DOI: 10.16016/j.1000-5404.201412075

论著

# 慢病毒介导 shRNA 沉默 LAMP-2A 和 TSG101 表达对 PC12 细胞中 EGFP-α-synuclein(A53T)降解的影响

王建东[1],刘 腾[2],张君莉[1],刘海耘[3],黄永秀[2],张 红[2] (610500 成都,成都医学院:生物医学系生物化学与分子生物学教研室[1],检验医学院[2],基础医学院[3])

[摘要] **目的** 采用慢病毒介导的 shRNA 干扰技术,下调 PC12 细胞中溶酶体相关膜蛋白-2A(lysosome-associated membrane protein type 2A,LAMP-2A)和肿瘤易感基因 101(tumor susceptibility gene 101,TSG101)的表达,并研究其对 EGFP-α-synuclein(A53T)降解的影响。**方法** 以 LAMP-2A 和 TSG101 为靶基因,合成寡核苷酸,退火形成双链 DNA,与经 *Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ双酶切的 pHBLV-U6-Puro 载体连接获得重组慢病毒载体;将其与病毒包装辅助质粒共感染 293T 细胞,收集并浓缩上清液获得重组病毒,测定病毒滴度;病毒颗粒转染 PC12 细胞,经嘌呤霉素筛选获得稳定感染细胞株;Western blot 检测 LAMP-2A 和 TSG101 蛋白的表达;分别采用 LAMP-2A shRNA2 和 TSG101 shRNA1 下调 PC12 细胞中 LAMP-2A 和 TSG101 蛋白的表达,并结合巴佛洛霉素 A1 处理,研究其对 PC12 细胞中 EGFP-α-synuclein(A53T)、EGFP、α-synuclein(A53T)和 LC3B 蛋白的影响,免疫荧光检测各组 PC12 细胞中 EGFP-α-synuclein(A53T)和 LC3B 蛋白的表达。**结果** 成功构建干扰 LAMP-2A 和 TSG101 表达的慢病毒载体,并在 293T 细胞中包装获得病毒。重组病毒感染 PC12 细胞后,Western blot 检测结果显示 LAMP-2A shRNA2 和 TSG101 shRNA1 干扰效果最好;下调 LAMP-2A 和 TSG101 蛋白表达均能够抑制细胞中 EGFP-α-synuclein(A53T)、EGFP 和 α-synuclein(A53T)蛋白的降解($P<0.01$),并提高 LC3-Ⅱ蛋白的含量($P<0.01$)。**结论** 慢病毒介导的 shRNA 能有效地沉默 PC12 细胞中 LAMP-2A 和 TSG101 的表达,抑制细胞中 EGFP-α-synuclein(A53T)的降解。

[关键词] 溶酶体相关膜蛋白-2A;肿瘤易感基因 101;慢病毒;α-突触蛋白;PC12 细胞
[中图法分类号] R394-33;R394.3;R742.5 [文献标志码] A

# Effect of lentivirus-mediated LAMP-2A and TSG101 silencing on EGFP-α-synuclein (A53T) degradation in PC12 cells

Wang Jiandong[1], Liu Teng[2], Zhang Junli[1], Liu Haiyun[3], Huang Yongxiu[2], Zhang Hong[2] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Biomedical Sciences, [2]School of Laboratory Medicine, [3]School of Basic Medical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan Province, 610500, China)

[**Abstract**] **Objective** To suppress the gene expression of lysosome-associated membrane protein type 2A (LAMP-2A) and tumor susceptibility gene 101 (TSG101) by lentiviruses, and observe its impact on EGFP-α-synuclein(A53T) degradation in PC12 cells. **Methods** Synthesized oligonucleotides were cloned into the lentiviral vectors pHBLV-U6-Puro which was digested with *Bam*HⅠ and *Eco*RⅠ. The recombinant vectors were verified by sequencing, and transferred into 293T package cells together with helper vectors. Recombinant lentiviruses were extracted from cell cultures to transfect PC12 cells. Stably transfected cells were screened with puromycin, and the expression of LAMP-2A and TSG101 was determined by Western blotting.

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(31201045);四川省应用基础研究计划(2012JY0113);四川省教育厅科研项目(13ZB0094);成都医学院自然科学基金(CYZ11-007)
[通信作者] 张 红,E-mail:pretty_zhang@163.com
黄永秀,E-mail:295806285@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150514.1634.010.html(2015-05-14)

The expression of LAMP-2A and TSG101 was suppressed by lentiviruses LAMP-2A shRNA2 and TSG101 shRNA1, respectively, and after treatment with bafilomycin A1, the expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP)-α-synuclein (A53T), EGFP, α-synuclein (A53T) and LC3B protein in PC12 cells was observed. The expression of EGFP-α-synuclein (A53T) and LC3B protein were examined by immunofluorescence assay. **Results** Recombinant vectors were successfully constructed, and sufficient lentiviruses were obtained from the package cells. The recombinant lentiviruses could efficiently transfect PC12 cells, and 2 clones transfected with lentiviruses LAMP-2A shRNA2 and TSG101 shRNA1, respectively, were screened. The results of Western blotting showed that LAMP-2A and TSG101 expression was efficiently suppressed in PC12 cells. The degradation of EGFP-α-synuclein(A53T), EGFP and α-synuclein(A53T) was significantly suppressed ($P<0.01$), and the expression of LC3-Ⅱ was increased ($P<0.01$). **Conclusion** RNAi technology based on lentivirus can efficiently suppress the gene expression of LAMP-2A and TSG101, and inhibit the degradation of EGFP-α-synuclein(A53T) in PC12 cells.

