

Rab27b 对小鼠星形胶质细胞源性神经营养因子分泌的影响

张月 王昊

100730 首都医科大学附属北京同仁医院 北京市眼科研究所(张月); 100730 首都医科大学附属北京同仁医院 北京市糖尿病研究所(王昊)

通信作者: 王昊, Email: hwang2002@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2024.04.002

【摘要】目的 探讨Rab27b对小鼠星形胶质细胞源性神经营养因子(BDNF)分泌的影响。**方法** 采用定量PCR和免疫荧光染色法检测Rab27分子的2个亚型Rab27a和Rab27b在野生型小鼠大脑皮层和海马组织中的表达和分布情况。采用免疫荧光染色法检测Rab27b在野生型小鼠海马区星形胶质细胞中的表达情况。采用Western blot方法检测Rab27b基因敲除小鼠星形胶质细胞BDNF和海马区突触可塑性标志分子PSD95及突触素1的表达, ELISA方法检测Rab27b基因敲除小鼠星形胶质细胞BDNF的分泌情况,明确Rab27b基因敲除对星形胶质细胞BDNF分泌水平的影响。**结果** 定量PCR和免疫荧光染色结果显示,野生型小鼠大脑皮层和海马区Rab27b的mRNA水平和荧光强度均高于Rab27a,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。免疫荧光结果显示Rab27b与星形胶质细胞标志分子GFAP共表达。Western blot结果显示Rab27b基因敲除小鼠星形胶质细胞内BDNF总量与野生型小鼠比较,差异无统计学意义($P > 0.05$), ELISA结果显示Rab27b基因敲除小鼠星形胶质细胞BDNF分泌水平低于野生型小鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot结果显示Rab27b基因敲除小鼠海马中PSD95及突触素1的表达水平均低于野生型小鼠,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。**结论** Rab27b调节小鼠星形胶质细胞分泌BDNF,改善突触可塑性。

【关键词】 星形胶质细胞; 脑源性神经营养因子; 囊泡分泌; 突触可塑性

基金项目: 国家自然科学基金(82101275, 82170809); 辽宁省教育厅基本科研项目(LJKQZ2021101)

Effects of Rab27b on BDNF secretion from mouse astrocytes Zhang Yue, Wang Hao

Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China (Zhang Y); Beijing Institute of Diabetes, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China (Wang H)

Corresponding author: Wang Hao, Email: hwang2002@126.com

【Abstract】Objective To explore the effect of Rab27b on the secretion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mouse astrocytes. **Methods** Quantitative PCR and immunofluorescence staining were used to detect the mRNA expression and distribution of Rab27a and Rab27b, two subtypes of Rab27 molecules, in the cerebral cortex and hippocampus of wild-type mice. Immunofluorescence staining was used to detect the expression of Rab27b in astrocytes in the hippocampus of wild-type mice. Western blot method was used to detect the expression of BDNF in astrocytes and PSD95 and Synapsin1, synaptic plasticity markers in the hippocampus of Rab27b gene knockout mice. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the secretion of BDNF in astrocytes of Rab27b gene knockout mice, and to clarify the effect of Rab27b gene knockout on BDNF secretion levels in astrocytes. **Results** The results of quantitative PCR and immunofluorescence staining showed that the mRNA levels and fluorescence intensity of Rab27b in the cerebral cortex and hippocampus of wild-type mice were higher than those of Rab27a, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). The immunofluorescence results showed that Rab27b was co expressed with the astrocyte marker GFAP. Western blot results showed that there was no statistically significant difference in the total amount of BDNF in astrocytes of Rab27b gene knockout mice compared to wild-type mice ($P > 0.05$). The ELISA results showed that the secretion level of BDNF in astrocytes of Rab27b gene knockout mice was

lower than that of wild-type mice, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Western blot results showed that the expression levels of PSD95 and Synapsin1 in the hippocampus of *Rab27b* gene knockout mice were lower than those of wild-type mice, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$).

Conclusions *Rab27b* regulates the secretion of BDNF from mouse astrocytes and improves synaptic plasticity.

【Key words】 Astrocytes; Brain-derived neurotrophic factor; Vesicle secretion; Synaptic plasticity

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (82101275, 82170809); Basic Scientific Research Project of Education Department of Liaoning Province (LJKQZ2021101)

随着神经科学和认知科学的快速发展,突触可塑性与认知功能的相关研究受到广泛关注。星形胶质细胞是中枢神经系统的主要神经胶质细胞类型,在神经元的生长、发育和功能发挥中起着关键作用^[1]。星形胶质细胞分泌的BDNF参与神经元的生长、分化和修复,在突触可塑性中发挥重要作用,因此与学习和记忆密切相关^[2]。

Rab蛋白是小G蛋白Ras超家族最大的亚家族成员,具有GTP酶活性,可结合和水解GTP,通过调节致密核心囊泡的分泌过程从而在调节性分泌中起重要作用^[3-4]。BDNF由神经细胞中的致密核心囊泡分泌^[2]。研究表明,Rab蛋白在调控星形胶质细胞BDNF分泌中起重要作用^[5]。Rab27是Rab家族蛋白中的一员,在多种类型细胞的致密核心囊泡上表达并调节其分泌活动^[6]。Rab27的异常表达与神经系统疾病密切相关。研究发现AD患者海马和皮层Rab27的mRNA表达明显增加^[7]。此外,与对照组相比,PD患者尸体脑组织中Rab27b的蛋白表达增加^[8],这些研究表明Rab27可能在神经退行性疾病的发病机制中起重要作用。然而有关Rab27在调控星形胶质细胞BDNF分泌中的作用及机制研究较少。

