

· 基础研究 ·

ISRIB对A β_{1-42} 诱导的SH-SY5Y细胞的神经保护作用

宋成洁^{1,2}, 王敏³, 汤韞祎³, 郑月^{2*}¹徐州医科大学生理学系, 江苏 徐州 221004; ²南京医科大学生物化学与分子生物学系, ³病理学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:以 β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein 1-42, A β_{1-42})诱导的SH-SY5Y细胞为模型,探讨综合应激反应抑制剂(integrated stress response inhibitor, ISRIB)对A β_{1-42} 诱导的内质网应激和细胞凋亡的影响。方法:SH-SY5Y细胞按不同处理方式分为4组:对照组、A β 组、ISRIB组、ISRIB+A β 组。培养48 h后用噻唑蓝比色法检测各组细胞存活率,蛋白免疫印迹试验检测内质网应激相关蛋白的表达,包括葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)、蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)-真核起始因子2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α)-活化转录因子4(activation transcription factor 4, ATF4)介导的内质网应激通路,以及下游的CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP),同时也检测了凋亡相关蛋白的表达,包括Bcl-2、Bax、cleaved-caspase-3。结果:与A β 组比较,ISRIB能显著提高SH-SY5Y细胞的存活率($P < 0.01$),显著降低p-PERK($P < 0.01$)、p-eIF2 α ($P < 0.05$)、ATF4($P < 0.01$)和CHOP的表达($P < 0.05$),提高Bcl-2/Bax表达($P < 0.05$),降低cleaved-caspase-3表达($P < 0.01$)。结论:ISRIB能够抑制A β_{1-42} 诱导的SH-SY5Y细胞凋亡,其机制与抑制ERS造成的eIF2 α 通路激活及其相关凋亡信号通路有关。

[关键词] 阿尔茨海默病;内质网应激;eIF2 α ; β -淀粉样蛋白

[中图分类号] R749.16

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)12-1712-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20191202

The neuroprotective effect of ISRIB on SH-SY5Y cells induced by A β_{1-42}

Song Chengjie^{1,2}, Wang Min³, Tang Yunyi³, Zheng Yue^{2*}¹Department of Physiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, ³Department of Pathology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effect of integrated stress response inhibitor (ISRIB) in apoptosis and endoplasmic reticulum stress of SH-SY5Y cells induced by amyloid β -amyloid protein 1-42 (A β_{1-42}) and to clarify its mechanism. **Methods:** SH-SY5Y cells were divided into normal control group, A β group, ISRIB group and ISRIB+A β group. The survival rate of cells in each group was detected by MTT colorimetric assay. Western blotting was used to examine the expression of endoplasmic reticulum stress marker glucose-regulated protein 78 (GRP78) and activation of protein kinase R-like ER kinase (PERK)-eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α)-activation transcription factor 4 (ATF4) signaling pathway, together with C/EBP homologous protein (CHOP). Meanwhile, apoptosis-related proteins were also detected, including Bcl-2, Bax and cleaved-caspase3. **Results:** Compared with A β group, ISRIB significantly increased the survival rate of SH-SY5Y cells ($P < 0.01$), significantly decreased the activation of p-PERK ($P < 0.01$), p-eIF2 α ($P < 0.05$), ATF4 ($P < 0.05$) and CHOP ($P < 0.05$), increased Bcl-2/Bax level ($P < 0.05$) and decreased cleaved-caspase3 expression ($P < 0.01$). **Conclusion:** ISRIB could inhibit the apoptosis of SH-SY5Y cells induced by A β_{1-42} , and its mechanism is related to the inhibiting the activation of eIF2 α pathway and apoptotic signaling pathway induced by ERS.

[Key words] Alzheimer's disease; endoplasmic reticulum stress; eukaryotic initiation factor 2 α ; amyloid β -amyloid

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(12): 1712-1715, 1722]

[基金项目] 国家自然科学基金(81703184)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhengyue@njmu.edu.cn

