

2,5-二叔丁基对苯二酚对阿尔茨海默病细胞模型的保护作用

孙上奇 刘聪聪 田野 张兆辉 张振涛

【摘要】 目的 探讨 2,5-二叔丁基对苯二酚(2,5-Di-tert-butylhydroquinone, DBHQ)对阿尔茨海默病细胞模型的保护作用及分子机制。**方法** 利用 K18 聚集体处理稳定转染 Tau 片段的 HEK293 细胞,制作 Tau 蛋白聚集的细胞模型;利用 DBHQ 处理细胞,荧光显微镜检测 DBHQ 对 Tau 蛋白聚集的影响;在 HT22 神经元中转导 K18 聚集体,光镜下观察 DBHQ 对 HT22 细胞形态的影响;用 DCFH-DA 探针及 DHE 探针检测 DBHQ 对活性氧和超氧阴离子的影响;在 HT22 细胞中转染 mito-Dendra2 质粒,共聚焦显微镜动态记录线粒体融合功能。**结果** K18 聚集体诱导细胞内 Tau 蛋白聚集,而 DBHQ 可以减轻 K18 聚集体诱导的 Tau 蛋白聚集;K18 聚集体处理后 HT22 细胞发生形态改变,而 DBHQ 减轻 K18 诱导的细胞形态变化,并降低细胞内活性氧和超氧阴离子水平;线粒体融合功能检测发现 DBHQ 增强线粒体功能。**结论** 本研究表明 DBHQ 可减少细胞内的 Tau 蛋白聚集,并保护线粒体、减轻氧化应激水平,对阿尔茨海默病细胞模型起到保护作用。

【关键词】 2,5-二叔丁基对苯二酚 阿尔茨海默病 氧化应激 线粒体

【中图分类号】 R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2022)01-0003-06

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.01.001

Protective effect of 2,5-Di-tert-butylhydroquinone on cellular models of Alzheimer's disease Sun Shangqi, Liu Congcong, Tian Ye, et al. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan Hubei 430060

【Abstract】 Objective To explore the protective effect and molecular mechanisms of 2,5-di-tert-butylhydroquinone (DBHQ) on cellular models of Alzheimer's disease. **Methods** K18 fibrils were used to treat HEK293 cells stably transfected with tau fragments to make a cellular model of tau aggregation. The effect of DBHQ on tau aggregation was detected by fluorescence microscope. The effect of DBHQ on the morphology of K18 fibrils-treated HT22 cells in the presence or absence of DBHQ were observed under a light microscope. DCFH-DA probe and DHE probe were used to detect the effect of DBHQ on the levels of reactive oxygen species and superoxide anion. To observe the effect of DBHQ on mitochondrial function, the HT22 cells were transfected with mito-Dendra2 plasmid. The mitochondrial fusion function was dynamically recorded by a confocal microscope. **Results** K18 fibrils induced tau aggregation, while DBHQ reduced the aggregation of tau. Besides, DBHQ attenuated K18-induced cell morphological changes of HT22 cells, and decreased the levels of reactive oxygen species and superoxide anions in HT22 cells. The mitochondrial fusion function test found that DBHQ protected mitochondrial function from the toxicity of K18 fibrils. **Conclusion** Our results indicate that DBHQ alleviates the accumulation of tau in cells. It attenuates mitochondrial dysfunction, reduces oxidative stress, and plays a protective role in the cellular models of Alzheimer's disease.

【Key words】 2,5-Di-tert-butylhydroquinone Alzheimer's disease Oxidative stress Mitochondria

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以进行性认知功能障碍和行为损害为主要临床表现的神

退行性疾病,发病后症状进行性加重,严重影响患者的生活质量。目前尚无明确有效的治疗方法可以延缓疾病的进展,仅能部分缓解症状。AD 的主要发病机制包括淀粉样蛋白沉积、Tau 蛋白磷酸化、氧化应激、线粒体功能障碍和钙稳态失调等^[1-3]。脑内 Tau 蛋白的沉积与 AD 疾病严重程度呈正相关^[4]。Tau 是微管组装相关的蛋白,在维持神经元

基金项目:国家自然科学基金(No. 81822016, 81771382)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科[孙上奇 刘聪

聪 田野 张兆辉 张振涛(通信作者)]

