

• 论著 •

细胞外基质金属蛋白酶诱导因子与
阿尔茨海默病 γ -分泌酶的相关性研究

智孔亮, 辛娜, 曹志红, 卢丽敏

邯郸市第一医院, 河北省邯郸市 056002

摘要:目的 探讨细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(CD147)与阿尔茨海默病 γ -分泌酶的相关性。方法 CD147 cDNA 转染人神经母细胞瘤,并通过遗传霉素 G418 筛选 CD147 超表达细胞。超表达细胞设为实验组,正常细胞设为对照组,Western Blot 检测两组 CD147 含量,Elisa 分析两组 A β 40 和 A β 42 含量。结果 实验组和对照组 CD147 含量分别为(40.23 ± 0.20) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 (27.98 ± 0.12) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,实验组显著高于对照组($t = 90.97$, $P < 0.05$)。实验组和对照组 A β 40 与 A β 42 总含量分别为(141.05 ± 2.13) pg/mL 和 (323.41 ± 2.78) pg/mL ,实验组显著低于对照组($t = 90.19$, $P < 0.05$)。结论 随着 CD147 含量的增加,A β 的生成减少,而 γ -分泌酶是生成 A β 的限速酶,可知 γ -分泌酶随着 CD147 含量的增加而呈负增长,提示 CD147 对 γ -分泌酶的活性起着负调节作用。

关键词: 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子; γ -分泌酶; 阿尔茨海默病

Relationship between extracellular matrix metalloproteinase inducer and γ -secretase in Alzheimer's disease

ZHI Kong-Liang, XIN Na, CAO Zhi-Hong, LU Li-Min. Handan First Hospital, Handan, Hebei 056002, China

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) and γ -secretase in Alzheimer's disease. **Methods** CD147 cDNA was transfected into human neuroblastoma cells, and cells with overexpression of CD147 were selected by neomycin G418. CD147 overexpression cells and normal cells were set as experimental group and control group, respectively. The expression of CD147 protein in the two groups were determined by Western blot, and the content of amyloid β protein (A β) 40 and A β 42 in the two groups was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The expression of CD147 protein was significantly higher in the experimental group than in the control group (40.23 ± 0.20 vs. 27.98 ± 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; $t = 90.97$, $P < 0.05$). Moreover, the total content of A β 40 and A β 42 was significantly lower in the experimental group than in the control group (141.05 ± 2.13 vs. 323.41 ± 2.78 pg/mL ; $t = 90.19$, $P < 0.05$). **Conclusions** The synthesis of A β is reduced with increasing CD147 content. Given that γ -secretase is the rate-limiting enzyme in A β synthesis, the level of γ -secretase should be reduced with increasing CD147 content, indicating that CD147 is a negative regulator of γ -secretase activity.

Key words: extracellular matrix metalloproteinase inducer; γ -secretase; Alzheimer's disease

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种中枢神经系统退行性疾病^[1]。主要临床症状表现为记忆力下降、认知和语言功能障碍以及人格和行为的改变,严重影响患者的正常工作与生活^[2,3]。目前,AD的发病机制尚不十分清楚,其主要病理改变表现为大脑皮质和海马区胞外难溶性的 β 淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β) 沉积,A β

是引起 AD 患者突触功能障碍的主要原因之一^[4-5]。有研究指出,淀粉样前体蛋白经 β -分泌酶切割生成 sAPP- β 和 C99,C99 经 γ -分泌酶的进一步切割,最终生成难溶性、有毒性的 A β 沉积在大脑内^[6,7]。由此可见, γ -分泌酶是生成 A β 的限速酶,对调节体内 A β 的平衡具有十分重要的意义。细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular ma-

基金项目:邯郸市科学技术研究与发展计划项目(1423108130)

收稿日期:2015-04-10;修回日期:2015-06-09

作者简介:智孔亮(1981-),男,主治医师。

trix metalloproteinase inducer, CD147) 是一种糖蛋白, 在多种组织和细胞中均有表达, 与肿瘤的发生、视网膜功能、胚胎发育和神经退行性疾病等密切相关, 有报道指出 CD147 参与了对 γ -分泌酶活性的调节, 从而影响 $A\beta$ 的生成, 继而影响 AD 的发生发展^[8,9]。本文采用 CD147 cDNA 转染人神经母细胞瘤细胞, 以研究 CD147 对 γ -分泌酶的影响, 旨在增进对 AD 发病机制的认识, 从而为 AD 的治疗提供新的思路和途径。

