

学校项目编号：[18591]

复旦大学本科生学术研究资助计划 (FDUROP)

曦源项目结题报告

(2018 年项目)

课题名称 三种自噬调控药物对小鼠自噬的影响

所属学科 生物学 [代码 180]

项目负责人 赵子繁

院 系 生命科学学院

导 师 鲁伯坝

填表日期 2019. 4. 11

复旦大学教务处制表

二、结题报告

说明：

1. 根据开题报告中的研究进展计划要求作结题报告。
2. 根据课题的具体情况选择合适的结题形式，除报告和论文外，如用其他方式展示研究成果，则需附一篇包含研究背景、过程以及内容等的介绍性文字；
3. 书面版结题报告页数、格式不限，但须符合本学科基本学术规范。
4. 电子版结题报告的格式必须符合附录 2 中的格式要求。
5. 结题报告后请附参加该项目的心得和感悟。

三种自噬调控药物对小鼠自噬的影响

生命科学学院 赵子繁

指导老师 鲁伯坝

摘要：细胞自噬是真核细胞的一种主要的分解代谢途径。细胞自噬与肿瘤、神经退行性疾病等多种人类疾病有关。因此，自噬调控剂非常重要。然而，目前大多数的自噬调控剂对自噬的作用都是间接的，特异性不强。在前期研究中，我们发现了三种能够通过自噬核心蛋白 LC3 直接调控自噬的化合物。在本研究中，我们利用免疫印迹和免疫组织化学的方法，在野生型小鼠的肌肉组织中，验证了这三种化合物中的两种对自噬的作用。

关键词：细胞自噬、LC3、p62

Abstract: Autophagy is one of the main degradation routes in eukaryotic cells. Autophagy plays important roles in human diseases including cancer and neurodegenerative diseases. Therefore, autophagy regulators are highly desired. However, most of the current autophagy regulating drugs lack specificity and influence autophagy indirectly. In previous study, we discovered three novel autophagy regulate, which modulate autophagy directly through the key autophagic protein LC3. In this study, we used Western blot and Immunohistochemical staining and validated two of the three compounds' effect on autophagy in muscle tissues of wild type mice.

Key Words: Autophagy, LC3, p62

引言

细胞自噬作为真核细胞所共有的一种基本的生理功能，对多种生理生化过程、疾

病都有影响(Ohsumi, 2014)。目前, 基于细胞自噬的研究越来越多。对于这些研究者而言, 好的自噬调控药物非常关键。目前, 通过多种手段, 科研人员已经发现了多种自噬调控药物(Sarkar and Perlstein et al., 2007), 但这些药物大都调控自噬上游的蛋白, 或调控溶酶体功能, 对自噬的作用都是间接的。本课题通过筛选能够特异性结合自噬关键蛋白 LC3B 的小分子, 筛选出能够特异性地通过 LC3B 蛋白调控自噬的化合物, 有望实现对自噬的直接调控。

对自噬的精确调控具有潜在的医用前景。首先, 神经退行性疾病往往具有自噬功能障碍与致病蛋白堆积的特征。上调自噬有助于恢复细胞的原有功能, 并降解致病蛋白, 从而缓解神经退行症状(Nixon, 2013)。其次, 肿瘤细胞大多依赖高水平的自噬来生存和增殖, 下调自噬有助于杀灭肿瘤细胞(Lorenzo Galluzzi and Amaravadi et al., 2015)。目前, 自噬调控药物已经在多个肿瘤临床实验中被证明有效(Rojas-Puentes and Gonzalez-Pinedo et al., 2013)。

综上, 特异性的自噬调控药物有着巨大的科研、医用前景。而小鼠实验是证明药物有效的重要环节。通过前期筛选, 本课题组得到了三种能够在细胞中, 通过与 LC3B 蛋白结合, 稳定调控自噬的化合物。本课题的主要目标在于验证这三种药物是否能在小鼠中调控自噬。

本课题中, 我们将首先通过腹腔注射将药物注入小鼠体内。连续注射一周后, 处死小鼠, 并提取每只小鼠的全脑、肝脏、部分肌肉三种组织。随后, 通过免疫组化和免疫印迹两种方法, 分别检测了控制组与实验组的自噬水平。

免疫组化中, 我们主要通过 LC3、LAMP1 等蛋白观察自噬体、溶酶体、自噬溶酶体的数目的和位置分布。以此来确定自噬的情况。免疫印迹中, 我们检测了 p62、LC3- I、LC3- II 等自噬相关蛋白在组织中的含量, 从而验证了化合物在小鼠中的作用。

