

# EGFP-LC3稳定细胞系的建立及对A $\beta$ 自噬效应的研究

房芳 张莹\* 彭向雷 王荷 张钊 郑妍鹏

(北京交通大学理学院生命科学与生物工程研究院, 北京 100044)

**摘要** 该文建立了稳定表达EGFP-LC3的HEK293细胞系, 以10  $\mu\text{mol/L}$ 的A $\beta$ 肽及其不同疏水性氨基酸含量的截短形式处理细胞24 h, 计数LC3的荧光斑点数; Western blot检测LC3B表达量的变化; MTT检测特定A $\beta$ 诱导细胞自噬后对细胞活性的差异; 用透射电镜确认自噬体的细胞超微结构。结果显示, G418(700  $\mu\text{g/mL}$ )筛选6周后, 建立了稳定表达EGFP-LC3的HEK293细胞系; A $\beta$ 25-35、A $\beta$ 40和A $\beta$ 42诱导细胞内LC3荧光斑点的效果较明显; Western blot结果显示LC3B的酯化, 即LC3BI向LC3BII转变; MTT检测发现, 与A $\beta$ 40相比, A $\beta$ 42处理后伴随自噬的细胞毒性更强; 电镜可以见到A $\beta$ 诱导的自噬小体。提示, A $\beta$ 肽及其截短的疏水性片段均可诱导自噬, 且诱导自噬的效果与疏水性氨基酸含量无关; 同时, A $\beta$ 42细胞损伤强于A $\beta$ 40。该研究为进一步探讨AD自噬机制提供了实验基础。

**关键词**  $\beta$ -淀粉样肽(A $\beta$ ); 自噬; 阿尔茨海默病(AD); 微管相关蛋白轻链3(MAPLC3, LC3); 自噬小体

## Establishment of EGFP-LC3-HEK293 Stable Cell Line and the Role in A $\beta$ -induced Autophagy

Fang Fang, Zhang Ying\*, Peng Xianglei, Wang He, Zhang Zhao, Zheng Yanpeng

(College of Life Science and Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China)

**Abstract** In this study, an EGFP-LC3-HEK293 stable cell line has been established. The cells were incubated with 10  $\mu\text{mol/L}$  of A $\beta$  and the truncated peptides with various percentages of hydrophobic amino acids (A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, A $\beta$ 1-11, A $\beta$ 12-24, A $\beta$ 25-35 and A $\beta$ 35-42) for 24 h. The expression of LC3 was detected by fluorescence microscopy and Western blot, cell viability was measured via MTT assays and the ultrastructural morphology was studied by transmission electron microscopy (TEM). As a result, the best concentration of G418 was 700  $\mu\text{g/mL}$  for EGFP-LC3 stable clone screen. The quantitative immunofluorescence microscopy data showed that A $\beta$ 25-35, A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 induced autophagy significantly in EGFP-LC3-HEK293 stable cells. MTT assays showed much stronger cytotoxicity in A $\beta$ 42-treated group than in A $\beta$ 40 group whereas both peptides induced autophagy. LC3BII/I shifting which indicated LC3B lipidation was detected via Western blot. A $\beta$ -induced autophagosomes could be observed by TEM. Our data suggests that autophagy can be induced by A $\beta$  peptides and the truncated forms of hydrophobic amino acids fragment, but the autophagy induction is not correlated with the percentage of hydrophobic amino acids. Furthermore, A $\beta$ 42 is much more cytotoxic than A $\beta$ 40 during autophagy induction. Based on this study, our research lay the foundation for further mechanisms of autophagy in Alzheimer's disease.

**Keywords**  $\beta$ -Amyloid peptide (A $\beta$ ); autophagy; Alzheimer's disease (AD); microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAPLC3, LC3); autophagosomes

收稿日期: 2014-12-05 接受日期: 2015-05-22

国家自然科学基金(批准号: 81100809、81271417)和北京市自然科学基金(批准号: 7152090)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-51684351-202, E-mail: yingzhang@bjtu.edu.cn

Received: December 5, 2014 Accepted: May 22, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81100809, 81271417) and the Beijing Natural Science Foundation (Grant No.7152090)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-51684351-202, E-mail: yingzhang@bjtu.edu.cn

网络出版时间: 2015-07-02 09:45 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150702.0945.001.html>

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种渐进性神经退行性疾病,是老年痴呆的一种常见形式。其主要病理学特征为 $\beta$ 淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ -peptide, A $\beta$ )沉积形成老年斑(senile plaques, SPs)、tau蛋白过度磷酸化引发的神经元纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)、神经元突触功能异常及丢失<sup>[1]</sup>。因此,AD也属于蛋白质异常折叠性疾病<sup>[2]</sup>。在AD小鼠模型脑组织中发现,A $\beta$ 聚集之前就在小鼠突触内检测到大量自噬体,这表明自噬可能与AD发病相关<sup>[3-4]</sup>。

