

甲醛诱导 Tau 蛋白形成“孔道样”聚集结构*

NAQVI Sajjad Haider^{1,3)} 王维山²⁾ 苗君叶^{1,3)} 赫荣乔^{1,3)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 脑与认知科学国家重点实验室, 北京 100101; ²⁾北京老年医院, 老年痴呆研究中心, 北京 100095;

³⁾中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 尽管 Lin 等(University of California, Santa Barbara)就蛋白构象病中细胞死亡的机制提出了“非特异性淀粉样离子通道”(aspecific amyloid ion channels)学说, 但到目前为止, 尚未发现神经 Tau 蛋白能形成“孔道样”聚集结构, 也未寻找到可以导致蛋白质形成“孔道样”聚集结构的诱导剂。依据本实验室提出的“散发性老年痴呆发生发展中的内源性甲醛慢性损伤”假说, 采用一定浓度的甲醛与 Tau 蛋白进行温育, 观察到甲醛可以明显诱导 Tau 蛋白分子聚集并形成淀粉样沉积物, 同时也观察到了 Tau 蛋白“孔道样”聚集结构。上述结果为探索甲醛诱导 Tau 蛋白错误折叠形成的产物导致细胞代谢障碍和死亡的机制提供了新的研究思路。

关键词 Tau 蛋白, 甲醛, 错误折叠, “孔道样”聚集物, 神经退行性疾病, 慢性损伤, 散发性老年痴呆

学科分类号 Q5, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00375

蛋白质错误折叠形成淀粉样沉积是神经退行性疾病的典型病理特征^[1-2], 但淀粉样沉积物如何导致细胞代谢紊乱甚至死亡的机制尚不清楚。有关蛋白质错误折叠产物导致细胞代谢障碍和死亡机制的学说大致分为两个方面: 一是蛋白质错误折叠产物启动细胞“死亡通路”^[3-4]; 二是淀粉样蛋白形成“非特异性膜孔道”引起细胞膜的损伤, 造成离子代谢紊乱而导致细胞死亡^[5-7]。关于“非特异性膜孔道损伤”学说, 最先由 Lin 等(2001 年)提出^[6]。随后, Quist 等^[9]选取了 6 种淀粉样蛋白(amyloid- β , α -synuclein, Abri, Adan, serum amyloid A, amylin), 通过原子力显微镜观察到了这些蛋白质可以形成“孔道样”聚集结构。

Tau 蛋白属细胞微管结合蛋白家族, 具有启动和稳定细胞骨架结构的作用^[8-9]。异常磷酸化可以引起 Tau 蛋白错误折叠, 形成配对螺旋样二聚体(paired helical filaments, PHFs), 是老年痴呆病人脑内神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)的主要成分。然而, Tau 蛋白是否能够形成“孔道

样”聚集结构, 国内外尚未见报道。另外, 是否存在能够导致蛋白质错误折叠形成“孔道样”聚集结构的诱导因子, 在这方面也暂无相关研究报道。

Harvard 大学医学院 Lansbury 等^[10], 针对蛋白质错误折叠产物在脑内沉积的现象提出一个有趣的问题: “究竟是神经退行性疾病导致了蛋白质错误折叠, 还是错误折叠蛋白导致了退行性疾病”, 这是一个难以回答和解决的科学问题。简而言之, 究竟什么是蛋白质错误折叠的触发因素? 这个问题的探索对于阐明神经退行性疾病的发病机制具有重要的科学意义。

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB500703, 2010CB912303)资助项目, 中国科学院创新方向项目(CAS-KSCX2-YW-R-119)和中国科学院创新预研项目(KSCX2-YW-R-256)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64889876, E-mail: rongqiaohe@gmail.com

收稿日期: 2010-07-16, 接受日期: 2010-10-21

为了研究蛋白质错误折叠的触发因素, 本实验室提出了神经退行性疾病的“内源性甲醛慢性损伤”假说^[11-12], 即认为内源性甲醛代谢平衡失调, 体内甲醛浓度随年龄升高, 从而导致神经细胞、胶质细胞以及脑白质变性是散发性老年痴呆发生发展的重要危险因素之一. 作者观察到, 内源性甲醛的升高与老年痴呆程度呈正相关, 死亡病人尸体解剖发现, 其海马内的甲醛含量显著高于正常对照, 1~3 月龄 APP, APP-PS1, SMAR-8 等转基因小鼠脑内甲醛也显著高于对照组^[13]. 此外, 作者还发现甲醛可以导致 Tau 蛋白错误折叠, 其聚集产物具有明显的细胞毒性^[14-16]. 本文介绍了甲醛导致 Tau 蛋白错误折叠, 从而形成“孔道样”聚集结构的现象.

1 材料与方法

1.1 材料

表达人类神经 Tau 异构体 tau23 的菌株 BL21 由龚成新教授(New York Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, USA)馈赠. 人神经母细胞瘤细胞系(SH-SY5Y)由中国科学院生物物理研究所感染与免疫中日联合实验室的阎锡蕴博士赠送. SP-sepharose, Q-sepharose 柱填料购自 Amersham Biosciences 公司(USA). DMEM/F12 培养基、胎牛血清购于 HyClone 公司(USA). 单克隆抗体 Tau1、HRP- 山羊抗小鼠 IgG 分别购自 Millipore 公司(USA)、中山金桥公司. 甲醛溶液、氨苄青霉素、链霉素、IPTG 购自 Sigma 公司(USA).

