

托卡朋衍生物PCDNA抑制A β 42纤维化并降低其细胞毒性

陈贝贝¹, 蒋露莹¹, 郭芳妍², 屈莉莉¹, 汪文倩¹, 金成华^{2*}, 刘夫锋^{1*}

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 淀粉样 β 蛋白 (amyloid- β protein, A β) 在脑内的异常聚集是诱发阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 的重要原因, 因此开发抑制A β 聚集的药物是治疗AD的重要手段之一。前期研究发现托卡朋能抑制A β 42聚集并降低A β 42聚集物诱导的细胞毒性, 但临床研究发现托卡朋有很强的肝毒性。为了降低托卡朋的肝毒性, 对其侧链结构进行改造并获得其衍生物苯乙基 (*E*)-2-氰基-3-(3,4-二羟基-5-硝基苯)-丙烯酸酯 (PCDNA)。通过硫磺素T (thioflavin T, ThT) 和原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM) 实验研究了PCDNA对A β 42纤维化的抑制作用; 通过细胞毒性实验研究了PCDNA对A β 42聚集物诱导的细胞毒性作用; 并研究了PCDNA对成熟A β 42纤维的解聚作用。最后, 通过分子对接实验研究了PCDNA与A β 42五聚体之间的相互作用。这些实验结果为研究托卡朋结构类似物作为A β 抑制剂奠定了基础。

关键词: 阿尔茨海默症; 淀粉样 β 蛋白; 抑制剂; 托卡朋衍生物; 纤维化; 分子对接

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)04-1063-07

Tolcapone derivative PCDNA inhibits A β 42 fibrillogenesis and reduces its cytotoxicity

CHEN Bei-bei¹, JIANG Lu-ying¹, GUO Fang-yan², QU Li-li¹, WANG Wen-qian¹,
JIN Cheng-hua^{2*}, LIU Fu-feng^{1*}

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: Abnormal aggregation of amyloid- β protein (A β) in brain plays a vital role in the occurrence of Alzheimer's disease (AD). Hence, inhibiting A β aggregation is one major tactic for therapy of AD. Previous studies have found that tolcapone can inhibit A β 42 aggregation and reduce the cytotoxicity induced by A β 42 aggregates, but clinical studies have found that tolcapone has strong liver toxicity. To reduce the liver toxicity of tolcapone, its side chain structure was modified to obtain its derivative phenethyl (*E*)-2-cyano-3-(3,4-dihydroxy-5-nitrobenzene)-acrylate (PCDNA). Thioflavin T (ThT) and atomic force microscopy (AFM) assays were used to explore the inhibitory effect of PCDNA on A β 42 fibrillogenesis. The cytotoxicity assays were used to explore the inhibitory effect of PCDNA against the cytotoxicity induced by A β 42 aggregates. In addition, the depolymerization effect of PCDNA on mature A β 42 fibrils was also explored. Finally, molecular docking was used to explore the interaction between PCDNA and A β 42 pentamer. These results lay the foundation for the study of the structural analogues of tolcapone as A β inhibitors.

Key words: Alzheimer's disease; amyloid- β protein; inhibitor; tolcapone derivative; fibrillogenesis; molecular docking

收稿日期: 2020-12-03; 修回日期: 2021-01-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21878234, 81560557); 天津市自然科学基金资助项目 (18JCZDJC33000).

*通讯作者 Tel: 86-22-60602717, E-mail: fufengliu@tust.edu.cn;

Tel: 86-433-2436942, E-mail: jinchenghua@ybu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1853

淀粉样蛋白的错误折叠和异常沉积会诱发多种疾病^[1]。例如,阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病和2型糖尿病分别是由淀粉样 β 蛋白 (amyloid- β protein, A β)、 α -突触核蛋白和人胰岛淀粉样多肽的错误折叠和聚集所引起^[2-4]。其中A β 是淀粉样 β 前体蛋白在 β 分泌酶和 γ 分泌酶错误切割下产生的^[5]。由于 γ 分泌酶的酶切位点不确定,所以会产生多种类型的A β 变异体。其中,A β 40和A β 42是两种最常见的变异体。A β 在病理条件下易自聚形成纤维,这种聚集的纤维沉积在大脑中可导致神经细胞损伤和死亡,进而导致AD^[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的潜在手段之一。

