

淀粉样肽 A β 导致线粒体功能紊乱 的体内和体外研究*

刘玲玲¹⁾ 盛柏杨¹⁾ 龚 锴¹⁾ 赵南明¹⁾ 张秀芳¹⁾ 唐佩福²⁾ 公衍道^{1)**}

(¹⁾清华大学生命科学学院, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084; (²⁾解放军总医院骨科, 北京 100853)

摘要 为探索阿尔茨海默症(AD)中 β 淀粉样肽(A β)对线粒体功能的影响, 比较了稳定表达人野生型淀粉样前体蛋白(APP)的细胞和同时转入人 Swedish 突变 APP 及 Δ E9 突变 PS1 的双转细胞(swe. Δ 9)的线粒体功能. 结果发现, swe. Δ 9 细胞的线粒体膜电位、细胞色素 c 氧化酶活性、线粒体膜流动性、ATP 含量均明显低于 APP 细胞, 而 APP 细胞又明显低于对照的转入空质粒的细胞. 在转基因小鼠上也得到类似结果: 同时转入人 Swedish 突变 APP 和人 PS1 M146V 敲入的双转小鼠的细胞色素 c 氧化酶活性和 ATP 含量比只转入 Swedish 突变 APP 的 Tg2576 小鼠更低. 结果证明了 AD 模型中线粒体功能损害程度与 A β 产量的正相关关系.

关键词 阿尔茨海默症, 线粒体, β 淀粉样蛋白, 线粒体膜电位, 细胞色素 c 氧化酶活性, 线粒体膜流动性, ATP
学科分类号 Q6, R338, Q189

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00556

阿尔茨海默症(AD)是临床较为常见的神经退行性病变, 以脑细胞内神经纤维缠结(NFTs)和细胞外老年斑(SPs)为主要病理特征. 其中 NFTs 的主要成分为高度磷酸化的 tau 蛋白, SPs 的主要成分为淀粉样肽前体蛋白(APP)产生的 β 淀粉样肽(A β). 线粒体在细胞能量代谢中起着重要的作用. 线粒体功能紊乱及代谢异常存在于家族性 AD (FAD) 和散发性 AD(SAD)中^[1]. 但在 AD 中线粒体功能紊乱和线粒体损伤引起细胞凋亡的机制及其诱发的应激性信号转导仍不清楚. 同时, 线粒体功能紊乱与 A β 的相互关系也不清楚^[2].

A β 由淀粉样肽前体蛋白(APP)经 β 剪切酶和 γ 剪切酶切割产生. γ 剪切酶由 presenilin、nicastrin、pen-2、Aph-1 四个组分组成^[3]. APP、Presenilin1 (PS1)、Presenilin2(PS2)基因突变是家族性 AD 的重要病因^[4]. 目前研究中使用的 AD 模型大多数是过表达 APP 的细胞模型和动物模型, 这样的模型过量表达 APP 因此也会产生过量的 A β , 在模型动物脑中会形成老年斑. APP 被证明定位于线粒体, 过表达 APP 会影响线粒体蛋白运输通道的正常运行, 导致线粒体功能紊乱^[5]. 用 A β 与分离的线粒体单独孵育, 发现 A β 破坏线粒体的膜流动性, 增加活

性氧生成和细胞色素 c 释放, 减少 ATP 的产生^[6]. 过表达 APP 会导致生成的 A β 增多, 因此很难断言导致线粒体功能紊乱的究竟是 APP 的作用, 还是 A β 的作用.

本研究比较了稳定表达人 APP695 的细胞模型(APP)和共转入 Swedish 家族性突变 APP 和 Δ E9 家族性突变 presenilin1 细胞(swe. Δ 9)的线粒体功能. 在 APP 细胞中会表达比野生细胞过量的 APP, 而在 swe. Δ 9 细胞中, γ 酶活性增强, APP 更容易被大量剪切, 产生过量的 A β . 比较这两种模型细胞的线粒体功能, 有助于确认线粒体功能的紊乱究竟是 APP 起主要作用还是 A β 起主要作用.

此外, 我们还比较了转 Swedish 突变 APP 的小鼠 Tg2576 和 Swedish 突变 APP 及 Presenilin1M146V 敲入的双转小鼠的线粒体功能, 对细胞模型得到的结论进行了验证.

