doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.08.001

# ·基础研究·

# Cu2+-Aβ复合物与Aβ单体诱导神经元H2O2释放作用的比较研究\*

倪雯雯<sup>1</sup> 谭小芳<sup>1</sup> 于丰祥<sup>1</sup> 宫 平<sup>1</sup> 陈 功<sup>2</sup> 侯丽娜<sup>1</sup> 李 娟<sup>1</sup> (1上海交通大学医学院基础医学院药理学教研室 上海 200025;2上海交通大学医学院临床医学系 14 级八年制 上海 200025)

摘要 目的: 比较不同摩尔比 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物与 Aβ 单体诱导神经元 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放作用的差异。方法:制备不同摩尔比 (0.1-5)的 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物,通过检测硫磺素 T (Thioflavin T, ThT) 荧光强度考察 Cu<sup>2+</sup> 对 Aβ 纤丝形成的影响。利用原代培养的大鼠海马神经 元细胞,分别以不同摩尔比 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物,不同浓度 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物(摩尔比为 1),以及 Aβ 单体和 Cu<sup>2+</sup> 处理细胞,检测培养上 清中的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量;分离线粒体,分别检测不同浓度 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物(摩尔比为 1),以及 Aβ 单体和 Cu<sup>2+</sup> 处理后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的释放;观察 不同摩尔比 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物,不同浓度 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物(摩尔比为 1),以及 Aβ 单体和 Cu<sup>2+</sup> 处理后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的释放;观察 不同摩尔比 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物,不同浓度 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物(摩尔比为 1),以及 Aβ 单体和 Cu<sup>2+</sup> 处理后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的释放;观察 不同摩尔比 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物,不同浓度 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物(摩尔比为 1),以及 Aβ 单体和 Cu<sup>2+</sup> 对神经元细胞活力的影响。结果:(1) ThT 荧光试验结果表明,Cu<sup>2+</sup> 与 Aβ(10 μM)摩尔比为 1~5范围内可明显抑制 Aβ 纤丝形成。(2)Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物(摩尔比为 1~5; Aβ 浓度为 10 μM)以及摩尔比为 1 的 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物(Aβ 浓度分别为 5,10 μM)可显著诱导神经元释放 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 另外,摩尔比为 1 时,Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物还可诱导神经元线粒体内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放;上述作用均强于 Aβ 单体或 Cu<sup>2+</sup>。(3)Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物(摩尔比为 1~5)可 显著降低神经元细胞活力,该作用强于 Aβ 单体或 Cu<sup>2+</sup>。结论:与 Aβ 单体相比,Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物诱发神经元细胞及其线粒体释放 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用更强,并诱发更为明显的神经元毒性。提示 Cu<sup>2+</sup> 与 Aβ 之间的配位结合可能增强其引发活性氧释放以及神经元毒性反  $_{c};Cu<sup>2+</sup>-Aβ$  复合物引发的活性氧可能主要来自线粒体。

关键词:Cu2+-AB复合物;AB;神经元;活性氧;阿尔茨海默病

中图分类号:R-33;R749.16;R741.02 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)08-1401-06

# Comparison of the Effects of Cu<sup>2+</sup>-Aβ Complex and Aβ Monomers on Neuronal Release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>\*

NI Wen-wen', TAN Xiao-fang', YU Feng-xiang', GONG Ping', CHEN Gong<sup>2</sup>, HOU Li-na', LI Juan<sup>1/Δ</sup>

(1 Department of Pharmacology, Basic Medicine Sciences, Shanghai Jiaotong University of Medicine, Shanghai, 200025, China;

