

## 研究论文

# 抑制聚ADP-核糖聚合酶-1活性降低HEK293/tau441细胞tau蛋白的磷酸化

陈钦浩, 廖晓梅, 王少辉\*

华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079

**摘要:** 为了研究聚ADP-核糖聚合酶-1 [poly(ADP-ribose)polymerase-1, PARP-1]对微管相关蛋白tau磷酸化水平的影响, 本实验分别用不同剂量(0.5, 1, 2, 4 mmol/L)的PARP-1的抑制剂3-氨基苯甲酰胺(3-aminobenzamide, 3-AB)处理稳定表达tau441蛋白的HEK293细胞。24 h后观察细胞的形态学变化, 并用免疫印迹的方法检测PARP-1的聚ADP-核糖化修饰变化、微管相关蛋白tau的磷酸化水平和糖原合酶激酶-3 (glycogen synthase kinase 3, GSK-3)的活性改变情况。结果显示: (1)不同浓度的3-AB处理HEK293/tau441细胞后, 细胞形态未发生显著的变化; (2) PARP-1的活性下降引起tau蛋白Ser195/198/199/202位点的非磷酸化增强; (3) PARP-1的活性抑制使tau蛋白Thr231位点的磷酸化下降, 同时细胞内的GSK-3的活性也下降。结果提示, PARP-1的活性抑制可能通过下调GSK-3的活性, 降低tau蛋白磷酸化水平。

**关键词:** 聚ADP-核糖聚合酶-1; 糖原合酶激酶-3; tau蛋白; 阿尔茨海默病

**中图分类号:** R363

## Suppressing poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibits tau phosphorylation in HEK293/tau441 cells

CHEN Qin-Hao, LIAO Xiao-Mei, WANG Shao-Hui\*

College of Life Science, Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China

**Abstract:** The study aimed to investigate the effect of inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activity on tau phosphorylation in HEK293/tau441 cells and its mechanism. HEK293/tau441 cells were treated with 3-aminobenzamide (3-AB), a PARP-1 inhibitor, at different doses (0.5, 1, 2, 4 mmol/L). After 24 h, the cell morphology was observed under phase contrast microscope, tau phosphorylation level in different sites (tau-1, tau-5, Thr231) and the activity of glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) were detected by Western blotting. The results showed: (1) 3-AB at different doses failed to change the morphology of cells; (2) The 3-AB-induced decrease in activity of PARP-1 resulted in increase of unphosphorylation level in tau-1(Ser195/198/199/202) sites; (3) The phosphorylation of tau was decreased in Thr231 site, while the total tau was slightly changed after 3-AB treatment; (4) With the increased phosphorylation of GSK-3 at Ser9 site, the activity of GSK-3 was decreased after 3-AB treatment. The results suggest that the inhibition of PARP-1 by 3-AB could decrease tau phosphorylation in HEK293/tau441 cells probably through decreasing GSK-3 activity.

**Key words:** poly(ADP-ribose)polymerase-1; glycogen synthase kinase 3; tau protein; Alzheimer's disease

聚ADP-核糖聚合酶-1 [poly(ADP-ribose)polymerase-1, PARP-1] 是一种蛋白翻译后核糖修饰核酶, 易被断裂的DNA激活, 激活的PARP-1参与DNA的损伤修复、基因转录、细胞死亡等一系列

Received 2011-04-21 Accepted 2011-06-16

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30800329 and 30700208) and Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 200805111019).

\*Corresponding author. Tel: +86-27-67867221; E-mail: wsh2002505@163.com

病理生理进程, 促进癌症、糖尿病和一些神经系统疾病的发生<sup>[1]</sup>。有研究表明 PARP-1 在神经元发挥正常功能如神经元某些基因的表达、神经元突触可塑性中起着重要的作用, 最新的报道发现部分阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 病人 PARP-1 表达增高, 并认为 PARP-1 和 AD 的发病可能存在一定的相关性<sup>[2]</sup>。但 PARP-1 在 AD 中的作用如何, 还不是十分清楚。