* 清华裕元医学科学研究基金(20240000514), 生物膜与膜生物工程国家重点实验室基金, 国家自然科学基金(30973068)和国家高技术研究发展计划(863)(2008AA022403)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62785049, E-mail: gongyd@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2009-11-20, 接受日期: 2009-11-27

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及转基因动物. 野生型小鼠 N2a 细胞(转入空质粒, wt)、稳定过表达人 APP695 的模型细胞(APP)及共转入 swe 家族性突变 APP 和 presenilin1 家族性突变 Δ E9 的细胞(swe. Δ 9)为许华曦教授(Burnham Institute, La Jolla, CA)馈赠. N2a 细胞培养基由体积分数为 0.475 的 DMEM、体积分数为 0.475 的 OPTIMEM 和体积分数为 0.05 的胎牛血清组成. Tg2576 小鼠和 PS1 M146V 等位基因敲入小鼠为美国贝勒医学院郑辉教授赠送. Tg2576 小鼠和 PS1 M146V 敲入小鼠杂交得到 APP/PS1^{M146V/+} 双转小鼠(DT), 双转小鼠具有 B6SJL 杂交背景.

1.1.2 主要试剂. 抗 A β 1-42 抗体(4d10)为自制; APP C 端抗体(369)、PS1 N 端抗体由许华曦教授(Burnham Institute, La Jolla, CA)赠送; Actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 罗丹明 123(Rh 123)、硫磺素 S、四氢呋喃(DPH)购自美国 Sigma 公司; ATP 检测试剂盒购自碧云天公司; A β 测量试剂盒购自日本 Wako 公司.

1.2 方法

1.2.1 Western blot 实验. 细胞长满后用含蛋白酶抑制剂的裂解液冰上裂解细胞 30 min, 刮取细胞并超声 10 s 破碎细胞. 于 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度. 加入 4 \times 上样缓冲液后煮沸 5 min, 样品进行 10% SDS-PAGE, 半干转法转膜 50 min, 加入含 3% BSA 的封闭液封闭 2 h, 加入一抗, 室温孵育 4 h, PBST 洗 3 次后, 加入碱性磷酸酶标记的二抗(羊抗小鼠), 孵育 2 h, PBST 洗 3 次, NBT/BCIP 底物显色.

1.2.2 细胞的免疫荧光实验. 将细胞种植在盖玻片上培养 24 h, 用 PBS 洗 2 次后, 用含 4%多聚甲醛的 PBS 室温固定细胞 10 min. PBS 漂洗 3 次去除游离的多聚甲醛. 用含 0.2% TritonX-100 的 PBS 透化细胞 10 min, 冰上操作. 漂洗后, 用 5%羊血清封闭 1 h, 用 1:100 稀释的一抗 4d10 共同孵育 2 h, 漂洗 3 次后, 用 TRITC 偶联的羊抗小鼠二抗, 避光孵育 1 h, 用 1:1 000 稀释的 DAPI 染色 10 min, PBS 漂洗后将玻片倒置于载玻片上, 封片剂封片. 共聚焦显微镜下观察蛋白质表达.

1.2.3 细胞线粒体膜电位(MMP)检测. 使用染料

罗丹明 123(Rh 123)检测细胞线粒体膜电位, Rh123 的荧光强度反映细胞的 MMP^[7]. 培养细胞用缓冲液清洗 3 次, 加入 Rh 123 工作液至终浓度为 1 μ mol/L, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中避光孵育 15 min, 用缓冲液清洗 5 次, 在 35 mm 培养皿中加入 2 ml 细胞平衡维持溶液, 准备共聚焦显微镜观察. 激光共聚焦显微镜观察荧光强度(激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm), 荧光强弱代表 MMP 的高低.

1.2.4 匀浆线粒体的制备.

线粒体提取基于蔗糖梯度离心法^[8].

细胞线粒体提取: 细胞长满后, 用 0.25%胰酶消化, 1 000 r/min 离心收取细胞. 所得细胞用缓冲液 1 (134 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 0.7 mmol/L Na₂HPO₄, 10 mmol/L Tris, pH 7.5)清洗后, 重新悬于 1.5 ml 缓冲液 2 (10 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L Tris, pH 7.5), 冰上放置 5 min 后转入玻璃匀浆器匀浆, 之后立即加入 0.3 ml 缓冲液 3 (2000 mmol/L 蔗糖, 35 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris, pH 7.5)混匀, 3 000 r/min 离心 4 min, 取上清于 14 000 r/min 离心 20 min, 所得沉淀为线粒体组分. 缓冲液 4 (210 mmol/L 甘露醇, 70 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, pH 7.5)清洗 2 次得到线粒体. 上述所有缓冲液均在冰浴条件下使用.

