

# $\gamma$ -Adducin 减轻 $A\beta_{1-42}$ 诱导的神经元突起损伤

熊敏 孟兰霞 何名扬 张星雨 戴莉君 潘丽娜 张振涛

**【摘要】 目的** 探讨  $\gamma$ -Adducin 蛋白是否可减轻  $A\beta_{1-42}$  纤维诱导的神经元突起损伤。**方法** 实验一:培养原代神经元,用  $10 \mu\text{mol/L}$   $A\beta_{1-42}$  纤维处理神经元 24 h,采用神经元特异性标记物 MAP2 检测神经元突起损伤,用 TUNEL 染色检测神经元凋亡;实验二:分别用对照病毒和表达  $\gamma$ -Adducin 的腺相关病毒感染神经元,蛋白表达 5 d 后再分别加入  $A\beta_{1-42}$  纤维处理,用免疫荧光染色法观察  $\gamma$ -Adducin 蛋白过表达对  $A\beta_{1-42}$  纤维引起的神经元突起损伤的影响,用 Dil 染色检测神经元树突棘密度的变化。**结果**  $A\beta_{1-42}$  纤维对神经元的突起具有损伤作用,并且引起神经元凋亡;过表达  $\gamma$ -Adducin 蛋白对  $A\beta_{1-42}$  纤维引起的神经元突起和树突棘损伤均有保护作用。**结论**  $\gamma$ -Adducin 蛋白可减轻  $A\beta_{1-42}$  纤维导致的神经元突起损伤,它可能是 1 个新的阿尔茨海默病治疗靶点。

**【关键词】**  $\gamma$ -Adducin 阿尔茨海默病 神经元 突起

**【中图分类号】** R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2020)01-0014-06

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2020.01.003

$\gamma$ -Adducin alleviated neurite damage induced by  $A\beta_{1-42}$  Xiong Min, Meng Lanxia, He Mingyang, et al.  
Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

**【Abstract】 Objective** To explore whether  $\gamma$ -Adducin alleviated neurite damage induced by  $A\beta_{1-42}$  fibrils in neurons. **Methods** Experiment # 1: Primary cultured neurons were exposed to  $A\beta_{1-42}$  fibrils at a concentration of  $10 \mu\text{mol/L}$  for 24 hours, neurite change was measured after staining with neuronal marker microtubule associated protein 2 (MAP2), TUNEL staining was performed to detect apoptosis. Experiment # 2: Primary neurons were pre-treated with adeno-associated virus encoding control or  $\gamma$ -Adducin, respectively, 5 days after virus infection,  $A\beta_{1-42}$  fibrils ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) were added into both groups. Immunofluorescence staining was used to investigate the effect of  $\gamma$ -Adducin on neurite damage induced by  $A\beta_{1-42}$  fibrils, Dil staining was used to detect the changes of dendritic spines density in primary neurons. **Results**  $A\beta_{1-42}$  fibrils induced damage of neurites and caused apoptosis in primary neurons. Overexpression of  $\gamma$ -Adducin protected neurites from damage induced by  $A\beta_{1-42}$  fibrils. **Conclusion** It was found that  $\gamma$ -Adducin alleviated neuronal neurite damage induced by  $A\beta_{1-42}$  fibrils, which indicated that  $\gamma$ -Adducin might be a novel therapeutic target for Alzheimer's disease.

**【Key words】**  $\gamma$ -Adducin Alzheimer's disease Neurons Neurites

成熟的神经元一般具有一个轴突和多个树突,轴突通过运输将信号传递给其它神经元,而胞体和树突接收来自其它神经元的信号,轴突和胞体-树突之间的信号传递构成了精确而复杂的神经网络系统,因此神经元轴突和树突功能的完善是神经系统生理功能得以体现的基础。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是发病率较高的神经变性疾病,大量研究表明 AD 发生的早期已经出现了神经

