

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_密级\_\_\_\_

学号: 32320111153277

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

铜离子及铜相关蛋白 CUTA 在 APP 表达及  
A $\beta$  生成中的作用研究

The role of copper and the copper-related protein CUTA in  
mediating APP expression and A $\beta$  generation

侯 平

指导教师姓名: 张云武 教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2014 年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 摘要

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)的一个重要病理特征和致病关键原因是大脑中有由  $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )过度产生和沉积形成的淀粉样斑。A $\beta$  是由  $\beta$ -淀粉样蛋白前体蛋白 ( $\beta$ -Amyloid Precursor Protein, APP) 经过  $\beta$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶的顺序剪切后所产生。A $\beta$  有多种形式, 主要为 A $\beta$ 40 和 A $\beta$ 42, A $\beta$ 42 约占 A $\beta$  总量的 5%, 但却是 A $\beta$  的主要毒性形式。此外, 金属离子铜在 AD 的病理过程中也发挥着重要的作用。我们实验室前期工作发现的一个铜相关蛋白 CUTA 能够与  $\beta$ -分泌酶 BACE1 相互作用, 调控 APP 的 $\beta$ -剪切和 A $\beta$  的生成。

本论文中我们进一步研究了 CUTA 与铜之间的相互关系, 以及它们对于调控 APP 表达和 A $\beta$  产生之间的潜在联系。我们的结果证实了铜可以提高 APP 的 mRNA 水平和蛋白水平, 并且可以促进 A $\beta$  的分泌。但是, 虽然过表达 CUTA 可以缓解铜离子诱导的 A $\beta$ 42 的产生, 而下调内源性的 CUTA 也会促进铜诱导的 A $\beta$ 42 的分泌升高, 然而 CUTA 本身并不影响 APP mRNA 的表达水平, 而铜离子对于 APP 表达的影响也不依赖于 CUTA。此外, 铜离子也没有影响 CUTA 和 BACE1 的相互作用。这些结果提示铜和 CUTA 对于 APP 切割和 A $\beta$  的生成的作用是通过两个平行的途径来进行。我们进一步发现铜在一定的浓度范围内可以提高 CUTA mRNA 的表达水平, 进而提高其蛋白水平。反过来, 过表达 CUTA 会提高细胞内铜元素的含量, 并且缓解铜处理导致的细胞毒性。这些结果提示 CUTA 可能参与了铜的平衡调控, 并能在铜对细胞的应激下起到一定的保护作用。最后, 我们发现在 APP/PS1 的 AD 小鼠模型中, 其海马区 CUTA 的蛋白表达水平, 以及铜的含量都低于野生型小鼠, 进一步在体内表明了 CUTA 与铜的相关性。综上所述, 我们的研究对于进一步揭示 CUTA 与铜之间的相互联系, 以及二者在 AD 发病过程中的作用, 具有重要的意义。

**关键词:** APP A $\beta$  CUTA 铜

## Abstract

One major pathological hallmark and trigger of Alzheimer's disease (AD) is overreproduction and accumulation of  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ), especially the neurotoxic  $A\beta_{42}$  species, in the brain.  $A\beta$  is derived from  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) through sequential cleavages by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. In addition, abnormal copper metabolism may also contribute to the pathogenesis of AD. Recently we find that a copper-related protein, CutA divalent cation tolerance homolog of *E.coli* (CUTA), can interact with the  $\beta$ -secretase BACE1 and affects APP  $\beta$ -processing / $A\beta$  generation.

In the study, we further investigated the correlation between CUTA and copper, as well as any potential interplay between the two during their regulation of APP processing. We first confirmed that copper treatments promote the expression of APP as well as the secretion of  $A\beta$ . We then found that overexpression and downregulation of CUTA can ameliorate and increase copper-induced  $A\beta_{42}$  production, respectively. However, overexpression of CUTA does not affect APP expression, whereas downregulation of CUTA does not affect copper-induced APP expression. In addition, copper treatments have no effect on the interaction between CUTA and BACE1. Together these results suggest that CUTA and copper independently affects APP processing/ $A\beta$  production. Moreover, we found that copper treatments can promote CUTA expression, whereas overexpression of CUTA can increase intracellular level of copper and ameliorate copper-induced cytotoxicity. Finally, we found that both levels of CUTA and copper are decreased in the hippocampus of APP/PS1 AD mouse brain. Together, our results reveal a mutual modulation of copper and CUTA and suggest that the two play independent role in mediating APP processing. Such study may further our understanding of the mechanism underlying AD pathology.

