



细胞凋亡抑制家族蛋白在阿尔茨海默病动物模型中的表达及其初步作用机制研究*

路亚岚 周 澧 韩云林 王克维 秦 川**

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 国家人类疾病动物模型资源库, 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021)

摘要 随着全球老龄化日益严重, 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 作为神经退行性疾病的最常见类型, 以进行性认知障碍为主要临床表现, 以老年斑、神经纤维缠结和神经元及突触的凋亡缺失为主要病理特征。细胞凋亡抑制家族蛋白 (inhibitor of apoptosis family protein, IAP) 是一类内源性细胞凋亡抑制蛋白, 它们在AD病理进程中的功能尚未十分明确。本研究从AD患者数据库、动物模型和诱导的脑片模型分析IAPs蛋白表达, 并通过EMSA和免疫印迹实验初步探索了NF κ B信号通路的活化。结果表明: 存活蛋白 (Survivin) 在AD患者、小鼠模型以及A β 、冈田酸和LPS诱导脑片中共同上调, 同时NF κ B通路被显著激活, 两者变化趋势相似, 可能通过NF κ B-Survivin轴抵抗神经元凋亡。Survivin蛋白在AD中的进一步深入研究将成为AD治疗和预防的重要靶标。

关键词 阿尔茨海默病, 细胞凋亡抑制家族蛋白, APP/PS1小鼠模型, 脑片, NF κ B通路

中图分类号 Q7, R74

DOI: 10.16476/j.piibb.2021.0135

随着全球老龄化的日益严重, 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 成为继心血管疾病、脑血管疾病和癌症之后严重威胁老年人健康的第四大原因。阿尔茨海默病占全部老年期痴呆的80%左右, 主要发病于65岁以上老人群体^[1]。AD以渐进性记忆障碍、认知功能障碍、语言障碍等为主要表现, 后期患者可陷入木僵状态, 患者通常在发病后5~10年内死于多器官功能衰竭^[2]。AD的主要病理特征是全脑萎缩, 淀粉样蛋白沉积形成的老年斑, Tau蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结, 以及广泛的神经元变性凋亡, 并伴随着神经炎症反应^[3]。神经元凋亡是AD的重要发病环节, 其机制与淀粉样蛋白的沉积、氧化自由基损伤、Ca²⁺稳态失调等诸多因素异常调节相关^[4]。

细胞凋亡抑制家族蛋白 (inhibitor of apoptosis family protein, IAP) 是一类内源性细胞凋亡抑制蛋白, 在多种物种中起着阻止细胞凋亡的作用^[5]。IAP家族分子都具有BIR结构域, 它位于IAP的氨基端, 由约70个氨基酸序列组成, 其中BIR的C端为一段保守的CX2CX16HX6C结构。在人类细胞

中存在7种IAPs, 包括NAIP (BIRC1)、cIAP1 (BIRC2)、cIAP2 (BIRC3)、XIAP (BIRC4)、Survivin (BIRC5)、Apollon (BIRC6) 和Livin (BIRC7)^[6]。在小鼠体内无NAIP (BIRC1) 蛋白。IAPs主要通过两条途径抑制细胞凋亡: a. 直接抑制胱天蛋白酶 (Caspase) 或Caspase前体 (pro-Caspase); b. IAPs通过作用于TNF受体介导的信号转导, 激活NF κ B信号通路, 促进细胞生存^[5, 7]。该家族蛋白的表达异常与神经凋亡相关, Christie等^[8]研究发现, AD患者的NAIP蛋白水平降低, 且与神经纤维缠结水平升高相关, XIAP水平在AD中升高, 进一步的数据表明NAIP的降低可促进细胞凋亡和神经纤维缠结的发生。

为了进一步探索IAPs家族蛋白是否在AD中发挥功能, 本研究在患者水平上, 通过大数据平台收

* 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2019-12M-1-004) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-67770815, E-Mail: qinchuan@pumc.edu.cn

收稿日期: 2021-05-11, 接受日期: 2021-06-17

集整合AD患者和对照组不同脑区基因的表达量, 其优点在于样本量大、数据偏倚小, 是AD患者数据分析的可靠资源. 在动物水平上, 使用经典的APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP^{K670N, M671L} PSEN1^{ΔE9}, APP/PS1) 双转基因修饰小鼠模型. 该双转小鼠表达突变的APP和PS1融合体, 主要模拟淀粉样变性的病理特征, 4月龄左右出现老年斑, 6个月时出现行为学障碍^[9]. 在组织水平上, 使用可体外培养的脑组织精密切片, 其包含神经元、星型胶质细胞、小胶质细胞和内皮细胞, 比细胞系能更好地模拟体内环境. 脑片中加入淀粉样蛋白 (amyloid-beta, Aβ)、冈田酸 (okadaic acid, OA) 和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 分别模拟淀粉样蛋白沉积、Tau蛋白磷酸化和神经炎症反应, 多角度体现AD的病理反应^[10-11].

本研究应用AD患者大数据、AD小鼠模型和脑片诱导模型详细、全面探索IAPs蛋白在不同的AD模型中的表达量并探索初步的调控机制, 为AD的防控和治疗提供靶标.

