

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001725

APP 代谢通路关键基因在非洲爪蛙早期胚胎中的时空表达

程良平, 石 宇, 周维涛, 李廷玉

(重庆医科大学附属儿童医院认知与发育转化医学重庆市重点实验室、儿童发育疾病研究省部共建教育重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400016)

【摘要】目的: $A\beta$ 的沉积是形成老年斑的主要原因, 同时是阿尔茨海默病的主要病理标志物。 $A\beta$ 形成来源于该病的主要致病基因淀粉样前体蛋白 APP (Amyloid beta precursor protein; XB-GENE-479158; NCBI: X1.8671), APP 在非洲爪蛙早期胚胎时空表达图式目前还不清楚, 之前的报道只在某些手术分离的组织中用 RT-PCR 的方法进行了研究, 为进一步在爪蛙中研究这类基因在发育过程中的时空表达及可能的功能, 展开了本研究。**方法:** 本研究收集了第 2 期到第 4 期非洲爪蛙胚胎包括(卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经轴胚、尾芽期和蝌蚪期), 通过整体胚胎原位杂交和半定量 RT-PCR 检测基因 APP 在胚胎发育不同时期的时空表达, 用双荧光素酶报告基因系统检测 APP 启动子活性。**结果:** APP 有 2 种主要的转录产物, 短的 693~694 个氨基酸, 长的有 750~751 个氨基酸, 主要差别来自外显子 7 的可变剪切。其中短的剪切体是主要转录的产物, 而长的一个剪切体则表现为持续的低表达。整体原位表达结果显示: 在神经板阶段, APP 主表达在孵化和黏液腺中。神经管闭合后, APP 转录水平升高, 在体细胞中胚层, 前肾和背侧神经管中呈现高表达。在尾芽末期, APP 在晶状体、端脑、松果体、间脑和背侧耳泡中表达。在蝌蚪期, APP 主要在包括胰腺、胃和十二指肠在内的消化系统中高表达。**结论:** APP 是一个母源性表达的基因, 其时空表达分布的特异性预示其在相关部位发育过程中可能发挥重要作用, 从而为研究阿尔茨海默病的关键致病基因在胚胎早期的所发挥的作用提供了新的路径。

【关键词】非洲爪蛙; 发育; 表达谱; 胚胎; 淀粉样前体蛋白**【中图分类号】**R741.02**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-10-13Temporal and spatial expression of amyloid β precursor protein (APP) in *Xenopus Laevis*

Cheng Liangping, Shi Yu, Zhou Weitao, Li Tingyu

(Chongqing Key Laboratory of Translational Medical Research in Cognitive Development and Learning and Memory Disorder, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】Objective: Amyloid β protein ($A\beta$) is the central component of neuritic plaques, and also the main neuropathological marker of Alzheimer's Disease (AD). $A\beta$ is derived from the amyloid β precursor protein (APP, amyloid beta precursor protein; XB-GENE-479158; NCBI: X1.8671), the main pathogenic genes of this disease, and the temporal and partial expression patterns of APP in the embryonic period of *Xenopus Laevis* (*X.laevis*) has not been clear yet. This study was designed to examine the temporal and spatial expression pattern of APP in the embryonic period of *X.laevis* and its possible functions. **Methods:** The normal embryonic tissues from frogs (at embryonic stages 2 to 4) were collected, and the expression of APP in different stages of embryonic development was detected by the whole-mount in situ hybridization and RT-PCR. The promoter activity was measured by the dual-reporter assays, and the Western blot analysis was used to determine the protein expression. **Results:** Our data revealed that the APP gene mainly had two types of mRNA variants: shorter 693~694aa and longer 750~751aa protein products, and the main difference was the alternative splicing of exon 7. All the APP transcripts were maternally expressed, and the shorter variant expressed predominantly, with a steadily increased expression level during the development, while the longer variant expressed weakly, but maintained a constant level during the whole embryonic stage. Results of the

作者介绍: 程良平, Email: chelsea_lpc@163.com,

研究方向: 儿科学。

通信作者: 李廷玉, Email: tyli@vip.sina.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180522.0941.014.html>

(2018-05-23)

whole-mount in situ hybridization showed that the APP mainly expressed in hatching and cement gland at neural plate stage, and after the closure of neural tube, the transcript level of APP elevated, presenting high expression in somatic mesoderm, pronephros and dorsal neural tube. At late tail-bud stage, the APP expressed in lens, telencephalon, epiphysis, diencephalon and dorsal otic vesicle. At tadpole stage, the APP highly expressed in the digestive system, including pancreas, stomach and duodenum. **Conclusion:** The specificity in the distribution of temporal and partial expression of APP, a maternally expressed gene, indicates the important role it plays in embryonic development, thus providing a new path to study the role of key pathogenic genes of AD in early embryogenesis.

