



α -突触核蛋白异常沉积后的成分改变

卢 军¹, 乔立艳²

1. 中国人民解放军第二炮兵总医院, 北京 100088

2. 清华大学玉泉医院, 北京 100049

摘要 神经元内 α -突触核蛋白 (α -syn) 异常沉积见于许多神经系统变性疾病中, 如帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩等。溶酶体酶是清除 α -syn 的主要途径之一。在溶酶体酶 Cathepsin D (CD) 缺乏的小鼠中, 已经发现有 α -syn 异常沉积。为了明确溶酶体出现缺陷后, 体内 α -syn 异常沉积的过程, 对野生型和 CD-/- 小鼠的皮层作抗 α -syn 抗体的 Western blot, 分析了 CD-/- 小鼠大脑皮层内 α -syn 的成分改变。结果发现, α -syn 单体在两种小鼠大脑皮层的可溶性和不溶性成分里均没有明显变化, α -syn 其他成分 CD-/- 小鼠则比野生型明显增多, 特别是在可溶性成分里的大小位于分子量 25~37 kD 之间, CD-/- 小鼠有明显的带存在而野生型的没有。结果提示, 溶酶体功能的正常对于 α -syn 的代谢有重要的作用, 其功能的缺失主要是影响 α -syn 多倍体成分, 推测体内正常的 α -syn 除了单体, 也有多倍体存在。溶酶体功能的异常引起该平衡失调, 导致大量的分子量大的 α -syn 异常出现, 直至导致 α -syn 聚集体的出现。

关键词 α -突触核蛋白; 溶酶体; Cathepsin D

中图分类号 R741.02

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)17-0081-03

Changes of α -synuclein After Accumulation

LU Jun¹, QIAO Liyan²

1. General Hospital of the Second Artillery of PLA, Beijing 100088, China

2. Yuquan Hospital of Tsinghua University, Beijing 100049, China

Abstract Deposition of filamentous structures of α -synuclein (α -syn) in the neuronal cytoplasm is a common pathological feature of many neurological diseases, such as Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. Lysosome is one of the main clearance ways for α -syn degradation. The α -syn accumulation has been found in the lysosome enzyme Cathepsin D (CD) deficient mice in our previous work. However, little is known about how cells handle protein aggregates. To study the process of α -syn accumulation, the bands in the α -syn Western blot were analyzed in the soluble and insoluble homogenate of the wide type and CD knock out mice. Obvious changes were not found in the monomer α -syn, however, they were found in other bands, especially between 25~37 kD. These results suggest that lysosomal

functions are important to the equilibrium of α -syn metabolism, especially to the oligomer. It is speculated that natural α -syn may exist in the form of monomer, as well as oligomer. The dysfunction of lysosomal will lead to the imbalance between monomer and oligomer of α -syn until the α -syn form accumulation.

Keywords α -synuclein; lysosome; Cathepsin D

0 引言

α 突触核蛋白 (α -synuclein, α -syn) 是组成 Lewy 体 (Lewy's body) 的主要成分, 而 Lewy 体出现于许多常见的神经系统变性疾病中, 如帕金森氏病、路易体痴呆 (Lewy's dementia)、多系统萎缩 (Multiple system atrophy) 等^[1]。这些疾病多见于老年人, 临床表现为运动、认知功能障碍和痴呆, 呈慢性进展性病程, 因病因不清, 迄今尚无有效治疗。

这些疾病的病理特点都是在脑内神经元中存在 α -syn 病理性沉积。目前仅在少数帕金森氏病家族病例中, 由于基因突变导致 α -syn 的过度表达, 绝大多数帕金森氏及路易体痴呆病例中并未发现有 α -syn 的表达增多, 提示清除途径受损在 α -syn 沉积中具有重要作用^[2]。体外试验证明 α -syn 主要的清除途径有二: 溶酶体介导的自噬作用 (溶酶体途径) 和泛素-蛋白酶体系统 (UPS)^[3]。

CD 是溶酶体内主要的天冬氨酸蛋白酶和肽链内切酶, 负

收稿日期: 2009-07-14

基金项目: 首都医学发展基金项目 (2005-3030)

作者简介: 卢军, 主治医师, 研究方向为急诊医学、认知功能障碍, 电子信箱: lujun307@yahoo.com.cn; 乔立艳 (通信作者), 副主任医师, 研究方向为老年认知功能障碍、神经免疫性疾病, 电子信箱: qiaoliyan2000@yahoo.cn



