

· 论 著 ·

半胱氨酰白三烯受体 1 调节 APP/PS1 小鼠原代神经元
 β 淀粉样蛋白生成及机制

龙 燕, 柯 璇, 洪 浩

(中国药科大学药学院药理系, 江苏 南京 211198)

摘要:目的 探究半胱氨酰白三烯受体 1(CysLT₁R)对体外培养的 APPswe/PS1 Δ E9 双转基因小鼠 (APP/PS1 小鼠)皮质原代神经元 β 淀粉样蛋白(A β)生成的影响及机制。方法 ① 将携带 CysLT₁R 的慢病毒-绿色荧光蛋白载体(LV-CysLT₁R-EGFP)或空载体(LV-EGFP)转染至 APP/PS1 小鼠皮质原代神经元,使神经元过表达 CysLT₁R(CysLT₁R-OE),采用 Western 印迹法检测神经元 CysLT₁R 蛋白表达水平。② 分别以 CysLT₁R 激动剂 YM17690(1 μ mol·L⁻¹)单用或与 CysLT₁R 拮抗剂普仑司特(Pran 1 μ mol·L⁻¹)联用处理 CysLT₁R-OE 神经元 12 h;采用 ELISA 检测细胞培养基内 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 水平;Western 印迹法检测神经元中淀粉样前体蛋白(APP)、 β 淀粉样前体蛋白切割酶 1(BACE1)、早老素(PS)1 和 PS2 表达水平。以 YM17690(1 μ mol·L⁻¹)单用或与 Pran(1 μ mol·L⁻¹)联用处理 CysLT₁R-OE 神经元 2 h 后,采用 Western 印迹法检测 CysLT₁R 和 NF- κ B P65 亚基在细胞内的分布。③ 采用渗透差法在 CysLT₁R-OE 神经元中导入核定位序列多肽(NLS-pep, 10 g·L⁻¹)竞争性抑制 CysLT₁R 核转位或阴性对照多肽(NON-pep, 10 g·L⁻¹),随即以 YM17690(1 μ mol·L⁻¹)处理 CysLT₁R-OE 神经元 12 h,采用 Western 印迹法检测 CysLT₁R 激活后细胞培养基内 A β 水平、胞质中 APP 和 BACE1 表达水平;以 YM17690(1 μ mol·L⁻¹)处理导入多肽后的 CysLT₁R-OE 神经元 2 h,采用 Western 印迹法检测 CysLT₁R 和 NF- κ B P65 亚基在细胞内的分布。结果 ① CysLT₁R-OE 神经元 CysLT₁R 蛋白表达水平较对照组显著增加($P<0.01$)。② 与 CysLT₁R-OE 组相比, CysLT₁R-OE+YM17690 组神经元分泌 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 显著增加($P<0.05$),胞质中 BACE1 及细胞核中 CysLT₁R 和 NF- κ B P65 亚基表达水平显著增加($P<0.05$),而神经元中 APP, PS1 和 PS2 表达水平无明显改变。YM17690 和 Pran 联用(CysLT₁R-OE+YM17690+Pran 组)可消除上述改变。③ 与 CysLT₁R-OE+YM17690 组相比, CysLT₁R-OE+NLS-pep+YM17690 组 CysLT₁R 和 NF- κ B P65 亚基在细胞核内的表达水平显著下降($P<0.05$),神经元分泌 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 显著下降($P<0.05$),胞质中 BACE1 表达水平下调($P<0.05$),APP 未见显著改变。结论 CysLT₁R 被激活后,通过上调 BACE1 表达从而促进 A β 的生成,其机制可能是通过 CysLT₁R 发生核转位并激活 NF- κ B 信号通路介导。

关键词: 半胱氨酰白三烯受体 1; β 淀粉样蛋白; NF- κ B P65; 核定位序列; 核转位

中图分类号: R749.16, R966 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002-(2022)02-0081-09

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.02.001

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种临床表现为记忆缺失、认知能力下降、空间视觉损害、执行功能减退和人格改变等多方面神经功能障碍的神经退行性疾病^[1]。AD 的主要病理特征为脑内神经元外 β 淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 沉积形成的老年斑和神经元内高度磷酸化的 tau 蛋白聚集形成的神经元纤维缠结^[2]。AD 是由遗传、环境、炎症和年龄等多种因素导致的疾病,目前对于其发病机制提出了多种假说, A β 级联假说占据 AD 发病机制的主导地位^[3]。A β 主要有 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 2 种,由 β 淀粉样前体蛋白切割酶 1 (β -site of amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, BACE1) 和 γ 分泌酶先后剪切淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 产生^[4],两者在脑内浓度比是 10:1,而 A β ₁₋₄₂ 疏水性强、毒性大,易聚合成具有生物活性的构象类型,形成老年斑沉淀的核心,并可能引发 AD^[5]。迄今为止,治疗 AD 的药物仅能暂时缓解症状,均不能阻止 AD 的发展进程,且不良反应

基金项目: 国家自然科学基金 (81573413)

作者简介: 龙 燕, 博士, 主要从事神经精神药理学研究。

通讯作者: 洪 浩, E-mail: honghao@cpu.edu.cn

较大^[6]。目前,抑制脑内 A β 聚集、促进 A β 清除是研究 AD 防治药物的重要策略之一^[7]。

半胱氨酰白三烯受体 1 (cysteinyl leukotriene receptor 1, CysLT₁R) 是一种 G 蛋白偶联受体,由 6 个亲水环连接 7 个跨膜疏水区组成^[8]。近年来研究发现,在脑缺血、脑外伤和脑脊髓炎等疾病动物模型中,中枢 CysLT₁R 被过度激活,且与神经功能受损显著相关,而 CysLT₁R 拮抗剂可产生明显的保护作用^[9-12]。本课题组前期研究结果显示,CysLT₁R 参与多种因素诱导的动物认知功能障碍,且 CysLT₁R 拮抗剂普仑司特 (pranlukast, Pran) 可以显著改善 A β 诱导的 AD 模型小鼠的认知功能障碍^[13-16]。与老龄对照组相比,AD 患者前额叶皮质 CysLT₁R 水平升高了 2 倍,并且 APPswe/PS1 Δ E9 双转基因小鼠 (APP/PS1 小鼠) 的 CysLT₁R mRNA 和蛋白水平随着年龄的增长而增加^[17]。表明 CysLT₁R 可能在 AD 的发病过程中起着重要作用。本研究旨在探究 CysLT₁R 对 APP/PS1 小鼠皮质原代神经元中 A β 生成的影响及其可能的机制,为进一步阐明 CysLT₁R 在 AD 发病过程中的重要作用提供理论依据,同时也为抗 AD 药物靶标的发掘提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 动物

