

可溶的和纤维化的 $A\beta_{1-40}$ 对膜脂的通透性的影响

马晓翠, 沙印林, 林克椿, 聂松青

(北京大学医学部生物物理系, 北京 100083)

摘要: 利用光散射, 浊度, 荧光以及电镜等技术研究了可溶性的 $A\beta_{1-40}$ 聚集形成纤维的动力学过程; 用三种水溶性的分子质量不同的荧光探针 ANTS/DPX, Calcein, Dextran FD-4 包裹在脂质体内, 检测可溶的和纤维化的 $A\beta_{1-40}$ 对其内含物漏出的影响。结果表明: 可溶性的 $A\beta_{1-40}$ 在 pH7.4, 37°C 温育 4 天以后开始聚集, 7 天后形成稳定的纤维; 聚集的 $A\beta_{1-40}$ 能够诱导包裹在脂质体内的 ANTS/DPX, Calcein 的漏出, 但不能诱发 Dextran (FD-4) 的漏出, 并初步估算出聚集的 $A\beta_{1-40}$ 在膜上能产生孔径为 13-18Å 的小孔, 而可溶的 $A\beta_{1-40}$ 无此作用。这提示我们, 聚集成纤维的 $A\beta_{1-40}$ 能改变膜脂的物理化学性质, 并造成内含物的漏出, 这些作用可能是造成神经细胞毒性的重要原因。

关键词: 可溶的 $A\beta_{1-40}$; 纤维化的 $A\beta_{1-40}$; 膜脂; 漏出

中图分类号: Q73

文献标识码: A

文章编号: 1000-6737(2002)03-0282-05

随着人类老龄化社会的到来, 阿尔兹海默病 (Alzheimer disease, AD) 的研究已经越来越成为社会和医学所面临的严峻课题。AD 是一种渐进性大脑退行性病变, 细胞外的神经炎性斑 (老年斑) 和细胞内的神经纤维缠结是 AD 的主要病理学特征。老年斑的主要成分 $A\beta$ 是由前体蛋白 APP 剪切而来的分子质量为 4 kd 的多肽, 一般由 39-43 个氨基酸组成^[1]。 $A\beta$ 具有两亲性, N 端亲水, C 端疏水, 分子与分子之间容易以 β 折叠 (β -sheet) 的构象相互聚集形成纤维。正常人的脑脊液中存在一定浓度的 $A\beta$, 在 AD 发生过程中 $A\beta$ 从可溶的单体变成了不溶的纤维, 可溶的 $A\beta$ 对神经元是否具有毒性作用尚存在争议, 但目前普遍认为聚集状态的 $A\beta$ 具有神经毒性, 至于其毒性机理, 至今还不清楚, 仍是这一领域的研究热点。有的学者认为^[2], $A\beta$ 通过受体与配体的特异相互作用与膜结合, 进一步损伤细胞。Cotman 等发现: $A\beta_{1-40}$ 的所有 D 型和 L 型空间异构体均有类似的神经毒性, 也就是说 $A\beta$ 的毒性并不是通过受体-配体空间特异性结合来介导的, 由此提出 $A\beta$ 是通过改变膜组分 (包括膜脂和膜蛋白) 的物理化学性质来影响膜的功能^[2-4]。

当前, $A\beta$ 与 AD 发病机制的相关性已被研究人员从各个角度、方向和领域加以研究, 但有关

$A\beta$ 与膜相互作用的研究工作仍不多见。我们以模拟大鼠神经细胞膜膜脂成分的人工脂质体为模型, 利用多种生物物理技术, 检测可溶性的 $A\beta_{1-40}$ 聚集成纤维的动力学过程, 研究两种状态的 $A\beta$ 对膜的物理性质——通透性的影响, 并进而探讨其作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料

合成多肽 β -Amyloid(1-40) 的序列为: H-DAEFRHDSGYEVGSHHQKLVFFAEDVNGALLGLMVGGVV-OH。购自 Advanced ChemTech (Louisville, KY, USA), 纯度大于 98%, 质谱检验分子质量与计算值相符合。用 DMSO 配成 10 g/L 溶液, 储存于 -20°C。二棕榈酰卵磷脂 (L- α -phosphatidylcholine, dipalmitoyl, DPPC), 二棕榈酰乙醇胺 (L- α -phosphatidylethanolamine,

收稿日期: 2002-01-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970196)