生长发育过程中扮演重要角色,其聚集可引起神经毒性,并诱导线粒体功能障碍、氧化应激等,导致神经元损伤,因此抑制 Tau 蛋白的聚集及促进其清除是 AD 可能的治疗策略之一^[5]。2,5-二叔丁基对苯二酚(2,5-Di-tert-butylhydroquinone, DBHQ)是一种小分子钙泵抑制剂,也是一种工业抗氧化剂,常用于橡胶、乳胶、油脂、合成树脂及医疗用品中。近年来有学者发现 DBHQ 可以调节细胞内钙离子代谢^[6],并显著延长秀丽隐杆线虫的寿命^[7]。由于氧化应激和钙离子水平异常在 AD 的发病中发挥重要作用,本研究在细胞模型中观察了 DBHQ 对 Tau 蛋白聚集、氧化应激和线粒体功能障碍的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞

稳定转染 Tau 蛋白 RD 结构域的 HEK293 细胞(Tau-HEK293 细胞)由本实验室构建,HT22 海马神经元购自中科院上海细胞库。Tau-HEK293 细胞和 HT22 细胞培养于 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)培养基中,添加 10%胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μ g/mL,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养,隔天换液,每 2 d 以 1:3 的比例传代。

1.2 主要试剂及仪器

DBHQ 和二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)购自 SigmaAldrich,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)购自 BioFRox,活性氧试剂盒购自南京建成公司,超氧阴离子试剂盒和碘化丙啶-Hoechst(Propidium Iodide-Hoechst 33342,PI-Hoechst)凋亡试剂盒购自碧云天公司,Lipofectamine2000 购自 Invitrogen,在线粒体中表达 Dendra2 荧光蛋白(Expressing dendra2 fluorescent protein in mitochondria,Mito-dendra2)质粒购自 Addgene,荧光显微镜及解剖显微镜为 Olympus 公司产品,共聚焦显微镜为 Leica 公司产品,恒温混匀仪为 Eppendorf 公司产品。

1.3 原代神经元的分离与培养

无菌条件下用多聚赖氨酸包被 6 孔板,无菌水洗 4 遍加入 DMEM 培养基(86%普通培养基,1%青霉素-链霉素溶液,1%谷氨酰胺,6%胎牛血清,6%马血清)于培养箱温育;颈椎脱臼处死小鼠,酒精消毒孕鼠皮肤及子宫内取出的胎鼠,解剖显微镜下取完整脑组织并分离嗅球,剔除脑膜及下丘脑,钝性

分离双侧大脑皮层,剪碎取出的皮层组织,并用巴氏管吹打分散组织,加入 5 mL 马加牛血清培养基于 15 mL 离心管重悬(均为冰上操作),4 $^{\circ}$ C 1000 r/min \times 5 min,重悬后同样条件下离心 5 min,重悬后计数,铺至 6 孔板并调节细胞密度至 1×10^6 /mL;6 h 后更换培养基(96% Neurobasal 培养基,1%谷氨酰胺,2% B27,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μ g/mL)。于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养,2 d 后用阿糖胞苷 10 μ mol/L 处理,4 h 后更换培养基,第 5 d 补充神经元培养基并进行转导 K18 聚集体。

1.4 K18 蛋白的纯化和聚集

将携带 His 标签的 K18 质粒转化至大肠杆菌(Escherichia coli BL21, BL21),添加 0.5 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导表达,用亲和层析镍柱纯化带 His 标签蛋白;10 mmol/L 咪唑缓冲液洗去杂蛋白及透析置换出 K18 蛋白溶液,BCA 蛋白定量(Bicinchoninic acid protein assay, BCA)法测定 K18 蛋白水平,K18 单体储存于 -80 $^{\circ}$ C,最后冻干储存;制备 K18 聚集体时用磷酸缓冲液(Phosphate buffer saline, PBS)溶解 K18 单体粉末,稀释至 1 mg/mL,溶解混匀后离心 15000 r/10 min,取上清,其中每 1 mL 溶液中加入肝素(终水平 5 μ mol/L)及二硫苏糖醇(DL-Dithiothreitol, DTT,终水平 5 μ mol/L),37 $^{\circ}$ C 恒温混匀仪 1000 r/min 震荡 1~2 d,第 2 d 用硫磺素 T 染料检测 K18 蛋白聚集情况,验证聚集后的 K18 聚集体分装储存于 -80 $^{\circ}$ C。

