

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002875

A β 对阿尔茨海默病模型小鼠脑神经元及小胶质细胞内溶酶体的影响

蒋玲芳¹, 贺桂琼², 汪克建², 龙志敏²

(重庆医科大学 1. 实验教学管理中心; 2. 人体解剖学教研室、神经科学研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨 β -淀粉样蛋白(amyloid β peptide, A β)对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型小鼠脑神经元及小胶质细胞内溶酶体的影响。**方法:**取 6 月龄 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠和同窝野生型小鼠各 6 只, 免疫荧光染色观察脑内神经元和小胶质细胞表达以及和溶酶体共表达情况; Western blot 检测小鼠脑内自噬相关蛋白表达。用 A β 25-35 处理 SH-SY5Y 细胞后, 转录因子 EB(transcription factor EB, TFEB)过表达腺病毒干预细胞 72 h, Western blot 检测 TFEB 和溶酶体标志物水平。**结果:**与野生型组小鼠比较, 6 月龄 AD 转基因组小鼠 LC3、p62 蛋白表达增加($t=4.976, P=0.008; t=4.463, P=0.011$), 溶酶体标志蛋白 LAMP1 明显减少($t=14.91, P=0.0001$)。AD 模型组小鼠海马区神经元明显丢失, 小胶质细胞明显增生, 溶酶体表达均明显减少。与野生型组小鼠比较, AD 转基因组小鼠磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mammalian target of rapamycin, p-mTOR)/mTOR 蛋白表达量明显升高($t=5.501, P=0.005$), TFEB 蛋白表达水平明显降低($t=5.899, P=0.004$)。A β 25-35 处理使 SH-SY5Y 细胞 TFEB 和 Lamp1 蛋白水平均下调($t=10.94, P<0.001; t=17.22, P<0.001$), 过表达 TFEB 后, 溶酶体标志物 Lamp1 蛋白水平明显升高($t=5.136, P<0.01$)。**结论:**A β 引起 AD 转基因小鼠脑内神经元和小胶质细胞内溶酶体均减少, 可能通过抑制 mTOR/TFEB 信号通路发挥作用。

【关键词】阿尔茨海默病; 自噬; 溶酶体; 神经元; 小胶质细胞**【中图分类号】**R394.3; R741.05**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2021-03-04

Effects of A β on lysosomes in neurons and microglia of Alzheimer's disease model mice

Jiang Lingfang¹, He Guiqiong², Wang Kejian², Long Zhimin²

(1. Experimental Teaching Management Center; 2. Teaching and Research Section of Anthropotomy, Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of A β on lysosomes in neurons and microglia of Alzheimer's disease(AD) model mice. **Methods:** Six 6-month-old APP/PS1 double transgenic AD mice and six wild type(WT) mice were selected to observe the expression of neurons and microglia, as well as the co-expression of neurons, microglia and lysosomes by immunofluorescence staining. Western blot was used to detect the expression of autophagy related proteins. After SH-SY5Y cells were treated with A β 25-35, adenovirus overexpressed transcription factor EB(TFEB) was intervened for 72 h. The levels of TFEB and lysosomal markers were detected by Western blot. **Results:** Compared with wild-type mice, the expression of LC3 and p62 in AD transgenic mice at 6 months old increased($t=4.976, P=0.008; t=4.463, P=0.011$), and the lysosomal marker protein LAMP1 decreased significantly($t=14.91, P=0.0001$). In AD model group, neurons were significantly lost, microglia were significantly proliferated and lysosome expression was significantly decreased. Compared with wild-type mice, the expression of p-mammalian target of rapamycin(p-mTOR)/mTOR protein in AD transgenic mice was significantly increased($t=5.501, P=0.005$), and the expression of TFEB protein was significantly decreased($t=5.899, P=0.004$). A β 25-35 down regulated the protein levels of TFEB and Lamp1 in SH-SY5Y cells($t=10.94, P<0.001; t=17.22, P<0.001$). Overexpression of TFEB significantly increased the protein level of lysosomal marker Lamp1($t=5.136, P<0.01$). **Conclusion:** A β can

decrease lysosomes in neurons and microglia of AD model mice, which may act by inhibiting mTOR/TFEB signaling pathway.