[**Key words**] lysosome-associated membrane protein type 2A; tumor susceptibility gene 101; lentivirus; α-synuclein; PC12 cells

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (31201045), the Project of Applied Basic Research Program of Sichuan Province (2012JY0113), the Project of Sichuan Committee of Education (13ZB0094) and the Natural Science Foundation of Chengdu Medical College (CYZ11-007). Corresponding author: Zhang Hong, E-mail: pretty_zhang@163.com; Huang Yongxiu, E-mail: 295806285@qq.com

帕金森病(Parkinson's disease,PD)是一种神经系统退行性疾病,其重要病理学标志是胞内出现路易小体(lewy body)。研究表明遗传因素、线粒体功能障碍、氧化应激以及蛋白降解异常等许多因素都可以诱导α-突触核蛋白(α-synuclein)的异常聚集[1-2],而α-synuclein的异常聚集正是路易小体形成的主要因素[3-4]。近年来,人们发现自噬溶酶体途径在控制细胞内α-synuclein代谢平衡以及PD的致病过程中均发挥了非常重要的作用[5-6]。

最近的研究表明在哺乳动物细胞内,存在类似小自噬的内体小自噬途径[7]。这一自噬途径通过热休克蛋白70(heat shock-cognate protein of 70 KDa, Hsc70)识别目标蛋白的LIR结构域(KFERQ),进而将靶蛋白输送入晚期内体(Late endosome)并经内体小自噬途径降解。Hsc70也能够识别α-synuclein,但是内体小自噬途径在α-synuclein的降解过程中发挥了怎样的作用,目前还不清楚。本研究利用慢病毒介导的shRNA技术分别干扰肿瘤易感基因101(tumor susceptibility gene 101,TSG101)和溶酶体相关膜蛋白-2A(lysosome-associated membrane protein type 2A, LAMP-2A)的表达,研究抑制内体小自噬途径和分子伴侣介导的自噬途径(chaperon-mediated autophagy, CMA)对PC12细胞中EGFP-α-synuclein(A53T)蛋白降解的影响,以期为进一步研究PD等神经系统退行性疾病的分子机制提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

PC12细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。DMEM完全培养基、Opti-MEMI优化培养基和胎牛血清购自Gibco公司。Lipofectamine® 3000转染试剂购自Life公司。质粒提取试剂盒购自OMEGA公司。巴佛洛霉素A1(Bafilomycin A1)购自ENZO公司。BCA蛋白定量试剂盒和Alexa Fluor® 555荧光标记驴抗小鼠IgG购自碧云天生物科技研究所。兔抗LC3B多克隆抗体购自Novus抗体公司,兔抗TSG101单克隆抗体购自上海生工生物工程有限公司,兔抗LAMP-2A多克隆抗体购自BioVision公司,小鼠抗GFP单克隆抗体和兔抗α-synuclein多克隆抗体购自巴傲得公司,小鼠抗β-actin单克隆抗体购自成都正能生物技术有限责任公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG和山羊抗小鼠IgG均购自CST公司。PVDF膜和ECL化学发光试剂购自Millipore公司。嘌呤霉素(puromycin)购自北京索莱宝科技有限公司。人源性pEGFP-alphasynuclein-A53T质粒购自Addgene公司[8]。LAMP-2A和TSG101 shRNA慢病毒、对照慢病毒均由上海汉恒生物科技有限公司提供。

### 1.2 LAMP-2A和TSG101 shRNA慢病毒载体的构建

分别根据GenBank中大鼠LAMP-2A和TSG101基因序列,设计与合成3对shRNA靶序列。其中,正义链5′端引入*Bam*HⅠ酶切位点,反义链5′端引入*Eco*RⅠ酶切位点。LAMP-2A shRNA1序列:正义链5′-GATCCGCAGTGCCTGACAAGGTGACATACAATTCAAGAGATTGTATGTCACCTTGTCAGGCACTGTTTTTTC-3′,反义链5′-AATTGAAAAAACAGTGCCTGACAAGGTGACATACAATCTCTTGAATTGTATGTCACCTTGTCAGGCACTGCG-3′;LAMP-2A shRNA2序列:正义链5′-GATCCGCAGAATGGGAGATGAATTTCTTCAAGAGAGAAATT-

