

苗雨润,李明学,李娜,等. 树鼩 *BACE1* 全长编码序列的克隆及分子特征分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 01-10.
Miao YR, Li MX, Li N, et al. Cloning a full-length coding sequence of *BACE1* in tree shrews and prediction of its molecular characteristics [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 01-10.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.08.001

树鼩 *BACE1* 全长编码序列的克隆及分子特征分析

苗雨润,李明学,李娜,王文广,匡德宣,仝品芬,孙晓梅,罕园园,
陆彩霞*,代解杰*

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心,昆明 650118)

【摘要】 目的 获取树鼩 β -淀粉样前体蛋白切割酶 *BACE1* (β -site APP cleaving enzyme-1)的全长编码序列并进行分子特征分析,为开展 AD 疾病的机制研究提供依据。**方法** 提取树鼩大脑及其他脏器组织总 RNA,通过 RACE (rapid-amplification of cDNA ends)实验得到的序列与中间序列进行拼接得到树鼩 *BACE1* 全长编码序列,使用 DNAMAN、MEGA 10.0.5、PyMOL 等生物信息学软件,对其序列和分子特征进行分析。**结果** 树鼩 *BACE1* 除在脑组织表达外,在外周组织也有表达。树鼩 *BACE1* 核酸序列和蛋白质分子整体结构与人类高度相似,树鼩与人类的 *BACE1* 蛋白在膜内结构区均存在一个高度保守的 DXXLL 的 ACDL 分选内吞基序,两者具有相同的胞外域、跨膜域及胞内域,但树鼩 *BACE1* 蛋白质相比人少一个潜在的乙酰基化位点,并且在折叠结构上存在差异。**结论** 本研究获得树鼩 *BACE1* 基因完整编码序列,其蛋白基本结构与人的基本相似,提示树鼩可能是作为研究 AD 病理改变或药物研究潜在的理想模型。

【关键词】 树鼩; β -淀粉样前体蛋白切割酶;分子克隆;结构预测;系统发育分析

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 08-0001-10

Cloning a full-length coding sequence of *BACE1* in tree shrews and prediction of its molecular characteristics

MIAO Yurun, LI Mingxue, LI Na, WANG Wenguang, KUANG Dexuan, TONG Pinfen, SUN Xiaomei,
HAN Yuanyuan, LU Caixia*, DAI Jiejie*

(Center of Tree Shrews Germplasm Resource, Institute of Medical Biology, the Chinese Academy of Medical Science Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To obtain the full-length coding sequence of β -amyloid precursor protein-cleaving enzyme (*BACE1*) and analyze its molecular characteristics. **Methods** Total RNAs from the brains and other organs of tree shrews were used. The full-length coding sequence of *BACE1* was obtained by splicing the sequence obtained via rapid amplification of cDNA ends (RACE) with the intermediate sequence. Sequence and molecular characteristic analyses were performed using DNAMAN, MEGA 10.0.5, PyMOL and other bioinformatics softwares. **Results** The *BACE1* nucleic acid sequence of tree shrews was highly similar to that of humans. The overall structures of the two protein molecules were highly similar

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31601907);云南省科技人才和平台计划项目(2018H B071、2017HC019)。
【作者简介】 苗雨润(1993—),男,硕士,研究方向:人类疾病动物模型建立。E-mail: miaomiao415@vip.qq.com
【通信作者】 代解杰,男,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: dj@imbcams.com.cn
陆彩霞,女,博士,研究生导师,研究方向:干细胞及人类疾病动物模型建立。E-mail: lc@imbcams.com.cn * 共同通信作者

and had the same extracellular, transmembrane and intracellular domains. Both the tree shrew and the human BACE1 proteins had a highly conserved ACDL sorting endocytic motif of DXXLL in the intramembranous domain. However, the tree shrew BACE1 protein had one potential acetylation site compared with that of humans and differed in its folding structure.

Conclusions The complete coding sequence of the *BACE1* gene is obtained in our study, and the protein structure of tree shrews is similar to that of humans, suggesting that tree shrews may be an ideal model for studying pathological changes of Alzheimer's disease or potential drug research.

【Keywords】 tree shrew(*Tupaia belangeri chinensis*); *BACE1*; cloning; structural prediction; phylogenetic analysis

β -淀粉样前体蛋白切割酶(β -site APP cleaving enzyme-1, BACE1)是一种 β -分泌酶,属于天冬氨酸蛋白酶,也称之为 asp2 或 memapsin-2^[1],目前认为 β -分泌酶能够特异靶向膜结合底物,且对底物的切割具有序列特异性,切割 APP 形成 β -淀粉样多肽(β -amyloid peptide, A β)的 N 端以启动 A β 生成,可能是导致阿兹海默病发病的直接原因。

阿兹海默病(Alzheimer's disease, AD),是发生在老年期及老年前期的一种原发性神经退行性疾病,表现为持续性的高级神经功能活动障碍。据报道,该病特征性病理变化表现为大脑皮层萎缩,并伴有 β -淀粉样蛋白沉积,记忆性神经元数目大量减少,神经细胞内出现神经纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)以及出现老年斑(senile plaque)^[2-4]。迄今为止,关于 AD 的发病机制尚不明朗。但 Hardy 等^[5]提出了以 β -淀粉样多肽为核心的 A β 学说,近年来,针对 AD 遗传学及分子生物学的相关研究也更加有力地支持了 A β 学说:A β 的产生与代谢、解离与凝聚的不均衡导致异常多的 A β 不断聚积形成老年斑,由此导致了其他如轴突和神经细胞缺失,神经纤维缠结等一系列的病理改变^[6]。因此, A β 的聚积被认为是 AD 病理改变发生的起始环节。A β 来源于 β -淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein, β -APP),其在体内有两种裂解途径:非淀粉样途径和淀粉样途径。前者是指 α -分泌酶在 β -APP 的第 16 位氨基酸残基处裂解,其不产生完整的 A β ,该途径不引起淀粉样蛋白沉积;后者是指 β -分泌酶在 β -APP 的 N 端进行裂解,产生了包含完整 A β 序列的 β -CTF (C-terminal fragments),之后 γ -分泌酶裂解 β -CTF 产生了一系列长短不等的 A β ,其中 A β 42 是组成老年斑的主要成分^[7]。BACE1 作为一种 β -分泌酶,有研究报道,BACE1 基因敲除的小鼠脑内没有 A β 的产生,日常活动没有异常^[8],这提示可以通过阻断 A β 的产生来改善甚至治疗 AD,此法的优势还在于这样做可能不存在不良反应。近年来 BACE1 抑制剂已成为药物开发的热点,在治疗