AD 早期的两大病理特征改变包括神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 和老年斑 (senile plaques, SP)<sup>[3]</sup>。NFTs 主要是由过度磷酸化修饰的 tau 蛋白构成, tau 蛋白在 AD 发生、发展中的作用已成为近几年 AD 研究领域的靶蛋白。当 tau 蛋白发生过度磷酸化时, 不易被降解而聚集形成双股螺旋丝 (paired helical filaments, PHFs), 进一步恶化形成 NFTs, 使神经元轴突转运受损, 引发突触丢失和神经元死亡, 从而可能发生 AD 等神经退行性疾病<sup>[4]</sup>。引起 tau 蛋白磷酸化的上游因素主要是蛋白激酶和蛋白酯酶失衡导致的, 而蛋白激酶包括糖原合酶激酶-3 (glycogen synthase kinase 3, GSK-3)、细胞周期依赖性蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 和蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 等。在 AD 病人的脑中发现 tau 蛋白被磷酸化的位点有 40 个, 其中大多数是由 GSK-3 激活所催化的, 包括 tau 蛋白中 17 个丝氨酸和 6 个苏氨酸位点的磷酸化<sup>[5]</sup>。有报道证明 PARP-1 活性升高可以促进 GSK-3 的激活, 而用特异性抑制剂 3-AB 抑制 PARP-1 活性可以显著降低海马和皮层中 GSK-3 (Tyr216) 的磷酸化水平, 降低 GSK-3 的活性<sup>[6]</sup>。还有证据表明 AD 病人脑中 NFTs 周围 PARP-1 的活性增强<sup>[7]</sup>。大量研究表明 PARP-1 抑制剂在脑缺血、脑外伤、帕金森病和亨廷顿病等动物模型中具有一定的治疗作用<sup>[8, 9]</sup>, 而 PARP-1 与 AD 的关系也越来越受到重视, 但两者之间的作用如何尚未可知。根据前期研究, 我们推测 PARP-1 可能通过影响 GSK-3 的活性在 AD 的发生、发展中起到一定的作用。

本实验采用 PARP-1 特异性抑制剂 3-氨基苯甲酰胺 (3-aminobenzamide, 3-AB) 抑制 HEK293/tau441 细胞的 PARP-1 活性, 观察 tau 蛋白总量、Thr231 位点磷酸化和 Ser195/198/199/202 位点非磷酸化的 tau 蛋白水平, 同时检测引起 tau 蛋白磷酸化的可能的上游信号 GSK-3 活性的改变, 进一步明确

PARP-1 与 AD 的关系及可能机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 转入人最长 tau 异构体 cDNA 的人胚肾母细胞瘤细胞 (HEK293/tau441) 由华中科技大学同济医学院病理生理教研室惠赠。PARP-1 抑制剂 3-AB 购自 Sigma 公司, PAR 单克隆抗体 (anti-ADP-ribose Units) 购于 Abcam 公司, tau-1 单克隆抗体 (检测 Ser198/199/202 位点非磷酸化的 tau 蛋白) 购于 Millipore 公司, tau-5 (检测 tau 蛋白的总量) 和 pT231 (检测 Thr231 位点磷酸化的 tau 蛋白) 抗体购于 Invitrogen 公司, GSK-3 多克隆抗体和检测其 Ser9 位点磷酸化的 pGSK-3 抗体均购于 Cell Signaling 公司,  $\beta$ -actin 抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗鼠或羊抗兔的二抗购自武汉飞羿有限公司, 化学发光底物 (enhanced chemiluminescent, ECL) 试剂盒购于 Millipore 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和药物处理** HEK293/tau441 细胞培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中, 用含胎牛血清 (10%) 和 G418 (200  $\mu$ g/mL) 的 DMEM 培养基培养细胞。当细胞长到 70%~80% 时, 进行传代, 将细胞密度调整为 200 个/mL, 接种到六孔板, 每孔的体积为 1.2 mL。实验共分为 6 组, 每组设三个平行样。在 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养箱中培养 2~3 d 后, 更换一半新鲜的培养基并将每孔培养基定容为 1 mL。对照组不作处理; DMSO 组每孔加 4  $\mu$ L 的 DMSO; 实验组分别向孔中加入 0.5、1、2、4 mmol/L 的 3-AB, 药物处理 24 h 后收集样品。