脑组织线粒体提取: 迅速将小鼠断头, 迅速切开大脑半球并用冰冻缓冲液(210 mmol/L 甘露醇, 70 mmol/L 蔗糖, 10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L EDTA, 0.45%胎牛血清, 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇)清洗, 切除小脑, 将脑组织放入 2 ml 缓冲液中, 用组织匀浆器匀浆(400 r/min, 10~15 次). 4 $^{\circ}$ C 下 1 400 r/min 离心 7 min, 去除核. 重复离心一次, 取上清在 4 $^{\circ}$ C 下 10 000 r/min 离心 5 min, 沉淀即为线粒体. 将沉淀溶于 1 ml 缓冲液, 4 $^{\circ}$ C 下 3 000 r/min 离心 5 min. 取上清液在 4 $^{\circ}$ C 下 10 000 r/min 离心 5 min, 沉淀溶于 1 ml 缓冲液, 4 $^{\circ}$ C 保存待用.

1.2.5 线粒体细胞色素氧化酶(COX IV)活性检测. BCA 测定线粒体蛋白浓度, 将各样品浓度调为一致. 过量维生素 c 还原细胞色素 c, 使得 550 nm 处吸光度与 500 nm 处吸光度之比大于 12($A_{550}/A_{500} > 12$). 取 pH 值为 7.4 的 200 μ mol/L KH₂PO₄ 0.5 ml, 加入双蒸水 0.375 ml, 12%(体积比) TritonX-100 25 μ l, 线粒体蛋白 67 μ l (20 μ g), 还原型的细胞色素 c 33 μ l (20 g/L), 用紫外分光光度计测定 550 nm 处细胞色素吸收值 A 的变化^[9].

1.2.6 线粒体膜流动性测量. 取 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 DPH 液 2 ml, 加入 2 ml 的线粒体膜悬液, 混合均匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 40 min. 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 加入 PBS 3.5 ml. 将标记后线粒体立即用 HITACHI F-4000 Fluorescence Spectrophotometer 检测并记录起偏片和检偏片分别为 0 $^{\circ}$ 和 90 $^{\circ}$ 时的 4 个荧光强度, 激发波长和发射波长为 362 nm 和 432 nm. 用公式 $P = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + GI_{VH})$, $G = I_{VH} / I_{HH}$, $\eta = 2P / (0.46 - P)$, 计算微黏度 η 值. $1/\eta$ 值的大小反映线粒体膜的流动性. η 值越大, 线粒体膜的流动性越小; 反之, η 值越小, 线粒体膜的流动性越大^[10].

1.2.7 ATP 含量的测定. 细胞 ATP 含量的测定: 使用碧云天公司生产的 ATP 检测试剂盒. 脑组织 ATP 含量测定: 小鼠断头, 迅速切开大脑半球, 然后按照碧云天公司生产的 ATP 检测试剂盒提供的方法检测 ATP 含量.

1.2.8 老年斑检测. 用 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射小鼠至麻醉, 开胸, 经左心室主动脉插管, 快速灌注预冷的生理盐水 50 ml 冲洗, 继续灌注预冷的含 4% 多聚甲醛的磷酸缓冲液 (PBS) 80 ml 固定 0.5 h. 除去颅盖, 取出鼠脑, 置入相同固定液中固定 24 h. 冰冻切片 30 μm . 硫磺素 S 染色

参考文献报道方法操作^[11], 简要如下: 切片于 PBS 洗 5 min, 晾干至少 10 min, 0.1% 硫磺素 S 染色 5 min, PBST 洗 5 min, 荧光显微镜下观察.

1.2.9 数据处理与统计学检验. 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为显著性差异.

2 结 果

2.1 wt、APP、swe. $\Delta 9$ 细胞中 APP 和 $A\beta$ 的表达

本研究中所用细胞为转入正常人 APP695 的 N2a 细胞 (APP) 和转入 Swedish 家族性突变的 APP695 及 $\Delta E9$ 突变 presenilin1 (PS1) 的 N2a 细胞 (swe. $\Delta 9$). 将 APP 和 swe. $\Delta 9$ 细胞中 APP 表达水平与野生型 N2a(wt) 细胞进行比较, 发现 APP 细胞中的 APP 表达量显著高于 wt 细胞. 由于表达 PS1 $\Delta E9$ 突变基因, swe. $\Delta 9$ 细胞中的 APP 异常剪切增多, APP 的总量低于 APP 细胞, 但高于 wt 细胞 (图 1a). 由于 APP 细胞中 APP 过量表达, 导致 $A\beta$ 分泌量高于 wt 细胞, 但由于 swe. $\Delta 9$ 细胞中 APP 异常剪切增多, 其 $A\beta$ 量最高 (图 1c).