1.2 方法

1.2.1 Tau23 蛋白的表达纯化. 参考 Lee 等^[17]使用的方法, 用划线法将保存的菌种接种于 LB 固体培养基(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中, 37℃ 培养过夜. 挑取单菌落转接种于 LB 液体培养基(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中进行扩大培养. 当培养液的吸光度值(A_{600})达到 0.5~0.7 时, 加入 IPTG(终浓度 0.2 mmol/L)继续培养 3~4 h, 离心(6 500 r/min, 4℃, 20 min), 收集菌体. 按 1:100 (v/v)的比例将菌体重悬于 Pipes 缓冲液(含 2 mmol/L Aprotinin, 0.2 mmol/L PMSF, 2 mmol/L DTT, 1% TritonX-100, 10 mmol/L β - 巯基乙醇, 20 mg/L 溶菌酶)中, 冰浴中超声处理. 离心后的上清液置入沸水浴 20 min, 再次离心(15 000 r/min, 4℃), 上清液先后经过

Q-Sepharose 和 SP-Sepharose 离子交换柱, 用 Pipes 缓冲液(含 0.3 mol/L NaCl)洗脱, 收集的蛋白质经 10 mmol/L Pipes (pH 6.4)缓冲液透析, 冻干后于 -70℃ 保存备用. 蛋白质样品分别通过 12% SDS-PAGE 及 Western-blot (单克隆抗体 Tau-1, Millipore 公司, USA)进行检测. 蛋白质浓度采用 BCA 试剂盒(Pierce 公司, USA)进行测定.

1.2.2 微管蛋白的分离纯化. 参考 Williams 等^[18]的方法, 即依据微管蛋白在 0℃ 解聚、37℃ 聚集的特性, 通过 4℃、25℃ 两次循环超速离心分离微管蛋白, 再通过 P11 磷酸纤维素离子交换柱除去其上吸附的 Tau 蛋白. 步骤: 将新鲜猪脑置于冰上, 小心剥去血管与脑膜, 用预冷的缓冲液(0.1 mol/L Mes, 1 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L β -ME, 0.1 mmol/L EDTA, pH 6.4)洗两次, 然后按 0.75 ml/g 的比例将缓冲液加入脑组织中进行匀浆, 超速离心(100 000 g, 4℃, 1 h)后弃沉淀. 加入与上清等体积的 Mes 缓冲液(含 1 mmol/L GTP, 8 mol/L 甘油), 混匀保温(37℃, 20 min), 超速离心(100 000 g, 25℃, 1 h)后弃上清. 按 0.2 ml/g 的比例加入 Mes 缓冲液(含 1 mmol/L GTP, 8 mol/L 甘油)重悬沉淀(冰浴 30 min, 每隔 5 min 轻摇一次), 超速离心(100 000 g, 4℃, 1 h)后弃沉淀. 再次加入与上清等体积的 Mes 缓冲液(含 1 mmol/L GTP, 8 mol/L 甘油), 混匀保温(37℃, 20 min), 超速离心(100 000 g, 25℃, 1 h)后弃上清. 用预冷的 Mes-EDTA 缓冲液(25 mmol/L Mes, 0.5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L β -ME, 0.1 mmol/L EDTA, pH 6.4)重悬蛋白质沉淀, 并通过 P11 磷酸纤维素离子交换柱, 收集穿过峰. 蛋白质冻干后保存于 -70℃. 微管蛋白的鉴定与 Tau23 的检测方法相同.

1.2.3 Tau 蛋白活性的鉴定. 根据国际同行普遍采用的“微管蛋白聚集”法^[19-20], 在微管蛋白聚集时, 观察 350 nm 处紫外吸收值的变化, 以此检测 Tau 蛋白的活性. 用 Mes-EDTA 缓冲液配制微管蛋白溶液(0.4 g/L), 20℃ 水浴 5 min 后迅速提高温度至 37℃, 加入终浓度为 1 mmol/L GTP, 在紫外分光光度计上测定 350 nm 的吸光度值(Hitachi UV-2010, Japan). 相同条件下, 测定微管蛋白(终浓度 0.4 g/L)与不同浓度 Tau 蛋白(终浓度 0.1 g/L, 0.2 g/L)混合溶液在 350 nm 处的吸光度值(Hitachi UV-2010, Japan).

1.2.4 甲醛温育 Tau 蛋白的鉴定. 将人类神经 Tau 蛋白(终浓度 20 $\mu\text{mol/L}$)与 0.5 % 甲醛溶液(50 mmol/L PBS, pH 7.3)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 24 h. 取样(10 $\mu\text{l/lane}$)通过 12% SDS-PAGE 进行检测, 并测定蛋白质活性.

