

α -Synuclein 蛋白过表达对小鼠纹状体的影响

段晋燕, 刘可夫, 张永谦, 张彦彦, 庆宏, 邓玉林

北京理工大学生命学院, 北京 100081

摘要 帕金森病是世界第二大老年神经退行性疾病, 致病机理极为复杂。 α -synuclein(α -syn)是帕金森病主要病理特征的路易小体的主要组成成分, 其突变基因 α -syn A30P 也与部分家族性帕金森相关。通过对过表达野生型人源 α -syn WT 及其突变体 α -syn A30P 蛋白的转基因小鼠的行为学检验、脑部纹状体中氧化应激水平以及儿茶酚胺异喹啉物质水平的检测, 研究过表达 α -syn 蛋白对小鼠纹状体产生的影响。结果显示转基因小鼠模型与正常鼠相比, 其协调能力明显下降, 纹状体与全脑的比例显著降低。同时, 模型鼠脑中的氧化应激水平与儿茶酚胺异喹啉物质的表达水平均显著升高。研究结果说明, α -syn 蛋白及其突变体的过表达会引起小鼠脑部纹状体中氧化应激水平与儿茶酚胺异喹啉物质表达水平的升高, 从而导致纹状体组织严重损伤。

关键词 帕金森病; α -synuclein 蛋白; 纹状体; 氧化应激; 儿茶酚胺异喹啉类物质

中图分类号 R741.02

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.07.002

Effects of α -Synuclein Protein Overexpression on Mice Striatum

DUAN Jinyan, LIU Kefu, ZHANG Yongqian, ZHANG Yanyan, QING Hong, DENG Yulin

School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

Abstract Parkinson's disease (PD) is a common progressive neurodegenerative syndrome. The α -synuclein (α -syn) is a major protein constituent of Lewy bodies, and the α -syn A30P mutant causes familial autosomal dominant PD. In the present study, we explored the effect of α -syn overexpression and its mutant α -syn A30P on mice striatum. The behavior of PDGF-h α -synuclein^{WT} and PDGF-h α -synuclein^{A30P} transgenic mice was investigated, and the oxidative stress levels and the concentration of catecholamine isoquinolines (CAIQs) were determined in transgenic mice striatum, respectively. Compared to the control group, the coordination abilities of the two types of transgenic mice decreased. In addition, the level of oxidative stress and the concentration of CAIQs significantly increased in the overexpression of α -syn WT and α -syn A30P mice striatum. Thus, it is concluded that overexpression of α -syn and its mutant α -syn A30P exhibit impairment in the striatum through increasing the level of oxidative stress and CAIQs.

Keywords Parkinson's disease; α -synuclein; striatum; oxidative stress; catecholamine isoquinolines

帕金森病(Parkinson's disease, PD)自1817年首次报道以来, 越来越受到关注。该病是仅次于阿兹海默病(Alzheimer's disease, AD)的世界第二大中老年慢性神经退行性疾病^[1]。据统计, 分别有超过1%的年龄在65岁以上和4%的年龄在85岁以上的老年人患有此病^[2]。鉴于其发病率在世界范围内与日俱增, 对PD致病机理的研究显得日益迫切。

α -Synuclein (α -syn)蛋白是PD的主要病理特征之一路易小体(Lewy body)的主要组成成分。 α -syn 基因也是最早发现的与PD致病相关的基因之一, 且该基因的突变也与一些家族性PD有关^[3-5]。虽然科研人员对 α -syn 蛋白的PD致病机理已进行了体外实验、细胞实验、动物实验等大量研究, 得到了一系列该蛋白参与PD发病过程的证据, 但其完整的致病

收稿日期: 2013-08-26; 修回日期: 2013-12-09

基金项目: 国家科技重大专项(2012YQ040140)

作者简介: 段晋燕, 博士, 研究方向为神经生物学, 电子邮箱: cathyduanjinyan@126.com; 邓玉林(通信作者), 教授, 研究方向为神经生物学, 电子邮箱: deng@bit.edu.cn

引用格式: 段晋燕, 刘可夫, 张永谦, 等. α -Synuclein 蛋白过表达对小鼠纹状体的影响[J]. 科技导报, 2014, 32(7): 22-26.