AD 方面具有很强的应用前景。

树鼩(Tree shrew, *Tupaia belangeri chinensis*)作为一种新型实验动物,近年来受到广泛关注,其基因组序列的测定和分析表明其比小鼠和大鼠更接近于非人灵长类,加之体型小、饲养成本低等特性,目前已被广泛应用于人类疾病模型的构建及相关领域的研究,具有很强的应用潜力^[9]。近年来有关于树鼩抑郁症模型的建立揭示了树鼩不同于啮齿类动物的神经系统可能更适合作为人类神经系统疾病研究的实验动物^[10-11]。Fan 等^[12]将树鼩与人、猕猴和小鼠的脑组织中与 AD 相关 131 个基因进行了同源性比对,结果显示树鼩脑组织中 A β 累积与 NFTs 的表达模式与人类脑组织相似,而且具有类似的年龄依赖效应,此外,相较于小鼠,树鼩与人类 AD 相关基因的序列具有更高的同源性。这些研究为树鼩可能更适合建立 AD 动物模型提供了有力的证据。但迄今为止,尚未有关于树鼩 BACE1 分子克隆的研究报道。因此,本研究采用 RACE 技术获得树鼩 BACE1 全长编码序列为目的,并对其序列和分子特征进行分析,为今后建立树鼩 AD 模型或将树鼩应用于 AD 药物的研究奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级滇缅树鼩,成年树鼩体重约 130 g,幼年树鼩体重不作要求,雌雄不限,幼年组实验树鼩(42~52 月龄)3 只;青年组(15~18 月龄)3 只;老年组(78~86 月龄)3 只。由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心提供[SCXK(滇)K2018-0002];实验操作均在中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心内进行[SYXK(滇)K2018-0002],实验过程严格遵循实验动物使用的 3R 和福利伦理原则。

1.2 实验方法

1.2.1 树鼩 BACE1 的分子克隆

(一)*BACE1* 引物设计

根据 Genbank 已经注册登记的人 *BACE1* (NM_000011.10)、小鼠 *BACE1* (NM_001145947.2) 和猕猴 *BACE1* (NM_001260928.1) 的保守序列,设计表一中的 4 组引物,该 4 组引物分别覆盖了树鼩 *BACE1* mRNA 的整个编码区(表 1)。

(二)RNA 与 cDNA 制备

取脑组织放入 1.5 mL 离心管,采用柱式 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒(生工 B511321)提取组织总 RNA,并采用 3' adaptor 引物和 M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit M-MuLV 试剂盒(生工 B532435)一步法逆转录成 cDNA,并去除基因组 DNA 污染。

(三)普通 PCR

以 3' adaptor 为反转录引物的 cDNA 为模版,采用表一中 *BACE1-F* 和 *BACE1-R* 中间序列扩增引物和 TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version 试剂盒进行普通 PCR,进行基因调取。循环参数:95℃ 3 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 1 min、33 个循环;72℃ 7 min。PCR 产物电泳后回收测序。

(四)3' RACE 巢式 PCR

以 3' adaptor 为反转录引物的 cDNA 为模版,采用 3' RACE 特异性引物和接头引物进行巢氏 PCR。

采用 *BACE1-F1* 和 5.3' outer 引物进行第一轮 PCR,循环参数:95℃ 3 min;94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 1 min、33 个循环;72℃ 7 min。以第一轮 PCR 产物为模版,采用 *BACE1-F2* 和 5.3' inner 引物进行第二轮 PCR,循环参数:95℃ 3 min;94℃ 30 s、58℃ 58 s、72℃ 1 min、33 个循环;72℃ 7 min。PCR

产物电泳后回收测序。

(五)5' RACE 巢式 PCR

以特异性引物 *BACE1-RT1*、*BACE1-RT2* 进行反转录,得到 cDNA,经 RNase H 和 TdT 处理后,采用 5' RACE 特异性引物和接头引物进行巢氏 PCR。

以 5' adaptor 和 *BACE1-R1* 为引物进行第一轮 PCR,循环参数:95℃ 3 min;94℃ 30 s、68℃ 30 s、72℃ 1 min、33 个循环;72℃ 7 min。

以第一轮 PCR 产物为模版,采用 5' outor 和 *BACE1-R2* 引物进行第二轮 PCR,循环参数:95℃ 3 min;94℃ 30 s、68℃ 68 s、72℃ 1 min、33 个循环;72℃ 7 min。

(六)测序

PCR 产物交由公司(生工生物工程(上海)股份有限公司)测序。将 PCR 纯化产物插入 pMD-18T 载体后,转化大肠杆菌感受态细胞,提取质粒进行双酶切鉴定,最终进行双向测序。进行序列拼接得到全长编码序列,拼接时要求序列间碱基重合大于 40 bp,一致性大于 90%。