自噬是淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)代谢的重要途径<sup>[5]</sup>。APP是一种跨膜蛋白质,在体内各组织中广泛存在<sup>[6]</sup>,以脑组织中表达量最高<sup>[7]</sup>。APP被 $\beta$ 和 $\gamma$ 分泌酶切割,产生具有40、42或43个氨基酸的A $\beta$ 肽<sup>[8]</sup>,这一过程与自噬的各阶段密切相关<sup>[9]</sup>。自噬体与溶酶体相结合也是细胞分泌和清除A $\beta$ 的重要途径<sup>[10]</sup>。AD中存在早期自噬异常激活和晚期自噬障碍的平衡紊乱,但是,其机制并不清楚<sup>[11]</sup>。研究表明,A $\beta$ 在体外可以诱导自噬<sup>[12-14]</sup>,但是其机制以及与细胞死亡的关系并不明确。

A $\beta$ 42和A $\beta$ 40是AD研究的靶点之一,其中A $\beta$ 42主要存在于AD患者大脑淀粉样斑块中<sup>[15]</sup>,而A $\beta$ 40通常沉积于脑血管周围<sup>[16]</sup>。A $\beta$ 42比A $\beta$ 40更容易聚集,对细胞毒性也更强<sup>[17]</sup>,但是二者在细胞自噬中的作用是否有差别,目前尚不清楚。A $\beta$ 肽的多种疏水性结构域可能与自噬通量相关。其中,A $\beta$ 1-11是B细胞识别区,在抗体生成的过程中起到重要作用<sup>[18]</sup>;A $\beta$ 12-24是影响 $\beta$ 折叠形成的关键部位,对A $\beta$ 42的构象产生一定影响<sup>[19]</sup>;A $\beta$ 25-35被认为是细胞毒性区<sup>[20]</sup>;A $\beta$ 35-42富含疏水性氨基酸,对A $\beta$ 42的聚集有重要作用<sup>[21]</sup>。但是,这些疏水性不同的截短多肽或结构域是否决定了自噬的发生,目前未见报道。

本文构建了稳定表达EGFP-LC3的HEK293细胞系,用于研究不同形式A $\beta$ 参与细胞自噬调控的作用。利用荧光显微镜观察LC3荧光斑点并定量分析,Western blot检测自噬分子标志LC3B及其酯化情况,透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察自噬小体的细胞超微结构等,同时分析了特定A $\beta$ 诱导的自噬伴随细胞活力的差异,以期为进一步研究A $\beta$ 自噬机制并寻找新的AD治疗靶点奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株及细胞系

感受态细胞DH5 $\alpha$ 、pEGFP-LC3质粒、pCDNA3.1(-)及pCDNA3.1(-)-A $\beta$ 质粒、人胚肾细胞(HEK293)均为本实验室保存。

### 1.2 试剂

人A $\beta$ 42多肽委托上海生工生物工程技术有限公司合成,纯度为95%以上;六氟异丙醇(1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol, HFIP)为瑞士Fluka公司产品;限制性内切酶(*Bam*H I、*Bgl* II)、预染蛋白质分子量标准(Marker)为美国NEB公司产品;质粒小提试剂盒(E.Z.N.A.TM Plasmid Mini Kit)为OMEGA BIO-TEK公司产品;DNA分子量标准(DNA Marker)为日本TaKaRa公司产品;脂质体转染试剂为Polyplus Transfection公司产品;BCA蛋白浓度测定试剂盒及化学发光底物(SuperSignal<sup>®</sup> West Pico)为美国Thermo公司产品;DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)高糖培养基为Gibco公司产品;胎牛血清为美国Hyclone公司产品;兔抗LC3B多克隆抗体、自噬诱导剂雷帕霉素购自美国Sigma-Aldrich公司;自噬体-溶酶体结合的阻断剂巴佛洛霉素A1(bafilomycin A1, Baf A1)购自Invivo-gen公司;Hoechst 33258购自江苏海门碧云天生物技术研究所;兔抗 $\beta$ -actin多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;鼠抗p62单克隆抗体购自Abcam公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG和山羊抗鼠IgG购自北京中山金桥生物技术有限公司。

### 1.3 载体EGFP-LC3的鉴定及A $\beta$ 寡聚体的制备

将重组质粒pEGFP-LC3转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞,并涂布在含卡那霉素的LB平板上,挑取生长良好的单克隆菌落过夜培养,提取质粒。用*Bam*H I和*Bgl* II进行双酶切鉴定<sup>[22-23]</sup>。

将化学合成的A $\beta$ 42肽及HFIP置于冰上预冷,每1 mg A $\beta$ 42加入220  $\mu$ L HFIP,室温放置60 min。将溶解好的A $\beta$ 42放回冰上5~10 min,之后于室温在通风橱内使HFIP挥发,2~3 h后离心管壁上会形成无色透明的肽膜。每管加入44  $\mu$ L无水二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO),吹打混匀后每管加2 156  $\mu$ L不含酚红的DMEM/F12,4  $^{\circ}$ C放置24 h。

### 1.4 细胞培养与转染

HEK293细胞培养于DMEM培养基(含10%胎牛血清及100 U/mL青霉素和100  $\mu$ g/mL链霉素)中,置于37  $^{\circ}$ C、5.0% CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱(美国Nuair NU-425-400E)中培养。转染前1天,将处于对数生长期的HEK293细胞接种于6 cm皿中。第2天,细胞约70%汇