目前,已发现的抑制剂种类主要为小分子化合物^[8-11]、短肽^[12,13]、蛋白^[14]和纳米材料^[15-17]等。由于小分子抑制剂具有结构简单、易于修饰等优势被广泛研究。目前已开发出姜黄素^[18]、利福平^[19]和茶多酚 [(-)-epigallocatechin gallate, EGCG]^[20]等。其中,托卡朋是一种含有硝基苯酚基团的化合物,能穿过血脑屏障,前期研究发现它能够抑制淀粉样蛋白的纤维化^[21],并降低A β 42诱导的细胞毒性,但是托卡朋具有肝毒性等缺点^[22]。进一步研究发现,托卡朋的肝毒性主要由其侧链在代谢过程中产生的一种亚醌类化合物所引起,这种化合物能破坏线粒体内的电子传递,进而破坏细胞,因此,对其侧链结构的改造可能达到降低其肝毒性的作用。例如,Silva等^[23]经过结构改造发现了一种与托卡朋结构类似的化合物苯乙基 (*E*)-2-氰基-3-(3,4-二羟基-5-硝基苯)-丙烯酸酯 [phenethyl (*E*)-2-cyano-3-(3,4-dihydroxy-5-nitrobenzene)-acrylate, PCDNA]。结果表明,PCDNA不仅具有托卡朋类似的药理作用^[24],且毒性较低,但是关于PCDNA对A β 42的抑制作用尚未见报道。

本研究采用硫磺素T (thioflavin T, ThT) 和原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM) 实验研究了PCDNA对A β 42纤维化过程的抑制作用,并检测了PCDNA对A β 42诱导的细胞毒性的抑制作用。随后研究了PCDNA对成熟A β 42纤维的解聚作用。最后,运用分子对接技术研究了PCDNA与A β 42五聚体相互作用的分子机制。

材料与方法

材料 人源A β 42 (纯度为95%) 购于上海吉尔生化公司; 苯乙基 (*E*)-2-氰基-3-(3,4-二羟基-5-硝基苯)-丙烯酸酯 (PCDNA, 纯度99%) 由延边大学利用有机合成方法获得; 氢氧化钠 (NaOH)、[3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2*H*-溴化四唑] (MTT)、ThT、六氟异丙

醇 (hexafluoroisopropanol, HFIP) 和 DMSO 购于 Sigma 公司; RPMI1640 培养基、胎牛血清及一些细胞培养用品购自 Gibco 公司。

仪器 SpectraMax M2 型酶标仪 (奥地利 Molecular Devices 公司); BX53 荧光显微镜 (日本奥林巴斯公司); 多模8AFM (美国Bruker公司)。

蛋白预处理 A β 42 具有非常强的疏水性, 存储过程极易发生聚集沉淀, 因此使用六氟异丙醇打散已有聚集体。具体方法: 称取一定量A β 42溶于六氟异丙醇使其终浓度为 1 mg·mL⁻¹, 4 °C 静置 2 h, 超声 20 min, 1.6×10⁴ r·min⁻¹ 离心 20 min, 除去已形成的聚集体, 离心后取上清分装于 1.5 mL EP 管中, -80 °C 冻实, 冻干机冻干后于 -20 °C 储存。

溶液配制 称取 PCDNA 溶于磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS), 配成 4 mmol·L⁻¹ 储液, 吸取适量储液, 用 PBS 稀释成 500 μmol·L⁻¹ 溶液备用; 称取 NaOH 溶于去离子水, 配为 20 mmol·L⁻¹ 储液; 称取 ThT 溶于 100 mmol·L⁻¹ PBS, 配为 275 μmol·L⁻¹ 储液。

A β 42 聚集动力学实验 取冻干蛋白加入 20 mmol·L⁻¹ NaOH 溶解, 超声 20 min, 1.6×10⁴ r·min⁻¹ 离心 20 min。为进一步去掉已形成的聚集体, 仅取 75% 上清, 用 Nano Drop2000 检测蛋白浓度, 用 20 mmol·L⁻¹ NaOH 制备成浓度为 275 μmol·L⁻¹ 储液。将蛋白和 ThT 用 PBS 稀释为 25 μmol·L⁻¹ 终浓度, PCDNA 终浓度为 1、3、10 和 30 μmol·L⁻¹, 置于 96 孔全黑板中, 每孔体积为 200 μL, 37 °C、250 r·min⁻¹ 培养, 激发波长 440 nm, 发射波长 480 nm, 每隔 1 h 检测荧光强度的变化。每个浓度设置 3 个平行, 重复 3 次。

