

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002882

姜黄素通过增强 Rab7 的表达促进 N2a/APP695swe 细胞中的自噬流

康清梅¹, 梁洁¹, 周凡琳¹, 张雄², 李昱¹

(重庆医科大学 1. 基础医学院病理学教研室; 2. 神经科学研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察姜黄素(curcumin)对稳定表达 APP695swe 的 Neuro-2a 小鼠脑神经瘤细胞(N2a/APP695swe)中自噬流的作用;再进一步深入探讨其作用于 N2a/APP695swe 细胞中自噬流的可能机制。**方法:**首先将细胞分成 4 组:野生型对照组(WT组)、空白对照组(Control 组)、溶剂对照组(Sham 组)、姜黄素组(Curcumin 组)。透射电镜观察各组中自噬体形态特点,Western blot 检测 p62 和 LC3 II 的表达;并分别运用 Western blot 及免疫荧光检测 Rab7 蛋白表达,实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测 Rab7 mRNA 表达。在 N2a/APP695swe 细胞中分别过表达及沉默 Rab7 后,将细胞分成 5 组:Control 组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-Rab7 组、NC-siRNA 组和 Rab7-siRNA 组。再运用透射电镜观察各组自噬体形态特点,Western blot 检测 p62 和 LC3 II 蛋白表达。**结果:**经姜黄素处理后,透射电镜观察到细胞中的自噬体主要为单层膜结构的自噬溶酶体,同时,自噬活性关键性蛋白 LC3 II 的表达增加($P=0.000$),而自噬底物蛋白 p62 的表达减少($P=0.000$);Rab7 在蛋白水平及 mRNA 水平均明显升高($P=0.000, 0.000$)。过表达 Rab7 后,自噬体主要为单层膜结构的自噬溶酶体,p62 蛋白表达明显减少($P=0.000$),LC3 II 蛋白表达无明显变化($P=0.669$)。沉默 Rab7 后,自噬体主要为双层膜结构的早期自噬体形态,p62 蛋白表达明显增加($P=0.000$),LC3 II 蛋白表达无明显变化($P=0.622$)。**结论:**姜黄素促进 N2a/APP695swe 细胞中的自噬流,其作用机制可能与增强 Rab7 表达有关。

【关键词】阿尔茨海默病;姜黄素;自噬流;Rab7**【中图分类号】**R741.02**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2021-04-20

Curcumin stimulates autophagy flux via enhancing the expression of Rab7 in N2a/APP695swe cells

Kang Qingmei¹, Liang Jie¹, Zhou Fanlin¹, Zhang Xiong², Li Yu¹

(1. Teaching and Research Section of Pathology; 2. Neuroscience Research Center, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the effect of curcumin on autophagic flux in Neuro-2a mouse brain neuroma cells of expressing APP695swe stably (N2a/APP695swe) and explore the potential mechanism. **Methods:** Firstly, cells were divided into 4 groups: wild type group (WT), blank control group (Control), solvent control group (Sham) and curcumin group (Curcumin). Transmission electron microscopy (TEM) was performed to observe the morphological characteristics of autophagosomes in each group, Western blot was used to test the expressions of p62 and LC3 II proteins. Meanwhile, Western blot and immunofluorescence staining were performed to detect the expression of Rab7 protein, and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was carried out to analyze the mRNA level of Rab7. Then cells were divided into 5 groups after transfection of pcDNA3.1, pcDNA3.1-Rab7, NC-siRNA and Rab7-siRNA respectively: Control group, pcDNA3.1 group, pcDNA3.1-Rab7 group, NC-siRNA group and Rab7-siRNA group. The morphological characteristics of autophagosomes were observed by transmission electron microscopy, and the levels of p62 and LC3 II proteins were

作者介绍:康清梅, Email: 694679011@qq.com,
研究方向:神经退行性疾病。

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, 81801389);

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.20210723.1354.002.html>

(2021-07-24)

detected by Western blot, too. **Results:** After treatment of curcumin, autolysosomes with monolayer were observed by TEM. And the expression of LC3 II protein was increased ($P=0.000$), while the expression of p62 was decreased ($P=0.000$). Meanwhile, the expressions of Rab7 were increased at both protein and mRNA levels ($P=0.000, 0.000$). After over-expression of

Rab7, more autolysosomes were observed, and the expression of p62 protein was reduced ($P=0.000$), while the expression of LC3 II protein did not change significantly ($P=0.669$). After transfection of Rab7-siRNA in N2a/APP695swe cells, autophagosomes with double membranes were observed visibly. The expression of p62 protein was elevated ($P=0.000$), while the expression of LC3 II protein did not change prominently ($P=0.622$). **Conclusion:** Curcumin stimulates autophagy flux in N2a/APP695swe cells, and the mechanism may be related to the enhancement of Rab7.