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病,随着年龄的增长伴随着认知能力下降和记忆力减退^[1]。诱发AD的因素很多,越来越多证据表明 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)沉积是诱发AD的共同通路,是AD形成和发展的关键因素之一,因此在神经退行性疾病中,蛋白质折叠障碍导致的蛋白质异常聚集日益受到关注^[2]。内质网是参与蛋白质折叠的细胞器,内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)与AD的发病具有相关性。ERS增加未折叠蛋白的聚集,伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)从内质网膜蛋白的腔面解离下来并结合到未折叠蛋白上,最重要的3种内质网膜蛋白有肌醇酶(inositol-requiring enzyme-1, IRE1)、活化转录因子6(activation transcription factor 6, ATF6)和蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)。与GRP78的分离使得膜蛋白激活,启动未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)。UPR的激活对细胞起保护作用,但过度的ERS则不可逆地引起异常折叠蛋白在细胞内过度沉积,启动细胞凋亡程序^[3]。研究表明,UPR的PERK-真核起始因子2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α)分支在AD大脑中被激活,并发现PERK信号的减弱可以减轻AD的记忆障碍^[4]。

研究显示,综合应激反应抑制剂(integrated stress response inhibitor, ISRIB)可以通过调节eIF2B来逆转eIF2 α 磷酸化^[5]。然而,目前尚不清楚ISRIB是否可改善AD中的神经细胞凋亡。本研究拟采用A β ₁₋₄₂损伤SH-SY5Y细胞建立体外AD模型,较系统地观察ISRIB拮抗A β ₁₋₄₂诱导的细胞凋亡和ERS的作用,旨在阐明ISRIB抑制AD发病的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人源神经母细胞瘤细胞株(human neuroblastoma cell, SH-SY5Y, 上海阔然医学检验中心实验室),胎牛血清、DMEM培养基、100 U/L青霉素和100 mg/mL链霉素(Gibco公司,美国),四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma公司,美国), β -actin、GRP78、eIF2 α 、p-eIF2 α 、ATF4、CHOP、Bcl-2、Bax、caspase-3和cleaved-caspase-3抗体(Abcam公司,美国),辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠和羊抗兔二抗购自中国中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 无菌A β 寡聚体的制备

将A β ₁₋₄₂粉末(1 mg/管,上海吉尔生物公司)溶

解于六氟异丙醇(1,1,1,3,3,3 hexafluoro, HFIP)并分装至5个离心管中,200 μ g/管,在化学通风橱中蒸发后于-80 $^{\circ}$ C保存。无菌条件下双蒸水溶解,配制成A β 单体工作液,浓度为500 μ mol/L。经4 $^{\circ}$ C孵育24 h,16 000 r/min离心3 min,去除离心管底部不溶的纤维体,将上清转移至新的EP管中4 $^{\circ}$ C保存,得到A β ₁₋₄₂寡聚体。

1.2.2 人神经母细胞瘤细胞株SH-SY5Y的培养

SH-SY5Y细胞培养在高糖DMEM培养基中,含有10%胎牛血清、100 U/L青霉素和100 mg/mL链霉素。5% CO₂、37 $^{\circ}$ C培养箱中培养,3 d换液1次,待细胞状态稳定,密度70%~80%左右消化传代培养。

1.2.3 细胞分组和药物处理

按 1×10^6 个/mL密度接种SH-SY5Y细胞于96孔板或直径6 cm培养皿中。96孔板培养细胞用于MTT检测,6 cm培养皿细胞用于Western blot检测。

96孔板细胞分为6组:0 μ mol/L ISRIB组,20 μ mol/L ISRIB组,40 μ mol/L ISRIB组,10 μ mol/L A β ₁₋₄₂组,10 μ mol/L A β ₁₋₄₂+20 nmol/L ISRIB,10 μ mol/L A β ₁₋₄₂+40 nmol/L ISRIB组,每组设置6个复孔,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养48 h准备MTT实验。

6 cm培养皿细胞分为4组:正常对照组(Con组)、10 μ mol/L A β ₁₋₄₂组(A β 组)、40 nmol/L ISRIB(ISRIB组)、40 nmol/L ISRIB+10 μ mol/L A β ₁₋₄₂组(ISRIB+A β 组)。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养48 h后收取蛋白,准备Western blot检测。

1.2.4 MTT实验

96孔板各组SH-SY5Y细胞培养结束后,每孔加入20 μ L MTT工作液(浓度为5 mg/mL),37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养4 h。吸弃上清液,每孔加入DMSO 150 μ L,混匀后于490 nm处读取吸光度值。

