

Sirt1对SH-SY5Y细胞突触囊泡蛋白表达的影响

何静 王蓉

100053 北京,首都医科大学宣武医院中心实验室(何静、王蓉); 100053 北京脑重大疾病研究院阿尔茨海默病研究所(王蓉); 100053 北京老年医学研究中心(王蓉)

通信作者:王蓉, Email: rong_wang72@aliyun.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2024.04.003

【摘要】目的 探讨Sirt1对突触囊泡蛋白表达的影响和其在突触前位点的功能。**方法** 采用CRISPRa技术激活SH-SY5Y细胞内源Sirt1表达,通过转染aSirt1质粒将细胞分为aSirt1#1、aSirt1#2、aSirt1#3、aSirt1#NC组并设置空白对照(Mock)组。采用乳酸脱氢酶检测细胞毒性,通过Western blot检测突触囊泡蛋白及自噬相关蛋白表达水平。**结果** aSirt1#1组和aSirt1#3组细胞毒性低于aSirt1#NC组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。aSirt1#1组细胞的Sirt1、突触素、囊泡相关膜蛋白2(VAMP2)、 α -突触核蛋白(α -Syn)表达水平高于Mock组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。aSirt1#1组SH-SY5Y细胞中自噬相关蛋白Atg13、Becln1表达水平高于Mock组,自噬底物SQSTM1表达水平低于Mock组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。aSirt1#1组SH-SY5Y细胞中P-AMPK/AMPK、P-ULK1/ULK1比值高于Mock组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** Sirt1可以通过激活AMPK-ULK1通路的来调节自噬,影响突触囊泡蛋白的表达,有利于突触囊泡循环,影响突触前位点的功能。

【关键词】 自噬; CRISPR转录激活; Sirt1; 突触素

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0108503, 2022YFC2403500)

Effects of Sirt1 on synaptic vesicle protein expression in SH-SY5Y cells He Jing, Wang Rong

Central Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China (He J, Wang R); Institute of Alzheimer's Disease, Beijing Institute of Brain Disorders, Beijing 100053, China (Wang R); Beijing Research Center for Geriatrics, Beijing 100053, China (Wang R)

Corresponding author: Wang Rong, Email: rong_wang72@aliyun.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of Sirt1 on the expression of synaptic vesicle protein and its function at presynaptic sites. **Methods** Endogenous Sirt1 expression in SH-SY5Y cells was activated using CRISPRa technology. The cells were divided into aSirt1 #1, aSirt1#2, aSirt1#3, and aSirt1#NC groups by transfection with aSirt1 plasmid, and a blank control (Mock) group was set up. Lactate dehydrogenase was used to detect cytotoxicity, and Western blot was used to detect the expression levels of synaptic vesicle protein and autophagy related proteins. **Results** The cytotoxicity of the aSirt1#1 and aSirt1#3 groups was lower than that of the aSirt1#NC group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression levels of Sirt1, synaptophysin, vesicle associated membrane protein 2 (VAMP2), and alpha-synuclein (α -Syn) in cells of aSirt1#1 group were higher than those of the Mock group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression levels of autophagy related proteins Atg13 and Becln1 in SH-SY5Y cells of aSirt1#1 group were higher than those in the Mock group, and the expression levels of autophagy substrate SQSTM1 were lower than those in the Mock group, with statistical differences (all $P < 0.05$). The P-AMPK/AMPK and P-ULK1/ULK1 ratio in SH-SY5Y cells of aSirt1#1 group were higher than those in the Mock group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** Sirt1 can regulate autophagy by activating the AMPK-ULK1 pathway, affecting the expression of synaptic vesicle proteins, promoting synaptic vesicle circulation, and affecting the function of presynaptic sites.

【Key words】 Autophagy; CRISPR transcriptional activation; Sirtuin 1; Synaptophysin

Fund programs: National Key Research and Development Plan (2018YFA0108503, 2022YFC2403500)

AD是一种神经退行性疾病,但其确切病因和发病机制仍存在争议,目前尚无预防或逆转AD进展的治疗方法。自噬失调在神经退行性疾病的病因和(或)进展中起着关键作用^[1]。自噬是记忆形成必需的过程,年龄依赖性认知能力下降与自噬减少有关^[2]。自噬对细胞内物质的正常周转较为重要,特别是在神经元等静止细胞中^[3]。在神经元稳态的维持和神经发育中,自噬是调节突触可塑性必需的过程,对突触传递起到了重要作用^[4]。目前,自噬已经在非极化细胞中得到了广泛研究,但其在神经元中的功能,如在突触囊泡循环中的作用仍未明确^[5]。

