

·基础研究·

β -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

张 蓓, 谷贝贝, 范胜诺, 赵 嘉, 赵仲艳, 刘 军*

(中山大学孙逸仙纪念医院神经科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】探讨 β -淀粉样蛋白 $A\beta_{25-35}$ 诱导 HT22 细胞产生自噬及与 V-ATPase 变化的关系。【方法】将 HT22 细胞分为对照组、无血清培养组、 $A\beta$ 处理组和 $A\beta$ + Bafilomycin A1 组,不同浓度的 $A\beta_{25-35}$ 作用于 HT22 细胞 24 h,用 CCK8 测定细胞活力变化,免疫细胞荧光检测自噬斑点变化,及 Western blot 检测 LC3、V-ATPase 蛋白变化。【结果】 $A\beta$ 可以诱导 HT22 细胞出现明显的自噬现象,且这种自噬同 $A\beta$ 的浓度以及作用时间具有一定的相关性。V-ATPase 的表达伴随自噬的增多也逐渐增多。Bafilomycin A1 可以进一步诱导 V-ATPase 增加,增加细胞内自噬体的聚积。【结论】 $A\beta_{25-35}$ 可诱导 HT22 细胞产生自噬,且与 V-ATPase 表达有关。

关键词: $A\beta_{25-35}$; HT22 细胞; 自噬; V-ATPase; Bafilomycin A1

中图分类号: R741.02

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)01-0001-05

A β 25-35 Induced Autophagy in HT22 Cells and Relationship with V-ATPase

ZHANG Bei, GU Bei-bei, FAN Sheng-nuo, ZHAO Jia, ZHAO Zhong-yan, LIU Jun*

(Department of Neurology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To explore $A\beta_{25-35}$ -induced autophagy in HT22 cells and relationship with V-ATPase. 【Methods】HT22 cell was divided into control group, serum free group, $A\beta$ treatment group, and $A\beta$ + Bafilomycin A1 group. CCK8 assay was used to determine the cell vitality in different concentration of $A\beta_{25-35}$ for 24 hours. LC3 puncta dots were observed by immune cell fluorescence. The expression of LC3 and V-ATPase were detected by Western blot analysis. 【Results】 $A\beta_{25-35}$ in HT22 cells effected cell vitality in a time- and concentration-dependent manner. The amount of V-ATPase was correlated with the extent of autophagosome formation. Bafilomycin A1 could further induce V-ATPase and intracellular autophagosome accumulation ($P \leq 0.05$). 【Conclusion】 $A\beta_{25-35}$ can induce the autophagy of HT22 cells and is relative with V-ATPase expression.

Key words: $A\beta_{25-35}$; HT22 cells; autophagy; V-ATPase; Bafilomycin A1

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(1): 1-5]

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种进行性、致死性的中枢神经系统退行性疾病,以老年斑、神经原纤维缠结以及海马神经元丢失为主要病理特征。 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, $A\beta$) 是老年斑的主要成分,目前 $A\beta$ 在脑内的异常形成并堆积而产生的神经毒性作用已经被认为是 AD 形成和发展的关键因素^[1-2]。 $A\beta$ 包括 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{25-35}$ 等多种片段,其中 $A\beta_{25-35}$ 是发挥神经营养及神经毒性作用的最短活性片段,其作用于

不同细胞系及实验动物,均显示出与 $A\beta$ 全长相似的效应^[3]。迄今为止,AD 的病因及发病机制尚不十分明确。脑内 $A\beta$ 的聚集涉及到 $A\beta$ 的产生与降解之间的速率平衡。越来越多的研究发现 $A\beta$ 降解功能的异常导致 $A\beta$ 在脑实质内的沉积是 AD 病理发生的起始因素和关键环节。最近的研究发现 AD 患者溶酶体功能缺陷导致的自噬 (autophagy) 功能异常在 AD 的病理发生与发展过程中起到了重要的作用。当溶酶体功能障碍时,将

收稿日期: 2012-10-08

基金项目: 国家自然科学基金 (30970966); 教育部留学归国人员基金 (002006006); 中央高校基本科研业务费专项基金 (11ykpy23)

作者简介: 张蓓, 硕士研究生, E-mail: aiglaio@163.com; * 通信作者: 刘军, 教授, E-mail: docliujun@hotmail.com

