

百草枯引起神经元 α -突触核蛋白寡聚化并向细胞核易位的时间依赖性研究

张宝馥, 王楷栋, 张冰洋, 黄敏

宁夏医科大学公共卫生与管理学院, 职业卫生与环境卫生学系/宁夏环境因素与慢性病控制重点实验室, 宁夏 银川 750004



DOI 10.11836/JEOM21422

摘要:

[背景] 百草枯(PQ)作为散发性帕金森病(PD)的环境毒物之一可引起 α -突触核蛋白(α -syn)异常聚集,但在其构象变化及亚细胞定位的研究有限。

[目的] 探讨 PQ 对多巴胺能神经元中 α -syn 构象以及亚细胞定位的影响。

[方法] 选取 48 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠随机分为对照组和模型组,模型组腹腔注射 PQ($15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),对照组腹腔注射等容量 0.9%生理盐水,每周注射 2 次,连续 8 周以构建类 PD 样小鼠模型。观察各组小鼠神经行为学(旷场实验、爬杆实验)的变化,来评估小鼠运动能力的改变。染毒结束后取小鼠脑组织进行免疫组织化学染色(IHC),检测中脑多巴胺(DA)能神经元特异性标记物酪氨酸羟化酶(TH)以及 α -syn 的表达量;同时采用蛋白质印迹法(WB)检测小鼠中脑 TH、 α -syn 的蛋白表达量。以人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞作为多巴胺能神经元的体外模型,使用固定浓度 PQ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理细胞不同时间(0、12、24、36、48 h)后,采用 WB 法分别检测全细胞、细胞质、细胞核 α -syn 的表达情况;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞外 α -syn 的表达水平;免疫荧光法(IFA)观察 α -syn 的位置变化。

[结果] 神经行为学结果显示,与对照组比较,随染毒时间的增加 PQ 模型组小鼠旷场周边区域停留时间增加($P<0.05$),中央区域停留时间和移动距离减少($P<0.05$),爬杆时间增加($P<0.05$);动物实验 IHC 结果显示,6 周、8 周模型组与对照组比较,中脑 TH 阳性细胞数减少($P<0.05$),而 α -syn 阳性表达量在 4、6 和 8 周增多($P<0.05$);WB 结果同样显示 TH 相对表达量在 PQ 染毒 6、8 周明显减少($P<0.05$),寡聚体 α -syn 相对表达量在 4、6 和 8 周增多($P<0.05$)。细胞实验 WB 结果显示,细胞全蛋白寡聚体 α -syn 相对表达量随时间依赖性增多($R^2=0.7440$, $P<0.05$);细胞质寡聚体 α -syn 相对表达量随时间增加先增加后减少($P<0.05$);细胞核寡聚体 α -syn 相对表达量随时间依赖性增加($R^2=0.7913$, $P<0.05$);IFA 结果显示,寡聚化的 α -syn 表达增加并向细胞核易位($P<0.05$);ELISA 结果表明,细胞所释放的 α -syn 随 PQ 染毒时间增加呈现上升的趋势($P<0.05$)。

[结论] PQ 引起多巴胺能神经元内 α -syn 表达增加,结构发生寡聚化且向细胞核易位。

关键词: 百草枯; α -突触核蛋白;寡聚化;核易位;帕金森病

Temporal dependence of neuronal alpha-synuclein oligomerization and nuclear translocation induced by paraquat ZHANG Baofu, WANG Kaidong, ZHANG Bingyang, HUANG Min (Department of Occupational Health and Environmental Hygiene, School of Public Health and Management/Ningxia Key Laboratory of Environmental Factors and Chronic Disease Control, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract:

[Background] Paraquat (PQ), one of the environmental poisons associated with sporadic Parkinson's disease (PD), can cause abnormal aggregation of alpha-synuclein (α -syn), but the research on its conformational changes and subcellular localization is limited.

[Objective] To investigate the effect of PQ on α -syn conformation and subcellular localization in dopaminergic neurons.

[Methods] Forty-eight SPF C57BL/6 male mice were selected and randomly divided into a control group and a model group. The model group was intraperitoneally injected with PQ ($15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and the control group was intraperitoneally injected with 0.9% normal saline, twice a week for eight weeks to construct a PD-like mouse model. The changes of neurobehavior (by

基金项目

宁夏自然科学基金重点项目(2020AAC02 018);中国科学院 2020 年度“西部之光”人才培养计划(XAB2020YW14)

作者简介

张宝馥(1994—),女,硕士生;
E-mail: m18335143901@163.com

通信作者

黄敏, E-mail: 82621894@qq.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-09-12

录用日期 2021-12-20

文章编号 2095-9982(2022)02-0193-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

张宝馥,王楷栋,张冰洋,等.百草枯引起神经元 α -突触核蛋白寡聚化并向细胞核易位的时间依赖性研究[J].环境与职业医学,2022,39(2):193-199.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21422

Funding

This study was funded.