本研究采用野生型和*Rab27b*完全基因敲除小鼠,从整体和细胞水平探讨Rab27b在星形胶质细胞中的表达情况及在星形胶质细胞分泌BDNF中的调控作用,以期深入了解神经系统疾病的发生、发展提供视角和潜在的治疗靶点。

一、资料与方法

1. 实验动物:选择33只品系为C57BL/6的野生型雄性小鼠和27只*Rab27b*完全基因敲除雄性小鼠,来源于江苏集萃药康生物科技股份有限公司[动物生产许可证号:SYXK(苏)2023-0036],小鼠周龄为12~16周,体重20~30g。选择新生1~3d胎鼠,来自C57BL/6的野生型雌性孕鼠和*Rab27b*完全基因敲除雌性孕鼠,每组各20~24只。所有小鼠自由进食、饮水,在温度为24~25℃,相对湿度为50%~60%的条件下按自然昼夜规律饲养。本研究在北京迈德

康纳生物技术有限公司[动物使用许可证号:SYXK(京)2020-0050]进行,动物实验严格遵循国家有关实验动物管理和使用的规定。本研究已经实验动物伦理委员会审核批准(伦理批号:MDKN-2022-072)。

2. 实验试剂:兔抗BDNF多克隆抗体(货号:ab108319)、兔抗PSD95多克隆抗体(货号:ab18258)和兔抗突触素I多克隆抗体(货号:ab254349)购自英国Abcam公司;鼠抗 β -actin单克隆抗体(货号:A5316)购自美国Sigma-Aldrich公司;鼠抗GFAP单克隆抗体(货号:MAB360)购自美国Millipore公司;兔抗Rab27a多克隆抗体(货号:69295S)购自美国CST公司;兔抗Rab27b多克隆抗体(货号:13412-1-AP)购自中国Proteintech公司;辣根过氧化物酶标记的驴抗小鼠和驴抗兔二抗(免疫印迹用)购自美国Jackson ImmunoResearch Laboratories公司;Alexa Fluor 488或594标记的山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗(免疫荧光用)购自美国Invitrogen公司;ECL显影液购自英国Amersham公司;BCA试剂盒购自美国Thermo Scientific公司。

3. 实验方法:(1)反转录PCR。应用Trizol法提取细胞总RNA(每组小鼠各3~4只),使用反转录试剂盒(全式金,货号:AT-301-03)将1 μ g RNA反转录成cDNA后用定量PCR super mix(全式金,货号:AQ141-P)和实时定量PCR仪(罗氏,瑞士)进行mRNA含量的测定。引物序列见表1。(2)Western blot。收取细胞或者组织样本(每组小鼠各3~4只),加入组织蛋白裂解液,冰上裂解30min后,于4℃、15000 r/min离心15min,吸取上清。取1 μ l进行BCA蛋白定量,根据BCA定量测定结果,取30 μ g样品上样,25mA恒流电泳,120V恒压湿转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。TBST缓冲液配置的5%脱脂奶粉室温封闭30min,加入1%BSA-TBST配置的一抗,4℃过夜。TBST漂洗3次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育60min,经TBST漂洗5次后加入ECL化学发光底物显色。用Image Quant LAS4000化学发光成像分析仪(BD,美国)显影,Image J软件进行灰度值分析,用目的蛋白灰度值与各自内参灰

度值之比进行半定量分析。(3)免疫荧光。麻醉小鼠(每组各3~5只),4%多聚甲醛心脏灌注,取脑后固定24 h,30%蔗糖脱水3 d,OCT包埋后于冰冻切片机切片,片厚10 μm。磷酸缓冲生理盐水(PBS)洗1次,擦干切片组织周围水分后用免疫组化笔圈起组织,0.1%TrionX-100室温孵育30 min,PBS洗2次,每次10 min,1%BSA室温封闭1 h,PBS洗1次,加稀释过的一抗(稀释比例1:100),放置于湿盒内,4℃冰箱过夜。次日PBS洗2次,每次10 min,避光加稀释过的二抗(稀释比例1:500),室温避光孵育1 h,PBS洗5次,每次10 min,使用含有DAPI的抗荧光淬灭封片液封片,荧光显微镜(Nikon A1,日本)观察小鼠大脑皮层和海马区域并拍照。(4)原代星形胶质细胞的提取。取1~3天龄的新生小鼠海马和大脑皮层(每组各20~24只),快速剥离皮层上脑膜与血管膜。用终浓度为0.25%的胰蛋白酶(Gibco,美国)在37℃解离切碎的组织,并用含10%胎牛血清(Gibco,美国)和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基(Gibco,美国)终止解离。1500 r/min离心5 min,将细胞重悬后接种于事先用多聚赖氨酸(Sigma-Aldrich,美国)包被的培养瓶中,放入37℃、5%CO₂的培养箱内进行培养。每2天更换新鲜培养基,培养到第10天,通过震荡从培养液中去除小胶质细胞和少突胶质细胞。解离下层贴壁细胞,离心重悬后将星形胶质细胞种植于经多聚赖氨酸处理过的六孔板中。(5)星形胶质细胞分泌实验。使用含有30 mmol/L KCl的培养液于37℃环境下刺激星形胶质细胞30 min,收集细胞上清和提取细胞蛋白。细胞上清于4℃、15000 r/min离心10 min,吸取上清,弃去细胞碎片。细胞蛋白提取先加入预冷PBS清洗2次后加入RIPA裂解液收集细胞,在冰上进行超声裂解,充分裂解后,于4℃、15000 r/min离心15 min,吸取上清,弃掉沉淀。星形胶质细胞中的致密核心囊泡除分泌BDNF,还分泌谷氨酸等递质调控神经元活性^[9],因此对培养液中的谷氨酸水平进行检测,使用ELISA试剂盒检测BDNF(Promega,美国)及Glutamate