作者简介: 马晓翠, 1970 年生, 在读博士研究生, 电话: (010) 62092444, E-mail: xiaocui@263.net

通讯作者: 聂松青

dipalmitoyl, DPPE), 二油酰丝氨酸 (L- α -phosphatidyl-L-serine, dioleoyl DOPS), 胆固醇 (cholesterol), 购自 Sigma 公司。荧光探针 ANTS、DPX、Calcein 为 Molecular Probes (JunctionCity, OR, USA) 产品, Thioflavin T 和 FITC-Dextran(FD-4) 为 Sigma 公司产品。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 人工膜脂的制备

取模拟神经细胞膜的磷脂 100 mg(36% DPPC, 36% DPPE, 10% DOPS, 18% Cholesterol, 均为质量百分比)溶于 10 ml CHCl₃/CH₃OH (2:1, 体积比)溶剂中待用^[9]。

1.2.2 A β_{1-40} 聚集的动力学

用 25 mmol/L 的 PBS 缓冲液 (120 mmol/L NaCl, 0.02% NaN₃, pH7.4) 将适量 A β_{1-40} 储存液稀释至 100 μ mol/L, 置于 37°C 温箱中存放, 每日取出适量进行下列实验一次。

(a) 光散射和浊度实验

每日取温育中的 100 μ mol/L A β_{1-40} 300 μ l 置于微量荧光杯中, 固定激发波长 $\lambda_{ex}=\lambda_{em}=488$ nm。于 Hitachi 850 型荧光分光光度计上测定光散射值。固定波长 $\lambda_x=405$ nm 处测定吸光度(A)值, 所用仪器为 Beckman DU 640 型^[9]。

(b) Thioflavin T 荧光测量

由于 Thioflavin T 只与纤维化的 A β 结合, 并只有在结合后纤维化的 A β 才能发出荧光, 因此可以用来监测 A β 聚集动力学过程。Thioflavin T 用 PBS 配成 100 μ mol/L。每日取 A β_{1-40} 温育液 12 μ l, 100 μ mol/L Thioflavin T 12 μ l, PBS 缓冲液 276 μ l, 混匀后于激发波长 $\lambda_{ex}=450$, 发射波长 $\lambda_{em}=482$ nm 进行荧光强度的测量^[7]。

(c) 电子显微镜观察

每日取一滴温育中的 100 μ mol/L A β_{1-40} 滴于喷有碳膜的铜网上, 用 1.5% 磷钨酸负染后在 H-500 透射电子显微镜下观察。

1.2.3 脂质体内容物的漏出^[8,9]

用含 12.5 mmol/L ANTS、45 mmol/L DPX、20 mmol/L NaCl、5 mmol/L HEPES 的缓冲液 (pH7.4) 制备包裹 ANTS/DPX 的大单层脂质体。方法如下: 取磷脂储存液 200 μ l, N₂ 气吹干后冷冻真空干燥 8 h, 加入 500 μ l HEPES 缓冲液, 于 63°C 震荡 15 min, 快速反复冻溶 6 次, 得到大单层脂质体。用 0.2 μ m 微孔滤膜过滤后的脂质体溶液经 Sephadex G-75 柱层析去除未被包裹的 ANTS

和 DPX, 用 5 mmol/L HEPES、200 mmol/L NaCl、pH 7.4 的缓冲液洗脱。洗脱后的脂质体溶液用 Ames 定磷方法^[10] 确定脂浓度。取脂浓度为 100 μ mol/L 脂质体溶液放入比色杯中, 固定 ANTS 激发波长 $\lambda_{ex}=355$ nm, 发射波长 $\lambda_{em}=520$ nm, 测量不加多肽时溶液的荧光强度 (I_0), 加入不同量的多肽后, 溶液于 37°C 保温 20 min 后再测量荧光强度 (I), 用脂质体溶液加入 Triton X-100 (0.5%, 体积比) 后的荧光强度 (I_1) 代表脂质体内容物 100% 漏出的情况, 根据下式计算漏出百分率: $(I-I_0) / (I_1-I_0) \times 100\%$ 。测量时间曲线时, 加入多肽后即开始测量, 多肽的浓度为 2.5 μ mol/L。

用含 75 mmol/L Calcein、85 mmol/L NaCl、2.5 mmol/L HEPES、1 mmol/L EDTA, pH7.4 的缓冲液制备包裹 Calcein 的大单层脂质体。方法同上。0.4 μ m 的微孔滤膜过滤后, 经 Sephadex G-75 柱层析去除未被包裹的 Calcein, 用含 145 mmol/L NaCl、2.5 mmol/L HEPES、1 mmol/L EDTA, pH7.4 的缓冲液洗脱。定磷后取 100 μ mol/L 脂质体溶液放入比色杯中, 固定激发波长 $\lambda_{ex}=495$ nm, 发射波长 $\lambda_{em}=517$ nm, 测漏出百分率。

