

化性损伤标志物 8-OHdG 增多。提示鞣花酸可破坏 HEK-293 细胞内氧化-抗氧化平衡,使细胞处于氧化应激状态,造成细胞 DNA 的损伤。

#### 参考文献

- [1] Koponen JM, Happonen AM, Mattila PH, et al. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(4):1612-1619.
- [2] 郭增军, 谭林, 徐颖, 等. 鞣花酸类化合物在植物界的分布及其生物活性[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(3):519-524, 540.

- [3] Labieniec M, Gabryelak T, Falcioni G. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*[J]. Mutat Res, 2003, 539(1-2):19-28.
- [4] Labieniec M, Gabryelak T. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14[J]. Mutat Res, 2003, 539(1-2):127-135.
- [5] Singh NP, Stephens RE. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching [J]. Mutat Res, 1997, 383:167-175.
- [6] 苏莉, 邓渊韬, 张瑞, 等. 硫酸镍对大鼠睾丸细胞损伤作用[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(12):1597-1598.

收稿日期: 2012-09-05

(解学魁编辑 刘铁校对)

### · 实验研究 ·

## γ-分泌酶在铝致大鼠脑内 Aβ 蓄积中作用

王林平<sup>1</sup>, 王静<sup>2</sup>, 石樱桃<sup>3</sup>, 张玲<sup>1</sup>, 牛侨<sup>1</sup>

**摘要:**目的 探讨 γ-分泌酶在铝引起脑内 β-淀粉样蛋白(Aβ)蓄积中的作用。方法 32 只 SD 大鼠随机分为对照组, 麦芽酚铝低、中、高剂量组(0.4、0.8、1.2 mg/kg); 腹腔注射麦芽酚铝 8 周后, 酶联免疫吸附试验和 western-blot 检测大鼠皮质和海马 Aβ 的量和 γ-分泌酶组成亚单位早老素 1(presenilin 1)和 nicastrin 蛋白。结果 在皮质内, 高剂量染铝组 Aβ 总量为(120.58 ± 23.65) pg/mL, 在海马内中、高剂量染铝组 Aβ 总量为(115.57 ± 7.00)、(127.09 ± 11.04) pg/mL, 均高于对照组(P < 0.05); 在皮质和海马内, 与对照组比较, 各染毒组 Aβ40 无明显变化; 在皮质内, 高剂量染铝组 Aβ42 为(51.02 ± 20.90) pg/mL, 在海马内, 低、中、高剂量染铝组 Aβ42 分别为(24.84 ± 5.05)、(42.52 ± 12.13)、(54.42 ± 7.98) pg/mL, 均高于对照组(P < 0.05); 与对照组比较, 中、高剂量染铝组大鼠脑皮质和海马内 presenilin 1、nicastrin 均升高(P < 0.05)。结论 γ-分泌酶水平的升高是铝引起大鼠脑内 Aβ 蓄积的重要原因之一。

**关键词:** 铝; β-淀粉样蛋白(Aβ); γ-分泌酶; 早老素 1(presenilin 1); nicastrin 蛋白

中图分类号: R 995 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2013)11-1632-03 DOI: 10.11847/zgggws2013-29-11-22

## Role of γ-secretase during accumulation of Aβ induced by aluminum in rat's brain

WANG Lin-ping\*, WANG Jing, SHI Ying-tao, et al (\* Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi Province 030001, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role of γ-secretase during the accumulation of β amyloid protein(Aβ) induced by aluminum in rat's brain. **Methods** A total of 32 male Sprague-Dawley(SD) rats were randomly divided into control group, low, medium, and high dose group(0.4 mg/kg BW, 0.8 mg/kg BW and 1.2 mg/kg BW). Aluminum-maltolate exposure was conducted by intraperitoneal injection. Eight weeks later, Aβ and γ-secretase(presenilin and nicastrin) were detected with enzym-linked immunosorbent assay(ELISA) and western blot. **Results** Compared with the control group, the level of Aβ(120.58 ± 23.65 pg/ml) significantly increased in the cortex of high dose group(P < 0.05), and significantly increased in hippocampus of medium(115.57 ± 7.00 pg/ml) and high dose group(127.09 ± 11.04 pg/ml)(P < 0.05). There was no significant difference in the level of Aβ 40 in cortex and hippocampus of aluminum treated groups compared with that of the control group(P > 0.05). The level of Aβ 42(51.02 ± 20.90 pg/ml) significantly increased in cortex of high dose group, and in hippocampus of all the aluminum treated groups(24.84 ± 5.05, 42.52 ± 12.13, 54.42 ± 7.98 pg/ml). The expression of presenilin 1 and nicastrin increased significantly in cortex and hippocampus of medium and high dose group(P < 0.05). **Conclusion** The decreasing of γ-secretase may be one of the reasons for aluminum-induced accumulation of Aβ.

