基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001249

姜黄素通过提高自噬体形成相关蛋白的表达增强 N2a/APP695swe 细胞的自噬作用

康清梅[1]，梁　洁[1]，张　雄[2]，周凡琳[1]，李　丹[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**：全面研究姜黄素（curcumin）对 N2a/APP695swe 细胞自噬作用的影响，进一步探讨姜黄素调节 N2a/APP695swe 细胞自噬的可能机制。**方法**：将细胞分为 4 组：野生型对照组（WT 组）、空白对照组（Control 组）、溶剂对照组（Sham 组）、姜黄素处理组（Curcumin 组，5 μmol/L）。Western blot 分别检测自噬标志性蛋白 LC3Ⅱ和底物蛋白 SQSTM1 的表达，以及 Atg 蛋白 Beclin1、Atg5、Atg7、Atg12、Atg16L1 的表达；免疫荧光法进一步验证 SQSTM1 蛋白的表达。各组分别转染细胞自噬体指示探针（GFP-LC3）和溶酶体红色探针（LysoRed）后，激光共聚焦显微镜观察自噬体和自噬溶酶体的数量检测自噬流。**结果**：Western blot 结果表明，Curcumin 组 LC3Ⅱ蛋白表达量较对照组明显增高（0.59 ± 0.03 vs. 0.11 ± 0.01，*P*=0.000）；同时，Curcumin 组 SQSTM1 蛋白表达量较对照组明显降低（0.19 ± 0.04 vs. 0.66 ± 0.05，*P*=0.000）。免疫荧光实验再次验证了 SQSTM1 蛋白的这个表达趋势。共聚焦显微镜观察发现，与对照组相比，Curcumin 组细胞内自噬体数量增加（154.67 ± 7.37 vs. 89.00 ± 7.21，*P*=0.000），同时自噬溶酶体数量也显著增加（84.67±12.50 vs. 42.33 ± 6.51，*P*=0.000）。Western blot 进一步检测发现，与对照组相比，Curcumin 组 Atg 蛋白 Beclin1、Atg7、Atg16L1 的表达均明显增加（0.55 ± 0.09 vs. 0.10 ± 0.02，*P*=0.000；0.89 ± 0.12 vs. 0.39 ± 0.07，*P*=0.000；0.36 ± 0.07 vs. 0.13 ± 0.02，*P*=0.003），而 Atg5 和 Atg12 改变差异无统计学意义（0.79 ± 0.12 vs. 0.79 ± 0.10，*P*=0.470；0.94 ± 0.13 vs. 0.87 ± 0.16，*P*=0.587）。**结论**：姜黄素增强 N2a/APP695swe 细胞的自噬水平，其机制可能与提高自噬体形成相关蛋白 Beclin1、Atg7、Atg16L1 的表达有关。

【关键词】姜黄素；自噬；阿尔茨海默病；Beclin1；Atg7；Atg16L1
【中国分类号】R741.02　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-11-17

Curcumin improves autophagy in N2a/APP695swe cells via elevating the expressions of Atg proteins

Kang Qingmei[1], Liang Jie[1], Zhang Xiong[2], Zhou Fanlin[1], Li Dan[1], Gao Minna[1], Li Yu[1]
(1. Teaching and Research Section of Pathology, College of Basic Medicine;
2. Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To explore the effects of curcumin on autophagy of N2a/APP695swe cells and the underlying mechanisms. ***Methods***: The N2a/WT and N2a/APP695swe cells were involved, and were divided into four groups: wild type (WT) group, control group, sham group and curcumin group (5 μmol/L). Western blot was carried out to detect the expressions of LC3Ⅱ, SQSTM1, and the autophagy-related genes (Atg) including Beclin1, Atg5, Atg7, Atg12, and Atg16L1 proteins. Immunofluorescence was used to test the expression of SQSTM1 protein, too. After transfection of pSELECT-GFP-LC3 and LysoRed into the cells of four groups, respectively, confocal microscope was performed to observe the difference of the number of autophagosomes and autolysosomes in each group. ***Results***: Western blot demonstrated that compared with those of control group, the expressions of LC3Ⅱ protein were significantly increased in curcumin group (0.59 ± 0.03 vs. 0.11 ± 0.01, *P*=0.000). But the expression of SQSTM1 protein was attenuated in curcumin group than that in control group, simultaneously (0.19 ± 0.04 vs. 0.66 ± 0.05, *P*=0.000). And immunofluorescence also verified this trend of SQSTM1 protein. Then confocal microscope showed that the number of autophagosomes and the quantity of autolysosomes were improved in curcumin group, compared with those in control group (154.67 ± 7.37 vs. 89.00 ± 7.21, *P*=0.000; 84.67 ± 12.50 vs. 42.33 ± 6.51, *P*=0.000). At last, Western blot further found that the expressions of Beclin1, Atg7, and Atg16L1 at protein levels were increased in curcumin group when compared with those of control group (0.55 ± 0.09 vs. 0.10 ± 0.02, *P*=0.000; 0.89 ± 0.12 vs. 0.39 ± 0.07, *P*=0.000; 0.36 ± 0.07 vs. 0.13 ± 0.02, *P*=0.003). However, there was no significant difference in the two