TCATCTCCCATTCTGCTTTTTTC-3′,反义链 5′-AATTGAAAAAAGCAGAATGGGAGATGAATTTCTCTCTTGAAGAAATTCATCTCCCATTCTGCG-3′; LAMP-2A shRNA3 序列:正义链 5′-GATCCGCAGTTGTGGCGATGATAAGATTCAAGAGATCTTATCATCGCCACAACTGCTTTTTTC-3′,反义链 5′-AATTGAAAAAAGCAGTTGTGGCGATGATAAGATCTCTTGAATCTTATCATCGCCACAACTGCG-3′。TSG101 shRNA1 序列:正义链 5′-GATCCGCCCGTAAACAGTTCCAGCTAATTCAAGAGATTAGCTGGAACTGTTTACGGGTTTTTTC-3′,反义链 5′-AATTGAAAAAACCCGTAAACAGTTCCAGCTAATCTCTTGAATTAGCTGGAACTGTTTACGGGCG-3′;TSG101 shRNA2 序列:正义链 5′-GATCCGCGTCCGTCAAACTGTCAATGTTTCAAGAGAACATTGACAGTTTGACGGACGTTTTTTC-3′,反义链 5′-AATTGAAAAAACGTCCGTCAAACTGTCAATGTTCTCTTGAAACATTGACAGTTTGACGGACGCG-3′; TSG101 shRNA3 序列:正义链 5′-GATCCGCCCTGTGCGCTATCGAGGTAATATATTCAAGAGATATATTACCTCGATAGCGCACAGGGTTTTTTC-3′,反义链 5′-AATTGAAAAAACCCTGTGCGCTATCGAGGTAATATATCTCTTGAATATATTACCTCGATAGCGCACAGGGCG-3′(下划线处为干扰序列)。将合成的 DNA 单链退火形成双链,连接到经 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ双酶切的慢病毒 pHBLV-U6-Puro载体中,转化感受态细胞 DH5α,$Amp^+$平板筛选阳性重组子并进行测序鉴定。靶序列设计与合成均由上海汉恒生物科技有限公司完成。

### 1.3 LAMP-2A 和 TSG101 shRNA 慢病毒的包装与滴度测定

取对数生长期的 293T 细胞,接种于 75 $cm^2$细胞培养瓶中,接种量 $9\times10^6$/孔,于 37 ℃、5% $CO_2$条件下培养,待细胞密度达 80% ~90% 时,按照汉恒生物 Lipofiter™转染试剂说明书操作,将含有重组子的慢病毒载体与病毒包装辅助质粒共感染 293T 细胞。转染 48 h 和72 h 后分别两次收集病毒上清,以 0.45 μm 滤器过滤后,于 40 mL 超速离心管中,72 000 ×*g*、4 ℃离心 2 h,500 μL 新鲜培养液重悬病毒沉淀,置于 -80 ℃保存。分别取部分慢病毒浓缩液,采用梯度稀释法测定并计算病毒滴度。慢病毒的包装与滴度测定均由上海汉恒生物科技有限公司完成。

### 1.4 慢病毒感染 PC12 细胞和稳定感染 PC12 细胞株的筛选

取对数生长期的 PC12 细胞,接种于 24 孔板中,接种量 $5\times10^4$/孔,于 37 ℃、5% $CO_2$培养 24 h,待细胞密度达 80% ~90% 时,以病毒液与培养液体积比 1∶9 的比例,加入对照慢病毒、LAMP-2A 和 TSG101 shRNA 慢病毒进行感染,24 h 后,更换新鲜培养液并加入 2.5 μg/mL 的 puromycin 筛选阳性细胞。持续筛选 2 周后,获得各组慢病毒稳定感染 PC12 细胞株。

### 1.5 Western blot 检测各组慢病毒稳定感染 PC12 细胞中 LAMP-2A 和 TSG101 蛋白的表达

分别收集对照慢病毒、LAMP-2A 和 TSG101 shRNA 慢病毒的稳定感染 PC12 细胞,加入 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,于 4 ℃ 14 000 ×*g* 离心 15 min 收集裂解上清液,BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳,每组上样 60 μg/泳道,PVDF 膜湿转 60 ~80 min,分别加兔抗 LAMP-2A 抗体(1∶1 000)、兔抗 TSG101 抗体(1∶1 000)及小鼠抗 β-actin 抗体(1∶10 000),4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,分别加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1∶2 000)或山羊抗小鼠 IgG(1∶2 000),37 ℃ 孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,ECL 化学发光法检测相关蛋白的表达。

### 1.6 下调 LAMP-2A 和 TSG101 蛋白对 PC12 细胞中 EGFP-α-synuclein (A53T)、EGFP、α-synuclein (A53T)和 LC3B 蛋白降解的影响

分别取对照慢病毒、LAMP-2A shRNA2 慢病毒和 TSG101 shRNA1 慢病毒的稳定感染 PC12 细胞,接种于6 孔板中,接种量 $3\times10^5$个/孔,当细胞生长至70%融合时,按照 Lipofectamine 3000 转染试剂盒说明书进行 pEGFP-alphasynuclein-A53T 质粒转染,转染量2.5 μg/孔,37 ℃培养 4 h 后更换新鲜培养液。上述各组转染细胞在 37 ℃继续培养 36 h 后,进行下一步实验。分别进行实验分组:空白对照组(Control 组,仅加入 D-Hanks 液),Bafilomycin A1 实验组(加入终浓度为 0.2 μmol/L 的 Bafilomycin A1)。药物处理 6 h 后,胰酶消化、收集各组细胞,加入 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,于 4 ℃、14 000 ×*g* 离心 15 min,收集裂解上清液,BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳,每组上样 60 μg/泳道,PVDF 膜湿转 60 ~80 min,分别加兔抗 LAMP-2A 抗体(1∶1 000)、兔抗 TSG101 抗体(1∶1 000)、小鼠抗 GFP 抗体(1∶2 000)、兔抗 α-synuclein 抗体(1∶1 000)、兔抗 LC3B 抗体(1∶1 000)及小鼠抗 β-actin 抗体(1∶10 000),4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,分别加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1∶2 000)或山羊抗小鼠 IgG(1∶2 000),37 ℃孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,ECL 化学发光法检测相关蛋白的表达情况。

