



蛋白质聚集路径的分子机制： 成核-延伸与液固转变*

梁雨涵¹⁾ 程婉茹¹⁾ 杨 硕¹⁾ 冯 爽^{2)**} 牛 铮^{1)**}

(¹⁾ 河南大学药学院, 开封 475004; ²⁾ 新疆科技学院医学院, 库尔勒 841000)

摘要 淀粉样蛋白倾向于从天然无规则的可溶单体状态, 聚集形成高度有序的淀粉样纤维, 且此类病理性纤维的形成及其在细胞间的扩散, 与神经退行性疾病的发生发展密切相关。此外, 在这类内在无序蛋白的异常聚集过程中, 伴随着液-液相分离的现象, 形成具有类液体性质的液滴。随着时间的推移, 液滴逐渐固化, 最终通过液-固相转变过程, 演化成了富含淀粉样聚集体的凝胶状态。这种从液相向固相的转变过程, 与多种神经退行性疾病的发病机制密切相关。本文综述了淀粉样蛋白异常聚集的两种典型路径: 一种是在稀溶液中, 遵循经典的成核-延伸机制, 形成淀粉样纤维; 另一种路径则发生在凝聚相中, 由液-液相分离过程介导, 伴随着异常的液-固相转变, 导致淀粉样蛋白的聚集和沉积。本文深入探讨淀粉样蛋白聚集的分子机理, 旨在推测和理解神经退行性疾病的发病机制, 为开发针对淀粉样蛋白聚集过程的治疗策略提供理论指导。

关键词 蛋白质折叠, 蛋白质聚集, 成核聚合, 液-液相分离, 液-固相转变

中图分类号 Q7

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0207

CSTR: 32369.14.pibb.20250207

蛋白质是生命活动的核心执行者, 其功能高度依赖于特定的三维空间结构。正确折叠的蛋白质通过精确的构象变化参与细胞信号转导、代谢调控、免疫应答等关键生理过程。然而, 在环境应激条件下, 蛋白质可能会发生错误折叠, 自组装形成多种异常的聚集体, 例如寡聚体或淀粉样纤维, 不仅导致蛋白质功能丧失, 还可能引发细胞毒性^[1-3]。在神经退行性疾病的病理进程中, 以 β 淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 和 tau 蛋白异常聚集为主要病理特征的阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)^[4-6]、由 α 突触核蛋白 (α -synuclein, α -syn) 错误折叠驱动的帕金森病 (Parkinson's disease, PD)^[7-8], 以及伴随 TAR DNA 结合蛋白 (transactive response DNA binding protein 43 kDa, TDP-43) 病理性沉积的肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)^[9-10] 等, 其核心病理机制均涉及特定蛋白质的构象失稳与异常聚

集^[11-12]。这些关键病理蛋白通过形成结构各异的寡聚体, 或者形成具有 β 折叠结构单元的淀粉样聚集体, 对神经元内稳态造成破坏。此外, 它们还能诱发氧化应激、线粒体功能障碍等级联反应, 最终引发程序性细胞死亡^[13-14]。

淀粉样蛋白质多数为内在无序蛋白质, 其聚集经历复杂的多步聚合过程, 最终形成具有交叉 β 折叠结构的淀粉样沉积物。交叉 β 折叠结构是由多条 β 折叠链通过反平行排列和氢键网络交叉堆叠形成, 具有较高的稳定性和特定的空间取向, 其中 β 股的排列方向垂直于它们所形成的纤维的长轴。这是一种典型的成核-延伸聚集路径, 且该路径与神经退行性疾病的发生发展密切相关^[15]。此外, 这

* 国家自然科学基金 (32100964) 资助项目。

** 通讯联系人。

牛铮 Tel: 17596515632, E-mail: nz@henu.edu.cn

冯爽 Tel: 0996-8871810, E-mail: fengshuang0129@163.com

收稿日期: 2025-05-07, 接受日期: 2025-08-01

些关键病理蛋白伴随着液-液相分离 (liquid-liquid phase separation, LLPS) 现象, 形成具有类液体性质的凝聚体, 进而通过液-固相转变 (liquid-to-solid phase transition, LSPT) 过程, 进一步在凝聚相中聚集形成淀粉样沉积物, 也是近年来的研究热点^[16-17]。这一新路径的发现, 为理解神经退行性疾病中蛋白质错误折叠和异常聚集的时空动态调控提供了全新视角, 并揭示了靶向调控液-液相分离过程的潜在治疗策略。内在无序蛋白质因其内在无序区域的理化特性及分子间的多价弱相互作用 (多价弱相互作用是指蛋白质中多个结构域之间通过氢键、范德华力、离子键等弱相互作用形成的稳定连接, 这些作用力共同维持蛋白质的三级或四级结构, 并参与信号转导、酶活性调节等生物学功能。主要包括带电残基间的静电作用、氢键、非极性残基间的疏水作用、芳香残基间的 π - π 堆积、带正电荷芳香残基间的阳离子- π 堆积等), 通过 LLPS 过程, 形成液态凝聚体^[18-19]。这类凝聚体在微环境受到扰动时, 如离子浓度失衡、遭遇氧化应激反应、分子伴侣功能缺陷, 会经历 LSPT。随着微环境扰动的持续加剧, 凝聚体逐渐丧失了原有的流动性, 开始向着更加稳定、高度结构化的状态演变。这一演变过程, 实质上是凝聚体从类液体状态逐步转化为具有特征性交叉 β 折叠结构的淀粉样凝胶或沉积物的过程。这一过程不仅改变了凝聚体的物理性质, 还可能对其生物功能和毒性产生深远影响^[20]。因此, 深入研究这一 LSPT 过程及其调控机制, 对于理解蛋白质构象病的发病机理, 以及开发有效的治疗策略具有重要意义。

本文综述了淀粉样蛋白两种典型的聚集路径: 一种是经典的成核-延伸路径, 该路径通过特定的成核过程触发, 随后蛋白质单体沿着形成的“核”逐渐延伸, 最终形成淀粉样纤维; 另一种路径则是 LLPS 介导的聚集过程, 蛋白质分子在特定条件下通过 LLPS 过程, 形成富含蛋白质分子的液滴或凝胶状结构, 促进淀粉样蛋白的聚集和沉积。深入研究淀粉样蛋白聚集的分子机理, 推测和理解神经退行性疾病的发病机制, 进而有针对性地设计出可以调控蛋白质聚集和异常 LLPS 的抑制剂, 达到治疗或者缓解神经退行性疾病的目的。