1 材料

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞由中国科学院上海细胞库提供, 脂质体转染培养基 OPTI-MEM、DMEM 培养基和 FBS 胎牛血清 (Gibico), 脂质体 (Invitrogen), CD 147 cDNA (Santa Cruz), 遗传霉素 G418 (Sigma), 兔抗 CD147 (Santa Cruz), 山羊抗兔荧光二抗 (Rockland), DAB 和 TMB 显色试剂盒 (Solarbio), $A\beta$ 40 和 $A\beta$ 42 Elisa 试剂盒 (HCB), 奥林巴斯生物显微镜 (CX21FS1 型, Olympus)。

2 方法

2.1 SH-SY5Y 细胞培养

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基, 维持 37℃ 和 5% CO_2 。细胞融合到 80% 左右时, 用 0.25% 胰酶消化, 传代。

2.2 基因转染及细胞筛选

2.2.1 基因转染 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 按 1×10^5 个细胞/mL 的密度, 接种于 6 孔培养板, 37℃, 5% CO_2 条件下培养至 40% ~ 60% 融合。转染 A 液制备: 用低血清 OPTI-MEM 培养基稀释 25 μ g 的 CD147 cDNA, 终量 2 mL, 室温静置 10 min。转染 B 液制备: 用低血清 OPTI-MEM 培养基稀释 50 μ g 的脂质体, 终量 2 mL, 室温静置 10 min。轻轻混合转染液 A、B 液, 室温静置 15 min, 可能稍有微浊现象, 但并不妨碍转染。取出培养 SH-SY5Y 细胞的 6 孔培养板, 用 2 mL 不含血清的培养液漂洗 3 次, 再加入 1 mL 不含血清的培养液。将 A/B 混合液缓慢加入培养液中, 轻轻摇匀, 37℃, 5% CO_2 条件下培养 12 h。12 h 后, 更换正常 DMEM 培养液继续培养。

2.2.2 细胞筛选 首先配置不同浓度的 G418 (0、200、400、600、800 和 1000 μ g/ml) 以确定最佳筛选浓度, 培养 15 d 左右, 以杀死全部细胞的最低浓度为 G418 的最佳浓度。本实验的 G418 最佳

筛选浓度经确定为 800 μ g/ml。将经过 CD147 cDNA 转染的 SH-SY5Y 细胞接种到 6 孔板上, 培养 24 h 后, 每孔加入 G418, 保持其浓度为 800 μ g/ml。第二天, 洗掉死亡上浮的细胞, 换培养液继续培养。3 d 后用胰蛋白酶处理细胞并转移至培养皿中继续培养。15 d 后当细胞融合度达 70% 左右, 收集细胞, 获得 CD147 超表达的 SH-SY5Y 细胞。

2.3 Western Blot 检测 CD147 蛋白含量

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞和 CD147 超表达的 SH-SY5Y 细胞, 分别接种于 6 孔培养板, 两组间细胞密度保持一致, 分别记为对照组和实验组, 每天更换培养液。培养 72 h 后, 取出培养板, PBS 淋洗 3 次。加入 RIPA 细胞裂解液裂解, 刮离细胞转移至离心管。20000 r/min, 离心 30 min, 取上清于 -20℃ 保存。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。分别取 50 μ g 的等量总蛋白上样, 浓缩胶恒压 80 V, 分离胶恒压 120 V 电泳。恒压 80 V 下 PVDF 膜转膜 2 h。TBST 淋洗 3×10 min, 室温下 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗 4℃ 孵育过夜。第二天, TBST 淋洗 3×10 min。加入荧光二抗, 37℃ 下孵育 1 h。1 h 后, TBST 淋洗 3×10 min, DAB 显色。采用图像分析软件进行分析。

2.4 Elisa 法分析 γ -分泌酶的活性

提取对照组和实验组 SH-SY5Y 细胞总蛋白。分别取 0.1 ml 上述蛋白 (浓度均为 2.0 mg/ml), 各加入 3 μ l 的 C99, 在 37℃ 下反应 12 h。将 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 标准品以及上述反应液 50 μ l 分别加到酶标板中。37℃ 下加一抗孵育 4 h, 然后加二抗继续反应 1 h, 最后加入 TMB 显色液显色 1 h。1 h 后终止显色, 上机检测。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 的方式表示, 组间计量资料的比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

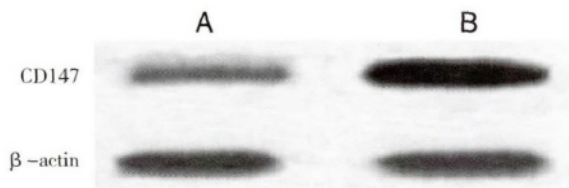
3 结果

3.1 Western Blot 检测 CD147 蛋白含量

Western Blot 分析结果表明, 实验组和对照组 CD147 含量分别为 (40.23 ± 0.20) μ g/ μ L 和 (27.98 ± 0.12) μ g/ μ L, 实验组显著高于对照组 ($t = 90.97$, $P < 0.05$), 表明 CD147 转染成功, CD147 超表达型 SH-SY5Y 细胞造模成功。见表 1、图 1。

