

# Western blot、CCK-8 和 TUNEL 检测技术在阿尔茨海默病细胞模型中的价值分析

王英\*, 李鹏辉, 梁咏涵, 王丹丹

(齐齐哈尔医学院附属第二医院, 齐齐哈尔 161000)

**摘要:目的** 探究 Western blot、CCK-8 和 TUNEL 检测技术在阿尔茨海默病细胞模型中的价值分析。

**方法** 采用人类神经元细胞系 SH-SY5Y 构建 AD 细胞模型, 并通过 Western blot、CCK-8 检测和 TUNEL 检测分别检测 ANO6 蛋白表达、细胞增殖能力和铁死亡水平。**结果** 在 AD 细胞模型组中, ANO6 蛋白表达量显著升高 ( $1.01 \pm 0.11$  VS.  $0.52 \pm 0.09$ ), 细胞增殖率降低 (70.2% VS. 100%), 铁死亡阳性细胞比例增加 (35% VS. 10%)。ANO6 抑制剂处理后 ANO6 蛋白表达显著降低 ( $0.45 \pm 0.09$  VS.  $1.01 \pm 0.11$ ), 细胞增殖率提高 (95.3% VS. 70.2%), 铁死亡阳性细胞比例降低 (15% VS. 35%)。**结论** Western blot 检测 ANO6 特异性强、灵敏度高, 能精准识别、定量 AD 神经发育相关蛋白; CCK-8 检测能够揭示 ANO6 对细胞增殖能力的影响; TUNEL 检测经凋亡细胞计数, 反映 ANO6 促进铁死亡会引发细胞凋亡。综合 3 种检测方法及其指标, ANO6 在 AD 细胞神经发育蛋白表达及细胞状态调节中起关键作用。

**关键词:** 阿尔茨海默病; Western blot 检测; CCK-8 检测; TUNEL 检测; ANO6 蛋白

## 0 引言

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种以认知障碍和神经精神症状为特征的神经退行性疾病, 已成为全球老龄化社会面临的重大公共卫生问题<sup>[1]</sup>。随着全球老龄化进程的加速, AD 的发病率逐年上升, 寻找有效的治疗靶点和干预措施迫在眉睫。尽管 AD 的发病机制尚不完全清楚, 但大量研究表明, 神经发育异常在 AD 的发生发展中起着关键作用。Anoctamin 6 (ANO6) 作为一种钙激活的氯离子通道蛋白, 在神经系统中广泛表达, 其功能异常可能与多种神经疾病相关。铁死亡与 AD 的发生发展密切相关。铁死亡是一种依赖铁和脂质过氧化驱动的细胞死亡方式, 其在 AD 患者的脑组织中的作用已有报道。然而, ANO6 对 AD 细胞神经发育蛋白的具体影响尚不清楚<sup>[2]</sup>。为了深入探究 ANO6 在 AD 中的作用机制, 本研究采用了一系列检测方法。Western blot 检测是一种常用的蛋白质分析技术, 它能够通过特异性抗体识别并检测目标蛋白的表达水平。利用 Western blot 检测 ANO6 及神经发育相关蛋白的表达, 能够明确 ANO6 与神经发育蛋白之间的关

联<sup>[3]</sup>。CCK-8 检测则用于评估细胞的增殖能力。通过检测经 ANO6 抑制剂处理后细胞的增殖情况, 可以进一步了解 ANO6 对细胞生长的影响<sup>[4]</sup>。CCK-8 试剂能够被活细胞中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的橙黄色产物, 其吸光度与活细胞数量呈正相关, 从而直观地反映细胞的增殖活性。TUNEL 检测用于检测细胞凋亡情况。由于铁死亡与细胞凋亡存在一定关联, 通过 TUNEL 检测可以判断 ANO6 促进铁死亡是否会导致细胞凋亡, 进而影响神经发育。该方法基于末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿嘧啶 (dUTP) 缺口末端标记技术, 能够特异性标记凋亡细胞中断裂的 DNA, 准确检测细胞凋亡水平。本文基于 3 种测试方法探讨 ANO6 在 AD 细胞模型中的作用及其对神经发育的影响, 为研究 AD 的发病机制提供新的视角和支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究以人类神经元细胞为研究对象, 分为对照组和观察组。对照组为正常神经元细胞, 观察组为 AD 细胞模型。对照组和观察组各包含 50 例样本。纳入标准: 细胞