(Biovision,美国),具体步骤按照试剂盒说明书进行操作。

4.统计学方法:采用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计分析。采用Shapiro-Wilk检验对计量资料进行正态性检验,符合正态分布的计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本t检验。计数资料采用频数表示。双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1.野生型小鼠大脑皮层和海马中Rab27a和Rab27b的表达及分布情况:Rab27有Rab27a与Rab27b两种亚型,免疫荧光结果显示两者在野生型小鼠大脑皮层和海马中均有表达,见图1A、1B;野生型小鼠大脑皮层区和海马区Rab27b的荧光强度和mRNA水平均高于Rab27a,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),见图1C、表2。此外,海马区Rab27b荧光强度高于皮层区,差异有统计学意义($P < 0.001$),见图1C、表3。定量PCR结果显示,小鼠大脑皮层区及海马区Rab27b的mRNA表达水平均高于Rab27a,Rab27b在海马中的mRNA表达水平较大脑皮层高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$),见图1D、表2。Western blot结果显示海马区Rab27b蛋白表达水平高于大脑皮层区,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图1E、1F和表3。

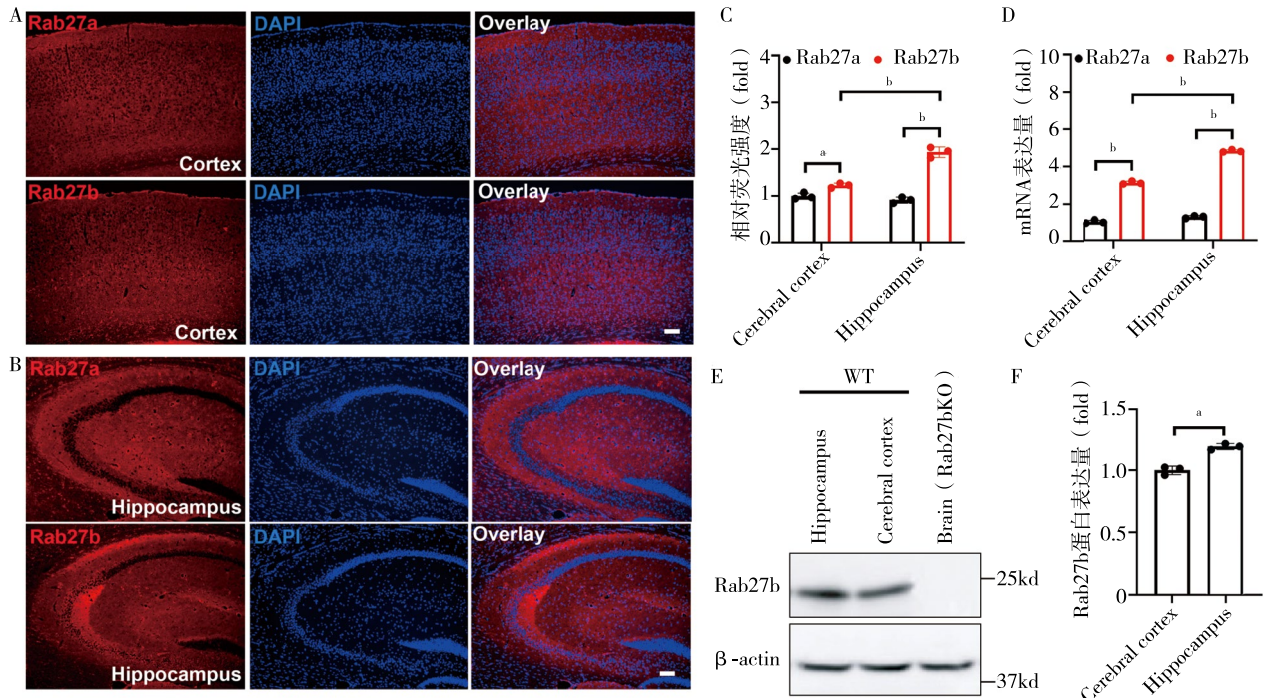
2.野生型小鼠大脑皮层及海马区星形胶质细胞中Rab27b的表达:使用GFAP作为星形胶质细胞的标记分子,免疫荧光结果显示在野生型小鼠大脑皮层区,GFAP表达不明显,见图2A;野生型小鼠大脑海马区中GFAP表达量多且与Rab27b共定位,见图2B、2C。

3. Rab27b基因敲除对小鼠大脑海马区星形胶质细胞BDNF合成和分泌的影响:对小鼠大脑海马区的星形胶质细胞进行逆转录实时定量PCR和Western blot,结果显示基础状态下Rab27b基因敲除小鼠星形胶质细胞内BDNF的mRNA水平和蛋白总量与野生型小鼠比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),

表1 各个引物序列

基因名称	正向引物序列 5' -3'	反向引物序列 5' -3'
GAPDH	GGGTCCCAGCTTAGGTTTCATC	AATCCGTTTCACACCGACCTT
Rab27a	AAGACCAGAGGGCAGTGAAA	ATCCGCTTCATGATCAGGTC
Rab27b	CGGGAAAAACGTGTGGTT	AAGTGCAGATGTACCTTAAACC
BDNF	GACCCCTCTTATCGCTGGGG	AATCCGTTTCACACCGACCTT