Sirtuin是高度保守的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)依赖性脱酰化蛋白家族,在代谢途径和细胞应激反应中起着关键作用^[6]。Sirt1是哺乳动物Sirtuin家族蛋白质成员之一,其在细胞核和细胞质之间穿梭,调节线粒体生物发生、氧化应激、细胞凋亡、自噬等多种生物学过程^[7]。Sirt1在衰老过程中通过自噬途径下调^[8],也可以通过多种机制调节自噬。

Sirt1的作用主要与热量限制和白藜芦醇相关,但Sirt1只是热量限制延长寿命的一种机制,白藜芦醇的底物也可能不局限于Sirt1。所以现阶段Sirt1的直接作用机制比较模糊。本研究采用成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)激活(CRISPRa)技术分析Sirt1对突触囊泡蛋白的影响,为了解其作用机制提供参考。

一、材料与方法

(一)材料

1. 细胞培养和处理: SH-SY5Y细胞系由瑞典卡罗琳斯卡研究所的Winblad教授和裴进京博士惠赠。SH-SY5Y细胞放置在含有10%胎牛血清的高糖DMEM培养基(Gibco, 美国)中,于37℃和5%CO₂细胞培养箱中培养。SH-SY5Y细胞每3~4天以1:4的比例传代1次,本研究选取复苏后5~20代的细胞进行实验。

2. 质粒及gRNA: 使用核酸酶缺陷Cas9(dCas9)-SAM多合一的UniSAM质粒载体激活内源性基因的表达^[9]。质粒载体含红色荧光蛋白(mCherry)序列为标签,用于评估转染效果。使用在线工具CRISPOR.org设计aSirt1#1、aSirt1#2及aSirt1#3靶向Sirt1上游启动子区域的gRNA序列^[10],将aSirt1#1的gRNA序列随机打乱,获得乱码序列aSirt1#NC作为阴性对照,见表1。质粒由云舟生物科技(广州)

股份有限公司构建,根据制造商的说明使用质粒小提试剂盒(维诺赞,中国)纯化质粒。将细胞分为aSirt1#1、aSirt1#2、aSirt1#3、aSirt1#NC组并设置空白对照(Mock)组。

表1 靶向Sirt1启动子区域gRNA序列

编号	gRNA序列
aSirt1#1	CCACAACACTACGGGTCACC
aSirt1#2	CTGGTTAAGAACTAACATTA
aSirt1#3	AAGCGGCCGAGGGCGGAATT
aSirt1#NC	GTGTAGTTCGACCATTCTGT

注: NC 阴性对照

(二)方法

1. 细胞转染: 将4×10⁵个细胞接种到6孔板中,细胞汇合度达到70%~80%时使用转染试剂jetOPTIMUS DNA Transfection Reagent®(Polyplus, 法国)转染,转染4h后更换新鲜培养基。固定DNA与转染试剂的比率(W/V)为1:1.5,通过增加质粒DNA浓度(1、3、5 μg质粒DNA)来获得最佳转染效率,转染24h后通过倒置荧光相差显微镜观察细胞形态,并通过mCherry红色荧光来评估转染效率。转染48h后进行后续分析。

2. 蛋白免疫印迹(Western blot)法: 使用RIPA裂解液(普利莱,中国)从细胞中抽提可溶性蛋白,用前补充苯甲基磺酰氟(PMSF)蛋白酶抑制剂(普利莱,中国)和蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Thermo Scientific, 美国)。使用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid)法微量蛋白定量试剂盒(普利莱,中国)进行蛋白质定量。蛋白样本进行变性后,在还原条件下通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(biotides, 中国)分离细胞裂解物。电泳后,通过湿式转膜将蛋白质转移到0.45 μm的PVDF膜上。用溶解在TBST中5%(w/v)的脱脂奶粉或BSA在室温下封闭游离结合位点1h。将一抗稀释在一抗稀释液(碧云天,中国)中,并在4℃下孵育过夜。一抗:Sirt1抗体(1:1000)、β-actin抗体(1:1000)、突触素(synaptophysin, SYP)抗体(1:800)、囊泡相关膜蛋白2(vesicle associated membrane protein 2, VAMP2)抗体(1:1000)、I型囊泡谷氨酸转运蛋白(type I vesicular glutamate transporter, VGluT1)抗体(1:1000)、α-突触核蛋白(alpha-synuclein, α-Syn)抗体(1:800)、AMP依赖蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)抗体(1:1000)、Phospho-AMPK(Thr172)抗

