

姜黄素通过提高 Rab 家族蛋白的表达增强 N2a/APP695swe 细胞的自噬作用

周凡琳¹,熊晓敏¹,梁洁¹,张雄²,李世杰¹,高敏娜¹,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:研究姜黄素(curcumin)对 N2a/APP695swe 细胞中自噬和 Rab 家族蛋白的影响,并且探讨姜黄素调节 N2a/APP695swe 细胞自噬的可能机制。**方法:**采用 N2a/WT 和 N2a/APP695swe 细胞,并将其分为 4 个组:N2a/WT 组(WT 组)、N2a/APP695swe 组(APP 组)、DMSO 溶剂对照组(DMSO 组,5 $\mu\text{mol/L}$, 24 h)、curcumin 处理组(curcumin 组,5 $\mu\text{mol/L}$, 24 h)。Western blot 分别检测各组自噬标志蛋白 LC3B II 和底物蛋白 SQSTM1 的表达,以及 Rab 家族蛋白 Rab1、Rab5、Rab7、Rab9、Rab24 和 Rab33B 的表达;共聚焦显微镜观察免疫荧光进一步验证各组 LC3B II 与 SQSTM1 蛋白的表达情况。**结果:**Western blot 结果表明,curcumin 组 LC3B II 蛋白表达量明显高于 APP 组和 DMSO 组(0.54 ± 0.02 vs. 0.29 ± 0.09 , 0.54 ± 0.02 vs. 0.29 ± 0.09 , $P=0.000$);同时,curcumin 组 SQSTM1 蛋白表达量则明显低于 APP 组(0.67 ± 0.01 vs. 1.02 ± 0.02 , $P=0.000$)。共聚焦显微镜观察免疫荧光实验再次验证了 LC3B 和 SQSTM1 蛋白的这种表达趋势。Western blot 进一步检测发现,与 APP 组相比,curcumin 组 Rab 家族蛋白 Rab1、Rab5、Rab7 和 Rab33B 的蛋白表达量均明显增加(1.00 ± 0.02 vs. 0.63 ± 0.02 , $P=0.000$; 0.94 ± 0.03 vs. 0.79 ± 0.03 , $P=0.000$; 0.75 ± 0.00 vs. 0.56 ± 0.01 , $P=0.000$; 0.88 ± 0.04 vs. 0.59 ± 0.03 , $P=0.000$),而 Rab9 和 Rab24 的改变差异无统计学意义(1.04 ± 0.02 vs. 1.06 ± 0.02 , $P=0.578$; 0.79 ± 0.00 vs. 0.80 ± 0.00 , $P=0.067$)。**结论:**姜黄素提高 N2a/APP695swe 细胞的自噬水平,其机制可能与增强 Rab 家族蛋白 Rab1、Rab5、Rab7 和 Rab33B 的表达有关。

【关键词】姜黄素;自噬;Rab 家族蛋白;阿尔茨海默病

【中图分类号】R741.02

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-07-10

Curcumin enhances the autophagy of N2a/APP695swe cells by up-regulating expression of the Rab family proteins

Zhou Fanlin¹, Xiong Xiaomin¹, Liang Jie¹, Zhang Xiong², Li Shijie¹, Gao Minna¹, Li Yu¹

(1. Department of Pathology, Chongqing Medical University;

2. Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of curcumin the autophagy of N2a/APP695swe cells and its possible mechanism. **Methods:** N2a/WT cells and N2a/APP695swe cells were selected as experimental cells. They were divided into four groups: N2a/WT group (WT group), N2a/APP695swe group (APP group), dimethylsulfoxide (DMSO) solvent control group (DMSO group, 5 $\mu\text{mol/L}$, 24 h), and curcumin treatment group (curcumin group, 5 $\mu\text{mol/L}$, 24 h). Western blot was used to determine the expression of autophagy marker — microtubule-associated protein light chain 3B-II (LC3B II), substrate protein-sequestosome 1 (SQSTM1), and Rab family proteins (Rab1, Rab5, Rab7, Rab9, Rab24, and Rab33B). Immunofluorescence assay was performed using a confocal microscope to verify the expression of LC3B II and SQSTM1. **Results:** Western blot results demonstrated that the curcumin group had significantly higher expression of LC3B II compared with the APP group and the DMSO group (0.54 ± 0.02 vs. 0.29 ± 0.09 , $P=0.000$; 0.54 ± 0.02 vs. 0.29 ± 0.09 , $P=0.000$). However, the curcumin group had significantly lower expression of SQSTM1 than the APP group (0.67 ± 0.01 vs. 1.02 ± 0.02 , $P=0.000$). And the immunofluorescence assay of LC3B II and SQSTM1 confirmed the above results. Western blot results also showed that the curcumin group had significantly increased expression of Rab1, Rab5, Rab7, and Rab33B compared with the APP group (1.00 ± 0.02 vs. 0.63 ± 0.02 , $P=0.000$; 0.94 ± 0.03 vs. 0.79 ± 0.03 , $P=0.000$; 0.75 ± 0.00 vs. 0.56 ± 0.01 , $P=0.000$; 0.88 ± 0.04 vs. 0.59 ± 0.03 , $P=0.000$). However, there were no significant differences in the expression of Rab9 and Rab24

