DOI:10.16016/j.2097-0927.202203123

突触融合蛋白 17 改善 Aβ31-35 诱导的小鼠海马神经细胞死亡

王 宁[1],周秀雅[1],何星鸿[1],张立飞[1],李朋佳[1],师 姝[1],王 丽[1,2],王晓晖[1,2] 030001 太原,山西医科大学基础医学院:病理教研室[1],基础医学研究中心[2]

[**摘要**] **目的** 探究突触融合蛋白 17(syntaxin17,STX17)在 Aβ 诱导的小鼠海马神经细胞死亡中的作用。**方法** 基于 WGCNA 方法选取与阿尔茨海默病显著相关的基因,与自噬基因库和 SNARE 家族基因取交集筛选关键基因;C57BL/6 小鼠海马组织中注射浓度为 1 g/L 的 Aβ31-35 和使用终浓度为 5 μmol/L Aβ31-35 处理 HT22 海马神经细胞,采用 Western Blot 检测 STX17、LC3 Ⅱ、P62 的蛋白表达情况;CCK-8 法检测 Aβ31-35 处理的 HT22 海马神经细胞存活率;慢病毒介导 HT22 海马神经细胞 STX17 过表达后,Western blot 检测 Aβ31-35 处理后 LC3 Ⅱ、P62 的蛋白表达情况。**结果** 与阿尔茨海默病显著相关的 Salmon 和 Black 模块分别与自噬基因库和 SNARE 亚家族取交集获取关键基因 STX17。与对照组比较,经 Aβ31-35 处理后,HT22 细胞细胞存活率[(81.81±11.65)%]明显下降($P<0.05$),小鼠海马组织和 HT22 细胞中 STX17 蛋白表达均显著降低($P<0.05$),LC3 Ⅱ 和 P62 蛋白表达均显著升高($P<0.05$);慢病毒介导 HT22 海马神经细胞 STX17 过表达后,显著逆转 Aβ31-35 诱导的 LC3 Ⅱ、P62 的蛋白表达上调($P<0.05$),并改善 Aβ31-35 诱导的 HT22 海马神经细胞存活率下降[(101.91±13.81)% *vs* (79.21±8.75)%,$P<0.05$]。**结论** STX17 通过促进自噬来改善 Aβ 诱导的小鼠海马神经细胞死亡。

[**关键词**] STX17;Aβ;小鼠海马神经细胞;细胞死亡;自噬

[**中图法分类号**] R338.26; R341; R394.2 [**文献标志码**] A

STX17 improves Aβ31-35 induced death of hippocampal neurons in mice

WANG Ning[1], ZHOU Xiuya[1], HE Xinghong[1], ZHANG Lifei[1], LI Pengjia[1], SHI Shu[1], WANG Li[1,2], WANG Xiaohui[1,2] [1]Department of Pathology, [2]Basic Medical Research Center, School of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi Province, 030001, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role of STX17 protein in Aβ-induced death of mouse hippocampal neuronal cells. **Methods** Based on Weighted correlation network analysis (WGCNA), the modules significantly related to Alzheimer's disease (AD) were selected, and key genes were screened for cross-fertilization with autophagy gene bank and SNARE family genes. Aβ31-35 at a concentration of 1 g/L was used to inject the C57BL/6 mouse hippocampal tissue, and HT22 hippocampal neuronal cells were treated with 5 μmol/L Aβ31-35. Then the protein expression of STX17, LC3 Ⅱ and P62 was detected by Western blotting. The survival rate of the HT22 hippocampal neuronal cells treated by using Aβ31-35 was detected by CCK-8 assay. Protein expression of LC3 Ⅱ and P62 were determined by Western blotting after overexpression STX17 in HT22 hippocampal neuronal cells. **Results** The Salmon and Black modules significantly associated with AD crossed with autophagic gene pool and SNARE subfamily intersection STX17, respectively. Under the

[**基金项目**] 山西省应用基础研究计划面上自然基金项目(201901D111197);山西省高等学校优秀成果(科学技术)培育项目(2020KJ012);山西省“1331 工程”项目重点学科建设计划优势特色学科(1331KSC);山西省省筹资金资助回国留学人员科研项目(2020-082)

[**通信作者**] 王晓晖,E-mail:163.wangxh@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

action of Aβ31-35 mouse hippocampal tissue and mouse HT22 hippocampal neuronal cells, and the survival rate of HT22 cells [(81.81±11.65)% *vs* (100.00±12.89)%, $P<0.05$] were decreased significantly, and the expression of STX17 was significantly reduced in both tissue and cells ($P<0.05$). The expression of tissue LC3Ⅱ and P62 proteins were significantly elevated in the tissue ($P<0.05$), and in the cells ($P<0.05$). After lentivirus-mediated overexpression of STX17 in HT22 hippocampal neuronal cells, the protein expression upregulation of LC3II and P62 induced by Aβ31-35 was significantly reversed, and the survival rate was improved in Aβ31-35-induced HT22 hippocampal neuronal cells [(101.91±13.81)% *vs* (79.21±8.75)%, $P<0.05$]. **Conclusion** STX17 improves Aβ-induced death of mouse hippocampal neuronal cells by promoting autophagy.

