

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

黄优

【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。**方法** 收集本院 2013 年 7 月~2015 年 7 月病例,将存在蛋白酶体功能障碍的帕金森病患者 50 例作为观察组,未存在蛋白酶体功能障碍的帕金森病患者 50 例作为对照组,观察 2 组患者的行为学改变情况,通过 RT-PCR、Western blotting 分子生物学方法检测患者血液中 α -突触核蛋白(α -Syn)表达水平。**结果** 观察组患者血清的 α -突触核蛋白表达水平显著高于对照组($P<0.05$)。**结论** 蛋白酶体功能障碍可能导致散发性帕金森病患者血液中 α -突触核蛋白(α -Syn)水平升高,考虑该因素可能是散发性帕金森病的危险因素。

【关键词】 蛋白酶体功能障碍 α -突触核蛋白(α -Syn) 散发性帕金森 发病机制

【中图分类号】 R742.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)05-0455-03

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.05.019

帕金森病是一种慢性进展性神经系统疾病,严重损害老年人的身体健康和影响老年人的日常生活,并给家庭和社会带来经济上沉重的负担。在我国中老年人群中发病率已达 0.2/100,且呈明显上升趋势^[1-2]。临床表现为静止性震颤、动作迟缓、运动减少、肌强直和姿势平衡障碍等 4 大主要特征,除了特征性的运动障碍等症状以外常伴有精神症状及认知功能障碍,主要表现为抑郁、多疑、思维迟钝、痴呆、智能低下、幻觉等。临床上以平衡障碍一步态异常为主要症状的帕金森病患者往往具有病程进展较快的特点,出现抑郁、认知障碍、跌倒及残疾的概率较高的特点。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,该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,即散发性的帕金森病^[1]。目前该病主要的治疗方法包括药物及外科手术治疗,但是都只是针对临床表现,并不能阻止疾病的进程,该病的致残率较高。该病的病理机制尚未完全明确,可能与遗传及环境因素有关。有研究发现蛋白纤维化是散发性帕金森病患者导致神经元死亡的重要原因^[2]。在疾病形成的过程中 α -突触核蛋白是与该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

森病患者中黑质致密部位氧化损伤的蛋白水平表达升高。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]。这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,以期为其在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

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 分组

收集本院 2013 年 7 月~2015 年 7 月病例,将蛋白酶体功能障碍的帕金森病患者 50 例作为观察组,其中女 22 例,男 28 例,所有的病例都是初治病例,H&Y 分期不超过 2 期,其中 1 期 18 例,1.5 期

15 例,2 期 17 例,年龄 20~70 岁,平均年龄(61.25 ± 10.23)岁。未存在蛋白酶体功能障碍的帕金森病患者 50 例作为对照组,其中男 27 例,女 23 例,年龄 0~70 岁,平均年龄(64.26 ± 8.56)岁,H&Y 分期不超过 2 期,其中 1 期 18 例,1.5 期 14 例,2 期 18 例。抽取患者的空腹血液,匀浆器充分匀浆,之后将其转移至 EP 管中,以 14 000 r/min 离心 30 min,取上清液移至新 EP 管保存,使用前经 BCA 法测定蛋白水平。

1.3 纳入标准

①符合帕金森病的临床诊断标准;②年龄 20~70 岁;③纳入研究的患者均为接受过多巴胺受体激动剂及左旋多巴制剂的治疗;④入组前头颅影像学检查排除帕金森综合征及多系统萎缩等;⑤依从性强,愿意接受本临床研究。

1.4 排除标准

①年龄<20 岁或>70 岁的患者;②存在其他躯体系统疾病,有严重其他系统疾病和恶性肿瘤的患者;③帕金森叠加综合征、脑血管病、脑炎、一氧化碳中毒及药物等影响的患者;④患者姿势平衡障碍是由于其他疾病引起的;⑤存在严重的记忆障碍,研究对象的简易智力状态检查 MMSE<24 分者;⑥不愿意接受本临床研究,依从性差的患者。

1.5 RT-PCR(半定量逆转录聚合酶链反应)

抽取患者的空腹血液,每例血清 100mg,提取总 RNA。取 2μg 总 RNA 行逆转录 cDNA,反应体系为 20 μl;吸取逆转录产物 2 μl,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 5 mins,94℃变性 30 s,60℃30 s,72℃60 s,72℃7 mins,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)。

