

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002904

不同月龄 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠
海马神经元线粒体的动态变化李世杰¹, 唐 俐¹, 周凡琳², 熊晓敏¹, 张 雄¹, 李 昱²

(1. 重庆医科大学基础医学院病理学与病理生理学教研室, 重庆 400016; 2. 重庆大学附属肿瘤医院病理科, 重庆 400030)

【摘要】目的:检测不同月龄 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型小鼠海马神经元中线粒体自噬的动态变化,并探讨其意义。**方法:**选取 20 只雄性 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠为研究对象,分为 3 月龄组、6 月龄组、9 月龄组和 12 月龄组,以 C57 小鼠为对照组。获取海马组织,通过电镜观察海马区神经元中线粒体的形态变化,用 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3 和 P62 的表达水平;线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin 和 Miro1 的表达水平;线粒体外膜蛋白 Tom20 的表达水平。**结果:**电镜观察结果显示:随着月龄增大,APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马区神经元中线粒体损伤的病理变化呈逐渐加重的过程,即线粒体明显水肿、透明,嵴排列不规则,断裂,甚至消失。Western blot 结果显示,与野生小鼠组比较,LC3、P62、PINK1 和 Parkin 蛋白表达水平在 6 月龄组、9 月龄组和 12 月龄组小鼠中明显增高($P<0.05$),而 Miro1 蛋白却明显降低($P<0.05$),Tom20 的表达水平无明显差异($P>0.05$)。**结论:**随着 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠月龄的增加,其海马区神经元线粒体病理改变呈动态,线粒体自噬呈动态增强但伴随线粒体清除障碍。

【关键词】AD 小鼠;不同月龄;海马;线粒体**【中图分类号】**R363.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2021-04-30

Dynamic changes of hippocampal neuron mitochondria in APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease mice at different months

Li Shijie¹, Tang Li¹, Zhou Fanlin², Xiong Xiaomin¹, Zhang Xiong¹, Li Yu²

(1. Teaching and Research Section of Pathology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University; 2. Department of Pathology, Affiliated Tumor Hospital of Chongqing University)

【Abstract】Objective: To detect the dynamic changes of mitochondria in hippocampal neurons of APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease (AD) mice at different months and explore its significance. **Methods:** Twenty male APP/PS1 double transgenic AD mice were selected and divided into 3-month-old group, 6-month-old group, 9-month-old group and 12-month-old group, with C57 mice as the control group. The morphological changes of mitochondria in hippocampal neurons were observed by electron microscope. Western blot was used to detect the expression levels of autophagy-related proteins LC3 and P62, the expression levels of mitochondrial autophagy-related proteins PINK1, Parkin and Miro1, and the expression levels of mitochondrial outer membrane protein Tom20. **Results:** Electron microscopy study showed that the pathological changes of mitochondria damage in hippocampus neurons of APP/PS1 double transgenic AD mice were gradually aggravated with the increase of months, namely that, mitochondria showed obviously edema, transparent and irregularly arranged, broken or even disappeared cristae. Western blot results showed that compared with the wild mouse group, the expression levels of LC3, P62, PINK1 and Parkin protein were significantly increased in 6-month-old, 9-month-old and 12-month-old mice ($P<0.05$), while Miro1 protein was significantly decreased ($P<0.05$), and the expression level of Tom20 had no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusion:** With the increase of age, the pathological changes of mitochondria

in hippocampal neurons are dynamic in APP/PS1 double transgenic AD mice. Mitophagy is dynamically enhanced but accompanied by mitochondrial clearance obstacles.

【Key words】Alzheimer's disease mice; different months; hippocampus; mitochondrion

作者介绍: 李世杰, Email: 385108617@qq.com,

研究方向: 阿尔茨海默病的发生发展机制及药物防治的机制。

通信作者: 李 昱, Email: liyu100@cqu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81671261); 重庆市自然科学基金资助项目(编号: cstc2017jcyjAX0050)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20211015.1248.004.html>
(2021-10-18)