[Key words] Alzheimer's disease; curcumin; autophagic flux; Rab7

自噬有 3 种类型:巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬。其中,巨自噬(以下简称自噬)是研究最为广泛的类型^[1]。细胞内形成自噬体结构,包裹有毒物质及功能受损的细胞器(如线粒体)后,通过溶酶体途径进行降解,对维持神经元细胞内环境的稳态起重要作用^[2]。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的神经退行性疾病,以进行性记忆力减退及认知功能下降为主要表现,其病理特征主要由异常折叠的蛋白质堆积形成,包括老年斑(细胞外不溶的 β 淀粉样蛋白聚集形成)及神经纤维缠结(细胞内 Tau 蛋白的异常磷酸化形成)。大量证据表明,自噬功能的失调在 AD 患者及 AD 动物模型中都普遍存在^[2]。

细胞内从产生杯状形的双层膜结构,到该结构延伸、包裹异常蛋白质后闭合,到最后自噬体成熟,与溶酶体结合,形成自噬溶酶体(单层膜结构),发挥降解作用,是一个动态的过程,叫“自噬流”^[3]。在这一过程中,成熟的自噬体与溶酶体结合,是其发挥降解作用的关键。否则,过多的自噬体异常沉积则会造成自噬应激,引起细胞死亡^[8-9]。Rab7 是 Rab 蛋白家族的重要成员之一。近年来有学者提出, Rab7 在自噬体的成熟及自噬体与溶酶体的结合中发挥重要作用^[4]。

姜黄素(curcumin)是一种从姜科植物根茎中提取的二酮类化合物,可以通过提高 Rab7 的表达诱导自噬,保护血管内皮细胞免受氧化应激损伤^[5]。然而,在 AD 中,姜黄素是否可以通过增强 Rab7 表达,从而促进自噬流,对细胞发挥保护作用,尚未见报道。本研究采用稳定表达 APP695swe 的 Neuro-2a 小鼠脑神经瘤细胞(N2a/APP695swe)作为 AD 的细胞模型,观察姜黄素是否促进该细胞中的自噬流,并深入探讨其作用机制是否与 Rab7 有关,以期为

姜黄素治疗 AD 提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 研究材料

野生型 Neuro-2a 小鼠脑神经瘤细胞(N2a/WT)和在该细胞中稳定表达 APP695swe 的细胞(N2a/APP695swe)均由厦门大学许华曦教授赠送。细胞培养中使用的 Opti-MEM($1 \times$)和 DMEM basic($1 \times$)培养基均购自 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)购自 ExCell Bio 公司;0.25%胰蛋白酶(-)EDTA 购自 Geneview 公司;G418 购自 Amresco 公司。二甲基亚砜(DMSO)购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。姜黄素购自美国 Sigma-Aldrich 公司。实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)中使用的试剂均购自 Takara 公司。Rab7 引物购于生工生物工程(上海)股份有限公司。青霉素-链霉素溶液($100 \times$)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(强)、DAPI 染色液等均购自碧云天生物技术公司。抗荧光衰减封片剂、即用型正常山羊血清、Western blot 试剂盒等均购自博士德生物工程有限公司。所用抗体 Rab7、p62 均购自 Cell Signaling Technology(CST)公司;LC3、 β -actin 分别购自 Sigma-Aldrich 公司和北京四正柏生物科技有限公司。NC-siRNA、Rab7-siRNA 质粒均购自上海拓然生物科技有限公司;pcDNA3.1、pcDNA-Rab7 质粒均购自武汉金开瑞生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及加药处理 N2a/WT 细胞:用每 100 mL 培养基中含 47 mL Opti-MEM、47 mL DMEM、5 mL FBS 和 1 mL 青霉素-链霉素溶液的培养基,于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中进行培养。N2a/APP695swe 细胞:用每 100 mL 培养基中含 47 mL Opti-MEM、47 mL DMEM、5 mL FBS、1 mL 青霉素-链霉素溶液和 20 mg G418 的培养基,于 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中进行培养。在 N2a/APP695swe 细胞汇合到 40%~60% 的时候,加入 DMSO $5 \mu\text{mol/L}$ 或用 DMSO 溶解的姜黄素 $5 \mu\text{mol/L}$ 作用 24 h。取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2.2 细胞转染 pcDNA3.1、pcDNA3.1-Rab7、NC-siRNA、Rab7-siRNA 6 孔板每孔接种 1×10^6 个 N2a/APP695swe 细