Correspondence to

HUANG Min, E-mail: 82621894@qq.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-09-12

Accepted 2021-12-20

► To cite

ZHANG Baofu, WANG Kaidong, ZHANG Bingyang, et al. Temporal dependence of neuronal alpha-synuclein oligomerization and nuclear translocation induced by paraquat[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(2): 193-199.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21422

open field test and pole climbing test) were observed to evaluate motor ability of mice. Immunohistochemical staining (IHC) was used to detect the expression levels of tyrosine hydroxylase (TH) and α -syn in the midbrain. Western blotting (WB) was used to measure the protein expression levels of TH and α -syn in midbrain. Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were used as dopaminergic neuron *in vitro* models. After the cells were treated with PQ ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 0, 12, 24, 36 and 48 h, the expressions of α -syn in whole cell, cytoplasm, and nucleus were detected by WB; the expression level of extracellular α -syn was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the change of α -syn location was observed by immunofluorescence assay (IFA).

[Results] The neurobehavioral tests' results showed that compared with the control group, the residence time in peripheral area of mice in the PQ model group increased with the increase of exposure time ($P < 0.05$), the residence time and moving distance in the central region decreased ($P < 0.05$), and the pole climbing time increased ($P < 0.05$). The mouse IHC results showed that compared with the control group, the number of TH positive cells in the midbrain decreased in the model group at week 6 and 8 ($P < 0.05$), while the expression level of α -syn increased at week 4, 6, and 8 ($P < 0.05$). The WB results of mouse showed that the relative expression of TH decreased significantly after 6 and 8 weeks of PQ exposure ($P < 0.05$), and the relative expression of oligomer α -syn increased after 4, 6, and 8 weeks of PQ exposure ($P < 0.05$). The WB of *in vitro* models results showed that the relative expression of α -syn in cells increased with time ($R^2=0.7440$, $P < 0.05$); the relative expression of α -syn in cytoplasm increased firstly and then decreased with time ($P < 0.05$); the relative expression of α -syn in nucleus increased with time ($R^2=0.7913$, $P < 0.05$). The IFA results of *in vitro* models showed that the expression of oligomerized α -syn increased and translocated to the nucleus ($P < 0.05$). The ELISA results of *in vitro* models showed that α -syn increased with the increase of PQ exposure time ($P < 0.05$).

[Conclusion] PQ can increase the expression of α -syn in dopaminergic neurons, induce oligomerization and translocation to the nucleus.

Keywords: paraquat; alpha-synuclein; oligomerization; nuclear translocation; Parkinson's disease

百草枯(paraquat, PQ)是一种结构类似于公认的帕金森病(Parkinson's disease, PD)诱导剂 1-甲基-4-苯基吡啶离子的季铵盐除草剂^[1],且有病例对照研究显示 PQ 暴露与 PD 患病风险增加相关,其中使用 PQ 的农药施用者患病风险增加了一倍以上 [$OR(95\%CI)=2.5(1.4\sim4.7)$]^[2]。PD 的主要病理特征是含有原纤维的 α -突触核蛋白(alpha-synuclein, α -syn)在多巴胺(dopamine, DA)能神经元内聚集形成路易小体(Lewy body, LB)并伴随神经元的变性缺失^[3]。 α -syn 的形态结构在生理状态下是无序可溶的单体,病理状态下 α -syn 单体聚集形成分子量逐渐增加的寡聚体、原纤维、纤维体并随之产生细胞毒性^[4]。同时 α -syn 是一种丰富的神经元蛋白,在神经元的突触前末端、细胞核和细胞质中广泛分布^[5]。但在病理状态下的 α -syn 可能更趋向于存在细胞核中从而发挥更大的毒性。在 PD 患者脑组织中,神经元细胞核内 α -syn 的表达量明显升高^[6]。另有研究显示,丝氨酸 129 磷酸化可通过调节 α -syn 的核定位来增强细胞毒性^[7]。因此, α -syn 的寡聚化并向细胞核异常转移可能参与 PD 的发生与发展。本研究通过腹腔注射 PQ ($15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的染毒方法建立类 PD 样小鼠模型且以人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞作为 DA 能神经元的体外模型来探究病理状态下 α -syn 的形态及其确切的亚细胞定位,可为阐明 PQ 对 PD 的致病机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

PQ(纯度 $\geq 98\%$,美国 Sigma),兔 α -syn 多克隆抗

体(美国 Cell Signaling Technology),兔 α -syn 单克隆抗体(美国 Abcam, Proteintech),酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz),兔 Lamin B1 单克隆抗体(美国 Abcam),鼠 β -actin 单克隆抗体、鼠 GAPDH 单克隆抗体、免疫组化通用型二步法试剂盒(中国北京中杉金桥生物技术有限公司),SH-SY5Y 细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库),胎牛血清(FBS)(美国 Biological Industries),DMEM/F12 基础培养基(美国 Gibco),胰蛋白酶(中国北京索莱宝科技有限公司),硫黄素 T(美国 MCE),全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白含量检测试剂盒(中国南京凯基生物科技有限公司),核蛋白/胞浆蛋白提取试剂盒(中国上海贝博生物科技有限公司),人 α -syn 酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(中国上海信裕生物科技有限公司),Smart 3.0 小动物行为系统(西班牙 Panlab 公司),细胞超声破碎仪(中国上海微弥科技有限公司),蛋白垂直电泳仪、印迹转膜仪、凝胶成像系统(Gel Doc XR)(美国 Bio Rad),倒置荧光显微镜、图像采集系统(美国 ECHO)。

1.2 动物分组及给药方法

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 48 只,体重(22 ± 2)g,购自宁夏医科大学实验动物中心[动物质量合格许可证编号:SCXK(宁)2020-0001]。经宁夏医科大学实验动物中心实验动物福利伦理委员会审核后,实验过程符合要求,可进行实验(批准号:IACUC-NYLAC-2020-172)。饲养温度为(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,湿度为 50%~60%,给予自由饮水和摄食,每周更换 2~3 次垫料。适应性饲养一周后

