

CRM-2102 对冈田酸诱导 SH-SY5Y 细胞 tau 蛋白磷酸化的影响

摘 要

目的 研究 CRM-2102 对冈田酸 (OA) 诱导 tau 蛋白磷酸化的影响。**方法** 体外培养 SH-SY5Y 细胞, 用不同浓度(0.1-10 μ mol/L)的含药培养基处理细胞 24 h, 再用 40 nmol/L OA 处理细胞 24 h, 收集细胞, 采用 Western Blot 测定各组细胞 p-tau^{Ser396} 水平。**结果:** 与阴性对照组相比, 1、3、10 μ mol/L CRM-2102 组细胞 p-tau^{Ser396} 水平显著下降 ($P<0.05$), 0.1、0.3 μ M CRM-2102 组细胞 p-tau^{Ser396} 水平下降, 但无显著性差异 ($P>0.05$)。**结论:** 1-10 μ mol/L CRM-2102 能抑制 OA 诱导的细胞 tau 蛋白磷酸化。

一、试验目的

观察不同浓度的 CRM-2102 对冈田酸诱导 SH-SY5Y 细胞 tau 蛋白磷酸化的影响。

二、受试药物

1. 药物名称: CRM-2102

(1) 提供单位: 南京中瑞生物药业有限公司

(2) 批号: 20210510

(3) 含量: $>98.5\%$

(4) 溶媒: DMSO

(5) 分子量: 229.23

(6) 配制方法：用 DMSO 将 CRM-2102 配制成 $1.0 \times 10^5 \mu\text{mol/L}$ 母液，再用培养基稀释成不同浓度的含药培养基。

三、实验细胞

人神经母瘤细胞 (SH-SY5Y) (中科院上海细胞库, 批号: 15227J08)。

四、主要试剂与仪器

主要试剂：冈田酸 (GLPBIO, 批号: GC16958)；DMEM: F12 培养基 (维森特生物技术有限公司, 批号: 319075026)；胎牛血清 (FBS) (GIBCO 南美胎牛血清, 批号: 2158738P)；青霉素-链霉素混合溶液 (Genviue, 批号: 84020101100)；胰酶 (南京伟沃生物科技有限公司, 批号: 011122220307)；PBS (南京百斯凯生物科技有限公司, 批号: SP2008380954)；BCA 蛋白定量试剂盒 (碧云天生物科技有限公司)；Prestained Protein Marker (碧云天生物科技有限公司)； β -Actin Rabbit mAb (GLPBIO)；Rabbit polyclonal to Tau^{Ser396} (Invitrogen)；HRP Conj. Goat Anti-Rabbit IgG (华安生物科技有限公司)；全蛋白提取试剂盒 (Solarbio)；ECL (天能科技有限公司)；PVDF 膜 (红荣微再生物工程技术有限公司)；丙烯酰胺 (生工生物工程有限公司)；十二烷基硫酸钠 (生工生物工程有限公司)；过硫酸胺 (生工生物工程有限公司)；四甲基乙二胺 (南京化学试剂股份有限公司)；甘氨酸 (生工生物工程有限公司)；三羟甲基氨基甲烷 (生工生物工程有限公司)； β -巯基乙醇 (β -Mercaptoethanol, β -ME)；吐温 20 (南京化学试剂股份有限公司)；脱脂奶粉 (翌圣生物科技股份有限公司)。

主要仪器：细胞刮刀（湖南比克曼生物科技有限公司）；XPR-2 微量天平（梅特勒-托利多）；Multiskan FC 型酶标仪（赛默飞世尔仪器有限公司）；XD-202 型倒置生物显微镜（南京江南永新光学有限公司）；Tanon4200 型化学发光成像分析系统（天能科技有限公司）；TGL-16 低温高速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；DYY-6C 型电泳仪电源、DYCP-40A 型转移电泳槽、DYCP-28D 夹芯垂直槽（北京市六一仪器公司）。

五、药物的配制

1. OA（分子量：805）溶液的配制

（1）OA 母液配制（ $1.0 \times 10^3 \mu\text{mol/L}$ ； 0.807 mg/mL ）：称取 $25 \mu\text{g}$ OA，溶于 $31 \mu\text{L}$ DMSO 中，即得浓度为 $1.0 \times 10^3 \mu\text{mol/L}$ 的母液， 4°C 储存备用。

（2）OA 工作溶液配制（ $1 \mu\text{mol/L}$ ； $0.807 \mu\text{g/mL}$ ）：取 $10 \mu\text{L}$ OA 母液，加入 $990 \mu\text{L}$ 培养基中，稀释成 1 mL 浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 OA 溶液。取 $100 \mu\text{L}$ 浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 OA 溶液，加入 $900 \mu\text{L}$ 培养基中，稀释成 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 OA 溶液，备用。