【Key words】Alzheimer's disease; autophagy; lysosome; neuron; microglia

作者介绍: 蒋玲芳, Email: 465654946@qq.com,

研究方向: 阿尔茨海默病的发病机制及治疗。

通信作者: 龙志敏, Email: zhiminlong@cqmu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 31600825)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210705.1341.002.html>

(2021-07-05)

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种与年龄相关、以记忆和认知功能逐渐丧失为主要临床表现的脑变性疾病。大脑内 β -淀粉样蛋白 (amyloid β peptide, A β) 的产生和降解的平衡被扰乱是现在比较公认的 AD 发病机制^[1-2]。作为维持细胞稳态的守护者,神经元自噬与消除 AD 脑内 A β 的异常积累密切相关,但异常增多的自噬体又可能成为 A β 蛋白产生的场所^[3]。因此自噬体只有与溶酶体融合后,自噬体的内膜及其内容物被溶酶体酶降解,才能完成自噬降解 A β 过程并防止自噬体堆积。小胶质细胞是中枢神经系统中的一种巨噬细胞,研究显示小胶质细胞具有很强的内吞 A β 能力。在小胶质细胞内,A β 一方面可以经再循环途径被转运到细胞外,另一方面也可以经过自噬-溶酶体途径降解^[4]。本课题组前期研究发现 AD 患者和 AD 转基因小鼠脑内溶酶体表达减少^[5],但 AD 脑内神经元和小胶质细胞溶酶体表达是否存在差异目前尚未见报道。本研究通过观察 APP/PS1 双转基因小鼠 AD 模型小鼠和同窝野生型小鼠脑内神经元及小胶质细胞溶酶体的表达情况,探讨 A β 对脑内神经元及小胶质细胞溶酶体的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

LC3 兔多克隆抗体购自美国 Sigma 公司 (L7543); 购自美国 CST 公司, Lamp1 兔多克隆抗体购自美国 Abcam 公司 (ab24170); SQSTM1/p62 兔多克隆抗体 (5144)、NeuN 兔多克隆抗体 (D4G40)、IBA-1 兔多克隆抗体 (17198) 均购自美国 CST 公司; 转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 兔多克隆抗体 (ab270604) 购自美国 Abcam 公司; mTOR 兔多克隆抗体 (AF6308)、p-mTOR (Ser2448) 兔多克隆抗体 (AF3308) 以及 GAPDH 兔多克隆抗体 (AF7021) 均购自美国 Affinity 公司; FITC-IgG、488-IgG、Cy3-IgG 等荧光二抗购自美国 Jackson Immuno Research 公司; 组织蛋白裂解液、BCA 试剂盒、显影定影液购自碧云天公司。TFEB 过表达腺病毒购自汉恒生物公司。其他均为国产分析纯。

1.2 实验动物与分组

APP/PS1 种鼠 B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{de9}) 购自中国医学科学院实验动物研究所, 交配繁殖。产下的后代通过 PCR 进行基因分型鉴定^[6], APP/PS1 基因表达双阳性为 APP/PS1 AD 模型小鼠, APP/PS1 基因表达双阴性为野生型小鼠。所有实验小鼠由重庆医科大学动物饲养中心饲养, 饲养条件: 22 °C 标准条件下饲养一个 12 h 光/12 h 暗循环; 温度为 (23 ± 3) °C; 相对湿度为 (55 ± 5) %, 12 h/12 h 逆光/暗光; 循环食物和水

可以随意饮用。动物护理和实验程序遵守美国国家研究院实验室护理和使用卫生指南动物与重庆医科大学动物使用政策。

1.3 免疫荧光染色

取 6 月龄 APP/PS1 小鼠和同窝野生型小鼠各 6 只, 体重 25~30 g。使用戊巴比妥按照 50 mg/kg 将小鼠深度麻醉后处死。用 0.9% 生理盐水经心脏灌流, 冲洗脑循环血液。然后在冰冷的平板上操作, 迅速将脑组织取出。置于 4% 多聚甲醛中后固定 72 h, 70% 酒精常规脱水, 石蜡包埋, 冠状切片 (厚度 4 μ m)。甲苯脱蜡后进行常规水化, 抗原修复后, 使用 PBS 清洗 3 遍, 5% BSA 封闭液在室温下封闭 1 h。分别加入一抗 anti-NeuN (浓度 1:300)、anti-IBA-1 (浓度 1:300)、anti-Lamp1 (浓度 1:200) 孵育切片组织, 阴性对照用 PBS 代替 I 抗孵育, 4 °C 冰箱过夜。次日对切片清洗 3 遍后, 室温避光孵育二抗 1 h (FITC、488 或者 CY3)。进一步用 DAPI 对组织细胞核染色, 清洗样品后用盖玻片封片。荧光显微镜观察并采集荧光图像。用 Image J 软件对免疫阳性细胞进行分析, 每只小鼠海马和皮质取相同区域高倍视野下计数 5 个视野的阳性细胞的数量或者分析荧光强度。