合时,利用脂质体转染试剂与质粒pEGFP-LC3、pcDNA3.1(-)及pcDNA3.1(-)-A $\beta$ 按照产品说明书进行转染。

### 1.5 稳定表达EGFP-LC3细胞系的建立

首先确定培养基中G418的最适浓度,按照方法1.4所述进行细胞转染。转染24 h后,按1:10传代,用最适浓度的G418加压筛选,每3天换液,持续2周至形成明显的单克隆,以G418维持浓度,扩大培养,倒置荧光显微镜(日本Nikon TE2000-S)下,随机选取5个不同视野下的细胞观察、拍照和统计学分析,计算细胞EGFP(enhanced green fluorescence protein)阳性率,以期获得稳定细胞系EGFP-LC3-HEK293。

### 1.6 自噬的诱导及鉴定

将A $\beta$ 42、A $\beta$ 40以及截短片(A $\beta$ 1-11、A $\beta$ 12-24、A $\beta$ 25-35、A $\beta$ 35-42)以10  $\mu$ mol/L的剂量加入方法1.5所得的EGFP-LC3-HEK293细胞,孵育24 h,并设立细胞对照组、缓冲液组以及雷帕霉素(rapamycin, Rap)阳性对照组。利用荧光显微镜每组选取5个视野,观察EGFP-LC3斑点、计数并计算EGFP-LC3斑点总数/细胞总数的比值。同时,我们利用A $\beta$ 质粒转染HEK293细胞,并设立细胞对照组和载体对照组。

### 1.7 Western blot检测LC3B和p62的表达

将60%~70%汇合的EGFP-LC3-HEK293细胞分为细胞对照组、缓冲液组、A $\beta$ 40组(10  $\mu$ mol/L)、A $\beta$ 42组(10  $\mu$ mol/L)、雷帕霉素组(100 nmol/L)、血清去除组、细胞对照+Baf A1组、A $\beta$ 42+Baf A1组和血清去除+Baf A1组。在后面两组中,细胞经过A $\beta$ 42或者血清去除处理12 h后加入Baf A1(20 nmol/L)至24 h后,用含蛋白酶抑制剂(Roche)的细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% NP40, 0.5%脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1 mmol/L PMSF)

处理细胞;于4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心10 min,取上清,用BCA法测定蛋白浓度。每孔上样40  $\mu$ g,经15%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,常规Western blot检测。一抗分别为兔抗LC3B(1:1 000稀释)、鼠抗p62(1:1 000稀释)和兔抗 $\beta$ -actin(1:1 000稀释),ECL化学发光法检测目的条带。

### 1.8 MTT法检测细胞活力

将EGFP-LC3-HEK293细胞以 $5 \times 10^3$ /孔接种于96孔板中,置于37  $^{\circ}$ C、5.0% CO $_2$ 培养箱中孵育24 h,分别设立空白对照组、细胞对照组、缓冲液组、A $\beta$ 40组、A $\beta$ 42组、雷帕霉素组、血清去除组。每孔加入20  $\mu$ L的MTT(0.5 mg/mL)继续培养4 h,吸去孔内培养液。每孔加入150  $\mu$ L的DMSO,使结晶物充分溶解。测定490 nm处各孔的吸光度(D)值<sup>[24]</sup>。

### 1.9 TEM确认自噬超微结构

将A $\beta$ 40和A $\beta$ 42处理24 h后的细胞用2%多聚甲醛-2.5%戊二醛固定,用1% OsO $_4$ 于4  $^{\circ}$ C固定。乙醇逐级脱水,环氧树脂Epon812包埋、聚合、超薄切片及2%醋酸双氧铀和0.2%柠檬酸铅染色。利用JEM-1400透射电子显微镜(日本JEOL)在80 kV加速电压下进行观察并拍照。

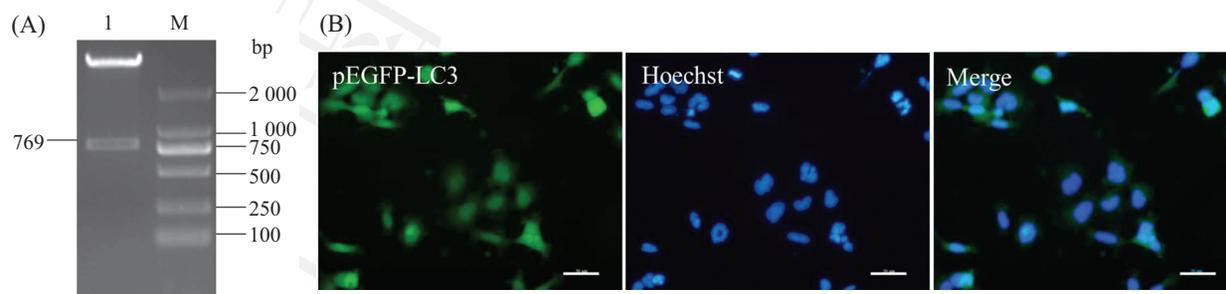
### 1.10 统计学分析

实验数据以mean $\pm$ SE形式表示,用SPSS 19.0软件进行显著性差异分析。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 稳定表达EGFP-LC3的HEK293细胞系的建立及鉴定

