

# 探究神经元核内包涵体病细胞模型中的 核质转运障碍及其对该疾病的影响

## Investigation into the nucleocytoplasmic transport disruption and its effect on the Neuronal Intranuclear Inclusion Disease cell model

学生 student: 万理铭 Liming Wan

指导教师 mentor: 侯宪玉 Steven X. Hou

(复旦大学生命科学学院 School of Life Sciences, Fudan University)

**摘要:** 神经元核内包涵体病 (NIID) 是一种由 *NOTCH2NLC* 基因 5'非翻译区 GGC 重复序列异常扩增引发的神经退行性疾病。该疾病特征表现为中枢及周围神经系统与多器官组织中存在嗜酸性核内包涵体。尽管已有大量临床观察数据, 但 NIID 的分子机制仍不清楚, 现有细胞模型也难以满足深入研究需求。本研究成功构建了可高效表达核内多聚甘氨酸 (polyG) 包涵体的 293T 细胞模型, 为后续研究提供了更符合临床表型的研究体系。利用该模型, 我们发现 polyG 包涵体会通过招募核质转运 (NCT) 关键因子 Ran GTP 酶破坏核质转运功能。NCT 功能障碍显著影响了与神经发育通路相关的 mRNA 的定位。这些发现有力表明 polyG 包涵体通过损害 NCT 功能导致 NIID 的发生。同时, 我们的细胞模型为进一步探索 NIID 病理机制及药物研发提供了重要工具。

**Abstract:** Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID) is a neurodegenerative disorder caused by an expansion of GGC repeats in the 5' UTR of the *NOTCH2NLC* gene. The disease features the presence of intranuclear eosinophilic inclusion bodies in the central and peripheral nervous systems and various other organs. Despite numerous clinical observations, the molecular mechanisms underlying NIID remain poorly understood, and current cell models are insufficient for in-depth investigation. In this study, we successfully established a 293T cell model that efficiently expresses intranuclear poly-glycine (polyG) inclusion bodies, providing a more reliable research system. Using this model, we found that polyG inclusion bodies disrupt nucleocytoplasmic transport (NCT) by recruiting a key NCT factor, Ran GTPase. The malfunction of NCT significantly affects the localization of mRNAs involved in the neurodevelopment pathways. These findings highly suggest that polyG inclusion bodies lead to the development of NIID by impairing NCT. At the same time, our cell model provides a valuable tool to further explore the pathobiology of NIID and to pave the way for its drug development.

**关键词:** 神经元核内包涵体疾病; 多聚甘氨酸包涵体; 核质转运障碍; 细胞模型

**Keywords:** Neuronal Intranuclear Inclusion Disease; poly-glycine inclusion body; nucleocytoplasmic disruption; cell model

## 引言

神经元核内包涵体病（NIID）是一种东亚人群高发的神经退行性疾病，其特点为在中央或外周神经系统以及多种其它器官中产生透明的嗜酸性核内包涵体<sup>[1,2]</sup>。NIID 的症状有很强的临床异质性，可表现为渐进型痴呆、帕金森综合征、小脑共济失调和肌萎缩侧索硬化症等<sup>[3]</sup>。

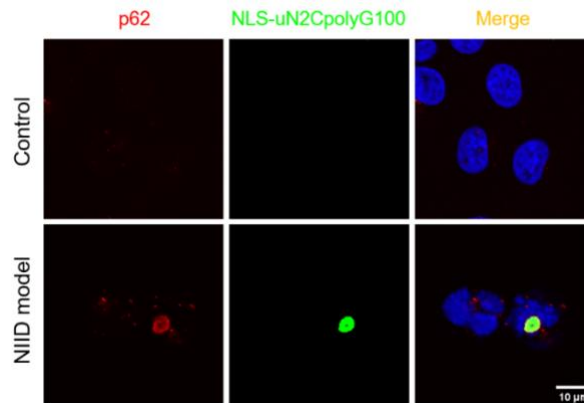
2019 年，国内外科研团队几乎同时在临床病例中通过长读测序发现 *NOTCH2NLC* 基因的 5'端非翻译区内出现的 GGC 重复序列的异常扩增是引发 NIID 的根本原因<sup>[4,5]</sup>。2021 年，复旦大学附属中山医院团队在小鼠模型中证实了这一发现，并表明该重复序列翻译出的多聚甘氨酸蛋白质（polyG）在神经元的细胞核内发生聚集并产生细胞毒性，最终影响神经元的正常生理功能<sup>[6]</sup>。我希望探究 polyG 包涵体如何导致 NIID 的发生。