注: GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; BDNF 脑源性神经营养因子



注: Cortex 皮质; Hippocampus 海马; Cerebral cortex 大脑皮质; Brain 脑; DAPI 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶; Overlay 合并图; fold倍; WT野生型小鼠组; Rab27bKO *Rab27b* 基因敲除小鼠组; A 为免疫荧光检测 Rab27a 和 Rab27b 在小鼠大脑皮层中的分布情况, 比例尺: 100 μ m; B 为免疫荧光检测 Rab27a 和 Rab27b 在小鼠海马中的分布情况, 比例尺: 100 μ m; C 为 Rab27a 和 Rab27b 在小鼠大脑皮层和海马中的荧光强度分析($n=3$); D 为 Rab27a 和 Rab27b 在小鼠大脑皮层和海马中的 mRNA 表达水平($n=3$); E 为免疫印迹法检测小鼠大脑皮层和海马组织中 Rab27b 蛋白的表达, *Rab27b* 基因敲除小鼠的脑组织蛋白为阴性对照; F 为 Rab27b 在小鼠大脑皮层和海马中的蛋白表达水平分析($n=3$); ^a $P < 0.01$; ^b $P < 0.001$

图1 野生型小鼠大脑皮层区和海马区中 Rab27a 和 Rab27b 的表达及分布情况

表2 野生型小鼠 Rab27a 和 Rab27b 免疫荧光强度和 mRNA 水平表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	相对荧光强度		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	mRNA 表达		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
		Rab27a	Rab27b			Rab27a	Rab27b		
大脑皮层	3	1.000 \pm 0.054	1.226 \pm 0.040	-4.751	0.009	1.000 \pm 0.068	3.093 \pm 0.068	-31.010	< 0.001
海马	3	0.917 \pm 0.053	1.938 \pm 0.093	-13.530	< 0.001	1.260 \pm 0.059	4.802 \pm 0.053	-66.680	< 0.001

表3 野生型小鼠大脑皮层和海马中 Rab27b 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

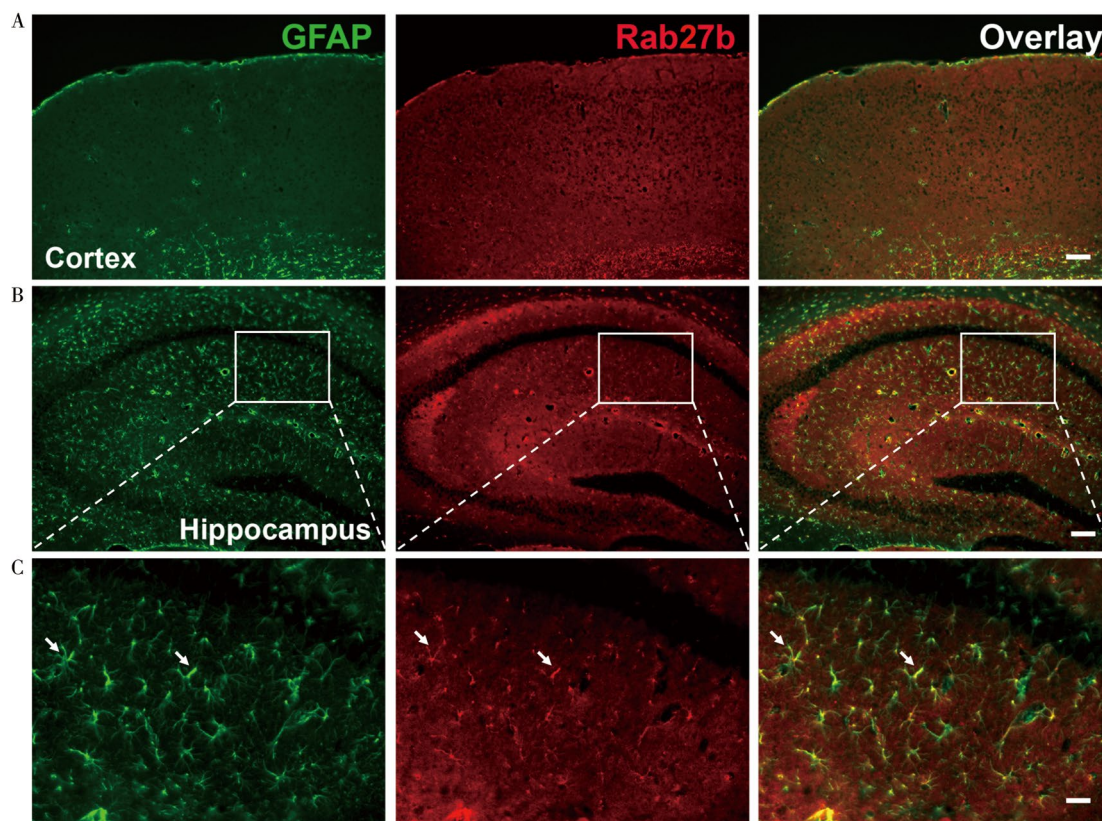
组别	只数	相对荧光强度	mRNA 表达	蛋白表达
大脑皮层	3	1.226 \pm 0.040	3.093 \pm 0.068	1.000 \pm 0.028
海马	3	1.938 \pm 0.093	4.802 \pm 0.053	1.192 \pm 0.019
<i>t</i> 值		-9.977	-28.130	-8.041
<i>P</i> 值		< 0.001	< 0.001	0.001

见图 3A ~ 3C、表 4。将提取的原代小鼠星形胶质细胞培养后进行分泌实验, ELISA 结果显示, 刺激状态下 *Rab27b* 基因敲除小鼠星形胶质细胞 BDNF 分泌少于野生型小鼠, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 3D、表 5; *Rab27b* 基因敲除小鼠星形胶质细胞中的 BDNF 总量与野生型小鼠比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 3E、表 5。ELISA 结果显示

Rab27b 基因敲除小鼠星形胶质细胞培养液中的谷氨酸表达水平与野生型小鼠比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 3F、表 5。