1.2.5 Western blot检测

SH-SY5Y细胞接种于6 cm培养皿,加药处理后,细胞用PBS洗3次,加入蛋白裂解液200 μ L,用细胞刮刮下细胞,将细胞裂解液吸取到EP管中,置冰上反应15 min,然后4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心10 min,吸取上清丢弃沉淀,然后进行BCA法测定细胞蛋白浓度。按20 μ g蛋白上样量,加入蛋白上样缓冲液后,水浴加热100 $^{\circ}$ C,10 min,-20 $^{\circ}$ C长期保存。经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移至PVDF膜上。用5%脱脂奶粉溶液封闭1 h,分别加入 β -actin、GRP78、eIF2 α 、ATF4、CHOP、Bcl-2、Bax、caspase-3和cleaved-caspase-3抗体,4 $^{\circ}$ C孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的抗小鼠、抗兔二抗,室温

孵育1 h后洗膜,将PVDF膜用发光试剂ECL显色后曝光。

1.3 统计学方法

实验数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 22.0统计软件中的单因素方差分析进行组间比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ISRIB抑制 $A\beta_{1-42}$ 诱导的SH-SY5Y细胞增殖活性下降

MTT检测发现单纯给予不同浓度的ISRIB(0、20、40 nmol/L)处理细胞48 h,细胞增殖能力未见明显改变。给予 $A\beta_{1-42}$ (10 $\mu\text{mol/L}$)和不同浓度的ISRIB处理细胞48 h,各实验组细胞增殖能力随ISRIB浓度的增加而上升($P < 0.05$,图1B)。

2.2 ISRIB降低 $A\beta_{1-42}$ 诱导SH-SY5Y细胞ERS相关蛋白的表达

用Western blot方法检测ERS相关蛋白,结果显示与Con对照组比较, $A\beta$ 组SH-SY5Y细胞中GRP78和p-PERK表达量明显高于Con组,提示 $A\beta_{1-42}$ 可诱导SH-SY5Y细胞产生ERS。而联合ISRIB处理后,由 $A\beta_{1-42}$ 上调的p-PERK表达量有所降低($P < 0.01$,图2),但是GRP78未见明显降低。

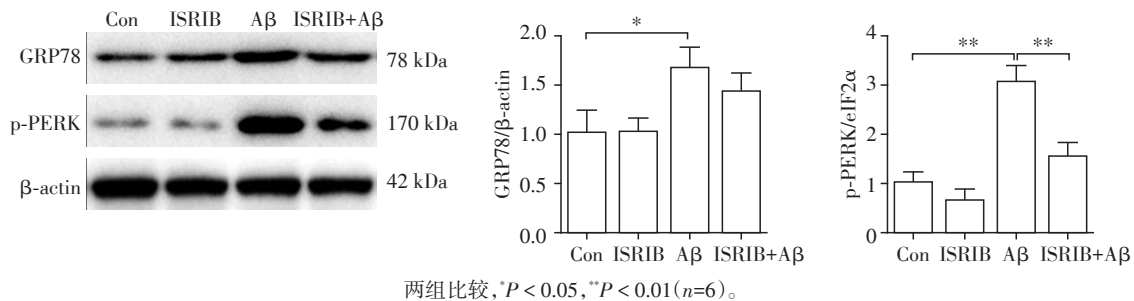


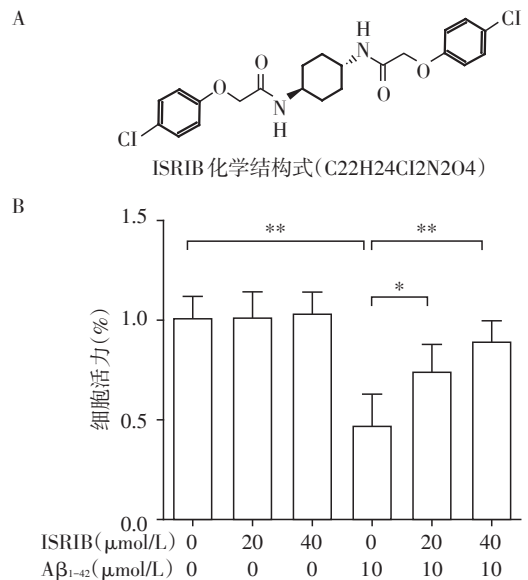
图2 Western blot检测ISRIB对 $A\beta_{1-42}$ 诱导SH-SY5Y细胞ERS相关蛋白的影响