将 48 只小鼠随机分为 2 组: 对照组和模型组每组各 24 只, 对照组腹腔注射等容量 0.9% 生理盐水, 模型组腹腔注射 PQ ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每周注射 2 次且分别连续注射 4、6、8 周。

1.3 神经行为学测试

行为学测试在染毒结束 2 d 后进行。(1) 旷场实验: 旷场实验可评价小鼠在新环境中的自主行为和探究行为。将小鼠放置旷场箱 ($50 \text{ cm} \times 50 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$) 中央区, 底面均匀地分为面积大小相同的 20 个区域 (6 个中心区域和 14 个外周区域)。使用 Smart 3.0 视频跟踪软件记录 10 min 内小鼠生物活动轨迹及在中心区域和外周区域的行进距离和所消耗时间。(2) 爬杆实验: 将一直径为 25 mm 的木球固定于一根长 50 cm、粗 1 cm 的木杆上, 木杆上缠上纱布以防打滑。将小鼠放置木球顶端, 记录小鼠从木球上下来所需要的时间。

1.4 取材及样品处理

小鼠 (每组 $n=4$) 腹腔注射 0.3% (质量分数) 乌拉坦 (每 10 g 体重注射 0.1 mL), 至深度麻醉后开胸, 剪破右心耳, 先经左心室快速灌注 0.9% (质量分数) 生理盐水直至血液冲到无色后缓慢灌注 4% (质量分数) 多聚甲醛缓冲液 20 min (至全身僵硬、各脏器发白)。冰上断头取脑, 并将脑组织放于多聚甲醛固定液位于 4°C 冰箱中固定, 48 h 后进行组织定位、脱水、石蜡包埋、切片, 片厚 $4 \mu\text{m}$ 。另取小鼠 (每组 $n=4$) 经预冷的 0.9% 生理盐水灌注后, 冰上快速分离中脑组织后用于蛋白含量的测定。

1.5 小鼠中脑 TH、 α -syn 免疫组织化学染色 (immunohistochemical staining, IHC)

将切片脱蜡水化后置于 $\text{pH}=6.0$ 的枸橼酸盐修复液恒温水浴锅 98°C 修复 15 min, 待其自然冷却至室温后孵育内源性过氧化物酶阻断剂 20 min; $1 \times \text{PBS}$ 冲洗 3 min、3 次; 山羊血清封闭液 10 min; 滴加一抗 TH ($1:300$)、 α -syn ($1:200$); 置于湿盒内 4°C 孵育过夜; 第二天室温下复温 45 min, $1 \times \text{PBST}$ 冲洗 3 min、3 次; 反应增强液 20 min; $1 \times \text{PBST}$ 冲洗 3 min、3 次; 二抗孵育 20 min; $1 \times \text{PBST}$ 冲洗 3 min、3 次; DAB 显色 10~20 s; 蒸馏水冲洗 30 s; 苏木素复染 2 min; 1% 盐酸酒精分化 5 s; 进行脱水、透明、封片, 于光镜下进行拍片, Image J 1.52 图像分析软件测量每个视野下阳性区域的平均光密度值作为蛋白的相对表达量。

1.6 小鼠中脑 TH、 α -syn 的蛋白免疫印迹法 (Western blotting, WB) 法检测

将每 100 mg 待测中脑组织中加入 $800 \mu\text{L}$ Lysis

Buffer 于高通量组织裂解仪上充分研磨, 制备成匀浆后置于 1.5 mL 预冷的离心管中, 低温离心 ($12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 离心半径 5 cm), 取上清, BCA 法进行蛋白定量。每组蛋白上样量均为 $50 \mu\text{g}$, 使用 10% 或 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶以 80、120 V 条件进行电泳。依据目的蛋白相对分子量大小采用恒压 100 V、不同时间水浴电转移法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜; 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 分别加入一抗 TH ($1:1000$)、 α -syn ($1:1000$)、GAPDH ($1:1000$)、 β -actin ($1:1000$) 4°C 孵育过夜, TBST 液洗 5 min、3 次; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 ($1:2000$) 室温孵育 1 h, TBST 液洗 10 min、3 次; 采用 ECL 试剂盒显影, 全自动化学发光检测仪拍照。利用图像分析软件 Image J 1.52 分析目的蛋白表达灰度值, 目的条带灰度值与内参条带灰度值之比作为蛋白的相对表达量。

1.7 SH-SY5Y 细胞培养

将细胞置于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM/F12 培养基进行培养, 当细胞密度达到 80%~85% 时用 0.25% 胰酶消化细胞, 按照比例 1:3 进行传代。选取对数生长期细胞, 调节细胞密度制成细胞悬液, 根据实验需要接种于不同的培养板。