1.5 细胞及神经元转导

处于对数生长期的 Tau-HEK293 细胞生长至 60%~70%密度时提前半小时更换成 3%FBS 培养基,每 250 μ L 的减血清培养基(Reduced serum medium, Opti-MEM)溶液中加入提前超声均匀的 K18 蛋白(终水平为 0.5 μ g/mL),充分涡旋后静置 5 min,然后在上述溶液中加入 4 μ L 的 Lipofectamine2000,混匀后静置 20 min,再将该转导体系缓慢均匀加入 6 孔板中,其余 2 孔分别加 DMSO,10 mmol/L DBHQ 母液(DMSO 配制)各 1 μ L。神经元每孔则加 K18 蛋白 4 μ g,余步骤同前。

1.6 Tau 聚集点的观察

24~36 h 后从 6 孔板中挑出玻片置于 12 孔板中,4%多聚甲醛及 1%聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100, TX-100)溶液固定及透化 0.5 h, PBS 清洗 5 min/次,共 3 次,DAPI(1 μ g/mL)染细胞核 3

min,PBS 清洗 3 次,抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜/共聚焦显微镜拍照。

1.7 原代神经元活性氧(Reactive oxygen species, ROS)及二氢乙锭(超氧化物阴离子荧光探针)(Dihydroethidium,DHE)染色

HT22 细胞经过转导及处理后将 DMSO 溶解的二氯二氢荧光素二乙酸酯(Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate,DCFH-DA)探针(10 mmol/L)与培养基(1:2000)混匀,每孔加入 1 mL 该混合液,37℃温箱避光孵育 30 min,PBS 洗去培养基中探针后加入新培养基;DHE(母液水平为 10 mmol/L)在 6 孔板中每孔加入 1 μL,轻混合后 37℃温箱避光孵育 30 min,PBS 洗去探针后荧光显微镜拍照。利用 Image J 软件进行荧光定量。

1.8 线粒体融合功能检测

在共聚焦培养皿中培养生长密度为 60%~70%的 HT22 海马神经元,转染 mito-Dendra2 质粒,第 2 d 转导 K18 聚集体;转导 24 h 后在共聚焦显微镜下找到合适视野,连续记录未光电转换的荧光图像及 405 激光(4%激光功率)下局部激发数秒后光转换状态下局部线粒体的融合状态,使用 63×油镜观察样品。mito-Dendra2 的激发波长为 488 nm,检测波长为 525/50 nm^[8-9]。

1.9 PI-Hoechst 凋亡测定

生长密度均匀的 HT22 细胞,实验组 DBHQ 终水平为 5 μmol/L,对照组设置等体积 DMSO,处理 12 h 后去除原培养基,加入细胞染色缓冲液后分别加入 PI 染色液 5 μL 及 Hoechst 染色液 5 μL,轻混

匀后冰浴 20 min,避光,染色后 PBS 洗涤 1 次,荧光显微镜拍照。

1.10 统计学处理

使用 GraphPad Prism 8,2 组比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DBHQ 减少细胞中 Tau 蛋白聚集

正常生长的 Tau-HEK293 细胞内不形成聚集点,而转导 K18 聚集体后 24 h 荧光显微镜下观察到绿色明亮的聚集点,证明 K18 蛋白聚集体成功诱导细胞内的 Tau 蛋白发生聚集。DBHQ 处理组细胞内聚集点数量较 K18 诱导组及溶剂对照组聚集点数减少($P<0.01$),即 DBHQ 可抑制细胞内 Tau 蛋白的聚集(图 1)。

2.2 DBHQ 抑制 Tau 蛋白聚集体诱导的 HT22 细胞损伤

正常培养的小鼠海马神经元 HT22 细胞系生长出突起,K18 聚集体处理 24 h 后在光镜下观察到 HT22 细胞呈现神经突起变短、细胞空泡化等损伤形态,而 DBHQ 处理后细胞的形态部分恢复,神经突起较纤长而完整(图 2)。

2.3 DBHQ 降低神经元活性氧和超氧阴离子水平

K18 聚集体处理后神经元内活性氧和超氧阴离子水平都出现升高,而 DBHQ 组活性氧水平下降($P<0.05$),超氧阴离子水平显著下降($P<0.001$),即 K18 聚集体诱导氧化应激,而 DBHQ 减少细胞内氧化应激水平(图 3)。

