

李娟,晏和熙,李红梅,等. *ATG5/7* 参与 METH 和 HIV-1Tat 蛋白协同诱导的树鼩中脑神经元自噬 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 20-24.

Li J, Yan HX, Li HM, et al. METH and HIV-1Tat protein co-induced autophagy via *ATG5/7* pathway in primary midbrain neuronal cells [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 20-24.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.03.004

ATG5/7 参与 METH 和 HIV-1Tat 蛋白协同诱导的树鼩中脑神经元自噬

李娟^{1,2}, 晏和熙¹, 李红梅¹, 吕丽琼¹, 曾晓锋^{3*}, 代解杰^{2*}

(1.昆明医科大学基础医学院,昆明 650500; 2.中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所,实验树鼩标准化与应用研究云南省创新团队,昆明 650118; 3.昆明医科大学法医学院,昆明 650500)

【摘要】 目的 探讨 METH 和 HIV-1Tat 蛋白协同诱导树鼩中脑神经元自噬的可能机制。**方法** 本文以树鼩原代中脑神经元为模型,采用 Western blot 和 Real-time PCR 法测定 METH 和 HIV-1Tat 蛋白治疗细胞后,细胞中 *ATG5/7* 蛋白和基因的表达。**结果** METH 和 HIV-1Tat 蛋白能够诱导树鼩原代中脑神经元自噬,两者具有协同效应,且通过调节 *ATG5/7* 基因表达上调 *ATG5/7* 蛋白,进而调控自噬。**结论** *ATG5/7* 基因参与了 METH 和 HIV-1Tat 蛋白诱导的树鼩中脑神经元自噬,这一结论为研究艾滋病脑病和自噬之间的关系提供了新的理论依据。

【关键词】 HIV-1Tat 蛋白;甲基苯丙胺;自噬;原代培养;树鼩

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 03-0020-05

METH and HIV-1Tat protein co-induced autophagy via *Atg5/7* pathway in primary midbrain neuronal cells

LI Juan^{1,2}, YAN Hexi¹, LI Hongmei¹, LV liqiong¹, ZENG Xiaofeng^{3*}, DAI Jiejie^{2*}

(1.School of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China.

2. Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Institute of Medical Biology, Yunnan Innovation Team of Standardization and Application Research in Tree Shrew, Kunming 650118. 3. School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500)

【Abstract】 Objective Although the clinical implementation of antiretroviral therapy (cART) has significantly prolonged the lifetime of AIDS patients, HIV-associated neurocognitive disorders (HANDs) remain a critical concern in a considerable number of HIV-positive individuals. HIV-1Tat protein is a viral protein released from HIV-infected cells, which may be one of the underlying mechanisms behind HANDs. Methamphetamine (METH) can penetrate the blood-brain barrier, damaging nerve cells and increasing the risk of HANDs. The combination of HIV-1Tat and METH can induce autophagy and apoptosis in nerve cells, but the regulatory mechanism behind this has remained unclear. **Methods** In this

[基金项目] 国家科技支撑计划项目 (2014BAI01B00); 国家自然科学基金地区基金项目 (81960340, 81660310, 81560303); NSFC-云南联合基金重点支持项目 (U1702282); 云南省科技人才和平台计划项目 (2017HC019); 云南省教育厅项目 (2019J1186); 昆明医科大学大学生创新项目 (2019-80)。

[作者简介] 李娟 (1980—), 女, 讲师, 研究方向: HIV 感染和毒品滥用协同机制研究。E-mail: 121093258@ qq.com

[通信作者] 曾晓锋 (1977—), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 毒品滥用机制研究。E-mail: zxf2004033@ 163.com

代解杰 (1961—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 病原生物学。E-mail: dj@ imbcams.com.cn * 共同通信作者

study, the primary midbrain neurons of tree shrews were used to determine the expression of ATG5/7 proteins and genes induced by HIV-1Tat and METH via Western blot and real-time PCR. **Results** HIV-1Tat protein and METH induced autophagy in tree shrews' primary midbrain neurons and had a synergistic effect. ATG5/7 genes were involved in this autophagy. **Conclusions** ATG5/7 genes are involved in HIV-1Tat protein and METH-induced autophagy of nerve cells, which provides a new theoretical basis for studying the relationship between HANDs and autophagy.