Figure 2 Effect of ISRIB on the endoplasmic reticulum stress-related protein induced by $A\beta_{1-42}$ in SH-SY5Y cells

示 $A\beta_{1-42}$ 可诱导SH-SY5Y细胞产生ERS并激活PERK信号通路。而联合ISRIB处理后,由 $A\beta_{1-42}$ 上调的p-eIF2 α 、ATF4和CHOP的表达量均有所降低($P < 0.05$,图3)。

2.4 ISRIB对 $A\beta_{1-42}$ 诱导SH-SY5Y细胞凋亡相关蛋白的影响

$A\beta_{1-42}$ 诱导促凋亡蛋白CHOP表达量明显增加,提示 $A\beta_{1-42}$ 可能诱导了凋亡性的ERS。为了进一步验证这一假设,对Bcl-2、Bax、cleaved-caspase-3进行了检测,结果发现,与Con组比较, $A\beta_{1-42}$ 降低了抗凋



A: ISRIB的化学结构式;B:用 $A\beta_{1-42}$ 和ISRIB处理SH-SY5Y细胞,并用MTT分析细胞活力,两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=6$)。

图1 ISRIB抑制 $A\beta_{1-42}$ 诱导SH-SY5Y细胞增殖活性下降
Figure 1 ISRIB REVERSED the decreased cell survival rate induced by $A\beta_{1-42}$ in SH-SY5Y cells

2.3 ISRIB降低 $A\beta_{1-42}$ 诱导SH-SY5Y细胞内质网PERK-eIF2 α -ATF4信号通路

与Con对照组比较, $A\beta$ 组SH-SY5Y细胞中p-eIF2 α 、ATF4和CHOP表达量明显高于Con组,提

亡蛋白Bcl-2表达,增加了促凋亡蛋白Bax表达,表明 $A\beta_{1-42}$ 可诱导凋亡性ERS的产生。同时发现,联合ISRIB处理后,由 $A\beta_{1-42}$ 上调的Bcl-2/Bax的水平被抑制($P < 0.05$,图4),cleaved-caspase-3表达量有所降低($P < 0.01$,图4)。

3 讨论

研究发现ERS,特别是神经元UPR的改变,在AD进展中起着重要作用,细胞外的 $A\beta_{1-42}$ 可诱发氧化应激和细胞内钙离子稳态失衡,引起ERS^[6-7]。ATF4

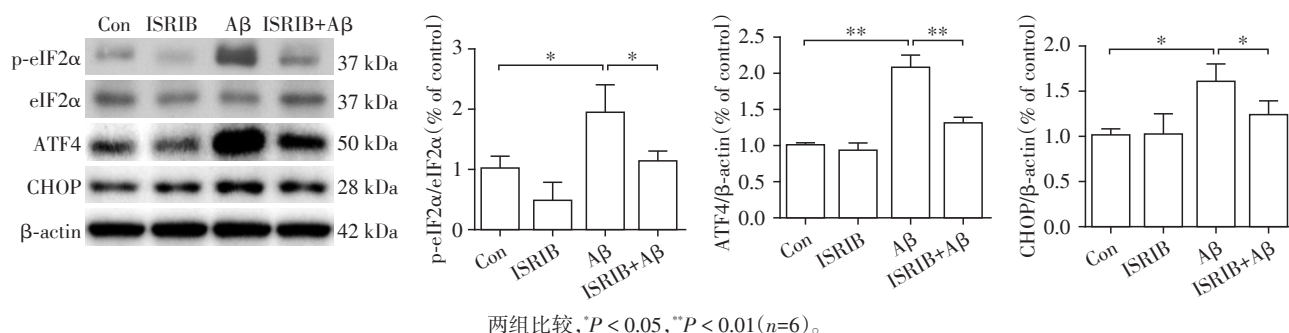


图3 Western blot检测ISRIB对A β ₁₋₄₂诱导SH-SY5Y细胞PERK-eIF2 α -ATF4信号通路的影响

Figure 3 Effect of ISRIB on the PERK-eIF2 α -ATF4 signalling pathway induced by A β ₁₋₄₂ in SH-SY5Y cells