体(1:500)、Unc-51样激酶1(Unc-51-like kinase 1, ULK1)抗体(1:1000)、Phospho-ULK1(Ser555)抗体(1:500)、螯合体1(sequestosome 1, SQSTM1)抗体(1:1000)、自噬相关蛋白13(Autophagy-related protein 13, ATG13)抗体(1:1000)、苜蓿素1(Beclin 1)抗体(1:1000)。TBST洗涤后,用辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗:山羊抗小鼠IgG(1:1000)、山羊抗兔IgG(1:1000),在TBST中稀释后在室温下孵育2h。使用ECL化学发光底物(天能,中国),通过化学发光成像系统(申花科技,中国)对膜进行可视化。

3. 细胞毒性测定:通过乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)细胞毒性检测试剂盒(Yeasen, 中国)测定释放到培养基中的LDH来评估细胞毒性。转染24h后吸去培养液,用PBS液洗涤一次,更换无血清的DMEM培养基。由于转染试剂本身会触发细胞毒性事件,所以加入了含转染试剂的Polyplus组作为转染对照组。设置无细胞的培养液孔(背景对照孔)、未转染的空白对照细胞孔(样品对照孔)、用于后续裂解的空白对照细胞孔(样品最大酶活性对照孔)、仅含转染试剂Polyplus的转染对照细胞孔(Polyplus组)和转染质粒的细胞孔(aSirt1#1、aSirt1#2、aSirt1#3、aSirt1#NC组)。转染48h后,分别取各孔的上清液进行样品测定。分别在各孔中加入60 μ L LDH检测液,混匀后室温(约25 $^{\circ}$ C)避光孵育30min。测定490nm处吸光度,测得的各组吸光度减去背景空白对照孔吸光度。细胞毒性(%)=(处理样品吸光度-样品对照孔吸光度)/(细胞最大酶活性的吸光度-样品对照孔吸光度) \times 100%。

4. 统计学方法:采用SPSS 19.0统计学软件进行数据分析。计数资料采用频数表示。采用Shapiro-Wilk检验正态分布,符合正态分布且方差齐的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,事后两两比较使用LSD-*t*检验。双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 不同aSirt1质粒浓度转染后SH-SY5Y细胞形态:质粒DNA为3 μ g时可获得较好的转染效率,且细胞状态较好。质粒DNA增加至5 μ g时转染效率提高,但细胞状态不佳,折光性变差,胞体失去正常细胞的饱满与光泽。相较于aSirt1#NC,转染aSirt1#1、aSirt1#3后细胞形态更佳。见图1。