1.8 SH-SY5Y 细胞中 α -syn 的 WB 法检测

将 SH-SY5Y 细胞以密度 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种到 10 cm 培养皿中, 待细胞生长至约 80%, 终浓度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PQ 分别处理 0、12、24、36、48 h, 收集细胞于 2 mL 离心管中, 各管细胞重悬计数后根据细胞量加入对应量的细胞裂解液, 超声仪充分裂解细胞, $1000 \times g$ 、 4°C 离心 5 min, 取上清为总蛋白; 同上收集细胞后, 各管细胞重悬计数后加入试剂盒对应的 A 液裂解细胞, $1000 \times g$ 、 4°C , 离心 10 min, 取上清为细胞质蛋白; 各管加入对应的 B 液溶解沉淀, $14000 \times g$ 、 4°C , 离心 10 min, 上清为细胞核蛋白; BCA 法进行细胞蛋白定量。分别取细胞全蛋白、核蛋白和浆蛋白 ($10 \mu\text{g}$) 进行 WB 实验, 方法同“1.6”。

1.9 免疫荧光法 (immunofluorescence assay, IFA) 检测 SH-SY5Y 细胞核中 α -syn 的定位情况

将细胞以 3×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 密度接种到提前置入 14 mm 玻片的 24 孔板中, 待细胞长至 70% 左右, 使用终浓度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PQ 处理细胞不同时间; 预冷的 PBS 清洗 5 min、3 次; 每孔加入预冷 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, PBS 清洗 5 min、3 次; 体积分数 0.5% TritonX-100 破膜 5 min, PBS 清洗 5 min、3 次; 4°C 1% BSA 封闭 1 h, PBS 清洗 5 min、3 次; 加入 α -syn 一抗

(1:100), 于 4 °C 孵育过夜; PBS 清洗 5 min、3 次, 加入荧光二抗(1:100), 室温避光孵育 1 h, PBS 清洗 5 min、3 次。取出细胞玻片, 细胞面倒扣在滴有 DAPI 的载玻片上, 等待 24 h 左右后于倒置荧光显微镜观察并拍照。硫磺素-T 是一种可以与含有 β -折叠层样结构的淀粉样蛋白结合后荧光强度增强的活性染料。蓝色荧光标记细胞核 DAPI, 红色荧光标记 α -syn, 绿色荧光标记硫磺素-T。利用图像分析软件 Image J 1.52 分析蛋白表达的荧光强度和共定位程度。

1.10 SH-SY5Y 细胞上清液 α -syn 的 ELISA 检测

终浓度 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ 分别处理细胞 0、12、24、36、48 h, 离心取上清液。在酶标包被板上加待测样品稀释液 40 μL , 然后再加待测样品 10 μL , 轻轻晃动混匀; 用封板膜封板后置 37 °C 温育 30 min; 弃去液体, 甩干, 静置洗涤 30 s、5 次, 拍干; 每孔加入酶标试剂 50 μL , 除空白孔; 封板后置 37 °C 温育 30 min; 弃去液体, 甩干, 静置洗涤 30 s、5 次, 拍干; 每孔先加入显色剂 A 50 μL , 后加入显色剂 B 50 μL , 轻轻震荡混匀, 37 °C 避光显色 15 min; 每孔加终止液 50 μL , 终止反应; 以空白孔调零, 450 nm 波长测量各孔 D 值。

1.11 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计分析。完全随机设计资料的多组均数比较采用单向方差分析(One-way ANOVA), 组间两两比较采用 Dunnett- t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

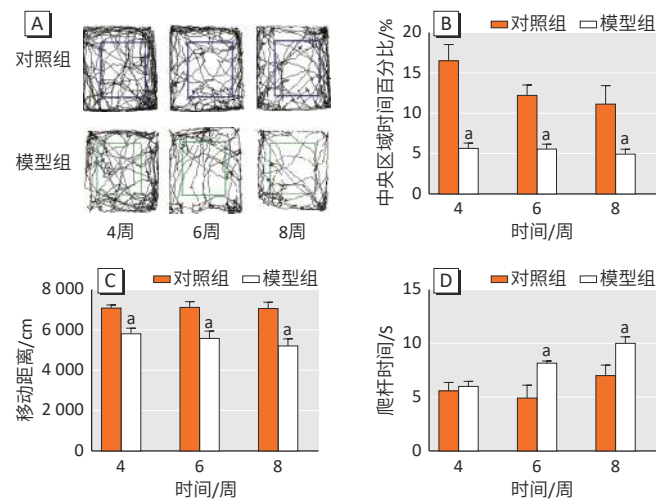
2.1 PQ 暴露对小鼠运动能力的影响

旷场实验结果显示(图 1A), 与对照组比较, 模型组小鼠周边区域停留时间增长, 中央区域停留时间降低(图 1B), 同时伴随移动距离明显减少(图 1C), 差异有统计学意义($P<0.05$), 提示 PQ 可引起小鼠自主行为增加而探究行为减少。爬杆实验结果显示(图 1D), 与对照组比较, 6 周和 8 周模型组小鼠的爬杆时间明显增加, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 PQ 暴露对小鼠中脑 TH、 α -syn 表达的影响

IHC 结果显示(图 2A), TH 阳性表达染色呈棕色, 对照组显示神经元数量多且轴突清晰, 而模型组随 PQ 染毒时间增加, TH 阳性数量逐渐减少且轴突模糊, 6、8 周与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)(图 2B)。WB 显示同样结果, 与对照组相比, 模型组在 6、8 周 TH 表达量减少, 差异有统计学意义($P<0.05$)。IHC 结果显示(图 2A), α -syn 阳性染色呈棕黄色, 对照组仅见