**1.2.2 细胞形态学观察** 药物处理 24 h 后用相差显微镜观察细胞的形态。

**1.2.3 免疫印迹** 收集细胞离心沉淀后, 提取细胞蛋白, 并用 BCA 法测定样品蛋白质浓度。10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后将蛋白质从 SDS-PAGE 凝胶转移至 NC 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入一抗, 4 °C 过夜, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 或兔抗羊 IgG (根据不同的一抗), 37 °C 孵育 1 h, 采用 ECL 试剂盒进行化学发光显影。结果用图像分析软件 (GelScan V5.1) 进行灰度值定量分析。

**1.3 统计学方法** 全部数据均采用 mean  $\pm$  SD 表示, 采用 SPSS 11.0 统计分析软件对数据进行 ANOVA 方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3-AB不影响HEK293/tau441的细胞形态

HEK293/tau441 细胞经过 0.5、1、2、4 mmol/L 3-AB 处理 24 h 后，用相差显微镜观察细胞的形态。结果显示：与对照组相比，不同浓度的 3-AB 处理细胞对 HEK293/tau441 细胞的形态无显著影响 (图 1)。

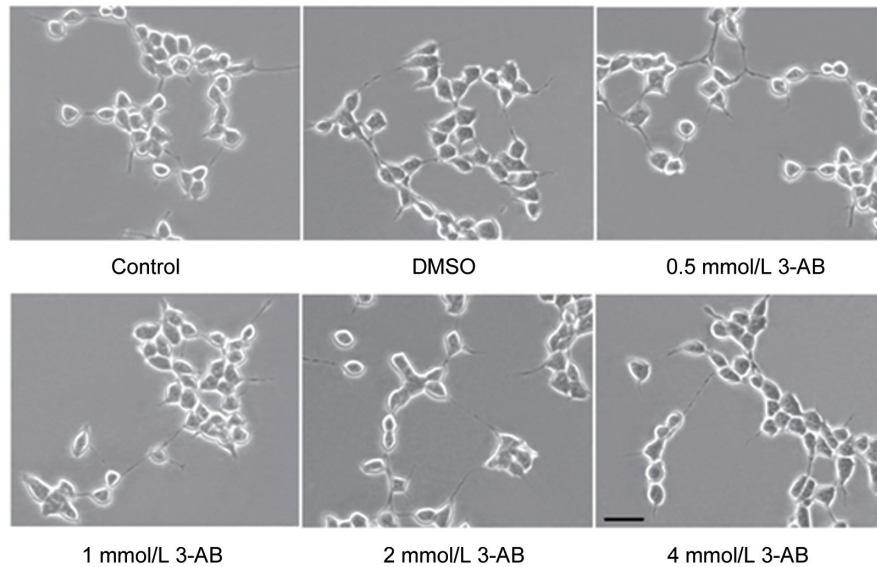


图 1. 用相差显微镜观察不同浓度3-AB处理HEK293/tau441细胞24 h后细胞形态图

Fig. 1. The effect of different doses of 3-AB on cellular morphology of HEK293/tau441 cells. The results showed no obvious difference among different groups. Scale bar, 50  $\mu$ m.

24 h 后，我们用抗体 PAR 检测 ADP-ribose units 的数量，结果显示随着 3-AB 浓度的升高，PARP-1 活性呈剂量依赖性下降，其活性抑制分别为 22%、39%、57%、78%，与对照组相比有明显的差异性，并表现出明显的剂量依赖性 (图 2)。

