

氧化应激对溶酶体储存与转运甲醛的影响*

陈茜茜^{1,2)} 苏 涛¹⁾ 赫英舸¹⁾ 赫荣乔^{1)**}

(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⁾ 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 内源甲醛代谢失调被认为是导致阿尔茨海默病的危险因素之一, 甲醛蓄积会引起神经细胞的死亡和认知功能的降低. 研究表明, 细胞内甲醛分布于溶酶体内, 而溶酶体功能异常与神经退行性疾病密切相关. 本文采用甲醛特异荧光探针, 在氧化应激条件下, 检测到小鼠脑微血管内皮细胞株 bEnd.3 和小鼠神经瘤母细胞株 N2a 溶酶体内甲醛明显升高; 在慢性脑低灌注大鼠动物模型中, 其脑神经细胞的溶酶体内甲醛也升高($P < 0.01$); LeuLeuOMe 处理 bEnd.3 细胞, 使其溶酶体膜通透性增加, 导致细胞内甲醛蓄积, 而胞外甲醛降低. 以上结果证明, 溶酶体具有储存和转运甲醛的功能, 如果溶酶体出现结构与功能的异常, 会导致甲醛代谢失调, 造成认知损害.

关键词 内源甲醛探针, 溶酶体, 双侧颈动脉不全结扎, 氧化应激

学科分类号 Q2, Q5

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0050

甲醛是一种无色、有强烈刺激性气味的气体. 甲醛不仅广泛存在于空气中, 也是所有生物, 包括细菌、植物、动物自身细胞代谢的产物, 生物体内检测到的甲醛, 被称之为“内源甲醛”. Li 等^[1]发现, 小鼠处于气态甲醛蒸汽环境中, 小鼠出现明显的抑郁与焦虑行为, 认知能力明显下降. Kilburn 等^[2]观察到, 在解剖和病理实验室长期工作的技术人员, 由于长期接触福尔马林(37%甲醛), 在退休后发生痴呆的概率要显著高于同龄对照. 王佳琬等^[3]观察到, 老年人(> 65 岁)经历大型手术, 发生手术后认知功能障碍(post operative cognitive dementia, POCD)的概率会显著增加, 同时检测到发生 POCD 的患者尿甲醛浓度要显著高于未发生 POCD 的患者. 杨美凤等^[4-5]采用低剂量甲醇喂食年轻猕猴(3~5 岁), 在体内, 甲醇在醇脱氢酶的作用下, 转化为甲醛, 检测到猴脑脊液甲醛浓度显著升高. 长期(2~3 年)饲喂甲醇后, 在猕猴脑内诱导出了老年斑(A β 淀粉样沉积), 同时发现异常磷酸化神经 Tau 蛋白在神经细胞内的聚积. 通过行为学检测发现, 猕猴表现出学习记忆能力下降.

本实验室曾提出“甲醛应激”假说^[6], 阐述了内源甲醛代谢失调对人认知功能损害的机制. 甲醛应激的发生主要是由于内源甲醛的代谢失衡, 内源甲醛在体内的过度积累, 引发蛋白质异常修饰、错

误折叠、分子聚积, 出现膜通透性改变、DNA 断裂, 甚至细胞死亡. 以上效应不断累积, 造成神经细胞不断丢失和认知损害. 最近, Tang 等^[7]采用荧光探针观察到甲醛分布于溶酶体, 为进一步探索内源甲醛在细胞内的代谢提供了有用的工具.

Wyss-Coray 等^[8]认为溶酶体功能异常与神经退行性疾病密切相关. 随着衰老进程的增加, 脑内溶酶体结构出现异常, 导致体内错误折叠的蛋白质不能及时代谢而在体内蓄积. 阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)患者脑内有两种典型的生理特征, 分别为由淀粉样(A β)沉淀蓄积导致的老年斑和 Tau 蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结^[9]. Nixon 等^[10]发现, 老年斑内存在大量溶酶体水解酶, 表明溶酶体功能的损害对 AD 早期进展具有贡献. Bagnolia 等^[11]证明溶酶体内特异的组织蛋白酶 D、组织蛋白酶 E 参与 γ 分泌酶活性的调节, 而 γ 分泌酶是产生 A β 的关键酶. 同时, 溶酶体也是细胞内降解淀粉样前体物质的关键细胞器. Mueller-Steiner 等^[12]敲除了小鼠组织蛋白酶 B 后发现, 小鼠脑内 A β 1-42 水平显著升高, 并出现 AD

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2012CB911004).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64889876, E-mail: herq@ibp.ac.cn

收稿日期: 2017-02-16, 接受日期: 2017-04-19

症状. 研究表明, 在异常磷酸化 Tau 蛋白的降解过程中, 溶酶体发挥了重要的作用^[13]. 甲醛是 AD 发生发展中的危险因素, 可以诱导蛋白质的错误折叠^[6]. 为了探究甲醛代谢异常导致的认知损伤是否与溶酶体相关, 本文采用甲醛的荧光探针, 探索了氧化应激条件下, 内源甲醛在细胞内的动态定位.

1 材料与方法

1.1 材料

材料: 小鼠脑微血管内皮细胞株 bEnd.3 由中国科学院生物物理研究所阎锡蕴院士赠送, 小鼠神经瘤母细胞株 N2a 购自中国医学科学院基础医学研究所(协和细胞库), Sprague Dawley(SD)大鼠购自维通利华实验动物技术有限公司(北京).

试剂: 加州大学伯克利分校 Christopher J.Chang 教授赠送了甲醛荧光探针(FAP-1)^[14], 乙腈(液相色谱级纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 2,4-二硝基苯肼(分析纯, 北京化学试剂研究所), 甲醛(分析纯, 美国 Sigma 公司), 三氯乙酸(分析纯, 西陇化工股份有限公司), LeuLeuOMe(分析纯, 美国 Sigma 公司), DMEM 细胞培养基(美国 Invitrogen 公司), 胎牛血清(奥地利 PAA 公司). BBS 缓冲液(136.9 mmol/L NaCl, 5.37 mmol/L KCl, 1.26 mmol/L CaCl₂, 0.81 mmol/L MgSO₄, 0.44 mmol/L KH₂PO₄, 0.335 mmol/L Na₂HPO₄, 10 mmol/L PIPES; pH 7.2).