责降解长寿蛋白,包括 α -syn。CD 在脑内广泛表达,如皮层、海马、纹状体、黑质等。在老年神经变性疾病患者脑中,有人检测到在早期有 CD 的升高,提示 Lewy 体形成和溶酶体酶之间可能存在某种联系^[4]。本课题组在过去的实验中采用免疫组织化学方法已经证实 CD-/-小鼠大脑皮层内发现 α -syn 的异常沉积^[5]。为了了解体内神经元 CD 功能缺失后对 α -syn 的影响,本研究对 CD-/-小鼠的 α -syn 进行了成分分析。

1 材料和方法

小鼠的培养和基因型 DNA 鉴定见文献[6]。将 P25 野生型和 CD-/-小鼠的大脑皮层放入 10 倍体积的预冷的溶解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4,175 mmol/L NaCl,5 mmol/L EDTA)中匀浆,超声 10 s,加 TritonX-100 至终浓度 1%,冰上孵育 30 min,4℃,15 000 r/min 离心 15 min,上清液为可溶性成分。将沉淀溶于 2% SDS 溶解缓冲液中,超声 10 s,为不溶性成分。将样品做蛋白定量后,SDS-PAGE 电泳,Western blot 分析。抗体采用鼠抗人 α -syn 单克隆抗体 (Chemicon),Western blot 结果扫描入 Adobe Photoshop,用 UN-SCAN-IT 软件(Orem,Utah)作定量分析。统计方法采用学生 *t* 检验。

2 结果

图 1 中,取 P25CD-/-和野生型小鼠的大脑皮层,提取蛋白裂解液,Western blot 分析,结果扫描,用 UN-SCAN-IT 软件定量,实验重复 3 次。结果发现,无论在可溶性还是在不可溶性成分里,两种小鼠中 α -syn 单体并没有明显差异。除了单体外,其他被试验中采用抗体识别的成分,CD-/-小鼠的均比野生小鼠的明显增加(图 1)。

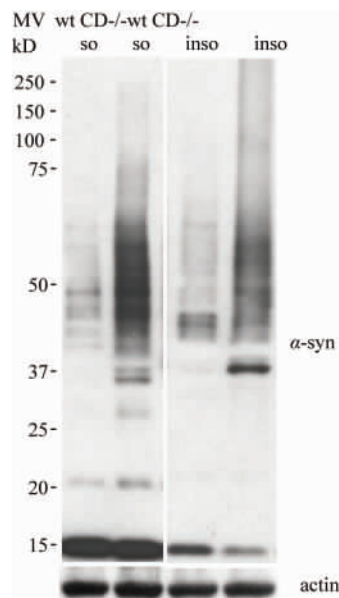


图 1 α -syn 异常沉积后的成分变化
Fig. 1 Changes of α -syn after accumulation

可溶性成分定量统计结果(图 2)显示,与野生型小鼠相比,CD-/-小鼠 α -syn 单倍体(17 kD)无明显变化,但 α -syn 聚集体明显增多($P<0.01$)。

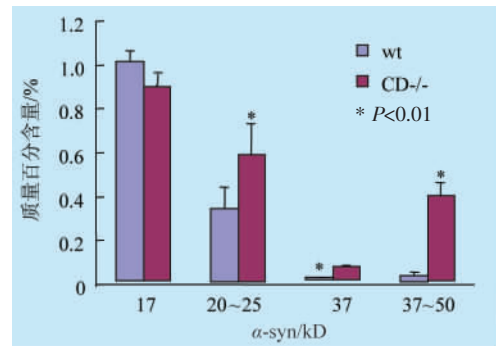


图 2 可溶性成份的定量结果
Fig. 2 Quantified results of soluble fractions

不可溶性成分定量统计结果(图 3)显示,与野生型相比,CD-/-小鼠 α -syn 单倍体(17 kD)无明显变化,但 α -syn 聚集体明显增多($P<0.01$)。