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性认知功能障碍和记忆力损伤为主要临床表现的神经退行性疾病,其病因多种多样,发病机制也十分复杂^[1]。研究发现,多种细胞器的异常变化(如线粒体异常)参与了 AD 的发生发展过程^[2]。线粒体是“能量工厂”,所有的生命活动都离不开线粒体产生的能量,健康和功能活跃的线粒体对细胞功能至关重要^[3]。与其他器官相比,大脑是一个对能量高需求的器官,它对线粒体功能情况十分敏感,不易耐受^[4]。在 AD 中,由于缺少组蛋白的保护,神经元中线粒体更容易受到损伤^[5];受损后会导致物质代谢紊乱,从而引起神经元死亡,并促进 AD 等相关神经退行性疾病发生^[6]。因此线粒体的功能障碍在 AD 发病中起核心作用^[7]。

自噬是细胞内的一种溶酶体降解途径,当细胞内产生破损的细胞器和损坏的蛋白时被吞噬泡所包裹形成自噬体,送入溶酶体融合为自噬溶酶体进行降解并得以循环利用^[8]。线粒体自噬是自噬的一种,是指细胞清除损伤或衰老的线粒体并加以利用的过程^[9]。

线粒体自噬的调节主要通过 PINK1-Parkin-Miro 途径实现。PINK1 定位于线粒体外层膜,是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。Parkin 定位在细胞质中,是一种 E3 泛素连接酶^[10]。Miro 蛋白主要定位于线粒体外膜上,含有 2 个串联的“EF 手”结构域和 2 个不相同的 GTP 酶结构域^[11]。线粒体受损后,PINK1 激活 Parkin 介导 Miro 形成复合物,导致 Miro 磷酸化并泛素化降解,使受损线粒体脱离微管,介导线粒体自噬发生^[12]。研究表明,在 AD 患者大脑的神经元内自噬/溶酶体途径发生障碍^[25],导致受损线粒体的清除发生障碍,异常线粒体累积增多;反过来又进一步造成线粒体自噬障碍,进入恶性循环,最终导致神经元死亡^[13]。

AD 中自噬和线粒体功能障碍研究较多,但线粒体自噬通路的动态变化 PINK1/Parkin/Miro 报道较少,因此线粒体的损伤引发线粒体自噬通路 PINK1/Parkin/Miro 的动态变化还有待进一步研究。本课题旨在动态观察不同月龄组 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠的海马区内神经元中线粒体的损伤情况、线粒体自噬的堆积水平和其标志通路 PINK1/Parkin/Miro 的蛋白表达水平,进一步明确 AD 中的线粒体损伤以及线粒体自噬之间的动态变化,为其治疗提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 24 只雄性转基因 AD 小鼠 B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9})85Dbo/j 品系双转基因小鼠 Tg2576 购自南京大学模式动物研究所,具有南京大学开具的实验动物质量合格证和出县境动物检疫合格证明。购买后的小鼠饲养于重庆医科大学动物实验中心 SPF 级代养室内,温度维持在 (25 ± 1) °C,每天给予 12 h 的光照和 SPF 级饲料和水。

1.1.2 实验试剂 Gluta 固定液购自重庆木天生物科技有限公司;812 环氧树脂包埋套装 (GP18010)、醋酸双氧钨 (GS02624)和柠檬酸铅染液 (GZ02616)购自北京中镜科技技术有限公司;四氧化锇 (GP18456)购自徕卡公司;甲醇、乙腈、乙酸铵、氨水和超纯水由重庆医科大学神经科学研究中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 获取海马组织 将小鼠用 4%的水合氯醛麻醉,剪开胸腔,暴露心脏,缓慢灌注生理盐水 15 mL,迅速取下大脑,剥离海马组织置于超低温冰箱中。

1.2.2 透射电镜 将冻存在超低温冰箱中的海马组织经 3%戊二醛预固定,1%四氧化锇再固定,丙酮逐级 (30%→50%→70%→80%→90%→95%→100%)脱水后放入含有不同比例 (3:1, 1:1, 1:3)的脱水剂和环氧树脂 (型号为 Epon812)渗透液中 30~60 min。渗透完毕后,将样品块放到适当模具中包埋,并用超薄切片机制备约 50 nm 的超薄切片,捞至铜网。先用醋酸铀染色 10~15 min,再用枸橼酸铅染色 1~2 min,室温下染色, JEM-1400PLUS 透射电镜观察。