机理仍未能得到有效的阐明^[6-8]。

与细胞等体外模型相比,动物模型在对疾病的发生机制,诊断及治疗的研究方面,起着十分重要甚至是不可或缺的作用。就PD而言,该疾病是一种和年龄紧密相关的疾病,其发生、发展进程具有很强的时间依赖性。它的两个主要的病理特征——多巴胺能神经元的特异性死亡以及路易小体的形成,都是PD的致病机制长期作用的结果^[9]。利用转基因技术构建PD动物模型的优势在于它可以通过对于PD相关基因的敲除或过表达模拟PD的发生。不但可以从整体上分析和研究目标基因对动物病症产生的影响,更可以深入到组织水平或者分子水平,为PD的发病机制、药物筛选生物标志物提供很好的研究平台。由于转基因动物具有发育过程,在模型建立后具备一定的时间和空间性,能够对动物发育过程中伴随产生的PD发生过程进行跟踪,检测动物的行为改变,更好地了解PD的发生和发展。

本研究利用过表达野生型人源 α -syn WT和突变型 α -syn A30P蛋白的C57BL/6J小鼠为PD模型,进一步探索 α -syn蛋白与PD之间的关系。该模型的造模原理是利用高表达的 α -syn蛋白,在纹状体中长时间表达积累后使小鼠产生PD病状,因此需要较长的生长时间,一般为7月龄以上。通过对这2种转基因小鼠纹状体氧化应激水平以及生物源性毒素儿茶酚胺类物质的含量变化进行检测,力求进一步揭示 α -syn蛋白的致病机理,为阐明PD的发病机制提供实验依据。

1 实验设计

常用的PD动物模型主要分为PD灵长类模型和PD鼠模型。由于灵长类动物来源少,价格贵,饲养条件要求高,实验消耗大,不适用于处于初期阶段的实验研究。实验用鼠能够实现造模需要,很好的模拟PD症状,其获得途径相对简单,费用较小,是研究PD的主要动物模型手段之一。

PD鼠模型的建立方法主要有6-OHDA损毁大鼠黑质模型、MPTP注射诱导PD鼠模型和转基因PD模型鼠3类^[10,11]。前两者都是利用化学物质造成实验用鼠的黑质区神经元死亡,使实验用鼠表现出PD的临床和病理特征,如:协调能力下降、自主活动减少,黑质区多巴胺羟化酶减少等。这类PD模型的建立可以在一定程度上模拟PD的发生和发展,对PD的研究起到了重要的作用,但是这两种方法都是模拟环境因素诱发PD的过程,而无法解释遗传因素导致PD的发病机制。转基因模型鼠则是过表达或敲除与PD相关的基因,使小鼠在生长过程中表现出PD症状,此类造模方法耗时较前两类时间长,常用于研究模型鼠在病程中的相关变化^[11]。本文主要报道 α -syn的PD致病机理。 α -syn A30P是 α -syn的常见突变蛋白之一,有一定代表性^[12]。因此,本研究选用过表达野生型人源 α -syn WT和突变型 α -syn A30P蛋白的C57BL/6J小鼠为PD模型。

PD的发病机制除与遗传因素有关外,还与环境因素有关,

更可能是两者共同作用的结果^[13,14]。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)是公认的PD致病性神经毒素之一,由于人们日常生活中能够接触到该物质的机会较小,因此寻找内源性的MPTP结构类似物是研究PD致病机理的一个热点领域。儿茶酚异喹啉类物质是多巴胺(dopamine, DA)与活性醛合成的产物,是外源性神经毒素MPTP的结构类似物。同时研究发现,在PD病人脑中存在salsolino(Sal)及它的氮甲基化产物N-methyl salsolinol(NMSal)这两种儿茶酚异喹啉类物质^[15,16],因此儿茶酚异喹啉类物质被认为是最有可能导致PD的一类内源性神经毒素。许多研究表明, α -syn的过量表达会引起线粒体损伤,使细胞发生氧化应激反应^[17]产生活性醛,而Sal恰恰是DA与活性醛合成产物。因此,研究 α -syn是否会引起Sal和NMSal在纹状体内表达水平的升高,是探索PD致病机理,联接遗传因素和环境因素的桥梁。