1.2.5 ThT 荧光光谱、Congo Red 吸收谱、光散射、CD 光谱的测定. 甲醛温育后的 Tau 蛋白(终浓度 2 $\mu\text{mol/L}$)与 ThT(终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)在 50 mmol/L PBS(pH 7.3)中温育(37 $^{\circ}\text{C}$, 15 min), 取样进行荧光光谱扫描(λ_{ex} =450 nm) (Hitachi -4500 荧光分光光度计, Japan). 相同条件下, 将样品与 Congo Red (终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$)反应, 并测定反应物的吸收光谱(400 nm~600 nm) (Hitachi UV -2010, Japan). 固定激发与发射波长(480 nm), 测定甲醛温育后未加染料样品的散射光强度. 此外, 对样品的圆二色谱进行测定(195 nm~250 nm) (Jasco J-720 CD 光谱仪, 分光株式会社, Japan). 未经甲醛温育的 Tau 蛋白作为对照, 必要时采用 BSA 作为蛋白质对照.

1.2.6 细胞培养及活力检测. 人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 在 DMEM/F12 培养基(含 10 % 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养. 将增殖后的细胞消化并种植于 96 孔培养板中, 10 000 个 / 孔. 实验组于培养基中加入经 0.5% 甲醛温育 24 h 后的 Tau 蛋白(超滤除去甲醛, Tau 蛋白终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$), 继续培养 48 h. 培养过程中, 每 24 h 取细胞用 MTT 法进行活力检测. 具体方法: 吸去培养基, 每孔加入 100 μl 1 g/L 的 MTT 溶液(50 mmol/L PBS, pH 7.3, 0.22 μm 滤膜过滤), 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 培养箱中避光孵育 30 min. 吸去 MTT 溶液, 每孔加入 100 μl DMSO, 置于摇床中(150 r/min, 37 $^{\circ}\text{C}$)孵育 10 min. 测定 560 nm 处的吸光度值(Multiskan MK3 酶标仪, Thermo, USA).

1.2.7 AFM 检测 Tau 蛋白聚集物. 将甲醛温育后的 Tau 蛋白稀释至 1~10 nmol/L(50 mmol/L PBS, pH 7.3), 取 10 μl 样品滴加到新揭开的云母表面(室温), 放置 1 min. 用 200 μl 双蒸水冲洗 3 次, 氮气吹干 3 min. 应用 Nanoscope MultiMode III a (USA)系统进行扫描(tapping model). 由于甲醛温育后的 Tau 蛋白主要为似球状, 因此本文采用记录颗粒半高宽的方式来分析其尺寸的变化, 分析软件采用 Nanoscope 6.11r1 software.

2 结 果

2.1 Tau 蛋白在甲醛溶液中形成具有细胞毒性的淀粉样聚集物

如图 1a 所示, 分离纯化的 Tau23 蛋白在 SDS-PAGE 上为单一条带(约 50 ku). 采用诱导微管蛋白聚集的方法测定 Tau 蛋白的生物活性, 即检测 350 nm 光吸收值的变化, 其结果显示 Tau 蛋白的活性与 Tseng 等^[19]报道的一致(图略).

将分离纯化的 Tau 蛋白与 0.5% 甲醛温育, 24 h 后蛋白质样品发生明显的聚集(图 1a), 形成二聚体和多聚体. 在相同条件下, 未经甲醛处理的 Tau 蛋白无明显聚集现象. 光散射实验结果也证实了甲醛温育的 Tau 蛋白(Tau-FA), 其 480 nm 光散射强度显著升高(图 1e). 未经甲醛温育的 Tau 蛋白(Tau alone)溶液的光散射强度也有一定程度的上升(相关解释见“讨论”). 将甲醛温育的 Tau 蛋白(终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)加入到 SH-SY5Y 细胞系, 培养 24 h 后的 MTT 吸收值与对照相比, 降低至 60% 左右, 48 h 后降低至 45% 左右(图 1b). 该结果提示, 甲醛温育的 Tau 蛋白产生了明显的细胞毒性.

ThT 染色结果表明(图 1c), Tau 与甲醛温育产物的 ThT 特征荧光明显增加, 而对照样品 ThT 荧光的增加却不明显, 提示甲醛可以诱导 Tau 蛋白形成淀粉样聚集物. 刚果红染色进一步证明, Tau-FA 蛋白聚集物具有淀粉样性质(图 1d). 然而, 圆二色谱的测定结果显示, Tau-FA 蛋白的二级结构变化相对不明显.

2.2 甲醛溶液中 Tau 蛋白聚集物的形态

通过原子力显微镜(AFM)观察, 甲醛可以诱导 Tau 蛋白形成“孔道样”聚集物, 该聚集物的中央似孔状结构(图 2). 聚集物的大小为(42.35 ± 2.61) nm, 所形成的孔径约为(8.94 ± 1.62) nm. “孔道样”聚集物占全部颗粒数的 18%~22% (表 1). 仅从 AFM 展示的形态来看, 一个“孔道样”聚集物含有多少个 Tau 蛋白分子尚不确定. 作者认为构成“孔道样”聚集物的 Tau 蛋白分子数可能是随机的. Tau 蛋白单独温育后, 在 AFM 下表现为纤维状和无定形聚集物, 与天然 Tau 蛋白的形态有明显差别(图 2). 自聚集 Tau 蛋白纤维直径为(18.32 ± 2.14) nm, 与报道的配对螺旋样纤维(paired helical filaments, PHFs)类似^[20]. 作为对照蛋白的 BSA, 未观察到类似的聚集现象(图 2d), 即甲醛温育前后的 BSA 颗粒半高宽无显著性差异(表 1).

