

Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(12): 1877-1891.

[19] Amenta F, Di Tullio MA, Tomassoni D. Arterial hyper-tension and brain damage-evidence from animal models (review). Clin Exp Hypertens, 2003, 25(6): 359-380.

sion and brain damage-evidence from animal models (review). Clin Exp Hypertens, 2003, 25(6): 359-380.

## 帕金森病的免疫治疗研究进展

杨云鹏 综述 彭国光 审校

重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆市 400016

**摘要:** 帕金森病的发病机制尚不完全清楚, 目前还没有根本有效的药物治疗。近年来免疫治疗在帕金森疾病的治疗方面显示出良好的前景。免疫治疗主要通过三个方面: 一是  $\alpha$ -突触核蛋白抗体的被动免疫治疗; 二是依赖 T 淋巴细胞的疫苗免疫治疗; 三是核酸疫苗主动免疫治疗。

**关键词:** 帕金森病;  $\alpha$ -突触核蛋白; 核酸疫苗; 免疫治疗

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种常见于中老年人的进行性中枢神经系统变性疾病。PD 的病因和发病机制尚不完全清楚, 目前还没有根本有效的药物治疗。临床使用的药物治疗只是围绕神经递质多巴胺 (dopamine, DA) 的缺乏进行对症治疗, 还无法针对其病理的主要环节, 延缓或阻止疾病的进展。因此, 探索更加有效的防治 PD 的策略成为不容忽视的问题。PD 的主要病理特点是黑质区出现以异常聚集的  $\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -syn) 为主要成分的路易小体 (Lewy body)。目前普遍认为  $\alpha$ -syn 是 PD 发病机制的核心。 $\alpha$ -syn 的积聚不仅具有神经毒性作用, 对突触功能和信号的传递也有影响, 参与 PD 的发生和发展过程<sup>[1,2]</sup>。研究表明 PD 的发生发展与  $\alpha$ -syn 的错误折叠和毒性有关, PD 患者  $\alpha$ -syn 的突变可破坏  $\alpha$  螺旋结构, 使之形成  $\beta$  折叠, 进而聚集并产生具有神经毒性的寡聚体, 最终导致神经变性<sup>[3]</sup>。另外,  $\alpha$ -syn 基因的致病单核苷酸突变 (A30P、A53T 和 E46K) 的发现对研究 PD 的致病机制具有重要意义<sup>[4,5]</sup>。本文就以清除异常聚集的  $\alpha$ -syn 为目标的 PD 免疫治疗研究进展做一综述。

### 1 $\alpha$ -syn 抗体被动免疫及治疗机制

Zhou 等<sup>[6]</sup> 采用  $\alpha$ -syn 高亲和力 scFv 抗体——

D10, 将 D10 scFv 基因转染到过表达野生型  $\alpha$ -syn 的 HEK293 细胞株, 在核定位信号的引导下, 进入细胞内高度表达, 并与野生型  $\alpha$ -syn 单体结合形成稳定可溶性的  $\alpha$ -syn, 从而抑制不溶性的  $\alpha$ -syn 聚集产物出现。只是, 细胞内抗体的研究和检测还仅限于组织培养中。Masliah 等<sup>[7]</sup> 用重组人类  $\alpha$ -syn (human  $\alpha$ -synuclein, h $\alpha$ -syn) 抗体接种 h $\alpha$ -syn 转基因 PD 小鼠, 产生了 DA 神经元保护作用。接种后产生的高亲和力抗体, 不仅抗体滴度高, 而且可识别  $\alpha$ -syn 的 C 末端表位; 同时发现 h $\alpha$ -syn 抗体可与神经元细胞体、细胞突起及突触胞膜, 形成直径约 0.4 ~ 0.8  $\mu$ m 的环状细胞结构并呈 cathepsin D 免疫反应阳性, 提示和  $\alpha$ -syn 反应的 h $\alpha$ -syn 抗体可通过溶酶体途径清除。这些研究表明中枢神经系统循环的 h $\alpha$ -syn 抗体可能识别与神经元细胞膜结合的  $\alpha$ -syn 聚集体, 进而激活溶酶体途径促进异常聚集的  $\alpha$ -syn 清除。此外与神经元细胞表面紧密结合的 h $\alpha$ -syn 抗体还可能通过与细胞表面的某些受体结合, 进而通过胞吞作用进入胞浆, 从而促进  $\alpha$ -syn 的清除降解。

