

阿尔茨海默病患者不同脑区 SOD-2 与 SIRT3 的表达水平及相关性*

向洁¹, 曹坤¹, 董阳婷^{2,3}, 曾晓晓^{2,3}, 徐毅¹, 冉龙艳¹, 邓婕^{2,3}, 官志忠^{1,2,3**}

(1. 贵州医科大学附院 病理科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 贵州省医学分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨过氧化物酶 2 (SOD-2) 与沉默信息调节因子-3 (SIRT3) 在阿尔兹海默病 (AD) 患者不同脑区的表达, 评估两者的相关性。方法: 10 例 AD 患者 (AD 组) 和 10 例同龄正常人 (对照组) 尸体解剖后的脑组织, 选择颞叶、额叶、海马和小脑脑区, 应用免疫组织化学方法检测不同脑组织中 SOD-2 及 SIRT3 的分布和表达, 采用 Spearman 分析在不同脑区 SOD-2 与 SIRT3 表达水平的相关性。结果: 与对照组相比, AD 患者颞叶、额叶、海马中 SOD-2 和 SIRT3 阳性细胞数及 IOD 值明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而在小脑中 SOD-2 及 SIRT3 表达较弱, 且两组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); AD 患者的颞叶、额叶、海马中 SOD-2 与 SIRT3 的表达呈正相关 ($r^2 = 0.425, P = 0.041$; $r^2 = 0.411, P = 0.046$; $r^2 = 0.402, P = 0.049$), 而在小脑中则无明显相关关系 ($r^2 = 0.031, P = 0.624$)。结论: AD 患者大脑颞叶、额叶、海马中 SOD-2 和 SIRT3 表达水平降低, 且两者呈现一定的相关性, 可能与该病的神经病理学改变有关。

[关键词] 阿尔兹海默病; 大脑; 过氧化物酶-2; 沉默信息调节因子 3; 免疫组织化学

[中图分类号] R361+.3; R742 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)05-0497-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.05.001

SOD2 and SIRT3 Expression Levels in the Different Brain Regions of Patients with Alzheimer's Disease and Their Correlation

XIANG Jie¹, CAO Kun¹, DONG Yangting^{2,3}, ZENG Xiaoxiao^{2,3},

XU Yi¹, RAN Longyan¹, DENG Jie^{2,3}, GUAN Zhizhong^{1,2,3}

(1. Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Guizhou Medical University,

Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of peroxidase 2 (SOD2) and sirtuin-3 (SIRT3) in different brain regions of patients with Alzheimer's disease (AD) and evaluate their correlation.

Methods: Brains from ten patients with AD (AD group) and ten normal brain tissues with normal age (control group) were collected. The expression levels of SOD2 and SIRT3 were detected using immunohistochemistry in temporal lobe, frontal lobe, hippocampus and cerebellum. Spearman analysis was used to assess the association of the distribution and expression of SOD2 and SIRT3 in different brain regions. **Results:** Compared with the control group, the number of SOD-2 and SIRT3 positive cells and the IOD value were significantly lower in the temporal lobe, frontal lobe and hippocampus of patients with AD than those in control group ($P < 0.05$). The expression of SOD-2 and SIRT3 were weak in

*[基金项目] 国家自然科学基金(U1812403); 贵州省创新计划项目[黔教合协同创新中心(2014) 06]; 贵州省科技创新团队基金[黔科通(2016) 161]

** 通信作者 E-mail: 1457658298@qq.com

网络出版时间: 2019-05-28 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190528.0227.001.html>

the cerebellum, and there was no significant difference between AD group and control group ($P > 0.05$). SOD2 expression levels were positively correlated with SIRT3 expression levels in temporal lobe, frontal lobe and hippocampus of AD patients ($r^2 = 0.425$, $P = 0.041$; $r^2 = 0.411$, $P = 0.046$; $r^2 = 0.402$, $P = 0.049$, respectively), while they were not significantly correlated in the cerebellum ($r^2 = 0.031$, $P = 0.624$). **Conclusion:** The expression levels of SOD-2 and SIRT3 in the temporal lobe, frontal lobe and hippocampus of AD patients are decreased, and SOD2 was positively correlated with SIRT3. It may be related to AD neuropathological changes.