2. CRM-2102 溶液配制

（1）母液配制：称取 CRM-2102 化合物 2.000 mg ，溶于 $87 \mu\text{L}$ DMSO 中，配置成体积为 $87 \mu\text{L}$ 、浓度为 $1.0 \times 10^5 \mu\text{mol/L}$ 的母液备用。

（2） $10 \mu\text{mol/L}$ （ 2.299 mg/L ）含药培养基配制：取母液 $10 \mu\text{L}$ ，加入 $990 \mu\text{L}$ 培养基，稀释成体积为 $1000 \mu\text{L}$ 、浓度为 $1.0 \times 10^3 \mu\text{mol/L}$ 的 CRM-2102 溶液。取 $40 \mu\text{L}$ 浓度为 $1.0 \times 10^3 \mu\text{mol/L}$ 的 CRM-2102 药，加入 $3960 \mu\text{L}$ 培养基稀释成体积为 4 mL 、浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 CRM-2102 溶液。

(3) 3 $\mu\text{mol/L}$ (0.690 mg/L) 含药培养基配制：取 900 μL 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CRM-2102 溶液，加入 2100 μL 培养基稀释成体积为 3 mL、浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ 的 CRM-2102 溶液。

(4) 1 $\mu\text{mol/L}$ (0.230 mg/L) 含药培养基配制：取 200 μL 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CRM-2102 药，加入 1800 μL 培养基稀释成体积为 2 mL、浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 CRM-2102 溶液。

(5) 0.3 $\mu\text{mol/L}$ (0.069 mg/L) 含药培养基配制：取 200 μL 浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ 的 CRM-2102 药，加入 1800 μL 培养基稀释成体积为 2 mL、浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 的 CRM-2102 溶液。

(6) 0.1 $\mu\text{mol/L}$ (0.023 mg/L) 含药培养基配制：取 200 μL 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 CRM-2102 药，加入 1800 μL 培养基稀释成体积为 2 mL、浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 CRM-2102 溶液。

六、实验主要步骤

1、SH-SY5Y 细胞培养、传代

将 SH-SY5Y 细胞以 1×10^5 个/mL 的细胞悬液接种于 25 cm^2 的细胞培养瓶中，用含 10% 的特级牛胎血清 (FBS) 及双抗 (青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL) 的 DMEM 培养基于 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度的条件下进行常规培养。当细胞铺满培养瓶 90% 时 (两天左右)，倒出培养液，用 PBS 洗涤 3 次，加入 1 mL 0.25% 胰酶溶液消化 30 s，随后加入含血清的培养基终止消化，吸入离心管，1000 r/min 离心 5 min，2 mL 培养液重悬细胞，吹打均匀，每个 25 cm^2 的细胞瓶中加入 1 mL 细胞悬液，再添加 1 mL 正常培

培养基后放入 CO₂ 培养箱中进行培养。

2、剂量设置

(1) CRM-2102 浓度: 0.1 μmol/L、0.3 μmol/L、1.0 μmol/L、3.0 μmol/L、10 μmol/L

3、分组与给药

(1) CRM-2102 分组

取 SH-SY5Y 细胞, 制备细胞悬液 (细胞密度=1×10⁵ 个/mL), 取细胞悬液 1 mL 接种每瓶中, 共接种 14 瓶, 分为 7 组, 每组 2 瓶细胞, 培养 24 小时后各组细胞处理方法如下:

① 正常对照组: 吸弃原培养基, 每瓶加入 960 μL 正常培养基, 孵育 24 h 后, 加入 40 μL 正常培养基, 继续培养 24 h。

② 阴性对照组: 吸弃原培养基, 每瓶加入 960 μL 培养基, 孵育 24 h 后, 每瓶加入 40 μL 浓度为 1 μmol/L OA 的培养基溶液 (OA 终浓度为 40 nmol/L), 继续培养 24 h。

③ ~⑦ CRM-2102 给药组: 吸弃原培养基, 每瓶分别加入 960 μL 浓度为 0.1、0.3、1.0、3.0、10 μmol/L CRM-2102 的含药培养基, 孵育 24 h 后, 每瓶加入 40 μL 浓度为 1 μmol/L OA 的培养基溶液 (OA 终浓度为 40 nmol/L), 继续培养 24 h。