将重组质粒pEGFP-LC3用BamH I和Bgl II进行

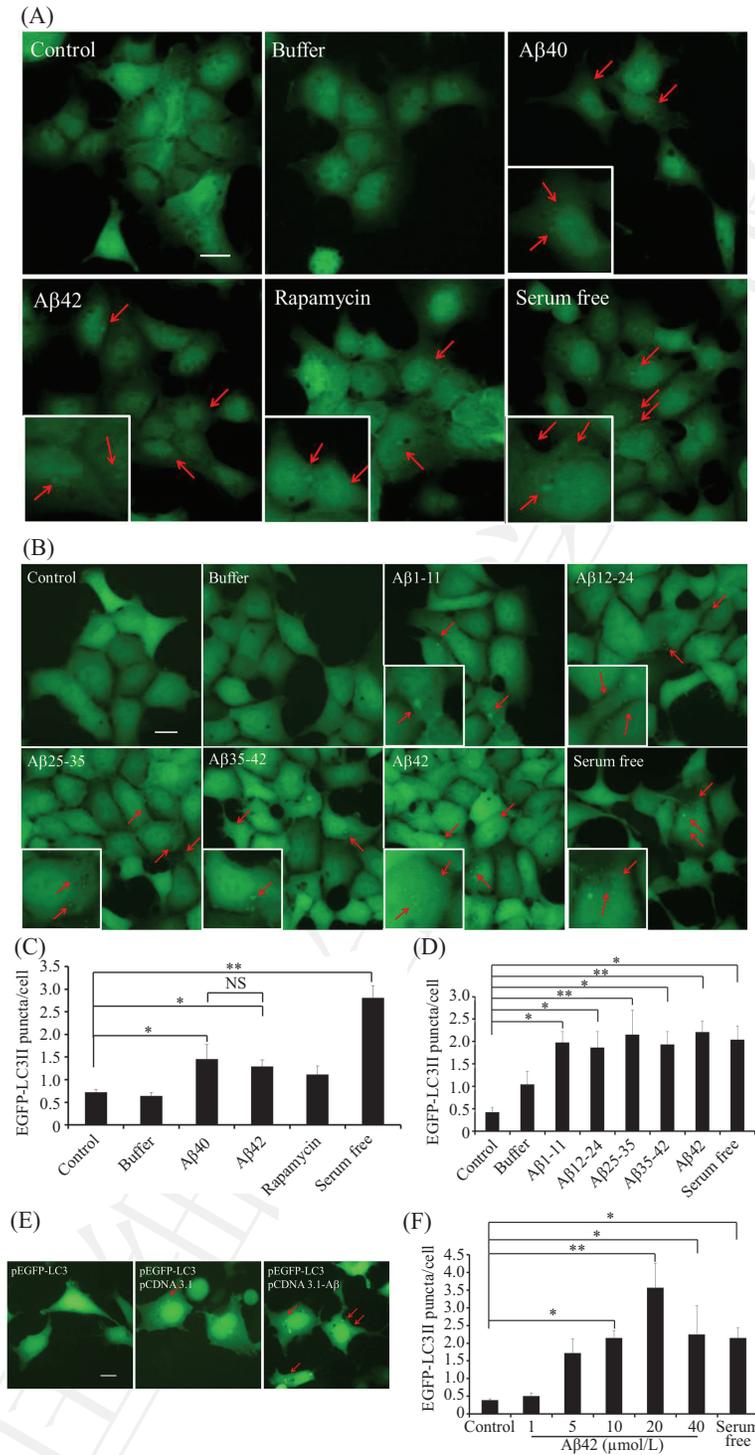


A: pEGFP-LC3的双酶切鉴定。1: pEGFP-C1载体和769 bp长度的LC3基因片段; M: DNA分子量标准DL2000; B: 稳定表达EGFP-LC3的HEK293细胞荧光照片。绿色代表EGFP-LC3蛋白表达,蓝色代表细胞核,利用表达绿色荧光蛋白的细胞数/细胞核数目计算表达LC3阳性细胞所占的比例(标尺=50  $\mu$ m)。

A: identification of pEGFP-LC3 plasmid by restriction enzyme digestion. 1: 769-bp-band represented LC3 gene fragment, and the upper band was vector gene fragment; M: DNA marker DL2000; B: images of EGFP-LC3-HEK293, green indicated EGFP-LC3 expression, blue indicated Hoechst-stained nuclei, and the percentage of LC3 positive cells was calculated by the ratio of green/blue (scale bars=50  $\mu$ m).