2 14 Grade and Eight Year System of Clinical Medicine, Shanghai Jiaotong University of Medicine, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To compare the effects of  $Cu^{2+}-A\beta$  complex at different molar ratios with  $A\beta$  monomers on neuronal release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Methods: Cu<sup>2+</sup>-A β complex at different molar ratios (0.1-5) were prepared. Thioflavin T (ThT)-based fluorometric assay was used to examine the effect of Cu<sup>2+</sup> on AB fibril formation. The primary hippocampal neurons were treated with Cu<sup>2+</sup>AB complex of different ratios,  $Cu^{2+}$ -A $\beta$  complex of different concentrations (with a molar ratio of 1), A $\beta$  monomers and  $Cu^{2+}$ , respectively. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in the culture medium was measured. The mitochondria were separated and treated with different concentrations of Cu2+A B complex (with a molar ratio of 1), A  $\beta$  monomers and Cu<sup>2+</sup>, respectively. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from mitochondria were also measured. Neuronal viability was detected using Cell Counting Kit-8 (CCK-8) after the neurons were treated with Cu2+-AB complex of different ratios, Cu2+-AB complex of different concentrations (with a molar ratio of 1), A $\beta$  monomers and Cu<sup>2+</sup>. **Results:** (1) ThT-based fluorometric assay demonstrated that  $Cu^{2+}$  inhibited A $\beta$  fibril formation when the molar ratio of  $Cu^{2+}$  to A $\beta$  (10  $\mu$ M) was within 1~5. (2)  $Cu^{2+}$ -A $\beta$  complex (the molar ratio was within 1~5; the concentration of A $\beta$  was 10  $\mu$ M) and Cu<sup>2+</sup>-A $\beta$  complex with molar ratio of 1 (the concentrations of A were 5, 10  $\mu$ M) significantly induced neuron releasing of  $H_2O_2$ ; In addition, when the molar ratio was 1,  $Cu^{2+}A\beta$  complex also induced neuronal mitochondria releasing of  $H_2O_2$ ; All the above mentioned effects were stronger than that of A $\beta$  monomer or  $Cu^{2+}$ . (3)  $Cu^{2+}-A\beta$  complex (with a molar ratios within  $1 \sim 5$ ) significantly reduced the viability of neuron cells, which was stronger than that of AB monomers or Cu<sup>2+</sup>. **Conclusions:** Compared with A  $\beta$  monomers, Cu<sup>2+</sup>-A  $\beta$  complex elicited a more robust H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from neuronal cells and their mitochondria. Moreover, it induced a more overt neuronal cell death. Our observations suggest that Cu2+-AB interactions may enhance the ability of Aβ to induce reactive oxygen species release and neuronal toxicity; Cu<sup>2+</sup>-Aβ complex-evokeded reactive oxygen species may primarily come from the mitochondria.

△ 通讯作者:李娟,博士,副教授,主要研究方向:神经药理学,E-mail: lijuanpharm@163.com

<sup>\*</sup>基金项目:国家自然科学基金项目(81373417,81503044,30973538);上海市"科技创新行动计划"生物医药领域科技支撑项目 (14431901800)

作者简介:倪雯雯 (1985-),硕士研究生,主要研究方向:神经药理学,电话:13524681046,E-mail: shirleynww@shsmu.edu.cn

<sup>(</sup>收稿日期:2017-12-15 接受日期:2018-01-09)

Key words: Cu<sup>2+</sup>-Aβ complex; Aβ; Neuron; Reactive oxygen species; Alzheimer's Disease Chinese Library Classification(CLC): R-33; R949.16; R741.02 Document code: A Article ID:1673-6273(2018)08-1401-06

# 前言

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种最常见的 引起老年人群痴呆的神经退行性疾病,主要表现为进行性记忆 丧失和认知障碍。其脑内特征性病理改变包括神经元细胞外异 常聚集和沉积的 β- 淀粉样肽(β-Amyloid, Aβ)形成的老年斑 (Senile plaques, SP), 以及细胞内 Tau 蛋白过度磷酸化形成的 神经原纤维缠结(Neurofibrillary tangles, NFTs)<sup>[1,2]</sup>。迄今, AD的 病因和发病机制尚未完全阐明。Aβ级联假说认为,可溶性 Aβ 单体在脑内异常聚集是 AD 神经元退变病理生理过程的中心 环节<sup>[3]</sup>。事实上, Aβ 异常聚集的过程并不仅是单纯的自聚集过 程,还是一个多种分子参与的变构过程。大量研究表明,具有氧 还 (Redox) 活性的 Cu<sup>2+</sup> 是与 Aβ 结合并诱导 Aβ 变构的重要辅 因子(Cofactor)<sup>[4,5]</sup>。胞外 Cu<sup>2+</sup> 可通过与 Aβ 配位结合(以摩尔配 比为1的方式最为常见;1个 Aβ 单体可结合多个 Cu<sup>2+</sup>),形成 Cu2+-Aβ复合物,引起 Aβ构象改变,从而促进 Cu2+-Aβ 配位结 合物之间的聚集<sup>[68]</sup>。在此过程中,Cu<sup>2+</sup>一方面促进 Aβ 聚集,另 一方面在与 Aβ 相互作用过程中促进活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的释放,从而诱发氧化应激损伤(为 AD 最早期、 最重要的神经病理事件)<sup>[8-10]</sup>。因此,Cu<sup>2+</sup>-Aβ配位结合及共聚集 在 AD 早期神经元损伤机制中可能居于重要地位。

