

文章编号:1003-2754(2020)06-0531-04

doi:10.19845/j.cnki.zfysjbbz.2020.0387

LRG1 通过抑制 p38/MAPK 通路的活化缓解 A β 1-42 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤

康涛, 韩征, 薛廷莉, 杨谦

摘要: 目的 探讨 LRG1 在 A β 1-42 诱导阿尔茨海默病(AD)细胞模型中的作用和机制。方法 A β 1-42 处理 SH-SY5Y 细胞体外建立 AD 细胞模型。细胞计数试剂盒(CCK-8)检测细胞活性;实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 LRG1 转录水平;免疫印迹(Western blot)实验检测 LRG1、Bcl-2 和 Bax 蛋白以及 p38 磷酸化水平;流式细胞术(Flow Cytometry)实验检测细胞凋亡率。结果 A β 1-42 处理 SH-SY5Y 细胞显著降低了细胞活性,提高 LRG1 蛋白水平。沉默 LRG1 提高 A β 1-42 诱导的 SH-SY5Y 细胞活性下降,抑制细胞凋亡;沉默 LRG1 逆转了 A β 1-42 诱导 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平的变化;沉默 LRG1 抑制 A β 1-42 诱导 p38 的磷酸化水平。另外,U-46619(p38 特异性激活剂)逆转了 LRG1 沉默对 A β 1-42 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用。结论 LRG1 沉默通过抑制 p38/MAPK 信号通路的活化缓解 A β 1-42 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤。

关键词: 阿尔茨海默病; LRG1; A β 1-42; 凋亡; p38/MAPK

中图分类号:R749.1

文献标识码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



LRG1 alleviates A β 1-42-induced SH-SY5Y cell damage by inhibiting the activation of p38/MAPK pathway KANG Tao, HAN Zheng, XUE Yanli, et al. (Department of Neurology, Shan'xi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: **Objective** To explore the role and mechanism of LRG1 in the cell model of A β 1-42-induced Alzheimer's disease (AD). **Methods** A β 1-42 stimulated SH-SY5Y cells was used to build AD cell model in vitro. The cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect cell viability. LRG1 transcriptional level was measured through real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). The phosphorylation level of p38 and the protein levels of LRG1, Bcl-2 and Bax were detected by Western blot. Apoptosis rate was checked by flow Cytometry. **Results** The results showed that treatment of A β 1-42 in SH-SY5Y cells significantly reduced cell viability and increased LRG1 protein level. LRG1 silencing promoted the cell viability and inhibited apoptosis that induced by A β 1-42. Silencing LRG1 reversed the changes of Bcl-2 and Bax protein levels which induced by A β 1-42. Silencing LRG1 inhibited the phosphorylation of p38 that induced by A β 1-42. In addition, U-46619 (p38 specific activator) reversed the protective effect of LRG1 silencing on A β 1-42-treated SH-SY5Y cell damage. **Conclusion** These results suggest that LRG1 silencing alleviates cell injury that induced by A β 1-42 through deactivating of the p38/MAPK signaling pathway.