AFM 实验 将 ThT 实验获得的相同实验样品滴加到云母片中孵育 10 min。用双蒸馏水冲洗云母片, 过夜晾干。用多模 8AFM、硅探针进行测试。测试参数: Model Scanasyst-Air: 115 m 悬臂; 齿尖圆角半径: 2 nm; 弹簧常数: 0.4 N·m⁻¹; 共振频率: 70 Hz。在 AFM 扫描过程中, 设置扫描大小为 2 μm×2 μm, 分辨率为 512 行。所有 AFM 图像使用 Nanoscope analysis 1.8 软件 (Bruker 公司) 进行分析。

MTT 实验 使用 PC12 细胞检测 A β 42 聚集体的细胞毒性。PC12 细胞于 RPMI1640 培养基 (含 10% 胎牛血清) 在 37 °C、5% CO₂ 条件培养。将 PC12 细胞以每毫升 5×10⁴ 个的密度接种到 96 孔细胞培养板培养 24 h 后, 将与不同浓度 PCDNA (1、3、10 和 30 μmol·L⁻¹) 培养 24 h 的 A β 42 或单纯培养的 A β 42 吸取 10 μL 加入细胞中, 孵育 48 h, 加入 10 μL 5 mg·mL⁻¹ MTT 培养 4 h, 去除培养基, 每孔加入 100 μL DMSO, 于 570 nm 处测吸光度。每个浓度设 4 个平行, 重复 3 次。

FDA/PI (fluorescein diacetate/propidium iodide) 染色实验 将2 mL PC12细胞以每毫升 5×10^4 个的密度接种于6孔板, 培养24 h, 加入预培养好的蛋白共孵育48 h, FDA/PI染色1 min, 吸出染色液并加入PBS, 用BX53显微镜观察并拍照。用软件Image J分析PI染色后荧光强度来定量细胞毒性。

解聚实验 取冻干蛋白进行与聚集动力学实验相同的处理, 首先将A β 42与ThT (终浓度均为 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 于 37°C 、 $250 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养24 h至纤维成熟, 再加入不同浓度PCDNA (1 、 3 、 10 和 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 每小时检测荧光强度变化。每个浓度设3个平行, 重复3次。

分子对接实验 应用Vina^[25]软件研究抑制剂PCDNA与A β 42五聚体 (PDB ID: 5OQV^[26]) 之间的相互作用。分子对接的格点间距被设为 1 \AA , 同时使其格点中心位于 $x = 39.632$, $y = 58.128$, $z = 52.583$ 。此外, 格点参数设为 $40 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA} \times 35 \text{ \AA}$, 对接所得构象数为20。使用软件VMD^[27]和Discovery Studio Visualizer-2018分析PCDNA与A β 42五聚体之间的相互作用。

数据分析 数据采用GraphPad Prism 6统计软件进行统计分析并作图, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性差异比较采用 t 检验法进行, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果与讨论

1 PCDNA抑制A β 42纤维化

ThT荧光分子能特异性与淀粉样蛋白中的 β -折叠结构结合, 并在 440 nm 激发波长下, 于 480 nm 处发射较强的荧光^[28,29]。与之相反, ThT在自由状态下基本不发光。因此, 本研究用ThT荧光检测方法研究PCDNA对A β 42纤维化的抑制作用。在不存在PCDNA时 (图1), A β 42聚集过程基本没有延迟期, 可在10 h内迅速聚集而到达平台期, 该结果与前期研究结果类似^[30]。当溶液中存在低浓度 (如 1 和 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的PCDNA时, PCDNA对A β 42的快速增长期和平台期并没有明显抑制作用。当PCDNA浓度继续增加, 每时

刻的ThT荧光值均比不含抑制剂的溶液的荧光值低, 说明PCDNA对A β 42纤维化的抑制作用呈浓度依赖性。例如, 10 和 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA分别会使其荧光强度降低至纯A β 42荧光强度的45%和10%。上述研究结果表明, PCDNA可以抑制A β 42的纤维化过程。

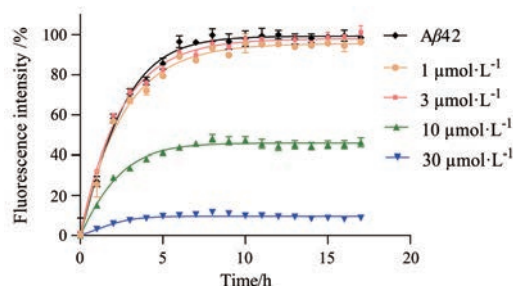


Figure 1 Phenethyl (*E*)-2-cyano-3-(3,4-dihydroxy-5-nitrobenzene)-acrylate (PCDNA) inhibits amyloid- β protein (A β)42 fibrillogenesis was tested by using thioflavin T (ThT) fluorescence assay. The concentration of A β 42 is $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