通常，对于疾病的研究从最简单的模型出发，即细胞模型。但是由于已发表文献中使用的 293T 细胞模型表达的包涵体均不能入核，这与从患者的组织中得到的实验数据不一致。我们首先构建了一个新的细胞模型，能够更好地模拟病理状态。由于已发表文献显示，polyG 包涵体会使细胞的核质转运受到影响，因此我们使用优化的模型去筛选与包涵体共定位的核质转运因子及相关蛋白质，进一步探究核质转运异常与 NIID 的关系。

## 实验结果

### 1. 构建 NIID 细胞模型

我们通过改造质粒，添加核定位信号的序列以及增加 GGC 重复次数（从 60 次到 100 次），获得了多聚甘氨酸（polyG）包涵体可以进入核的 293T 细胞模型。在对此模型进行 NIID 标志物（p62 蛋白）的检测后，获得阳性结果，验证了新模型的正确性。



用 NLS-polyG100-EGFP 质粒或空载体转染 293T 细胞，48 小时后固定并对 p62 蛋白进行免疫荧光染色；制片后使用 Olympus FV3000 激光共聚焦显微镜拍照

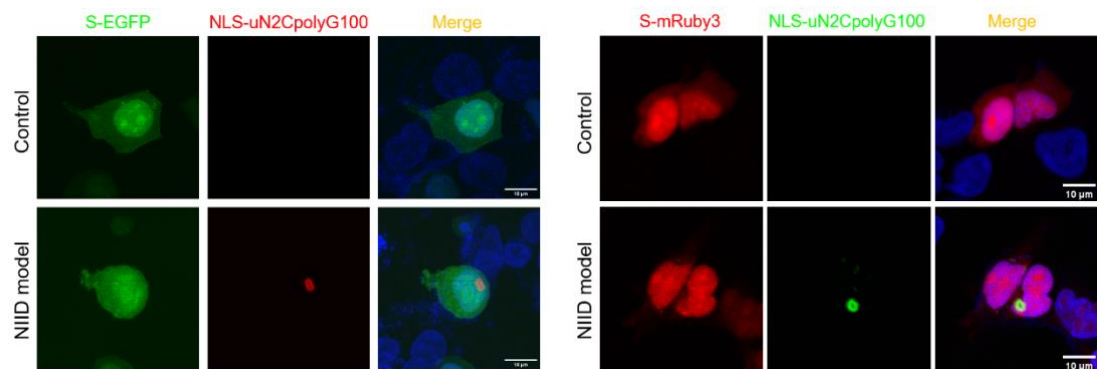
图 1 NIID 细胞模型的构建与验证

### 2. 探究 polyG 包涵体对核质转运的影响

复旦大学附属中山医院发表的文章表明 NIID 细胞模型中会发生核质转运异常<sup>[6]</sup>，但是此结论是基于在细胞质中表达 polyG 包涵体的细胞模型而得出的。因此我使用新的模型探究这一现象。

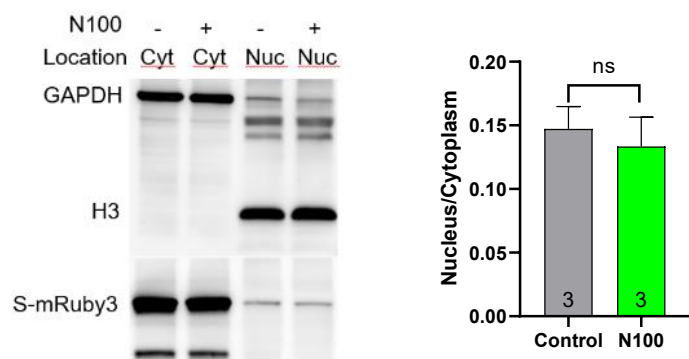
## 2.1 利用核质穿梭蛋白检测核质转运功能障碍

首先，我将 NLS-EGFP-NES 穿梭蛋白的定位作为检测指标，检验细胞的核质转运功能是否受到核内包涵体的影响。预测的结果是，若核质转运受阻，绿色荧光将全部位于核内或全部位于核外。但实际的实验结果是绿色荧光在核内外均有分布。此后，使用改造的 NLS-mRuby3-NES 质粒，重复实验，结果无显著差异。