1 典型的成核聚合过程

淀粉样蛋白的聚集过程类似于分子结晶, 是一个高度有序且复杂的过程, 包含成核期与生长期。在聚集早期, 无序的蛋白质单体通过自组装, 形成分子质量较小的聚集体, 被称为“核”。“核”是能够引发纤维伸长的最小结构, 或引发单体加入速率超过单体释放速率的最小物质^[21]。这些“核”作为聚集的起点, 进一步吸引周围的蛋白质分子, 逐渐长大, 形成更大的聚集体。随着单体的不断加入, 最终伸长形成淀粉样纤维。淀粉样纤维因具有高度稳定的交叉 β 折叠结构, 通常处于热力学基态, 表现为不可逆性; 而特定条件下形成的可逆淀粉样纤维因处于亚稳态, 其热力学性质允许与可溶单体、中间体之间存在动态平衡^[22-23]。总体来说, 淀粉样蛋白的聚集过程遵循成核依赖机制, 其动力学特征符合 S 型生长曲线, 包括成核延滞期、指数增长期、动态平衡期 3 个阶段 (图 1a)。为揭示微观机制, Zhang 等^[24]利用全原子分子动力学模拟, 在分子尺度上研究纤维生长的微观过程。结果表明, 溶液中的多肽相互结合后, 沿着纤维表面扩散, 进而导致纤维伸长, 显著加速了纤维的整体生长动力学。

由于成核过程必须克服一定的能量壁垒, 才能形成稳定的“核”, 这导致蛋白质难以从天然的单体状态中直接成核^[25-26]。因此, 成核阶段成为蛋白质聚集过程中的一个关键限速步骤。伴随着初级成核和纤维延伸过程, 体系中的淀粉样纤维积累并达到一定程度, 提供新的界面, 吸引蛋白质单体分子在其表面聚集, 从而触发次级成核过程, 进而形成新的淀粉样聚集体^[27]。初级成核是一种自发过程, 它不需要任何预先存在的晶种或聚集体来诱导。这个过程对环境条件非常敏感, 如盐离子浓度、溶液温度与 pH 值等, 微小的变化都可能影响初级成核过程的速率。相比之下, 次级成核过程则是在已有聚集体的基础上进行的, 可以显著加速蛋白质分子的聚集速率, 促进更大规模和具有复杂结构的聚集体的形成。在淀粉样蛋白的聚集过程中, 次级成核往往发生在初级成核形成的纤维或聚集体达到一定数量后, 两种成核过程相互交织、叠加, 形成更复杂的聚集网络。

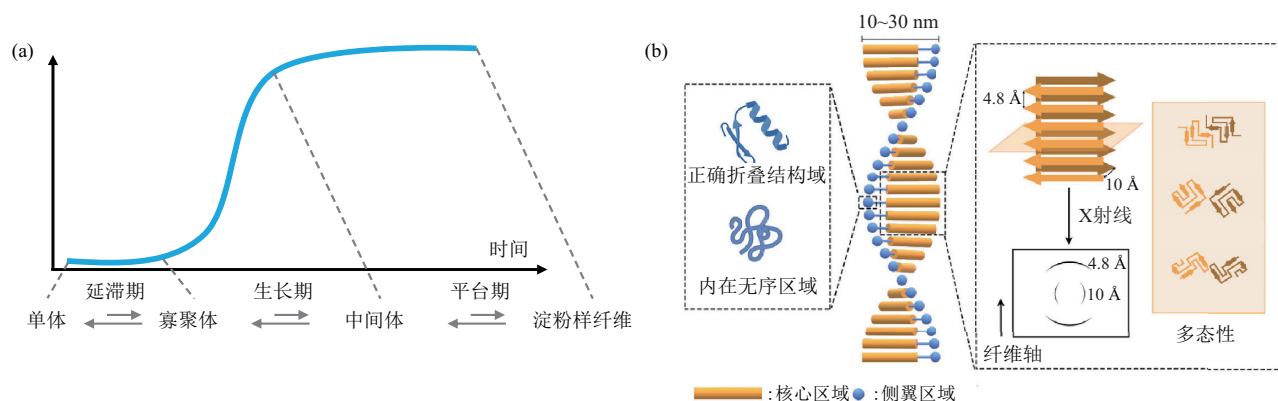


Fig. 1 Schematic illustration of nucleation-dependent polymerization kinetics and structural features of amyloid fibrils

图1 成核-延伸动力学过程及淀粉样纤维结构特征的示意图

(a) 淀粉样蛋白质聚集动力学过程符合S型曲线, 主要包括延滞期、生长期和平台期3个阶段; (b) 淀粉样蛋白纤维的结构特征^[28]。

淀粉样蛋白可以通过均相成核的方式自发聚集, 也可以在脂质表面、空气-水界面或金属离子存在的条件下, 通过异相成核的途径聚集^[29-31]。蛋白质发生异相成核时, 一方面通过增加界面处蛋白质分子的局部浓度或改变蛋白质的构象, 最大限度地优化亲水相互作用和疏水相互作用之间的平衡, 促使蛋白质采取更具成核活性的构象。另一方面, 蛋白质溶液润湿界面, 并在界面处铺展, 导致接触角减小, 有效表面能降低, 从而降低了成核的自由能势垒, 加速了淀粉样蛋白的聚集。在蛋白质聚集动力学研究中, 常规实验体系往往采用机械扰动法构建空气-水界面, 诱导蛋白质分子构象重排并吸附在界面上^[32], 或是引入两亲性的脂质, 使具有流动性的脂质插入到纤维结构中, 降低纤维形成的能量壁垒, 显著提高了聚集的速率^[33]。

淀粉样蛋白从无规则的单体结构聚集形成高度有序的淀粉样纤维, 经历了多种中间状态。在聚集早期, 所形成的寡聚体具有分子质量小、扩散性高、表面疏水性强等特点, 易与受体、代谢产物、核酸以及细胞膜发生相互作用。尤其是可溶性寡聚体插入细胞膜, 形成孔道, 导致离子失衡, 或者引发活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 积累, 线粒体形态异常, 进而激活细胞凋亡通路, 展现出远超淀粉样纤维的细胞毒性^[34-35]。因此, 寡聚体被认为是真正诱发神经退行性疾病的关键因素。在众多淀粉样蛋白中, 最早提出的“ $A\beta$ 寡聚体假说”为淀粉样蛋白聚集过程的研究提供了重要线索。该假说指出, 寡聚体的结构不仅决定其形态的多样性, 还与它们产生的细胞毒性息息相关^[36]。 $A\beta$ 不

