

蛋白酶体功能障碍对散发性帕金森病发病机制影响的探讨

卢健军, 王展航, 王玉周, 潘梦秋, 匡祖颖, 叶锦龙, 李波, 徐炎

作者单位: 510510 广州, 广东三九脑科医院神经内一科

作者简介: 卢健军(1978-), 男, 大学本科, 学士学位, 主治医师, 研究方向: 帕金森病及相关疾病的诊治。E-mail: Drlujianjun1978@163.com

[摘要] **目的** 探讨蛋白酶体功能障碍对散发性帕金森病的发病机制的影响。**方法** 观察组大鼠 50 只, 将蛋白酶抑制剂注入大鼠的右侧黑质致密部位, 构建蛋白酶体功能障碍模型, 对照组大鼠 50 只采用生理盐水注射。观察两组大鼠的行为学改变情况, 通过 HE 染色检测路易(小)体形成率, 半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、Western blotting 分子生物学方法检测黑质部位 α -突触核蛋白(α -Syn)表达情况。**结果** 观察组路易(小)体形成率高于对照组($P < 0.01$)。RT-PCR、Western blotting 分子生物学检测结果显示观察组 α -Syn 显著高于对照组($P < 0.01$)。**结论** 蛋白酶体功能障碍可以导致路易(小)体形成率及黑质部位 α -Syn 形成, 是散发性帕金森病的危险因素。

[关键词] 路易(小)体形成率; α -突触核蛋白; 散发性帕金森; 发病机制

[中图分类号] R 741 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2017)12-1176-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2017.12.14

Effect of proteasome dysfunction on the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease LU Jian-jun, WANG Zhan-hang, WANG Yu-zhou, et al. The First Department of Neurology, Guangdong 999 Brain Hospital, Guangzhou 510510, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of proteasome dysfunction on the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease. **Methods** The rat model of proteasome dysfunction was made by injecting protease inhibitor into the right site of substantia nigra (the observation group, $n = 50$). The rats in the control group ($n = 50$) were injected with saline injection ($n = 50$). The changes of behavior, the Louis (small) formation rate evaluated by HE staining and the expression of α -synuclein (α -Syn) in substantia nigra detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting molecular biology were compared between the two groups. **Results** The Louis (small) formation rate in the observation group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). The levels of the expression of α -Syn in the observation group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Proteasome dysfunction can lead to high Louis (small) formation rate and the expression of α -Syn in the substantia nigra, which is a risk factor for the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease.

[Key words] Louis (small) formation rate; α -synuclein (α -Syn); Sporadic Parkinson; Pathogenesis

原发性帕金森是一种慢性的神经系统疾病, 是一种中老年的常见性疾病, 临床上主要表现为震颤、肌肉强直、运动迟缓等, 主要的病理特征是出现黑质的致密部位多巴胺能神经元的选择性丧失, 出现残存路易小体。本病包括帕金森病痴呆和路易体痴呆, 其中 90% 的患者呈现散在发生, 即散发性的帕金森^[1]。目前本病主要的治疗方法包括药物及外科手术治疗, 但是都只是针对病症, 并不能阻止疾病

的进程, 致残率相当高。本病的发病机制尚未完全明确, 与遗传及环境因素有关, 研究发现蛋白纤维化是散发性帕金森导致神经元死亡的重要原因^[2]。在疾病形成的过程中, α -突触核蛋白 (α -Syn) 是与本病最为密切的相关蛋白, 具有一定的神经毒性, 同时受到脂肪酸的作用, 在蛋白酶体功能障碍时会发生结构和构象变化, 泛素-蛋白酶体系是细胞蛋白的重要系统, 可以参与降解蛋白质和氧化蛋白质^[3]。

帕金森患者中黑质致密部位氧化损伤的蛋白质表达升高。多项研究都表明蛋白酶体可诱导神经细胞凋亡,同时促进胞质内泛素/ α -共核蛋白免疫反应阳性包涵体形成^[4],提示蛋白酶体障碍对神经系统发病起着重要作用。本研究通过探讨蛋白酶体功能障碍对散发性帕金森病发病机制的影响,以期为研究散发性帕金森病发病机制提供依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、细胞与仪器 广东动物实验中心的8周健康的100只雄性Wistar大鼠作为本研究对象,体重为250~300g。逆转录试剂盒(MBI公司,美国),辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔IgG、HRP标记山羊抗小鼠IgG(碧云天生物技术有限公司),Goat anti-rabbit IgG HRP, Goat anti-mouse IgG-HRP, α -Syn rabbit polyclonal IgG和 β -actin(C4)mouse monoclonal IgG1(购自美国Santa Cruz Biotechnology公司),避光4℃保存。半干式转移和电泳仪(购自美国BIO-RAD公司)。倒置相差显微镜(OLYMPUS,日本)、全能型高性能台式冷冻离心机(Heaeus, Biofuge Stratos 德国)、深低温冰箱(SANYO, AltraLow 日本)、实时定量荧光PCR仪(Rotor-gene3000, 澳大利亚)。