利用 APP 的免疫荧光实验验证了两种模型细胞内 APP 的表达情况. 结果显示, APP 和 swe. $\Delta 9$ 细胞中的 APP 均过量表达 (图 1b). 同时, ELISA 结果显示 swe. $\Delta 9$ 细胞中分泌的 $A\beta$ 远远高于 APP

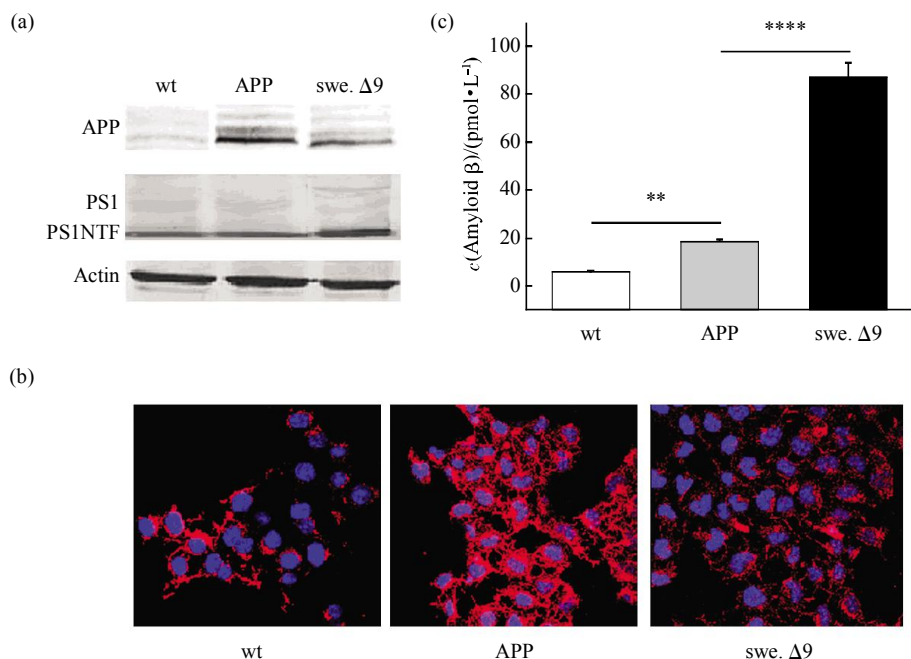


Fig. 1 Expression of APP, PS1 and $A\beta$ in model cells

(a) Expression of APP, full-length and NTF PS1 was detected in N2a cells. Protein samples of wt, APP, and swe. $\Delta 9$ cells were immunoblotted with antibodies: 369 (C terminal of APP), cuMc14 (N terminal of PS1). (b) Expression of APP was detected by immunofluorescence assay. The stains showed that APP was overexpressed in both APP and swe. $\Delta 9$ cells (600 \times). (c) Levels of secreted $A\beta$ in wt, APP and swe. $\Delta 9$ cells. The culture medium was collected for measurement of $A\beta$ by commercially available ELISA kit which specifically recognizes $A\beta_{x-40}$. The chemically synthesized $A\beta$ fragments in the kit were used as standards (** $P < 0.01$ APP vs wt; **** $P < 0.0001$, swe. $\Delta 9$ vs APP; $n=3$).

细胞分泌的 A β ($P < 0.0001$). 这与之前的报道结论是一致的^[12-13].

2.2 转基因细胞线粒体膜电位(MMP)变化

线粒体跨膜电位是由于线粒体内膜两侧质子及其他离子不对称分布造成的, MMP 对维持线粒体内膜对各种物质的选择性与通透性及线粒体正常的形态结构与功能都具有重要作用.

我们测定了 3 种细胞的线粒体膜电位. 实验结果如图 2a 所示, swe. $\Delta 9$ 细胞线粒体膜电位要显著低于 APP ($P < 0.01$), 而 APP 细胞的线粒体膜电位显著低于 wt 细胞 ($P < 0.005$).

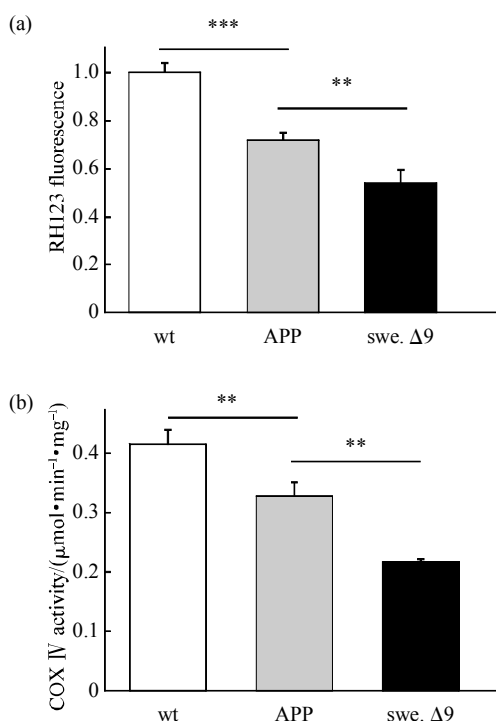


Fig. 2 Mitochondrial membrane potential and complex IV activity were gradually decreased in APP cells and in swe. $\Delta 9$ cells

(a) Mitochondrial membrane potential is significantly decreased in APP cells compared with control cells ($***P < 0.005$), and swe. $\Delta 9$ cells compared with APP cells (ANOVA: $**P < 0.01$). (b) Altered complex IV activity was detected in APP cells and swe. $\Delta 9$ cells (ANOVA: $**P < 0.01$, $n = 6$).