作者介绍：康清梅，Email：694679011@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.20170426.1820.052.html（2017-04-26）

groups at the levels of Atg5 and Atg12 proteins(0.79 ± 0.12 vs. 0.79 ± 0.10, P=0.470; 0.94 ± 0.13 vs. 0.87 ± 0.16, P=0.587). ***Conclusion***: Curcumin plays a key role in elevating autophagy in N2a/APP695swe cells and the potential mechanisms is associated with Atg proteins including Beclin1, Atg7, and Atg16L1.

【Key words】curcumin; autophagy; Alzheimer's disease; Beclin1; Atg7; Atg16L1

自噬是真核细胞内普遍存在的一种非常重要的代谢途径，对维持细胞内环境的稳定起着重要的作用。在自噬存在的 3 种途径（巨自噬、微自噬及分子伴侣介导的自噬）中，巨自噬（即通常所说的自噬，以下简称自噬）是最主要的途径，也是研究最广泛的途径。在这一过程中，细胞质内首先产生游离的杯状形双层膜结构，称为前自噬泡（吞噬泡）；随后，前自噬泡继续延伸闭合，同时包裹需要降解的物质，进而发展形成自噬体；最后，自噬体与溶酶体正常结合，通过溶酶体的酸性环境，降解其内包裹的异常折叠的蛋白质、功能异常的细胞器等，从而对细胞起到保护作用[1]。自噬体从产生到降解是一个动态的过程，也叫“自噬流”，在这一过程中，许多自噬相关基因（autophagy-related genes, ATG）参与其中。Beclin1（也称 BECN1，酵母 ATG6 的同系物）是早期吞噬泡形成的一个重要因子，诱导自噬的发生[2]。此外，Atg5、Atg7、Atg12 及 Atg16L1 对于前自噬泡的延伸及闭合起着重要的作用[2]。微管相关蛋白轻链 3（microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3，酵母 ATG8 的基因同源物）的存在有 2 种形式，即广泛分布于细胞质的 LC3 Ⅰ与定位于自噬体膜上的 LC3 Ⅱ。研究表明，LC3 Ⅱ的存在贯穿于整个自噬流的过程中，不仅能出现在早期吞噬泡膜表面，还能定位于自噬体及晚期自噬溶酶体膜上，因此被作为自噬体的特异性标记蛋白[3-4]。自噬的功能紊乱与肿瘤、神经退行性疾病、感染、衰老等多种疾病密切相关[5]。近年来，越来越多的证据表明，在神经退行性疾病中，自噬一方面能够对细胞起到保护作用，另一方面如果自噬体不能顺利降解，其过度堆积则会形成自噬应激，导致神经细胞最终发生自噬性死亡[6-7]。因此，自噬流的通畅显得尤为重要。重组人死骨片 1（sequestosome 1, SQSTM1）/P62 是一种偶联于微管相关蛋白 3 的蛋白，参与自噬体的构成，并在自噬的中、晚期被降解[8]，故 SQSTM1 的表达水平可间接反映自噬流的情况。

姜黄素（curcumin）是从姜科植物根茎中提取的一种二酮类化合物，具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化等作用[9]，其毒副作用低，临床应用前景广阔。有学者发现，在神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 中，姜黄素能够通过增强 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ调节自噬，降低百草枯诱导的细胞死亡[10]。本课题组前期研究也发现，在经姜黄素喂养 6 个月的阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）动物模型——APP/PS1 双转基因小鼠的海马 CA1 区，电镜观察其自噬体数量增多，同时，免疫荧光和 Western blot 实验也发现 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ的比值明显增加，提示自噬活性增强[11]。然而，在 AD 中，姜黄素对于自噬的影响，目前尚缺乏完整的动态研究，其机制也有待进一步探讨。本实验拟纳入 N2a/WT 及 N2a/APP695swe 细胞作为模型，观察姜黄素是否促进 N2a/APP695swe 细胞的自噬及自噬流作用，进一步探讨其发挥作用的机制，为 AD 的研究和防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