1.2 内源甲醛荧光探针检测方法

bEnd.3 细胞. bEnd.3 培养于 35 mm 玻底细胞培养皿(细胞密度: 1×10^5 / 皿), DMEM 培养基(含 10%胎牛血清), 37℃, 5% CO₂ 培养箱中. 加入终浓度为 1 mmol/L 的 LeuLeuOMe, 处理 0、6、12 h 后, 用含有甲醛荧光探针 FAP-1(终浓度为 10 μmol/L)的 BBS 缓冲液替换 DMEM 培养基, 37℃ 30 min, 再用无 FAP-1 探针的 BBS 缓冲液替换, 在德国 ZEISS LSM 700 激光共聚焦显微镜下观察. FAP-1 探针的激发波长 633 nm, 发射波长 688 nm. Mito Tracker Green FM(美国 Cell Signaling 公司)染线粒体, 激发波长 490 nm, 发射波长 516 nm. Lyso Tracker Green DND-26(美国 Cell Signaling 公司)染溶酶体, 激发波长 504 nm, 发射波长 511 nm.

N2a 细胞. N2a 除了用 MEM 培养基(含 10%胎牛血清)培养外, 其他操作步骤与 bEnd.3 细胞相同. N2a 细胞培养基中加入 50 g/L Rosup 溶液,

37℃ 30 min, 用含有活性氧荧光探针 DCFH-DA 的 BBS 缓冲液替换 DMEM 培养基, 37℃ 30 min, 再用无探针的 BBS 缓冲液替换, 在德国 ZEISS LSM 700 激光共聚焦显微镜下观察, 激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm.

六孔板内培养 bEnd.3(细胞密度: 1×10^6 / 孔), 无血清 DMEM 培养基中加入终浓度为 1 mmol/L 的 LeuLeuOMe, 处理 0、6、12 h 后, 收集培养基, 用高效液相色谱方法测定培养基内甲醛浓度^[15].

96 孔板内培养 bEnd.3(细胞密度: 1×10^5 / 孔), 无血清 DMEM 培养基中加入终浓度为 1 mmol/L 的 LeuLeuOMe, 处理 0、6、12 h 后, 用含有甲醛荧光探针 FAP-1(终浓度为 10 μmol/L)的 BBS 缓冲液替换 DMEM 培养基, 37℃ 30 min, 再用无 FAP-1 探针的 BBS 缓冲液替换, 用 SpectraMax Paradigm 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)检测细胞 FAP-1 探针荧光强度, 激发波长 633 nm, 发射波长 688 nm. Lyso Tracker Green DND-26(美国 Cell Signaling 公司), 激发波长 504 nm, 发射波长 511 nm.

六孔板内培养 bEnd.3(细胞密度: 1×10^6 / 孔), 装载甲醛荧光探针 FAP-1, 37℃ 30 min, BBS 缓冲液洗涤细胞 3 次. 孔内加入 BBS 缓冲液(FAP 组), 孔内加入 0.1 mmol/L 甲醛溶液(FA 组), 孔内加入 50 g/L Rosup 溶液(ROS 组, S0033-2, 上海碧云天公司). 装载活性氧荧光探针 DCFH-DA(S0033-1, 上海碧云天公司). 37℃ 30 min, BBS 缓冲液洗涤细胞 3 次. 孔内加入 BBS 缓冲液(DCFH 组), 孔内加入 0.1 mmol/L 甲醛溶液(FA 组), 孔内加入 50 g/L Rosup 溶液(ROS 组). FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测, 甲醛荧光探针 FAP-1 激发波长 633 nm, 发射波长 688 nm. 活性氧荧光探针 DCFH-DA 激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm.

1.3 内源甲醛高效液相色谱检测方法

样品制备方法: 大鼠脑组织 1 g, 用溶酶体分离试剂盒(LYSIS01, 美国 Sigma 公司)纯化溶酶体, 取溶酶体溶液或者大鼠尿液 400 μl, 加入 100 μl 三氯乙酸(10%)溶液, 100 μl 的 2,4-二硝基苯肼(1 g/L)和 400 μl 乙腈, 混匀, 60℃水浴 30 min. 水浴结束后, 将样品离心 13 000 r/min, 10 min, 用 0.22 μm 滤膜过滤后, 用高效液相色谱(HPLC)测定.

液相色谱条件: LC-20A 高效液相色谱仪 UV-HPLC, SPD-M20A 二极管阵列检测器(日本岛津

公司). 色谱柱: LiChrospher 100 RP-18(250 mm×4.6 mm×5 μm, 德国 Merck 公司). 流动相: 乙腈: 超纯水=65:35 (v/v), 超声脱气, 流速: 0.8 ml/min, 进样量: 20 μl, 检测波长: 355 nm, 柱温: 35℃.

1.4 动物饲养和给药

SD 大鼠饲养于无病原体的专用 IVC 鼠笼中, 提供 SPF 级大鼠饲料和无菌饮用水; 所有动物实验均依照美国国立卫生研究院(NIH)颁布的实验动物饲养与使用守则, 并经中国科学院生物物理研究所生物医学研究道德委员会的批准(批准号: SYXK2015-10).

慢性脑低灌注动物模型制作: SD 大鼠(约 300 g)做双侧颈动脉不全结扎手术, 制作慢性脑低灌注动物模型. 手术步骤: a. 腹腔注射水合氯醛麻醉后, 将大鼠仰卧, 四肢固定在手术台上, 剪掉颈部毛发; b. 用碘伏消毒后, 在大鼠胸锁乳突肌上进行皮肤切口, 用消毒后镊子分离颈总动脉, 注意将颈

总动脉上的迷走神经剥离; c. 用消毒后的丝线与塑料管不全结扎颈总动脉, 结扎时在血管旁放置直径 0.33 mm 的塑料管, 血管与塑料管一起用丝线结扎紧, 然后取出塑料管, 保证结扎后血管直径一致, 为 0.33 mm; d. 缝合手术伤口. 实验中, 正常对照组(Control)不进行手术; 假手术组(Sham)只分离颈总动脉, 不用丝线结扎颈总动脉; 手术组(Surgery)用丝线结扎颈总动脉.

1.5 统计分析

统计方法运用 SPSS 软件(版本 13.0, 美国 International Business Machines Corporation 公司)单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计.