### 2.3 3-AB对HEK293/tau441细胞tau蛋白不同位点磷酸化影响

HEK293/tau441 细胞经过不同浓度 3-AB 处理 24 h 后，用免疫印迹检测 tau 蛋白磷酸化水平的变化。结果显示：随着 3-AB 浓度的升高，对 tau 蛋白的总量无显著影响 (图 3A)，tau 蛋白位点 Ser195/198/199/202 非磷酸化 (tau-1 显示，图 3B) 水平逐渐上升，tau 蛋白 Thr231 位点的磷酸化水平逐渐下降 (图 3C)。

### 2.4 PARP-1活性抑制对GSK-3水平和活性影响

Tau 蛋白的 tau-1 位点和 Thr231 位点的磷酸化水平与蛋白激酶 GSK-3 密切相关。因此我们检测了 GSK-3 水平和活性的变化。结果显示：3-AB 处

### 2.2 3-AB剂量依赖地抑制HEK293/tau441细胞PARP-1活性

PARP-1 的激活需要对其自身的 poly(ADP-ribose)ylation (PAR) 修饰，而 PAR 的修饰程度与 ADP-ribose units 的数量有关，ADP-ribose units 的数量越多表示其活性越强，反之活性越低。HEK293/tau441 细胞经过 0.5、1、2、4 mmol/L 3-AB 处理

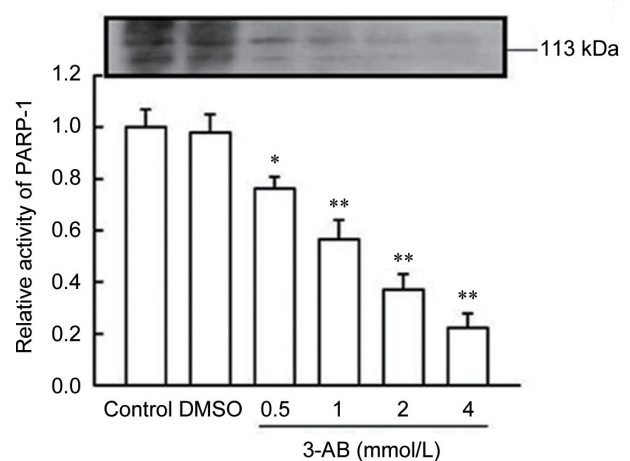


图 2. 不同浓度3-AB对HEK293/tau441细胞PARP-1活性的影响

Fig. 2. The effect of different doses of 3-AB on the activity of PARP-1 in HEK293/tau441 cells. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  as compared to control.

理 24 h 后, GSK-3 总体水平无显著变化 (图 4A), 而 GSK-3 的 Ser9 位点的磷酸化 (非活性形式) 随 3-AB 浓度的升高而增强, 表明 GSK-3 的活性受到抑制 (图 4B)。

