

脂多糖加重 α -synuclein 基因突变小鼠多巴胺能神经元损伤机制的研究

郑远鹏, 臧彩霞, 王璐, 杨瀚宇, 孙华, 鲍秀琦*, 张丹*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD) 是由遗传和炎症等多种病因引起的神经退行性疾病。有多种可模拟 PD 发病的动物模型, α -synuclein (A53T) 转基因小鼠和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 腹腔注射小鼠分别从基因突变和炎症角度模拟 PD 的病理改变, 但这些模型仅模拟 PD 发病的单一因素, 且出现病理改变的时间较长。本实验采用 LPS 注射 α -synuclein 转基因小鼠建立炎症和遗传因素双重打击的 PD 模型。结果显示 LPS 联合 α -synuclein 转基因刺激可明显引起小鼠运动协调能力和多巴胺神经元功能障碍, 以上行为学和病理改变均较二者单独刺激明显加重, 表现出协同效应。机制研究发现 LPS 联合 α -synuclein 可引起明显的神经炎症和神经元凋亡, 差异蛋白质组学研究发现 LPS 和 α -synuclein 双重打击可导致小鼠脑中与炎症和凋亡相关蛋白 CD99 抗原样蛋白 2 (CD99L2) 和细胞色素 C 氧化酶 7A 相关蛋白 (COX7RP) 的表达明显提高, 提示这两种蛋白可能参与 PD 的发病过程。以上研究表明在基因突变基础上引入炎症刺激可建立更理想的 PD 动物模型。

关键词: 帕金森氏病; 脂多糖; α -突触核蛋白; 神经炎症

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 05-0729-08

Lipopolysaccharide potentiates dopaminergic neuronal dysfunction in α -synuclein transgenic mice

ZHENG Yuan-peng, ZANG Cai-xia, WANG Lu, YANG Han-yu, SUN Hua,
BAO Xiu-qi*, ZHANG Dan*

(State Key Laboratory of Natural Products and Functions, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Parkinson's disease (PD) is the most prevalent neurodegenerative disorder, with several risk factors contributing to the onset, such as aging, genetics, oxidative stress and neuroinflammation. There are several PD animals that mimics different risk factor. α -Synuclein mutation mice and systemic lipopolysaccharide (LPS) injection mice are two kinds of most common animal models that replicate genetic mutation and neuroinflammation, respectively. However, in these two animal models, the pathogenesis occurred after a long period of stimulation. In the present study, four-month-old α -synuclein transgenic mice (A53T) were intraperitoneally injected with LPS once a week for continuous 8 weeks to simulate the inflammatory response. The behavioral results showed that the time of mice staying on the rod and the performance score were markedly decreased, indicating motor dysfunction. Dopaminergic neuronal function also decreased. It was noted that the movement dysfunction and pathological changes were aggravated in LPS plus α -synuclein challenged mice

收稿日期: 2017-01-16; 修回日期: 2017-03-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81630097); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目 (2016-I2M-3-011).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165178, E-mail: baoxiuqi@imm.ac.cn;

Tel: 86-10-63165203, E-mail: danzhang@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0065

compared with LPS or α -synuclein stimulated alone, suggesting that the double attack had synergistic effects. Mechanistic study demonstrated that LPS and α -synuclein combined challenge led to obvious neuroinflammatory response and apoptosis, which might contribute to motor and dopaminergic neuronal dysfunction. In addition, differential proteomic study showed that the expression of CD99L2 and COX7RP significantly increased in the midbrain of LPS plus α -synuclein challenged mice, which were closely related to inflammation and apoptosis, and might be involved in the pathogenesis of PD. In conclusion, the present study demonstrated that LPS could potentiate dopaminergic neuronal function in α -synuclein transgenic mice, which might be an ideal method to develop PD animal model.

Key words: Parkinson's disease; lipopolysaccharide; α -synuclein; neuroinflammation

帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD) 是发病率居第二位的神经退行性疾病。主要病理改变是黑质致密部多巴胺能神经元丢失, 导致多巴胺能神经元功能低下而胆碱能神经元占优势^[1], 引起患者静止性震颤、僵直、行动迟缓、站立不稳、自主活动障碍并伴有情感和认知障碍。PD 的主要病理标志是脑内出现以 α -突触核蛋白 (α -synuclein, α -Syn) 为主要成分的路易小体。按遗传方式分为家族性和散发性 PD, 其中家族性 PD 与 α -Syn 的基因错义突变 (A53T、A30P 和 G46L) 相关^[2]。全基因组关联分析表明 α -Syn 与散发性 PD 也有密切的关系, 是散发性 PD 路易小体的主要成分^[3]。除此之外, PD 的发病还受到其他因素的影响, 其中神经炎症在 PD 的发生和发展中起着重要的作用^[4]。在受到外界致病因子刺激时, 脑内小胶质细胞被激活, 吞噬损伤的组织和异物, 有利于组织修复。若炎症持续存在, 变成慢性炎症, 胶质细胞被过度激活, 释放多种炎症趋化因子、细胞因子和兴奋性氨基酸等毒性物质损伤神经元^[5]。受损的神经元释放出细胞内蛋白, 与胶质细胞膜表面受体结合, 激活胶质细胞, 从而在神经元凋亡和胶质细胞激活之间形成恶性循环, 导致神经元慢性进行性死亡和丢失^[6]。因此, 炎症因素和遗传因素共同参与了 PD 的发病。