2 结 果

2.1 内源甲醛在活细胞内主要分布于溶酶体

在 bEnd.3 细胞内, 采用甲醛荧光探针染色(红色, 图 1a), 显示甲醛在细胞内呈颗粒状染色. 与溶酶体染料 Lyso Tracker Green DND-26(绿色,

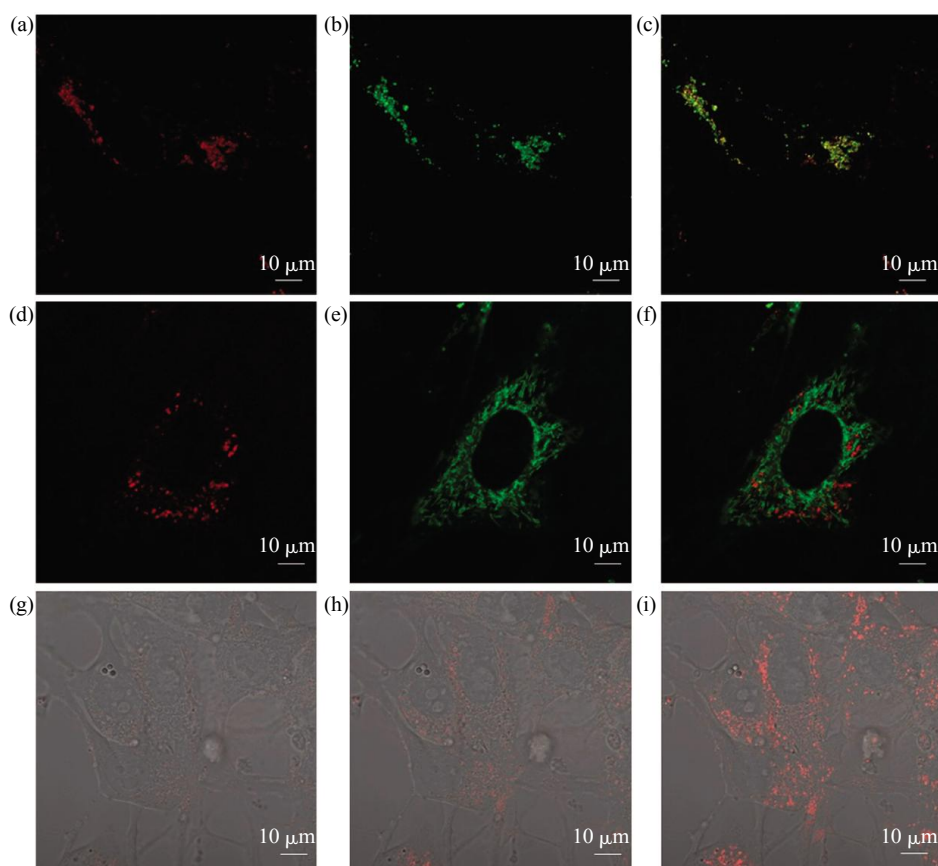


Fig. 1 Fluorescence image of the endogenous formaldehyde in the bEnd.3 cells

(a) Fluorescence image of FAP-1 (red); (b) Fluorescence image of Lyso Tracker Green DND-26 (green); (c) Merged image of panel (a) and panel (b); (d) Fluorescence image of FAP-1 (red); (e) Fluorescence image of Mito Tracker Green FM (green); (f) Merged image of panel (d) and panel (e); (g) Bright-field image of the cells as control; (h) Bright-field image of the cells treated with FAP-1; (i) Bright-field image of the cells treated with FAP-1 and 0.1 mmol/L formaldehyde.

图 1b)相比, 甲醛与溶酶体的信号几乎完全重叠(图 1c). 同样, 采用甲醛荧光探针(红色, 图 1d)与线粒体染料 Mito Tracker Green FM(绿色, 图 1e)对比显示, 甲醛的信号与线粒体几乎完全不重合(图 1f), 提示甲醛不定位于线粒体. 为了进一步阐明甲醛分布于溶酶体内, 作者采用活细胞开展了实验. 活细胞录像显示(视频文件 S1), 在 bEnd.3 细胞培养基中加入甲醛探针 FAP-1, 可以观察到细胞内有少量内源甲醛存在于溶酶体. 进一步的活细胞录像显示(视频文件 S2), 在 bEnd.3 细胞培养基中加入 0.1 mmol/L 甲醛时, 溶酶体内甲醛信号迅速在细胞内增强(图 1g, h, i), 并且甲醛被局限在颗粒状的溶酶体内, 并且随着时间的推移, 溶酶体内的甲醛信号逐渐降低. 相同条件下, N2a 细胞培养

基加入甲醛探针 FAP-1, 同样观察到甲醛信号与溶酶体几乎完全重合(图 S1), 没有加入 FAP-1 的对照组则没有甲醛荧光信号.

LeuLeuOMe 诱导细胞内溶酶体膜的通透性增加, 导致溶酶体内容物的释放. 如图 2 所示, LeuLeuOMe 未处理细胞, 其甲醛(红色荧光)定位于溶酶体. LeuLeuOMe 处理 6 h, 溶酶体出现肿胀, 体积变大. 处理 12 h, 红色荧光强度降低, 呈弥散状分布. 说明 LeuLeuOMe 处理后, 甲醛释放到溶酶体外. 同时, 细胞内甲醛荧光强度(红色)与溶酶体荧光强度(绿色)的比值显著升高(图 3a), 而培养基内甲醛浓度显著降低(图 3b). 说明溶酶体结构的破坏, 使得甲醛无法有效通过胞吐过程运送到细胞外, 而造成甲醛在细胞内蓄积.