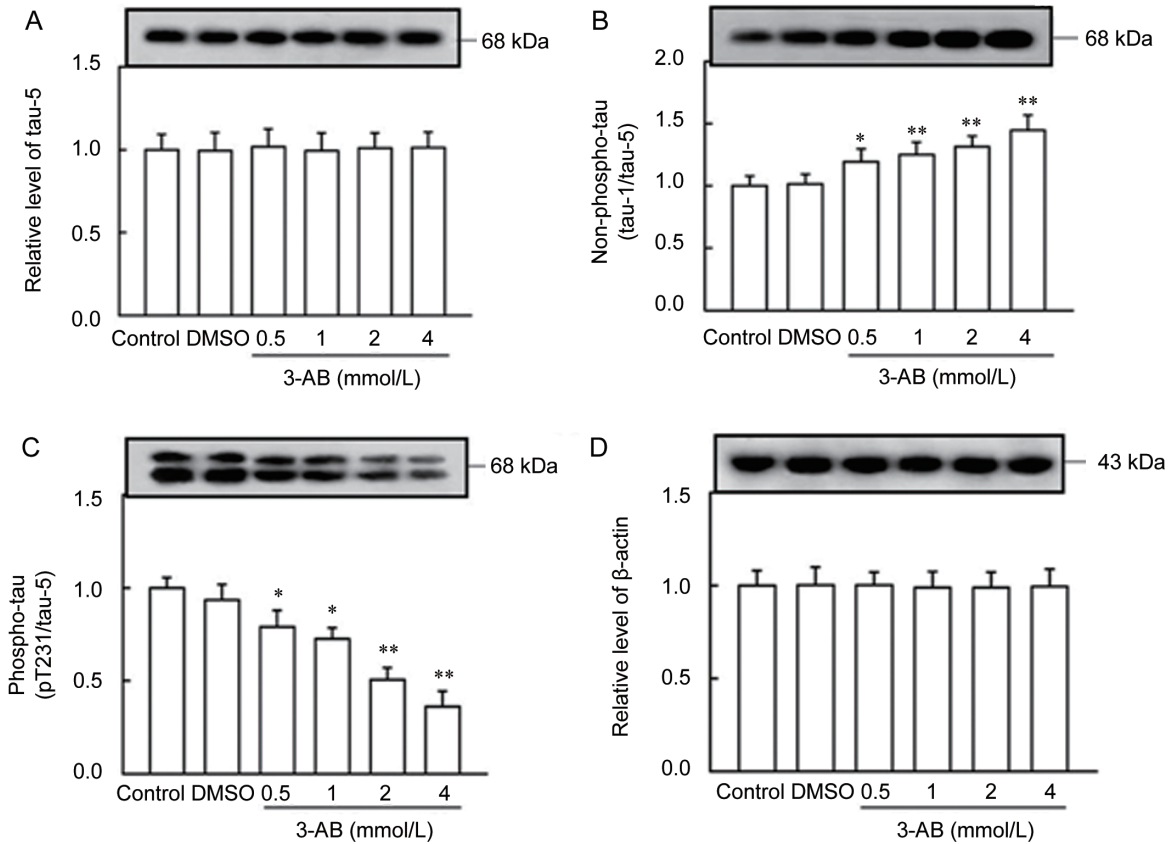


图 3. PARP-1活性抑制后对tau蛋白磷酸化的影响

Fig. 3. The effect of PARP-1 inhibition on the phosphorylated tau. *A*: Immunostaining of the total tau was detected by tau-5 antibody; *B*: Immunostaining of the non-phosphorylated (Ser195/198/199/202) tau detected by tau-1 antibody; *C*: Immunostaining of the phosphorylated (Thr231) tau detected by pT231 antibody; *D*: Immunostaining of the  $\beta$ -actin. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  as compared to control group.

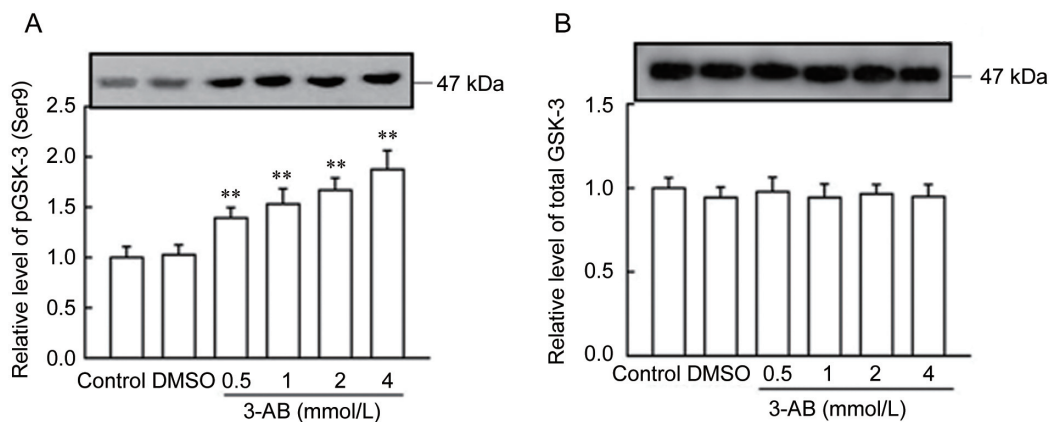


图 4. PARP-1活性抑制对GSK-3水平和活性影响

Fig. 4. The level and activity of GSK-3. *A*: The alteration of the Ser9-phosphorylated GSK-3 (inactivated form of the kinase); *B*: The alteration of the total level of GSK-3. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\* $P < 0.01$  as compared to control group.