### 1.7 免疫荧光技术检测各组 PC12 细胞中 EGFP-α-synuclein(A53T)和 LC3B 蛋白的表达

采用 Stefanis 等[9]的策略来检测 PC12 细胞中表达的外源性 α-synuclein(A53T)蛋白。由于我们使用的兔抗 α-synuclein 抗体对 PC12 细胞中内源性表达的 α-synuclein 蛋白的亲和力较低,而与 pEGFP-alphasynuclein-A53T 质粒表达的人源性 α-synuclein 蛋白的亲

和力较高,因此 Western blot 检测到的 α-synuclein 条带主要为人源性的 α-synuclein(A53T)蛋白。分别取对照慢病毒、LAMP-2A shRNA2 慢病毒和 TSG101 shRNA1慢病毒的稳定感染 PC12 细胞,接种于放置了多聚赖氨酸包被圆玻片的 24 孔板中,接种量 $5\times10^4$/孔,当细胞生长至70%融合时,按照 Lipofectamine 3000 转染试剂盒说明书进行 pEGFP-alphasynuclein-A53T 质粒转染,转染量 1 μg /孔,37 ℃培养 4 h 后更换新鲜培养液。继续培养 36 h 后,进行下一步实验。实验分组同 1.6。药物处理 6 h 后,吸去培养基,PBS 洗涤 3 次,冰甲醇 -20 ℃固定15 min,PBS 洗涤 3 次,使用含有羊血清和驴血清的封闭液室温封闭 1 h,加兔抗 LC3B 抗体(1∶200),4 ℃孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,再加 Alexa Fluor® 555 荧光标记驴抗小鼠 IgG (1∶1 000),室温孵育 1 h,PBS 洗涤3 次,封片,利用荧光显微镜观察照相。

### 1.8 统计学分析

运用 SPSS 19.0 统计软件,组间均数比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 慢病毒的制备

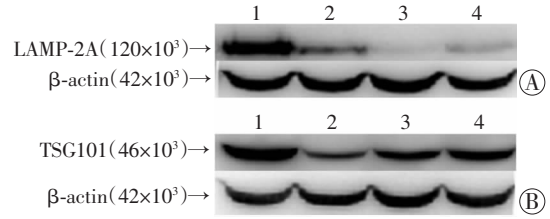
测序结果显示,6 条 LAMP-2A 和 TSG101 shRNA 慢病毒载体序列与设计的 6 对 shRNA 靶序列完全一致,表明已经成功地构建了针对 LAMP2A 和 TSG101 基因的重组慢病毒载体。将含有重组子的慢病毒载体与病毒包装辅助质粒共感染 293T 细胞后获得重组慢病毒,浓缩后取部分慢病毒浓缩液,采用 3 倍梯度稀释法测定病毒滴度。经计算得到各组慢病毒滴度均达到 $2\times10^8$PFU/mL,滴度较高,可以用于下一步实验。

### 2.2 各组慢病毒稳定感染 PC12 细胞中 LAMP-2A 和 TSG101 蛋白的表达

LAMP-2A shRNA-2 感染 PC12 细胞中 LAMP-2A 蛋白表达的抑制效果最好,而 TSG101 shRNA-1 感染 PC12 细胞中 TSG101 蛋白表达的抑制效果最好(图1)。因此,选择这 2 组细胞分别作为下调 LAMP-2A 和 TSG101 蛋白的细胞模型用于后续实验。

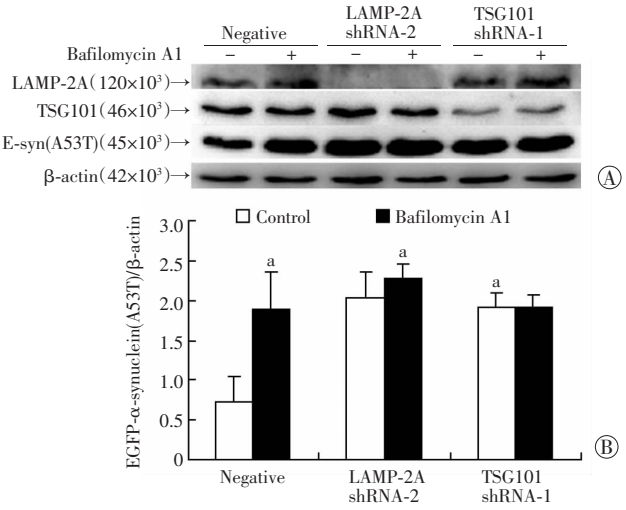
### 2.3 下调 LAMP-2A 和 TSG101 蛋白对各组细胞中 EGFP-α-synuclein(A53T)蛋白的影响