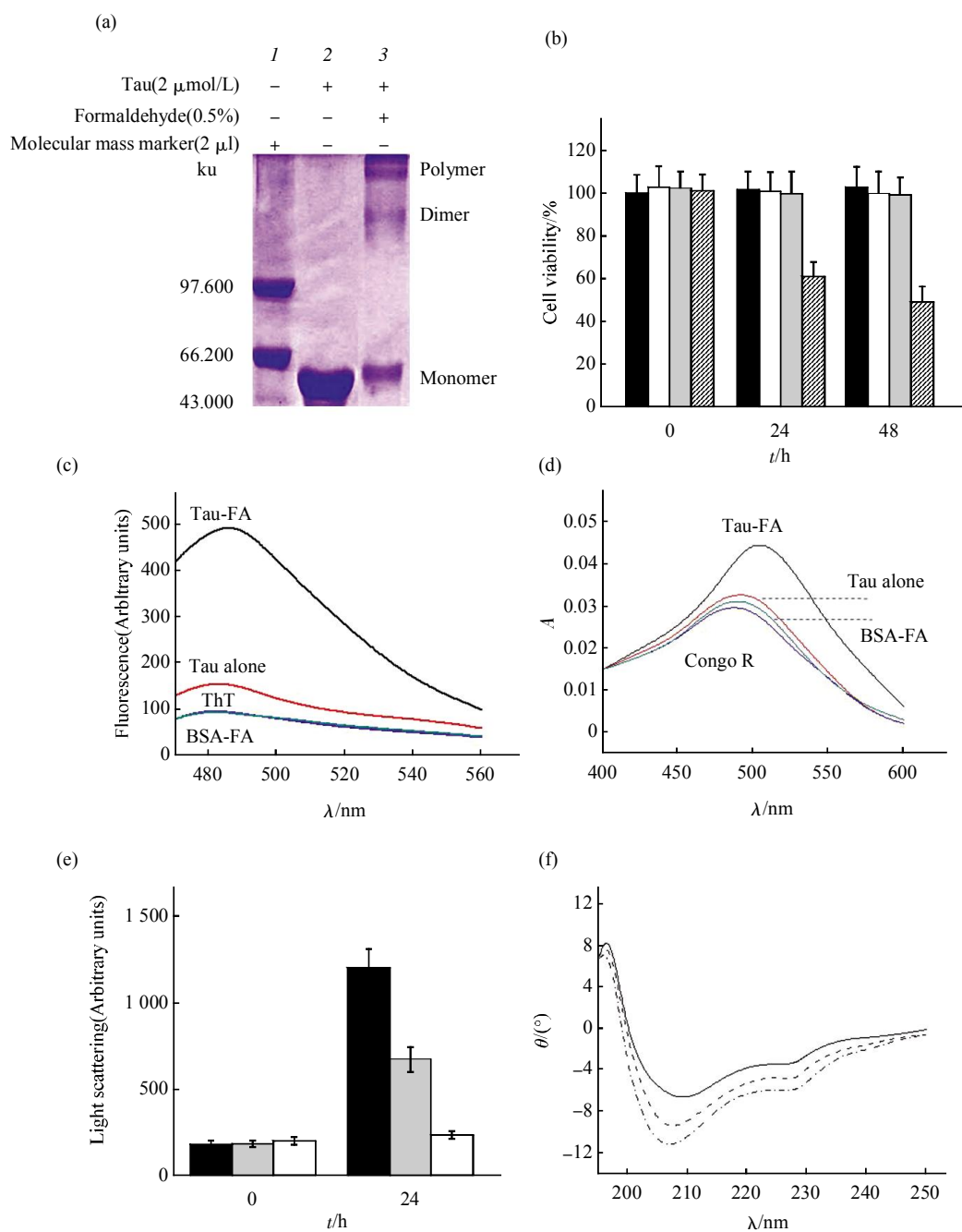


Fig. 1 Characteristics of Tau protein aggregates in the presence of formaldehyde

(a) Tau protein (final concentration is 20 $\mu\text{mol/L}$) was incubated with 0.5% formaldehyde in 50 mmol/L phosphate buffer (pH 7.3) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h, followed by measurements with 12% SDS-PAGE. (b) MTT for cell viability. ■: Native Tau as control; □: FA-treated BSA; ▒: Self-aggregated Tau; ▨: FA-treated Tau. (c) ThT fluorescence. (d) Congo red staining. (e) Light scattering. ■: Tau+FA; ▒: Tau alone; □: BSA+FA. (f) CD. —: FA-treated Tau; ----: Self-aggregated Tau;: Native Tau. Protocols in detail were under **Materials and methods**.