元轴突和树突功能障碍,是认知功能障碍的病理基础<sup>[1]</sup>。AD 特异性的病理改变是脑内大量  $\beta$ -淀粉样蛋白(Amyloid- $\beta$ ,  $A\beta$ )异常聚集体,形成老年斑。 $A\beta$ 是由淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)经  $\beta$ -和  $\gamma$ -分泌酶的蛋白水解作用而形成的含有 40~42 个氨基酸的多肽,主要形式为  $A\beta_{1-40}$ 和  $A\beta_{1-42}$ ,其中  $A\beta_{1-42}$ 更容易聚集,对神经细胞毒性更大,最终形成淀粉样斑块而造成神经元功能紊乱,在 AD 的发病中起到关键作用<sup>[2-3]</sup>。越来越多的研究证据表明  $A\beta_{1-42}$ 形成的聚集体对神经元的突起有损伤作用,并引起神经元的凋亡<sup>[4-7]</sup>。内收蛋白( $\gamma$ -Adducin)是一种广泛表达于神经元的细胞骨架相关蛋白,可以与血影蛋白和肌动蛋白相互结合,使血

基金项目:国家自然科学基金(No. 81822016, 81771382, 81571249)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科[熊敏 孟兰霞 何名扬 张星雨 戴莉君 潘丽娜 张振涛(通信作者)]

影蛋白快速结合到肌动蛋白生长末端<sup>[8]</sup>,主要的生理功能包括参与细胞信号转导<sup>[9]</sup>、调节肌动蛋白的动力<sup>[10]</sup>、参与突触可塑性<sup>[11]</sup>,它还与突起生长和退变有关<sup>[12]</sup>。前期研究证据表明  $\gamma$ -Adducin 蛋白能够促进猴肾成纤维细胞(COS7 Cells)的突起生长<sup>[13]</sup>。为了明确  $\gamma$ -Adducin 蛋白是否能够减轻神经元突起损伤,本研究以原代培养的神经元为主要研究对象,观察  $\gamma$ -Adducin 蛋白是否可以减轻  $A\beta_{1-42}$  纤维所致的突起损伤,以期 AD 的治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

孕 18 d 的 C57 野生型小鼠,由武汉大学人民医院动物实验中心 SPF 级屏障环境自行繁殖获得。

### 1.2 主要试剂与仪器

$A\beta_{1-42}$  购自 rPeptide 公司(A-1163-1); GFP-Vector 和 GFP- $\gamma$ -Adducin 腺相关病毒由武汉枢密脑科学技术有限公司包装; MAP2 抗体(17490-1-AP)和 GFP 抗体(66002-1-Ig)均购自 Proteintech 公司; Dil 染料购自 Thermo Fisher Scientific 公司(1975524); TUNEL 试剂盒购自 Roche 公司(12156792910); DAPI 购自 BioFRox 公司(EZ3412B205);超高分辨激光扫描共聚焦显微镜和荧光显微镜以及解剖显微镜购自 OLYMPUS。

### 1.3 原代皮层神经元的培养

生物安全柜内无菌操作条件下提前用多聚赖氨酸包被 6 孔板,4 h 后用无菌水洗 6 孔板并加入含有马加牛血清的培养基(1%青霉素-链霉素溶液,1%谷氨酰胺,6%热激活胎牛血清,6%马血清,86%普通培养基)置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中,脱臼处死孕鼠,消毒小鼠皮肤,于解剖显微镜下完整取出左右脑组织,去除嗅球,剔除脑膜和下丘脑,钝性分离出双侧大脑皮层,于冰上将皮层组织剪碎并加入 5 mL 培养基重悬组织,第一遍用巴氏吸管吹打组织,4℃离心 1000 r/min×5 min,再次重悬组织后同条件离心,重悬后进行细胞计数,调至  $1 \times 10^6$ /mL,铺于 6 孔板内,4 h 后换成基础培养基(1%青霉素-链霉素溶液,1%谷氨酰胺,2% B27, 96% Neurobasal Media),2 d 后用阿糖胞苷 10  $\mu$ mol/L 处理神经元以去除神经胶质细胞,4 h 后更换培养基,培养 1~2 d 后向培养基中滴加相应病毒,继续培养 5~7 d 后根据神经元 GFP 和  $\gamma$ -Adducin 表达情况进行后续