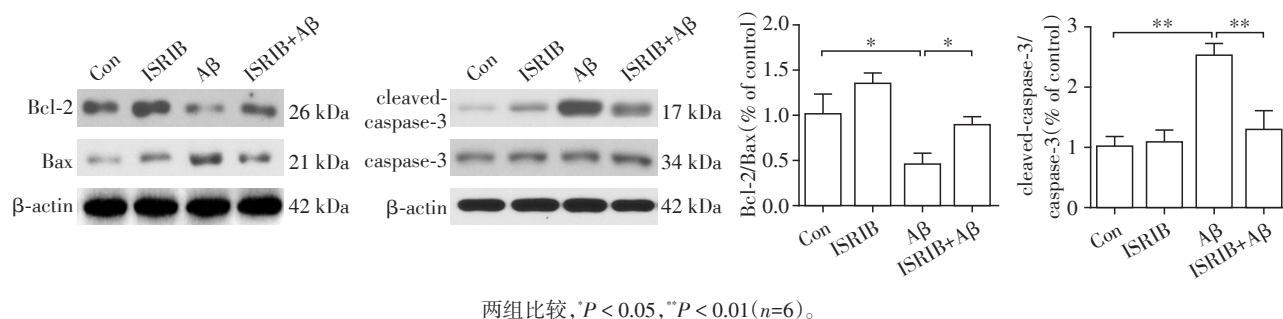


图4 Western blot检测ISRIB对A β ₁₋₄₂诱导SH-SY5Y细胞凋亡相关蛋白的影响

Figure 4 Effect of ISRIB on the apoptosis-related proteins induced by A β ₁₋₄₂ in SH-SY5Y cells

作为UPR的一个组成部分被ERS激活,已被确定为AD神经退行性信号的传递信息^[8]。此外,ATF4调控基因CHOP参与诱导细胞凋亡。尽管已显示ISRIB可增强记忆^[5],但目前尚不清楚ISRIB是否能有效改善AD神经细胞死亡。本文研究了ISRIB通过拮抗ISR对eIF2B级联信号的药理调节,能够改善AD,并提示ERS在AD的发病机制中发挥的作用,发现ISRIB抑制A β ₁₋₄₂诱导的eIF2 α 磷酸化和ATF4的表达。因此,ISRIB对神经的保护作用可能是通过抑制ATF4来介导的。

SH-SY5Y细胞是人来源的神经母细胞瘤细胞株,具有神经元的基本特征,被广泛应用于神经药理学及神经生理相关的研究。A β ₁₋₄₂能够诱导细胞凋亡及增加氧化应激反应,是常用的建立AD细胞模型的工具药。本研究结果显示,A β ₁₋₄₂处理后SH-SY5Y细胞的eIF2 α 磷酸化激活,ATF4和CHOP的蛋白表达量均升高。神经细胞中A β ₁₋₄₂主要通过 γ -分泌酶代谢产生, γ -分泌酶主要存在于内质网。免疫荧光实验验证在神经细胞中A β ₁₋₄₂主要产生并定位于内质网。在AD患者死后大脑标本、AD动物模型以及体外细胞试验中均发现UPR激活的标志,表明ERS和AD之间有着重要联系。在内质网过度应激的情况下,可通过PERK途径促进eIF2 α 磷酸化激活,增加

ATF4的翻译,从而使CHOP表达上调,进而导致细胞凋亡^[9-10]。而且,ERS本身也可以通过Bcl-2, Bax和caspase-3途径引起细胞凋亡。文献表明,ISRIB作为PERK信号通路抑制剂,可以抑制A β 诱导的神经元细胞eIF2 α 磷酸化,可防止异常软骨细胞分化,从而减轻软骨发育不良^[11]。在本实验中,ISRIB和A β ₁₋₄₂共同处理细胞,能够显著提高SH-SY5Y细胞的存活率,明显减少eIF2 α 磷酸化激活,降低ATF4和CHOP的表达量,提高Bcl-2/Bax比值,并降低cleaved-caspase-3表达量。结果表明ISRIB能够抑制A β ₁₋₄₂诱导SH-SY5Y细胞凋亡,其机制与抑制ERS造成eIF2 α 通路的激活,及其相关的凋亡信号通路相关。

综上所述,ISRIB不仅能显著提高SH-SY5Y细胞的存活率,抑制ATF4和CHOP的表达量,还能够提高Bcl-2/Bax比值和降低cleaved-caspase-3表达量,提示ISRIB在一定程度上对ERS起到了抑制作用,同时抑制了凋亡蛋白的表达,为改善AD认知功能障碍和延缓AD病程提供了可能。

