

• 研究论文 •

管花苷 B 抑制 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维化并降低其细胞毒性的研究

张 迪, 张娟利, 文爱东*, 王婧雯*

(空军军医大学第一附属医院药剂科, 陕西 西安 710032)

摘要: 本文旨在探讨管花苷 B (tubuloside B, Tub B) 对 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, $A\beta$) 纤维化的抑制作用及潜在作用机制。采用体外孵育 $A\beta_{1-42}$ 建立蛋白质淀粉样纤维化模型, 利用硫黄素-T (thioflavin T, ThT)、刚果红 (Congo red, CR)、8-苯胺-1-萘磺酸 (8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid, ANS) 染色和透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 考察 Tub B 对 $A\beta_{1-42}$ 纤维形成的抑制作用; 圆二色谱 (circular dichroism, CD) 分析 Tub B 对 $A\beta_{1-42}$ 二级结构的影响; 3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑蓝 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT] 和红细胞溶血实验研究 Tub B 对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的细胞毒性的抑制作用; 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 染色检测 Tub B 对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量的影响; 以及利用分子对接实验研究 Tub B 与 $A\beta_{1-42}$ 分子相互作用。结果显示, Tub B 对 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维形成具有一定抑制作用, 可降低 $A\beta_{1-42}$ 二级结构中 α -螺旋结构向 β -折叠结构的转化, 减少疏水区域暴露, 减弱 $A\beta_{1-42}$ 引起的细胞毒性和红细胞溶血性, 降低细胞损伤。综上所述, Tub B 能够抑制蛋白质淀粉样纤维形成, 且这种抑制作用可能与其抗氧化活性及与蛋白质分子间的氢键和疏水作用力有关。本研究的动物实验经空军军医大学动物实验伦理委员会批准 (批准号: 20190051)。

关键词: 管花苷 B; 阿尔茨海默病; β -淀粉样蛋白; 纤维化; 抑制作用

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)01-0096-09

Tubuloside B inhibits $A\beta_{1-42}$ fibrillization and alleviates amyloid-induced cytotoxicity

ZHANG Di, ZHANG Juan-li, WEN Ai-dong*, WANG Jing-wen*

(Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: This study aimed to investigate the inhibitory effect of tubuloside B (Tub B) on amyloid β -protein ($A\beta$), and analyse the potential mechanism. A model of amyloid fibril was established by incubation of $A\beta_{1-42}$ *in vitro*. Thioflavin-T (ThT), Congo red (CR), 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) staining and transmission electron microscopy (TEM) were applied to detect the suppression of Tub B on the formation of $A\beta_{1-42}$ fibril. Circular dichroism (CD) was used to analyse the regulatory effect of Tub B on the secondary structure of $A\beta_{1-42}$. 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazole)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and red blood cell hemolysis experiments were used to investigate the attenuation of Tub B on $A\beta_{1-42}$ induced cytotoxicity. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) staining was used to assess the expression of intracellular reactive oxygen species (ROS) induced by $A\beta_{1-42}$. And molecular docking experiment was used to explore the interaction between Tub B and $A\beta_{1-42}$. The results indicated that Tub B could inhibit $A\beta_{1-42}$ fibrillization in a certain extent, which retarded the structural transition of α -helix to β -sheet of $A\beta_{1-42}$, hampered the exposure of hydrophobic regions, and attenuated amyloid-induced cytotoxicity and hemolysis. In summary, Tub B can prevent the formation of $A\beta_{1-42}$ amyloid fibril, which may be related to its antioxidant activity and hydrogen bonding and hydrophobic interactions with protein

收稿日期: 2024-06-04; 修回日期: 2024-09-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074321, 81602979).

*通讯作者 Tel: 86-29-84773636, E-mail: wangjingwen8021@163.com; adz0323@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0531

molecules. All animal experiments were approved by the Experimental Animal Research Center of Air Force Medical University (No. 20190051).

Key words: tubuloside B; Alzheimer's disease; amyloid β -protein; fibrillization; inhibition

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种原发性神经退行性疾病, 会导致患者认知功能障碍、记忆力丧失、语言失调及生活能力低下, 已成为严重威胁老年人健康的主要疾病之一^[1]。据统计, 现阶段我国 60 岁及以上人群中痴呆患者 1 507 万例, 其中 AD 患者 983 万例^[2]。随着我国人口老龄化进程加快, 预计 2050 年 AD 患者将超过 3 000 万^[3], 中国也成为全球 AD 患病人数最多、增长幅度最快的地区, 给患者、家庭、社会和医疗带来沉重负担^[1]。

β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 异常聚集形成斑块是 AD 主要致病因素^[4], 也是 AD 患者的标志性病变之一^[5]。累积的 A β 淀粉样原纤维可发展为老年斑, 引起神经毒性, 导致细胞凋亡、神经元丢失等^[6,7]。因此, 开发可抑制 A β 聚集和解聚 A β 聚集物的药物是治疗 AD 的潜在方法之一。

管花苷 B (tubuloside B, Tub B, 图 1), 分子式 C₃₁H₃₈O₁₆, 是中药肉苁蓉苯乙醇苷类化合物的主要成分之一^[8], 具有抗衰老、抗哮喘、抗氧化、保肝、抗炎等多重药理作用^[9-13]。研究发现, Tub B 具有显著的神经保护作用, 可通过抗氧化活性抑制 1-甲基-4-苯基吡啶诱导的 PC12 细胞损伤^[14], 拮抗 TNF- α 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡^[15], 表明其在预防和治疗 AD 方面具有一定潜力。然而对于 Tub B 是否可通过抑制蛋白质淀粉样纤维化发挥 AD 的治疗作用目前鲜有研究。因此, 本研究通过恒温孵育建立 A β_{1-42} 淀粉样纤维化体外模型, 研究 Tub B 与 A β_{1-42} 的相互作用, 探讨其可能的作用机制, 以期为 Tub B 的开发和临床应用奠定理论基础。