雌性孕 APP/PS1 小鼠,约 12 周龄 (孕 16~18 d),体重 50~60 g,购自南京大学模式动物研究所,动物许可证号:SCXK(苏)2015-0001。动物饲养于室温 20~24℃、湿度 40%~60%、光照时间 8:00-20:00 的实验室环境中,自由饮水摄食。本研究通过中国药科大学伦理委员会审批,编号为 SYXK2016-0011。

1.2 药品、试剂和仪器

YM17690 (批号:108806-41-3),上海康曼生物科技有限公司;Pran (批号:150821-03-7),美国 Sigma-Aldrich 公司;慢病毒-绿色荧光蛋白 (lentivirus-enhanced green fluorescent protein, LV-EGFP) 载体 (1×10^{12} TU $\cdot$ L⁻¹,批号:00015399) 和 LV-CysLT₁R-EGFP 载体 (1×10^{12} TU $\cdot$ L⁻¹,批号:00015399),上海吉凯基因化学技术有限公司;脱氧核糖核酸酶 I 和木瓜蛋白酶,白鲨生物科技有限公司;人 A β ₁₋₄₀ (批号:CSB-E06928Eq) 和人 A β ₁₋₄₂ (批号:CSB-E10684h) ELISA 试剂盒,武汉华美生物工程有限公司;兔抗小鼠 APP, BACE1 和 NF- κ B P65 单克隆抗体 (批号:2452S, 5606S 和 4764T),美国 CST 公

司;兔抗小鼠 PS1 和 PS2 多克隆抗体 (批号:sc-7860 和 sc-1456-R),美国 Santa Cruz 公司;兔抗小鼠 CysLT₁R 多克隆抗体 (批号:120500),美国 Cayman Chemical 公司;兔抗小鼠 β 肌动蛋白单克隆抗体 (批号:BM3873) 和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (二抗,批号:BA1039),博士德生物工程有限公司;NP-40 蛋白裂解液、苯甲基磺酰氟、多聚赖氨酸和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号:P0012),碧云天生物技术有限公司;膜蛋白、核蛋白和胞质蛋白抽提试剂盒 (批号:C510002),上海生工生物工程股份有限公司;胰蛋白酶、兔抗小鼠 A β ₁₋₄₀ (批号:44-348A) 和 A β ₁₋₄₂ (批号:27250018) 多克隆抗体、胎牛血清、DMEM 培养基、B27 和 Neurobasal 培养基,美国 Invitrogen 公司。兔抗小鼠组蛋白 3 多克隆抗体 (批号:ab1791)、兔抗小鼠 Na⁺-K⁺-ATP 酶单克隆抗体 (批号:ab167390),美国 Abcam 公司。核定位序列多肽 (nuclear localization sequence peptides, NLS-pep, 序列:RKHSLSS-MTYVPKKK) 及其阴性对照多肽 (none-NLS-pep, NON-pep, 序列:SCFNPFLLYYFAGENF),由吉尔生化 (上海) 有限公司合成,NLS-pep 和 NON-pep 分别对应于小鼠 CysLT₁R 序列中第 311~325 个和 CysLT₂R 序列中第 282~296 个氨基酸,经高效液相色谱和质谱鉴定纯度达到 90%。RT-6000 型酶标仪,深圳雷杜生命科学股份有限公司;转移电泳槽和转移电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;Tanon4200 型化学发光成像分析系统和 Tanon3500 型数码凝胶成像分析系统,上海天能科技有限公司。

1.3 APP/PS1 小鼠皮质原代神经元的提取和培养

将 APP/PS1 孕鼠处死、消毒后取出胎鼠,在无菌环境下剪开胎鼠的颅腔,用眼科镊在冰浴的 DMEM 培养基中取皮质,去除脑膜和血管后剪碎。用脱氧核糖核酸酶 I 和木瓜酶消化皮质组织,离心、去上清液,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,再次离心、去上清液后加入含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基,轻轻吹打 10 次,静置 2 min,取上清液加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,重复吹打步骤。将收集到的细胞悬液静置 2 min,细胞计数,调整细胞密度至 1×10^9 L⁻¹,接种于用多聚赖氨酸包被的 6 孔板中,每孔接种 1 mL。接种 30 min 后换液,每孔加入含双抗和 B27 的 Neurobasal 培养基,置 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.4 APP/PS1 小鼠皮质原代神经元转染 LV-EGFP 或 LV-CysLT₁R-EGFP

APP/PS1 小鼠皮质原代神经元以 2.5×10^8 L⁻¹

的密度接种于 6 孔板中,每孔接种 2 mL,正常培养 1 周。吸出旧培养基,加入 1×10^{11} TU $\cdot$ L $^{-1}$ 的 LV-EGFP 或 LV-CysLT $_1$ R-EGFP(分别用促转染溶液稀释)100 μ L 和聚凝胺 50 mg $\cdot$ L $^{-1}$ (用 Neurobasal 培养基稀释)200 μ L,并加入 Neurobasal 培养基至总体积 2 mL。12 h 后,更换新鲜的含 B27 的 Neurobasal 培养基继续培养至 120 h 用于实验。

1.5 Western 印迹法检测 CysLT $_1$ R-OE 神经元 CysLT $_1$ R 表达水平

以 1.4 方法转染 LV-CysLT $_1$ R-EGFP,使神经元过表达 CysLT $_1$ R(CysLT $_1$ R-OE)后收集细胞,加入含苯甲基磺酰氟的 NP-40 蛋白裂解液充分裂解,以 16 770 $\times$ g,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,取上清。BCA 法检测蛋白质含量。分别经电泳和转膜后加入一抗[CysLT $_1$ R(1:1000), β 肌动蛋白(1:3000)]4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;洗去一抗,加入相应二抗(1:5000),室温孵育 2 h。采用化学发光成像系统拍照,Gel-Pro 软件扫描分析蛋白条带积分吸光度值。以目标蛋白与内参蛋白条带积分吸光度值的比值反映目标蛋白相对表达水平,各组数据以与对照组相比后的百分数表示。

1.6 ELISA 法检测 CysLT $_1$ R-OE 神经元培养基中 A β_{1-40} 和 A β_{1-42} 含量

CysLT $_1$ R-OE 转染方法同 1.4。将神经元分为对照组(转染 LV-EGFP 后加入溶剂)、CysLT $_1$ R-OE 组(转染 LV-CysLT $_1$ R-EGFP 后加入溶剂)、CysLT $_1$ R-OE+YM17690 组(转染 LV-CysLT $_1$ R-EGFP 后加入 YM17690 1 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$)和 CysLT $_1$ R-OE+YM17690+Pran 组(转染 LV-CysLT $_1$ R-EGFP 后同时加入 YM17690 和 Pran 各 1 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$)。药物作用 12 h 后,收集各组细胞培养基,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,测定 A β_{1-40} 和 A β_{1-42} 含量。