作者介绍:周凡琳, Email: 371642906@qq.com,

研究方向:神经退行性疾病。

通信作者:李昱, Email: liyu100@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81671261)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181031.0959.008.html>

(2018-11-01)

between the APP group and the curcumin group (1.04 ± 0.02 vs. 1.06 ± 0.02 , $P=0.578$; 0.79 ± 0.00 vs. 0.80 ± 0.00 , $P=0.067$).
Conclusion: Curcumin can enhance the autophagy of N2a/APP695swe cells, probably by increasing the expression of Rab1, Rab5, Rab7, and Rab33B.

[Key words] curcumin; autophagy; Rab family proteins; Alzheimer's disease

自噬是细胞利用溶酶体降解大分子物质和受损细胞器的过程,对于维持细胞内环境的稳态非常重要^[1]。细胞自噬由以下 4 个步骤组成:①自噬吞噬泡的形成;②自噬体的形成;③自噬溶酶体的形成;④自噬溶酶体的降解。Rab 家族蛋白属于 Ras 样 GTP 酶超家族,可以在活性状态(GTP 结合)和非活性状态(GDP 结合)之间转换,在不同的胞内囊泡转运过程中起着十分关键的作用^[2-3]。越来越多的研究发现,Rab 家族蛋白因其可以参与运输小泡形成、运输和结合的过程而参与了自噬的过程^[4]。例如,在自噬的起始阶段,Rab1、Rab5 和 Rab33B 参与自噬体的早期形成过程^[5-6]。最近发现通过依赖 Rab9 的一条自噬途径,可以不依赖自噬相关基因(autophagy-related genes, ATG) Atg5、Atg7,与反式高尔基体和晚期体内囊泡的融合形成自噬体^[7]。而在自噬过程的晚期阶段,Rab7 参与了自噬体成熟^[8]。Rab24 也被证实参与了经典的自噬过程,且与 LC3 存在共定位^[9]。无论是在自噬体形成的初始阶段还是自噬体成熟的晚期阶段,Rab 家族蛋白均发挥重要调节作用^[10]。LC3B 和 SQSTM1 作为自噬的重要标记蛋白和底物蛋白,是自噬发生的重要指标^[11]。自噬激活时,胞质中的 LC3BI 在泛素样反应酶的作用下转变成 LC3B II,并且定位于自噬体内外膜上。SQSTM1 作为自噬的底物蛋白,在自噬过程中随自噬体的降解而减少。

阿尔茨海默病(Alzheimer disease's, AD)是最常见的神经退行性疾病之一。有研究发现,在阿尔茨海默病患者的大脑中出现了大量的自噬体和自噬溶酶体。由于自噬体生成增加和降解减少导致自噬体在 AD 患者脑内大量聚集,无法顺利完成降解过程而对神经细胞发挥保护作用^[12]。姜黄素(curcumin)作为一种天然的多靶点植物提取物,已被证实具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用^[13]。本课题组前期研究发现,在姜黄素喂养 6 个月后的 12 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠(AD 的动物模型)的海马 CA1 区,有

大量的自噬体形成^[14]。然而,在 AD 中,姜黄素对自噬过程的影响和其神经保护机制尚未十分明确,Rab 家族囊泡转运蛋白在 AD 自噬中发挥的作用也有待进一步探讨和研究。本实验拟采用 N2a/WT 细胞和 N2a/APP695swe 细胞作为 AD 的体外研究细胞模型,根据前期实验研究选用 $5 \mu\text{mol/L}$ 的姜黄素处理。观察姜黄素是否调节 Rab 家族蛋白并促进自噬过程,探讨其可能机制,为 AD 的预防和治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

小鼠成神经瘤(Neuro-2a, N2a)野生型(N2a/WT)和稳定表达 Swedish 家族突变的人 APP695 型(N2a/APP695swe)细胞株均由和元生物科技有限公司构建。姜黄素购自 Sigma 公司;胎牛血清(FBS)购自 Biological Industries 公司;MEM 培养基购自 Gibco 公司;青霉素-链霉素溶液($100 \times$)、Western blot 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;即用型正常山羊血清购自博士德生物公司;鼠单抗 β -actin 抗体购自北京四正柏生物科技有限公司;鼠单抗 Rab33 和鼠单抗 Rab24 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;兔多抗 LC3B 和兔多抗 SQSTM1 均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔多抗 Rab1、兔多抗 Rab5 和兔多抗 Rab9 均购自 ABclonal 公司;山羊抗兔 IgG/Alexa Fluor® 488 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 N2a/WT 和 N2a/APP695swe 细胞分别用体积分数为 89%MEM、10%FBS、1%青链霉素双抗组成的混合培养液(N2a/WT 细胞培养液)和 89%MEM、10%FBS、1%青链霉素双抗、puro 组成的混合培养液(N2a/APP695swe 细胞培养液),置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养,取对数生长期的细胞用于以下实验。

