

促红细胞生成素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞 tau 蛋白磷酸化的抑制作用

孙治坤 杨红旗 陆国强 丁健青 陈生弟

【摘要】 目的 探讨促红细胞生成素(Epo)对凝聚态 β 淀粉样蛋白 25-35 片段($A\beta_{25-35}$)诱导的 SH-SY5Y 细胞 tau 蛋白磷酸化的影响。方法 MTT 法观察不同浓度的 Epo(0、5、10、20、50 U)单独作用 24 h 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响;20 $\mu\text{mol/L}$ 的凝聚态 $A\beta_{25-35}$ 作用于 SH-SY5Y 细胞不同时间点 (0 min、30 min、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h) 后,Western blot 法检测 tau 蛋白磷酸化(Ser199、Ser396 及 tau1)水平的变化;观察不同浓度的 Epo(5、10、20 U)预处理细胞 3 h 后对 $A\beta_{25-35}$ 作用的影响以及 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002(50 $\mu\text{mol/L}$)预处理细胞 1 h 后 Epo 抑制作用受到的影响。结果 不同浓度的 Epo 作用 24 h 后,MTT 示细胞存活率无明显变化。20 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 作用不同时间点后,tau 蛋白 Ser396、Ser199 位点的磷酸化水平 3 h 时开始增加,6 h 达到最高峰,12 h 后又逐渐下降,24 h 时仍维持较高水平,与 0 min、30 min 时比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);而总的 tau 蛋白没有任何变化。5、10、20 U Epo 预处理均可有效地抑制 $A\beta_{25-35}$ 引起的 Ser396、Ser199 位点的磷酸化,与正常对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。LY294002 预处理细胞后,Epo 的作用受到抑制。结论 Epo 可通过 PI3K/Akt 途径对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 tau 蛋白磷酸化发挥抑制作用,本研究为研究 AD 的发病机制及探索新的有效治疗药物提供了重要的理论基础。

【关键词】 β 淀粉样蛋白; Tau 蛋白磷酸化; 促红细胞生成素; 阿尔茨海默病

【中图分类号】 R749 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)08-0757-04

Effect of erythropoietin on β -amyloid peptide-induced tau phosphorylation in SH-SY5Y cells
SUN Zhi-kun, YANG Hong-qi, LU Guo-qiang, DING Jian-qing, CHEN Sheng-di. Department of Neurology and Institute of Neurology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 20025, China

Corresponding author: CHEN Sheng-di, Tel: 021-64457249, Email: chen-sd@medmail.com.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of erythropoietin (Epo) on tau hyperphosphorylation induced by β -amyloid peptide 25-35 ($A\beta_{25-35}$) in SH-SY5Y cells. **Methods** MTT assay was employed to identify the changes in the viability of SH-SY5Y cells following Epo treatment at 0, 5, 10, 20, and 50 U. Western blot was used to detect the levels of tau phosphorylation at Ser396, Ser199 and Tau1 at different time points after treatment with 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$. The effect of a 3-hour Epo pretreatment at 5, 10, and 20 U on the actions of $A\beta_{25-35}$ was evaluated. The inhibitory effect of Epo on $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity after pretreatment with the PI3K/Akt inhibitor LY294002 was assessed to explore the possible mechanism of Epo. **Results** The viability of SH-SY5Y cells showed no obvious changes in response to Epo exposure at different doses. Western blot showed that $A\beta_{25-35}$ induced increased phosphorylation at Ser396 and Ser199 3 h after the treatment. The phosphorylation reached the peak level at 6 h after $A\beta_{25-35}$ treatment and gradually decreased after 12 h, but still maintained a significantly higher level at 24 h, compared with 0 min, 30 min ($P<0.05$). The total tau underwent no significant changes in response to $A\beta_{25-35}$ treatment ($P>0.05$). Epo pretreatment at 5, 10, and 20 U efficiently inhibited $A\beta_{25-35}$ -induced tau phosphorylation in comparison with that in the control cells ($P<$

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.08.001

基金项目:国家重点基础研究发展计划资助项目(2006cb500706);上海市重大基础研究项目(04DZ14005);上海市医学领军人才计划(LJ06003)

作者单位:200025 上海,上海交通大学医学院附属瑞金医院神经内科,上海交通大学医学院神经病学研究所
通信作者:陈生弟,电话:021-64457249,Email: chen-sd@medmail.com.cn

0.05), and application of LY294002 resulted in obvious inhibition of the effect of Epo. **Conclusion** Epo can inhibit $A\beta_{25-35}$ -induced tau phosphorylation via PI3K/Akt signaling pathway, and this finding provides an important theoretical basis for studying the pathogenesis and management of AD.