为了研究PCDNA对A β 42聚集形态的影响, 利用AFM法观察了单纯A β 42和PCDNA与A β 42共培养时的A β 42的聚集形态 (图2)。EGCG是一种已知A β 42抑制剂, 可有效抑制A β 42形成纤维, 因此本研究选择EGCG作为阳性对照药物。从图2A可以看出, 单纯A β 42培养24 h后会聚集形成长短不一的纤维, 这与前期结果一致^[30]。但当与 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA共孵育时, A β 42聚集形态发生显著变化 (图2B)。将 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG与A β 42共孵育24 h, 观察A β 42的聚集形态 (图2C)。对比 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG与 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA处理后的A β 42聚集状态, 发现这两种药物都能使A β 42的聚集形态发生显著变化, 不仅没有形成纤维, 而是形成一种不规则的低聚物, 这表明PCDNA能够抑制A β 42纤维的形成。结合ThT和AFM实验结果, 进一步说明PCDNA可以抑制A β 42的纤维化。

2 PCDNA降低A β 42聚集体诱导的细胞毒性

脑内异常聚集的A β 42聚集体会诱导神经细胞的死亡, 进而引起AD^[2]。为了检测PCDNA对A β 42聚集

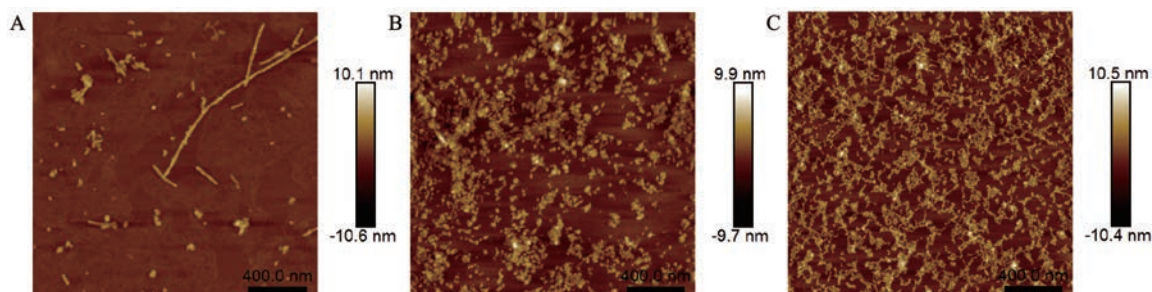


Figure 2 Inhibitory effect of PCDNA validated using atomic force microscopy (AFM) assay. A: Pure A β 42; B: A β 42 was co-cultured with $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA; C: A β 42 was co-cultured with $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (-)-epigallocatechin gallate (EGCG). Scale bar: 400 nm

体诱导的PC12细胞毒性的影响,本研究同时采用MTT实验(图3)和FDA/PI双染色实验(图4)两种方法检测。PBS对照组细胞活性设定为100%。由图3可知,与A β 42聚集体共孵育的细胞存活率仅为55%,表明A β 42聚集体有显著细胞毒性。而与1、3、10和30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA共培养的A β 42聚集体共孵育时,PC12细胞存活率分别为64%、66%、72%和75%,表明PCDNA对A β 42聚集体细胞毒性的抑制作用呈浓度依赖性,即PCDNA抑制A β 42聚集体对细胞毒性的能力随着其浓度的增加而增加。

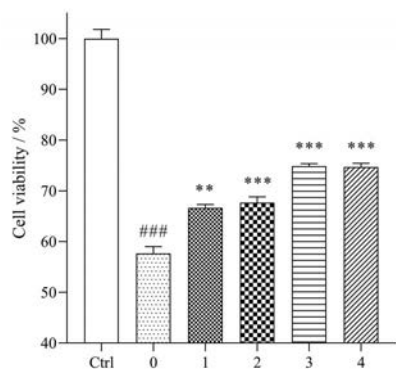


Figure 3 PCDNA greatly protects PC12 cells from A β 42-induced cytotoxicity which examined by the MTT assay. Phosphate buffer saline (PBS) was used as control (ctrl), and 0, 1, 2, 3, 4 represent PC12 cells co-incubation with mature A β 42, A β 42 co-cultured with 1, 3, 10, and 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA, respectively. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs ctrl; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs group 0

