

O-GlcNAc 糖基转移酶(OGT)基因表达的抑制 对 tau 蛋白磷酸化作用的影响*

杨江勇 顾建兰 施建华 刘飞 沈勤**

(南通大学医学院生物化学教研室, 南通 226001)

摘要 研究 HEK293T 细胞中 O-GlcNAc 糖基转移酶(OGT)基因表达抑制对与 AD 密切相关的 tau 蛋白磷酸化与糖基化修饰的影响. 以 OGT 基因为靶点设计三段 siRNA(OGT-siRNA₁₋₃), 用脂质体的方法转染 OGT-siRNA₁₋₃ 进入 HEK293T 细胞, 通过 RT-PCR 检测 OGT-siRNA₁₋₃ 对 OGT mRNA 的抑制. 将 pEGFP/OGT 与 OGT-siRNA₁₋₃ 共转染 HEK293T 细胞, 24 h 后在倒置荧光显微镜下观察各组 GFP/OGT 的表达, 根据 GFP/OGT 的表达量来评价 OGT-siRNA₁₋₃ 对 OGT 基因表达的抑制率. 将筛选出的具有最佳沉默效果的 OGT-siRNA 与质粒 pCI/tau₄₄₁ 共转染 HEK293T 细胞, 48 h 后 Western blot 检测 tau 蛋白糖基化与磷酸化修饰的变化. OGT-siRNA₃ 在 100 nmol/L 的终浓度时对 OGT 基因的抑制效率最高. 与 Mock 组相比, 对 OGT 基因 mRNA 及蛋白质水平的抑制率分别可达 80.0%与 51.3%左右. OGT 基因表达的下调使 tau 蛋白糖基化水平下降, 而磷酸化水平增高, 证实 tau 蛋白的糖基化负调节其磷酸化, 葡萄糖摄入减少或代谢降低可能在 AD 的发生发展中起关键作用.

关键词 阿尔茨海默病, tau 蛋白, O-GlcNAc 糖基转移酶, RNA 干扰

学科分类号 R749.1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00326

阿尔茨海默病(Alzheimer's diseases, AD)是一种原发性进行性神经系统变性型疾病, 病理改变以大脑弥漫性萎缩和神经细胞变性为主. 病理特征是脑内老年斑(senile plaques, SP)的聚集, 神经元纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)形成与神经元数量的减少. SP 的主要成分是 β 淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β). 早在 1986 年, Neve 就发现 NFT 由变性双股螺旋纤维(paired helical filament, PHF)所组成, PHF 的主要成分是高度磷酸化的 tau 蛋白. 大量证据表明, tau 的异常过度磷酸化在 AD 的神经元退行性病变中起关键作用^[1~4]. tau 异常过度磷酸化机制成为 AD 发病机制研究的热点.

O-GlcNAc 糖基化为 O 位 N-乙酰葡萄糖胺(O-linked N-acetylglucosamine, O-GlcNAc)糖基化, 是一种动态的蛋白质翻译后修饰方式. 有两种酶参与蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化过程. 一种是催化蛋白质 O-GlcNAc 糖基化反应的 O-GlcNAc 糖基转移酶(O- β -N-acetylglucosaminyltransferase, OGT), 另一种是水解 O-糖苷键的 O-GlcNAc 糖苷酶(O- β -N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase). 修饰过程中, 单糖的 β -N-乙酰氨基葡萄糖(O-GlcNAc)

在 OGT 的催化下, 经由 O-糖苷键从 UDP-GlcNAc 供体转移并连接至蛋白质的丝氨酸或苏氨酸残基的羟基上^[5]. O-GlcNAcase 的功能则是将 O-GlcNAc 从蛋白质丝氨酸或苏氨酸残基的羟基上去除. UDP-GlcNAc 由葡萄糖经己糖胺途径合成. AD 患者脑内葡萄糖代谢障碍与摄入减少, 使 UDP-GlcNAc 合成受到影响, 导致 tau 蛋白 O-GlcNAc 糖基化水平降低.

有研究证实, 大量的 O-GlcNAc 糖基化位点与脯氨酸磷酸化蛋白激酶位点(Ser/Thr)相似^[6]. 在体外培养的大鼠脑片和神经细胞中, 用 O-GlcNAc 糖苷酶抑制剂处理以增加 O-GlcNAc 糖基化的水平, 则明显抑制 tau 蛋白多个位点的磷酸化^[7]. 饥饿引起小鼠大脑皮质中总 tau 蛋白和 tau 蛋白的糖基化水平降低, 同时 tau 蛋白磷酸化水平升高, 且饥饿引起的 tau 蛋白糖基化和磷酸化改变均在恢复进食

* 国家自然科学基金资助项目(30572076).