同异构体在聚集行为和细胞毒性上表现出显著差异。其中, $A\beta$ 二聚体和三聚体都具有神经毒性, 通过损害神经元而影响认知功能^[37]。 $A\beta$ 42四聚体能够插入脂质双分子层中, 引起膜破裂, 进而破坏神经元膜的完整性^[38]; 还可以进一步组装成具有播种效应的十二聚体, 显著加速原纤维的伸长, 并导致记忆功能障碍^[39]。

此外, 聚集过程的最终产物淀粉样纤维, 其核心结构由特定的蛋白质序列以交叉 β 折叠结构排列构成, 形成了高度稳定且规则的三维结构单元, 为淀粉样纤维提供了坚实的结构支撑。其余序列则保持正常折叠构象或处于固有无序态, 分布于淀粉样核心结构的外表面, 构成相对柔韧的纤维外层 (图1b)。淀粉样纤维通过占据组织空间, 物理性地干扰细胞间信号转导, 与细胞损伤和疾病进程密切相关。某些转基因小鼠中, 纤维沉积先于认知障碍出现, 提示纤维可能直接参与病理过程^[40]。未来的研究方向将聚焦于探索寡聚体和纤维的毒性机制, 致力于寻找能够阻止或逆转其聚集过程的新型药物和干预手段。

2 液-液相分离介导的液固转变过程

淀粉样蛋白质的聚集路径复杂多样, 既可以在特定的条件下, 通过均相成核或异相成核的方式启动纤维化进程, 还可以通过LLPS途径聚集。LLPS形成的生物凝聚体, 不仅为成核提供了有利的局部环境, 使得蛋白质分子在浓缩状态下更容易相互接触并形成稳定的“核”, 还可以作为成核的前体或中间体, 进一步促进纤维的形成和延伸。因此,

LLPS与成核机制之间的相互作用和协同效应，为淀粉样蛋白的聚集过程增添了更多的复杂性和多样性，也为深入理解和干预这一病理过程提供了新的视角和思路。下文将围绕几种通过LLPS机制发生聚集的蛋白质进行详细阐述。

2.1 RNA结合蛋白经历液固转变的纤维化路径

Anthony A. Hyman 和 Simon Alberti 研究团队^[41]发现，ALS的关键致病蛋白肉瘤融合蛋白(fused in sarcoma, FUS)会发生LLPS现象形成液滴。随着时间的推移，液滴逐渐固化，变得不规则，最终通过LSPT形成高度有序，且具有细胞毒性的淀粉样纤维。进一步研究发现，在FUS凝聚体发生LSPT的动态过程中，凝胶化进程首先发生在凝聚体表面引发纳米级聚集体的形成，导致液相与固相在此区域共存(图2a)。此后，凝胶化作用

不断向液相核心区域推进，直至完成LSPT的完整过程^[42-44]。Molliex等^[45]发现核内不均一性核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, hnRNPA1)能够通过其低复杂结构域，介导LLPS过程，形成富含蛋白质的动态液滴。此外，hnRNPA1还能进一步组装成由淀粉样纤维交织而成的水凝胶，这种凝胶状态可能是该蛋白质在热力学条件下的一种稳定形态。Linsenmeier等^[46]揭示hnRNPA1在凝聚体的界面处通过改变蛋白质分子的取向和构象，使得易聚集区域相互靠近，进而促进纤维形成(图2b)。RNA结合蛋白通过LLPS路径聚集成淀粉样纤维，为理解病理条件下蛋白质异常相转变提供了关键线索，深入研究这一路径有助于开发新的治疗策略，为神经退行性疾病的预防和治疗开辟新的途径。

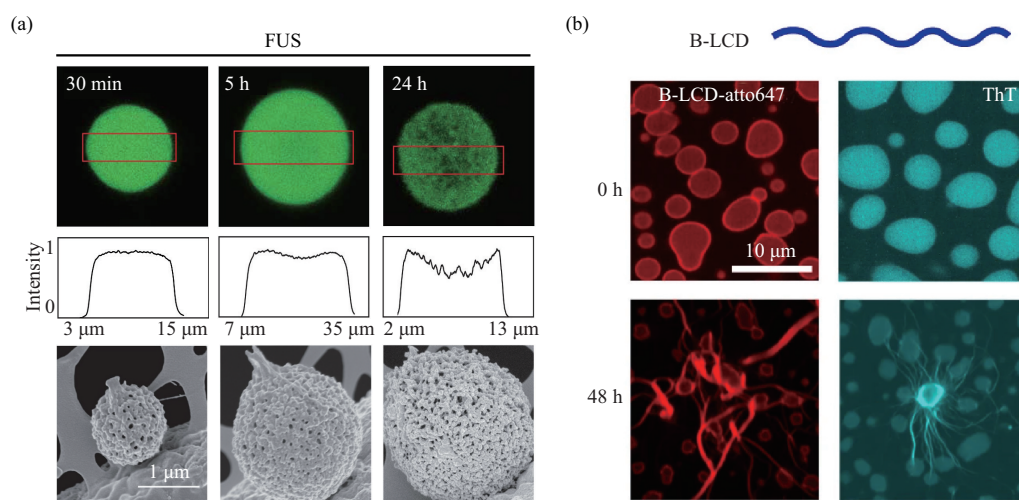


Fig. 2 FUS and hnRNPA1 undergo LSPT to promote fibrillization

图2 FUS和hnRNPA1经由液-固相转变形成淀粉样纤维

(a) FUS蛋白不同时间点(30 min、5 h、24 h)下的共聚焦图片，以及对应的荧光强度分布图和SEM图片^[44]；(b) hnRNPA1低复杂结构域(B-LCD, atto-647标记)经历LLPS和LSPT的荧光共聚焦图片^[46]。在初始时刻0 h，通过ThT染色无法观察到边缘结构；而经过48 h孵育后，界面处出现较高的ThT信号，表明存在富含 β 折叠结构的聚集体。

2.2 淀粉样蛋白经历液固转变的聚集路径

Pytowski等^[47]报道2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的关键病理蛋白人胰岛淀粉样多肽(human islet amyloid polypeptide, hIAPP)，在空气-水界面处自发经历LLPS过程，形成的动态液滴能够迅速发生不可逆的水凝胶化，阻止了与稀释相之间的分子交换。随后，在液滴的表面触发病理性聚集，这种局部聚集进一步扩散并