[Key words] *Xenopus laevis*; development; expression pattern; embryo; amyloid beta (A β) precursor protein

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 的特征主要有记忆和认知功能的进行性丧失。据 2015 年美国官方统计数据, AD 已经成为 65 岁以上人群疾病负担最重的疾病之一并呈逐年上升趋势^[1]。随着人口老龄化的加剧, 我国也面临同样严峻的问题。该病发病机理复杂, 目前尚无定论, 与其相关的基因已被广泛报道^[2-4]。遗传研究表明, 3 种基因突变引起常染色体显性早发型 AD^[5]: 淀粉样蛋白 β 前体蛋白 (amyloid beta precursor protein, APP)、早老素 1 (Presenilin1) 和早老素 2 (Presenilin2)。目前大多数 AD 病例是散发性迟发型, 原因未知。有报道载脂蛋白 E 等位 (ApoE) 基因变异与 AD 发生相关, ApoE e4 等位基因的患者发生迟发型 AD 的风险较高。全基因组关联研究确定了 *CRI* (Complement C3b/C4b Receptor 1)、*CLU* (Clusterin)、*PICALM* (Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein)、*BINI* (Bridging Integrator 1)、*EPHA1* (EPH Receptor A1)、*MS4A* (Membrane Spanning 4-Domains A10)、*CD33* (CD33 Molecule)、*CD2AP* (CD2 Associated Protein) 和 *ABCA7* (ATP Binding Cassette Subfamily A Member 7) 基因中检测的突变体也与迟发型 AD 有关联^[6-10]。

淀粉样蛋白 β 蛋白 (A β) 沉积形成神经炎斑块是 AD 患者大脑的主要病理特征^[11]。A β 是通过 β -分泌酶和 γ -分泌酶将 APP 逐次切割产生^[12]。然而, 非淀粉样变性途径是体内的主要途径。一般正常情况下, APP 主要通过 A β 结构域内的 α 分泌酶首先切割, 排除 A β 产生。 β 位点 APP 切割酶 1 (Beta-Secretase 1, BACE1) 及其同源物 BACE2 (Beta-Secretase 2, BACE2) 也有助于非淀粉样蛋白生成途径。BACE2 作为 θ 分泌酶, 在 A β Phe20 位点切割 APP, 产生 C80 (CTF θ)^[13-15]; 在生理条件下, BACE1 主要在 A β Glu11 β -分泌酶位点切割 APP 产生 C89, 随后 γ 分泌酶切割 C89 以产生截短的 A β 11-40^[14]。在病理

情况下需要 BACE1 和 γ 分泌酶对 APP 进行剪切以产生 A β 在淀粉样变性途径中起致病作用。BACE1 首先在 A β Asp1 位点切割 APP 以产生 C99, 随后, γ 分泌酶切割 C99 释放 A β 和 CTF γ ^[16]。因此, 通过降低 A β 产生抑制 BACE1 和 (或) γ -分泌酶活性可能是治疗 AD 有效的方式^[17-20]。

APP 是具有单次跨膜结构域的糖蛋白。编码 3 种主要 APP 转录本, 分别是 APP695、APP751 和 APP770。大脑神经元中 APP695 的表达占优势^[21-23]。APP 基因突变是导致早发型 AD 的第一个已鉴定的遗传突变^[24]。APP 的表达受到严格调控^[25]。哺乳动物包括人和猴 APP 基因转录由复合启动子调控^[26-27]。异常 APP 表达是 AD 发病的主要原因^[23, 28]。APP 的表达升高参与早发型和迟发型 AD 的发病机制。21 号染色体三倍体引起的唐氏综合征 (Down syndrome, DS) 患者与对照组相比, 脑中 APP 表达量较高, 中年之后不可避免地会发展为 AD, 其他 21 号染色体上基因的表达增加, 如 RCAN1 (regulator of calcineurin 1, RCAN1) 表达上升也被怀疑与早发型 AD 相关^[29-33]。APP 因为发生基因重复或 APP 启动子突变而引起过表达也可能导致早发型 AD^[34-35]。重要的是, 最近的研究表明 APP 上调也涉及迟发型 AD。下调 APP 表达的 MiR-106b 在散发性 AD 中发现明显降低^[36], 并且在散发性 AD 中报道了 APP mRNA 水平的明显增加^[37]。总之, 这些研究表明 APP 表达和加工的失调在 AD 发病机制中起关键作用。

最近的研究表明, APP 参与大脑发育和修复^[38-39], 潜在的机制仍未完全阐明, 非洲爪蛙胚胎是研究胚胎早期神经发育良好的模式动物, 它已经被广泛应用于神经学研究^[40-42]。过去通过手术分离胚胎不同的组织, RT-PCR 方法报道了 APP 在胚胎不同组织中表达的丰度^[43], 但是 APP 在胚胎发育中精细的时空表达图示尚未被详细刻画。在本研究中,

通过整体胚胎原位杂交和切片描述 APP 在早期胚胎发育中的表达图示,确定了不同转录本的存在形式及表达丰度。本研究进一步验证了 APP 表达的启动子,及其受到 β -分泌酶切割的位点的保守性,为进一步揭示它们在 AD 中的发病机制打下基础。

1 材料和方法

1.1 非洲爪蛙胚胎获取,APP 原位杂交和组织切片

如前所述^[44],进行体外受精,胚胎培养和非洲爪蛙胚胎的全原位杂交。将保存的整体胚胎包埋入石蜡中,切片没片 30 μm 。APP 原位杂交探针,用引物克隆 APP 片段:正向:5'-CAAGAGCCGCACTCACATT-3',反向 5'-CCTCATCATCAT-CCGTTTCC-3'。将非洲爪蛙 APP 全长基因用 *EcoRI* 和 *XhoI* 基因克隆进入 pCS2+载体中,单酶切从基因中间线性化后,用 SP6 转录出地高辛标记的反义 RNA 全长。

1.2 爪蛙 APP 的 mRNA 水平检测

依据 Nieuwkoop Faber 图谱^[45]收集爪蛙胚胎 2 期到 45 期胚胎,包括卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚、尾牙期和蝌蚪期。用 Trizol(天根)提取胚胎总 RNA,RT-PCR 检测 APP 基因不同转录本在各个发育时期的表达丰度,用看家基因 H4 作为内参。半定量 RT-PCR 所用引物见表 1。