** 通讯联系人.

Tel: 0513-85051724, E-mail: qins@ntu.edu.cn

收稿日期: 2008-07-01, 接受日期: 2008-12-15

后逆转成正常水平^[8]。提示蛋白质的磷酸化和 O-GlcNAc 糖基化可能具有负相关性, 而且这两种修饰之间可能存在一种平衡机制,

本实验拟通过 RNA 干扰的方法降低 HEK293T 细胞内 OGT 基因的表达水平, 检测 tau 蛋白多个位点磷酸化与糖基化的变化, 为揭示 AD 发病机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞, 培养基与质粒. HEK293T 细胞株为本实验室保存. 0.25% Trypsin-EDTA, 小牛血清, DMEM 培养基, Opti-MEM[®] I 均为 Invitrogen 公司产品. pCI/tau₄₄₁ 由日本物理化学研究所 Takashima 教授惠赠. pEGFP/OGT 与 DH5 α 菌由本实验室保存.

1.1.2 siRNA, 引物及抗体. 根据 Elbashir 和 Reynolds 的设计原则, 利用 siDirect 在线设计系统, 设计选取 3 对 siRNA 序列(OGT-siRNA_{1~3})送上海吉玛制药技术有限公司合成, 并从该公司购得 GAPDH positive control(GAPDH-siRNA), Negative

control(siRNA-NC)及 Negative control FAM(5' 端标记了荧光素 FAM 的 Negative control, siRNA-NC-FAM). 人 OGT 引物, GAPDH 引物, β -actin 引物由上海生物工程有限公司合成. 所用的 siRNA 及引物序列分别见表 1 和表 2. 抗 tau [pS396], tau [pS202], tau [pS214], tau [pS396], tau [pT205], tau [pT212] 抗体为美国 Biosource Internatinal 公司产品, 用做 tau 蛋白磷酸化位点的检测. RL2(Affinity Bioreagents, Golden, CO)为检测 tau 糖基化的抗体, R134d(多克隆抗体, 识别包括磷酸化和非磷酸化的总 tau 蛋白)为纽约州立基础研究所神经化学系研制. 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠及羊抗兔 IgG 为美国 Jackson Immuno Reseach Laboratories 产品.

Table 1 Synthesis of siRNA

Group	siRNA sequence(sense strand)
OGT-siRNA ₁	5' AGACAAUACUGGUGUGCUUdTdT 3'
OGT-siRNA ₂	5' GGGAAUGUGUACAAGGAAAdTdT 3'
OGT-siRNA ₃	5' GAAGAAAGUUCGUGGCCAAAdTdT 3'
GAPDH Positive control	5' GUAUGACAACAGCCUCAAGdTdT 3'
Negative control	5' UUCUCCGAACGUGUCACGUDTdT 3'

Table 2 Primers used in RT-PCR experiments

Primer name	Primer sequence	Length of amplified fragment
hOGT primer(F)	5' CGG GCT ATC GAA CTA CAA CCA 3'	356 bp
hOGT primer(R)	5' CCC ATA TTA GAG TAG GCA TCA GCA AAG 3'	
hGAPDH primer(F)	5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3'	452 bp
hGAPDH primer(R)	5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3'	
h β -actin primer(F)	5' CTACAATGAGCTGCGTGTGG 3'	527 bp
h β -actin primer(R)	5' AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC 3'	

1.1.3 其他材料. Wizard[™] Plus Miniprep System (Promega 公司), Trizol 试剂(Invitrogen 公司), Lipofectamine[™] 2000 转染试剂(Invitrogen 公司), First Strand cDNA Synthesis Kit(MBI 公司), PCR Kit(上海生工生物工程有限公司), BioTrace[™] PVDF (Pall 公司), ECL(PIERCE 公司), PureYield[™] Plasmid Midiprep System (Promega 公司).

1.2 方法

1.2.1 质粒的转化及抽提. pCI/tau₄₄₁ 与 pEGFP/OGT 按常规方法转化 DH5 α 感受态细胞, 克隆并鉴定后大量扩增. 用 Promega 公司质粒中抽试剂盒抽提质粒(根据说明书步骤操作), 分装后 -20 $^{\circ}$ C 储存备用.