1 实验材料

1.1 实验动物

APP/PS1及其对照小鼠模型来自于中国医学科学院医学实验动物研究所, C57/BL购自北京华康生物科技股份有限公司 [SCXK (京) 2014-0004], 实验中涉及的所有动物操作程序得到中国医学科学院医学实验动物研究所动物使用与管理委员会批准 (WKW19001), 并根据3R原则对实验动物的使用给予人道主义关怀.

1.2 主要试剂

DMEM/F12培养基 (11320-033)、胎牛血清 (10099141C)、青霉素-链霉素 (15140-122)、0.25%胰酶 (25200-056)、PBS (14190-144) 购自美国Gibco公司; Aβ1-42 (A9810) 和OA (09381-25 μg) 购买自Sigma-Aldrich公司; LPS (L8880) 购买自索莱宝公司; TRIzol试剂购买自美国ThermoFisher Scientific公司; PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (RR036A) 和TB Green Premix Ex Taq TM II (TliRNaseH Plus) (RR82WR) 购买自日本TaKaRa公司; RIPA裂解液 (P0013C)、蛋白酶抑制剂 (P1005)、BCA蛋白浓度测定试剂盒 (P0012)、BSA (ST023) 和脱脂奶粉 (P0216) 购买自中国上海碧云天生物技术有限公司; PVDF膜 (10600023) 购买自美国GE公

司; Aβ抗体 (800709) 购买自美国Biolegend公司; Alexa Fluor 594 InvitrogenTM 荧光二抗 (A-11005) 购买自美国Invitrogen公司, 含DAPI的封片剂 (ZLI-9557) 购买自北京中杉金桥公司; Survivin抗体 (ab469) 和c-IAPs抗体 (ab25939) 购买自英国Abcam公司; Livin抗体 (5471)、XIAP抗体 (2045)、Apollon抗体 (8756) 和NF-κB Pathway Sample Kit (9936T) 购买自美国Cell Signaling Technology; 山羊抗兔辣根过氧化物酶 (ZB2301) 和山羊抗小鼠辣根过氧化物酶 (ZB2305) 购买自北京中杉金桥生物技术有限公司; LightShift Chemiluminescent EMSA试剂盒 (20148)、Boitin 3' End DNA Labeling试剂盒 (89818)、NE-PER Nuclear 和 Cytoplasmic Extraction Reagents (78833) 以及Biodyne B Nylon Membrane (77016) 购买自美国ThermoFisher Scientific公司.

1.3 主要仪器

振动切片机购买自德国Leica, CO₂恒温培养箱购自美国ThermoFisher Scientific公司; 多功能酶标仪购自美国PerkinElmer公司; -80℃超低温冰箱购自中国Haier; Nanodrop 2000 购买自美国ThermoFisher Scientific; StepOnePlusTM购买自美国Applied Biosystems.

2 实验方法

2.1 大数据分析

通过Alzdata数据库 (<http://www.alzdata.org/>) 查询并整理IAPs家族蛋白成员在AD患者及对照的不同脑区 (内嗅皮层 (entorhinal cortex)、海马 (hippocampus)、颞叶皮层 (temporal cortex) 和额皮质 (frontal cortex)) 的mRNA水平表达量及其统计学意义; 同时通过The human protein atlas数据库 (<http://www.proteinatlas.org/>) 查询整理IAPs蛋白的细胞学定位.

2.2 冰冻切片免疫荧光染色

冰冻切片室温晾干15 min后, 置于PBS中清洗3次, 每次5 min; 用组化笔圈起待染色组织, 0.5%的Triton-100透化10 min后在PBS中清洗3次; 滴加正常山羊血清工作液封闭30~60 min后加一抗4℃孵育过夜; 第二天PBS清洗3次后, 加二抗室温孵育1 h后, PBS清洗3次, 用含有DAPI的封片剂封片后通过荧光显微镜观察、拍照.

2.3 总RNA提取和实时定量PCR (qPCR) 检测

用 TRIzol 试剂按照说明书操作流程提取组织样本总 RNA, 溶解于 DEPC 水中. 通过 Nanodrop 2000 仪器测量样品总 RNA 浓度, 并将同批次样品调节至相同浓度. 然后按照 PrimeScript RT Master Mix cDNA 逆转录试剂盒说明书流程将总 RNA 反

转录成 cDNA. 使用 TB Green Premix Ex Taq TM II (TliRNaseH Plus) 试剂盒进行 IAPs 和 β -actin 内参基因的 qPCR 检测. 使用 Step One Plus 实时 PCR 系统完成实验后, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析数据, 其中使用的引物见表 1.