由于 PD 是多种因素长期刺激的结果, 单一因素引起的 PD 病理改变不能全面模拟 PD 发病的病程和特点。为了更好地模拟 PD 的病因和病理过程, 本研究运用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 联合 α -Syn 基因突变, 模拟炎症和遗传因素双重打击小鼠, 观察其运动协调能力、多巴胺能神经元的功能和脑内炎症反应, 最后采用蛋白质组学寻找该模型中差异蛋白并进行验证。通过以上研究旨在模拟并阐明在长期炎症和遗传因素双重打击下, PD 模型小鼠的运动功能障碍和脑内病理变化, 为研究 PD 提供更理想和更有效的动物模型。

材料与方法

动物分组和处理 4 月龄清洁级雄性 α -Syn (A53T) 杂合子转基因小鼠 [201503826; B6; C3-Tg (Prnp-SNCA*A53T) 83Vle/Jnju] 由南京大学模式动物所提供。实验分为野生型 (WT) 组、WT+LPS 组、 α -Syn 组和 LPS+ α -Syn 组。LPS (Sigma-Aldrich 公司) 溶于生理盐水, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射, 每周 1 次, 连续 8 周, 对照组小鼠注射等体积生理盐水。所有实验均按北京市实验动物伦理委员会规定进行操作。

小鼠运动行为学测试

转棍法 转棍仪 (中国医学科学院药物研究所研制) 为直径 3 cm, 长约为 50 cm, 用隔板分隔为 5 段的水平杆, 保证动物彼此不受影响。转棍仪转速设为恒速 $14 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。将小鼠置于杆上, 打开开关, 开始计时, 记录从开始转棍到小鼠从杆上掉下的时间, 记为潜伏期 (即第 1 次掉落的时间), 以此表示其运动协调能力。于小鼠腹腔注射 LPS 8 周后的第 7 天进行转棍测试, 每只小鼠测试 2 次, 每次间隔 1 h, 取平均值。

爬杆法 爬杆法用一直径 13 mm, 高 50 cm, 顶部有一直径 3 cm 木球的光滑木杆 (中国医学科学院药物研究所研制), 垂直放置, 将小鼠头向下放置在杆的顶部球上, 让其沿杆自然爬下, 观察动物在爬下过程中的行为。小鼠爬下过程中的行为按标准记分, 评分标准如下: 5 分: 四肢并用, 一步一步协调向下爬行; 4 分: 一步一步向下爬行但兼有后肢滑行为; 3 分: 爬过一半距离后向下滑行, 但可抱紧杆; 2 分: 未爬过一半距离即出现滑行为; 1 分: 爬过一半距离后不能抓杆从杆上掉落; 0 分: 未爬过一半距离即不能抓杆, 从杆上掉落。实验前每只小鼠训练 2 次。于小鼠腹腔注射 LPS 8 周后的第 7 天进行爬杆测试, 每只小鼠测试 2 次, 每次间隔 1 h, 按照上述标准进行评分, 取平均值。

Western blot 小鼠于末次行为学结束后, 断头

取中脑, 用非变性裂解液 (北京普利莱公司) 匀浆提取蛋白。匀浆液离心后煮沸 5 min。10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 然后转移到 PVDF 膜上。转移上蛋白的 PVDF 膜用 5% TBST 配制的脱脂奶粉 (北京普利莱公司) 室温封闭 2 h。4 °C 下与 TBST 稀释的一抗 TH (tyrosinehydroxylase)、Bcl-2、Bax (Santa Cruz 公司)、COX7RP、CD99L2、RCN1 或 Claudin-11 (Cell Signaling 公司) 孵育过夜。用 TBST 洗 3 遍, 然后在 TBST 稀释的辣根过氧化物酶偶联的二抗中孵育 2 h, 再用 TBST 洗 3 遍后, 在 LAS4000 化学发光系统 (Fujifilm, 日本) 检测, Gel-Pro Analyzer 4.0 分析条带灰度。