1.7 Western 印迹法检测 CysLT $_1$ R-OE 神经元胞质中 APP, BACE1, PS1 和 PS2 蛋白表达水平

CysLT $_1$ R-OE 转染方法同 1.4,实验分组同 1.6。药物干预 12 h 后收集细胞,按照试剂盒说明书步骤分步提取胞质蛋白,加入一抗[APP, BACE1, PS1 和 PS2(1:1000)及 β 肌动蛋白(1:3000)]和二抗(1:5000)。实验步骤及结果处理同 1.5。

1.8 Western 印迹法检测 CysLT $_1$ R 和 NF- κ B P65 在 CysLT $_1$ R-OE 神经元中的分布

1.8.1 CysLT $_1$ R 在 CysLT $_1$ R-OE 神经元中的分布

CysLT $_1$ R-OE 转染方法同 1.4。将神经元分为 CysLT $_1$ R-OE 组(转染 LV-CysLT $_1$ R-EGFP 后加入溶剂)、CysLT $_1$ R-OE+YM17690 组(转染 LV-CysLT $_1$ R-EGFP 后加入 YM17690 1 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$)和 CysLT $_1$ R-

OE+YM17690+Pran 组(转染 LV-CysLT $_1$ R-EGFP 后同时加入 YM17690 和 Pran 各 1 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$)。药物干预 2 h 后收集细胞,按照试剂盒说明书步骤分步提取膜蛋白、核蛋白和胞质蛋白。加入一抗[CysLT $_1$ R、 β 肌动蛋白、组蛋白 3 和 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATP 酶(1:3000)]和二抗(1:5000)。其中, β 肌动蛋白为胞质蛋白内参,组蛋白 3 为核蛋白内参,Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATP 酶为膜蛋白内参。Western 印迹法实验步骤及结果处理同 1.5。各组数据以与 CysLT $_1$ R-OE 组相比后的百分数表示。

1.8.2 NF- κ B P65 在 CysLT $_1$ R-OE 神经元中的分布

CysLT $_1$ R-OE 转染方法同 1.4,实验分组同 1.6。抗 NF- κ B P65 抗体(稀释倍数 1:1000),Western 印迹法实验步骤及结果处理同 1.8.1。

1.9 Western 印迹法检测 CysLT $_1$ R-OE 神经元导入多肽后培养基内 A β_{1-40} 和 A β_{1-42} 、胞质内 APP 和 BACE1 蛋白表达水平及 CysLT $_1$ R 和 NF- κ B P65 亚基在细胞的分布

1.9.1 渗透差法将 NLS-pep 或 NON-pep 导入 CysLT $_1$ R-OE 神经元

CysLT $_1$ R-OE 转染方法同 1.4。将 CysLT $_1$ R-OE 神经元分为:CysLT $_1$ R-OE 组(加入溶剂),CysLT $_1$ R-OE+YM17690 组(加入 YM17690 1 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$),CysLT $_1$ R-OE+NON-pep+YM17690(导入 NON-pep 后随即加入 YM17690 1 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$),CysLT $_1$ R-OE+NLS-pep+YM17690(导入 NLS-pep 后随即加入 YM17690 1 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$)。实验前取 100 mg NLS-pep 或 NON-pep 溶于 10 mL 高渗导入液(含糖 171.15 g $\cdot$ L $^{-1}$ 、10% 聚乙二醇和 10% 胎牛血清的 DMEM 溶液)中,制成高渗多肽导入液,每孔 2 mL 加入 6 孔板中,室温孵育 10 min,而后迅速更换为低渗液(3.5 mL DMEM 用 6.5 mL 灭菌双蒸水稀释),室温孵育 2 min。重复上述操作 2 次。

1.9.2 导入多肽后 CysLT $_1$ R 在 CysLT $_1$ R-OE 神经元的分布

CysLT $_1$ R-OE 神经元导入多肽后随即加入 YM17690 1 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 孵育 2 h,收集细胞,按照试剂盒说明书步骤分步提取膜蛋白、核蛋白和胞质蛋白。加入一抗[CysLT $_1$ R(1:1000), β 肌动蛋白、组蛋白 3 和 Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATP 酶(1:3000)]和二抗(1:5000)。Western 印迹法实验步骤及结果处理同 1.5。各组数据以与 CysLT $_1$ R-OE 组相比后的百分数表示。

1.9.3 导入多肽后 NF- κ B P65 亚基在 CysLT $_1$ R-OE 神经元的分布

CysLT $_1$ R-OE 神经元分组同 1.9.1。加入 YM17690

孵育 2 h 后收集细胞,按照试剂盒说明书分步提取细胞的核蛋白和胞质蛋白。加入一抗[NF- κ B P65 (1:1000), β 肌动蛋白和组蛋白 3(1:3000)]和二抗(1:5000)。Western 印迹法实验步骤及结果处理同 1.9.2。

1.9.4 导入多肽后 CysLT₁R-OE 神经元培养基 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 水平及胞质中 APP 和 BACE1 蛋白表达水平

CysLT₁R-OE 神经元分组同 1.9.1。加入 YM17690 孵育 12 h 后分别收集培养基和神经元。以 1.5 方法提取神经元的胞质蛋白。加入一抗[A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂, APP 和 BACE1(1:1000); β 肌动蛋白(1:3000)]和二抗(1:5000)。通过 Western 蛋白印迹法检测培养基中 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 水平及胞质中 APP 和 BACE1 蛋白表达水平。Western 印迹法实验步骤及结果处理同 1.9.2。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。转染 LV-CysLT₁R-EGFP 后 CysLT₁R 过表达鉴定采用 Student *t* 检验;其他实验结果采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 APP/PS1 小鼠皮质原代神经元转染 LV-CysLT₁R-EGFP 后过表达 CysLT₁R

转染 LV-CysLT₁R-EGFP 120 h 后,与对照组相比,CysLT₁R-OE 组 APP/PS1 小鼠皮质原代神经元中 CysLT₁R 蛋白表达水平显著增加($P < 0.01$)(图 1)。