2. aSirt1质粒转染SH-SY5Y细胞后Sirt1蛋白表达水平比较:不同浓度aSirt1质粒转染SH-SY5Y

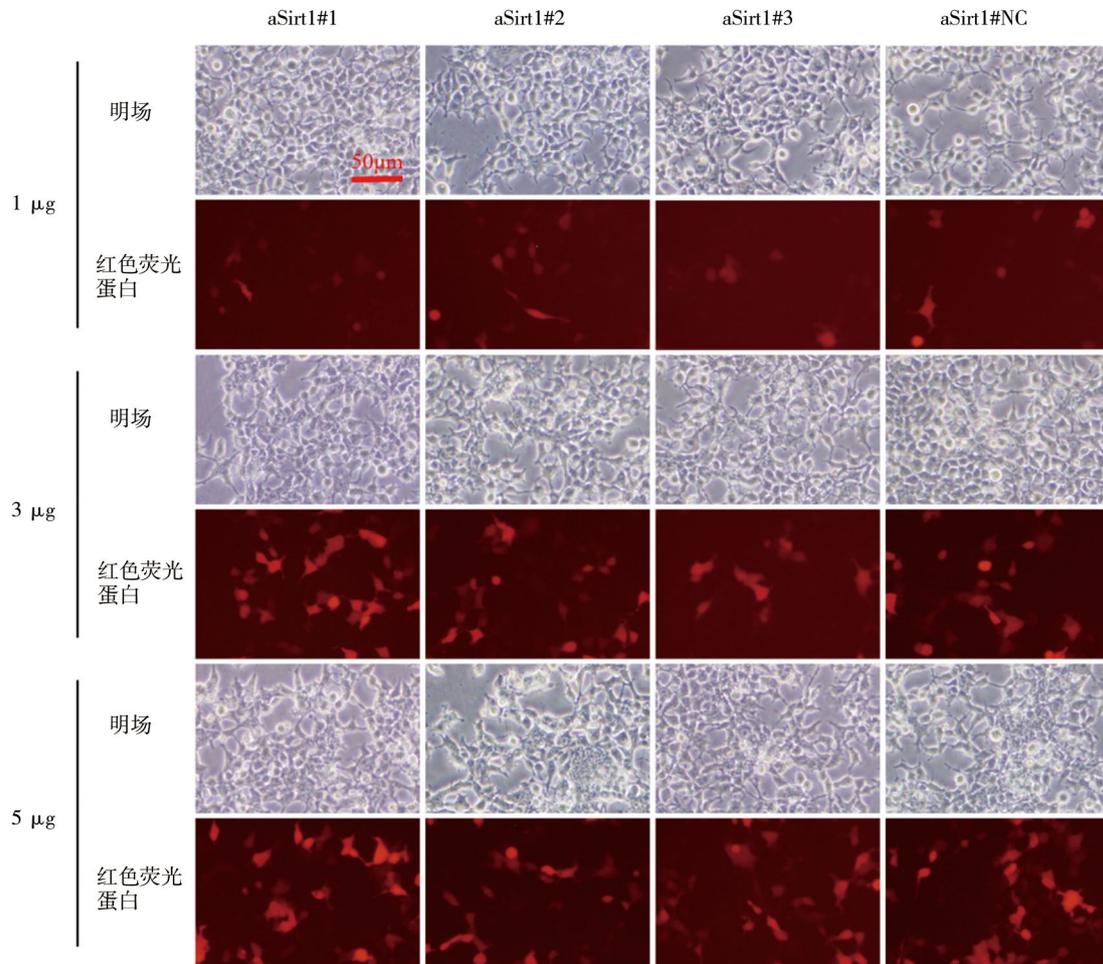
细胞后Sirt1蛋白条带见图2。5组Sirt1蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);aSirt1#1、aSirt1#3组Sirt1蛋白相对表达量高于Mock组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

3. aSirt1质粒转染SH-SY5Y细胞后的细胞毒性比较:不同处理下细胞毒性比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。aSirt1#1组和aSirt1#3组细胞毒性均低于Polyplus组和aSirt1#NC组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表3。aSirt1#1质粒具有更好的表达激活效果,更低的细胞毒性,所以将使用该质粒进行后续实验以探究Sirt1的功能。

4. Sirt1对突触囊泡蛋白表达的调节作用:Mock组、aSirt1#1组、aSirt1#NC组SH-SY5Y细胞的Sirt1、突触囊泡相关蛋白及 β -actin蛋白条带见图3。3组SH-SY5Y细胞的Sirt1表达水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);aSirt1#1组Sirt1、突触素、VAMP2、 α -Syn表达水平高于Mock组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表4。

5. Sirt1对自噬的影响:通过Western blot法检测AMPK在Thr172处和ULK1在Ser555处磷酸化蛋白的表达水平,并计算P-AMPK/AMPK和P-ULK1/ULK1的比值来说明AMPK在Thr172处和ULK1在Ser555处磷酸化水平的变化。Mock组、aSirt1#1组、aSirt1#NC组SH-SY5Y细胞中自噬相关蛋白的表达情况见图4。3组SH-SY5Y细胞中P-AMPK/AMPK和P-ULK1/ULK1比值比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);aSirt1#1组SH-SY5Y细胞中P-AMPK/AMPK、P-ULK1/ULK1比值高于Mock组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。3组SH-SY5Y细胞中Atg13、Beclin1、SQSTM1蛋白相对表达水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);aSirt1#1组SH-SY5Y细胞中Atg13、Beclin1蛋白相对表达水平高于Mock组,SQSTM1蛋白相对表达水平低于Mock组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表5。

讨论 Sirt1在基因组稳定性到能量代谢稳态等基本生物学功能的调节中发挥重要作用。在AD中,上调Sirt1的表达水平具有神经保护作用,而抑制Sirt2表达水平能够改善认知障碍^[11]。但由于哺乳动物Sirtuin家族成员都包含一个保守的催化核心结构域,如Sirt1激活剂白藜芦醇会上调Sirt2表达^[12]。因此有必要特异性调节Sirtuin家族成员。CRISPR-Cas系统具有基因编辑能力。使用dCas9的新技术迭代刺激了各种不同类型的基因工程平台,例如使