1.3 APP 启动子克隆,体外表达和双荧光素酶报告基因系统检测

构建启动子序列质粒,在 UCSC 和 NCBI 数据库中分别查找到爪蛙基因 APP 编码区上游以 ATG 的 A 为 0 向前为负的 +200/-2000 序列,分别用来检测 APP 可能的最小启动子区域;其中短片段-1/-270 上游 APP *Mul* I:5'-cgacgcgt-AGCAGGGTATCCCAAAAG-3',下游-1/-270APP *Xho* I:5'-ccgctcgagGGCTGCGGATCCACCACCGATCGAC-3';长片段上游-1/-1541APP *Mul* I:5'-cgacgcgtAGGGGATTTTCTGGAG-TTTAG-3',下游-1/-1541APP *Xho* I:5'-ccgctcgagGGCTGC-GGATCCACCACCGATCGAC-3';为了消除长片段效应,设计 APP 长片段反向,R-1/-1541 上游 APP *Xho* I:5'-ccgctcga-gAGGGGATTTTCTGGAGTTTAG-3'R-1/1541 下游 APP *Mlu* I:5'-cgacgcgtGGCTGCGGATCCACCACCGATCGAC-3'引物。将产物克隆进荧光素酶报告基因质粒载体 pGL3-basic 用来检

测荧光素酶活性;经英俊测序公司测序验证后扩增试剂盒抽提(天根 DP105-03),再按照标准 protocol 使用 Invitrogen 公司的 Lipo2000 转染。构建表达载体,使用 St.38 非洲爪蛙 cDNA 文库作为模板,用正向引物 5'-CGCGAATTCATGCTG-CCCCATATAACGC-3'和反向 5'-CGCCTCGAGTTAGTTC-TGCATCTGTTTCAAG-3'做逆转录 PCR,克隆爪蛙 APP 全长。用 *EcoR* I 和 *Xho* I 将 xAPP(XM_018244879.1)克隆到表达载体 pcDNA4A 中。非洲爪蛙 BACE2 克隆入 pcDNA4A,正向引物:5'-CGCGAATTCATGAAGATCCATTCCTCAGTTTGC-3'和反向 5'-CGCCTCGAGTTTCCATCGGTGTTGGACCAAC-3'。人类 BACE1 表达载体和稳转 2EB2 和 20E2 细胞株以及 Western blot 所用抗体 β -actin 和抗 APP 抗体 C20 都是实验室之前保存的。

双荧光素酶报告基因检测体系参照标准 protocol (Promega, Madison, WI, USA)^[46] 质粒转染 24 孔板 48 h 后收样加入 120 μL $\times$ PLB(passive lysis buffer)裂解完全后,取 10 μL 裂解液与 firefly luciferase assay reagent II 混合,检测荧光再加入 Stop and Glo[®] Reagent 每个 5 μL ,海肾荧光素(Renilla)报告基因载体 pCMV-Rluc 共转染作内参并用来标化检测结果。空载 pGL3-basic 作为阴性对照,pGL3 promoter 作为阳性对照;反向长片段质粒为了消除长片段效应同时作为阴性对照。

通过检索数据库,依据 Pedersen 等报道^[47]所述构建系统发育树,下载全长蛋白质序列用于树的构建。使用来自 GeneBank 的人、大鼠、小鼠、斑马鱼和果蝇 APP 蛋白序列。所用蛋白质的登录号为 P05067。使用分子进化遗传学分析软件 MEGA5^[48]建立基因系统发育树。

2 结果

2.1 爪蛙 APP 基因的时间表达模式

位于非洲爪蛙染色体 2L(NC_030726.1)中的淀粉样蛋白前体蛋白基因(APP)基因座位置:17,548,748-17,723,613。整个 APP 基因由 17 个外显子组成。以前的研究报道了 2 种不同转录本,成年非洲爪蛙中较短的(695 aa)和较长(751~770 aa)选择性剪接形式^[43]。国家生物技术信息网站最近的数据更新主要在非洲爪蛙中显示了两种 APP 转录本,较长的

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	PCR条件
APP-Xenopus laevis	识别长的转录本上游: AAGCCACCGAAAGAACAACA	94 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,30 个循环;
	识别长的转录本下游: TTTCCGTCACATCATAATACCAG	55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 1
	识别全部转录本上游: CAAGAGCCGCACTCACATT	个循环
	识别全部转录本下游: CCTCATCATCATCCGTTTCC	
H4-Xenopus laevis	上游: GGAATTCGAGCAAGAGATGG	H4, PCR 反应 23 个循环
	下游: GAAGCATTTGCGGTGGAG	