连接周围液滴，最终形成由纤维相互交织的网状结构(图3a)。Wegmann等^[48]研究证实，在生理条件下，tau蛋白通过LLPS过程，维持可溶性tau蛋白与凝聚相tau蛋白之间的动态平衡，在病理条件下，过度磷酸化的tau蛋白或者其突变体，通过LLPS过程，在凝聚相中聚合，逐渐固化为黏度较高的凝胶态，最终转变为富含 β 折叠结构的无定形聚集体。此外，在多聚阴离子(如肝素和RNA)

存在的条件下, tau 蛋白形成的凝聚体通过富集易聚集结构域, 诱导淀粉样纤维的形成^[49]。类似的, Gui 等^[50]发现, A β 42 寡聚体在十二烷基硫酸钠模拟的膜环境下, 通过疏水相互作用介导的 LLPS 过程, 促进寡聚体向淀粉样纤维的转变 (图 3a)。此类淀粉样蛋白经历 LLPS 的聚集行为, 与多种神经退行性疾病的病理机制密切相关。

LLPS 通过多价相互作用驱动生物大分子浓缩形成富含溶质的亚稳态液滴, 为成核过程提供了熵驱动与焓驱动协同作用的低势垒环境, 显著降低了分子聚集的能量门槛。在生物过程中, LLPS 与成核协同驱动无膜细胞器 (如核仁、P 颗粒) 的形成与功能化, 其异常与癌症、神经退行性疾病等密切相关。例如 AD 中, 过度磷酸化或基因突变的 tau 蛋白通过相分离形成液滴, 进而成核聚集引发神经毒性, 表明二者在生命活动调控中的关键作用^[48]。

在细胞环境中, α -syn 通过 LLPS 过程形成液态凝聚体。伴随着液滴老化, 最终形成富含寡聚体和淀粉样纤维的类固体凝胶^[51]。值得注意的是, 体系中已经形成的淀粉样聚集体通过降低成核能垒, 对这种液相向固相的转变过程起到显著的加速作用^[51-53]。然而, 并不是所有的生物大分子凝聚体都能促进淀粉样蛋白的聚集。Lipiński 等^[54]在研究 α -syn 的 LLPS 过程时, 发现凝聚体还会通过隔离效应, 稳定淀粉样蛋白, 进而抑制其聚集过程, 这可能是活细胞防止淀粉样沉积的一种保护机制。此外, 淀粉样蛋白质可以通过交叉相互作用形成异质凝聚体 (图 3b)^[55-56]。这种多组分间的协同作用不仅调控了蛋白质的 LLPS 行为, 重塑了单一蛋白质的聚集路径, 更在介观尺度上构建起动态调控网络, 精准调控蛋白质的 LLPS 行为和聚集行为。

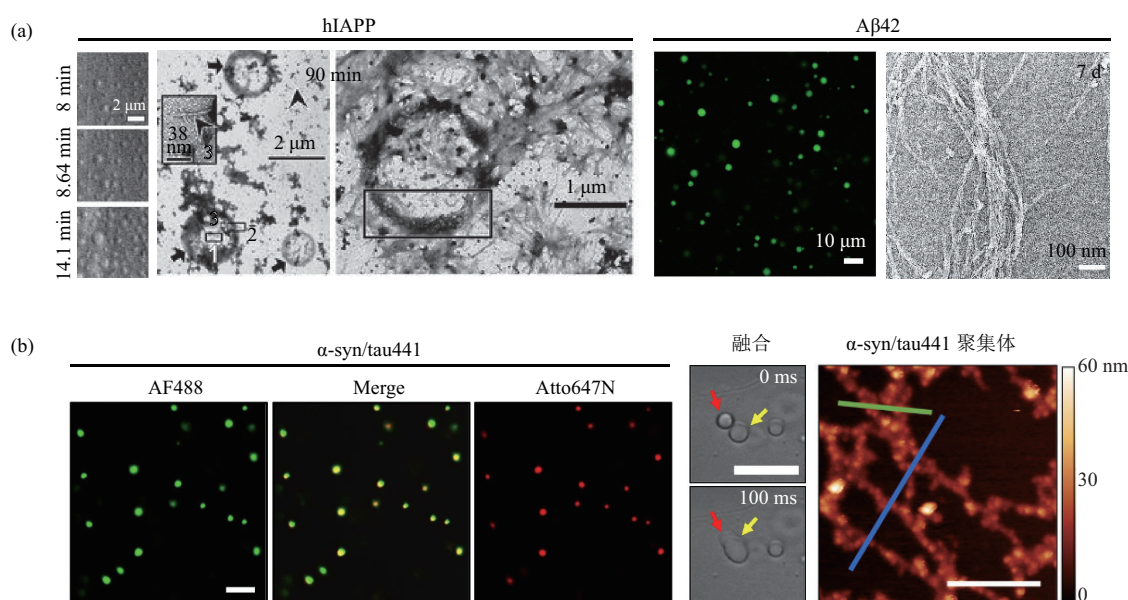


Fig. 3 Amyloid proteins undergo LSPT to form amyloid deposits and the complex coacervation between amyloid proteins

图3 淀粉样蛋白经由液固转变过程形成淀粉样纤维及淀粉样蛋白之间的共凝聚现象

(a) 淀粉样蛋白 hIAPP^[47] 和 A β 42^[50] 的 LLPS 行为。左: 随着时间的推移, hIAPP 液滴融合且尺寸变大, 90 min 后通过透射电子显微镜观察到淀粉样纤维生成。右: A β 42 在高盐条件下形成液滴, 温育 7 d 后, 观察到蛋白质分子在凝聚体内进一步聚集形成淀粉样纤维沉积。
(b) α -syn 通过与带正电荷的 tau 蛋白之间的静电吸引作用, 诱导共凝聚现象^[55]。

淀粉样蛋白的 LLPS 及其病理性 LSPT, 同时受到多种因素的调控, 从而在疾病发展中起关键作用 (表 1)。其中, 基因修饰能显著改变蛋白质表面电荷与分子间相互作用, 进而影响 LSPT 过程。例如, FUS 蛋白的突变型 G156E 和 R244C^[41]、

α -syn 的突变型 E46K 和 A53T^[51], 以及 tau 蛋白的突变型 P301L 和 P301S^[48] 等, 均表现出较强的 LLPS 和 LSPT 倾向, 并特异性地促进淀粉样成核。翻译后修饰如磷酸化、甲基化、泛素化和 N 端乙酰化, 则通过改变蛋白质的构象稳定性, 影响其

LLPS倾向, 改变生物分子凝聚体的材料特性。环境因素(如pH值的变化和金属离子的存在)可诱导蛋白质从天然构象转变为错误折叠状态, 这不仅降低了LLPS的临界饱和浓度, 还能促进凝聚体内

