

·基础研究·

## 线粒体未折叠蛋白反应对A $\beta$ 蛋白聚集毒性的影响

彭琼<sup>1</sup>, 赵思旭<sup>1</sup>, 邓雯娟<sup>1</sup>, 钟子源<sup>1</sup>, 贾伟章<sup>1,2</sup>

(广东药科大学 1. 生命科学与生物制药学院; 2. 生物资源与创新药物研究中心, 广东 广州 510006)

**摘要:**【目的】探讨线粒体未折叠蛋白反应(UPR<sup>m</sup>)对阿尔茨海默病(AD)A $\beta$ 蛋白聚集毒性的影响。【方法】将秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)线粒体外膜 *tomm-22*、内膜 *E04A4.5* 以及 *atfs-1* 基因克隆并构建 L4440 干扰载体, 转化 HT115 感受态细胞以制备 *tomm-22*、*E04A4.5* 和 *atfs-1* RNA 干扰菌。研究 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA 干扰对转基因线虫 AD 疾病模型 CL4176 和 CL2006 瘫痪进程的影响。观察 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA 干扰后野生型线虫 N2 寿命, 检测 ATFS-1 信号在抑制 A $\beta$  蛋白聚集毒性中的作用, 分析 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA 干扰后转基因线虫 SJ4100 UPR<sup>m</sup> 动态变化, 以及转基因线虫 DA2123 自噬水平。【结果】通过对线虫线粒体 *tomm-22* 和 *E04A4.5* 基因克隆及构建 RNA 干扰菌建立了 UPR<sup>m</sup> 模型, 证实能够抑制 AD 疾病模型 CL4176 A $\beta$  蛋白聚集毒性并延缓其瘫痪进程。野生型 N2 在喂食 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA 干扰菌后寿命明显缩短, 而渐进性瘫痪线虫 AD 模型 CL2006 呈现前期延缓瘫痪而后期加速瘫痪的生理现象, 说明 UPR<sup>m</sup> 呈现短期缓解线粒体应激和改善线粒体功能的调节作用。通过 *atfs-1* RNA 干扰证实延缓线虫 AD 模型 CL4176 瘫痪进程与 ATFS-1 信号不直接相关。然而, *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA 干扰后 UPR<sup>m</sup> 呈现逐渐增强的趋势, 并进一步诱导自噬相关分子 LGG-1 的上调表达, 提示 RNA 干扰延缓 AD 瘫痪进程是通过提高线虫体内自噬活性而发挥作用。【结论】线粒体 UPR<sup>m</sup> 通过协调线粒体与细胞核之间的信号转导能够抑制 A $\beta$  蛋白聚集毒性, 有助于恢复线粒体乃至细胞内蛋白质稳态, 保障细胞正常生理功能, 为 AD 等神经退行性疾病的早期预防和治疗提供新的靶点。

**关键词:** 未折叠蛋白反应; 线粒体; 自噬; A $\beta$  蛋白; 阿尔茨海默病

中图分类号: R3

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)04-0481-08

## Effects of Mitochondrial Unfolded-Protein Response on Aggregation Toxicity of Amyloid- $\beta$ Protein

PENG Qiong<sup>1</sup>, ZHAO Si-xu<sup>1</sup>, DENG Wen-juan<sup>1</sup>, ZHONG Zi-yuan<sup>1</sup>, JIA Wei-zhang<sup>1,2</sup>

(1. School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou; 2. Center for Bioresources and Drug Discovery, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Corresponding to: JIA Wei-zhang; E-mail: jiawzh@gdpu.edu.cn

**Abstract:** 【Objective】To investigate the effects of mitochondrial unfolded-protein response (UPR<sup>m</sup>) on the aggregation toxicity of A $\beta$  protein in Alzheimer's disease (AD). 【Methods】By cloning the mitochondrial outer membrane *tomm-22*, inner membrane *E04A4.5* and *atfs-1* genes of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) and constructing the L4440 interference vectors, HT115 competent cells were transformed to prepare *tomm-22*, *E04A4.5* and *atfs-1* RNAi bacteria. The effects of *tomm-22* and *E04A4.5* RNAi on the process of paralysis were investigated through transgenic AD disease models CL4176 and CL2006. The life span of wild type N2 *C. elegans* was observed after RNAi of *tomm-22* and *E04A4.5*. The regulatory role of ATFS-1 signaling by *atfs-1* RNAi in inhibition of A $\beta$  protein aggregation was detected. The dynamic changes of UPR<sup>m</sup> in transgenic SJ4100 nematode and the autophagy level in transgenic DA2123 nematodes were analyzed by *tomm-22* and *E04A4.5* RNAi. 【Results】We successfully established the UPR<sup>m</sup> model by cloning mitochondrial *tomm-22* and *E04A4.5* of *C. elegans* and further constructing RNAi bacteria, and showed that they can

收稿日期: 2017-04-17

基金项目: 国家自然科学基金(30371091); 广东普通高校国际暨港澳台国际合作重大项目(2015KCGJHZ022); 广东省医学科学基金(A2016232); 广东省大学生科技创新培育专项资金“攀登计划”项目(138981)

作者简介: 彭琼, 硕士研究生, 研究方向: 神经生物药物, E-mail: pqiongqiong@foxmail.com; 贾伟章, 通信作者, 副教授, 硕士生导师, E-mail: jiawzh@gdpu.edu.cn.