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）细胞均由厦门大学许华曦教授提供。姜黄素购自 Sigma 公司；OPTI-MEM、DMEM 培养基均购自 Gibco 公司；胎牛血清（FBS）购自 Hyclone 公司；G418 购自 Amresco 公司；青霉素-链霉素溶液（100 ×）、Western blot 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司；细胞自噬指示探针、溶酶体红色荧光探针 LysoRed 购自凯基生物公司；即用型正常山羊血清购自博士德生物公司；鼠单抗 β-actin、兔多抗 LC3、兔单抗 SQSTM1、兔多抗 Atg12、兔多抗 Beclin1 抗体分别购自北京四正柏生物科技公司、Sigma 公司、CST 公司、万类生物科技公司、美国 SANTA CRUZ 公司；鼠单抗 Atg5、兔多抗 Atg7、兔多抗 Atg16L1 抗体均购自 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 将冻存的 N2a/WT 和 N2a/APP695swe 细胞 37 ℃复苏至培养瓶中，用体积分数为 47%DMEM、47% OPTI-MEM、5%FBS 和 1%青链霉素双抗组成的混合培养液（N2a/WT 细胞培养液）和 47%DMEM、47%OPTI-MEM、5%FBS、1%青链霉素双抗和 200 μg/mL G418 组成的混合培养液（N2a/APP695swe 细胞培养液），置于 37 ℃、5%CO_2 的培养箱中培养，取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 免疫荧光标记 SQSTM1 的表达 取对数生长期的 N2a/WT 和 N2a/APP695swe 细胞，分别接种于内含消毒灭菌

后的 24 孔板专用爬片上（5×10⁴ 个/孔）。24 h 后随机选取 1/3 的 N2a/APP695swe 细胞进行姜黄素（5 μmol/L）处理 24 h；选取 1/3 的 N2a/APP695swe 细胞进行 DMSO 溶液（5 μmol/L）处理 24 h。处理完毕后，收集 4 组细胞爬片，用 0.01 mol/L PBS 清洗 3 次×2 min，4%多聚甲醛固定 20 min，0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次×5 min，即用型正常山羊血清中封闭 37 ℃、30 min。封闭完成后，兔单克隆抗体 SQSTM1（1:100）4 ℃孵育过夜。0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次×5 min，使用荧光标记（Alexa Fluor® 488）山羊抗兔二抗（1:400）室温孵育 1 h。随后，0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次×5 min，DAPI 染色液染核 5 min，0.01 mol/L PBS 漂洗 5 次×5 min，抗荧光淬灭封片剂封片，激光共聚焦显微镜下拍照。实验重复 3 次。

1.2.3 激光共聚焦显微镜观察自噬体及自噬溶酶体数量 取对数生长期的 N2a/WT 和 N2a/APP695swe 细胞，分别接种于内含消毒灭菌后的 24 孔板专用爬片上（5×10⁴ 个/孔）。待细胞汇合度达到 50%~60%，分别转染 pSELECT-GFP-LC3 细胞自噬指示探针（1 μg/test，使用 Lipofectamine 2000 转染试剂）6 h，换正常培养液继续培养，随机选取 1/3 的 N2a/APP695swe 细胞，姜黄素（5 μmol/L）处理 24 h，选取 1/3 的 N2a/APP695swe 细胞 DMSO 溶液（5 μmol/L）处理 24 h。转染溶酶体红色荧光探针 LysoRed（1 μmol/L）30 min，用 0.01 mol/L PBS 清洗 3 次×2 min，4%多聚甲醛固定 20 min。用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次×5 min，DAPI 染色液染核 5 min，0.01 mol/L PBS 漂洗 5 次×5 min，抗荧光淬灭封片剂封片，激光共聚焦显微镜下拍照。实验重复 3 次。每次实验中每组随机选取 10 个细胞进行统计计数。