实验方法和材料

1. 前期筛选

前期筛选时, 我们利用 OI-RD 显微镜技术(Fei, Y. Y., et al., 2013), 分析了 4000 种小分子化合物与纯化的 LC3B 蛋白的结合情况。这 4000 种小分子化合物由复旦大学医学院党建军课题组提供。

2. 小鼠组织样品处理

我们从 Jackson Lab 购买了 12 只野生型小鼠。我们将这些小鼠每 3 只一组, 分为 4 个组, 对照组注射 DMSO, 实验组分别注射 D4、D5、D8 这三种药物。每天腹腔注射一次, 连续一周。随后, 我们处死了这些小鼠, 并从中提取了脑、肝脏以及小腿腓肠肌三种组织。利用福尔马林溶液固定了这些组织后, 我们先后用 20%和 30%浓度的蔗糖溶液来给这些组织脱水。随后, 每种组织被平均分为两份(同一只小鼠的脑被分为左右脑; 肝脏被分为两半; 左右腿腓肠肌被别保存), 一份用于免疫

印迹实验，另一份用于免疫组织化学染色。

3. 免疫印迹

我们首先对每份小鼠组织样品加入 0.5%的 Triton 溶液，并利用超声波裂解（肌肉的超声波处理时间长于肝脏和脑）。随后，我们利用高速离心除去样品中的沉淀，仅保留上层清液。我们对上层清液进行 BCA 蛋白浓度检验，初步测定蛋白浓度后，将样品的蛋白浓度稀释到相同水平（20ng/ μ l）

4. 免疫组织化学

我们将经过福尔马林和蔗糖溶液处理的小鼠组织用 OCT 包埋，-80℃ 冷冻，并利用冷冻切片的方法将肌肉和肝脏组织切成 20 μ m 厚的薄片。我们随后将这些薄片贴于载玻片上。我们基本遵照 abcam 的《IHC staining protocol》对样品进行染色。唯一不同的是，为了增加肌肉组织的通透性，在封闭步骤之前，我们用 0.1%的 Triton 溶液对小鼠肌肉切片进行了 10 分钟的打孔。

实验结果

1. 前期筛选

我们与光学系费义艳老师课题组合作，运用 OI-RD 显微镜技术，扫描了 4000 种小分子化合物。发现其中有 14 种能够与 LC3B 蛋白特异结合。随后，我们检验了这 14 种化合物对细胞自噬的影响（图 1）。通过对自噬底物 p62 水平的检测，以及对 LC3B- II 水平的检测，我们发现：D4 能够稳定地降低 p62 水平，这表明 D4 增强了自噬；D5 增加了 p62 的量，表明 D5 抑制自噬，但 D5 同时提高了 LC3B- II 的量，表明 D5 促进自噬体的合成；D8 也增加 p62 的量，是一种自噬的抑制剂。