2.2 激活或竞争性抑制 CysLT₁R 对 CysLT₁R-OE 神经元培养基内 A β 及胞质内 APP, BACE1, PS1 和 PS2 表达水平的影响

ELISA 结果(图 2)显示,与 CysLT₁R-OE 组相比,CysLT₁R-OE+YM17690 组神经元分泌 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 显著增加($P < 0.05$);而 CysLT₁R-OE+YM17690+Pran 组神经元分泌 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 无明显变化。Western 印迹法结果(图 3)显示,与 CysLT₁R-OE 组相比,CysLT₁R-OE+YM17690 组神经元中 APP, PS1 和 PS2 表达水平无显著变化,但 BACE1 表达水平显著增加($P < 0.05$);而 CysLT₁R-OE+YM17690+Pran 组中 BACE1 的表达无明显变化。

2.3 激动 CysLT₁R 对该受体和 NF- κ B P65 亚基核转位的影响

Western 印迹结果显示,与 CysLT₁R-OE 组相

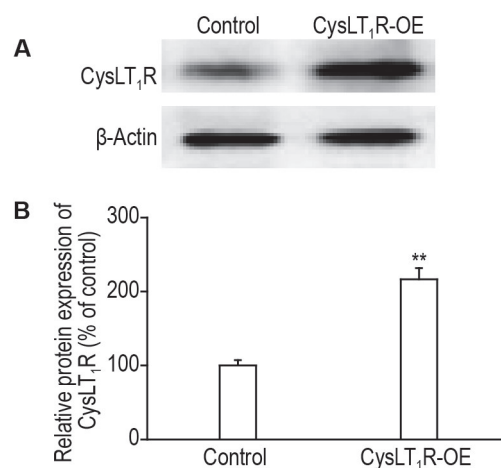


Fig.1 Overexpression of cysteinyl leukotriene receptor 1 (CysLT₁R-OE) in APPswe/PS1 Δ E9 double transgenic mouse (APP/PS1 mouse) primary cortical neurons by Western blotting. APP/PS1 mouse primary cortical neurons were transfected with lentivirus(LV)-enhanced green fluorescent protein (EGFP) or LV-CysLT₁R-EGFP for 120 h. B was the semi-quantitative result of A. Data were reported as a percentage increase compared with control group. $\bar{x} \pm s$, $n=4$. ** $P < 0.01$, compared with control group.

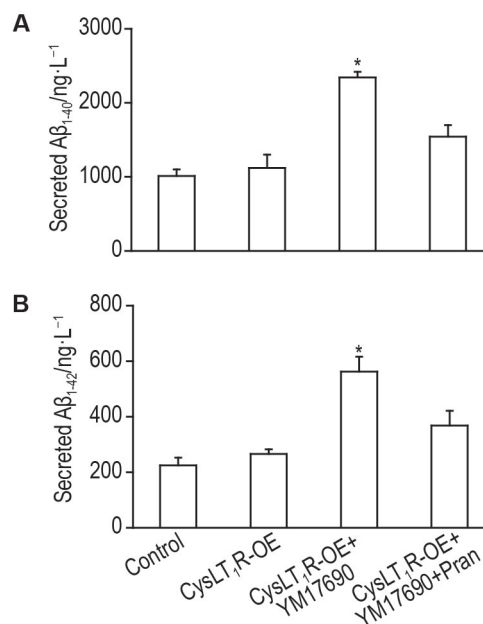


Fig.2 Activation of CysLT₁R by YM17690 increases amyloid β -protein (A β) secretion of CysLT₁R-OE neurons. APP/PS1 mouse primary cortical neurons were transfected with LV-EGFP (control group) or LV-CysLT₁R-EGFP (CysLT₁R-OE group) for 120 h, then the neurons in CysLT₁R-OE group were treated with vehicle (CysLT₁R-OE group), YM176901 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (CysLT₁R-OE+YM17690 group) or YM17690 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ together with pranlukast (Pran) 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (CysLT₁R-OE + YM17690 + Pran group) for 12 h. The levels of A β ₁₋₄₀ (A) and A β ₁₋₄₂ (B) in the medium were detected by ELISA. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P < 0.05$, compared with CysLT₁R-OE group.

比, CysLT₁R-OE+YM17690 组 CysLT₁R 在神经元细胞膜和细胞质中蛋白表达水平显著下降

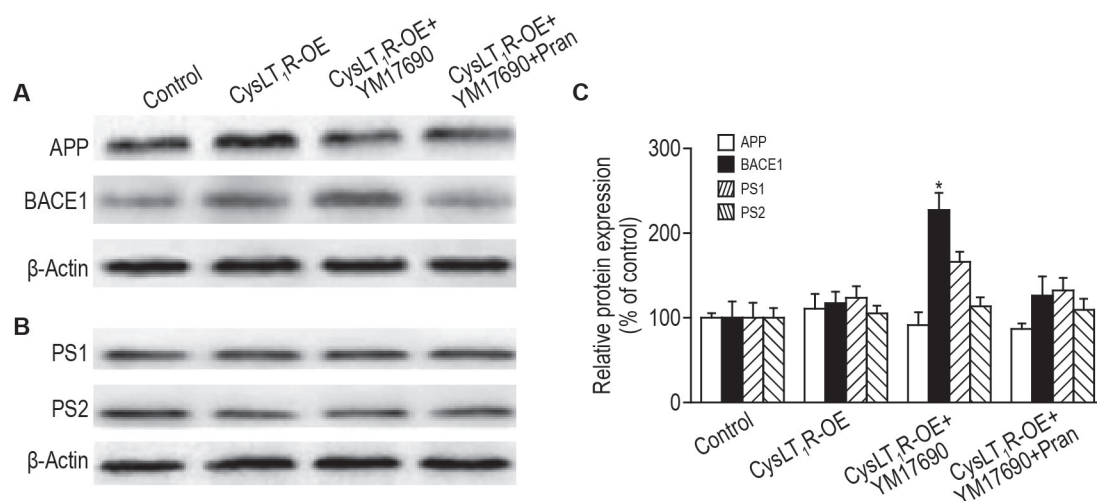


Fig.3 Effect of CysLT₁R activation on protein expressions of amyloid precursor protein (APP), β -site of APP cleaving enzyme 1 (BACE1), presenilin-1 (PS1) and PS2 in CysLT₁R-OE neurons by Western blotting. See Fig.2 for the cell treatment. C was the semi-quantitative result of A and B. Data were reported as a percentage increase compared with control group. $\bar{x} \pm s$, $n=4$. * $P<0.05$, compared with CysLT₁R-OE group.