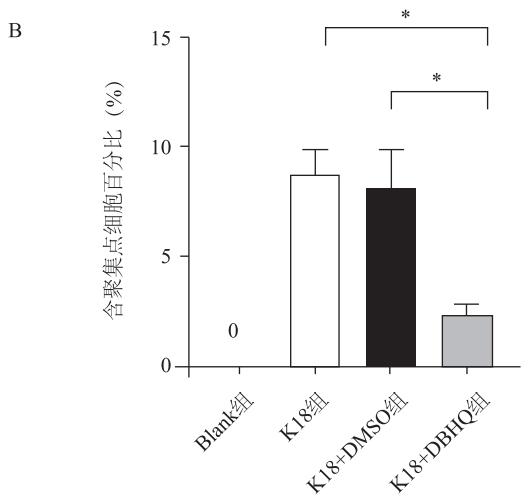
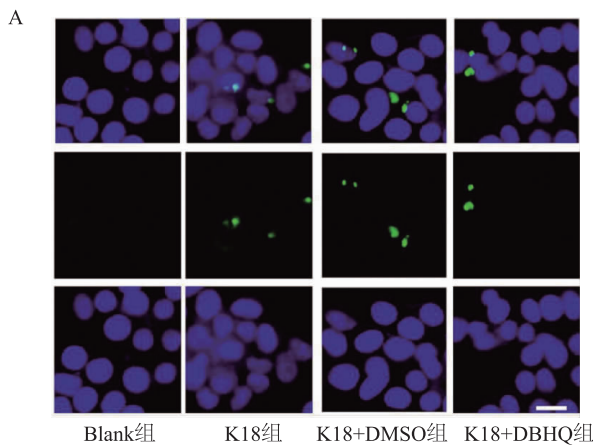


图 1 DBHQ 减少 Tau-HEK293 细胞中 Tau 蛋白聚集 A 代表聚集点荧光;B 代表统计学分析(Bar = 20 μm),两两比较, * $P<0.01$

2.4 DBHQ 保护 HT22 细胞的线粒体融合功能

Mito-Dendra2 是一种可追踪线粒体的光转换荧光蛋白,基线水平下产生绿色荧光,由于其具有光电转换性能,405 nm 激光激发下该蛋白可由绿光转变为红光。在给予 405 nm 激光激发前后通过实时观察红光(光转换)与绿光(未光转换)的共定位来观察线粒体的融合。正常的线粒体存在动态的融合和分裂^[9],K18 聚集体处理后 HT22 细胞出现线粒体

功能障碍,表现为共聚焦显微镜下线粒体共定位程度减低,而 DBHQ 处理后线粒体共定位程度增高(图 4),即 DBHQ 对 K18 诱导的线粒体损伤具有保护作用。

2.5 5 μmol/L 的 DBHQ 不引起 HT22 细胞凋亡

PI/Hoechst 染色荧光定量分析显示,5 μmol/L 的 DBHQ 组与溶剂对照组比较,海马神经元的凋亡率无明显差异($P>0.05$)(图 5)。

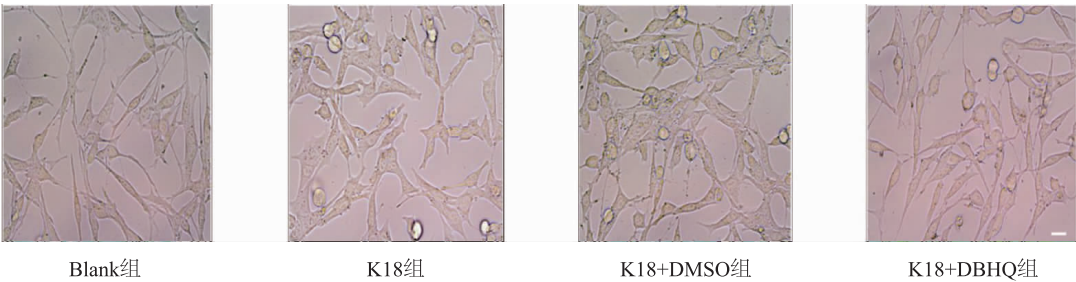


图 2 DBHQ 减少 K18 诱导的细胞形态损伤(Bar = 20 μm)