用含 20 mmol/L FITC-Dextran (FD-4)、5 mmol/L MOPS、40 mmol/L NaCl, pH7.4 的缓冲液制备包裹 FD-4 的大单层脂质体。方法同上。0.4 μ m 的微孔滤膜过滤后, 经 Sephadex S-300 柱层析去除未被包裹的 FD-4, 用含 5 mmol/L MOPS、65 mmol/L NaCl, pH7.4 的缓冲液洗脱。定磷后取 100 μ mol/L 脂质体溶液放入比色杯中, 固定激发波长 $\lambda_{ex}=465$ nm, 发射波长 $\lambda_{em}=515$ nm, 测漏出百分率。

2 结果与讨论

2.1 A β_{1-40} 聚集的动力学过程

图 1 A、B、C 分别记录了用光散射, 浊度及荧光方法检测样品, 即可溶性的 100 μ mol/L 的 A β_{1-40} 溶液, 在 pH7.4, 37°C 温育下聚集形成纤维的动力学过程。三种方法的实验结果均表明, 温育 4 天时开始形成纤维, 所得结果非常一致, 说明了实验结果的可靠性。同时我们用肉眼观察到从第 4 天起, A β_{1-40} 确实形成了纤维, 直径大概为 7-12 nm, 但此时也可见未连成纤维的小球。

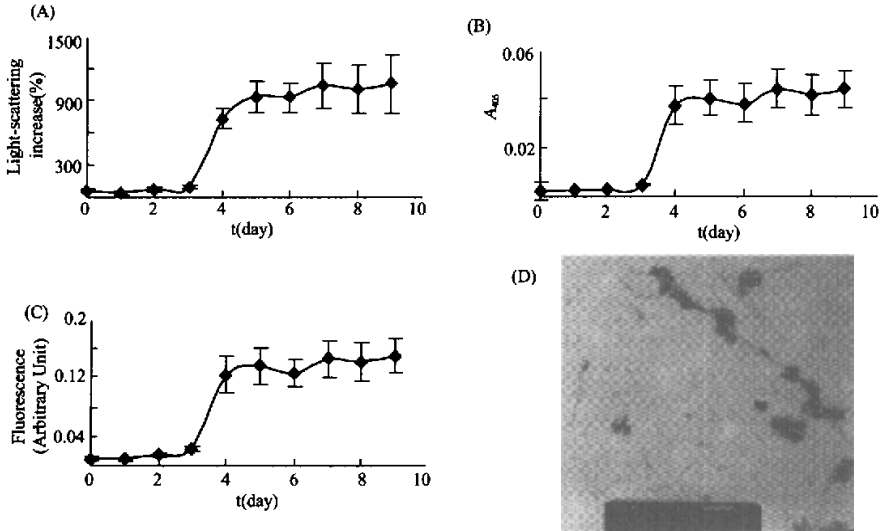


Fig.1 Time course of $A\beta_{1-40}$ fibril formation measured by light-scattering(A), A_{405} (B), thioflavin T(C) and electron micrographs of $A\beta_{1-40}$ at the fourth day(D), the bar is 100 nm. $A\beta_{1-40}$ (100 $\mu\text{mol/L}$) in 25 mmol/L PBS, final pH7.4 was incubated at 37°C

目前,关于 $A\beta$ 聚集动力学的研究已做了大量的工作。一致认为,成核依赖机制是纤维形成的原则。纤维形成过程一般需要经过成核→原纤维→纤维三个步骤。成核过程是淀粉样纤维形成的限速步骤。它是高度浓度依赖的,成核需要一定的时间,称为延迟时间 (lag time),一旦通过这段时间,纤维的形成将大大加速。

本实验的结果与该学说十分相符,100 $\mu\text{mol/L}$, 37°C 以及中性 pH7.4 的条件下, $A\beta_{1-40}$ 的成核大约需要 4 天时间,而后纤维迅速生成。聚集动力学的研究为我们得到可溶的和聚集的 $A\beta_{1-40}$ 提供了可靠的依据。在实验中,我们把刚刚溶解于 PBS 的 $A\beta_{1-40}$ 作为可溶性的 $A\beta_{1-40}$,把在 37°C 温育 7 天的 $A\beta_{1-40}$ 作为成熟的聚集状态的