Key words: Alzheimer's disease; LRG1; A β 1-42; Apoptosis; p38/MAPK

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是全世界老年人痴呆的主要原因。尽管用于 AD 预防和治疗药物的研究很多,但该病目前还没有有效的治疗方法,在个人、医学和社会经济水平上造成越来越大的负担^[1]。富亮氨酸 α 2 糖蛋白 1 (Leucine-rich-alpha-2-glycoprotein1, LRG1)是富含亮氨酸重复序列(leucine rich repeat, LRR)蛋白家族中高度保守的成员,参与蛋白间相互作用、信号转导、细胞粘附、细胞存活、细胞凋亡和细胞转移等^[2,3]。LRG1 与各种类型的癌症、早期中性粒细胞分化、炎症疾病、心衰以及免疫疾病有关^[4]。此外,有证据表明 LRG1 与神经退行性疾病^[5]以及特发性正常脑积水^[6]有关。Jin 等研究发现 LRG1 加重小鼠脑缺血诱导的损伤^[7]。在之前的研究报道 LRG1 在 AD 中高表达^[8],并且 Se-Met 作用于小鼠 AD 模型可以诱导 LRG1 表达水平下降^[9]。然而,LRG1 在 AD 发展中的具体作用仍是未知的。因此,本研究旨在探讨 LRG1 对 A β 1-42 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的作用,以期 AD 的治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 A β 1-42(美国 Sigma 公司),人骨髓神经母细胞瘤细胞株(SH-SY5Y,美国 ATCC),胎牛血清和 DEME(美国 Gibco 公司),Lipofectamine 2000 转染试剂盒(美国赛默飞世尔科技公司),Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),CCK-8(日本 Dojindo Molecular Technologies 公司),RNA 逆转录试剂盒、cDNA 合成试剂盒和 qPCR 定量试剂盒(日本 Takara 公司),qPCR 引物(上海生工公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司),SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术公司),聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国 Pall Corporation 公司),抗 LRG1 抗体、抗 Bcl-2 抗体、抗 Bax 抗体、抗 p-p38 抗体和抗 p38 抗体(美国 Millipore 公

收稿日期:2019-12-08;修订日期:2020-03-30

作者单位:(陕西省人民医院神经内科,陕西 西安 710068)

通讯作者:康涛, E-mail: ttaokang@163.com

司),抗 NADPH 抗体(美国 Sigma 公司),辣根过氧化物酶(HRP)二抗(南京钟鼎生物公司),Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒(南京凯基生物科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SH-SY5Y 细胞培养于添加了 10% 热灭活胎牛血清和 0.1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养,将细胞置于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中。

1.2.2 实验分组 (1)使用不同浓度的 Aβ1-42(3、6、9、12 和 15 μmol)处理 SH-SY5Y 细胞 48 h。通过 CCK-8 实验检测细胞活性,Western blot 实验检测 LRG1 蛋白表达。(2)SH-SY5Y 细胞分为未处理组、Aβ1-42 组、Aβ1-42 + shRNA 组、Aβ1-42 + shLRG1 组。培养 48 h 后,通过 RT-qPCR 检测 LRG1 mRNA 表达,CCK-8 实验检测细胞活性,流式细胞术检测凋亡率,Western blot 实验检测凋亡相关蛋白和 p-p38 的表达情况。(3)SH-SY5Y 细胞分为未处理组、Aβ1-42 组、Aβ1-42 + shLRG1 组、Aβ1-42 + shLRG1 + U-46619 组。培养 48 h 后,通过 CCK-8 实验检测细胞活性,流式细胞术检测凋亡率。

1.2.3 细胞活性检测 将 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板,每孔细胞数为 1 × 10⁴,待 SH-SY5Y 细胞长至 85% 融合后,分别用(3、6、9、12 和 15 μmol) Aβ1-42 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h,不做任何处理的细胞作为空白对照。处理完成后,使用 CCK-8 试剂盒进行细胞活性检测。

1.2.4 转染干扰质粒 将 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板,每孔细胞数为 1 × 10⁴。待细胞进入对数生长期后,按照 Lipo2000 转染试剂说明书进行 shLRG1 和 shRNA 转染。以 LRG1 mRNA 为靶点的慢病毒介导的短发夹 RNA (shRNA) 合成于上海吉码公司。序列如下:sense 5'-AGC TAA AAA GAT GTT TTC CCA GAA TGA CTC TCT TGA AGT CAT TCT GGG AAA ACA TCG GG-3';antisense 5'-AGC TAA AAA TTC TCC GAA CGT GTC ACG TTC TCT TGA AAC GTG ACA CGT TCG GAG AAG GG-3'。

1.2.5 RT-qPCR 未处理组、Aβ1-42、Aβ1-42 + shRNA、Aβ1-42 + shLRG1 细胞均匀接种于 96 孔板,37 °C 条件下培养 48 h。收集各组细胞,Trizol 法提取总 RNA,取 2 μg 总 RNA 进行反转录实验,并根据 qPCR 试剂盒说明书进行 SH-SY5Y 细胞 LRG1 转录水平检测。GAPDH 作为内参基因。LRG1 定量序列如下:sense 5'-TACAGCACCTGGATATGTTGGA-3';antisense 5'-GTTGTGGGAGATGTCG-3'。2^{-ΔΔCT}法计算基因的相对表达量,每个样本设置 3 个重复。