($P<0.05$),而在细胞核中表达水平显著升高($P<0.05$)(图4);NF- κ B P65亚基在细胞质中表达水平显著下降($P<0.05$),而在细胞核中表达水平显著升高($P<0.05$)(图5)。

2.4 YM17690对导入NLS-pep的CysLT₁R-OE神经元内CysLT₁R和NF- κ B P65亚基分布的影响

Western印迹结果(图6)显示,与CysLT₁R-OE+YM17690组相比,CysLT₁R-OE+NLS-pep+YM17690组神经元CysLT₁R和NF- κ B P65亚基在细胞核中表达水平显著下降($P<0.05$),CysLT₁R和

NF- κ B P65亚基在胞质中表达水平显著升高($P<0.05$),CysLT₁R在细胞膜上表达水平显著升高($P<0.05$);而CysLT₁R-OE+NON-pep+YM17690组神经元CysLT₁R和NF- κ B P65亚基在细胞核、胞质中和细胞膜上的表达水平均未见上述改变。

2.5 YM17690对导入NLS-pep的CysLT₁R-OE神经元培养基中A β_{1-40} 和A β_{1-42} 及胞质中APP和BACE1蛋白表达水平的影响

Western印迹结果(图7)显示,与CysLT₁R-OE+YM17690组相比,CysLT₁R-OE+NLS-pep+

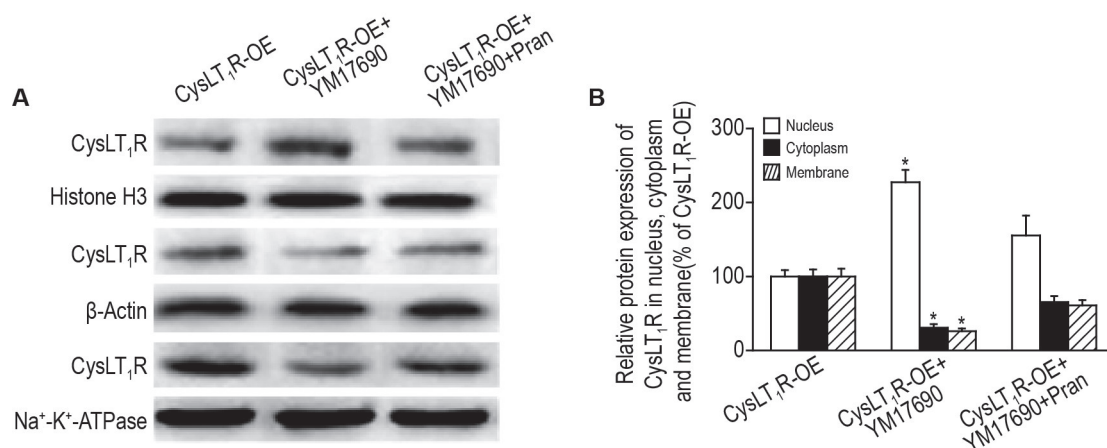


Fig.4 Effect of CysLT₁R activation on nuclear translocation of receptor in CysLT₁R-OE neurons by Western blotting. APP/PS1 mouse primary cortical neurons were transfected with LV-CysLT₁R-EGFP for 120 h, then the neurons in CysLT₁R-OE group were treated with vehicle (CysLT₁R-OE group), YM17690 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (CysLT₁R-OE+YM17690 group) or YM17690 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ together with Pran 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (CysLT₁R-OE+YM17690+Pran group) for 2 h. B was the semi-quantitative result of A. Data were reported as a percentage increase compared with CysLT₁R-OE group. $\bar{x} \pm s$, $n=4$. * $P<0.05$, compared with CysLT₁R-OE group.

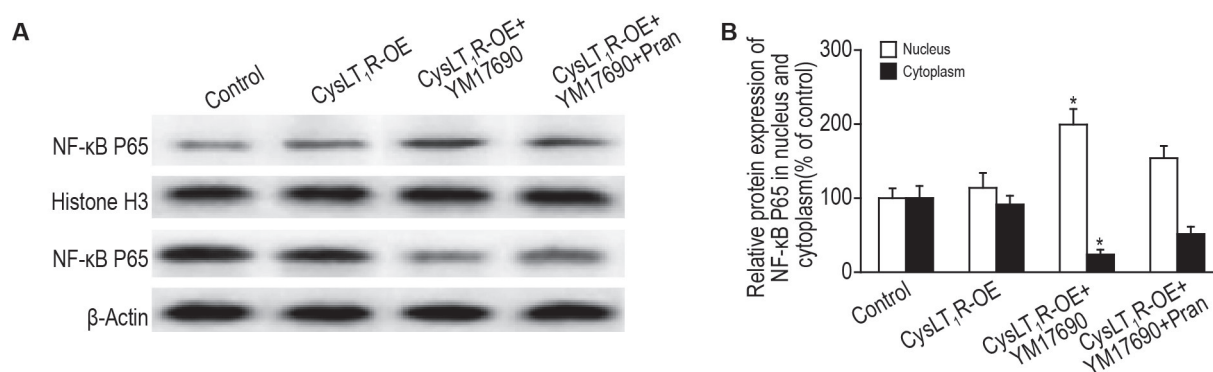


Fig.5 Effect of CysLT₁R activation on nuclear translocation of NF-κB P65 subunit in CysLT₁R-OE neurons by Western blotting. APP/PS1 mouse primary cortical neurons were transfected with LV-EGFP (control group) or LV-CysLT₁R-EGFP for 120 h, then the neurons in CysLT₁R-OE group were treated with vehicle (CysLT₁R-OE group), YM17690 1 μmol·L⁻¹ (CysLT₁R-OE+YM17690 group) or YM17690 1 μmol·L⁻¹ together with Pran 1 μmol·L⁻¹ (CysLT₁R-OE+YM17690+Pran group) for 2 h. B was the semi-quantitative result of A. Data were reported as a percentage increase compared with control group. $\bar{x} \pm s$. $n=4$. * $P<0.05$, compared with CysLT₁R-OE group.