1.2 实验方法 观察组大鼠50只腹腔注射戊巴比妥钠25g/L进行麻醉,利用立体定向仪(Queue systems TM2711, 美国),切开大脑的脑颅部,暴露出颅骨,在坐标骨膜下完成钻孔ML=3.2mm, AP=-5.2mm, DV=7.2mm,将Lactacystin 10 μ g以速度0.5 μ l/min注射至大鼠右侧黑质中,留针10min可进行缓慢退针。对照组大鼠50只进行同样的麻醉和定位,待钻孔完成将生理盐水以0.5 μ l/min的速度注入到大鼠右侧黑质中,留针10min可进行缓慢退针。继续喂养大鼠21d。所有大鼠均在清洁级实验室中采用单笼饲养,温度20~22℃,相对湿度55%~65%。喂食基础饲料,自由摄食、饮食。观察组大鼠出现自主活动减少、觅食差、体重减轻、弓背、竖毛等症状,对照组大鼠未见类似行为改变。所有大鼠饲养21d后予以40g/L多聚甲醛从左心室灌注固定,将大鼠断头取脑,将双侧黑质分离,并在冰上进行组织匀浆器充分匀浆,之后将其转移至EP管中,以14000r/min离心30min,取上清液移至新EP管保存,使用前经BCA法测定蛋白浓度。

1.3 HE染色 采用SP检测法,切片脱蜡,加入3%过氧化氢封闭阻断内源性过氧化物酶,50 μ l非免疫动物血清封闭,加HE染色剂,中性树脂固封。结果

判定:阳性细胞为细胞胞浆膜在倒置显微镜下出现深棕黄色的染色。

1.4 半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法 取组织100mg,提取总RNA。取2 μ g总RNA行逆转录cDNA,反应体系为20 μ l。吸取逆转录产物2 μ l,分别加入18sRNA、 α -Syn的引物进行PCR反应。反应条件均为95℃预变性5min,94℃变性30s,60℃30s,72℃60s,72℃7min,循环30次。PCR产物溴化乙锭1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统下进行观察并拍摄电泳图像。以18sRNA作为内参照,进行PCR产物的半定量分析,测量各电泳条带之吸光度积分值(A值)。

1.5 Western blotting方法 取组织提取100mg总蛋白。SDS-PAGE凝胶电泳,半干法转膜,加 α -Syn一抗(1:500),4℃孵育过夜;HRP标记的羊抗兔二抗(1:1000)37℃孵育1h。电子发光(ECL)光化学法显色,用彩色图像分析系统测定吸光度。

1.6 统计学方法 应用SPSS19.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用t检验,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠路易(小)体形成率的比较 两组大鼠HE染色结果显示观察组路易(小)体形成率高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表1。

表1 两组大鼠路易(小)体形成率的比较[n(%)]

组别	动物数	非实验侧	实验侧
观察组	50	2(4.0)	46(92.0)
对照组	50	1(2.0)	2(4.0)
χ^2	-	0.344	74.079
P	-	0.560	0.000

2.2 两组大鼠 α -Syn mRNA相对表达量的比较 RT-PCR检测结果显示观察组 α -Syn显著高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表2。

表2 两组大鼠 α -Syn mRNA相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	非实验侧	实验侧
观察组	50	0.68 \pm 0.23	1.56 \pm 0.45
对照组	50	0.72 \pm 0.2	0.80 \pm 0.31
t	-	2.072	9.712
P	-	0.110	0.000

2.3 两组大鼠 α -Syn蛋白表达的比较 Western blotting分子生物学检测结果显示观察组 α -Syn显著高于

对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表3。

表3 两组大鼠 α -Syn 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	非实验侧	实验侧
观察组	50	1.52 ± 0.72	3.23 ± 1.99
对照组	50	1.56 ± 0.86	1.69 ± 0.86
<i>t</i>	-	0.810	6.499
<i>P</i>	-	0.540	0.000