suppress aggregation toxicity of Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) protein in AD model CL4176, and slow down paralysis process. The life span of wild type N2 was significantly shortened after feeding with the *tomm-22* and *E04A4.5* RNAi bacteria. At the same time, the progressive paralysis AD model CL2006 shows a delayed paralysis in the early stage of life cycle but get acceleration in the late. These results illustrate that the UPR<sup>m</sup> can alleviate the mitochondrial stress and improve the function of mitochondria at least in the short term. The *atfs-1* RNAi confirmed that delayed paralysis process of AD model CL4176 is not directly related to the ATFS-1 signal. However, *tomm-22* and *E04A4.5* RNAi can gradually increase the UPR<sup>m</sup> response and induce the expression level of autophagy-related molecules LGG-1, suggesting that *tomm-22* and *E04A4.5* RNAi may play a role in delaying the AD disease process by enhancing the activity of autophagy in *C. elegans*. 【Conclusions】 The study found that the UPR<sup>m</sup> can inhibit the accumulation of  $A\beta$  protein by coordinating the signal transduction between mitochondria and nucleus, and can help to restore mitochondria and even intracellular protein homeostasis for protecting the normal physiological function of cells, and also provides new targets for prevention and treatment of neurodegenerative diseases such as AD.

**Key words:** unfolded-protein response; mitochondrial; autophagy; amyloid- $\beta$  protein; Alzheimer's disease

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(4): 481-488]

人类衰老相关疾病如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)等神经退行性疾病均伴有一定程度的线粒体功能障碍。线粒体DNA突变、呼吸链及能量代谢紊乱引起线粒体功能异常,进而导致细胞功能与形态结构发生一系列病理生理改变<sup>[1]</sup>。AD患者在出现神经元丢失、认知功能减退等临床病理症状之前,线粒体氧化磷酸化系统已遭破坏,ATP合成受限,氧化应激产物积聚,说明线粒体功能障碍是AD等神经退行性疾病发病的重要原因之一<sup>[2-3]</sup>。细胞自由基失衡是线粒体功能障碍发生的诱因,亦是线粒体损伤产生的结果。线粒体功能障碍加剧了细胞代谢紊乱,加速了组织退化进程。在AD中, $A\beta$ 前体蛋白(Amyloid- $\beta$  protein precursor, APP)过度表达会导致呼吸链酶系活性降低,线粒体肿胀、内外膜破裂,甚至 $A\beta$ 直接进入线粒体,诱导线粒体功能损伤<sup>[4]</sup>。 $A\beta$ 沉积会诱导产生过量的氧自由基破坏细胞内抗氧化防御体系,攻击线粒体DNA、呼吸链及三羧酸循环酶系,引起蛋白质氧化与脂质过氧化反应,通过氧化应激反应使线粒体功能发生衰退,由 $A\beta$ 引起的病理级联反应最终导致突触功能障碍,最终引发神经细胞凋亡<sup>[5]</sup>。因此,探讨线粒体功能障碍在神经退行性疾病发生过程中的作用机制,对认识神经退行性疾病的发病机理具有重要意义。由泛素-蛋白酶体系统(Ubiquitin-proteasome system, UPS)和自噬-溶酶体途径(Autophagy-lysosome pathway, ALP)组成的蛋白质质量监控体系保证了细胞中的蛋白质处于一种动态平衡,有利于细胞实施和调控各种复杂的生理功能,保护机体免受疾病侵

扰<sup>[6-7]</sup>。如果细胞不能自主维护蛋白动态平衡以适应和对抗外界环境和体内生理条件改变所带来的胁迫,则蛋白稳态失调并最终逐步衰退和紊乱,引发蛋白质毒性病变进而导致细胞功能丧失<sup>[8]</sup>。研究发现线粒体未折叠蛋白反应(Mitochondrial unfolded-Protein response, UPR<sup>m</sup>)通过协调线粒体与细胞核之间的信号转导可以减轻线粒体氧化应激损伤,有助于恢复线粒体乃至细胞内蛋白质稳态<sup>[9]</sup>。细胞在应激状态下会产生大量未折叠蛋白或错误折叠蛋白,而UPR<sup>m</sup>通过ATFS-1进入线粒体的效率可调节线粒体非折叠蛋白反应的水平,维持细胞蛋白质稳态<sup>[10]</sup>。线粒体应激不仅激活UPR<sup>m</sup>,也可以进一步诱导线粒体自噬<sup>[11]</sup>。因此,UPR<sup>m</sup>可能先于线粒体自噬被激活,当损伤超过了线粒体自噬的能力,最终会导致细胞发生程序性凋亡<sup>[12]</sup>。当前,UPR<sup>m</sup>相关的分子机理研究日益深入,但其功能仍存争议,尤其在 $A\beta$ 蛋白聚集、AD疾病发生乃至AD疾病进程中扮演的角色尚未明确<sup>[13]</sup>。通过遗传学或药理学手段调节上述信号通路可以维护蛋白质稳态,从而维持相关信号通路平衡并缓解异常聚集蛋白的神经毒性,起到改善病症甚至延长寿命的作用<sup>[14]</sup>。线粒体 *tomm-22* 和 *E04A4.5* 基因编码的蛋白质产物分别参与形成线粒体外膜 TOM 和内膜 TIM 转运复合体。本文通过 *tomm-22* 和 *E04A4.5* 基因功能缺失建立 UPR<sup>m</sup> 模型,证实能够抑制 AD 秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 模型 CL4176 的  $A\beta$  蛋白聚集毒性并延缓其瘫痪进程,为探索 AD 疾病的发生机制和治疗机理提供新的研究思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验中使用的线虫(*C. elegans*)为野生型 N2、转基因 AD 模型 CL4176 和 CL2006 以及转基因 SJ4100 和 DA2123 模型,由线虫遗传学中心(Caenorhabditis genetics center, CGC)提供保存于本实验室。大肠杆菌 *E. Coli* DH-5 $\alpha$ 、HT115(DE3)以及线虫 RNA 干扰 L4440 质粒载体由 CGC 提供,克隆载体 pMD-18T 从 TaKaRa 公司购买。实验中所用的限制性内切酶(*Xba* I 和 *Kpn* I)、Taq 酶(5 U/ $\mu$ L)、T4 连接酶(5 U/ $\mu$ L)、dNTP(10 mmol/L 和 2.5 mmol/L)、PCR 缓冲液、核酸分子质量标准(DL2000 Plus DNA Marker)、mRNA 逆转录试剂(PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit)均购于 TaKaRa 公司,DNA 胶回收试剂盒(D6945-01)和质粒 DNA 提取试剂盒(D6943-01)购自 Omega 公司,其它化学试剂为国产分析纯。