Cu<sup>2+</sup>-Aβ复合物的直接神经元毒性已有报道<sup>[11]</sup>。然而目前 对于其导致神经元损伤的机制尚未完全阐明。有文献报道, Cu<sup>2+</sup>-Aβ复合物的神经元毒性强于可溶性 Aβ单体<sup>[12]</sup>,但不同 摩尔配比下该复合物是否诱导神经元内 ROS 释放,以及该作 用是否强于 Aβ单体以及 Cu<sup>2+</sup>,目前尚不清楚。为此,本研究采 用硫磺素 T(Thioflavin T, ThT,可与异常聚集态蛋白质结构中 的-片层特异性结合)荧光检测,观察了不同配比下 Cu<sup>2+</sup>对 Aβ 纤丝形成的作用;应用原代培养的海马神经元细胞模型,对不 同配比 Cu<sup>2+</sup>-Aβ复合物与 Aβ单体诱导神经元 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放作用 及其神经元毒性进行了比较研究。

# 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 **试验试剂** 人 A $\beta_{1.40}$  (Biosource 公司), CuCl<sub>2</sub>(Sigma 公 司)。六氟异丙醇(Hexafluoro-2-propanol, HFIP, Acros organics 公司), 二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma 公司)。 胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS), DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium), Neurobasal 培养基, B27 supplement, 双抗 (青霉素和链霉素)、EBSS(Earle's Balanced Salt Solution)、胰蛋 白酶购自 Gibco 公司;谷氨酰胺、多聚赖氨酸、阿糖胞苷购自 Sigma 公司。CCK-8 试剂盒(Cell Counting Kit-8, 日本同仁化学 研究所),线粒体分离试剂盒(Mitochondria Isolation Kit, Sigma 公司), 过氧化氢检测试剂盒 (Amplex<sup>®</sup> Red Hydrogen Peroxide, Invitrogen 公司)。

1.1.2 试验仪器 酸度计(DELTA 320, Mettler Toledo 公司),

多功能酶标仪(Varioskan Flash, Thermo 公司), 生物安全柜(Nuaire 公司), 二氧化碳培养箱(Thermo 公司), 低温高速离心机(Eppendorf 公司), 超纯水系统(Millipore 公司), 电子天平(SARTORIUS 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Aβ 贮备液配制 将 1.0 mg 的 A $\beta_{1.40}$  溶于 1 mL 的 HFIP 中,室温静置 1-2 h 后在氮吹仪上用高纯氮慢速吹干。随后加入 DMSO 溶解,配置成终浓度为 500  $\mu$ M 的贮备液,分装冻存于 -20℃。用该方法制备的 Aβ 贮备液,其二级结构以可溶性无规 卷曲和 α- 螺旋为主,保证聚集反应初始的 Aβ 状态为非聚集 可溶性单体。

1.2.2 CuCl<sub>2</sub>**贮备液** CuCl<sub>2</sub>贮备液 (100 mM,使用前经 0.22 μm 滤膜过滤)应用 Millipore 超纯水配制。

1.2.3 反应缓冲液配制 应用含 20 mM HEPES (其与 Cu<sup>2+</sup>等 离子亲和力很低,而且金属离子在该溶液中可溶性好)的生理 盐水溶液作为反应缓冲液 (pH 6.6,与 AD 脑内微酸环境相似
<sup>(13)</sup>。现用现配,使用前经 0.22 μm 滤膜过滤。

1.2.4 Cu<sup>2+</sup>-Aβ<sub>1-40</sub> 复合物制备 将 CuCl<sub>2</sub> 和 Aβ<sub>1-40</sub> (500 μM)贮 备液按不同配比混合,用 pH 6.6 的 HEPES 缓冲液稀释至需要 浓度,37 ℃恒温生化箱孵育 24 h,得到不同摩尔比的 Cu<sup>2+</sup>-A β<sub>1-40</sub> 复合物<sup>[11]</sup>。