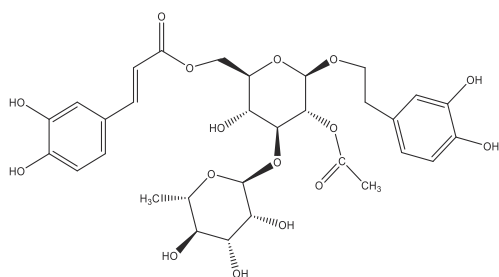


Figure 1 The chemical structure of tubuloside B (Tub B)

材料与方法

细胞 人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y 细胞) 购自美国 ATCC 细胞库。

实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只, 体质量

(200 ± 20) g, 由空军军医大学实验动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK (陕) 2019-001。所有大鼠均饲养于空军军医大学 SPF 级实验动物中心, 使用许可证号: SYXK (陕) 2019-001。饲养条件为室温 (22 ± 2) °C, 相对湿度 40%~70%, 12 h/12 h 明暗交替, 每笼 10 只。动物实验经空军军医大学动物实验伦理委员会批准, 批准号: 20190051。

药品与试剂 Tub B (B23222) 购自上海源叶生物科技有限公司; A β_{1-42} (PP69)、六氟异丙醇 (hexafluoroisopropanol, HFIP, 804515)、硫黄素 T (thioflavin T, ThT, T3516)、刚果红 (Congo red, CR, C6767)、8-苯胺-1-萘磺酸 (8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid, ANS, 10417)、3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑啉啶蓝 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT, 475989] 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (S0033) 购自碧云天生物技术有限公司。

仪器 F-2500 荧光分光光度计 (日本 Hitachi 公司); SPECORD 2000 紫外分光光度计 (德国 Analytik Jena 公司); JEM-1400 透射电子显微镜 (日本 JEOL 公司); Chirascan™ 圆二色谱仪 (英国 Applied Photophysics 公司); Bio-Rad 680 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); 5804R 低温冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Fluoview FV 1000 激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司)。

体外制备 A β_{1-42} 淀粉样纤维^[16] A β_{1-42} 具有较强疏水性, 存储过程极易聚集沉淀, 需预先利用 HFIP 打散已有聚集物。具体方法: 称取一定量 A β_{1-42} 溶于 HFIP 使其终浓度为 1 mg·mL⁻¹, 室温静置 2 h, 超声 30 min, 1.4 × 10⁴ r·min⁻¹ 离心 30 min, 除去已形成的聚集物, 取上清分装于 1.5 mL EP 管, -80 °C 冷冻, 冻干机冻干, -20 °C 储存。将冻存的 A β_{1-42} 溶于 20 mmol·L⁻¹ NaOH 溶液, 超声 2 min, 1.4 × 10⁴ r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液溶于含有 50 mmol·L⁻¹ PBS 和 100 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液 (pH 7.4), 使 A β_{1-42} 终浓度为 1 mmol·L⁻¹。将不同浓度的 Tub B 加入 A β_{1-42} 溶液, 保证 Tub B 终浓度为 0、50、100、150 μ mol·L⁻¹, 37 °C 恒温水浴孵育 24 h。孵育期间定时取样, 4 °C 密封保存。

ThT 荧光检测 取 A β_{1-42} 样品 30 μ L, 加入 1 mmol·L⁻¹ ThT 荧光染料 90 μ L, PBS 加至 9 mL, 混匀。荧光分光光度计检测, 检测条件为激发波长 440 nm,

发射波长 485 nm, 激发光和发射光狭缝均为 10 nm。

动力学曲线拟合 将 $A\beta_{1-42}$ 孵育过程中的孵育时间与相应的 ThT 荧光强度变化作图即可得纤维化动力学生长曲线。生长曲线可分为成核期、延伸期和平衡期^[17], 用 S-型曲线函数进行拟合^[18,19], 拟合公式如下:

$$Y = Y_0 + \frac{Y_{max} - Y_0}{1 + e^{-(t-t_{1/2})k}} \quad (1)$$

$$\text{Lag time} = t_{1/2} - \frac{2}{k} \quad (2)$$

其中 Y 为孵育 t h 的荧光强度, Y_0 和 Y_{max} 分别为孵育 0 h 和孵育达到稳定期时最大荧光强度, k 为动力学曲线常数; $t_{1/2}$ 为达到最大荧光强度一半时对应的孵育时间, lag time 为 $A\beta_{1-42}$ 聚集过程中的延滞时间。运用公式 (1) 和公式 (2) 对 ThT 荧光强度数据进行拟合, $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维的生长速率参数通过拟合后的动力学曲线获得。

CR 结合实验 取 $A\beta_{1-42}$ 样品 500 μL , 加 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CR 溶液至 9 mL, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。紫外分光光度计在 400~600 nm 波长范围内扫描。

ANS 荧光检测 取 $A\beta_{1-42}$ 样品 500 μL , 加 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ANS 荧光染料至 10 mL, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 30 min。荧光分光光度计检测, 检测条件为激发波长 380 nm, 扫描范围 400~600 nm, 激发光和发射光狭缝均为 10 nm。

圆二色谱 (circular dichroism, CD) 分析 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 稀释 $A\beta_{1-42}$ 样品至终浓度 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 取 500 μL 置于 1 mm 比色皿。圆二色谱仪检测, 检测条件为扫描波长 190~260 nm, 扫描速率 50 $\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$, 步长 0.3 nm, 响应时间 2 s。CDNN 软件分析 $A\beta_{1-42}$ 二级结构。

透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 检测 $A\beta_{1-42}$ 样品用 PBS 稀释至 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 取 15 μL 滴至铜网, 多余样品用滤纸吸掉, 静置 10 min。滴加 2% (w/v) 醋酸铀溶液 10 μL 染色 10 min, 待铜网干后, TEM 观察纤维形态并拍照 (电压 80 kV)。

细胞活性检测 SH-SY5Y 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养, 调整细胞浓度至每毫升 5×10^4 个, 定量接种于 96 孔板, 待贴壁并培养达 70% 以上融合度后, 将用无血清 RPMI1640 培养基稀释的 $A\beta_{1-42}$ 样品加至各孔使其终浓度为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 继续培养 24 h。每孔加入 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 溶液 30 μL , 孵育 4 h, 弃上清, 加入 150 μL DMSO 震动 15 min, 酶标仪于 570 nm 处测吸光度。