剪切体(NM_001088629.1 或 XM_018244877.1)翻译了 749~750 个氨基酸(aa)和较短的剪切体(XM_018244879.1 或 XM_018244878.1),产生了 693~694 aa。较短的 APP 成熟 mRNA 与较长的差异只是少了外显子 7,这可能是由于外显子的可变剪接造成。为了研究 APP 不同转录本的表达水平差异,分别使用引物 A、B 如图 1A 所示,通过半定量 RT-PCR,检测 APP 的 mRNA 表达水平(图 1B)。H4 作为 RT-PCR 中的内参基因。APP(B)表示总 APP 的 mRNA,其表达量比 APP(A)高 2~3 倍,表明所有的 APP 亚型都是母源性表达的。长转录本 APP(A)在整个早期发育阶段保持相对微弱但恒定的表达水平,在不同发育阶段的相对表达强度没有显著差异。使用 Image J 所做的灰度分析并用 Graph Pad prism6 进行相对定量分析 APP(B)相对表达强度:St.2:0.15 ± 0.031, St.7:0.186 ± 0.062, St.10:0.146 ± 0.028, St.20:0.141 ± 0.03, St.25:0.146 ± 0.021, St.28:0.092 ± 0.12, St.38:0.145 ± 0.134, St.40:0.137 ± 0.03, St.45:0.15 ± 0.028(图 1C)。APP 短转录本在尾芽期(st25)开始明显升高,表达丰度稳步增长。短转录本的表达强度与较长的转录本相比,从 25 期至 45 期明显增加(3~10 倍)。APP(A)相对表达强度:St.25:0.651 ± 0.188, St.28:0.631 ± 0.12, St.38:1.498 ± 0.053, St.40:1.426 ± 0.321, St.45:1.62 ± 0.067(图 1B、C)。我们的数据表明 APP 是母源性基因,较短的转录本是早期胚胎发育过程中的主要转录物。

2.2 非洲爪蛙胚胎发育早期 APP 基因的时空表达模式

据以往报道推测,由于基因表达的组织特异性,已经报道了 2 种不同的 APP 基因转录本,以组织特异分布的模式表达。较短的(695 aa)形式主要表现在脑、卵母细胞和生殖器官中,而较长的(751~770 aa)选择性剪接形式主要在心

脏、肺、肝、肾和脾中表达^[43]。先前报道的 APP 表达模式主要用了解剖所得的胚胎部分组织进行 RT-PCR 获得。具有更高分辨率的整胚原位杂交显示 APP 的确切时间和空间表达模式尚未被描述。在这项工作中,我们的结果显示了 2 个 APP 转录本都部分是母源性表达的。APP 总量在尾芽期(St28)开始时明显升高,随后发育阶段呈现恒定的表达水平(图 1C)。由于无法通过原位杂交了解不同转录本的 APP,因此我们设计了能识别所有 APP 转录本的探针。在神经板阶段(St18),APP 基因在孵化腺和胶黏腺处清晰表达,形成四边形结构;神经板和推测前肾(黑箭头)中表达 A 前面观,背侧在上,B 侧视图,头在右侧(图 2A、B)。在早期尾芽阶段,APP 转录升高,在体细胞中胚层、前肾和背侧神经管中表现出强的信号,图 2D 中的虚线表示由此位置做切片分析切面染色的图分别如图 E 和 F 所示(图 2D~F)后文的 G 图中虚线所示也是切面所处位置。尾芽后期,APP 阳性信号在晶状体、背侧端脑、间脑、松果体和背侧耳泡中表达。图 2G~I 展示了整胚及切面部分空间表达分布,显示间脑和晶状体有强烈而清晰的 APP 表达。在 St. 25 早期尾芽期,APP 在体细胞中胚层、前肾和背侧神经管中表达信号较强 G 图虚线处显示胚胎切面 H, I 图所示部分:APP 表达情况显示形成背耳泡中的 APP 转录水平呈现梯度表达。在 St45 期蝌蚪期,APP 存在于包括胰腺、胃和十二指肠在内的胚胎消化系统中(图 2C)。蓝色信号所示器官特异性发育起源的位置表明其可能参与相关器官发育。