[**Key words**] STX17 protein; Aβ; mouse hippocampal neuronal cells ; cell death; autophagy

Supported by the General Program of Natural Foundation for Applied Basic Research Plan of Shanxi Province (201901D111197), the Excellent Achievements (Science and Technology) Cultivation Project of Colleges and Universities in Shanxi Province (2020KJ012), the "1331 Project" for Key-Discipline Construction Plan for Advantageous and Characteristic Disciplines of Shanxi Province (1331KSC), and the Scientific Research Project for Returning Overseas Students of Shanxi Province (2020-082). Corresponding author: WANG Xiaohui, E-mail: 163.wangxh@163.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是一种以认知和记忆功能损害为主的慢性神经系统退行性疾病,随着老龄化社会的到来,AD 的发病率逐年上升并随着年龄的增长呈指数增加[1]。AD 的病理特点表现为神经元胞外老年斑、神经元纤维缠结以及海马等脑区神经元大量丢失[2],最终导致与海马区相关的学习记忆功能减弱和认知功能障碍。β 淀粉样蛋白(amyloid β-protein,Aβ)毒性学说是 AD 发病的主流学说[3]。Aβ 由 β 淀粉样前体蛋白(β-amyloid precursor protein,APP)经 β-分泌酶和 γ-分泌酶水解作用而产生的含有 39~43 个氨基酸的多肽[4],由细胞分泌,在细胞基质沉淀聚积后具有很强的神经毒性作用[5],可诱导海马神经细胞死亡[6]。

研究发现,在 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠脑内存在大量的自噬体和溶酶体,自噬体和溶酶体的增加很大程度上是由自噬水平降低引起的[7]。自噬是指吞噬自身受损蛋白或衰老细胞器使其包被进入囊泡,并与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物的过程。随着 AD 病情的进展,自噬体逐渐增多,自噬体和溶酶体融合受限,最终引起脑内大量神经细胞丢失和死亡[8]。因此,改善自噬体和溶酶体融合障碍对逆转 AD 尤为重要。突触融合蛋白 17(syntaxin17,STX17)是自噬体和溶酶体融合过程中的关键蛋白。在自噬过程中,STX17 蛋白招募 SNAP29 蛋白和 VAMP8 蛋白形成 STX17-SNAP29-VAMP8 复合体,介导自噬体与溶酶体的融合[9]。然而,STX17 是否可以改善 Aβ 诱导的海马神经细胞死亡目前尚不清楚。因此,本研究探讨 Aβ31-35 对小鼠海马神经细胞中 STX17 表达和自噬的影响,并观察过表达 STX17 是否能逆转 Aβ31-35 所致小鼠海马神经细胞死亡和自噬异常。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

6~8 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠,质量 18~25 g,饲养环境适宜且自由饮食。本研究涉及动物的所有程序均得到山西医科大学伦理委员会批准,使用过程符合国家实验动物使用规定。HT22 小鼠海马神经细胞系购自广州吉尼欧生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

Aβ31-35 试剂(货号:ab120974)、LC3 抗体(货号:ab48394)和 P62 抗体(货号:ab56416)购自英国 Abcam 公司;Cell Counting Kit-8 试剂盒(货号:CK04)购自日本 Dojindo 公司;STX17 抗体(货号:17815-1-P)购自美国 Proteintech 公司;LV-OE STX17 购自中国吉凯公司。

CO_2 恒温细胞培养箱(货号:HERAcell 150i)购自美国 Thermo 公司;酶联免疫检测仪(货号:SMP500-071 47-HLXU)购自美国 SoftMax 公司;PCR 扩增仪(货号:MX3005P)购自美国 Stratagene 公司;凝胶成像系统(货号:BioSpectrum 810)购自美国 UVP 公司,倒置荧光显微镜(货号:IX51)购自日本 Olympus 公司。

1.3 WGCNA 分析和关键基因筛选

使用 R 语言 WGCNA 包对 GSE 111737 数据进行

分析,该数据含 7 例 AD 患者和 6 例健康人群,参考 GPL21810 平台的注释信息将探针转换为相应的基因符号。通过 WGCNA 包中的“pickSoftThreshold”函数获得相邻函数加权参数的最优值,将其作为软阈值。构建邻接矩阵探索基因的内在联系,利用拓扑重叠矩阵(TOM)相似性函数将邻接矩阵转换为 TOM 矩阵。基于动态剪切树将基因分为不同模块,并计算模块临床特征的相关性,从中选择与阿尔茨海默病相关程度最高的模块并对该模块中的基因进行后续分析。通过 WGCNA 分析筛选出来的模块基因分别与自噬基因库和 KEGG 筛选出的 SNARE 家族基因取交集。

1.4 小鼠海马神经元 HT22 细胞培养

将-80 ℃取出装有 HT22 神经细胞的冻存管立即放入 37 ℃水浴锅,快速晃动冻存管使其融解,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清后添加新的完全培养基并吹打混匀,将重悬的细胞转移至培养瓶并补加适量的完全培养基,“8”字晃动培养瓶使细胞分布均匀;使用含 EDTA 的胰酶对生长状态良好的神经细胞进行消化,从而制备成细胞悬液,以 2×10^5/孔接种至 6 孔板,次日观察细胞生长情况,待汇合度达 70%进行干预;当培养瓶中细胞生长融合度达到 80%时进行传代处理;部分细胞进行冻存处理,以便后续实验需要。后续细胞实验分为对照组(正常培养)和 Aβ31-35 组(5 μmol/L Aβ31-35 处理)。

1.5 小鼠海马内注射给药

使用 5%水合氯醛对小鼠腹腔进行注射麻醉,将头部固定在三维脑力体定位仪,使用消毒后的剪刀在小鼠头部剪开约 1.5 cm 的切口;定位海马组织的位置:前囟后 2 mm,中线两侧旁开 1.8 mm,深度1.8 mm;进行海马内注射。实验分为对照组和 Aβ31-35 处理组,Aβ31-35 组给予 Aβ31-35(1 g/L,750 nmol/kg,双侧海马注射共约 8.2 μL),对照组注射等量的高压三蒸水。