免疫组化 行为学实验后, 每组随机取 4 只小鼠, 灌注固定后取脑, 标本完全包埋后, 在黑质部位行连续冠状面切片, 厚度 20 μm 。3% H_2O_2 室温孵育 10 min, PBST 洗 3 次, 每次 5 min; 用羊血清原液室温封闭 30 min, 加入稀释好的 TH (Santa Cruz 公司) 或 Iba1 (Abcam 公司) 抗体 4 °C 孵育过夜。然后加生物素标记的二抗, 室温孵育 2 h。加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记链亲合素, 室温孵育 2 h。用 DAB 工作液显色 2 min 左右; 显微镜下控制染色程度, 自来水终止显色反应。将脑切片固定于用黏片液处理过的载玻片上, 自然晾干。75%、80%、90%、95% 梯度酒精依次脱水, 二甲苯透明 2 次, 中性树脂封片。在光学倒置显微镜下观察小鼠 TH 神经元数量的变化。计数黑质致密部 TH 或 Iba1 阳性神经元数目, 取平均值。

多巴胺检测 分离小鼠纹状体, 按照 1 : 5 (w/v), 即 1 mg 组织样品加入 A 液 (0.6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高氯酸溶液中加入异丙肾上腺素, 其终质量浓度为 0.375 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 5 μL 的比例加入, 匀浆, 4 °C、20 000 $\times g$ 离心 20 min, 吸取一定量上清, 加入半体积的 B 液 (柠檬酸钾 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 磷酸氢二钾 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$ 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 冰浴 30 min, 20 000 $\times g$ 、4 °C 离心 20 min, 吸取上清, 4 °C 保存待测。Waters 电化学检测器 (Waters 公司, 美国) 检测多巴胺的含量。流动相为乙酸钠-柠檬酸缓冲液 (柠檬酸 85 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 无水乙酸钠 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$ 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 甲醇 15%, pH 3.68)。泵流速 1.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测器检测灵敏度 10 nA, 玻碳工作电极, Ag/AgCl 参比电极, 检测电位 0.76 V, 柱温 25 °C。

ELISA 小鼠分离中脑, 非变性裂解液匀浆, 离心后取上清, 用 TNF- α 和 IL-1 β ELISA 试剂盒 (eBioscience 公司) 检测 TNF- α 和 IL-1 β 的含量, 按照试剂盒说明书进行操作。

蛋白质组学研究

蛋白提取和消化 小鼠中脑于蛋白裂解液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 2.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ thiourea, 8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ urea, 4% CHAPS, 65 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT) 提取总蛋白。过滤后使用微波辅助蛋白质样品制备方法进行酶切, 然后用 C18 柱 (3 cc, 60 mg, Oasis) 脱盐, 500 μL 0.1% 甲酸洗 7 次, 500 μL 100% ACN 洗脱, 洗脱液真空离心干燥, -80 °C 保存。

iTRAQ 标记 消化后的样品与等比例的内标混匀, 用 116、117 和 118 iTRAQ 标记。标记按照说明书进行操作 (ABSciex), 冻干后进行 2D-LC/MS/MS 检测。

2D-LC/MS/MS 将标记的样品用高 pH 柱分离 (Waters, 250 $\text{mm}\times 4.6$ mm, C18, 3 μm)。洗脱梯度为 5%~90% 洗脱液 (90% 乙腈, pH 10), 洗脱 60 min。每分钟收集一次洗脱肽段。用自制反向 C18 柱 (100 $\text{mm}\times 75$ μm , 3 μm) 分析样品。洗脱梯度为 5%~30% 洗脱液 (0.1% 甲酸, 99.9% 乙腈), 洗脱 100 min。用 Triple-OF 5600 (Waters 公司, 美国) 分析样品。每个扫描之后, 系统进行 30 个 MS/MS 分析, 碰撞能量是 35%。电荷扫描带 +2~+4 个电荷的母离子, 15 s 内采用动态排除。MS/MS 扫描的范围是 100~1 800 m/z , 扫描时间 100 ms。

数据库搜索 用 Mascot software version 2.3.02 (Matrix Science, UK) 软件在 Uniprot 网站 (<http://www.uniprot.org>) SwissProt 小鼠数据库搜索 MS/MS 图谱。条件如下: 胰酶: 允许有 2 个错切的位点, Carbamidomethylation 和 iTRAQ 4-plex 标作为固定修饰。搜索时肽段和例子的误差是 0.05 Da。其他筛选条件: 蛋白水平允许有 1% 假阳性率, 每个蛋白有 2 个特异肽段。

统计分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 数据均以均数 \pm 标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组间的差异比较用双因素方差分析 (two-way ANOVA), 然后采用 LSD 检验。P<0.05 表示结果具有统计学差异。