2.3 爪蛙 APP 基因核心启动子区

本部分共设计了 ATG 上游 2 000 bp 区间内间隔每 200~300 bp 片段的引物构建载体连接到 pGL3-Basic 空载

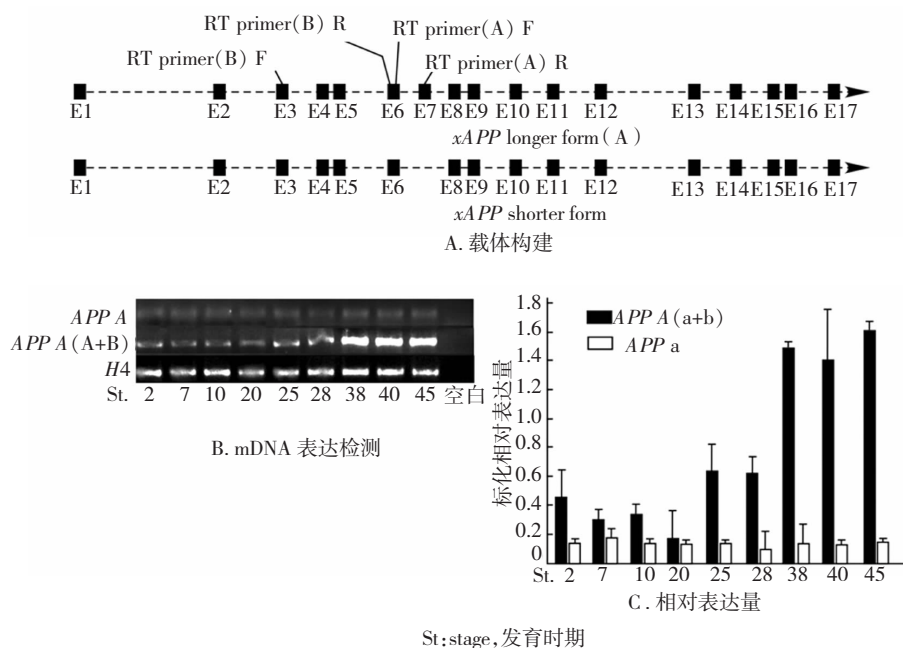


图 1 mRNA 水平检测胚胎不同时期爪蛙 APP mRNA 的表达情况

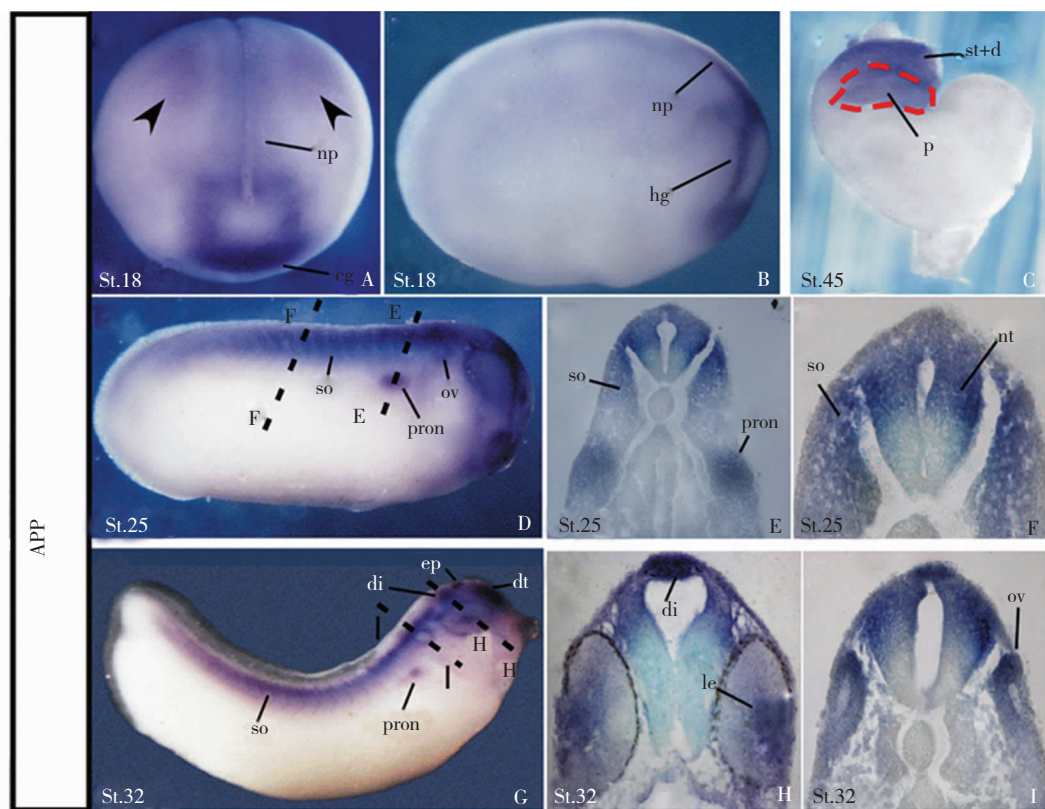
Fig.1 Temporal expression of APP mRNA

上,最后筛选出 2 个代表性的质粒。其中一个是最短的,但活性是最强的从-1 到-270 之间的片段构成质粒 pXAPP-A 和另一个最长的,同时也具有启动子活性的-1 到-1541 之间的片段构成的质粒 pXAPP-B,由于启动子是有方向性的,为了消除长片段效应,同时设计了长片段的反向序列质粒,最终得出爪蛙 APP 基因核心启动子区为 ATG 上游 270 bp 以内数字表示每个结构的终点。值表示平均值 $\pm$ SEM, $n=3$,通过单因素方差分析,然后进行 Turkey 多重比较检验。* 代表与 pGL3 Basic 相比启动子活性变化有显著性(图 3A、B)。荧光素酶报告基因系统检测结果显示-1/-270 pXAPP-A 活性(96.73 ± 1.76)是阳性对照 p-GL3-SV40-Promoter 活性(50.22 ± 0.71)的 2 倍,是长片段-1/-1541 pXAPP-B 活性的 3 倍(33.03 ± 0.71), $P<0.05$],而反向的长片段启动子活性为(0.19 ± 0.01),基本上没有启动子活性(图 3B)。

2.4 爪蛙 APP 基因物种保守性分析

通过序列比对发现 APP 在斑马鱼、鸡、非洲爪蛙、热带爪蛙、小鼠和人中均有同源基因,非洲爪蛙 APP 蛋白氨基酸序列与各脊椎动物比较的一致性百分数分别为热带爪蛙 98.4%、鸡 90.3%、人 90.7%、小鼠 90.5%、斑马鱼 79%(表 2)。为了进一步探讨 APP 蛋白在各物种间的进化关系,我们构建了该蛋白的进化树。对不同物种的 APP 蛋白质序列所作