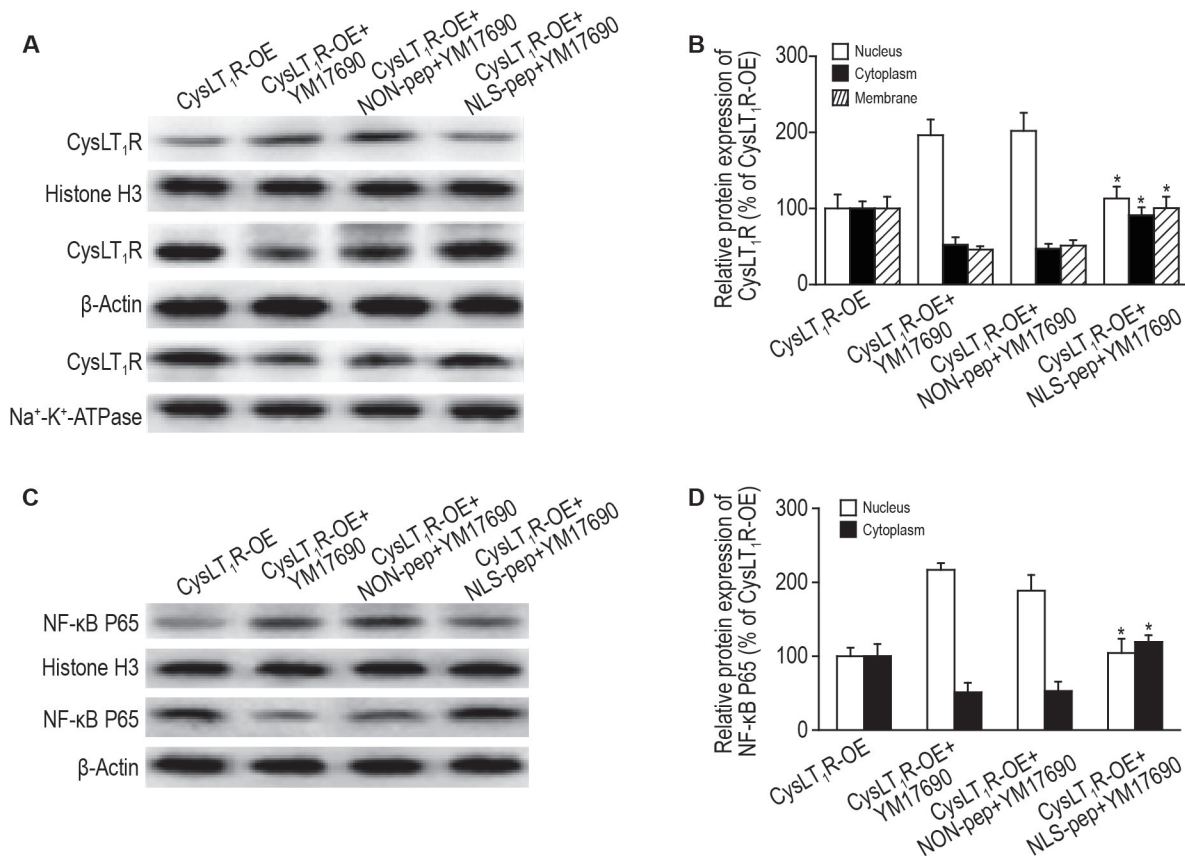


Fig.6 Effect of YM17690 on CysLT₁R (A and B) and NF-κB P65 subunit (C and D) distribution in CysLT₁R-OE neurons with nuclear localization sequence peptide (NLS-pep) delivery. After transfection of LV-CysLT₁R-EGFP into APP/PS1 mouse primary cortical neurons for 120 h, then the neurons in CysLT₁R-OE group were treated with vehicle (CysLT₁R-OE group), YM17690 1 μmol·L⁻¹ (CysLT₁R-OE+YM17690 group), NON-pep together with YM17690 1 μmol·L⁻¹ (CysLT₁R-OE+NON-pep+YM17690) or NLS-pep together with YM17690 (CysLT₁R-OE+NLS-pep+YM17690) for 2 h. B and D were the semi-quantitative results of A and C, respectively. Data were reported as a percentage increase compared with CysLT₁R-OE group. $\bar{x} \pm s$. $n=4$. * $P<0.05$, compared with CysLT₁R-OE+YM17690 group.

YM17690 组神经元培养基中 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 表达水平明显下降 ($P<0.05$), 胞质中 BACE1 表达水平明显下降 ($P<0.05$), 胞质中 APP 表达水平无明显变

化; 而 CysLT₁R-OE+NON-pep+YM17690 组神经元培养基中 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 及胞质中 BACE1 和 APP 表达水平均未见明显变化。

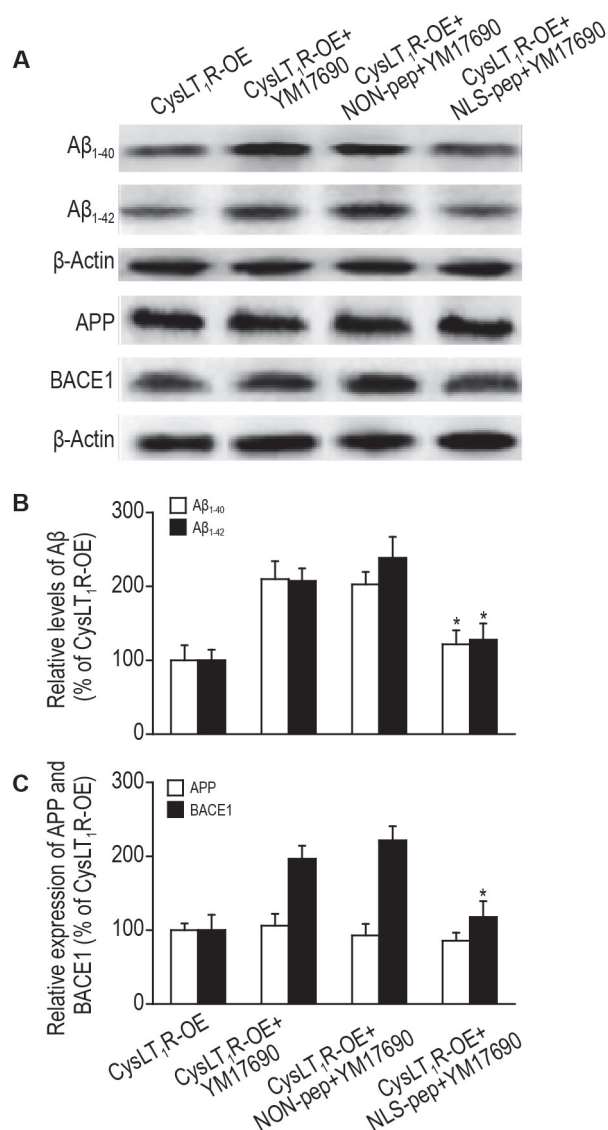


Fig.7 Effect of YM17690 on expressions of Aβ₁₋₄₀ and Aβ₁₋₄₂ in medium as well as APP and BACE1 in cytoplasm in CysLT₁R-OE neurons with NLS-pep delivery. See Fig.6 for the treatment. B and C were the semi-quantitative results of A. Data were reported as a percentage increase compared with CysLT₁R-OE group. $\bar{x} \pm s$, $n=4$. * $P<0.05$, compared with CysLT₁R-OE+YM17690 group.