[Keywords] HIV-1Tat protein; methamphetamine; autophagy; primary culture; tree shrew

众所周知,HIV 感染和毒品滥用是当今世界上严重两大社会和公共卫生问题,目前临床使用的抗逆转录病毒疗法(cART)虽然改善了 HIV 感染者的健康状况,但是不能改善 HIV 相关神经认知障碍(HAND)的症状,因此,HAND 仍然是 HIV 感染者面临的主要问题之一^[1],而毒品的滥用增加了 HAND 的风险。METH 即甲基苯丙胺(Mmethamphetamine, METH)也称为“冰毒”,会影响中枢神经系统功能的正常发挥。甲基苯丙胺滥用常常伴随 HIV 病毒的感染,而且甲基苯丙胺可以影响 HIV 病毒的复制和发病机制^[2],这些 HIV 感染者也表现出更大的神经损伤和更高的认知能力下降。

HIV-1Tat 蛋白是一种病毒蛋白,可以通过诱导神经细胞凋亡、自噬以及神经突触的改变,产生神经毒性,是 HAND 的主要致病因子之一^[3-4]。而 METH 能够刺激多巴胺神经元产生活性氧分子(ROS)从而导致谷氨酸代谢异常^[5],因而产生神经毒性。之前我们报道,METH 和 HIV-1Tat 蛋白可以显著增加神经细胞凋亡和自噬的风险,两者具有协同作用^[6-7],然而这种协同作用的分子机制还不清楚。

细胞死亡可以是偶然死亡,也可以是程序化死亡,都是为了维持细胞内环境的稳定。程序性细胞死亡依赖于特定的信号通路,导致裂解或非裂解形态,有凋亡(apoptosis)和自噬(autophagy)两种形式。自噬意即细胞的自我吞噬,是通过降解和回收细胞成分来维持细胞稳态,需要超过 30 多种自噬相关蛋白(ATG)来进行调节这个过程^[8]。树鼯(Tupaia Belangeri)虽然是一种小型哺乳动物,但是因为它与人类的亲缘关系相近,一些研究人员甚至将树鼯归类为一种独立的哺乳动物分类群^[9],而且树鼯大脑较发达,因此很多研究者将树鼯作为研究人类神经系统疾病的动物模型。

之前我们已经报道 METH 和 HIV-1Tat 蛋白能够协同诱导树鼯中脑神经元自噬,而 ATG5/7 蛋白参与了两者诱导的自噬,METH 和 HIV-1Tat 蛋白诱导的细胞氧化应激可能是引起自噬的基本原因^[7]。

据研究应激诱导的细胞自噬初期可能会起到保护细胞的作用,但应激状态持续,细胞无法适应这种应激,则会引起细胞凋亡^[10]。ATG5 和 ATG7 作为两种重要的自噬相关蛋白参与了 METH 和 HIV-Tat 蛋白诱导的自噬,对于维持细胞的内环境有一定的作用,然而氧化应激持续进行时,细胞是如何调节自噬并不完全被了解。而本研究则进一步证实 METH 和 HIV-1Tat 蛋白通过增加 ATG5/7 基因的表达上调 ATG5/7 蛋白,进而调控两者诱导的神经元自噬,探讨自噬的潜在机制,揭示吸毒人员引起的艾滋病脑病的发病机制,对于寻找合适的药物治疗靶点有一定的临床意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物

中緬树鼯滇西亚种(Tree Shrew, Tupaia Belangeri Chinesis)(新生 3 d 内)10 只,普通级,雌雄各半,体重 9.1~16.5 g,平均(13.1±1.2)g,选取身体虚弱,母树鼯不给予哺乳、出生 3 d 内的乳树鼯,由中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心提供,实验动物生产许可证号[SCXK(滇)K2018-0002],使用许可证号[SYXK(滇)K2018-0002]。同时中国医学科学院医学生物学研究所实验动物福利伦理委员会批准了本研究(DWSP2017053),实验过程中按照实验动物使用的 3R 原则,所有树鼯给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