用 NLS-polyG100-mRuby3/ NLS-polyG100-EGFP 质粒或空载体与穿梭蛋白 NLS-EGFP-NES/NLS-mRuby3-NES 质粒共转染 293T 细胞，48 小时后固定；使用 Olympus FV3000 激光共聚焦显微镜拍照  
图 2 观察穿梭蛋白在 NIID 细胞模型中的定位

为了更加精细地检测，我在共转染实验的基础上进行了核质分离实验，将细胞核与细胞质的蛋白质通过 Western Blot 半定量检测。两次生物学重复后，实验组与对照组仍无显著性差异。因此穿梭蛋白这一检测对象无法证明 polyG 包涵体对核质转运有阻碍作用。



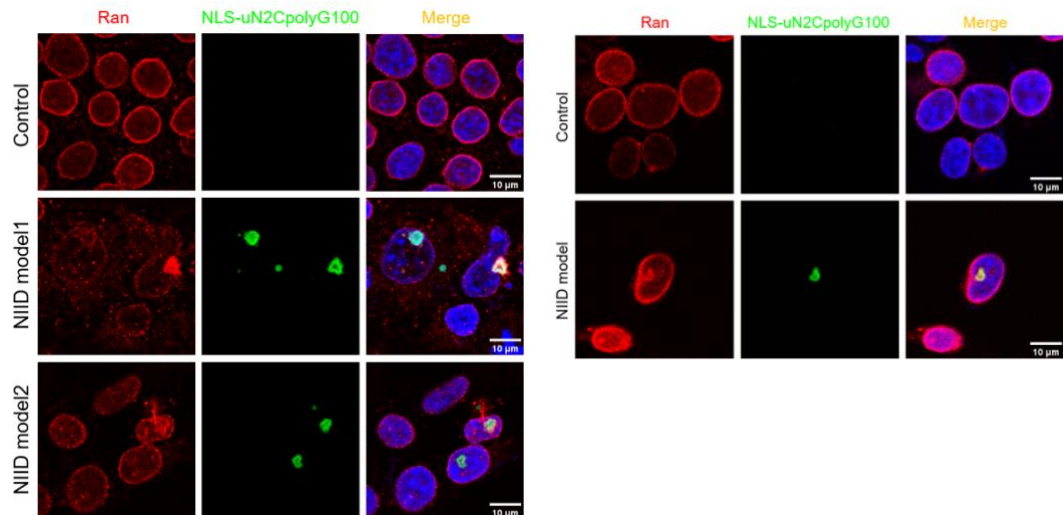
用 NLS-polyG100-EGFP 质粒或空载体与穿梭蛋白 NLS-mRuby3-NES 质粒共转染 293T 细胞，48 小时后进行细胞核质分离实验；将分离得到的蛋白样本进行 Western Blot 检测，其中 GAPDH 和 H3 的含量显示核质分离效果，mRuby3 的含量为最终检测对象；Cyt，细胞质；Nuc，细胞核；每组设 3 次重复；统计量为 mRuby3 在细胞核与细胞质中含量的比值；ns，无显著性差异

图 3 检测穿梭蛋白在 NIID 模型与对照组细胞的核与质中含量的比值

## 2.2 筛选与包涵体相互作用的核质转运相关蛋白

已有研究指出，定位于细胞质的 polyG 包涵体可干扰 RNA 的核质转运<sup>[6]</sup>。然而，在本研究中所检测蛋白的核质转运没有显著差异，可能存在以下两方面解释：1. 本模型中的包涵体主要分布于细胞核内，定位差异可能导致其对核质转运通路影响的机制与细胞质型聚集不同；2. 检测蛋白转运的方法存在局限性，如还未评估 RNA 或功能性转运过程，可能低估了包涵体的实际影响。因此我对核质转运相关蛋白进行定位检测，