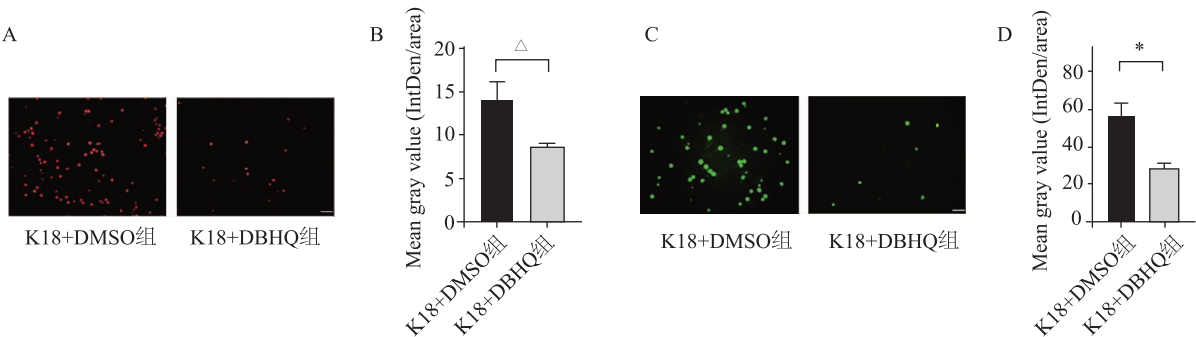


图 3 DBHQ 减轻了 K18 诱导的神经元活性氧及超氧阴离子增加 A 代表神经元 DHE 荧光;B 代表 DHE 荧光定量;C 代表神经元 ROS 荧光;D 为 ROS 荧光定量分析图(Bar = 50 μm);两两比较, * $P<0.05$, $\Delta P<0.001$

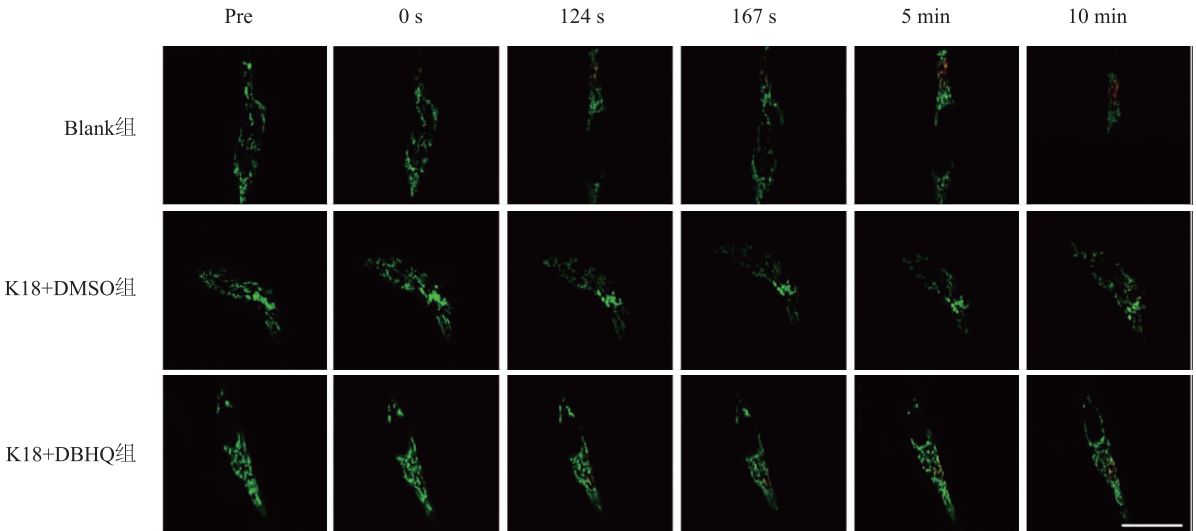


图 4 DBHQ 增强了 K18 损伤的线粒体融合功能(Bar = 25 μm)

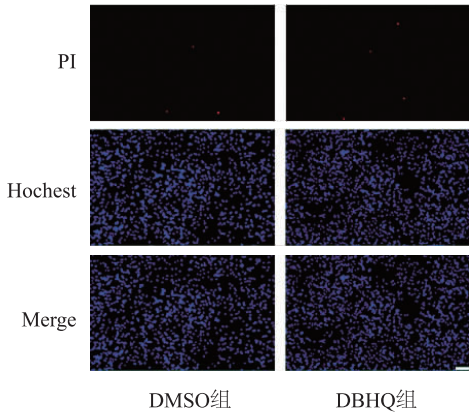


图 5 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 DBHQ 对 HT22 细胞凋亡率无明显影响 (Bar = 100 μm)