3 讨论

有研究表明, CysLT₁R 在 APP/PS1 小鼠脑内的表达随年龄的增长而增加, 并与 Aβ 沉积的增加量和行为缺陷的严重程度密切相关^[18]。CysLT₁R 是一种 G 蛋白偶联受体 (G protein coupled receptors, GPCR), 其内源性配体是 CysLT 类物质, 包括 LTC₄, LTD₄ 和 LTE₄ 等^[19]。本课题组前期研究发现, 伴随着 CysLT₁R 的激活, NF-κB 通路随后被激活, 且 CysLT₁R 介导的 NF-κB 激活参与了 LTD₄ 诱导的 Aβ 表达上调及 BACE1 和 γ 分泌酶活性增强^[13-15]。长久以来, GPCR 都被视为一类细胞表面

受体, 但 CysLT₁R 的配体 LTD₄ 可诱导 CysLT₁R 从质膜转移到细胞核, 产生核转位^[20]。YM17690 是一种选择性 CysLT₁R 激动剂, 稳定性良好^[14]。本研究采用 YM17690 激活 CysLT₁R 后, 该受体发生核转位, 且 CysLT₁R 核转位与调节 Aβ 生成有关。亲核蛋白的核输入通常依赖于核转运蛋白对的识别, 已有证据显示, CysLT₁R 氨基酸序列中包含一段经典 NLS, 而 NLS 的突变可抑制 CysLT₁R 的核转位^[21]。NLS-pep 的氨基酸序列与 CysLT₁R 的 NLS 相同, 向神经元中导入 NLS-pep 可使核转运蛋白对 CysLT₁R 的识别和转运趋于饱和, 从而竞争性地抑制受体本身的核输入。本研究结果显示, NLS-pep 特异性抑制 APP/PS1 小鼠皮质原代神经元中 CysLT₁R 的核转位, 进而抑制了 CysLT₁R 对 Aβ₁₋₄₀ 和 Aβ₁₋₄₂ 生成的调节作用。本研究通过检测 NF-κB 的细胞内分布验证 CysLT₁R 核转位与 NF-κB 通路激活之间的关系, 结果发现, CysLT₁R 发生核转位的同时 NF-κB P65 亚基也发生核转位, 且该现象可被 CysLT₁R 受体拮抗剂 Pran 和 NLS-pep 抑制。此外, 本课题组在 APP-HEK293 细胞中通过免疫共沉淀实验发现, CysLT₁R 与 NF-κB P65 亚基在细胞核内存在相互结合 (结果待发表), 推测 CysLT₁R 核转位是激活 NF-κB 信号通路的重要事件。

有研究证明, 在人 BACE1 启动子中有 4 个 NF-κB 结合元件, 其中 2 个与 NF-κB P65 亚基相互作用。NF-κB P65 亚基通过结合 BACE1 启动子上的 NF-κB 结合元件, 显著增强 BACE1 启动子活性^[22], BACE1 对 APP 的切割是 Aβ 生成的限速步骤^[23]。本研究发现, 激活 CysLT₁R 可上调 BACE1 的表达, 并促进 Aβ₁₋₄₀ 和 Aβ₁₋₄₂ 的生成。提示, 激活 CysLT₁R 可引起其内化与核转位, 从而引起 NF-κB P65 亚基的核转位而激活 NF-κB 信号通路, 后者可能通过上调 BACE1 表达, 进而促进 APP/PS1 皮质原代神经元生成 Aβ。有文献报道, Aβ₁₋₄₂ 可促进 NF-κB 报告基因的转录, 进而引起 NF-κB P65 亚基核转位^[24]; NF-κB 通路激活可引起 B 淋巴细胞中促炎细胞因子和趋化因子的转录, 诱导星形胶质细胞损伤或 Aβ 生成, 从而导致 AD^[25]。

综上所述, CysLT₁R 被激活后发生核转位, 受体核转位参与激活 NF-κB 信号通路并上调 BACE1 表达, 这可能是 CysLT₁R 调节 Aβ 生成增加的主要原因。

参考文献:

- [1] Isacson O, Seo H, Lin L, et al. Alzheimer's disease and Down's syndrome: roles of APP, trophic factors