微量阳性染色, 而随 PQ 染毒时间增加, α -syn 阳性表达量逐渐增加($R^2=0.8410$, $P<0.05$), 4、6、8 周与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)(图 2C)。WB 结果同样显示, 模型组 α -syn 寡聚体相对表达量随染毒时间增加逐渐增加($R^2=0.9898$, $P<0.05$), DA 能神经元 α -syn 聚集体的形成增加(图 2D、2F)。



[注] A: 旷场实验运动轨迹图, 蓝色、绿色方框表示中央区域; B: 旷场实验中央区域时间百分比; C: 旷场实验移动距离; D: 爬杆时间。
a: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

图 1 各组小鼠的运动能力变化 ($n=8$)

Figure 1 Changes in motor ability of mice in each group ($n=8$)

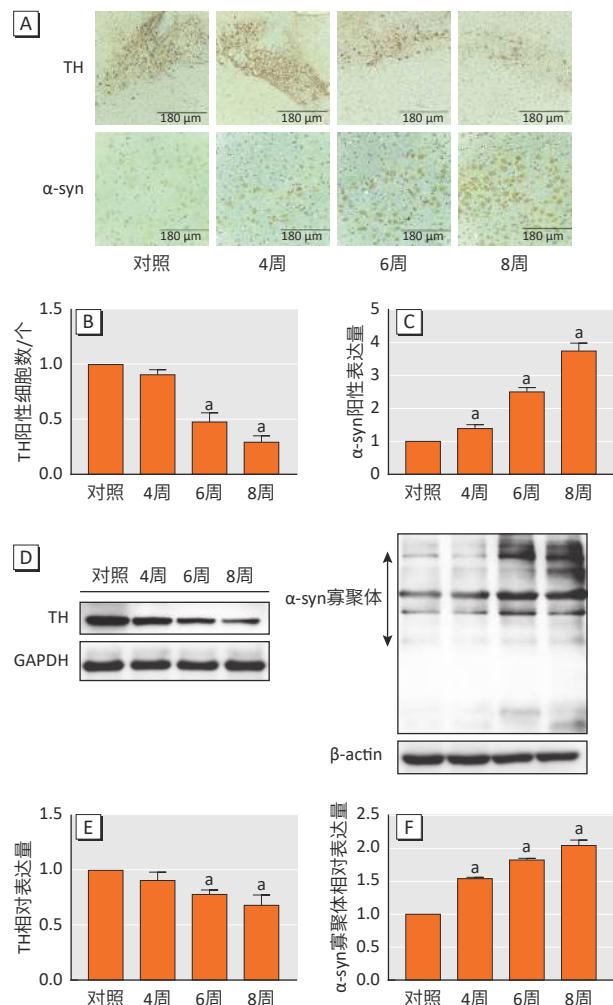
2.3 PQ 暴露对 SH-SY5Y 细胞中 α -syn 表达的影响

WB 结果显示(图 3A), α -syn 寡聚体相对表达量呈时间依赖性增加($R^2=0.7440$, $P<0.05$), 其中 24、36、48 h 与 0 h 相比差异有统计学意义($P<0.05$)(图 3B)。

2.4 PQ 对 SH-SY5Y 细胞细胞核中 α -syn 的影响

WB 结果显示(图 4A), α -syn 寡聚体的相对表达量随染毒时间依赖性增加($R^2=0.7913$, $P<0.05$), 其中 24、36、48 h 与 0 h 相比差异有统计学意义($P<0.05$)(图 4B)。IFA 双染结果显示(图 4C), 与 0 h 组相比, 红色荧光主要分布在细胞核并随染毒时间增加荧光共定位程度增加, 其余各组与 0 h 组相比差异均有统计学意义($P<0.05$)(图 4D), 且红色荧光强度逐渐增强, 其中荧光强度在 24、36、48 h 与 0 h 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)(图 4G), 提示 α -syn 在细胞核内聚集即向核易位。与 0 h 组相比, 随染毒时间的增加, 红色荧光与绿色荧光共定位程度也增加, 表明异常聚集的 α -syn 含有 β -折叠层样结构, 其构象发生寡聚化(图 4F)。与 0 h 组相比, 绿色荧光同样分布在细胞核并随染毒时间增加荧光共定位程度增加, 其余各组与 0 h 组相比差异均有统计学意义($P<0.05$)(图 4E), 且

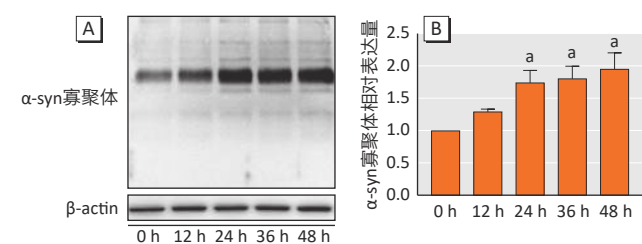
绿色荧光强度逐渐增强,表明 α -syn 可能更倾向于以寡聚体的形式进入到细胞核中,其中荧光强度在 24、36、48 h 与 0 h 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$) (图 4G)。



[注] A: 小鼠中脑 TH、 α -syn IHC 染色($\times 200$); B: 小鼠中脑 TH 阳性细胞数量; C: 小鼠中脑 α -syn 阳性表达量; D: 小鼠中脑 TH、 α -syn 蛋白条带图; E: TH 蛋白条带定量图; F: α -syn 蛋白条带定量图。a: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠中脑 TH 及其 α -syn 表达情况 ($n=3$)