胞。当细胞汇合度为 50%~70%时,开始进行 pcDNA3.1、pcDNA3.1-Rab7、NC-siRNA、Rab7-siRNA 转染。按照说明书,将几种质粒分别与 Opti-MEM 预混、Lipofectamine™ 2000 与 Opti-MEM 预混后,一起加入到 6 孔板中。于 37 °C、5%CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。4~6 h 后,将培养基换成前面所述的 N2a/APP695swe 细胞培养基。24 h 后,收集各组细胞进行后续实验。

1.2.3 透射电镜观察细胞内自噬体形态 培养对数生长期的细胞,细胞汇合度达 80%时,收集 N2a/WT 细胞、未处理的 N2a/APP695swe 细胞和处理后的 N2a/APP695swe 细胞,或收集转染相关质粒后的细胞,用于透射电镜观察。在常规胰蛋白酶溶液消化细胞后,800 r/min 离心 5 min,弃上清。用 1 mL 灭菌后的 PBS 溶液重悬细胞,将细胞悬液移入 2 mL 的 EP 管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。重复 2 遍此步骤。最后一次离心完成,弃上清,沿管壁缓慢加入戊二醛固定液,切勿破坏管底的细胞团块。于 4 °C 固定 30 min 后,将细胞团块送往电镜室进行脱水、包埋及超薄切片处理。最后,于透射电镜下观察各组细胞内自噬体形态。独立重复实验 3 次。

1.2.4 Western blot 培养对数生长期的细胞,细胞汇合度达 80%时,收集 N2a/WT 细胞、未处理的 N2a/APP695swe 细胞和处理后的 N2a/APP695swe 细胞,或收集转染相关质粒后的细胞。提取细胞中的总蛋白,BCA 法测定各样本中蛋白含量,再加入上样缓冲液在 100 °C 下进行蛋白变性。变性后的蛋白逐一经 SDS-PAGE 电泳、电转(湿转)、封闭、免疫检测、化学发光后,得到 LC3、p62 及 Rab7 的蛋白表达条带。独立重复实验 3 次。用 Image J 软件对条带的灰度值进行定量分析。

1.2.5 免疫荧光 将灭菌后的专用细胞爬片放置于 24 孔板中,培养对数生长期的细胞,药物处理后收集细胞爬片。PBS 溶液洗涤细胞爬片 3 次后,用 4%多聚甲醛溶液固定细胞 30 min。再用 PBS 溶液洗涤 3 遍,吸干 PBS 溶液,加入正常山羊血清于室温下封闭 1 h。按照适宜浓度稀释好一抗,于避光的湿盒中置于 4 °C 冰箱孵育过夜。第 2 天,用 PBST 溶液洗涤 3 遍,按照适宜浓度配制荧光二抗,于避光的湿盒中置于 37 °C 孵育 1 h。孵育完成后,进行 DAPI 溶液染核 10 min,抗荧光淬灭封片剂封片,最后,用激光共聚焦显微镜进行采图,采图时确保每张图片的拍摄条件完全一致。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件,分别测量每张图片中细胞富集区域的面积面积及该面积区域荧光 IOD 值,计算该图片中总的 IOD/面积值,得到待测蛋白的平均相对强度。独立重复实验 3 次。