1.2.4 Western blot 检测 LC3II、SQSTM1 及 Atg 蛋白的表达 取对数生长期的 N2a/WT 和 N2a/APP695swe 细胞进行培养，随机选取 N2a/APP695swe 细胞的 1/3 进行姜黄素（5 μmol/L）处理 24 h，1/3 进行 DMSO 溶液（5 μmol/L）处理 24 h 后，用全蛋白提取试剂盒分别提取各组细胞蛋白。BCA 法测定细胞浓度后，蛋白免疫印迹实验（Western blot）分别测定 LC3II、SQSTM1、Beclin1、Atg5、Atg7、Atg12、Atg16L1 的蛋白表达水平。选用 Image J 软件分析各组上述蛋白及内参（β-actin）的灰度值，相应蛋白表达水平用其与 β-actin 的比值表示。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 进行统计学分析，所有数据均以均数±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 α=0.05。

2 结 果

2.1 姜黄素增高 N2a/APP695swe 细胞中 LC3Ⅱ的表达，同时降低 SQSTM1 的表达

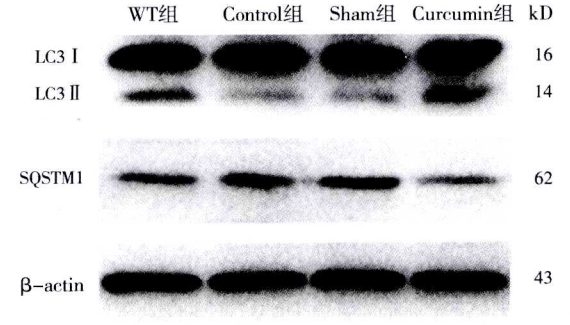
姜黄素处理细胞 24 h 后，LC3Ⅱ及 SQSTM1 的蛋白水平发生变化（表 1，图 1）。如图 1 A 所示，与 Control 组相比，Curcumin 组和 WT 组 LC3Ⅱ的蛋白表达明显增高，差异有统计学意义（P=0.000、P=0.000），Sham 组差异无统计学意义（P=0.669）。为了检测自噬流是否通畅，同时运用免疫荧光和 Western blot 技术检测各组中 SQSTM1 蛋白的表达。Western blot 结果显示，与 Control 组相比，姜黄素具有明显降低细胞模型中 SQSTM1 蛋白表达的作用（P=0.000），与 WT组效果相似（P=0.000），而 Sham 组 SQSTM1 蛋白的表达则无明显差异（P=0.715）。激光共聚焦显微镜观察各组中 SQSTM1蛋白的表达得到与之相似的结果，如图 1B 可见，SQSTM1 蛋白表达于细胞质，细胞核中未见表达，与 Control 组相比，Curcumin 组与 WT 组荧光强度明显降低，Sham 组无明显变化。

表 1 各组 LC3Ⅱ和 SQSTM1 的蛋白表达水平（n=3）

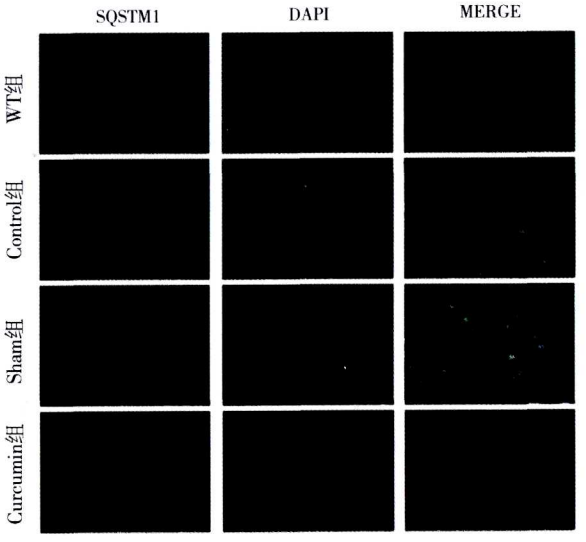
Tab.1 Expressions of LC3Ⅱ and SQSTM1 in each group（n=3）

组别	LC3Ⅱ	SQSTM1
WT组	0.268±0.053[a]	0.386±0.019[a]
Control组	0.112±0.011	0.664±0.050
Sham组	0.123±0.010[b]	0.650±0.064[b]
Curcumin组	0.592±0.031[a]	0.193±0.037[a]
F 值	151.614	74.240
P 值	0.000	0.000