1.4 细胞培养及腺病毒载体转染

SH-SY5Y 细胞于常规 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养。将细胞分为空白对照组、A β 组和 A β +TFEB 过表达组。空白对照组不作特殊处理, A β 组和 A β +TFEB 过表达组细胞均用 30 μ mol/L A β 25-35 处理 24 h (A β 25-35 使用前 37 °C 老化 1 周)。A β +TFEB 过表达组细胞在 A β 25-35 处理 24 h 后再用 TFEB 过表达腺病毒作用细胞 24 h, 在荧光显微镜下观察感染率达 90% 以上, 继续感染 48 h 后收集细胞提蛋白进行 Western blot。

1.5 Western blot

严格按照蛋白提取试剂盒说明, 提取小鼠皮质和海马组织或几组细胞的总蛋白质, 单独用细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒分离出细胞核蛋白用于 TFEB 检测。所有过程均在冰上操作, 玻璃匀浆器匀浆至完全裂解。采用 BCA 法进行蛋白浓度测量。取 50 g 总蛋白经 100 °C 变性 5 min, 而后用 10% SDS PAGE 凝胶进行电泳, 分离出的凝胶条带用恒流 250 mA、4 °C 下电转 2 h, 将目的蛋白转移至 PVDF 膜上, 在室温下用 5% 牛血清白蛋白 BSA 封闭液封闭 2 h, 分别在 anti-LC3、anti-p62、anti-Lamp1 (浓度均为 1:1 000) 和 anti-GAPDH (浓度 1:3 000) 抗体中 4 °C 孵育过夜。洗涤 PVDF 膜后加入二抗 (浓度 1:5 000) 室温孵育 2 h, 采用增强化学发光试剂盒显影, 凝胶成像系统采集蛋白显影图像, Quantity One 软件对蛋白条带进行光密度计量学分析。

1.6 统计学处理

使用 Graph-Pad Prism 8 软件进行数据分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并进行正态性分布检验。多组间的比较采用方差分析和重复检验, 2 组间比较采用独立样本 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 6 月龄 AD 转基因小鼠脑内自噬体增加但溶酶体减少

Western blot 检测显示,与野生型组小鼠比较,6 月龄 AD 转基因小鼠 LC3 蛋白表达量明显升高($t=4.976, P=0.008$),p62 蛋白表达水平也升高($t=4.463, P=0.011$),但溶酶体标志物 Lamp1 蛋白表达水平明显降低($t=14.91, P=0.001$),差异具有统计学意义(图 1)。

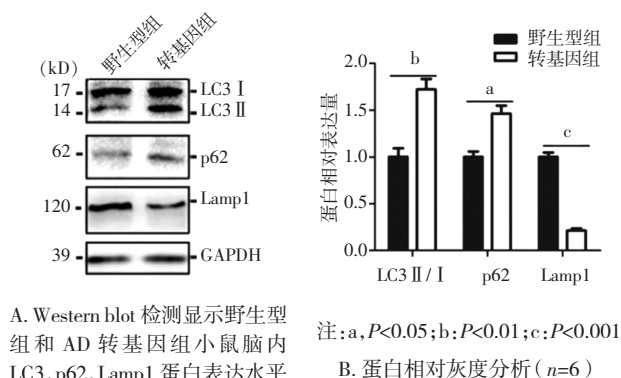


图 1 野生型组和 AD 转基因组小鼠脑内自噬体和溶酶体标志物表达情况

2.2 AD 转基因小鼠海马区神经元内溶酶体表达情况

免疫荧光染色显示,与野生型组小鼠比较,6 月龄 AD 转基因组小鼠海马区神经元标志物 NeuN 的阳性细胞数量明显少于野生型组($t=2.217, P=0.042$),差异有统计学意义。AD 转基因组小鼠神经元内溶酶体标志物 Lamp1 表达也比野生型组明显下调。且野生型组小鼠海马内 NeuN 与 Lamp1 大量共表达,而 AD 转基因组小鼠 NeuN 与 Lamp1 共表达减少(图 2)。