1.2.2 细胞培养. HEK293T 细胞接种于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基(高糖), 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱中培养. 待细胞生长到 80%~90% 密度, 胰酶消化, 传代.

1.2.3 siRNA 转染. 在转染前一天将细胞按每孔 6 \times 10⁴ 密度接种于 24 孔板, 第二天待细胞密度达到 50% 左右, 分别用 OGT-siRNA_{1~3}、siRNA-NC、siRNA-NC-FAM (100 nmol/L 终浓度)、GAPDH-siRNA (100 nmol/L 终浓度) 转染入 HEK293T 细胞(按照 Lipofectamine[™] 2000 试剂盒说明操作). 分组: 转染试剂对照组(加入与实验组等量的转染试剂, Mock), 阴性对照组(转染 Negative control, siRNA-NC)及实验组(转染 OGT-siRNA_{1~3}). 24 h 后

在倒置荧光显微镜下观察 siRNA-NC-FAM 组转染效率, 转染效率=荧光阳性细胞 / 细胞总数. 进行多次计数.

1.2.4 RT-PCR. 转染 24 h 后, 提取各组总 RNA (按 Trizol 说明书操作), 逆转录成 cDNA (按 Fermentas 说明书操作). β -actin 与 GAPDH 扩增程序: 94°C, 5 min; 94°C 40 s, 60°C 40 s, 72°C 35 s, 22 个循环; 72°C 7 min; 4°C 终止反应. OGT 扩增程序: 94°C 5 min, 94°C 40 s, 58°C 40 s, 72°C 35 s, 30 个循环; 72°C 7 min; 4°C 终止反应. 在进行 6 个循环后加入 GAPDH 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.50 μ l 再进行 24 个循环. 各组 OGT 基因 mRNA 的表达水平以 OGT/GAPDH 扫描灰度值表示. 数据用 SPSS10.0 统计软件进行分析, 用双因素方差分析判断浓度及 siRNA 设计上的差别对干扰效率的影响, 单因素方差分析判断同一浓度下各组干扰效率差别.

1.2.5 OGT 蛋白表达. 用 pEGFP/OGT 与 OGT-siRNA₁₋₃ 共转染 HEK293T 细胞, 转染分 A 组(只转染 pEGFP/OGT), 及 B、C、D 实验组(分别共转染 pEGFP/OGT 与 OGT-siRNA₁₋₃). 24 h 后在倒置荧光显微镜下观察各组 GFP/OGT 融合蛋白的表达, 根据 GFP/OGT 融合蛋白表达量评价 OGT-siRNA₁₋₃ 对 GFP/OGT 基因的抑制率. 抑制率 = A 组荧光率 - 各实验组荧光率 (荧光率: 反复计数同一视野下 100 个细胞中荧光细胞的数量).

1.2.6 Western blot 分析. 在转染前一天将细胞按每孔 2×10^5 密度接种于 6 孔板, 分组同 1.2.3 描述. 将筛选出的最佳沉默片段以最适合作用浓度转染 HEK293T 细胞. 因 HEK293T 细胞内无 tau 蛋白表达, 在转染 siRNA 的同时, 共转染 1.2 μ g 的质粒 pCI/tau₄₄₁. 48 h 后吸干净培养基, 用温的及预冷的 PBS 各洗一遍, 加入预冷的细胞裂解液, 冰上孵育 15 min, 收集每孔细胞至 1.5 ml 的 EP 管内, 沸水中煮 5 min, 4°C, 12 000 g 离心 15 min. 取上清, 用改良 Folin-酚法测量蛋白质浓度. 蛋白质印迹分析按文献[7]所述方法完成. 采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析, 各实验组间比较用单因素方差分析.

2 结 果

2.1 siRNA 转染效率

将 siRNA-NC-FAM 转染 HEK293T 细胞, 24 h 后, 倒置荧光显微镜下观察 siRNA 转染效率. 转

染了 siRNA-NC-FAM 的细胞呈现绿色荧光, 转染效率约为 85%(图 1).