注：a，与 Control 组比较，P<0.01；b：与 Control 组比较，P>0.05



A. Western blot 检测各组 LC3Ⅱ、SQSTM1 蛋白的表达



B. 激光共聚焦显微镜观察各组 SQSTM1 蛋白水平的表达

图 1 LC3Ⅱ和 SQSTM1 蛋白在不同处理组的表达水平（400×）

Fig.1 Expressions of LC3Ⅱ and SQSTM1 proteins in different groups（400×）

2.2 姜黄素增加 N2a/APP695swe 细胞中自噬体及自噬溶酶体的数量

姜黄素也可以改变细胞中自噬体及自噬溶酶体的数量（表 2，图 2）。如图 2 所示，绿色小点代表自噬体，红色小点代表溶酶体，黄色小点代表自噬溶酶体。各组中随机选取 10 个细胞进行计数，Control 组中绿色自噬体小点数为（89.000 ± 7.211）个，黄色自噬溶酶体小点数为（42.333 ± 6.506）个；Sham 组绿色自噬体小点数为（86.333 ± 10.408）个，黄色自噬溶酶体小点数为（39.333 ± 8.505）个，与 Control 组相比较，均无明显统计学差异（P=0.727、P=0.693）；与 Control 组相比，Curcumin 组中绿色自噬体小点数[（154.667 ± 7.371）个]与黄色自噬溶酶体小点数[（84.667 ± 12.503）个]均明显升高，差异均有统计学意义（P=0.000、P=0.000）；WT 组绿色自噬体小点数为（141.333 ± 10.599）个，黄色自噬溶酶体数为（85.333 ± 7.095）个，与 Control 组相比较，差异均有明显统计学差异（P=0.000、P=0.000）。

表 2 各组自噬体和自噬溶酶体数量（n=3）

Tab.2 Number of autophagosomes and autolysosomes in each group（n=3）

组别	自噬体数量（10 个细胞）	自噬溶酶体数量（10 个细胞）
WT组	141.333 ± 10.599[a]	85.333 ± 7.095[a]
Control组	89.000 ± 7.211	42.333 ± 6.506
Sham组	86.333 ± 10.408[b]	39.333 ± 8.505[b]
Curcumin组	154.667 ± 7.371[a]	84.667 ± 12.503[a]
F 值	45.658	24.341
P 值	0.000	0.000

注：a，与 Control 组比较，P<0.01；b：与 Control 组比较，P>0.05

2.3 姜黄素提高 Atg 蛋白 Beclin1、Atg7、Atg16L1 的表达

姜黄素可以提高 Atg 蛋白 Beclin1、Atg7、Atg16L1 的表达，对 Atg5 和 Atg12 蛋白水平的表达则无明显作用（表 3，图 3）。如图 3A 所示，Control 组细胞中 Beclin1、Atg7、Atg16L1 蛋白均有少量表达；与 Control 组相比，Sham 组细胞中 Beclin1、Atg7、Atg16L1 蛋白的表达量均无明显差异（P=0.744、P=0.906、P=0.976）；Curcumin 组较 Control 组细胞中 Beclin1、Atg7、Atg16L1 三种蛋白的表达量均明显升高，差异有统计学意义（P=0.000、P=0.000、P=0.003）；WT 组与 Control 组相比，细胞中 Beclin1 和 Atg16L1 的表达量明显增加，差异有统计学意义（P=0.000、P=0.000），而 Atg7 蛋白的表达量则无明显变化，差异无统计学意义（P=0.884）。然而，如图 3B 所示，Control 组细胞中 Atg5、Atg12 蛋白均有明显表达；与 Control 组相比，Sham 组 Atg5、Atg12 蛋白的表达无明显差异，无统计学意义（P=0.803、P=0.476）；Curcumin 组与 Control 组相比，Atg5、Atg12 蛋白的表达差异无统计学意义（P=0.470、P=0.587）；WT 组与 Control 组相比，Atg5、Atg12 蛋白的表达差异也无统计学意义（P=0.451、P=0.753）。