1.6 CCK-8 法检测细胞活性

将对数生长期的细胞制备成细胞悬液后接种到 96 孔板上,次日更换新的完全培养基并进行药物干预,药物处理 24 h 后,每孔各加入 10 μL CCK-8 溶液并孵育 1.5 h,使用酶标仪测定 450 nm 处的光密度值[D(450)]并进行数据处理分析,计算公式如下。

细胞存活率=[实验组 D(450)值-空白对照组 D(450)值]/[阴性对照组 D(450)值-空白对照组 D(450)值]×100%

1.7 Western blot 检测

使用配制好的裂解液(RiPa∶PMSF=100∶1)提取组织和细胞的总蛋白,BCA 法测蛋白的浓度,对各组溶液进行定量处理,之后放在 100 ℃金属浴加热 10 min;配制 5%的浓缩胶和 12%的分离胶,按顺序依次将 Marker 和蛋白样品加入 SDS-PAGE 胶样孔内,先设置 80 V 的电压待跑出一定量 Marker 后转为 120 V;使用甲醇激活 PVDF 膜后开始进行转膜,再使用 5%脱脂奶粉进行封闭(常温,2 h),封闭结束后使用 TBST 洗膜三次加入相应一抗进行孵育,孵育条件为 4 ℃冰箱过夜,次日继续洗膜 3 次,加入相应二抗,在 4 ℃孵育 2 h 后洗膜 3 次;吸取适量的 Super ECL Plus 超敏发光液滴加到 PVDF 膜蛋白条带上,使用 BioSpectrum 810 Imaging System 系统采集图像,利用凝胶成像系统曝光并使用 ImageJ 软件进行分析。

1.8 慢病毒感染及感染细胞的筛选

HT22 细胞制备成悬液后以 1×10^4/孔接种于 96 孔板上,设置梯度最佳感染复数 MOI 为 5、10、20、30,加入病毒体积=细胞计数×2×MOI/病毒滴度,根据荧光表达情况选择感染效率最佳 MOI。使用 1/2 小体积感染法:在倒置荧光显微镜下观察培养瓶中细胞生长状态和密度,密度达 60%时,弃旧培养基,加 PBS 缓冲液冲洗一次并更换新的完全培养基,同时加入最佳 MOI 值所对应的慢病毒量和 1/2 体积完全培养基和助转剂,待感染 4 h 后再加入另一半新鲜培养基和助转剂,感染 16 h 后,将含病毒的培养基换为普通完全培养基。实验分为 4 组:空病毒组(LV-NC)、空病毒+Aβ31-35 组(LV-NC+Aβ31-35)、慢病毒过表达 STX17 组(LV-OE STX17)、慢病毒过表达 STX17+Aβ31-35 组(LV-OE STX17+Aβ31-35)。

1.9 实时荧光定量 PCR(Real-Time PCR,RT-PCR)检测

在各组细胞加入 500 μL RNAisoPlus,冰上充分裂解后收集于 EP 管中,进行总 RNA 提取、溶解及浓度检测;进行 RNA 的反转录,以 cDNA 为模板进行扩增。PCR 上游引物:5′-GGAAACCTTAGAAGCGGACTT-3′,下游引物:5′-TCAACATTCACAGCGGCAC-3′。所有结果与对照组 GAPDH 的表达量进行标化,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因 mRNA 水平进行相对定量。实验分为 3 组:普通对照组(Control)、普通对照组+空载组(LV-NC)、普通对照组+载体组(LV-OESTX17)。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用完全随机两独立样本 t 检验,