3 讨论

3.1 帕金森病是临床上常见的神经退行性疾病,是与选择性的中脑黑质致密部位的多巴胺能神经元丢失和退化相关,主要特征是中枢神经系统的变性^[5]。最新的研究发现蛋白酶体受到抑制可以导致神经细胞的死亡,形成胞质的泛素- α -共核蛋白免疫反应包涵体,使神经元退变,伴随着黑质致密部位多巴胺的丧失,出现神经元的损伤,有研究发现蛋白酶体受损之后,多巴胺能神经元会使蛋白酶抑制剂敏感性提高,个别神经细胞出现凋亡,通过选择性损伤的机制促使神经细胞的氧自由基增多,需要蛋白酶体来清除这些受损的蛋白^[6-8]。蛋白酶体抑制剂选择性损害多巴胺能神经元可能与 α -共核蛋白削弱了突触囊泡对多巴胺的储存,从而进一步增加了胞浆内多巴胺及氧自由基,进而导致细胞氧化受损^[9]。黑质致密部的多巴胺能神经元的路易(小)体是诊断帕金森病的重要依据,也是帕金森病主要病理特征。有研究发现大部分散发性帕金森病具有明显的路易(小)体形成,而染色体隐性遗传患者并无明显路易(小)体形成,提示路易(小)体形成情况利于提高家族型和散发性帕金森病的检出率^[10,11]。

3.2 目前临床尚未明确 α -Syn的正常功能,在多数散发性帕金森病病例中未发现其基因突变,提示 α -Syn可能在散发性帕金森病发病中起着重要作用。泛素蛋白酶体系统是 α -Syn的主要降解途径,如果发生障碍则会导致 α -Syn聚集,从而诱发散发性帕金森病的发病^[12]。研究发现蛋白酶体成为影响细胞功能的重要药物靶点。该靶点的抑制剂在临床研究中被广泛应用, α -共核蛋白的生理功能尚不清楚,同时散发性帕金森患者的黑质致密部内 α -共核蛋白量增多^[13,14]。通过多种翻译后修饰形式,引起黑质多巴胺能神经元死亡,中脑黑质内多种细胞、生化及分子改变已被发现,散发性帕金森患者蛋白酶体 α 亚单位丢失,蛋白酶体活化因子表达下降,水解功能减弱^[15]。大量的研究表明在帕金森病发病机制中蛋白酶体功能下降起重要作用,参与了黑质的神

经元内蛋白质聚集及神经元变性^[16]。本研究结果显示,HE染色结果显示观察组路易(小)体形成率高于对照组,两组比较差异有统计学意义;RT-PCR、Western blotting分子生物学检测结果显示观察组 α -Syn显著高于对照组,两组比较差异有统计学意义。蛋白酶体功能障碍可以导致路易(小)体形成率及黑质部位 α -Syn形成,是散发性帕金森病的危险因素。蛋白酶体功能受损后不能降解氧化受损的蛋白质,从而降低了蛋白酶体的清除能力,同时氧化受损的蛋白质集聚增多,从而造成恶性循环,导致神经元死亡^[17]。

综上所述,蛋白酶体功能障碍可导致 α -Syn聚集及路易(小)体形成,是发生散发性帕金森病的重要危险因素,蛋白酶体功能下降可引起多巴胺能神经元内 α -共核蛋白聚集导致细胞功能的紊乱,最终促进了多巴胺能神经元的凋亡,应引起相关医护人员在临床中的高度重视。

参考文献

- Miwa H, Kubo T, Suzuki A, et al. Retrograde dopaminergic neuron degeneration following intrastriatal proteasome inhibition [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 380(1-2): 93-98.
- Winklhofer KF, Haass C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(1): 29-44.
- Anthony H. Mitochondrial diseases [J]. *The Lancet*, 2012, (379): 1825-1834.
- Blandini F. Neural and immune mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013, 8(1): 189-201.
- 陈生弟, 乐卫东, 陈先文, 等. 帕金森病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 12.
- 李兴安, 张应玖, 常明, 等. 散发性帕金森病蛋白酶体功能障碍及其所致的路易(小)体形成 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(5): 502-511.
- Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2012, (18): 210-212.
- Kanthasamy A, Jin H, Mehrotra S, et al. Novel cell death signaling pathways in neurotoxicity models of dopaminergic degeneration: relevance to oxidative stress and neuroinflammation in Parkinson's disease [J]. *Neurotoxicology*, 2010, 31(5): 555-561.
- Yvonne B. Neuroinflammation Inflammatory brain drain [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(2): 69.
- Micel LN, Tentler JJ, Smith PG, et al. Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis: novel targets for anticancer therapies [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(9): 1231-1238.
- Ernst A, Avvakumov G, Tong J, et al. A strategy for modulation of enzymes in the ubiquitin system [J]. *Science*, 2013, 339(6119): 590-595.
- Collison A, Hatchwell L, Verrills N, et al. The E3 ubiquitin ligase midline 1 promotes allergen and rhinovirus-induced asthma by inhib-