### 2 依赖 T 淋巴细胞的疫苗免疫治疗

Benner 等<sup>[8]</sup> 使用共聚物-1 (copolymer-1, Cop-1) 免疫脾细胞进行过继转移, 进行了疫苗的多巴

**基金项目:** 重庆市医学科研计划重点项目 (2009-1-58); 重庆市医学科研计划项目 (2011-2-131)

**收稿日期:** 2011-09-13; **修回日期:** 2012-01-08

**作者简介:** 杨云鹏 (1984-), 男, 住院医师, 在读硕士研究生, 主要从事帕金森病的基础与临床研究。

**通讯作者:** 彭国光 (1945-), 男, 主任, 教授, 博士生导师, 主要从事帕金森病的基础与临床研究。

胺能神经元免疫保护性研究。Cop-1 免疫保护作用是由 T 淋巴细胞依赖性的,能缓解 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 对纹状体中 DA 能神经纤维和黑质细胞的损害作用。其保护作用主要有以下几方面:保护有髓轴突;保护神经元 DA 代谢、神经元的结构成分及其突起;减轻小胶质细胞反应;增加中脑腹侧胶质细胞源性神经营养因子的表达。Kurkowska-Jastrzebska 等<sup>[9]</sup>用少突胶质细胞髓鞘糖蛋白 (myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG) 接种 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型,产生了保护作用。先使用 MOG 免疫实验性自身免疫性脑脊髓炎动物模型,诱导强烈的病理性 T 淋巴细胞和抗体反应,再注射 MPTP 时中枢神经系统内已有的自身反应性淋巴细胞有助于减轻 MPTP 毒性所致的神经元损伤。此外,免疫细胞分泌的神经营养因子有神经保护作用,能清除受损神经元和髓鞘产生的神经生长抑制因子。

### 3 核酸疫苗主动免疫治疗

1992 年, Tang 等开展了基因免疫治疗研究的前驱性工作——核酸疫苗。核酸疫苗是通过基因重组技术,将编码某种蛋白抗原的外源基因 (DNA 或 RNA) 导入动物体内,通过宿主细胞的转录系统合成抗原蛋白,诱导宿主细胞产生对该抗原蛋白的一系列特异性免疫应答,从而达到预防和治疗疾病的目的<sup>[10]</sup>。核酸疫苗的应用范围正日益扩大,不仅应用于感染性疾病的预防,还应用于传染性疾病、肿瘤和自身免疫性疾病的治疗,并且在神经变性疾病中也有了应用。国内外已构建核酸疫苗用于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 和亨廷顿病的治疗研究<sup>[11-13]</sup>。核酸疫苗可以诱导机体产生细胞免疫和体液免疫,刺激产生较强和较持久的免疫应答。1999 年 Schenk 等<sup>[14]</sup>采用 PDAPP 转基因鼠过表达变异的人 APP 以建立 AD 小鼠模型,并使用 A $\beta$ 42 进行免疫治疗后,取得了较好的免疫效果,从而把神经变性疾病免疫研究推向了高潮。如在减少朊病毒蛋白、亨廷顿蛋白等积聚的免疫研究都取得了较好的治疗结果。

核酸疫苗具有安全性好、成本低、纯化方便等优点。在 PD 的免疫治疗研究中,受到高度重视。目前已知帕金森病的发生可能与  $\alpha$ -syn 蛋白的异常聚集有关。虽然目前尚无有效方法阻止  $\alpha$ -syn 的病理性聚集<sup>[15]</sup>,但是如果可以使  $\alpha$ -syn 异常聚集

的发生减少或加速  $\alpha$ -syn 的降解清除,就有可能以此作为药物和基因治疗的基础。若以异常聚集、增多的  $\alpha$ -syn 为靶点,构建以抗原表位为基础的核酸疫苗,成功开发出核酸疫苗治疗 PD,将有望获得比其他治疗方法更好的效果。王加才等<sup>[16]</sup>将 h $\alpha$ -syn 全长和抗体可识别的抗原表位为目的基因,把完整的抗原编码基因和一个强的真核表达质粒构建成 DNA 重组子,成功构建了以 h $\alpha$ -syn 全长为基础的 h $\alpha$ -syn 核酸疫苗 pVAX1-h $\alpha$ S<sub>1-140</sub>,并在哺乳动物体内高效表达。通过采用此核酸疫苗治疗 MPTP 帕金森病模型小鼠,实验结果显示,pVAX1-h $\alpha$ S<sub>1-140</sub> 核酸疫苗具有较强的免疫原性,能对帕金森病模型小鼠产生较好的免疫治疗作用。

