

- [37] Gao X, Lai CQ, Scott T, et al. Urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and cognitive function in Puerto Rican adults. *Am J Epidemiol*, 2010, 172(3): 271-278.
- [38] Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. Mechanistic insights into diabetes mellitus and oxidative stress. *Curr Med Chemistr*, 2007, 14(16): 1729-1738.
- [39] 董屹, 孙中武. 轻度认知功能损害的磁共振波谱研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(5): 469-473.
- [40] Barkhof F, Polvikoski TM, van Straaten EC, et al. The significance of medial temporal lobe atrophy: a postmortem MRI study in the very old. *Neurology*, 2007, 69(15): 1521-1527.
- [41] Jagust WJ, Zheng L, Harvey DJ, et al. Neuropathological basis of magnetic resonance images in aging and dementia. *Ann Neurol*, 2008, 63(1): 72-80.
- [42] Kantarci K, Knopman DS, Dickson DW, et al. Alzheimer disease: postmortem neuropathologic correlates of antemortem 1H MR spectroscopy metabolite measurements. *Radiology*, 2008, 248(1): 210-220.
- [43] 王悦, 徐晓云, 金花, 等. 2型糖尿病患者认知功能与脑磁共振质子波谱研究. *中华糖尿病杂志*, 2010, 2(6): 443-448.
- [44] Park CR. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001, 25(4): 311-323.
- [45] Shepherd PR. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand*, 2005, 183(1): 3-12.
- [46] Li G, Xu XY, Wang DS, et al. Microglial activation during acute cerebral infarction in the presence of diabetes mellitus. *Neurosci*, 2011, 32(6): 1075-1079.
- [47] 金花, 徐晓云, 徐海元, 等. 糖尿病大鼠海马超微结构及蛋白质组学研究. *中华糖尿病杂志*, 2010, 2(3): 205-209.
- [48] 罗峥, 金花, 李渊灵, 等. 糖尿病大鼠海马 endophilin-A1 和 dynamin-1 的表达研究. *脑与神经疾病杂志*, 2012, 20(2): 4-7.

## $\alpha$ -突触核蛋白过表达转基因帕金森病动物模型研究进展

杨旭 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:** 帕金森病是最常见的神经变性疾病之一。帕金森病动物模型是解释疾病病因学根本机制, 开发新的神经保护药物和治疗策略研究的必不可少的工具。该文综述了目前常用的几类帕金森病  $\alpha$ -突触核蛋白过表达转基因动物模型及其优缺点。转基因动物模型是目前最为重要的帕金森病动物模型; 较全面地反映帕金森病病因及发病机理、病理特点, 将是帕金森病动物模型研究新时代的开始, 也是今后研究探讨的方向。

**关键词:** 帕金森病;  $\alpha$ -突触核蛋白; 转基因动物模型

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种常见于中老年人的渐进性神经系统变性疾病。PD 的发病机制尚不清楚, 但已明确环境因素和遗传因素在 PD 发病中起重要作用。PD 像人类其他疾病一样, 在动物中并不发生, 但能在动物上模拟, 使用标准化的方法, 可在动物程序性再现疾病的特征性病理事件和行为学表现。合适的动物模型能帮助

我们进一步解释疾病病因学的根本机制, 而且有助于新的神经保护药物和治疗策略的研究发展, 是基础研究和应用研究必不可少的工具。目前 PD 动物模型主要有两大类。一是神经毒素动物模型: 6-羟多巴胺、1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP)、鱼藤酮、蛋白酶体抑制剂等动物模型。虽然这类动物模型能再现 PD 的一些生化病理及行为学改变,