Table 1 The qPCR primers of mouse IAPs

Gene symbol	Forward primers	Reverse primers
cIAP1	ACACTCTGCTCGATTGAGGAC	ACACTCTGCTCGATTGAGGAC
cIAP2	TGAAGAGTGCTGACACCTTTG	GGAAAAGCTGAATACGTGGACAA
XIAP	ACTTCCCAAGTAGTAGTCCTGTT	TATTGCCGCATGACAACTGAA
Survivin	GAGGCTGGCTTCATCCACTG	ATGCTCCTCTATCGGGTTGTC
Apollon	CGTGGGCTGTAGGAAGGAC	GCCTCTGTGACGGGAAGTTC
Livin	TCCGTGTAACCATGTCCTGG	TAGCCGGAGATCCTCTGAGTC
β -Actin	GGCTGTATTCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

2.4 脑片的培养和A β 、OA以及LPS诱导

颈部脱臼法处死 6~8 周龄的 C57/BL 小鼠, 无菌操作取出脑部, 通过震荡切片获得厚度为 300 μ m 的切片 (包含大脑皮层和海马) 置入培养基 (DMEF/F12 + 10% FBS + 1% PS) 中, 加入指定浓度的 A β 蛋白、OA 及 LPS, 于 37°C、5% CO₂ 体系下旋转培养 24 h 后, 收取组织团块保存于 -80°C 低温冰箱中用于 qPCR、免疫印迹和 EMSA 检测.

2.5 免疫印迹检测

组织加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解细胞, 提取蛋白质, BCA 法测定蛋白质浓度. 通过 10%~15% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 80 V 恒压电泳 30 min 后, 调至 120 V 恒压电泳至蛋白质标准物分离开合适间距 (约 1~1.5 h), 结束电泳. 将凝胶中的蛋白质通过湿法电转印转移至 PVDF 膜上 (300 mA, 1~2 h), 用含 5% BSA 或脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加入一抗 cIAPs (1 : 1 000)、XIAP (1 : 2 000)、Apollon (1 : 1 000)、Livin (1 : 1 000)、Survivin (1 : 800)、Caspase3 (1 : 1 000)、p-p65 (1 : 1 000)、p65 (1 : 1 000)、 β -actin (1 : 2 000), 4°C 摇床过夜; 第二日 TBST 漂洗 3 次后加入二抗, 稀释比例 1 : 5 000, 室温孵育 1 h; TBST 漂洗 3 次, 使用 ECL 发光试剂盒和凝胶成像系统拍照.

2.6 核质分离实验

将诱导培养后的脑片收集于预冷的 1.5 ml EP 管中, 加 500 μ l PBS 重悬, 然后 500 g 离心 1 min,

弃去 PBS, 重复两次, 使组织团块尽可能干燥; 加入 CER1 200 μ l, 剧烈涡旋 15 s 后冰浴 10 min; 加入 11 μ l 的 CER2, 剧烈涡旋 5 s 后, 静置 1 min, 再剧烈涡旋 5 s 后, 16 000 g 离心 5 min, 将上清 (胞浆蛋白) 转移到预冷的 1.5 ml EP 管中备用; 在沉淀中加入 NER 100 μ l 剧烈涡旋 15 s 后, 将样品放置于冰浴中 40 min, 其中每 10 min 涡旋混匀 15 s; 然后通过 16 000 g 离心 10 min, 将上清 (细胞核蛋白) 转移至干净预冷的 1.5 ml EP 管中, 定量后保存于 -80°C 或进行后续的 EMSA 实验.

2.7 EMSA实验

按照说明书步骤制备蛋白质-探针复合物 20 μ l (2 μ l 10 $\times$ 结合缓冲液, 1 μ l poly [dI : dC], 2 μ l 生物素末端标记的目标 DNA, 4 μ g 核蛋白提取物), 于室温反应 20 min 后加入上样缓冲液. 非变性凝胶电泳预电泳 30~60 min 后, 将蛋白质-探针复合物全部上样, 100 V 约 40 min, 待溴酚蓝至 2/3~3/4 时停止电泳, 转至尼龙膜上 (380 mA, 40 min), 紫外 (120 mJ/cm², 60 s) 交联后, 于封闭缓冲液中封闭 20~30 min, 经过 HRP 标记的链霉亲和素孵育, 最后使用化学发光成像系统曝光成像. 其中探针序列为: 5'-AGTTGAGGGGAC-TTCCAGGC-3'.

3 实验结果

3.1 AD患者脑组织中IAPs蛋白mRNA水平表达量及组织细胞学定位

为了探索 IAPs 家族蛋白在 AD 中的功能, 首先

通过 AD 专业数据库——Alzdata，整理了 IAPs 蛋白在 AD 患者脑组织（内嗅皮层（entorhinal cortex）、海马（hippocampus）、颞叶皮层（temporal cortex）和额皮质（frontal cortex））中的表达量. 结果表明，IAPs 家族蛋白在 AD 脑组织中表达以上调为主，值得关注的有 4 个蛋白质，它

们在部分脑区中的表达量有显著的统计学差异，具体如下：cIAP1 与 cIAP2 在 AD 患者的额皮质中表达量上调；Survivin 在 AD 患者的内嗅皮层中表达量上调；而 XIAP 在海马组织中表达量下调（图 1）.