表1 两组细胞中 CD147 的含量的比较 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$; $\bar{x} \pm s$)

组别	CD147 蛋白含量				<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	1 次	2 次	3 次	平均		
实验组	40.13 $\pm$ 0.20	39.35 $\pm$ 0.19	41.21 $\pm$ 0.21	40.23 $\pm$ 0.20	90.97	<0.05
对照组	28.13 $\pm$ 0.14	27.75 $\pm$ 0.12	28.06 $\pm$ 0.09	27.98 $\pm$ 0.12		

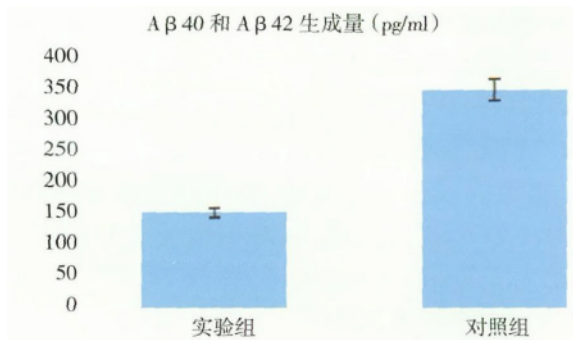
图1 Western Blot 检测两组细胞中 CD147 的含量。
A: 对照组; B: 实验组。

3.2 Elisa 法分析两组细胞中 γ -分泌酶的活性

Elisa 分析结果显示,实验组和对照组 A β 40 与 A β 42 总含量分别为 (141.05 $\pm$ 2.13) pg/mL 和 (323.41 $\pm$ 2.78) pg/mL,对照组显著高于实验组 ($t = 90.19$, $P < 0.05$)。说明随着 CD147 含量的增加,A β 的生成减少,而 γ -分泌酶是生成 A β 的限速酶,可知 CD147 对 γ -分泌酶的活性起着负调节的作用。见表 2、图 2。

表2 两组生成 A β 40 和 A β 42 的总量比较 (pg/ml; $\bar{x} \pm s$)

组别	A β 40 和 A β 42 总量				<i>P</i> 值
	1 次	2 次	3 次	平均	
实验组	141.53 $\pm$ 2.10	138.85 $\pm$ 2.29	142.76 $\pm$ 1.99	141.05 $\pm$ 2.13	<0.05
对照组	318.03 $\pm$ 2.44	323.65 $\pm$ 3.10	328.56 $\pm$ 2.79	323.41 $\pm$ 2.78	

图2 两组生成 A β 40 和 A β 42 的总量。

4 讨论

A β 是由 39 ~ 43 个氨基酸残基形成的多肽,其分子量为 4 kDa,A β 的 C-末端拥有 12 个疏水性的氨基酸残基,而 N-末端 28 个氨基酸残基位于细胞膜外,因此,A β 蛋白具有很强的自我聚集而成淀粉样纤维的特性,易在脑内沉积并引起 AD^[10,11]。 γ -分泌酶是由 PS、APH、NCT 和 Pen2 四大核心亚基组成的复合物,主要参与体内多个重要跨膜蛋白的切割,可切割 C99 而生成 A β ^[12,13]。由于 γ -分泌酶是生成 A β 的最终限速酶,所以 γ -分泌酶的活性对 AD 发病与否至关重要。CD147 在多种组织和细胞中均有表达,与神经退行性疾病密切相关。那

么,CD147 是否与 AD 的发病相关?是否是通过调节 γ -分泌酶的活性进而影响 A β 的生成?Zhou 等^[14]通过 RNA 干扰 HeLa 细胞 CD147 的表达,证实 CD147 参与对 γ -分泌酶活性的调节,从而影响 A β 的生成。张锦巍等^[15]通过表达小鼠胚胎成纤维细胞中 CD147 的含量观察其对 γ -分泌酶的影响,结果发现,过表达 CD147 的细胞,其 γ -分泌酶活性下降,其 A β 40 和 A β 42 水平下降。为了研究 CD147 对 γ -分泌酶活性的影响,本实验首先通过 CD147 cDNA 转染人神经母细胞瘤,并通过遗传霉素 G418 筛选出 CD147 超表达的细胞。Western Blot 分析表明,实验组细胞 CD147 蛋白含量显著高于对照组,表明 CD147 超表达型 SH-SY5Y 细胞造模成功。紧接着,采用 Elisa 法检测实验组和对照组中 A β 40 与 A β 42 的含量,结果表明实验组明显低于对照组。综上,本实验发现 A β 的含量随着 CD147 含量的增加减少,而 γ -分泌酶是生成 A β 的限速酶,可知 γ -分泌酶随着 CD147 含量的增加而呈负增长,提示我们 CD147 可能对 γ -分泌酶的活性起着负调节作用。

参 考 文 献

- [1] 黄越,马建芳,黄山. 阿尔茨海默病基因学研究进展. 中国现代神经疾病杂志, 2010, 10(2): 171-176.