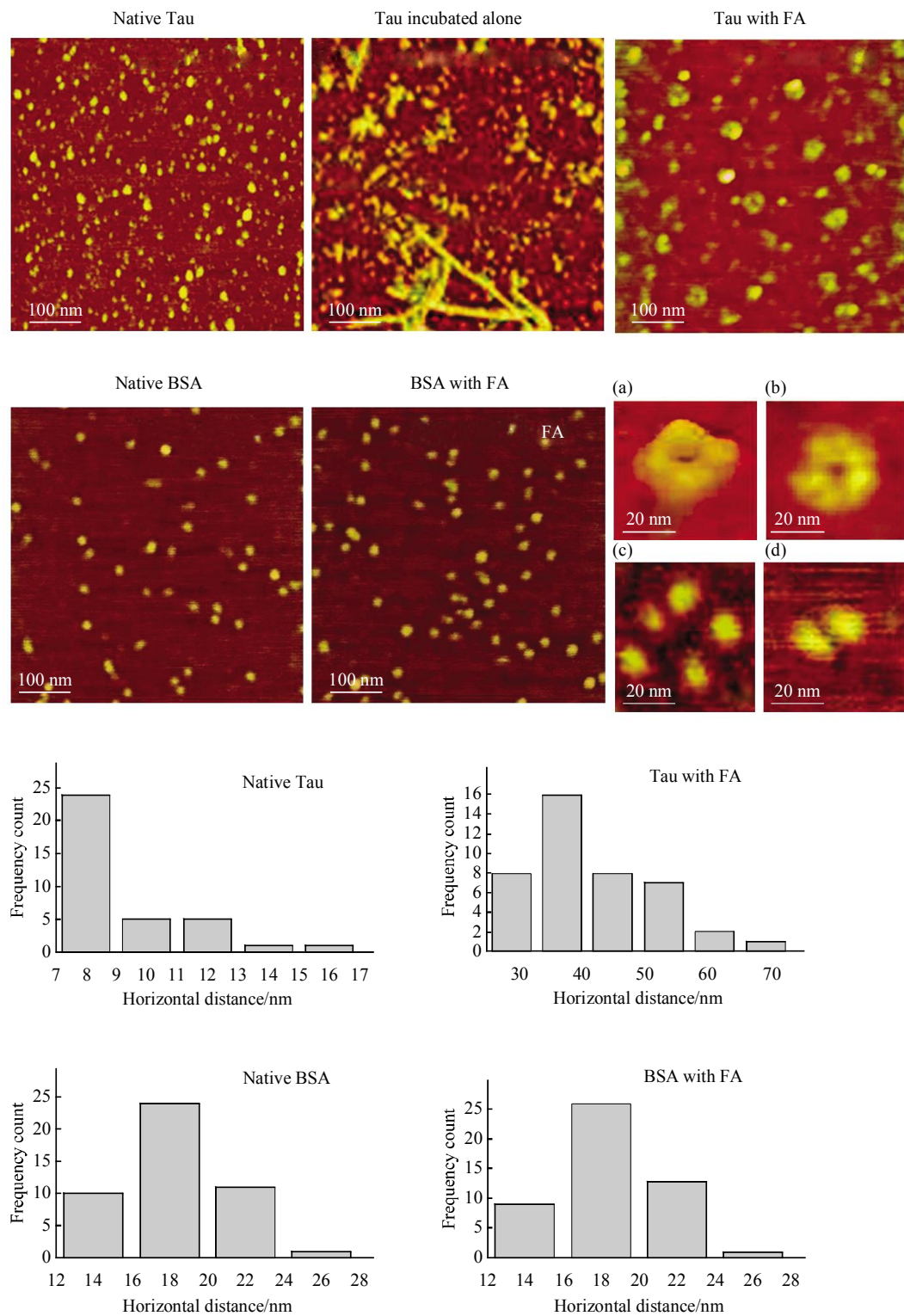


Fig. 2 Aggregation of Tau protein in the presence of formaldehyde

Incubation conditions were as for Figure 1. Atomic force microscopy (AFM) was employed to observe the protein aggregates. Aliquots were taken and diluted to the desired concentrations using the phosphate buffer, samples were dropped onto mica surfaces and dried with nitrogen before observed under AFM. Panels and Bars were as indicated. Two pore-like aggregates in the presence of 0.5 % formaldehyde (panel a, three dimensional image and panel b) were shown in a high magnified image. Native Tau protein (panel c) and BSA (panel d) were used as controls. Under the AFM images, the frequency counts of the horizontal diameters (explained in the text) of the protein particles in the same image were measured as indicated.

Table 1 Sizes of Tau protein aggregates in the presence of formaldehyde

	Particle size/nm	Pore diameter/nm	Filament diameter/nm	Ratio of pore-like aggregates/%
Formaldehyde-treated Tau	42.35 ± 2.61	08.94 ± 1.62	—	20.13 ± 2.64
Self-aggregated Tau	—	—	18.32 ± 2.14	—
Native Tau	08.62 ± 1.26	—	—	—
Formaldehyde-treated BSA	17.34 ± 2.43	—	—	—
BSA	16.68 ± 2.25	—	—	—

Ratio of pore-like aggregates was in $N_{por}/(N_{por} + N_{par})$ where N_{por} was the number of pore-like aggregates and N_{par} was the number of particles. It was difficult to measure self-aggregated Tau because of the amorphous aggregates. Measurements of these sizes were at least 100 particles ($n=100$) under the AFM.