1.2.2 免疫荧光检测 LC3B II 和 SQSTM1 的表达 取对数生长期的 N2a/WT 和 N2a/APP695swe 细胞分别均匀接种于放置在 24 孔板内的细胞爬片上。细胞贴壁后再培养 24 h,各取 3 孔 N2a/APP695swe 细胞分别加入 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 DMSO 和 curcumin 溶液。将细胞分为 N2a/WT 组(WT 组)、N2a/APP695swe 组(APP 组)、DMSO 溶剂对照组(DMSO 组, $5 \mu\text{mol/L}$)、

curcumin 处理组(curcumin 组, 5 $\mu\text{mol/L}$)4 个组继续培养 24 h。待处理完毕后,用 PBS(0.01 mol/L)漂洗(3 次 $\times$ 3 min),4%多聚甲醛固定 15 min,PBS(0.01 mol/L)漂洗(3 次 $\times$ 5 min)后收集 4 组细胞爬片(WT 组, APP 组, DMSO 组, curcumin 组)。收集后的爬片用即用型正常山羊血清封闭(30 min, 37 $^{\circ}\text{C}$),免多克隆抗体 LC3B(1:200)和 SQSTM1(1:200)湿盒中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS(0.01 mol/L)漂洗(3 次 $\times$ 5 min),荧光标记(Alexa Fluor[®] 488)山羊抗兔二抗(1:400)孵育(37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h)。随后,PBS(0.01 mol/L)漂洗(3 次 $\times$ 5 min),DAPI 染色液染核 10 min,再次 PBS(0.01 mol/L)漂洗(3 次 $\times$ 5 min),抗荧光淬灭封片剂封片,激光共聚焦显微镜下采集图像。实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 检测 LC3B II、SQSTM1 及 Rab 家族蛋白的表达 取对数生长期的 N2a/WT 和 N2a/APP695swe 细胞以合适密度,分别均匀接种于 6 孔板上。细胞贴壁后再培养 24 h,取 2 孔 N2a/APP695swe 细胞分别加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMSO 溶液和 curcumin 溶液。将细胞分为 N2a/WT 组(WT 组)、N2a/APP695swe 组(APP 组)、DMSO 溶剂对照组(DMSO 组, 5 $\mu\text{mol/L}$)、curcumin 处理组(curcumin 组, 5 $\mu\text{mol/L}$)4 个组继续培养 24 h。处理完毕后,用全蛋白提取试剂盒分别提取各组(WT 组、APP 组、DMSO 组、curcumin 组)细胞全蛋白。BCA 测蛋白浓度法测定细胞蛋白浓度,Western blot 分别测定 LC3B II、SQSTM1、Rab1、Rab5、Rab7、Rab9、Rab24 及 Rab33B 的蛋白表达水平。本实验选用 Image J 软件分析上述各组蛋白及内参 β -actin 的灰度值,计算各组蛋白与内参灰度值的比值。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 进行统计学分析,所有数据均以均数 $\pm$ 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 姜黄素提高 N2a/APP695swe 细胞中 LC3B II 的表达,并且降低 SQSTM1 的表达

姜黄素处理后可以提高 N2a/APP695swe 细胞中 LC3B II 的表达,并且降低 SQSTM1 的表达(表 1,图 1)。在姜黄素处理 24 h 之后,N2a/APP695swe 细胞中 LC3B II 的表达增加,SQSTM1 的表达降低。LC3B II 的 Western blot 结果显示(图 1A),与 APP 组相比,curcumin 组的表达明显增加且多于 WT 组的蛋白表达水平,差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$)。同时,与 N2a/APP695swe 组(APP 组)相比,curcumin 组和 WT 组的 SQSTM1 的表达量明显较低,差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$),DMSO 组差异无统计学意义($P=0.190$)。为了进一步检测自噬流,运用共聚焦显微镜观察 LC3B 与 SQSTM1 的免疫荧光(图 1B),LC3B 蛋白与 SQSTM1 蛋白均

表达于细胞浆,胞核中未见表达。LC3B 蛋白在 curcumin 组的荧光强度明显高于 WT、APP 及 DMSO 组。而与 APP 组相比,SQSTM1 蛋白在 curcumin 组与 WT 组荧光强度明显降低,DMSO 组无明显变化。