实验。

### 1.4 制备 $A\beta_{1-42}$ 纤维及分组

向 500  $\mu$ g 的  $A\beta_{1-42}$  内加入 450  $\mu$ L 无菌水,充分混匀后振荡 2 s,置于冰上 5 min,重复此操作持续 30 min,继续加入 50  $\mu$ L 缓冲液并振荡 1 次,置于 37℃,每天定时振荡 1 次,第 6 d 用硫黄素 T 染料检测  $A\beta_{1-42}$  纤维聚集情况,待测到  $A\beta_{1-42}$  纤维组(1 mg/mL 的  $A\beta_{1-42}$ )比对照组(PBS)荧光强度明显升高,则说明  $A\beta_{1-42}$  短肽已聚集成  $A\beta_{1-42}$  纤维,可用于做后续实验。

### 1.5 免疫荧光和 TUNEL 染色

各组神经元经 PBS 漂洗后用 4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 次,5 min/次,含 0.3% Triton X-100 的 PBS 透化 10 min, PBS 洗 3 次,5 min/次,3%牛血清白蛋白封闭 1 h,与各种抗体 4℃孵育过夜。本研究使用的抗体包括兔抗 MAP2(1:1000)和鼠抗 GFP(1:1000),第 2 d PBS 洗 5 次,5 min/次,用荧光兔二抗和鼠二抗室温避光孵育 2 h, PBS 洗 3 次,5 min/次,然后每孔加入 20  $\mu$ L 的 TUNEL 染色液,37℃培养箱避光孵育 1 h, PBS 洗 3 次,5 min/次,洗完后 DAPI 染液(1:1000)室温孵育 5 min, PBS 洗 3 次,5 min/次,加上抗荧光淬灭剂封片,最后于超高分辨激光扫描共聚焦显微镜和荧光显微镜下观察。

### 1.6 Dil 染色

各组神经元经 PBS 漂洗后用 4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 次,5 min/次,将 Dil 染料颗粒碾碎,均匀加至各孔内,染色 10 min 后用 PBS 漂洗直至显微镜下观察无明显颗粒状染料,4℃孵育过夜,于第 2 d PBS 洗 3 次,5 min/次,使用抗荧光淬灭剂封片,最后于荧光显微镜下观察。

### 1.7 统计学处理

采用 GraphPad Prism 7.0 统计学分析软件,全部数据采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,2 组均数比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用单因素方差分析(ANOVA),用最小显著差法(Least significant difference, LSD)作两两比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 $A\beta_{1-42}$ 纤维对神经元突起有损伤作用

为检测  $A\beta_{1-42}$  纤维对神经元突起的损伤作用,本实验使用 10  $\mu$ mol/L  $A\beta_{1-42}$  纤维处理神经元 24 h

后进行神经元特异性标志物 MAP2 染色,发现对照组神经元突起生长良好,形态完整连续,而使用 10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维处理后神经元突起受到明显损伤,出现突起断裂。量化分析发现对照组含有异常突起的神经元比例为  $(14.5 \pm 2.1)\%$ ,而  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维组含有异常突起的神经元比例为  $(41.2 \pm 2.1)\%$ (图 1)。

2.2  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维诱导神经元凋亡

为了进一步明确  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维对神经元的损伤作用,本实验使用 10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维处理神经元 24 h 后进行 TUNEL 染色发现, $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维处理神经元后出现 TUNEL 阳性的神经元。量化分析发现对照组凋亡率为  $(12.8 \pm 0.5)\%$ , $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维组凋亡率为  $(36.0 \pm 2.6)\%$ (图 2)。

2.3  $\gamma$ -Adducin 减轻  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维诱导的皮层神经元突起损伤

为了明确过表达  $\gamma$ -Adducin 对皮层神经元突起的生长状态的影响,本实验分别使用表达 GFP 和 GFP- $\gamma$ -Adducin 的腺相关病毒感染神经元 5d 后再加入  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维处理神经元发现, $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维诱导明显的神经元突起损伤,GFP- $\gamma$ -Adducin 过表达能够