结果

1 LPS 加重 α -Syn 转基因小鼠运动协调能力障碍

选用 4 月龄 α -Syn 转基因小鼠腹腔注射 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ LPS 模拟炎症刺激和遗传因素双重打击。8 周后用转棍法和爬杆法测试小鼠运动协调能力。结果显示单独注射 LPS 后, 小鼠的运动能力与 WT 小鼠相比有下降的趋势, 即在转棍上停留的时间减少和爬杆评分降低, 但无统计学差异。 α -Syn 转基因小鼠爬杆评分明显降低, 而在转棍上停留的时间与 WT 小鼠无显著性

差异。而 α -Syn 转基因小鼠注射 LPS 与 LPS 单独注射或 α -Syn 转基因小鼠相比在棍上停留的时间和爬杆评分都进一步降低 (图 1), 表明 α -Syn 基因突变联合 LPS 双重打击可加重小鼠运动功能障碍。

2 LPS 加重 α -Syn 转基因小鼠多巴胺能神经元功能障碍

PD 的主要病理改变是黑质多巴胺能神经元变性丢失, 从而导致纹状体多巴胺水平下降。研究结果显示, 小鼠腹腔注射 LPS 后, 黑质致密部 TH 阳性神经元的数量减少, 中脑 TH 的表达降低, 纹状体多巴胺的水平下降, 但与 WT 小鼠相比均无统计学差异。 α -Syn 转基因小鼠 TH 阳性神经元的数量与 WT 小鼠相比均显著降低, 而 TH 的表达和多巴胺的水平与 WT 小鼠相比无显著性差异。LPS 联合 α -Syn 基因突

变双重刺激后, 以上 3 个指标降低更为明显, 多巴胺能神经元功能出现明显下降 (图 2)。以上结果表明, LPS 刺激可加重 α -Syn 转基因小鼠多巴胺能神经元的损伤。

3 LPS 促进 α -Syn 转基因小鼠神经炎症反应

本研究继续研究 LPS 是如何加重 α -Syn 转基因小鼠多巴胺能神经元损伤的。发现单独 LPS 或 α -Syn 刺激均可引起脑内炎症反应, 表现在小鼠黑质处小胶质细胞活化标志物离子钙接头蛋白分子 1 (ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba1) 表达升高, 中脑炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 水平升高。而 LPS 联合 α -Syn 刺激后, 小鼠中脑 Iba1 表达、TNF- α 和 IL-1 β 水平均明显高于 LPS 或 α -Syn 单独刺激 (图 3), 表明 LPS 与 α -Syn 联合打击可加重神经炎症反应, 这可能

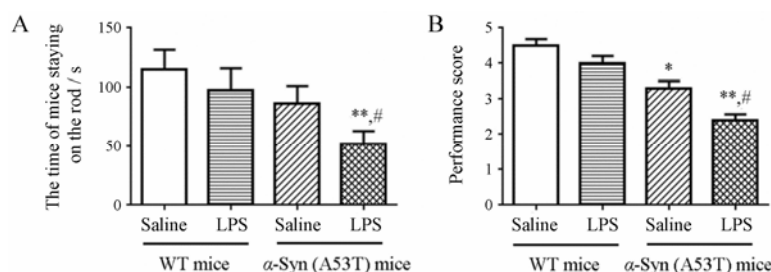


Figure 1 Lipopolysaccharide (LPS) potentiated the movement dysfunction of α -Syn (A53T) transgenic mice. Wide type (WT) and α -Syn transgenic mice were injected with LPS once a week for 8 weeks, the movement behaviour was detected by rotarod test and pole test. A: Rotarod test; B: Pole test. $n = 12$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT mice; # $P < 0.05$ vs LPS-injected mice or α -Syn transgenic mice