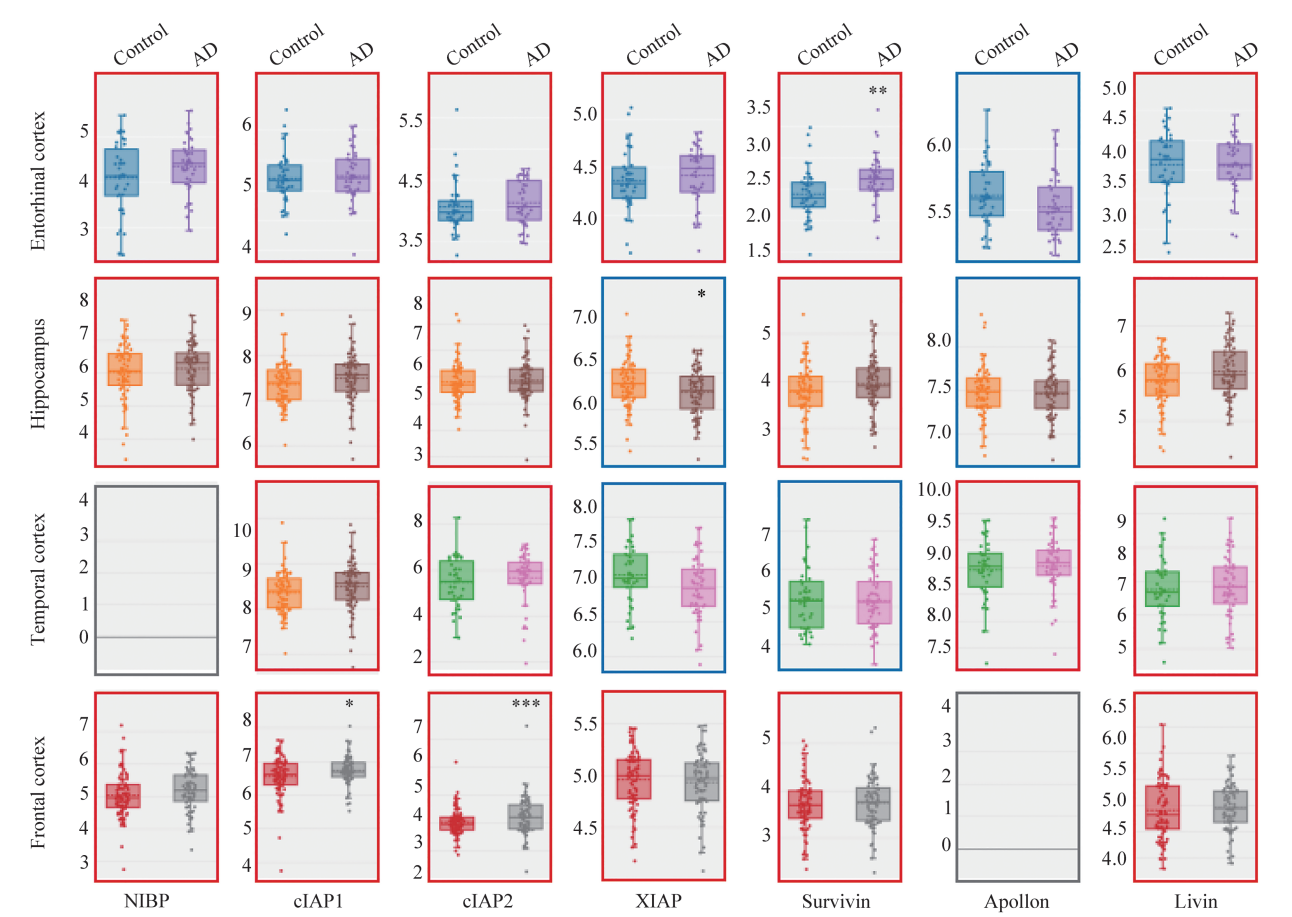


Fig. 1 IAPs expression in entorhinal cortex, hippocampus, temporal cortex and frontal cortex of control and AD patients
Red box: upregulation in AD, blue box: downregulation in AD, gray box: no available data, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

脑组织中的细胞类型包括有神经元、胶质细胞和内皮细胞，不同细胞类型行使不同的细胞功能. 蛋白质的细胞学定位与功能的发挥密切相关，为了进一步探索 IAPs 家族蛋白功能，我们统计了 The human protein atlas 数据库中 IAPs 蛋白家族成员在脑组织中不同细胞的定位（表 2）. NAIP 在神经元中特异高表达；cIAP1 在神经元、胶质细胞和内皮细胞中均高表达；cIAP2 在血管内皮细胞中低表达，其他细胞中几乎无表达；XIAP 蛋白主要定位于神经元和内皮细胞；Survivin 和 Apollon 蛋白在神经元和胶质细胞中均有表达，内皮细胞中几乎无表达；Livin 蛋白在该数据库中暂时没有可用资料.

Table 2 The cellular type location of IAPs in human brain

Protiens	Neuron	Gliocyte	Endothelial cells
NAIP	++	-	-
cIAP1	++	++	++
cIAP2	-	-	+
XIAP	++	-	++
Survivin	+	+	-
Apollon	++	++	-
Livin	NA	NA	NA

The cellular type location: +++, strong expression; ++, expression; +, weak expression; -, negative expression; NA, no available data.