2.3 转基因细胞细胞色素 c 氧化酶 (COX IV) 活性变化

比较了三种细胞的 COX IV 活性, 结果显示, APP 细胞和 swe. $\Delta 9$ 细胞的细胞色素 c 氧化酶活性明显低于 wt 细胞 (图 2b), 而 swe. $\Delta 9$ 细胞中细胞色素 c 氧化酶活性显著低于 APP 细胞 ($P < 0.01$).

2.4 转基因细胞线粒体膜流动性变化

线粒体膜流动性的高低与线粒体的产能效率密切相关, 我们测量了三种细胞的平均微黏度 η , η 可以表征线粒体膜流动性的高低, η 越大膜流动性越低. 实验结果显示 (图 3a), APP 细胞的线粒体膜流动性明显低于 wt 细胞 ($P < 0.05$), 而 swe. $\Delta 9$ 的线粒体膜流动性明显低于 APP 细胞 ($P < 0.01$).

2.5 转基因细胞 ATP 含量变化

线粒体是细胞产生 ATP 的场所. 比较三种细胞的 ATP 含量, 结果显示 APP 细胞的 ATP 含量明显低于 wt 细胞 (图 3b, $P < 0.01$), 而 swe. $\Delta 9$ 细胞中 ATP 含量显著低于 APP 细胞 ($P < 0.01$).

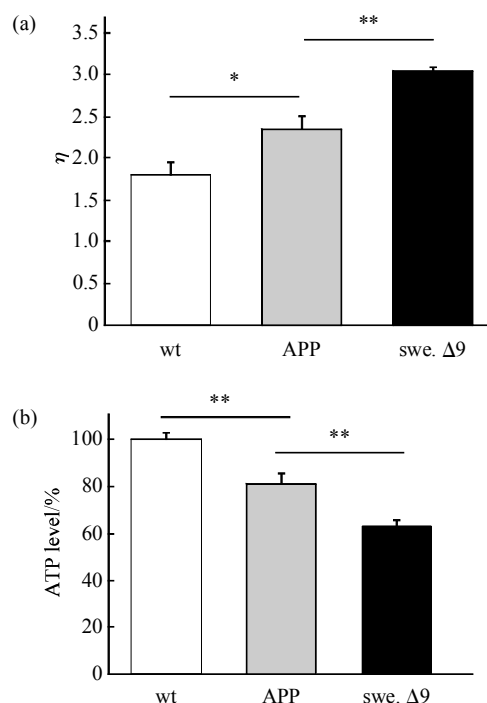


Fig. 3 swe. $\Delta 9$ cells showed abnormal mitochondrial membrane fluidity and ATP content

(a) Mitochondrial membrane fluidity was detected by measuring fluorescence anisotropy with DPH. Viscosity (η) of mitochondrial membrane in APP cells was significantly higher than that in wt cells, while significantly lower than that in swe. $\Delta 9$ cells. (b) ATP level in swe. $\Delta 9$ cells is lower than that in APP cells and the latter is lower than that in wt cells (ANOVA: $**P < 0.01$, $n = 6$).

2.6 转基因小鼠老年斑的观察

转基因小鼠的老年斑用硫磺素 S 染色测量. 本实验选用年龄约 12 月龄的野生 (wt)、Tg2576 和 DT 小鼠, 每组取 5 只. 如图 4 所示, 转基因小鼠 Tg2576 在大脑皮质区和海马区有很多的老年斑, 而双转小鼠 (DT) 的老年斑比 Tg2576 鼠更多. 这说明了 PS1 的突变增加了 γ 酶的活性, A β 的产量增多, 使得皮质区和海马区的老年斑增多.