1.2.5 ThT 溶液配制 应用 50 mM 甘氨酸溶液(pH 8.5)配制,
现用现配,使用前经 0.22 μm 滤膜过滤。

1.2.6 ThT 荧光试验 将 Cu<sup>2+</sup> 和 Aβ<sub>1-0</sub>按照 0.1:1、0.5:1、1:1、2: 1 和 5:1 不同摩尔比混合,于反应缓冲液中 37℃进行孵育(同 时设立对照组、Aβ 单体组和 Cu<sup>2+</sup> 组)。对照组用含 20 mM HEPES 的生理盐水处理,Aβ<sub>1-0</sub> 终浓度为 10 μM,反应体系终 体积为 100 μL。孵育 24 h 后,反应体系中加入 10 μL ThT(终 浓度为 10 μM),在酶标仪上读取荧光强度(激发波长 446 nm, 发射波长 485 nm)。

1.2.7 原代大鼠海马神经元培养 新生 24 h SD 大鼠(购自上海斯莱克试验动物有限公司),分出半月形海马,置于解剖液中,将海马剪碎后移入离心管中,使其自然沉淀至管底;吸除管内液体,加入消化液,摇动消化 10-20 min;吸除消化液,加入贴壁液终止消化,吹打 15-20 次使细胞分散,静置 2 min,将上清移入另一离心管;将上清离心后倾去上清,留沉淀,加入贴壁液,吹打;显微镜下计数,按所需密度种于培养板(事先用多聚赖氨酸包被)后置于 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱,37℃培养;4-5 h 后换液,仍为贴壁液;第 2 天更换为神经元培养液;第 3 天加阿糖胞 苷至终浓度 0.5-1 µM;随后每 3 天半量换液,培养 10-14 天后可用于试验<sup>[11]</sup>。

1.2.8 海马神经元线粒体分离 原代海马神经元细胞融合率 为80%-90%时,用0.25%胰酶消化1min,加入含10%FBS的 DMEM 终止,600×g离心5min;弃上清,加入预冷PBS 重悬 细胞,显微镜下计数,4℃,600×g离心5min,弃上清,重复此 步骤一次,不用计数;用1×裂解缓冲液重悬细胞;冰上孵育5

min,每隔1min 就用枪头吹打混匀一次;加入2倍体积的1× 提取液A(含蛋白酶抑制剂);4℃,600×g离心10min;小心地 将上清液转移到干净的1.5mLEP管中,4℃,11000×g离心 10min;吸除上清液,加入1×储存液重悬,用于后续试验。

1.2.9 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 测定 向 96 孔板中每孔加入 100 μL 反应液(含 10 mM Red reagent 和 10 U/mL HRP 的 KRPG 溶液),放于 37℃孵 育 10 min; 向每孔加入标准品和 20 μL 用 KRPG 缓冲液 (含 145 mM NaCl、5.7 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、4.86 mM KCl、0.54 mM CaCl<sub>2</sub>、 1.22 mM MgSO<sub>4</sub> 和 5.5 mM glucose, pH 7.35)稀释的海马神经 元细胞,每孔约 1.5× 10<sup>4</sup> 个细胞;将细胞分为对照组、不同摩尔 比 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 组、不同浓度 Aβ 单体和 Cu<sup>2+</sup>处理组、KRPG 处理 组,每组 3 复孔;或者分离细胞线粒体后加药:对照组、Cu<sup>2+</sup>-Aβ 组(1:1)、不同浓度 Aβ 单体和 Cu<sup>2+</sup> 处理组、KRPG 处理组 3 复孔。将 96 孔板置于 37℃孵育 1 h;期间于不同时间点 560 nm 波长检测各孔吸光度,根据 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 标准曲线计算相应的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度。

1.2.10 CCK-8 细胞活力检测 原代大鼠海马神经元以 2× 10<sup>4</sup>/ 孔接种于 96 孔板,细胞融合率达到 80%时加药;设置对照 组、不同摩尔比 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 组、不同浓度 Aβ 单体组和 Cu<sup>2+</sup> 处理 组,每组 3 复孔。24 h 后每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL (总体积 100 μL),37<sup>°</sup>C,5% CO<sub>2</sub> 继续培养 1 h,酶标仪测定吸光度(测定 波长 450 nm)。细胞存活率 (%)=处理组吸光度 / 对照组吸光 度× 100%。

# 1.3 统计学方法

试验数据采用均数±标准误表示。组间差异应用 Student's t 检验(两组比较)或单因素方差分析(ANOVA;多组比较)进行比较。P<0.05 即认为差异具有统计学意义。