**基金项目:** 重庆市医学科研计划重点项目 (2009-1-58); 重庆医科大学附属第一医院医学科学基金项目 (YXJJ2009-24)

**收稿日期:** 2011-10-12; **修回日期:** 2012-01-10

**作者简介:** 杨旭 (1986-), 女, 在读硕士, 主要从事帕金森病的防治研究。

**通讯作者:** 彭国光。Email: penwan233@sina.com。

但其主要有利于研究环境因素在 PD 中的作用。二是  $\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -syn) 过表达转基因动物模型, 可以很好的模拟致病基因诱发的疾病过程, 是研究疾病的发病机制、基因治疗及药物干预的一种良好动物模型。而且, 相比于神经毒素损伤动物模型,  $\alpha$ -syn 过表达转基因动物模型更能模拟人类 PD 多巴胺能神经元进行性缓慢退变的特点。本文就近年来发展的各种帕金森病  $\alpha$ -syn 过表达转基因动物模型研究进展做一综述。

## 1 $\alpha$ -synuclein 在 PD 发病机制中的作用

PD 的特征性病理改变是选择性中脑黑质多巴胺 (DA) 能神经元严重缺失, 残存神经元内出现 Lewy 小体。Lewy 小体由  $\alpha$ -syn 为主的蛋白质异常聚集而形成。体外研究发现,  $\alpha$ -syn 异常聚集参与了 PD 的 DA 能神经元变性过程, 异常聚集的  $\alpha$ -syn 在家族性和散发性 PD 的发病机制中起了重要作用<sup>[1]</sup>。Lehmannsiek<sup>[2]</sup> 等发现  $\alpha$ -syn 突变或过表达可加速线粒体功能障碍, 增加对氧化应激的敏感性及 DA 转运体介导的毒性, 促进细胞的死亡。正常情况下,  $\alpha$ -syn 经过泛素蛋白酶体通路 (VPP 或 UPP) 降解。而过表达或突变  $\alpha$ -syn 形成的  $\beta$  折叠结构在泛素化后不易被 VPP 降解, 并与蛋白酶体 26S 中的亚单位 6S 结合, 抑制其活性, 使细胞内  $\alpha$ -syn 蛋白不能被 VPP 有效及时地清除, 从而形成 Lewy 小体, 黑质神经元的氧化应激增加, 引起线粒体功能紊乱, 导致细胞凋亡。PD 是遗传因素和环境因素共同作用的结果, 而  $\alpha$ -syn 将目前的遗传易感因素及环境因素的作用联系起来, 通过氧化应激, 线粒体功能紊乱作为神经变性的最后通路, 提示  $\alpha$ -syn 在 PD 发病机制中起着重要的作用。因此, 基于  $\alpha$ -syn 过表达建立起来的 PD 转基因动物模型是解释 PD 病因学根本机制、新药研发和治疗策略研究必不可缺的工具。

## 2 $\alpha$ -syn 过表达 PD 转基因动物模型

### 2.1 不同启动子过表达 $\alpha$ -syn PD 转基因动物模型

2.1.1 血小板衍生生长因子- $\beta$  (PDGF- $\beta$ ) 启动子过表达  $\alpha$ -syn 转基因动物模型 Masliah 等<sup>[3]</sup> 第一个成功建立了  $\alpha$ -syn 转基因小鼠。该小组成员用 PDGF- $\beta$  作启动子过表达野生型  $\alpha$ -syn (WT-h- $\alpha$ -syn) 建立  $\alpha$ -syn 转基因小鼠。该转基因小鼠具有 PD 部分特征, 如纹状体 DA 能神经元末梢丢失, 新皮质、海马、黑质  $\alpha$ -syn 及泛素免疫反应性包涵体形成, 纹状体内酪氨酸羟化酶 (TH) 活性降低以

及运动障碍的出现。然而此包涵体既存在于胞浆内又存在于核内, 且电镜下观察到包涵体由颗粒物质组成。但未见经典的 Lewy 小体纤维状聚集物, 且 DA 能神经元和行为学异常只在高表达的转基因小鼠中观察到, 提示这种异常可能要求  $\alpha$ -syn 的表达达到一个关键的阈值。目前 Masliah 及其同事已用其建立的  $\alpha$ -syn 转基因小鼠进行一系列 PD 研究<sup>[4-5]</sup>。虽然其他转基因小鼠出现  $\alpha$ -syn 包涵体及运动障碍, 却没有黑质纹状体 DA 能神经元变性和丢失的证据。该 PD 动物模型与人类 PD 不同的是, 缺乏黑质内 DA 能神经元变性缺失及典型 Lewy 小体形成。