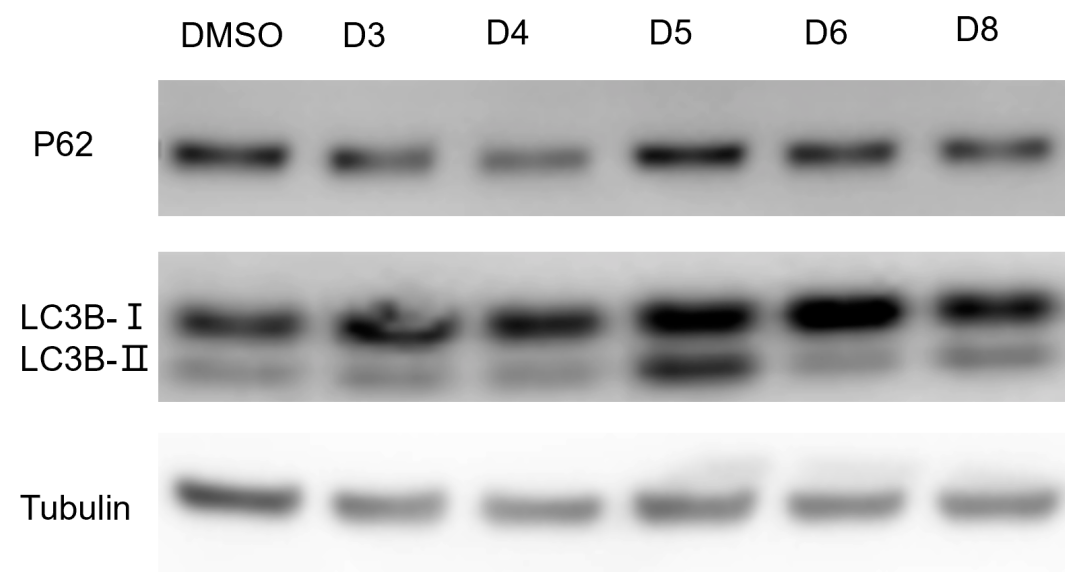


图 1：在 293T 细胞中分别加入各种 LC3 结合化合物，并检验 p62 和 LC3 蛋白的水平变化。

2. 小鼠实验结果

在细胞中初步确定了 D4, D5 和 D8 的作用之后，我们开始在小鼠中开展实验。我们用药物处理小鼠之后，对得到的肌肉组织进行了免疫印迹和免疫组织化学检测。免疫印迹实验的结果表明：D4 降低了 LC3B- I 和 LC3B- II 的水平；D5 提高了 LC3B- I 和 LC3B- II 的水平；D8 提高了 LC3B- I 的水平，降低 LC3B- II 的水平（图 2）。p62 抗体的作用并不理想，因此并未展示。同时，我们在其他研究中发现，D5 对于细胞自噬的效果较为复杂。因此，我们将 D5 用于研究，没有对 D5 进行后续的实验。在 D4 和 D8 的免疫组织化学染色实验中，我们发现 D4 增强了 p62 的信号，而 D8 减弱了 p62 信号（图 3）。由此，我们推断 D4 能够在小鼠中增强自噬，而 D8 在小鼠中抑制自噬。其中，D8 抑制自噬的结果与其降低 LC3B- II 水平的结果是相符合的；而 D4 降低 p62 水平的同时也降低 LC3B- II 的量，这表明 D4 促进自噬但不促进自噬体的合成。