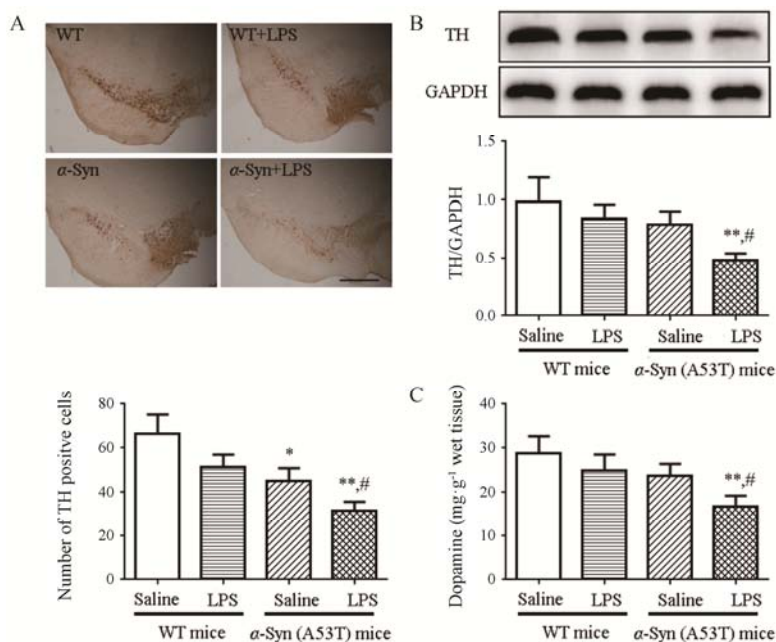


Figure 2 LPS potentiated dopaminergic neuronal dysfunction α -Syn (A53T) transgenic mice. WT and α -Syn transgenic mice were injected with LPS once a week for 8 weeks, the tyrosinehydroxylase (TH) positive cells, TH expression and dopamine levels were detected. A: TH positive cells ($n=4$), bar=500 μ m; B: TH expression ($n=3$); C: Dopamine content ($n=6$), $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT mice; # $P < 0.05$ vs LPS-injected mice or α -Syn transgenic mice

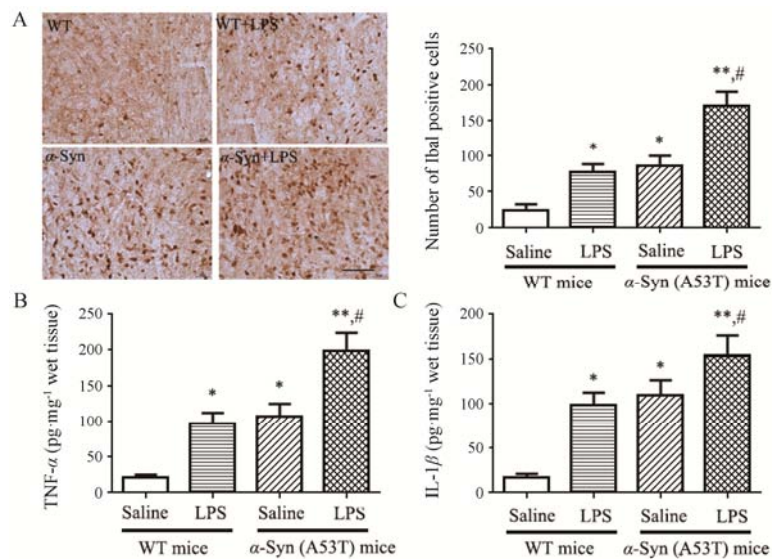


Figure 3 LPS increased the neuroinflammatory response in the brains of α -Syn (A53T) transgenic mice. WT and α -Syn transgenic mice were injected with LPS once a week for 8 weeks, Iba1 expression, TNF- α and IL-1 β productions were assayed. A: Iba1 positive cells ($n=4$), bar=32 μ m; B: TNF- α production ($n=6$); C: IL-1 β production ($n=6$), $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT mice, # $P < 0.05$ vs LPS-injected mice or α -Syn transgenic mice

是 LPS 导致 α -Syn 转基因小鼠多巴胺能神经元损伤加重的直接原因。

4 LPS 促进 α -Syn 转基因小鼠脑内神经元凋亡

PD 的神经退行性变与神经元凋亡有密切的关系, 研究发现 Bcl-2 与 Bax 蛋白水平高低与调控凋亡直接相关, Bcl-2 增高可抑制细胞凋亡, Bax 高表达可促进细胞凋亡, 因而 Bcl-2/Bax 比值可反映细胞凋亡程度。结果显示 LPS 和 α -Syn 小鼠 Bcl-2/Bax 的比值有下降的趋势, 提示有一定的神经元凋亡, 但无统计学差异。当 α -Syn 小鼠注射 LPS 后 Bcl-2/Bax 的比值进一步降低, 表明出现神经元凋亡。Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用, 其中 caspase-3 为关键的执行分子, 在凋亡信号传导的许

多途径中发挥作用。结果表明 LPS 和 α -Syn 小鼠中脑 caspase-3 的活性均升高, 但升高幅度不大。而当 α -Syn 小鼠注射 LPS 后, 小鼠中脑 caspase-3 的活性明显提高 (图 4)。以上结果表明, LPS 联合 α -Syn 可加重神经元的凋亡。

5 蛋白质组学研究

为探讨 α -Syn 转基因小鼠注射 LPS 后引起多巴胺能神经元损伤的作用机制, 本研究通过 iTRAQ 标记的蛋白质组学研究了 α -Syn 转基因小鼠腹腔注射 LPS 后小鼠与 WT 小鼠中脑蛋白表达的差异。一共定量了 3 844 种蛋白, 变化 ≥ 1.5 倍的蛋白定义为差异蛋白, 以此标准一共有 22 种蛋白符合标准, 这些蛋白主要与炎症、细胞凋亡及脱髓鞘相关 (表 1)。