多组间比较采用单因素方差分析,组间差异采用最小显著法(LSD)进行比较,检验水准 $\alpha=0.05$。

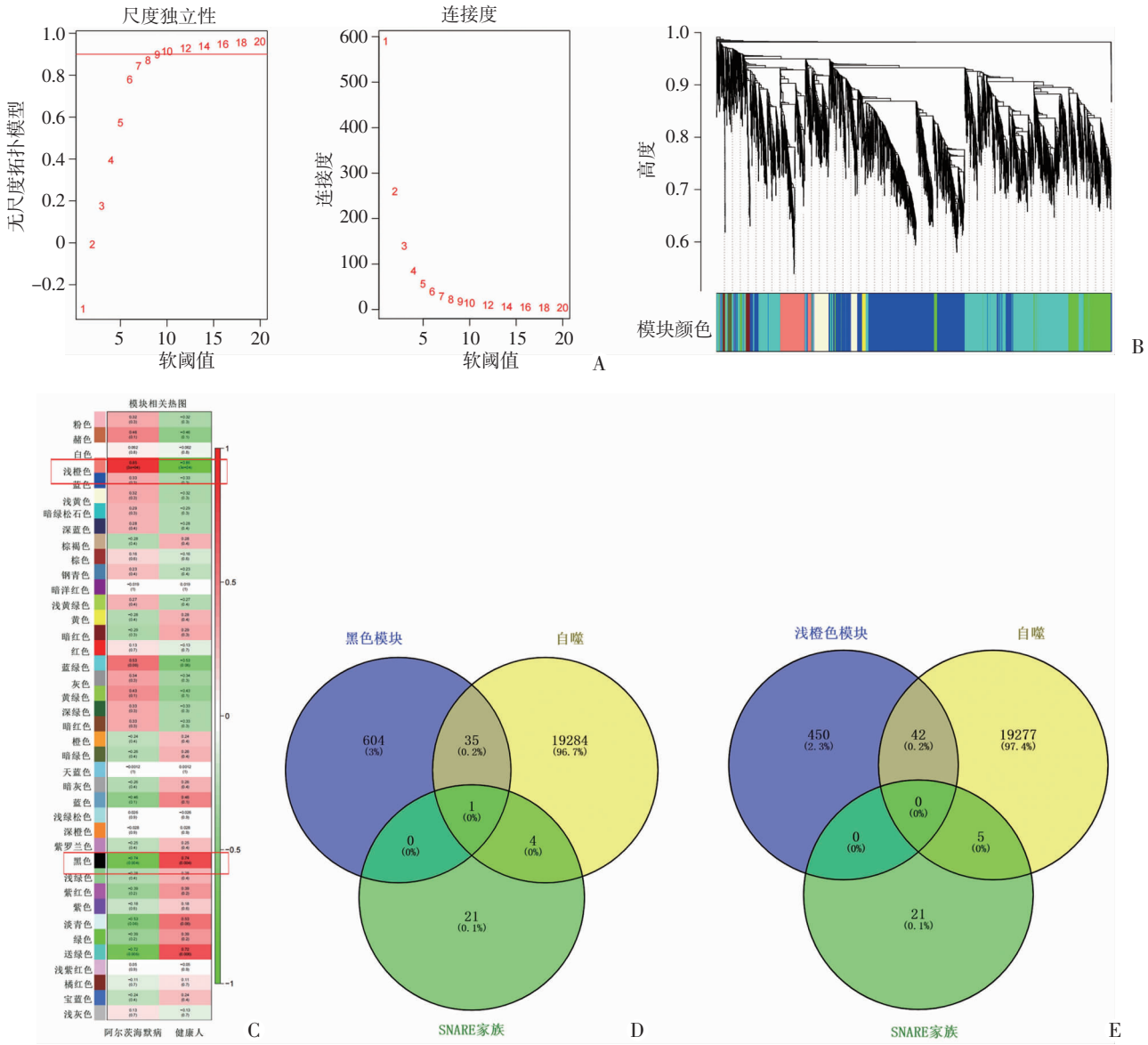
2　结果

2.1　生物信息学分析 AD 患者中 STX17 表达水平

通过 WGCNA 包的算法,根据无尺度网络分布拟合,选取 $\beta=8$ 作为软阈值(图 1A),并计算基因间的相关性矩阵和 TOM,使用 TOM 构建基因间分层聚类树,合并相似模块后得到 40 个模块(图 1B),其中黑色模块和浅橙色模块与 AD 的相关性最高(图 1C)。因此黑色模块和浅橙色模块可以作为与 AD 密切相关的枢纽模块。而后将两个模块的基因分别与自噬基因库和 SNARE 家族基因取交集,仅有黑色模块提取出 STX17(图 1D、E)。

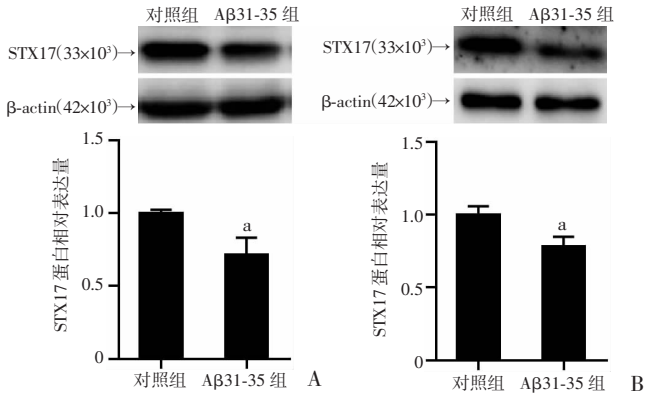
2.2　Aβ31-35 可诱导 C57BL/6 小鼠海马组织和 HT22 海马神经细胞的 STX17 蛋白表达下调

与对照组比较,海马内注射 Aβ31-35 诱导了 C57BL/6 小鼠海马组织 STX17 蛋白表达(0.72±0.28)显著降低($P<0.05$,图 2A)。进一步离体研究发现,Aβ31-35 作用后,HT22 海马神经细胞 STX17 蛋白表达(0.78±0.16)也较对照组显著降低($P<0.05$,图 2B)。



A:基于 GSE111737 表达数据的软阈值确定;B:基因表达的聚类分析　确定不同的共表达数据模块;C:基因模块与 AD 之间的相关性热图;D:黑色模块与自噬基因库和 SNARE 家族基因库取交集;E:浅橙色模块与自噬基因库和 SNARE 家族基因库取交集

图 1　STX17 基因在阿尔茨海默病中表达异常



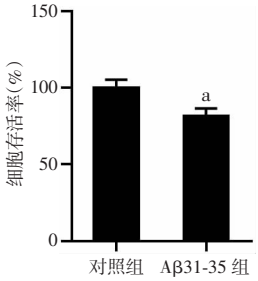
a:$P<0.05$,与对照组比较

A:Western blot 检测小鼠海马组织中 STX17 蛋白的表达及半定量分析;B:Western blot 检测 HT22 海马细胞中 STX17 蛋白的表达及半定量分析

图 2 Aβ31-35 诱导小鼠海马组织和 HT22 细胞中 STX17 蛋白表达降低($n=6,\bar{x}\pm s$)