### 3 讨论

本实验首先观察了 PARP-1 抑制剂 3-AB 对其活性的影响。结果显示给予特异性抑制剂 3-AB 处理 HEK293/tau441 细胞, PARP-1 的生物活性被抑制。PARP-1 生物活性的发挥是通过对其底物蛋白的 PAR 修饰来实现的, 其中包括对其自身 PAR 修饰。PAR 的修饰程度与 ADP-ribose units 的数量有关, ADP-ribose units 的数量越多活性越强, 反之活性越低<sup>[10]</sup>。随着 3-AB 浓度的升高, ADP-ribose units 的数量下降(图 2), 提示 PARP-1 的活性下降。

AD 的主要病理特征之一是病人脑内出现的大量 NFTs, 其主要由胞内异常过度磷酸化修饰的 tau 蛋白聚集形成 PHFs 组成的<sup>[11]</sup>。NFTs 的数量和病人的痴呆程度呈正相关, 因此, 过度磷酸化的 tau 蛋白在 AD 的发病机制起重要作用。Tau 蛋白有 85 个位点可被磷酸化, 其中在 Ser195/198/199/202 位点和 Thr231 位点的磷酸化在 AD 病人脑中发生最早, 同时与 PHFs 的形成密切相关<sup>[12,13]</sup>。Buerger 等认为 Thr231 位点的磷酸化升高可作为 AD 病的一个诊断标志, 同时也是区分 AD 病与非 AD 病的一个主要特征<sup>[14]</sup>。本实验中采用的 HEK293 细胞本身的 tau 蛋白含量极微, 而转染 tau441 蛋白后, tau 蛋白总量水平升高, 磷酸化水平较正常稍高, 因此常用来作为研究 tau 蛋白磷酸化的一个细胞模型。PARP-1 被抑制后, 我们发现其对总的 tau 蛋白无明显影响(图 3A); 而 Thr231 位点的磷酸化水平下降(图 3C), 非磷酸化水平升高(tau-1 显色结果, 图 3B), 表明 tau 蛋白发生了去磷酸化。

Tau 蛋白的磷酸化水平的改变, 主要是由于细胞内多种蛋白酯酶的去磷酸化和蛋白激酶的促磷酸化失调导致, 其中最重要的蛋白激酶之一是 GSK-3<sup>[15]</sup>。在体内和体外研究结果证明, AD 病人的脑中 GSK-3 表达水平和活性都有增强<sup>[16]</sup>, 也是引起 AD 病人脑中 tau 蛋白异常过度磷酸化的最主要激酶<sup>[17]</sup>。Tau 蛋白的 tau-1、Ser396 和 Thr231 位点的磷酸化与 GSK-3 活性改变有关。Wang 等人发现缺氧导致的 tau 蛋白上述位点的磷酸化是由 GSK-3 引起的<sup>[18]</sup>。有文献报道 3-AB 可抑制 GSK-3 的活性, 在过量的氧化应激中, 用 3-AB 可以抑制大鼠脑内过量的核糖化修饰和 GSK-3 的激活<sup>[19]</sup>。Szanto 等认为 PAR 含量下降, 促进 GSK-3 的上游磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 活性增强, 激活 PKB 信号通路, 进而抑制 GSK-3 的活

性<sup>[20]</sup>。我们推测本实验中 Thr231 位点的磷酸化水平降低可能与 GSK-3 的活性改变有关。进一步的实验结果也证明了该推测, 当我们给予 3-AB 后, 细胞内 PAR 的数量减少, GSK-3 的 Ser9 位点的磷酸化增强, 表明其活性受到抑制(图 4)。

综上所述, 本实验证实 3-AB 可以通过抑制 PARP-1 的活性, 调节 GSK-3 的活性, 降低 HEK293/tau441 细胞 tau 蛋白的磷酸化水平, 这为揭示 AD 的病发机制和治疗靶点提供了新的资料。