### 1.2 总 RNA 提取及反转录

将培养线虫置于 1.5 mL EP 管中,低速离心后去上清,加 1 mL 组织裂解液后匀浆,按 Trizol 试剂盒原理提取总 RNA,并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。以组织总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链,反应体系:总 RNA(3  $\mu$ g)2  $\mu$ L, Oligo-dT17 (50  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ L, RNase free 水 7  $\mu$ L, 混合后 65  $^{\circ}$ C 孵育 5 min,冰上冷却。上述混合物加入 5  $\times$  Prime-Script 反应缓冲液 4  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP (2.5 mmol/L each)1  $\mu$ L, RNase 抑制剂(40 U/ $\mu$ L)0.5  $\mu$ L, 逆转录酶 PrimeScript RTase 1  $\mu$ L, 30  $^{\circ}$ C 10 min, 42  $^{\circ}$ C 60 min, 99  $^{\circ}$ C 5 min, 合成 cDNA, -20  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.3 cDNA 扩增与克隆

根据 Bennett 等研究<sup>[13]</sup>,通过对线粒体外膜

*tomm-22* 和内膜 *E04A4.5* 进行克隆及构建 RNA 干扰菌建立了 UPR<sup>m</sup> 模型。线虫 *tomm-22*、*E04A4.5* 和 *atfs-1* 基因 cDNA 扩增体系如下:cDNA 1  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR buffer 2  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP mixture 1.5  $\mu$ L, Taq 酶(5 U/ $\mu$ L)0.25  $\mu$ L, 正向引物 *tomm-22*-F、*E04A4.5*-F 和 *atfs-1*-F (10  $\mu$ mol/L) 分别为 1  $\mu$ L, 反向引物 *tomm-22*-R、*E04A4.5*-R 和 *atfs-1*-R (10  $\mu$ mol/L) 分别为 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 13.25  $\mu$ L, 总体积为 20  $\mu$ L。使用热启动和降落 PCR 程序:94  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 10 个循环:94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s (每轮循环降 1 $^{\circ}$ C), 72  $^{\circ}$ C *tomm-22* 基因延伸 30 s, *E04A4.5* 和 *atfs-1* 基因延伸 1 min。25 个循环:94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C *tomm-22* 基因延伸 30 s, *E04A4.5* 和 *atfs-1* 基因分别延伸 1 min; 1 个循环:72  $^{\circ}$ C 延伸 6 min。取 4  $\mu$ L PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检查, PCR 产物目的条带切胶回收。取 PCR 回收产物 5  $\mu$ L, pMD18-T 载体 1  $\mu$ L, 10  $\times$  T4 ligase buffer 1.5  $\mu$ L, T4 ligase 1  $\mu$ L, 反应体系 15  $\mu$ L, 16  $^{\circ}$ C 连接 6 h。取连接产物转化 *E. coli* DH-5 $\alpha$  感受态细胞,冰上放置 30 min,加入上述连接产物 5  $\mu$ L, 42  $^{\circ}$ C 水浴 90 s, 冰上 5 min, 加 500  $\mu$ L LB 液体培养基于 37  $^{\circ}$ C 摇床培养 30 min, 取 100  $\mu$ L 涂布于含氨苄西林(Ampicillin, Amp)的 LB 平板, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单菌落于 500  $\mu$ L LB 液体培养基, 37  $^{\circ}$ C 培养 5 h, 菌液 PCR 筛选阳性克隆。抽提质粒, *Xba*I 和 *Kpn*I 双酶切鉴定后送上海生工测序。酶切体系:重组质粒 8  $\mu$ L、*Xba*I 1  $\mu$ L、*Kpn*I 1  $\mu$ L、10  $\times$  Quick buffer 3  $\mu$ L, 加水至 30  $\mu$ L, 酶切 2 h。

### 1.4 RNA 干扰菌构建及线虫表型

将含目的基因的 pMD-18T 和 L4440 载体双酶切(*Xba*I 和 *Kpn*I), 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收。将目的基因与 L4440 载体连接, 连接体系:

表 1 线粒体 UPR<sup>m</sup> 干扰菌构建

Table 1 Primers for construction of UPR<sup>m</sup> RNAi bacteria

Name	Primer sequence(5'-3')	Function
<i>tomm-22</i> -F	TGCTCTAGATGGCACTGGTTCGTGACGA	<i>tomm-22</i> RNAi
<i>tomm-22</i> -R	CGGGGTACCTTGTGTAATGGCCGCAGATG	<i>tomm-22</i> RNAi
<i>E04A4.5</i> -F	TGCTCTAGACCAGAGAGCCATGCCCATATC	<i>E04A4.5</i> RNAi
<i>E04A4.5</i> -R	CGGGGTACCGTGGATCGTCCGAGAGCCTTCTG	<i>E04A4.5</i> RNAi
<i>atfs-1</i> -F	TGCTCTAGAGGCATAGAACGACCAGCTTC	<i>atfs-1</i> RNAi
<i>atfs-1</i> -R	CGGGGTACCGATTCATGCCTCCCAATCGA	<i>atfs-1</i> RNAi