1.2.2 序列分析

文中所用的参考蛋白质及核酸序列均来源于 GenBank,利用 MEGA10.0.5 推导其蛋白质编码区(CDS)开放阅读框(ORF)及氨基酸序列,使用 PyMOL 分别进行蛋白质三维模型的构建,利用在线软件 SWISS-MODEL (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>)及 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对 *BACE1* 蛋白氨基酸序列及蛋白质模型结构进行分析。将其核酸序列与

表 1 树鼩 *BACE1* PCR RACE 引物设计
Table 1 Primer design of tree shrew *BACE1*

名称 Primers	引物序列 Primer sequence	
5' adaptor	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTCCCCCCCCCCCCCCC	接头引物 Adaptor primer
3' adaptor	GCTGTCAACGTACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTT	
5.3' outer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC	中间序列扩增引物 Intermediate sequence amplification primer
5.3' inner	GCTACGTAACGGCATGACAGTG	
bace1-1F	TGTTCTTCATCAATGGCTCCAA	
bace1-R	AAATAACAGGGCGATGAGACTTC	
bace1-F1	ATGGTGTGTCAGTGGCGCTGCCT	3' RACE 特异性引物 3' RACE specific primer
bace1-F2	CTGCCGCCACGACGATGACT	
bace1-R1	AGGCCGCCCTTGATGGACTTGACA	5' RACE 特异性引物 5' RACE specific primer
bace1-R2	AGAACCCGTCCGGGAACCTCTCTGT	
bace1-RT1	CTGCCGCCGTCTGAACT	
bace1-RT2	TCCTCCATGTCCGGGGTGA	

NCBI 数据库进行比对,下载 NCBI 数据库中其他物种的 *BACE1* 氨基酸序列,利用 MEGA 10.0.5 中 Neighbour-Joining、bootstrap 置信度 1000 次自导复制构建系统进化树。

1.2.3 *BACE1* 的表达模式分析

(一)RNA 相对表达定量

对幼年组、青年组和老年组树鼩脑组织(顶叶、额叶、颞叶、枕叶、海马体和小脑)中提取总 RNA。在 MyIQ2 双色实时 PCR 检测系统上,使用 One Step TB Green™ PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)和表 2 中的 *BACE1* 特异性引物(*BACE1*-F 和 *BACE1*-R)与内参 *GAPDH* 特异性引物(*GAPDH*-F 和 *GAPDH*-R)进行 qRT-PCR。数据处理使用非参数秩和检验 Kruskal-Wallis 法,检验 mRNA 表达量与实验动物年龄之间的等级关系,当 $P<0.05$ 时,差异具有统计学意义。

表 2 RT-PCR 实验所用引物序列

Table 2 RT-PCR primer sequences

引物名称 Primers	引物序列 Primers sequences
<i>BACE1</i> -F	5'-TCGTCTGCCCAAGAAGGTG-3'
<i>BACE1</i> -R	5'-GAGGATGGTGATGCGGAAG-3'
<i>GAPDH</i> -F	5'-CTTCAACTCTGGCAAGGT-3'
<i>GAPDH</i> -R	5'-AAGATGCTGATGGACTTCC-3'

(二)Western blotting

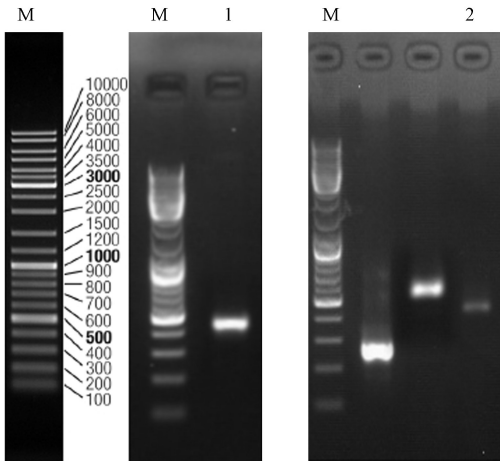
对收集的组织提取蛋白。超声波破碎仪破碎组织,并用含 PMSF 的裂解液裂解细胞。蛋白浓度测定按照碧云天(增强型)BCA 试剂盒说明书操作进行。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western blotting 标准方法,25 mg 总蛋白的上样量,分别用抗 *BACE1* (2338e53, AffinityY)和 β -actin(8H10D10, ABGENT)抗体 4℃ 过夜孵育, TBST 清洗 3 次,每次 10 min。摇床常温孵育二抗 60 min, TBST 清洗 3 次,每次 10 min。最后采用 ECL 底物化学发光法进行显色, Bio-Rad 凝胶成像系统进行显色。

2 结果

2.1 RACE 结果与序列分析

以树鼩脑组织总 RNA, 反转录后进行 PCR 扩增测序。将中间序列及 5' 和 3' RACE 实验得到的序列进行拼接,得到树鼩 *BACE1* 基因全长序列为 1 406 bp,其中 CDS 区为 804 bp,3' 末端非编码区 200 bp,5' 末端非编码区 402 bp(图 1),GenBank 登录号: MK766412。DNAMAN 分析结果显示树鼩

BACE1 CDS 区编码 267 个氨基酸,分子量约为 224.74×10^3 (图 2)。利用 MEGA10.0.5 构建进化树进行系统发育分析,发现树鼩与灰狼的 *BACE1* 基因的亲缘关系较为接近,这与实验预期估计有所差异(图 3)。



注:M 为 Marker,1 为 *BACE1*-3' RACE 结果,2 为 *BACE1*-5' RACE 结果,图中未标注条带不属于本实验涉及结果。

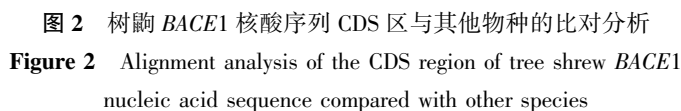
图 1 树鼩 *BACE1* 基因 RACE 扩增电泳图

Note. M is marker, 1 is the result of *BACE1*-3'RACE, 2 is the result of *BACE1*-5'RACE, and the unlabeled band in the figure is not the result of this experiment.