[Key words] β -amyloid peptide; Tau phosphorylation; Erythropoietin; Alzheimer's disease

促红细胞生成素(erythropoietin, Epo)是由胚胎肝脏和成人肾脏分泌的一种低分子糖蛋白,可促进造血前体细胞的增殖和分化,调节红细胞的生成。近年来的研究发现,Epo 在多种神经系统损伤模型中均具有保护作用^[1],故设想 Epo 在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)等神经变性疾病中也可能具有保护作用。新近研究表明,在 AD 的发病机制中, β 淀粉样蛋白($A\beta$)可通过激活多种蛋白激酶使 tau 蛋白出现过度磷酸化^[2]。本研究采用凝聚态 $A\beta_{25-35}$ 片断($A\beta_{25-35}$)作用于 SH-SY5Y 细胞,建立 tau 蛋白过度磷酸化的细胞模型,观察 Epo 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 tau 蛋白磷酸化有无影响,并探讨其作用环节,旨在为 AD 的防治探求新途径。

材料与方 法

一、药品与试剂

DMEM 高糖培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; $A\beta_{25-35}$ 、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、RIPA 细胞裂解液、鼠单克隆 β -actin 均购自美国 Sigma 公司;兔多克隆 tau 蛋白磷酸化特异性抗体(ps396 及 ps199)购自美国 BioSource 公司;鼠单克隆抗 tau(非磷酸化)抗体(tau1 识别总的 tau 蛋白)购自英国 Abcam 公司;人重组 Epo 购自美国 R&D 公司;LY294002 购自美国 Cell Signaling 公司;BCA 蛋白定量试剂盒、Western blot 化学发光检测试剂盒购自美国 Pierce 公司。

二、凝聚态 $A\beta_{25-35}$ 的制备

用超纯水将冻干的 $A\beta_{25-35}$ 溶解,配成 2 mmol/L 的储存液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,临用前于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 5~7 d,使其凝聚。

三、细胞培养和药物处理

SH-SY5Y 细胞(人神经母细胞瘤细胞,购自中科院上海生物化学和细胞生物学研究所)接种在直径为 10 cm 的培养皿(每皿 2×10^6 个细胞)和 96 孔培养板(1×10^4 个细胞)中,用 1:1 混合的 DMEM 和 F12 培养基培养,含体积比为 10%的胎牛血清、0.1 U/L 青霉素、100 ng/L 链霉素,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%的 CO_2 培养箱中培养,每 2 天更换一次培养基,隔 5~6 d 传代。当细胞进入对数生长期后进行实验,实验前 12 h 细胞换用无血清培养液,观察不同时间点(0 min、30 min、1 h、

3 h、6 h、12 h、24 h) $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ (国外学者报道 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 可有效地诱导 tau 蛋白磷酸化)对其的作用;观察 Epo 的作用时,在给予 $A\beta_{25-35}$ 前 3 h 加入 Epo;抑制剂 LY294002 于 Epo 加入前 1 h 加入,以检测其可能的信号传导通路。另设正常对照组细胞,不做任何处理。

四、细胞活力检测

通过 MTT 法观察不同终浓度(0、5、10、20、50 U)的 Epo 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响。细胞接种于 96 孔板 24 h 后加入不同浓度的 Epo,每个浓度设 4 个复孔,同时设与实验孔平行的空白对照,即除了不含细胞外其他条件相同的对照孔,最后比色时以对照孔调零。共同孵育 24 h 后更换培养基,每孔加入 180 μL 的培养基和 20 μL 的 MTT(5 mg/mL), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 4 h;弃培养液,每孔加入 200 μL DMSO, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;至结晶物充分溶解,在瑞典 Tecan 公司的多功能酶标仪(Sunrise 型号)上测定 570 nm 的吸光度值,以与正常对照组细胞吸光度值的比值作为相对细胞活力。

