反应的作用, 但是 TGF- β 1 表达水平不进入平台期也可能是由于两种毒性多肽的浓度还没有达到诱导 TGF- β 1 进入平台期的浓度, 或 TGF- β 1 有其他变化规律, 这还有待进一步的试验阐明。

4 结 论

TSEs 病的毒性多肽 PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 在 25 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 AD 病的毒性多肽 A β ₁₋₄₂ 在 2.5 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可以上调 BV-2 小胶质细胞的趋化指数 (CD) 和增殖指数 (PI) 以及表达 MCP-1、TGF- β 1 水平, 并引起这些参数有规律的变化; PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ 及 A β ₁₋₄₂ 这两种多肽在蛋白水平同步诱导 BV-2 上述指标方面存在明显的拮抗作用。

参考文献:

- [1] KONTUREK P C, BAZELA K, KUKHARSKYY V, et al. Helicobacter pylori upregulates prion protein expression in gastric mucosa; a possible link to prion disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11 (48): 7651-7656.
- [2] SAFAR J, ROLLER P P, GAJDUSEK D C, et al. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(27): 20276-20284.
- [3] LE Y, YAZAWA H, GONG W, et al. Cutting edge: The neurotoxic prion peptide fragment PrP₁₀₆₋₁₂₆ is a chemotactic agonist for the G protein-coupled receptor formyl peptide receptor-like 1 [J]. *J Immunol*, 2001, 166(3): 1448-1451.
- [4] HUANG H C, JIANG Z F. Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2009, 16 (1): 15-27.
- [5] ANDREASEN N, BLENNOW K. CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2005, 107(3): 165-173.
- [6] ARISPE N, DOH M. Plasma membrane cholesterol controls the cytotoxicity of Alzheimer's disease A β (1-40) and (1-42) peptides [J]. *FASEB J*, 2002, 16 (12): 1526-1536.
- [7] CHROMY B A, NOWAK R J, LAMBERT M P, et al. Self-assembly of A β (1-42) into globular neurotoxins [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(44): 12749-12760.
- [8] POWERS J M, LIU Y, HAIR L S, et al. Concomitant Creutzfeldt-Jakob and Alzheimer diseases [J]. *Acta Neuropathol*, 1991, 83(1): 95-98.
- [9] HAINFELLNER J A, WANSCHITZ J, JELLINGER K, et al. Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease [J]. *Acta Neuropathol*, 1998, 96(2): 116-122.
- [10] VOIGTLÄNDER T, KLÖPPEL S, BIRNER P, et al. Marked increase of neuronal prion protein immunoreactivity in Alzheimer's disease and human prion diseases [J]. *Acta Neuropathol*, 2001, 101(5): 417-423.
- [11] CISSE M, MUCKE L. Alzheimer's disease: A prion protein connection [J]. *Nature*, 2009, 457 (7233): 1090-1091.
- [12] VEERHUIS R, BOSHUIZEN R S, FAMILIAN A. Amyloid associated proteins in Alzheimer's and prion disease [J]. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2005, 4(3): 235-248.
- [13] LAURÉN J, GIMBEL D A, NYGAARD H B, et al. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- β oligomers [J]. *Nature*, 2009, 457 (7233): 1128-1132.
- [14] TSUCHIYA K, YAGISHITA S, IKEDA K, et al. Coexistence of CJD and Alzheimer's disease: An autopsy case showing typical clinical features of CJD [J]. *Neuropathology*, 2004, 24(1): 46-55.
- [15] FERRER I, BLANCO R, CARMONA M, et al. Prion protein expression in senile plaques in Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2001, 101 (1): 49-56.
- [16] BLASI E, BARLUZZI R, BOCCHINI V, et al. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus [J]. *J Neuroimmunol*, 1990, 27(2-3): 229-237.
- [17] PRAT E, BARON P, MEDA L, et al. The human astrocytoma cell line U373MG produces monocyte chemotactic protein (MCP)-1 upon stimulation with β -amyloid protein [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 283 (3): 177-180.
- [18] CIESIELSKI-TRESKA J, GRANT N J, ULRICH G, et al. Fibrillar prion peptide (106-126) and scrapie prion protein hamper phagocytosis in microglia [J]. *Glia*, 2004, 46(2): 101-115.
- [19] ROTA E, BELLONE G, ROCCA P, et al. Increased intrathecal TGF- β 1, but not IL-12, IFN- γ and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients [J]. *Neurol Sci*, 2006, 27(1): 33-39.

- [20] STINE W B Jr, DAHLGREN K N, KRAFFT G A, et al. *In vitro* characterization of conditions for amyloid- β peptide oligomerization and fibrillogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(13): 11612-11622.
- [21] BAMBERGER M E, HARRIS M E, MCDONALD D R, et al. A cell surface receptor complex for fibrillar β -amyloid mediates microglial activation [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(7): 2665-2674.
- [22] BURDICK D, SOREGHAN B, KWON M, et al. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A β / β amyloid peptide analogs [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(1): 546-554.
- [23] DUNZENDORFER S, KASER A, MEIERHOFER C, et al. Dendritic cell migration in different micropore filter assays [J]. *Immunol Lett*, 2000, 71(1): 5-11.
- [24] KANEIDER N C, KASER A, DUNZENDORFER S, et al. Sphingosine kinase-dependent migration of immature dendritic cells in response to neurotoxic prion protein fragment [J]. *J Virol*, 2003, 77(9): 5535-5539.
- [25] KALLITHRAKA S, BAKKER J, CLIFFORD M N, et al. Correlations between saliva protein composition and some T-I parameters of astringency [J]. *Food Qual Prefer*, 2001, 12(2): 145-152.
- [26] YANG L F, ZHOU X M, YANG J M, et al. Aspirin inhibits cytotoxicity of prion peptide PrP₁₀₆₋₁₂₆ to neuronal cells associated with microglia activation *in vitro* [J]. *J Neuroimmunol*, 2008, 199(1-2): 10-17.
- [27] BRANDENBURG L O, LUCIUS R, TAMEH ABOLFAZL A, et al. Internalization and signal transduction of PrP₁₀₆₋₁₂₆ in neuronal cells [J]. *Ann Anat*, 2009, 191(5): 459-468.
- [28] BATE C, VEERHUIS R, EIKELENBOOM P, et al. Microglia kill amyloid- β 1-42 damaged neurons by a CD14-dependent process [J]. *Neuroreport*, 2004, 15(9): 1427-1430.
- [29] WANG Z F, WEI Z L, LI X M, et al. P1-241 A β ₁₋₄₂ can kill murine N2A neuroblastoma cells at nanomolar concentration [J]. *Neurobiol Aging*, 2004, 25(S2): S165-S171.
- [30] SUN Y X, CRISBY M, LINDGREN S, et al. Pravastatin inhibits pro-inflammatory effects of Alzheimer's peptide A β 1-42 in glioma cell culture *in vitro* [J]. *Pharmacol Res*, 2003, 47(2): 119-126.
- [31] KREUTZBERG G W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS [J]. *Trends Neurosci*, 1996, 19(8): 312-318.

(编辑 白永平)