显著减轻  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维诱导的神经元突起损伤。量化分析发现 GFP-vector +  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维组含有异常突起的神经元比例为  $(68.2 \pm 9.0)\%$ ,GFP- $\gamma$ -Adducin +  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维组含有异常突起的神经元比例为  $(36.9 \pm 3.4)\%$ ,GFP- $\gamma$ -Adducin 组含有异常突起的神经元比例为  $(14.0 \pm 2.8)\%$ 。TUNEL 染色显示,GFP- $\gamma$ -Adducin 能够显著减少  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维诱导的神经元凋亡,量化分析发现 GFP-vector +  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维组凋亡率为  $(40.7 \pm 0.8)\%$ ,GFP- $\gamma$ -Adducin +  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维组凋亡率为  $(31.8 \pm 0.8)\%$ ,GFP- $\gamma$ -Adducin 组凋亡率为  $(6.3 \pm 1.1)\%$ (图 3)。

2.4  $\gamma$ -Adducin 减轻  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维诱导的神经元树突棘损伤

进一步使用 Dil 染色观察了  $\gamma$ -Adducin 对  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维诱导的神经元树突棘损伤的影响。 $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维处理后树突棘数量明显减少,而过表达  $\gamma$ -Adducin 的神经元树突棘数量明显多于对照组,树突棘密度量化显示 GFP-vector +  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维组树突棘密度为  $(1.3 \pm 0.6)/10 \mu\text{m}$ ,GFP- $\gamma$ -Adducin +  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维组树突棘密度为  $(5.0 \pm 1.0)/10 \mu\text{m}$ ,GFP- $\gamma$ -Adducin 组树突棘密度为  $(9.0 \pm 1.0)/10 \mu\text{m}$ (图 4)。

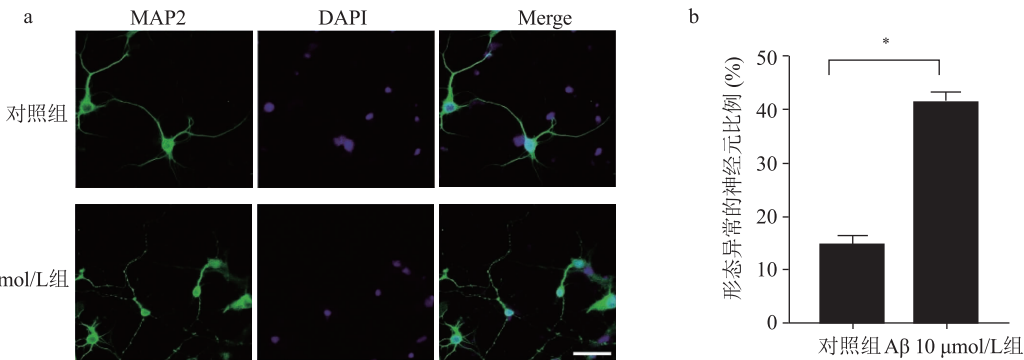


图 1  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维对神经元突起形态的影响 a 为 MAP2 免疫荧光染色检测神经元突起损伤程度;b 为对照组与  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维组含有异常突起的神经元所占百分比;绿色代表 MAP2,蓝色代表 DAPI(Bar = 20  $\mu\text{m}$ );两两比较, \*  $P < 0.05$