未加 Bafilomycin A1 处理的对照慢病毒组细胞(Negative + Control)中的 EGFP-α-synuclein(A53T)[E-syn(A53T)]蛋白含量明显较低,与加 Bafilomycin A1 处理的对照慢病毒组细胞(Negative + Bafilomycin A1)比较差异有统计学意义($P<0.01$),表明 Bafilomycin A1 抑制了细胞中 EGFP-α-synuclein(A53T)蛋白的降解。同样,未加 Bafilomycin A1 处理时,仅下调 LAMP-2A 或 TSG101 蛋白也能够抑制细胞中 EGFP-α-synuclein(A53T)蛋白的降解($P<0.01$)。而加入 Bafilomycin A1 处理后,与 Negative 组比较,LAMP-2A shRNA-2 组、TSG101 shRNA-1 组细胞中 EGFP-α-synuclein(A53T)蛋白表达差异并无显著性($P>0.05$,图2)。




A:LAMP-2A 1:对照慢病毒;2:LAMP-2A shRNA-1;3:LAMP-2A shRNA-2;4:LAMP-2A shRNA-3;B:TSG101 1:对照慢病毒;2:TSG101 shRNA-1;3:TSG101 shRNA-2;4:TSG101 shRNA-3

**图1 Western blot 检测各组慢病毒稳定感染 PC12 细胞中 LAMP-2A 和 TSG101 蛋白的表达**




A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.01$,与 Negative + Control 比较

**图2 Western blot 检测各组细胞中 EGFP-α-synuclein (A53T)蛋白的表达**

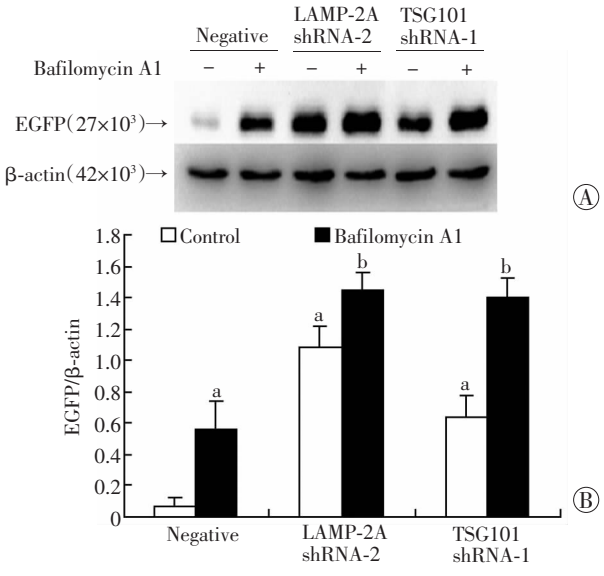
### 2.4 下调 LAMP-2A 和 TSG101 蛋白对各组细胞中 EGFP 蛋白的影响

Bafilomycin A1 处理后,与未加 Bafilomycin A1 相比,对照慢病毒组细胞中的 EGFP 蛋白有显著增加($P<0.01$),表明 Bafilomycin A1 处理抑制了细胞中 EGFP 蛋白的降解。而 LAMP-2A shRNA-2 组、TSG101 shRNA-1 组与 Negative 组相比,无论是未加 Bafilomycin A1,还是加入 Bafilomycin A1 处理,细胞中的 EGFP 蛋白都显著增加($P<0.01$,图3),表明下调 LAMP-2A 或 TSG101 蛋白同样能够抑制细胞中 EGFP 蛋白的降解。

### 2.5 下调 LAMP-2A 和 TSG101 蛋白对各组细胞中 α-synuclein(A53T)蛋白的影响

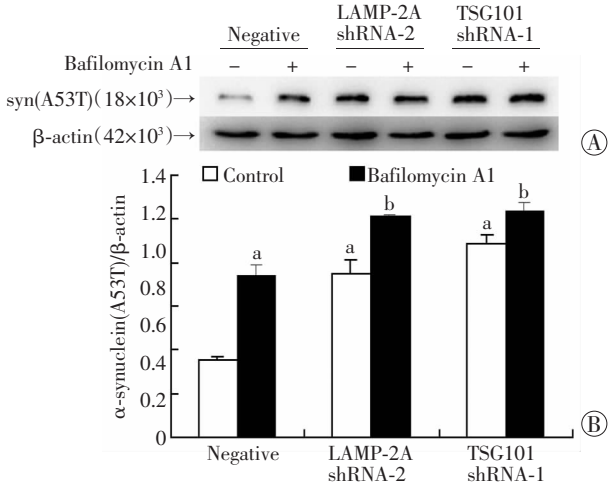
与 EGFP 蛋白相似,Bafilomycin A1 处理后,与未

加 Bafilomycin A1 相比，对照慢病毒组细胞中的 α-synuclein(A53T)蛋白有显著增加($P<0.01$)。而 LAMP-2A shRNA-2 组、TSG101 shRNA-1 组与 Negative 组相比，无论是未加 Bafilomycin A1，还是加入 Bafilomycin A1 处理，细胞中的 α-synuclein(A53T)蛋白都有显著增加($P<0.01$，图 4)。




A：Western blot 检测；B：半定量分析 a：$P<0.01$，与 Negative + Control 比较；b：$P<0.01$，与 Negative + Bafilomycin A1 比较