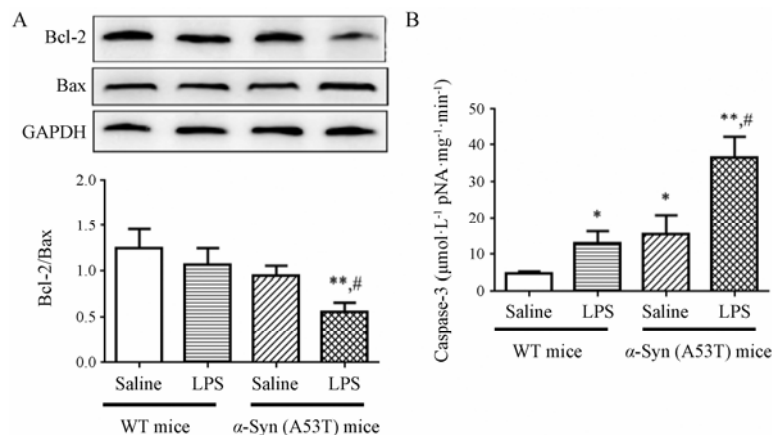


Figure 4 LPS induced more neuronal apoptosis in α -Syn (A53T) transgenic mice. WT and α -Syn transgenic mice were injected with LPS once a week for 8 weeks, Bcl-2, Bax and caspase-3 were assayed. A: Bcl-2/Bax ($n=3$); B: Caspase-3 activity ($n=6$), $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT mice; # $P < 0.05$ vs LPS-injected mice or α -Syn transgenic mice

Table 1 Differential protein qualified by proteomic study ($n=3$). *Fold of changes = α -Syn+LPS/WT

Accession number	Protein description	Molecular weight/kDa	Fold of change*
Q61387	Cytochrome C oxidase subunit 7A-related protein	36	2.0
P01872	Ig mu chain C region secreted form	50	1.9
Q6A037	NEDD4-binding protein 1	99	1.8
O55042	α -Synuclein	14	3.2
Q9R257	Heme-binding protein 1	21	1.6
Q9CYW4	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3	28	1.6
P12961	Neuroendocrine protein 7B2	24	1.9
O35943	Frataxin, mitochondrial	23	1.7
Q8BIF0	CD99 antigen-like protein 2	25	1.6
Q61646	Haptoglobin	39	2.4
Q61941	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	114	2.0
O88492	Perilipin-4	139	1.5
Q9QXV0	ProSAAS	27	1.5
P26339	Chromogranin-A	52	1.5
Q3TRR0	Microtubule-associated protein 9	74	1.5
Q05186	Reticulocalbin-1 (RCN1)	38	1.5
Q9QZB0	Regulator of G-protein signaling 17	24	1.5
Q64523	Cluster of histone H2A type 2-C	14	0.5
Q60771	Claudin-11	22	0.5
Q761V0	Sodium- and chloride-dependent glycine transporter 2	88	0.5
P21440	Cluster of multidrug resistance protein 3	140	0.6
Q9D2P8	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	19	0.6

6 差异蛋白的验证

在以上这些差异蛋白中, 挑选了报道与炎症、凋亡或神经退行性疾病相关的蛋白进行验证, 分别为 cytochrome C oxidase subunit 7A-related protein (COX7RP)、CD99 antigen-like protein 2 (CD99L2)、reticulocalbin-1 (RCN1) 和 claudin-11。Western blot 结果显示, 变化最明显的蛋白为 CD99L2, α -Syn 联合 LPS 刺激小鼠中脑 CD99L2 的表达为 WT 小鼠的 2.3 倍, 其次为 COX7RP, α -Syn 联合 LPS 刺激小鼠中脑 COX7RP 的表达为 WT 小鼠的 1.5 倍, 而 RCN1 和 claudin-11 的表达均无统计学差异 (图 5)。对于 CD99L2 和 COX7RP 在神经退行性疾病, 特别是在 PD 发病中的作用及机制有待于进一步研究和探讨。

讨论

本研究采用 LPS 腹腔注射 α -Syn 转基因小鼠双重打击引起小鼠 PD 样病理改变, 发现在该刺激条件下, 6 月龄转基因小鼠出现了明显的运动功能障碍、多巴胺神经元损伤以及神经炎症反应。差异蛋白质组学鉴定结果显示, 与神经炎症和细胞凋亡相关的蛋白 CD99L2 及 COX7RP 明显提高。另外, LPS 联合 α -Syn 双重打击无论在运动协调障碍还是病理改变上都明显较二者单独刺激加重, 表现出协同效应, 表明