- and ACh [J]. *Trends Neurosci*, 2002, 25(2):79-84.
- [2] Querfurth HW, Laferla FM. Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(4): 329-344.
 - [3] Tadokoro K, Ohta Y, Inufusa H, *et al.* Prevention of cognitive decline in Alzheimer's disease by novel antioxidative supplements[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 1974 [2021-06-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32183152/>. DOI: 10.3390/ijms21061974.
 - [4] Wang J, Gu BJ, Masters CL, *et al.* A systemic view of Alzheimer disease-insights from amyloid- β metabolism beyond the brain[J]. *Nat Rev Neurol*, 2017, 13(10): 612-623.
 - [5] Hampel H, Vassar R, De Strooper B, *et al.* The beta-secretase BACE1 in Alzheimer's disease[J]. *Biol Psychiatry*, 2021, 89(8): 745-756.
 - [6] Canter RG, Penney J, Tsai LH. The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2016, 539(7628): 187-196.
 - [7] Dong Y, Li X, Cheng J, *et al.* Drug development for Alzheimer's disease: microglia induced neuroinflammation as a target?[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3): 558 [2021-06-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30696107/>. DOI:10.3390/ijms20030558.
 - [8] Bäck M, Dahlén SE, Drazen JM, *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIV: leukotriene receptor nomenclature, distribution, and pathophysiological functions [J]. *Pharmacol Rev*, 2011, 63: 539-584.
 - [9] Ghosh A, Chen F, Thakur A, *et al.* Cysteinyl leukotrienes and their receptors: emerging therapeutic targets in central nervous system disorders [J/OL]. *CNS Neurosci Ther*, 2016, 22(12): 943-951 [2021-06-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27542570/>. DOI:10.1111/cns.12596.
 - [10] Saad MA, Abdelsalam RM, Kenawy SA. Montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist protects against hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in rats attia AS [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(1): 139-150.
 - [11] Qian XD, Wei EQ, Zhang L, *et al.* Pranlukast, a cysteinyl leukotriene receptor 1 antagonist, protects mice against brain cold injury [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 549(1-3): 35-40.
 - [12] Wang L, Du C, Lv J, *et al.* Antiasthmatic drugs targeting the cysteinyl leukotriene receptor 1 alleviate central nervous system inflammatory cell infiltration and pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Immunol*, 2011, 187(5): 2336-2345.
 - [13] Wang XY, Tang SS, Hu M, *et al.* Leukotriene D4 induces amyloid- β generation via CysLT₁R-mediated NF- κ B pathways in primary neurons [J]. *Neurochem Int*, 2013, 62(3): 340-347.
 - [14] Tang SS, Wang XY, Hong H, *et al.* Leukotriene D4 induces cognitive impairment through enhancement of CysLT₁R-mediated amyloid-beta generation in mice [J]. *Neuropharmacology*, 2013, 65: 182-192.
 - [15] Tang SS, Ji MJ, Chen L, *et al.* Protective effect of pranlukast on A β_{1-42} -induced cognitive deficits associated with downregulation of cysteinyl leukotriene receptor 1 [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2014, 17(4): 581-592.
 - [16] Zhang CT, Lin JR, Wu F, *et al.* Montelukast ameliorates streptozotocin-induced cognitive impairment and neurotoxicity in mice [J]. *Neurotoxicology*, 2016, 57: 214-222.
 - [17] Chen F, Fang S, Du Y, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated CysLT₁R deletion reverses synaptic failure, amyloidosis and cognitive impairment in APP/PS1 mice [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(5): 6634-6661.
 - [18] Na JY, Song K, Lee JW, *et al.* 6-Shogaol has anti-amyloidogenic activity and ameliorates Alzheimer's disease via CysLT₁R-mediated inhibition of cathepsin B[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477(1): 96-102.
 - [19] Singh RK, Gupta S, Dastidar S, *et al.* Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics [J]. *Pharmacology*, 2010, 85(6): 336-349.
 - [20] Pavlos NJ, Friedman PA. GPCR signaling and trafficking: the long and short of it [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(3): 213-226.
 - [21] Nielsen CK, Campbell JI, Ohd JF, *et al.* A novel localization of the G-protein-coupled CysLT₁ receptor in the nucleus of colorectal adenocarcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(3): 732-742.
 - [22] Chen CH, Zhou W, Liu S, *et al.* Increased NF- κ B signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2012, 15(1): 77-90.
 - [23] Hampel H, Vassar R, De Strooper B, *et al.* The beta-secretase BACE1 in Alzheimer's disease [J]. *Biol Psychiatry*, 2021, 89(8): 745-756.
 - [24] Blanco A, Alvarez S, Fresno M, *et al.* Amyloid- β induces cyclooxygenase-2 and PGE2 release in human astrocytes in NF- κ B dependent manner [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 22(2): 493-505.
 - [25] González-Reyes RE, Nava-Mesa MO, Vargas-Sánchez K, *et al.* Involvement of astrocytes in Alzheimer's disease from a neuroinflammatory and oxidative stress perspective [J/OL]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 427 [2021-06-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29311817/>. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00427.

Regulation of cysteinyl leukotriene receptor 1 on amyloid β -protein production in APP/PS1 mouse primary neurons and mechanism

LONG Yan, KE Xuan, HONG Hao

(Department of Pharmacology, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the effect of cysteinyl leukotriene receptor 1 (CysLT₁R) on amyloid β -protein (A β) production in APP^{swe}/PS1 Δ E9 double transgenic (APP/PS1) mouse primary cortical neurons and the underlying mechanism. **METHODS** ① The lentivirus-EGFP (LV-EGFP) vector and lentivirus-CysLT₁R-EGFP (LV-CysLT₁R-EGFP) vector were constructed and transfected into primary cortical neurons from APP/PS1 mice. The neurons over expressing CysLT₁R (CysLT₁R-OE) after transfection with LV-CysLT₁R-EGFP were referred to as CysLT₁R-OE neurons, and the expression of CysLT₁R protein was detected by Western blotting. ② After the CysLT₁R-OE neurons were treated with 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of CysLT₁R agonist YM17690 alone or in combination with 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of CysLT₁R antagonist pranlukast (Pran) for 12 h, the secretory levels of A β_{1-40} and A β_{1-42} were detected by ELISA and the expressions of amyloid precursor protein (APP), β -site of amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1), presenilin-1 (PS1) and PS2 were determined by Western blotting. After the CysLT₁R-OE neurons were treated with YM17690 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ alone or in combination with Pran 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 2 h, the subcellular distribution of CysLT₁R and NF- κ B P65 subunit was determined by Western blotting. ③ To competitively inhibit the nuclear translocation of CysLT₁R, 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of nuclear localization sequence peptide (NLS-pep) or 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of none-nuclear localization sequence peptide (NON-pep) was delivered into CysLT₁R-OE neurons that were immediately treated with YM17690 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 12 h. The levels of A β_{1-40} and A β_{1-42} in culture medium and the expressions of APP and BACE1 in cytoplasm were detected by Western blotting. After the delivery of NLS-pep or NON-pep, the CysLT₁R-OE neurons were treated with YM17690 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 2 h, and the distribution of CysLT₁R and NF- κ B P65 subunit was observed by Western blotting. **RESULTS** ① The expression of CysLT₁R in the CysLT₁R-OE group was significantly increased ($P<0.01$). ② Compared with the CysLT₁R-OE group, the secretion of A β_{1-40} and A β_{1-42} was significantly promoted ($P<0.05$), the expression of BACE1 was significantly up-regulated ($P<0.05$), the nuclear translocation of CysLT₁R and NF- κ B P65 subunit was induced ($P<0.05$) and the expressions of APP, PS1 and PS2 remained unaltered in neurons of the CysLT₁R-OE + YM17690 group. YM17690 combined with Pran (CysLT₁R-OE + YM17690 + Pran group) could counteract the above changes caused by YM17690 alone (CysLT₁R-OE + YM17690 group). ③ Compared with the CysLT₁R-OE + YM17690 group, the nuclear translocation of CysLT₁R and NF- κ B P65 subunit was blocked ($P<0.05$), the secretion of A β_{1-40} and A β_{1-42} was significantly decreased ($P<0.05$), the expression of BACE1 was significantly down-regulated ($P<0.05$), and the expression of APP was unaltered in neurons of the CysLT₁R-OE + NLS-pep + YM17690 group. **CONCLUSION** Activation of CysLT₁R promotes A β production by up-regulating the expression of BACE1, which is mediated by the nuclear translocation of the receptor and activation of NF- κ B signals.

Key words: cysteinyl leukotriene receptor 1; amyloid β -protein; NF- κ B P65; nuclear localization sequence; nuclear translocation

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81573413)

Corresponding author: HONG Hao, E-mail: honghao@cpu.edu.cn

(收稿日期: 2021-07-14 接受日期: 2021-12-26)

(本文编辑: 赵楠)