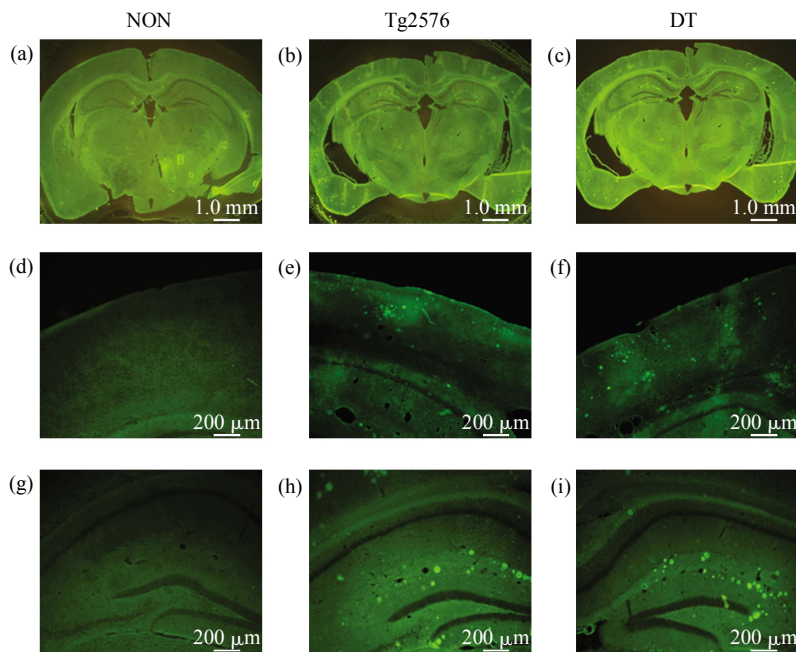


Fig. 4 Plaques were investigated in Tg2576 and APP/PS1 M146V/+ mice

Thioflavin S staining revealed more parenchymal plaques in double mutant mice than in Tg2576 mice. (a~c) Holo-brain. (a) NON, wild type mice, (b) Tg2576, (c) DT. (d~f) Cortex. (d) NON. (e) Tg2576. (f) DT. (g~i) Hippocampus. (g) NON. (h) Tg2576. (i) DT. $n=5/\text{group}$.

2.7 转基因小鼠脑组织细胞色素 c 氧化酶(COX IV) 活性比较

在上述转基因细胞测量结果的基础上, 我们比较了几种模型动物的细胞色素 c 氧化酶活性, 结果显示(图 5a), DT 小鼠的 COX IV 活性明显低于 Tg2576 鼠($P < 0.01$), 而 Tg2576 鼠的 COX IV 活性

明显低于野生型小鼠($P < 0.01$).

2.8 转基因小鼠脑组织中 ATP 含量变化

我们还检测了转基因小鼠脑组织中 ATP 含量的变化, 结果显示(图 5b), DT 小鼠脑组织的 ATP 含量明显低于 Tg2576 小鼠, 而 Tg2576 小鼠脑组织的 ATP 含量明显低于野生型小鼠.

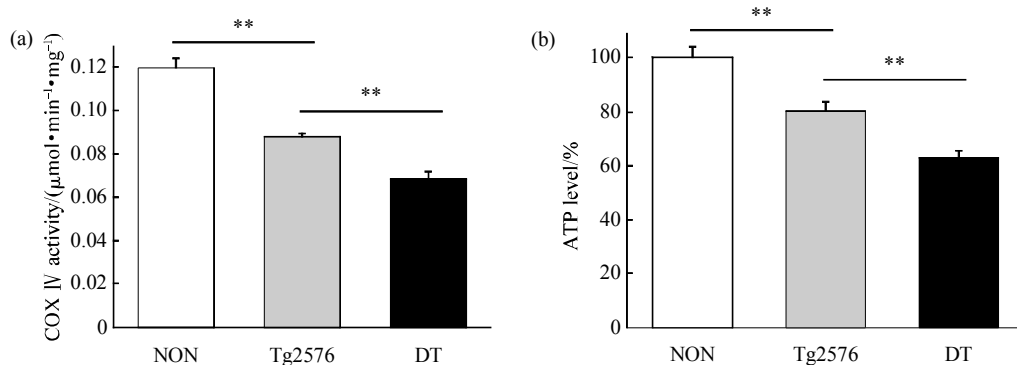


Fig. 5 Complex IV activity and ATP content were compared in transgenic mice

(a) Altered complex IV activity was detected in Tg2576 mice and Doubly Transgenic mice (ANOVA: $***P < 0.01$). NON, wild type mice. (b) ATP level in DT mice brain is lower than that in Tg2576 mice brain and the later is lower than that in non transgenic mice brain (ANOVA: $***P < 0.01$).