表 1 各组中 LC3B II 和 SQSTM1 的蛋白表达水平

($\bar{x} \pm s, n=3$)		
组别	LC3 II	SQSTM1
WT组	0.314 7 $\pm$ 0.177 9 ^b	0.914 1 $\pm$ 0.010 5 ^a
APP组	0.288 4 $\pm$ 0.083 7	1.020 4 $\pm$ 0.024 2
DMSO组	0.288 0 $\pm$ 0.090 3 ^b	1.041 2 $\pm$ 0.019 1 ^b
curcumin组	0.539 9 $\pm$ 0.018 7 ^{ac}	0.671 7 $\pm$ 0.014 1 ^{ac}
<i>F</i> 值	217.889	272.281
<i>P</i> 值	0.000	0.000

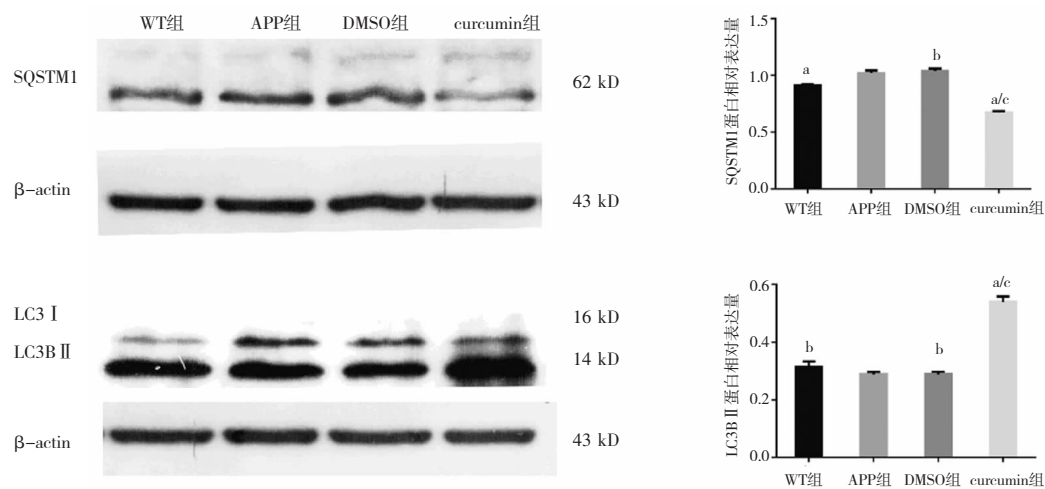
注:a,与 APP 组比较, $P<0.01$;b,与 APP 组比较, $P>0.05$;c,与 WT 组比较, $P<0.01$

2.2 姜黄素提高 Rab 家族蛋白 Rab1、Rab5、Rab7 和 Rab33B 的表达

姜黄素可以提高 Rab 家族蛋白 Rab1、Rab5、Rab7 和 Rab33B 的表达,对 Rab9 和 Rab24 蛋白水平的表达则无明显作用(表 2,图 2)。如图 2A 所示,APP 组细胞中 Rab1、Rab5、Rab7 和 Rab33 蛋白表达量均少于 WT 组,差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$);与 APP 组相比,DMSO 组细胞中 Rab1、Rab5、Rab7 和 Rab33 蛋白的表达量均无明显差异($P=0.731$, $P=0.224$, $P=0.327$, $P=0.762$);curcumin 组较 APP 组细胞中 Rab1、Rab5、Rab7 和 Rab33 四种蛋白的表达量均明显升高,差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.001$, $P=0.000$, $P=0.000$);而与 APP 组相比,Rab9 和 Rab24 蛋白在 curcumin 组的表达量则无明显变化,差异无统计学意义($P=0.578$, $P=0.067$);并且 Rab9 和 Rab24 蛋白在 APP 组和 DMSO 组表达无明显差异($P=0.839$, $P=0.123$);而 Rab24 蛋白在 WT 组的表达量均高于 APP 组、DMSO 组和 curcumin 组,差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$)。