图1 稳定表达EGFP-LC3的HEK293细胞系建立及鉴定

Fig.1 Establishment and identification of EGFP-LC3-HEK293 stable cell line



A: A $\beta$ 40和A $\beta$ 42以10  $\mu$ mol/L的剂量诱导细胞24 h, 同时设立细胞对照组、缓冲液组、雷帕霉素组和血清去除组, 利用荧光显微镜观察绿色荧光斑点并拍照(标尺=50  $\mu$ m); B: 不同A $\beta$ 肽(A $\beta$ 1-11, A $\beta$ 12-24, A $\beta$ 25-35, A $\beta$ 35-42及A $\beta$ 42)以10  $\mu$ mol/L的剂量诱导细胞24 h, 同时设立细胞对照组、缓冲液组、血清去除组, 利用荧光显微镜观察并拍照(标尺=20  $\mu$ m); C、D: 分别是A和B的统计学分析; E: A $\beta$ 质粒转染(标尺=20  $\mu$ m); F: A $\beta$ 42诱导细胞自噬的剂量依赖关系。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01。A、B和E中, 箭头所指为LC3荧光斑点的位置。

A,B: images of EGFP-LC3 puncta in EGFP-LC3-HEK293 cells. A: cells were treated with A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 (10  $\mu$ mol/L), rapamycin, serum starvation and A $\beta$  buffer for 24 h, and autophagosome formation increased as demonstrated by the fluorescent puncta (scale bar=50  $\mu$ m); B: cells were treated with specific A $\beta$  peptides [A $\beta$ 1-11, A $\beta$ 12-24, A $\beta$ 25-35, A $\beta$ 35-42 and A $\beta$ 42 (10  $\mu$ mol/L)] or serum starvation for 24 h (scale bar=20  $\mu$ m); C,D: quantification of the results from A and B; E: transfection of A $\beta$  plasmids (scale bar=20  $\mu$ m); F: the dose-dependent effects of A $\beta$  peptides on autophagy. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01. Arrows indicated the LC3 puncta.

图2 A $\beta$ 肽诱导稳定表达EGFP-LC3细胞的自噬  
Fig.2 A $\beta$  peptide-induced autophagy in EGFP-LC3 stable cells

双酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳显示769 bp的目的片段和4.7 Kb的载体片段(图1A), 条带位置与目的片段大小吻合。

G418筛选的最适合浓度是700  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。用Hoechst染细胞核后计数提示, 所获稳定表达EGFP-LC3的HEK293细胞EGFP阳性率达到100%(图1B)。

## 2.2 A $\beta$ 诱导的细胞自噬

利用荧光显微镜观察A $\beta$ 诱导的细胞自噬, 计数LC3荧光斑点并进行统计学分析(图2A和2C)。结果显示, 外源A $\beta$ 40诱导的LC3荧光斑点数目略高于外源A $\beta$ 42, 但无统计学差异。为了进一步明确自噬的机制, 我们同时用截短的A $\beta$ 肽处理细胞。结果表明, A $\beta$ 25-35和A $\beta$ 42两组中绿色荧光斑点数目明显增多( $P<0.01$ )(图2B红色箭头所示), 统计学分析见图2D。

同时, 我们利用A $\beta$ 质粒转染进一步研究细胞内表达A $\beta$ 诱导HEK293细胞自噬的效果。结果显示, 与空白组和载体对照组相比, A $\beta$ 质粒组中LC3荧光斑点数目明显增多(图2E)。

为了进一步验证A $\beta$ 与细胞自噬是否存在剂量

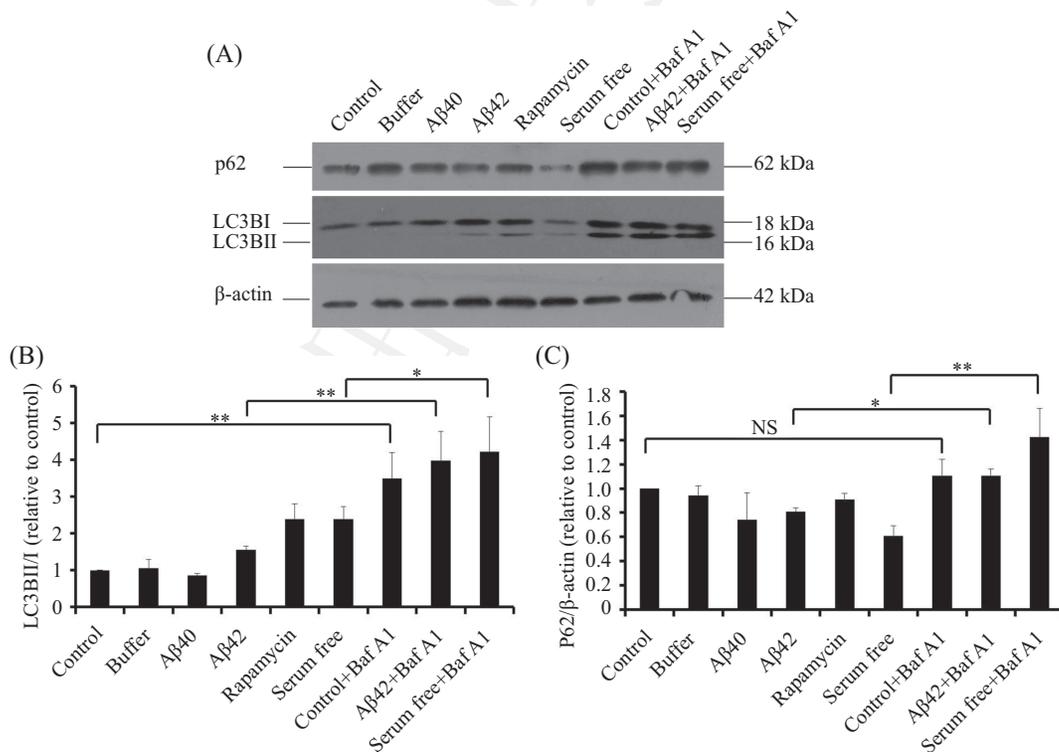
依赖关系, 随A $\beta$ 多肽浓度增加, 计数LC3荧光斑点并进行统计学分析。我们发现, 在0~20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的范围内, 伴随A $\beta$ 42多肽浓度的升高, 细胞自噬斑点随之增多(图2F)。