Figure 1 Electrophoresis map of RACE amplification of tree shrew *BACE1*

2.2 树鼩 *BACE1* 氨基酸序列的分析

通过比对,树鼩 *BACE1* 蛋白 CDS 区的氨基酸残基序列与人类序列比对重合度高达 98.87%,其中有三个氨基酸残基有差异,包括 41 位碱基差异(K41→N41)、204 位碱基差异(L204→P204)及 254 位碱基差异(Q254→H254)。采用 Clustal W 推导出的树鼩 *BACE1* 蛋白 CDS 区氨基酸残基序列,并参照 GenBank 中人的 *BACE1* 的结构域注释做出比对,发现两者同属跨膜蛋白并具有相同的跨膜结构域,总体结构包括胞外结构域(1-223)、跨膜结构域(224-244)及胞内结构域(245-267),并拥有 1 个相同的糖基化位点(N125)、4 个相同的乙酰化位点(K45、K51、K65、K66)及一个相同的磷酸化位点(S264);但是人和小鼠还存在一个额外的乙酰基位点(K41),这是树鼩所没有的,造成这种原因可能是由于树鼩 *BACE1* 核苷酸序列与人类在第 41 位碱基的差异(K41→N41)所导致,这也可能是两者表面绝对电荷分布产生差异的重要原因。其跨膜结构域和胞内结构域还存在 4 个位置相同的脂质结合位



基酸序列进行分析,分析结果显示,该蛋白分子量预测结果为 30358.96,亲水性平均值 (GRAVY) 为 0.034,等电点为 5.04,蛋白由 20 种不同的氨基酸

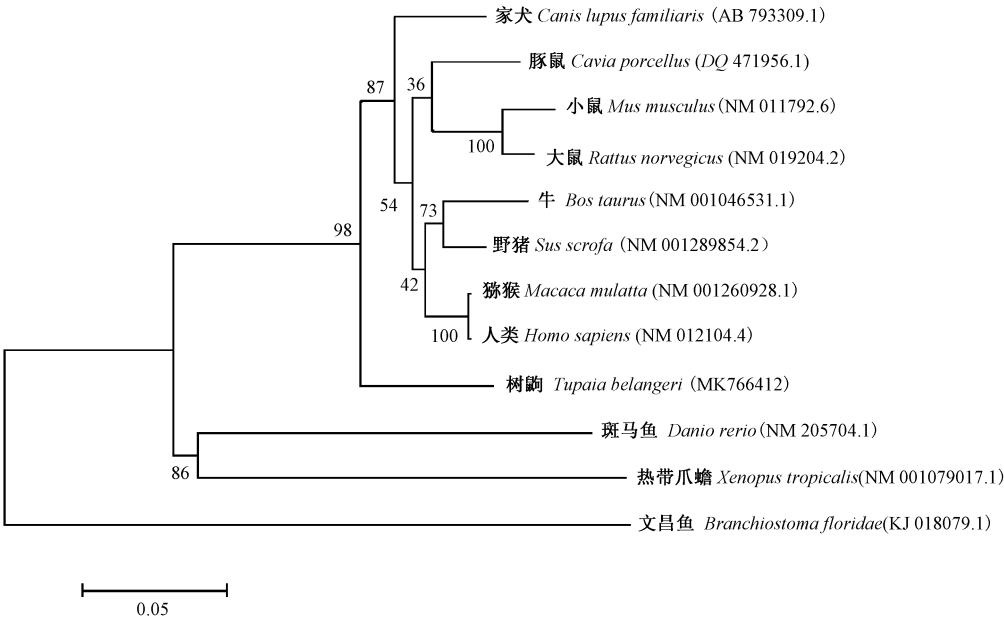
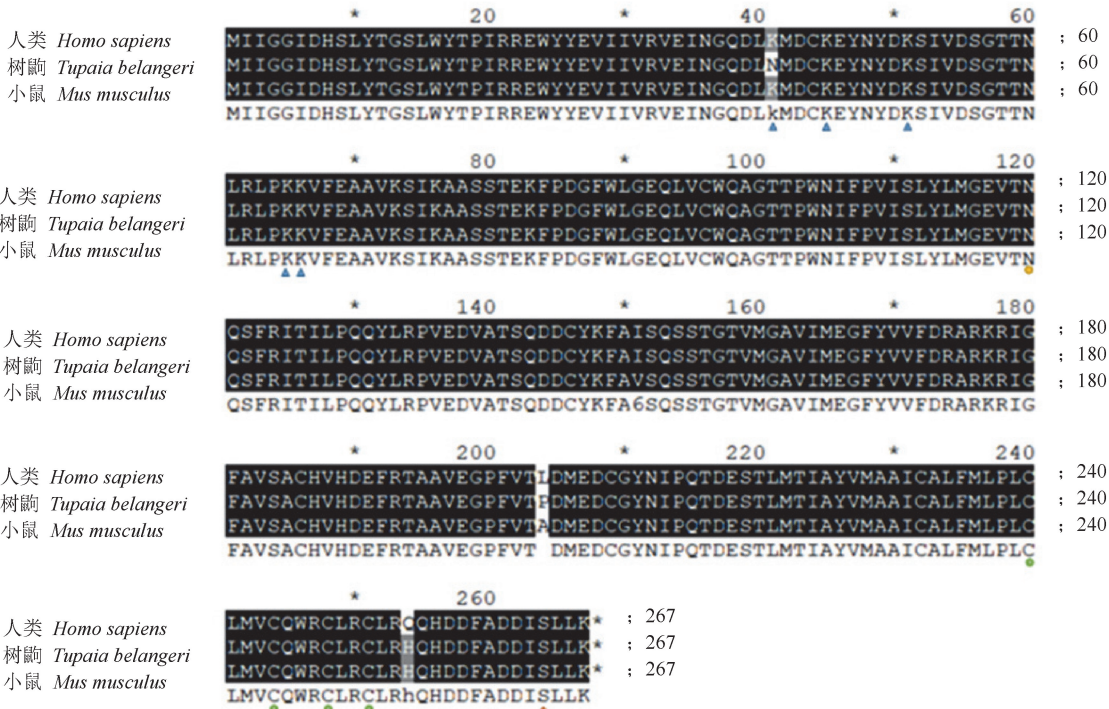


图 3 树鼩和其他物种 *BACE1* 之间的亲缘关系

Note. bootstrap;10 000 replicates; method: Neighbour-Joining.