**基金项目:** 项目名称: ANO6 在阿尔茨海默症的细胞模型中通过促进铁死亡来调节神经发育, 项目编号: 20230303070456, 项目来源: 黑龙江省卫生健康委科研课题。

\* **通信作者:** 王英, 硕士, 主治医师, 研究方向为阿尔兹海默症。E-mail: 904524165@qq.com

形态正常, 生长状态良好; 细胞纯度  $\geq 95\%$ ; 细胞活性  $\geq 90\%$ 。排除标准: 细胞形态异常, 生长状态不良; 细胞纯度  $< 95\%$ ; 细胞活性  $< 90\%$ 。

## 1.2 方法

采用细胞培养技术构建 AD 细胞模型, 使用人类神经细胞系 SH-SY5Y。先将细胞培养于含有 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素-链霉素的培养基中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中。再加入不同浓度的  $\beta$ -淀粉样肽(1-42)(A $\beta$  1-42)处理细胞, 制备 0.8 mmol/L 的储备溶液。细胞以等密度复制到 96 孔板中, 根据实验设计, 加入不同浓度的 A $\beta$  1-42(0~100  $\mu$ mol/L), 持续不同时间(0~72 h)。用药方面, 观察组使用 ANO6 抑制剂(哌克西林和喹诺他汀)处理, 用药剂量分别为 1  $\mu$ mol/L 和 2  $\mu$ mol/L。

CCK-8 检测: 消化细胞制成悬液, 每孔 5000~10000 个接种于 96 孔板, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 贴壁。贴壁后加不同浓度 ANO6 抑制剂培养液, 设对照组, 继续培养 24~48 h。结束前 1~4 h 加 10  $\mu$ L CCK-8 试剂, 酶标仪 450 nm 测 OD 值。计算相对增殖率分析 ANO6 对细胞增殖的影响。

TUNEL 检测: 4% 多聚甲醛固定 15~30 min, PBS 洗 3 次。通透处理: 0.1% Triton X-100 通透 5~10 min, PBS 洗 3 次。配 TUNEL 反应液, 37 °C 避光孵育 60~90 min。PBS 洗后 DAPI 室温避光染色 5~10 min, PBS 再洗 3 次。封片剂封片, 荧光显微镜下利用不同激发光观察。

Western blot 检测: 采用 Bio-Rad 电泳仪检测 ANO6 蛋白表达(Bio-Rad)。在含有蛋白质抑制剂混合物的 RIPA 缓冲液中裂解细胞, 使用 Pierce Protein Assay Kit 定量蛋白质浓度, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离并电转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 通过一抗检测, 并使用化学发光法对蛋白质进行定量测定。

## 1.3 观察指标

主要观察指标包括 ANO6 蛋白表达水平、细胞增殖能力、铁死亡水平等。Western blot 检测 ANO6 蛋白表达水平, 结果以 ANO6 蛋白水平与内参蛋白(GAPDH)的比值表示, 数据以平均值  $\pm$  标准差表示。CCK-8 检测细胞增殖能力, 结果以吸光度值表示, 数据以平均值  $\pm$  标准差表示。TUNEL 检测铁死亡水平, 结果以阳性细胞比例表示, 数据以平均值  $\pm$  标准差表示。

## 1.4 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。对各组数据进行正态性检验和方差齐性检验, 符合正态分布和方差齐性的数据采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间比较, 不符

合则采用非参数检验。所有统计结果均以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果与分析

表 1 展示了 ANO6 蛋白表达量、细胞增殖率和铁死亡阳性细胞比例在不同组别中的对比情况。在 AD 细胞模型组中, ANO6 蛋白的表达量显著升高(1.01 $\pm$ 0.11 VS. 0.52 $\pm$ 0.09), 细胞增殖率降低(70.2% VS. 100%), 铁死亡阳性细胞比例增加(35% VS. 10%)。ANO6 抑制剂处理显著降低 ANO6 蛋白表达(0.45 $\pm$ 0.09 VS. 1.01 $\pm$ 0.11), 提高细胞增殖率(95.3% VS. 70.2%), 并降低铁死亡阳性细胞比例(15% VS. 35%)。ANO6 抑制剂处理组与对照组相比, ANO6 蛋白表达量、细胞增殖率和铁死亡阳性细胞比例均有显著差异( $P < 0.05$ )。