1.2.6 qRT-PCR 培养对数生长期的细胞,细胞汇合度达 80%时,收集 N2a/WT 细胞、未处理的 N2a/APP695swe 细胞和处理后的 N2a/APP695swe 细胞。依次进行细胞总 RNA 提取、RNA 反转录反应及实时荧光定量 PCR 反应,得出 Ct 值。最后,根据 Ct 值,用 2^{-ΔΔCt} 法计算出相应基因的 mRNA 表达量。

独立重复实验 3 次。

1.3 统计学处理

所有资料均使用 SPSS 20.0 进行统计学分析。所得到的数值都以均数 ± 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 姜黄素促进 N2a/APP695swe 细胞中的自噬流

Western blot 检测自噬活性关键性蛋白 LC3 II 和自噬底物蛋白 p62 的表达,结果见表 1。单因素方差分析 4 组 LC3 II 蛋白表达水平的差异,差异具有统计学意义($F=122.017, P=0.000$)。两两比较结果显示,与 Control 组相比,WT 组和 Curcumin 组中 LC3 II 蛋白的表达明显增高(0.66 ± 0.03 vs. $0.41 \pm 0.03, P=0.000$; 0.85 ± 0.04 vs. $0.41 \pm 0.03, P=0.000$),Sham 组则无明显差异(0.41 ± 0.01 vs. $0.41 \pm 0.03, P=0.912$)。单因素方差分析 4 组 p62 蛋白表达水平的差异,差异具有统计学意义($F=22.840, P=0.000$)。两两比较结果显示,与 Control 组相比,WT 组和 Curcumin 组中 p62 蛋白的表达明显减少(0.32 ± 0.04 vs. $0.60 \pm 0.04, P=0.000$; 0.35 ± 0.04 vs. $0.60 \pm 0.04, P=0.000$),Sham 组则无明显变化(0.61 ± 0.07 vs. $0.60 \pm 0.04, P=0.853$)(表 1、图 1)。

表 1 各组 LC3 II 和 p62 的蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	LC3 II	p62
WT 组	0.66 ± 0.03^a	0.32 ± 0.04^a
Control 组	0.41 ± 0.03	0.60 ± 0.04
Sham 组	0.41 ± 0.01^b	0.61 ± 0.07^b
Curcumin 组	0.85 ± 0.04^a	0.35 ± 0.04^a
F 值	122.017	27.840
P 值	0.000	0.000

注:a,与 Control 组比较, $P<0.05$;b:与 Control 组比较, $P>0.05$

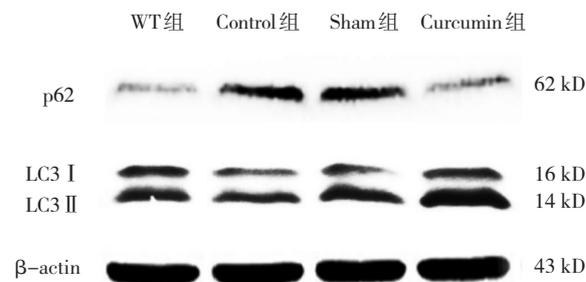


图 1 Western blot 检测各组 LC3 II、p62 蛋白的表达

透射电镜观察细胞内自噬体形态发现,各组中均可见到自噬体产生。其中,WT 组和 Curcumin 组细胞中自噬体主要为单层膜结构的自噬溶酶体,而 Control 组与 Sham 组细胞中主要为双层膜结构的早期自噬体(图 2)。