红细胞溶血实验 SD 大鼠眼眶取血, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离得红细胞沉淀, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 7.4 的 PBS 洗涤 3 次, 加 PBS 制成 1% 悬浮液。取 1% 红细

胞悬液 1 mL 与 $A\beta_{1-42}$ 样品 0.1 mL 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液用酶标仪于 540 nm 处测吸光度。

体外制备 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维 将冻存的 $A\beta_{1-42}$ 溶于 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液, 超声 2 min, 1.4×10^4 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取上清液溶于含有 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 和 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液 (pH 7.4), 使 $A\beta_{1-42}$ 终浓度为 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 24 h, 形成纤维样沉积物。将已形成的 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维用无血清培养基稀释至 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 备用。

细胞内 ROS 含量测定 将 SH-SY5Y 细胞以每毫升 5×10^4 个的密度接种于 6 孔板, 待细胞融合至 70% 左右时, 加入 Tub B 使其终浓度为 0、50、100、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养 12 h, 各孔加入已孵育 24 h 的 $A\beta_{1-42}$ 样品液使其终浓度为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 继续培养 24 h 后除去培养液。取 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 10 μL , 无血清培养基稀释至 10 mL (1:1 000, 终浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 每孔加入 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 消化离心, PBS 洗 3 遍。激光共聚焦显微镜检测, 检测条件为激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm, Olympus FV10-ASW 软件定量分析。

分子对接实验 使用 AutoDock Vina 软件 (版本号: 1.5.6) 分析 Tub B 与 $A\beta_{1-42}$ 的相互作用^[20], $A\beta_{1-42}$ 三维结构取自 RCSB 蛋白数据库 (<https://www.rcsb.org/>, PDB ID: 1Z0Q), Tub B 分子结构取自 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, CID: 9831166)。利用 pymol 对 $A\beta_{1-42}$ 结构去水去配体后, 使用 AutoDock Tool 将二者以 PDBQT 格式进行对接模拟输入, 使用 AutoDock Vina 将 $A\beta_{1-42}$ 与 Tub B 进行对接, 盒子中心坐标为 (-1.683, 1.711, -6.781) \AA , 盒子大小为 40 $\text{\AA}\times 40\text{\AA}\times 40\text{\AA}$, 对接成功后计算出二者相互作用力类型和大小, 筛选最低结合能量的构象并使用软件 Discovery Studio Visualizer-2020 分析 Tub B 与 $A\beta_{1-42}$ 之间的相互作用。

统计学分析 数据采用 GraphPad Prism 5.01 统计软件进行分析及作图。所有数据均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验、多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 Tub B 对 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维化的抑制作用

ThT 荧光实验是检测蛋白质纤维化的常用方法, ThT 荧光分子能特异性与淀粉样纤维中的 β -折叠结构结合, 并在 440 nm 激发波长下, 于 485 nm 处发射较强荧光, 且荧光强度随 β -折叠结构比例增加而不断加强^[21,22]。如图 2A 所示, $A\beta_{1-42}$ 的淀粉样纤维化生长曲线

呈典型的“S”型,即成核期的荧光强度无明显变化;延滞期荧光强度迅速增长,延滞时间为3.9 h;12 h后到达峰值而进入平衡期。经24 h孵育,A β_{1-42} 的ThT荧光强度明显增强(0 h: 75.93 ± 0.65 A.U.; 24 h: $1\,534.84 \pm 3.74$ A.U.),而Tub B的加入能显著降低荧光强度(图2A、B),延长延滞时间(图2C),且Tub B浓度越高,作用越明显。

CR能与淀粉样纤维中的 β -折叠结构特异性结合,当二者发生相互作用后,吸光度显著升高并伴随最大吸光度值对应波长红移,淀粉样纤维的数量越多则含有的 β -折叠结构越多,吸光度越大^[23],因此CR结合实验可进一步验证Tub B对淀粉样纤维化的影响。图2D、E显示,孵育24 h后A β_{1-42} 的CR吸光度显著升高,且最大吸收峰红移,表明淀粉样纤维已形成;而A β_{1-42} 样品的吸光度及红移程度随加入Tub B浓度的增加(50、100、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)而显著降低。

2 Tub B对A β_{1-42} 表面疏水性的影响

ANS是一种疏水性荧光探针,能与蛋白质纤维化后暴露的疏水区域特异性结合,最大吸收峰蓝移,且荧光强度也随之增加,因此ANS常用来检测淀粉样纤维的形成和聚集情况^[24,25]。如图3所示,与0 h相比,孵育24 h后A β_{1-42} 的ANS荧光强度显著增强,且最大吸收峰蓝移。而随着加入Tub B浓度的升高,荧光强度的增强趋势依次减弱,波峰蓝移减弱,表明A β_{1-42} 表面疏水结构的暴露程度降低,进一步推断Tub B对A β_{1-42} 淀粉样纤维化有抑制作用,且这种抑制效果呈浓度依赖性。

3 Tub B对A β_{1-42} 二级结构的影响

CD是检测蛋白质二级结构的重要方法,蛋白质发生淀粉样纤维化伴随着二级结构中 α -螺旋结构向 β -折叠结构的转变^[16]。故本文利用CD光谱考察Tub B对A β_{1-42} 聚集过程中构象转变的影响。从图4A可以看出,0 h时A β_{1-42} 分别在208和222 nm处有一吸收峰,这