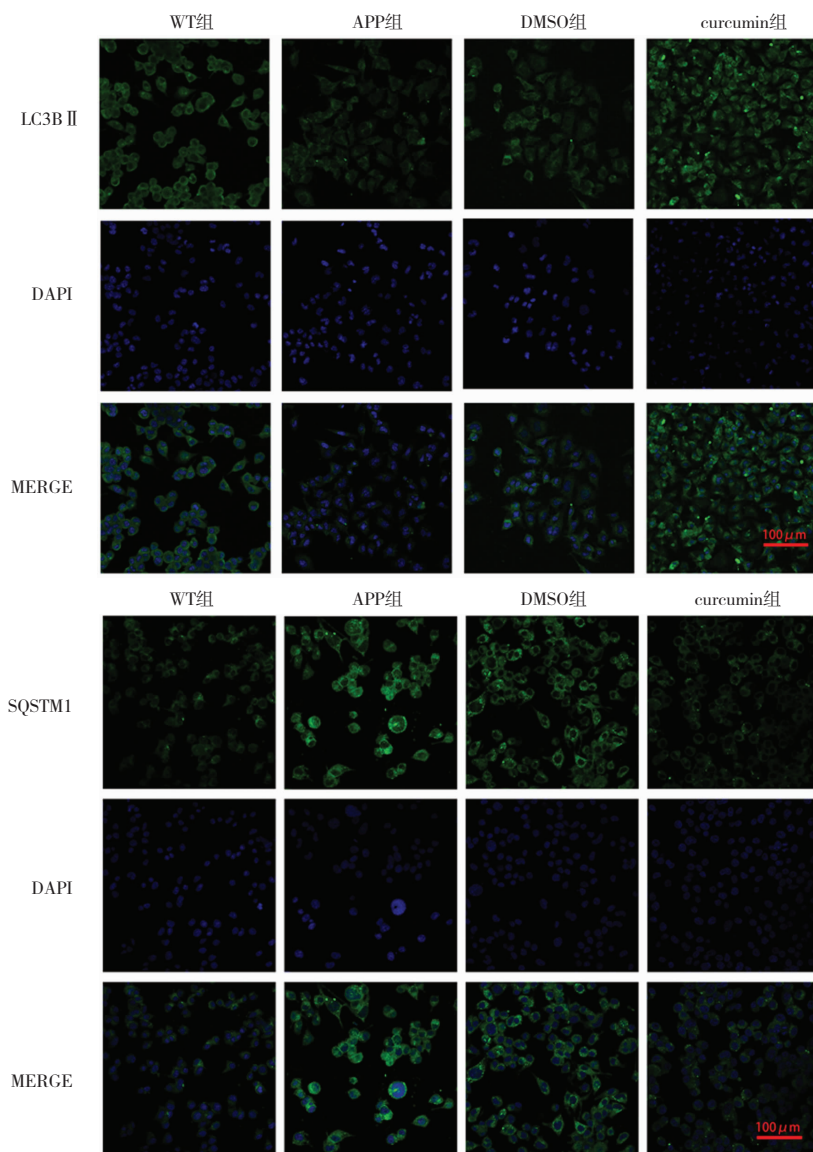
3 讨论

AD 作为最常见的神经退行性疾病,主要临床表现为记忆和认知功能障碍、行为及人格异常改变。研究发现,在 AD 患者的脑部中主要的病理学特征为 β -淀粉样蛋白(A β)沉积形成的老年斑(SPs)、Tau 蛋白过度磷酸化引发神经元纤维缠结(NFTs)及神经元丢失^[15-16]。目前,对于 AD 发病机制仍未十分明确,近年来对 AD 提出了许多相关的假说。其中“ $A\beta$ 级联假说”受到学术界的广泛认可。如何清除老年斑中的主要沉积物 A β 近年来成为 AD 防治的