3 讨 论

3.1 Tau 蛋白在溶液中温育自发形成纤维状结构

Schweers 等^[2]认为, Tau 蛋白在溶液中呈“worm-like”柔性构象. Goedert 等^[21]观察到, Tau 在体外形成的纤维状结构与老年痴呆病人脑内形成的 PHFs 基本相似. 因此, 在体外研究 Tau 蛋白的错误折叠和聚集机制, 可以为解释体内神经纤维缠结形成的原因提供重要的信息. 如本文图 2 所示, 作为对照的 Tau 蛋白在没有甲醛存在的情况下, 37℃ 温育 24 h 之后, 可以观察到自发形成的纤维状结构, 这与 Goedert 等观察到的现象一致. 但在相同条件下, 未见自发形成的 Tau 蛋白聚集物产生“孔道样”结构, 其细胞毒性也不明显. 甲醛温育的 Tau 蛋白, 不但发生明显聚积, 并且能够产生“孔道样”结构, 同时具有明显的细胞毒性. 本实验室前期的工作也证实了甲醛温育的 Tau 蛋白具有明显的神经细胞毒性^[16].

3.2 甲醛诱导 Tau 蛋白形成“融球状”淀粉聚集物

尽管本实验室前期报道了一定浓度的甲醛可以导致 Tau 蛋白错误折叠并形成球状聚集物^[14-16], 此外, 经一定浓度核糖温育的蛋白质也可以聚集成球状淀粉结构^[23-26]. 但是所形成的似球状聚集物的性质尚未阐明. 在此, 作者认为甲醛诱导 Tau 蛋白错误折叠的似球状聚集物为“融球状”(molten globules), 并具有淀粉样性质. 提出这个观点的依据是: a. Tau-FA 的生物学活力完全丧失; b. Tau23 与甲醛温育 24 h 后, 蛋白质的二级结构未见有明显改变; c. AFM 可以直接观察到 Tau-FA 在云母膜表面形成球状聚集物; d. 经过甲醛温育,

Tau23 的 ThT 和 Congo red 染色呈阳性反应, 说明甲醛诱导的蛋白质结构改变主要发生在二级结构以上并具有淀粉样性质. 因此, 可以推测, 甲醛诱导 Tau 蛋白错误折叠所形成的“融球状”聚集物可能就是其细胞毒性物质. 需要说明的是, 在 Tau40 (4R-tau) 与甲醛温育的实验中, 虽然检测到 β 折叠有一定的增加, 但其二级结构的改变并不明显^[16]. Tau23(3R-tau)的 CD 谱与 Tau40(4R-tau)基本类似, 同样未显示出二级结构的显著变化.

3.3 甲醛诱导 Tau 蛋白形成“孔道样”聚集结构

为什么“融球状”聚集物具有细胞毒性? 这是一个复杂的生物学基础问题. 目前有关蛋白质错误折叠产物导致细胞代谢障碍和死亡的机制, 大致可以概括为两个方面, 即激活“死亡通路”^[3-4]和“非特异性膜孔道损伤”学说^[5-9]. 就本文在体外获得的结果来看, 一定浓度的甲醛可以诱导 Tau 蛋白产生“融球状”聚集物, 并且部分产物形成了“孔道样”聚集结构. 同时, 甲醛诱导的蛋白质聚集物具有明显的细胞毒性. 而作为对照组的 Tau 蛋白和 BSA 却未见相同结构或细胞毒性.

因此, 作者推测, 甲醛诱导的 Tau 蛋白“孔道样”聚集结构, 可能引起细胞膜的损伤. 如图 2 所示, 甲醛导致 Tau 蛋白错误折叠, 形成“融球状”聚集物, 部分蛋白质分子相互作用形成“孔道样”聚集结构. 然而, 需要声明的是, 尽管本文作者观察到了甲醛可以诱导 Tau 蛋白错误折叠并产生“孔道样”聚集结构, 但是每一个“孔道样”聚集结构含有多少个 Tau 蛋白分子尚不明确, 需要进一步研究.

3.4 要证明“孔道样”聚集物导致细胞损伤尚有许多工作要做

尽管 Quist 博士等证明了一些淀粉样肽可以形

成“孔道样”聚集结构,也采用电生理的方法,证明了这些“孔道样”聚集物可以导致膜内外由 K^+ 浓度差所形成的电位发生改变^[9],但是 Tau 蛋白形成“孔道样”聚集结构的现象还未见报道.作者提出了“内源性甲醛慢性损伤可能是散发性老年痴呆发生发展过程中的重要机制”的假设^[11-12].甲醛作为诱导剂与 Tau 蛋白作用并使后者形成“孔道样”结构,该现象的发现为这一假设提供了一定的证据.但是,要阐明“孔道样”聚集物能否导致细胞膜的损伤,就需要验证“孔道样”聚集物是否能够插入细胞膜中、引起离子在膜内外分布的改变,进而导致膜电位的改变.因此,要证明“孔道样”聚

集结构导致细胞离子代谢紊乱、甚至死亡,还有许多工作要做.另外,在诱导 Tau 蛋白错误折叠并聚集的实验中,作者采用的甲醛溶液浓度达到了 0.5%,该浓度超过了甲醛对人类中枢神经细胞的致死量.因此,内源性甲醛在体内的异常升高,是否能够导致“孔道样”聚集结构的形成尚有待于进一步证实.正如图 3 所示,作者在“pore-like aggregates”与“membrane pores”之间加了一个“?”号.然而,作者观察到了甲醛能够诱导 Tau 蛋白形成“孔道样”聚集结构,该工作为阐明甲醛诱导的蛋白质错误折叠产物的细胞毒性机制提供了新的思路.