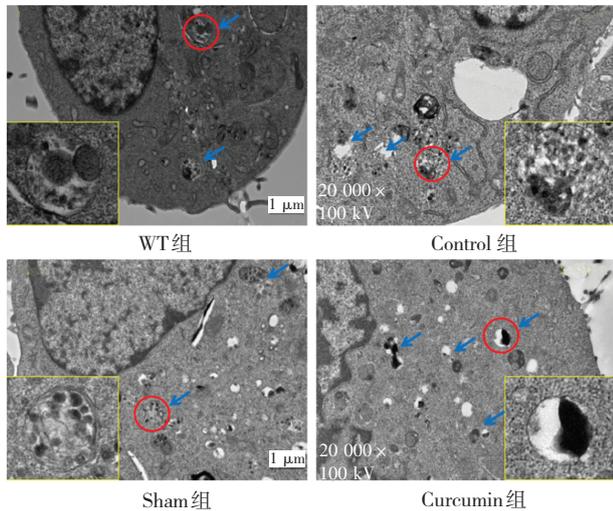


图 2 透射电镜观察姜黄素促进 N2a/APP695swe 细胞内的自噬流

2.2 姜黄素增强 N2a/APP695swe 细胞中 Rab7 的表达

qRT-PCR 用于检测各组中 Rab7 在分子水平的差异,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 比较各组 Rab7 mRNA 水平定量检测结果(表 2)。单因素方差分析 4 组 Rab7 mRNA 表达水平的差异具有统计学意义($F=263.489, P=0.000$)。两两比较结果显示,与 Control 组相比,Curcumin 组 Rab7 的 mRNA 表达明显增高(2.77 ± 0.14 vs. $1.00 \pm 0.00, P=0.000$),WT 组 Rab7 的 mRNA 表达也有所升高(1.88 ± 0.12 vs. $1.00 \pm 0.00, P=0.000$),而 Sham 组则无明显差异(0.99 ± 0.03 vs. $1.00 \pm 0.00, P=0.861$)(表 2)。

表 2 各组 Rab7 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Rab7 mRNA	Western blot 检测	免疫荧光检测
		Rab7 蛋白	Rab7 蛋白
WT 组	1.88 ± 0.12^a	0.80 ± 0.08^a	0.57 ± 0.03^a
Control 组	1.00 ± 0.00	0.59 ± 0.03	0.45 ± 0.01
Sham 组	0.99 ± 0.03^b	0.57 ± 0.05^b	0.45 ± 0.02^b
Curcumin 组	2.77 ± 0.14^a	0.91 ± 0.06^a	0.65 ± 0.04^a
F 值	263.489	24.266	36.020
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与 Control 组比较, $P<0.05$;b:与 Control 组比较, $P>0.05$

Western blot 检测各组 Rab7 蛋白表达的差异。单因素方差分析 4 组 Rab7 蛋白表达水平,差异具有统计学意义($F=24.266, P=0.000$)。两两比较结果显示,与 Control 组相比,Curcumin 组和 WT 组 Rab7 蛋白表达量均明显增加(0.91 ± 0.06 vs. $0.59 \pm 0.03, P=0.000$; 0.80 ± 0.08 vs. $0.59 \pm 0.03, P=0.002$),Sham 组无明显变化(0.57 ± 0.05 vs. $0.59 \pm 0.03, P=0.698$)(表 2、图 3)。免疫荧光标记 Rab7 蛋白后,激光共聚焦观察发现,Rab7 表达于细胞质,细胞核中未见明显表达。单因素方差分析 4 组平均荧光强度,差异具有统计学意义($F=$

$36.020, P=0.000$)。两两比较结果显示,与 Control 组相比,Curcumin 组和 WT 组 Rab7 的荧光表达均明显增强(0.65 ± 0.04 vs. $0.45 \pm 0.01, P=0.000$; 0.57 ± 0.03 vs. $0.45 \pm 0.01, P=0.001$),Sham 组无明显变化(0.45 ± 0.02 vs. $0.45 \pm 0.01, P=0.980$)(表 2、图 4)。