## 2.3 Western blot检测LC3BII/I和p62的变化

Western blot检测显示, 与空白对照组以及缓冲液处理组相比, A $\beta$ 42组及阳性对照组的LC3BII都有所增加(图3A)。经过Baf A1处理后, 阻断了自噬溶酶体的降解, 导致自噬相关蛋白表达增加, LC3BI及LC3BII表达增强(图3A)。LC3BII/I的比值伴随细胞自噬增强而增加, 在Baf A1处理的三组中, LC3BII/I比值较未处理组均有显著差异(图3A和图3B); 同时, 伴随自噬的激活, p62蛋白的表达量相应减少(图3A), 经过Baf A1处理后, p62的降解受到抑制, 表达水平相应增加, A $\beta$ 42组及血清去除组较未处理组均有显著差异(图3A和图3C)。

## 2.4 MTT检测A $\beta$ 诱导自噬后的细胞活性

如图4, 与细胞空白组相比, A $\beta$ 40组( $P<0.05$ )、雷帕霉素组( $P<0.05$ )和A $\beta$ 42组( $P<0.01$ )处理后细胞

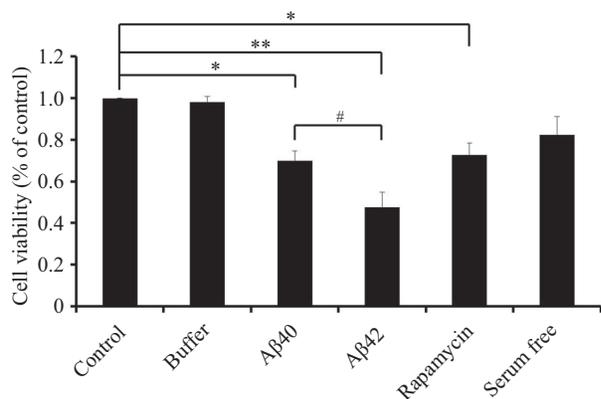


A: Western blot检测LC3BII/I和p62的表达水平; B、C: 利用AlphaView SA软件对A中Western blot条带进行定量分析, 目的蛋白相对 $\beta$ -actin进行校正( $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ , NS: 无显著差异)。

A: Western blot analysis of LC3BII/I and p62 expression level in EGFP-LC3-HEK293 cells in the absence or presence of 20 nmol/L of Baf A1; B,C: quantitative analysis of optical densities of LC3BII/I and p62 via AlphaView SA software and normalized to the expression of  $\beta$ -actin ( $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ , NS: not significant).

图3 Western blot检测LC3BII/I和p62的变化

Fig.3 The changes of LC3BII/I and p62 were detected by Western blot



稳定表达EGFP-LC3的HEK293细胞中分别加入A $\beta$ 40、A $\beta$ 42(10  $\mu$ mol/L)、雷帕霉素(100 nmol/L)和血清去除分别处理细胞24 h后,利用MTT检测细胞活性(\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01)。

The EGFP-LC3 stable cells were incubated with A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, rapamycin and serum deprivation for 24 h, and cell viability was detected by MTT assays (\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01).