**Key words:** APP;  $A\beta$ ; CUTA; Copper

目 录

<b>第一章 前言 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 阿尔茨海默症.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 阿尔茨海默症概述.....	1
1.1.2 AD 主要的病理特征 .....	2
1.1.2.1 神经纤维缠结.....	3
1.1.2.2 淀粉样斑.....	3
<b>1.2 A<math>\beta</math> 的产生和 A<math>\beta</math> 级联假说.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 $\beta$ -淀粉样蛋白前体蛋白及其分泌酶 .....	3
1.2.1.1 APP .....	4
1.2.1.2 $\alpha$ -分泌酶 .....	7
1.2.1.3 $\beta$ -分泌酶 .....	8
1.2.1.4 $\gamma$ -分泌酶 .....	9
1.2.2 A $\beta$ 级联假说.....	10
<b>1.3 AD 发病的其它因素.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 铜和 AD.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 CUTA .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6 本论文研究的内容和意义 .....</b>	<b>18</b>
<b>第二章 材料与方法 .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 实验材料 .....</b>	<b>19</b>
2.1.1 菌种、细胞株及动物.....	19
2.1.2 质粒.....	19
2.1.3 抗体.....	20
2.1.4 化学药品及试剂盒.....	20
2.1.5 溶液与试剂配制.....	24
2.1.6 培养基配制.....	25
2.1.7 其它所需试剂和材料.....	25
<b>2.2 主要实验设备 .....</b>	<b>26</b>

<b>2.3 实验方法 .....</b>	<b>26</b>
2.3.1 感受态细胞制备.....	27
2.3.2 大肠杆菌转化实验.....	27
2.3.3 质粒提取.....	27
2.3.4 细胞培养.....	29
2.3.5 质粒转染.....	31
2.3.6 铜处理细胞.....	32
2.3.7 免疫共沉淀.....	33
2.3.8 免疫印迹.....	33
2.3.9 培养基蛋白的检测 (sAPP $\alpha$ 以及分泌的 myc-CUTA) .....	34
2.3.10 实时荧光定量 PCR .....	35
2.3.11 鼠尾样品 Genotyping .....	37
2.3.12 ICP-MS 测铜元素的样品制备 .....	38
2.3.13 统计学处理.....	38
<b>第三章 实验结果与分析 .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 铜离子处理细胞促进 APP 的表达和 A<math>\beta</math> 的分泌 .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 CUTA 和铜均能影响 A<math>\beta</math> 的分泌 .....</b>	<b>41</b>
3.2.1 CUTA 调控铜诱导的 A $\beta$ 分泌但不影响 APP 的表达.....	41
3.2.2 铜离子不影响 CUTA 和 BACE1 的相互作用 .....	43
<b>3.3 铜离子促进细胞内 CUTA 的表达 .....</b>	<b>45</b>
<b>3.4 过表达 CUTA 可以增加细胞内的铜含量和缓解铜的细胞毒性 .....</b>	<b>46</b>
<b>3.5 CUTA 和铜在 APP/PS1 小鼠中水平下降.....</b>	<b>47</b>
<b>第四章 讨论与展望 .....</b>	<b>49</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>53</b>

# Catalog

<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Alzheimer's Disease .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Overview of AD .....	1
1.1.2 Major Pathologic Features of AD .....	2
1.1.2.1 NFT .....	3
1.1.2.2 SP .....	3
<b>1.2 Production of A<math>\beta</math> and A<math>\beta</math> Cascade Hypothesis .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 APP and Secretases .....	3
1.2.1.1 APP .....	4
1.2.1.2 $\alpha$ -secretases .....	7
1.2.1.3 $\beta$ -secretases .....	8
1.2.1.4 $\gamma$ -secretases .....	9
1.2.2 A $\beta$ Cascade Hypothesis .....	10
<b>1.3 Factors Related to AD Pathology .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Copper and AD .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 CUTA .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6 Contents and Purposes of This Thesis .....</b>	<b>18</b>
<b>Chapter 2 Materials and Methods.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Materials .....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Bacteria, Cell lines and Animals .....	19
2.1.2 Plasmids .....	19
2.1.3 Antibodies .....	20
2.1.4 Chemicals and Kits .....	20
2.1.5 Solution Preparation .....	24
2.1.6 Media Preparation .....	25
2.1.7 Other Reagents and Materials .....	25
<b>2.2 Major Apparatus .....</b>	<b>26</b>