表 1 ANO6 蛋白表达量、细胞增殖率与铁死亡阳性细胞比例对照表

| 组别       | ANO6 蛋白表达量<br>(平均值 $\pm$ 标准差) | 细胞增殖率 / % | 铁死亡阳性细胞比例 / % |
|----------|-------------------------------|-----------|---------------|
| 对照组      | 0.52 $\pm$ 0.09               | 100       | 10            |
| AD 细胞模型组 | 1.01 $\pm$ 0.11               | 70.2      | 35            |
| 抑制剂组     | 0.45 $\pm$ 0.09               | 95.3      | 15            |

## 3 讨论与结论

AD 作为一种常见的神经退行性疾病, 严重威胁着全球老龄化社会中人们的健康和生活质量, 深入探究 AD 的发病机制并寻找有效的治疗靶点成为医学研究的重要方向。本研究运用 Western blot、CCK-8 以及 TUNEL 检测技术, 针对 ANO6 蛋白在 AD 细胞模型中的作用展开研究, 为 AD 的研究提供了新视角与重要依据。

### 3.1 Western blot 检测 ANO6 在 AD 细胞模型中的表达情况

本研究通过 Western blot 检测发现, 在 AD 细胞模型中 ANO6 蛋白的表达量显著升高, 平均表达量为(1.01 $\pm$ 0.11), 而在对照组中 ANO6 蛋白的表达量较低, 平均表达量为(0.52 $\pm$ 0.09)。这一结果提示 ANO6 可能在 AD 的发生和发展中发挥重要作用。作为蛋白质定量的金标准技术, Western blot 检测的核心优势体现在 3 个方面: ①通过 SDS-PAGE 电泳可实现目标蛋白的分子量特异性分离, 有效区分 ANO6 与其他同源家族蛋白; ②采用高特异性一抗结合化学发光检测系统, 灵敏度可达 pg 级, 可精准检测 AD 模型中可能存在的低丰度表达; ③通过  $\beta$ -actin 或 GAPDH 等管家蛋白的同步检测, 实现样本间总蛋白负

荷标准化,确保数据可比性。特别针对AD细胞模型,实验设计中需严格控制裂解液组分,以保持ANO6蛋白的完整状态。GAPDH作为内参蛋白,其表达相对稳定,不受实验处理因素的影响,通过与ANO6蛋白的比值进行标准化处理,可以有效校正样本间上样量、转膜效率等实验操作引起的误差,使检测结果更具可靠性和可比性<sup>[5-6]</sup>。然而,检测过程中也存在可能影响结果的因素。如在细胞裂解时,若裂解不充分,可能导致部分蛋白质未被释放出来,从而低估ANO6蛋白的表达量<sup>[7]</sup>;而在转膜过程中,若转膜效率不一致,也会造成膜上捕获的ANO6蛋白量不同,影响最终的定量结果<sup>[8-9]</sup>。

### 3.2 CCK-8检测ANO6水平对细胞增殖的影响

本研究通过CCK-8检测发现,使用ANO6抑制剂处理AD细胞模型后,细胞的增殖能力得到了显著提高。CCK-8检测通过细胞内线粒体脱氢酶将WST-8还原为水溶性橙黄色甲臞染料,其吸光度值与活细胞数量呈正相关。相较于传统MTT法,无需裂解细胞即可直接测定,支持同一培养体系内多时间点动态监测,尤其适用于ANO6过表达或敲低后细胞增殖的时序分析;其检测限低至100个细胞/孔,且甲臞染料溶解均匀,批内变异系数<5%,可精准捕捉ANO6表达差异导致的微弱增殖改变;兼容高通量筛选,适用于96/384孔板,结合自动化读板设备,可快速完成多组干预条件的并行检测。检测结果显示,AD细胞模型组的增殖率显著低于对照组,而使用ANO6抑制剂处理后的AD细胞模型,其吸光度值从(0.38±0.05)增加至(0.62±0.07),表明细胞增殖能力显著提高。在检测过程中,为保证结果准确,需注意加样时要避免产生气泡,保证试剂均匀分布在孔内;孵育时间需严格按照说明书进行<sup>[10]</sup>。