**Key words:** aluminum; Aβ; γ-secretase; presenilin 1; nicastrin

作者单位: 1. 山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001; 2. 中国石油集团石油职业卫生技术服务中心; 3. 山西省肿瘤医院

作者简介: 王林平(1973-), 女, 山西太原人, 讲师, 博士在读, 研究方向: 化学物神经毒性。

通讯作者: 牛侨, E-mail: niuqiao55@163.com

数字出版日期: 2013-9-12 14:30

数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20130912.1430.001.html

铝作为慢性神经毒物,可引起神经系统多种病理变化,并与脑内老年斑形成密不可分,研究表明,铝接触可以引起老年斑主要成分  $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$  amyloid protein, A $\beta$ )聚集<sup>[1-4]</sup>。但铝如何引起脑内 A $\beta$  聚集的机制尚不清楚。A $\beta$  由淀粉样蛋白前体(amyloid protein precursor, APP)经过  $\beta$  和  $\gamma$  分泌酶连续的蛋白酶裂解产生。 $\gamma$ -分泌酶是 A $\beta$  生成的最后一个决定因素,因此, $\gamma$ -分泌酶的表达对于 A $\beta$  的产生和聚集具有重要影响。本研究通过建立大鼠铝染毒模型,探讨  $\gamma$ -分泌酶在铝引起脑内 A $\beta$  沉积中的作用,进一步明确铝神经毒性机制。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 32 只[山西医科大学动物中心,许可证号:SCXK(晋)2009-0001],体重 180~220 g,在动物室适应性喂养 1 周后,开始实验。

1.2 主要仪器及试剂 SpectraMax M5 酶标仪及 SoftMax Pro v5.0.1 软件(美国 Molecular Devices 公司),DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂),捷达 801 专业数码凝胶成像与分析系统 3.3(江苏捷达科技发展有限公司);结晶氯化铝( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ),麦芽酚,分析纯,(美国 Sigma 公司);早老素 1(Presenilin1)、Nicastrin 单克隆抗体(美国 Epitomics 公司),A $\beta$ 1-40、A $\beta$ 1-42 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)试剂盒(武汉 Usen life science 公司); $\beta$ -actin 单克隆抗体、二抗、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid hydrate disodium salt, BCA)蛋白定量试剂盒、超敏发光液(北京康为世纪公司);预染蛋白 Marker(立陶宛 Fermentas 公司)。

1.3 动物分组与处理 按体重将大鼠随机分为对照组(生理盐水),麦芽酚铝低、中、高剂量组(0.4、0.8、1.2 mg/kg),每组 8 只。染毒前将等体积麦芽酚溶液和三氯化铝溶液混合成麦芽酚铝溶液,并将其 pH 调节至 7.1~7.4,抽滤后待用。腹腔注射方法染毒,容量为 0.1 mL/100 g 体重,连续 5 d,间歇 2 d,共染毒 8 周。整个染毒期间,动物室以自然节律采光,温度 20~22  $^{\circ}\text{C}$ ,湿度 40%~60%,动物饲以普通饲料,自由进食和饮水。笼具、水瓶等所有用具,均不使用含铝制品。每日观察大鼠进食进水情况,动物精神状态,行为,有无死亡等。染毒结束后,麻醉状态下处死大鼠,于冰皿上分离脑组织,置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱待用。

### 1.4 指标与方法

1.4.1 组织蛋白提取与定量 取 0.1 g 脑组织,加入 1 mL 组织蛋白提取剂和蛋白酶抑制剂复合物,冰浴中超声波粉碎组织,冰上放置 20 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/m 离心 15 min,取上清待用。按照 BCA 试剂盒说明书操作,酶标仪进行比色,计算样品浓度。

1.4.2 脑组织中 A $\beta$  含量检测 采用 ELISA 法,按照说明书进行,每个样品设立 2 个复孔,使用酶标仪在 450 nm 测量吸光度值,使用 SoftMax Pro v5.0.1 软件计算每个样品 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 浓度。

1.4.3 Presenilin 1 和 nicastrin 蛋白表达检测 采用 western blot 法,沸水浴 5 min 使蛋白变性,10% 分离胶进行蛋白电泳;400 mA 恒流转膜;5% 脱脂奶粉封闭 100 min;孵育一抗(presenilin 1:1:1 000; nicastrin:1:1 000; $\beta$ -actin:1:2 000),4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。磷酸盐洗涤缓冲液(phosphate buffered saline add Tween-20, PBST)洗膜,20 min  $\times$  3 次;加入二抗(抗体滴度 1:1 000),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 100 min。PBST 洗膜,20 min  $\times$  3 次;进行化学发光显影,压片;扫描仪扫描条带,捷达 801 系列凝胶电泳图像分析系统对 western blot 结果进行分析,计算待测蛋白灰度与对应  $\beta$ -actin 灰度的比值。