[**Key words**] Alzheimer's disease; brain; peroxidase-2; silencing regulator 3; immunohistochemistry

阿尔兹海默病(alzheimer's disease, AD)又称老年性痴呆,是一种主要在老年期发生的神经元退行性变疾病,以进行性痴呆为主要特征,主要神经病理学改变有老年斑增多、神经元纤维缠结形成、神经元丧失及脑萎缩^[1]。近年来随着以清除 A β 为主流的临床 III 期治疗药物研究的失败,进一步阐明 AD 的分子发生机制、分析临床研究失败的原因、以及采取新的治疗途径等成为当前 AD 研究的热点^[2]。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一种含有金属元素的活性蛋白酶,可分为铜-锌-SOD(Cu-Zn-SOD, SOD-1)、锰-SOD(Mn-SOD, SOD-2)和铁-SOD(Fe-SOD, SOD-3)三种。其中, SOD-2 是线粒体内重要的抗氧化物酶,可将超氧化物分解为水和过氧化氢,从而保护细胞免受氧化损伤。沉默信息调节因子-3(silent information regulator 3, SIRT3)是一种依赖 NAD⁺ 的去乙酰化酶,主要定位于线粒体,与多种生物学功能密切相关,其中包括 ATP 生成、氧自由基清除及维持线粒体稳态等^[3]。SOD-2 及 SIRT3 都参与调节线粒体功能、抵抗氧化应激,在神经退行性疾病中起着关键作用。有研究表明, SIRT3 能通过提高 SOD-2 活性,从而增强机体抗氧化的作用^[4]。另外 SIRT3 协同 SOD-2 在衰老、致癌等方面也有着至关重要的作用^[5-6],但它们在 AD 发病机制中的作用报道甚少,本研究以人脑组织为标本,探讨 AD 患者和对照组的不同脑区 SOD-2 和 SIRT3 的表达、分布及两者的关系。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 抗体试剂 兔多克隆抗 SOD-2 抗体(美国 genetex 公司),小鼠多单隆抗 SIRT3 抗体(美国 Santa Cruze 公司),山羊抗鼠 IgG 标记 cy-3 和山羊抗兔 IgG 标记 488(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),免疫组织化学通用二步法试剂盒、DAB 显色

试剂盒、PBS 缓冲液、柠檬酸盐、山羊血清(中杉金桥生物技术有限公司)

1.1.2 人脑样本 由荷兰阿姆斯特丹人脑组织标本库提供 AD 患者(AD 组)及正常人(对照组)各 10 例尸体解剖后脑组织标本蜡块,有大脑颞叶皮质、额叶皮质、海马及小脑等不同脑区。AD 患者死亡时平均年龄为(81.5 ± 7.1)岁,正常对照组为(79.4 ± 9.2)岁;AD 患者和对照组的死后间隔时间(PMI,死亡和尸检间隔)分别为(5.1 ± 1.0)h 和(8.0 ± 3.4)h,研究对象的临床和神经病理学特征见表 1。AD 诊断根据患者的病史、临床表现和实验室检查,排除了其他可能的痴呆原因,同时根据美国国立神经病、语言交流障碍和卒中研究所标准对 AD 患者痴呆严重程度进行了临床分级。患者与对照组脑组织标本在各种因素上均具有良好的匹配性,包括生前和死后相关因素。生前因素包括年龄、性别、疾病状态和死亡时间,死后因素包括死后尸检时间、固定方式、保存时间等^[7-9]。所提供的 AD 样本患者均未接受胆碱能抑制剂等特殊治疗。本研究获得贵州医科大学伦理委员会批准(2018 第 67 号)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 将不同脑区的石蜡包埋标本行脑组织切片,厚度 6 μm , 60 ~ 65 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 1 h,将切片置于二甲苯及不同浓度乙醇脱蜡水化,0.25% PBST 缓冲液洗涤切片;随后采用微波修复对切片进行组织抗原修复,待切片自然冷却后于切片上滴加内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育 10 min;山羊血清工作液封闭 1 h,滴加抗 SOD-2 (1:200)、抗 SIRT3 (1:200)抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBST 缓冲液冲洗,滴加适量的反应增强液,室温孵育 20 min, PBST 缓冲液再次冲洗,滴加增强酶标羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物,室温孵育 20 min;加入适量新鲜配置的 DAB 显色液,室温孵育 5 ~ 8 min 后,清水终止显色;脱水、透明,中性树胶封片,镜检。