[参考文献]

- [1] Zimmermann J, Alain C, Butler C. Impaired memory-guided attention in asymptomatic APOE4 carriers [J]. Sci (下转第1722页)

- [2] Elizabeth TC, Lining G, Christine LS, et al. Profound perturbation of the metabolome in obesity is associated with health risk[J]. *Cell Metab*, 2019, 29(2):488-500
- [3] Loerz C, Maser E. The cortisol-activating enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in skeletal muscle in the pathogenesis of the metabolic syndrome[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 174(11):65-71
- [4] Wang L, Liu J, Zhang A, et al. BVT.2733, a selective 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, attenuates obesity and inflammation in diet-induced obese mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7):e40056
- [5] Liu J, Wang L, Zhang A, et al. Adipose tissue-targeted 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor protects against diet-induced obesity[J]. *Endocr J*, 2011, 58(3), 199-209
- [6] Liu J, Kong X, Wang L, et al. Essential Roles of 11 β -HSD1 in regulating brown adipocyte function[J]. *J Mol Endocrinol*, 2013, 50(1):103-113
- [7] Huang M, Liu J, Sheng Y, et al. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor attenuates high-fat diet induced cardiomyopathy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 125(12):106-116
- [8] 杨洁,童佩,奚玲,等. 11 β /HSD1与糖脂代谢异常的相关关系研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(4):464-469
- [9] Dammann C, Stapelfeld C, Maser E, et al. Expression and activity of the cortisol-activating enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is tissue and species-specific[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 303(4):57-61
- [10] Sattler AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(1):1-4
- [11] Yuan X, Li H, Bai H, et al. The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor protects against the insulin resistance and hepatic steatosis in db/db mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 788(10):140-151
- [12] Park HJ, Park HS, Lee JU, et al. Sex-based selectivity of PPAR γ regulation in Th1, Th2, and Th17 differentiation[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8):E1347
- [收稿日期] 2019-06-27

(上接第1715页)

- Rep, 2019, 9(1):8138
- [2] Letoha T, Hudak A, Kusz E, et al. Contribution of syndecans to cellular internalization and fibrillation of amyloid-beta(1-42)[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):1393
- [3] 徐朝琪,许玉宇,姜盼,等. 橄榄苦苷抑制丙烯醛诱导的HBE细胞内质网应激的机制研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(9):1124-1130
- [4] Zhong S, Pei D, Shi L, et al. Ephrin-B2 inhibits Abeta25-35-induced apoptosis by alleviating endoplasmic reticulum stress and promoting autophagy in HT22 cells[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 704(1):50-56
- [5] Sidrauski C, Acosta-Alvear D, Khoutorsky A, et al. Pharmacological brake-release of mRNA translation enhances cognitive memory[J]. *Elife*, 2013, 2:e00498
- [6] 张本峥,张蒙,任怡稚,等. 消退素D1通过影响小胶质细胞代谢抑制神经炎症改善阿尔茨海默病认知功能[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(5):629-635
- [7] Lee J H, Won S M, Suh J, et al. Induction of the unfolded protein response and cell death pathway in Alzheimer's disease, but not in aged Tg2576 mice[J]. *Exp Mol Med*, 2010, 42(5):386-394
- [8] Baleriola J, Walker C A, Jean Y Y, et al. Axonally synthesized ATF4 transmits a neurodegenerative signal across brain regions[J]. *Cell*, 2014, 158(5):1159-1172
- [9] Hosoi T, Kakimoto M, Tanaka K, et al. Unique pharmacological property of ISRIB in inhibition of Abeta-induced neuronal cell death[J]. *J Pharmacol Sci*, 2016, 131(4):292-295
- [10] Briggs D I, Defensor E, Memar Ardestani P, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in learning and memory impairment and Alzheimer's disease-like neuropathology in the PS19 and APP(Swe) mouse models of tauopathy and amyloidosis[J]. *eNeuro*, 2017, 4(4):1-26
- [11] Wang C, Tan Z, Niu B, et al. Inhibiting the integrated stress response pathway prevents aberrant chondrocyte differentiation thereby alleviating chondrodysplasia[J]. *Elife*, 2018, 7:e37673
- [收稿日期] 2019-07-19