会导致 A β 降解下降,从而引起 A β 在脑内的异常聚集;而 A β 的聚集又会进一步加重溶酶体功能的缺陷,从而加速了 A β 在脑内的堆集^[4]。此外,亦有研究证明在一定程度上,自噬也参与 A β 的神经毒性作用^[5],但其具体机制仍有待阐明。本研究拟通过使用 A β_{25-35} 干预 HT22 细胞,观察其自噬现象的出现及其变化,并试图探讨 V-ATPase 的变化与自噬的相关性,为进一步研究自噬在 AD 的发生发展中的作用提供一定的理论基础,为 AD 的防治药物靶点的发现提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

HT22 细胞株由本实验室保存。A β_{25-35} 、二甲基亚砜(DMSO)、质子泵抑制剂 Bafilomycin A1(Baf A1) 购自 Sigma 公司;CCK-8 购自日本同仁公司;2.5 g/L 胰蛋白酶、DMEM 高糖培养基、胎牛血清、Neurobasal 培养基和 N₂ 添加剂均购自 Gibco 公司,抗 Anti-LC3B 抗体购自 MBL 公司,抗体 Anti-V-ATPase 购自 Santa cruz 公司,其余均为国产分析纯试剂。主要仪器包括美国 Thermo 公司恒温 CO₂ 培养箱,奥林巴斯 BX51WI 研究级正置荧光显微镜,Spectramax M5 多功能酶标仪。Western blot 采用 Bio-Rad 仪器。

1.2 细胞培养、分化及药物处理

HT22 细胞,是 HT4 细胞的亚克隆,为一种永生化的小鼠海马神经元细胞,其培养参照文献^[6]。细胞在药物处理前,进行细胞分化处理 24 ~ 36 h,具体参照文献^[7]。将 HT22 细胞分为空白对照组:不添加任何药物的等体积的完全培养基。A β 处理组:加入 A β_{25-35} ,A β_{25-35} 使用前 1 周取出至 37 °C 孵育,7 d 后取出用分化液稀释至工作浓度 10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 。A β + Baf A1 处理组:同时加入 A β_{25-35} 和 Baf A1 100 nmol/L。阳性对照组:无血清添加的等体积培养基。

1.3 细胞活力测定

取对数生长的 HT22 细胞,以 5×10^3 /孔的密度种植至 96 孔细胞培养板中,贴壁分化后加入不同浓度的 A β_{25-35} (10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$)或 A β_{25-35} 和 Baf A1 100 nmol/L 共孵育。24 h 后每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂,于 37 °C、体积百分数为 5% CO₂ 培养箱内温育 1 ~ 2 h,用酶标仪于 450 nm

波长处测定各孔的吸光度,扣除空白孔中本底的吸光度,结果以各处理组于空白对照组的比值作为相对细胞活力。

1.4 自噬小体的免疫细胞荧光测定

在前述研究的基础上,采用 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 A β_{25-35} 进行自噬的研究。取对数生长的 HT22 细胞,以 7×10^3 /孔的密度种于 24 孔细胞培养板的细胞爬片上,贴壁后将不同浓度 A β_{25-35} (10 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$) 和/或 100 nmol/L Baf A1 加入,使用血清剥夺的培养基作为阳性对照组。24 h 后加入 40 g/L 多聚甲醛溶液固定细胞 15 min,经通透、封闭后,一抗 Anti-LC3 于 4 °C 孵育过夜,二抗常温孵育 1 h,DAPI 染核 5 min 后封片,于正置荧光显微镜下拍照。

1.5 蛋白印迹法检测轻链 3(LC3)等蛋白表达

将不同浓度 A β_{25-35} (10 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$) 和/或 100 nmol/L Baf A1 及血清剥夺的培养基处理细胞后,冷的 PBS 洗 2 次后加入细胞裂解液进行裂解,离心弃沉淀,吸出上清液用 BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μg 总蛋白与 5 $\times$ SDS 上样缓冲液混合,95 °C 变性 5 min,行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳将蛋白转移到 PVDF 膜上,50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h。用 TBST 洗 3 次后,4 °C 孵育 Anti-LC3B (1:1 000)过夜。室温下孵育兔抗 IgG (1:5 000) 1 h,使用 GeneTools 凝胶曝光系统曝光。

1.6 统计学处理

所有实验数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用统计学软件 SPSS 16.0 进行单因素方差分析及 t 检验, $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 A β 对 HT22 细胞活力的影响