核酸疫苗和佐剂的兴起也为 PD 的免疫治疗开辟了一条新途径,构建优化的核酸疫苗有望成为预防和治疗 PD 的有力手段。王法祥等<sup>[17]</sup>在全长核酸疫苗 pVAX1-h $\alpha$ S<sub>1-140</sub> 的基础之上,通过基因重组技术增加促进蛋白分泌功能的 Ig Kappa 信号肽基因片段,制备了优化高分泌型  $\alpha$ -syn 核酸疫苗 pVAX1-lgk-h $\alpha$ S<sub>1-140</sub>。并在后期实验中发现:pVAX1-lgk-h $\alpha$ S<sub>1-140</sub> 核酸疫苗对 MPTP 帕金森病模型小鼠产生了较好的预防和治疗作用。何卿玮等<sup>[18]</sup>在全长核酸疫苗的基础上,剔除了 T 细胞表位,加入人 IL-4 为免疫佐剂,优化构建了多价 B 细胞表位核酸疫苗 pVAX1-IL-4/SYN-B,并在哺乳动物体内高效表达。经采用优化核酸疫苗预防注射 MPTP 帕金森病模型小鼠,实验结果显示,pVAX1-IL-4/SYN-B 核酸疫苗能对抗炎症因子 COX-2 表达、抑制小胶质细胞激活,对多巴胺神经细胞具有保护作用。这些研究表明 h $\alpha$ -syn 核酸疫苗可能通过两方面来治疗 MPTP 帕金森病模型小鼠。一方面是 h $\alpha$ -syn 核酸疫苗诱导产生 h $\alpha$ -syn 抗体可清除异常聚集  $\alpha$ -syn,主要通过受体依赖或非受体依赖的抗体或抗原抗体复合物的胞吞作用所介导,进而和溶酶体融合和/或与  $\alpha$ -syn 聚集体混合,激活溶酶体途径促进  $\alpha$ -syn 寡聚体降解清除。另一方面越来越多的研究显示炎症在 PD 的发病与进展过程中发挥了重要作用<sup>[19]</sup>,h $\alpha$ -syn 核酸疫苗可以对抗炎症因子来改善 MPTP 慢性帕金森病模型小鼠的症状。因此,h $\alpha$ -syn 核酸疫苗在治疗 MPTP 帕金森病模型小鼠方面取得了较好的疗效。

### 4 问题和展望

核酸疫苗的安全性是临床应用前期首要解决

的关键问题。王少君等<sup>[20]</sup>在后期的实验中发现全长核酸疫苗 pVAX1-h $\alpha$ S<sub>1-140</sub> 在免疫治疗时发现会加重小鼠中脑黑质区炎症反应。A $\beta$  核酸疫苗 (AN1792) 在进行 II a 期临床试验时, 因 6% 受试者出现无菌性脑炎而中止了试验。进一步研究认为该脑炎是由 Th1 细胞免疫反应所致自身免疫反应造成<sup>[21]</sup>, 并且发现通过筛选合适的抗原表位、免疫佐剂, 可降低 Th1 型细胞免疫反应, 提高 Th2 型体液免疫反应, 从而减少脑内的炎症反应<sup>[22]</sup>。

以前使用 MPTP 帕金森病模型小鼠作为动物模型来评价免疫治疗的效果及疫苗的安全性, 但由于小鼠的血脑屏障的结构以及产生抗体的类型与人类的存在差异, 无法完全模拟人体的真实状况, 没有表现出人体试验中所出现的自身免疫反应性脑炎以及脑萎缩并发症, 因此 PD 小鼠作为评价疫苗有效性和安全性的模型存在巨大缺陷。而使用与人类遗传更接近的灵长类动物进行治疗效果及安全性的评价更具有说服力。