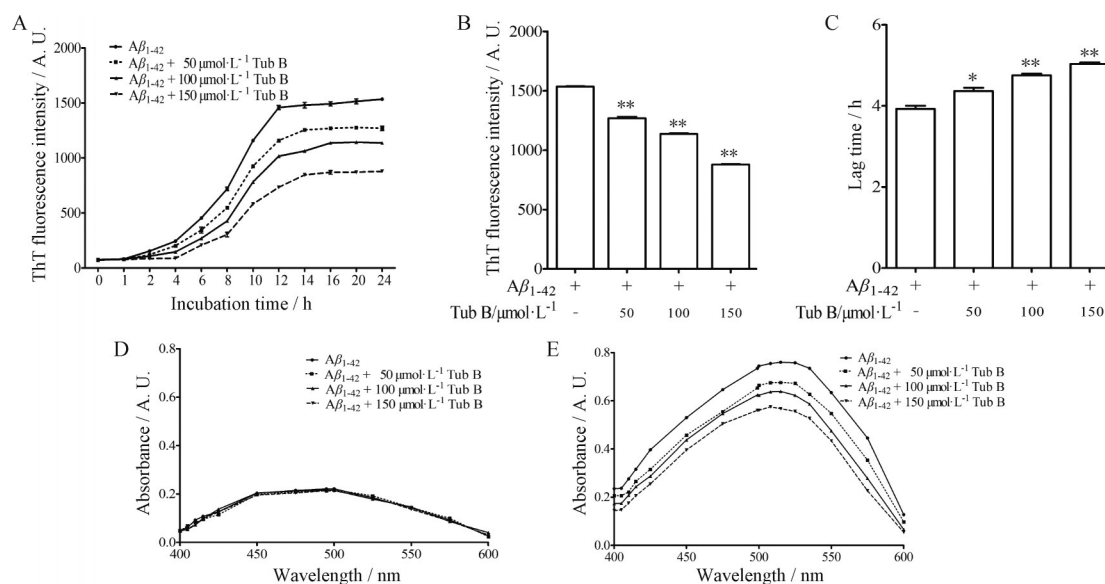


Figure 2 The effect of different concentrations of Tub B on amyloid β -protein (A β) fibrillization. A: Thioflavin-T (ThT) fluorescence growth curves of A β_{1-42} after 24 h of incubation; B: ThT fluorescence intensity of A β_{1-42} with various concentrations of Tub B at 24 h; C: The lag time of A β_{1-42} with various concentrations of Tub B; D: Congo red (CR) binding spectra were taken at 0 h; E: CR binding spectra were taken at 24 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs A β_{1-42}

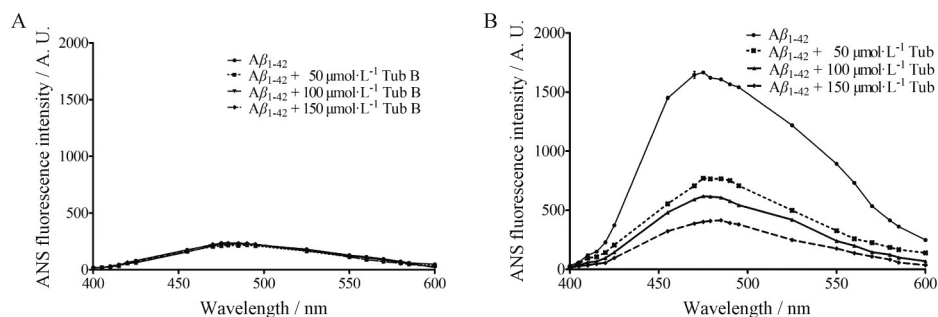


Figure 3 Representative 8-anilino-1-naphthene sulfonic acid (ANS) fluorescence emission spectra of A β_{1-42} with various concentrations of Tub B. A: ANS fluorescence emission spectra were taken at 0 h; B: ANS fluorescence emission spectra were taken at 24 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

是 α -螺旋结构的典型吸收峰;图4B显示,孵育24 h后 $A\beta_{1-42}$ 在220 nm处出现一强吸收峰,代表 β -折叠结构的增加,而208和222 nm处吸收峰减弱,说明在纤维化过程中 $A\beta_{1-42}$ 二级结构变化的总体趋势是 α -螺旋结构比例降低, β -折叠结构比例增加^[26];Tub B的加入使得220 nm处吸收峰减弱,208 nm处吸收峰增强。接着,通过软件分析0和24 h不同 $A\beta_{1-42}$ 样品二级结构中各部分所占比例的变化,与CD谱图一致,Tub B的加入使得 $A\beta_{1-42}$ 中 α -螺旋结构比例增加, β -折叠结构比例减少,抑制了 α -螺旋结构向 β -折叠结构的转化(表1)。

4 Tub B对 $A\beta_{1-42}$ 聚集形态的影响

为了更直观观察 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维的形成及评估Tub B的抑制作用,采用TEM观察 $A\beta_{1-42}$ 的形态变化。如图5所示,经过37 °C恒温孵育24 h, $A\beta_{1-42}$ 形成密集的细长纤维交错缠绕,加入Tub B后, $A\beta_{1-42}$ 的纤维化程度明显减弱,且随着Tub B浓度的升高,形成的纤维数量逐渐减少且更细更短。

5 Tub B对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的细胞毒性和红细胞溶血性的影响

如图6A所示,不加Tub B共孵育的 $A\beta_{1-42}$ 具有较强

细胞毒性,显著降低SH-SY5Y细胞存活率($54.15\% \pm 0.67\%$, $P < 0.01$);相比之下,分别与50、100、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tub B共孵育24 h的 $A\beta_{1-42}$ 可使细胞存活率依次升高,分别为 $62.49\% \pm 1.27\%$ 、 $68.25\% \pm 0.68\%$ 、 $77.91\% \pm 1.28\%$ ($P < 0.01$)。结果表明,Tub B可抑制 $A\beta_{1-42}$ 聚集物的产生,从而减弱 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维诱导的细胞毒性。

如图6B显示,与对照组相比, $A\beta_{1-42}$ 形成的淀粉样纤维可显著增加红细胞溶血率($38.26\% \pm 1.50\%$, $P < 0.01$)。而与 $A\beta_{1-42}$ 共孵育的Tub B浓度越高(50、100、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),红细胞溶血率越低($21.98\% \pm 0.90\%$ 、 $19.24\% \pm 0.57\%$ 、 $11.23\% \pm 0.85\%$, $P < 0.01$)。结果表明,Tub B通过抑制 $A\beta_{1-42}$ 聚集物的产生,进而降低 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维引起的红细胞溶血性。