HT22 细胞活力测定结果显示,当不同浓度的 A β_{25-35} 作用于 HT22 细胞后,HT22 细胞活力呈剂量依赖性地降低 ($P \leq 0.05$),高浓度 A β_{25-35} 对细胞有明显毒性作用,随浓度减低细胞毒性作用减小(图 1)。此外,A β_{25-35} 对 HT22 细胞的毒性作用亦具有时间的相关性,当 A β_{25-35} 浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$,细胞活力在 24 h 才开始出现一定变化(图 2)。加入 100 nmol/L 质子泵抑制剂 Baf A1 后细胞活力有所增加(图 3),提示了其对抗了 A β_{25-35} 对 HT22 细胞的毒性作用。

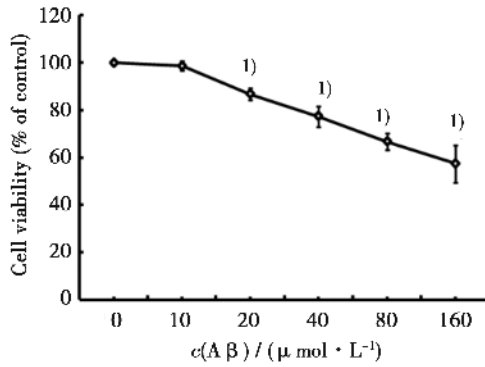


图 1 $A\beta_{25-35}$ 作用 24 h 对 HT22 细胞活力的影响

Fig.1 The cell viability of HT22 cells in different concentration of $A\beta_{25-35}$ for 24 h

Each data is representative of the result of five independent experiments. 1) $P < 0.05$

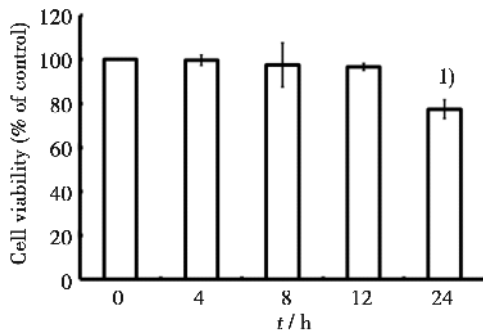


图 2 $A\beta_{25-35}$ 作用不同时间对 HT22 细胞活力的影响

Fig.2 The cell viability of HT22 cells in different time of $A\beta_{25-35}$

$A\beta_{25-35}$ concentration: $40 \mu\text{mol/L}$. Each data is representative of the result of five independent experiments. 1) $P < 0.05$

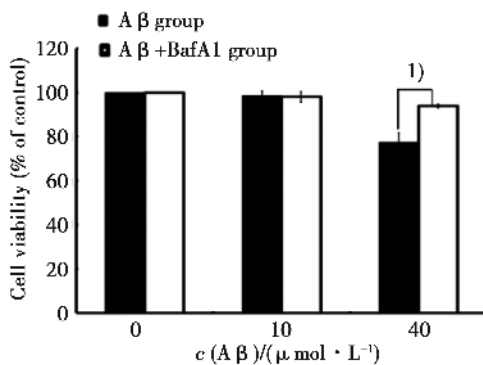


图 3 Bafilomycin A1 对 HT22 细胞活力的影响

Fig.3 The cell viability with Bafilomycin A1

Bafilomycin A1: 100 nmol/L . Each data is representative of the result of five independent experiments. 1) $P < 0.05$

2.2 免疫细胞荧光

微管相关蛋白的轻链 3(light chain 3, LC3)是

目前公认的自噬分子标记物。在正置荧光显微镜下,细胞的 LC3 染色结果显示,在 $A\beta_{25-35}$ 作用下, HT22 细胞中可以出现斑点状的自噬体结构,表现为颜色较亮的斑块。高浓度的 $A\beta_{25-35}$ ($40 \mu\text{mol/L}$) 较低浓度 $A\beta_{25-35}$ ($10 \mu\text{mol/L}$) 干预后, HT22 细胞中斑点增多(图 4)。与此同时,加入 100 nmol/L 的 Baf A1 后,可见的斑点数目明显增多。

