

激活葡萄糖脑苷酯酶对帕金森病患者皮肤成纤维细胞自噬活性的影响

陈艳红 孙涛

【摘要】 目的 探讨激活葡萄糖脑苷酯酶(GBA)对帕金森病患者皮肤成纤维细胞自噬活性的影响。**方法** 取 32 例帕金森病患者的皮肤标本进行成纤维细胞体外培养,运用含有雷帕霉素及不含雷帕霉素的 GBA 培养基分别进行体外培养,用蛋白印迹法检测自噬体的经典标记物微管相关蛋白的表达。**结果** 雷帕霉素处理后 Beclin 1 和 LC3 - II /LC3-I 蛋白的表达水平增高($P<0.05$),而 α -synuclein 表达水平则下降($P<0.05$)。**结论** 激活 GBA 可以强化自噬水平,降低 α -synuclein 蛋白的表达。

【关键词】 葡萄糖脑苷酯酶 α -突触核蛋白 自噬

【中图分类号】 R742.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)02-0114-03

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.02.011

Effect of activation of glucocerebrosidase on autophagotrophic activity of skin fibroblasts in Parkinson's patients Chen Yanhong, Sun Tao. Department of Geriatrics, Taihe Hospital of Hubei Medical College, Shiyan 442000

【Abstract】 Objective To investigate the effect of activation of glucocerebrosidase on autophagotrophic activity of skin fibroblasts in Parkinson's patients. **Methods** 32 cases of Parkinson's disease were selected. Fibroblast cells were cultured in vitro with rapamycin or without rapamycin GBA culture medium respectively. Microtubule associated protein phage classic markers expression were detected by protein imprinting method. **Results** Beclin 1 and LC3 - II /LC3 - I protein expression level increased ($P<0.05$), while α -synuclein expression level decreased ($P<0.05$). **Conclusion** GBA activity can strengthen autophagy and reduce α -synuclein protein expression.

【Key words】 Glucocerebrosidase α -synuclein Autophagy

帕金森病(Parkinson's Disease, PD)是人类常见的中枢神经系统退行性疾病之一, α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)或者功能异常的细胞器(如线粒体、内质网等)的降解障碍都是导致 PD 发生的重要因素,有研究表明 α -突触核蛋白与葡萄糖脑苷酯酶(glucocerebrosidase gene, GBA)蛋白的缺乏在 PD 的发病中起到了一个双向环路的作用^[1]。自噬-溶酶体途径(Autophagy-lysosome pathway, ALP)是细胞内重要的蛋白降解途径,尤其在清除异常聚集的 α -突触核蛋白中发挥着重要作用,GBA 是溶酶体内的一种酶,且 GBA 与 α -突触核蛋白可相互影响,因此有学者推测 GBA 在自噬、溶酶体和调控 α -

syn 的表达中发挥着某种作用。为此,本实验旨在探讨 GBA 对自噬的调控及 α -syn 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料及病例资料

1.1.1 主要试剂及仪器 鼠抗人 8-Glc 单克隆抗体及羊抗鼠 IgG 均购自上海蓝基生物公司(上海,中国),取皮器产(日本),酶标仪(Bio-Rad, USA),自动洗板机(MODEL1575, USA),台式高速离心机(TGL-16G, 中国),红外荧光扫描成像仪。

1.1.2 病例资料 选择 2013 年 9 月~2015 年 9 月在湖北医药学院附属太和医院神经科及老年病科就诊的患者,其均符合原发性 PD 的标准诊断^[2]。所有患者均由同一位医生间断 3 次评估,排除帕金森综合症。原发性帕金森病组病例组共 32 例,其中男 17 例,女 15 例,平均年龄(59.08 ± 7.01)岁。

1.2 方法

基金项目:2015 年湖北省教育厅科学研究项目划指导性(项目编号为 B2015473)

作者单位:442000 十堰市太和医院湖北医药学院附属医院中医康复综合部(陈艳红);十堰市人民医院湖北医药学院附属医院泌尿外科[孙涛(通信作者)]

1.2.1 标本采集 取患者皮肤进行成纤维细胞培养,所有受试者均签署知情同意书。上臂背侧肘关节常规消毒皮肤,利多卡因局部浸润麻醉后用打孔机样取皮器旋取皮肤标本,置入加抗生素的的青霉素瓶中,在超净台内将标本转移到培养皿中,用眼科剪修剪,去除皮下脂肪组织,并将标本剪碎,取皮后创口消毒、压迫止血,用无菌纱布加压包扎。

1.2.2 细胞培养 帕金森病患者皮肤成纤维细胞用 DMEM 培养基、体积分数为0.10的胎牛血清、抗生素,于 37℃ CO₂ 孵箱中进行原代培养及传代培养,当细胞传代生长达到一定规模后可以将部分细胞冷冻保存备用,冻存的细胞应该处在生长良好(即处于对数生长期)且存活率高(90%以上)的状态。