Figure 3 Relationship between tree shrews and other species *BACE1*



注:相同的氨基酸位点在阴影部分表示,其中共同基序用阴影画出,潜在的 N-糖基化位点用黄色圆形标出,潜在的磷酸化位点用橙色菱形标出,潜在的乙酰化位点用蓝色三角形标出,跨膜结构域及膜内结构域上潜在的脂质结合位点用绿色同心圆标出。

图 4 树鼩 *BACE1* CDS 区氨基酸序列与人,小鼠的比对分析

Note. The same amino acid position is indicated in the shaded part, where the common motif is shaded, the potential N-glycosylation site is marked with a yellow circle, and the potential phosphorylation site is marked with an orange diamond. Potential acetylation sites are indicated by blue triangles, and potential lipid-binding sites on the transmembrane domain and the intramembrane domain are marked with green concentric circles.

Figure 4 Analysis of amino acid sequence of *BACE1* CDS region in tree shrews with human and mouse

残基构成,其中缬氨酸(Val)含量最高(7.9%),异亮氨酸(Ile)(7.5%)、亮氨酸(Leu)(7.5%)、丙氨酸(Ala)(6.7%)及天冬氨酸(Asp)(6.7%)的含量都相对较高。利用 SignalIP 3.0 Server 在线预测软件对树鼩 BACE1 蛋白进行蛋白质 N-末端信号肽预测,预测结果显示该蛋白无信号肽(图 5)。使用 ExPASy-ProtScale 在线分析软件,对树鼩 BACE1 蛋白的亲疏水性进行预测,结果如图 6 所示,图形的高峰值(正值)的区域表示疏水的区域,而负值的“低谷”区域是亲水区域,树鼩 BACE1 蛋白绝大部分区域属于亲水区域,一般认为蛋白的膜外的部分为亲水区,而跨膜区域为疏水区,此结果与 TMHMM 蛋白的结构域位置预测结果非常一致。

通过 SWISS 在线预测软件进行树鼩 BACE1 蛋白的结构模型构建,之后通过 APBS 和 Pymol 在线软件分别对树鼩 BACE1 分子表面绝对电荷和蛋白三维空间结构进行分析。结果显示,预测的树鼩 BACE1 蛋白结构与人具有高度一致性,在空间结构和分子表面电荷分布基本一致,同时在膜内结构区存在一个高度保守的 DXLL 的 ACDL 分选内吞基序。两者胞外结构域均由间隔分布的两部分折叠结构组成,包括一个包含 3 个 α 螺旋和 4 个 β 折叠

片以 α - β - β - α - β - β - α 的排序构成的折叠结构,以及一个包含 7 个 α 螺旋及 9 个 β 折叠片以 α - β - α - β - β - α - β - β - α - β - α 的排序构成的折叠结构,但由于两者在第一个折叠结构的氨基酸序列上存在差异,这导致了树鼩在 31 位到 48 位残基的空间构象上存在差异。此外,其胞内结构域由于碱基结构不同可能导致其拓扑结构域在空间构象上存在差异。此外,研究人员在树鼩 BACE1 蛋白上同样找到了四个氢键,以及两对二硫键(C44-C209 及 C96-C146),其分布位置均相同,认为这可能是两者空间构象高度相似的重要原因(图 7)。

同时比较 BACE1 蛋白模型的分子表面绝对电荷分析,发现两者的分子表面绝对电荷分布基本一致,表现为树鼩 BACE1 蛋白的 21 位、22 位及 174 位、176 位及 178 位均为带正电荷的精氨酸,这两个残基刚好暴露于分子表面,因而导致该区域带上了较强的正电荷。这与人的 BACE1 蛋白的表面绝对电荷是高度一致的。虽然两者分子表面绝对电荷分布基本一致,但在局部仍存在一定差异,具体表现为由于第 41 位的氨基酸残基序列的差异,导致人的 BACE1 在该位置带正电荷而树鼩的 BACE1 在该位置为中性电荷(图 8)。

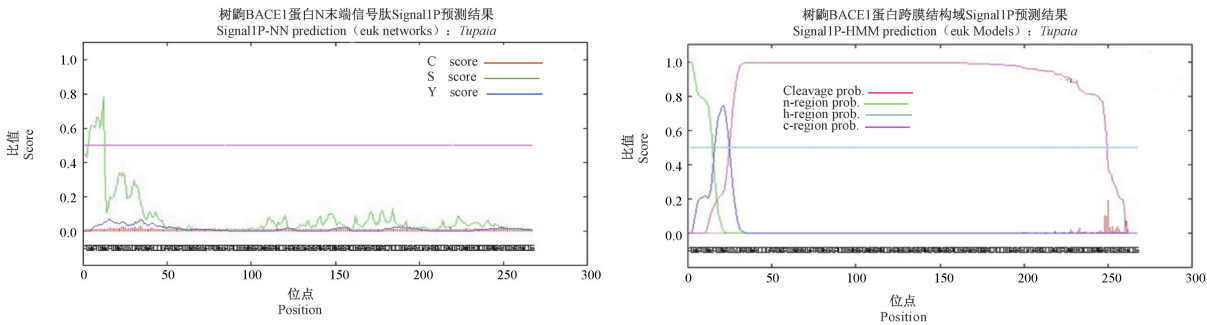


图 5 树鼩 BACE1 蛋白的信号肽预测
Figure 5 Signal peptide prediction of tree shrew BACE1 protein