1.5 统计分析 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析,两两比较采用 Dunnett- $t$  法进行,以双侧  $P < 0.05$  作为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 不同剂量染铝大鼠脑 A $\beta$ 表达量变化

2.1.1 不同剂量染铝大鼠脑皮质 A $\beta$  表达量变化(表 1) 与对照组比较,高剂量染铝组大鼠大脑皮质中 A $\beta$  总量均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );其中 A $\beta$ 40 变化不大,而 A $\beta$ 42 升高明显;与对照组比较,高剂量染铝组大鼠大脑皮质中 A $\beta$ 42 升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 染铝大鼠脑皮质 A $\beta$  表达( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL,  $n = 8$ )

组别(mg/kg)	A $\beta$ 40	A $\beta$ 42	A $\beta$ 总量
对照组	77.29 $\pm$ 10.05	9.79 $\pm$ 7.44	87.08 $\pm$ 10.68
麦芽酚铝 0.4	71.52 $\pm$ 9.24	16.12 $\pm$ 13.67	87.64 $\pm$ 20.06
0.8	72.34 $\pm$ 4.41	23.60 $\pm$ 18.63	95.94 $\pm$ 18.93
1.2	69.55 $\pm$ 6.30	51.02 $\pm$ 20.90 <sup>a</sup>	120.58 $\pm$ 23.65 <sup>a</sup>

注:与对照组比较, a  $P < 0.05$ 。

2.1.2 不同剂量染铝大鼠脑海马 A $\beta$  表达量变化(表 2) 随染铝剂量增高,与对照组比较,中、高剂量染铝组大鼠海马中 A $\beta$  总量均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与对照组比较,低、中、高剂量染铝组大鼠海马中 A $\beta$ 42 含量均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

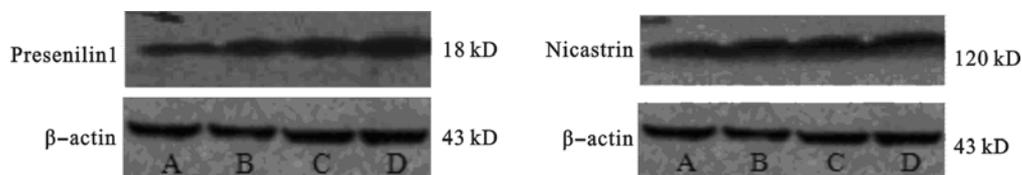
表 2 染铝大鼠脑海马 A $\beta$  表达( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL,  $n = 8$ )

组别(mg/kg)	A $\beta$ 40	A $\beta$ 42	A $\beta$ 总量
对照组	87.30 $\pm$ 10.68	11.32 $\pm$ 2.33	98.62 $\pm$ 8.47
麦芽酚铝 0.4	87.50 $\pm$ 20.92	24.84 $\pm$ 5.05 <sup>a</sup>	112.35 $\pm$ 22.69
0.8	73.05 $\pm$ 11.79	42.52 $\pm$ 12.13 <sup>a</sup>	115.57 $\pm$ 7.00 <sup>a</sup>
1.2	72.67 $\pm$ 13.97	54.42 $\pm$ 7.98 <sup>a</sup>	127.09 $\pm$ 11.04 <sup>a</sup>

注:与对照组比较, a  $P < 0.05$ 。

## 2.2 $\gamma$ -分泌酶主要亚单位在染铝大鼠脑组织中表达

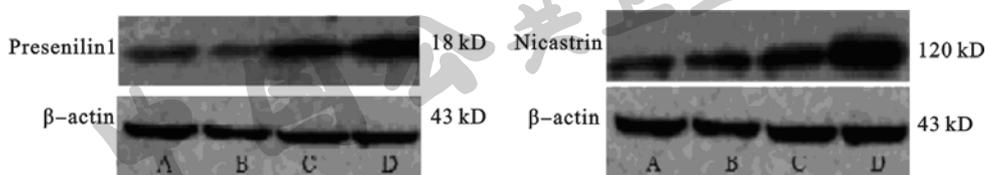
2.2.1 Presenilin 1 和 nicastrin 蛋白在染铝大鼠脑皮质中表达(图 1) 随着麦芽酚铝浓度增高,染铝大鼠脑皮质  $\gamma$ -分泌酶主要组成亚单位 presenilin1 和