1.2.3 Western blot 按照全蛋白提取液说明书提取海马组织蛋白,用 BCA 方法测浓度并调整其浓度为 20 mg/mL。蛋白原液与 5 × 蛋白上样缓冲液按 25:1 混合置于金属浴 100 °C 加热 5 min 使蛋白变性,在 8%~10%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,采用湿转将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上,脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入相应一抗 4 °C 冰箱过夜,洗脱后加入对应二抗室温孵育 30 min,采用快速显影法在凝胶成像仪上进行显影。采用 Image J 进行条带分析。

1.3 统计学处理

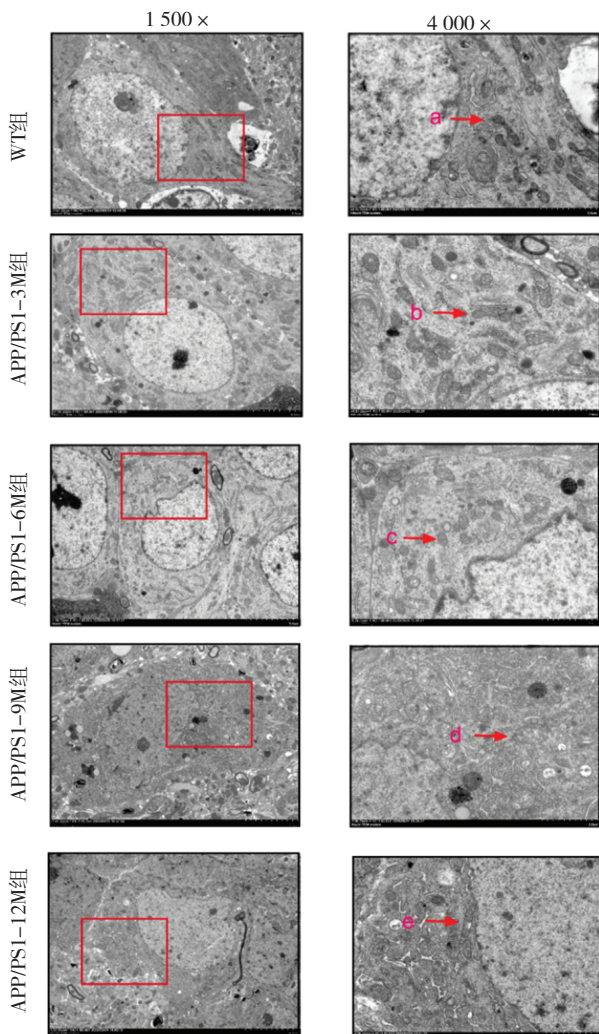
采用 SPSS 26.0 进行统计学分析。所有数据均以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 透射电镜检测结果

透射电镜观察发现,在 WT 组海马区神经元中线粒体清晰可见,数目和形态结构正常,基质均匀,充满致密排列且规则分布的嵴 (箭头 a 所示),未见线粒体自噬现象。APP/PS1-

3M 组海马神经元中依然可见清晰线粒体,其数目和结构正常,致密排列且规则分布的嵴(箭头 b 所示),未见线粒体自噬现象;而在 APP/PS1-6M 组海马神经元线粒体体积增大、肿胀,基质密度下降(箭头 c 所示),数量减少,可见明显自噬现象;APP/PS1-9M 组线粒体体积明显增大、肿胀,基质密度进一步下降,呈透明状,嵴排列紊乱、断裂(箭头 d 所示),数量减少,有明显的自噬现象和自噬体堆积;APP/PS1-12M 组可见线粒体明显水肿,嵴断裂甚至消失(箭头 e 所示),数量较少,明显可见自噬现象和自噬体堆积(图 1)。



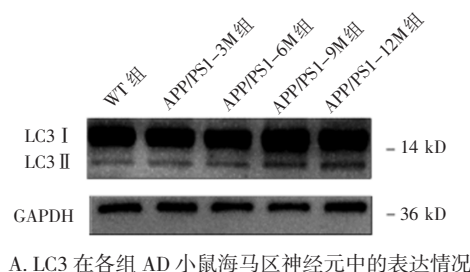
注:箭头 a 及红色方框,未见线粒体自噬现象;箭头 b 及红色方框,未见线粒体自噬现象;箭头 c 及红色方框,可见明显自噬现象;箭头 d 及红色方框,有明显的自噬现象和自噬体堆积;箭头 e 及红色方框,明显可见自噬现象和自噬体堆积