### 2 结果

### 2.1 不同摩尔比 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物 ThT 荧光检测结果

ThT 荧光检测结果显示,与 Aβ 单独孵育组比较,随着 Cu<sup>2+</sup>/Aβ<sub>140</sub> 摩尔比增加,ThT 荧光强度随之下降;其中 Cu<sup>2+</sup>与 Aβ (摩尔比分别为 1、2 和 5) 共孵育可明显降低 ThT 荧光强 度,见图 1。





#### 2.2 不同摩尔比 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物对海马神经元 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放的影响

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 检测结果显示, 与 A<sub>β140</sub> 单体比较, Cu<sup>2+</sup>-A<sub>β140</sub> 复合物 (摩尔比分别为 1、2 和 5) 能够非常明显刺激海马神经元细胞 释放 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 见图 2A<sub>0</sub>1~5  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup> 处理组对神经元 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放无 明显改变, 当剂量增加至 10  $\mu$ M 或以上时, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生明显增 加, 见图 2B<sub>0</sub> 在摩尔比为 1 时, Cu<sup>2+</sup>-A<sub>β140</sub> 复合物在 1~10  $\mu$ M 剂量下可导致剂量依赖性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放增加。该作用在 5 min 即 可出现, 见图 2C<sub>0</sub> A<sub>β140</sub> 单体(1~10  $\mu$ M)对神经元 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放无 明显影响, 见图 2D<sub>0</sub>

#### 2.3 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物对海马神经元线粒体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放的影响

摩尔比为 1 时, Cu<sup>2+</sup>-A $\beta_{1.40}$  (终浓度分别为 5 和 10  $\mu$ M)复 合物能够明显促进海马神经元线粒体内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放,见图 3A。 A $\beta_{1.40}$ (1、5 和 10  $\mu$ M)未诱发明显 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放;1~5  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup> 对海 马神经元线粒体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放无明显影响;当剂量增加至 10  $\mu$ M 时, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放明显增多,见图 3B。

2.4 不同摩尔比 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物对海马神经元细胞活力的影响

CCK-8 检测结果显示,与 Con 组比较,Cu<sup>2+</sup>-A $\beta_{140}$ 复合物 (摩尔比分别为1、2和5)处理组的海马神经元活力有所下降, 见图 4A。摩尔比为1时,Cu<sup>2+</sup>-A $\beta_{140}$ 复合物在10 μM 剂量下可 导致海马神经元活力较明显下降,见图 4B。A $\beta_{140}$ 在终浓度分 别为1~10 μM 时,对海马神经元活力没有明显影响,见图 4C。 不同浓度 Cu<sup>2+</sup>处理组对海马神经元活力没有明显影响,见图 4D。

### 3 讨论

作为脑内重要的过渡金属离子,Cu<sup>2+</sup>可与 Aβ 单体亲水 N 端的 His6、His13 或 His14 等残基配位结合,形成 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合 物<sup>[14]</sup>。本研究首先制备了类似脑内微酸环境下形成的 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物,比较了不同摩尔配比下 Cu<sup>2+</sup>对 Aβ 纤丝形成的影响。 ThT 荧光试验结果显示,Cu<sup>2+</sup>与 Aβ(摩尔比为 1~5)共孵育可 明显降低 ThT 荧光强度,提示 Cu<sup>2+</sup> 龄抑制 β- 片层构象形成, 从而抑制 Aβ 纤丝形成。这与文献报道结果<sup>[15]</sup>以及本课题组前 期研究结果相一致<sup>[11]</sup>。然而关于 Cu<sup>2+</sup> 对 Aβ 构象及聚集状态的 影响一直存在争议。有研究认为 Cu<sup>2+</sup> 与 Aβ 结合后可抑制纤丝 形成,但也有结果显示 Cu<sup>2+</sup> 促进 Aβ 纤丝形成,或促进 Aβ 寡 聚体或具无定形结构 Aβ 聚集物的形成<sup>[7,8]</sup>。结果存在差异的原 因可能是由于试验条件以及检测方法不同所致。