基于以上原因,本研究围绕 α -syn过表达、氧化应激与Sal和NMSal之间的关系展开。由于过氧化氢(H_2O_2)和丙二醛(malonaldehyde, MDA)是两个具有代表性的氧化应激产物,实验中通过检测MDA和 H_2O_2 含量反映氧化应激的水平。先对转基因鼠进行行为学及脑部纹状体损伤检测,确认造模成功,随后检测 H_2O_2 和MDA表达水平的变化,再对纹状体中Sal和NMSal进行检测,研究 α -syn的过表达是否能引起神经源性毒素Sal和NMSal生成量的增加。

2 材料与方法

2.1 实验动物

C57BL/6J-TgN小鼠,16只;6J-TgN(α -synWT)ZLFILAS PD模型鼠,14只;L/6J-TgN(α -synA30P)ZLFILAS PD模型鼠14只,雌雄各半。购自中国医学科学院实验动物研究所,卫生部人类疾病比较医学重点实验室。

2.2 试剂

H_2O_2 、MDA试剂盒,南京建成生物工程研究所。

甲酸铵、氯化钠及30% H_2O_2 均为分析纯,北京化学试剂公司;甲酸为色谱纯,购自迪马科技有限公司;甲醇为色谱纯,购自美国Fisher公司;实验用水为Milli-Q纯水系统所制三蒸水。

2.3 主要设备

Discovery[®]HS F5五氟苯基柱,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;大小鼠转棒仪DXP-3,中国医学科学院药物研究所;Centrifuge 5417R高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;Agilent1290高效液相色谱,Agilent6460三重四级杆质谱,安捷伦科技(中国)有限公司。

2.4 实验步骤

2.4.1 小鼠的饲养

饲养条件:按照小鼠类型、雌雄分笼培养。饲养密度 \leq 5只/笼,温度为18~21 $^{\circ}C$,湿度 $>$ 40%,自然光照,自由摄食与进水。

2.4.2 转棒实验

转棒(rota rod)实验是对小鼠协调能力检测常用的一种实验方法。实验前,先对每只小鼠训练5 min,使其适应转棒仪,休息后即进行实验。转棒仪转速为15 r/min,以老鼠自然掉下转棒仪的时间为计时终点。每只老鼠进行3次实验,取平均值作为该小鼠实验结果,并用SPSS软件分析处理数据,分别对7月、9月、11月龄小鼠进行测试。

2.4.3 小鼠组织器官的获得

将小鼠称重后用无水乙醚将小鼠深度麻醉,剪开胸腔,进行心脏灌流,待血液完全排出,断头取脑,称重后,取出纹状体,再次称重后,放入1.5 mL离心管中,液氮速冻,备用。同时,分别取得小鼠心、肝、脾、肺和肾进行称重,并用锡箔纸包裹,液氮速冻。

2.4.4 小鼠纹状体内H₂O₂和MDA含量的检测

取出纹状体称重后,按1 mg纹状体加入10 mL生理盐水的比例加入生理盐水,随后置于组织研磨器中,在冰上进行研磨,破碎时间为2 min。将所得组织匀浆液于17000 r/min、4℃离心30 min,取上清测定蛋白浓度后用试剂盒进行H₂O₂和MDA的含量进行检测。

2.4.5 纹状体内Sal和NMSal含量的检测

取出纹状体并称重后,按1 mg纹状体加入10 mL溶剂的比例,加入100 μg/L 3,4-二羟基苯甲胺(3,4-dihydroxybenzylamine, DHBA)的生理盐水,按上述方法将组织匀浆,离心获得上清,加入30 μL高氯酸溶液,混匀,于4℃放置30 min,充分沉淀蛋白,再用17000 r/min,4℃离心30 min,取上清,用0.22 μm水系滤膜过滤,置于HPLC进样瓶中,放于-80℃待测。

