

自噬及 Rab9 在阿尔茨海默病神经元变性过程中的作用

陈妍林¹, 李志军², 巴黎², 张旻²

1. 华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院神经内科, 湖北省武汉市 430000

2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科, 湖北省武汉市 430030

摘要:目的 以 12 月龄的 APP^{sw}/PS1^{de} 双转基因小鼠为对象, 研究自噬及 Rab9 在阿尔茨海默病神经元变性过程中的作用。方法 以同窝同龄同性别野生型小鼠脑组织为对照, 采用免疫荧光检测 12 月龄 APP^{sw}/PS1^{de} 转基因小鼠脑组织中 A β 1-16、LC3B 和 Rab9 的表达; 采用 Western Blot 对脑组织中 LC3B-I、LC3B-II 和 Rab9 蛋白表达进行定量分析。结果 12 月龄 APP^{sw}/PS1^{de} 双转基因小鼠的皮质及海马区域有大量典型“有致密核心”的老年斑分布。12 月龄的 APP^{sw}/PS1^{de} 双转基因小鼠脑内 LC3B 和 LC3B-II 的表达较对照组明显增多, 差异具有统计学意义 (LC3B: 0.819 ± 0.034 vs. 0.390 ± 0.047 , $P = 0.0005$; LC3B-II: 0.162 ± 0.004 vs. 0.067 ± 0.001 , $P < 0.0001$)。12 月龄的 APP^{sw}/PS1^{de} 双转基因小鼠脑内 Rab9 呈粗颗粒状, 聚集为“半月形”, 分布于核周区, 与在对照组小鼠脑内分布的形态不同; 但两组在 Rab9 表达水平上差异无统计学意义 (0.481 ± 0.071 vs. 0.508 ± 0.064 , $P > 0.05$)。结论 阿尔茨海默病神经元变性过程中存在自噬诱导的增加和 Rab9 的功能和/或分布异常。

关键词: 阿尔茨海默病; APP^{sw}/PS1^{de} 双转基因小鼠; 自噬; LC3B; Rab9

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2018.01.010

Roles of autophagy and Rab9 in neuronal degeneration of Alzheimer's disease

CHEN Yan-Lin, LI Zhi-Jun, BA Li, ZHANG Min. Department of Neurology, The Central Hospital of WuHan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, WuHan 430000, China

Corresponding author: ZHANG Min, E-mail: 408241998@qq.com

Abstract: Objective To investigate the roles of autophagy and Rab9 in the neuronal degeneration of Alzheimer's disease (AD) using 12-month-old APP^{sw}/PS1^{de} double transgenic mice. **Methods** Immunofluorescence assay was used to measure the expression of A β 1-16, LC3B, and Rab9 in brain tissue of the 12-month-old APP^{sw}/PS1^{de} double transgenic mice, and the brain tissue samples from wild-type mice in the same brood matched for age and sex were used as controls. Western blot was used to measure the protein expression of LC3B-I, LC3B-II, and Rab9 in brain tissue. **Results** Abundant senile plaques with “dense cores” were observed in the cortex and hippocampus of the 12-month-old APP^{sw}/PS1^{de} double transgenic mice. Compared with the control group, the 12-month-old APP^{sw}/PS1^{de} double transgenic mice had significantly higher expression of LC3B and LC3B-II in the brain (LC3B: 0.819 ± 0.034 vs 0.390 ± 0.047 , $P = 0.0005$; LC3B-II: 0.162 ± 0.004 vs 0.0672 ± 0.004 , $P < 0.0001$). In the 12-month-old APP^{sw}/PS1^{de} double transgenic mice, Rab9 had a coarse granular shape and gathered in the perinuclear region of neural cells with a special “half-moon” morphology, which was different from the morphology in the control group; however, there was no significant difference in the expression of Rab9 between the two groups (0.481 ± 0.071 vs 0.508 ± 0.064 , $P > 0.05$). **Conclusions** Increased autophagy induction and dysfunction and/or abnormal distribution of Rab9 are observed in the neuronal degeneration of AD.