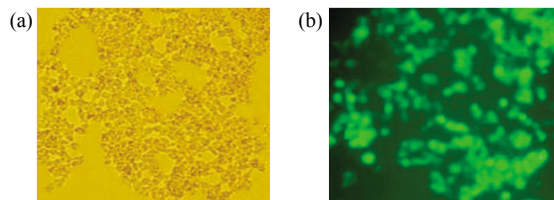


Fig. 1 Photograph of transfection efficiency of siRNA-NC-FAM

The green fluorescent was observed under fluorescence microscopy at 200 \times magnification. (a) HEK293T cell under ordinary light. (b) HEK293T cell under fluorescent light.

2.2 RT-PCR

2.2.1 GAPDH-siRNA 抑制 GAPDH 基因的表达. 如图 2 所示, Mock, siRNA-NC 组均在 452 bp 处有一亮的条带, GAPDH-siRNA 组在此处条带亮度较弱, 内参 β -actin(527 bp)的 4 个条带亮度均一. 从表 3 可以看出, 阳性对照 GAPDH-siRNA 可以明显抑制 GAPDH 基因的表达, 抑制率为 (52.0 \pm 3.3)%, $P < 0.01$, 差异有显著统计学意义. 说明整个实验系统可靠.

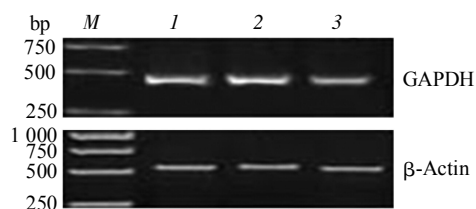


Fig. 2 The expression of GAPDH mRNA in HEK293T cells after transfected with GAPDH-siRNA for 24 h

Marker: DL2000; Mock: Treated with lipofectamine2000; siRNA-NC: Transfected with siRNA-NC(100 nmol/L); GAPDH-siRNA: Transfected with GAPDH-siRNA (100 nmol/L). Each level of PCR product of GAPDH gene was quantitated and normalized to the level of β -actin. Data are representatives of three separate experiments. M: Marker; 1: Mock; 2: siRNA-NC; 3: GAPDH-siRNA.

Table 3 Inhibition ratio of GAPDH mRNA expression

Mock	siRNA-NC	GAPDH-siRNA	Inhibition ratio/%
0.62 \pm 0.03	0.64 \pm 0.03	0.32 \pm 0.02**	52.0 \pm 3.3

** $P < 0.01$: vs control.

2.2.2 OGT-siRNA₁₋₃ 抑制 OGT 基因干扰效果筛选. RT-PCR 产物电泳结果如图 3 所示, 图 3a,b,c 分别代表转染 OGT-siRNA 终浓度为 50 nmol/L、75 nmol/L、100 nmol/L 时对 OGT 基因表达的抑制作用. 表 4 为各 siRNA 在不同浓度时对 OGT 表达的抑制率, 从表 4 中可以看出: 在 50 nmol/L 的终浓度时, 设计的三段 OGT-siRNA 对 OGT 基因 mRNA 表达水平与 Mock 组比都没有明显抑制作用, $P > 0.05$. 浓度为 75 nmol/L 时, OGT-siRNA₁ 的干扰效率最高, 达 $(65.0 \pm 2.9)\%$, $P < 0.01$, 差异有显著统计学意义. 浓度升至 100 nmol/L, OGT-siRNA₁ 的干扰效率仅有 $(38.9 \pm 2.4)\%$, 而 OGT-siRNA₃ 对 OGT 基因 mRNA 水平的抑制效率最高, 可达 $(80.0 \pm 1.7)\%$, $P < 0.01$, 在此浓度下 OGT-siRNA₂ 也显示出最好的沉默效果, 可达 $(71.1 \pm 2.1)\%$, $P < 0.05$, 差异有统计学意义.

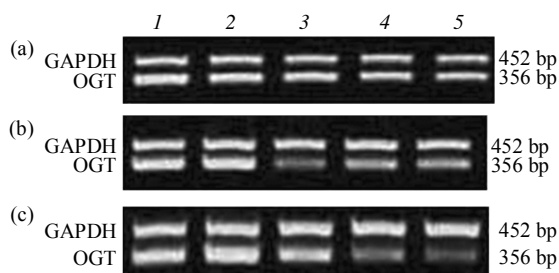


Fig. 3 Relative OGT mRNA expression level after transfected for 24 h with OGT-siRNA₁₋₃ in different concentrations in HEK293T cells

Marker: DL2000; Mock: Treated with lipofectamine2000; siRNA-NC: Transfected with siRNA-NC (100 nmol/L); OGT-siRNA₁: Transfected with OGT-siRNA₁; OGT-siRNA₂: Transfected with OGT-siRNA₂; OGT-siRNA₃: Transfected with OGT-siRNA₃. (a) HEK293T cells were transfected with siRNA-NC and OGT-siRNA₁₋₃ in 50 nmol/L. (b) in 75 nmol/L. (c) in 100 nmol/L. Each level of PCR product of OGT gene was quantitated and normalized to the level of GAPDH. Data are representatives of three separate experiments. 1: Mock; 2: siRNA-NC; 3: OGT-siRNA₁; 4: OGT-siRNA₂; 5: OGT-siRNA₃.