检测过程使用的色谱条件为Discovery®HS F5柱(150 mm×2.1 mm, 3 μm);流动相为5 mmol/L 甲酸铵缓冲溶液(pH=3.0)-甲醇(80:20, 体积比);流速:0.15 mL/min;进样量5 μL。质谱条件采用电喷雾电离正离子源(ESI+),多反应检测(MRM)模式监测反应质荷比(*m/z*): 123→51 (DHBA), 180→117 (Sal), 194→117 (NMSal); 碎裂电压(fragmentor)为135 V;碰撞能量分别为26、20、24、20 V。其他质谱参数:干燥气流速6.0 L/min;干燥器温度325℃;雾化器压力35.0 psi。

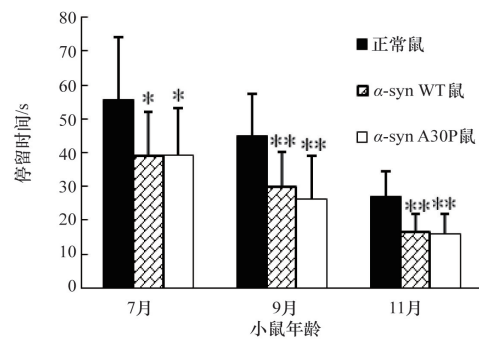
2.4.6 统计学方法

本实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS18.0统计软件,组间比较采用单因素方差分析,*n*为实验鼠数量,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 PD小鼠模型协调能力

对比同一月龄的正常鼠、过表达 α -syn WT、 α -syn A30P蛋白模型小鼠各14只的行为学差异可以看出(图1),在7月龄时,两种不同类型的PD鼠模型与正常组相比,运动协调能力下降($P < 0.05$),9月龄和11月龄时,与正常组相比协调能力进一步衰退,在转棒仪上停留时间明显减短($P < 0.01$),同时出现前肢震颤的症状。

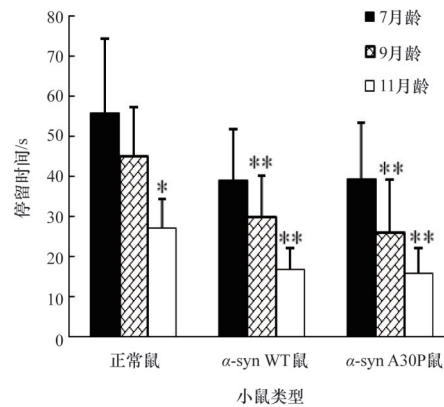


*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 对比正常鼠

图1 3种类型小鼠不同年龄转棒实验

Fig. 1 Rota rod test for three types of mice of different months

进一步对比同一类型鼠在不同月龄时行为能力变化,可以看到,随着年龄增长,包括正常鼠在内的3种类型小鼠的行为能力都有不同程度降低,但是PD模型鼠的运动能力下降程度极为显著($P < 0.01$)(图2)。



*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 对比7月龄

图2 3种类型小鼠随年龄增长,转棒实验检测

Fig. 2 Rota rod test for three types of mice of 7 months, 9 months and 11 months

通过对PD模型鼠行为学的监测发现,7月龄时,PD模型鼠的运动协调能力远低于正常鼠,且随着年龄的增长,这种差异更加明显。虽然正常鼠的协调能力也随着年龄的增长而下降,但是下降的速度远低于模型鼠。由此可见,过表达的 α -syn WT及 α -syn A30P对小鼠的脑部产生了一定的影响,从而干扰了其运动协调能力。

3.2 PD模型鼠纹状体占全脑质量

对3种类型小鼠(各14只)的心、肝、脾、肺、肾的脏器系数,及全脑占体重的百分比进行比较。发现各小鼠间的脏器系数并没有显著性差别(图3)。由于PD的发病部位位于大脑黑质纹状体,因此对纹状体占全脑质量的百分比进行计算。通过比较发现,过表达 α -syn蛋白的小鼠纹状体质量占全脑质量的比例比正常鼠显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)(图4)。