Underline were *Xba*I (TCTAGA) and *Kpn*I (GGTACC) cleavage sites, respectively

目的基因产物 5  $\mu\text{L}$ , L4440 载体 1  $\mu\text{L}$ ,  $10 \times \text{T4 ligase buffer}$  1.5  $\mu\text{L}$ , T4 ligase 1  $\mu\text{L}$ , 16  $^{\circ}\text{C}$  连接 6 h。取 5  $\mu\text{L}$  连接产物转化 100  $\mu\text{L}$  HT115 感受态细胞。重新提取 L4440 重组质粒, 酶切鉴定后测序。以 RNA 干扰菌为食, 于 15  $^{\circ}\text{C}$  培养 CL4176 线虫, 并观察其表型。

### 1.5 线虫培养及同步化

线虫采用标准的 NGM (Nematode Growth Medium) 平板培养, 野生型 N2、转基因 CL4176、CL2006、SJ4100 和 DA2123 线虫在 15  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中喂食肠杆菌 OP50。线虫同步化: 收集产卵期线虫, M9 buffer 清洗后加入裂解液, 振荡 1 min 而后静止 30 s, 视裂解情况重复 2~3 次, 5500 r/min ( $r=4$  cm) 离心 1 min 收集虫卵, 弃上清液。用 M9 缓冲液重复冲洗 3 次, 收集虫卵并置于含 3 mL S. Medium 的 50 mL 锥形瓶中, 于摇床 15  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 20 h, 再将 L1 期幼虫置于涂有 OP50 的 NGM 平板, 15  $^{\circ}\text{C}$  培养。

### 1.6 线虫瘫痪率实验

瘫痪是 CL4176 线虫受温度诱导的一种显著表型, 反映了 A $\beta$  蛋白聚集对线虫肌肉细胞的毒性作用。同步化线虫, 每板约 50 条 (含 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5-FU、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AMP 和 1 mmol/L IPTG), 每个实验组 3 板。15  $^{\circ}\text{C}$  培养 36 h 或 48 h 后升温至 23  $^{\circ}\text{C}$ , 34 h 后观察线虫的瘫痪情况, 每隔 2 h 计数 1 次。以刺激线虫尾部没有反应判断为瘫痪, 直至全部瘫痪。CL2006 为渐进性瘫痪模型, 同步化线虫置于干扰菌的 NGM 平板 (含 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5-FU、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AMP 和 1 mmol/L IPTG)。每板约 50 条线虫, 每个实验组 3 板。20  $^{\circ}\text{C}$  培养, 每天统计一次瘫痪, 直至全部瘫痪。用 GraphPad Prism 5.01 软件进行数据处理和绘图。

### 1.7 线虫寿命实验

N2 线虫同步化, 将 L1 幼虫移至分别含 L4440 空载体、*tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA 干扰菌的液体培养液中 (含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AMP 和 1 mmol/L IPTG)。各组设 5 个复孔, 每孔约 20 条线虫。培养 45 h 后每孔加入终浓度 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5-FU (5-Fluorouracil)。置于 20  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱培养中, 每 2 d 统计一次存活。用 GraphPad Prism 5.01 软件进行数据处理和绘图。

### 1.8 线粒体 UPR<sup>m</sup> 检查

转基因 SJ4100 线虫模型 (*hsp-6::gfp*) 可以检测 UPR<sup>m</sup> 水平。同步化线虫置于 NGM 平板 (含 75

$\mu\text{g}/\text{mL}$  5-FU、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AMP 和 1 mmol/L IPTG), 每组 3 板。对照组喂食含 L4440 空载体的 HT115 菌, 实验组分别喂食 *tomm-22*、*E04A4.5* RNA 干扰菌。20  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 24 h 和 48 h 后, 通过高内涵成像系统 (ImageXpress<sup>®</sup> Micro XLS, MD) 观察线虫 UPR<sup>m</sup> 水平。

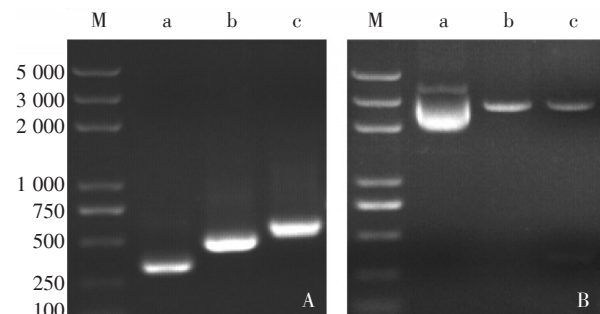
### 1.9 自噬活性检测

转基因 DA2123 线虫模型 (*lgg-1::gfp*) 用于分析自噬水平, 其中 *lgg-1* 为自噬检测标记基因。同步化线虫置于 NGM 干扰板 (含 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  5-FU、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AMP 和 1 mmol/L IPTG), 每个实验组 3 板。对照组喂食含 L4440 空载体的 HT115 菌, 实验组分别喂食 *tomm-22*、*E04A4.5* 和 *atfs-1* RNA 干扰菌。20  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 72 h 后, 通过荧光显微镜 (奥林巴斯, BX51) 观察并分析线虫自噬活性。