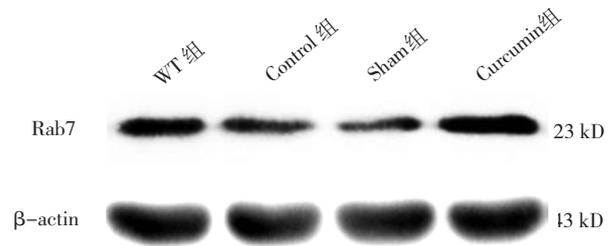


图 3 Western blot 检测各组 Rab7 蛋白的表达

2.3 Rab7 促进 N2a/APP695swe 细胞中的自噬流

在 N2a/APP695swe 细胞中分别转染 pcDNA3.1、pcDNA3.1-Rab7、NC-siRNA 和 Rab7-siRNA 后,Western blot 检测 LC3 II 和 p62 的表达。单因素方差分析 5 组 LC3 II 蛋白表达水平,差异没有统计学意义($F=0.593, P=0.767$)。两两比较结果显示,与 Control 组相比,pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-Rab7 组、NC-siRNA 组和 Rab7-siRNA 组中 LC3 II 蛋白的表达均无明显差异(0.42 ± 0.02 vs. $0.43 \pm 0.02, P=0.254$; 0.43 ± 0.01 vs. $0.43 \pm 0.02, P=0.669$; 0.42 ± 0.01 vs. $0.43 \pm 0.02, P=0.231$; 0.43 ± 0.02 vs. $0.43 \pm 0.02, P=0.622$)(表 3、图 5)。然而,单因素方差分析 5 组 p62 蛋白表达水平,差异则具有统计学意义($F=759.234, P=0.000$)。两两比较结果显示,与 Control 组相比,pcDNA3.1-Rab7 中 p62 蛋白的表达明显减少(0.09 ± 0.02 vs. $0.38 \pm 0.02, P=0.000$),Rab7-siRNA 组中 p62 蛋白的表达明显增加(0.76 ± 0.01 vs. $0.38 \pm 0.02, P=0.000$)(表 3、图 5)。

表 3 各组 LC3 II 和 p62 的蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	LC3 II	p62
Control 组	0.43 ± 0.02^b	0.38 ± 0.02^b
pcDNA3.1 组	0.42 ± 0.02	0.39 ± 0.01
pcDNA3.1-Rab7 组	0.43 ± 0.01^b	0.09 ± 0.02^a
NC-siRNA 组	0.42 ± 0.01^b	0.38 ± 0.02^b
Rab7-siRNA 组	0.43 ± 0.02^b	0.76 ± 0.01^a
F 值	0.593	759.234
P 值	0.676	0.000

注:a,与 Control 组比较, $P<0.05$;b:与 Control 组比较, $P>0.05$

透射电镜观察各组中自噬体形态发现,pcDNA3.1-Rab7 组主要为单层膜的自噬溶酶体结构,而 Control 组、pcDNA3.1 组、NC-siRNA 组和 Rab7-siRNA 组则主要为双层膜的早期自噬体结构(图 6)。