表 1 两组研究对象的临床和神经病理学特征

Tab.1 Clinical and neuropathological characteristics of the patients with AD and control subjects											
对象	性别	年龄(岁)	PMI(h)	NFT	Aβ	对象	性别	年龄(岁)	PMI(h)	NFT	Aβ
C1	男	65	14.4	0	0	AD1	男	85	7.2	5	C
C2	女	78	6.5	1	A	AD2	女	76	5.1	5	C
C3	男	78	6.9	1	A	AD3	男	73	3.6	6	C
C4	男	82	13.6	2	A	AD4	男	80	5.3	6	C
C5	男	88	5.7	2	B	AD5	男	88	5.0	4	C
C6	女	78	4.3	1	0	AD6	女	95	4.8	5	C
C7	男	83	7.8	2	0	AD7	女	72	3.8	6	C
C8	男	98	8.7	1	B	AD8	女	86	4.8	4	B
C9	女	72	4.8	2	0	AD9	女	82	6.2	5	C
C10	男	72	6.8	1	A	AD10	女	78	4.8	6	C

注:AD1 ~ AD10 为 AD 患者,NFT 为根据神经纤维缠结的分布和数量对 AD 的分级,Aβ 为根据老年斑对 AD 的分级

1.2.2 结果判定 每张切片随机选择 5 个视野(原始放大倍数为 200 倍),将 5 个视野的阳性蛋白表达平均灰度值作为每一张切片的阳性蛋白表达的灰度值。最后计算阳性细胞数以及 SIRT3、SOD-2 平均光密度(IOD)。

1.3 统计学分析

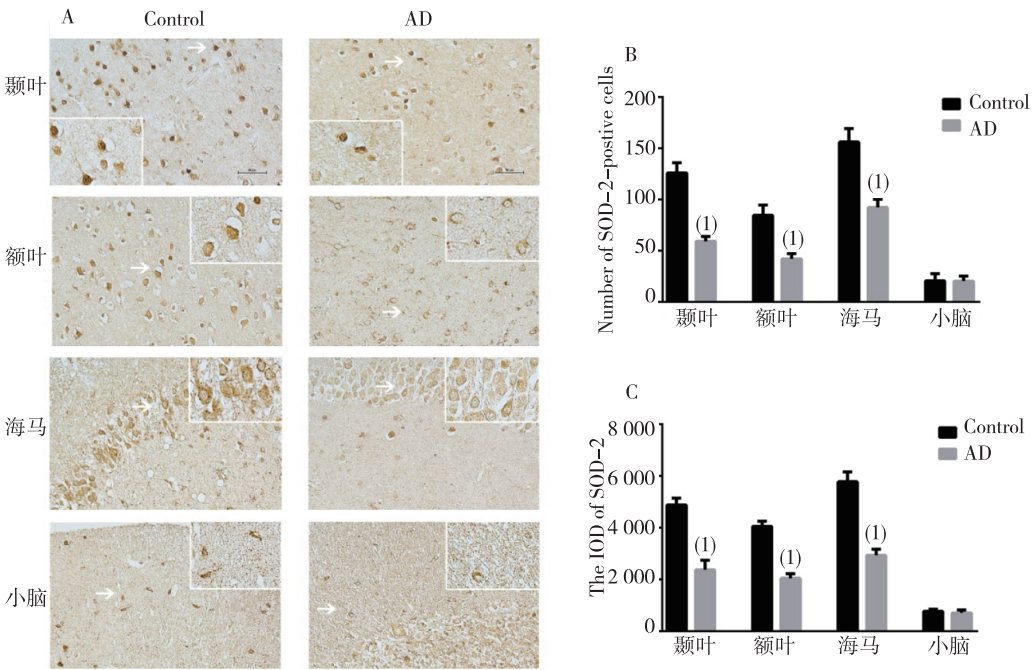
采用 GraphPad Prism 软件(graph pad software, San Diego,CA,USA)进行统计分析。实验数据应用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用双因素方差分析(*Two-Way ANOVA*),进一步多重比较,方差齐者采用 *LSD-t* 检验,方差不齐者采用 *Dunnett*