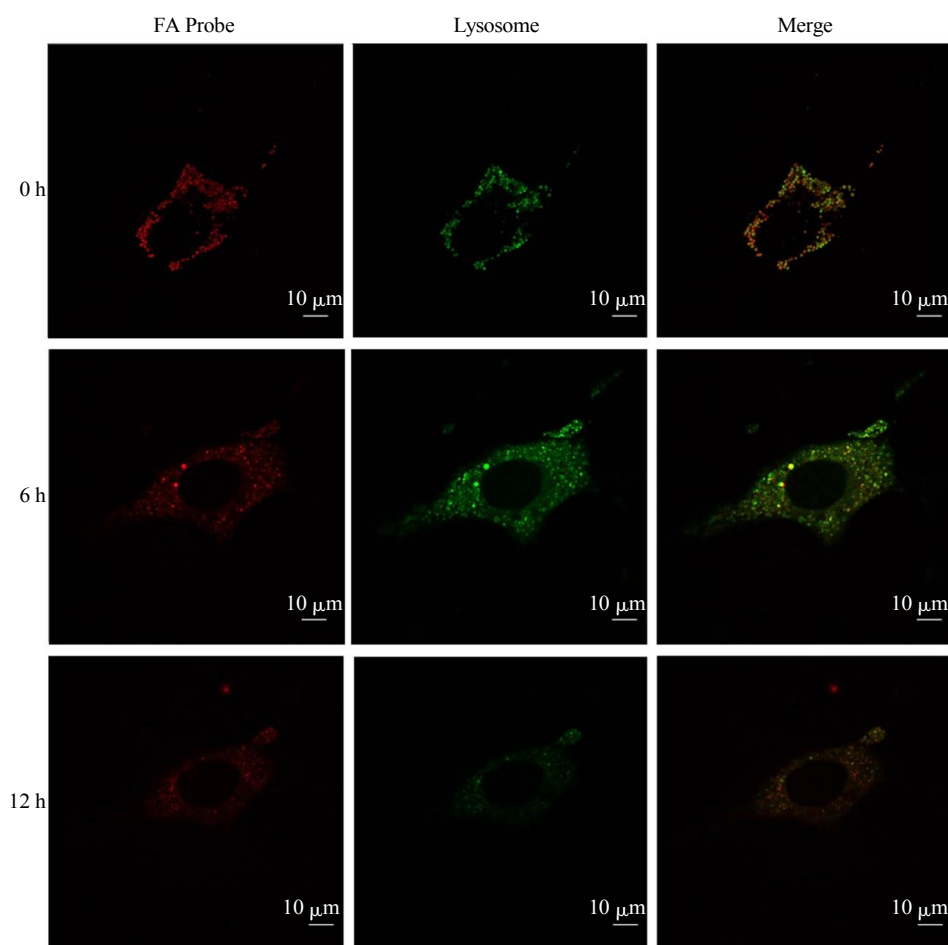


Fig. 2 LeuleuOMe induced lysosomal membrane permeabilization and formaldehyde redistribution in the bEnd.3 cells

bEnd.3 cells were exposed to 1 mmol/L LeuLeuOMe for 12 h. Fluorescence images were recorded by laser confocal microscope. The formaldehyde (red) underwent redistribution from the lysosome (green) to the cytoplasm in a time-dependent manner, with an onset as early as 6 h after LeuLeuOMe administration.

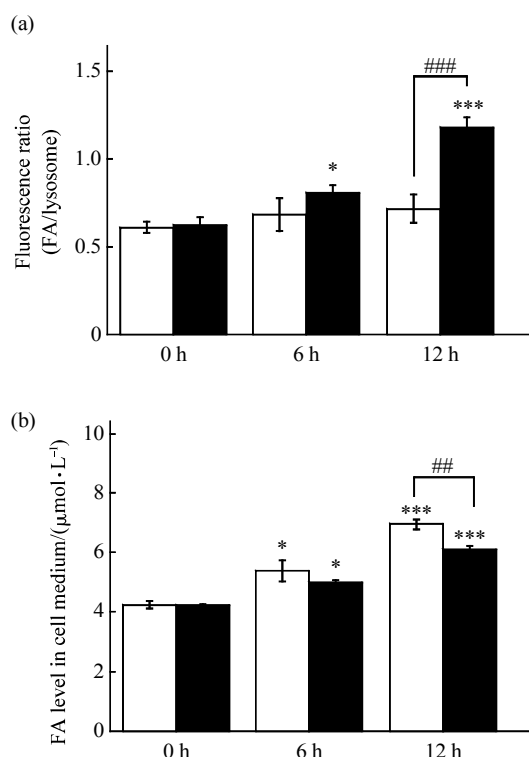


Fig. 3 Changes of formaldehyde in LeuLeuOMe induced bEnd.3 cells assayed by microplate reader

(a) Changes in the fluorescence intensity of formaldehyde-probe in addition of 1 mmol/L LeuLeuMeo to culture medium of bEnd.3 cells. Fluorescence ratio is calculated according to dividing the intensity of formaldehyde by that of lysosome. (b) Changes in the formaldehyde level in cell culture medium. The data were from at least three independent experiments. All values are expressed as the mean $\pm$ SD; FA, formaldehyde. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$. □: Control; ■: LeuLeuOMe.

2.2 ROS 导致溶酶体内甲醛升高

甲醛荧光探针(FAP-1)染色后, 在 bEnd.3 细胞培养基中加入活性氧自由基(ROS), 流式细胞仪检测到内源甲醛显著升高($P < 0.001$, 图 4a). 说明细胞内氧化应激会导致甲醛的产生. 将实验的顺序反过来, 先进行 ROS 探针(DCFH)的染色, 细胞培养基中加入甲醛(0.1 mmol/L), 也可导致 ROS 水平的升高($P < 0.001$, 图 4b). 说明甲醛同样可以引起细胞的氧化应激, 造成细胞的损伤. 在 N2a 细胞培养基中加入活性氧自由基(Rosup), 用激光共聚焦显微镜观测, 溶酶体内甲醇荧光强度(红色, FAP-1 染色)与活性氧自由基荧光强度(绿色, DCFH-DA 染色)都显著高于没有加入 Rosup 的对照组(图 S2). 说明氧化应激会导致神经元溶酶体内甲醛的产生.