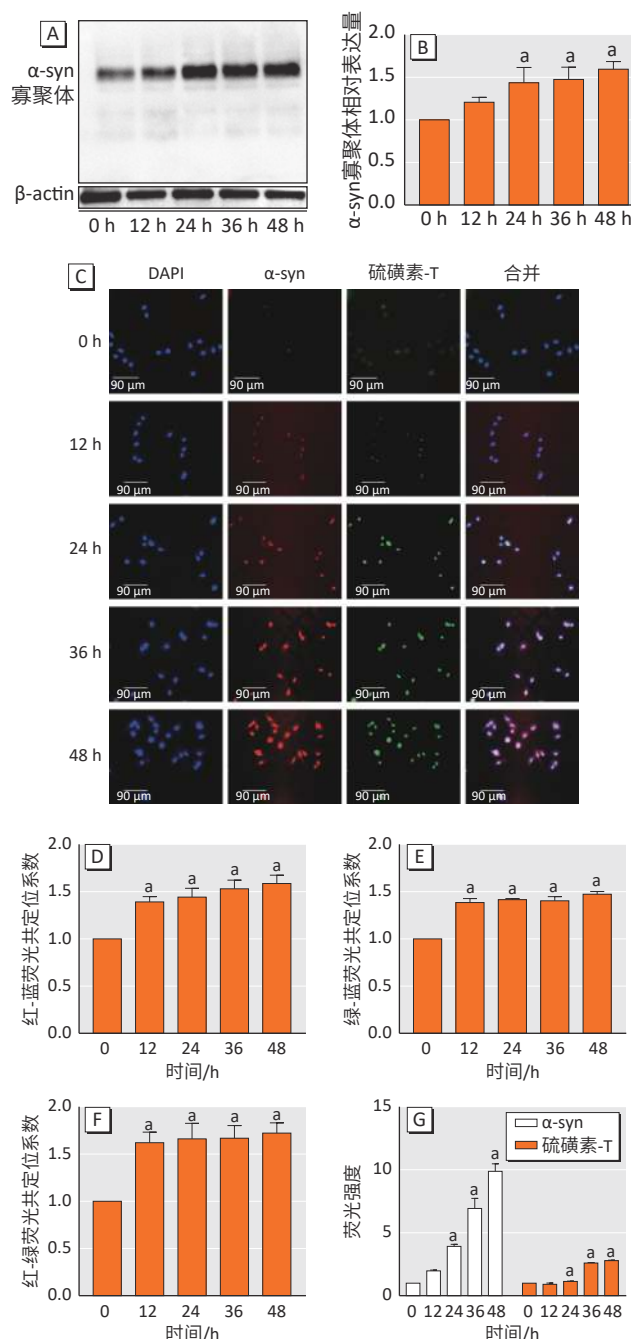
Figure 2 TH and α -syn expressions in the midbrain of mice ($n=3$)



[注] A: 细胞全蛋白中 α -syn 蛋白条带图; B: 全蛋白 α -syn 蛋白定量图。a: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 PQ 处理 SH-SY5Y 细胞不同时间后 α -syn 的表达情况 ($n=3$)

Figure 3 Expressions of α -syn in SH-SY5Y cells after PQ treatment for different time ($n=3$)



[注] A: 细胞核中 α -syn 蛋白条带图; B: 细胞核中 α -syn 蛋白定量图; C: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ 处理不同时间后 α -syn 与硫磺素-T IF 双标结果 ($\times 200$); D: α -syn 与细胞核共定位分析; E: 硫磺素-T 与细胞核共定位分析; F: α -syn 与硫磺素-T 共定位分析; G: α -syn 与硫磺素-T 荧光强度定量图。a: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 PQ 处理 SH-SY5Y 细胞不同时间后细胞核中 α -syn 的表达情况 ($n=3$)

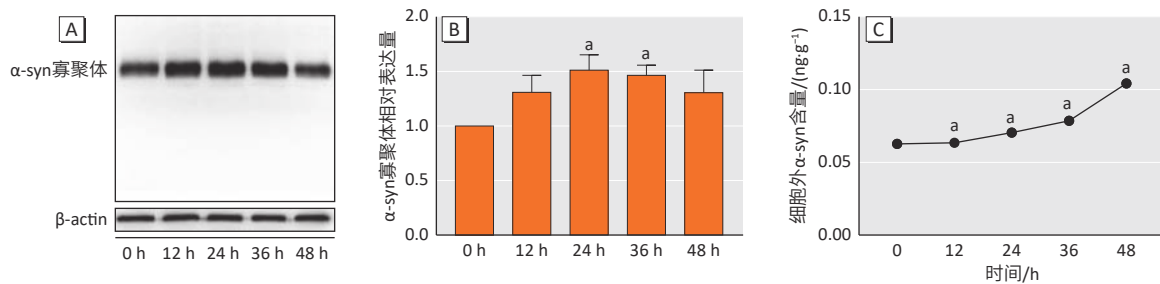
Figure 4 Expressions of α -syn in the nucleus of SH-SY5Y cells treated with PQ for different time ($n=3$)

2.5 PQ 暴露对 SH-SY5Y 细胞中 α -syn 位置动态变化的影响

WB 结果显示 (图 5A), α -syn 寡聚体的相对表达量随染毒时间增加呈现先增加后减少的趋势,其中在

24、36 h 与 0 h 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 5B)。ELISA 结果显示 (图 5C), SH-SY5Y 细胞所释放