1.2.6 Western blot 未处理组、Aβ1-42、Aβ1-42 + shRNA、Aβ1-42 + shLRG1 细胞均匀接种于 96 孔板,37 °C 条件下培养 48 h。收集并裂解细胞,BCA 法检测蛋白的总浓度,10% ~ 12% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白并转移到 PVDF 膜上,室温封闭 3 h。

用 LRG1(1: 100)、Bcl-2(1: 100)、Bax(1: 500)、p-p38(1: 1000)、p38(1: 1000)和 NADPH(1: 2000)的初抗 4 °C 孵育过夜。随后,室温下用 HRP 二抗(1: 5000)孵育 1 h。实验重复 3 次。

1.2.7 细胞凋亡检测 未处理组、Aβ1-42、Aβ1-42 + shRNA、Aβ1-42 + shLRG1 细胞均匀接种于 96 孔板,37 °C 条件下培养 48 h。使用 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒检测各组细胞的凋亡情况。

1.2.8 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。每个实验重复 3 次。数据用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用 *t* 检验,3 组及以上比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LRG1 在 Aβ1-42 处理的 SH-SY5Y 中表达量上调 本研究将 SH-SY5Y 与 Aβ1-42 孵育模拟 AD 的细胞模型。不同浓度的 Aβ1-42(3、6、9、12 和 15 μmol)处理 SH-SY5Y 细胞 48 h 后通过 CCK-8 实验检测细胞活性。CCK-8 实验结果表明,与未处理组相比,随着 Aβ1-42 的浓度的增加,细胞的活性不断被抑制(*P* < 0.05,见图 1A)。另外,Western blot 实验结果表明,Aβ1-42 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h 后 LRG1 蛋白表达水平显著升高且与 Aβ1-42 处理浓度有关(*P* < 0.05,见图 1B)。本实验选取 12 μmol 作为 Aβ1-42 体外诱导 SH-SY5Y 损伤的浓度。

2.2 LRG1 沉默缓解 Aβ1-42 诱导的细胞凋亡 为了探究 LRG1 对 Aβ1-42 诱导的细胞损伤的作用,本研究使用 LRG1 干扰质粒转染 SH-SY5Y 细胞。将 SH-SY5Y 细胞分为以下 4 组:未处理组、Aβ1-42 组、Aβ1-42 + shRNA 组、Aβ1-42 + shLRG1 组,培养 48 h。通过 RT-qPCR 检测实验 LRG1 转录水平。RT-qPCR 结果表明,LRG1 沉默显著抑制 Aβ1-42 诱导的 LRG1 转录水平(*P* < 0.05,见图 2A)。相似地,使用 CCK-8、流式细胞术和 Western blot 分别检测细胞活性、凋亡率和凋亡相关蛋白水平。实验结果发现 Aβ1-42 处理 SH-SY5Y 细胞显著降低细胞活性、提高细胞凋亡率、抑制 Bcl-2 蛋白水平以及促进 Bax 蛋白表达;然而 LRG1 沉默缓解了由 Aβ1-42 引起的细胞活性的降低、细胞凋亡率的升高、Bcl-2 蛋白水平的下调以及 Bax 蛋白表达的上调(*P* < 0.05,见图 2B ~ D)。

2.3 LRG1 沉默调节 p38/MAPK 信号通路 为了探究 LRG1 敲除缓解 Aβ1-42 诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的可能机制,我们进一步研究了 p38/MAPK 信号通路。将 SH-SY5Y 细胞分为以下 4 组:未处理组、Aβ1-42 组、Aβ1-42 + shRNA 组、Aβ1-42 + shLRG1 组,培养 48 h。通过 Western blot 检测实验 p38 磷酸化水平。Western blot 结果表明,Aβ1-42 诱导 p38 磷酸化水平上调,然而,LRG1 沉默抑制 Aβ1-42 诱导的 p38 磷酸化水平上调(*P* < 0.05,见图 3A)。因此,LRG1 沉默可能抑制 Aβ1-42 诱导的 p38/MAPK 信号通路的激活。