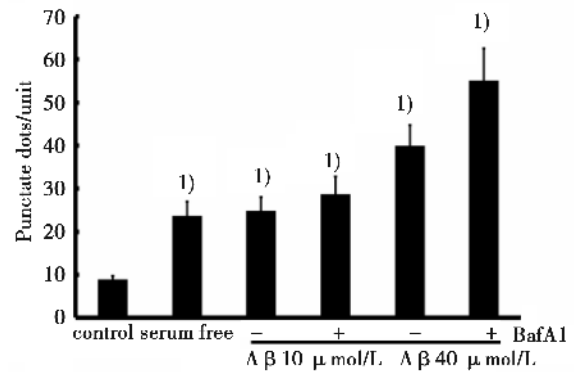
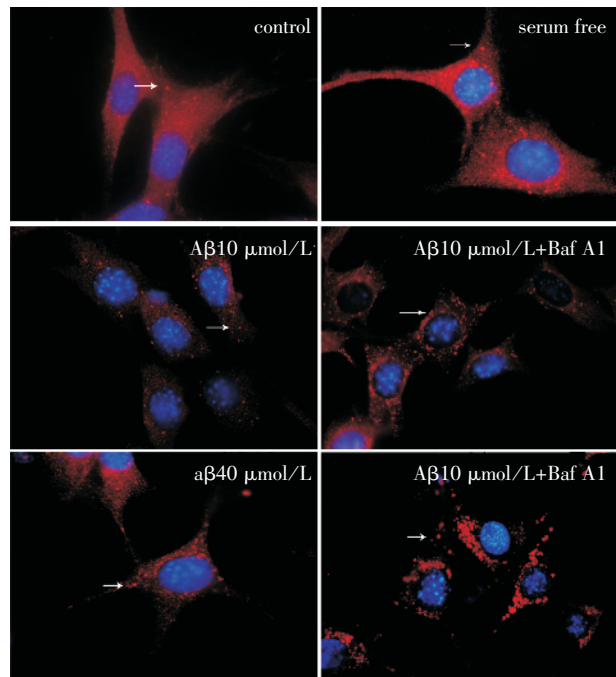


图 4 不同处理组 HT22 细胞免疫荧光斑点

Fig.4 The fluorescent puncta of different groups of HT22 cells

Arrowheads indicate the autophagic vacuoles in HT22 cells ($\times 1000$). Each data is representative of the result of five independent experiments. 1) $P < 0.05$

2.3 细胞 LC3 以及 V-ATPase 表达

HT22 细胞在 $40 \mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 作用 24 h 下, Western blotting 结果显示在阳性对照组, $A\beta_{25-35}$ 处理组以及 $A\beta_{25-35} + \text{Baf A1}$ 处理组中可见 LC3-II

的表达量以及 LC3-II / I 的比值较空白对照增高 ($P < 0.05$), 尤以 $A\beta_{25-35}$ + Baf A1 处理组增高最为明显。与此同时, V-ATPase 表达在上述 3 组中较空白对照组亦有所增高 ($P < 0.05$), 尤以 $A\beta_{25-35}$ + Baf A1 处理组增高最为明显(图 5)。

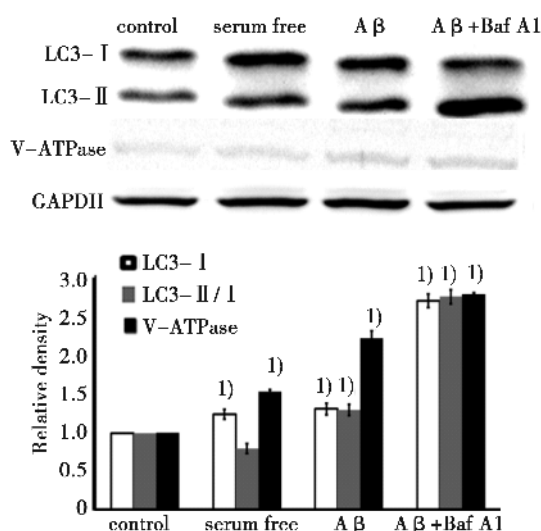


图 5 $A\beta$ 组及 $A\beta$ + Baf A1 处理组 LC3 及 V-ATPase 表达
Fig.5 The expression of LC3 and V-ATPase in $A\beta$ treatment or with Baf A1

$A\beta$: 40 $\mu\text{mol/L}$. Each data is representative of the result of five independent experiments. 1) $P < 0.05$