## 2 结果

### 2.1 RNA 干扰菌构建

以反转录一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 分别得到约 310 bp、440 bp 和 550 bp 的 *tomm-22*、*E04A4.5* 和 *atfs-1* 片段 (图 1)。将切胶回收获得的目的基因片段连接到 pMD-18T 克隆载体上, 经双酶切、测序和序列比对确定为秀丽线虫 *tomm-22*、*E04A4.5* 和 *atfs-1* 基因序列。将 *tomm-22*、*E04A4.5* 和 *atfs-1* 基因序列重新构建到 L4440 干扰载体上, 经双酶切、测序鉴定后转化 HT115 感



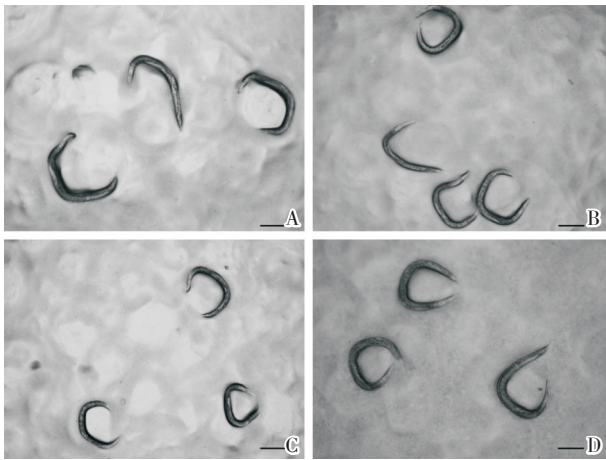
A shows the target gene cloning; M: D2000 plus; a: *tomm-22*; b: *E04A4.5*; c: *atfs-1*. B shows the plasmid extraction and enzyme digestion. M: D2000 plus; a: Plasmid L4440 extraction; b: Plasmid L4440 by *Kpn* I and *Xba* I double enzyme digestion; c: Identification of recombinant *tomm-22* plasmid by double enzyme digestion.

图1 线粒体 UPR<sup>m</sup> RNA 干扰菌的构建  
Fig.1 Construction of mitochondrial UPR<sup>m</sup> RNAi bacteria

受态细胞,菌液PCR筛选阳性克隆。

## 2.2 RNA干扰效果观察

对照组喂食含L4440空载体的HT115,显微镜下观察 *tomm-22*、*E04A4.5* 和 *atfs-1* RNA干扰菌喂食后各组线虫的生长发育情况。观察发现 *tomm-22*、*E04A4.5* 和 *atfs-1* RNA干扰后线虫呈现明显差异,其中 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA干扰后食物清除率降低,线虫均能存活并产卵,但产卵量显著减少。而 *atfs-1* RNA干扰后,除线虫发育速度较正常稍快外,产卵量等其他指标未见明显异常(图2)。



A shows the control; B shows the *tomm-22* RNAi; C shows the *E04A4.5* RNAi; D shows the *atfs-1* RNAi. Scale bar = 200  $\mu$ m.

图2 RNA干扰后线虫CL4176的表型

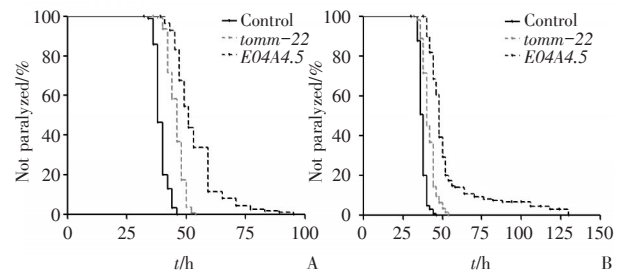
Fig. 2 The CL4176 phenotype after RNAi

## 2.3 *tomm-22*、*E04A4.5* RNA干扰延缓CL4176瘫痪进程

将 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA干扰菌喂食CL4176线虫,并以含L4440空载体的HT115菌为对照组。先置于低温(15  $^{\circ}$ C)分别培养36 h和48 h,然后转移到23  $^{\circ}$ C诱导瘫痪,并每隔2 h统计瘫痪数量。结果发现,*tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA干扰后能够延缓AD疾病模型线虫株CL4176的瘫痪进程;而且,延长低温(15  $^{\circ}$ C)培养时间,CL4176线虫的瘫痪进程明显延后( $P < 0.001$ )。

## 2.4 *tomm-22*、*E04A4.5* RNA干扰对N2寿命和CL2006瘫痪的影响

以喂食含L4440空载体HT115菌为对照组,*tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA干扰菌喂食野生型N2线虫,在20  $^{\circ}$ C恒温箱中培养并观察 *tomm-22* 和



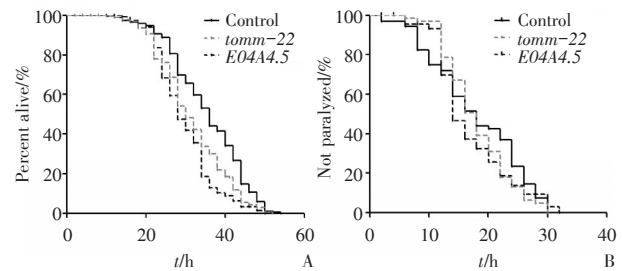
A shows the paralysis rate of CL4176 after RNAi 36 h under 15  $^{\circ}$ C; B shows the paralysis rate of CL4176 after RNAi 48 h under 15  $^{\circ}$ C.