2.3 Aβ31-35 导致 HT22 海马神经细胞死亡

5 μmol/L Aβ31-35 作用 24 h 后,HT22 海马神经细胞存活率为(81.81±11.65)%,较对照组显著降低($P<0.05$,图 3),表明 Aβ31-35 对海马神经细胞产生明显的毒性作用。

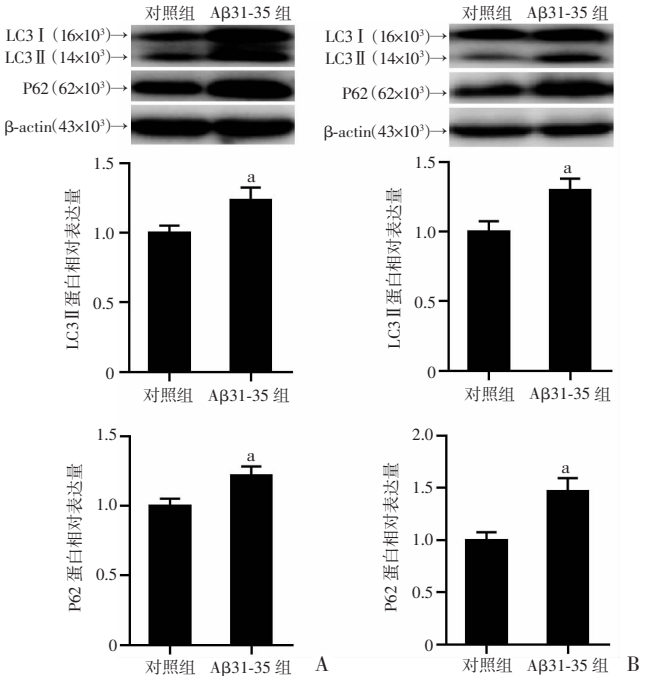


a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3 Aβ31-35 对 HT22 细胞存活率的影响($n=6,\bar{x}\pm s$)

2.4 Aβ31-35 诱导小鼠海马神经细胞自噬相关蛋白 LC3Ⅱ、P62 蛋白表达升高

经海马内注射 Aβ31-35 后,小鼠海马组织 LC3Ⅱ的表达(1.23±0.22)较对照组显著升高($P<0.05$),P62 的表达(1.22±0.16)较对照组显著升高($P<0.05$),见图 4A。同样的,Aβ31-35 作用 HT22 海马神经细胞后,细胞中 LC3Ⅱ的表达较对照组显著升高($P<0.05$),P62 的表达较对照组显著升高($P<0.05$),见图 4B。



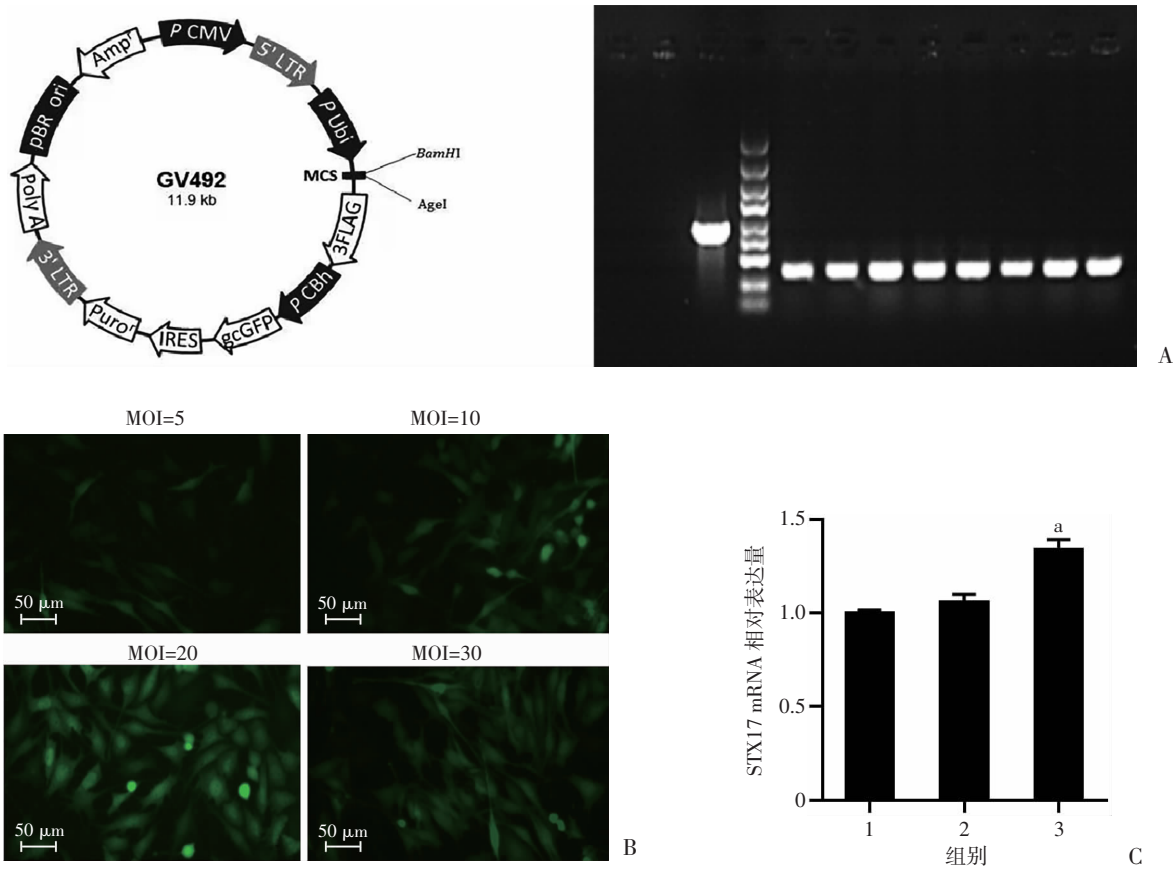
a:$P<0.05$,与对照组比较

A:Western blot 检测小鼠海马组织中 LC3Ⅱ、P62 蛋白表达及半定量分析;B:Western blot 检测 HT22 海马细胞中 LC3Ⅱ、P62 蛋白表达及半定量分析