3 讨 论

自噬是一种最终通过溶酶体降解部分细胞自身组分的分解代谢过程。自噬现象普遍存在于真核细胞, 主要清除异常积聚的蛋白质、长寿命蛋白及受损的细胞器等, 具有高度保守性。细胞产生自噬, 以清除废弃的或毒性蛋白质, 对于细胞稳态的维持起着重要作用。

研究表明^[8-9], 自噬在清除与疾病相关的错误折叠和突变的易聚集蛋白方面起着关键作用, 尤其在作为蛋白质构象疾病 (protein conformational disorders) 或蛋白质量调控障碍性疾病 (protein quality disease) 的神经变性疾病如 AD 的发生、发展过程中发挥着重要的作用。目前越来越多的资料表明自噬作用功能的异常已被认为在 AD 的病理发生中起到了关键的作用。

在正常生理情况下 APP/ $A\beta$ 可以在自噬溶酶体内低水平的产生, 在应激 (如 $A\beta$ 干预) 或疾病状态 (如 AD) 下可以诱发细胞产生进一步产生自

噬以清除的异常蛋白, 避免异常蛋白的聚集, 溶酶体降解 $A\beta$ 被认为可以清除其细胞毒性, 延缓其病理的发生。有研究发现, AD 除了 $A\beta$ 的累积之外, 还有大量自噬体堆积, 甚至先于细胞外 $A\beta$ 的聚集^[10]。但是, 相反的, 在病理情况下自噬溶酶体在胞体及突触终末快速大量聚集亦可以破坏自噬的连续稳定性或导致自噬溶酶体通路障碍^[11]。此外, 还有研究发现, 在 AD 动物模型中, 自噬体与溶酶体结合及溶酶体降解阶段, 自噬发生障碍, 导致不能及时清除 $A\beta$ ^[12]。敲除自噬相关基因, 呈现年龄相关性神经退行性变特征, 这些都证明, AD 中自噬功能的异常可能与 $A\beta$ 的降解功能下降有关^[13-14]。那么这种异常究竟是有何种机制所导致的, 已引起了国内外学者进一步的关注。

LC3 是自噬体上的标志性蛋白, 分为 LC3-I、LC3-II 两个亚型^[15]。自噬发生时, LC3-I 转变为 LC3-II, 因此 LC3-II 或 LC3-II / I 的比值可以大致代表自噬早期阶段发生水平的高低^[16]。我们的研究发现在使用不同浓度的 $A\beta_{25-35}$ 作用于体外培养的 HT22 海马神经元细胞时, 在细胞活力没有变化或者仅轻微下降时, 细胞内即可观察到较空白对照组明显增多的自噬现象, 包括 LC3 标记的自噬颗粒的增多, LC3-II 的表达量以及 LC3-II / I 的比值明显增高, 其中 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta$ 较 10 $\mu\text{mol/L}$ 更多 LC3 点状聚集物的形成, 表明在 $A\beta$ 的刺激下细胞内自噬体的形成增多。

根据自噬的形成过程, 可以分为自噬的启动、自噬体与溶酶体的融合、以及溶酶体内的降解几个阶段。溶酶体参与自噬的最后阶段, 即与自噬体结合并降解自噬内容物, 因此对于自噬功能起着重要作用。溶酶体内 pH 为 3.5 ~ 5.5, 酶促反应的最适 pH 为 5.0。V-ATPase 能依赖分解 ATP 产生的能量作为动力, 逆浓度梯度地将 H^+ 质子泵出细胞外或泵入细胞管泡腔内, 对于维持细胞胞质的 pH 值在 7.0 左右及溶酶体等细胞器的低 pH 值, 是必要的^[17]。有研究表明, TgAPP^{sw} 小鼠和野生型小鼠脑内分离培养的小胶质细胞中发现两者 V-ATPase 的蛋白表达存在明显差异, 但是细胞内 V-ATPase 在 $A\beta$ 刺激的情况下是否出现变化, 以及出现何种变化, 同时又会对自噬现象产生何种影响目前还不是十分明确。而我们的研究结果发现, 在不同浓度 $A\beta_{25-35}$ 作用于 HT22 细胞后, 细胞内 V-ATPase 的表达亦随之增加, 在加入 V-ATPase