---

<b>2.3 Methods</b> .....	<b>26</b>
2.3.1 Preparation of Competent Cells .....	27
2.3.2 Transformation of E.coli .....	27
2.3.3 Plasmids Extraction .....	27
2.3.4 Cell Culture .....	29
2.3.5 Plasmids Transfection .....	31
2.3.6 Copper Treatment for cells .....	32
2.3.7 Co-Immunoprecipitation .....	33
2.3.8 Western Blot .....	33
2.3.9 Detection of Proteins in Medium) .....	34
2.3.10 Real-time PCR .....	35
2.3.11 Genotyping of mouse .....	37
2.3.12 Preparation for Cu measurement by ICP-MS .....	38
2.3.13 Statistical Analyses .....	38
<b>Chapter 3 Results and Analysis</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 Copper treatment promotes APP production and A<math>\beta</math> secretion</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2 CUTA and copper both affect A<math>\beta</math> secretion</b> .....	<b>41</b>
3.2.1 CUTA regulates copper induced A $\beta$ secretion without affects APP expression .....	41
3.2.2 Copper doesn't affects the interaction between CUTA1 and BACE1 .....	43
<b>3.3 Copper promotes CUTA expression</b> .....	<b>45</b>
<b>3.4 CUTA protects cells from copper induced stress</b> .....	<b>46</b>
<b>3.5 CUTA and copper level decrease in AD mouse hippocampus</b> .....	<b>47</b>
<b>Chapter 4 Discussion and Prospect</b> .....	<b>49</b>
<b>References</b> .....	<b>53</b>

## 英文缩略词中英对照表

英文缩写	英文全名	中文名称
A $\beta$	$\beta$ -Amyloid	$\beta$ -淀粉样蛋白
AChE	Acetylcholinesterase	乙酰胆碱酯酶
AD	Alzheimer's Disease	阿尔茨海默症
ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase	分离整合素金属蛋白酶
AICD	APP Intracellular Domain	APP 胞内区域
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
APH-1	Anterior Pharynx-Defective 1	前咽缺陷蛋白-1
APLPs	Amyloid Precursor-like Proteins	淀粉样前体类似蛋白
ApoE	Apolipoprotein E	载脂蛋白 E
APP	$\beta$ -Amyloid Precursor Protein	$\beta$ -淀粉样前体蛋白
BACE1	$\beta$ -site APP Cleaving Enzyme 1	$\beta$ -位点 APP 剪切酶 1
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
Co-IP	Co-immunoprecipitation	免疫共沉淀
Cp	Ceruloplasmin	血浆铜蓝蛋白
CRFR	Corticotropin-releasing hormone receptor	促肾上腺皮质激素释放激素受体
CQ	Clioquinol	氯碘喹啉
CTFs	C-terminal Fragments	C-端片段
CuBD	Copper binding domain	铜结合域
CutA	Copper Tolerance A	铜耐受蛋白 A
CUTA	CutA Divalent Cation Tolerance Homolog of E.coli	CutA 二价阳离子耐受蛋白类似物 (E.coli)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附实验
EOAD	Early-onset Alzheimer's disease	早发性阿尔茨海默病
ER	Endoplasmic Reticulum	内质网
EST	Expression Sequence Tag	表达序列标签
HPA axis	Hypothalamic-pituitary adrenal axis	下丘脑-垂体-肾上腺轴
IP	Immunoprecipitation	免疫沉淀
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry	电感耦合等离子体质谱
LOAD	Late-onset Alzheimer's disease	晚发型阿尔茨海默病