2.4 p38/MAPK 信号通路的激活减弱 LRG1 沉默对 Aβ1-42 诱导细胞损伤的保护作用 随后, 我们检测了 p38/MAPK 信号通路和 LRG1 在 Aβ1-42 诱导细胞损伤中的关系。将 SH-SY5Y 细胞分为以下 4 组: 未处理组、Aβ1-42 组、Aβ1-42 + shLRG1 组、Aβ1-42 + shLRG1 + U-46619 组, 培养 48 h。通过 CCK-8 和 Western blot 检测细胞活性和凋亡率。结

果表明, 沉默 LRG1 缓解了由 Aβ1-42 引起的细胞活性的降低和细胞凋亡率的升高。然而, U-46619 (p38 信号通路的特异性激活剂) 处理显著抑制了 LRG1 沉默对 Aβ1-42 诱导细胞损伤的保护作用 ($P < 0.05$, 见图 4A、B)。这些结果表明了 LRG1 沉默保护 Aβ1-42 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤是通过抑制 p38/MAPK 信号通路的激活。

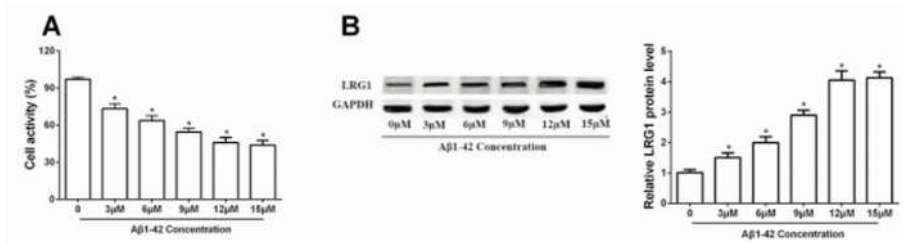


图 1 Aβ1-42 对 SH-SY5Y 细胞活性和 LRG1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)。与对照组比较 * $P < 0.05$

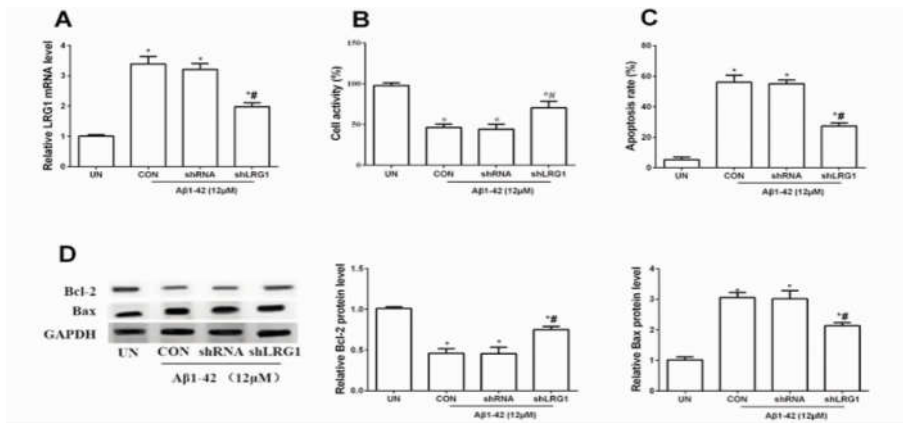


图 2 LRG1 敲除对 SH-SY5Y 细胞活性和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)。UN: 未处理组; CON: Aβ1-42 处理组。与 UN 组比较 * $P < 0.05$; 与 CON 组比较 # $P < 0.05$

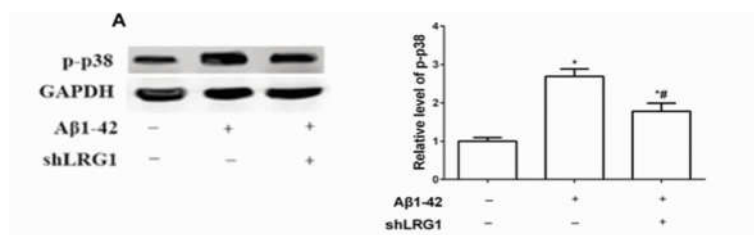


图 3 LRG1 沉默抑制 Aβ1-42 诱导 p38 磷酸化水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)。与未处理组比较 * $P < 0.05$; 与 Aβ1-42 处理组比较 # $P < 0.05$