LC3B rabbit Ab(2775s),Beclin-1 rabbit Ab(3738s),Anti-rabbit IgG-HRP(7074s),Anti-mouse IgG-HRP(7076s)购于 Cell Signaling Technology 公司。ATG5 rabbit Ab(ab108327),ATG7 rabbit Ab(ab133528)购于 abcam 公司。Anti-β-Actin Mouse Ab(A1978)购于 Sigma 公司;胎牛血清(1739464),B27 supplement(50X)(17504-044),Pen Strep(15140-122),0.25% Trypsin-EDTA(25200-056),Neurobasal-a 培养基(10888-022)购于 Gibco 公司;DMEM/F12 培养基(SH30023.01)购于 Hyclone 公

司;Western Blot 相关试剂购于上海碧云天生物技术有限公司;HIV-Tat 蛋白 Clade-B (HIV-129-c) 购于 PROSPEC 公司,甲基苯丙胺(化学对照品,纯度>99%,Methylamphetamine) (171212-200603) 购于中国药品生物制品检定所;RNAzol RNA 提取试剂(RN190) 购于 MRC 公司,RT-PCR 一步法 RT-PCR 试剂盒 SYBR Green 染料法(1708892) 购于 BIO-RAD 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 树鼩中脑神经元分离、培养

树鼩中脑神经元分离、培养方法见参考文献^[7]。

1.3.2 引物设计、合成

从 NCBI 数据库中查找 ATG5 和 ATG7 的序列,设计 qRT-PCR 检测引物,ATG5 引物序列正向:5'-GCCATCAATCGGAACTCAT-3',反向:5'-CACAGGACGGAACAGCTTCT-3',ATG7 引物序列正向:5'-GCCCTGTGTCTTCCAGAGAG-5',反向:5'-AGTGCCGTGACTCCTTCTGT-3';同时以 GAPDH 作为内参基因,GAPDH 引物序列正向:5'-CAT GGC ACC GTC AAG GCT GAG AA-3',反向:5'-CAG TGG ACT CCA CGA CGT ACT CA-3',引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3.3 RNA 提取以及荧光定量 RT-PCR

采用 TRIzol 法提取树鼩中脑神经元中的 mRNA,并对其进行浓度和纯度的测定。使用一步法 SYBR Green 荧光 PCR 进行 RT-PCR 反应,所得数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算分析。

1.3.4 Western blot

用 Western 和 IP 裂解液提取蛋白,经 BCA 法测定蛋白浓度。取 25 μg 蛋白,经 SDS-PAGE 蛋白分离后,转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,随后加入一抗(LC3、Beclin-1、ATG5、ATG7,稀释比例均为 1:1000, β -actin 稀释比例为 1:2000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用 1 $\times$ PBST 清洗干净后,放入二抗中室温孵育 2 h,用 ECL 显色液显色,利用 Image J 软件分析灰度值,每次实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

本实验数据分析使用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 6.00 软件,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),结果以 $P<0.05$ 具有统计学意义。HIV-1Tat 蛋白和/或 METH 诱导的 Beclin-1、LC3B、

ATG5/7 蛋白使用 Bliss 独立模型(Bliss independence model) 计算两者是否具有协同效应,效应值 < 1 为协同(synergistic) = 1 为叠加(additive), > 1 为拮抗(antagonistic)^[11]。