注:a,与 APP 组比较, $P<0.01$;b:与 APP 组比较, $P>0.05$;c:与 WT 组比较, $P<0.01$

A. Western blot 检测各组 LC3B II 与 SQSTM1 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



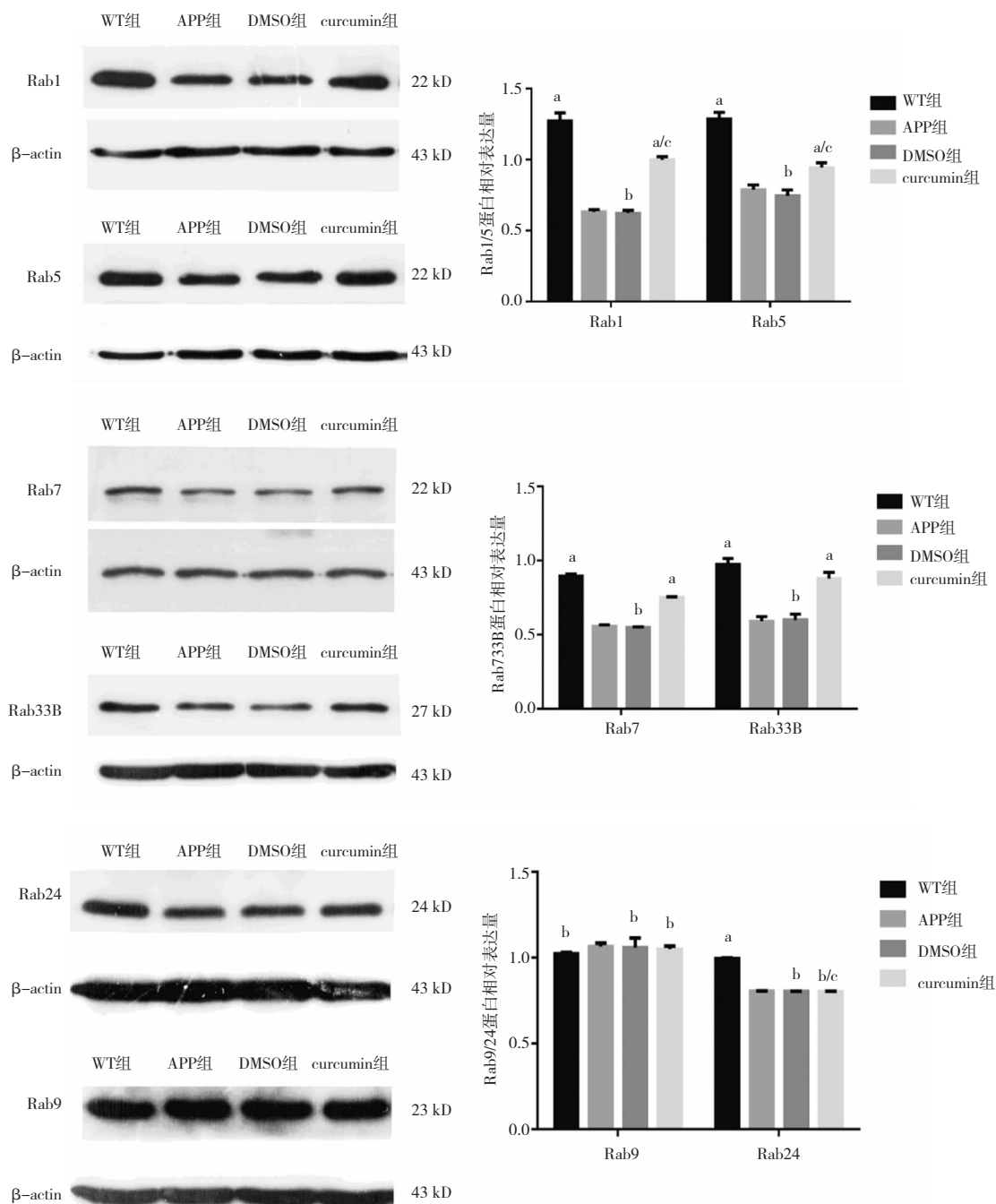
B. 激光共聚焦显微镜观察各组 LC3B 和 SQSTM1 蛋白水平的表达 (400 $\times$)

图1 LC3B 和 SQSTM1 蛋白在各实验组中的表达水平

表 2 各组中 Rab1、Rab5、Rab7、Rab9、Rab24 和 Rab33B 蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Rab1	Rab5	Rab7	Rab9	Rab24	Rab33B
WT组	1.27 ± 0.05 ^a	1.29 ± 0.05 ^a	0.90 ± 0.01 ^a	1.02 ± 0.01 ^b	0.99 ± 0.00 ^a	0.97 ± 0.04 ^a
APP组	0.63 ± 0.02	0.79 ± 0.03	0.56 ± 0.01	1.06 ± 0.02	0.79 ± 0.00	0.59 ± 0.03
DMSO组	0.62 ± 0.02 ^b	0.74 ± 0.04 ^b	0.55 ± 0.00 ^b	1.05 ± 0.06 ^b	0.81 ± 0.00 ^b	0.60 ± 0.04 ^b
curcumin 组	1.00 ± 0.02 ^a	0.94 ± 0.03 ^{ac}	0.75 ± 0.00 ^{ac}	1.04 ± 0.02 ^b	0.80 ± 0.00 ^{bc}	0.88 ± 0.04 ^a
F 值	278.061	113.866	1 114.871	0.933	3 421.042	76.387
P 值	0.000	0.000	0.000	0.468	0.000	0.000

注:a,与 APP 组比较, $P<0.01$;b:与 APP 组比较, $P>0.05$;c:与 WT 组比较, $P<0.01$



注:a,与 APP 组比较, $P<0.01$;b:与 APP 组比较, $P>0.05$;c:与 WT 组比较, $P<0.01$

图 2 Rab 家族蛋白 Rab1、Rab5、Rab7、Rab9、Rab24 和 Rab33B 在各实验组中的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

研究关键^[17]。而自噬作为一种降解胞内异常蛋白和受损细胞器的过程,对维持细胞内环境的稳态非常重要。有研究发现,在 AD 患者的大脑中出现了大量的自噬体和自噬溶酶体。在疾病的早期,机体可通过激活自噬过程,增加 A β 和受损细胞器的清除^[18]。但随着疾病的进展,由于自噬体生成增加和降解减少导致自噬体在 AD 患者脑内大量聚集,无法顺利完成降解^[12]。因此,在 AD 中,自噬体生成及降解顺利是自噬发挥神经保护作用的前提保障。