图3 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA干扰线虫CL4176瘫痪率

Fig.3 The CL4176 paralysis rate of *tomm-22* and *E04A4.5* RNAi *C. elegans*

*E04A4.5* RNA干扰后对寿命的影响。野生型N2喂食 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA干扰菌后平均寿命显著缩短( $P < 0.001$ ;图4A)。

为进一步验证 *tomm-22* 和 *E04A4.5* 对线虫瘫痪的影响,以渐进性瘫痪AD模型CL2006喂食 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA干扰菌。结果发现,*tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA干扰在早期能够延缓瘫痪进程,而后期加速瘫痪进程,与对照相比整体差异不明显( $P > 0.05$ ;图4B)。



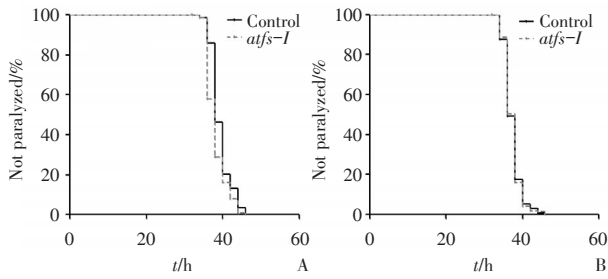
A shows the wild type N2 lifespan; B shows the paralysis rate of progressive paralysis AD model CL2006.

图4 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA干扰N2寿命和CL2006瘫痪率

Fig.4 N2 lifespan and CL2006 paralysis rate of *tomm-22* and *E04A4.5* RNAi *C. elegans*

## 2.5 *atfs-1* RNA干扰不影响线虫CL4176瘫痪进程

研究显示,ATFS-1进入线粒体的效率可调节UPR<sup>m</sup>的水平,维持细胞蛋白质稳态。然而,由图5可见,与对照组相比,*atfs-1* RNA干扰组的瘫痪进程无明显差异( $P > 0.05$ )。因此,线粒体UPR<sup>m</sup>延缓瘫痪进程与ATFS-1信号不直接相关。



A shows the paralysis rate of CL4176 after 36 h under 15 °C; B shows the paralysis rate of CL4176 after 48 h under 15 °C.

图5 *atfs-1* RNA 干扰线虫 CL4176 瘫痪率

Fig.5 Paralysis rate of *atfs-1* RNAi CL4176 *C. elegans*

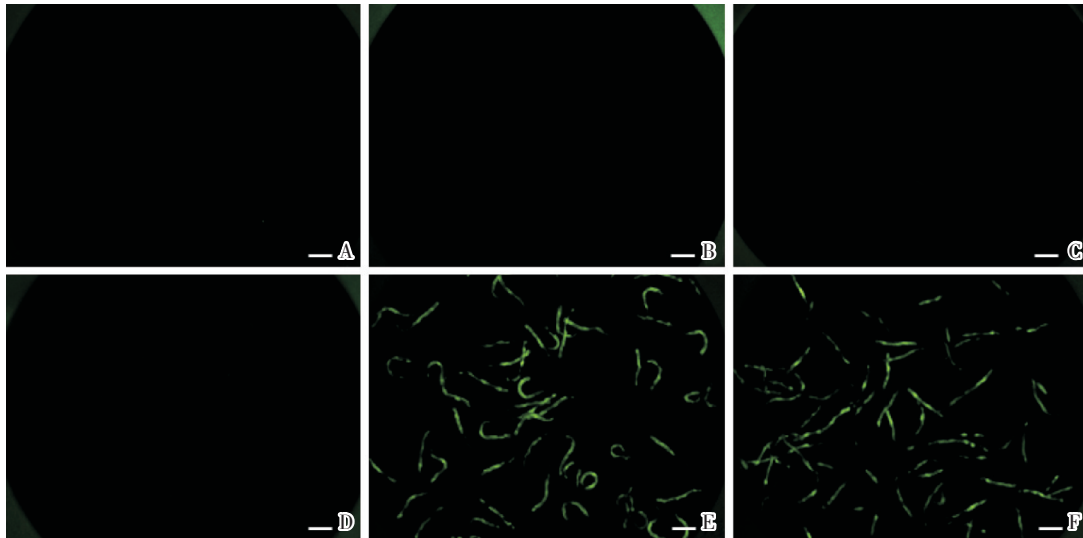
## 2.6 *tomm-22*、*E04A4.5* RNA 干扰增强 UPR<sup>mt</sup> 反应

利用转基因 SJ4100 线虫模型 (*hsp-6::gfp*) 检测 UPR<sup>mt</sup> 水平动态变化。线虫培养 24 h 后,通过

高内涵成像系统发现对照组和 *tomm-22*、*E04A4.5* 干扰组之间均未出现明显线粒体 UPR<sup>mt</sup>。线虫在培养 48 h 后 *tomm-22*、*E04A4.5* 干扰组呈现明显 UPR<sup>mt</sup> 反应(图 6)。