五、Western blot 检测

待药物处理一定时间后,将培养液吸弃,用预冷的 PBS 清洗 2 次,每皿加入 200 μL RIPA 细胞裂解液在冰面上裂解 20 min; $14\ 000\text{ r/min}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min,吸取上清,BCA 法进行蛋白定量。取等量蛋白(20 μg)进行 SDS-PAGE 电泳分离(美国 BIO-RAD 公司),先在恒压 100 V 下电泳约 20 min,随后 150 V 电泳 60 min;接着在 250 mA 的条件下电转膜 90 min,将蛋白转移至 PVDF 膜(美国 BIO-RAD 公司)上;5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入相应的一抗(ps396、ps199 的稀释度均为 1:1000,tau1 的稀释度为 1:2000, β -actin 的稀释度为 1:5000) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜;加入相对应的生物素化的二抗(稀释度均为 1:2000)室温下 2 h;再加入 ABC 复合物(美国 Vector 公司)室温 30 min,加入 DAB 显色液(美国 Vector 公司)。以 β -actin 为内参照,实验在相同的条件下重复 3 次。条带灰度处理用美国 BIO-RAD 公司的 Quantity-One 分析软件。

六、统计学处理

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS11.0 统计软件进行处理,方法采用方差分析及 LSD-*t* 检

验, $P \leq 0.05$ 示差异有统计学意义。

结 果

一、Epo 对细胞活力的影响

MTT 结果显示, 不同浓度的 Epo(0、5、10、20、50 U) 对 SH-SY5Y 细胞均无明显的细胞毒性作用, 细胞活力均在正常值范围内。

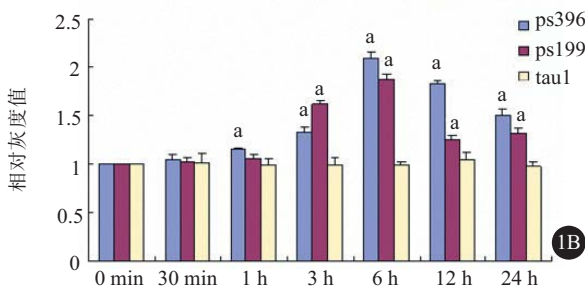
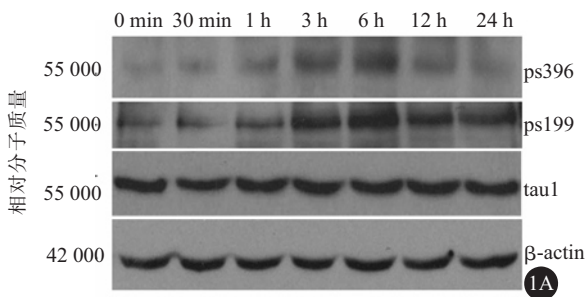
二、凝聚态 $A\beta_{25-35}$ 对 SH-SY5Y 细胞 tau 蛋白磷酸化水平的影响

20 $\mu\text{mol/L}$ 凝聚态 $A\beta_{25-35}$ 作用 SH-SY5Y 细胞 3 h 后, Western blot 检测示 tau 蛋白 Ser396、Ser199 位点的磷酸化水平 3 h 时开始增加, 6 h 达到最高峰, 12 h 后又逐渐下降, 24 h 时仍维持较高水平, 与 0 min、30 min 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而对总的 tau 蛋白(tau1)没有任何变化(图 1)。

三、Epo 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 tau 蛋白磷酸化的抑制作用

选用 6 h 作为作用时间点, 在 $A\beta_{25-35}$ 加入前 3 h 加入不同浓度的 Epo(5、10、20 U)作用 6 h, Western blot 检测示不同浓度的 Epo 均可有效地抑制 $A\beta_{25-35}$ 引起的 Ser396、Ser199 位点的磷酸化, 与添加前比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 10 U 和 20 U Epo 的抑制作用强于 5 U Epo, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 但 10 U 与 20 U 之间的作用比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)(图 2)。