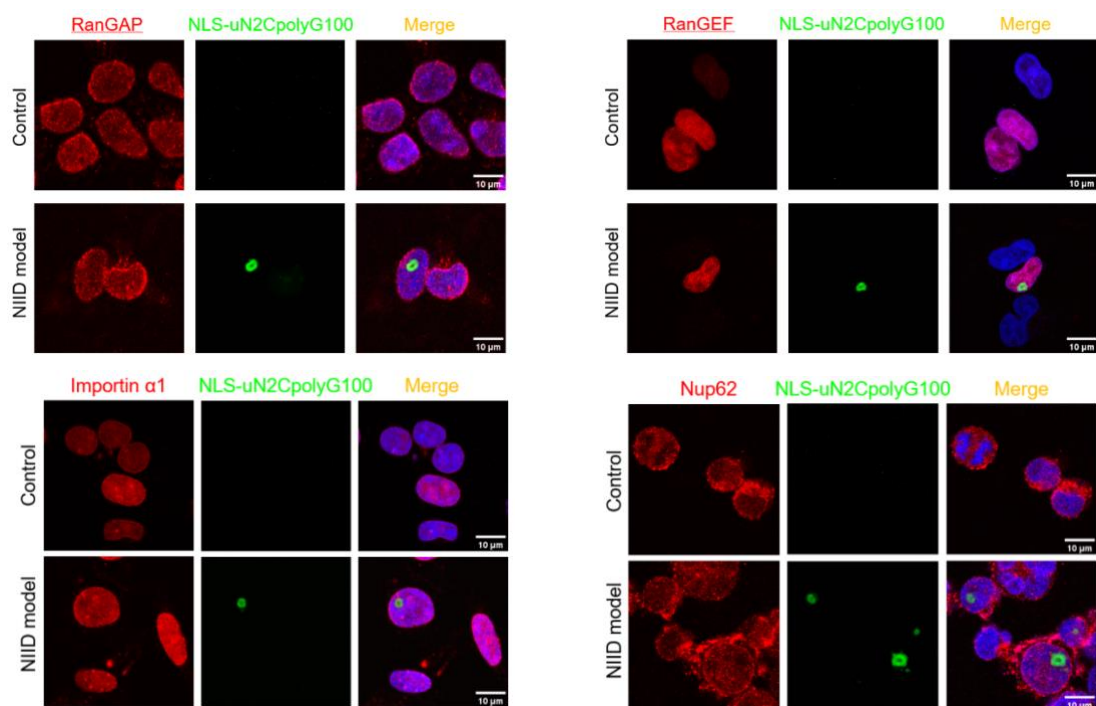
希望筛选到受包涵体影响的蛋白。首先我对 Ran GTPase 进行了免疫荧光检测，经统计发现 37 个表达包涵体的细胞中，32 个出现了 Ran 分布异常。因此，我又构建了 Ran-mRuby3 的融合蛋白质粒，共转染结果显示含有包涵体的细胞都出现 Ran 与包涵体的共定位现象，证实 Ran 和包涵体有结合作用。



左图为使用 NLS-polyG100-EGFP 质粒或空载体转染 293T 细胞，48 小时后固定，再对 Ran 蛋白进行免疫荧光染色；右图为使用 NLS-polyG100-EGFP 质粒或空载体与 Ran-mRuby3 质粒共转染 293T 细胞，48 小时后固定；制片后使用 Olympus FV3000 激光共聚焦显微镜拍照

图 4 检测 Ran GTPase 在 NIID 细胞模型中的定位

此外，我也对 RanGAP、KPNA2 (importin $\alpha$  的亚基) 和核孔蛋白 Nup62 进行了免疫荧光染色；构建 RanGEF 与 mRuby3 的融合蛋白质粒，与 polyG 共转染后观察定位。得到的结果是，这些蛋白均不受包涵体的影响，证明 polyG 包涵体对核质转运相关蛋白的结合是有特异性的。