2.3 AD 转基因小鼠海马区小胶质细胞溶酶体表达情况

免疫荧光染色显示,与野生型组小鼠比较,6 月龄 AD 转基因组小鼠海马区小胶质细胞标志物 IBA-1 的阳性细胞数量明显多于野生型组,差异有统计学意义($t=3.731, P=0.002$)。但 APP/PS1 组小鼠小胶质细胞内溶酶体标志物 Lamp1 表达也比野生型组明显下调,小胶质细胞与溶酶体标志物 LAMP1 的共表达明显减少(图 3)。

2.4 AD 转基因小鼠 mTOR/TFEB 表达情况

Western blot 检测显示,与野生型组小鼠比较,6 月龄 APP/PS1 组小鼠脑内 p-mTOR/mTOR 蛋白表达量明显升高($t=5.501, P=0.005$),细胞核上 TFEB 蛋白表达水平明显降低($t=5.899, P=0.004$),差异具有统计学意义(图 4)。

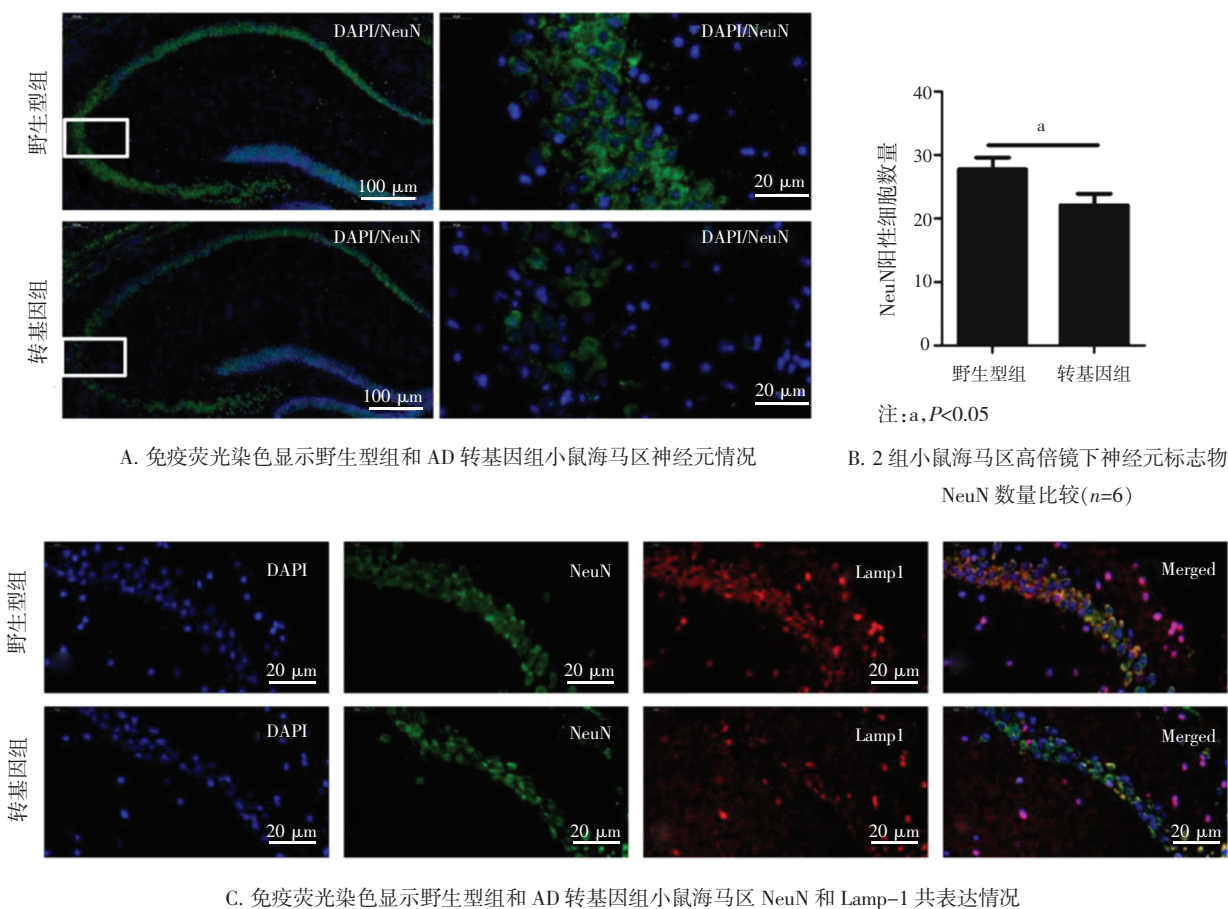
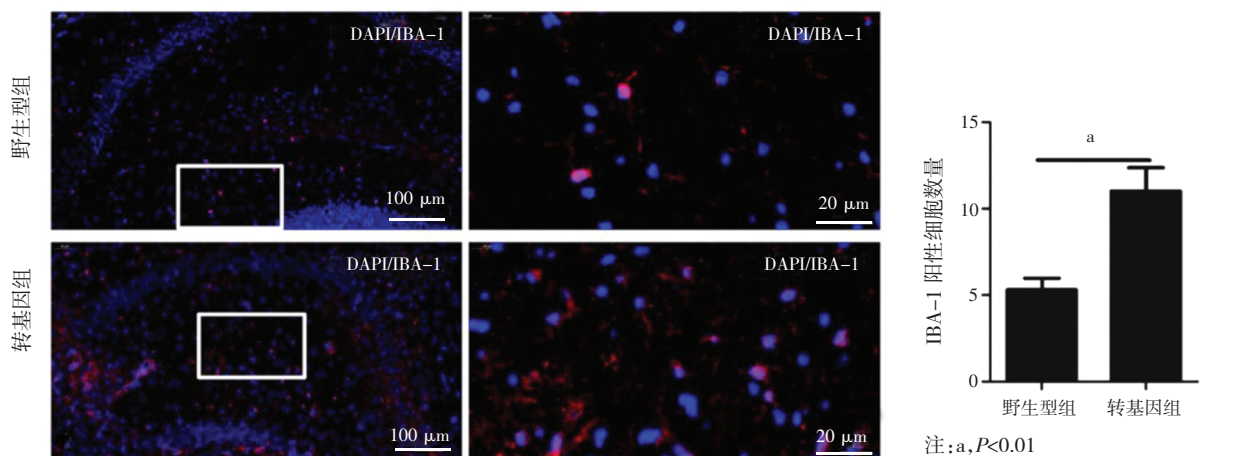