- [2] 李兴强. 家族性阿尔茨海默病研究现状. 国际神经病学神经外科杂志, 2014, 41(2): 156-159.
- [3] Lippa CF. Alzheimer's Disease: A Financial Crisis and the Commonwealth of Pennsylvania. Am J Alzheimers Dis Other Demen, 2015, 30(2): 117-118.
- [4] 徐金静, 方力群, 赵春慧, 等. β -淀粉样蛋白对阿尔茨海默病转基因果蝇认知功能的影响. 国际神经病学神经外科杂志, 2013, 40(2): 101-104.
- [5] 高玲焕, 邹莉波, 迟天燕. β -淀粉样蛋白在阿尔茨海默病病因学中作用研究进展. 沈阳药科大学学报, 2008, 25: 41-45.
- [6] 胡海燕. β -淀粉样蛋白在阿尔茨海默病中的作用及中药多靶点对抗研究进展. 中华中医药学刊, 2012, 30(3): 488-492.
- [7] 康林, 杜鹃, 王斌, 等. 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子降解途径的初步研究. 神经解剖学杂志, 2014, 30(5): 541-545.
- [8] Kanyenda LJ, Verdile G, Martins R, et al. Is Cholesterol and Amyloid- β Stress Induced CD147 Expression a Protective Response? Evidence that Extracellular Cyclophilin A Mediated Neuroprotection is Reliant on CD147. J Alzheimer's Dis, 2014, 39: 545-556.
- [9] Yurt Kilcar A, Biber Müftüleri ZF, Evren V, et al. Investigation of ^{99m}Tc Labeled Clioquinol Derivative on Amyloid Plaque Specificity by Using Animal Model of Alzheimer's Disease. Mol Imaging Radionucl Ther, 2015, 24(1): 40-41.
- [10] Wang L, Benzinger TL, Hassenstab J, et al. Spatially distinct atrophy is linked to β -amyloid and tau in preclinical Alzheimer disease. Neurology, 2015, 84(12): 1254-1260.
- [11] Brickman AM, Guzman VA, Gonzalez-Castellon M, et al. Cerebral autoregulation, beta amyloid, and white matter hyperintensities are interrelated. Neurosci Lett, 2015, 592: 54-58.
- [12] Nahalkova J, Volkmann I, Aoki M, et al. CD147, a γ -secretase associated protein is upregulated in Alzheimer's disease brain and its cellular trafficking is affected by presenilin-2. Neurochem Int, 2010, 56: 67-76.
- [13] Roher AE, Maarouf CL, Kokjohn TA, et al. Neuropathological and biochemical assessments of an Alzheimer's disease patient treated with the γ -secretase inhibitor semagacestat. Am J Neurodegener Dis, 2014, 3(3): 115-133.
- [14] Zhou SX, Zhou H, Walian PJ, et al. CD147 is a regulatory subunit of the γ -secretase complex in Alzheimer's disease amyloid β -peptide production. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(21): 7499-7504.
- [15] 张锦巍, 井丽娟, 孙亚平, 等. CD147 超表达对 γ -分泌酶影响的临床研究. 重庆医学, 2012, 41(36): 3801-3806.

• 论著 •

帕金森操康复训练的临床疗效观察

李芳

岳阳市一人民医院神经内科 湖南省岳阳市 414000

摘要: 目的 探讨帕金森健康操对帕金森病患者运动功能和日常生活能力的影响。方法 选取 2013 年 4 月至 2014 年 7 月期间我院收治的帕金森病患者 38 例。分为两组: 治疗组给予临床常规药物治疗及常规康复治疗, 并在此基础上教授帕金森健康操, 每天 2 h; 对照组仅给予临床常规药物治疗及常规康复治疗。治疗 5 月及 14 月后观察疗效。结果 两组治疗 5 月后 UPDRS II 评分和 UPDRS III 评分均较治疗前降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 治疗组在治疗 14 月后, 与治疗前比较降低更加显著 ($P < 0.01$)。治疗组在治疗 14 月后与治疗 5 月后比较也有明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗 5 月后和治疗 14 月后治疗组与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 帕金森健康操能提高帕金森病患者的运动功能, 改善患者的日常生活活动能力, 特别是长期预后具有较好的临床效果。

关键词: 帕金森健康操; 帕金森病; 运动功能; 日常生活能力

基金项目: 岳阳市科技局资助课题(岳市科发[2013]30 号)

收稿日期: 2015-04-26; 修回日期: 2015-06-19

作者简介: 李芳(1981-), 女, 硕士。E-mail: 316302425@qq.com。