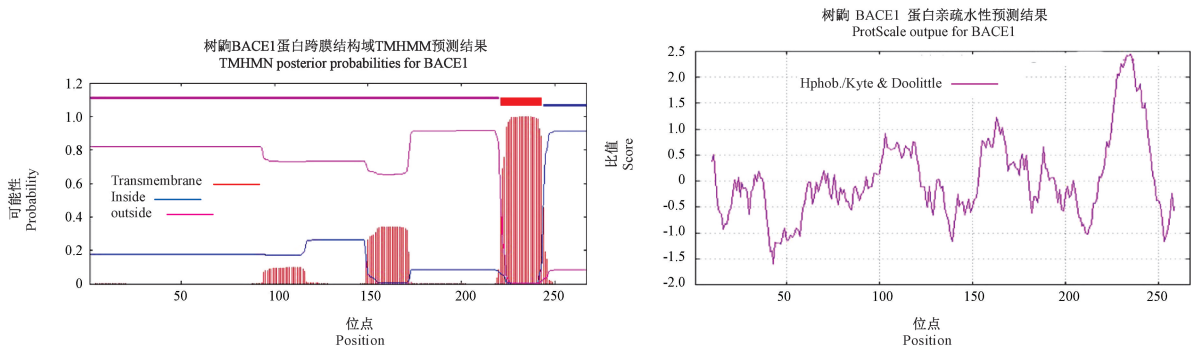
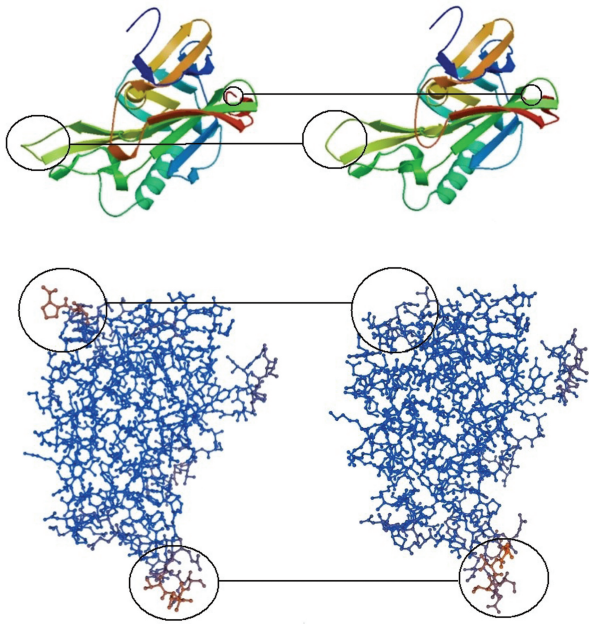


图 6 树鼩 BACE1 蛋白跨膜结构与亲疏水性预测
Figure 6 Analysis of transmembrane structure and hydrophobicity of tree shrew BACE1 protein



注:圆圈部分为结果讨论中比较的差异区域。
图 7 人和树鼩 *BACE1* 蛋白三维结构构建与球棒模型比较
Note. The circled part is the difference area compared in the result discussion.

Figure 7 Comparison of the three-dimensional structure construction of human and tree shrew *BACE1* proteins

2.4 树鼩 *BACE1* 基因在不同年龄段脑组织的表达分析

用 qPCR 方法对树鼩大脑中不同组织的 *BACE1* 相对表达量伴随实验动物年龄的变化情况也做了相关的研究分析。结果显示,伴随着树鼩的年龄增长,*BACE1* 表达量变化情况在大脑中枕叶与海马体中表现显著,差异有等级相关,呈非线性正相关;在颞叶部位的表达量有一定变化,差异具有等级相

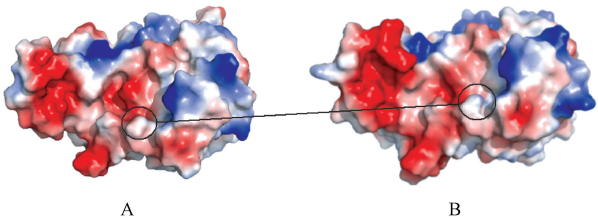


图 8 人和树鼩 *BACE1* 蛋白表面绝对电荷差异性比较
Figure 8 Comparison of absolute surface charge differences between *BACE1* proteins of humans and tree shrews

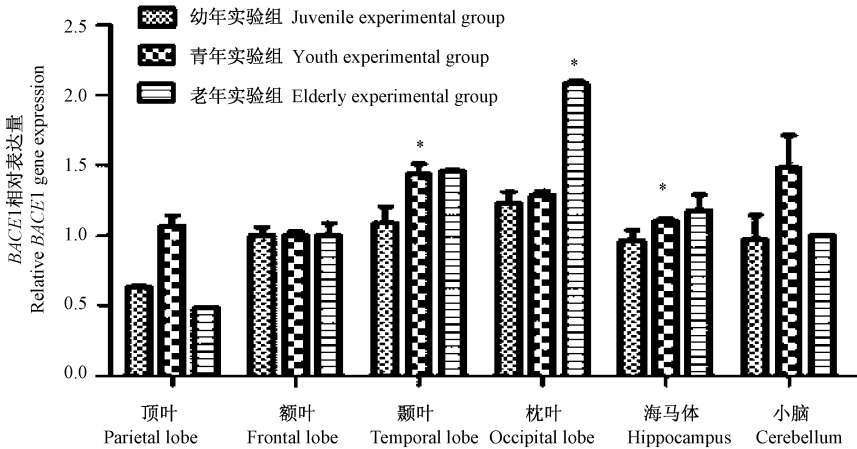
关,呈线性正相关;但在顶叶与小脑及额叶中表达量变化不明显或差异不具有等级相关(图 9)。