6 Tub B对已形成的 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维干预的SH-SY5Y细胞活性和胞内ROS含量的影响

由图7A可知,与对照组相比,已形成的 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维可降低SH-SY5Y细胞存活率,而对SH-SY5Y细胞进行不同浓度(50、100、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的Tub B预处理可抑制 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维诱导的细胞存活率降低。图7B、C是激光共聚焦显微镜检测细胞内ROS的结

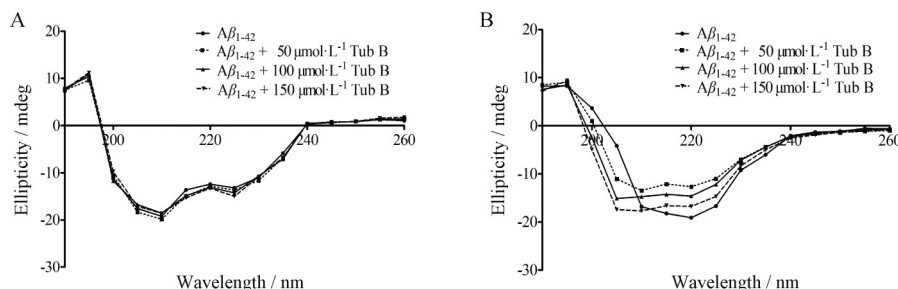


Figure 4 Representative circular dichroism (CD) spectra of $A\beta_{1-42}$ with various concentrations of Tub B. A: CD spectra were taken at 0 h; B: CD spectra were taken at 24 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Table 1 Estimates of the secondary structural components of $A\beta_{1-42}$ with different concentrations of Tub B as obtained from CD spectral analyses

Sample	Time/h	Helix/%	Antiparallel/%	Parallel/%	Beta-turn/%	Rndm. coil/%
$A\beta_{1-42}$	0	34.50	8.70	8.20	18.30	30.10
$A\beta_{1-42}$	24	18.80	16.30	12.60	27.50	24.90
$A\beta_{1-42} + 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tub B	24	22.50	14.90	11.80	24.90	25.60
$A\beta_{1-42} + 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tub B	24	25.80	13.60	10.90	23.80	26.20
$A\beta_{1-42} + 150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tub B	24	28.20	11.20	10.10	21.70	28.70

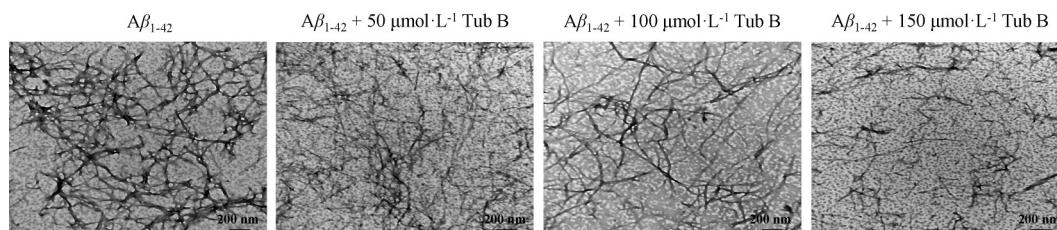


Figure 5 Transmission electron microscopy (TEM) images of $A\beta_{1-42}$ with various concentrations of Tub B after 24 h of incubation. Scale bars: 200 nm

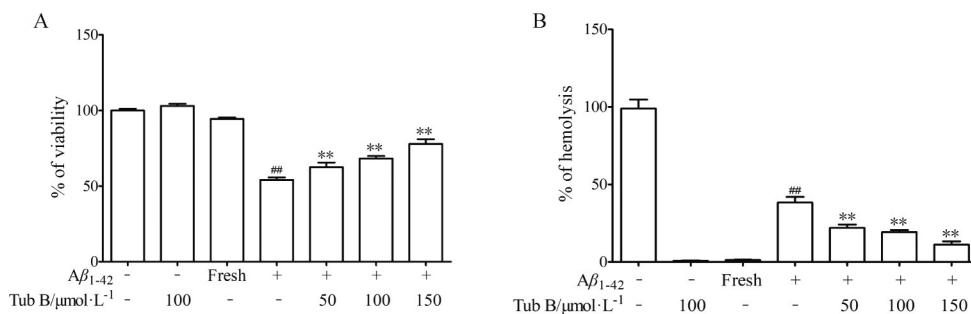


Figure 6 Cytotoxicity and hemolytic assays of A β_{1-42} with various concentrations of Tub B after 24 h of incubation. A: Viability percentage of SH-SY5Y cells upon treatment with A β_{1-42} and addition of different concentrations of Tub B; B: Hemolysis percentage of A β_{1-42} with different concentrations of Tub B. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs control; ^{**} $P < 0.01$ vs A β_{1-42}