图4 A $\beta$ 诱导自噬后的细胞活性

Fig.4 The cell viability of A $\beta$  treated autophagic cells

活性明显降低。与A $\beta$ 40组相比, A $\beta$ 42组的细胞活力显著降低( $P$ <0.05)。本实验结果由3次相互独立的重复实验所得。

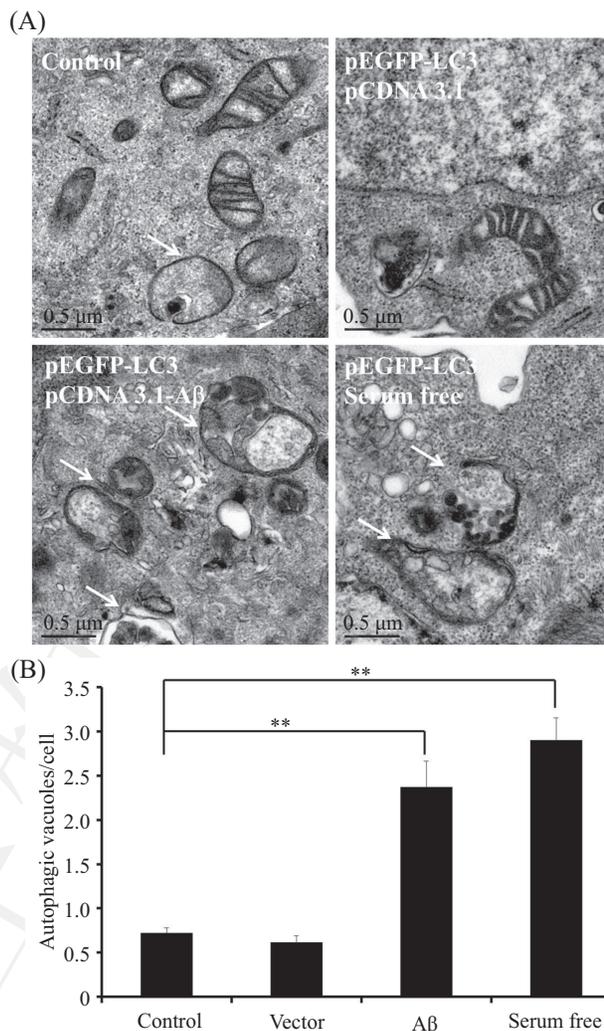
## 2.5 TEM检测自噬小体超微结构

为了从超微结构水平确认A $\beta$ 细胞自噬的效果,利用TEM观察其形态学特征——自噬小体,并进行统计学分析。结果显示,与空白组和载体对照组相比,转染A $\beta$ 质粒组中自噬小体数目明显增多(图5)。

## 3 讨论

在真核生物中,自噬是去除老化细胞器和蛋白质聚集体、保护机体免受病原入侵以及在缺乏能源等应激条件下通过降解大分子物质为细胞提供营养的一种机能<sup>[25-26]</sup>。这种在进化上高度保守的生物学功能在AD等神经退变性疾病的发生发展中尤为重要<sup>[27]</sup>。本研究利用稳定表达EGFP-LC3的HEK293细胞系,初步探讨特定形式A $\beta$ 参与细胞自噬及其对细胞生长的作用机制。

文献<sup>[28-29]</sup>指出, LC3的荧光斑点及其酯化是判断细胞自噬的主要标准。本研究用这种方法得出“A $\beta$ 对细胞的自噬具有调控作用”的结果。同时,自噬伴随有细胞存活状态改变,说明A $\beta$ 诱导的自噬可能参与了细胞损伤机制。由图2A和图4可知,相同条件下A $\beta$ 40和A $\beta$ 42均可诱导细胞自噬,但是A $\beta$ 42对细胞活性的影响更大,或者说细胞毒性更强。虽



A: 超薄切片透射电镜显示自噬小体,左上图为细胞对照组,右上图为载体对照组,左下图为转染A $\beta$ 质粒的实验组,右下图为血清去除组(箭头所指为自噬小体的位置); B: 图A的统计学分析, \*\* $P$ <0.01。

A: TEM images of the autophagosomes via ultra thin section: In upper panels, the left picture was cell control and the right one was vector control group. In lower panels, cells were transfected with A $\beta$  plasmids (left) or treated with serum starvation (right) respectively (arrows indicated the autophagic vacuoles); B: quantification of the results from A, \*\* $P$ <0.01.

图5 透射电镜观察自噬小体超微结构

Fig.5 TEM ultrastructural morphology of autophagosomes

然A $\beta$ 40和A $\beta$ 42仅在羧基端相差两个氨基酸,但却导致A $\beta$ 42更容易聚集成寡聚体,致使二者诱导自噬及凋亡的信号可能存在差异,这一结果与文献报道相似<sup>[30-31]</sup>。同时,我们检测了经过Baf A1处理后, LC3BII以及p62的表达水平(图3),结果提示, Baf A1可以阻断A $\beta$ 诱导的自噬通量(autophagic flux)的水平。

疏水性氨基酸增加了蛋白质聚集的倾向。为了研究A $\beta$ 诱导自噬是否与其疏水性氨基酸含量相关,我们将其划分为A $\beta$ 1-11、A $\beta$ 12-24、A $\beta$ 42、A $\beta$ 25-

35和A $\beta$ 35-42(疏水性分别为9.1%、46.1%、50%、63.6%和87.5%,依次升高),利用这5种截短的A $\beta$ 诱导细胞自噬。结果发现,虽然这5种截短的A $\beta$ 都可以诱导HEK293细胞自噬,但是效果不同,并且未见与疏水性氨基酸含量的相关性。A $\beta$ 25-35和A $\beta$ 42诱导细胞自噬的效果更明显,也提示二者的细胞毒性作用可能与自噬存在对话机制。