的 α -syn 呈时间依赖性增加, 其余各组与 0 h 组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。



[注] A: 细胞浆蛋白中 α -syn 蛋白条带图; B: 细胞浆蛋白 α -syn 蛋白定量图 ($n=3$); C: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PQ 处理不同时间后细胞上清中 α -syn 含量的变化 ($n=7$)。a: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 PQ 处理 SH-SY5Y 细胞不同时间对 α -syn 位置动态变化的影响

Figure 5 Dynamic changes of α -syn location in SH-SY5Y cells treated with PQ for different time

3 讨论

PQ 与公认的 PD 诱导剂 1-甲基-4-苯基吡啶离子具有极为相似的化学结构, 并且多项流行病学研究显示, 通过劳作、饮水及食物等方式长期低剂量接触 PQ 的人群, PD 等中枢神经系统退行性疾病的发病风险会明显增加, 因此, PQ 被认为是散发性 PD 的重要环境毒素之一^[8]。有数据表明, 1990 年至 2010 年期间, 因 PD 导致的伤残年数和伤残调整寿命年数不断增加, 预计随着世界人口老龄化, PD 的社会和经济负担逐步增加, 将成为全球重要的公共卫生问题^[9-10]。本次运动行为学研究结果显示模型组小鼠出现了运动能力异常, 表现为小鼠周边区域停留时间增长, 中央区域停留时间降低, 同时伴随移动距离明显减少, 爬杆时间增加等类 PD 样运动功能障碍。TH 是 DA 生物合成途径的关键酶, 为 DA 能神经元的特异性标记物。通过 IHC 发现, 随着 PQ 染毒时间的增加, 小鼠中脑 TH 表达降低表明 DA 能神经元呈进行性变性缺失。运动行为学异常与 TH 表达下降共同说明 PQ 成功诱导小鼠出现 PD 样病理特征。

PD 的组织病理学特征是在中脑 DA 能神经元以及其他脑区的神经元中出现 LB, 而含有 β -淀粉样结构的 α -syn 原纤维已被证明是 LB 的主要成分^[11]。 α -syn 异常聚集在散发性 PD 以及其他突触核蛋白病如路易体痴呆和多系统萎缩病中都具有显著的致病作用^[12]。 α -syn 是神经系统中最丰富的蛋白质之一, 由 140 个氨基酸残基组成^[13]。 α -syn 是由 3 个结构域组成的, 分别是 N 端结构域、非 β 淀粉样区以及 C 端结构域, 其中非 β 淀粉样区由于其疏水组成而允许其寡聚化, 其在体外极易聚集从而促进全长^[14]。 α -syn 在生理状态下以可溶性未折叠单体的形式存在, 与囊泡膜接

触后形成螺旋状单体, 膜上的螺旋单体可能会组装成亚稳定的生理多聚体^[15]。相反在病理状态下未折叠的单体相互作用形成最初不稳定的二聚体, 后聚集形成不同形态的寡聚体, 最终转化为原纤维, 这些淀粉样原纤维的积累导致了细胞内内含物 LB 的形成^[16]。在 α -syn 纤维形成和聚集过程中, 中间体-寡聚体和原纤维毒性增强^[17]。有研究显示 α -syn 的聚集和寡聚化过程能增加 α -syn 的毒性, 干扰正常的细胞功能和促进 DA 能神经元变性^[18]。体外研究表明, α -syn 寡聚体干扰突触蛋白的轴突运输, 导致突触功能障碍并最终导致神经退化^[19]。本次研究显示, 作为 PD 典型病理特征的 α -syn, 总表达量与寡聚化 α -syn 的表达量均呈时间依赖性增加, 细胞实验同样发现 α -syn 寡聚体的表达量随 PQ 染毒时间的增加而增加, 提示 α -syn 的聚集和寡聚化可能参与了 PQ 诱导的 DA 能神经元进行性损伤。

近来有研究发现, α -syn 可以逐渐向细胞核转移从而发挥更大的毒性^[20]。尽管 α -syn 分布广泛, 但在病理状态下更趋向于向细胞核聚集, 从而改变细胞的正常生理状态, 促进 PD 的发展。 α -syn 野生型和突变型 A30P 在核内过表达不仅促进 Ser129 的磷酸化水平, 且会诱导 DNA 损伤修复相关基因表达下调, 从而造成 DNA 损伤^[21]。此外, α -syn 的核易位增强了所培养神经元 SH-SY5Y 毒性以及升高 PD 相关基因的表达水平^[22], 再次提示 α -syn 核易位与 PD 发病密切相关。但目前尚未清楚 α -syn 是以何种形态结构向细胞核易位。本次研究结果表明, 随 PQ 染毒时间的增加, DA 能神经元内的 α -syn 表达量逐渐增加, 但在对不同亚细胞位置分别定量时发现, 细胞质表达的 α -syn 随染毒时间延长先增加后减少, 细胞核内的表达量逐渐递增, IFA 结果同样显示寡聚体 α -syn 表达量逐渐增加并