的进化树分析,线条和数字分别表同源性距离长短和保守程度(图 3C)。结果显示 APP 在非洲爪蛙和热带爪蛙上比对保守率为 100%,具有极高的同源性,APP 的碳末端(C 末端,C-terminal)区域的保守性分析结果表明小鼠和人的 APP 高度同源且保守。通过从 UniProt 数据库下载的不同蛋白质序列进行比对,截取 C 末端区域,可见产生 C83 的 C 末端片段的 α -分泌酶位点,产生 C89 或 C99 β -分泌酶位点,产生 C80 的 θ 分泌酶位点和随后由切割为不同种类多肽的 γ 分泌酶位点在人类和非洲爪蛙之间的氨基酸序列甚至完全相同(图 3D)。综上可以看出 APP 在进化上十分保守,提示其具有重要的生物学功能。由于人类 APP 蛋白可以在物理或病理条件下经过一系列分泌酶水解生成不同大小的多肽。为了描述爪蛙 APP 的不同切割方式,本研究比对了不同物种之间的 APP 序列。蛋白质序列比对显示 APP 在不同动物中生成 $A\beta$ 的碳末端结构域的高度保守(图 3D)。人类、小鼠、鸡、斑马鱼和爪蛙中 APP 蛋白的系统发育分析树表现出极高的一致性,表明进化上保守的性质(图 3C,表 2)。为了描述 APP 的切割过程,通过 PCR 从 St.38 非洲爪蛙脑 cDNA 文库中分离非洲爪蛙 APP 全长 cDNA,然后克隆到哺乳动物表达质粒 pcDNA4/ myc-His 载体中体外表达爪蛙 APP 蛋白。将含有全长人类野生型 APP cDNA 的质粒 pcDNA4-hAPP 和编码爪



eg: 黏液腺; d: 十二指肠; di: 间脑; dt: 端脑; ep: 松果体; hg: 孵化腺; le: 晶状体; np: 神经板; nt: 神经管; ov: 耳泡; p: 胰腺; pron: 前肾; so: 体结; st: 胃; St: 发育时期的缩写; 黑色虚线处显示切片位置, 红色虚线表示内脏胰腺所在位置

图 2 APP 的表达图示

Fig.2 The spatial expression pattern of APP in *Xenopus* embryo

蛙 APP 蛋白质粒 pcDNA4-xAPP 分别转染到 HEK293 细胞。将稳定表达瑞典突变体 APP 和 BACE1 的 HEK293 稳转细胞株 20E2 和 2EB2 水解产物用作 APP 蛋白分子标志(C83 主要在 20E2 和 C99 主要在 2EB2 中)^[49]。使用 C20 抗体进行蛋白质印迹分析,以检测 APP 及其蛋白质水解产物。用抗 APP

抗体 C20 检测爪蛙 xAPP 蛋白,类似于人的 Hwt.APP 蛋白(图 3E)。在 pcxAPP 转染的细胞中也检测到 C83,即 α -分泌酶产物(图 3E)。在 β -分泌酶(BACE1)或 θ -分泌酶(BACE2)的存在下,水解爪蛙 xAPP 产生 C89 和 C99 或 C80(图 3F)。数据显示非洲爪蛙 APP 蛋白与人类具有相同的剪切水解模式。

表 2 不同物种间一致性百分数

Tab.2 The accordance rate in different species

物种	非洲爪蛙	热带爪蟾	鸡	人	小鼠	斑马鱼
氨基酸长度	748	749	750	750	750	729
一致性 (%)	100.0	98.4	90.3	90.7	90.5	79.0