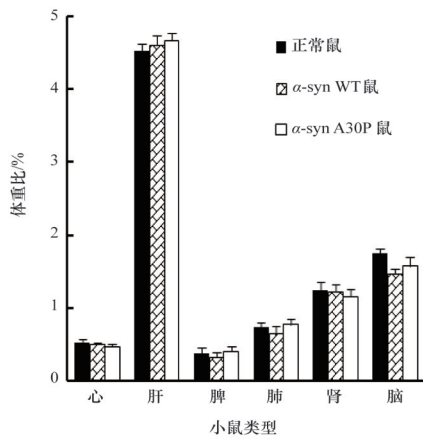


图3 3种小鼠间脏器占体重百分比

Fig. 3 Comparison of main organ coefficients among the three types of mice

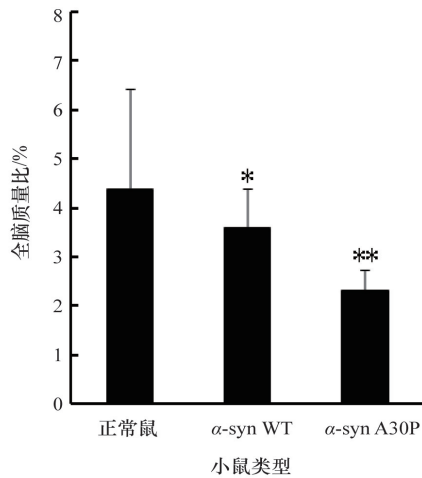
*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 对比正常鼠

图4 3种类型小鼠纹状体占全脑质量百分比

Fig. 4 Percentages of striatum in the total brain of the three types of mice

可见, α -syn 的过表达并不影响小鼠其他器官的正常生长和发育。同时, 对大脑占体重的百分比进行比较, 差异也不显著。其原因在于虽然纹状体多巴胺神经元特异性缺失是PD的一个病理特征, 但是纹状体自身体积较小, 它的部分缺失对整脑质量的改变影响不大。因此, 其全脑与体重的比值与正常鼠相比没有显著变化。但比较纹状体占整脑的比重时发现, PD鼠模型纹状体所占整脑的比重远小于正常鼠, 且过表达 α -syn A30P的小鼠纹状体所占比重更小, 这一结果显示, 转基因小鼠的纹状体受到了一定的损伤。

3.3 PD模型鼠脑内纹状体氧化应激水平

对3种类型小鼠脑(每种各14只)纹状体中的MDA和 H_2O_2 含量进行检测, 发现模型鼠纹状体中MDA和 H_2O_2 的含量比正常鼠纹状体中的含量都有所升高($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图

5, 图6), 这说明过表达的 α -syn蛋白和其突变蛋白均能增加鼠脑纹状体中氧化应激的水平。

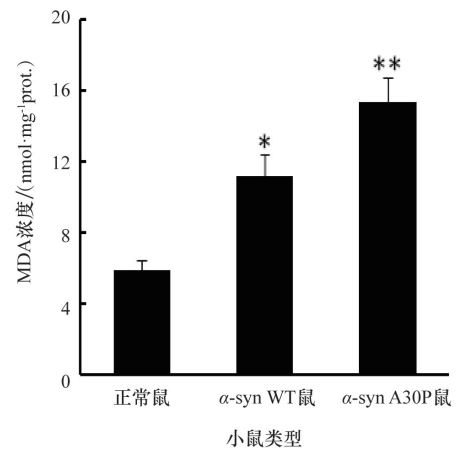
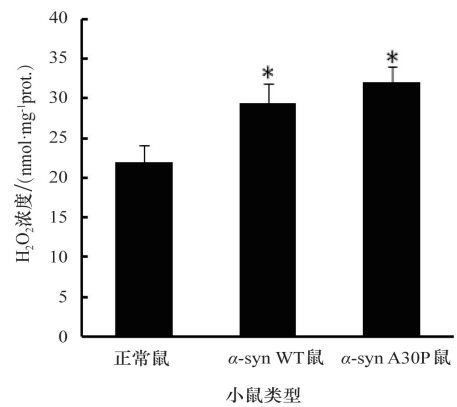
*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 对比正常鼠