### 参考文献

- 1 Kauppinen TM. Multiple roles for poly(ADP-ribose)polymerase-1 in neurological disease. *Neurochem Int* 2007; 50(7-8): 954-958.
- 2 Liu HP, Lin WY, Wu BT, Liu SH, Wang WF, Tsai CH, Lee CC, Tsai FJ. Evaluation of the poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene variants in Alzheimer's disease. *J Clin Lab Anal* 2010; 24(3): 182-186.
- 3 Parihar MS, Hemnani T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J Clin Neurosci* 2004; 11(5): 456-467.
- 4 Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8(9): 663-672.
- 5 Hanger DP, Anderton BH, Noble W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 2009; 15(3): 112-119.
- 6 Songin M, Ješko H, Czapski G, Adamczyk A, Strosznajder RP. GSK-3beta and oxidative stress in aged brain. Role of poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Folia Neuropathol* 2007; 45(4): 220-229.
- 7 Love S, Barber R, Wilcock GK. Increased poly(ADP-ribose)ylation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain* 1999; 122 (2): 247-253.
- 8 Chen QH (陈钦浩), Wang SH. Relationship between poly(ADP-ribose)polymerase-1 and CNS disease. *J Med Mol Biol* (医学分子生物学杂志) 2010; 7(4): 364-367 (Chinese, English abstract).
- 9 Adamczyk A, Ješko H, Strosznajder RP. Alzheimer's disease related peptides affected cholinergic receptor mediated poly(ADP-ribose)polymerase activity in the hippocampus. *Folia Neuropathol* 2005; 43(3): 139-142.
- 10 Visochek L, Steingart RA, Vulih-Shultzman I, Klein R, Priel E, Gozes I, Cohen-Armon M. PolyADP-ribosylation is involved in neurotrophic activity. *J Neurosci* 2005; 25(32): 7420-7428.
- 11 Stoothoff WH, Johnson GV. Tau phosphorylation: physio-

- logical and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1739(2–3): 280–297.
- 12 Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Brain levels of microtubule associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease brain: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* 1992; 59(2): 750–753.
  - 13 Reynolds CH, Betts JC, Blackstock WP, Nebreda AR, Anderton BH. Phosphorylation sites on tau identified by nano-electrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. *J Neurochem* 2000; 74(4): 1587–1595.
  - 14 Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Arai H, DeBernardis J, Kerkman D, McCulloch C, Padberg F, Faltraco F, Goernitz A, Tapiola T, Rapoport SI, Pirttilä T, Möller HJ, Hampel H. Differentiation of geriatric major depression from Alzheimer's disease with CSF tau protein phosphorylated at threonine 231. *Am J Psychiatry* 2003; 160(2): 376–379.
  - 15 Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 1992; 147(1): 58–62.
  - 16 Rankin CA, Sun Q, Gamblin TC. Pre-assembled tau filaments phosphorylated by GSK-3 $\beta$  form large tangle-like structures. *Neurobiol Dis* 2008; 31(3): 368–377.
  - 17 Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP. Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007; 33(1): 43–55.
  - 18 Liu R, Pei JJ, Wang XC, Zhou XW, Tian Q, Winblad B, Wang JZ. Acute anoxia induces tau dephosphorylation in rat brain slices and its possible underlying mechanisms. *J Neurochem* 2005; 94(5): 1225–1234.
  - 19 Palfi A, Toth A, Hanto K, Deres P, Szabados E, Szereday Z, Kulcsar G, Kalai T, Hideg K, Gallyas F Jr, Sumegi B, Toth K, Halmosi R. PARP inhibition prevents postinfarction myocardial remodeling and heart failure via the protein kinase C/glycogen synthase kinase-3beta pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41(1): 149–159.
  - 20 Szanto A, Hellebrand EE, Bognar Z, Tucsek Z, Szabo A, Gallyas F Jr, Sumegi B, Varbiro G. PARP-1 inhibition-induced activation of PI-3-kinase-Akt pathway promotes resistance to taxol. *Biochem Pharmacol* 2009; 77(8): 1348–1357.