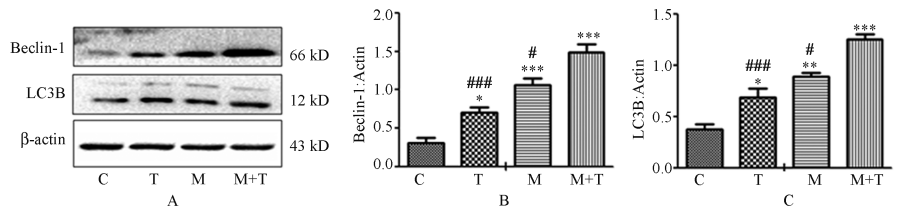
2 结果

2.1 METH 和 HIV-1Tat 蛋白协同诱导树鼩中脑神经元自噬

根据之前研究结果^[7] 本文用 HIV-1Tat 蛋白(100 nmol/L)单独/联合 METH(0.5 mmol/L)作用细胞 24 h,检测细胞中自噬蛋白 Beclin-1 和 LC3B 蛋白的表达水平(图 1)。METH 和 HIV-1Tat 蛋白均可以提高细胞中 Beclin-1 和 LC3B 蛋白的表达,与对照组相比,HIV-1Tat 蛋白诱导细胞 Beclin-1 和 LC3B 蛋白的表达分别上升了 2.2 倍($P<0.05$)和 1.8 倍($P<0.001$);METH 诱导细胞 Beclin-1 和 LC3B 蛋白表达分别上升了 3.4 倍($P<0.05$)和 2.3 倍($P<0.01$)。METH 和 HIV-1Tat 蛋白联合作用细胞后,细胞中 Beclin-1 和 LC3B 蛋白明显升高,高于其余组,有显著性差异($P<0.001$)。METH 和 HIV-1Tat 蛋白两者联合诱导细胞 Beclin-1 和 LC3B 蛋白的效应值分别是 0.77 和 0.76,具有协同效应。

2.2 ATG5 和 ATG7 参与了两诱导的细胞自噬

本文检测了细胞中自噬蛋白 ATG5/7 的表达水平,如图 2 所示:给予细胞 METH 和 HIV-1Tat 蛋白治疗后,细胞中 ATG5/7 蛋白表达量升高。HIV-1Tat 蛋白单独作用细胞后,细胞中 ATG5/7 蛋白表达比对照组分别上调了 1.1 倍($P<0.05$)和 1.0 倍($P<0.01$),METH 作用细胞后,细胞中 ATG5/7 蛋白表达比对照组上调了 1.2 倍($P<0.05$)和 1.0 倍($P<0.01$),而两者同时作用细胞后,细胞中 ATG5/7 蛋白表达量明显上升,作用效应分别是 0.84(ATG5)和 0.64(ATG7),具有协同效应。而 PCR 结果显示(图 3),单独给予 HIV-1Tat 蛋白治疗后,ATG5/7 基因的表达量升高,分别是对照组的 99 倍($P<0.05$)和 129 倍($P<0.01$);单独应用 METH 治疗后 ATG5/7 基因的表达量也升高,分别是对照组的 114 倍($P<0.01$)和 128 倍($P<0.01$);HIV-1Tat 蛋白和 METH 两者联合明显上调 ATG5/7 的表达量,与单独药物组和对照组比,差异有显著性,具有统计学意义。

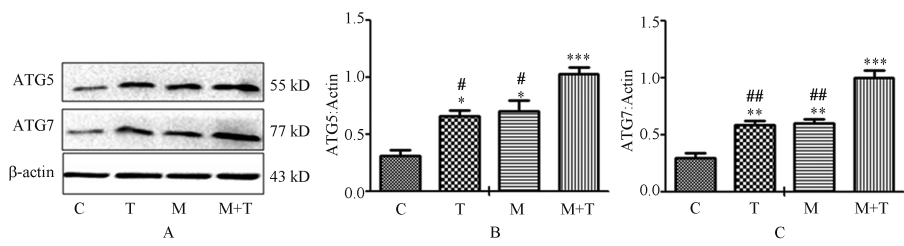


注：A:WB 结果;B: Beclin-1 蛋白灰度值与 β -action 灰度值比值;C: LC3B 蛋白灰度值与 β -action 灰度值比值。灰度值测定用 Image J 软件,数据分析及作图使用 Graphpad Prism 软件。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与 M+T 组相比, # $P<0.05$, ### $P<0.001$ 。

图 1 METH 和 HIV-1Tat 蛋白诱导细胞后 Beclin-1 和 LC3B 蛋白表达

Note. A, The data were analyzed using western blotting. B, The ratio of Beclin-1/ β -action. C, The ratio of LC3B/ β -action. The data were quantified by Image J software, and displayed using a scatterplot with bars showing the means and individual data points of each column by Graphpad Prism software. Representative blot images are shown.Compared with control. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with M+T. # $P<0.05$, ### $P<0.001$.

Figure 1 Cells were exposed to HIV-1Tat protein and/or METH for 24 h and the protein levels of Beclin-1 and LC3B were analyzed by western blotting.