图 1 不同月龄 AD 小鼠海马区神经元线粒体的动态变化

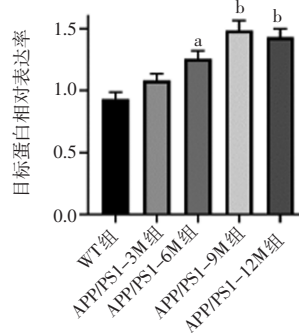
2.2 Western blot 检测结果

2.2.1 AD 小鼠海马区自噬障碍加重 利用 Western blot 检测实验组海马区的自噬功能。LC3 是自噬水平的标记蛋白, P62 是自噬底物的标记蛋白。Western blot 结果显示,与 WT 组相比,APP/PS1-3M 组的 LC3 II 蛋白表达量与 GAPDH 相

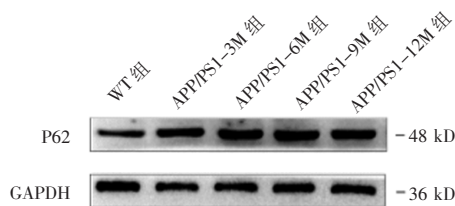
比有所增加但无统计学意义($P>0.05$);APP/PS1-6M 组、APP/PS1-9M 组和 APP/PS1-12M 组 LC3 II 蛋白的表达量与 GAPDH 相比明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 2A、B)。与 WT 组相比,APP/PS1-3M 组、APP/PS1-6M 组、APP/PS1-9M 组和 APP/PS1-12M 组 P62 蛋白的表达量明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 2C、D)。这些结果表明在月龄大的 AD 小鼠海马区神经元自噬水平加强,而 P62 累积,自噬过程发生了障碍(图 2)。



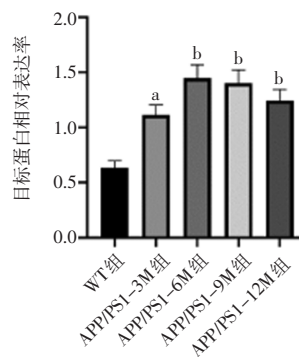
A. LC3 在各组 AD 小鼠海马区神经元中的表达情况



B. LC3 在各组 AD 小鼠海马区神经元中的表达情况的统计学分析



C. P62 在各组 AD 小鼠海马区神经元中的表达情况



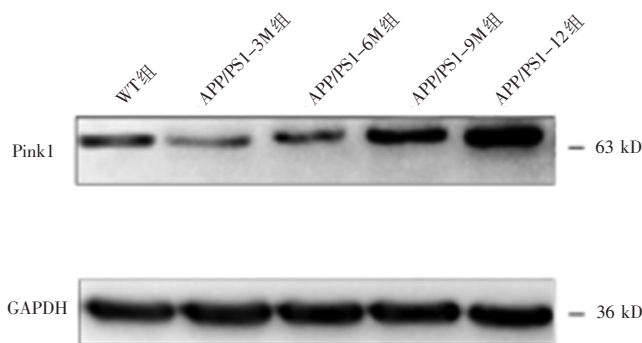
D. P62 在各组 AD 小鼠海马区神经元中的表达情况

注:a,与 WT 相比较, $P<0.05$;b:与 WT 相比较, $P<0.01$

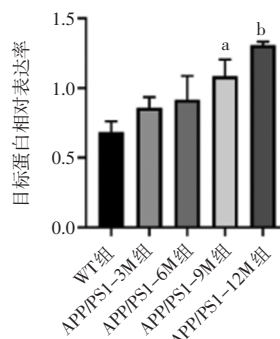
图 2 AD 小鼠海马区自噬障碍的动态变化

2.2.2 AD 小鼠海马区线粒体自噬增强 自噬水平在 AD 小鼠海马区神经元有明显增加,那线粒体自噬水平如何呢? 为了探究线粒体自噬水平,依然利用 Western blot 检测线粒体自噬相关蛋白 PINK1、Parkin 和 Miro1 的表达水平。与 WT 组相比,APP/PS1-3M 组和 APP/PS1-6M 组中的 PINK1 蛋白的表达量无统计学差异 ($P>0.05$);APP/PS1-9M 组和 APP/PS1-12M 组中 PINK1 蛋白表达量明显增强,差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 3A、B)。与 WT 组相比,APP/PS1-3M 组中的