炎症和遗传因素双重打击是较为理想的建立 PD 模型的一种方法。

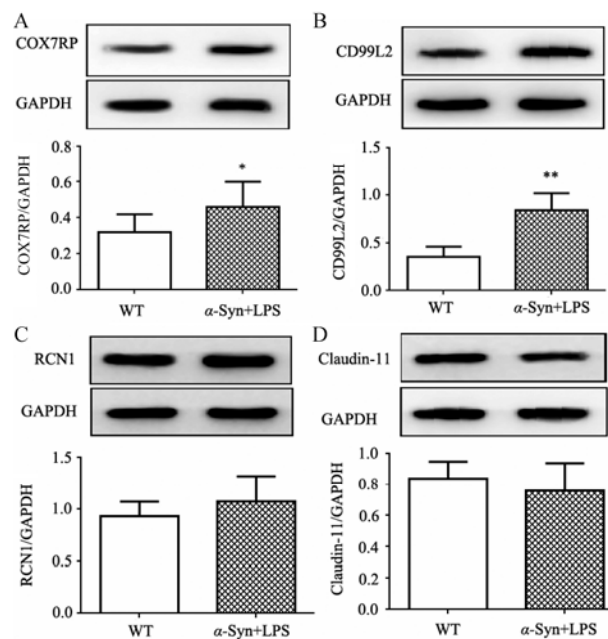


Figure 5 Verification of proteins associated with inflammation and apoptosis by Western blot. Differentially expressed proteins associated with inflammation and apoptosis were selected for Western blot analysis in the midbrains of WT mice and LPS injected α -Syn transgenic mice. A: COX7RP; B: CD99L2; C: RCN1; D: Claudin-11 ($n=3$), $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs WT mice

PD 是多因素导致的神经退行性疾病, 家族遗传是其发病的另一个重要原因。 α -Syn 基因突变可导致其在细胞内异常蓄积聚集, 已被确定为家族性 PD 的主要原因, 而且与散发性 PD 亦密切相关。 α -Syn 聚集过程中形成的寡聚体可与细胞膜结合, 具有较强的细胞毒性, 可导致神经元凋亡^[7]。另外, 聚集的 α -Syn 可激活小胶质细胞引起炎症反应, 激活小胶质细胞产生细胞因子或氧自由基对多巴胺能神经元造成神经毒性^[8, 9], 这同时也提示损伤或死亡的神经元释放的 α -Syn 聚集体会进一步对神经元造成长期持续的损伤^[10]。 α -Syn 转基因小鼠 8~10 月龄时才能出现明显的运动障碍和病理改变。本研究发现, 6 月龄 α -Syn 转基因小鼠脑内出现了一定程度的炎症反应和神经元凋亡以及多巴胺能神经元功能障碍, 小鼠表现出运动功能下降的趋势, 但均不明显。

黑质致密部多巴胺能神经元退行性变导致纹状体多巴胺水平降低, 后者是调节人体躯体运动的重要神经递质, 是引起 PD 患者运动功能障碍的直接原因^[11]。胶质细胞持续活化介导的神经炎症可引起神经元变性坏死, 导致中枢神经系统功能紊乱, 与神经退行性疾病的发生发展有密切的关系。研究发现, 在 PD 患者脑内有大量活化的小胶质细胞, 表明神经炎症参与 PD 的病理过程。体内外研究发现 LPS 诱导的炎症可导致多巴胺能神经元凋亡^[12, 13]。将 LPS 直接脑内注射可引起明显的炎症反应和神经元凋亡^[12], 但 LPS 不能透过血脑屏障, 所以该方法不能完全模拟 PD 发病。而通过腹腔注射 LPS 诱发中枢炎症而导致神经元凋亡的周期较长, 一般为 10~12 个月^[14]。本实验中小鼠腹腔注射 LPS 8 周, 发现脑内出现一定程度炎症反应, 但并没导致运动功能和多巴胺能神经系统功能出现明显障碍, 进一步证明单纯炎症刺激不足以引起较为明显的 PD 病理改变。当在遗传因素的基础上引入 LPS 刺激, 即在 α -Syn 转基因小鼠腹腔注射 LPS, 小鼠的以上病理改变和运动协调障碍均明显加重, 表明 LPS 联合 α -Syn 刺激小鼠能较好地模拟 PD 的症状和病理改变。本实验同时提示, LPS 联合 α -Syn 刺激更符合 PD 的发病过程, 即在基因突变的基础上加上炎症刺激, 小鼠在 6 月龄即出现明显的病理改变, 是建立 PD 模型的一种较为理想的方法。

为进一步阐明 LPS 联合 α -Syn 双重打击导致 PD 病理改变的机制, 采用差异蛋白质组学研究了小鼠中脑蛋白表达变化。本实验一共定量了 3 844 种蛋白, 有 22 种蛋白符合筛选标准, 这些蛋白主要与炎症、