- iting protein phosphatase 2A activity [J]. *Nature Med*, 2013, 19 (2):232-237.
- 13 Yoshinori O. Molecular dissection of autophagy two ubiquitin-like systems[J]. *Nature Review*, 2001, (2):211-216.
- 14 Yao H, Zhao D, Khan SH, et al. Role of autophagy in prion protein-induced neurodegenerative diseases[J]. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, 2013, 45(6):494-502.
- 15 Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease[J]. *New England J Med*, 2013, 368(7):651-662.
- 16 Rubinshtein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging[J]. *Cell*, 2011, 146(5):682-695.
- 17 Orenstein SJ, Sheng HK, Tasset I, et al. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy [J]. *Nature Neuroscience*, 2013, (3350):1-16.

[收稿日期 2017-04-05][本文编辑 黄晓红]

临床研究 · 论著

复方益消复瘫汤联合鼠神经生长因子治疗 2型糖尿病合并脑梗死的疗效评价

刘正国, 包志英, 祁琴

作者单位: 733299 甘肃, 天祝县疾病预防控制中心(刘正国); 733299 甘肃, 天祝县藏医院内科(包志英); 730020 兰州, 甘肃省第三人民医院内分泌科(祁琴)

作者简介: 刘正国(1971-), 男, 大学本科, 医学学士, 主治医师, 研究方向: 中医治疗糖尿病及并发症。E-mail: gszcdctb@126.com

通讯作者: 祁琴(1981-), 女, 大学本科, 硕士学位, 主治医师, 研究方向: 中西医结合治疗糖尿病及并发症。E-mail: 358802011@qq.com

[摘要] 目的 评价复方益消复瘫汤联合鼠神经生长因子(mNGF)治疗2型糖尿病合并脑梗死的疗效。

方法 选取2015-08~2016-08该院收治的2型糖尿病合并脑梗死患者98例作为研究对象,按照随机数字表法分为治疗组和对照组各49例。在常规降糖治疗的同时,对照组给予mNGF治疗,治疗组在对照组基础上联合复方益消复瘫汤治疗,两组均治疗8周。观察两组患者的临床疗效、神经功能、日常生活能力以及血浆内皮功能等指标。**结果** 治疗组基本痊愈5例,显效29例,有效12例,无效3例。对照组基本痊愈2例,显效23例,有效11例,无效13例。治疗组疗效优于对照组($P < 0.05$)。治疗8周后治疗组神经功能缺损评分(NIHSS)和日常生活能力量表(ADL)评分分别为(5.74 ± 1.28)分和(16.57 ± 3.43)分,均低于对照组($P < 0.01$);治疗组的内皮素(ET)值和一氧化碳(NO)值分别为(55.43 ± 6.27)pg/ml和(73.58 ± 7.40)μmol/L,均优于对照组($P < 0.01$)。**结论** 复方益消复瘫汤联合mNGF能够有效改善2型糖尿病合并脑梗死患者血糖和神经功能,提高临床疗效。

[关键词] 复方益消复瘫汤; 鼠神经生长因子; 2型糖尿病; 脑梗死; 临床疗效

[中图分类号] R 587.1; R 743.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2017)12-1179-04
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2017.12.15

The therapeutic effect of compound Yixiaofutan decoction combined with mNGF on type 2 diabetes mellitus complicated with cerebral infarction LIU Zheng-guo, BAO Zhi-ying, QI Qin. *Centre for Disease Control and Prevention of Tianzhu County, Gansu 733299, China*

[Abstract] **Objective** To evaluate the therapeutic effect of compound Yixiaofutan decoction combined with mouse nerve growth factor (mNGF) on Type 2 diabetes mellitus complicated with cerebral infarction. **Methods** Ninety-eight patients with Type 2 diabetes mellitus complicated with cerebral infarction were collected as the research subjects and were divided into the treatment group ($n = 49$) and the control group ($n = 49$) by random number table. The control group was treated with mNGF plus conventional glucose-lowering treatment, while the treatment group received the same therapy as the control group plus compound Yixiaofutan decoction. The clinical effect, neurologic function, activities of daily living and plasma endothelial function were compared between the two groups 8 weeks af-