英文缩略词中英对照表

LRP-1	Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-1	低密度脂蛋白受体相关蛋白-1
LTP	Long-term Potentiation	长时程增强
MAP	Microtubule-associated Protein	微管相关蛋白
NCT	Nicastrin	$\gamma$ 分泌酶组分之一
NFT	Neurofibrillar Tangles	神经元纤维缠结
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate	N-甲基-D-天冬氨酸
NRG-1	Neuregulin-1	神经调节蛋白-1
P3	3 kDa Peptide	3kDa 多肽
PAX	paired box	配对盒因子
PEN-2	Presenilin Enhancer 2	早老素增强因子 2
PHF	Paired-helical Filament	配对螺旋纤维
PS	Presenilin	早老素
ROS	Reactive Oxygen Species	活性氧
RTN	Reticulon	网状蛋白
RT-PCR	Real-time PCR	实时荧光定量 PCR
SAD	Sporadic AD	散发性 AD
sAPP	Soluble APP N-terminus	可溶性 APP N 端
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	SDS-凝胶电泳
siRNA	Small Interference RNA	小干扰 RNA
SNX6	Sorting Nexin 6	分选微管连接蛋白 6
SOD-1	Superoxide Dismutase-1	超氧化物歧化酶-1
SP	Senile plaque	老年斑
ST6Gal-1	$\beta$ -galactoside $\alpha$ -2,6 sialyltransferase 1	$\beta$ -半乳糖苷 $\alpha$ -2,6-唾液酸转移酶 1
TACE	Tumor necrosis factor- $\alpha$ converting enzyme	肿瘤坏死因子 $\alpha$ 转化酶
TCA	Trichloroacetic Acid	三氯乙酸
TGN	Trans-Golgi Network	反式高尔基网络
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$	肿瘤坏死因子
VGSC $\beta$	Voltage-gated Sodium Channel $\beta$ subunits	电压门控钠离子通道 $\beta$ 亚基

## 第一章 前言

### 1.1 阿尔茨海默症

#### 1.1.1 阿尔茨海默症概述

阿尔茨海默症（Alzheimer's disease, AD）是一种与年龄相关的神经退行性疾病<sup>[1]</sup>，也是最常见的一种慢性发展的神经退行性疾病。AD 患者临床症状主要有渐进性的记忆损伤、认知能力障碍，进行性的语言功能丧失、人格和行为异常以及随着脑萎缩的进行而出现的日常行动能力的退化，最终在持续并且不可逆的患病过程中死亡<sup>[2]</sup>。年龄是 AD 发病的主要因素，据统计，65 岁以上的人口中每百万人每年新增 AD 患者 1275 例<sup>[3]</sup>，85 岁以上的老人中患病概率超过三分之一，也就是说除了少数具有遗传倾向的患者诊断为早发性家族性 AD（Early-onset AD），大部分患者在 65 岁以后发病，因此 AD 旧称老年痴呆症，它也是痴呆症的主要形式，AD 和血管性痴呆患者数占痴呆症患者总数的 63%~73%<sup>[4]</sup>。也是继心血管、脑血管疾病和癌症之后，威胁老人健康的“第四大杀手”。目前，世界人口的发展已呈现出老龄化的趋势，而我国已步入老龄化社会，从 2000 年到 2007 年，人口老龄化年均增长率高达 3.2%，约为总人口增长速度的 5 倍。据 2012 年国家老龄委员会公布的报告，预计到 2042 年，我国老年人口总数将超过 4 亿，占总人口的 30%，据此推测我国的 AD 患者也会相应快速增加。

因为 AD 早期诊断难，截至 2012 年，在超过 1000 个临床试验的研究中，如何有效治疗 AD 仍是未知数<sup>[5]</sup>，AD 患者的身体和精神健康在较长的时间内进行性受损，需要其家庭和社会的照顾，给患者家庭带来极重的精神和经济负担，同时这一疾病也会对老龄化不断推进的我国乃至全世界的社会稳定性和经济发展产生影响。因此积极的研究阐释 AD 的发病机理，对于找到有效的预防和治疗方法具有重要的意义。

#### 1.1.2 AD 主要的病理特征

神经元胞内纤维缠结（Neurofibrillar Tangles, NFTs）和神经元胞外淀粉样斑（Amyloid Plaques）是阿尔茨海默症的两个主要病理特征（图 1.1），同时也是

临床诊断阿尔茨海默症的主要病理学依据<sup>[6]</sup>。这是德国医生 Alois Alzheimer 在 1907 年第一次对阿尔茨海默症进行的临床病理特征的描述，通过解剖并利用银染的方法他发现患者脑中存在神经元丢失、神经元内纤维缠结以及神经元外淀粉样斑<sup>[7]</sup>，这之后此病就以他的名字命名。