4. *Rab27b* 基因敲除对小鼠大脑海马区 PSD95 和突触素 1 表达的影响: 采用 Western blot 法检测突触可塑性标志分子 PSD95 及突触素 1 表达水平, 结果显示 *Rab27b* 基因敲除小鼠海马中 PSD95 的蛋白表达水平低于野生型小鼠, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见图 4A、4B 和表 6; *Rab27b* 基因敲除小鼠海马中突触素 1 的蛋白表达水平低于野生型小鼠, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见图 4C、4D 和表 6。

讨论 BDNF 参与神经元的生长、分化、修复及突触的形成, 在与认知密切相关的突触可塑性中发挥重要作用^[10-12]。研究显示, BDNF 在多种认知功能障碍患者(如 AD 和亨廷顿舞蹈病等)中表达明显



注: GFAP 神经胶质细胞原纤维酸性蛋白; Cortex 皮质; Hippocampus 海马; Overlay 合并图; A 为免疫荧光检测 Rab27b 及神经胶质细胞原纤维酸性蛋白在野生型小鼠大脑皮层中的分布情况, 比例尺: 100 μm ; B 为免疫荧光检测 Rab27b 及神经胶质细胞原纤维酸性蛋白在野生型小鼠海马中的分布情况, 比例尺: 100 μm ; C 为 B 白框内放大图片, 白色箭头指示共定位的神经胶质细胞原纤维酸性蛋白和 Rab27b, 即表达 Rab27b 的星形胶质细胞, 比例尺: 25 μm

图2 野生型小鼠大脑皮层及海马区 Rab27b 和神经胶质细胞原纤维酸性蛋白的表达

降低, 而增加 BDNF 表达可以改善认知功能^[13-14], 因此 BDNF 被认为是改善认知功能的重要分子。

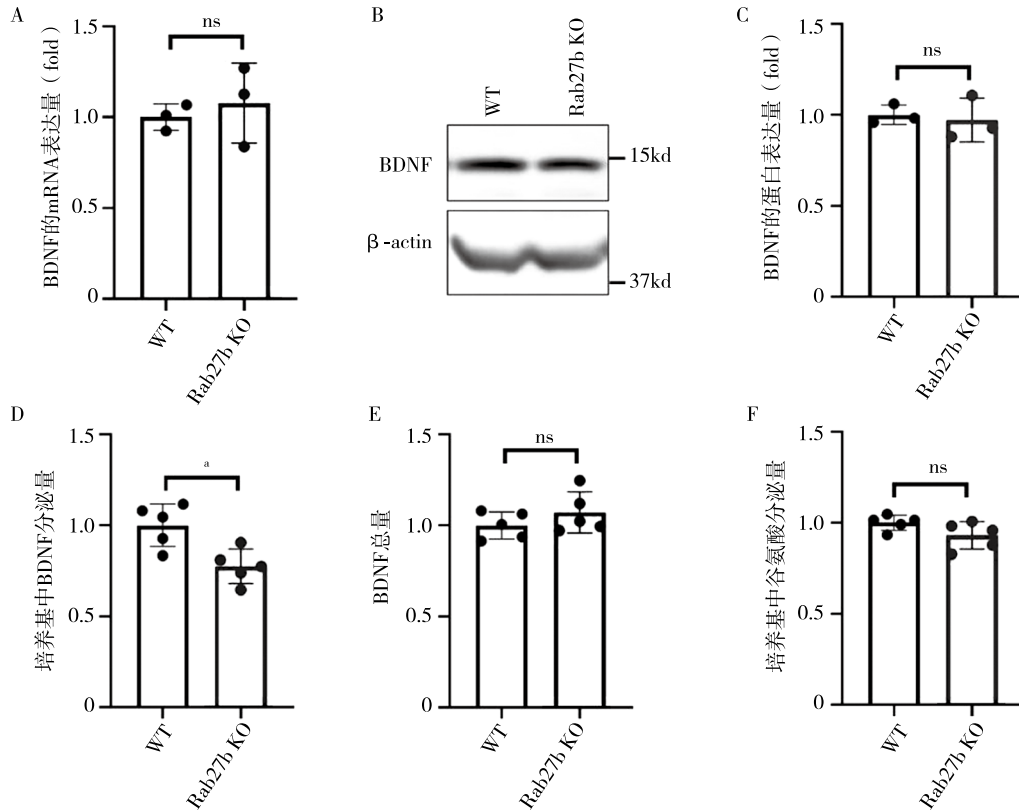
早期研究发现认知功能障碍性疾病患者中神经元细胞分泌 BDNF 减少, 提示神经元细胞释放的 BDNF 可能与认知功能密切相关^[15]。目前研究发现星形胶质细胞通过胞吐作用也可以分泌 BDNF, 支持邻近神经元并调节其功能^[16-18]。

Rab 蛋白介导的神经细胞分泌功能在认知功能中起重要作用。Rab 基因的表达或调控异常可直接或间接引起认知功能障碍相关疾病, 反之认知功能障碍相关疾病亦经常伴随某些 Rab 蛋白的异常表达^[19]。在 AD 患者的海马神经元和基底前脑胆碱能神经元中, 某些 Rab 基因表达水平在疾病进展期间上调, 而 BDNF 及其受体 *TrkB* 基因的表达下调^[20], 提示 Rab 蛋白与认知功能障碍的发生发展密切相关。

Rab27 是 Rab 家族蛋白中的一员, 是神经内分泌细胞中参与囊泡调节性分泌的主要 Rab 蛋白之一。Rab27 分为 Rab27a 与 Rab27b 两个亚型, 广泛分布于内分泌细胞、外分泌细胞和神经细胞等。本研

究结果显示, 在小鼠大脑皮层和海马, Rab27b 的表达高于 Rab27a, 提示 Rab27b 可能起主要作用。进一步研究发现星形胶质细胞主要分布在海马区, 其表达一定量的 Rab27b 并呈散在分布, 且 Rab27b 与星形胶质细胞标记分子 GFAP 共表达, 提示 Rab27b 可能参与调节星形胶质细胞的囊泡分泌功能。