Key words: Alzheimer's disease; APP^{sw}/PS1^{de} double transgenic mouse; Autophagy; LC3B; Rab9

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是累及中枢神经系统的神经元变性疾病。细胞外 β 淀粉样蛋白 (amyloid- β , A β) 沉积形成的老年斑是 AD 的核心病理改变之一。大量研究表明, 自噬在

基金项目: 国家自然科学基金 (81271406)

收稿日期: 2017-10-13; 修回日期: 2018-01-11

作者简介: 陈妍林 (1986-), 女, 硕士, 主要从事阿尔茨海默病相关研究。

通信作者: 张旻 (1971-), 女, 博士, 教授, 主要从事神经系统退行性疾病的研究。E-mail: 408241998@qq.com。

细胞内 $A\beta$ 及其前体蛋白 APP (amyloid precursor protein, APP) 的转运、代谢和清除过程中起到了非常重要的作用^[1], 这已成为 AD 神经元变性机制的研究热点。APP 在不同细胞器间的运输及囊泡的融合由 Rab-GTP 酶家族精密调控^[2]。其成员之一的 Rab9 是表达于晚期内体的特异性小分子 GTP 激酶, 参与内体、溶酶体和高尔基复合体间的囊泡运输和信号传导^[3]。研究显示, 选择性自噬的过程也依赖于 Rab9^[4]。但是, 自噬和 Rab9 在 AD 的神经元变性过程中会发生什么样的改变, 迄今为止并没有阐明。故本研究以 12 月龄的 APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠为对象, 采用免疫荧光和 Western Blot 等实验技术对小鼠脑组织内 $A\beta$ 1-16、LC3B 和 Rab9 进行细胞内定位及定量分析, 初步探讨阿尔茨海默病神经元变性过程中自噬及 Rab9 的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 杂合型 APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠 (以下简称转基因小鼠, Tg) 购于美国 Jackson 实验室, 在华中科技大学同济医学院动物中心饲养, 给予高温高压消毒的标准啮齿类动物饲料及饮水, 饲养环境保持 12 h 的明暗周期, 室温 25°C, 湿度 50%。将杂合型 APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠与同系野生型小鼠 (以下简称野生型小鼠, Wt) 交配繁殖传代, 子代小鼠在 2 月龄剪尾进行 PCR 基因型鉴定, 于 12 月龄时, 以同龄同窝同性别野生型小鼠为对照组, 每组 4 只小鼠。

1.1.2 主要试剂及设备 Mouse anti-Human Beta Amyloid ($A\beta$) monoclonal antibody (6E10) 购于 Covance (America) 公司; Rabbit anti LC3B polyclonal antibody 购于 Cell Signaling; Goat anti Rab9A polyclonal antibody 购于 Santa cruz; Alexa Fluor® 594-Donkey anti-mouse IgG、Alexa Fluor® 594-Donkey anti-rabbit IgG 和 Alexa Fluor® 488-Donkey anti-Goat IgG 均购于 Molecular Probes 公司; 正常驴血清 (NDS) 购于联科生物公司; 牛血清白蛋白 (BSA) 购于美国 SIGMA 公司; 冰冻切边修复液 (5×)、DAPI、PMSF、RIPA 裂解液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购于上海碧云天生物技术公司; Western 凝胶试剂盒和 β -actin 抗体均购于武汉博士德生物工程有限公司; ECL 底物液购于 Thermo; 显影定影试剂盒购于武汉巴菲尔生物; PVDF 膜购于 Millipore; 免荧光倒置显微镜购于 OLYMPUS, LEICA 公司; 冰冻切片机购于德国

Leica; 微量加样器购自 Eppendorf 公司; 蛋白电泳仪电源、垂直电泳槽、电转仪和酶标仪均购自 BIO-RAD。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脑组织取材 12 月龄小鼠经腹腔注射氯胺酮麻醉后, 4°C 的 0.01 mol/L 生理盐水心脏灌注, 取脑, 矢状位切开, 左侧半于 4% 多聚甲醛中固定 16 h 后, 梯度沉糖 (顺序经历 10%、20% 和 30% 蔗糖溶液), OCT 包埋后于恒冷箱冰冻切片机冠状位连续冰冻切片, 片厚 20 μ m; 贴于防脱玻片上进行免疫荧光染色。右侧半于 EP 管中称量后用于 Western Blot 蛋白定量分析。