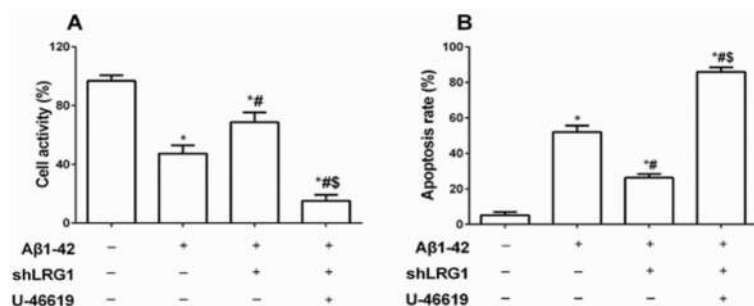


图 4 U-46619 处理逆转了沉默 LRG1 对 Aβ1-42 诱导细胞损伤的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)。与未处理组比较 * $P < 0.05$; 与 Aβ1-42 处理组比较 # $P < 0.05$; 与 Aβ1-42 + shLRG1 组比较 \$ $P < 0.05$

3 讨论

本实验探究了 LRG1 在 A β 1-42 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤中的作用和潜在机制。在这里,我们发现 A β 1-42 处理可有效地抑制 SH-SY5Y 细胞活性。此外,A β 1-42 可上调 LRG1 的表达量,且其表达量的变化与 A β 1-42 处理的浓度有关。与本研究结果类似,先前的研究也表明在七氟醚诱导 AD 小鼠中 LRG1 水平显著上调^[10],并且 Zou 等的报道同样指出 LRG1 在 AD 患者中的基因水平显著高于正常人^[8]。研究表明,在心机梗死的小鼠中沉默 LRG1 促进成纤维细胞的增殖能力^[11]。Jin 等的研究表明在小鼠急性缺血性脑卒中 LRG1 过表达显著促进神经元细胞的凋亡^[7]。同样的,本研究也发现沉默 LRG1 可有效缓解 A β 1-42 诱导的神经细胞活性降低和细胞凋亡增加。细胞凋亡是神经退行性疾病和神经系统疾病的重要原因,如帕金森病和 AD^[12]。而研究已经证明 A β 积累诱导的神经细胞凋亡在 AD 发病机制中起着举足轻重的作用^[13]。最近的研究表明在小鼠急性缺血性脑卒中 LRG1 过表达显著促进神经元细胞的凋亡和自噬^[7]。本研究的结果表明,A β 1-42 处理可以显著降低 SH-SY5Y 细胞活性,促进细胞凋亡,而沉默 LRG1 逆转了 A β 1-42 的作用。这些结果表明 LRG1 沉默可以缓解 A β 1-42 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)在细胞外刺激转化为一系列胞内磷酸化级联过程中起着重要的转导作用^[14]。研究表明 MAPKs 调节 A β 1-42 诱导 AD 神经炎症反应、神经元死亡和认知缺失^[15]。p38 信号途径作为 MAPKs 中一种,优先被炎症细胞因子和细胞外压力(如紫外线、热量和活性氧)激活^[16]。在早期 AD 患者的脑部可以发现 p38/MAPK 信号的激活,而减弱 p38/MAPK 信号可以减少 A β 1-42 诱导神经元死亡^[17]。Ban 等研究表明在甲状腺癌细胞中过表达 LRG1 显著增加 p38 的磷酸化水平^[18]。另外,Xie 等的结果也证明了 LRG1 与表皮生长因子受体相互作用进一步激活了 p38/MAPK 信号通路^[19]。本研究结果表明,沉默 LRG1 可以抑制 A β 1-42 诱导的 p38 的磷酸化和细胞凋亡,并且 p38/MAPK 信号通路的特异性激活剂 U-46619 可以逆转保护效果。这些结果表明 LRG1 沉默可以抑制 p38/MAPK 信号通路的激活从而缓解 A β 1-42 诱导的细胞损伤。

综上所述,LRG1 沉默可以缓解 A β 1-42 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤。其机制可能是 LRG1 沉默抑制 p38/MAPK 信号通路的激活。因此,LRG1 可以作为一个潜在的分子靶点用于治疗老年痴呆。

[参考文献]

[1] Mackowiak M, Mordalska P, Wedzony K. Neurologins, synapse balance and neuropsychiatric disorders[J]. *Pharmacological Reports*, 2014, 66 (5): 830-835.