T3 分析;采用 *Spearman* 分析在不同脑区 SOD-2 与 SIRT3 表达水平的相关性。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 SOD-2 表达

脑组织中 SOD-2 的表达定位于细胞质中(图 1A)。与对照组相比,AD 组颞叶、额叶、海马等脑区中 SOD-2 阳性细胞数(图 1B)及 IOD 值(图 1C)均降低($P < 0.05$);AD 组和对照组小脑中 SOD-2 阳性细胞数及 IOD 值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A 放大 200 倍、白框中放大 400 倍,⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$

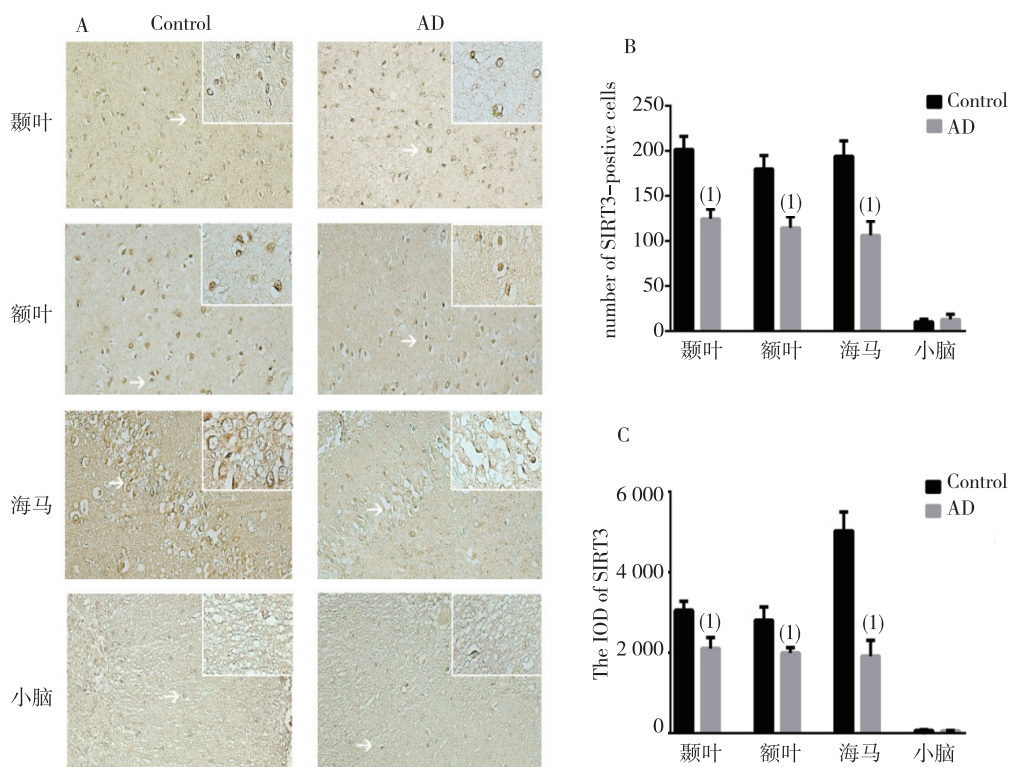
图 1 SOD-2 在 AD 组及对照组大脑颞叶、额叶、海马和小脑的分布及表达(DAB 染色)