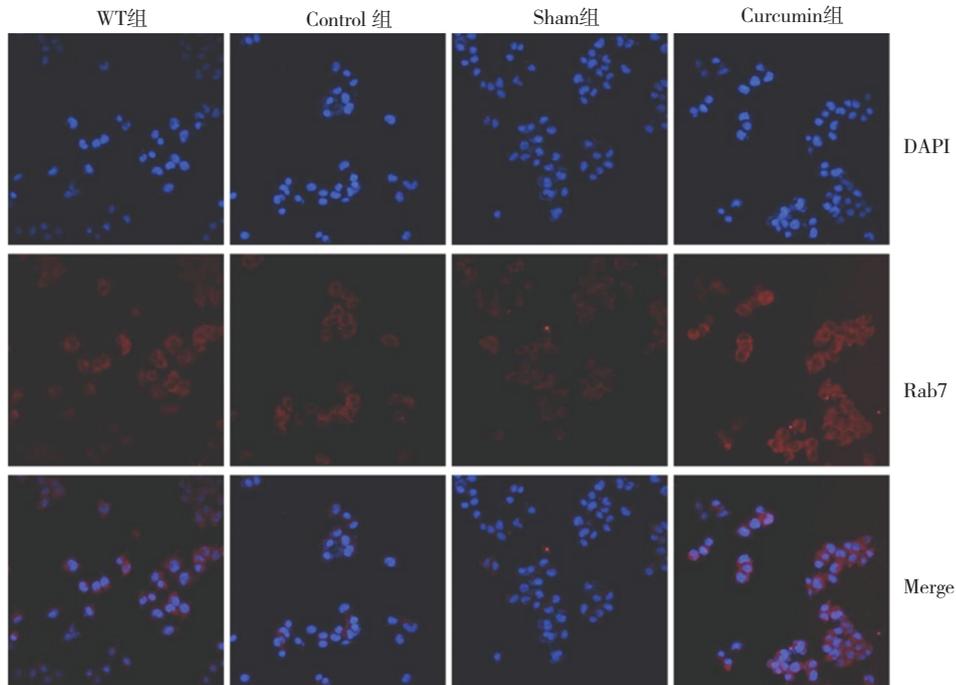


图 4 激光共聚焦显微镜观察各组 Rab7 蛋白的表达

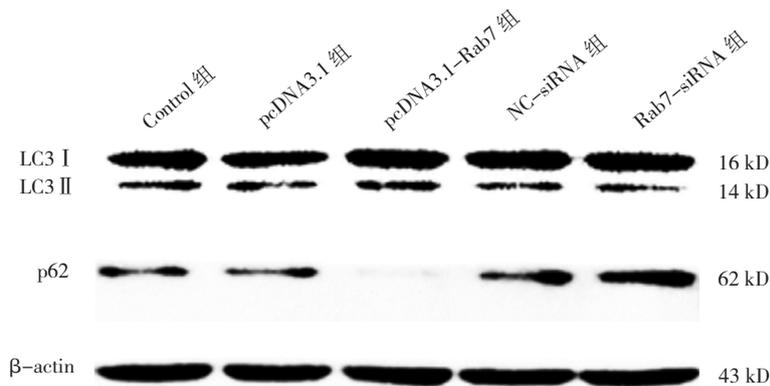


图 5 Western blot 检测各组 LC3 II、p62 蛋白的表达

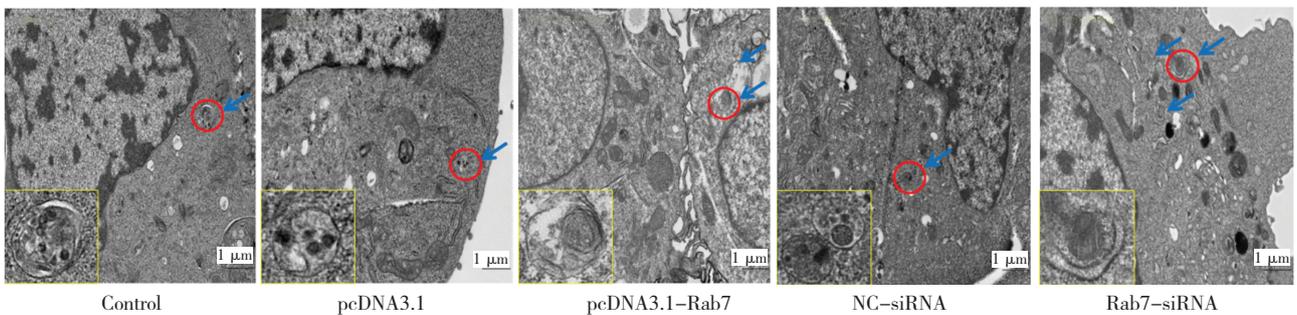


图 6 透射电镜观察 Rab7 促进 N2a/APP695swe 细胞内的自噬流

3 讨论

自噬对于清除细胞内错误折叠或异常堆积的蛋白质及各种受损的细胞器起着非常重要的作用,

是维持细胞内环境稳定的关键。越来越多的研究发现,姜黄素可以通过调节自噬活性,对 AD 起到神经保护作用^[6]。本课题组前期研究发现,在 AD 动物模型 (APP/PS1 双转基因小鼠) 中,姜黄素可以提高小鼠海马 CA1 区自噬活性^[7]。然而,自噬是一把“双刃

剑”,若自噬体形成后不能与溶酶体结合,过多的自噬体堆积则会引起自噬应激,导致细胞死亡^[8-9]。因此,自噬流的通畅是自噬发挥保护作用的关键。本实验通过姜黄素作用于 N2a/APP695^{swe} 细胞的体外研究发现,经姜黄素处理后,透射电镜可以观察到自噬体结构,且主要为单层膜的自噬溶酶体;同时,Western blot 检测也发现,姜黄素不仅可以提高自噬活性关键蛋白 LC3 II 的表达,还降低自噬底物蛋白 p62 的表达,说明姜黄素不仅可以提高细胞内自噬活性,促进自噬体产生,还可以促进细胞内自噬流通畅。但姜黄素促进自噬流的机制还需进一步探讨。