当自噬激活时,胞质中的 LC3B I 在泛素样反应酶的作用下转变成 LC3B II,并且定位于自噬体内外膜上,而 SQSTM1 在自噬的过程中随着自噬体的降解而减少。Jaroonwichawan 等^[19]发现,在百草枯诱导死亡的神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 中,姜黄素提高了 LC3B II/LC3B I 水平,降低了细胞死亡率。本实验的前期研究发现,经过姜黄素处理 24 h 后的 N2a/APP695swe 细胞在 5 μ mol/L 浓度时细胞的存活率最高^[20]。与前人研究所不同的是,为了检测姜黄素对 N2a/APP695swe 细胞自噬水平的影响,本实验运用 Western blot 检测 LC3B II 和 SQSTM1 的蛋白表达水平,发现经姜黄素处理后的细胞中,LC3B II 蛋白的表达量明显增加,差异有统计学意义。免疫荧光检测 LC3B II 和 SQSTM1 的水平发现,经姜黄素处理后的细胞,LC3B II 蛋白的表达量明显增加,而 SQSTM1 蛋白的表达量则下降。以上结果提示姜黄素可以促进 N2a/APP695swe 细胞中自噬的发生及自噬体的降解,但其具体机制还需进一步研究。

在自噬过程中,有许多蛋白发挥重要的调节作用,其中 Rab 家族蛋白对自噬过程顺利进行的作用尤为重要。Rab 家族蛋白作为一种重要的小 GTP 酶,参与运输小泡形成、运输和结合的过程,所以在近年来成为自噬研究的热点之一^[4]。自噬的完整过程包括自噬吞噬泡的形成、自噬体的形成、自噬溶酶体的形成及自噬溶酶体的降解 4 个阶段。各种 Rab 家族蛋白在这些阶段中发挥着不同的作用。例如,在自噬吞噬泡的形成阶段,Rab1 对内质网与高尔基体间的囊泡转运进行调节,同时参与自噬的形成^[9]。Rab5 位于早期内体膜上,调节内吞泡与早期内体的融合,因此 Rab5 又被看成是早期内体的标记物,所以对于自噬体的早期形成有重要意义。Ravikumar 等^[21]的研究发现,在亨廷顿病的细胞和果蝇模型中,Rab5 也参与了自噬体的形成以调节自噬。

高尔基体相关蛋白 Rab33B 已被证实可与 Atg16L 特异性地结合并且相互作用参与调节自噬过程^[22]。本研究运用姜黄素处理后发现,N2a/APP695swe 细胞中 Rab1 蛋白、Rab5 蛋白和 Rab33B 蛋白的含量明显增加,说明姜黄素可能促进了自噬体的早期形成。大多数 Rab 蛋白对自噬体形成的调节作用依赖于 Atg5 和 Atg7 的作用,然而,最近的研究发现了一种仅仅依赖 Rab9 的自噬体形成途径。在此途径中,Rab9 参与囊泡从晚期内体到反式高尔基体的转运和融合^[7]。本实验发现,Rab9 在 N2a/WT 和 N2a/APP695swe 细胞中并无明显差异且姜黄素对其表达并无影响,姜黄素诱导 N2a/APP695swe 细胞中自噬的产生可能不通过仅仅依赖 Rab9 的自噬体形成途径。随着自噬过程的进行,在自噬体与溶酶体结合阶段,Rab7 蛋白作为另一种常见的内吞 Rab 蛋白协调晚期内小体与溶酶体之间的运输。有研究发现,抑制 Rab7 阻断晚期内吞途径会导致 A β 纤维形成增加。许多研究表明 Rab7 参与了自噬体成熟的晚期阶段^[8]。Han 等^[23]发现血管内皮细胞受到 H₂O₂ 诱导的氧化应激损伤时,姜黄素通过上调 Beclin1 诱导自噬,并且通过增加 Rab7 表达促自噬。本实验检测了 N2a/WT 细胞、N2a/APP695swe 细胞及姜黄素处理后 N2a/APP695swe 细胞的 Rab7 蛋白水平,发现 N2a/APP695swe 细胞的 Rab7 蛋白水平明显低于 N2a/WT 细胞。表明在 AD 细胞模型中,自噬体与溶酶体的结合可能受到抑制。并且经过姜黄素处理后,Rab7 表达明显增加,可能促进了自噬体与溶酶体的结合,其具体机制有待后续实验进一步研究。另一种高尔基体相关的 Rab 蛋白 Rab24 已被证实参与了经典的自噬过程。Egami 等^[9]发现在用蛋白酶体抑制剂 MG132 处理的神经元 PC12 细胞中,Rab24 和 LC3 的表达明显增加,Rab24 与 LC3 共定位,证实了 Rab24 参与自噬。本实验发现 Rab24 蛋白在 N2a/APP695swe 细胞中降低,但姜黄素处理后并无明显变化,表明姜黄素提高自噬水平的作用可能并非通过提高 Rab24 蛋白的表达而实现的。