为进一步验证PCDNA对A β 42聚集体诱导的细胞毒性的抑制作用,随后进行了FDA/PI双染色法检测实验(图4)。FDA染料可进入活细胞内,并在内酯酶催化下水解二乙酸酯基团,从而产生高强度荧光;PI是一种可对DNA染色的细胞核染色试剂,用于检测细胞凋亡。因此,常用FDA和PI染料分别检测活细胞和死细胞含量。由图4A可知,PBS组细胞生长状态较好,且绿色荧光较强,基本没有红色荧光。纯A β 42组细胞的绿色荧光减弱,同时出现较多红色荧光。这表明A β 42聚集体有较强的细胞毒性,与前期研究结果一致。而与30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA共培养的A β 42组的细胞的绿色荧光较强,同时红色荧光信号变弱。为了进一步研究PCDNA抑制A β 42聚集体诱导的细胞凋亡情况,对图4A中PI处理后的荧光进行了定量分析(图4B)。加入30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA,PI染色的荧光强度降低。综上所述,PCDNA可以有效降低A β 42聚集体诱导的细胞毒性。

3 PCDNA解聚成熟的A β 42为低毒聚集体

A β 42在脑内的沉积是一种较漫长的过程,其沉积

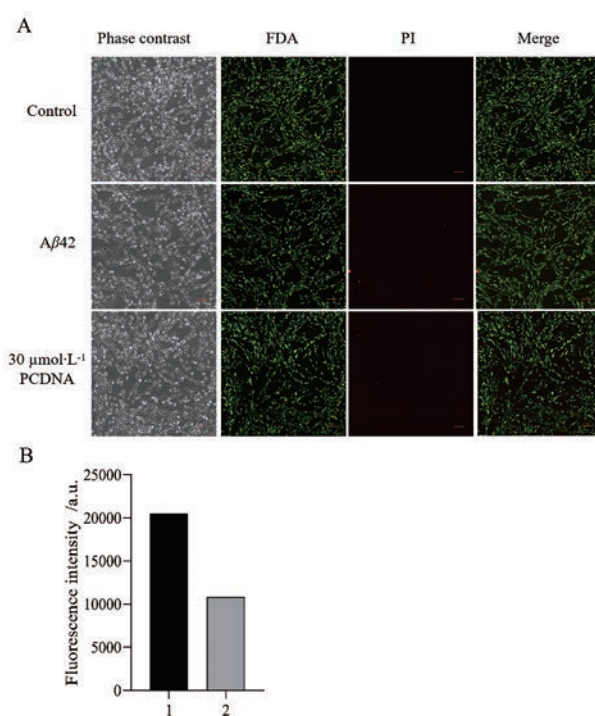


Figure 4 Fluorescein diacetate/propidium iodide (FDA/PI) staining analysis of the effect of A β 42 on PC12 cells. A: Cell viability of PC12 cells induced by A β 42 aggregation species with or without 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA as characterized by the FDA/PI staining assay, control was PBS buffer. Scale bar: 100 μm ; B: The fluorescence quantification of PI staining in A. The number 1 and 2 represent the fluorescence intensities of A β 42 alone and A β 42 treated with 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA, respectively

早于AD发病,因此药物能有效解聚成熟A β 42纤维也是一种必不可少的功能^[31,32]。培养初期荧光强度很低,表明培养初始时A β 42主要以单体形式存在(group 0,图5A)。然后将A β 42培养至平台期,分别加入PBS(作为阴性对照)、1、3、10和30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PCDNA共孵育10 h,检测最终荧光强度(图5A)。为了方便比较,将PBS组荧光设定为100%。结果显示,随着PCDNA浓度的增加,荧光强度显著降低。例如,与30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA共培养的A β 42的荧光强度低于10%,表明30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA可将A β 42聚集体降解为一种无法结合ThT的聚集体。随后,用MTT实验验证了这种被解聚的聚集物的毒性(图5B),随着PCDNA浓度的增加,细胞存活率增加,说明A β 42被解聚为一种低毒聚集体,表明PCDNA具有降解A β 42纤维的作用,并且降解的聚集体毒性较低。应用AFM观察加入30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA后A β 42的聚集状态(图5C)。结果显示,成熟A β 42纤维与30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA共孵育10 h后,基本不存在较大纤维,说明PCDNA可有效解聚A β 42成熟纤维。上述实验表明,PCDNA具有解聚