酶的特异性抑制剂 Baf A1 后, V-ATPase 表达量有进一步提高,与此同时,细胞内 LC3 点状聚集物明显增多,提示自噬体明显增多。

Nakamura 等^[18]对酵母的研究表明 V-ATPase 参与自噬体与溶酶体融合以降解自噬体内容物的过程,但是,对自噬小体的形成没有影响,提示小泡的酸化与自噬小体内容物的降解有关。Baf A1 是空泡型 H^+ -ATP 酶的特异性抑制剂。当突触小泡胞外分泌时, Baf A1 可以避免小泡重新酸化。在自噬发生过程中, Baf A1 可使蛋白降解被抑制,从而阻断自噬体与溶酶体的融合,使自噬体逐渐聚集增多^[19]。在自噬过程的后期,溶酶体与自噬体融合形成自噬溶酶体将其中内容物降解,而降解产生的产物有研究提示可以负反馈地促进 mTOR 途径的激活,从而抑制自噬的进展。降解产物的减少使负反馈效应减弱,进一步引起自噬体的增多。

我们的研究结果显示,在 $A\beta$ 的干预下可以诱导细胞出现明显的自噬现象,且这种自噬同 $A\beta$ 的浓度以及作用时间具有一定的相关性。V-ATPase 的表达伴随自噬的增多也逐渐增多,且在加入抑制剂 Baf A1 后, V-ATPase 表达量仍有提高,推测可能是细胞早期代偿性的结果。但是究竟其代偿的能力限度如何,其功能如何影响自噬体与溶酶体的融合等具体机制尚不清楚,仍有待进一步深入研究。另外, V-ATPase 通过何种机制参与自噬仍需进一步研究阐明。

参考文献:

- [1] LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid in Alzheimer's disease[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(7): 499-509.
- [2] Ghiso J, Frangione B. Amyloidosis and Alzheimer's disease[J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2002, 54(12): 1539-1551.
- [3] Harkany T, Abraham I, Konya C, et al. Mechanisms of beta-amyloid neurotoxicity: perspectives of pharmacotherapy[J]. *Rev Neurosci*, 2000, 11(4): 329-382.
- [4] Vikram K, Ilan ES, Tudor AF, et al. Lysosomal dysfunction promotes cleavage and neurotoxicity of tau in vivo[J/OL]. *Plos One*, 2010, 6(7): e1001026.
- [5] Hansoo K, Jinsun C, Joohyun R, et al. Activation of autophagy during glutamate-induced HT22 cell death[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(2): 339-344.
- [6] Li J, Li LX, Suo WZ. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties[J]. *Life Sci*, 2009, 84(9-10): 267-271.
- [7] Zhao Z, Lu R, Zhang B, et al. Differentiation of HT22 neurons induces expression of NMDA receptor that mediates homocysteine cytotoxicity [J]. *Neurol Res*, 2012, 34(1): 38-43.
- [8] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42.
- [9] Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Autophagy, organelles and ageing[J]. *J Pathol*, 2007, 211(2): 134-143.
- [10] Mizushima N. $A\beta$ generation in autophagy vacuoles[J]. *J Cell Biol*, 2005, 171(1): 15-17.
- [11] Nixon RA. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 23): 4081-4091.
- [12] Ling DJ, Song HJ, Garza D, et al. $A\beta_{42}$ -induced neurodegeneration via an age-dependent autophagic-lysosomal injury in *Drosophila*[J/OL]. *Plos One*, 2009, 4(1): e4201.
- [13] Boland B, Kumar A, Lee S, et al. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(27): 6926-6937.
- [14] Ling D, Salvaterra PM. Brain aging and $A\beta_{1-42}$ neurotoxicity converge via deterioration in autophagy-lysosomal system: a conditional *Drosophila* model linking Alzheimer's neurodegeneration with aging [J]. *Acta Neuropathol*, 2011, 121(2): 183-191.
- [15] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2503-2518.
- [16] Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes [J]. *Autophagy*, 2008, 4(2): 151-175.
- [17] Aronson NN Jr, Kuranda MJ. Lysosomal degradation of Asn-linked glycoproteins[J]. *FASEB J*, 1989, 3(14): 2615-2622.
- [18] Nakamura N, Matsuura A, Wada Y, et al. Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Biochem*, 1997, 121(2): 338-344.
- [19] Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, et al. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells [J]. *Cell Struct Funct*, 1998, 23(1): 33-42.

(编辑 刘清海)