的蛋白质聚集。分子伴侣(如热休克蛋白Hsp70)作为一类协助蛋白质正常折叠和组装的因子, 稳定其LLPS过程, 防止发生异常聚集^[57]。

Table 1 The characteristics of LLPS and LSPT along with their regulatory factors of several typical proteins

表1 几种典型蛋白质液-液相分离、液-固相转变的过程特征与调控因素

名称	液-液相分离机制	液-固相转变特征	调控因素
A β 42 ^[50]	高盐条件下通过疏水相互作用介导相分离	液-液相分离过程加速纤维化进程	盐离子浓度、蛋白质浓度
tau ^[48]	磷酸化tau通过静电吸引和疏水相互作用协同驱动液滴形成	液滴界面处发生构象转变, 形成淀粉样聚集体	分子拥挤剂、蛋白质浓度、蛋白质修饰
α -syn ^[51]	通过静电吸引和疏水相互作用, 在分子拥挤剂存在的条件下形成液滴	经由液-固相转变过程, 形成富含寡聚体和纤维的类固体凝胶	分子拥挤剂、蛋白质修饰、金属离子、脂质环境
hIAPP ^[47]	通过疏水相互作用在空气-水界面富集, 导致局部蛋白质浓度提高而形成液滴	液滴迅速形成不可逆的水凝胶, 在其表面纤维化, 最终形成纤维聚集网络	蛋白质浓度、空气-水界面
FUS ^[41]	低复杂结构域通过多价相互作用, 形成高度可逆的蛋白质液滴, 参与应激颗粒的形成	液滴表面形成纤维状突起	溶液条件、分子拥挤剂、蛋白质浓度、蛋白质修饰

LLPS介导的聚集过程是一种新发现的蛋白质聚集路径。在这一过程中, 蛋白质通过其低复杂结构域或特异性相互作用基序, 在多价弱相互作用的协同驱动下, 诱导LLPS现象, 形成富含蛋白质的动态液滴。这些液滴作为聚集的中间态, 进一步演变, 形成淀粉样聚集体或纤维等高度有序的结构, 导致细胞损伤与死亡^[58]。这一路径的揭示, 为理解蛋白质构象病的发病机理提供了新的视角, 可以更深入地探讨蛋白质聚集过程中结构与功能的变化如何导致细胞功能障碍, 以及这些聚集体与神经退行性疾病之间的关联。

3 总结与展望

淀粉样蛋白质的聚集机制一直是神经退行性疾

病研究中的热点和难点问题。近年来, 随着对错误折叠蛋白质的深入研究, 发现淀粉样蛋白的聚集并非仅由成核聚合过程介导, 病理性LSPT逐渐被认为是神经退行性疾病的发病机制之一^[59-60]。本文总结了淀粉样蛋白聚集的两种主要途径(图4)。一种是在稀溶液中, 由初级成核启动, 诱导更多蛋白质分子发生自组装; 另一种是在LLPS形成的凝聚相中, 经过LSPT而导致的纤维化过程。凝聚相的形成通过分子拥挤效应, 将蛋白质浓度提升至LSPT的临界阈值附近, 同时液滴的封闭隔室环境降低了构象熵限制, 促使蛋白质转化为更伸展的构象状态, 易聚集结构域相互靠近, 从而驱动淀粉样纤维的形成。

在神经退行性疾病的病理进程中, 致病的淀粉

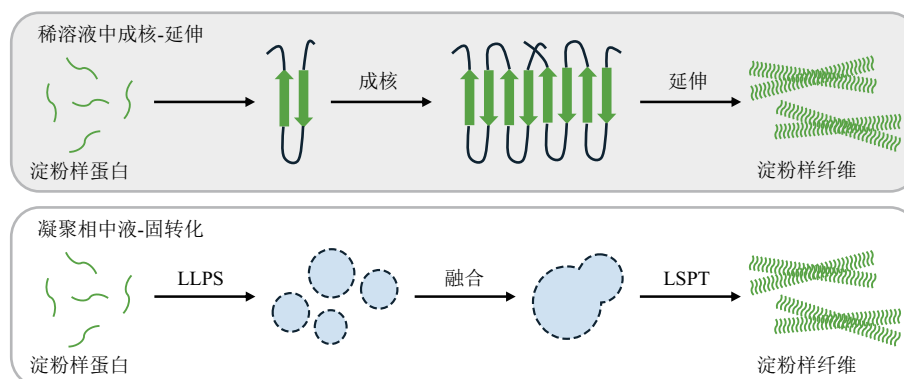


Fig. 4 Amyloid fibrils formation via two typical routes

图4 淀粉样蛋白聚集的两种典型路径

在稀溶液中, 淀粉样纤维的形成遵循成核-延伸路径; 在凝聚相中, 淀粉样纤维的形成则通过LLPS和LSPT路径实现。LLPS: 液-液相分离 (liquid-liquid phase separation), LSPT: 液-固相转变 (liquid-to-solid phase transition)。

样纤维或者沉积物的形成无论通过何种途径, 都与其中间产物的结构和功能特性紧密相连。这些中间产物不仅直接参与纤维化进程, 还可能影响细胞的正常生理功能。因此, 解析淀粉样蛋白各种聚集体的分子结构与功能, 有助于在原子水平上揭示淀粉样蛋白异常聚集的分子机理, 不仅为深入理解不同构象状态如何影响神经毒性提供关键结构证据, 还能为开发靶向特定聚集阶段的干预策略奠定分子基础。近年来, 多种先进的技术已被广泛应用于淀粉样蛋白聚集体的结构和功能研究中, 包括质谱分析、固体核磁共振、冷冻电子显微镜、分子动力学模拟等技术^[61]。质谱技术可以提供蛋白质及其寡聚体的结构信息, 阐明其在错误折叠过程中序列、结构和构象变化。核磁共振技术可识别分子间相互作用的关键残基及瞬时二级结构变化, 有助于揭示蛋白质聚集过程中的分子作用网络。固体核磁共振和冷冻电镜技术, 能够在近原子级分辨率下解析蛋白质结构, 探索淀粉样纤维形成和聚集的动态调控机制^[61-62]。