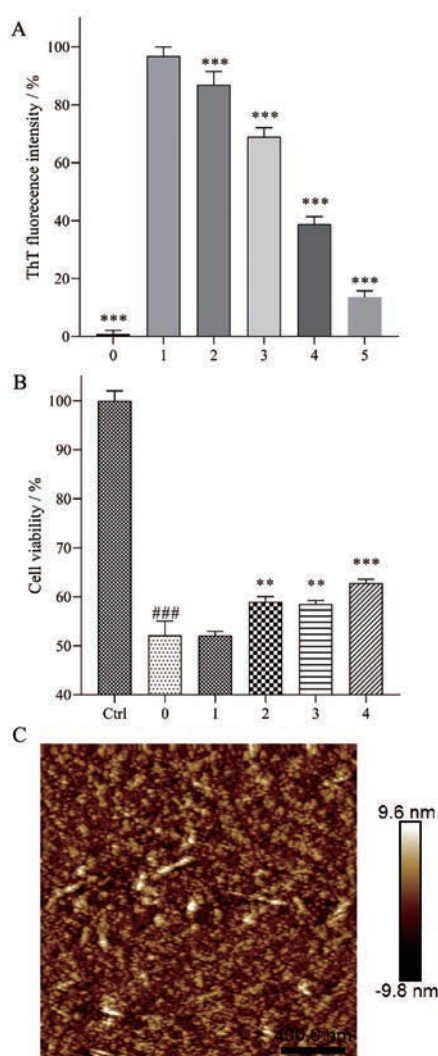


Figure 5 PCDNA depolymerizes mature A β 42 fibrils into non-toxic aggregates. A: Effect of PCDNA on the fluorescence intensity of mature fibrils of A β 42. The group 0, 1, 2, 3, 4, and 5 represent 0 h A β 42, A β 42 co-incubation with PBS, 1, 3, 10, and 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA for 10 h, respectively. $***P < 0.001$ vs group 1; B: Cytotoxicity of A β 42 species depolymerized by PCDNA was determined using the MTT assay. The group 0, 1, 2, 3, and 4 represent pure A β 42 fibrils, A β 42 co-incubation with 1, 3, 10, and 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA, respectively. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. $***P < 0.001$ vs ctrl (PBS); $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs group 0; C: A β 42 species were co-incubated with 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA for 10 h and observed by AFM assay. Scale bar: 400 nm

A β 42纤维的能力,且解聚产物为一种低毒的寡聚物。

4 PCDNA与A β 42五聚体的相互作用研究

使用分子对接方法研究了PCDNA与纤维化形态A β 42五聚体的相互作用(图6)。结果显示,PCDNA与A β 42五聚体之间有较低结合能($-9.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$),表明PCDNA与A β 42五聚体可通过直接相互作用解聚A β 42五聚体。图6展示了PCDNA与A β 42五聚体之间具有最

低结合能的3种不同结合方式及其相互作用二维图。

如图6A、B所示,PCDNA嵌入由残基F₁₉FAED-VGSNKGAI₃₁形成的A β 42五聚体内部,与A β 42五聚体上A~E链的残基F19、N27、K28、G29、A30以及I31产生较强的相互作用。此时,PCDNA与A β 42五聚体之间拥有最低结合能,约为 $-9.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,表明PCDNA优先结合到A β 42五聚体的内部。此外,如图6C、D所示,PCDNA结合到A β 42五聚体的外侧,主要