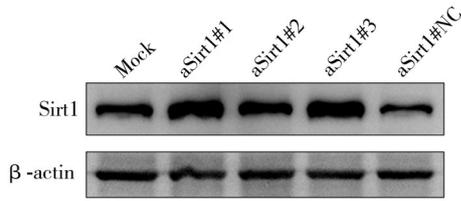
注: 倒置荧光相差显微镜拍摄, 图片放大倍数为200 \times , 比例尺为50 μm ; NC阴性对照

图1 不同浓度aSirt1质粒转染SH-SY5Y细胞形态

用CRISPRa的转录调节^[13]。dCas9允许直接操纵转录过程, 而无须遗传改变DNA序列, 可用于转录水平的基因调控^[14]。CRISPRa可以激活内源性基因表达, 并避免了在标准转基因方法中观察到的异常高水平的基因表达。与多质粒系统相比, 多合一的dCas9-SAM载体UniSam将基因表达激活到相当水平, 但总DNA含量降低导致转染细胞的活力显著提高^[9]。所以本研究通过CRISPRa技术, 基于多合一的dCas9-SAM载体UniSam特异性地激活了内源Sirt1表达。

谷氨酸是CNS中主要的兴奋性神经递质。VGluT1可以将谷氨酸转运到突触囊泡中, 从而控制神经元活动^[15]。本研究结果显示, 激活Sirt1表达后, 对VGluT1的表达无明显影响, 表明Sirt1对神经传递的调节, 可能并不是通过影响转运到囊泡中谷氨酸的量来实现的。VAMP2是可溶性N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体(SNARE)复合物的

关键组成成分, 通过与突触前质膜上的同源SNARE伴侣相互作用来驱动突触囊泡融合, 介导神经递质的释放^[16]。突触素在突触囊泡循环中起作用, 介导海马神经元中突触囊泡的融合后恢复, 如有效检索回收VAMP2^[17]。本研究结果显示, 激活Sirt1表达后, 能够上调突触素和VAMP2的表达, 所以认为Sirt1具有调控突触囊泡循环的潜力。 α -Syn在正常生理状态下也参与突触囊泡循环的调节, 但其过表达和异常聚集与许多神经退行性疾病有关^[18]。本研究结果显示, 激活Sirt1表达后, α -Syn的表达下调。由于 α -Syn细胞内降解的主要途径之一是自噬, 而Sirt1可以诱导自噬。本研究结果显示, 激活Sirt1表达后, AMPK在Thr172处的磷酸化水平和ULK1在Ser555处的磷酸化水平呈上调趋势, 自噬相关蛋白Atg13、Becln1表达水平上调, 自噬底物SQSTM1表达水平下降。AMPK通过直接物理相互作用激活ULK1和多个位点的磷酸化, 包括Ser555,



注: Mock 空白对照; NC 阴性对照

图2 aSirt1质粒转染SH-SY5Y细胞后对Sirt1表达水平的影响

表2 不同aSirt1质粒转染SH-SY5Y细胞后Sirt1蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Sirt1 蛋白相对表达量
Mock 组	1.000 ± 0.144
aSirt1#1 组	1.535 ± 0.251 ^a
aSirt1#2 组	1.209 ± 0.351
aSirt1#3 组	1.366 ± 0.247 ^a
aSirt1#NC 组	1.019 ± 0.189
F 值	5.184
P 值	0.004

注: ^a与Mock组比较, $P < 0.05$; Mock 空白对照; NC 阴性对照

表3 aSirt1质粒转染SH-SY5Y细胞后LDH检测细胞毒性比较($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞毒性
aSirt1#NC 组	0.463 ± 0.109
aSirt1#1 组	0.189 ± 0.100 ^{ab}
aSirt1#2 组	0.341 ± 0.103
aSirt1#3 组	0.218 ± 0.044 ^{ab}
Polyplus 组	0.407 ± 0.114
F 值	5.867
P 值	0.005

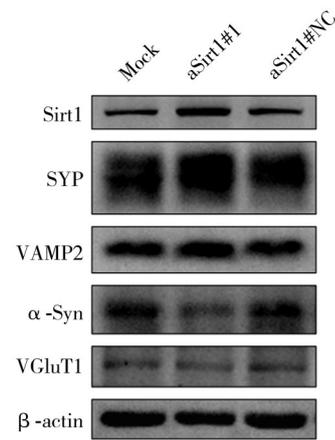
注: ^a与Polyplus组比较, $P < 0.05$; ^b与aSirt1#NC组比较, $P < 0.01$; LDH 乳酸脱氢酶; NC 阴性对照