图 2 野生型组和 AD 转基因组小鼠海马区神经元内溶酶体比较

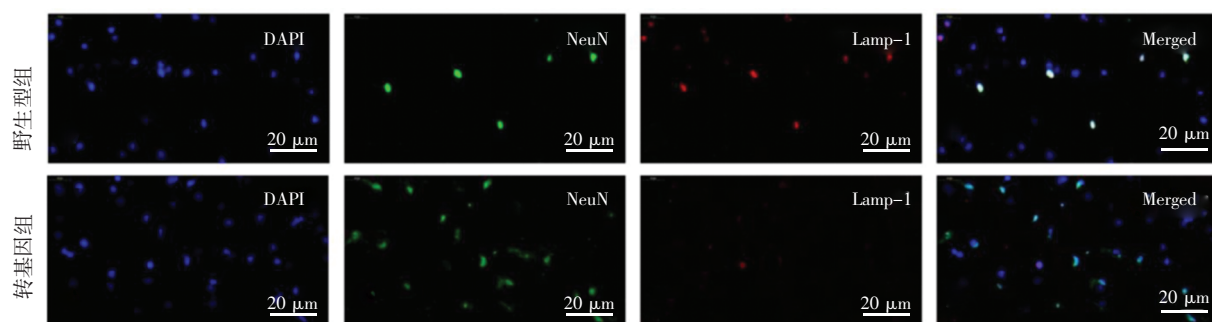
2.5 过表达 TFEB 上调 Lamp1 的表达

收集各组细胞进行 Western blot 检测显示,用 A β 25-35 干预 SH-SY5Y 细胞后,TFEB 和 Lamp1 蛋白水平均下调($t=10.94, P<0.001; t=17.22, P<0.001$),向 SH-SY5Y 细胞加入