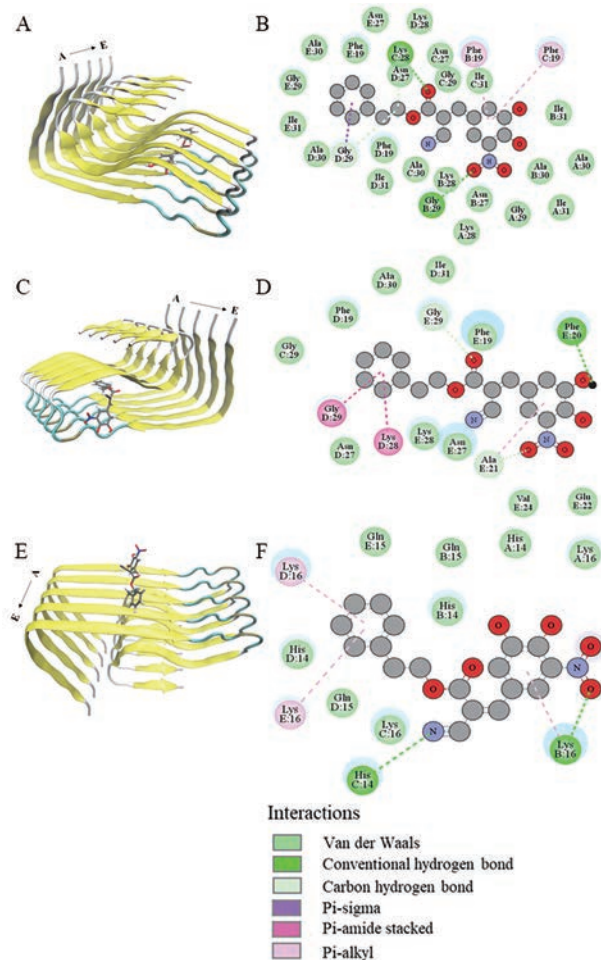


Figure 6 Analysis of the direct interaction between PCDNA and A β 42 pentamer. A, B: The typical conformation of PCDNA embedded in the A β 42 pentamer (A) and its corresponding two-dimensional analysis (B); C, D: The representative conformation of PCDNA bound to the outside of A β 42 pentamer (C) and the corresponding two-dimensional analysis (D); E, F: The typical conformation (E) of the PCDNA embedded in the groove at the bottom of the A β 42 pentamer and the corresponding two-dimensional analysis (F). The interaction diagram between PCDNA and A β 42 pentamer was drawn using VMD software and Discovery Studio Visualizer-2018 software, respectively. The A β 42 pentamer is represented by "NewCartoon", and PCDNA molecules are represented by "Licorice". Carbon, nitrogen, oxygen, and hydrogen atoms are colored by gray, blue, red, and white, respectively

与 A β 42 五聚体上 D 和 E 链上的残基 F19、F20、A21、E22、V24、N27、K28、G29、A30 以及 I31 结合, 此时其结合能为 $-8.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。值得注意的是, 不论 PCDNA 嵌入 A β 42 五聚体内部还是外侧, 都主要与 A β 42 五聚体上残基 F19、N27、K28、G29 以及 I31 相互作用, 这也说明了这些残基是 A β 42 五聚体与 PCDNA 结合的热点残基。在图 6E、F 中, PCDNA 嵌入由残基 H₁₄QK₁₆ 形成的凹槽中, 主要与 A β 42 五聚体上 A~E 链的残基 H14、Q15 以及 K16 形成较强的相互作用, 其结合能达到 $-8.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

综上所述, PCDNA 与 A β 42 五聚体之间拥有较强的疏水相互作用、 π -烷基相互作用、 π -sigma 相互作用、酰胺- π 堆积作用以及氢键相互作用。这些相互作用有助于 PCDNA 结合到 A β 42 五聚体上, 同时这也是 PCDNA 与 A β 42 五聚体之间结合能较低的原因。

结论

本文利用 ThT 和 AFM 实验研究了 PCDNA 对 A β 42 纤维化的抑制作用, 结果表明, PCDNA 可显著抑制 A β 42 的纤维化过程, 改变 A β 42 的聚集状态。MTT 和 FDA/PI 实验结果表明, $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PCDNA 可显著降低 A β 42 聚集诱导的细胞毒性作用。上述实验方法研究 PCDNA 对已聚集的 A β 42 纤维的解聚作用, 发现 PCDNA 可解聚已聚集的 A β 42 纤维, 并且解聚产生的聚集物具有较低细胞毒性。分子对接结果表明, PCDNA 与 A β 42 五聚体的相互作用主要是疏水相互作用、 π -烷基相互作用、 π -sigma 相互作用、酰胺- π 堆积作用以及氢键相互作用, 这些相互作用有助于两者的结合, 同时这也是 PCDNA 与 A β 42 五聚体之间结合能较低的原因。综上所述, PCDNA 可以作为抑制 A β 42 聚集的潜在化合物, 有望成为治疗 AD 的潜在药物。