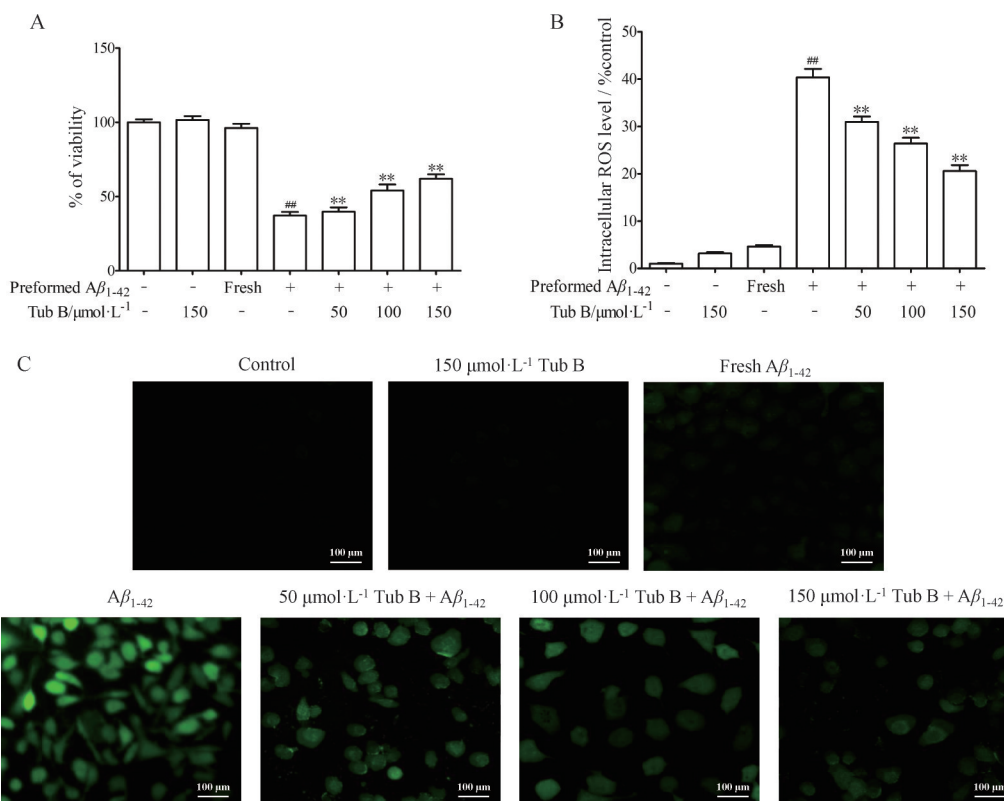


Figure 7 Inhibitory effect of Tub B against preformed A β_{1-42} -induced cytotoxicity and intracellular reactive oxygen species (ROS) accumulation. A: Viability percentage of SH-SY5Y cells upon treatment with preformed A β_{1-42} fibril and the addition of different concentrations of Tub B; B: Fluorescence intensity of the intracellular ROS in SH-SY5Y cells; C: Confocal microscopy imaging of the intracellular ROS levels in SH-SY5Y cells. Scale bars: 100 μm . $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs control; ^{**} $P < 0.01$ vs A β_{1-42}

果, 与对照组相比, 已形成的淀粉样纤维可刺激细胞内 ROS 的产生, 而 Tub B 预处理能显著降低细胞内 ROS 含量, 且这种作用与 Tub B 浓度成正比。

7 Tub B 与 A β_{1-42} 的相互作用

分子对接是研究小分子和蛋白质之间相互作用的重要手段, 通常结合能被作为配体和受体对接结果的评判依据^[27]。当结合能小于 $-4.25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时, 表明两者具有一定的结合活性; 当结合能小于 $-5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时, 表明两者结合活性较好; 当结合能小于 $-7.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,

表明两者具有强烈的结合活性^[28]。如图 8 所示, Tub B 可与 A β_{1-42} 多肽中的多种氨基酸残基发生相互作用, 并具有较低结合能 ($-6.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)。其中, Tub B 分别与 A β_{1-42} 的 HIS 6、ALA 2、GLN 15 和 ASP 1、ASP 7 通过传统氢键和碳氢键形成稳定的氢键作用力; 分别与 TYR 10 和 VAL 18 通过 Pi-Pi 堆积和 Pi-烷基形成疏水力作用。这些相互作用有助于两者的结合, 同时也是 Tub B 与 A β_{1-42} 之间结合能较低的原因。

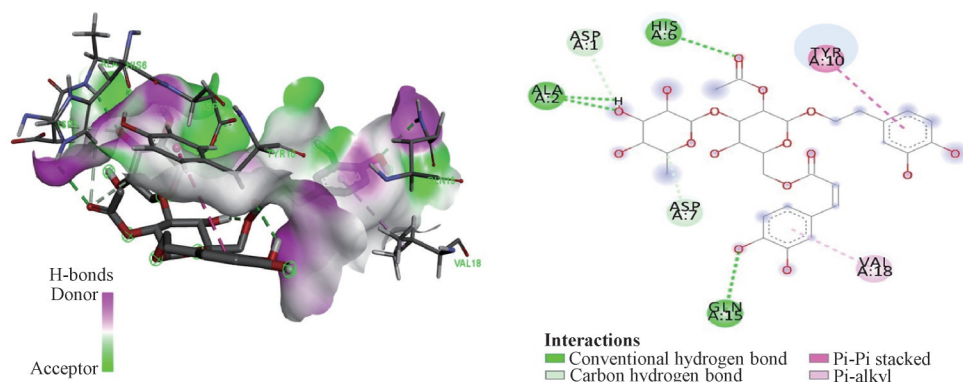


Figure 8 Schematic diagrams (3D and 2D) of the binding modes of Tub B with $A\beta_{1-42}$

讨论

作为老年人最常见的神经系统疾病, AD 已成为继心脑血管疾病、肿瘤和脑卒中之后的老年人第四大杀手, 严重危害老年患者的身体健康和生活质量^[29]。AD 的病理特征之一是大脑中存在大量由 $A\beta$ 聚集形成的纤维状沉积物^[30,31], 其中 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 是沉积 $A\beta$ 的主要成分, 而 $A\beta_{1-42}$ 比 $A\beta_{1-40}$ 更易沉积形成淀粉样纤维且毒性更大, 被认为是 $A\beta$ 聚集的核心物质, 最终导致 AD 患者大脑中淀粉样斑块沉积^[32]。故本研究体外恒温孵育 $A\beta_{1-42}$ 建立蛋白质淀粉样纤维化模型, 系统研究了 Tub B 对 $A\beta_{1-42}$ 纤维化动力学、蛋白质构象和细胞毒性的影响, 提出了 Tub B 调节蛋白质淀粉样纤维化的可能作用机制。实验结果表明, Tub B 能显著抑制 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维化, 阻止蛋白分子中 α -螺旋结构向 β -折叠结构的转化, 从而降低 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维引起的细胞毒性和红细胞溶血性, 且这种作用随 Tub B 浓度的升高而明显增强。