随着生物分子凝聚体介导的蛋白质聚集途径的发现, 研究焦点转向异常 LSPT 的病理过程。病理性 LSPT 通过改变凝聚体物理特性和功能而产生广泛的细胞毒性, 因此调控该过程可能成为潜在的治疗干预策略^[63]。具体而言, 针对关键病理性 LSPT 过程实施靶向干预, 借助能够特异性识别淀粉样蛋白聚集体的分子伴侣, 可有效抑制这一病理性转化进程。分子伴侣凭借其精准的识别能力, 特异性结合淀粉样蛋白聚集体, 干扰其从液态向固态的异常转变, 从而阻断相关病理进程。此外, 基于 LLPS 过程, 合理设计人工凝聚体, 将其开发为潜在的药物递送系统, 为药物提供安全的“储存空间”, 可能为神经退行性疾病的临床治疗开辟新的途径。

当前该领域仍面临诸多关键挑战。a. 生物大分子经由 LLPS 过程形成的凝聚相作为蛋白质聚集的前体, 其内部微环境对蛋白质聚集的调控机制尚未阐明, 凝聚相内部的分子构象尚未揭示, 凝聚相的物理化学特性如何调控蛋白质构象的动态转变, 以及蛋白质-蛋白质或蛋白质-脂质复合物在两相或多相界面处的相互作用如何触发不可逆聚集, 均缺乏系统性的理论框架。b. 传统成核聚合理论难以解释部分淀粉样蛋白在生理浓度下仍能发生快速聚集的现象, 提示可能存在尚未被识别的催化机制, 如经由 LLPS 过程, 导致凝聚相内局部浓度骤增引发的聚集路径, 或特定的翻译后修饰作用(如磷酸化、

糖基化)对聚集倾向的调控作用。c. 神经退行性疾病中往往存在多种淀粉样蛋白的交叉相互作用, 导致多种蛋白质协同聚集, 此类淀粉样复合物如何改变单个蛋白的聚集动力学轨迹, 进而影响病理进程, 仍是亟待解答的关键问题。d. 缺乏特异性干预手段也是制约该领域发展的重大瓶颈。由于对蛋白质聚集过程的分子机制认识不足, 难以设计出高度特异且有效的干预策略。现有靶向聚集体的单克隆抗体药物由于血脑屏障穿透性差, 致使大部分药物难以到达脑内病变部位, 进而无法与聚集体有效结合并发挥治疗作用, 因此对患者认知功能、运动能力等临床症状的改善效果欠佳。同时, 单克隆抗体药物无法精确区分各类聚集体在结构和组成上的微小差别, 在复杂生理环境的干扰下, 其对目标聚集体的特异性识别和结合能力被进一步削弱。目前, 基于调控 LLPS 过程开发的新型干预手段展现出独特潜力。例如, 部分小分子化合物能够特异性地结合 RNA 结合蛋白, 通过改变其构象或化学修饰状态, 调控其相分离行为, 或者设计特定的反义寡核苷酸或小干扰 RNA, 干扰相分离驱动因子, 破坏相分离过程, 阻止蛋白质聚集体的形成。然而, 此类技术尚处于概念验证阶段, 如何实现从分子机制到临床转化的跨越, 仍需解决药物递送系统优化、疗效评估指标标准化等工程化难题。

参 考 文 献

- [1] Mukherjee S, Poudyal M, Dave K, *et al.* Protein misfolding and amyloid nucleation through liquid-liquid phase separation. *Chem Soc Rev*, 2024, **53**(10):4976-5013
- [2] Nguyen P H, Ramamoorthy A, Sahoo B R, *et al.* Amyloid oligomers: a joint experimental/computational perspective on Alzheimer's disease, Parkinson's disease, type II diabetes, and amyotrophic lateral sclerosis. *Chem Rev*, 2021, **121**(4): 2545-2647
- [3] Soto C, Pritzkow S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*, 2018, **21**(10): 1332-1340
- [4] Scheltens P, Blennow K, Breteler M M B, *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet*, 2016, **388**(10043): 505-517
- [5] Selkoe D J, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, 2016, **8**(6): 595-608
- [6] Bloom G S. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol*, 2014, **71**(4): 505-508
- [7] Bloem B R, Okun M S, Klein C. Parkinson's disease. *Lancet*, 2021, **397**(10291): 2284-2303
- [8] Kalia L V, Lang A E. Parkinson's disease. *Lancet*, 2015, **386**(9996): 896-912
- [9] Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, *et al.* Amyotrophic lateral

- sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, **3**: 17071
- [10] Suk T R, Rousseaux M W C. The role of TDP-43 mislocalization in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*, 2020, **15**(1): 45
- [11] Wilson D M, Cookson M R, Van Den Bosch L, *et al.* Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell*, 2023, **186**(4): 693-714
- [12] Ruan K, Bai G, Fang Y, *et al.* Biomolecular condensates and disease pathogenesis. *Sci China Life Sci*, 2024, **67**(9): 1792-1832
- [13] Lo Cascio F, Park S, Sengupta U, *et al.* Brain-derived tau oligomer polymorphs: distinct aggregations, stability profiles, and biological activities. *Commun Biol*, 2025, **8**(1): 53
- [14] Alqahtani T, Deore S L, Kide A A, *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease, and Parkinson's disease, Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis-An updated review. *Mitochondrion*, 2023, **71**: 83-92
- [15] Louros N, Schymkowitz J, Rousseau F. Mechanisms and pathology of protein misfolding and aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, **24**(12): 912-933
- [16] Visser B S, Lipiński W P, Spruijt E. The role of biomolecular condensates in protein aggregation. *Nat Rev Chem*, 2024, **8**(9): 686-700
- [17] Rekhi S, Garcia C G, Barai M, *et al.* Expanding the molecular language of protein liquid-liquid phase separation. *Nat Chem*, 2024, **16**(7): 1113-1124
- [18] Poudyal M, Patel K, Gadhe L, *et al.* Intermolecular interactions underlie protein/peptide phase separation irrespective of sequence and structure at crowded milieu. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 6199
- [19] Borchers W, Bremer A, Borgia M B, *et al.* How do intrinsically disordered protein regions encode a driving force for liquid-liquid phase separation?. *Curr Opin Struct Biol*, 2021, **67**: 41-50
- [20] Zhang H, Ji X, Li P, *et al.* Liquid-liquid phase separation in biology: mechanisms, physiological functions and human diseases. *Sci China Life Sci*, 2020, **63**(7): 953-985
- [21] Chiti F, Dobson C M. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. *Annu Rev Biochem*, 2017, **86**: 27-68
- [22] Farzadfard A, Kunka A, Mason T O, *et al.* Thermodynamic characterization of amyloid polymorphism by microfluidic transient incomplete separation. *Chem Sci*, 2024, **15**(7): 2528-2544
- [23] Weber C, Michaels T, Mahadevan L. Spatial control of irreversible protein aggregation. *eLife*, 2019, **8**: e42315
- [24] Zhang R, Jalali S, Dias C L, *et al.* Growth kinetics of amyloid-like fibrils: an integrated atomistic simulation and continuum theory approach. *PNAS Nexus*, 2024, **3**(2): pgae045
- [25] Buell A K. The growth of amyloid fibrils: rates and mechanisms. *Biochem J*, 2019, **476**(19): 2677-2703
- [26] Lee C T, Terentjev E M. Mechanisms and rates of nucleation of amyloid fibrils. *J Chem Phys*, 2017, **147**(10): 105103
- [27] Michaels T C T, Šarić A, Curk S, *et al.* Dynamics of oligomer populations formed during the aggregation of Alzheimer's A β 42 peptide. *Nat Chem*, 2020, **12**(5): 445-451
- [28] Xu Q, Ma Y, Sun Y, *et al.* Protein amyloid aggregate: structure and function. *Aggregate*, 2023, **4**(4): e333
- [29] do Amaral M J, Mohapatra S, Passos A R, *et al.* Copper drives prion protein phase separation and modulates aggregation. *Sci Adv*, 2023, **9**(44): eadi7347
- [30] Jain M, Matysiak S. Dual role of anionic lipids in amyloid aggregation. *J Phys Chem B*, 2024, **128**(44): 10831-10840
- [31] Ren H, Chen H, Kang Y, *et al.* Non-fibril amyloid aggregation at the air/water interface: self-adaptive pathway resulting in a 2D Janus nanofilm. *Chem Sci*, 2024, **15**(23): 8946-8958
- [32] Camino J D, Gracia P, Cremades N. The role of water in the primary nucleation of protein amyloid aggregation. *Biophys Chem*, 2021, **269**: 106520
- [33] Krausser J, Knowles T P J, Šarić A. Physical mechanisms of amyloid nucleation on fluid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(52): 33090-33098
- [34] Lee S J C, Nam E, Lee H J, *et al.* Towards an understanding of amyloid- β oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. *Chem Soc Rev*, 2017, **46**(2): 310-323
- [35] Liu C, Luo J. Protein oligomer engineering: a new frontier for studying protein structure, function, and toxicity. *Angew Chem Int Ed*, 2023, **62**(23): e202216480
- [36] Cline E N, Bicca M A, Viola K L, *et al.* The amyloid- β oligomer hypothesis: beginning of the third decade. *J Alzheimers Dis*, 2018, **64**(s1): S567-S610
- [37] 安鹏远, 王钦文, 徐淑君. 不同聚集状态的A β 寡聚体在阿尔茨海默病发生中的作用机制研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2016, **43**(2): 109-114
- An P Y, Wang Q W, Xu S J. *Prog Biochem Biophys*, 2016, **43**(2): 109-114
- [38] Ciudad S, Puig E, Botzanowski T, *et al.* A β (1-42) tetramer and octamer structures reveal edge conductivity pores as a mechanism for membrane damage. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 3014
- [39] Economou N J, Giammona M J, Do T D, *et al.* Amyloid β -protein assembly and Alzheimer's disease: dodecamers of A β 42, but not of A β 40, seed fibril formation. *J Am Chem Soc*, 2016, **138**(6): 1772-1775
- [40] 魏枫, 程维维, 尹雅芙. 阿尔茨海默病转基因小鼠模型特点和应用进展. *实验动物与比较医学*, 2022, **42**(5): 432-439
- Wei F, Cheng W W, Yin Y F. *Lab Anim Comp Med*, 2022, **42**(5): 432-439
- [41] Patel A, Lee H O, Jawerth L, *et al.* A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation. *Cell*, 2015, **162**(5): 1066-1077
- [42] He C, Wu C, Li W, *et al.* Multidimensional super-resolution microscopy unveils nanoscale surface aggregates in the aging of FUS condensates. *J Am Chem Soc*, 2023, **145**(44): 24240-24248
- [43] Ji J, Xu K, Wang W, *et al.* Probing the formation and liquid-to-solid transition of FUS condensates *via* the lifetimes of fluorescent proteins. *J Phys Chem Lett*, 2025, **16**(14): 3553-3561
- [44] Shen Y, Chen A, Wang W, *et al.* The liquid-to-solid transition of FUS is promoted by the condensate surface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, **120**(33): e2301366120

- [45] Molliex A, Temirov J, Lee J, *et al.* Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell*, 2015, **163**(1): 123-133
- [46] Linsenmeier M, Faltova L, Morelli C, *et al.* The interface of condensates of the hnRNPA1 low-complexity domain promotes formation of amyloid fibrils. *Nat Chem*, 2023, **15**(10): 1340-1349
- [47] Pytowski L, Lee C F, Foley A C, *et al.* Liquid-liquid phase separation of type II diabetes-associated IAPP initiates hydrogelation and aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(22): 12050-12061
- [48] Wegmann S, Eftekharzadeh B, Tepper K, *et al.* Tau protein liquid-liquid phase separation can initiate tau aggregation. *EMBO J*, 2018, **37**(7): e98049
- [49] Ambadipudi S, Biernat J, Riedel D, *et al.* Liquid-liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein Tau. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 275
- [50] Gui X, Feng S, Li Z, *et al.* Liquid-liquid phase separation of amyloid- β oligomers modulates amyloid fibrils formation. *J Biol Chem*, 2023, **299**(3): 102926
- [51] Ray S, Singh N, Kumar R, *et al.* α -Synuclein aggregation nucleates through liquid-liquid phase separation. *Nat Chem*, 2020, **12**(8): 705-716
- [52] Piroška L, Fenyi A, Thomas S, *et al.* α -Synuclein liquid condensates fuel fibrillar α -synuclein growth. *Sci Adv*, 2023, **9**(33): eadg5663
- [53] Dada S T, Hardenberg M C, Toprakcioglu Z, *et al.* Spontaneous nucleation and fast aggregate-dependent proliferation of α -synuclein aggregates within liquid condensates at neutral pH. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, **120**(9): e2208792120
- [54] Lipiński W P, Visser B S, Robu I, *et al.* Biomolecular condensates can both accelerate and suppress aggregation of α -synuclein. *Sci Adv*, 2022, **8**(48): eabq6495
- [55] Gracia P, Polanco D, Tarancón-Diez J, *et al.* Molecular mechanism for the synchronized electrostatic coacervation and co-aggregation of alpha-synuclein and tau. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 4586
- [56] Kostylev MA, Tuttle M D, Lee S, *et al.* Liquid and hydrogel phases of PrP^C linked to conformation shifts and triggered by Alzheimer's amyloid- β oligomers. *Mol Cell*, 2018, **72**(3): 426-443.e12
- [57] Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, **14**(10): 630-642
- [58] Li T, Ilhamsyah D, Tai B, *et al.* Functional biomaterials derived from protein liquid-liquid phase separation and liquid-to-solid transition. *Adv Mater*, 2025, **37**(22): e2414703
- [59] Mathieu C, Pappu R V, Taylor J P. Beyond aggregation: pathological phase transitions in neurodegenerative disease. *Science*, 2020, **370**(6512): 56-60
- [60] Alberti S, Hyman A A. Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, **22**(3): 196-213
- [61] Bai Y, Zhang S, Dong H, *et al.* Advanced techniques for detecting protein misfolding and aggregation in cellular environments. *Chem Rev*, 2023, **123**(21): 12254-12311
- [62] Liu J, Wu X L, Zeng Y T, *et al.* Solid-state NMR studies of amyloids. *Structure*, 2023, **31**(3): 230-243
- [63] Wang Y, Yu C, Pei G, *et al.* Dissolution of oncofusion transcription factor condensates for cancer therapy. *Nat Chem Biol*, 2023, **19**(10): 1223-1234