虽然全长核酸疫苗在免疫治疗时会加重 PD 模型小鼠中脑黑质区炎症。但应该看到 PD 核酸疫苗在治疗 MPTP 帕金森病模型小鼠方面取得的疗效, 说明免疫疗法具有一定疗效。相信随着 PD 发病机制认识的逐渐深入, 免疫治疗作用机制的不断明确, 疫苗制备技术的发展, 更加可靠的动物模型的建立以及评价体系的完善, 将来会制备出疗效更好且无毒副作用的疫苗, 也为帕金森病的防治带来新的希望。

#### 参 考 文 献

- [1] Zhu Y, Duan C, Lü L, et al.  $\alpha$ -Synuclein overexpression impairs mitochondrial function by associating with adenylate translocator. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43 (5): 732-741.
- [2] Chinta SJ, Mallajosyula JK, Rane A, et al. Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neurosci Lett*, 2010, 486 (3): 235-239.
- [3] Uversky VN. Alpha-synuclein misfolding and neurodegenerative diseases. *Curr Protein Pept Sci*, 2008, 9 (5): 507-540.
- [4] Emmer KL, Waxman EA, Covey JP, et al. E46K human alpha-synuclein transgenic mice develop Lewy-like and tau pathology associated with age-dependent, detrimental motor impairment. *J Biol Chem*, 2011, 286 (40): 35104-35118.
- [5] Mizuno Y, Hattori N, Kubo S, et al. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2008, 363 (1500): 2215-2227.
- [6] Zhou C, Emadi S, Sierks MR, et al. A human single-chain Fv intrabody blocks aberrant cellular effects of overexpressed alpha-synuclein. *Mol Ther*, 2004, 10 (6): 1023-1031.
- [7] Masliah E, Rockenstein E, Adame A, et al. Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron*, 2005, 46 (6): 857-868.
- [8] Benner EJ, Mosley RL, Destache CJ, et al. Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (25): 9435-9440.
- [9] Kurkowska-Jastrzebska I, Balkowiec-Iskra E, Joniec I, et al. Immunization with myelin oligodendrocyte glycoprotein and complete Freund adjuvant partially protects dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced damage in mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2005, 131 (1): 247-254.
- [10] Wang G, Pan L, Zhang Y. Approaches to improved targeting of DNA vaccines. *Hum Vaccin*, 2011, 7 (12): 1271-1281.
- [11] DaSilva KA, Brown ME, McLaurin J. Reduced oligomeric and vascular amyloid-beta following immunization of TgCRND8 mice with an Alzheimer's DNA vaccine. *Vaccine*, 2009, 27 (9): 1365-1376.
- [12] Qu B, Boyer PJ, Johnston SA, et al. A $\beta$ 42 gene vaccination reduces brain amyloid plaque burden in transgenic mice. *J Neurol Sci*, 2006, 244 (1-2): 151-158.
- [13] Luthi-Carter R. Progress towards a vaccine for Huntington's disease. *Mol Ther*, 2003, 7 (5 Pt 1): 569-570.
- [14] Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 1999, 400 (6740): 173-177.
- [15] Masliah E, Hashimoto M. Development of new treatments for Parkinson's disease in transgenic animal models: a role for beta-synuclein. *Neurotoxicology*, 2002, 23 (4-5): 461-468.
- [16] 王加才, 王少君, 彭国光, 等. h $\alpha$ -syn 蛋白核酸疫苗 pVAX1-h $\alpha$ S1-140 的构建及其表达. *重庆医学*, 2008, 37 (17): 1953-1955.
- [17] 王法祥, 彭国光, 王加才, 等. 优化人 alpha-syn 基因疫苗免疫 MPTP 慢性 PD 小鼠的神经保护作用. *第四军医大学学报*, 2009, 30 (20): 2125-2128.
- [18] 何卿玮, 王加才, 彭国光, 等. pVAX1-IL-4/SYN-B 融合质粒的构建及表达. *免疫学杂志*, 2009, 25 (5): 588-590.
- [19] Etminan M, Carleton BC, Samii A. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of Parkinson disease: a retrospective cohort study. *J Clin Neurosci*, 2008, 15 (50): 576-577.

- [20] Schenk D. Amyloid- $\beta$  immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nat Rev*, 2002, 3(10): 824-828.
- [21] Ferrer I, Boada RM, Sanchez Guerra, et al. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid  $\beta$  immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*, 2004, 14(1):

11-20.