TFEB 过表达腺病毒感染 72 h 后,TFEB 蛋白表达水平较 A β 25-35 组明显升高,差异具有统计学意义($t=21.89, P<0.001$);随之溶酶体标志物 Lamp1 蛋白水平也升高,与 A β 25-35 组比较,差异具有统计学意义($t=5.136, P<0.01$)(图 5)。

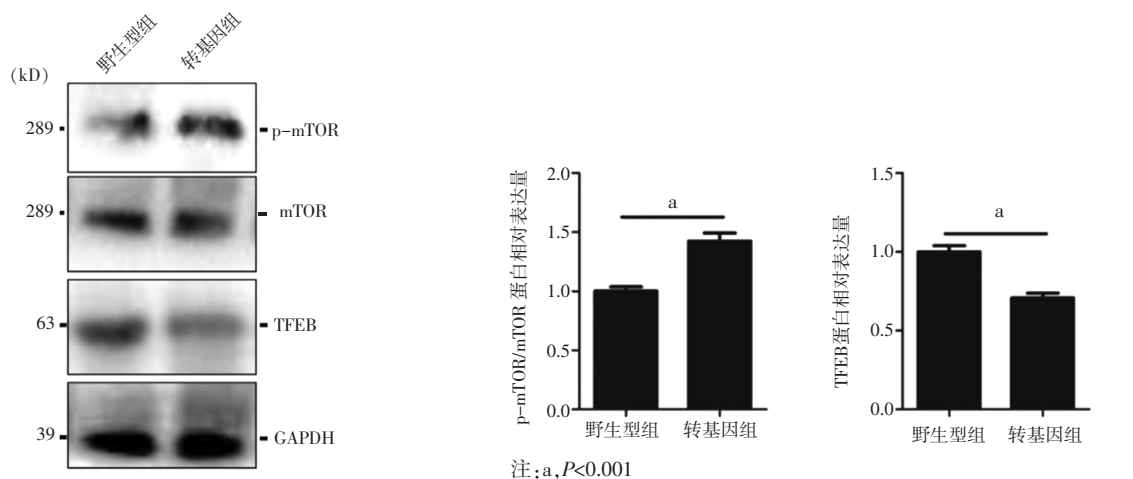


A. 免疫荧光染色显示野生型组和 AD 转基因组小鼠海马区小胶质细胞表达情况

B. 2 组小鼠海马区高倍镜下小胶质细胞标志物 IBA-1 数量比较($n=6$)

C. 免疫荧光染色显示野生型组和 AD 转基因组小鼠海马区 IBA-1 和 Lamp-1 共表达情况

图 3 野生型组和 AD 转基因组小鼠海马区小胶质细胞内溶酶体比较



A. Western blot 检测显示野生型组和 AD 转基因组小鼠脑内 p-mTOR、mTOR、TFEB 蛋白表达水平

B. p-mTOR/mTOR 蛋白相对灰度分析($n=6$)C. TFEB 蛋白相对灰度分析($n=6$)

图 4 野生型组和 AD 转基因组小鼠脑内 mTOR/TFEB 表达情况

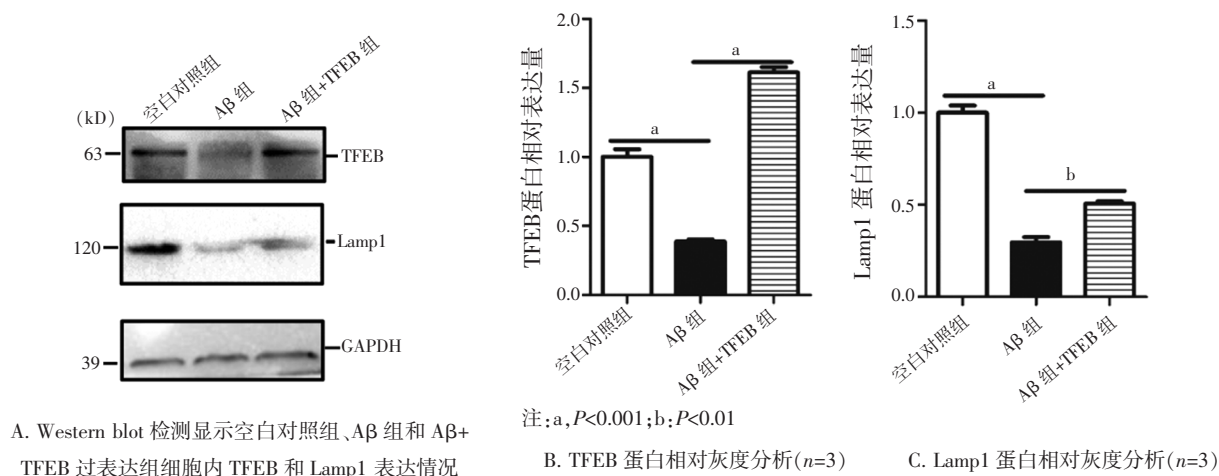


图 5 过表达 TFEB 上调 Lamp1 的表达

3 讨论

AD 脑的特征性病理变化是:细胞外 β 淀粉样蛋白(amyloid β peptide, A β)异常聚集形成的老年斑、细胞内 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)、海马和大脑皮质的神经元凋亡、小胶质细胞和星形胶质细胞炎性活化等^[7-8]。自噬是清除 AD 患者脑中异常积累的 A β 、过度磷酸化的 tau 等蛋白的重要途径^[9],对神经细胞代谢和体内平衡至关重要。自噬包含自噬结构的形成、底物向溶酶体的运送以及底物的降解和大分子物质释放回细胞质的整个流程,因此称为“自噬流”^[10]。