2.5 树鼩 *BACE1* 蛋白的表达模式分析

对树鼩大脑及外周组织的 *BACE1* 蛋白表达做了 Western blot 验证实验,结果显示,*BACE1* 蛋白在除树鼩的脑组织(顶叶、枕叶、颞叶、额叶、海马和小脑)明显表达外,在外周组织肾脏、胰脏及肝脏也有一定程度的表达(图 10)。

3 讨论

本研究通过 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 实验得到树鼩 *BACE1* 基因的全长序列,并利用树鼩 *BACE1* 基因序列和其他 11 类物种的 *BACE1* 基因序列进行系统发育分析,在构建进化树进行系统发育分析的过程中,发现树鼩 *BACE1* 与灰狼属的亲缘关系较为接近,反而与人类、小鼠等物种的 *BACE1* 的亲缘关系相对较远,这与预期估计有所偏差,这是否揭示树鼩的 β -分泌酶在进化过程中是否由于环境因素或其他原因导致,使得 β -分泌酶在进化策略上与灵长类的出现差异。



注:与其他两组相比, * $P < 0.05$ 。
图 9 不同年龄组树鼩大脑不同组织中 *BACE1* cDNA 的相对表达量
Note. Compared with other two groups, * $P < 0.05$.

Figure 9 Relative expression of *BACE1* cDNA in different tissues of tree shrews in different age groups

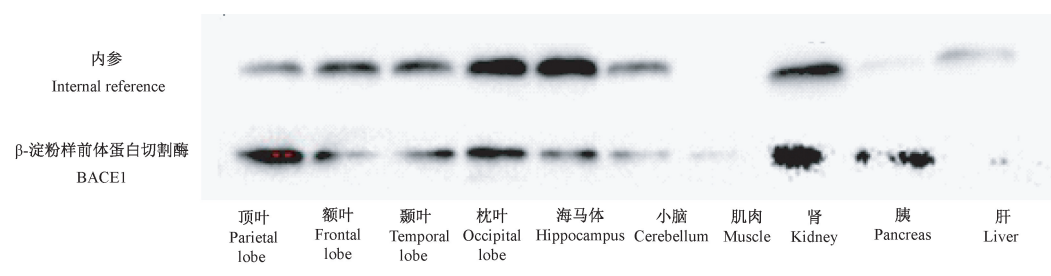


图 10 树鼩大脑各部位 BACE1 蛋白表达 Western Blot 实验结果

Figure 10 Western blot results of BACE1 protein expression in various parts of the brain

诚然,如果基于 *BACE1* 基因序列相似度分析的角度来讲,较猕猴等灵长类动物和人类 *BACE1* 核酸序列相似度相比,树鼩作为 AD 模式动物的研究中可能并不占优势,但如果从氨基酸残基序列的角度来分析,研究人员认为树鼩仍然有作为 AD 动物模型研究的应用前景。根据已有的关于人类的 *BACE1* 蛋白结构的报道^[13-14]及笔者用树鼩与人类 *BACE1* 氨基酸残基序列比对结果,发现两者相似性非常高,他们拥有相同的胞外结构域、跨膜结构与及胞内结构域,并且拥有高度相似的配体结合位点,基于以上结果可以推断,树鼩 *BACE1* 蛋白的基本结构应与人类 *BACE1* 蛋白结构基本相似。在对 *BACE1* 蛋白三维结构建模及空间构象建模的过程中发现,两者的蛋白质三维空间结构与表面绝对电荷分布基本一致,这与两者的氨基酸残基序列高度一致性可能有直接关系,此外,与两者的高度相似的二级结构及相同的氢键、二硫键位置也可能存在很大的关联^[15-16]。在表面绝对电荷分布分析的过程中,笔者认为两者在电荷和空间构象上可能保有高度的一致性,但其中仍存在一定差异,至于这些差异是否会影响到树鼩 *BACE1* 与其它分子的结合,还有待进一步的实验验证。除此之外还发现,树鼩与人类的 *BACE1* 蛋白在膜内结构区均存在一个高度保守的 DXXLL 的 ACDL 分选内吞基序,有报道称,该基序可能与 *BACE1* 的外功能区与 β -APP 的外功能区之间的相互作用有直接关系^[15,17-18],当然相关具体的分子机制仍有待进一步研究结果支持,但如果论点得到支持,研究人员有理由可以相信,树鼩在由 *BACE1* 蛋白介导的 β -APP 的淀粉样裂解途径应该与人类是一致的,这无论对于树鼩作为 AD 模型的构建还是作为 *BACE1* 抑制剂药物研究的实验动物都是具有一定的积极意义的。