有资料表明,非细胞体系中 Cu<sup>2+</sup>与 Aβ 的相互作用可产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>16</sup>。然而 Cu<sup>2+</sup>与 Aβ 配位结合后形成的共聚集物是否诱导 神经元内 ROS 释放,尚未见文献报道。因此,我们首次利用大 鼠原代海马神经元细胞,探究了不同摩尔比 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物及 Aβ 单体对海马神经元 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放的影响。结果显示,Cu<sup>2+</sup>-Aβ 摩 尔比为 1~5 时,可明显促进神经元 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放;且随着摩尔比的 增加,该作用逐步增强。鉴于 Cu<sup>2+</sup>与 Aβ 配位结合以 1:1 的方 式最为普遍<sup>[8]</sup>,我们又着重检测了不同浓度 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物(摩 尔比为 1)对海马神经元 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放的影响。我们发现,该复合物 在 1~10  $\mu$ M 剂量下可导致剂量依赖性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放增加,而 Aβ 单体对神经元 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放无明显影响。Silvia Bolognin 等的研究 结果<sup>1(7)</sup>显示,Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物未引起神经元内 ROS 释放增加, 可能是由于 Aβ 与其金属复合物的浓度较低(0.2  $\mu$ M)引起。



图 2 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物对海马神经元 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放的影响

Fig.2 The effects of Cu2+-AB complex on H2O2 release of hippocampal neurons

Note: (A) The effects of  $Cu^{2+}$ -A $\beta$  complex at different molar ratios with A $\beta$  monomers on neuronal release of  $H_2O_2$  after 1 h stimulation. (B) The effects of  $Cu^{2+}$  (1~50  $\mu$ M) on neuronal release of  $H_2O_2$  after 1 h stimulation. (C) The effects of  $Cu^{2+}$ -A $\beta$  complex (1, 5, 10  $\mu$ M, molar ratio=1) on neuronal release of  $H_2O_2$ .(D)The effects of A $\beta$  monomers (1, 5, 10  $\mu$ M) on neuronal release of  $H_2O_2$ .

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs Control group; ###P < 0.001 vs A $\beta_{1.40}$  group, means ± SEM, n = 3.





Fig.3 The effects of  $Cu^{2+}$ -A $\beta$  complex on  $H_2O_2$  release of mitochondria of hippocampal neurons

Note: (A) The effects of  $Cu^{2+}A\beta$  complex (molar ratio=1) on mitochondrial release of  $H_2O_2$ . (B) The effects of  $A\beta$  monomers and  $Cu^{2+}(1, 5, 10 \ \mu\text{M})$  on mitochondrial release of  $H_2O_2$  after 1 h stimulation. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs Control group, means ± SEM, n = 3.

线粒体是除了细胞膜 NADPH 氧化酶之外,细胞内 ROS 的另一个重要来源<sup>[18,19]</sup>。我们前期应用小胶质细胞的研究表明,

Cu<sup>2+</sup>-Aβ复合物诱发的 ROS 主要来自线粒体,而不是经由 NADPH 氧化酶途径产生<sup>[20]</sup>。因此,我们进一步检测了不同浓度



图 4 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物对海马神经元细胞活力的影响

Fig.4 The effects of  $Cu^{2+}-A\beta$  complex on cell viability of hippocampal neurons

Note: (A) The effects of  $Cu^{2+}A\beta$  complex at different molar ratios with  $A\beta$  monomers on cell viability of hippocampal neurons after 24 h stimulation. (B) The effects of  $Cu^{2+}A\beta$  complex (1, 5, 10  $\mu$ M, molar ratio=1) on cell viability of hippocampal neurons after 24 h stimulation.

(C) The effects of A $\beta$  monomers (1, 5, 10  $\mu$ M) on cell viability of hippocampal neurons after 24 h stimulation.

(D) The effects of  $Cu^{2+}$  (1~50  $\mu$ M) on cell viability of hippocampal neurons after 24 h stimulation. \*P < 0.05 vs Control group, means ± SEM, n =6.