星形胶质细胞中的囊泡分泌属于调节性分泌, 在一定刺激下, 将囊泡内容物(如 BDNF 和谷氨酸)释放到细胞外^[21]。释放的 BDNF 和谷氨酸与神经元相应受体结合, 参与神经元生长、分化和修复。有研究指出, Rab3 功能障碍可减少星形胶质细胞 BDNF 分泌, 而过表达 Rab3 可增加 BDNF 的表达, 表明 Rab3 在调节星形胶质细胞分泌 BDNF 的过程中发挥重要作用^[5]。Rab27 和 Rab3 是同源分子, 通常共同存在于同一神经内分泌细胞中介导分泌囊泡的调节性分泌。如在胰岛 β 细胞中 Rab3 通过其效应物 Rabphilin 和 RIM2 介导胰岛素分泌颗粒的启动和融合^[22-23], 而 Rab27 通过其效应物介导胰岛素囊泡的成熟、转运、锚定和融合, 进而影响胰岛素的分泌^[24-28]。而在中枢



注: BDNF 脑源性神经营养因子; WT 野生型小鼠组; Rab27b KO *Rab27b* 基因敲除小鼠组; fold倍; Astrocyte 星形胶质细胞; A 为逆转录实时定量聚合酶链式反应检测基础状态下两组小鼠星形胶质细胞内脑源性神经营养因子的 mRNA 表达水平($n=3$); B、C 为免疫印迹法检测基础状态下两组小鼠星形胶质细胞内 BDNF 的蛋白表达水平($n=3$); D 为酶联免疫吸附试验检测刺激后两组小鼠星形胶质细胞培养液中的脑源性神经营养因子蛋白表达水平($n=5$); E 为酶联免疫吸附试验检测刺激后两组小鼠星形胶质细胞中的脑源性神经营养因子蛋白表达水平($n=5$); F 为酶联免疫吸附试验检测刺激后星形胶质细胞培养液中的谷氨酸蛋白表达水平($n=5$); * $P < 0.05$; ns 为 $P > 0.05$

图3 *Rab27b* 基因敲除小鼠和野生型小鼠海马区星形胶质细胞脑源性神经营养因子的生成和分泌情况

表4 基础状态下两组海马星形胶质细胞中 BDNF 的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	mRNA 表达	蛋白表达
WT	3	1.000 ± 0.059	1.000 ± 0.044
Rab27b KO	3	1.077 ± 0.180	0.971 ± 0.098
<i>t</i> 值		-0.574	0.379
<i>P</i> 值		0.597	0.724

注: BDNF 脑源性神经营养因子; WT 野生型小鼠组; Rab27b KO *Rab27b* 基因敲除小鼠组

表5 刺激状态下两组海马星形胶质细胞培养液中 BDNF 和谷氨酸的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

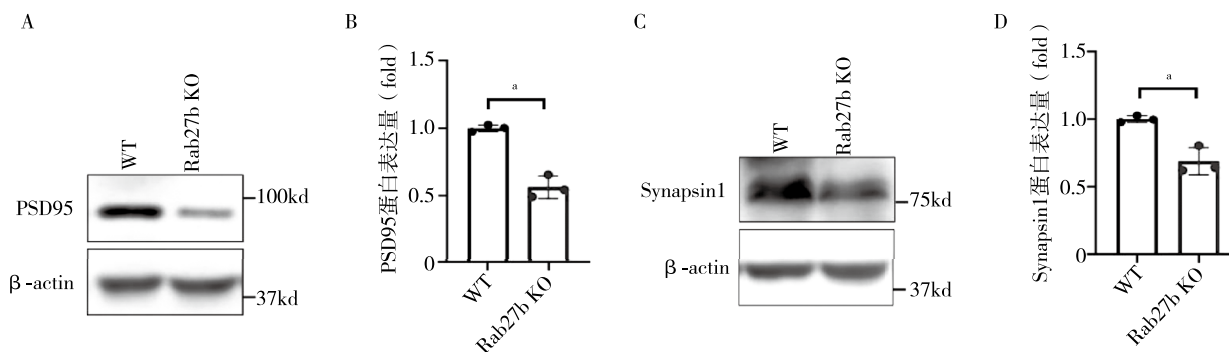
组别	只数	BDNF 分泌	BDNF 总量	谷氨酸分泌
WT	5	1.000 ± 0.105	1.000 ± 0.066	1.000 ± 0.038
Rab27b KO	5	0.775 ± 0.085	1.071 ± 0.102	0.930 ± 0.067
<i>t</i> 值		3.350	-1.175	1.809
<i>P</i> 值		0.010	0.274	0.108

注: BDNF 脑源性神经营养因子; WT 野生型小鼠组; Rab27b KO *Rab27b* 基因敲除小鼠组

神经系统中, Rab3 和 Rab27 作用机制与其在胰岛 β 细胞中类似, 通过其效应物介导神经递质的分泌^[29-32]。本研究结果显示 Rab27b 在星形胶质细胞中高表达, 在 *Rab27b* 基因敲除小鼠海马和皮层的星形胶质细胞中, 虽然 BDNF 总量不变, 但其分泌减少, 而另一神经功能因子谷氨酸的分泌未见明显变化, 提示 Rab27b 可能特异性调节星形胶质细胞 BDNF 的分泌但不改变 BDNF 的合成。