Table 4 Inhibition ratio of OGT-siRNA₁₋₃ on the expression of OGT mRNA

Group	50 nmol/L	Inhibition ratio/%	75 nmol/L	Inhibition ratio/%	100 nmol/L	Inhibition ratio/%
OGT-siRNA ₁	1.22 ± 0.05	5.6 ± 3.7	0.45 ± 0.04	65.0 ± 2.9**	0.90 ± 0.04	38.9 ± 2.4*
OGT-siRNA ₂	1.20 ± 0.05	7.4 ± 4.0	0.78 ± 0.03	38.9 ± 2.1*	0.43 ± 0.03	71.1 ± 2.4**
OGT-siRNA ₃	1.21 ± 0.03	6.0 ± 2.3	0.73 ± 0.03	43.0 ± 2.3*	0.30 ± 0.03	80.0 ± 1.7**

* $P < 0.05$, vs control; ** $P < 0.01$, vs control. $\bar{x} \pm s$.

2.3 OGT-siRNA₁₋₃ 对 OGT 蛋白表达的抑制作用

如图 4 所示, 采用 100 nmol/L 的 OGT-siRNA₃ 与 pEGFP/OGT 共转染 HEK293T 细胞, 对 GFP/OGT

蛋白表达抑制效率最好, 抑制效率可达 51.3% 左右, 这与从 mRNA 水平检测 OGT 的表达结果相一致(图 4d).

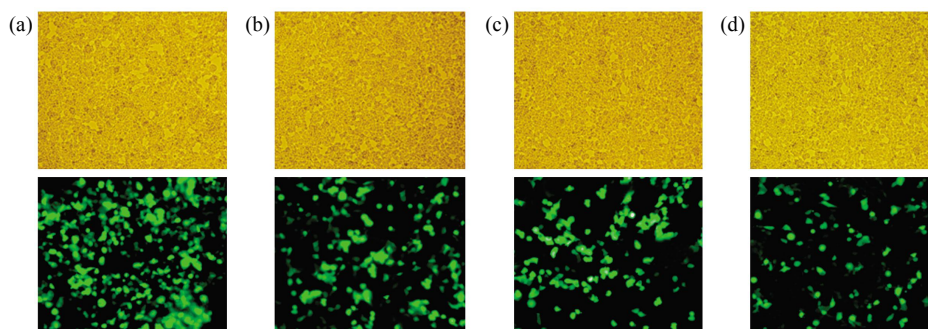


Fig. 4 The effects of OGT-siRNA on the expression of GFP/OGT protein

(a) HEK293T cells was transfected with pEGFP/OGT only. (b) HEK293T cells were cotransfected with pEGFP/OGT and OGT-siRNA₁(75 nmol/L). (c) HEK293T cells were cotransfected with pEGFP/OGT and OGT-siRNA₂(100 nmol/L). (d) HEK293T cells were cotransfected with pEGFP/OGT and OGT-siRNA₃(100 nmol/L). Representative photographs were shown only, when OGT-siRNA₁₋₃ showed the best inhibition effect on OGT protein expression.

2.4 OGT-siRNA₁₋₃ 对 tau 蛋白糖基化与磷酸化的影响

以 β -actin 做为内参照. 结果以目的蛋白 /

β -actin 内参扫描灰度值表示. 如图 5 所示: R134d (检测包括磷酸化与非磷酸化的总 tau 蛋白抗体)没有明显的变化, $P > 0.05$, 差异无统计学意义.

RL2 为检测糖基化 tau 蛋白的抗体, 4 组中 OGT-siRNA₃ 转染组糖基化水平降低, $P < 0.01$, 差异有显著统计学意义. 采用 tau 蛋白经典磷酸化位点 (Ser199, Ser202, Ser214, Ser396, Thr205, Thr212) 的相应抗体 tau[pS199], tau[pS202], tau[pS214], tau

[pS396], tau[pT205], tau[pT212] 检测其磷酸化水平, 结果显示, 与 Mock 组相比各磷酸化位点的磷酸化水平都显著升高, $P < 0.05$, 差异均有统计学意义.