此前有报道称,发现了 β -分泌酶的第二种亚型,并命名为 *BACE2*,该蛋白主要在心脏、肾脏和胎盘组织表达,而在脑组织中表达量极少。因此,推

断 *BACE2* 可能在 $A\beta$ 的产生中不占重要地位^[19]。本研究的 Western blot 验证实验结果可以提示,笔者发现的树鼩 *BACE1* 蛋白应不属于这种亚型,而与影响 AD 形成的 *BACE1* 更加相似。除此之外,对树鼩不同组织及大脑的不同部位的 *BACE1* 蛋白表达做了 Western blot 验证实验,结果表明,*BACE1* 蛋白在树鼩的肾脏和胰脏有表达,并在大脑的顶叶和枕叶中具有表达,这与预测的情况相吻合,也与人类 *BACE1* 蛋白表达情况保持高度一致^[20-22]。除此之外,对不同年龄组别的树鼩大脑中不同部位的 *BACE1* 的 mRNA 表达量做了相对定量分析,结果显示,由于年龄增长的影响因素伴随 *BACE1* 的表达量差异集中体现于树鼩大脑中的枕叶、颞叶与海马体;据报道,枕叶的功能作用体现于负责处理语言、动作感觉、抽象概念及视觉信息^[23];颞叶的功能作用表现在负责处理听觉信息,也与记忆和情感有关^[24];而海马体则主要负责长时记忆的存储转换和定向等功能^[25];据此分析,如果大脑中的这三个部位功能丧失确实可能引起个体产生符合 AD 的所有临床表现,包括但不限于记忆障碍、失语、失用、失认、视空间技能损害、执行功能障碍以及人格和行为改变等全面性痴呆表现^[26]。这一发现说明树鼩大脑中由 β -分泌酶介导切割 APP 形成 β -淀粉样多肽以启动 $A\beta$ 生成发生的主要位置及发生功能破坏及损伤的部位是以上三个部位,而与大脑中其他组织部位关联性不强,也证实了树鼩与人类在 β -分泌酶介导的 β -APP 淀粉样途径的发生部位可能是一致的,更有力的说明了树鼩可以作为 AD 模型的应用研究的可行性;这一结果也提示,如果可以利用 *BACE1* 抑制剂药物来达到治疗或预防 AD 的目的,是否可以直接从这三个大脑分区入手以减轻药物对大脑的负面作用,或者可以依此来提高药物的有效性及准确性,基于此研究人员是否可以认为,树鼩可能是作为研究 AD 病理改变或药物研究潜在的理想模型。

参考文献:

- [1] Kandalepas PC, Vassar R. Identification and biology of beta-secretase [J]. J Neurochem, 2012, 120(1): 55-61.
- [2] Xu TT, Zhang Y, He JY, et al. Bajijiasu ameliorates β -amyloid-triggered endoplasmic reticulum stress and related pathologies in an Alzheimer's disease model [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(1): 107-117.
- [3] 邹昱,张庆文,陈佩杰,等. β -淀粉样蛋白研究热点与内容分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 44(4): 473-480.
- [4] 曹树春,吕恒刚. 老年痴呆症的早期干预探讨 [J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 37(2): 197-197.
- [5] Hardy J, Higgins GA. Alzheimer's diseases: the amyloid cascade hypothesis [J]. Science, 1992, 256(5054): 184-185.
- [6] 廖国超,聂爱华,肖军海,等. β -分泌酶抑制剂的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2006, 16(6): 373-380.
- [7] Varghese J, Beck JP, Bienkowski MJ, et al. Human β -secretase (BACE) and BACE inhibitors [J]. J Med Chem, 2003, 46(22): 4625-4630.
- [8] Roberds SL, Anderson J, Basi G, et al. BACE knock-out mice are healthy despite lacking the primary β -secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics [J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(12): 1317-1324.
- [9] 黄晓燕,徐娟,孙晓梅,等. 树鼩在人类疾病动物模型中应用研究进展 [J]. 实验动物科学, 2013, 30(2): 59-64.
- [10] Wang J, Chai A, Zhou Q, et al. Chronic clomipramine treatment reverses core symptom of depression in subordinate tree shrews [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e80980.
- [11] Schmelting B, Corbach-Shle S, Kohlhaue S, et al. Agomelatine in the tree shrew model of depression: effects on stress-induced nocturnal hyperthermia and hormonal status [J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2014, 24(3): 437-447.
- [12] Fan Y, Luo R, Su LY, et al. Does the genetic feature of the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) support its potential as a viable model for Alzheimer's disease research? [J]. J Alzheimers Dis, 2018, 61(3): 1015-1028.
- [13] Liesveld JL, Phillips GL 2nd, Becker M, et al. A phase 1 trial of eltrombopag in patients undergoing stem cell transplantation after total body irradiation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2013, 19(12): 1745-1752.
- [14] Kuter DJ. The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists [J]. Int J Hematol, 2013, 98(1): 10-23.
- [15] Ye JT, Pi RB, Mao XX, et al. Alterations in mRNA expression of BACE1, cathepsin B, and glutamyl cyclase in mice ischemic brain [J]. Neuroreport, 2009, 20(16): 1456-1460.
- [16] Decicco CP, Tebben AJ, Thompson LA, et al. Novel γ -lactams as β -secretase inhibitors [P]. WO: 2004/013098, 2004-02-12.
- [17] 陈琪. 巨噬细胞内吞脂质的分子机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(7): 529.
- [18] 张瑜. DKK1 抑制巨噬细胞内脂质沉积及其相关分子机制 [D]. 济南: 山东大学, 2015.
- [19] Bennett BD, Babu-Khan S, Loeloff R, et al. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues [J]. J Biol Chem, 2000, 275(27): 20647-20651.
- [20] Vassar R, Kandalepas PC. The beta-secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. Alzheimer's Res Ther, 2011, 3(3): 20.
- [21] Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE [J]. Science, 1999, 286(5440): 735-741.
- [22] Hussain I, Powell D, Howlett DR, et al. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase [J]. Mol Cell Neurosci, 1999, 14(6): 419-427.
- [23] 方环海,王梅. 大脑枕叶语言功能的研究进展 [J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(8): 739-741.
- [24] 杨二娟,毓青,白学军,等. 颞叶和额叶癫痫认知功能特点的研究 [J]. 天津医科大学学报, 2013, 19(01): 70-72.
- [25] Kumaran D, Maguire EA. The human hippocampus: cognitive maps or relational memory? [J]. J Neurosci, 2005, 25(31): 7254-7259.
- [26] 陈彪,马秋兰. 阿尔茨海默病病因学研究进展及治疗展望 [J]. 中华神经科杂志, 2003, 36(2): 158-160.

[收稿日期] 2019-06-03