PSD95 和突触素 1 是突触可塑性的标志分子, 而突触可塑性是学习记忆的生物学基础^[33]。本研

究结果显示, *Rab27b* 基因敲除小鼠海马区 PSD95 和突触素 1 的水平降低, 表明 Rab27b 可能影响神经突触可塑性, 进而影响学习记忆。有研究发现在 AD 患者大脑组织中, Rab27b 的蛋白表达水平显著升高, 而 Rab27a 的蛋白表达水平无明显变化, 表明 Rab27b 可能参与调节 AD 的进展^[34]。在 AD 患者大脑中星形胶质细胞会激活^[35-36], 因此推测在 AD 患者大脑中, Rab27b 的表达可能伴随星形胶质细胞增多而代偿性增高, 通过调节小鼠星形胶质细胞 BDNF 的分泌, 营养附近受损伤的神经元细胞, 进而



注: WT 野生型小鼠组; Rab27b KO *Rab27b* 基因敲除小鼠组; Hippocampus 海马; PSD95 突触后致密蛋白 95; fold 倍; Synapsin1 突触素 1; A、B 为免疫印迹法检测两组小鼠海马区 PSD95 的表达($n=3$); C、D 为免疫印迹法检测两组小鼠海马区 Synapsin1 的表达($n=3$); * $P < 0.01$

图 4 *Rab27b* 基因敲除小鼠和野生型小鼠海马区 PSD95 及 Synapsin1 的蛋白表达水平

表 6 两组海马中突触可塑性标志蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	PSD95	突触素 1
WT	3	1.000 ± 0.021	1.000 ± 0.021
Rab27b KO	3	0.563 ± 0.068	0.688 ± 0.082
<i>t</i> 值		8.630	5.217
<i>P</i> 值		< 0.001	0.006

注: WT 野生型小鼠组; Rab27b KO *Rab27b* 基因敲除小鼠组; PSD95 突触后致密蛋白 95

影响突触可塑性和认知功能。

综上所述,本研究初步探讨了 *Rab27b* 对小鼠星形胶质细胞分泌 BDNF 的影响。结果显示 *Rab27b* 在小鼠大脑皮层和海马区与星形胶质细胞共表达,敲除小鼠 *Rab27b* 基因可降低星形胶质细胞 BDNF 的分泌及海马区突触可塑性标志分子 PSD95、突触素 1 的表达水平,提示 *Rab27b* 通过调节小鼠星形胶质细胞 BDNF 的分泌,进而影响突触可塑性。

本研究存在一定的局限性: *Rab27b* 基因敲除对突触可塑性的影响只检测了突触结构可塑性标志分子 PSD95 及突触素 1 的表达,缺少突触功能可塑性(长时程增强)的检测。此外,缺少 *Rab27b* 基因敲除对 AD 模型小鼠学习记忆影响的检测。未来研究将构建星形胶质细胞 *Rab27b* 特异性敲除小鼠,结合 AD 模型小鼠,通过行为学和分子生物学实验检测小鼠的学习记忆能力和神经细胞的突触功能可塑性,深入探讨 *Rab27b* 在星形胶质细胞 BDNF 的分泌和小鼠学习记忆中的作用。本研究结果为 *Rab27b* 作为认知功能障碍的神经营养疗法治的靶点提供了一定的依据,以期临床治疗神经退行性疾病引起的认知功能障碍提供参考。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 实验设计与实施为张月、王昊,论文撰写为张月,论文修订为王昊

参 考 文 献

- [1] Patani R, Hardingham GE, Liddel SA. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration[J]. Nat Rev Neurol, 2023, 19(7): 395-409. DOI: 10.1038/s41582-023-00822-1.
- [2] Benarroch EE. Brain-derived neurotrophic factor: regulation, effects, and potential clinical relevance[J]. Neurology, 2015, 84(16): 1693-1704. DOI: 10.1212/WNL.0000000000001507.
- [3] Fischer von Mollard G, Stahl B, Li C, et al. Rab proteins in regulated exocytosis[J]. Trends Biochem Sci, 1994, 19(4): 164-168. DOI: 10.1016/0968-0004(94)90278-x.
- [4] Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(8): 513-525. DOI: 10.1038/nrm2728.
- [5] Hong Y, Zhao T, Li XJ, et al. Mutant huntingtin impairs BDNF release from astrocytes by disrupting conversion of Rab3a-GTP into Rab3a-GDP[J]. J Neurosci, 2016, 36(34): 8790-8801. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0168-16.2016.
- [6] Fukuda M. Rab27 effectors, pleiotropic regulators in secretory pathways[J]. Traffic, 2013, 14(9): 949-963. DOI: 10.1111/tra.12083.
- [7] Ginsberg SD, Mufson EJ, Alldred MJ, et al. Upregulation of select rab GTPases in cholinergic basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease[J]. J Chem Neuroanat, 2011, 42(2): 102-110. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2011.05.012.
- [8] Underwood R, Wang B, Carico C, et al. The GTPase Rab27b regulates the release, autophagic clearance, and toxicity of α -synuclein[J]. J Biol Chem, 2020, 295(23): 8005-8016. DOI: 10.1074/jbc.RA120.013337.
- [9] de Ceglia R, Ledonne A, Litvin DG, et al. Specialized astrocytes mediate glutamatergic gliotransmission in the CNS[J]. Nature, 2023, 622(7981): 120-129. DOI: 10.1038/s41586-023-06502-w.
- [10] Wang CS, Kavalali ET, Monteggia LM. BDNF signaling in context: from synaptic regulation to psychiatric disorders[J]. Cell, 2022, 185(1): 62-76. DOI: 10.1016/j.cell.2021.12.003.
- [11] von Bohlen Und Halbach O, von Bohlen Und Halbach V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function[J]. Cell Tissue Res, 2018, 373(3): 729-741. DOI: 10.1007/s00441-017-2782-x.