APP/PS1 双转基因小鼠是国际上研究 AD 发病机制和药物靶点的主要动物模型之一。6 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠脑内已出现老年斑沉积^[5]。大量研究报道 AD 患者脑中存在大量的自噬体堆积。自噬体堆积一方面由于自噬激活,另一方面由自噬底物的清除缺陷引起。LC3 是自噬体形成标记物,自噬发生时,LC3 由 I 型转变为 II 型,但 LC3 II/I 比值升高,可由自噬激活引起,也可由自噬溶酶体降解减少导致。p62 蛋白是溶酶体降解的底物之一,自噬发生且自噬流通畅时,p62 水平下降,而当自噬活动受到阻碍时,p62 则不断累积。Lamp1 是溶酶体膜蛋白,其数量的高低与溶酶体的数量及完整性正相关^[11]。Western blot 检测结果显示,与同窝野生型小

鼠比较,AD 转基因小鼠脑内 LC3 和 p62 都升高,说明自噬受阻,这和文献报道一致^[12]。但 AD 转基因小鼠脑内溶酶体标志物 Lamp1 明显减少,说明自噬体大量堆积可能与溶酶体减少导致自噬溶酶体不能顺利降解有关。

以往的研究大多集中于神经元自噬在神经退行性疾病中的作用,近年研究发现小胶质细胞比神经元更快速地吞噬 A β ,并且具有更强的降解 A β 能力。在小胶质细胞内,A β 一方面可以经再循环途径被转运到细胞外,另一方面也可以经过自噬-溶酶体途径降解。目前很多学者认为,A β 沉淀诱发小胶质细胞的活化引起脑内慢性炎症反应可能是 AD 发病的核心病理机制之一^[13]。本研究结果显示,AD 转基因小鼠脑内小胶质细胞明显活化。然而,小胶质细胞活化是一把双刃剑。一方面,老年斑周围小胶质细胞的聚集和活化是机体对不利因素的自我防御反应,活化的小胶质细胞可以对 A β 发生吞噬和清除作用,从而减轻 A β 对脑组织的损害;另一方面,活化的小胶质细胞能够分泌大量细胞毒性物质如一氧化氮、促炎性细胞因子、活性氧自由基等,参与神经元的变性,加速 AD 的进展^[14]。研究表明,自噬可以调控 AD 中小胶质细胞活化引起的炎症反应^[15]。本研究结果也显示对 AD 转基因小鼠脑内神经元都开始出现明显的丢失,而小胶质细胞明显激活。AD 转基因小鼠脑内不管是神经元和小胶质细胞内溶酶体标志物 Lamp1 都明显下调,说明 A β 不仅直接影响神经元的自噬溶酶体途径,还影响小胶

质细胞内溶酶体数量,从而阻碍神经细胞和小胶质细胞对 A β 的降解,反而导致自噬体堆积。而小胶质细胞自噬流不畅,不能及时降解细胞毒性物质,加速神经元的变性和丢失。