细胞凋亡及脱髓鞘相关。进而选出 4 个感兴趣的蛋白进行验证, 发现 CD99L2 和 COX7RP 的表达与蛋白质组学结果一致, 均明显升高。研究发现 CD99L2 是重要的黏附分子, 可引起中性粒细胞的聚集, 在中性粒细胞、单核细胞和 T 淋巴细胞的外渗中起着重要作用, 其抗体可明显抑制炎症反应^[15, 16]。小鼠敲除 CD99L2 基因后炎症反应减弱^[17]。与上述研究结果一致, 本研究发现伴随着小鼠脑内炎症的发生, CD99L2 的表达也相应升高, 表明 CD99L2 在 PD 的发病中起着重要的作用。COX7RP 是存在于线粒体复合物 IV 中的雌激素应答基因^[18]。研究表明 COX7RP 在超级复合体的组装中起着重要作用, 过表达 COX7RP 可提高细胞色素 C 的氧化能力^[19], 表明其在线粒体氧化磷酸化中可能发挥重要作用。在本实验中 COX7RP 在 LPS 联合 α -Syn 双重打击 PD 模型中表达明显升高, 表明该蛋白可能与线粒体氧化应激有关。对于 CD99L2 和 COX7RP 这两种蛋白在 PD 发病中的作用和机制还有待于进一步研究和探讨。

本研究主要阐明了 LPS 联合 α -Syn 双重打击对 PD 病理进程的影响, 发现二者联合比单独刺激更易加剧 PD 小鼠病理改变和运动功能障碍, 这表明 LPS 联合 α -Syn 双重打击是建立 PD 模型较为理想的方法。而 LPS 联合 α -Syn 双重打击的协同效应可能与其长期刺激诱发的脑内炎症反应所致血脑屏障通透性增加有关, 这还有待于进一步研究探讨。

References

- [1] Kamel F. Epidemiology. Paths from pesticides to Parkinson's [J]. Science, 2013, 341: 722-723.
- [2] Uversky VN. Alpha-synuclein misfolding and neurodegenerative diseases [J]. Curr Protein Pept Sci, 2008, 9: 507-540.
- [3] Edwards TL, Scott WK, Almonte C, et al. Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease [J]. Ann Hum Genet, 2010, 74: 97-109.
- [4] Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention [J]. Neurobiol Dis, 2010, 37: 510-518.
- [5] Pal R, Tiwari PC, Nath R, et al. Role of neuroinflammation and latent transcription factors in pathogenesis of Parkinson's disease [J]. Neurol Res, 2016, 38: 1111-1122.
- [6] Qian L, Flood PM, Hong JS. Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy [J]. J Neural Transm (Vienna), 2010, 117: 971-979.

- [7] Ysselstein D, Joshi M, Mishra V, et al. Effects of impaired membrane interactions on α -synuclein aggregation and neurotoxicity [J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 79: 150–163.
- [8] Zhang QS, Heng Y, Yuan YH, et al. Pathological α -synuclein exacerbates the progression of Parkinson's disease through microglial activation [J]. *Toxicol Lett*, 2017, 265: 30–37.
- [9] Kim C, Ho DH, Suk JE, et al. Neuron-released oligomeric α -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1562.
- [10] Zhang W, Wang T, Pei Z, et al. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progress in Parkinson's disease [J]. *FASEB J*, 2005, 19: 533–542.
- [11] Chang CK, Wang NL, Lin MT. Inhibition of the dopamine system in rat amygdala attenuates the picrotoxin-induced locomotor hyperactivity and hypertension [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, 31: 284–288.
- [12] He H, Guo WW, Xu RR, et al. Alkaloids from piper longum protect dopaminergic neurons against inflammation-mediated damage induced by intranigral injection of lipopolysaccharide [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 412.
- [13] Okuyama S, Semba T, Toyoda N, et al. Prenyloxy phenylpropanoids suppress microglial activation and dopaminergic neuronal cell death in a lipopolysaccharide-induced model of Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: pii: E1716.
- [14] Wang Q, Qian L, Chen SH, et al. Post-treatment with an ultra-low dose of NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium attenuates disease progression in multiple Parkinson's disease models [J]. *Brain*, 2015, 138: 1247–1262.
- [15] Schenkel AR, Dufour EM, Chew TW, et al. The murine CD99-related molecule CD99-like 2 (CD99L2) is an adhesion molecule involved in the inflammatory response [J]. *Cell Commun Adhes*, 2007, 14: 227–237.
- [16] Bixel MG, Petri B, Khandoga AG, et al. A CD99-related antigen on endothelial cells mediates neutrophil, but not lymphocyte extravasation *in vivo* [J]. *Blood*, 2007, 109: 5327–5336.
- [17] Rutledge NS, Weber EW, Winger R, et al. CD99-like 2 (CD99L2)-deficient mice are defective in the acute inflammatory response [J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 99: 455–459.
- [18] Seelan RS, Grossman LI. Cytochrome C oxidase subunit VIIa isoforms. Characterization and expression of bovine cDNAs [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 19752–19757.
- [19] Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K, et al. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2147.