- [12] Bali P, Banik A, Nehru B, et al. Neurotrophic factors mediated activation of astrocytes ameliorate memory loss by amyloid clearance after transplantation of lineage negative stem cells[J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(12): 8420-8434. DOI: 10.1007/s12035-019-01680-z.
- [13] Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, et al. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 76(2): 347-354. DOI: 10.1016/s0169-328x(00)00023-1.
- [14] Giralt A, Carretón O, Lao-Peregrin C, et al. Conditional BDNF release under pathological conditions improves Huntington's disease pathology by delaying neuronal dysfunction[J]. *Mol Neurodegener*, 2011, 6(1): 71. DOI: 10.1186/1750-1326-6-71.
- [15] Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pagès M, et al. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules[J]. *Cell*, 2004, 118(1): 127-138. DOI: 10.1016/j.cell.2004.06.018.
- [16] Miyamoto N, Maki T, Shindo A, et al. Astrocytes promote oligodendrogenesis after white matter damage via brain-derived neurotrophic factor[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(41): 14002-14008. DOI: 10.1523/jneurosci.1592-15.2015.
- [17] Liu JH, Li ZL, Liu YS, et al. Astrocytic GABAB receptors in mouse hippocampus control responses to behavioral challenges through astrocytic BDNF[J]. *Neurosci Bull*, 2020, 36(7): 705-718. DOI: 10.1007/s12264-020-00474-x.
- [18] Quesseveur G, David DJ, Gaillard MC, et al. BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities[J]. *Transl Psychiatry*, 2013, 3(4): e253. DOI: 10.1038/tp.2013.30.
- [19] Kiral FR, Kohrs FE, Jin EJ, et al. Rab GTPases and membrane trafficking in neurodegeneration[J]. *Curr Biol*, 2018, 28(8): R471-R486. DOI: 10.1016/j.cub.2018.02.010.
- [20] Arimura N, Kimura T, Nakamuta S, et al. Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27 [J]. *Dev Cell*, 2009, 16(5): 675-686. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.03.005.
- [21] Verkhratsky A, Matteoli M, Parpura V, et al. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion[J]. *EMBO J*, 2016, 35(3): 239-257. DOI: 10.15252/embj.201592705.
- [22] Arribas M, Regazzi R, Garcia E, et al. The stimulatory effect of rabphilin 3a on regulated exocytosis from insulin-secreting cells does not require an association-dissociation cycle with membranes mediated by Rab3 [J]. *Eur J Cell Biol*, 1997, 74(3): 209-216.
- [23] Yasuda T, Shibasaki T, Minami K, et al. Rim2alpha determines docking and priming states in insulin granule exocytosis[J]. *Cell Metab*, 2010, 12(2): 117-129. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.05.017.
- [24] Wang H, Ishizaki R, Kobayashi E, et al. Loss of granuphilin and loss of syntaxin-1A cause differential effects on insulin granule docking and fusion[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(37): 32244-32250. DOI: 10.1074/jbc.M111.268631.
- [25] Wang H, Ishizaki R, Xu J, et al. The Rab27a effector exophilin7 promotes fusion of secretory granules that have not been docked to the plasma membrane[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(3): 319-330. DOI: 10.1091/mbc.E12-04-0265.
- [26] Wang H, Mizuno K, Takahashi N, et al. Melanophilin Accelerates Insulin Granule Fusion without Predocking to the Plasma Membrane[J]. *Diabetes*, 2020, 69(12): 2655-2666. DOI: 10.2337/db20-0069.
- [27] Fan F, Matsunaga K, Wang H, et al. Exophilin-8 assembles secretory granules for exocytosis in the actin cortex via interaction with RIM-BP2 and myosin-VIIa[J]. *Elife*, 2017, 6: e26174. DOI: 10.7554/eLife.26174.
- [28] Matsunaga K, Taoka M, Isobe T, et al. Rab2a and Rab27a cooperatively regulate the transition from granule maturation to exocytosis through the dual effector Noc2 [J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(3): 541-550. DOI: 10.1242/jcs.195479.
- [29] Geppert M, Bolshakov VY, Siegelbaum SA, et al. The role of Rab3A in neurotransmitter release[J]. *Nature*, 1994, 369(6480): 493-497. DOI: 10.1038/369493a0.
- [30] Arimura N, Kimura T, Nakamuta S, et al. Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27 [J]. *Dev Cell*, 2009, 16(5): 675-686. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.03.005.
- [31] Yu E, Kanno E, Choi S, et al. Role of Rab27 in synaptic transmission at the squid giant synapse[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(41): 16003-16008. DOI: 10.1073/pnas.0804825105.
- [32] Mahoney TR, Liu Q, Itoh T, et al. Regulation of synaptic transmission by RAB-3 and RAB-27 in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(6): 2617-2625. DOI: 10.1091/mbc.e05-12-1170.
- [33] Magee JC, Grienberger C. Synaptic plasticity forms and functions[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2020, 43: 95-117. DOI: 10.1146/annurev-neuro-090919-022842.
- [34] Huang M, Darvas M, Keene CD, et al. Targeted quantitative proteomic approach for high-throughput quantitative profiling of small GTPases in brain tissues of Alzheimer's disease patients[J]. *Anal Chem*, 2019, 91(19): 12307-12314. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b02485.
- [35] Ceyzeriat K, Ben Haim L, Denizot A, et al. Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2018, 6(1): 104. DOI: 10.1186/s40478-018-0606-1.
- [36] Bellaver B, Povala G, Ferreira P, et al. Astrocyte reactivity influences amyloid- β effects on tau pathology in preclinical Alzheimer's disease[J]. *Nat Med*, 2023, 29(7): 1775-1781. DOI: 10.1038/s41591-023-02380-x.

(收稿日期: 2023-10-29)

(本文编辑: 郑圣洁)