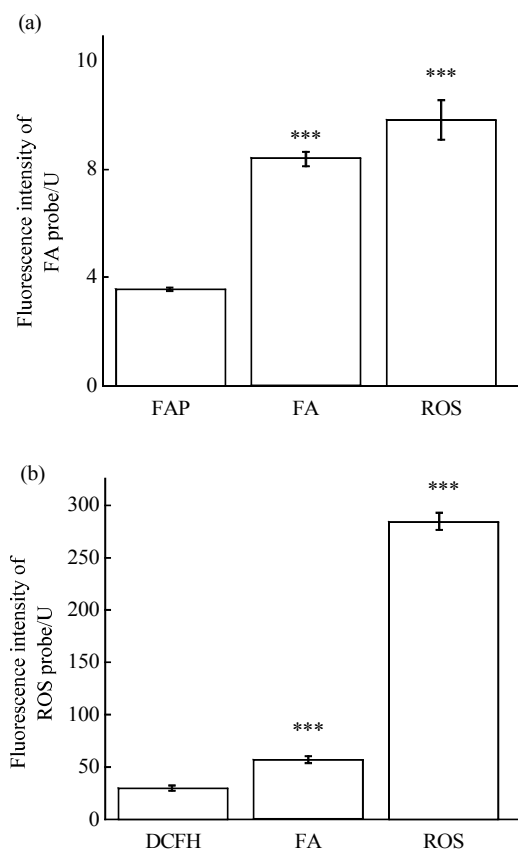


Fig. 4 Relation of formaldehyde and ROS in bEnd.3 cells detected by flow cytometry

(a) Changes in the fluorescence intensity of formaldehyde-probe in addition of ROS to culture medium of bEnd.3 cells; (b) Changes in the fluorescence intensity of ROS-probe in addition of formaldehyde. The data were from at least three independent experiments. All values are expressed as the mean $\pm$ SD; FA, formaldehyde. *** $P < 0.001$.

2.3 慢性脑低灌注动物模型内源甲醛升高

双侧颈动脉不全结扎用来构建慢性脑低灌注动物模型, 导致动物脑部氧化应激损伤^[16-17]. 如表 1 所示, 双侧颈动脉不全结扎手术后 1 天, 大鼠脑组织与血清中参与降解 ROS 的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(还原型/氧化型, GSH/GSSG)都有不同程度的升高. 说明手术后大鼠产生了氧化应激. 将大鼠脑组织细胞内容物分离纯化后测定甲醛浓度, 手术组甲醛浓度显著高于假手术组和对照组(图 5). 同时, 溶酶体内甲醛浓度显著高于细胞质内, 说明内源甲醛主要定位于溶酶体.

Table 1 Oxidative stress levels in SD rats with bilateral carotid occlusion

	Brain			Serum		
	Control	Sham	Surgery	Control	Sham	Surgery
SOD/(U·mg ⁻¹)	1.05 ± 0.02	1.11 ± 0.07	2.05 ± 0.05*	1.45 ± 0.09	2.45 ± 0.12*	2.75 ± 0.10*
GSH/GSSG (fold)	5.57 ± 0.45	5.61 ± 0.34	7.58 ± 0.45*	7.76 ± 1.57	8.77 ± 2.67*	11.05 ± 1.78*

SOD, Superoxide Dismutase; GSH/GSSG, relation reduced/oxidized glutathione. *n* = 12. Data are expressed as the mean ± SD; * *P* < 0.05.

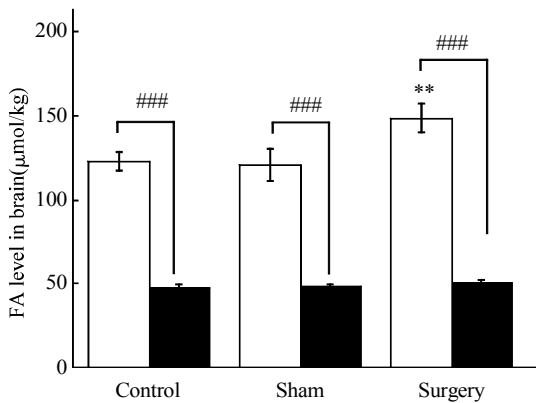


Fig. 5 Formaldehyde levels in the SD rats with bilateral carotid occlusion

Levels of formaldehyde in the lysosome and cytoplasm of brain. *n* = 12. Data are expressed as the mean ± SD; ***P* < 0.01; ###*P* < 0.001. □: Lysosome; ■: Cytoplasm.

3 讨 论

3.1 溶酶体可能是甲醛储存和转运的主要细胞器

我们假设溶酶体可能是细胞储存甲醛的主要细胞器，其理由是：a. 甲醛探针 FAP-1 的信号与溶酶体信号几乎完全重合，而不与线粒体荧光信号重合(图 1)；b. 活细胞录像证实，在生理状态下，甲醛存在于溶酶体内(视频文件 S1)；c. 在细胞培养基内加入甲醛，可以观察到溶酶体内的甲醛信号迅速增强，随时间的推移，逐渐降低；d. 将大鼠脑内的溶酶体分离出来，采用 FAP-1 探针测定其甲醛的结果表明，溶酶体内的甲醛显著高于细胞质(图 3)。因此，甲醛在时间和空间上主要定位于细胞内的溶酶体，该现象提示溶酶体可能是甲醛及其衍生物的储存场所。

Mezey 等^[18]发现溶酶体可以通过泛素蛋白酶体途径降解乙醇脱氢酶，同时二氢睾酮可以加速乙醇脱氢酶的降解从而调控体内乙醇脱氢酶的含量。Cebollero 和 Gonzalez^[19]发现甲醛降解酶 Ald6p

(acetaldehyde dehydrogenase)位于包括自噬小体在内的囊泡内，并认为该酶可以作为检测自噬作用的生物标记物。作者用 LeuLeuOMe 破坏溶酶体膜结构，导致溶酶体膜通透性增加、内容物释放。细胞内甲醛水平相对升高，而培养基中甲醛浓度降低，显示溶酶体不但是甲醛储存的场所，也是细胞内转运甲醛的重要细胞器。这些结果暗示，甲醛通过胞饮进入细胞再融合进入溶酶体，溶酶体内的甲醛可通过胞吐释放到细胞外。在此过程中，甲醛降解酶也可能存在于转运甲醛的囊泡之中，起到代谢甲醛的作用。然而，这一猜测需要进一步的实验证明。