3.2 APP/PS1小鼠模型中A β 蛋白的沉积和IAPs蛋白表达

为了进一步探索IAPs家族蛋白在AD小鼠模型中的表达,选取12月龄APP/PS1双转的AD与对照小鼠.首先通过A β 抗体的免疫荧光染色检测大脑皮层和海马区A β 沉积,实验结果表明,APP/PS1小鼠的皮层与海马区均有大量老年斑形成,而对照小鼠未检测到老年斑沉积,表明该AD小鼠模型成功,可用于后续检测(图2a).之后,针对IAPs家族蛋白对模型组小鼠和对照组小鼠的皮层与海马组

织通过qPCR检测,结果显示:皮层中除cIAP2外的其他所有蛋白质(包括cIAP1、XIAP、Survivin、Apollon和Livin)表达量都上调且有统计学差异,与AD患者表达谱相似;而在海马区cIAP2和Livin表达有不同程度的下调,其余蛋白质表达差异不大(图2b).进一步通过免疫印迹发现,皮层与海马区域的IAPs蛋白表达与mRNA水平基本一致,其中APP/PS1小鼠大脑皮层的XIAP、Survivin和Livin显著上调,海马区域的Livin蛋白略有下调,其余蛋白质表达量变化不大(图2c).

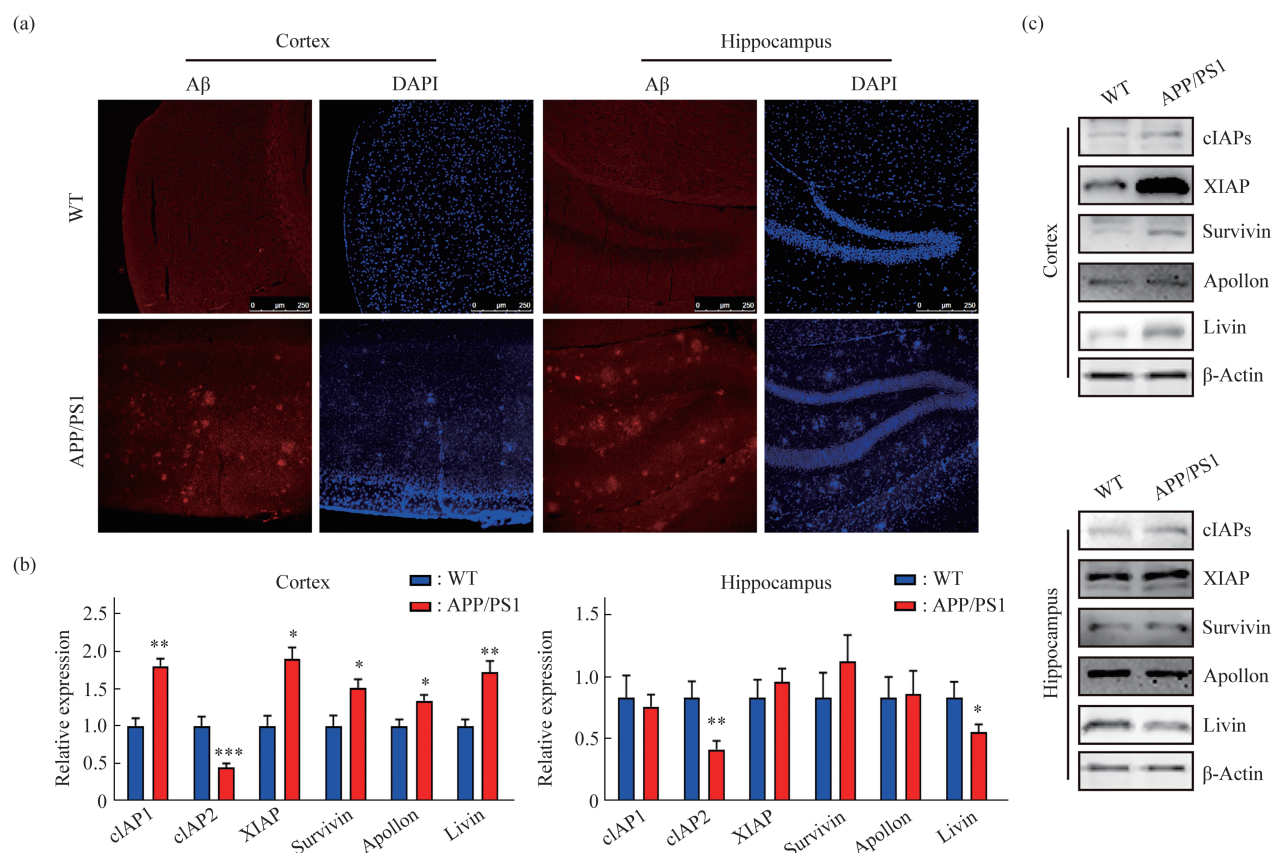


Fig. 2 A β deposition and IAPs expression in APP/PS1 mouse model

(a) IF staining for A β in APP/PS1 mouse cortex and hippocampus; (b) IAPs mRNA expression in APP/PS1 mouse cortex and hippocampus compared with wild type mouse; (c) Immunoblotting analysis of IAPs in APP/PS1 mouse cortex and hippocampus. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