Fig.1 Immunohistochemical staining for SOD2 in cerebral temporal lobe, frontal lobe, hippocampus and cerebellum of patients with AD and control subjects

2.2 SIRT3 表达

脑组织中 SIRT3 主要表达定位于细胞质中(图 2A)。半定量分析显示,SIRT3 阳性细胞数在 AD 患者颞叶、额叶、海马中均少于对对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而在小脑中两组 SIRT3

阳性细胞数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2B;同样,IOD 值在 AD 组颞叶、额叶、海马中均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),在小脑中两组 IOD 值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2C。



注:A 放大 200 倍、白框中放大 400 倍,⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$

图 2 SIRT3 在 AD 患者及对照组大脑颞叶、额叶、海马和小脑分布及表达(DAB 染色)

Fig. 2 Immunohistochemical staining for SIRT3 in cerebral temporal lobe, frontal lobe, hippocampus and cerebellum of AD patients and control subjects

2.3 AD 患者 SOD-2 与 SIRT3 表达的关系

AD 患者脑组织中,SOD-2 与 SIRT3 蛋白表达水平在大脑颞叶($r^2 = 0.425$, $P = 0.041$)、额叶($r^2 = 0.411$, $P = 0.046$)及海马($r^2 = 0.402$, $P = 0.049$)中呈正相关,说明随着 SOD-2 蛋白水平降低,SIRT3 蛋白水平也降低(图 3A、B、C)。在小脑中,这两种蛋白之间则没有相关性($r^2 = 0.031$, $P = 0.624$),见图 3D。

3 讨论

AD 病因十分复杂,涉及遗传、环境等多种因素。大量研究表明,氧化应激损伤是 AD 发病机制中至关重要的影响因素^[10]。A β 的大量蓄积可直接破坏线粒体电子传递链,从而增加 ROS 的产

生^[11],并且影响 ATP 的生成^[12]。另一方面,作为氧化代谢的重要场所,同时也是 ROS 产生和消除的重要场所。线粒体内 ROS 水平升高,进一步可导致线粒体凋亡^[13]。本研究以定位于线粒体的关键蛋白 SOD-2 及 SIRT3 作为研究对象,探讨两者在 AD 患者中的表达及相关性。研究结果显示,AD 患者颞叶、额叶、海马中,SOD-2 及 SIRT3 表达水平较对照组明显降低,而在小脑未见明显改变。

基于对抗氧化应激损伤的 AD 治疗研究中发现,SOD-2 基因多态性与 AD 的发生发展有关^[14],拟 AD 动物模型 Tg2576 小鼠中 SOD-2 的过表达可降低小鼠脑组织海马过氧化物的含量,并可预防记忆缺陷^[15]。进一步证实,SOD-2 是线粒体内主要的氧自由基清除剂,在维持线粒体功能、体内外抗氧化损伤中发挥着主要作用。