向细胞核易位。此次研究还发现,随 PQ 染毒时间的增加细胞所释放的 α -syn 也呈现增多趋势。因此,本研究不仅发现 PQ 可以放大 α -syn 的释放,还重点发现 PQ 可以引起寡聚体 α -syn 增加并向细胞核转运, α -syn 向细胞核易位与 PD 发病密切相关,通过有效方法抑制 α -syn 核易位或许可作为 PD 的治疗策略之一。

综上所述,PQ 对 DA 能神经元的损伤致 PD 可能通过促进寡聚体 α -syn 的表达并向细胞核易位的方式进行。 α -syn 作为散发性 PD 的核心因素,抑制其寡聚化并向细胞核转移可作为 PD 治疗的新靶点,但具体机制仍有待研究。本次研究的局限性首先在于未使用靶向寡聚体 α -syn 的抗体来证明其发生寡聚化,其次并未阐明寡聚化的 α -syn 如何向细胞核转移进而发挥更大的毒性。因此在接下的研究中,深入 PQ 如何引起 α -syn 发生寡聚化从而进入细胞核并发挥神经毒性作用的研究将有助于更好地阐明 PD 的发病机制,进而有助于相关药物的研发。

参考文献

- [1] FLEMING SM. Mechanisms of gene-environment interactions in Parkinson's disease[J]. *Curr Environ Health Rep*, 2017, 4(2): 192-199.
- [2] TANNER CM, KAMEL F, ROSS GW, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease[J]. *Environ Health Perspect*, 2011, 119(6): 866-872.
- [3] OBESO JA, STAMELOU M, GOETZ CG, et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: a special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy[J]. *Mov Disord*, 2017, 32(9): 1264-1310.
- [4] HAYAKAWA H, NAKATANI R, IKENAKA K, et al. Structurally distinct α -synuclein fibrils induce robust parkinsonian pathology[J]. *Mov Disord*, 2020, 35(2): 256-267.
- [5] ZHANG L, ZHANG C, ZHU Y, et al. Semi-quantitative analysis of α -synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: an immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody[J]. *Brain Res*, 2008, 1244: 40-52.
- [6] ROUSSEAU MW, DE HARO M, LASAGNA-REEVES CA, et al. TRIM28 regulates the nuclear accumulation and toxicity of both α -synuclein and tau[J]. *eLife*, 2016, 5: e19809.
- [7] PINHO R, PAIVA I, JERCIC KG, et al. Nuclear localization and phosphorylation modulate pathological effects of α -synuclein[J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(1): 31-50.
- [8] TRANCHANT C. Introduction and classical environmental risk factors for Parkinson[J]. *Rev Neurol (Paris)*, 2019, 175(10): 650-651.
- [9] VOS T, FLAXMAN AD, NAGHAVI M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2163-2196.
- [10] MURRAY CJ L, VOS T, LOZANO R, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2197-2223.
- [11] GUO M, WANG J, ZHAO Y, et al. Microglial exosomes facilitate α -synuclein transmission in Parkinson's disease[J]. *Brain*, 2020, 143(5): 1476-1497.
- [12] SHAHNAWAZ M, MUKHERJEE A, PRITZKOW S, et al. Discriminating α -synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy[J]. *Nature*, 2020, 578(7794): 273-277.
- [13] BERNAL-CONDE LD, RAMOS-ACEVEDO R, REYES-HERNÁNDEZ MA, et al. Alpha-synuclein physiology and pathology: a perspective on cellular structures and organelles[J]. *Front Neurosci*, 2020, 13: 1399.
- [14] PONZINI E, DE PALMA A, CERBONI L, et al. Methionine oxidation in α -synuclein inhibits its propensity for ordered secondary structure[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(14): 5657-5665.
- [15] HÖGEN T, LEVIN J, SCHMIDT F, et al. Two different binding modes of α -synuclein to lipid vesicles depending on its aggregation state[J]. *Biophys J*, 2012, 102(7): 1646-1655.
- [16] JAN A, GONÇALVES NP, VAEGTER CB, et al. The prion-like spreading of Alpha-synuclein in Parkinson's disease: update on models and hypotheses[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8338.
- [17] INGELSSON M. Alpha-synuclein oligomers-neurotoxic molecules in Parkinson's disease and other lewy body disorders[J]. *Front Neurosci*, 2016, 10: 408.
- [18] KAYED R, DETTMER U, LESNÉ SE. Soluble endogenous oligomeric α -synuclein species in neurodegenerative diseases: expression, spreading, and cross-talk[J]. *J Parkinsons Dis*, 2020, 10(3): 791-818.
- [19] SCOTT DA, TABAREAN I, TANG Y, et al. A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in α -synuclein-induced neurodegeneration[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(24): 8083-8095.
- [20] 赵云, 韩玉坤, 郑焱, 等. 不同亚细胞定位的 α -突触核蛋白对SK-N-SH细胞的毒性影响[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(2): 164-170.
ZHAO Y, HAN YK, ZHENG Y, et al. Effects of subcellular localized α -Synuclein on the viability of SK-N-SH cells[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2019, 35(2): 164-170.
- [21] PAIVA I, PINHO R, PAVLOU MA, et al. Sodium butyrate rescues dopaminergic cells from α -synuclein-induced transcriptional deregulation and DNA damage[J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(12): 2231-2246.
- [22] DAVIDI D, SCHECHTER M, ELHADI SA, et al. α -synuclein translocates to the nucleus to activate retinoic-acid-dependent gene transcription[J]. *iScience*, 2020, 23(3): 100910.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 陈姣)