作者贡献: 陈贝贝负责论文写作、ThT 实验、细胞毒性实验、FDA/PI 染色实验和 AFM 实验; 蒋露莹负责分子对接实验; 金成华和郭芳妍负责 PCDNA 分子合成; 屈莉莉和汪文倩负责部分 ThT 实验和细胞毒性实验操作; 刘夫锋负责实验设计、论文写作与把关。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Chuang E, Hori AM, Hesketh CD, et al. Amyloid assembly and disassembly [J]. *J Cell Sci*, 2018, 131: 89928-89945.
- [2] Reiss AB, Arain HA, Stecker MM, et al. Amyloid toxicity in Alzheimer's disease [J]. *Rev Neurosci*, 2018, 29: 613-627.
- [3] Mehra S, Sahay S, Maji SK. α -Synuclein misfolding and aggregation: implications in Parkinson's disease pathogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2019, 1867: 890-908.
- [4] Bishoyi AK, Roham PH, Rachineni K, et al. Human islet amyloid polypeptide (hIAPP) - a curse in type II diabetes mellitus: insights from structure and toxicity studies [J]. *Biol Chem*, 2020, 402: 133-153.
- [5] Chakraborty S, Basu S. Structural insight into the mechanism of amyloid precursor protein recognition by β -secretase 1: a molecular dynamics study [J]. *Biophys Chem*, 2015, 202: 1-12.
- [6] Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, et al. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 450-464.
- [7] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis [J]. *Science*, 1992, 256: 184-185.
- [8] Du WJ, Guo JJ, Gao MT, et al. Brazilin inhibits amyloid β -protein fibrillogenesis, remodels amyloid fibrils and reduces amyloid cytotoxicity [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 7992-7801.
- [9] Huang L, Zhao C, Feng X, et al. Exploration of nonclinical pharmacodynamics evaluation system of Alzheimer's disease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 789-805.
- [10] Peng Y, Li P, Li L, et al. Progress of clinical trials in Alzheimer's disease drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1185-1195.
- [11] Zhang B, Pang X, Jia H, et al. Repositioning drug discovery for Alzheimer's disease based on global marketed drug data [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 54: 1214-1224.
- [12] Honcharenko D, Juneja A, Roshan F. Amyloid- β peptide targeting peptidomimetics for prevention of neurotoxicity [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10: 1462-1477.
- [13] Gosztyla ML, Brothers HM, Robinson SR. Alzheimer's amyloid- β is an antimicrobial peptide: a review of the evidence [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 62: 1495-1506.
- [14] Bode DC, Stanyon HF, Hirani T, et al. Serum albumin's protective inhibition of amyloid- β fiber formation is suppressed by cholesterol, fatty acids and warfarin [J]. *J Mol Biol*, 2018, 430: 919-934.
- [15] Xiong N, Dong XY, Zheng J, et al. Design of LVFFARK and LVFFARK-functionalized nanoparticles for inhibiting amyloid β -protein fibrillation and cytotoxicity [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 5650-5662.
- [16] Han Q, Wang X, Cai S, et al. Quercetin nanoparticles with enhanced bioavailability as multifunctional agents toward amyloid induced neurotoxicity [J]. *J Mater Chem B*, 2018, 6: 1387-1393.
- [17] Guan Y, Gao N, Ren J, et al. Rationally designed CeNP@MnMoS₄ core-shell nanoparticles for modulating multiple facets of Alzheimer's disease [J]. *Chemistry*, 2016, 22: 14523-14526.
- [18] Reddy PH, Mancaza M, Yin X, et al. Protective effects of indian spice curcumin against amyloid- β in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 61: 843-866.
- [19] Umeda T, Ono K, Sakai A, et al. Rifampicin is a candidate preventive medicine against amyloid- β and tau oligomers [J].

- Brain, 2016, 139: 1568-1586.
- [20] Park G, Xue C, Wang H, et al. Distinguishing the effect on the rate and yield of A β 42 aggregation by green tea polyphenol EGCG [J]. ACS Omega, 2020, 5: 21497-21505.
- [21] Mo J, Chen T, Yang H, et al. Design, synthesis, *in vitro* and *in vivo* evaluation of benzylpiperidine-linked 1,3-dimethylbenzimidazolinones as cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2020, 35: 330-343.
- [22] Borges N. Tolcapone in Parkinson's disease: liver toxicity and clinical efficacy [J]. Expert Opin Drug Saf, 2005, 4: 69-73.
- [23] Silva T, Mohamed T, Shakeri A, et al. Development of blood-brain barrier permeable nitrocatechol-based catechol *O*-methyltransferase inhibitors with reduced potential for hepatotoxicity [J]. J Med Chem, 2016, 59: 7584-7597.
- [24] Pinheiro SD, Serrão MP, Silva T, et al. Pharmacodynamic evaluation of novel catechol-*O*-methyltransferase inhibitors [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 847: 53-60.
- [25] 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.
- [26] Gremer L, Schölzel D, Schenk C, et al. Fibril structure of amyloid- β (1-42) by cryo-electron microscopy [J]. Science, 2017, 358: 116-119.
- [27] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics [J]. J Mol Graph, 1996, 14: 33-8, 27-8.
- [28] Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1804: 1405-1412.
- [29] Groenning M. Binding mode of thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status [J]. J Chem Biol, 2010, 3: 1-18.
- [30] Liu F, Wang W, Sang J, et al. Hydroxylated single-walled carbon nanotubes inhibit A β (42) fibrillogenesis, disaggregate mature fibrils, and protect against A β (42)-induced cytotoxicity [J]. ACS Chem Neurosci, 2019, 10: 588-598.
- [31] Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years [J]. EMBO Mol Med, 2016, 8: 595-608.
- [32] Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease [J]. Eur J Neurol, 2018, 25: 59-70.