3.2 氧化应激导致溶酶体内甲醛升高

氧化应激过程中产生的活性氧自由基(ROS)等活性物质容易与蛋白质发生反应，破坏蛋白质的空间结构^[20-21]。细胞在缺血缺氧状态下会产生内质网应激^[22]，使内质网的形态、功能受到损害，干扰蛋白质加工运输过程^[23-24]，产生大量未折叠或者错误折叠的蛋白质。细胞需要通过溶酶体降解空间结构错误的蛋白质。甲醛易与蛋白质的 α 氨基以及赖氨酸残基的 ε 氨基发生反应，蛋白质结构发生改变后，更容易暴露其内部的疏水氨基酸，被溶酶体内富含的蛋白酶降解。根据 Mego 等^[25]报道，被甲醛处理后变性的血清白蛋白更容易被硫醇类蛋白酶降解，该反应主要发生在肝脏与肾脏溶酶体内。氧化应激伴随的溶酶体内甲醛升高，可以帮助细胞降解氧化应激导致的空间结构错误的蛋白质。脂质过氧化过程中会产生甲醛^[26-27]。除此之外，细胞内产生甲醛的代谢途径还包括生物大分子的脱甲基和转甲基^[28-29]、氨基脲敏感型胺氧化酶^[30-31]降解甲胺等。但是，甲醛作为活泼的一元醛，氧化性很强，容易破坏 DNA、RNA、蛋白质的空间结构，加剧氧化应激损伤，形成氧化应激的正反馈调节。甲醛过量蓄积形成体内氧化压力，会导致衰老与疾病。

3.3 溶酶体功能异常、甲醛代谢失调导致认知损害

Wyss-Coray^[8]认为异常溶酶体的积累是脑老化过程中的自然现象。异常溶酶体无法降解和清除受

损生物大分子,使脑内异常蛋白质聚积,包涵体增加,从而破坏蛋白质代谢稳态,造成细胞功能障碍甚至死亡. 甲醛代谢失调与溶酶体异常相关,同时可以影响蛋白质代谢平衡,也是神经退行性疾病的危险因素之一. 一些实验支持了这一观点: a. 脑内异常溶酶体^[32]与内源甲醛相似^[33],随衰老而增加. b. 甲醛诱导 A β 在脑内的沉积和 Tau 蛋白的异常磷酸化^[34-35]. c. 内源甲醛的浓度与老年认知的损害呈正相关^[36-37]. d. 溶酶体是甲醛在细胞内储存^[38]和转运的重要细胞器.

本文揭示了细胞内甲醛定位于溶酶体,氧化应激状态下细胞溶酶体内甲醛升高. 慢性脑低灌注动物实验也证明,双侧颈动脉不全结扎后大鼠脑组织溶酶体内甲醛异常升高. 内源甲醛定位的确定,为进一步研究内源甲醛代谢失调^[39]与认知损害的关系具有一定的启示作用,为治疗由甲醛引起的认知功能损伤提供了潜在的靶点.

致谢 感谢加州大学伯克利分校 Christopher J.Chang 教授提供甲醛荧光探针 FAP-1, 中国科学院生物物理研究所阎锡蕴院士提供 bEnd.3 细胞, 中国科学院生物物理研究所卫涛涛研究员提供 LeuLeuOME 试剂.

附件 视频文件 S1~S2, 图 S1~S2, 见本文网络版附录(<http://www.pibb.ac.cn>)

参 考 文 献

- [1] Li Y, Song Z, Ding Y, *et al.* Effects of formaldehyde exposure on anxiety-like and depression-like behavior, cognition, central levels of glucocorticoid receptor and tyrosine hydroxylase in mice. *Chemosphere*, 2016, **144**: 2004–2012
- [2] Kilburn K H, Warshaw R, Thornton J C. Formaldehyde impairs memory, equilibrium, and dexterity in histology technicians: effects which persist for days after exposure. *Arch Environ Health*, 1987, **42**(2): 117–120
- [3] Wang J W, Su T, Liu Y, *et al.* Postoperative cognitive dysfunction is correlated with urine formaldehyde in elderly noncardiac surgical patients. *Neurochemical Research*, 2012, **37**(10): 2125–2134
- [4] Yang M F, Lu J, Miao J Y, *et al.* Alzheimer's disease and methanol toxicity (part 1): chronic methanol feeding led to memory impairments and tau hyperphosphorylation in mice. *J Alzheimers Dis*, 2014, **41**(4): 1117–1129
- [5] Yang M F, Miao J Y, Rizak J H, *et al.* Alzheimer's disease and methanol toxicity (part 2): lessons from four rhesus macaques (*Macaca mulatta*) chronically fed methanol. *J Alzheimers Dis*, 2014, **41**(4): 1131–1147
- [6] He R Q, Lu J, Miao J Y. Formaldehyde stress. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(12): 1399–1404
- [7] Tang Y H, Kong X Q, Liu Z R, *et al.* Lysosome-targeted turn-On fluorescent probe for endogenous formaldehyde in living cells. *Anal Chem*, 2016, **88**(19): 9359–9363
- [8] Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature*, 2016, **539**(7628): 180–186
- [9] Zhang L S, Sheng R, Qin Z H. The lysosome and neurodegenerative diseases. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2009, **41**(6): 437–445
- [10] Nixon R A, Cataldo A M, Mathews P M. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem Res*, 2000, **25**(9): 1161–1172
- [11] Bagnolia S, Nacmiasa B, Teddea A, *et al.* Cathepsin D polymorphism in Italian sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 2002, **328**(3): 273–276
- [12] Mueller-Steiner S, Zhou Y, Arai H, *et al.* Antiamyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron*, 2006, **51**(6): 703–714
- [13] Hamano T, Gendron T F, Causevic E, *et al.* Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *Eur J Neurosci*, 2008, **27**(5): 1119–1130
- [14] Brewer T F, Chang C J. An Aza-cope reactivity-based fluorescent probe for imaging formaldehyde in living cells. *J Am Chem Soc*, 2015, **137**(34): 10886–10889
- [15] Chen Q Q, Zhang J, Zhao K, *et al.* Lysosomal chymotrypsin induces mitochondrial fission in apoptotic cells by proteolytic activation of calcineurin. *Protein & Cell*, **5**(8): 643–647
- [16] Ningaraj N S, Rao M K. Disulfiram augments oxidative stress in rat brain following bilateral carotid artery occlusion. *J Biomed Sci*, 1998, **5**(3): 226–230
- [17] Farkas E, Luiten P G, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*, 2007, **54**(1): 162–180
- [18] Mezey E, Tankersley L R, Potter J J. Liver alcohol dehydrogenase is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Biophys Res Co*, 2001, **285**(3): 644–648
- [19] Cebollero E, Gonzalez R. Induction of autophagy by second-fermentation yeasts during elaboration of sparkling wines. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(6): 4121–4127
- [20] Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 2003, **4**(1): 49–60
- [21] Perez V I, Buffenstein R, Masamsetti V, *et al.* Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(9): 3059–3064
- [22] Evans A M, Fameli N, Ogunbayo O A, *et al.* From contraction to gene expression: nanojunctions of the sarco/endoplasmic reticulum deliver site- and function-specific calcium signals. *Sci China Life Sci*, **59**(8): 749–763
- [23] Kim I, Xu W, Reed J C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev*