3.3 Survivin蛋白在A β 、OA以及LPS诱导的脑片中表达量上调

为了多角度解读IAPs家族成员对AD发生发展的作用,通过A β 、OA以及LPS诱导的脑片分别模拟淀粉样蛋白沉积、Tau蛋白磷酸化和神经炎症.在免疫印迹检测中发现,给予3种刺激后活性Caspase3上调,表明3种诱导均能促进细胞凋亡,

这与AD的神经元凋亡这个关键病理反应一致(图3b).通过qPCR检测发现Survivin在3种诱导模型中表达量均上调,并呈浓度梯度依赖性.其余基因在不同诱导方式和浓度下表达谱不尽相同,具体如下:cIAP2在LPS和OA低剂量时上调、高剂量时下调,在A β 低剂量时下调、高剂量时上调;cIAP1和Livin在LPS模型中上调,OA和A β 模型

中下调; XIAP 和 Apollon 在 LPS 中上调、OA 中低剂量上调、高剂量下调, 在 A β 模型中下调 (图 3a) . 在 IAPs 家族蛋白检测中发现: Survivin 在 3 种模型中出现了不同程度的上调, 与 mRNA 水平一致; cIAP1/2 在 LPS 和 A β 模型中下调, 冈田酸模型中上调, 与 mRNA 水平接近; 其余蛋白质变化趋势不显著 (图 3b) .

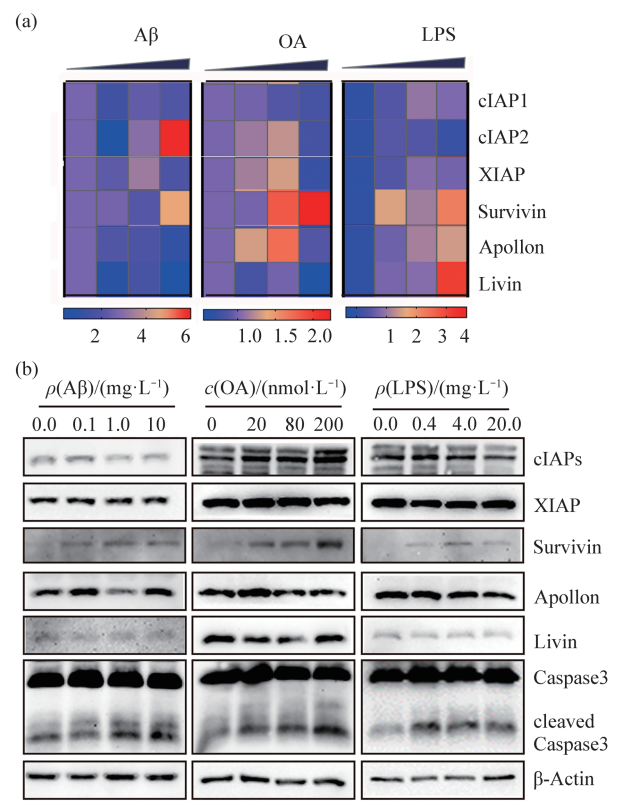


Fig. 3 IAPs expression in A β , OA and LPS induced brain slices
(a) Heatmap depiction of IAPs mRNA expression levels assessed by qPCR in A β , OA and LPS induced brain slices. The colored scale bar indicates the fold-change range compared with non-induced condition.
(b) Immunoblotting analysis of IAPs and Caspase 3 in A β , OA and LPS induced brain slices.

3.4 NF κ B通路活性在A β 、OA以及LPS诱导的脑片中呈剂量依赖性上调

NF κ B 通路是神经元凋亡、神经炎症的关键通路之一, IAPs 家族蛋白是 NF κ B 通路的下游信号, 它们的转录水平受 NF κ B 通路激活的调控^[12-13]. 为了进一步明确 A β 、OA 以及 LPS 诱导的脑片 Survivin 上调与 NF κ B 通路的相关性, 我们通过 EMSA 和免疫印迹的方法检测了在 3 种诱导模型下

NF κ B 通路的激活情况. 结果表明, 在 3 种诱导条件下 NF κ B 通路均激活, 并呈一定的浓度梯度依赖性 (图 4a) . p65 的磷酸化水平与 NF κ B 通路激活程度呈正相关, 在给予 A β 、OA 以及 LPS 诱导后, 通过免疫印迹检测发现 p-p65 均显著上调, NF κ B 通路激活, 与 EMSA 结论一致 (图 4b) .