Cu<sup>2+</sup>-Aβ复合物(摩尔比为1)对海马神经元线粒体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放 的影响。结果显示,Cu<sup>2+</sup>-Aβ复合物(5和10 $\mu$ M)可导致海马神 经元线粒体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放明显增加。值得注意的是,该复合物诱发 的线粒体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 释放,在量效、时效关系上与整个细胞释放 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的特征相一致。因此,结合 Cu<sup>2+</sup>-Aβ复合物诱发神经元释放 ROS 的结果,我们推测,Cu<sup>2+</sup>与 Aβ之间的配位结合可能增强 了 Aβ 引发的 ROS 释放作用,而 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物诱发产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可能主要来源于线粒体。

在 AD 发病机制中,氧化应激导致的神经元损伤占有重要 地位。研究表明,在 AD 患者脑内,ROS 的产生和清除严重失 衡,大量聚集的 ROS( $H_2O_2$ 、OH<sup>-</sup>和 O<sub>2</sub>)能够氧化脂质、蛋白质 和 DNA,引起细胞损伤<sup>[21,22]</sup>。我们观察了不同摩尔比 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物以及 Aβ 单体对海马神经元细胞活力的影响。CCK -8 结果显示,Aβ 单体(1~10  $\mu$ M)和 Cu<sup>2+</sup>(1~50  $\mu$ M)均无直接神经 元毒性,但二者配位结合形成复合物后(摩尔比为 1~5;Aβ 浓 度为 10  $\mu$ M)可显著降低神经元细胞活力,提示 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 相互 作用可增强 Aβ 神经元毒性作用,这与文献报道的结果<sup>[12]</sup>相似。 我们注意到,有文献记载线粒体 ROS 对神经元有毒性,是诱发 神经元损伤的重要因素<sup>[23]</sup>。由于 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复合物可导致线粒体 ROS 释放,我们推测其引发的神经元毒性可能与促进线粒体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生有关。

综上所述,本研究首次证实 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 配位结合可增强 Aβ 引发神经元 ROS 释放作用,并增强其神经元毒性;Cu<sup>2+</sup>-Aβ 复 合物引发的 ROS 可能主要来自线粒体。本研究为阐明 Cu<sup>2+</sup>-Aβ 互作通过增强氧化应激引发神经元损伤提供了细胞学试验证 据。然而该复合物是直接进入神经元细胞引发线粒体 ROS 释 放增加?还是先作用于细胞膜上的某个初始靶点,经由胞内信 号转导通路,促进线粒体 ROS 释放?上述问题有待进一步的研 究证实。

#### 参考文献(References)

- Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2016, 388(10043): 505-517
- [2] Kocahan S, Dogan Z. Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors [J]. Clin Psychopharmacol Neurosci, 2017, 15(1): 1-8
- [3] Karran E, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure[J]? J Neurochem, 2016, 139 (Suppl 2): 237-252

- [4] Stewart KL, Radford SE. Amyloid plaques beyond Aβ: a survey of the diverse modulators amyloid aggregation[J]. Biophys Rev, 2017, 9(4): 405-419
- [5] Tamano H, Takeda A. Is interaction of amyloid β-peptides with metals involved in cognitive activity?[J]. Metallomics, 2015, 7(8): 1205-1212
- [6] Huy PD, Vuong QV, La Penna G, et al.Impact of Cu (II) Binding on Structures and Dynamics of Aβ42 Monomer and Dimer: Molecular Dynamics Study[J]. ACS Chem Neurosci, 2016, 7(10): 1348-1363
- [7] Lin CJ, Huang HC, Jiang ZF. Cu (II) interaction with amyloid-beta peptide: a review of neuroactive mechanisms in AD brains [J]. Brain Res Bull, 2010, 82(5-6): 235-142
- [8] Tougu V, Tiiman A, Palumaa P. Interactions of Zn(II) and Cu(II) ions with Alzheimer's amyloid-peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity[J]. Metallomics, 2011, 3(3): 250-261
- [9] Mayes J, Tinker-Mill C, Kolosov O, et al. β-amyloid fibrils in Alzheimer disease are not inert when bound to copper ions but can degrade hydrogen peroxide and generate reactive oxygen species[J]. J Biol Chem, 2014, 289(17): 12052-12062
- [10] Chassaing S, Collin F, Dorlet P, et al. Copper and heme-mediated Abeta toxicity: redox chemistry, A beta oxidations and anti-ROS compounds[J]. Curr Top Med Chem, 2012, 12(22): 2573-2595
- [11] Yu F, Gong P, Hu Z, et al. Cu (II) enhances the effect of Alzheime's amyloid-β peptide on microglial activation [J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 122
- [12] Sharma AK, Pavlova ST, Kim J, et al. The effect of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on the Aβ42 peptide aggregation and cellular toxicity [J]. Metallomics, 2013, 5(11): 1529-1536
- [13] Atwood CS, Moir RD, Huang X, et al. Dramatic aggregation of Alzheimer A by Cu (II) is induced by conditions representing physiological acidosis[J]. J Biol Chem, 1998, 273(21): 12817-12826
- [14] Goch W, Bal W.Numerical Simulations Reveal Randomness of Cu