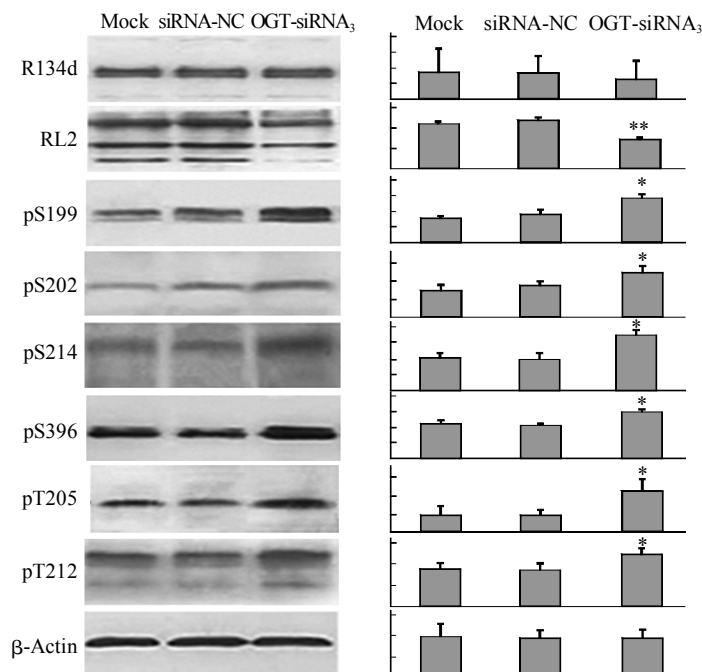


Fig. 5 The effect of decreasing OGT mRNA expression level on tau phosphorylation and glycosylation

Mock: HEK293T cells were transfected with pCI/tau₄₄₁ and treated with lipofectamine2000; siRNA-NC: HEK293T cells were cotransfected with pCI/tau₄₄₁ and siRNA-NC (100 nmol/L); OGT-siRNA₃: HEK293T cells were cotransfected with pCI/tau₄₄₁ and OGT-siRNA₃ (100 nmol/L). The cell extracts were analyzed by Western blots developed with total tau antibody, glycosylation antibody, and site-specific tau phosphorylation antibodies after transfected for 48 h. Data are representatives of four separate experiments. * $P < 0.05$; *v.s.* control; ** $P < 0.01$; *v.s.* control.

3 讨 论

tau 蛋白是一种神经元微管相关细胞骨架蛋白, tau 还是一种含磷的糖蛋白, 其磷酸化程度与神经元的可塑性有关. tau 蛋白的磷酸化异常, 特别是微管结合区域中 tau 蛋白位点的磷酸化, 将极大地降低 tau 与微管的结合. 几乎所有的神经变性疾病发现都有 tau 蛋白异常磷酸化.

AD 患者脑中 tau 的异常过度磷酸化在 NFT 的形成过程中起非常重要的作用. 用蛋白磷酸酶抑制剂处理培养的细胞, 可引起 tau 过度磷酸化, 降低 tau 的生物活性并促使纤维状 tau 沉积于细胞中^[1]. 正常 tau 过表达并无细胞毒性作用, 而模拟过度磷酸化的 tau (将丝氨酸和苏氨酸残基突变为谷氨酸) 具有细胞毒性^[2]. 用 A β 处理细胞可导致 tau 过度磷酸化, 并具有神经细胞毒性, 但 A β 对 tau 基因敲除的细胞无毒性^[3]. 果蝇脑内过量表达 tau 和糖

元合成酶激酶 -3 β (GSK-3 β)可引起神经退行性病变和类似 NFT 的 tau 沉积, 但只过量表达 tau 而不能引起上述病变^[4]. 值得强调的是, 在 AD 患者大脑神经元内沉积的 tau 均以异常过度磷酸化的形式存在, 且 tau 过度磷酸化的发生早于其聚积成 NFT^[5]. 这些研究足以证明 tau 蛋白的异常过度磷酸化在 AD 的神经元退行性病变中起关键作用.