## 2.7 *tomm-22*、*E04A4.5* RNA 干扰影响线虫自噬活性

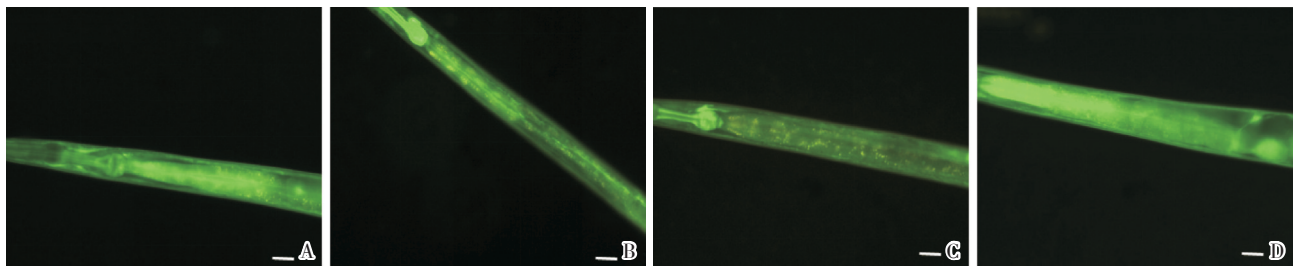
以转基因 DA2123 线虫为模型检测了 *tomm-22*、*E04A4.5* 和 *atfs-1* RNA 干扰后线虫体内自噬相关分子 GFP::*LGG-1* 表达水平。研究发现,与对照相比,线粒体 *atfs-1* RNA 干扰后对自噬相关分子 GFP::*LGG-1* 无影响;而线粒体 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA 干扰能够增加自噬相关分子 GFP::*LGG-1* 的表达水平,说明 *tomm-22*、*E04A4.5* RNA 干扰延缓 AD 疾病进程是通过提高线虫体内自噬活性而发挥作用(图 7)。



A shows the control after 24 h; B shows the *tomm22* group after 24 h RNAi; C shows the *E04A4.5* group after 24 h RNAi; D shows the control after 48 h. E shows the *tomm22* group after 48 h RNAi; F shows the *E04A4.5* group after 48 h RNAi. Scale bar = 200 μm.

图6 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA 干扰后 UPR 动态水平

Fig.6 The dynamic changes of UPR after *tomm-22* and *E04A4.5* RNAi



A shows the control; B shows the *tomm-22* RNAi; C shows the *E04A4.5* RNAi; D shows the *atfs-1* RNAi. Scale bar = 50 μm.

图7 *tomm-22*、*E04A4.5* 和 *atfs-1* RNA 干扰后自噬水平

Fig.7 Detection of autophagy level of *tomm22*, *E04A4.5* and *atfs-1* RNAi *C. elegans*

### 3 讨 论

蛋白质的稳定和平衡是维持细胞生理平衡的重要基石,而衰老过程中伴随着广泛的蛋白质聚集<sup>[14]</sup>。目前,已知多种神经退行性疾病都涉及蛋白质的错误折叠和异常聚集(如AD中的A $\beta$ 异常聚集),由此引发的毒性胁迫扰乱了整个蛋白动态平衡系统,从而激活病理级联反应,推动蛋白质异常聚集及神经毒性的发展,并加速衰老与凋亡、行为失常等退行性病变<sup>[15]</sup>。线粒体相关信号通路中的关键节点参与调控寿命、胁迫和蛋白动态平衡,在时空上相互交错形成信号网络,各条通路在网络中又相互作用使机体在总体上处于动态平衡状态。RNA干扰是由双链RNA引起的转录后水平的基因沉默现象,作为研究基因功能的一种快速和高通量的方法,在线虫遗传、发育和神经生物学等领域广泛应用<sup>[16]</sup>。本文利用线粒体外膜 *tomm-22* 和内膜 *E04A4.5* 基因构建 RNA 干扰菌,通过线粒体功能障碍诱导线虫产生UPR<sup>m</sup>。研究发现, *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA 干扰能够抑制AD线虫模型CL4176的A $\beta$ 蛋白聚集毒性并延缓其瘫痪进程。小鼠中的研究发现UPR<sup>m</sup>参与调控肠道上皮细胞的炎症反应,而线虫中的研究证实ATFS-1通过UPR<sup>m</sup>激活天然免疫以抵御病原体感染<sup>[17]</sup>。然而,与Bennett等研究结果相一致<sup>[13]</sup>,线粒体 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA 干扰并不能延长野生型线虫N2的自然寿命。同时, *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA 干扰使渐进性瘫痪AD线虫模型CL2006呈现前期延缓瘫痪而后期加速瘫痪的生理现象,说明UPR<sup>m</sup>呈现短期缓解线粒体应激和改善线粒体功能的调节作用,但长期UPR<sup>m</sup>或进一步加强应激可能会诱导线粒体自噬以及细胞程序性凋亡,这对细胞乃至生物体存活未必有利<sup>[12]</sup>。

在AD中,A $\beta$ 蛋白尤其是寡聚体具有强烈的神经毒性,能够抑制细胞内蛋白质降解体系的功能,从而引起蛋白动态平衡失调,导致氧化应激、炎症、Ca<sup>2+</sup>稳态等多种生理功能的紊乱<sup>[18]</sup>。研究发现UPR<sup>m</sup>通过协调线粒体与细胞核之间的信号转导可以减轻线粒体氧化应激损伤,有助于恢复线粒体乃至细胞内蛋白质稳态<sup>[9]</sup>。本文证实线粒体应激不仅激活UPR<sup>m</sup>,也可以进一步诱导线粒体自噬。线粒体 *tomm-22* 和 *E04A4.5* RNA 干扰能够

增加自噬相关分子LGG-1表达水平,提示RNA干扰延缓AD瘫痪进程是通过提高线虫体内自噬活性而发挥作用。UPR<sup>m</sup>通过协调线粒体与细胞核之间的信号转导提高线粒体功能,而线粒体自噬不仅选择性清除多余或受损严重的线粒体,而且参与A $\beta$ 蛋白及异常蛋白聚集体的降解。自噬的活性可以从多个层面被细胞精细调控,如转录水平、蛋白修饰水平以及一些营养信号通路和应激信号通路等,广泛参与各种生理和病理过程<sup>[6,19-20]</sup>。最近研究发现,ATFS-1能够通过调节细胞自噬基因的转录而实现对细胞自噬活性的调节<sup>[21]</sup>。然而,本文通过 *atfs-1* RNA 干扰显示抑制A $\beta$ 蛋白聚集毒性及延缓瘫痪进程与ATFS-1信号不直接相关,并且 *atfs-1* RNA 干扰没有明显影响自噬活性。本研究结果表明,线粒体UPR<sup>m</sup>以及自噬活化能够抑制A $\beta$ 蛋白聚集毒性,有助于恢复线粒体乃至细胞内蛋白质稳态,保障细胞正常生理功能。