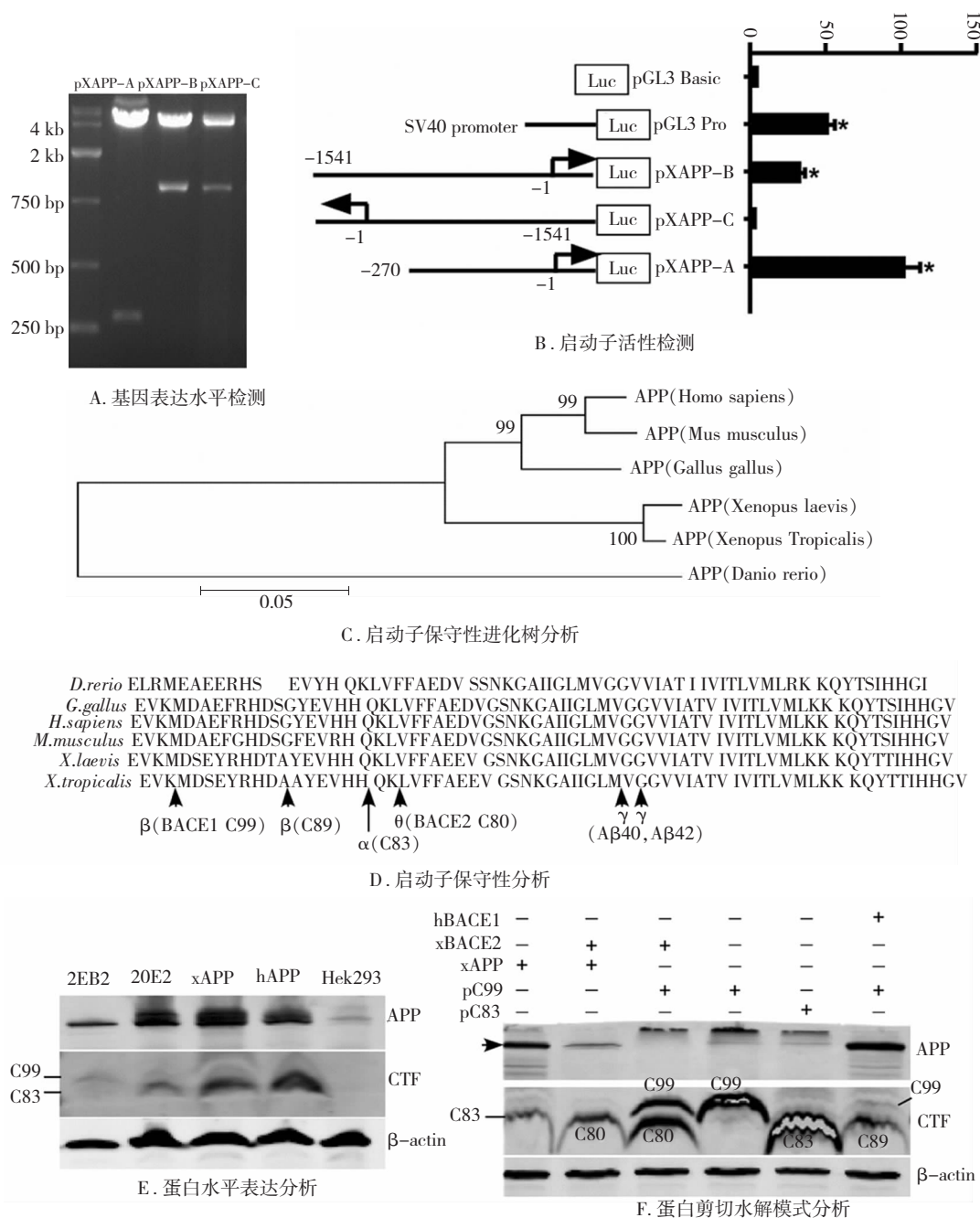


图 3 爪蛙 APP 核心启动子区的鉴定及物种保守性进化树分析

Fig.3 The identification of APP core promoter regions in *Xenopus laevis* and the analysis of phylogenetic trees

3 讨 论

APP 是单次跨膜糖基化蛋白,它在大脑经历复杂的蛋白水解过程,最后生成 A β 沉积的病理过程研究已经屡见不鲜,潜在的发生机制仍然没有阐述清楚,APP 基因在早期胚胎期的表达模式及其在发育中的作用尚未明确。

非洲爪蛙胚胎是研究早期发育的最佳模式动物之一,它通常用于神经嵴研究^[40-42]。在本研究中,非洲爪蛙 APP 基因在神经系统中表达无处不在。APP mRNA 存在于背侧神经管、晶状体、端脑、耳泡、间脑和背侧囊泡中,意味着其神经参与功能与人类相似。本研究中发现胚胎消化系统,如胰腺、胃和十二指肠中有 APP 的表达。近期的研究报道了人和小鼠成年动物中类似的胰腺表达模式,胰腺中 APP 的加工影响胰岛素分泌。本课题组还发现在前肾中有明确的 APP 转录。其在肾脏发育中的作用需要进一步研究。非洲爪蛙 APP 进化过程中具有保守功能结构域和分泌酶切割位点,与人 APP 高度保守。说明较低的脊椎动物胚胎可用于人类基因研究。关于本研究的局限性,主要在于应用非洲爪蛙作为研究 AD 并不太适合,首先在爪蛙中建立 AD 的模型没有太多说服力,因为无法进行更多的行为评估,这是最大的硬伤,但在研究早期发病的分子机制方面确有天然优势,例如对相关通路上的关键基因的突变产生的功能研究非常有利。本研究表明,非洲爪蛙可能是进一步探索 APP 基因功能和对早期胚胎发育和对神经变性疾病潜在作用的影响的一种优秀模式动物。

参 考 文 献

- [1] Alzheimer's A. 2015 Alzheimer's disease facts and figures[J]. *AlzheimersDement*, 2015, 11(3):332.
- [2] Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies[J]. *Cell*, 2012, 148(6):1204-1222.
- [3] Tang K, Wang C, Shen C, et al. Identification of a novel alternative splicing isoform of human amyloid precursor protein gene, APP639[J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 18(1):102-108.
- [4] Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, et al. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids[J]. *Nature*, 1992, 359(6393):325-327.
- [5] Zhang S, Zhang M, Cai F, et al. Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis[J]. *Transl Neurodegener*, 2013, 2(1):15.
- [6] Naj AC, Jun G, Beecham GW, et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(5):436-441.
- [7] Hollingworth P, Harold D, Sims R, et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(5):429-435.
- [8] Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, et al. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease[J]. *JAMA*, 2010, 303(18):1832-1840.
- [9] Lambert JC, Heath S, Even G, et al. European Alzheimer's disease initiative investigators. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(10):1094-1099.
- [10] Harold D, Abraham R, Hollingworth P, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(10):1088-1093.
- [11] Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease; initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein[J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 1984, 120(3):885-890.
- [12] Sun X, Bromley-Brits K, Song W. Regulation of β -site APP-cleaving enzyme 1 gene expression and its role in Alzheimer's disease[J]. *J Neurochem*, 2012, 120(s1):62-70.
- [13] Liu X, Wang Z, Wu Y, et al. BACE2 degradation mediated by the macroautophagy-lysosome pathway[J]. *Eur J Neurosci*, 2013, 37(12):1970-1977.
- [14] Deng Y, Wang Z, Wang R, et al. Amyloid- β protein(A β) Glu11 is the major β -secretase site of β -site amyloid- β precursor protein-cleaving enzyme 1(BACE1), and shifting the cleavage site to A β Asp1 contributes to Alzheimer pathogenesis[J]. *Eur J Neurosci*, 2013, 37(12):1962-1969.
- [15] Sun X, Wang Y, Qing H, et al. Distinct transcriptional regulation and function of the human BACE2 and BACE1 genes[J]. *FASEB J*, 2005, 19(7):739-749.
- [16] Zhang Z, Nadeau P, Song W, et al. Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1[J]. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(7):463-465.
- [17] Ly PT, Wu Y, Zou H, et al. Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes[J]. *J Clin Invest*, 2012, 123(1):224-235.
- [18] Chen CH, Zhou W, Liu S, et al. Increased NF- κ B signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2012, 15(1):77-90.
- [19] Chen B, Bromley-Brits K, He G, et al. Effect of synthetic cannabinoid HU210 on memory deficits and neuropathology in Alzheimer's disease mouse model[J]. *Current Alzheimer Research*, 2010, 7(3):255-261.
- [20] Qing H, He G, Ly PT, et al. Valproic acid inhibits A β production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease

- mouse models[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(12): 2781–2789.
- [21] Zimmermann K, Herget T, Salbaum JM, et al. Localization of the putative precursor of Alzheimer's disease-specific amyloid at nuclear envelopes of adult human muscle[J]. *EMBO J*, 1988, 7(2): 367.
- [22] Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, et al. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 1988, 331(6156): 528–530.
- [23] Neve RL, Finch EA, Dawes LR. Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain[J]. *Neuron*, 1988, 1(8): 669–677.
- [24] Goate A, Chartier-Harlin MC. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 1991, 349(6311): 704.
- [25] Theuns J, VanBroeckhoven C. Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes; implications for susceptibility[J]. *Human Molecular Genetics*, 2000, 9(16): 2383–2394.
- [26] Song W, Lahiri DK. Functional identification of the promoter of the gene encoding the Rhesus monkey β -amyloid precursor protein[J]. *Gene*, 1998, 217(1): 165–176.
- [27] Song W, Lahiri DK. Molecular cloning of the promoter of the gene encoding the Rhesus monkey β -amyloid precursor protein; structural characterization and a comparative study with other species[J]. *Gene*, 1998, 217(1): 151–164.
- [28] Sun X, He G, Qing H, et al. Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(49): 18727–18732.
- [29] Wu Y, Song W. Regulation of RCAN1 translation and its role in oxidative stress-induced apoptosis[J]. *FASEB J*, 2013, 27(1): 208–221.
- [30] Sun X, Wu Y, Chen B, et al. Regulator of calcineurin 1 (RCAN1) facilitates neuronal apoptosis through caspase-3 activation[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(11): 9049–9062.
- [31] Cheon MS, Dierssen M, Kim SH, et al. Protein expression of BACE1, BACE2 and APP in Down syndrome brains[J]. *Amino Acids*, 2008, 35(2): 339–343.
- [32] Sun X, Tong Y, Qing H, et al. Increased BACE1 maturation contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome[J]. *FASEB J*, 2006, 20(9): 1361–1368.
- [33] Oyama F, Cairns NJ, Shimada H, et al. Down's syndrome; up-regulation of β -amyloid protein precursor and τ mRNAs and their defective coordination[J]. *J Neurochem*, 1994, 62(3): 1062–1066.
- [34] Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(1): 24.
- [35] Brouwers N, Sleegers K, Engelborghs S, et al. Genetic risk and transcriptional variability of amyloid precursor protein in Alzheimer's disease[J]. *Brain*, 2006, 129(11): 2984–2991.
- [36] Hebert SS, Horreik K, Nicolai L, et al. MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression[J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 33(3): 422–428.
- [37] Matsui T, Ingelsson M, Fukumoto H, et al. Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease[J]. *Brain Res*, 2007, 1161: 116–123.
- [38] Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, et al. A critical function for β -amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(52): 14459–14469.
- [39] Leyssen M, Ayaz D, Hebert SS, et al. Amyloid precursor protein promotes post-developmental neurite arborization in the Drosophila brain[J]. *EMBO J*, 2005, 24(16): 2944–2955.
- [40] Theveneau E, Mayor R. Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration[J]. *Dev Biol*, 2012, 366(1): 34–54.
- [41] Trainor PA. Craniofacial birth defects; the role of neural crest cells in the etiology and pathogenesis of Treacher Collins syndrome and the potential for prevention[J]. *Am J Med Genet A*, 2010, 152A(12): 2984–2994.
- [42] Betancur P, Bronner-Fraser M, Sauka-Spengler T. Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2010, 26: 581–603.
- [43] Collin RW, van den Hurk WH, Martens GJ. Biosynthesis and differential processing of two pools of amyloid- β precursor protein in a physiologically inducible neuroendocrine cell[J]. *J Neurochem*, 2005, 94(4): 1015–1024.
- [44] Shi Y, Li J, Chen C, et al. 5-methyltetrahydrofolate rescues alcohol-induced neural crest cell migration abnormalities[J]. *Molecular Brain*, 2014, 7(1): 67.
- [45] Nieuwkoop PD, Faber J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis[M]. Garland Publisher New York, 1994.
- [46] Li Y, Zhou W, Tong Y, et al. Control of APP processing and A β generation level by BACE1 enzymatic activity and transcription[J]. *FASEB J*, 2006, 20(2): 285–292.
- [47] Pedersen JK, Nelson SB, Jorgensen MC, et al. Endodermal expression of Nkx6 genes depends differentially on Pdx1[J]. *Developmental Biology*, 2005, 288(2): 487–501.
- [48] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [49] Sun X, He G, Song W. BACE2, as a novel APP theta-secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome[J]. *FASEB J*, 2006, 20(9): 1369–1376.

(责任编辑:张辉洁)