**图 3 Western blot 检测各组细胞中 EGFP 蛋白的表达**

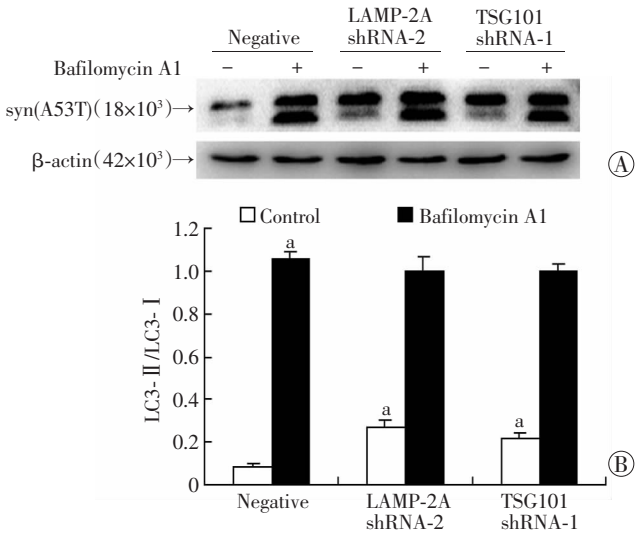



A：Western blot 检测；B：半定量分析 a：$P<0.01$，与 Negative + Control 比较；b：$P<0.01$，与 Negative + Bafilomycin A1 比较

**图 4 Western blot 检测各组细胞中 α-synuclein(A53T)蛋白的表达**

### 2.6 下调 LAMP-2A 和 TSG101 蛋白对各组细胞中 LC3B 蛋白的影响

Bafilomycin A1 处理后，与未加 Bafilomycin A1 相比，各组细胞中的 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值都有显著提高($P<0.01$)。未加 Bafilomycin A1 处理时，LAMP-2A shRNA-2 组、TSG101 shRNA-1 组与 Negative 组相比，细胞中的 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值也都有显著提高($P<0.01$)。而加入 Bafilomycin A1 处理后，LAMP-2A shRNA-2 组、TSG101 shRNA-1 组与 Negative 组相比，LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值差异并无显著性($P>0.05$，图 5)。




A：Western blot 检测；B：半定量分析 a：$P<0.01$，与 Negative + Control 比较

**图 5 Western blot 检测各组细胞中 LC3B 蛋白的表达**

### 2.7 免疫荧光技术检测各组细胞中 EGFP-α-synuclein(A53T)和 LC3B 蛋白的表达

未加 Bafilomycin A1 处理时(Control)，各组细胞形态较为正常，与 Negative 组细胞相比，LAMP-2A shRNA-2 组和 TSG101 shRNA-1 组细胞内 EGFP-α-synuclein(A53T)聚集体明显增多，LC3B 自噬斑点也有增加。加入 Bafilomycin A1 处理后，各组细胞均发生皱缩，EGFP-α-synuclein(A53T)聚集体和 LC3B 自噬斑点也显著增多(图 6)。

## 3 讨论

近年来的研究表明自噬溶酶体途径在调节细胞内 α-synuclein 代谢平衡中发挥了非常重要的作用。经典的自噬溶酶体途径可以分为 3 种类型：大自噬途径(macroautophagy)、小自噬途径(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬途径(CMA)[10]。大自噬途径是通过形成脂质双层膜包裹待降解目标蛋白或细胞器，并将其融入溶酶体内降解。已有研究证实 ubiquitin-p62 信号通路可以特异性的识别不溶性 α-synuclein 聚集体以及突变型 α-synuclein 并经大自噬途径降解，从而阻止其对细胞造成的损害[11]。CMA 途径依赖分子伴侣对底物的特异识别作用，研究表明热休克蛋白 Hsc70 可以识别野生型 α-synuclein，然后通过与溶酶