(II) Induced Aβ Peptide Dimerization under Conditions Present in Glutamatergic Synapses[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170749

- [15] Chen WT, Liao YH, Yu HM, et al. Distinct effects of Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, and Al<sup>3+</sup> on amyloid-beta stability, oligomerization, and aggregation: amyloid-beta destabilization promotes annular protofibril formation [J]. J Biol Chem, 2011, 286(11): 9646-9656
- [16] Cheignon C, Jones M, Atrián-Blasco E,et al.Identification of key structural features of the elusive Cu-Aβ complex that generates ROS in Alzheimer's disease[J]. Chem Sci, 2017, 8(7): 5107-5118
- [17] Bolognin S, Zatta P, Lorenzetto E, et al. β-Amyloid-aluminum complex alters cytoskeletal stability and increases ROS production in cortical neurons[J]. Neurochem Int,2013, 62(5): 566-574
- [18] Sharma AK, Singh V, Gera R, et al. Zinc Oxide Nanoparticle Induces Microglial Death by NADPH-Oxidase-Independent Reactive Oxygen Species as well as Energy Depletion [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(8): 6273-6286
- [19] Wong HS, Dighe PA, Mezera V, et al. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions[J]. J Biol Chem, 2017, 292(41): 16804-16809
- [20] Hu Z, Yu F, Gong P, et al. Subneurotoxic copper (II)-induced NF-κB-dependent microglial activation is associated with mitochondrial ROS [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2014, 276 (2): 95-103
- [21] Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease[J]. J Alzheimers Dis, 2017, 57(4): 1105-1121
- [22] Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, et al. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases[J]. Exp Neurobiol, 2015, 24(4): 325-340
- [23] Nissanka N, Moraes CT. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease [J]. FEBS Lett, 2017, Dec 27. [Epub ahead of print]

#### (上接第1434页)

- [18] Keijzer R, van Tuyl M, Meijers C, et al. The transcription factor GATA6 is essential for branching morphogenesis and epithelial cell differentiation during fetal pulmonary development[J]. Development, 2001, 128(4): 503-511
- [19] Shi Z-D, Lee K, Yang D-p, et al. Genome Editing in hPSCs Reveals GATA6 Haploinsufficiency and a Genetic Interaction with GATA4 in Human Pancreatic Development [J]. Cell Stem Cell, 2017, 20 (5): 675-688
- [20] Nishida W, Nakamura M, Mori S, et al. A Triad of Serum Response Factor and the GATA and NK Families Governs the Transcription of Smooth and Cardiac Muscle Genes [J]. J. Biol. Chem., 2002, 277(9): 7308-7317
- [21] Kubo H, Shimizu M, Taya Y, et al. Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry[J]. Genes Cells, 2009, 14(3): 407-424
- [22] Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche [J]. Eur Cell Mater,

2012, 23: 13-27

- [23] Sozen T, Ozisik L, Basaran NC. An overview and management of osteoporosis[J]. Eur J Rheumatol, 2017, 4(1): 46-56
- [24] Hill TR, Aspray TJ. The role of vitamin D in maintaining bone health in older people[J]. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2017, 9(4): 89-95
- [25] Kiernan J, Hu S, Grynpas MD, et al. Systemic Mesenchymal Stromal Cell Transplantation Prevents Functional Bone Loss in a Mouse Model of Age Related Osteoporosis [J]. Stem cells translational medicine, 2016, 5(5): 683-693
- [26] Bayat M, Jalalifirouzkouhi A. Presenting a Method to Improve Bone Quality Through Stimulation of Osteoporotic Mesenchymal Stem Cells by Low-Level Laser Therapy[J]. Photomed Laser Surg, 2017
- [27] Mohanakrishnan V, Ramachandran A, Rajendran K, et al. Regulation of Runx2 by Histone Deacetylases in Bone [J]. Current Protein & Peptide Science, 2016, 17(4): 343-351
- [28] Chow SK, Leung KS, Qin J, et al. Mechanical stimulation enhanced estrogen receptor expression and callus formation in diaphyseal long bone fracture healing in ovariectomy-induced osteoporotic rats [J]. Osteoporos Int, 2016, 27(10): 2989-3000