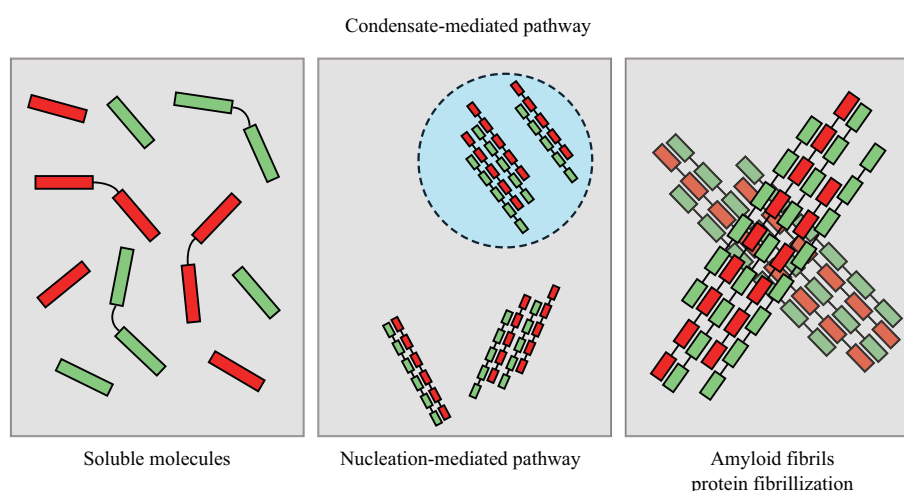
Nucleation-dependent Polymerization and Liquid-to-solid Phase Transition in Protein Aggregation*

LIANG Yu-Han¹⁾, CHENG Wan-Ru¹⁾, YANG Shuo¹⁾, FENG Shuang^{2)**}, NIU Zheng^{1)**}

¹⁾School of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China;

²⁾School of Medicine, Xinjiang College of Science & Technology, Korla 841000, China)

Graphical abstract



Abstract Neurodegenerative diseases (NDs) are a wide variety of disorders characterized by the progressive and irreversible loss of neuronal structure and functions leading to cognitive impairments. The common types of NDs include Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Huntington's disease, and Parkinson's disease. The sharing pathological hallmarks of these diseases are the aberrant aggregation and amyloid deposition. However, the underlying molecular mechanisms of protein misfolding and aberrant aggregation remain elusive. Amyloid protein is prone to aggregate from its native disordered monomeric state into well-ordered amyloid fibril state *via* nucleation-dependent polymerization mechanism, in which follows sigmoidal growth kinetics with three steps: lag phase, growth phase, and plateau phase. The formation and subsequent distribution of these pathological amyloid fibrils are closely related to the onset and progression of NDs. Additionally, the aberrant aggregation of these disease-associated proteins proceeds *via* liquid-liquid phase separation (LLPS) and liquid-to-solid phase transition (LSPT) leading to amyloid fibril formation in the condensed phase. The phase transition from liquid-like droplets or dynamic condensates to solid-like hydrogel or amyloids is intimately linked to the pathogenesis of several NDs. In this review, we discuss two typical pathways of amyloid fibrils formation. One route involves aggregation in

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (32100964).

** Corresponding author.

NIU Zheng. Tel: 86-17596515632, E-mail: nz@henu.edu.cn

FENG Shuang. Tel: 86-996-8871810, E-mail: fengshuang0129@163.com

Received: May 7, 2025 Accepted: August 1, 2025

the bulk solution environment, proceeding *via* nucleation and elongation steps to form amyloid fibrils. In this scenario, protein aggregation initiates with the nucleation step to form oligomeric nuclei. Then the nuclei serve as templates for the subsequent elongation step ultimately leading to the formation of amyloid fibrils. When sufficient fibrils have formed during self-assembly, the secondary nucleation is triggered to generate new species of oligomers and fibrillar aggregates. The other route of fibril formation occurs in the condensed phase through LLPS and LSPT to form amyloid aggregates and deposits. The occurrence of a phase separation leads to the liquid-like droplets formation during the early stage of aggregation. Over time, these dynamic biomolecular condensates gradually solidify and ultimately evolve into a hydrogel state enriched by amyloid aggregates through a phase transition process. Evidence indicates that pathological phase transitions are early events in the pathogenesis of several NDs. It should be noted that these two routes are not independent or mutually exclusive. They are interconnected and function cooperatively during aberrant aggregation. The pathological progression of NDs is closely related to the dominant aggregation pathway involved in aberrant aggregation. Moreover, the molecular mechanisms underlying the formation of pathogenic amyloid deposits are intricately linked to the structural and functional characteristics of aggregates. These aggregates may not only directly participate in fibrillization, but also indirectly promote the development of NDs by affecting the normal physiological cellular functions. Therefore, in-depth research on the structural and functional properties of both intermediates and fibrils is of great significance for understanding the molecular mechanisms of protein misfolding and aberrant aggregation. Overall, this paper reviews the amyloid deposition and pathological phase transitions in NDs. By delving into the molecular mechanisms of amyloid fibrillization, the aim is to better understand the pathogenesis of NDs, and to provide valuable insights into the development of therapeutic strategies targeting amyloid aggregation and aberrant phase transition.

Key words protein folding, protein aggregation, nucleation-dependent polymerization, liquid-liquid phase separation, liquid-to-solid phase transition

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0207

CSTR: 32369.14.pibb.20250207