- Drug Discov, 2008, **7**(12): 1013–1130
- [24] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, **8**(7): 519–529
- [25] Mego J L. Role of thiols, pH and cathepsin D in the lysosomal catabolism of serum albumin. *Biochem J*, 1984, **218**(3): 775–783
- [26] Gulec M, Songur A, Sahin S, *et al.* Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products in heart tissue of subacute and subchronic formaldehyde-exposed rats: A preliminary study. *Toxicol Ind Health*, 2006, **22**(3): 117–124
- [27] 李芳序, 卢静, 许亚杰, 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 Fang Xu, Lu J, Xu Y J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(4): 393–400
- [28] Luka Z, Pakhomova S, Loukachevitch L V, *et al.* Crystal structure of the histone lysine specific demethylase LSD1 complexed with tetrahydrofolate. *Protein Sci*, 2014, **23**(7): 993–998
- [29] 苏涛, 宋丹, 李婷, 等. 核酸(脱)甲基化与内源甲醛及认知损伤. *生物化学与生物物理进展*, 2015, **42**(3): 211–219
Su Tao, Song D, Li T, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2015, **42**(3): 211–219
- [30] Andres N, Lizcano J M, Rodriguez M J, *et al.* Tissue activity and cellular localization of human semicarbazide-sensitive amine oxidase. *J Histochem Cytochem*, 2001, **49**(2): 209–217
- [31] Qiang M, Xiao R, Su T, *et al.* A novel mechanism for endogenous formaldehyde elevation in SAMP8 mouse. *J Alzheimers Dis*, 2014, **40**(4): 1039–1053
- [32] 赫荣乔. 溶酶体异常与甲醛代谢失调及老年认知损害. *生物化学与生物物理进展*, 2016, **43**(12): 1197
He R Q. *Prog Biochem Biophys*, 2016, **43**(12): 1197
- [33] Lu J, Miao J Y, Su T, *et al.* Formaldehyde induces hyperphosphorylation and polymerization of Tau protein both *in vitro* and *in vivo*. *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1830**(8): 4102–4116
- [34] Chen J, Sun M R, Wang X H, *et al.* The herbal compound geniposide rescues formaldehyde-induced apoptosis in N2a neuroblastoma cells. *Sci China Life Sci*, 2014, **57**(4): 412–421
- [35] Hu X, Wang T, Jin F. Alzheimer's disease and gut microbiota. *Sci China Life Sci*, **59**(10): 1006–1023
- [36] Tong Z Q, Zhang J L, Luo W H, *et al.* Urine formaldehyde level is inversely correlated to mini mental state examination scores in senile dementia. *Neurobiol Aging*, 2009, **32**(1): 31–41
- [37] Tong Z Q, Han C S, Qiang M, *et al.* Age-related formaldehyde interferes with DNA methyltransferase function, causing memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2014, **36**(1): 100–110
- [38] Xiong J, Zhu M X. Regulation of lysosomal ion homeostasis by channels and transporters. *Sci China Life Sci*, **59**(8): 777–791
- [39] 刘开力, 赫英舸, 于乐洋, 陈瑶, 赫荣乔. 老年痴呆症 APP/PS1 转基因小鼠肠道甲醛浓度异常升高. *微生物学通报*, 2017(DOI: 10.13344/j.microbiol.china.176008)
Liu K L, He Y G, Yu L Y, Chen Y, He R Q. *Microbiology China*, 2017(DOI: 10.13344/j.microbiol.china.176008)

Effect of Oxidative Stress on Accommodation and Transportation of Formaldehyde by Lysosome*

CHEN Xi-Xi^{1,2)}, SU Tao¹⁾, HE Ying-Ge¹⁾, HE Rong-Qiao^{1)**}

¹⁾ State Key Laboratory of Brain and Cognitive Sciences, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Dysmetabolism of endogenous formaldehyde is regarded as one of the risk factors for the onset and progression of Alzheimer's disease. Excess extracellular and intracellular formaldehyde induce neuron death, involving the impairment of cognitive ability. As previously reported, lysosome dysfunction plays an important role in neurodegenerative diseases and intracellular formaldehyde locates in the lysosome. Utilizing formaldehyde fluorescent probe, abnormally increase of the lysosomal formaldehyde was detected in the blood endothelial cell line (bEnd.3) and neuroblastoma N2a cells (N2a) from mouse brain under oxidative stress. Brain formaldehyde was significantly ($P < 0.01$) elevated in the chronic cerebral hypoperfusion rats compared with those with SHAM. LeuLeuOMe was used to induce the permeabilization of lysosome membrane in bEnd.3. After LeuLeuOMe treatment, higher intracellular and lower extracellular formaldehyde were measured by microplate reader and high performance liquid chromatography (HPLC) respectively. In other words, lysosome not only accommodates endogenous formaldehyde, but also transports the compound out of cells. Abnormal lysosome function causes dysmetabolism of formaldehyde, which is correlated with age-related cognitive impairment.

Key words endogenous formaldehyde probe, lysosome, bilateral carotid occlusion, oxidative stress

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0050

*This work was supported by a grant from The National Basic Research Program of China (2012CB911004).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-6488987, E-mail: herq@ibp.ac.cn