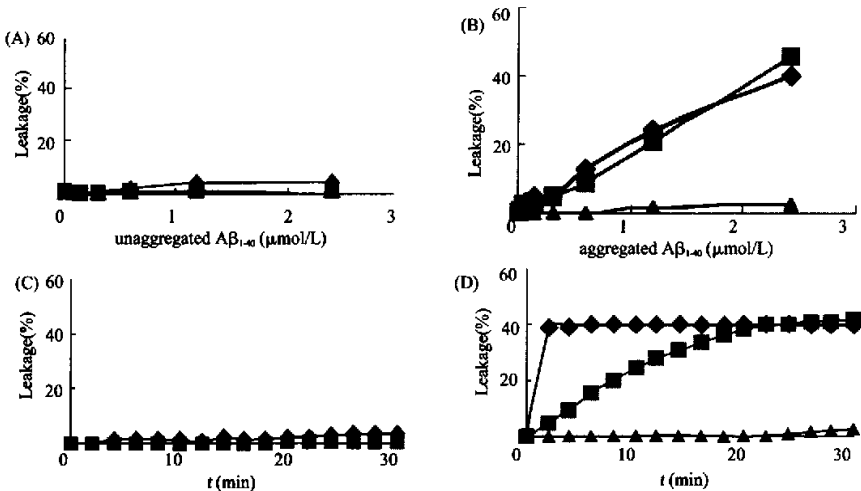


Fig.2 The concentration curves and time curves of leakage effect of unaggregated and aggregated $A\beta_{1-40}$ on liposome encapsulated ANTS/DPX, Calcein and FD-4. (A) unaggregated $A\beta_{1-40}$; (B) aggregated $A\beta_{1-40}$; (C) kinetics of unaggregated $A\beta_{1-40}$ -induced leakage from liposomes; (D) kinetics of aggregated $A\beta_{1-40}$ -induced leakage from liposomes

◆: ANTS, ■: calcein, ▲: FD-4

A β_{1-40} , 进行下列实验研究。

2.2 脂质体内容物的漏出

图 2 A 为未聚集的 A β_{1-40} 对包裹三种不同探针的脂质体的漏出效应的浓度曲线, 可以看出未聚集的 A β_{1-40} 对三种脂质体几乎没有漏出作用。

图 2 B 为聚集的 A β_{1-40} 对包裹三种不同探针的脂质体的漏出效应的浓度曲线, 可以看出聚集的 A β_{1-40} 能导致 ANTS 和 Calcein 的漏出, 漏出的百分数随浓度的增大而增大, 却不能诱导 FD-4 的漏出。

图 2 C 为未聚集的 A β_{1-40} 对包裹三种不同探针的脂质体的漏出效应的时间曲线, 曲线表明未聚集的 A β_{1-40} 在 30 min 内不能诱导任何探针的漏出。

图 2 D 为聚集的 A β_{1-40} 对包裹三种不同探针的脂质体的漏出效应的时间曲线, 结果表明随着时间的延长聚集的 A β_{1-40} 能导致 ANTS 和 Calcein 的漏出, 但漏出速率并不相同, ANTS 几乎在 A β_{1-40} 加入瞬间就已达到最大的漏出百分数(40%), 而 Calcein 的漏出则相对缓慢, 在加入样品 20 min 后才达到最大值, 而对于 FD-4 即使加入样品时间长达 30 min 仍未见任何明显的漏出作用。

我们知道, 脂膜是生活细胞的屏障, 对细胞的生命活动起保护作用, 它能选择性地物质跨膜运输, 调控细胞内外物质和离子的平衡及渗透压平衡, 维持细胞内外环境的恒定, 因此, 保持脂膜正常的通透性对生命体来说是至关重要的。然而, 细胞膜的结构非常复杂, 它不仅包含脂双层, 还有各种糖类, 蛋白和受体。为了使研究体系简单化, 本实验以脂质体为模型, 研究两种状态的 A β_{1-40} 对其通透性的影响。

我们在大单层脂质体上包裹了三种不同分子质量的探针, 来检测两种不同状态的 A β_{1-40} 对脂双层结构的完整性和通透性的影响。结果表明可溶的 A β_{1-40} 几乎没有诱导荧光探针漏出的能力, 而聚集的 A β_{1-40} 确实能干扰脂双层诱导 ANTS 和 Calcein 的漏出, 但对大分子质量的 FD-4 无此作用。这说明聚集状态的 A β_{1-40} 并不能象去垢剂那样将膜破碎, 而可能在膜上形成了孔道。至于孔道的结构还很难回答, 基于它能诱导 ANTS/DPX 和 Calcein 的漏出而 FD-4 漏出的受阻, 根据它们分子质量的大小, 我们可以推测聚集的 A β_{1-40} 在膜上形成的孔道直径大约为 13-18Å^[8, 11]。这一尺寸的孔径足以导致细胞内容物的漏出及离子平衡失调, 直接造成细胞的损伤甚至死亡。