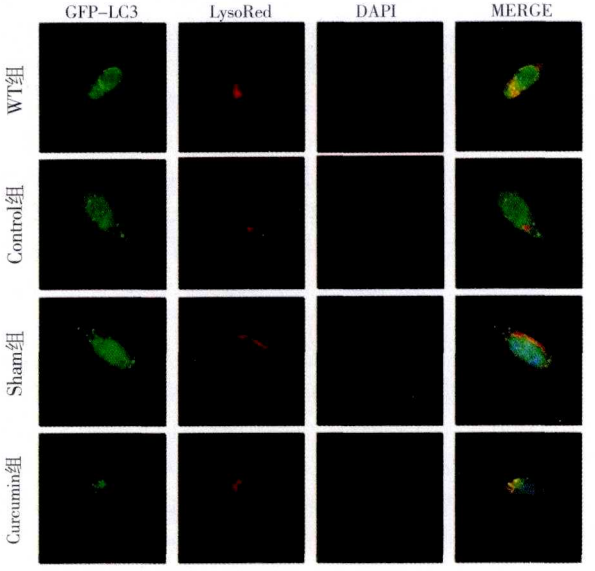


图 2 激光共聚焦显微镜观察不同处理组的自噬体及自噬溶酶体数量（800×）

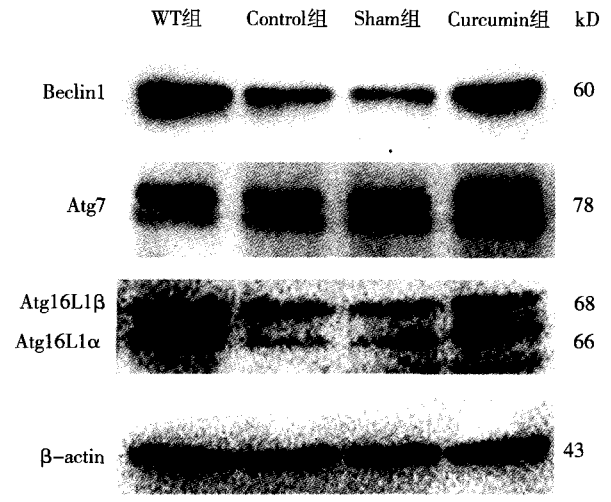
Fig.2 Number of autophagosome and autolysosome in different groups observed by confocal microscope（800×）

表 3 各组 Beclin1、Atg7、Atg16L1、Atg5 和 Atg12 蛋白表达水平（n=3）

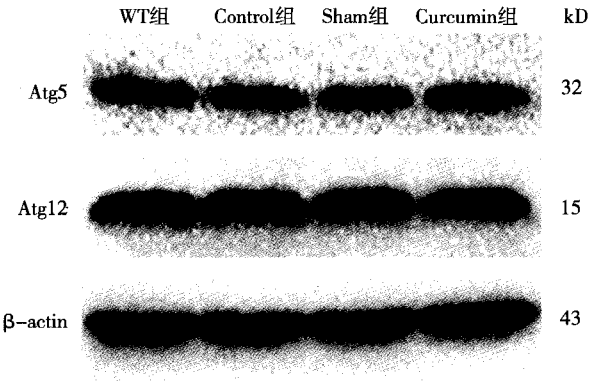
Tab.3 Expressions of Beclin1, Atg7, Atg16L1, Atg5 and Atg12 in each group（n=3）

组别	Beclin1	Atg7	Atg16L1	Atg5	Atg12
WT组	0.73 ± 0.06[a]	0.41 ± 0.09[b]	0.60 ± 0.11[a]	0.79 ± 0.10[b]	0.91 ± 0.15[b]
Control组	0.10 ± 0.02	0.39 ± 0.07	0.13 ± 0.02	0.73 ± 0.07[b]	0.87 ± 0.16[b]
Sham组	0.08 ± 0.00[b]	0.40 ± 0.06[b]	0.13 ± 0.02[b]	0.75 ± 0.06[b]	0.96 ± 0.13[b]
Curcumin组	0.55 ± 0.09[a]	0.89 ± 0.12[a]	0.36 ± 0.07[a]	0.79 ± 0.12[b]	0.94 ± 0.13[b]
F 值	97.416	23.356	33.520	0.301	0.210
P 值	0.000	0.000	0.000	0.824	0.887

注：a，与 Control 组比较，P<0.01；b：与 Control 组比较，P>0.05



A. Western blot 检测各组间 Beclin1、Atg7、Atg16L1 蛋白的表达



B. Western blot 检测各组间 Atg5、Atg12 蛋白的表达

图 3 Beclin1、Atg7、Atg16L1、Atg5 及 Atg12 在不同处理组的表达水平

Fig.3 Expressions ofBeclin1, Atg7, Atg16L1, Atg5 and Atg12 at the level of protein in different groups