[2] Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11 (6): 725-732.

[3] Wong CCL, Tse APW, Huanget YP, et al. Lysyl oxidase-like 2 is critical to tumor microenvironment and metastatic niche formation in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2014, 60 (5): 1645-1658.

[4] 于菁, 张俊. 富亮氨酸 α -2 糖蛋白-1 的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2019, 17: 32.

[5] Miyajima M, Nakajima M, Motoi Y, et al. Leucine-rich α 2-glycoprotein is a novel biomarker of neurodegenerative disease in human cerebrospinal fluid and causes neurodegeneration in mouse cerebral cortex[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (9): e74453.

[6] Nakajima M, Miyajima M, Ogino I, et al. Leucine-rich α 2-glycoprotein is a marker for idiopathic normal pressure hydrocephalus[J]. *Acta Neurochirurgica*, 2011, 153 (6): 1339-1346.

[7] Jin J, Sun H, Liu D, et al. LRG1 promotes apoptosis and autophagy through the TGF β 1/Smad1/5 signaling pathway to exacerbate ischemia/reperfusion injury[J]. *Neuroscience*, 2019, 413: 123-134.

[8] Zou C, Wang J, Huang X, et al. Analysis of transcription factor- and ncRNA-mediated potential pathogenic gene modules in Alzheimer's disease[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11 (16): 6109-6119.

[9] Zheng R, Zhang HZ, Zhao YX, et al. Transcriptomic insights into the response of the olfactory bulb to selenium treatment in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (12): 2998.

[10] Ge X, Zhang Y, Zuo Y, et al. Transcriptomic analysis reveals the molecular mechanism of Alzheimer-related neuropathology induced by sevoflurane in mice[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (10): 17555-17565.

[11] Su Q, Lv XW, Sun YH, et al. MicroRNA-494 inhibits the LRG1 expression to induce proliferation and migration of VECs in rats following myocardial infarction[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 110-122.

[12] Zhang H, Liu Y, Lao M, et al. Puerarin protects Alzheimer's disease neuronal cybrids from oxidant-stress induced apoptosis by inhibiting pro-death signaling pathways[J]. *Experimental Gerontology*, 2011, 46 (1): 30-37.

[13] Wang Y, Li Y, Yanget E, et al. Ginsenoside Rb1 inhibit apoptosis in rat model of Alzheimer's disease induced by A β 1-40[J]. *American Journal of Translational Research*, 2018, 10 (3): 796-805.

[14] Su Q, Lv XW, Sun YH, et al. MicroRNA-494 inhibits the LRG1 expression to induce proliferation and migration of VECs in rats following myocardial infarction[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2019, 18: 110-122.

[15] Ke-Wei C, Hang-Fan Z, Kai-Ge, et al. Activation of α 7 nicotinic acetylcholine receptor alleviates A β 1-42-induced neurotoxicity via down-regulation of p38 and JNK MAPK signaling pathways[J]. *Neurochemistry International*, 2018, 120: 238-250.

[16] Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (25): 14843-14846.

[17] Huang Y, Li X, Wang Y, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced hepatic stellate cell apoptosis through calcium-mediated JNK/P38 MAPK and Calpain/Caspase-12 pathways[J]. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 2014, 394 (1): 1-12.

[18] Ban Z, He J, Tang Z, et al. LRG1 enhances the migration of thyroid carcinoma cells through promotion of the epithelial-mesenchymal transition by activating MAPK/p38 signaling[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41 (6): 3270-3280.

[19] Xie ZB, Zhang YF, Jin C, et al. LRG-1 promotes pancreatic cancer growth and metastasis via modulation of the EGFR/p38 signaling[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38 (1): 75.