在以前的研究中, 我们还发现聚集状态的 A β_{1-40} 可以降低脂双层磷脂分子头部区域的膜流动性, 扰乱膜磷脂分子的排列, 这些结果均表明聚集状态的 A β_{1-40} 是通过改变膜质双层的物理化学性质从而使包裹在脂质体内部的荧光探针产生漏出。因而我们认为聚集成纤维的 A β 与膜的非特异性作用很可能是产生细胞毒性的原因之一。

AD 是一种多因异质性疾病, 其发病机制并不清楚。聚集的 A β_{1-40} 与脂膜相互作用时呈现的膜通透性的改变为其神经毒作用提供了新的信息。而可溶性的 A β_{1-40} 很可能只有在很高的浓度下聚集形成纤维样 A β 后才会致病。本实验仅对 A β_{1-40} 导致脂膜通透性改变这一现象进行了观察, 在接下来的工作中, 我们还将利用 CD, FTIR 等技术对肽脂相互作用中 A β 构象进行研究, 对两种状态的 A β 的插膜深度和角度等做定量的研究, 以期更深入细致地阐明漏出的机制, 并将直接研究它对活的神经细胞的通透性的影响。

参考文献:

- [1] Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 120:885-890.
- [2] Cribbs DH, Pike CJ, Cotman CW. All-D-enantiomers of beta amyloid exhibit similar biological properties to all-L-beta amyloids[J]. *J Biol Chem*, 1997,272(11):7431-7436.
- [3] Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U. Amyloid beta-peptides increase annular and bulk fluidity and induce lipid peroxidation in brain synaptic plasma membranes[J]. *J Neurochem*, 1997,68:2086-2091.
- [4] Mason RP, Estermyer JD, Kelly JF. Alzheimer's disease amyloid beta peptide 25-35 is localized in the membrane hydrocarbon core: x-ray diffraction analysis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996,222:78-82.
- [5] Bretscher MS. Membrane structure:some general principles[J]. *Science*, 1973,181:622-629.
- [6] Goldsbury CS, Wirtz S, Muller SA. Studies on the *in vitro* assembly of a beta 1-40: implications for the search for a beta fibril formation inhibitors[J]. *J Struct Biol*, 2000,130: 217-231.
- [7] Shen CL, Murphy RM. Solvent effects on self-assembly of beta-amyloid peptide[J]. *Biophys J*, 1995,69:640-651.
- [8] Jose MM, Mercedes O. Release of lipid vesicle contents by

- an antibacterial cecropin a-melittin hybrid peptide [J]. *Biochemistry*, 1996,35:9892-9899.
- [9] Bonnafous P, Stegmann T. Membrane perturbation and fusion pore formation in influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion. A new model for fusion[J]. *J Biol Chem*, 2000,275:6160-6166.
- [10] Ames BN. Phosphate assay[J]. *Methods in Enzymology*, 1966, 8:115.
- [11] Alexey SL, Michael ES, Stephen HW. Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: pore formation by melittin [J]. *Biophys J*, 1997,72: 1762-1766.

THE EFFECT OF SOLUBLE AND FIBRILAR $A\beta_{1-40}$ ON MEMBRANE PERMEABILITY

MA Xiao-cui, SHA Yin-lin, LIN Ke-chun, NIE Song-qing

(Department of Biophysics, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: The time course of $A\beta_{1-40}$ fibril formation was characterized using a variety of assays. The effect of soluble and fibrillar $A\beta_{1-40}$ on the membrane permeability was assessed by measuring the release of vesicle-entrapped with three different molecular weight fluorescence probes (ANTS/DPX, Calcein, FD-4). The results showed that fibrils had formed after 4 days. Aggregated $A\beta_{1-40}$ may induce the leakage of ANTS and Calcein in a dose-dependent manner, but soluble $A\beta_{1-40}$ had no such effect. It suggests that the change of physico-chemical properties of membrane constituents may have some relation to $A\beta$ neurotoxicity.

Key Words: Soluble $A\beta_{1-40}$; Fibrillar $A\beta_{1-40}$; Membrane; Leakage