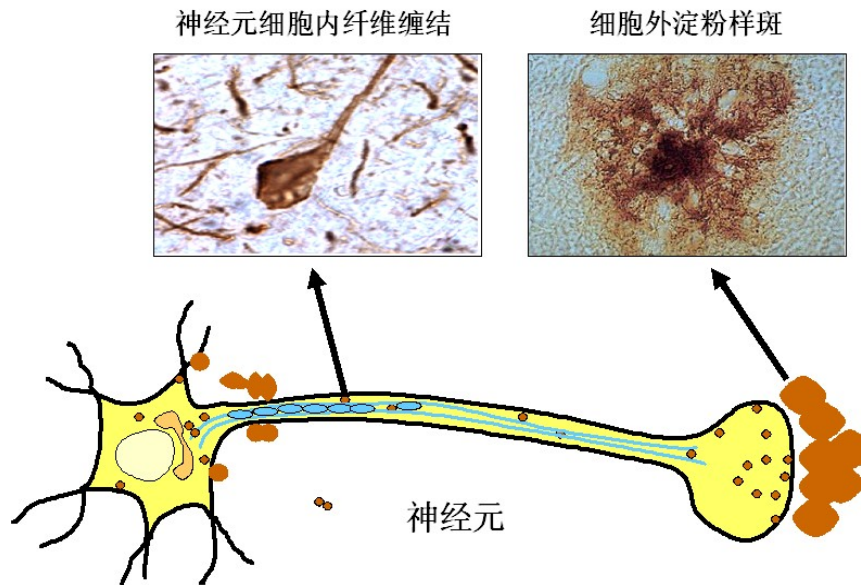


图 1.1 AD 的两个主要病理学特征

Figure 1.1 Two major pathologic characteristics of AD

注：摘自陈晔光等，《分子细胞生物学》，2006 年 9 月

### 1.1.2.1 神经纤维缠结

椎体神经元内由纤丝状包含物组成的神经纤维缠结不仅是 AD 的病理特征也出现在其他的神经退行性疾病中<sup>[8]</sup>。神经纤维缠结的数量是衡量 AD 严重性的一个病理性标志。NFTs 的基本单位是配对的双股螺旋纤维(Paired-helical filament, PHF)，而 PHF 又是由超磷酸化的微管相关蛋白 (Microtubule-associated protein, MAP) tau 蛋白组成，通常情况下，轴突上含有丰富并可溶性的 tau 蛋白，能够促进微管的组装，增加其稳定性并能促进囊泡运输，然而过度磷酸化的 tau 是不可溶的，缺乏与微管的亲和力，最后自我组装成为双股螺旋纤维。Tau 的超磷酸化使其与微管蛋白的结合量下降约 90%，一方面，过度磷酸化的 Tau 蛋白与正常微管相关蛋白竞争，影响微管形成；另一方面，促使正常微管相关蛋白与微管的分离，加速微管解聚，导致神经元轴突的变性进而影响神经递质的合成、释放，

造成神经细胞间的联系屏障，最终导致神经退行性病变<sup>[9, 10]</sup>。据报道，AD 病人脑中纯化的 tau 蛋白，其磷酸化的程度以及磷酸化位点的数量都大大超过正常人的大脑<sup>[11]</sup>，GSK3 $\beta$ 、CDK5、PKA 和 MAPK 等多种蛋白激酶可能参与了 tau 的磷酸化<sup>[12]</sup>，这表明在 AD 形成过程中发生了很多的磷酸化级联反应。动物实验以及细胞实验都表明磷酸化的 tau 单体和寡聚体具有细胞毒性<sup>[13, 14]</sup>。Tau 蛋白的结构异常进而导致的功能异常会导致神经元的功能障碍和坏死，这对 AD 的发生产生了重要的影响，针对其代谢和功能进行药物研究对 AD 的治疗也具有重大的意义。