近年来, 葡萄糖摄入减少或代谢下降在 AD 发生发展中的作用日益受到重视. 用正电子发射断层摄影研究正常人、家族性 AD (familial Alzheimer's disease, FAD) 患者和无症状 FAD 谱系高危人群大脑区域性葡萄糖代谢, 在无症状 FAD 谱系高危人群中看到葡萄糖代谢显著下降, 说明 AD 患者在出现认知功能减退、CT 和 MRI 相应部位无异常改变以前, 大脑皮层的糖代谢就已经出现异常^[6]. 表明葡萄糖代谢障碍可能是 AD 的早期信号. 已证实, 在 AD 患者脑中, 葡萄糖代谢率明显下降, 且

下降的程度与患者认知能力损害程度呈正相关^[11]。进一步研究表明, AD 患者脑中的神经细胞退化是由葡萄糖摄入和利用的降低引起, 而不是前者引起后者的降低^[12]。

葡萄糖摄入和代谢降低使需要葡萄糖作为原料的 UDP-乙酰氨基己糖的合成减少, 造成 UDP-GlcNAc 的显著下降, 而 UDP-GlcNAc 又是 O-GlcNAc 糖基化的供体, 最终导致 AD 患者脑中蛋白质 O-GlcNAc 糖基化修饰数量减少。Tau 蛋白同样受 O-GlcNAc 糖基化的修饰。越来越多的证据表明: tau 蛋白的 O-GlcNAc 糖基化与磷酸化呈明显的负相关, 而且这两种修饰之间可能存在一种平衡机制^[13]。用饥饿处理小鼠, 使小鼠脑内葡萄糖摄入减少, 可引起小鼠大脑皮质中总 tau 蛋白和 tau 蛋白的 O-GlcNAc 糖基化水平降低, tau 蛋白磷酸化水平升高。并且饥饿引起的 tau 蛋白 O-GlcNAc 糖基化和磷酸化改变均在恢复进食后逆转成正常水平^[8], 说明葡萄糖摄入和代谢降低在 AD 的发生发展过程中起关键作用。

RNAi 指内源性或外源性与靶基因的转录产物 mRNA 存在同源互补序列的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA), 在细胞内特异地降解该 mRNA, 从而致使特异性的基因有效封闭的过程。因为它具有高特异性、高效性、高稳定性的特点, 已经成为现代分子生物学研究基因功能的有力工具^[14]。本实验利用 RNA 干扰技术特异性抑制 OGT 基因的表达, 减少 tau 蛋白的糖基化修饰, 观察干扰是否能引起 tau 蛋白磷酸化水平增高。我们设计了三对针对 OGT 基因靶位的特异性沉默 siRNA (OGT-siRNA₁₋₃), 转染 HEK293T 细胞后, 对 HEK293T 细胞中 OGT 基因 mRNA 表达有明显的抑制作用, 最高的抑制效率可达 (80.0±1.7)%。R134d 为检测总 tau 蛋白(磷酸化与非磷酸化的)的抗体, 结果显示 4 组之间总 tau 蛋白没有明显的变化。RL2 为检测糖基化 tau 蛋白的抗体, 4 组中 OGT-siRNA₃ 转染组糖基化水平降低。采用 tau 蛋白经典磷酸化位点 (Ser199, Ser202, Ser214, Ser396, Thr205, Thr212) 的相应抗体检测其磷酸化水平, 结果显示, 与 Mock 组相比各磷酸化位点的磷酸化水平都显著升高。

体外动力学试验表明, Ser199, Ser202, Ser214, Thr205, Thr212 的磷酸化可使 tau 变成毒性分子从而失去正常微管相关蛋白的作用^[15], 而 Ser396 的磷酸化则可促使 tau 自身聚积成纤维状结构。Tau

羧基端 (Ser396, Ser404, Ser422) 的磷酸化对其形成 PHF 起关键作用^[16, 17]。实验中发现, tau 蛋白的糖基化水平下调不但能使 tau 蛋白 Ser199, Ser202, Ser214, Ser396, Thr205, Thr212 位点磷酸化水平增高, 同时 Ser396 位点的磷酸化水平也增高, 可见 AD 患者脑中糖代谢的下降, 不但能引起 tau 功能的丧失, 还使 tau 磷酸化形成 NFT, 葡萄糖摄入减少或代谢降低在 AD 的发生发展中的确起关键作用。