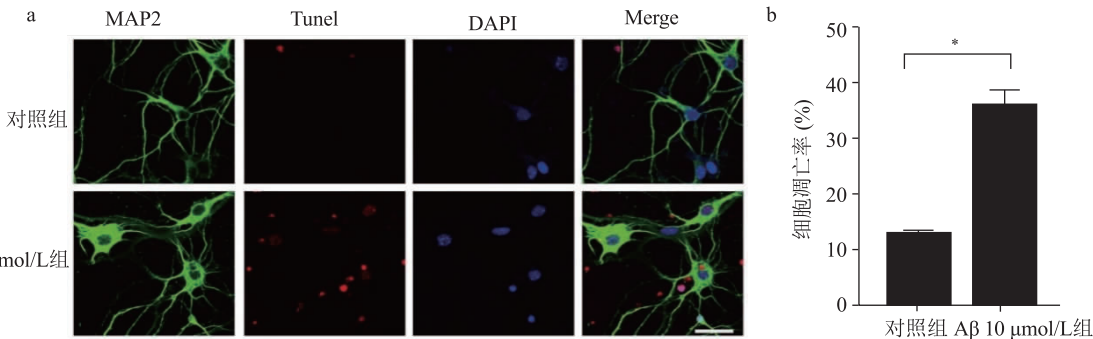


图 2  $\text{A}\beta_{1-42}$  纤维对皮层神经元凋亡的影响 a 为共聚焦显微镜下观察 TUNEL 阳性细胞;b 为细胞凋亡率量化分析;绿色代表 MAP2,红色代表凋亡细胞,蓝色代表 DAPI(Bar = 20  $\mu\text{m}$ );两两比较, \*  $P < 0.05$