3 讨 论

阿尔茨海默症(AD)的发病机理至今仍不清

楚. 近年来, AD 病人线粒体功能的异常逐渐被人们所重视. 在散发性 AD 和家族性 AD 中均发现有线粒体功能的破坏以及能量代谢的紊乱, 但是其具

体的作用机制并不清楚^[14]。

本研究测定了 FAD 模型细胞的线粒体功能, 发现 APP 细胞线粒体膜电位(MMP)和细胞色素 c 氧化酶(COX IV)活性均低于野生型细胞, 而 swe. $\Delta 9$ 细胞中 MMP 和细胞色素 c 氧化酶活性均明显低于 APP 细胞. 而 COX IV 活性的降低及其所导致的线粒体功能障碍会选择性损伤 AD 病人脑中的某些神经元^[15]. 同时, 我们发现 swe. $\Delta 9$ 细胞的线粒体膜流动性以及 ATP 含量明显低于 APP 细胞, 而 APP 细胞的线粒体膜流动性以及 ATP 含量明显低于野生型细胞. 线粒体膜流动性在维持线粒体功能中起重要作用. 实验结果表明 FAD 相关的模型细胞线粒体膜流动性降低, 这与之前的报道一致^[16]. 而 ATP 含量异常说明线粒体氧化磷酸化过程受阻, 能量代谢紊乱. 如图 1c 所示, swe. $\Delta 9$ 细胞表达的 A β 含量明显高于 APP 和野生型细胞, 而其线粒体功能的破坏程度也是最深的. 这一研究结果证明了线粒体的功能与内源性生成的 A β 产量的相关关系. 这一结论在转基因小鼠上进一步得到验证, 同龄的转基因小鼠中, DT 小鼠的 A β 老年斑最多, 而其脑组织中细胞色素 c 氧化酶的活性和 ATP 的含量最低. 本研究利用体内体外实验分别证明, 淀粉样肽 A β 的过量和线粒体一系列功能紊乱有着正相关的关系.

在 AD 的病理学研究中, 过表达 APP 的细胞被经常使用. APP 可以直接定位于人 HCN-1A 细胞的线粒体上, 过量的 APP 可导致细胞线粒体功能的紊乱^[17], 而外源性的 A β 直接作用于提取的线粒体可以引起线粒体功能和结构的逐步破坏^[6]. 因此, 过量的 APP 和 A β 都会造成细胞线粒体功能的异常, 但是这些研究都没有明确证明在 AD 的发病过程中, 主要是 APP 引起了线粒体的功能破坏还是 A β 引起了线粒体功能的紊乱. 结合之前的文献报道和本实验模型细胞线粒体指标的变化说明可能存在以下的机制: 在 APP 细胞中 APP 过量表达, 可能导致了线粒体的功能异常. 而在 swe. $\Delta 9$ 细胞中, APP 被大量剪切, 产生了过量的 A β , A β 负担超过了细胞或机体自身清除的能力, 因此会持续破坏线粒体的功能, 造成功能的异常. 本研究证明这种 A β 造成的线粒体功能异常比起 APP 过量造成的线粒体功能异常要更加严重. 说明了 A β 对 AD 模型线粒体功能紊乱的重要作用. A β 如何定位于线粒体, 目前还没有公认的机制^[2]. 但是线粒体中存在把 APP 切割生成 A β 的 γ 酶的 4 个组分

即 presenilins、nicastrin、pen2、Aph-1, 它们可以在线粒体内组成有活性的复合物^[18], 说明 APP 或其切割产物可以在线粒体内直接被 γ 酶切割生成 A β . 最近有研究证明, A β 能够通过线粒体 TOM 复合体穿过线粒体外膜进入线粒体并定位在线粒体脊上^[19], 说明线粒体中的 A β 也有一部分来自线粒体外. 但是 A β 是如何达到线粒体表面的, 还需要进一步的研究来探索. 本研究中的动物实验证明, APP/PS1 双转的小鼠形成的 A β 老年斑比 APP 转基因小鼠更多, 相应的线粒体功能受到更严重的损伤, 说明 A β 对 AD 病理过程中线粒体功能的损坏起了重要作用. 至于 A β 通过何种机制来破坏线粒体, 也是今后需要研究解决的一个问题. 这一研究可以帮助认识 AD 的发病机理, 同时为 AD 的治疗提供方向.

致谢 感谢美国 Burnham 医学院许华曦教授提供 N2a 细胞, 感谢 Baylor 医学院郑辉教授提供转基因小鼠.