3 讨论

Tau 蛋白的异常聚集是 AD 重要的病理特征, Tau 蛋白的微管结合域(K18)是其发生聚集的关键片段,既往研究报道 K18 的聚集体可以作为“种子”,诱导细胞内的 Tau 蛋白发生聚集,病理性 Tau 蛋白聚集体可以在脑内播散,导致神经损伤和认知功能障碍^[10-11]。本实验选择 Tau-HEK293 细胞和 HT22 细胞为研究对象,利用 K18 的聚集体处理细胞,可诱导细胞内 Tau 蛋白的聚集,构建了 Tau 蛋白聚集的细胞模型,这与既往研究报道一致^[12]。利用此模型,本研究发现抗氧化剂 DBHQ 能够减少 K18 聚集体诱导的 Tau 蛋白聚集,该结果提示 DBHQ 可抑制外源性 K18 聚集体诱导的 Tau 蛋白异常聚集。

DBHQ 是对苯二酚的衍生物,既往研究发现它可以抑制肌浆/内质网 Ca^{2+} -ATP 酶 (Sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase, SERCA) 的活性,从而调节细胞内 Ca^{2+} 的释放,DBHQ 分子中的羟基是其发挥抑制剂作用必不可少的基团^[13]。AD 患者脑内存在 Ca^{2+} 调控异常,是导致神经损伤的重要机制^[1]。本研究推测 DBHQ 对细胞的保护作用可能是通过调控细胞内的钙稳态实现的。另外,本研究发现 DBHQ 还可降低细胞内的氧化应激水平,并保护损伤的线粒体。线粒体是产生能量的主要细胞器,其存在动态的融合和裂变,有研究发现 AD 模型中线粒体的融合和裂变障碍,线粒体功能障碍,促进氧化应激和神经损伤的产生。本研究发现 K18 聚集体处理后细胞内线粒体融合功能障碍,而 DBHQ 可保护线粒体功能,因此 DBHQ 可能通过保护线粒体、减少氧化应激而发挥细胞保护作用。

既往研究发现 DBHQ 可能具有潜在的抗肿瘤作用,其与 2.5 μM 萝卜硫素联合使用时可显著增强如醛糖酮还原酶家族 1 成员 C1 (Aldo-keto reductase family 1 member C1, AKR1C1) 和血红素加氧酶-1 (Heme oxygenase-1, HO-1) 的表达^[14]。本研究发现低剂量 DBHQ 能够减轻 K18 聚集体诱导的氧化应激和细胞形态变化,具有细胞保护作用。有研究发现大剂量 DBHQ 也可发挥损伤效应。如饮食中添加 1% 的 DBHQ 可诱发叙利亚仓鼠前胃乳头瘤^[15]。Imazawa 等^[16] 人给予 Wistar 雌性大鼠单次口服 120 mg/kg 的 DBHQ,电镜下早期可观察到腰肌的运动终板上线粒体和突触小泡丢失。这些结果表明,大剂量 DBHQ 可导致损伤效应。因此,不同剂量的 DBHQ 对神经系统的作用还需要进一步研究。由于 DBHQ 是一种高效的抗氧化剂,在生产生活中广泛应用,因此生产工人的职业暴露及人们日常接触是否存在损伤效应是 1 个值得关注的问题。

AD 是导致老年人痴呆的主要原因,当前尚无有效疗法能够延缓或阻止疾病的进展,如能延缓 Tau 蛋白的异常聚集和脑内的播散,可能延缓神经损伤的进展,从而起到疾病修饰作用^[17]。本研究在 AD 细胞模型中观察到, DBHQ 减少了 Tau 的聚集,维持线粒体正常功能,减少氧化应激,因此 DBHQ 对 AD 的保护作用值得深入研究。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Cascella R, Cecchi C. Calcium dyshomeostasis in alzheimer's disease pathogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4914.
- [2] Wang W, Zhao F, Ma X, et al. Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances[J]. Mol Neurodegener, 2020, 15(1): 30.
- [3] Simunkova M, Alwasel SH, Alhazza IM, et al. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease [J]. Arch Toxicol, 2019, 93(9): 2491-2513.
- [4] Congdon EE, Sigurdsson EM. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease[J]. Nat Rev Neurol, 2018, 14(7): 399-415.
- [5] Long JM, Holtzman DM. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies[J]. Cell, 2019, 179(2): 312-339.
- [6] Chen YJ, Hsu KW, Tsai JN, et al. Involvement of protein kinase C in the inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by thapsigargin in RAW 264. 7 macrophages [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(12): 2574-2585.

(下转第 12 页)