图 4 Aβ31-35 诱导小鼠海马组织和 HT22 细胞中 LC3、P62 蛋白表达升高($n=6,\bar{x}\pm s$)

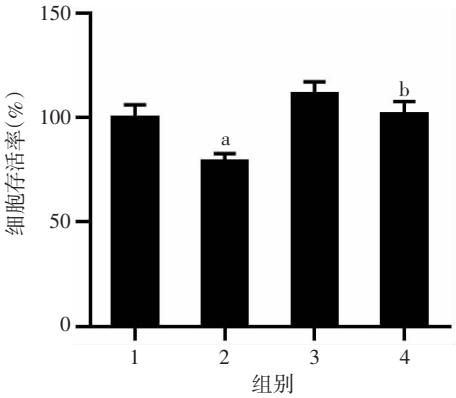
2.5 过表达 STX17 逆转 Aβ31-35 诱导的 HT22 海马神经细胞存活率降低

上海吉凯公司协助构建慢过表达 STX17 病毒载体(OE STX17,图 5A),设置 MOI 值,在倒置荧光显微镜下观察细胞感染情况,结果显示 MOI=20 时荧光强度较高(图 5B),故选用 MOI=20 用于后续实验;与对照组比较,慢病毒 OE STX17 感染使 HT22 海马神经细胞 STX17 mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$,图 5C)。STX17 过表达的 HT22 海马神经细胞存活率为(101.91±13.81)%,较 Aβ31-35 处理组(79.21±8.75)%显著上升($P<0.05$,图 6),说明过表达 STX17 可以逆转 Aβ 诱导的 HT22 海马神经细胞存活率降低。



A:上海吉凯公司提供的构建过表达慢病毒载体;B:MOI 为 5、10、20、30 的 GFP 荧光图;C:RT-PCR 检测 LV-OE STX17 mRNA 表达情况 1:Control;2:LV-NC 组; 3:LV-OESTX17;a:$P<0.05$,与 Control 和 LV-NC 组比较

图 5 OE STX17 感染使 HT22 海马神经细胞 STX17 mRNA 表达水平显著升高($n=6$, $\bar{x}\pm s$)



1:LV-NC 组;2:LV-NC+Aβ31-35 组;3:LV-OE STX17 组;4:LV-OE STX17+Aβ31-35 组;a:$P<0.05$,与 LV-NC 组比较,b:$P<0.05$,与 LV-NC+Aβ31-35 组比较

图 6 过表达 STX17 逆转了 Aβ31-35 诱导的 HT22 海马神经细胞存活率降低($n=6$,$\bar{x}\pm s$)

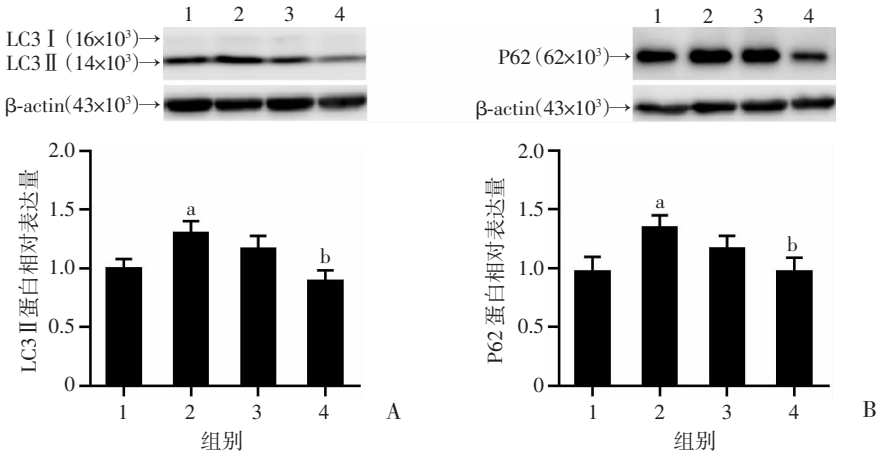
2.6 过表达 STX17 逆转 Aβ31-35 诱导的 HT22 海马神经细胞 LC3Ⅱ和 P62 蛋白升高

慢病毒感染 HT22 海马神经细胞过表达 STX17 后,LC3 Ⅱ 蛋白表达(0.89±0.23)较 Aβ31-35 处理组(1.30±0.25)显著降低($P<0.05$,图 7A),P62 蛋白表达(0.97±0.29)较 Aβ31-35 处理组(1.34±0.26)显著降低($P<0.05$,图 7B),表明过表达 STX17 后拮抗了 Aβ31-35 诱导的小鼠海马神经细胞 LC3 Ⅱ 和 P62 蛋白表达升高。