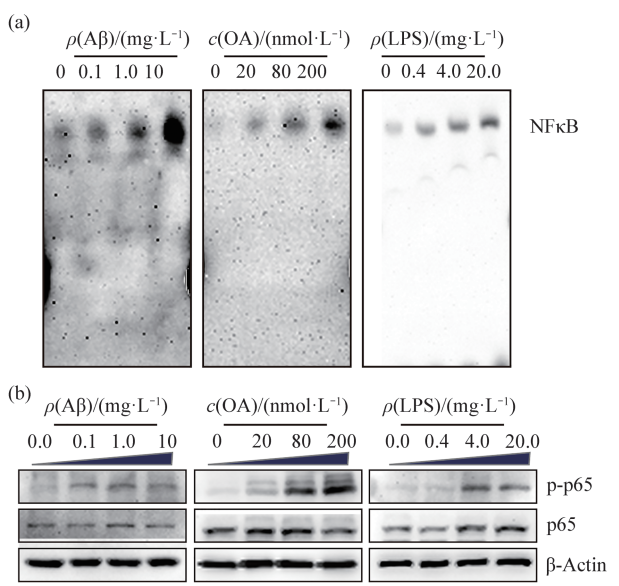


Fig. 4 The activation of NF κ B signaling pathway in A β , OA and LPS induced brain slices
(a) EMSA analysis of NF κ B pathway in A β , OA and LPS induced brain slices; (b) Immunoblotting analysis of phosphorylation and total levels of p65 levels.

4 讨 论

对 AD 的分子机制进行深入研究是防治该病的关键, IAPs 家族成员是抗凋亡的主要成员, 它们是否在 AD 的发生发展中具有功能尚不十分清楚. 在 AD 患者的公用数据分析中, 大量的 IAPs 蛋白以上调为主, 说明在 AD 的发生中它们都积极地被调动抵抗神经元大量凋亡, 保护神经元功能. 其中 Survivin 是 3 种模型 (AD 患者、AD 小鼠皮层以及诱导的脑片模型) 中唯一共同上调的蛋白质, 进一步表明其为 AD 中抵抗神经元凋亡的重要成员. 在进一步的细胞定位中查询到 Survivin 在脑组织中主要定位于神经元和胶质细胞. 神经元的主要功能是接受刺激、产生兴奋并传到兴奋; 胶质细胞是神经系统中的支持细胞, 参与免疫应答、神经元的修复再生以及物质营养代谢等^[14-16]. 因此 Survivin 可能

通过促进神经元的存活, 也可能会通过调控能量供应和免疫微环境促进神经认知功能, 为神经认知障碍的缓解和恢复提供细胞学基础. Survivin是NF κ B通路的下游信号, 而且在脑片诱导模型中Survivin蛋白上调与NF κ B通路的激活趋势相似, 因此, 可能通过NF κ B-Survivin轴阻止AD的细胞凋亡过程^[17]. Survivin在AD中的作用可通过构建转基因/敲除的细胞系和动物模型进行深入探索, 为AD的防治提供可能的新靶标.

在AD患者、AD小鼠和诱导脑片3种模型的IAPs蛋白检测结果不尽相同, 其中cIAP1/2在患者组织和OA诱导的脑片中上调, 而在AD小鼠、LPS和A β 模型中下调, 可能是由于该数据库收集AD患者的发病背景和不同的发病阶段以及种属差异等有关. 动物和患者组织标本是多因素长时间的综合反应, 两者的蛋白质表达谱也比较接近. APP/PS1小鼠携带淀粉样前体蛋白(APP)和早老素(PSEN)基因, 终生过表达该基因, 模拟淀粉样蛋白的形成、沉积过程以及因此而诱发的一系列病理反应, 如神经炎症和神经元凋亡等, 一般6月龄后开始出现认知记忆障碍等行为学改变^[18-19]. 而脑片给予A β 1-42片段也可以模拟淀粉样蛋白沉积, 但是该模拟为短时间的即时刺激, 尚未形成稳定的神经炎症反应和细胞凋亡. 两者中cIAP2基因表达量都下调, 它是重要的抗凋亡蛋白, 不仅可以抑制Caspase激酶活性, 而且是NF κ B经典通路中的一个E3泛素连接酶. 它主要定位于内皮细胞, 该蛋白质表达量下调会破坏血脑屏障, 增加神经元凋亡, 与AD的病理进程一致, 表明其可能以AD淀粉样变性病理进程中的一个驱动基因发挥作用. 其他蛋白质上调或者无显著变化表明它们是作为神经元凋亡的负反馈机制被上调, 使神经元凋亡处于可控状态, 从而一定程度上保护神经元的活性. 而脑片的LPS和OA组分别模拟AD患者脑组织中的神经炎症和Tau蛋白磷酸化两个病理特征. cIAP1/2在LPS组中下调, 而OA组中上调; Survivin在LPS和OA以及A β 模型中均稳定上调; 其他蛋白质变化不显著. 这些结果表明, cIAP1/2在神经炎症中为驱动基因, 而在神经纤维缠结中为后发性保护基因, 此外, XIAP在患者海马区作为一个有统计学意义的下调基因, 它定位于神经元和内皮细胞, 它的下调可促进神经元凋亡, 促发AD病理进程.

综上所述, 从AD患者、脑片和小鼠模型分析, Survivin在阻止AD的病理进程发生中发挥重

要作用, 可能通过NF κ B-Survivin轴阻止AD的细胞凋亡过程, 它的进一步分子机制研究是AD防治的重要靶标, 其他IAPs蛋白尤其是cIAP1/2和XIAP蛋白可作为关注重点, 进一步探索其在AD发生发展中的功能.