4、Western Blot 检测细胞 tau 蛋白磷酸化水平

(1) 收集细胞蛋白

倒出培养液, 每瓶使用 2 mL 0.01 mol/L PBS 洗涤细胞, 每瓶加入 300 μL 细胞裂解液, 静置 30s 后用细胞刮刀刮下细胞, 收集瓶中细胞裂解液于

Eppendorf 管中,置于冰中裂解 30 min。低温离心(4°C, 12000 r/min)15 min,收集上清移至 Eppendorf 管中,标记好保存于-80°C。

(2) BCA 蛋白定量: 将蛋白标准液(BSA, 50 mg/ml)稀释成 0.25~5 µg/µL 系列浓度标准溶液(C₁~C₆), 加入 BCA 工作液, 37°C放置 30 分钟, 于波长 562 nm 处测定 OD 值, 绘制标准曲线 ($OD = 0.1562C + 0.0411, R^2 = 0.9996$)。

(3) Western Blot

制备电泳凝胶, 上样(15 µl, 12 µg), 电泳(80 V, 40 min; 120 V, 60 min), 转膜(100 V, 90 min), 封闭(5%脱脂牛奶, 摇荡 2 h), 一抗孵育液(p-tau^{Ser396} 抗体 1: 1000, β-actin 抗体 1: 3000), 二抗孵育(1:3000), 显色。

七、统计学处理

采用Image J软件采集目标蛋白与内参蛋白灰度值。采用GraphPad Prism 9 软件进行分析, 所有数据均用均值±标准误($\bar{x} \pm SEM$)表示。数据比较采用单因素方差(One Way ANOVA)分析。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有极显著性差异, $P > 0.05$ 表示无显著性差异。

八、实验结果

1、Western Blot 检测 SH-SY5Y 细胞内 tau 蛋白磷酸化水平结果

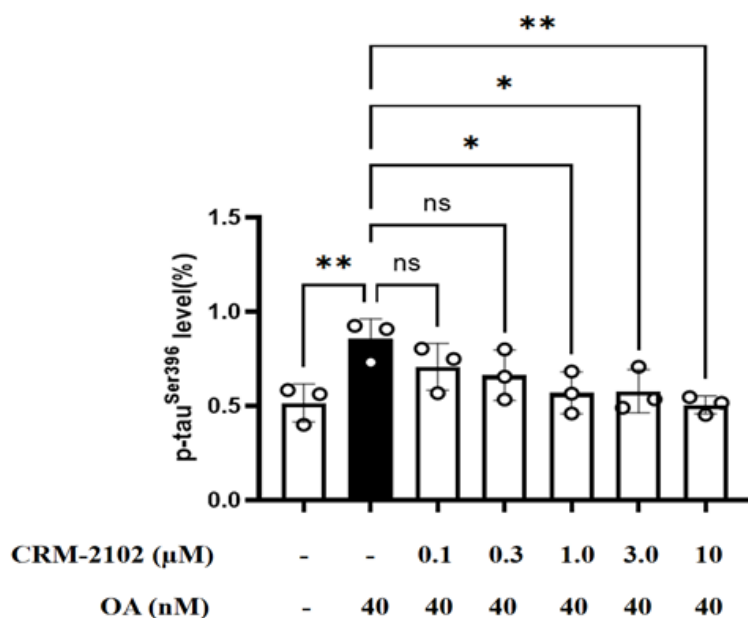
与阴性对照组相比, 浓度为 1、3、10 µmol/L CRM-2102 给药组细胞 p-tau^{Ser396} 的含量显著减少, 有统计学差异 ($P < 0.05$), 浓度为 0.1、0.3 µmol/L CRM-2102 给药组细胞 p-tau^{Ser396} 的含量下降, 但无统计学差异 ($P > 0.05$), 结果见表 1 和图 1。

表1.CRM-2102对OA诱导的SH-SY5Y细胞p-tau^{Ser396}的影响($\bar{x} \pm \text{SEM}$, n=3)

实验组别		p-tau ^{Ser396} level(%)
正常对照组		0.450±0.021**
OA 造模组(阴性对照)		0.855±0.023
CRM-2102 (μmol/L)	0.1	0.761±0.008
	0.3	0.663±0.027
	1.0	0.557±0.013*
	3.0	0.578±0.025*
	10	0.522±0.016**

*P<0.05, 与阴性对照组相比; **P<0.01, 与阴性对照组相比 (n=3)。

图1: CRM-2102 对OA诱导的SH-SY5Y细胞p-tau^{Ser396}的影响



*P<0.05, 与阴性对照组相比; **P<0.01, 与阴性对照组相比 (n=3)。

九、结论

1-10 μmol/L CRM-2102 能抑制冈田酸 (OA) 诱导的 tau 蛋白磷酸化。