图5 3种类型小鼠脑部纹状体内MDA浓度比较

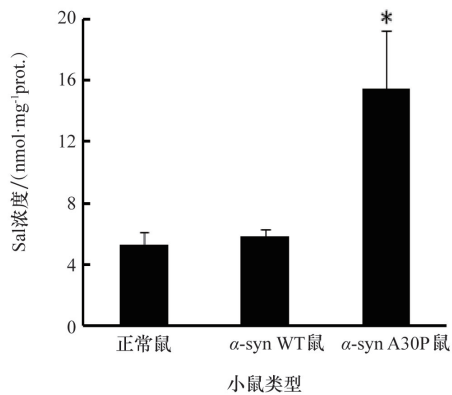
Fig. 5 Levels of MDA in the striatum of the three types of mice

*: $P < 0.05$ 对比正常鼠图6 3种类型小鼠脑部纹状体内H₂O₂浓度比较Fig. 6 Levels of H₂O₂ in the striatum of the three types of mice

3.4 PD鼠脑纹状体中儿茶酚异喹啉类物质

对小鼠脑部纹状体中儿茶酚异喹啉类物质Sal和NMSal的含量进行检测。过表达人源 α -syn WT蛋白的小鼠纹状体中Sal含量的变化与正常鼠相比不明显($P > 0.05$), 但是过表达 α -syn A30P蛋白的小鼠纹状体中Sal含量有所升高($P < 0.05$) (图7)。

同样, 在过表达 α -syn WT蛋白的小鼠纹状体中NMSal含量的变化与正常鼠相比虽然浓度有一定的升高, 但是不具备显著差异($P > 0.05$)。而过表达 α -syn A30P蛋白的小鼠纹状体中NMSal含量却有所升高($P < 0.05$), 如图8所示。



*: $P < 0.05$ 对比正常鼠

图7 3种类型小鼠脑部纹状体中Sal的浓度比较
Fig. 7 Levels of Sal in the striatum of the three types of mice

以上结果显示,过表达 α -syn WT小鼠的纹状体中NMSal的含量有了一定程度增高,但增高程度并不明显,而过表达 α -syn A30P的小鼠纹状体中Sal、NMSal的含量均有显著性的升高,说明 α -syn A30P的过表达相对于 α -syn WT蛋白更容易引起神经内源性毒素的产生,会对纹状体多巴胺能神经元细胞造成损伤,这一结果也与本实验中过表达 α -syn A30P的小鼠脑中纹状体组织占全脑组织比重较其他两类小鼠显著降低的原因相统一。

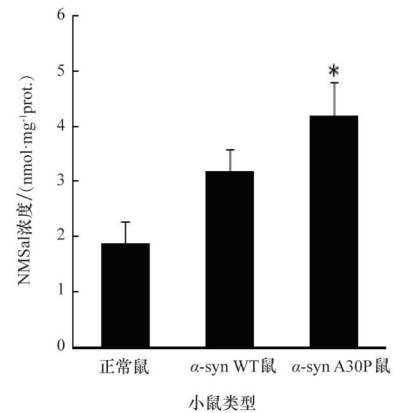
4 讨论与结论

α -Syn蛋白是公认的与散发性和遗传性PD有关的关键性致病蛋白,其突变或者遗传会诱导产生PD;Sal、NMSal这两种儿茶酚异喹啉类物质是潜在的内源性神经毒素。目前,大量关于PD致病性的研究都是围绕单因素展开,或是遗传因素,或是环境因素,很少将二者相结合。本研究将PD遗传致病因子 α -syn蛋白与内源性神经毒素Sal和NMSal的关系进行了研究,发现二者存在一定的联系,这为更好地阐明PD的致病机理提供了新的思路。