Received: February 16, 2017 Accepted: April 19, 2017

附 录

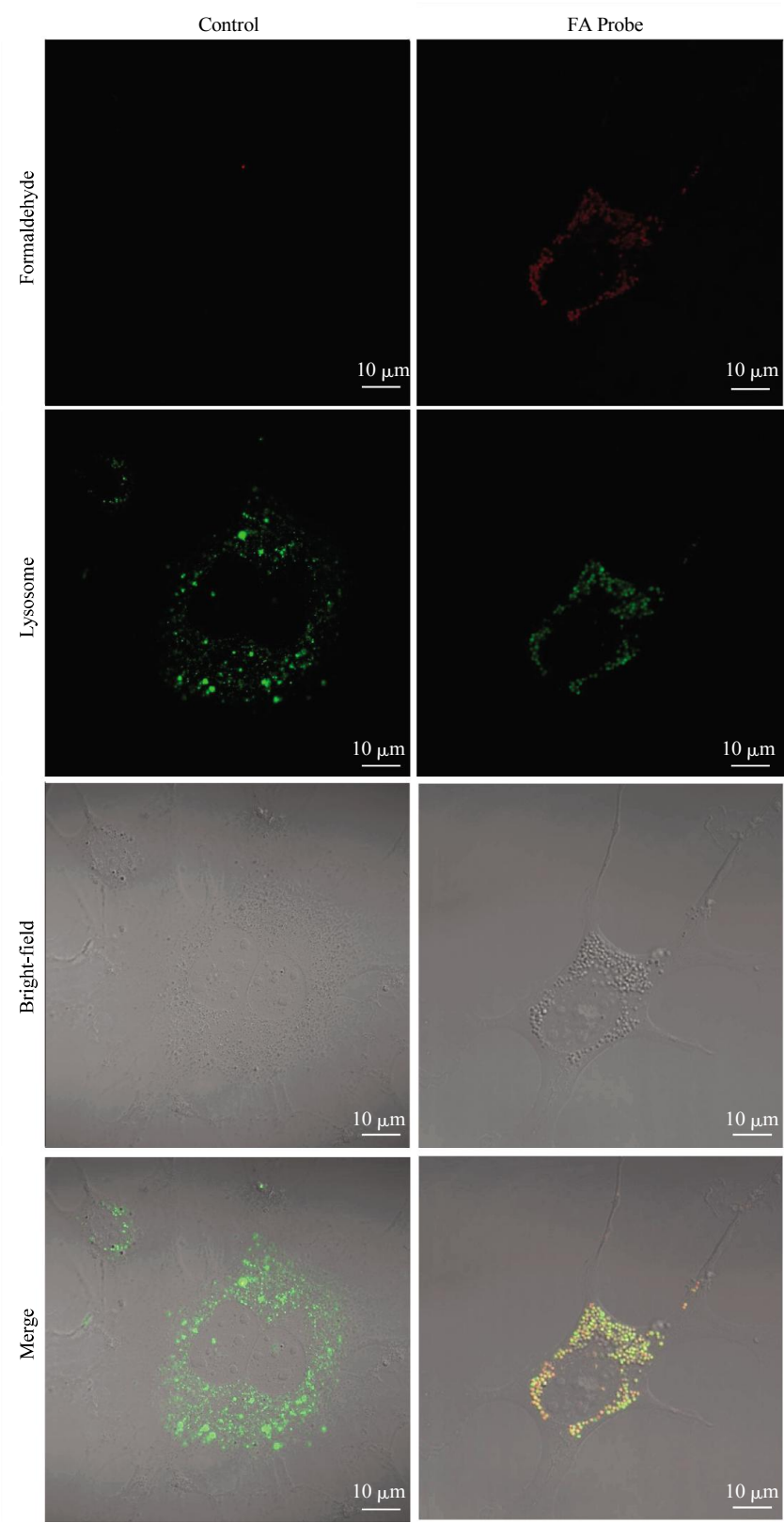


Fig. S1 Image of the endogenous formaldehyde and lysosome in the N2a cells

Fluorescence image of FAP-1 (red), Lyso Tracker Green DND-26 (green) and bright-field image were recorded by laser confocal microscope, respectively. PFA-1 was not added in the control group.

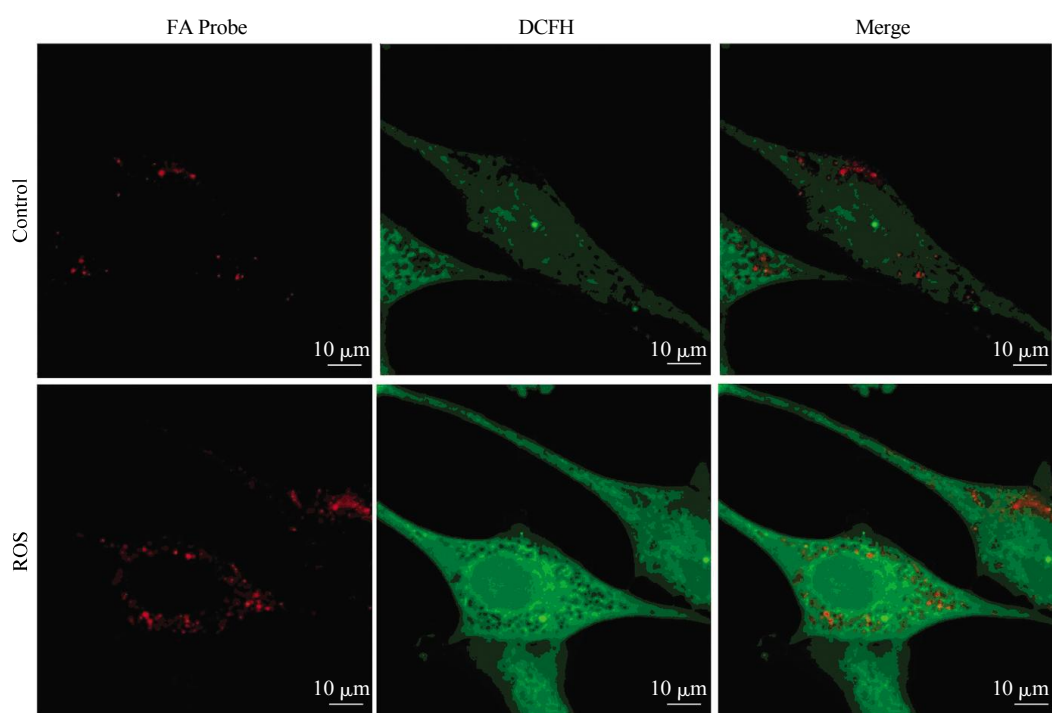


Fig. S2 Fluorescence image of the endogenous formaldehyde in the N2a cells under oxidative stress

N2a cells were exposed to 50 g/L Rosup for 30 mins. Fluorescence image of FAP-1 (red), DCFH-DA (green) were recorded by laser confocal microscope, respectively. Formaldehyde should be located in the transparent sites where lysosomes were not stained.