- [22] Terrence T, Martina V, Anant P, et al. Reduced Th1 and enhanced Th2 immunity after immunization with Alzheimer's  $\beta$ -amyloid 1-42. *J Neuroimmunol*, 2002, 132(1): 49-59.

## NOX2 与中枢神经系统关系的研究进展

黄碧霞 综述 叶钦勇 审校

福建医科大学协和临床医学院/福建医科大学附属协和医院/  
福建医科大学脑血管病研究室,福建省福州市 350001

**摘 要:** NOX2 是 NADPH 氧化酶的一个亚型,通过质膜传递电子,产生活性氧,从而发挥着各种生理和病理作用。NOX2 与神经细胞的发育、增殖、活化、凋亡等过程密切相关,在中枢神经系统中各种疾病的发生、发展中具有重要作用,通过抑制 NOX2,减少活性氧,可有效防治神经系统疾病。本文对 NOX2 在神经系统中的生理及病理作用的研究进展进行了阐述。

**关键词:** NOX2;活性氧;氧化应激

氧化应激在中枢神经系统是一个主要导致疾病和老化的原因。至今,线粒体仍被认为是活性氧(ROS)的主要来源,但是,越来越多的证据表明 NADPH 氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase)可能在中枢神经系统 ROS 的产生中发挥重要作用。NADPH 氧化酶体系现在已基本确定:7 种 NOX 同源异构体(NOX1-5、DUOX1、DUOX2),两种组织亚基( $p47^{phox}$ 、NOXO1),两种激活亚基( $p67^{phox}$ 、NOXA1)和两种 DUOX 特定的成熟因素(DUOXA1 和 DUOXA2)<sup>[1]</sup>。NOX 酶家族广泛分布在各种组织,但高表达水平分布发现于特殊的器官或细胞类型(如 NOX1 在结肠、NOX2 在吞噬细胞、NOX3 在内耳、NOX4 在肾脏)。最近研究数据表明,NOX 酶在神经系统中也广泛表达,可能参与大量的生理功能和神经系统各种疾病的过程。至今,有研究表明 NOX 酶参与脑血管疾病方面的作用<sup>[2]</sup>和 NOX2 调节小神经胶质细胞炎症过程<sup>[3]</sup>。本文主要对中枢神经系统中 NOX2 的作用进行总结。

### 1 NOX2 概述

NADPH 氧化酶 2 即还原型烟酰胺腺嘌呤二核

苷酸氧化酶 2,该氧化酶是由  $gp91^{phox}$ ,  $p22^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ ,  $p40^{phox}$  和 GTP 酶 Rac 这 6 种亚基组成的复合体,其中  $gp91^{phox}$  是其主要的功能亚单位(gp 表示糖蛋白,phox 代表吞噬细胞氧化酶成分)。上世纪 80 年代末,吞噬细胞 NADPH 氧化酶催化亚基的基因密码  $gp91^{phox}$  被 Teahan 等<sup>[4]</sup>克隆出来的,从此  $gp91^{phox}$  也被称为 NOX2。然而,相关研究很快发现,NOX2 并非吞噬细胞 NADPH 氧化酶的唯一的部分,它还包括跨膜蛋白  $p22^{phox}$ (与 NOX2 结合的膜亚基)、细胞质亚基  $p40^{phox}$ 、 $p47^{phox}$  和  $p67^{phox}$ ,以及小 GTP 结合蛋白 Rac1 和 Rac2。

#### 1.1 NOX2 的结构

多数已知的 NOX 家族的形状和结构是从对吞噬细胞 NOX2 的结构研究而形成的。NOX 家族的所有成员都是跨膜蛋白,穿过生物细胞膜传递电子,从而促进超氧化物的形成。NOX2 的结构从羧基端开始,其保守的结构特征包括:①一个 NADPH 结合端,存在于羧基端的极端处;②一个 FAD 结合区域是最接近羧基端的跨膜区;③N 端有 6 个保守的跨膜结构域;④4 个高度保守含铁血黄素结合组氨酸,各有 2 个分别存在于第三和第五两个跨膜

基金项目:福建省青年科技人才创新项目(2007F3035)

收稿日期:2011-09-13;修回日期:2012-01-06

作者简介:黄碧霞(1987-),女,硕士,主要从事帕金森病的基础研究。

通讯作者:叶钦勇(1970-),男,主任医师,副教授,博士,主要从事帕金森病的基础和临床研究。E-mail:unionqyye@163.com。