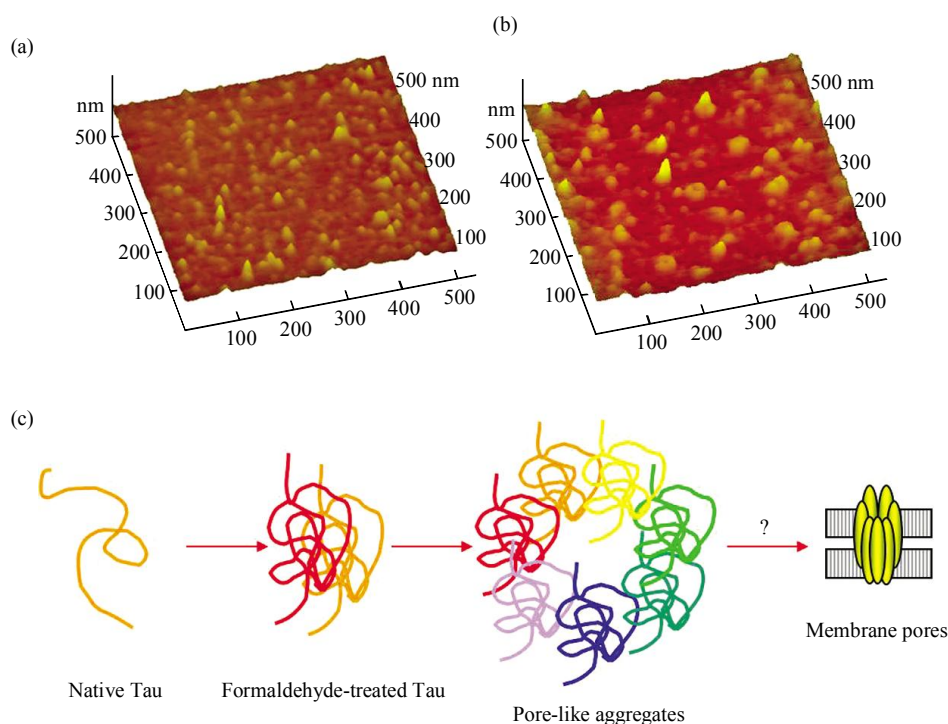


Fig. 3 A putative scheme for Tau protein aggregation in the presence of formaldehyde

Conditions were mentioned in **Figure 2**. Three dimensional atomic force microscopic images for native Tau(a) and formaldehyde-treated Tau(b) were shown. Tau protein misfolded in the presence of formaldehyde and then aggregated. Part of misfolded Tau protein assembled into pore-like aggregates. It suggested that the pore-like aggregates may interact with cell membrane where they could form aspecific pores disrupting cellular homeostasis (c).

致谢 感谢龚成新博士(New York Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, USA)馈赠表达人类神经 Tau 异构体 tau23 的菌株 BL21. 感谢中国科学院生物物理研究所感染与免疫中日联合实验室的阎锡蕴博士提供人神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞系. 感谢中国科学院生物物理研究所蛋白质技术平台的王娅老师在原子力显微镜技术方面提供的帮助.

参 考 文 献

- [1] 周筠梅. 蛋白质的错误折叠与疾病. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(6): 579
Zhou J M. Prog Biochem Biophys, 2000, 27(6): 579
- [2] 赫荣乔, 陈 岚, 柯 莎, 等. 多因素异常修饰导致体内蛋白质选择性错误折叠和功能丧失的假设. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(10): 940-941