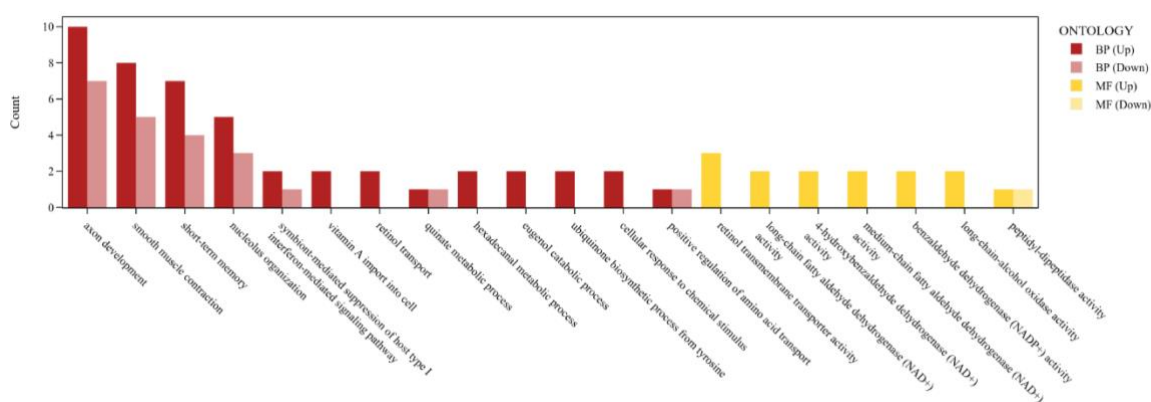


左上、左下、右下图为使用 NLS-polyG100-EGFP 质粒或空载体转染 293T 细胞，48 小时后固定，再分别对 RanGAP、KPNA2、Nup62 蛋白进行免疫荧光染色；右上图使用 NLS-polyG100-EGFP 质粒或空载体与 RanGEF-mRuby3 质粒共转染 293T 细胞，48 小时后固定；制片后使用 Olympus FV3000 激光共聚焦显微镜拍照

图 5 检测 RanGAP、RanGEF、Importin $\alpha$  和 Nup62 在 NIID 细胞模型中的定位

## 2.3 探究 mRNA 的核质运输是否受到包涵体影响

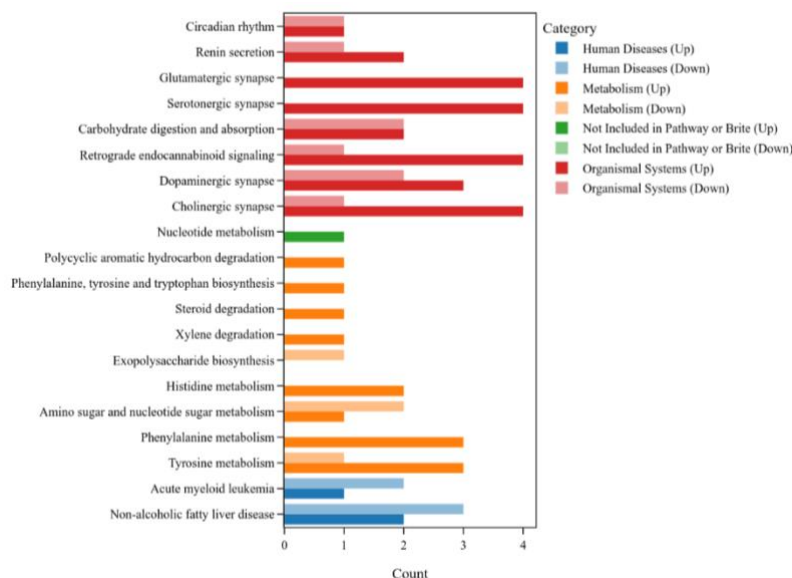
由于已经得知细胞核质转运因子 Ran 受到核内 polyG 包涵体的影响，因此希望检测是否 mRNA 的转运也受到影响。对 NIID 模型细胞和对照组细胞核质分离后，抽提细胞质的 RNA 并转录组测序。其中 Gene Ontology 分析发现细胞质内发生上调或下调的基因较多与轴突发育和短期记忆相关，同时也有其它一些生物过程（如平滑肌收缩和核仁组织过程等）有关联。这与 NIID 的临床异质性高度吻合，但核内 polyG 包涵体仍主要导致神经退行性疾病。