3 讨论

本研究通过生物信息学发现 AD 患者海马组织中 STX17 表达水平异常,Aβ31-35 导致小鼠海马神经细胞存活率下降,诱导了 STX17 蛋白表达下降和自噬相关蛋白 LC3Ⅱ、P62 表达升高,使用慢病毒感染 HT22 海马神经细胞来过表达 STX17 后,改善了 Aβ31-35 诱导的海马神经细胞存活率降低和逆转了 LC3Ⅱ、P62 蛋白表达升高。

AD 发病机制不清,目前有多种学说[10],例如 Aβ 毒性学说、Tau 蛋白过度磷酸化学说、氧化应激学说、炎症学说和胆碱能损伤学说等[11],进一步揭示 AD 发病机制和寻找潜在干预靶点尤为重要。研究发现,AD



1:LV-NC 组;2:LV-NC+Aβ31-35 组;3:LV-OE STX17 组;4:LV-OE STX17+Aβ31-35 组;a:$P<0.05$,与 LV-NC 组比较,b:$P<0.05$,与 LV-NC+Aβ31-35 组比较

A:Western blot 检测 LC3Ⅱ蛋白表达及半定量分析;B:Western blot 检测 P62 蛋白表达及半定量分析

图 7 STX17 过表达拮抗 Aβ31-35 诱导的海马神经细胞 LC3Ⅱ和 P62 蛋白表达升高($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

发生过程中伴有自噬功能障碍[12],AD 患者以及 AD 小鼠模型大脑皮质和海马神经元内存在大量的自噬泡的异常聚集,提示 AD 过程中存在自噬体和溶酶体融合障碍[13]。在自噬过程中,STX17 可与囊泡相关蛋白 8(VAMP8)、可溶性 NSF 黏附蛋白 29(SNAP29)形成 SNARE 复合体共同介导自噬小体与溶酶体的融合,且有研究表明 AD 患者死后脑样本中 SNARE 复合体水平降低[14],提示 SNARE 蛋白复合体与 AD 的发生或发展相关。本研究采用 WGCNA 分析 GSE 111737 数据集获得 40 个与 AD 临床特征相关的模块,其中以 salmon 和 black 模块的相关性最为显著,而后将自噬基因库和 SNARE 家族基因与 salmon 模块和 black 模块中的基因取交集,最终得到 1 个 AD 发病关键基因——STX17 基因。

STX17 蛋白是自噬体和溶酶体融合的关键蛋白,主要位于内质网和细胞质。STX17 蛋白具有特殊的发夹结构,有助于其向自噬体转移[15],转位到自噬体的 STX17,募集细胞质中 SNAP29 与 VAMP8 并结合形成 STX17-VAMP8-SNAP29 复合物,介导自噬体与溶酶体的融合。当自噬体和溶酶体融合发生障碍时就会导致自噬流受阻,进而导致细胞内损伤的细胞器和异常蛋白质聚集。通常,评价自噬功能状态主要有 2 个指标,分别是 LC3 和 P62。LC3 是自噬小体膜上特征性标记,自噬形成时,胞浆型 LC3(即 LC3-Ⅰ)会酶解掉一小段多肽,转变为膜型(即 LC3-Ⅱ),LC3-Ⅱ/Ⅰ比值的大小可在一定程度上评估自噬水平的高低。因此,LC3 蛋白的表达高低在某种程度上可以反映自噬小体形成的活跃程度[16]。P62 作为自噬选择性底物,在自噬功能正常即自噬流通畅的情况可以被降解,当 LC3 蛋白升高,P62 蛋白水平也升高的情况下提示自噬流受阻,反之,当 P62 蛋白水平降低时提示自噬流通畅,自噬功能正常[17]。STX17 的耗竭阻断了 STX17-VAMP8-SNAP29 复合物的形成,并损害了溶酶体和自噬体的融合,导致自噬体的积累[18],自噬流受阻,进而导致自噬标记物 LC3 蛋白和底物 P62 蛋白表达水平升高[19]。研究证实,在 AD 模型小鼠脑内 STX17 蛋白表达明显下调[20]。本研究结果显示,经 Aβ31-35 的处理后,在体和离体水平小鼠海马神经组织和细胞 STX17 蛋白表达均显著下调,自噬标志性蛋白 LC3Ⅱ、P62 表达升高。提示 STX17 蛋白在阿尔茨海默病的发展进程中起重要作用。

本研究进一步证实 STX17 蛋白表达异常是否是神经细胞死亡的重要原因。如前文所述,STX17 蛋白在调控自噬过程中发挥着重要作用。当自噬过程异常时能导致自噬性细胞死亡,一种程序性细胞死亡[21]。研究发现,STX17 可以通过增强自噬通量和减少内质网应激依赖性神经元凋亡来改善缺血/再灌注诱导的神经元损伤[22]。STX17 过表达恢复了自噬通量,并且缓解了柯萨奇病毒 B3 诱导的溶酶体功能障碍,并减少了 HeLa 细胞中柯萨奇病毒 B3 感染诱导的细胞凋亡[23]。本研究采用慢病毒感染 HT22 海马神经细胞来过表达 STX17 基因进行实验,结果显示 LV-OE STX17 后改善了 Aβ31-35 导致的细胞存活率降低。可见,STX17 可以有效逆转 AD 神经细胞死亡,并与细胞自噬功能密切相关,早期合理调控 STX17 蛋白水平对于减少 AD 神经细胞死亡意义重大。

参考文献:

[1] LONG J M, HOLTZMAN D M. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies[J]. Cell, 2019, 179(2): 312-339. DOI:10.1016/j.cell.2019.09.001.