- He R Q, Chen L, Perrett S, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2006, **33**(10): 940-941
- [3] Nakamura T, Lipton S A. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. Apoptosis, 2009, **14**(4): 455-468
- [4] Gu Z, Nakamura T, Lipton S A. Redox reactions induced by nitrosative stress mediate protein misfolding and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. Mol Neurobiol, 2010, **41**(2-3): 55-72
- [5] Quist A, Doudevski I, Lin H, *et al.* Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, **102**(30): 10427-10432
- [6] Lin H, Bhatia R, Lal R. Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. FASEB J, 2001, **15**(13): 2433-2444
- [7] Lal R, Lin H, Quist A P. Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm. Biochim Biophys Acta-Biomembranes, 2007, **1768**(8): 1966-1975
- [8] Metcalfe M J, Figueiredo-Pereira M E. Relationship between Tau pathology and neuroinflammation in Alzheimer's disease. Mount Sinai J Medicine, 2010, **77**(1): 50-58
- [9] 盛之玲, 曲梅花, 何海进, 等. HeLa、HEK293、SH-SY5Y 细胞中的 Tau 蛋白. 生物化学与生物物理进展, 2008, **35**(12): 1364-1370
- Sheng Z L, Qu M H, He H J, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2008, **35**(12): 1364-1370
- [10] Lansbury P T, Lashuel H A. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. Nature, 2006, **443**(7113): 774-779
- [11] 李芳序, 卢静, 徐亚杰, 等. 老年性痴呆发病过程中内源性甲醛慢性损伤机制. 生物化学与生物物理进展, 2008, **35**(4): 393-400
- Li F X, Lu J, Xu Y J, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2008, **35**(4): 393-400
- [12] He R Q, Tong Z Q, Zhang J L, *et al.* Endogenous formaldehyde is related to sporadic Alzheimer's disease. Biophysical J, 2009, **96**(3): 89a
- [13] Tong Z Q, Zang J L, Luo W H, *et al.* Urine formaldehyde level is inversely correlated to mini mental state examination scores in senile dementia [J/OL]. Neurobiol Aging (2009-10-29) [http://linkinghub.elsevier.com\(DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2009.07.013\)](http://linkinghub.elsevier.com(DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2009.07.013))
- [14] Nie C L, Zhang W, Zhang D, *et al.* Changes in conformation of human neuronal tau during denaturation in formaldehyde solution. Protein Pept Lett, 2005, **12**(1): 75-78
- [15] Nie C L, Wei Y, Chen X Y, *et al.* Formaldehyde at low concentration induces protein Tau into globular amyloid-Like aggregates *in vitro* and *in vivo*. PloS ONE, 2007, **2**(7): e629
- [16] Nie C L, Wang X S, Liu Y, *et al.* Amyloid-like aggregates of neuronal tau induced by formaldehyde promote apoptosis of neuronal cells. BMC Neurosci, 2007, **8**: 9(DOI:10.1186/1471-2202-8-9)
- [17] Lee G, Newman S T, Gard D L, *et al.* Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. J Cell Science, 1998, **111** (Pt21): 3167-3177
- [18] Williams R C Jr, Lee J C. Preparation of tubulin from brain. Methods Enzymol, 1982, **85**(Pt B): 376-385
- [19] Tseng H C, Lu Q, Henderson E, *et al.* Phosphorylated tau can promote tubulin assembly. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, **96**(17): 9503-9508
- [20] Smith M J, Crowther R A, Goedert M. The natural osmolyte trimethylamine N-oxide (TMAO) restores the ability of mutant tau to promote microtubule assembly. FEBS Lett, 2000, **484** (3): 265-270
- [21] Goedert M, Jakes R, Spillantini M G, *et al.* Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. Nature, 1996, **383**(6600): 550-553
- [22] Schweers O, Schonbrunn-Hanebeck E, Marx A, *et al.* Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. J Biol Chem, 1994, **269** (39): 24290-24297
- [23] Chen L, Wei Y, Wang X Q, *et al.* d-Ribosylated Tau forms globular aggregates with high cytotoxicity. Cell Mol Life Sci, 2009, **66**(15): 2559-2571
- [24] Chen L, Wei Y, Wang X, *et al.* Ribosylation rapidly induces alpha-synuclein to form highly cytotoxic molten globules of advanced glycation end products. PloS ONE, 2010, **5**(2): e9052
- [25] Wei Y, Chen L, Chen J, *et al.* Rapid glycation with D-ribose induces globular amyloid-like aggregations of BSA with high cytotoxicity to SH-SY5Y cells. BMC Cell Biology, 2009, **10**: 10 (DOI:10.1186/1471-2121-10-10)
- [26] 盛之玲, 刘延英, 陈岚, 等. 非酶糖基化对 α -synuclein 分子构象的影响. 生物化学与生物物理进展, 2008, **35**(10): 1202-1208
- Sheng Z L, Liu Y Y, Chen L, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2008, **35**(10): 1202-1208

Pore-like Aggregates of Tau Protein Induced by Formaldehyde*

NAQVI Sajjad Haider^{1,3)}, WANG Wei-Shan²⁾, MIAO Jun-Ye^{1,3)}, HE Rong-Qiao^{1,3)}**

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ Beijing Hospital of Elderly, Beijing 100095, China; ³⁾ Graduate University of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Though the hypothesis of "aspecific amyloid ion channels" has been proposed by Lin, *et al* (University of California, Santa Barbara) to explain the mechanism of metabolic dysfunction and cell death during protein conformational diseases, the "pore-like" aggregates of misfolded neural Tau have not been observed. Revulsants involved in the formation of "pore-like" aggregates have not been found yet. According to the hypothesis "chronic impairment resulted from abnormally-increased endogenous formaldehyde is one of the important risk factors related to sporadic senile dementia", formaldehyde has been utilized to incubate with Tau protein resulting in amyloid-like deposits with marked cytotoxicity. Under the experimental conditions, 0.5% formaldehyde-treated Tau could form "pore-like" aggregates. These results may deliver a novel approach to study the mechanism of cellular metabolic disturbance, even cell death, which is induced by formaldehyde-treated neural Tau.

Key words Tau protein, formaldehyde, misfolding, pore-like aggregates, neurodegeneration, chronic impairment, sporadic Alzheimer's diseases

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00375

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2006CB500703, 2010CB912303), Knowledge Innovation Project of CAS(KSCX2-YW-R-256 and CAS-KSCX2-YW-R-119).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64889876, E-mail: rongqiaohe@gmail.com

Received: July 16, 2010 Accepted: October 21, 2010