在蛋白质淀粉样纤维化的成核阶段, 部分折叠的单体通过疏水和氢键作用相互结合形成纤维核 (初级成核), 纤维核进一步自组装结合形成短纤维。随后蛋白质聚集进入快速生长阶段, 即延伸期, 此阶段的单体以初级成核的短纤维为核心 (二次成核), 通过分子间氢键与纤维末端结合延伸形成长纤维, 长纤维进一步自组装捆绑聚集形成成熟的淀粉样纤维。快速生长阶段过后, 蛋白质聚集进入平衡期, 即形成的成熟淀粉样纤维基本稳定不变^[33,34]。ThT 荧光实验结果表明 Tub B 通过增加延滞时间, 延长聚集过程的成核期, 抑制纤维生长从而阻滞纤维化进程。分子对接实验也证实 Tub B 通过与 $A\beta_{1-42}$ 形成疏水和氢键作用力, 从而干扰蛋白质自身的相互作用, 并且氢键可能是 Tub B 与 $A\beta_{1-42}$ 反应的主要作用力, 从而抑制 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维的形成。

研究发现, 蛋白质在不断聚集形成纤维化的过程

中, 常伴随着蛋白质结构中疏水性氨基酸的暴露^[35], 而 $A\beta_{1-42}$ 在孵育过程中可通过疏水作用力上调分子中 β -折叠结构比例, 这是其形成淀粉样纤维的关键^[36,37]。ANS 荧光实验结果显示, Tub B 可阻止淀粉样纤维形成过程中 $A\beta_{1-42}$ 表面疏水结构的暴露; 分子对接实验又进一步证实 Tub B 通过 Pi-Pi 堆积和 Pi-烷基与 $A\beta_{1-42}$ 中的氨基酸残基 TYR 10 和 VAL 18 形成疏水作用力, 表明 Tub B 通过与 $A\beta_{1-42}$ 分子间的非共价键相互作用, 阻止 $A\beta_{1-42}$ 表面疏水结构的暴露, 降低蛋白质分子间的作用力, 从而破坏富含 β -折叠的淀粉样纤维结构形成。

此外, 由于多酚类结构中存在芳香环, 已被证实可通过芳香环上的受体基团与纤维核产生氢键作用, 从而干扰 β -折叠结构生成, 延缓蛋白质聚集^[38,39], 且氢键作用主要发生于 N 端亲水区 1~16 位氨基酸残基^[40]。分子对接结果表明, Tub B 主要通过传统氢键和碳氢键与 $A\beta_{1-42}$ 形成稳定的氢键作用力, 结合位点为 HIS 6、ALA 2、GLN 15、ASP 1 和 ASP 7, 进而干扰 α -螺旋结构向 β -折叠结构的转化, 阻止淀粉样纤维的形成。

氧化应激损伤是导致神经元凋亡的重要原因之一, $A\beta$ 沉积形成的不溶性斑块会导致大量自由基生成, 引起线粒体功能、糖脂代谢及其他关键生化反应障碍, 最终因供能不足等原因导致神经元凋亡。因此, 改善氧化应激损伤可能是防治 AD 的重要研究方向^[41-43]。细胞实验表明, Tub B 可提高 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维干预的 SH-SY5Y 细胞活性, 降低胞内 ROS 水平, 说明 Tub B 具有一定的抗氧化能力, 改善 $A\beta_{1-42}$ 所致的细胞氧化应激损伤。

综上所述, Tub B 可能凭借良好的抗氧化活性, 通过氢键和疏水作用力与 $A\beta_{1-42}$ 结合, 从而维持蛋白质结构稳定, 阻止 α -螺旋结构向 β -折叠结构的转化, 抑制蛋白质淀粉样纤维形成, 降低 $A\beta_{1-42}$ 淀粉样纤维引起的细胞毒性。本研究为 Tub B 如何影响 $A\beta_{1-42}$ 纤维化动力学提供了直接证据, 在分子水平上初步解释了二者的

相互作用机制,为Tub B治疗蛋白质淀粉样纤维导致的AD提供了一定的实验基础。

但本实验仅初步阐述了Tub B对蛋白质淀粉样纤维化的抑制与其抗氧化能力以及与蛋白质分子间的氢键和疏水作用力有关,具体机制尚有待进一步探讨。如纤维的形成过程中存在很多中间聚集物,本实验缺乏有关淀粉样纤维形成过程中各种中间体的结构分析和动态变化监测,下一步作者将优化中间体的分离,解析3D结构,开展更深层次的机制研究;同时在分子层面深入探索淀粉样纤维形成的不同阶段,Tub B与A β_{1-42} 的动态相互作用和具体结合位点,从微观机制探究淀粉样蛋白的纤维化过程和发现影响淀粉样蛋白纤维化的核心因素,阐明Tub B对A β_{1-42} 纤维化抑制作用的构效关系。此外,Tub B对细胞的毒性较低,体外抑制效果较好,然而还需在动物层面进行深入研究以验证Tub B是否能够在体内发挥有效作用,并进一步应用于临床。