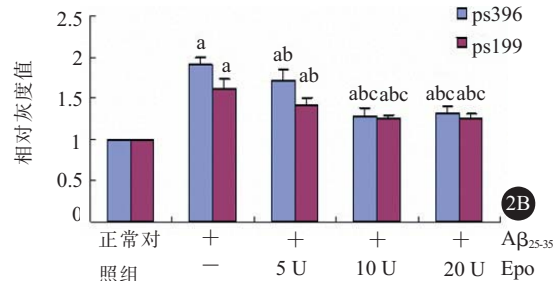
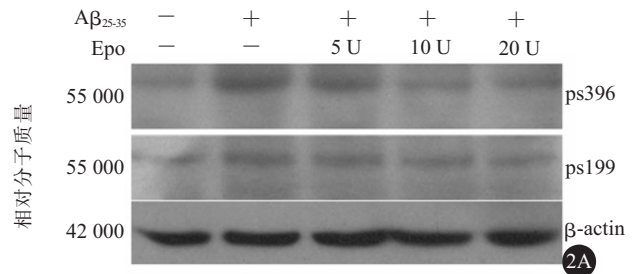
四、Epo 抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 tau 蛋白磷酸化的



1A: Western blot 原始图片; 1B: Western blot 分析后结果

图 1 凝聚态 $A\beta_{25-35}$ 对 SH-SY5Y 细胞 tau 蛋白磷酸化水平的影响

Fig.1 $A\beta_{25-35}$ -induced tau phosphorylation in SH-SY5Y cells



与正常对照组比较, $^a P < 0.05$; 与 $A\beta_{25-35}$ 组比较, $^b P < 0.05$; 与 5 U Epo 组比较, $^c P < 0.05$

2A: Western blot 原始图片; 2B: Western blot 分析后的结果

图 2 Epo 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 tau 蛋白磷酸化的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effect of Epo treatment on $A\beta_{25-35}$ -induced tau phosphorylation in SH-SY5Y cells

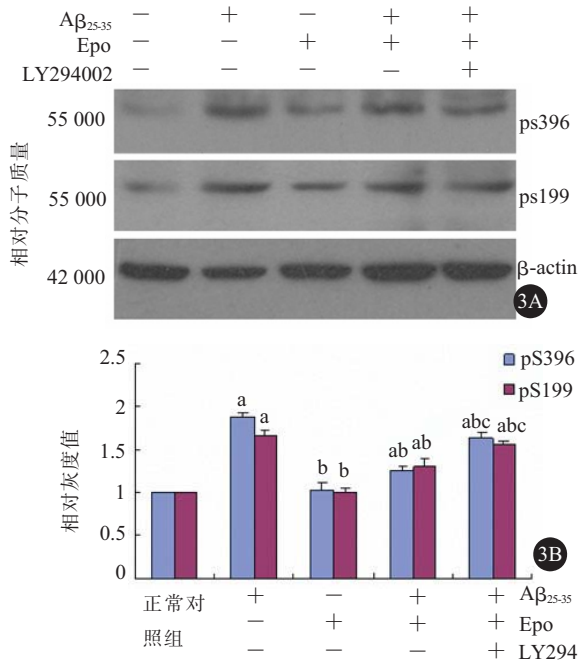
可能作用机制

用磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt)抑制剂 LY294002(50 $\mu\text{mol/L}$)提前 1 h 处理细胞, Western blot 检测示 LY294002 可有效地抑制 Epo 的作用, 提示 PI3K/Akt 途径参与了 Epo 抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 tau 蛋白磷酸化的作用(图 3)。

讨 论

AD 是一种以进行性认知功能减退, 包括记忆障碍和痴呆为特征的神经变性疾病。近年来, 对 AD 发病机制的研究认为, $A\beta$ 能诱导 tau 蛋白磷酸化, 进而导致 AD 的发生^[2]。本研究采用凝聚态 $A\beta_{25-35}$ 作用于 SH-SY5Y 细胞, 建立 tau 蛋白过度磷酸化的细胞模型, 观察 Epo 对其的影响。