对ULK1的激活和自噬的诱导起重要作用^[19]。自噬底物SQSTM1是一种经典的选择性自噬受体,选择性自噬是维持蛋白稳态的重要过程^[20]。在诱导自噬时可以观察到SQSTM1水平降低,可用作研究自噬通量的标志物^[21]。以上结果表明激活Sirt1表达

表4 3组SH-SY5Y细胞的Sirt1、突触囊泡相关蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Sirt1	突触素	VAMP2	α -Syn	VGluT1
Mock 组	1.000 ± 0.156	1.000 ± 0.035	1.000 ± 0.070	1.000 ± 0.095	1.000 ± 0.243
aSirt1#1 组	2.089 ± 0.270 ^a	1.622 ± 0.368 ^a	1.223 ± 0.111 ^a	0.673 ± 0.243 ^a	0.838 ± 0.088
aSirt1#NC 组	1.301 ± 0.174	1.005 ± 0.219	0.892 ± 0.063	1.138 ± 0.089	0.879 ± 0.370
F 值	22.372	6.226	12.047	6.782	0.314
P 值	0.002	0.034	0.008	0.029	0.742

注: ^a与Mock组比较, $P < 0.05$; Mock 空白对照; NC 阴性对照; VAMP2 囊泡相关膜蛋白2; α -Syn α -突触核蛋白; VGluT1 I型囊泡谷氨酸转运蛋白



注: SYP 突触素; VAMP2 囊泡相关膜蛋白2; α -Syn α -突触核蛋白; VGluT1 I型囊泡谷氨酸转运蛋白; Mock 空白对照; NC 阴性对照

图3 Mock组、aSirt1#1组、aSirt1#NC组SH-SY5Y细胞的Sirt1、突触囊泡相关蛋白表达情况

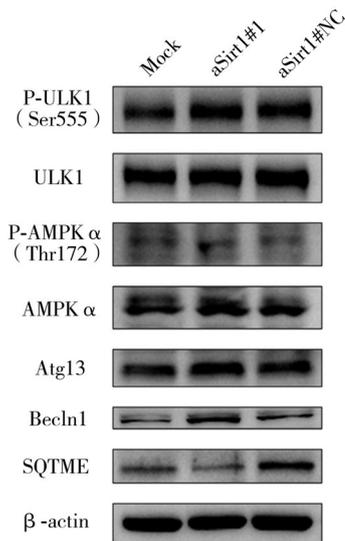
后,可以通过AMPK-ULK1通路的激活来调节自噬。因此, Sirt1可能通过调节突触囊泡蛋白突触素和VAMP2的表达,调控突触囊泡循环,从而影响突触前位点的功能。并且Sirt1还可以通过激活自噬,调节 α -Syn的表达水平,维持突触蛋白稳态。

自噬和突触囊泡运输不仅在功能上存在相互依赖性^[22],在分子机制上也存在联系,内质网、高尔基体和内体是ATG和突触囊泡的来源。相关研究发现Atg9运输可以作为突触活动的“传感器”,将神经元的活动状态与突触处的自噬体生物发生联系起来^[23]。本研究结果显示,激活Sirt1表达后,Atg13和Beclin1表达水平上调,表明Atg13和Beclin1也可能在自噬和突触囊泡运输的分子机制中具有潜在作用。Atg13与ULK1(或其同源物ULK2)、RB1CC1/FIP200和Atg101结合形成ULK1复合物,启动自噬体的生物发生,但其也具有独立于ULK1/2的额外功能^[24]。既往研究表明,Atg13可以组织自噬前结构(pre-autophagosomal structure, PAS)的形成,募集Atg9囊泡,参与Atg9/ATG9A的运输和定位^[25]。PAS是Atg蛋白的液体状

表 5 3 组 SH-SY5Y 细胞的自噬相关蛋白磷酸化水平及相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	P-AMPK/AMPK	P-ULK1/ULK1	Atg13	Beclin1	SQSTM1
Mock 组	1.000 ± 0.206	1.000 ± 0.205	1.000 ± 0.121	1.000 ± 0.106	1.000 ± 0.212
aSirt1#1 组	1.403 ± 0.259 ^a	1.516 ± 0.162 ^a	1.587 ± 0.542 ^a	1.570 ± 0.433 ^a	0.686 ± 0.102 ^a
aSirt1#NC 组	1.027 ± 0.151	1.148 ± 0.031	0.955 ± 0.181	1.087 ± 0.186	0.997 ± 0.033
F 值	4.583	9.186	4.375	4.848	5.196
P 值	0.042	0.015	0.047	0.037	0.049