本实验用 RNAi 方法干扰 OGT 基因的表达, 致使 tau 蛋白的糖基化修饰减少而磷酸化修饰显著增高。证明 tau 蛋白的糖基化负调节其磷酸化, 葡萄糖摄入减少或代谢降低可能在 AD 的发病过程中起关键的作用, 为进一步阐明 AD 的发病机制提供的科学依据。

参 考 文 献

- 1 Pérez M, Hernández F, Gómez-Ramos A, *et al.* Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells. *Eur J Biochem*, 2002, **269**(5): 1484~1489
- 2 Fath T, Eidenmuller J, Brandt R. Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2002, **22**(22): 9733~9741
- 3 Rapoport M, Dawson H N, Binder L I, *et al.* Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(9): 6364~6369
- 4 Jackson G R, Wiedau-Pazos M, Sang T K, *et al.* Human Wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in drosophila. *Neuron*, 2002, **34**(4): 509~519
- 5 Hart G W. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Biochem*, 1997, **66**(1): 315~335
- 6 Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, *et al.* Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins—a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1619**(2): 167~176
- 7 Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, *et al.* O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(29): 10804~10809
- 8 石俊, 李旭, 卢芬. 饥饿对小鼠脑中 tau 蛋白磷酸化和 O-GlcNAc 糖基化的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(7): 647~652
Shi J, Li X, Lu F. *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(7): 647~652
- 9 Gong C X, Liu F, Grundke-Iqbal I, *et al.* Dysregulation of protein phosphorylation/dephosphorylation in Alzheimer's disease: A therapeutic target. *J Biomed Biotechnol*, 2006, **2006**(3): 31825
- 10 Mosconi L, Brys M, Glodzik S L, *et al.* Early detection of Alzheimer's disease using neuroimaging. *Exp Gerontol*, 2007, **42**(1~2): 129~138

- 11 Bokde A L, Teipel S J, Drzezga A, *et al.* Association between cognitive performance and cortical glucose metabolism in patients with mild Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2005, **20**(6): 352~357
- 12 Hoyer S. Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol*, 2004, **541**(7): 135~152
- 13 Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, *et al.* Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins—a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1619**(2): 167~176
- 14 Bertrand J R, Pottier M, Vekris A, *et al.* Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **296**(4): 1000~1004
- 15 Alonso Adel C, Mederlyova A, Novak M, *et al.* Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia taumutations. *J Biol Chem*, 2004, **279**(33): 34878~34881
- 16 Abraha, Ghoshal N, Gamblin T C, *et al.* C-terminal inhibition of tau assembly *in vitro* and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci*, 2000, **113**(21): 3734~3745
- 17 Haase C, Stieler J, Arendt T, *et al.* Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self aggregation. *J Neurochem*, 2004, **88**(6): 1509~1520

The Inhibitory Effect of OGT Gene Expression on The Level of tau Phosphorylation*

YANG Jiang-Yong, GU Jian-Lan, SHI Jian-Hua, LIU Fei, SHEN Qin**

(Department of Biochemistry, Medical College, Nantong University, Nantong 226001, China)

Abstract To investigate the effect of OGT expression inhibited by RNAi on the alteration of tau phosphorylation and glycosylation level in HEK293T cells. The siRNAs targeting OGT gene (OGT-siRNA_{1~3}) were designed and chemically synthesized. The OGT-siRNA_{1~3} were transfected into HEK293T cells *via* lipofectamine2000. The efficacy of RNA interference was detected by RT-PCR. The fluorescence of GFP/OGT was counted by fluorescence microscopy after pEGFP/OGT and OGT-siRNA_{1~3} cotransfected to HEK293T cells for 24 h. The level of tau phosphorylation and glycosylation were detected by Western blot after Plasmid pCI/tau₄₄₁ and the siRNA cotransfected HEK293T cells for 48 h. OGT-siRNA₃ (100 nmol/L) could effectively downregulate the expression of OGT gene compared with Mock group (80.0% at mRNA level and 51.3% at protein level). The level of phosphorylation at various sites of the tau was significantly upregulated and the glycosylation was downregulated following the inhibition of OGT gene expression. There is an apparent negative correlation between the modification of phosphorylation and glycosylation of tau protein, the deficient in glucose uptaken/metabolism may be an important pathogenesis of AD.

Key words Alzheimer's disease, tau, OGT, RNA interference

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00326

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30572076).

**Corresponding author.

Tel: 86-513-85051724, E-mail: qins@ntu.edu.cn

Received: July 1, 2008 Accepted: December 15, 2008