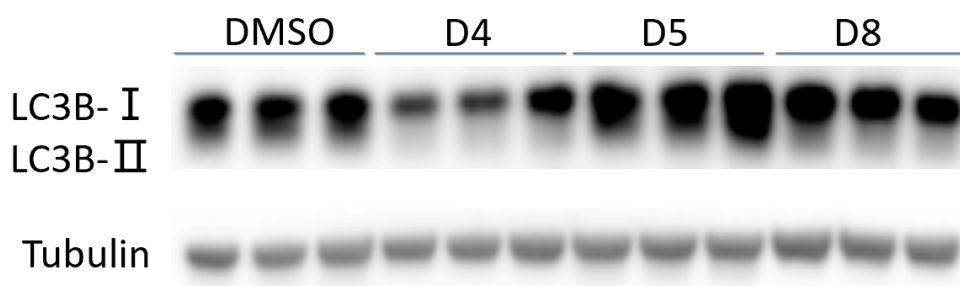


图 2：小鼠肌肉组织免疫印迹实验。相邻的三个样品来自同组的三只不同的小鼠。

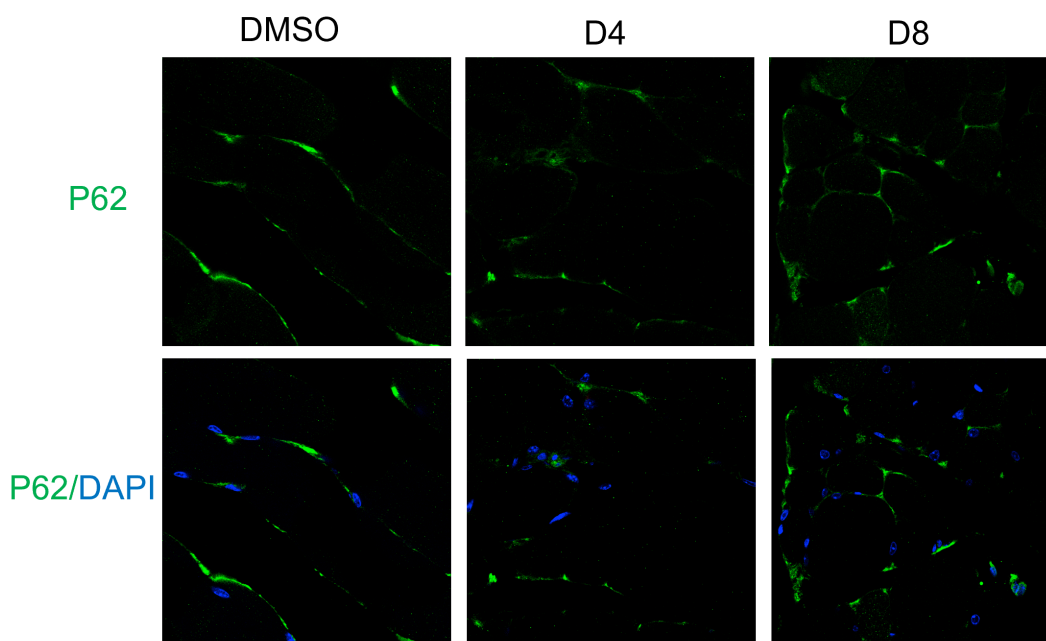


图 3: 小鼠肌肉组织免疫组织化学染色结果。绿色为 p62 蛋白的信号, 蓝色为 DAPI 的信号。

3. 功能实验

在小鼠中验证了 D4 和 D8 的对自噬的作用之后, 我们进一步对两种化合物的功能进行了研究。我们首先在 Q7/7 细胞中检测了化合物对细胞生长的影响 (图 4)。结果表明, D4 对细胞的生长几乎没有影响; D8 对细胞生长有轻微的抑制, 而且这种抑制可以进一步被自噬抑制剂氯喹 (CQ) 加剧。

增强自噬有利于降解堆积的蛋白, 并缓解神经退行性疾病的症状。由于 D4 能在小鼠中有效增强自噬, 我们进一步检验了 D4 对亨廷顿舞蹈症 (HD) 神经元的拯救作用。结果表明, 在 48 小时之内, D4 能够有效缓解 HD 神经元的死亡。

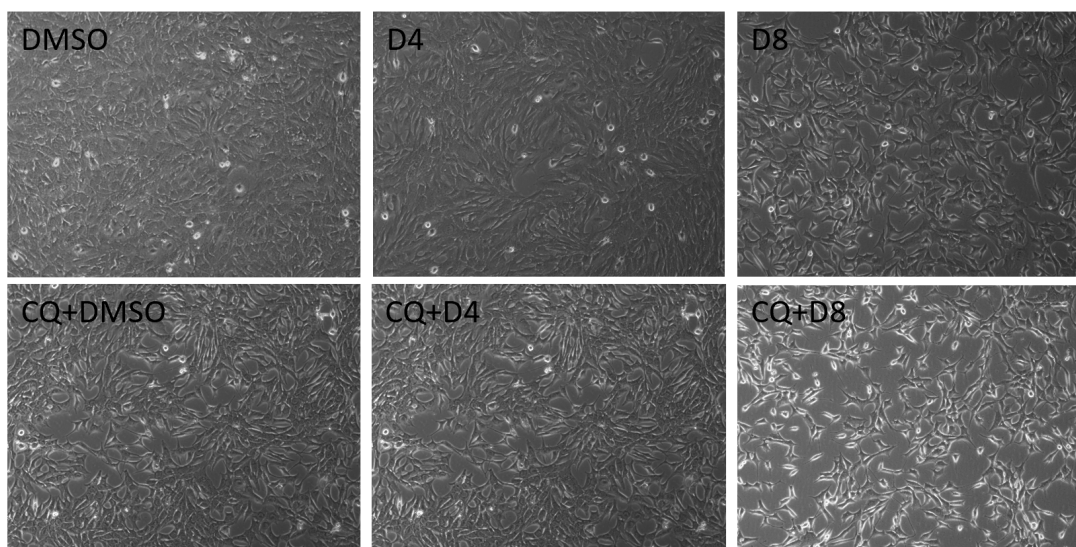


图 4: STHdhQ7/7 形态观察实验。在 Q7/7 细胞的培养基中分别加入 10 μ M 的 DMSO、D4、D8 和 CQ, 培养 24 小时, 观察细胞的生长情况。