1.2.3 分组 通过细胞计数取适量细胞,根据培养基种类分为两组,A 组(不含雷帕霉素)及 B 组(含有雷帕霉素)。

1.2.4 Western 印迹杂交分析蛋白表达水平 A 组及 B 组培养成纤维细胞 4 d 后收集并裂解细胞,定量取蛋白行 SDS-PAGE 电泳后,转膜、封闭,一抗(鼠抗人 8 — Glc 单克隆抗体,体积比为 1:500)室温作用 1 h 后洗膜 3 次,再与二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,体积比为 1:500)室温反应 1 h,洗膜后行 ECL 光化学法显色,暗室下行 x 线胶片曝光,内参为 GAPDH。2 组 Western blot 蛋白条带用平均吸光度值表示。

1.2.5 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,配对组间比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05表示差异有统计学意义。

2 结 果

2 组皮肤成纤维细胞内源性 Beclin 1、LC3-II/LC3-I、a-synuclein 的表达水平

A 组与 B 组内源性 Beclin 1、LC3-II/LC3-I、a-synuclein 蛋白的浓度比较有显著差异(*P*<0.05);A 组 a-synuclein 的水平[(3.869 ± 1.292) ng/mL]明显高于对照组[(2.922 ± 0.804) ng/mL];A 组 Beclin-1 的水平及 LC3-II/LC3-I 比值明显低于对照组(表 1)。

3 结 论

帕金森病的患病因素包括遗传易感性、年龄、老化及环境等多种环节。有多项研究表明自噬与帕金森病有密切的联系,自噬的失调对 PD 的发生、发展

表 1 2 组血浆 a-synuclein、Beclin 1、LC3-II/LC3-I 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	人数	a-syn(ng/ml)	Beclin-1	LC3-II/LC3-I
A 组	32	3.869 ± 1.292	0.177 ± 0.055	0.483 ± 0.102
B 组(GBA)	32	2.922 ± 0.804 *	0.560 ± 0.040 *	2.347 ± 0.292 *

注:32 例 PD 患者检测寡聚体水平时,其中有 2 例患者因其 OD 值小于检测范围,因无具体数值,故未纳入比较;与 A 组比较,* *P*<0.05

起着重要作用,但是目前关于在 PD 患者活体内自噬功能的研究还很少。本研究主要通过 GBA 培养基激活其活性,诱导自噬,发挥其清除胞浆内异常蛋白质或细胞器的功能。

自噬的发生及发展的分子机制十分复杂,但却有相当高的相似性。Komatsu M 通过对酵母的研究发现,高等真核生物与酵母有类似的自噬分子机制^[3]。自噬体标记物有多种蛋白,其中微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC-3)是一种经典的标记物^[4],LC-3I (18KD)和 LC-3II (16KD)是细胞内两种主要形式 LC-3。一般情况下自噬激活后 LC-3I 就被活化,在泛素样反应酶的作用下与磷脂酰乙醇胺偶联生成 LC-3II。因此,LC-3II 的量与自噬小体的形成有紧密的联系,而 LC-3II 与 LC-3I 的比值是反映自噬活性的可靠指标^[5-6]。因此,本实验选用观察 LC3 的表达水平判断 PD 患者皮肤成纤维细胞的自噬情况,直接观察指标为 LC-3II 与 LC-3I 的比值。本研究 B 组 Beclin1 蛋白水平明显高于 A 组,通过培养基激活 GCA 使 Beclin1 蛋白水平表达明显上调,同时 B 组 LC3II/LC3-I 比值也明显高于 A 组,由此可见激活 GCA 可以上调自噬水平。但 B 组 a-syn 的水平明显低于 A 组,提示激活 GCA 可以使 a-syn 突触核蛋白表达降低。过表达 GBA 一方面可以上调自噬水平;另一方面又能使突触核蛋白表达降低。其机制可能为自噬可降解异常蛋白质,这些蛋白质通常来自于诱发损伤的早期死亡细胞,或者清除异常的蛋白质和(或)失活的细胞器^[7],从而对神经元起保护作用,反过来神经细胞内的自噬被抑制后会 导致神经元变性 及异常蛋白质的积聚,激活 GBA 可促进 a-syn 分解代谢,低水平的 a-syn 又促进了 GBA 蛋白的活化,而 GBA 活性的改变反过来又加速了 a-syn 的清除。由此推测激活 GBA 可能通过自噬降低了 a-syn 的表达水平。

本研究结果表明,激活 GBA 不仅可以强化自噬水平,还可以降低 a-syn 的表达,PD 患者活体皮肤成纤维细胞自噬功能的检测为阐明 PD 的发病机制提供了理论依据。另外,雷帕霉素对 PD 患者成