3 讨 论

AD是一种以记忆力降低，认知功能障碍以及神经精神系统症状为主要表现的神经退行性疾病，是痴呆的主要类型，随着人口的老龄化加重，AD 已成为威胁人类健康的主要疾病之一。AD 的发病机制目前存在很多假说，其中以“Aβ 级联假说”与“Tau 蛋白学说”为主，得到学术界广泛的认可，老年斑中的主要沉积物 Aβ 以及神经纤维缠结的主要组成物异常磷酸化的 Tau 蛋白成为近年来的研究靶点。自噬作为主要的蛋白质降解途径，在清除异常磷酸化的 Tau 蛋白以及影响 Aβ 代谢中都起到重要的作用[12]。Han 等研究发现，在缺氧的条件下，姜黄素可以通过增强自噬对血管内皮细胞起到保护作用[13]。在神经退行性疾病的体外研究中，Jaroonwitchawan等[10]发现，姜黄素可以增强自噬，降低百草枯诱导的 SH-SY5Y 凋亡，减少 APP 的产生。本课题组前期研究也表明，姜黄素可以促进 APP/PS1 双转基因小鼠大脑的海马 CA1 区发生自噬[11]。然而，在 N2a/APP695swe 细胞中，姜黄素是否仍然可以提高其自噬作用目前仍未见报道。本实验将 N2a/APP695swe 细胞作为 AD 的细胞模型，前期研究发现，经姜黄素以 5 μmol/L 浓度处理 24 h 后，细胞的存活率最高[14]。因此，本研究以姜黄素 5 μmol/L 浓度处理 N2a/APP695swe 细胞 24 h 后，提取细胞总蛋白检测相关指标。LC3 Ⅱ作为自噬体的特异标志性蛋白，在自噬激活时，胞质中的 LC3 Ⅰ在泛素样反应酶的作用下，生成定位于自噬体内外膜的 LC3 Ⅱ。与之前研究不同的是，2016 年自噬指南中以 LC3 Ⅱ/actin 替代 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ，作为目前自噬研究的关键指标[3]。本实验中 Western blot 检测自噬的标志性蛋白 LC3 Ⅱ发现，经姜黄素处理后的细胞中，LC3 Ⅱ蛋白的表达量明显增加，差异有统计学意义。共聚焦显微镜观察也发现，经姜黄素处理后，细胞自噬体数量明显增多，差异有统计学意义。以上结果提示姜黄素可以促进 N2a/APP695swe 细胞中自噬的发生。

然而，自噬作为一把“双刃剑”，如果自噬体能顺利与溶酶体结合，通过正常途径代谢，则发挥保护作用；反之，若自噬体过度增加，又不能与溶酶体正常结合，造成自噬体堆积，则会引起细胞自噬性死亡。因此，自噬体的增多、自噬现象的增强并不能说明其发挥的是积极的作用，还有待检测自噬流是否通畅。在 AD 的研究中，虽然 Wang 等[11]及 Jaroonwitchawan 等[10]已经分别从在体及体外实验证明了姜黄素对自噬的促进作用，但均只检测了 LC3 Ⅱ蛋白的表达上升，以及自噬体数量的增加，对自噬过程的动态研究尚不完善，自噬体产生后是否与溶酶体融合使其包裹的物质顺利降解并不清楚。本实验中，通过增加自噬底物蛋白 SQSTM1 的表达与自噬溶酶体数量的检测，更加全面地反映了自噬流的情况。Western blot 与免疫荧光结果均表明，经姜黄素处理后的细胞，SQSTM1 蛋白的表达量明显下降，差异有统计学意义，表明自噬过程多处于中后期阶段。同时，共聚焦显微镜也观察到，姜黄素处理后，细胞中自噬溶酶体的数量明显增加，自噬流通畅。以上结果表明，姜黄素不仅能增强 N2a/APP695swe 细胞中的自噬作用，且能促进自噬流的过程，对 N2a/APP695swe 细胞起到保护作用。