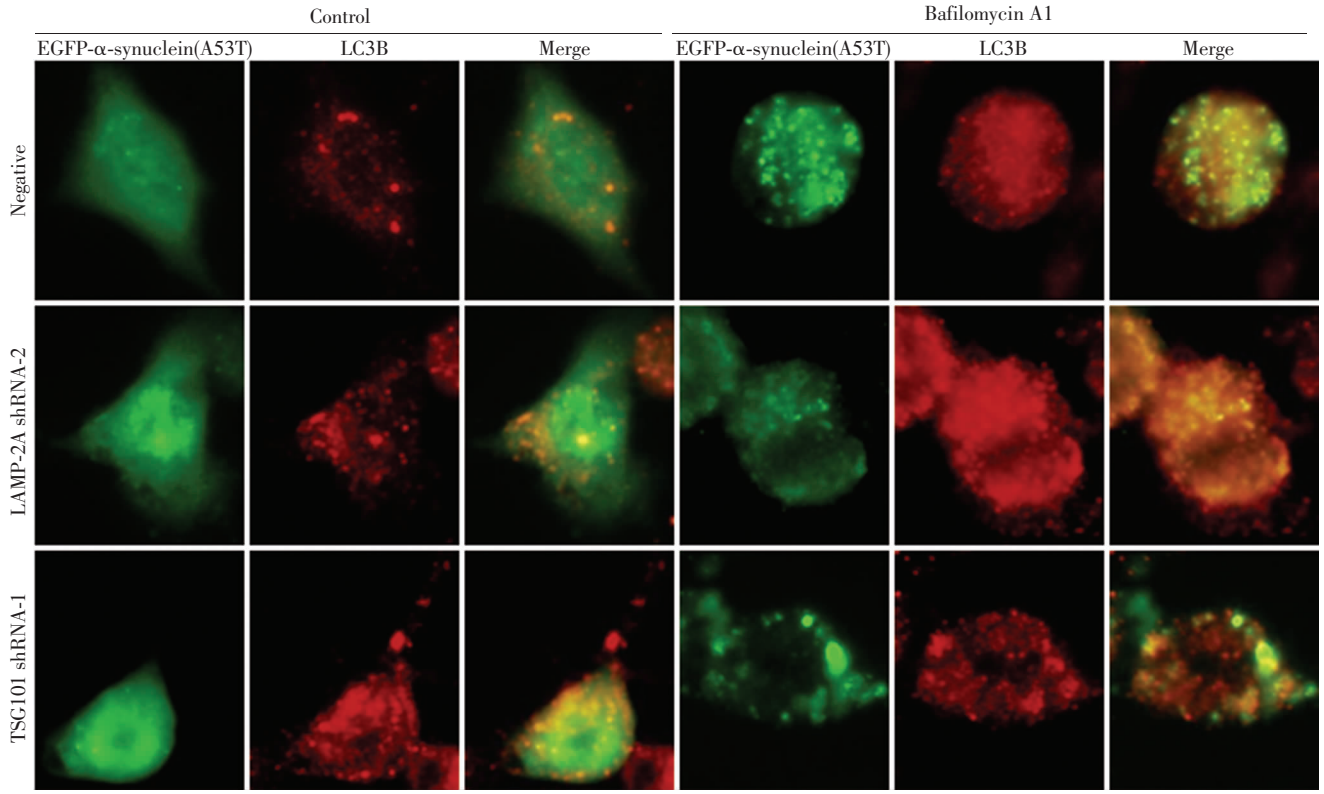



**图6 荧光显微镜下观察EGFP-α-synuclein(A53T)和LC3B蛋白的表达** (×400)

体膜蛋白LAMP-2A作用,从而将野生型α-synuclein导入溶酶体内经CMA途径降解。但是,CMA途径不能降解突变型α-synuclein或α-synuclein聚集体[12-14]。小自噬途径是溶酶体直接包裹降解蛋白质或细胞器的自噬方式,尽管小自噬途径已在酵母细胞内得到广泛证实并进行了深入研究[15-16],然而在哺乳动物细胞内,关于小自噬途径的研究还很少,其在调控α-synuclein代谢中的作用也不清楚。最近的研究表明在哺乳动物细胞内,存在类似小自噬的内体小自噬途径[7]。这一作用同样依赖于Hsc70对目标蛋白的LIR结构域(KFERQ)的识别,进而将靶蛋白输送入晚期内体并经溶酶体降解。那么,α-synuclein是否也能通过内体小自噬途径降解,目前还不清楚。

突变型α-synuclein(A53T)基因是家族遗传性PD的致病基因之一,由于CMA途径对α-synuclein的空间结构有一定限制,α-synuclein(A53T)蛋白被Hsc70识别并结合到溶酶体膜表面后,不能通过CMA途径降解,因此会抑制CMA途径功能,导致其他CMA底物蛋白的聚集,并引起细胞死亡[17-18]。内体小自噬途径可以通过直接包裹的方式降解底物[7],因此,与CMA途径只能降解野生型α-synuclein不同,我们推测内体小自噬途径也能降解突变型α-synuclein甚至α-synuclein聚集体。在本研究中,我们选择EGFP-α-synuclein(A53T)融合蛋白作为底物蛋白研究内体小自噬途径在降解α-synuclein中的作用。

Bafilomycin A1是空泡型$H^+$-ATP酶的特异性抑制剂,能够破坏溶酶体腔内的低pH环境,从而抑制溶酶体内的蛋白酶活性,并阻断自噬溶酶体的形成,因此对所有类型的自噬都有抑制作用[19]。在本研究中,我们利用Bafilomycin A1处理PC12细胞,结果显著提高了对照病毒组感染细胞中EGFP-α-synuclein(A53T)、EGFP和α-synuclein(A53T)蛋白的含量,表明细胞中EGFP-α-synuclein(A53T)的确主要通过自噬溶酶体途径降解。

溶酶体膜蛋白LAMP-2A是CMA途径中的关键调节蛋白,抑制LAMP-2A蛋白表达可以特异性地阻断CMA途径,而不影响大自噬和小自噬等其他自噬途径[20-22]。我们利用慢病毒介导的shRNA技术干扰溶酶体膜蛋白LAMP-2A的表达,发现阻断CMA途径后,细胞中EGFP-α-synuclein(A53T)、EGFP和α-synuclein(A53T)的含量均有了显著增加,提示阻断CMA途径能够抑制EGFP-α-synuclein(A53T)的降解。我们推测其原因可能是因为阻断CMA途径能够引起CMA底物蛋白的聚集和代偿性的大自噬降解作用,进而干扰了EGFP-α-synuclein(A53T)通过大自噬途径的降解过程。

内体小自噬途径需要内体分选复合物(endosomal sorting complexes required for transport,ESCRT)Ⅰ和Ⅲ的参与[7],TSG101是ESCRT Ⅰ的关键调控因子[23],抑制TSG101蛋白表达可以特异性地阻断内体小自噬