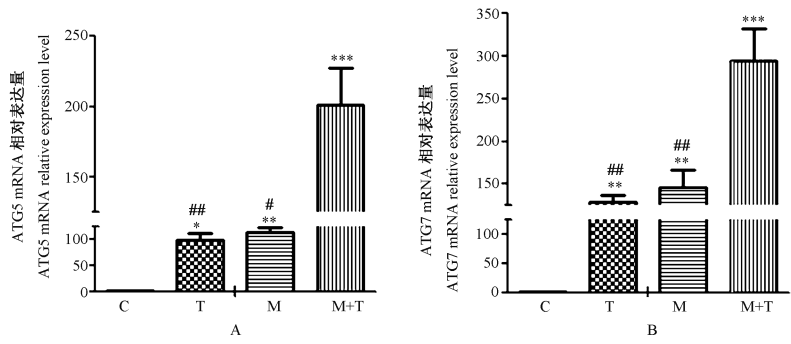


注：A:WB 结果;B:ATG5 蛋白灰度值与 β -action 灰度值比值;C:ATG7 蛋白灰度值与 β -action 灰度值比值。灰度值测定用 Image J 软件,数据分析及作图使用 Graphpad Prism 软件。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与 M+T 组相比, # $P<0.05$, ### $P<0.001$ 。

图 2 METH 和 HIV-1Tat 蛋白诱导细胞 ATG5 和 ATG7 蛋白表达

Note. A, The data were analyzed using western blotting. B, The ratio of ATG5/ β -action. C, The ratio of ATG7/ β -action. The data were quantified by Image J software, and displayed using a scatterplot with bars showing the means and individual data points of each column by Graphpad Prism software. Representative blot images are shown.Compared with control. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with M+T. # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 2 Cells were exposed to HIV-1Tat protein and/or METH for 24 h and the protein levels of ATG5 and ATG7 were analyzed by western blotting



注:与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与 M+T 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 3 METH 和 HIV-1Tat 蛋白诱导细胞 ATG5 和 ATG7 基因表达

Note. A, The expression levels of mRNA ATG5. B, The expression levels of mRNA ATG7. The data were calculated and analyzed by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, and displayed using a scatterplot with bars showing the means and individual data points of each column by Graphpad Prism software.Compared with control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with M+T, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 3 Cells were exposed to HIV-1Tat protein and/or METH for 24 h and the expression levels of mRNA ATG5 and ATG7

3 讨论

HIV 感染者滥用 METH 增加了 HAND 发生的

风险。据研究,METH 通过下降神经突触前和突触后蛋白降低 HIV-1Tat 转基因 (Tat-Tg) 小鼠的工作记忆和空间记忆,并且服用 METH 的 Tat-Tg 小鼠在

空间记忆方面具有明显的缺陷^[12]。METH 和 HIV-1Tat 能协同增强大鼠和 SH-SY5Y 细胞(人神经母细胞瘤细胞)的氧化应激反应,从而损伤大鼠的血脑屏障,诱导细胞凋亡和自噬,增加神经毒性^[13-14]。

哺乳动物的自噬可以在缺氧、饥饿、病毒侵入等应激情况下增强,有利于细胞的存活,但是过度自噬则会导致细胞死亡。在酵母和哺乳动物中,有两种泛素样(ubiquitin-like, UBL)蛋白的共轭系统利于噬菌体扩大延伸^[15],其中一个系统是 ATG12-ATG5-ATG16 复合体。在酵母中,ATG5 依赖 E1 激酶而激活,而 ATG7 作为一种独特的 E1 酶,激活 ATG12 并将其转化为不同的 E2 酶^[16]。研究发现 ATG5/7 依赖性自噬在吗啡成瘾以及神经元树突调节中起着关键作用^[17]。Zheng 等^[18]通过 Ad-ATG5/7 重组腺病毒转染小鼠软骨细胞后,发现 ATG5/7 蛋白可以通过 PERK 信号通路促进自噬。Yang 等^[19]认为 METH 通过 AKT/mTOR 信号通路调控神经细胞自噬,而天麻素能够减轻其诱导的自噬,从而起到保护作用。在本研究中,METH 和 HIV-1Tat 蛋白协同可以显著上调 ATG5/7 基因的表达水平,从而调控蛋白表达促进细胞自噬,增加细胞毒性。