参 考 文 献

- [1] 吴卉, 靳翠红. 神经退行性疾病发病机制的研究进展. 毒理学杂志, 2018, **32**(6): 484-488
Wu H, Jin C H. Journal of Toxicology, 2018, **32**(6): 484-488
- [2] Ballard C, Gauthier S, Corbett A, *et al.* Alzheimer's disease. Lancet, 2011, **377**(9770): 1019-1031
- [3] Serý O, Povová J, Mišek I, *et al.* Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. Folia Neuropathol, 2013, **51**(1): 1-9
- [4] 程书珍, 苏安英, 高丽萍, 等. 阿尔兹海默病中细胞凋亡的机制研究进展. 邯郸医学高等专科学校学报, 2003 (5): 487-489
Cheng S Z, Su A Y, Gao L P, *et al.* Journal of Handan Medical College, 2003(5): 487-489
- [5] 王春平, 龚丽娟, 彭晓君. 细胞凋亡抑制蛋白: IAP家族. 国外医学(生理、病理科学与临床分册), 2001, **21**(1): 10-12
Wang C P, Gong L J, Peng X J. Foreign Medical Sciences (Section of Pathophysiology and Clinical Medicine), 2001, **21**(1): 10-12
- [6] Silke J, Vince J. IAPs and cell death. Curr Top Microbiol Immunol, 2017, **403**: 95-117
- [7] Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. Mol Cell, 2002, **9**(3): 459-470
- [8] Christie L A, Su J H, Tu C H, *et al.* Differential regulation of inhibitors of apoptosis proteins in Alzheimer's disease brains. Neurobiol Dis, 2007, **26**(1): 165-173
- [9] Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. Acta Neuropathol, 2017, **2**(133): 155-175
- [10] Singh A K, Mishra G, Maurya A, *et al.* Role of TREM2 in Alzheimer's disease and its consequences on β -amyloid, tau and neurofibrillary tangles. Curr Alzheimer Res, 2019, **16**(13): 1216-1229
- [11] Boban M, Babić Leko M, Miškić T, *et al.* Human neuroblastoma SH-SY5Y cells treated with okadaic acid express phosphorylated high molecular weight tau-immunoreactive protein species. J Neurosci Methods, 2019, **319**: 60-68
- [12] Sonoda Y, Matsumoto Y, Funakoshi M, *et al.* Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK): induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL-60. J Biol Chem, 2000, **275**(21): 16309-16315
- [13] Park M, Yoon H J, Kang M C, *et al.* PTK7 regulates radioresistance through nuclear factor-kappa B in esophageal squamous cell carcinoma. Tumour Biol, 2016, **37**(10): 14217-14224
- [14] Suzumura A. Neuron-microglia interaction in neuroinflammation. Curr Protein Pept Sci, 2013, **14**(1): 16-20
- [15] Bartels T, De Schepper S, Hong S. Microglia modulate

- neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Science, 2020, **370**(6512): 66-69
- [16] Jha M K, Morrison B M. Glia-neuron energy metabolism in health and diseases: new insights into the role of nervous system metabolic transporters. Exp Neurol, 2018, **309**: 23-31
- [17] Li W, Du D, Li Y. Id-1 promotes reendothelialization in the early phase after vascular injury through activation of NFkB/survivin signaling pathway. Drug Des Devel Ther, 2019, **13**: 3799-3811
- [18] Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. Acta Neuropathol, 2017, **2**(133): 155-175
- [19] Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, *et al.* Mouse models of Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis, 2017, **57**(4): 1171-1183

The Expression and Preliminary Mechanism of IAPs Family Proteins in Alzheimer's Disease's Animal Models*

LU Ya-Lan, ZHOU Li, HAN Yun-Lin, WANG Ke-Wei, QIN Chuan**

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; National Human Disease Animal Model Resource Center; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Disease, Beijing 100021, China)

Abstract As the increasing aging population globally, Alzheimer's disease (AD) has been the most common type of neurodegenerative disease, characterized with progressive cognitive impairment. The main pathological features were senile plaques, neurofibrillary tangles and neurons and synapse loss. Inhibitor of apoptosis family proteins (IAPs) are a class of endogenous apoptosis inhibitors, and their function in the pathological process of AD has not been clear. In this study, IAPs protein expression were analyzed from AD patient databases, AD animal models and brain slice models. NF κ B signaling pathway was detected by EMSA and immunoblotting. The results show that Survivin acts as a co-upregulated gene in all models including AD patients, AD mouse models and A β , okadaic acid and LPS induced brain slices. NF κ B signaling pathway was significantly activated, and they exhibited the similar expression profile. Therefore, the cell apoptosis in AD progression may be inhibited by NF κ B/IAPs axis. Survivin may be an important target for AD prevention and treatment.

Key words Alzheimer's disease, IAPs protein, APP/PS1 mouse model, brain slice, NF κ B signaling

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0135

* This work was supported by a grant from Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) Innovation Fund for Medical Sciences (2019-12M-1-004).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-67770815, E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn

Received: May 11, 2021 Accepted: June 17, 2021