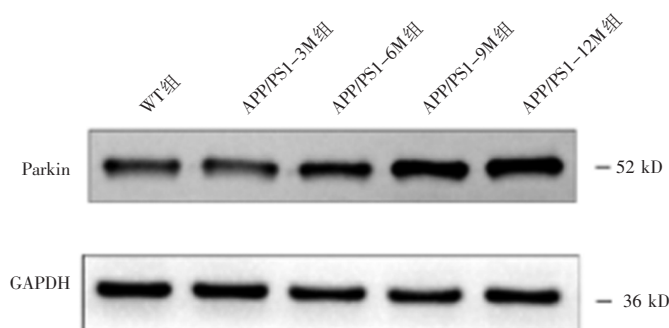
Parkin 蛋白表达量无统计学差异 ($P>0.05$);APP/PS1-6M 组、APP/PS1-9M 组和 APP/PS1-12M 组中 Parkin 蛋白表达量明显增强,差异有统计学意义 ($P<0.01$) (图 3C、D)。与 WT 组相比,APP/PS1-3M 组中的 Miro1 蛋白表达量无统计学差异 ($P>0.05$);APP/PS1-6M 组、APP/PS1-9M 组和 APP/PS1-12M 组中 Miro1 蛋白的表达量明显降低,差异有统计学意义 ($P<0.01$) (图 3E、F)。以上结果表明线粒体自噬随 APP/PS1 月龄增大逐渐加强(图 3)。