作者贡献: 张迪负责实验实施、数据采集分析和论文撰写;张娟利负责部分数据分析;王婧雯和文爱东负责指导实验设计和论文修改。

利益冲突: 本文所有作者均声明无利益冲突。

References

- [1] The Alzheimer's Association. 2022 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2022, 18: 700-789.
- [2] Ren R, Qi J, Lin S, et al. The China Alzheimer report 2022 [J]. *Gen Psychiatr*, 2022, 35: e100751.
- [3] Wang YQ, Liang JH, Jia RX, et al. Alzheimer disease in China (2015-2050) estimated using the 1% population sampling survey in 2015 [J]. *Chin J Alzheimers Dis Relat Disord (阿尔茨海默病及相关病)*, 2019, 2: 289-298.
- [4] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397: 1577-1590.
- [5] Luo D, Hou X, Hou L, et al. Effect of pioglitazone on altered expression of A β metabolism-associated molecules in the brain of fructose-drinking rats, a rodent model of insulin resistance [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 664: 14-19.
- [6] Wälti MA, Ravotti F, Arai H, et al. Atomic-resolution structure of a disease-relevant A β_{1-42} amyloid fibril [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: e4976-e4984.
- [7] Ferreira ST, Chan KH, Lam KL, et al. Adiponectin is protective against oxidative stress induced cytotoxicity in amyloid-beta neurotoxicity [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e52354.
- [8] Yang S, Qu R, Sun P, et al. Determination of tubuloside B by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in rats [J]. *Biomed Chromatogr*, 2017, 33: e4428.
- [9] Li YY. Study on Functional Factors and Mechanism of Delay Aging of *Cistanche* (肉苁蓉延缓衰老的功能因子及作用机制研究) [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [10] Yao J, Wan H, Zhang J, et al. Tubuloside B, a major constituent of *Cistanche deserticola*, inhibits migration of hepatocellular carcinoma by inhibiting Hippo-YAP pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155552.
- [11] Xiao L, Yao J, Miao Y, et al. Tubuloside B, isolated from *Cistanche tubulosa*, a promising agent against M1 macrophage activation via synergistically targeting Mob1 and ERK1/2 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113414.
- [12] Shu M, Zeng XB, Yu CJ, et al. Effect of tubuloside B on pulmonary inflammation induced by ovalbumin combined with PM2.5 in mice with severe asthma [J]. *Lingnan J Emerg Med (岭南急诊医学杂志)*, 2024, 29: 20-22.
- [13] Xiong Q, Kadota S, Tani T, et al. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola* [J]. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19: 1580-1585.
- [14] Sheng G, Pu X, Lei L, et al. Tubuloside B from *Cistanche salsa* rescues the PC12 neuronal cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis and oxidative stress [J]. *Planta Med*, 2002, 68: 966-970.
- [15] Deng M, Zhao JY, Ju XD, et al. Protective effect of tubuloside B on TNF alpha-induced apoptosis in neuronal cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25: 1276-1284.
- [16] Kai T, Zhang L, Wang X, et al. Tabersonine inhibits amyloid fibril formation and cytotoxicity of A β_{1-42} [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2015, 6: 879-888.
- [17] Bhasikuttan AC, Mohanty J. Detection, inhibition and disintegration of amyloid fibrils: the role of optical probes and macrocyclic receptors [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53: 2789-2809.
- [18] Cabaleiro-Lago C, Szczepankiewicz O, Linse S. The effect of nanoparticles on amyloid aggregation depends on the protein stability and intrinsic aggregation rate [J]. *Langmuir*, 2012, 28: 1852-1857.
- [19] Gade Malmos K, Blancas-Mejia LM, Weber B, et al. ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation [J]. *Amyloid*, 2017, 24: 1-16.
- [20] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31: 455-461.
- [21] Biancalana M, Makabe K, Koide A, et al. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to the surface of β -rich peptide self-assemblies [J]. *J Mol Biol*, 2009, 385: 1052-1063.
- [22] Paul A, Frenkel-Pinter M, Escobar Alvarez D, et al. Tryptophan-galactosylamine conjugates inhibit and disaggregate amyloid fibrils of A β_{42} and hIAPP peptides while reducing their toxicity [J]. *Commun Biol*, 2020, 3: 484.
- [23] Bahramikia S, Yazdanparast R. Anti-amyloidogenic and fibril-

- destabilizing effects of two manganese-salen derivatives against hen egg-white lysozyme aggregation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50: 187-197.
- [24] Wang M, Wang S, Li B, et al. Synthesis of linear polyglucoside and inhibition on the amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 166: 771-777.
- [25] Hawe A, Sutter M, Jiskoot W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization [J]. *Pharm Res*, 2008, 25: 1487-1499.
- [26] Hojati S, Ghahghaei A, Lagzian M. The potential inhibitory effect of β -casein on the aggregation and deposition of $A\beta_{1-42}$ fibrils in Alzheimer's disease: insight from *in-vitro* and *in-silico* studies [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2018, 36: 2118-2130.
- [27] Razique A. Identification of small molecule inhibitors of penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* for the therapeutics of bacterial infection [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2024, 70: 40-47.
- [28] Chen J, Wu X, Yu R. Unraveling the therapeutic mechanism of *Saussurea involucrata* against rheumatoid arthritis: a network pharmacology and molecular modeling-based investigation [J]. *Nutrients*, 2023, 15: 4294.
- [29] Lee JH, Kahn A, Cheng R, et al. Disease-related mutations among Caribbean Hispanics with familial dementia [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2014, 2: 430-437.
- [30] Viola KL, Klein WL. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis [J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129: 183-206.
- [31] Sun X, Chen WD, Wang YD. β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 221.
- [32] Qiu T, Liu Q, Chen YX, et al. $A\beta_{42}$ and $A\beta_{40}$: similarities and differences [J]. *J Pept Sci*, 2015, 21: 522-529.
- [33] Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease [J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 333-366.
- [34] Wilson MR, Yerbury JJ, Poon S. Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity [J]. *Mol Biosyst*, 2008, 4: 42-52.
- [35] Ban DK, Paul S. Functionalized gold and silver nanoparticles modulate amyloid fibrillation, defibrillation and cytotoxicity of lysozyme *via* altering protein surface character [J]. *Appl Surf Sci*, 2019, 473: 373-385.
- [36] Serpell LC. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1502: 16-30.
- [37] López De La Paz M, Goldie K, Zurdo J, et al. *De novo* designed peptide-based amyloid fibrils [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 16052-16057.
- [38] Yang SG, Wang WY, Ling TJ, et al. α -Tocopherol quinone inhibits β -amyloid aggregation and cytotoxicity, disaggregates preformed fibrils and decreases the production of reactive oxygen species, NO and inflammatory cytokines [J]. *Neurochem Int*, 2010, 57: 914-922.
- [39] Convertino M, Pellarin R, Catto M, et al. 9,10-Anthraquinone hinders beta-aggregation: how does a small molecule interfere with Abeta-peptide amyloid fibrillation? [J]. *Protein Sci*, 2009, 18: 792-800.
- [40] Zirah S, Kozin SA, Mazur AK, et al. Structural changes of region 1-16 of the Alzheimer disease amyloid beta-peptide upon zinc binding and *in vitro* aging [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 2151-2161.
- [41] Cunnane SC, Trushina E, Morland C, et al. Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19: 609-633.
- [42] Bell SM, Barnes K, De Marco M, et al. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: a biomarker of the future? [J]. *Biomedicines*, 2021, 9: 63.
- [43] Stranahan AM, Mattson MP. Recruiting adaptive cellular stress responses for successful brain ageing [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2012, 13: 209-216.