Rab7 是 Rab 蛋白家族的重要成员之一,作为一种小 GTP 蛋白,它在自噬体的成熟及自噬体与溶酶体的结合中都发挥重要作用。一方面,Rab7 通过与同型融合及液态蛋白分选复合物作用,促进自噬体成熟^[10];另一方面,Rab7 的缺失导致自噬体与溶酶体结合障碍^[11]。Han J 等^[5]发现,姜黄素可以提高血管内皮细胞中 Rab7 蛋白的表达,但目前关于姜黄素对 Rab7 蛋白作用的研究较少,尚未有更多证据证明姜黄素对 Rab7 的作用及该作用的意义。本课题组前期研究发现,姜黄素可以通过提高细胞内多种 Rab 蛋白的表达增强自噬活性^[12],但并未深入探讨姜黄素对其相应基因的作用,也未进一步对 Rab 蛋白的表达进行干预,进而研究其对 N2a/APP695^{swe} 细胞中自噬流的影响。本研究中,经姜黄素处理后,N2a/APP695^{swe} 细胞内 Rab7 在分子水平及蛋白水平的表达都有明显升高,但姜黄素是否通过提高 Rab7 的表达促进细胞内自噬流还需要进一步验证。因此,本研究进一步过表达及沉默 Rab7,观察其对自噬流的影响。结果发现,过表达 Rab7 后,细胞内自噬体形态主要为单层膜的自噬溶酶体结构,沉默 Rab7 后则主要为双层膜的自噬体结构。Western blot 检测结果发现,Rab7 虽然对自噬活性关键蛋白 LC3 II 的表达无明显作用,但可以明显降低 p62 的表达,促进自噬体与溶酶体结合,调节自噬流通畅。由此可见,姜黄素提高 Rab7 的表达后,主要作用在于促进自噬流的通畅。而前期研究观察到的姜黄素增强自噬活性,促进自噬体生成,则可能是通过提高早期自噬体形成相关蛋白 Beclin1、Atg7 和 Atg16L1

等实现的^[13]。

综上所述,本研究发现姜黄素可以促进 N2a/APP695^{swe} 细胞内的自噬流,其机制主要与提高细胞内 Rab7 的表达、促进自噬体与溶酶体结合有关。姜黄素作为一种天然、无毒且多靶点的植物化合物,其作用机制的进一步研究将为 AD 预防和治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. Cell, 2011, 147(4): 728-741.
- [2] Li Q, Liu Y, Sun M. Autophagy and Alzheimer's disease [J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(3): 377-388.
- [3] Choi Y, Bowman JW, Jung JU. Autophagy during viral infection: a double-edged sword [J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(6): 341-354.
- [4] Ohbayashi N, Fukuda M. Role of Rab family GTPases and their effectors in melanosomal logistics [J]. J Biochem, 2012, 151(4): 343-351.
- [5] Han J, Pan XY, Xu Y, et al. Curcumin induces autophagy to protect vascular endothelial cell survival from oxidative stress damage [J]. Autophagy, 2012, 8(5): 812-825.
- [6] Forouzanfar F, Read MI, Barreto GE, et al. Neuroprotective effects of curcumin through autophagy modulation [J]. IUBMB Life, 2020, 72(4): 652-664.
- [7] Wang C, Zhang X, Teng Z, et al. Downregulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in curcumin-induced autophagy in APP/PS1 double transgenic mice [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 740: 312-320.
- [8] Loos B, du Toit A, Hofmeyr JH. Defining and measuring autophagosome flux: concept and reality [J]. Autophagy, 2014, 10(11): 2087-2096.
- [9] Loos B, Engelbrecht AM, Lockshin RA, et al. The variability of autophagy and cell death susceptibility: unanswered questions [J]. Autophagy, 2013, 9(9): 1270-1285.
- [10] Furuta N, Fujita N, Noda T, et al. Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes [J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(6): 1001-1010.
- [11] Zhou J, Tan SH, Nicolas V, et al. Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion [J]. Cell Res, 2013, 23(4): 508-523.
- [12] 周凡琳,熊晓敏,梁洁,等.姜黄素通过提高 Rab 家族蛋白的表达增强 N2a/APP695^{swe} 细胞的自噬作用 [J]. 重庆医科大学学报, 2020, 45(1): 51-57.
- [13] 康清梅,梁洁,张雄,等.姜黄素通过提高自噬体形成相关蛋白的表达增强 N2a/APP695^{swe} 细胞的自噬作用 [J]. 重庆医科大学学报, 2017, 42(5): 481-486.

(责任编辑:冉明会)