### 1.1.2.2 淀粉样斑

AD 的另一个主要病理学特征是大脑皮层和海马区出现的大量的淀粉样斑，淀粉样斑的主要成分是由淀粉样前体蛋白（Amyloid precursor protein, APP）水解生成的  $\beta$ -淀粉样蛋白（ $\beta$ -amyloid, A $\beta$ ），其组分还有 tau 蛋白、载脂蛋白 E（apolipoprotein E, ApoE）和金属离子<sup>[15, 16]</sup>。A $\beta$  是含有 39-43 个氨基酸的自然代谢产物，其基本结构中含  $\beta$  折叠结构，因此 A $\beta$  容易形成不溶性纤维进而聚集形成不溶性淀粉样斑。A $\beta$  的氨基酸各种序列组成形式中，单体 A $\beta$ 40 的含量要比 A $\beta$ 42 丰富的多，在细胞中 A $\beta$ 42 占 A $\beta$  总数的 5%左右，但是因为其含有两个疏水的氨基酸，更容易产生聚集，所以是构成淀粉样斑的主要成分。可溶性的 A $\beta$  寡聚体和形成淀粉样斑的中间形式最具有神经毒性<sup>[17]</sup>，能够引起胆碱能神经元损伤、引发炎症反应、破坏钙平衡、神经细胞凋亡等现象。研究发现，A $\beta$  的积累会造成 tau 蛋白的聚集<sup>[18]</sup>，这对 AD 病理特征的形成无疑起到了加速的作用，因此，我们希望通过抑制 A $\beta$  的聚集、加速多余 A $\beta$  的降解，减弱淀粉样斑的形成过程从而达到治疗 AD 的目的。

## 1.2 A $\beta$ 的产生和 A $\beta$ 级联假说

### 1.2.1 $\beta$ -淀粉样蛋白前体蛋白及其分泌酶

之前提到淀粉样斑的主要成分 A $\beta$  是由  $\beta$ -淀粉样蛋白前体蛋白（APP）经蛋白酶水解产生的。以下内容将阐述 APP 的水解过程和 A $\beta$  的产生。

## 1.2.1.1 APP

APP是典型的 I 型跨膜蛋白，大多数细胞广泛存在此蛋白。1987年，APP基因被发现并命名，人APP基因位于第21号染色体的长臂中段<sup>[19]</sup>，由于基因的选择性剪切，APP主要有三个异构体，分别被命名为APP695，APP751和APP770（它们分别含有695个、751个、770个氨基酸残基）。APP751和APP770广泛表达于大部分的组织，而APP695是神经元中的主要APP表达形式<sup>[20]</sup>。APP主要由较长的一段膜外氨基端结构域、一段单次跨膜结构域和一段较短的胞内羧基端结构域三部分组成<sup>[21]</sup>，其结构表现为典型的细胞表面受体的特征。其中胞外有E1和E2两个结构域，Kunitz蛋白酶抑制剂（Kunitz protease inhibitor, KPI）结构域，56个氨基酸残基，存在于E1结构域，但APP695不含这个KPI结构域<sup>[22]</sup>。研究发现在AD大脑中随着A $\beta$ 的沉积，含有KPI结构域的APP751和APP770的蛋白水平和mRNA水平都有上升<sup>[23]</sup>；E2结构域含有另外一个HFBD/GFLD结构和随机翻卷的区域<sup>[24]</sup>。哺乳动物的APP具有高度保守性，APP家族成员还包括APP类似蛋白1（APP-like protein 1, APLP1）以及APP类似蛋白2（APP-like protein 2, APLP2）<sup>[25]</sup>。三者具有共同的保守结构域，并且具有相似的水解过程，但是除了APP，APLP1和APLP2均不含有A $\beta$ 的肽段区域。