参 考 文 献

- [1] Bubber P, Haroutumian V, Fish G, *et al.* Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann Neurol*, 2005, **57**(5): 695-703
- [2] Wang X, Su B, Perry G, *et al.* Insights into amyloid- β -induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, 2007, **43**(12): 1569-1573
- [3] Kimberly W T, LaVoie M J, Ostaszewski B L, *et al.* γ -secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (11): 6382-6387
- [4] Drouet B, Pincon-Raymond M, Chambaz J, *et al.* Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*, 2000, **57**(5): 705-715
- [5] Devi L, Prabhu B M, Galati D F, *et al.* Accumulation of Amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's Disease brain: is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*, 2006, **26**(35): 9057-9068
- [6] Aleardi A M, Benard G, Augereau O, *et al.* Gradual Alteration of mitochondrial structure and function by β -Amyloids: importance of membrane viscosity changes, energy deprivation, reactive oxygen species production, and cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr*, 2005, **37**(4): 207-225
- [7] Emaus R K, Grunwald R, Lemasters J J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta*, 1986, **850**(3): 436-448
- [8] Park J W, Youn Y C, Kwon O S, *et al.* Protective effect of serotonin on 6-hydroxydopamine- and dopamine-induced oxidative damage of brain mitochondria and synaptosomes and PC12 cells. *Neurochem Int*, 2002, **40**(3): 223-233

- [9] Vijayarathy C, Damle S, Lenka N, *et al.* Tissue variant effects of heme inhibitors on the mouse cytochrome c oxidase gene expression and catalytic activity of the enzyme complex. *Eur J Biochem*, 1999, **266**(1): 191–200
- [10] Meddings J B, Hogaboam C M, Tran K, *et al.* Capsaicin effects on non-neuronal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1070**(1): 43–50
- [11] Wyss-Coray T, Masliah E, Mallory M, *et al.* Amyloidogenic role of cytokine TGF- β 1 in transgenic mice and Alzheimer's disease. *Nature*, 1997, **389**(6651): 603–606
- [12] Katayama T, Imaizumi K, Honda A, *et al.* Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's Disease-linked Presenilin-1 mutations. *J Biol Chem*, 2001, **276**(46): 43446–43454
- [13] Wang Y P, Wang X C, Tian Q, *et al.* Endogenous overproduction of beta-amyloid induces tau hyperphosphorylation and decreases the solubility of tau in N2a cells. *J Neural Transm*, 2006, **113**(11): 1723–1732
- [14] Castellani R, Hirai K, Aliev G, *et al.* Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, 2002, **70**(3): 357–360
- [15] Davis R E, Miller S, Herrstadt C, *et al.* Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(9): 4526–4531
- [16] Mecocci P, Cherubini A, Beal M F, *et al.* Altered mitochondrial membrane fluidity in AD brain. *Neurosci Lett*, 1996, **207**(2): 129–132
- [17] Anandatheerthavarada H K, Biswas G, Robin M A, *et al.* Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol*, 2003, **161**(1): 41–54
- [18] Hansson C A, Frykman S, Farmery M R, *et al.* Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active gamma-secretase complexes in mitochondria. *J Biol Chem*, 2004, **279**(49): 51654–51660
- [19] Hansson Petersen C A, Alikhani N, Behbahani H, *et al.* The amyloid β -peptide is imported into mitochondria *via* the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(35): 13145–13150

Research on The Effect of Amyloid beta on Mitochondrial Dysfunction *In vivo* and *In vitro* *

LIU Ling-Ling¹⁾, SHENG Bai-Yang¹⁾, GONG Kai¹⁾, ZHAO Nan-Ming¹⁾,
ZHANG Xiu-Fang¹⁾, TANG Pei-Fu²⁾, GONG Yan-Dao^{1)**}

¹⁾ State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²⁾ Department of Orthopaedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract To investigate the effect of A β on mitochondrial dysfunction, cells stably transfected by human amyloid precursor protein 695 (APP) and cells stably co-transfected by familial Alzheimer's disease (FAD)-linked Swedish mutant of APP695 gene plus Δ E9 deleted presenilin1 gene (swe. Δ 9) were used to study the mitochondrial function. Swe. Δ 9 cells showed more reduce in mitochondrial membrane potential, altered complex IV activity, mitochondrial membrane fluidity and ATP content. However, these parameters in APP cells were lower than those in N2a cells stably transfected with empty vector. The similar results were observed in transgenic mice. APP/PS1^{MI46V/+} mice showed more reduced complex IV activity and ATP content than Tg2576 mice. These data indicated that the dose-dependent effect of A β on mitochondrial dysfunction.

Key words Alzheimer's disease, mitochondria, amyloid β , mitochondrial membrane potential, cytochrome c oxidase activity, mitochondrial membrane fluidity, ATP

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00556

*This work was supported by grants from Tsinghua-Yue-Yuen Medical Sciences Fund(20240000514), The State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, The National Natural Science Foundation of China(30973068) and The Hi-Tech Research and Development Program of China(2008AA022403).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62785049, E-mail: gongyd@tsinghua.edu.cn

Received: November 20, 2009 Accepted: November 27, 2009