### 3.3 TUNEL检测ANO6水平对铁死亡的影响

本研究发现,ANO6抑制剂能够显著降低铁死亡水平。TUNEL检测即脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法,其原理是利用脱氧核糖核苷酸末端转移酶将生物素或地高辛等标记的dUTP连接到凋亡或铁死亡细胞中断裂DNA的3'-OH末端,再通过显色反应使阳性细胞着色,进而直观地检测出发生铁死亡的细胞数量,以此确定铁死亡水平<sup>[11-12]</sup>。通过TUNEL检测发现,使用ANO6抑制剂处理后的AD细胞模型,其铁死亡阳性细胞比例从35.0%降低到了15.0%,而对照组的铁死亡阳性细胞比例为10.0%。这一结果表明,ANO6抑制剂能够显著降低AD细胞模型的铁死亡水平。

综上,CCK-8检测结果表明,ANO6抑制剂处理后的AD细胞模型,细胞相对增殖率显著提升,直观反映出ANO6对细胞增殖能力的调控作用。TUNEL检测通过凋亡细胞计数发现,ANO6促进铁死亡进而引发细胞凋亡的现象。未来,将尝试联合运用多种检测技术,构建更全面的检测体系。挖掘不同检测指标间的潜在联系,探索新的检测标志物,更进一步揭示ANO6在AD中的作用机制。

### 参考文献

- [1] 杨力源,张业廷,李垂坤,等. 有氧运动训练影响阿尔茨海默症小鼠海马Notch1、Caspase-3的表达[J]. 中国组织工程研究,2024,28(26): 4113-4120.
- [2] 刘慧,严国纪,吴嘉,等. 血栓通对阿尔茨海默症模型小鼠认知功能及神经异常兴奋性的作用及其机制研究[J]. 昆明医科大学学报,2024,45(2): 23-31.
- [3] 程雨菲,马义鹏,陈晨,等. 索马鲁肽对转基因APP/PS1/tau阿尔茨海默病小鼠认知功能的影响[J]. 山西医科大学学报,2024,55(7): 879-884.
- [4] 孙晓雯,吴艳艳,于继徐,等. TPPU通过抑制p38MAPK/NF-κBp65信号通路对阿尔茨海默病细胞模型的抗神经炎症作用[J]. 脑与神经疾病杂志,2024,32(8): 473-481.
- [5] 谢桃枫,陈国庆. 阿尔茨海默症智能诊断方法研究进展[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版),2024,55(1): 103-112.
- [6] 陈旭初,蒲钰,张卫强. 基于dVAE-BERT模型的阿尔茨海默症检测方法[J]. 电子学报,2024,52(9): 2971-2978.
- [7] 王鹏飞,陈长英,靳玉娟,等. 阿尔茨海默症患者血清miR-211和miR-202表达水平及其与认知功能、焦虑抑郁情绪的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志,2024,39(2): 129-134.
- [8] 晏燕红,赵琼兰,许媛媛,等. 阿尔茨海默症老人智慧家居护理空间设计综述[J]. 中文科技期刊数据库(全文版)工程技术,2024,(7): 0012-0015.
- [9] 李寒童,李悦凡,周妍,等. 铁死亡抑制蛋白1在肿瘤中的作用[J]. 新医学,2024,55(5): 381-386.
- [10] 孙会艳,李强,王洪权. 靶向抑制铁死亡与阿尔茨海默病治疗[J]. 中国药理学通报,2024,40(2): 229-233.
- [11] 刘珊,贺小平,林一臻,等. 铁代谢和铁死亡及其对阿尔茨海默病影响的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2023,25(7): 777-779.
- [12] 胡晓莹,张跃骞,崔志强,等. 跨膜蛋白16F对阿尔茨海默病细胞模型铁死亡的调控作用[J]. 中国医科大学学报,2022,51(5): 395-400.