1.6 Western blotting

取血清提取 100 mg 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;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:1000)37℃孵育 1 h;ECL 光化学法显色,用彩色图像分析系统测定吸光度。

1.7 统计学处理

采用 spss20.0 统计软件,正态分布资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布资料以中位数和四分位数间距表

示;遵循正态分布而且方差齐性,两两比较采用 LSD 检验,α-Syn mRNA 和 α-Syn 蛋白的表达水平的比较采用非参数检验,两两比较采用 Mann-whitney U 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 α-Syn mRNA 表达水平

观察组患者的血清 α-突触核蛋白表达水平显著高于对照组($P<0.05$)(表 2)。

表 1 α-Syn mRNA 表达水平的比较

组别	n	治疗前 α-Syn mRNA 表达水平	治疗后 α-Syn mRNA 表达水平
观察组	50	0.68 ± 0.23	1.56 ± 0.45*△
对照组	50	0.72 ± 0.2	0.80 ± 0.31

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与治疗前比较,△ $P<0.05$

2.2 α-Syn 蛋白表达水平

观察组患者的血清 α-突触核蛋白表达水平显著高于对照组($P<0.05$)(表 2)。

表 2 α-Syn 蛋白表达水平的比较

组别	n	治疗前 α-Syn 蛋白表达水平	治疗后 α-Syn 蛋白表达水平
观察组	50	1.52 ± 0.72	3.23 ± 1.99*△
对照组	50	1.56 ± 0.86	1.69 ± 0.86

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与治疗前比较,△ $P<0.05$

3 讨论

帕金森病是临床上的常见神经退行性疾病,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,通过选择性损伤机制促使神经细胞的氧自由基的增多,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有关^[9-11]。

目前临床尚未明确 α-突触核蛋白的正常功能,在多数散发性帕金森病患者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,同时散发性帕金森病患者机体内的 α -共核蛋白量增高^[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,散发性帕金森病患者蛋白酶体 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,观察组 α -突触核蛋白表达水平显著高于对照组($P < 0.05$)。这提示蛋白酶体功能障碍可能导致患者血清中的 α -突触核蛋白(α -Syn)形成,考虑该因素可能是散发性帕金森病的危险因素。蛋白酶体功能不能得到恢复,影响氧化受损的蛋白质的降解,从而降低了蛋白酶体的清除能力,同时氧化受损的蛋白集聚增多,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能导致 α -Syn 血液中的聚集释放,也可能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,从而导致细胞功能的紊乱,最终促进了多巴胺能神经元的凋亡。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] W I W, Haass C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(1): 29-44.
- [3] A N A. Mitochondrial diseases [J]. *Lancet*, 2016, 2 (379): 16081.
- [4] B L B. Neural and immune mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2013, 8(1): 189-201.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] H I H, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2012, 18(Suppl): 210-212.
- [8] K A K, 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.
- [9] Y V Y. Neuroinflammation inflammatory brain drain [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(2): 69.
- [10] M I M, Tentler J J, Smith P G, et al. Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis: novel targets for anticancer therapies [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2013, 31 (9): 1231-1238.
- [11] E R E, Avvakumov G, Tong J, et al. A strategy for modulation of enzymes in the ubiquitin system [J]. *Science*, 2013, 339 (6119): 590-595.
- [12] C O C, Hatchwell L, Verrills N, et al. The E3 ubiquitin ligase midline 1 promotes allergen and rhinovirus-induced asthma by inhibiting protein phosphatase 2A activity [J]. *Nat Med*, 2013, 19(2): 232-237.
- [13] Y O Y. Molecular dissection of autophagy two ubiquitin-like systems [J]. *Nature Review*, 2001, 2(3): 211-216.
- [14] Y A Y, Zhao D, Khan S H, et al. Role of autophagy in prion protein-induced neurodegenerative diseases [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013, 45(6): 494-502.
- [15] C H C, Ryter S W, Levine B. Autophagy in human health and disease [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(7): 651-662.
- [16] R U R, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging [J]. *Cell*, 2011, 146(5): 682-695.
- [17] O R O, Sheng H K, Tasset I, et al. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy [J]. *Nature Neuroscience*, 2013, 16(4): 394-406.

(2016-09-21 收稿)