1.2.2 免疫荧光染色 取小鼠冰冻切片晾干后, 经 70% 甲酸室温处理 10 min (仅限于 6E10 染色时), PBS 漂洗后, 冰冻切片修复液 (1×) 于 37°C 抗原修复 25 min, 滴加适量一抗溶液 (稀释比例: 6E10:1:1000; LC3B:1:200; Rab9A:1:100), 于 4°C 过夜孵育, PBS 漂洗后加入二抗溶液 (用 PBS 稀释, Alexa Fluor® 594-Donkey anti-mouse IgG:1:200; Alexa Fluor® 594-Donkey anti-rabbit IgG:1:200; Alexa Fluor® 488-Donkey anti-Goat IgG:1:100), 室温避光孵育 1 h, PBS 漂洗后加入 DAPI (1×) 复染 2 min; PBS 漂洗, 去离子水洗 1 min; 梯度酒精脱水晾干 (100%、95%、80% 和 70%, 各 3 min), 甘油封片, 荧光显微镜下观察拍照。

1.2.3 脑组织 Western Blot 小鼠脑组织加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液 (100:1), 0~4°C 冰水混合物中用 1 ml 玻璃匀浆器进行组织匀浆后, 离心取上清所需蛋白, 测定浓度, 加上样 Buffer, 置于沸水中 10 min, 取 50 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 转移到 PVDF 膜后, 用相应一抗 4°C 孵育过夜 (抗体稀释倍数: LC3B:1:600; Rab9:1:400), PBS 洗 3 次去除多余抗体, 室温孵育二抗 (1:40000 稀释), 通过凝胶成像系统观察结果。

1.3 统计与分析

本研究中所有数据均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 17 统计软件进行统计分析, 两组之间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$, 判断为差异具有统计学意义; Image J 分析 Western Blot 条带灰度值, 计算并统计各蛋白条带相对于 β -actin 条带的灰度值比; 采用 GraphPad Prism 5 制作统计图表。

2 结果

2.1 免疫荧光染色

12 月龄 APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠脑内可见 A β 沉积,可见大量典型的老年斑——有致密核心的神经炎症斑块,主要分布在皮质和海马(图 1)。12 月龄 APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠脑内可见自噬的增加(图 2)。两组小鼠脑内均有 Rab9 的表达,均分布于胞浆中,但二者表达形态有所不同:与对照组比较,12 月龄 APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠脑内 Rab9 呈粗颗粒状,聚集成“半月形”,分布在核周区(图 3)。

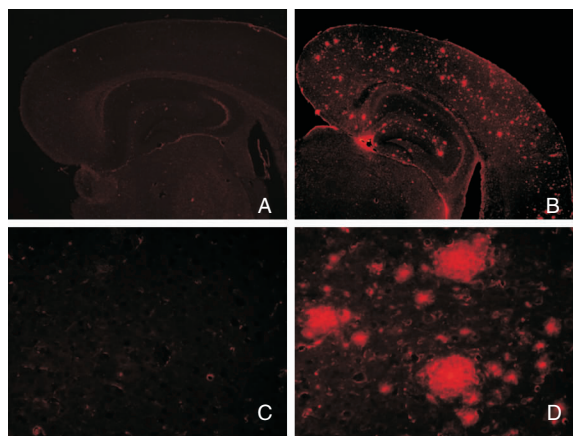


图 1 不同基因型小鼠 6E10 免疫荧光染色结果
注:A:野生型小鼠,×10 倍;B:APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠,×10 倍;C:野生型小鼠,×40 倍;D:APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠,×40 倍。

2.2 Western Blot 结果

LC3B-II 是自噬小体特异性的标志物,该蛋白的表达提示出现了自噬的诱导^[4]。本研究经 Western Blot 发现,虽然在转基因小鼠及野生型小鼠脑内均有 LC3B 表达,但转基因小鼠表达量明显增多(0.819 ± 0.034 vs. 0.390 ± 0.047 , $P = 0.0005$);与对照组相比,APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠脑内 LC3B-II 的表达量明显增高(0.162 ± 0.004 vs. 0.067 ± 0.001 , $P < 0.0001$),表明在 AD 中,存在自噬诱导的增加。本研究发现不同基因型小鼠脑内 Rab9 表达量无统计学差异(0.481 ± 0.071 vs. 0.508 ± 0.064 , $P > 0.05$)。见图 4 和图 5。