注:A:对照组;B、C、D:麦芽酚铝低、中、高剂量组。

图 1  $\gamma$ -分泌酶主要亚单位在染铝大鼠脑皮质表达

2.2.2 Presenilin1 和 nicastrin 在染铝大鼠脑海马中表达(图 2) 随着麦芽酚铝浓度增高,染铝大鼠脑海马  $\gamma$ -分泌酶主要组成亚单位 presenilin1 和 nica-



注:A:对照组;B、C、D:麦芽酚铝低、中、高剂量组。

图 2  $\gamma$ -分泌酶主要亚单位在染铝大鼠脑海马表达

nicastrin 均呈上升趋势。与对照组比较,中、高剂量染铝组大鼠脑皮质 presenilin1、nicastrin 蛋白表达均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

trin 蛋白均呈上升趋势。与对照组比较,中、高剂量染铝组大鼠脑海马中 presenilin1、nicastrin 蛋白表达均升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

铝是地壳中蕴藏量最高的金属,长期接触可以造成学习记忆功能降低<sup>[5-6]</sup>等神经系统损伤,并可以引起多种病理改变,其中铝可以引起脑内 A $\beta$  沉积增多,可能是铝产生神经毒性的原因之一。

A $\beta$  是  $\beta$  淀粉样蛋白前体蛋白分别经  $\beta$ -和  $\gamma$ -分泌酶的酶切作用而生成。A $\beta$  有 A $\beta$ 40 和 A $\beta$ 42 两种主要存在形式,A $\beta$ 42 比 A $\beta$ 40 更容易发生聚积,是形成神经系统病理改变老年斑的主要物质。 $\gamma$ -分泌酶是 A $\beta$  生成的最后剪切酶,其表达量的多少对于 A $\beta$  生成有着重要影响。 $\gamma$ -分泌酶复合体由 4 部分组成:早老素(presenilin, PS)异二聚体、单过性跨膜蛋白 nicastrin(NCT)和另外 2 个整膜蛋白前咽缺陷因子 1 (anteriorp harynx defective 1, APH1)、早老素增强因子 2 (presenilin enhancer-2, PEN2)。广泛表达定位于内质网和高尔基体腔隙的 PS 是  $\gamma$ -分泌酶的核心部分,包含有 2 种同源异构体 PS1 和 PS2。研究认为 PS,尤其 PS1 是  $\gamma$ -分泌酶必需的活性基团。但是 Esler 等<sup>[7]</sup>研究发现 NCT 也可特异性地结合  $\gamma$ -分泌酶抑制剂并且和  $\gamma$ -分泌酶的活性有关,如用抗 NCT 的抗体进行免疫沉淀后, $\gamma$ -分泌酶活性丧失,表明 NCT 也是  $\gamma$ -分泌酶复合体所必须活性因素;APH1 和 PEN2 是 2 个较小的亚基。APH1 是  $\gamma$ -分泌酶复合体组装过程中的“支架”,PEN2 是  $\gamma$ -分泌酶成熟的条件<sup>[8]</sup>。本研究结果显示,麦芽酚铝可

以使大鼠脑皮质与海马区  $\gamma$ -分泌酶主要活性单位 nicastrin 蛋白与 presenilin 1 蛋白表达量升高,且铝使大鼠大脑皮质和海马中 A $\beta$  总含量也随染毒剂量增高而升高,其中主要是更容易聚集的 A $\beta$ 42 升高,以海马区更为明显。提示  $\gamma$ -分泌酶的增多可能是铝引起脑皮质和海马 A $\beta$  蓄积的重要原因之一。

## 参考文献

- [1] Luo Y, Niu FN, Sun ZZ, et al. Altered expression of A $\beta$  metabolism-associated molecules from D-galactose/AICl<sub>3</sub> induced mouse brain[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2009, 130(4): 248-252.
- [2] House E, Collingwood J, Khan A, et al. Aluminium, iron, zinc and copper influence the *in vitro* formation of amyloid fibrils of A beta-42 in a manner which may have consequences for metal chelation therapy in Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2004, 6(3): 291-301.
- [3] Praticò D, Uryu K, Sung S, et al. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice[J]. FASEB J, 2002, 16(9): 1138-1140.
- [4] 贾丽. 两种染铝小鼠阿尔茨海默病(AD)模型的形态学特征及 ApoE 基因在铝致 AD 中的作用[D]. 太原:山西医科大学硕士学位论文, 2009.
- [5] 高丽萍,程书珍,王晓梅,等. 铝对大鼠学习记忆及海马神经细胞凋亡影响[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(2): 214-215.
- [6] 巩泉泉,刘萍,嵇金花,等. 铝螯合剂对染铝大鼠学习记忆及脑 ATP 酶影响[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(5): 576-578.
- [7] Esler WP, Kimberly WT, Ostaszewski BL, et al. Activity-dependent isolation of the presenilin-gamma-secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(5): 2720-2725.
- [8] Niimura M, Isoo N, Takasugi N, et al. Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the g-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions[J]. J Biol Chem, 2005, 280(13): 12967-12975.