注：^a与 Mock 组比较， $P < 0.05$ ；Mock 空白对照；NC 阴性对照；AMPK AMP 依赖的蛋白激酶；ULK1 UNC-51 样激酶 1；Atg13 自噬相关 13；Beclin1 苯氯素 1；SQSTM1 整合体 1



注：Mock 空白对照；NC 阴性对照

图 4 Mock 组、aSirt1#1 组、aSirt1#NC 组 SH-SY5Y 细胞的自噬相关蛋白表达情况

缩合物，被认为是自噬机制的核心驱动因素，其产生的流动性类似于突触处囊泡的液相突触蛋白簇^[26]。目前，尚无研究明确 Beclin1 与突触囊泡运输间具体的分子机制。但有研究发现 Beclin1 蛋白缺失的转基因小鼠的新皮层和海马体中谷氨酸能的下调、GABA 能突触电流的上调以及长期可塑性的损害，表明 Beclin1 参与的自噬通路对突触传递以及突触可塑性有影响^[4]。

本研究存在一定的局限性：本研究仅讨论了 Atg13 和 Beclin1 与 Atg9 运输相关，有将自噬体生物发生和突触囊泡运输联系起来的潜力。此外，本研究只在细胞系中进行了实验，与疾病的关联比较薄弱。未来可进一步验证 Atg13 和 Beclin1 在自噬体生物发生和突触囊泡运输中的作用，并增加疾病动物模型进行验证。

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 研究构思与设计为何静、王蓉，研究实施、数据整理与分析为何静，论文修订、审校为王蓉

参 考 文 献

- [1] Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders[J]. Prog Neurobiol, 2014, 112: 24-49. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.004.
- [2] Glatigny M, Moriceau S, Rivagorda M, et al. Autophagy is required for memory formation and reverses age-related memory decline[J]. Curr Biol, 2019, 29(3): 435-448, e8. DOI: 10.1016/j.cub.2018.12.021.
- [3] Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice[J]. Nature, 2006, 441(7095): 885-889. DOI: 10.1038/nature04724.
- [4] Lalo U, Nezis IP, Pankratov Y. Impact of autophagy impairment on experience- and diet-related synaptic plasticity[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9228. DOI: 10.3390/ijms23169228.
- [5] Andres-Alonso M, Kreutz MR, Karpova A. Autophagy and the endolysosomal system in presynaptic function[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(6): 2621-2639. DOI: 10.1007/s00018-020-03722-5.
- [6] Chang HC, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2014, 25(3): 138-145. DOI: 10.1016/j.tem.2013.12.001.
- [7] Yang Y, Liu Y, Wang Y, et al. Regulation of SIRT1 and its roles in inflammation[J]. Front Immunol, 2022, 13: 831168. DOI: 10.3389/fimmu.2022.831168.
- [8] Xu C, Wang L, Fozouni P, et al. SIRT1 is downregulated by autophagy in senescence and ageing[J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(10): 1170-1179. DOI: 10.1038/s41556-020-00579-5.
- [9] Fidanza A, Lopez-Yrigoyen M, Romanò N, et al. An all-in-one UniSam vector system for efficient gene activation[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6394. DOI: 10.1038/s41598-017-06468-6.
- [10] Concordet JP, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(W1): W242-W245. DOI: 10.1093/nar/gky354.
- [11] Bai N, Li N, Cheng R, et al. Inhibition of SIRT2 promotes APP acetylation and ameliorates cognitive impairment in APP/PS1 transgenic mice[J]. Cell Rep, 2022, 40(2): 111062. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111062.
- [12] Liang A, Huang L, Liu H, et al. Resveratrol improves follicular development of PCOS rats by regulating the glycolytic pathway[J]. Mol Nutr Food Res, 2021, 65(24): e2100457. DOI: 10.1002/mnfr.202100457.
- [13] Bendixen L, Jensen TI, Bak RO. CRISPR-Cas-mediated transcriptional modulation: The therapeutic promises of CRISPRa and CRISPRi[J]. Mol Ther, 2023, 31(7): 1920-1937. DOI: 10.1016/j.ymthe.2023.03.024.

[14] Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(1): 5-15. DOI: 10.1038/nrm.2015.2.