用 NLS-polyG100-EGFP 质粒或空载体转染 293T 细胞；在进行核质分离后，对细胞质抽提 RNA 并进行转录组测序，对测序结果进行 Gene Ontology 分析

图 6 NIID 细胞模型中细胞质内 mRNA 的 GO 分析

同样，使用 KEGG 通路分析，结果显示很多在 NIID 细胞模型中发生转录上调的基因都与突触形成相关，而突触是记忆形成的基础。



用 NLS-polyG100-EGFP 质粒或空载体转染 293T 细胞；在进行核质分离后，对细胞质抽提 RNA 并进行转录组测序，对测序结果进行 KEGG 通路分析

图 7 NIID 细胞模型中细胞质内 mRNA 的 KEGG 通路分析

## 总结与讨论

首先，我们构建了更好的 NIID 细胞模型，从而可以为将来的 NIID 研究提供基础。其次，利用这一模型，我发现了 polyG 核内包涵体对细胞核质转运产生了阻碍，并且是通过招募 Ran GTPase 导致的。最后，我对细胞中的 mRNA 分布是否受到包涵体的影响也进行了检测，发现在细胞质中，有很多与神经发育相关的基因转录水平发生了上调或下调的改变，从而可能解释了 NIID 的发病机理。

然而本课题仍有很多未解决的问题，比如 Ran 是通过哪个结构域和 polyG 发生的相互作用，以及它的功能是如何被抑制的。另外，关于 RNA 的核质转运是否受到影响，也需要进一步验证，因为目前仍未检测细胞核内的 RNA，因此不排除可能是整体转录水平发生变化，从而导致细胞质内的 mRNA 水平改变。但是细胞质内某些 mRNA 含量的改变一定影响了相应蛋白质的翻译，所以细胞质转录组分析结果仍有很大的意义。

## 参考文献

- [1] Boivin M, Deng J, Pfister V, et al. Translation of GGC repeat expansions into a toxic polyglycine protein in NIID defines a novel class of human genetic disorders: The polyG diseases. *Neuron*. 2021 Jun 2;109(11):1825-1835.
- [2] Lindenberg R, Rubinstein LJ, Herman MM, et al. A light and electron microscopy study of an unusual widespread nuclear inclusion body disease. A possible residuum of an old herpesvirus infection. *Acta Neuropathol*. 1968 Jan 2;10(1):54-73.
- [3] Sone J, Mori K, Inagaki T, et al. Clinicopathological features of adult-onset neuronal intranuclear inclusion disease. *Brain*. 2016 Dec;139(Pt 12):3170-3186.
- [4] Tian Y, Wang JL, Huang W, et al. Expansion of Human-Specific GGC Repeat in Neuronal Intranuclear Inclusion Disease-Related Disorders. *Am J Hum Genet*. 2019 Jul 3;105(1):166-176.
- [5] Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, et al. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet*. 2019 Aug;51(8):1215-1221.
- [6] Zhong S, Lian Y, Luo W, et al. Upstream open reading frame with NOTCH2NLC GGC expansion generates polyglycine aggregates and disrupts nucleocytoplasmic transport: implications for polyglycine diseases. *Acta Neuropathol*. 2021 Dec;142(6):1003-1023.



## 后记

感谢侯宪玉老师对于我开展本课题的大力支持与经费资助，感谢王洋老师在我课题进展中提供思路的启发，感谢朱佳欣师兄在我的课题进展与实验过程中为我答疑解惑，感谢陈彦豪师兄最初教我如何做最基础的实验。在每个人的帮助下，我虽然历经坎坷，却最终完成本课题，我会永远感激他们。

### 指导教师评语

万理铭同学在本课题中展现出良好的独立思考能力和积极探索精神，结合实验室前期工作，在指导下成功构建了核内 polyG 包涵体的 NIID 细胞模型，并系统探究其对核质转运的影响。实验设计合理，数据扎实，初步揭示了 polyG 与 Ran 的相互作用及其对 mRNA 定位的潜在影响。整体工作具有一定创新性，为核内 polyG 包涵体相关研究提供了有益补充，具备良好的后续研究潜力。

指导教师：侯宪玉

2025年4月25日