[2] TIWARI S, ATLURI V, KAUSHIK A, *et al*. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics[J]. Int J Nanomed, 2019, 14: 5541-5554. DOI: 10.2147/IJN.S200490.

[3] DI MECO A, CURTIS M E, LAURETTI E, *et al*. Autophagy dysfunction in Alzheimer's disease: mechanistic insights and new therapeutic opportunities[J]. Biol Psychiatry, 2020, 87(9): 797-807. DOI:10.1016/j.biopsych.2019.05.008.

[4] CHEN G F, XU T H, YAN Y, *et al*. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development[J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38(9): 1205-1235. DOI:10.1038/aps.2017.28.

[5] KASTANENKA K V, BUSSIERE T, SHAKERDGE N, *et al*. Immunotherapy with aducanumab restores calcium homeostasis in Tg2576 mice[J]. J Neurosci, 2016, 36(50): 12549-12558. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2080-16.2016.

[6] LUO Y N, ZHOU S Q, HAEIWA H, *et al*. Role of amber extract in protecting SHSY5Y cells against amyloid β1-42-induced neurotoxicity[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 141: 111804. DOI:10.1016/j.biopha.2021.111804.

[7] BREWER G J, HERRERA R A, PHILIPP S, *et al*. Age-related intraneuronal aggregation of amyloid-β in endosomes, mitochondria, autophagosomes, and lysosomes[J]. J Alzheimers Dis, 2020, 73(1): 229-246. DOI: 10.3233/JAD-190835.

[8] YIN Y, LI E, SUN G, *et al*. Effects of DHA on hippocampal autophagy and lysosome function after traumatic brain injury[J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(3): 2454-2470. DOI:10.1007/s12035-017-0504-8.

[9] KATO S, ARASAKI K, TOKUTOMI N, *et al*. Syntaxin 17, an ancient SNARE paralog, plays different and conserved roles in different organisms[J]. J Cell Sci, 2021, 134(22): jcs258699. DOI:10.1242/jcs.258699.

[10] FAN L Y, MAO C Y, HU X C, *et al*. New insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Front Neurol, 2020, 10: 1312. DOI:10.3389/fneur.2019.01312.

[11] GARCÍA-MESA Y, COLIE S, CORPAS R, *et al*. Oxidative stress is a central target for physical exercise neuroprotection against pathological brain aging[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2016, 71(1): 40-49. DOI: 10.1093/gerona/glv005.

[12] ZHANG Z G, YANG X F, SONG Y Q, *et al*. Autophagy in Alzheimer's disease pathogenesis: therapeutic potential and future perspectives[J]. Ageing Res Rev, 2021, 72: 101464. DOI:10.1016/j.arr.2021.101464.

[13] ZHAO Y, ZHANG Y D, ZHANG J, *et al*. Molecular mechanism of autophagy: its role in the therapy of Alzheimer's disease[J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 18(8): 720-739. DOI:10.2174/1570159X18666200114163636.

[14] SHARMA M, BURRÉ J, SÜDHOF T C. Proteasome inhibition alleviates SNARE-dependent neurodegeneration[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(147): 147ra113. DOI:10.1126/scitranslmed.3004028.

[15] ITAKURA E, MIZUSHIMA N. Syntaxin 17: the autophagosomal SNARE[J]. Autophagy, 2013, 9(6): 917-919. DOI:10.4161/auto.24109.

[16] SONG T T, SU H F, YIN W, *et al*. Acetylation modulates LC3 stability and cargo recognition[J]. FEBS Lett, 2019, 593(4): 414-422. DOI:10.1002/1873-3468.13327.

[17] WU Y Y, ZHENG B R, CHEN W Z, *et al*. Expression and role of autophagy related protein p62 and LC3 in the Retina in a rat model of acute ocular hypertension[J]. Int J Ophthalmol, 2020, 13(1): 21-28. DOI: 10.18240/ijo.2020.01.04.

[18] JIA R, GUARDIA C M, PU J, *et al*. BORC coordinates encounter and fusion of lysosomes with autophagosomes[J]. Autophagy, 2017, 13(10): 1648-1663. DOI: 10.1080/15548627.2017.1343768.

[19] ZHANG L, FANG Y, ZHAO X Y, *et al*. BRUCE silencing leads to axonal dystrophy by repressing autophagosome-lysosome fusion in Alzheimer's disease[J]. Transl Psychiatry, 2021, 11(1): 421. DOI: 10.1038/s41398-021-01427-2.

[20] HERRING A, MÜNSTER Y, AKKAYA T, *et al*. Kallikrein-8 inhibition attenuates Alzheimer's disease pathology in mice[J]. Alzheimers Dement, 2016, 12(12): 1273-1287. DOI:10.1016/j.jalz.2016.05.006.

[21] SIQUEIRA M, RIBEIRO R M, TRAVASSOS L H. Autophagy and its interaction with intracellular bacterial pathogens[J]. Front Immunol, 2018, 9: 935. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00935.

[22] CHEN L, XIA Y F, SHEN S F, *et al*. Syntaxin 17 inhibits ischemic neuronal injury by resuming autophagy flux and ameliorating endoplasmic Reticulum stress[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 160: 319-333. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.010.

[23] TIAN L, YANG Y Y, LI C Y, *et al*. The cytotoxicity of coxsackievirus B3 is associated with a blockage of autophagic flux mediated by reduced syntaxin 17 expression[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 242. DOI:10.1038/s41419-018-0271-0.

(收稿:2022-03-14;修回:2022-05-06)

(编辑 汪勤俭)