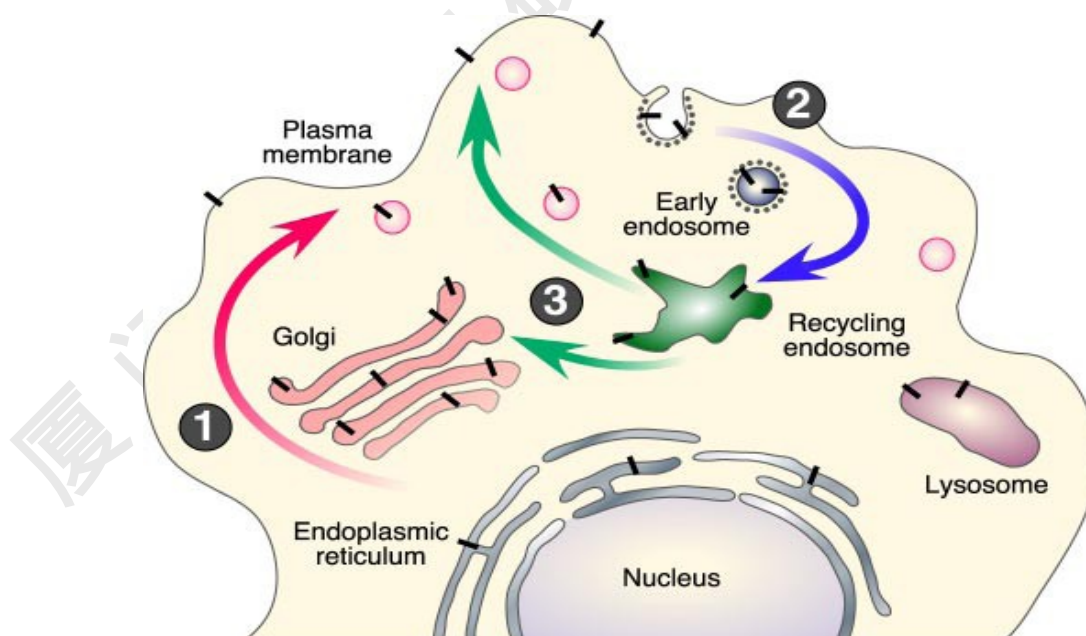


图 1.2 APP 的胞内运输

Figure 1.2 Intracellular trafficking of APP

注：摘自 Gopal Thinakaran, et al. 等，2008

新合成的APP在从内质网到细胞膜的转运过程中，会经历N-、O-糖基化、胞外域和胞质磷酸化以及酪氨酸硫酸化等翻译后修饰。只有一小部分（约10%，在APP过表达的细胞中）的APP存在于细胞膜上，大部分成熟的APP位于高尔基体及其反面囊泡结构(TGN)。APP C-端含有YENPTY（APP695的682到687位氨基酸残基）这一内吞基序，在非神经元细胞中，APP一旦到达细胞膜，很快就会被内吞并被运输到内体，一部分可以重新循环并转运到细胞膜，还有一小部分被转运到溶酶体降解<sup>[26]</sup>（图1.2）。

自从发现了APP，人们就为其或是它的某种异构体赋予了很多的生理功能，但至今仍不能确切说明它的作用，不过APP在胞内胞外的一些功能域已经被证实，包括铜锌结合域、胞外与肝素、胶原和黏连蛋白结合的区域、神经营养和粘附区域以及上述的KPI结构域。最早对APP功能的叙述是降低APP蛋白水平会导致成纤维细胞生长延滞，而用纯化后的APP处理这些细胞，则能使细胞恢复正常生长<sup>[27]</sup>，即APP可能在促进纤维细胞生长方面具有一定的调控能力。随后的研究证明APP能够刺激神经突的增生，这一结论也和在中枢神经元的成熟过程中APP表达量上升吻合<sup>[28]</sup>。此外，体内实验也证明APP可增加突触密度并改善记忆<sup>[29]</sup>。APP的另外一个功能是细胞黏着，在靠近APP跨膜区域的胞腔外侧或是APP C端在A $\beta$ 区域内由一个RHDS元件，被认为可以行使整合蛋白功能，而且APP在轴突表面的粘附位点和整联蛋白能共定位，一项研究表明APP在神经元前体细胞往皮层迁移的过程中发挥作用，并且这一作用受Dab1的调控<sup>[30]</sup>。因为RHDS序列存在于A $\beta$ 的N末端，因此认为A $\beta$ 也具有相似的粘附功能。动物实验显示，APP基因双敲除的小鼠能够存活和繁殖，但要比同龄的野生型小鼠体重轻15%-20%，前肢抓力下降，自发性活动相对减少，且60%以上的小鼠在14周时表现出了反应性的神经胶质增生<sup>[31]</sup>，补充APP的保护作用，APP缺失会损害神经或肌肉功能。APP基因缺失小鼠也表现出与长时程增强（Long-term potentiation, LTP）缺陷相关的认知和空间记忆损伤<sup>[30]</sup>。APP家族成员中，APLP2和APP在胚胎发育以及成年动物组织中的分布都相当一致，二者在各组织中均广泛表达，且在神经元中含量最丰富<sup>[32-34]</sup>。APLP1基因敲除小鼠会有细胞生长缺陷<sup>[35]</sup>，APLP2基因敲除小鼠没有表现明显的异常<sup>[36]</sup>，单基因敲除的小鼠都不具致死性，APP/APLP2和APLP1/APLP2双敲除小鼠出生后很快死亡<sup>[35, 36]</sup>，然而



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