Epo 是一种促进造血前体细胞增殖和分化, 调节红细胞生成的细胞因子。近来研究发现, Epo 及其功能受体(erythropoietin receptor, Epo-R)在中枢神经系统中也有表达, 且具有神经保护功能^[3]。因而设想 Epo 在 AD 等神经变性疾病中也可能具有保护作用。Chong 等^[4]研究发现, Epo 可通过 NF- κ B 核转移抑制 $A\beta$ 引起的早期或晚期原代海马神经细胞的凋亡, 为研究 Epo 在 AD 中的作用提供了理论依据。本研究成功地建立体外 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 tau 蛋白磷酸化的细胞模型后, 选用 $A\beta_{25-35}$ 作用 6 h(为细胞毒性最强)的时间点, 观察到 Epo 预处理 3 h 后, 不同浓



与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 $A\beta_{25-35}$ + 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 $A\beta_{25-35}$ + Epo + 组比较, ^c $P < 0.05$

3A: Western blot 原始图片; 3B: Western blot 分析后的结果

图 3 LY294002 预处理对 Epo 的抑制作用

Fig.3 Inhibitory effect of LY294002 pretreatment on Epo

度的 Epo(5、10、20 U)均可有效地抑制 $A\beta_{25-35}$ 引起的 tau 蛋白在 Ser396、Ser199 位点的磷酸化。

Epo 引起的细胞信号传导开始于其受体 Epo-R 的激活, 激活可导致几种下游传导途径的磷酸化, 包括 PI3K、信号转导与转录活化因子 5 (signal transducers and activators of transcription, STAT-5) 等等^[5]。PI3K 是一种细胞内蛋白激酶, 近年研究发现, PI3K 信号途径参与了神经系统的发育、保护、学习和记忆等多种生理功能。Akt 是 PI3K 信号转导途径中一个重要的下游靶激酶, 具有丝/苏氨酸激酶活性。本研究采用 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 (50 $\mu\text{mol/L}$), 观察 Epo 的作用机制是否与该途径有关。结果发现, LY294002 可有效地抑制 Epo 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 tau 蛋白磷酸化的抑制作用, 提示 PI3K/Akt 途径参与了 Epo 的抑制作用。

以往大量研究已证明, GSK-3 β 是 PI3K/Akt 的下游底物, 活化的 Akt 能诱导 GSK-3 β 在丝氨酸 Ser9 位点的磷酸化, 丝氨酸 Ser9 位点的磷酸化可下调 GSK-3 β 的活性^[2, 6-8]。而 GSK-3 β 与 tau 蛋白的磷

酸化有密切关系, 故而笔者推测, Epo 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 tau 蛋白磷酸化的抑制作用可能与其激活 PI3K/Akt 后, 引起 GSK-3 β 的活性抑制有关, 但其具体的作用机制仍需进一步研究。

综上所述, Epo 可通过 PI3K/Akt 途径对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 tau 蛋白磷酸化发挥抑制作用, 这为研究 AD 的发病机制及探索新的有效治疗药物提供了重要的理论基础; 另外, Epo 已经用于脑卒中患者的临床试验, 且被证明是安全而有效的^[9]。

参 考 文 献

- [1] Wei L, Han BH, Li Y, et al. Cell death mechanism and protective effect of erythropoietin after focal ischemia in the whisker-barrel cortex of neonatal rats [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 317(1): 109-116.
- [2] Wang ZF, Li HL, Li XC, et al. Effects of endogenous beta-amyloid overproduction on tau phosphorylation in cell culture [J]. J Neurochem, 2006, 98(4): 1167-1175.
- [3] Wen X, Huang Y, Wang J. Erythropoietin preconditioning on hippocampus neuronal apoptosis following status epilepticus induced by Li-pilocarpine in rats through anti-caspase-3 expression [J]. Neurol India, 2006, 54(1): 58-63.
- [4] Chong ZZ, Li F, Maiese K. Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity [J]. Curr Neurovasc Res, 2005, 2(5): 387-399.
- [5] Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine [J]. Cell Death Differ, 2004, 11 (Suppl 1): S37-44.
- [6] Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? [J]. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25 (11): 577-583.
- [7] Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, et al. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway [J]. J Neurochem, 2006, 96(4): 1005-1015.
- [8] Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, et al. Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies [J]. Curr Alzheimer Res, 2005, 2(1): 3-18.
- [9] Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial [J]. Mol Med, 2002, 8(8): 495-505.

(收稿日期: 2009-04-12)

(本文编辑: 张玲)