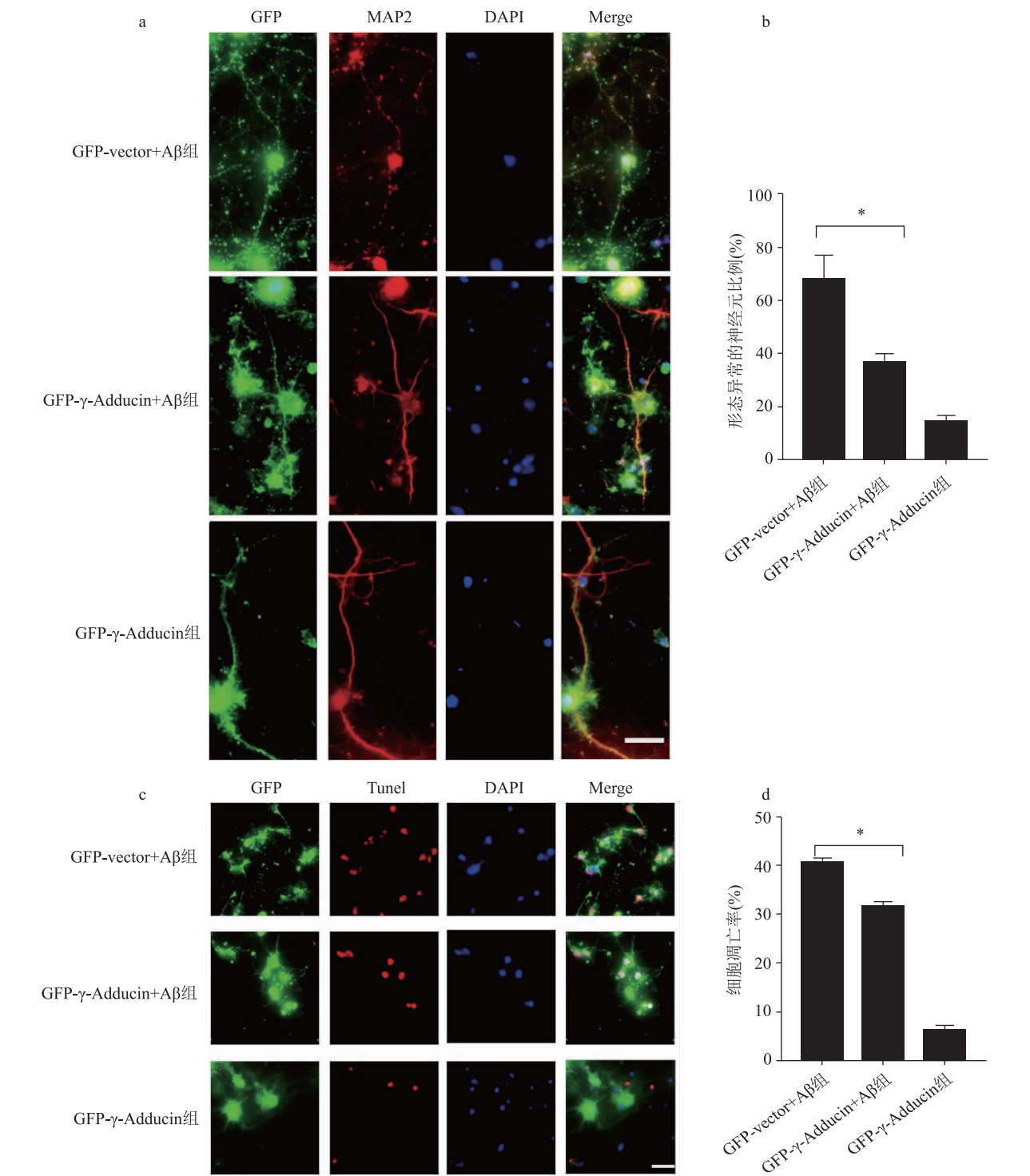


图 3  $\gamma$ -Adducin 蛋白对神经元突起形态和凋亡的影响 a 为 MAP2 染色检测  $\gamma$ -Adducin 蛋白对神经元突起形态的影响;b 为对照组与各处理组神经元形态异常的百分比差异;c 为 TUNEL 染色检测  $\gamma$ -Adducin 蛋白对神经元凋亡的影响;d 为细胞凋亡率量化分析;绿色代表 GFP,红色代表 TUNEL,蓝色代表 DAPI (Bar = 20  $\mu$ m);两两比较, \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

AD 是最常见的神经变性疾病,也是导致痴呆最常见的原因。随着人口老龄化的加剧,AD 的发

病率呈逐年升高趋势。AD 脑内存在两大特征性的病理表现: Tau 蛋白高度磷酸化形成的神经原纤维缠结, A $\beta$  在脑内沉积形成的神经炎性斑, Tau 和 A $\beta$  共同作用,最终导致突触功能障碍和突起损伤,临床

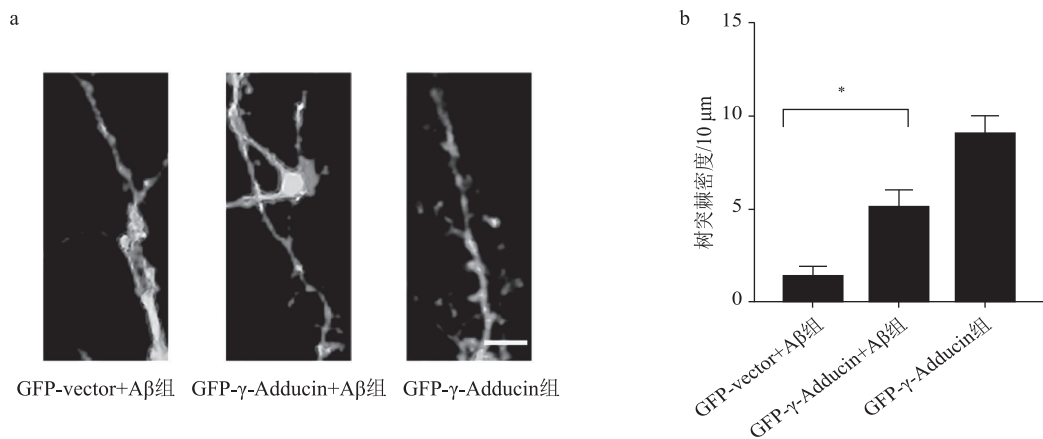


图4  $\gamma$ -Adducin 蛋白对神经元树突棘密度的影响 a 为 Dil 染色检测  $\gamma$ -Adducin 蛋白对神经元树突棘密度的影响;b 为树突棘密度量化(Bar = 20  $\mu$ m);两两比较, \*  $P < 0.05$