本研究证实UPR<sup>m</sup>能够抑制AD线虫模型CL4176的A $\beta$ 蛋白聚集毒性并延缓其瘫痪进程,但野生型N2寿命和渐进性瘫痪AD模型CL2006提示短期UPR<sup>m</sup>能够缓解线粒体应激和改善线粒体功能,而长期UPR<sup>m</sup>或更进一步加强应激不利于细胞乃至生物体存活。此外,通过SJ4100和DA2123线虫模型证实UPR<sup>m</sup>及进一步活化的自噬作用在抑制A $\beta$ 蛋白聚集毒性中发挥关键作用。本研究以转基因线虫为模型探讨UPR<sup>m</sup>在AD疾病发生过程中的调控作用,为AD等神经退行性疾病的早期预防和治疗提供新的靶点。

#### 参考文献:

- [1] López-Armada MJ, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, et al. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response [J]. *Mitochondrion*, 2013, 13(2): 106-118.
- [2] Markham A, Bains R, Franklin P, et al. Changes in mitochondrial function are pivotal in neurodegenerative and psychiatric disorders: How important is BDNF? [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(8): 2206-2229.
- [3] Yin F, Sancheti H, Liu Z, et al. Mitochondrial function in ageing: Coordination with signalling and transcriptional pathways [J]. *J Physiol*, 2016, 594(8): 2025-2042.
- [4] Yao J, Du H, Yan S, et al. Inhibition of amyloid-beta (A $\beta$ ) peptide-binding alcohol dehydrogenase-A $\beta$

- interaction reduces Abeta accumulation and improves mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(6):2313-2320.
- [5] Tu S, Okamoto S, Lipton SA, et al. Oligomeric A $\beta$ -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2014, 9(3):48-56.
- [6] Ryter SW, Cloonan SM, Choi AM. Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis [J]. *Mol Cells*, 2013, 36(1):7-16.
- [7] Chondrogianni N, Voutetakis K, Kapetanou M, et al. Proteasome activation: An innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases [J]. *Ageing Res Rev*, 2015, 23(Pt A):37-55.
- [8] Ben-Zvi A, Miller EA, Morimoto RI. Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(35):14914-14919.
- [9] Baker MJ, Palmer CS, Stojanovski D. Mitochondrial protein quality control in health and disease [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(8):1870-1889.
- [10] Weinberg SE, Sena LA, Chandel NS. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity [J]. *Immunity*, 2015, 42(3):406-417.
- [11] Jin SM, Youle RJ. The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria [J]. *Autophagy*, 2013, 9(11):1750-1757.
- [12] Runke ED, Baumeister R, Schulze E. Mitochondrial stress: Balancing friend and foe [J]. *Exp Gerontol*, 2014, 56(8):194-201.
- [13] Bennett CF, Wende HV, Simko M, et al. Activation of the mitochondrial unfolded protein response does not predict longevity in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nat Commun*, 2014, 5(3):3483-3487.
- [14] Walther DM, Kasturi P, Zheng M, et al. Widespread proteome remodeling and aggregation in aging *C. elegans* [J]. *Cell*, 2015, 161(4):919-932.
- [15] Hetz C, Chevet E, Oakes SA. Proteostasis control by the unfolded protein response [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(7):829-838.
- [16] 曹蕾, 杨玉荣. *C.elegans* 中 dyn-1 基因对寿命和发育的影响 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34(8):795-802.
- Cao L, Yang YR. Effects of *Caenorhabditis elegans* dyn-1 on lifespan and fecundity [J]. *Chinese J Cell Biol*, 2012, 34(8):795-802.
- [17] Rath E, Berger E, Messlik A, et al. Induction of dsRNA-activated protein kinase links mitochondrial unfolded protein response to the pathogenesis of intestinal inflammation [J]. *Gut*, 2012, 61(9):1269-1278.
- [18] Navone F, Genevini P, Borgese N. Autophagy and neurodegeneration: Insights from a cultured cell model of ALS [J]. *Cells*, 2015, 4(3):354-386.
- [19] 张蓓, 谷贝贝, 范胜诺, 等.  $\beta$ -淀粉样蛋白 A $\beta$ 25-35 诱导 HT22 细胞自噬及其对 V-ATPase 表达的影响 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2013, 34(1):1-5.
- Zhang B, Gu BB, Fang SN. A  $\beta$ 25-35 induced autophagy in HT22 cells and relationship with V-ATPase [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2013, 34(1):1-5.
- [20] 杨晓红, 王胜男, 刘庆余, 等. Nrf2 通过上调自噬促进 C17.2 神经干细胞的增殖 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2016, 37(4):481-489.
- Yang XH, Wang SN, Liu QY, et al. Nrf2 promotes C17.2 neural stem cell proliferation via up-regulating autophagy [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2016, 37(4):481-489.
- [21] Guo B, Huang X, Zhang P, et al. Genome-wide screen identifies signaling pathways that regulate autophagy during *Caenorhabditis elegans* development [J]. *EMBO Rep*, 2014, 15(6):705-713.

(编辑 孙慧兰)