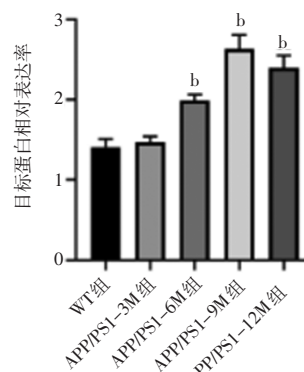
A. PINK1 在各组 AD 小鼠海马区神经元中的表达情况



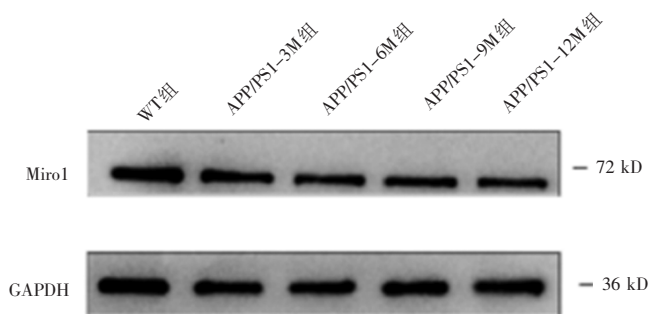
B. PINK1 在各组 AD 小鼠海马区神经元中的表达情况的统计学分析



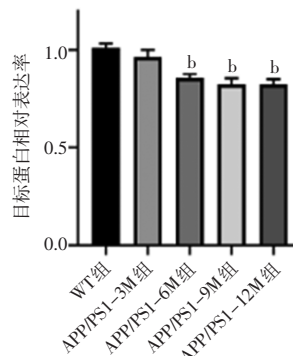
C. Parkin 在各组 AD 小鼠海马区神经元中的表达情况



D. Parkin 在各组 AD 小鼠海马区神经元中的表达情况



E. Miro1 在各组 AD 小鼠海马区神经元中的表达情况



F. Miro1 在各组 AD 小鼠海马区神经元中的表达情况的统计学分析

注:a,与 WT 组相比较, $P<0.05$;b:与 WT 组相比较, $P<0.01$

图 3 AD 小鼠海马区线粒体自噬水平增强

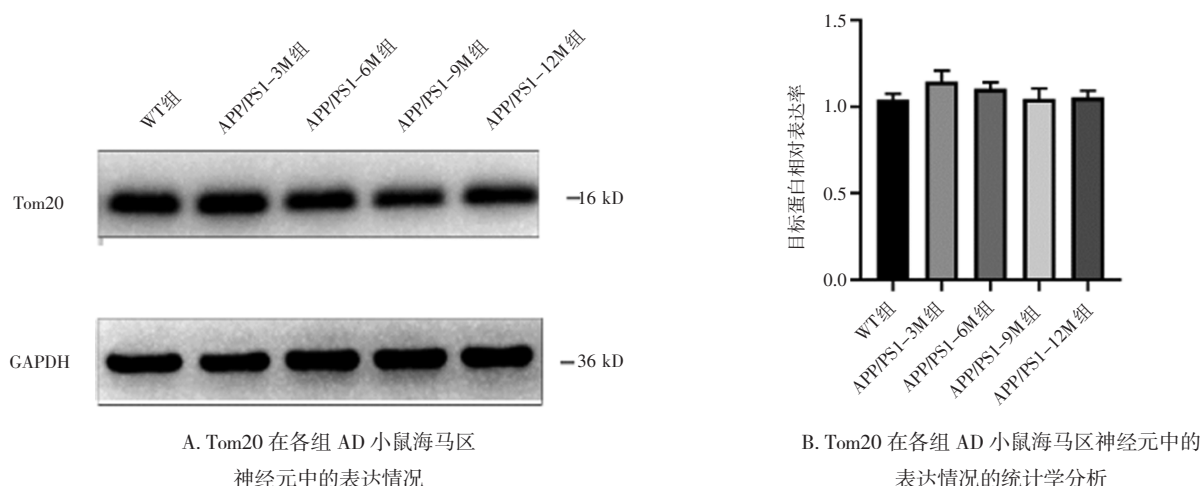


图 4 AD 小鼠海马区线粒体外膜蛋白表达无差异

2.2.3 AD 小鼠海马区线粒体受损清除障碍 上述结果提示自噬在加强,但海马区自噬过程却受障碍。为了探究线粒体的清除情况,利用 Western blot 检测线粒体外膜标记蛋白 Tom20 的表达水平。与 WT 组相比,APP/PS1-3M 组、APP/PS1-6M 组、APP/PS1-9M 组和 APP/PS1-12M 组 Tom20 蛋白的表达量无统计学差异($P>0.05$)(图 4A、B)。这一结果说明受损的线粒体并没有得到有效清除(图 4)。

3 讨论

目前 AD 最常用的体内模型是 APP^{swe}/PS1 Δ E9 双转基因鼠,这种转基因小鼠可以稳定表达 A β 的前体蛋白 APP,APP 通过降解生成不溶性 A β ,并且随月龄的增大其 APP 表达水平越高,A β 的聚积也增多^[14]。

海马区是大脑学习和记忆的关键区域,越来越多的证据表明,在 AD 早期,海马区神经元就已经发生形态和功能的改变^[15]。线粒体是神经元的关键细胞器,线粒体在支持突触功能以及突触应激中起关键作用^[16]。研究证实线粒体形态和功能受损很早就出现在 AD 患者的神经元内,形态变化主要表现为线粒体数量百分比降低、线粒体形状更短更宽、双层膜结构的消失、内膜背嵴的不规则改变和基质的水肿等^[17]。在本研究中,电镜显示了不同月龄 APP/PS1 双转基因小鼠海马区的神经元中线粒体的形态变化,结果显示随着其月龄的增长,线粒体体积逐

渐增大、肿胀,嵴也逐渐发生断裂,数量减少甚至消失。这与之前的研究结果一致^[8]。

为了进一步明确线粒体损伤与自噬之间的关系,通过 Western blot 检测经典线粒体自噬途径 PINK1/Parkin/Miro 的表达水平^[18]。PINK1 在实验组 9 月龄和 12 月龄时表达水平明显升高;Parkin 在实验组 6 月龄、9 月龄和 12 月龄时表达水平明显升高;Miro 在实验组 6 月龄、9 月龄和 12 月龄时表达水平明显降低。表明线粒体自噬途径 PINK1/Parkin/Miro 有效激活并发挥生物学效应。虽然 PINK1/Parkin/Miro 有效激活,但通过透射电子显微镜观察到实验组 9 月龄有明显的自噬体堆积,受损线粒体并没有被有效清除。这是由于溶酶体降解途径异常引起的。采用 Western blot 检测自噬标记物 LC3、自噬底物 P62 和线粒体外膜标记物 Tom20^[19]。本实验中,LC3 在实验组 6 月龄、9 月龄和 12 月龄时表达水平明显升高;P62 在实验组 6 月龄、9 月龄和 12 月龄时表达水平明显升高,累积趋势却下降;Tom20 在实验组中没有明显变化。