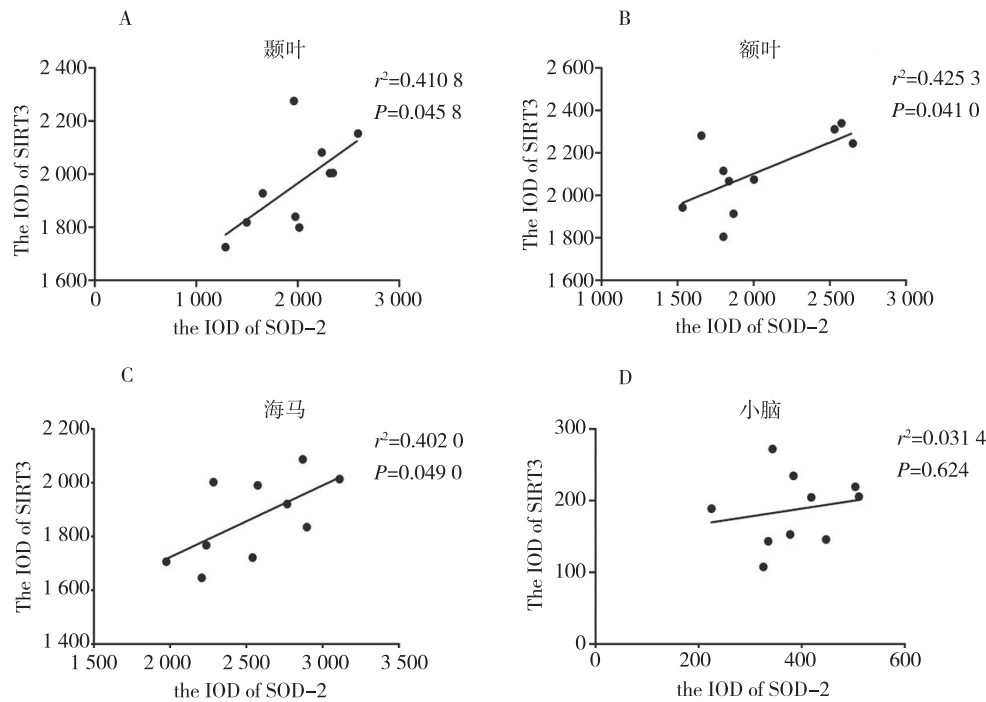


图3 AD患者大脑额叶、颞叶、海马和小脑中SOD-2与SIRT3蛋白表达的相关性

Fig.3 The correlation between SOD2 and SIRT3 in SOD-2 in cerebral temporal lobe, frontal lobe, hippocampus and cerebellum of AD patients

Sirtuins 蛋白家族是一组依赖烟腺嘌呤二核苷酸(NAD)的去乙酰化蛋白,家族包括7个成员,其中SIRT3的活性形式存在于线粒体基质,通过去乙酰化作用调节线粒体代谢,包括ATP的产生,ROS的代谢和细胞凋亡。*SIRT3*基因与衰老密切相关^[16],且其升高能减轻A β 的神经毒性,介导对神经退行性疾病的保护作用^[17]。

SOD-2作为氧化应激反应中最重要最基础的抗氧化酶,可能与共同表达在线粒体的SIRT3有着密切的联系,或许介导其神经保护作用。研究表明,SOD-2与SIRT3联系密切,SIRT3是通过SOD-2的增多来实现抗ROS的作用^[18]。在成骨细胞分化过程中,SIRT3可通过改变SOD-2表达,清除线粒体内的ROS,促进成骨细胞分化,而敲除*SOD-2*和*SIRT3*基因后,可抑制成骨细胞分化^[19]。另一方面,抑制SIRT3-SOD-2-线粒体信号通路,可诱导血管炎症,促进动脉粥样硬化^[20]。而在神经退行性疾病中,模拟亨廷顿病和癫痫的SIRT3缺陷小鼠表现出更多的神经元损伤,这种损伤最主要原因也与SOD-2含量降低有关^[21]。目前两者在AD发病机制的研究较少,本研究结果显示,SOD-2及SIRT3在AD病变较重的脑区,如额叶、颞叶、海马

中表达减少,且在这3个脑区中,SOD-2表达与SIRT3表达存在正相关,说明SOD-2含量减少,SIRT3表达也减少,由此推测SOD-2与SIRT3共同参与了AD发病过程中线粒体能量代谢障碍的过程,从而导致抗氧化应激作用降低,可能是AD氧化应激假说的一个重要因素。

综上所述,AD患者额叶、颞叶、海马等脑区中SOD-2和SIRT3表达降低,SOD-2表达水平与SIRT3表达水平呈正相关,可能与该病的神经病理学改变有关。

4 参考文献

[1] SCHELTENS P, BLENNOW K, BRETELER M M, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2016, 388(10043):505-517.