综上所述,我们建立的EGFP-LC3-HEK293细胞系有助于A $\beta$ 参与自噬的研究,为进一步阐明自噬在AD神经退变病理过程中的作用奠定基础。

### 参考文献 (References)

- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006; 368(9533): 387-403.
- Costanzo M, Zurzolo C. The cell biology of prion-like spread of protein aggregates: Mechanisms and implication in neurodegeneration. *Biochem J* 2013; 452(1): 1-17.
- Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, *et al.* Macroautophagy—a novel beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 2005; 171(1): 87-98.
- 张莹, 郭舒涵, 房芳, 何金生, 彭向雷. 自噬稳态调控与阿尔茨海默病防治策略. *生命科学*(Zhang Ying, Guo Shuhan, Fang Fang, He Jinsheng, Peng Xianglei. Regulation of autophagy: the way for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Chinese Bulletin of Life Sciences*) 2014; 4: 340-8.
- Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ. Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: Alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 1992; 357(6378): 500-3.
- Sardana V, Xu B, Zugay-Murphy J, Chen Z, Sardana M, Darke PL, *et al.* A general procedure for the purification of human beta-secretase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2004; 34(2): 190-6.
- Nicolas M, Hassan BA. Amyloid precursor protein and neural development. *Development* 2014; 141(13): 2543-8.
- Weggen S, Beher D. Molecular consequences of amyloid precursor protein and presenilin mutations causing autosomal-dominant Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2012; 4(2): 9.
- Yu WH, Kumar A, Peterhoff C, Shapiro KL, Uchiyama Y, Lamb BT, *et al.* Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: Implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(12): 2531-40.
- Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, *et al.* Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(30): 11172-7.
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, *et al.* Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: An immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64(2): 113-22.
- Xue Z, Zhang S, Huang L, He Y, Fang R, Fang Y. Upexpression of Beclin-1-dependent autophagy protects against beta-amyloid-induced cell injury in PC12 cells. *J Mol Neurosci* 2013; 51(1): 180-6.
- Hung SY, Huang WP, Liou HC, Fu WM. Autophagy protects neuron from Abeta-induced cytotoxicity. *Autophagy* 2009; 5(4): 502-10.
- Son SM, Jung ES, Shin HJ, Byun J, Mook-Jung I. Abeta-induced formation of autophagosomes is mediated by RAGE-CaMKKbeta-AMPK signaling. *Neurobiol Aging* 2012; 33(5): 1006-11.
- McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, *et al.* Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron* 2005; 47(2): 191-9.
- Lu XL, Liu JX, Wu Q, Long SM, Zheng MY, Yao XL, *et al.* Protective effects of puerarin against Ass40-induced vascular dysfunction in zebrafish and human endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 2014; 732: 76-85.
- Matlack KE, Tardiff DF, Narayan P, Hamamichi S, Caldwell KA, Caldwell GA, *et al.* Clioquinol promotes the degradation of metal-dependent amyloid-beta (Abeta) oligomers to restore endocytosis and ameliorate Abeta toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(11): 4013-8.
- Bergamaschini L, Donarini C, Foddi C, Gobbo G, Parnetti L, Agostoni A. The region 1-11 of Alzheimer amyloid-beta is critical for activation of contact-kinin system. *Neurobiol Aging* 2001; 22(1): 63-9.
- Xu W, Zhang C, Derreumaux P, Graslund A, Morozova-Roche L, Mu Y. Intrinsic determinants of Abeta(12-24) pH-dependent self-assembly revealed by combined computational and experimental studies. *PLoS One* 2011; 6(9): e24329.
- Millucci L, Ghezzi L, Bernardini G, Santucci A. Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35. *Curr Protein Pept Sci* 2010; 11(1): 54-67.
- Wagoner VA, Cheon M, Chang I, Hall CK. Impact of sequence on the molecular assembly of short amyloid peptides. *Proteins* 2014; 82(7): 1469-83.
- Stine WJ, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ. *In vitro* characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* 2003; 278(13): 11612-22.
- Dai X, Chang P, Zhu Q, Liu W, Sun Y, Zhu S, *et al.* Chitosan oligosaccharides protect rat primary hippocampal neurons from oligomeric beta-amyloid 1-42-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett* 2013; 554: 64-9.
- Sun Q, Jia N, Wang W, Jin H, Xu J, Hu H. Activation of SIRT1 by curcumin blocks the neurotoxicity of amyloid-beta25-35 in rat cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 448(1): 89-94.
- Nixon RA. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 23): 4081-91.
- Barth JM, Kohler K. How to take autophagy and endocytosis up a Notch. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 960803.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, *et al.* Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; 90(4): 1383-435.
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*

- 2008; 4(2): 151-75.
- 29 Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; 8(4): 445-544.
- 30 Fonseca MB, Sola S, Xavier JM, Dionisio PA, Rodrigues CM. Amyloid beta peptides promote autophagy-dependent differentiation of mouse neural stem cells: Abeta-mediated neural differentiation. *Mol Neurobiol* 2013; 48(3): 829-40.
- 31 Guglielmotto M, Monteleone D, Piras A, Valsecchi V, Tropiano M, Ariano S, *et al.* Abeta1-42 monomers or oligomers have different effects on autophagy and apoptosis. *Autophagy* 2014; 10(10): 1827-43.

中国细胞生物学