以上结果表明实验组 6 月龄后线粒体损伤逐步加重,机体的自噬逐渐加强,线粒体自噬也逐渐加强,但溶酶体降解途径发生障碍,最终导致损伤的线粒体没有被有效清除,其自噬的清除作用已经无法满足线粒体的损伤累积。为什么会产生这样的结果呢?本实验研究认为线粒体受损导致其功能障

碍,导致其 ATP 产生不足,使机体的能量得不到有效补给,又进一步加重其自噬降解障碍。可能的机制是线粒体损伤不能产生足量的中间酶进行三羧酸能量转化,最后导致 ATP 生产不足,机体不能进行有效生命活动,包括 A β 和受损线粒体的清除,最终导致 AD 的发展。

综上所述,AD 转基因小鼠随着月龄的增加,海马区神经元线粒体出现动态化损伤,从而引发线粒体自噬的动态增强,但由于 AD 小鼠自身自噬功能的障碍,最终导致损伤线粒体累积。本课题就 AD 小鼠海马区线粒体和线粒体功能做了动态观察,进一步阐述了 AD 疾病的发展与线粒体之间的关系,ATP 生产不足与能量代谢密不可分,接下来将探讨 AD 小鼠海马区 ATP 变化与相关代谢途径之间的关系,为治疗 AD 提供新的见解。

参 考 文 献

- [1] Vaz M, Silvestre S. Alzheimer's disease; recent treatment strategies[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 887: 173554.
- [2] Kosel F, Pelley JMS, Franklin TB. Behavioural and psychological symptoms of dementia in mouse models of Alzheimer's disease-related pathology[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2020, 112: 634–647.
- [3] Sorrentino V, Menzies KJ, Auwerx J. Repairing mitochondrial dysfunction in disease[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2018, 58: 353–389.
- [4] Weidling IW, Swerdlow RH. Mitochondria in Alzheimer's disease and their potential role in Alzheimer's proteostasis[J]. *Exp Neurol*, 2020, 330: 113321.
- [5] Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(2): 514–519.
- [6] Shevtsova EF, Vinogradova DV, Neganova ME, et al. Mitochondrial permeability transition pore as a suitable target for neuroprotective agents against Alzheimer's disease[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2017, 16(6): 677–685.
- [7] Pradeepkiran JA, Reddy PH. Defective mitophagy in Alzheimer's disease[J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 64: 101191.
- [8] Agrawal I, Jha S. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease; role of microglia[J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12: 252.
- [9] Kerr JS, Adriaanse BA, Greig NH, et al. Mitophagy and Alzheimer's disease: cellular and molecular mechanisms[J]. *Trends Neurosci*, 2017, 40(3): 151–166.
- [10] Seirafi M, Kozlov G, Gehring K. Parkin structure and function[J]. *FEBS J*, 2015, 282(11): 2076–2088.
- [11] Klosowiak JL, Focia PJ, Chakravarthy S, et al. Structural coupling of the EF hand and C-terminal GTPase domains in the mitochondrial protein Miro[J]. *EMBO Rep*, 2013, 14(11): 968–974.
- [12] Di Rita A, Peschiaroli A, Acunzo PD, et al. HUWE1 E3 ligase promotes PINK1/PARKIN-independent mitophagy by regulating AM-BRA1 activation via IKK α [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3755.
- [13] Reddy PH, Oliver DM. Amyloid beta and phosphorylated tau-induced defective autophagy and mitophagy in Alzheimer's disease[J]. *Cells*, 2019, 8(5): 488.
- [14] Dawson TM, Golde TE, Lagier-Tourenne C. Animal models of neurodegenerative diseases[J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(10): 1370–1379.
- [15] Mu Y, Gage FH. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2011, 6: 85.
- [16] Guo L, Tian J, Du H. Mitochondrial dysfunction and synaptic transmission failure in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57(4): 1071–1086.
- [17] Cadonic C, Sabbir MG, Albensi BC. Mechanisms of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(9): 6078–6090.
- [18] Narendra DP, Jin S M, Tanaka A, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin[J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(1): e1000298.
- [19] Zhang WW, Feng C, Jiang H. Novel target for treating Alzheimer's diseases: crosstalk between the Nrf2 pathway and autophagy[J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 65: 101207.

(责任编辑:冉明会)