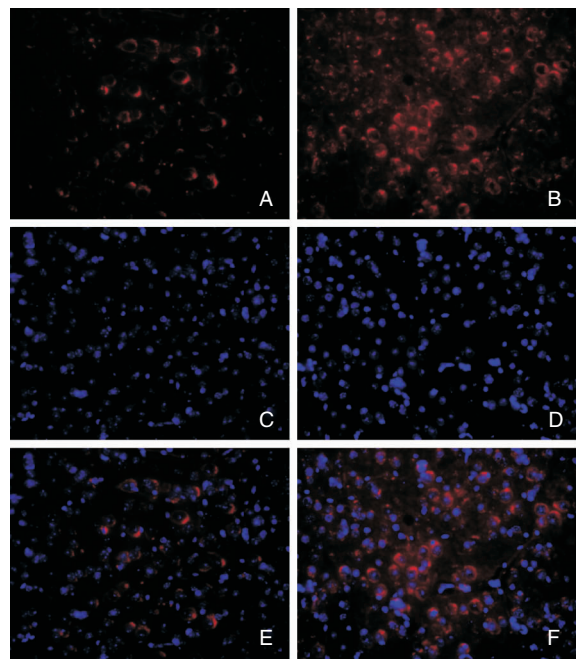


图 2 不同基因型小鼠 LC3B 免疫荧光染色结果,×40 倍
注:A:野生型小鼠 LC3B;B:APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠 LC3B;C:野生型小鼠 DAPI;D:APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠 DAPI;E:野生型小鼠 LC3B-DAPI;F:APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠 LC3B-DAPI。

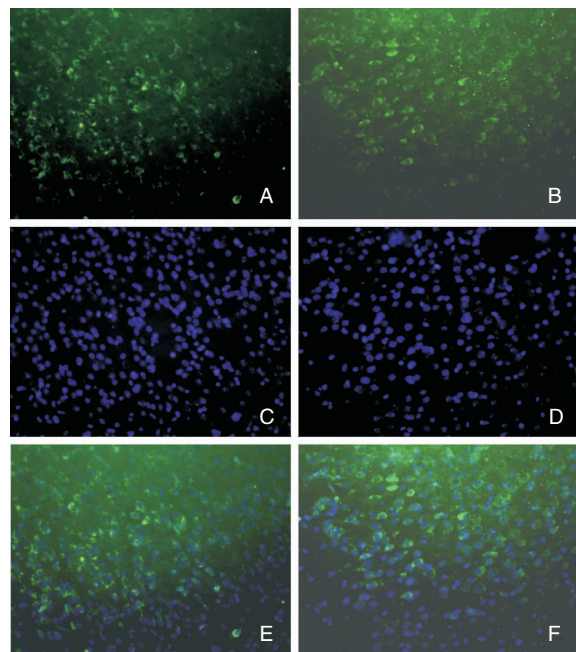


图 3 不同基因型小鼠 Rab9 免疫荧光染色结果,×40 倍
注:A:野生型小鼠 Rab9;B:APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠 Rab9;C:野生型小鼠 DAPI;D:APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠 DAPI;E:野生型小鼠 Rab9-DAPI;F:APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠 Rab9-DAPI。

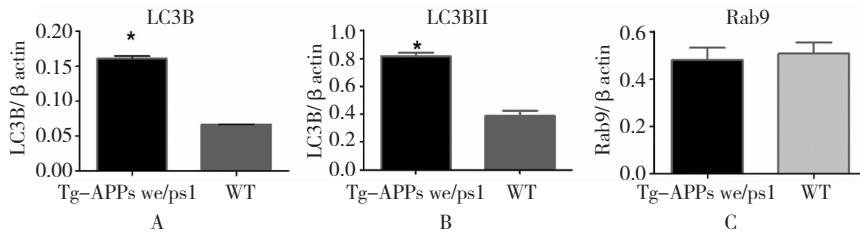


图4 不同基因型小鼠脑内 LC3B、Rab9 表达水平的定量分析

注:A:不同基因型小鼠脑内 LC3B 表达水平比较, $P < 0.05$; B:不同基因型小鼠脑内 LC3BII 表达水平比较, $P < 0.05$; C:不同基因型小鼠脑内 Rab9 表达水平比较, $P > 0.05$; *:转基因小鼠与野生型小鼠比较。

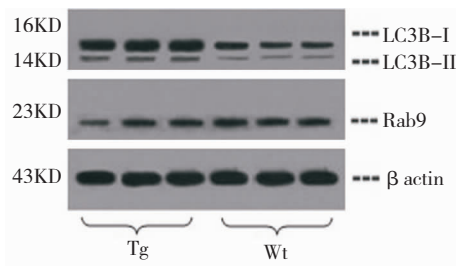


图5 不同基因型小鼠脑内 LC3B、Rab9 和 β -actin 电泳条带图

注:LC3B 条带中分别为 16KD 的 LC3B-I 和 14KD 的 LC3B-II。

3 讨论

本试验中 12 月龄的 APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠在皮质和海马区域出现大量的有“致密核心”的老年斑,说明该小鼠能够在 12 月龄时出现 AD 患者特征性的病理改变,可以用于 AD 的发病机制研究。