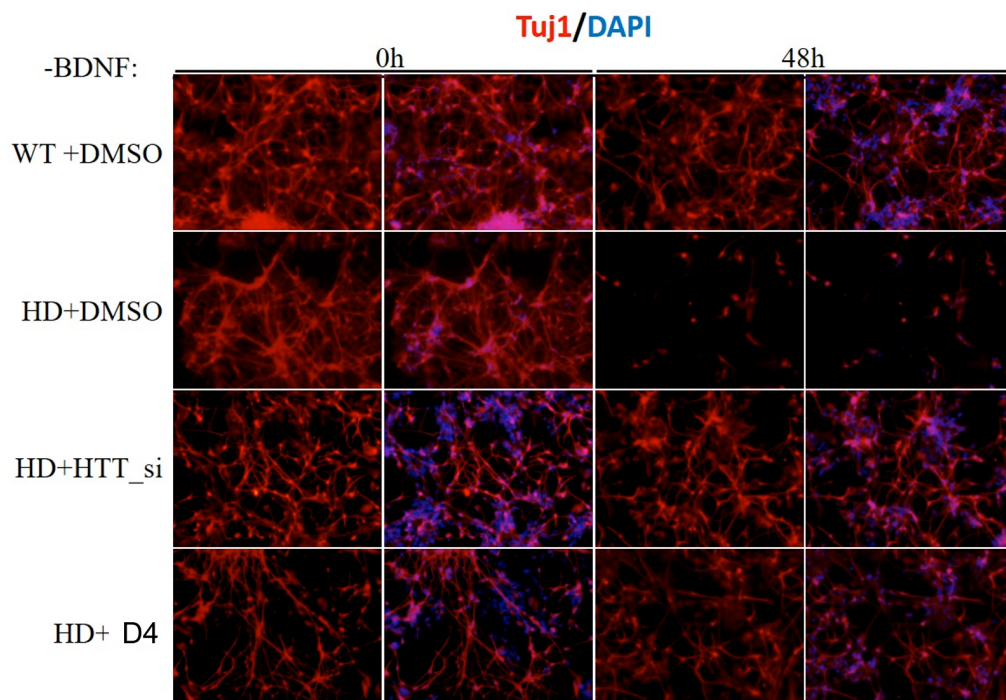


图 5：亨廷顿舞蹈症（HD）神经元拯救实验。在 HD 神经元中分别加 DMSO、HTT 的 siRNA，以及 10 μ M 的 D4。培养 48 小时后，用 Tuji 染色，观察神经元的生长情况。

结论

本课题通过前期高通量筛选和细胞实验，发现了三种全新的自噬调控化合物。本课题主要验证了这三种化合物在小鼠中的作用。通过免疫印迹和免疫组织化学的方法，我们验证了 D4 能够在小鼠中促进自噬，D8 能够在小鼠中抑制自噬。在项目进行期间，我们发现 D5 对自噬的作用比较复杂，因此暂停了对 D5 的研究。对小鼠的肝脏和脑组织的实验由于技术问题，没能取得有意义的结果，因此只展示了肌肉组织的结果。验证了 D4 和 D8 对自噬的调控作用后，我们进一步开展了功能实验，发现 D4 能够拯救 HD 神经元死亡，D8 轻微抑制细胞生长。

参考文献

Abcam., IHC staining protocol

Fei, Y.Y., et al., An optics-based variable-temperature assay system for characterizing thermodynamics of biomolecular reactions on solid support. 2013.

Lorenzo Galluzzi, F. P. J. M. and E. H. B. F. Amaravadi, et al. (2015). "Autophagy in malignant transformation and cancer progression." EMBO J.

Nixon, R. A. (2013). "The role of autophagy in neurodegenerative disease." Nature Medicine.

Ohsumi, Y. (2014). "Cell Research review Historical landmarks of autophagy research." Cell Research.

Rojas-Puentes, L. L. and M. Gonzalez-Pinedo, et al. (2013). "Phase II randomized, double-blind, placebo-controlled study of whole-brain irradiation with concomitant chloroquine for brain metastases.".

Sarkar, S. and E. O. Perlstein, et al. (2007). "Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models." Nature Chemical Biology

致谢

感谢曦源计划项目的资助。感谢党永军老师课题组提供的化合物库。感谢费义艳老师课题组提供的 OI-RD 显微镜技术。

项目负责人（签名）:

日期: 年 月 日

三、指导老师评语

请手写意见。电子版须誊录导师手写的意见。

在过去一年中，赵子繁同学工作认真努力，能在实验过程中能够及时和实验室的其他成员沟通，并迅速解决实验中的各类技术问题。

指导教师（签名）：

日期： 年 月 日

五、学校复核意见

专家评审：

评审老师签名：

日期： 年 月 日

教务处意见：

☐ 同意结题

☐ 不同意结题

公 章：

日期： 年 月 日