TFEB 与溶酶体生物合成、自噬、脂类物质代谢等都有着密切关系,在维持细胞稳态等过程中至关重要^[16]。TFEB 在溶酶体表面被 mTOR 磷酸化后,发生核移位进而发挥生物学功能。本研究结果表明 AD 转基因小鼠脑中 p-mTOR/mTOR 蛋白表达量明显升高而 TFEB 蛋白表达水平明显降低,说明 AD 转基因小鼠脑神经元和小胶质细胞内溶酶体减少可能和 mTOR/TFEB 通路受抑制密切相关。进一步在细胞水平进行验证,用 A β 25-35 干预 SH-SY5Y 细胞后,TFEB 和 Lamp1 蛋白水平均下调,向 SH-SY5Y 细胞加入腺病毒过表达 TFEB 后,溶酶体标志物 Lamp1 蛋白水平也明显升高,说明过表达 TFEB 可以一定程度上逆转溶酶体的减少。

综上所述,本研究结果表明 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠脑内自噬体大量堆积可能与溶酶体减少导致自噬流不畅通有关。AD 模型组小鼠海马区神经元明显丢失,小胶质细胞明显增生,且神经元内和小胶质细胞内溶酶体的表达均减少,可能通过抑制 mTOR/TFEB 信号通路发挥作用。因此,通过调节自噬防治 AD,不能单纯地激活自噬或抑制自噬,关键是促进溶酶体的降解,保证自噬流通畅,维持自噬稳态,才能有效减少不成熟的自噬体堆积,加速自噬溶酶体清除 A β 等病理蛋白。

参 考 文 献

- [1] Trambauer J, Fukumori A, Steiner H. Pathogenic A β generation in familial Alzheimer's disease: novel mechanistic insights and therapeutic implications[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2020, 61: 73-81.
- [2] Kent SA, Spires-Jones TL, Durrant CS. The physiological roles of tau and A β : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics[J]. *Acta Neuropathol*, 2020, 140(4): 417-447.
- [3] Uddin MS, Stachowiak A, Mamun AA, et al. Autophagy and Alzheimer's disease: from molecular mechanisms to therapeutic implications[J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10(4): 1-18.
- [4] Ainhoa PZ, Virginia ST, Amanda S. Autophagy and microglia: novel partners in neurodegeneration and aging[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 598.
- [5] Long ZM, Chen JF, Zhao YY, et al. Dynamic changes of autophagic flux induced by A β in the brain of postmortem Alzheimer's disease patients, animal models and cell models[J]. *Aging*, 2020, 12(11): 10912-10930.
- [6] 陈婧菲, 贺桂琼, 龙志敏. APP/PS1/LC3 三转基因小鼠的构建及其自噬流水平研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2018, 43(9): 1140-1146.
- [7] Vickers JC, Mitew S, Woodhouse A, et al. Defining the earliest pathological changes of Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2016, 13(3): 281-287.
- [8] Esquerda-Canals G, Martí-Clúa J, Roda AR, et al. An intracellular amyloid- β /A β PP epitope correlates with neurodegeneration in those neuronal populations early involved in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 59(3): 1079-1096.
- [9] Peric A, Annaert W. Early etiology of Alzheimer's disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction?[J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129(3): 363-381.
- [10] Matus S, Valenzuela V, Hetz C. A new method to measure autophagy flux in the nervous system[J]. *Autophagy*, 2014, 10(4): 710-714.
- [11] Wolfe DM, Lee JH, Kumar A, et al. Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification[J]. *Eur J Neurosci*, 2013, 37(12): 1949-1961.
- [12] Hamano T, Hayashi K, Shirafuji N, et al. The implications of autophagy in Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2018, 15(14): 1283-1296.
- [13] Li JW, Zong Y, Cao XP, et al. Microglial priming in Alzheimer's disease[J]. *Ann Trans Med*, 2018, 6(10): 176.
- [14] Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models[J]. *Science*, 2016, 352(6286): 712-716.
- [15] Cho MH, Cho K, Kang HJ, et al. Autophagy in microglia degrades extracellular β -amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome[J]. *Autophagy*, 2014, 10(10): 1761-1775.
- [16] Yamamoto F, Taniguchi K, Mamada N, et al. TFEB-mediated enhancement of the autophagy-lysosomal pathway dually modulates the process of amyloid β -protein generation in neurons[J]. *Neuroscience*, 2019, 402(15): 11-22.

(责任编辑: 冉明会)