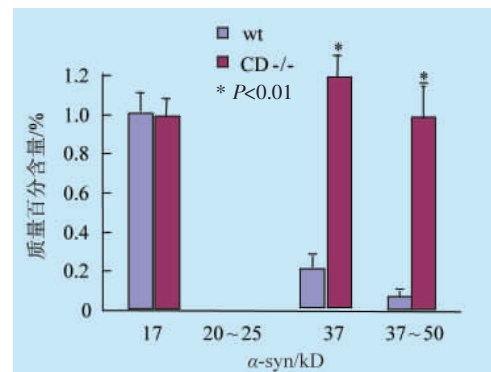


图 3 不可溶性成份的定量结果
Fig. 3 Quantified results of insoluble fractions

3 讨论

本课题组小鼠体内实验提示,溶酶体酶 CD 缺乏后对 α -syn 单体影响不明显,主要是影响单体以上的 α -syn 聚集体,与 Lee 等^[7]用溶酶体抑制剂体外处理神经元与非神经元内的结果类似。对于 α -syn 聚集体,则各不相同,即使 Lee 等用同样的方法处理不同的细胞,结果也不同,推测可能与组织特异性有关。

另外一个特点是,绝大多数 α -syn 聚集体同时在野生型和 CD-/-小鼠中出现。生化研究证实 α -syn 能够形成与体内包涵体形态学类似的 β 片层纤维样物。胞浆内纤维状的 α -syn 的聚集体起自部分折叠的单体二聚化,然后形成非纤维状的富含 β 片层的寡聚中间体,寡聚中间体再进一步形成成熟的包涵体^[8]。本研究结果提示:体内存在 α -syn 单体和聚集体的平衡,溶酶体对于维持这个平衡具有重要作用,溶酶

体功能的异常将会导致细胞内大量的 α -syn 聚集体异常增多,最终导致包涵体的形成。

对于在体外试验发生的神经变性作用和致细胞死亡的主要物质,目前还没有定论,有的认为是 α -syn 寡聚中间体,有的认为是成熟的包涵体,但迄今只有文献证实寡聚中间体可以被溶酶体清除途径清除^[9]。本实验提示溶酶体功能的异常与 α -syn 异常聚集有关。增强溶酶体的功能可能是治疗帕金森氏病、Lewy 痴呆等疾病的可能靶点。

4 结论

溶酶体功能的正常对于 α -syn 的代谢有重要的作用,其功能的缺失主要是影响 α -syn 多倍体成分,推测体内正常的 α -syn 除了单体,也有多倍体存在,溶酶体功能的异常引起该平衡失调,导致大量的大分子量的 α -syn 异常出现,直至导致 α -syn 聚集体的出现。

参考文献 (References)

- [1] Qiao L, Zhang J. Inhibition of lysosomal functions reduces proteasomal activity[J]. *Neurosci Lett*, 2009, 456(1): 15-19.
- [2] Webb J L, Ravikumar B, Skepper J N, *et al.* Alpha-synuclein is

degraded by both autophagy and the proteasome [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 25009-25013.

- [3] Cuervo A M, Tallozy Z, Kaushik S, *et al.* Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy [J]. *Science*, 2004, 305: 1292-1295.
- [4] Sacka J J, Klocke B J, Young C, *et al.* Cathepsin D deficiency induces persistent neurodegeneration in the absence of Bax-dependent apoptosis [J]. *J Neuroscience*, 2007, 27(8): 2081-2090.
- [5] Qiao L, Hamamichi S, Caldwell K A, *et al.* Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity[J]. *Mol Brain*, 2008, 21(1): 17.
- [6] Walls K C, Klocke B J, Saftig P, *et al.* Altered regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in cathepsin D-deficient brain[J]. *Autophagy*, 2007, 3(3): 222-229.
- [7] Lee H J, Khoshaghideh F, Patel smita, *et al.* Clearance of α -synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway [J]. *J Neuroscience*, 2004, 24(8): 1888-1896.
- [8] Krishan S, Chi E Y, Wood S J, *et al.* Oxidative dimer formation is the critical rate-limiting step for Parkinson's disease alpha-synuclein fibrillogenesis[J]. *Biochemistry*, 2003, 42: 829-837.
- [9] Komatsu M, Waguri S, Chiba T, *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice [J]. *Nature*, 2006, 441: 880-884.

(责任编辑 李慧政)

第6届中国通信学会 学术年会

时 间: 2009年11月
地 点: 广东省深圳市

主办单位: 中国通信学会
协办单位: 《通信学报》、《中国通信》
承办单位: 中国通信学会学术工作委员会

信息通信技术创新发展 与信息产业融合

电子信箱: cicnh@tom.com
通信地址: 北京邮电大学287信箱 (100876)