[15] Du X, Li J, Li M, et al. Research progress on the role of type I vesicular glutamate transporter (VGLUT1) in nervous system diseases[J]. Cell Biosci, 2020, 10: 26. DOI: 10.1186/s13578-020-00393-4.

[16] Yan C, Jiang J, Yang Y, et al. The function of VAMP2 in mediating membrane fusion: an overview[J]. Front Mol Neurosci, 2022, 15: 948160. DOI: 10.3389/fnmol.2022.948160.

[17] Cousin MA. Synaptophysin-dependent synaptobrevin-2 trafficking at the presynapse-mechanism and function[J]. J Neurochem, 2021, 159(1): 78-89. DOI: 10.1111/jnc.15499.

[18] Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The function of α -synuclein[J]. Neuron, 2013, 79(6): 1044-1066. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.09.004.

[18] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(2): 132-141. DOI: 10.1038/ncb2152.

[19] Kumsta C, Chang JT, Lee R, et al. The autophagy receptor p62/SQST-1 promotes proteostasis and longevity in *C. elegans* by inducing autophagy[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5648. DOI: 10.1038/s41467-019-13540-4.

[21] Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, et al. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1 [J]. Methods Enzymol, 2009, 452: 181-197. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)03612-4.

[22] Limanaqi F, Biagioni F, Gambardella S, et al. Interdependency between autophagy and synaptic vesicle trafficking: implications for dopamine release[J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 299. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00299.

[23] Yang S, Park D, Manning L, et al. Presynaptic autophagy is coupled to the synaptic vesicle cycle via ATG-9 [J]. Neuron, 2022, 110(5): 824-840, e10. DOI: 10.1016/j.neuron.2021.12.031.

[24] Alers S, Löffler AS, Paasch F, et al. Atg13 and FIP200 act independently of Ulk1 and Ulk2 in autophagy induction[J]. Autophagy, 2011, 7(12): 1423-1433. DOI: 10.4161/autophagy.7.12.18027.

[25] Yamamoto H, Fujioka Y, Suzuki SW, et al. The intrinsically disordered protein Atg13 mediates supramolecular assembly of autophagy initiation complexes[J]. Dev Cell, 2016, 38(1): 86-99. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.06.015.

[26] Fujioka Y, Alam JM, Noshiro D, et al. Phase separation organizes the site of autophagosome formation[J]. Nature, 2020, 578(7794): 301-305. DOI: 10.1038/s41586-020-1977-6.

(收稿日期: 2024-01-03)
(本文编辑: 郑圣洁)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊文稿中缩略语的书写要求

在本刊发表的学术论文中,已被公知公认的缩略语在正文中可以不加注释直接使用(表1);不常用的和尚未被公知公认的缩略语以及原词过长、在文中多次出现者,若为中文可于文中第1次出现时写明全称,在圆括号内写出缩略语,如:流行性脑脊髓膜炎(流脑);若为外文可于文中第1次出现时写出中文全称,在圆括号内写出外文全称及其缩略语,如:阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)。若该缩略语已经公知,也可不注出其英文全称。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语,以免影响论文的可读性。西文缩略语不得拆开转行。

表1 《神经疾病与精神卫生》杂志常用缩略语

缩略语	中文全称	缩略语	中文全称	缩略语	中文全称
CNS	中枢神经系统	AD	老年痴呆症(阿尔茨海默病)	GABA	γ -氨基丁酸
IL	白细胞介素	CT	电子计算机体层扫描	PD	帕金森病
MRI	磁共振成像	BDNF	脑源性神经营养因子	DSA	数字减影血管造影
PCR	聚合酶链式反应	ELISA	酶联免疫吸附剂测定	PET	正电子发射计算机断层显像
SOD	超氧化物歧化酶	NIHSS	美国国立卫生研究院卒中评分	CRP	C反应蛋白
MMSE	简易精神状态检查	WHO	世界卫生组织	TIA	短暂性脑缺血发作
TNF	肿瘤坏死因子	PANSS	阳性与阴性症状量表	HAMD	汉密尔顿抑郁量表
HAMA	汉密尔顿焦虑量表	SSRIs	选择性5-羟色胺再摄取抑制剂	rTMS	重复经颅磁刺激
5-HT	5-羟色胺	ICD-10	国际疾病分类第十版	MoCA	蒙特利尔认知评估量表
PTSD	创伤后应激障碍	CCMD	中国精神障碍分类与诊断标准	DSM	美国精神障碍诊断与统计手册