本研究的结果揭示 METH 和 HIV-1Tat 蛋白通过上调 ATG5/7 基因的表达,协同诱导树鼩中脑神经元自噬,从而为了解 HIV 感染的 METH 吸毒患者神经认知障碍的分子机制提供了新的见解和理论依据。同时树鼩的原代中脑神经元可以作为研究 HIV-1Tat 蛋白和 METH 自噬的一个模型,为进一步的研究提供一个新的方向。

参考文献:

- [1] Mauber ME, Pirrone V, Rivera NT, et al. Interaction between Tat and drugs of abuse during HIV-1 infection and central nervous system disease[J]. *Front Microbiol*, 2016, 6: 1512.
- [2] Scott HM, Vittinghoff E, Irvin R, et al. Age, race/ethnicity, and behavioral risk factors associated with per-Contact risk of HIV infection among men who have sex with men in the United States [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2014, 65(1): 115-121.
- [3] Fields J, Dumaop W, Eleuteri S, et al. HIV-1 Tat alters neuronal autophagy by modulating autophagosome fusion to the lysosome; implications for HIV-associated neurocognitive disorders [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(5): 1921-1938.
- [4] Hu G, Niu F, Liao K, et al. HIV-1 Tat-induced astrocytic extracellular vesicle miR-7 impairs synaptic architecture [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2019.
- [5] Abdul Muneer PM, Alikuju S, Sziachetka AM, et al. Methamphetamine inhibits the glucose uptake by human neurons and astrocytes: stabilization by acetyl-L-carnitine [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19258.
- [6] Qi L, Gang L, Hang KW, et al. Programmed neuronal cell death induced by HIV-1 tat and methamphetamine [J]. *Microsc Res Tech*, 2011, 74(12): 1139-1144.
- [7] Li J, Wang W, Tong P, et al. Autophagy induction by HIV-Tat and methamphetamine in primary midbrain neuronal cells of tree shrews via the mTOR signaling and ATG5/ATG7 Pathway [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 921.
- [8] Sun D, Wen X, Wang M, et al. Apoptosis and autophagy in picornavirus infection [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2032.
- [9] Yang ZF, Zhao J, Zhu YT, et al. The tree shrew provides a useful alternative model for the study of influenza H1N1 virus [J]. *Virol J*, 2013, 10: 111.
- [10] Walter F, Schmid J, Düssmann H, et al. Imaging of single cell responses to ER stress indicates that the relative dynamics of IRE1/XBP1 and PERK/ATF4 signaling rather than a switch between signaling branches determine cell survival [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(9): 1502-1516.
- [11] Foucquier J, Guedi M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2015, 3(3): e00149.
- [12] Nookaia AR, Schwartz DC, Chaudhari NS, et al. Methamphetamine augment HIV-1 Tat mediated memory deficits by altering the expression of synaptic proteins and neurotrophic factors [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 71: 37-51.
- [13] Banerjee A, Zhang X, Manda KR, et al. HIV proteins (gp120 and Tat) and methamphetamine in oxidative stress-induced damage in the brain: potential role of the thiol antioxidant N-acetylcysteine amide [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(10): 1388-1398.
- [14] Zeng XF, Li Q, Li J, et al. HIV-1 Tat and methamphetamine co-induced oxidative cellular injury is mitigated by N-acetylcysteine amide (NACA) through rectifying mTOR signaling [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 299: 159-171.
- [15] Song S, Tan J, Miao T, et al. Crosstalk of autophagy and apoptosis: involvement of the dual role of autophagy under ER stress [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(11): 2977-2984.
- [16] Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(3): 211-216.
- [17] Su LY, Luo R, Liu Q, et al. Atg5-and Atg7-dependent autophagy in dopaminergic neurons regulates cellular and behavioral responses to morphine [J]. *Autophagy*, 2017, 13(9): 1496-1511.
- [18] Zheng W, Xie W, Yin D, et al. ATG5 and ATG7 induced autophagy interplays with UPR via PERK signaling [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 42.
- [19] Yang G, Zeng X, Li J, et al. Protective effect of gastrodin against methamphetamine-induced autophagy in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells via the AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 707: 134287.