综上所述,各项研究均表明 Rab 家族蛋白作为一种小 GTP 酶蛋白参与自噬过程,但在 AD 中,姜黄素是否可以促进 Rab 家族蛋白的表达而增强自噬过程尚未见报道。本研究着重对 Rab 家族蛋白进行检测,发现姜黄素可以提高 N2a/APP695swe 细胞中 Rab1、Rab5、Rab7 和 Rab33B 蛋白水平的表达,

增加 LC3B II 的表达且降低 SQSTM1 的表达而促进自噬过程。同时发现,姜黄素诱导 N2a/APP695^{swe} 细胞中自噬过程并非通过提高 Rab24 蛋白和依赖 Rab9 蛋白的自噬形成途径而发挥作用。这对深入探讨姜黄素在 AD 中对自噬的影响及其作用机制具有重要意义。本实验尚存在一定局限性,尚未深入阐明 AD 中姜黄素通过调节 Rab 家族蛋白对自噬过程发挥作用的具体机制。经过本次实验,初步筛选出姜黄素在 AD 中影响自噬水平的作用靶点,并且在今后的研究工作中将着重深入其对 Rab1、Rab5 和 Rab33B 在早期自噬体形成过程中的作用,以及 Rab7 对晚期自噬溶酶体形成的影响,为 AD 的预防和治疗提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Cadwell K, Debnath J. Beyond self-eating: the control of nonautophagic functions and signaling pathways by autophagy-related proteins[J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(3): 813–822.
- [2] Beau I, Mehrpour M, Codogno P. Autophagosomes and human diseases[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(4): 460–464.
- [3] Chua CE, Gan BQ, Tang BL. Involvement of members of the Rab family and related small GTPases in autophagosome formation and maturation[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(20): 3349–3358.
- [4] Sztamari Z, Sass M. The autophagic roles of Rab small GTPases and their upstream regulators: a review[J]. *Autophagy*, 2014, 10(7): 1154–1166.
- [5] Zoppino FC, Militello RD, Slavin I, et al. Autophagosome formation depends on the small GTPase Rab1 and functional ER exit sites [J]. *Traffic*, 2010, 11(9): 1246–1261.
- [6] Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(11): 2201–2214.
- [7] Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology[J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(1): 119–149.
- [8] Bains M, Florez-McClure ML, Heidenreich KA. Insulin-like growth factor-1 prevents the accumulation of autophagic vesicles and cell death in Purkinje neurons by increasing the rate of autophagosome-to-lysosome fusion and degradation[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(30): 20398–20407.
- [9] Egami Y, Kiryu-Seo S, Yoshimori T, et al. Induced expressions of Rab24 GTPase and LC3 in nerve-injured motor neurons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(4): 1206–1213.
- [10] Ao X, Zou L, Wu Y. Regulation of autophagy by the Rab GTPase network[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(3): 348–358.
- [11] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)[J]. *Autophagy*, 2016, 12(1): 1–222.
- [12] 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.
- [13] Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IM, et al. Curcumin—from molecule to biological function[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(22): 5308–5332.
- [14] 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.
- [15] Wang J, Gu BJ, Masters CL, et al. A systemic view of Alzheimer disease—insights from amyloid- β metabolism beyond the brain[J]. *Nat Rev Neurol*, 2017, 13(10): 612–623.
- [16] Polanco JC, Li C, Bodea LG, et al. Amyloid- β and tau complexity—towards improved biomarkers and targeted therapies[J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(1): 22–39.
- [17] Ballard C, Gauthier S, Corbett A, et al. Alzheimer's disease[J]. *Lancet*, 2011, 377(9770): 1019–1031.
- [18] Cerri S, Blandini F. Role of autophagy in Parkinson's disease[J]. *Curr Med Chem*, 2018[Epub ahead of print]. DOI: 10.2174/0929867325666180226094351.
- [19] Jaroonwitchawan T, Chaicharoenadomrung N, Namkaew J, et al. Curcumin attenuates paraquat-induced cell death in human neuroblastoma cells through modulating oxidative stress and autophagy[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 636: 40–47.
- [20] 许可, 向月, 孙洁芸, 等. 姜黄素影响 N2a/APP695^{swe} 细胞中 ABCA1 表达的机制研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2015, 40(5): 677–681.
- [21] Ravikumar B, Imarisio S, Sarkar S, et al. Rab5 modulates aggregation and toxicity of mutant huntingtin through macroautophagy in cell and fly models of Huntington disease[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 10): 1649–1660.
- [22] Itoh T, Fujita N, Kanno E, et al. Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(7): 2916–2925.
- [23] 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.

(责任编辑:唐秋姗)