在自噬体形成的过程中，需要许多 Atg 蛋白的参与，研究已经证实，在哺乳动物细胞中，上调 Beclin1 的表达能够诱导自噬的发生[15]。此外，由 Atg5、Atg7、Atg12 及 Atg16L1 参与组成的 Atg12-结合过程和由 LC3、Atg3、Atg4、Atg7 参与组成的 LC3 修饰过程 2 条泛素样蛋白加工修饰过程在自噬体的形成中起着重要的作用[16]。E1 样酶的 Atg7 可活化 Atg12，启动 Atg12-结合过程，使之与其他因子相互作用、结合，最终形成 Atg12-Atg5-Atg16L1 复合物。在自噬体形成的早期阶段，此复合物与前自噬泡的外膜结合，促进前自噬泡的伸展、延伸以及闭合。同时，Atg7 还可促进 LC3 Ⅰ到 LC3 Ⅱ的修饰[17]，对自噬过程的发展起着关键的作用。研究者发现，如果缺乏一些关键的自噬相关因子，如 Atg5 和 Atg7，则前自噬泡及自噬体均不能形成，实验动物中将不会发生自噬现象[18-19]。另有研究表明，姜黄素可以通过增强 Atg 蛋白中的 Atg7 和 Beclin1 的表达促进自噬，对血管内皮细胞起到保护作用[13]。我们前期研究也发现，姜黄素可以促进 AD 模型鼠海马 CA1 区 Beclin1 的表达增加[11]。但到目前为止，在 AD 中，姜黄素是否可以促进其他早期 Atg 蛋白的表达尚未见报道。本实验运用 Western blot 分别检测 Beclin1、Atg5、Atg7、Atg12、Atg16L1 蛋白水平的表达，结果发现姜黄素可以明显增强 Beclin1、Atg7、Atg16L1 蛋白水平的表达，差异具有统计学意义。且在 4 个组中，只有姜黄素处理组 Atg7 的表达明显增加，WT 组并未见明显变化，可见姜黄素通过提高 Atg7 的表达促进 N2a/APP695swe 细胞中自噬的发生具有重要的意义。然而，本研究也发现，经姜黄素处理后的细胞，Atg5 和 Atg12 的表达并未见明显变化，由此推测，姜黄素诱导 N2a/APP695swe 细胞中自噬的产生可能不是主要通过促进 Atg12-结合过程产生的。

综上，本实验表明姜黄素可以通过增强 Atg 蛋白中 Beclin1、Atg7、Atg16L1 蛋白水平的表达促进 N2a/APP695swe 细胞中自噬的发生。这对深入探讨姜黄素在 AD 中发挥保护作用的机制具有重要意义。进一步探讨 Beclin1、Atg7、Atg16L1 有关的信号通路，可以对姜黄素在 AD 中发挥神经保护作用的分子机制有更加深入的了解。

参 考 文 献

[1] Shibutani ST, Yoshimori T. A current perspective of autophagosome biogenesis[J]. Cell Res, 2014, 24(1): 58-68.

[2] Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation[J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 124-131.

[3] 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.

[4] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. EMBO J, 2000, 19(21): 5720-5728.

[5] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature, 2008, 451(7182): 1069-1075.

[6] Loos B, du Toit A, Hofmeyr JH. Defining and measuring autophagosome flux-concept and reality[J]. Autophagy, 2014, 10(11): 2087-2096.

[7] Loos B, Engelbrecht AM, Lockshin RA, et al. The variability of autophagy and cell death susceptibility: unanswered questions[J]. Autophagy, 2013, 9(9): 1270-1285.

[8] Kirkin V, McEwan DG, Novak I, et al. A role for ubiquitin in selective autophagy[J]. Mol Cell, 2009, 34(3): 259-269.

[9] Venigalla M, Gyengesi E, Munch G. Curcumin and Apigenin-novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. Neural Regen Res, 2015, 10(8): 1181-1185.

[10] Jaroonwitchawan T, Chaicharoenaudomrung 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.

[11] 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.

[12] 高 雅，邢皓月. 自噬在神经退行性疾病中的作用研究进展[J]. 中国科技信息，2013，24(11)：169-170.

[13] 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.

[14] 许 可，向 月，孙洁芸，等. 姜黄素影响 N2a/ APP695swe 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.

[15] Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1[J]. Nature, 1999, 402(6762): 672-676.

[16] Ward C, Martinez-Lopez N, Otten EG, et al. Autophagy, lipophagy and lysosomal lipid storage disorders[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1861(4): 269-284.

[17] Nemoto T, Tanida I, Tanida-Miyake E, et al. The mouse APG10 homologue, an E2 -like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification[J]. J Biol Chem, 2003, 278(41): 39517-39526.

[18] Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, et al. Dissection of autophagosome formation using Apg5 -deficient mouse embryonic stem cells[J]. J Cell Biol, 2001, 152(4): 657-668.

[19] Komatsu M, Waguri S, Ueno T, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice[J]. J Cell Biol, 2005, 169(3): 425-434.

（责任编辑：冉明会）