[2] HONIG L S, VELLAS B, WOODWARD M, et al. Trial of solanezumab for mild dementia due to Alzheimer's disease[J]. N Engl J Med, 2018, 378(4):321-330.

[3] ANSARI A, RAHMAN M S, SAHA S K, et al. Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease[J]. Aging Cell, 2017, 16(1):4-16.

- [4] QIU X, BROWN K, HIRSHEY M D, et al. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation[J]. *Cell Metab*, 2010, 12(6):662–667.
- [5] XIE X, WANG L, ZHAO B, et al. SIRT3 mediates decrease of oxidative damage and prevention of ageing in porcine fetal fibroblasts[J]. *Life Sci*, 2017, 177:41–48.
- [6] WEI L, ZHOU Y, QIAO C, et al. Oroxylin A inhibits glycolysis-dependent proliferation of human breast cancer via promoting SIRT3-mediated SOD2 transcription and HIF1 α destabilization[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6:e1714.
- [7] RAVID R, VAN ZWIETEN E J, SWAAB D F. Brain banking and the human hypothalamus--factors to match for, pitfalls and potentials[J]. *Prog Brain Res*, 1992, 93:83–95.
- [8] RAVID R, SWAAB D F. The netherlands brain bank--a clinico-pathological link in aging and dementia research[J]. *J Neural Transm Suppl*, 1993, 39:143–153.
- [9] RAVID R. Standard operating procedures, ethical and legal regulations in BTB (Brain/Tissue/Bio) banking: what is still missing[J]. *Cell Tissue Banking*, 2008, 9: 121–137.
- [10] CHEIGNON C, TOMAS M, BONNEFONT-ROUSSWLOT D, et al. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease[J]. *Redox Biol*, 2018, 14:450–464.
- [11] MANCZAK M, MAO P, CALKINS M J, et al. Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease neurons[J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 20(Suppl2):S609–S631.
- [12] TANEJ J, ADACHI T, YOSHIDA A, et al. Amyloid β -oligomers induce interleukin-1 β production in primary microglia in a cathepsin B- and reactive oxygen species-dependent manner[J]. *BiochemBiophys Res Comm*, 2015, 458: 561–567.
- [13] GUPTA S, KASS G E, SZEGEZDI E, et al. The mitochondrial death pathway: a promising therapeutic target in diseases[J]. *J Cell Mol Med*. 2009, 13(6):1004–1033.
- [14] AWIENER H W, PERRY R T, CHEN Z, et al. A polymorphism in SOD2 is associated with development of Alzheimer's disease[J]. *Genes Brain Behav*, 2007, 6(8):770–775.
- [15] MASSAAD C A, WASHING T M, PAUTLER R G, et al. Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(32):13576–13581.
- [16] BELLIZZI D, ROSE G, CAVALCANTE P, et al. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages[J]. *Genomics*, 2005, 85(2):258–263.
- [17] HAN P, TANG Z, YIN J, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects against beta-amyloid toxicity[J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35: 2064–2071.
- [18] TAO R, A VASSILOPOULOS L, PARISIADOU Y, et al. Regulation of Mn-SOD enzymatic activity by Sirt3 connects the mitochondrial acetylome signaling networks to aging and carcinogenesis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20: 1646–1654.
- [19] GAO J, FENG Z, WANG X, et al. SIRT3/SOD2 maintains osteoblast differentiation and bone formation by regulating mitochondrial stress[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(2):229–240.
- [20] CHEN M L, ZHU X H, RAN L, et al. Trimethylamine-N-Oxide induces vascular inflammation by activating the NLRP3 inflammasome through the SIRT3-SOD2-mtROS signaling pathway[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(9): 4–15.
- [21] CHENG A, YANG Y, ZHOU Y, et al. Mitochondrial SIRT3 mediates adaptive responses of neurons to exercise and metabolic and excitatory challenges[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(1):128–142.

(2019-02-11 收稿, 2019-04-13 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 张启芳