通过分别对过表达野生型人源 α -syn WT及其突变体 α -syn A30P蛋白的转基因小鼠的行为学检验、脑部纹状体中氧化应激水平和儿茶酚胺异喹啉物质水平的检测,发现 α -syn WT蛋白及其突变产物 α -syn A30P蛋白的过表达能够引起PD鼠脑纹状体内氧化应激水平的升高,增加内源性神经毒素儿茶酚胺异喹啉类物质的合成水平,从而造成黑质多巴胺能神经元的损伤。这一研究结果将 α -syn蛋白的过表达与Sal和NMSal在纹状体中表达量的升高相联系,为遗传因素理论与环境因素理论提供了纽带,为进一步了解PD的发病机制提供了新的思路。

参考文献 (References)

[1] Thomas B, Beal M F. Parkinson's disease[J]. Human Molecular Genetics, 2007, 16(R2): R183-R194.
[2] De Rijk M C, Launer L J, Berger K, et al. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts.



*: $P < 0.05$ 对比正常鼠

图8 3种类型小鼠纹状体中NMSal的质量浓度比较
Fig. 8 Levels of NMSal in the striatum of the three types of mice

Neurologic diseases in the elderly research group[J]. Neurology, 2000, 54(11 S5): 21-23.
[3] Polymeropoulos M H, Higgins J J, Golbe L I, et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23[J]. Science, 1996, 274 (5290): 1197-1199.
[4] Kruger R, Kuhn W, Muller T, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease[J]. Nature Genetics, 1998, 18(2): 106-108.
[5] Zarranz J J, Alegre J, Gomez-Esteban J C, et al. The new mutation, E46K, of α -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia[J]. Annals of Neurology, 2004, 55(2): 164-173.
[6] Garcia-Reitböck P, Anichtchik O, Dalley J W, et al. Endogenous α -synuclein influences the number of dopaminergic neurons in mouse substantia nigra[J]. Experimental Neurology, 2013, 248: 541-545.
[7] George S, Rey N L, Reichenbach N, et al. α -Synuclein: the long distance runner[J]. Brain Pathology, 2013, 23(3): 350-357.
[8] Bendor J T, Logan T P, Edwards R H. The Function of α -Synuclein[J]. Neuron, 2013, 79(6): 1044-1066.
[9] Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: Dopamine, vesicles and α -synuclein[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2002, 3(12): 932-942.
[10] Lane E, Dunnett S. Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: How close are we to the clinic?[J]. Psychopharmacology, 2008, 199(3): 303-312.
[11] Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, et al. Classic and new animal models of Parkinson's disease[J/OL]. Journal of Biomedicine & Biotechnology, 2012, [2013-12-09]. http://dx.doi.org/10.1155/2012/845618.
[12] Krüger R, Kuhn W, Müller T, et al. AlaSOPro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease[J]. Nature Genetics, 1998, 18(2): 106-108.
[13] Chinta S J, Lieu C A, Demaria M, et al. Environmental stress, ageing and glial cell senescence: A novel mechanistic link to Parkinson's disease?[J]. Journal of Internal Medicine, 2013, 273(5): 429-436.
[14] Singleton A B, Farrer M J, Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: Progress and therapeutic implications[J]. Movement Disorders, 2013, 28(1): 14-23.
[15] Kang J H. Salsolinol, a catechol neurotoxin, induces oxidative modification of cytochrome c[J]. BMB Reports, 2013, 46(2): 119-123.
[16] Su Y, Duan J, Ying Z, et al. Increased vulnerability of parkin knock down PC12 cells to hydrogen peroxide toxicity: The role of salsolinol and NM-salsolinol[J]. Neuroscience, 2013, 233: 72-85.
[17] Witt S N, Flower T R. α -Synuclein, oxidative stress and apoptosis from the perspective of a yeast model of Parkinson's disease[J]. FEMS Yeast Research, 2006, 6(8): 1107-1116.

(编辑 田恬)