本实验发现,APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠脑内 LC3B 表达明显增多,表明在 AD 小鼠脑内有自噬小体的增多。自噬是细胞通过自我吞食 (self-eating) 消除和降解受损、衰老的细胞器和变性蛋白质等生物大分子,为细胞的再生和修复提供原料的过程^[5,6],与细胞正常生理功能的维系密不可分。细胞内 LC3B 主要有两种类型,一种是 LC3B-I,分子量为 16 KD,主要位于细胞质;另外一种为 LC3B-II,分子量 14 KD,定位于自噬小体膜,是自噬小体,尤其是自噬诱导特异性的标记物^[7,8]。在本研究中,我们发现,LC3B 阳性的细胞在 AD 转基因小鼠的新皮质和海马显著增加。进一步的 Western Blot 发现,APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠脑内 LC3B-II 明显增多,说明在 AD 小鼠的大脑中,可能存在自噬诱导的异常激活,导致自噬增加。自噬小体的增多和堆积

是否还与自噬小体的降解受损有关,有待进一步研究。由于 APP 可以在自噬小体中经过 β 和 γ 分泌酶的切割产生 $A\beta$,因此,这些自噬小体将成为 $A\beta$ 的“生成基地”,从而诱导细胞死亡^[6,9]。虽然自噬能清除异常聚集的蛋白,但上调的自噬也促进了 $A\beta$ 有关的病理改变发生。不仅如此, $A\beta$ 能够破坏溶酶体对自噬小体内容物的降解能力,从而形成一个不断放大的恶性循环,加速神经元变性。这些可能是自噬过程参与了 AD 的神经元变性的机制所在。

有研究发现, β 淀粉样蛋白前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 在不同细胞器间的运输及细胞器间囊泡的融合由 Rab-GTP 酶家族精密调控^[2]。其中的成员之一,Rab9 主要分布在晚期内体,少量分布在高尔基体及溶酶体^[9,10]。细胞内的 APP 主要通过以下两种途径代谢^[11]:①自噬途径:细胞内的 APP,被包裹后成为自噬前体结构 (pre-autophagosomal structure, PAS),封闭后形成自噬小体 (autophagosome, AP),在与溶酶体融合成自噬溶酶体 (autophagolysosome, AL),最后经溶酶体降解。②内吞途径:APP 内吞后形成囊泡,经高尔基体介导或直接与早期内体融合,成熟为晚期内体,一部分直接与溶酶体融合而降解另一部分先与自噬小体融合成自噬内体,然后再与溶酶体融合而降解。Rab9 为晚期内体特异性小分子 GTP 激酶^[3],通过参与晚期内体、溶酶体及反式高尔基体网状结构之间的囊泡转运^[12],参与 APP 的代谢调控。正常情况下,新合成的溶酶体酶依赖 6-磷酸甘露糖受体 (mannose-6-phosphate receptors, MPRs) 从高尔基体运输到溶酶体,然后,在 Rab9 和 Tip47 (Rab9 的效应子) 的帮助下,MPRs 从晚期内体送回高尔基体以恢复自身活性^[4,13]。由此推测,Rab9 通过影响自噬途径中溶酶体酶的转运者 MPRs 而影响 APP 代

谢的自噬途径。自噬有依赖 Atg5、Atg7 和 LC3 的传统自噬和依赖 Rab9 的选择性自噬两种^[4,14]。Nishida 等^[4]发现,采用 RNAi 沉默 Rab9 能减慢自噬过程,并且抑制自噬小体的成熟。由此可见,Rab9 在内体和自噬小体的成熟及物质转运和清除过程中起到了关键作用。有研究发现,在神经系统异常变性病 C 型 Niemann-Pick 病(NPC)的细胞和小鼠模型中,虽然 Rab9 的表达水平正常,但大量的 Rab9 被扣留在去磷酸化的中间丝(intermediate filament, IF)波形蛋白(vimentin)中而不能发挥正常的功能,导致 6-磷酸甘露糖受体(MPRs)无法转运出晚期内体而被溶解和囊泡运输障碍,进而出现细胞的死亡^[15-17]。将外源性的 Rab9 过表达于 NPC 的细胞或小鼠模型中可以纠正此时的晚期内体功能障碍,使 NPC 细胞存活增加和小鼠脑内 Tau 蛋白的过度磷酸化减轻,延缓浦肯野神经元的死亡减少和运动功能改善^[18]。NPC 有“少年型 AD”之称,患者脑内可以见到大量神经原纤维缠结和广泛的神经元变性,同时在海马锥体细胞和浦肯野神经元中还能检测到 APP 代谢异常和 A β 42 的沉积^[13],表明该病可能和 AD 具有相同的神经病理信号传递机制。而本研究发现,APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠脑内 Rab9 表达水平虽然与野生型小鼠无显著性差异,但 Rab9 在两种小鼠脑细胞内的分布形态有明显差异。推测在阿尔茨海默病神经元变性过程 Rab9 在细胞内的分布发生了异常改变,从而导致其不能发挥正常功能。这种现象背后的机制值得开展进一步的深入研究加以明确。

APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠较好的体现了 AD 患者的神经病理特点——典型的“有致密核心”老年斑,可用于 AD 发病机制及治疗探索的研究。自噬诱导的增加、Rab9 的功能和/或分布异常可能参与了 AD 的神经元变性过程。

参 考 文 献

- [1] Li Q, Liu Y, Sun M. Autophagy and Alzheimer's Disease [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(3): 377-388.
- [2] Pfeffer SR. Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways [J]. *Mol Biol Cell*, 2017, 28(6): 712-715.
- [3] Kucera A, Bakke O, Progida C. The multiple roles of Rab9 in the endolysosomal system [J]. *Commun Integr Biol*, 2016, 9(4): e1204498.
- [4] Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, et al. Corrigendum: Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy [J]. *Nature*, 2016, 533(7601): 130.
- [5] Karabiyik C, Lee MJ, Rubinshtein DC. Autophagy impairment in Parkinson's disease [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 711-720.
- [6] Zare-Shahabadi A, Masliah E, Johnson GV, et al. Autophagy in Alzheimer's disease [J]. *Rev Neurosci*, 2015, 26(4): 385-395.
- [7] He Y, Zhao X, Subahan NR, et al. The prognostic value of autophagy-related markers beclin-1 and microtubule-associated protein light chain 3B in cancers: a systematic review and meta-analysis [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(8): 7317-7326.
- [8] 周瑾瑕,李东方,毕方方.自噬在 Duchenne 型肌营养不良中的研究 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2017, 44(4): 365-369.
- [9] Tam JH, Seah C, Pasternak SH. The Amyloid Precursor Protein is rapidly transported from the Golgi apparatus to the lysosome and where it is processed into beta-amyloid [J]. *Mol Brain*, 2014, 7: 54.
- [10] Junaid M, Muhseen ZT, Ullah A, et al. Molecular modeling and molecular dynamics simulation study of the human Rab9 and RhoBTB3 C-terminus complex [J]. *Bioinformation*, 2014, 10(12): 757-763.
- [11] Nixon RA, Yang DS. Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect [J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 43(1): 38-45.
- [12] Szatmari Z, Sass M. The autophagic roles of Rab small GTPases and their upstream regulators: a review [J]. *Autophagy*, 2014, 10(7): 1154-1166.
- [13] Cermak S, Kosicek M, Mladenovic-Djordjevic A, et al. Loss of Cathepsin B and L Leads to Lysosomal Dysfunction, NPC-Like Cholesterol Sequestration and Accumulation of the Key Alzheimer's Proteins [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0167428.
- [14] Shimizu S, Arakawa S, Nishida Y. Autophagy takes an alternative pathway [J]. *Autophagy*, 2010, 6(2): 290-291.
- [15] Pu J, Guardia CM, Keren-Kaplan T, et al. Mechanisms and functions of lysosome positioning [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(23): 4329-4339.
- [16] Ganley IG, Pfeffer SR. Cholesterol accumulation sequesters Rab9 and disrupts late endosome function in NPC1-deficient cells [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(26): 17890-17899.
- [17] Ng EL, Gan BQ, Ng F, et al. Rab GTPases regulating receptor trafficking at the late endosome-lysosome membranes [J]. *Cell Biochem Funct*, 2012, 30(6): 515-523.
- [18] Kaptzan T, West SA, Holicky EL, et al. Development of a Rab9 transgenic mouse and its ability to increase the lifespan of a murine model of Niemann-Pick type C disease [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(1): 14-20.