途径[7,20]。为了验证内体小自噬途径在 EGFP-α-synuclein(A53T)降解中的作用,我们利用慢病毒介导的 shRNA 技术特异抑制 TSG101 的表达,结果显示阻断内体小自噬途径能够诱导细胞内 EGFP-α-synuclein(A53T)、EGFP 和 α-synuclein(A53T)蛋白的聚集,提示内体小自噬途径在细胞内 EGFP-α-synuclein(A53T)的降解中可能也发挥了一定的作用,但是这一结果也有可能是因为阻断内体小自噬途径,引起其底物蛋白的聚集和大自噬功能紊乱所导致,还需要进一步的实验来证实。

本研究结果表明:下调 LAMP-2A 和 TSG101 蛋白都能够引起细胞内 LC3-Ⅱ蛋白的表达增加。LC3-Ⅱ是衡量大自噬水平的一个重要因子[24],但是细胞内 LC3-Ⅱ蛋白的表达增加,既可能是大自噬途径被激活引起,也有可能是自噬体与溶酶体的融合受阻而积聚产生。已有研究认为下调 LAMP-2A 引起的 LC3-Ⅱ蛋白增加,是由于大自噬代偿性升高所导致的[13,20]。因此,我们推测下调 TSG101,抑制内体小自噬途径后,也会引起大自噬水平的代偿性升高。

综上所述,本研究结果提示:除了大自噬途径,内体小自噬途径也可能参与了细胞内 α-synuclein(A53T)蛋白的降解过程,但是其具体机制还不清楚。而进一步研究内体小自噬途径在降解突变 α-synuclein 以及清除 α-synuclein 异常聚集中的作用,将为深入阐释 PD 的发生机制提供新的思路。

**参考文献:**


[1] Xie W, Wan O W, Chung K K. New insights into the role of mitochondrial dysfunction and protein aggregation in Parkinson's disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1802(11): 935 – 941.

[2] Mammucari C, Rizzuto R. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging[J]. Mech Ageing Dev, 2010, 131(7/8): 536 – 543.

[3] Recasens A, Dehay B. Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease[J]. Front Neuroanat, 2014, 8: 159.

[4] McNaught K S, Olanow C W. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease[J]. Ann Neurol, 2003, 53(Suppl 3): S73 – S84.

[5] Martinez-Vicente M, Cuervo A M. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike[J]. Lancet Neurol, 2007, 6(4): 352 – 361.

[6] Rubinsztein D C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration[J]. Nature, 2006, 443(7113): 780 – 786.

[7] Sahu R, Kaushik S, Clement C C, *et al*. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes[J]. Dev Cell, 2011, 20(1): 131 – 139.

[8] Furlong R A, Narain Y, Rankin J, *et al*. Alpha-synuclein overexpression promotes aggregation of mutant huntingtin[J]. Biochem J, 2000, 346(Pt 3): 577 – 581.

[9] Stefanis L, Larsen K E, Rideout H J, *et al*. Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death[J]. J Neurosci, 2001, 21(24): 9549 – 9560.

[10] 韩起, 陈莎, 杨明珍, 等. 溶酶体相关膜蛋白 2A shRNA 对乳腺癌细胞株紫杉醇耐药的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(4): 351 – 354.

[11] Martinez-Vicente M. Multiple ways for a-synuclein degradation[J]. Mov Disord, 2012, 27(3): 345.

[12] Cuervo A M, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging[J]. Cell Res, 2014, 24(1): 92 – 104.

[13] Cuervo A M, Stefanis L, Fredenburg R, *et al*. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy[J]. Science, 2004, 305(5688): 1292 – 1295.

[14] Kaushik S, Cuervo A M. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world[J]. Trends Cell Biol, 2012, 22(8): 407 – 417.

[15] Kissova I, Salin B, Schaeffer J, *et al*. Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast[J]. Autophagy, 2007, 3(4): 329 – 336.

[16] Farre J C, Krick R, Subramani S, *et al*. Turnover of organelles by autophagy in yeast[J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(4): 522 – 530.

[17] Bourdenx M, Bezard E, Dehay B. Lysosomes and α-synuclein form a dangerous duet leading to neuronal cell death[J]. Front Neuroanat, 2014, 8: 83.

[18] Yang Q, She H, Gearing M, *et al*. Regulation of neuronal survival factor MEF2D by chaperone-mediated autophagy[J]. Science, 2009, 323(5910): 124 – 127.

[19] Shacka J J, Klocke B J, Roth K A. Autophagy, bafilomycin and cell death: the "a-B-cs" of plecomacrolide-induced neuroprotection[J]. Autophagy, 2006, 2(3): 228 – 230.

[20] Klionsky D J, Abdalla F C, Abeliovich H, *et al*. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. Autophagy, 2012, 8(4): 445 – 544.

[21] Massey A C, Kaushik S, Sovak G, *et al*. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(15): 5805 – 5810.

[22] Kaushik S, Cuervo A M. Methods to monitor chaperone-mediated autophagy[J]. Methods Enzymol, 2009, 452: 297 – 324.

[23] Falguieres T, Luyet P P, Bissig C, *et al*. *In vitro* budding of intralumenal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(11): 4942 – 4955.

[24] 李霞, 黄文娟, 朱素菲, 等. 雷帕霉素诱导细胞自噬促进乙型肝炎病毒的复制[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(12): 1233 – 1236.


(**收稿**:2014-12-08;**修回**:2015-01-09)

(编辑 郭建秀)