上表现为进行性认知功能障碍<sup>[14]</sup>。目前较为公认的学说是“淀粉样蛋白级联假说”<sup>[15]</sup>,认为病理性 A $\beta$  在脑内沉积导致神经元损伤,其中致病能力最强的是 A $\beta_{1-42}$ <sup>[16]</sup>。本实验结果表明 A $\beta_{1-42}$  纤维可引起神经元突起损伤以及神经元凋亡。A $\beta$  可能通过多种机制导致细胞凋亡,包括氧化应激、细胞内钙稳态失衡、线粒体功能障碍等<sup>[17]</sup>。

神经元通过轴突和树突与其他神经元相互联系,共同构成神经网络,是维持正常认知功能的基础。AD 早期出现神经元突起功能障碍,但机制不清。 $\gamma$ -Adducin 蛋白是 1 个与突触相关的细胞膜骨架蛋白,参与中枢神经系统部分疾病的发生与发展如遗传性脑瘫<sup>[18]</sup>、神经胶质瘤<sup>[19]</sup>和高血压病<sup>[20]</sup>等,其主要生理功能是通过与肌动蛋白结合,从而起到稳定细胞骨架的作用<sup>[11]</sup>。本实验结果表明在神经元内过表达  $\gamma$ -Adducin 蛋白可减轻 A $\beta_{1-42}$  纤维引起的神经元突起损伤,减少神经元凋亡,增加树突棘密度,说明  $\gamma$ -Adducin 蛋白在神经元突起生长过程中起着重要的作用。可能的机制是  $\gamma$ -Adducin 作为 1 个细胞膜骨架蛋白,维持细胞正常形态结构的稳定性,并与肌动蛋白相互作用,起到稳定神经元微管的作用,从而减轻 A $\beta_{1-42}$  纤维引起的突起损伤和神经元凋亡,这一机制有待于后续实验进一步证实。

AD 是一个隐袭起病、缓慢进展的疾病,有研究发现典型的 AD 症状出现之前潜在的神经病理损伤已经存在了 15~20 年<sup>[21]</sup>。本研究的意义在于从 AD 早期出现的神经元突起损伤入手研究  $\gamma$ -Adducin 蛋白对神经元突起形态和树突棘密度的影响,尝试从减轻突起损伤方面来改善 AD 的临床症状。在当前治疗 AD 的药物临床试验反复失败的背景下本实验为

保护 AD 中的神经元突起损伤提供新的理论依据。

参 考 文 献

[1] Marin MA, Ziburkus J, Jankowsky J, et al. Amyloid- $\beta$  plaques disrupt axon initial segments[J]. *Exp Neurol*, 2016, 281: 93-98.

[2] Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease [J]. *Science*, 2006, 314(5800): 777-781.

[3] Luhers T, Ritter C, Adrian M, et al. 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(48): 17342-17347.

[4] Nishioka C, Liang H, Barsamian B, et al. Amyloid-beta induced retrograde axonal degeneration in a mouse tauopathy model [J]. *NeuroImage*, 2019, 189: 180-191.

[5] Ng J, Kaur H, Collier T, et al. Site-specific glycosylations of A $\beta_{1-42}$  affect fibril formation and are neurotoxic [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(22): 8806-8818.

[6] Postuma R B, He W, Nunan J, et al. Substrate-bound beta-amyloid peptides inhibit cell adhesion and neurite outgrowth in primary neuronal cultures [J]. *J Neurochem*, 2000, 74(3): 1122-1130.

[7] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, 297(5580): 353-356.

[8] Matsuoka Y, Li X, Bennett V. Adducin: structure, function and regulation [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, 57(6): 884-895.

[9] Matou-Nasri S, Gaffney J, Kumar S, et al. Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc2 and  $\gamma$ -adducin [J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(4): 761-773.

[10] Kugelmann D, Waschke J, Radeva M Y. Adducin is involved in endothelial barrier stabilization [J]. *PLOS ONE*, 2015, 10(5): e0126213.

[11] Gruenbaum L M, Gilligan D M, Picciotto M R, et al. Identification and characterization of aplysia adducin, an aplysia cytoskeletal protein homologous to mammalian adducins: Increased phosphorylation at a protein Kinase C consensus site during long-term synaptic facilitation [J]. *Journal of Neuroscience*, 2003, 23(7): 2675-2685.