2.1.2 鼠 Thy1 (mThy1) 启动子过表达  $\alpha$ -syn 转基因动物模型 van der Putten 等<sup>[6]</sup> 通过 mThy1 启动子过表达 WT 或 A53T 突变 h- $\alpha$ -syn 建立 PD 转基因小鼠。这些转基因小鼠中发现  $\alpha$ -synucleinopathy, 其特征与路易体病人大脑中观察到的极为相似。尽管在黑质致密部 DA 能神经元  $\alpha$ -syn 表达水平较低, 但仍有神经退行性变迹象及 PD 样症状。免疫电镜及普通电镜观察转基因小鼠  $\alpha$ -syn 阳性神经元包涵体超微结构显示神经元有  $\alpha$ -syn 颗粒沉积, 但缺乏人脑 Lewy 小体典型纤维成分, 可能是由于小鼠年龄不够和 (或) 物种差异。

2.1.3 酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 启动子过表达  $\alpha$ -syn 转基因动物模型 Richfield 等<sup>[7]</sup> 建立了大鼠 TH 启动子过表达 WT 或 A53T 及 A30P 双突变 (hm2 $\alpha$ -SYN) h- $\alpha$ -syn 转基因小鼠。在这些转基因小鼠中,  $\alpha$ -syn 在细胞体、轴突、纹状体末梢表达, 但无神经退行性变。过表达 hm2 $\alpha$ -SYN 转基因小鼠显示多巴胺减少及运动障碍, 对阿扑吗啡自发反应减少及敏感性下降。该模型虽能模拟 PD 部分特征, 但无 Lewy 样包涵体及中脑黑质多巴胺能神经元缺失。

Matsuoka 等<sup>[8]</sup> 为了明确是否过表达 h- $\alpha$ -syn 可导致 Lewy 样包涵体形成及黑质 DA 能神经元细胞缺失, 建立了 TH 过表达 WT 或 A53T, A30P h- $\alpha$ -syn 转基因小鼠。他们的研究发现, 高水平 h- $\alpha$ -syn 积聚在 DA 细胞体, 但在黑质纹状体系统未发现 Lewy 样包涵体, 而且黑质神经元数量及纹状体 DA 含量与非转基因小鼠相比无明显变化。

2.1.4 鼠阮蛋白 (PrP) 启动子过表达  $\alpha$ -syn 转基因动物模型 有人提出  $\alpha$ -syn 损伤导致了神经元退行性病变, 目前对于这一说法还存有争议。为了

探讨这一问题, Giasson 等<sup>[9]</sup>建立 PrP 启动子过表达 WT 及 A53Th- $\alpha$ -syn 转基因小鼠。A53Th- $\alpha$ -syn 转基因小鼠可产生严重运动障碍, 甚至进一步瘫痪、死亡;  $\alpha$ -syn 包涵体, 见于脑干、脊髓; 脊髓根轴突变性, 但无黑质神经元变性及其缺失。 $\alpha$ -syn 包涵体重现了人类疾病特征, 免疫电镜显示  $\alpha$ -syn 包涵体含 10 ~ 16 nm 纤维类似人病理性包涵体, 证实 A53Th- $\alpha$ -syn 导致毒性纤维状  $\alpha$ -syn 包涵体形成, 从而导致神经退行性病变。

同样, Martin 等<sup>[10]</sup>建立了 PrP 启动子过表达 WT、A30P 及 A53Th- $\alpha$ -syn 转基因小鼠。只有 A53Th- $\alpha$ -syn 转基因小鼠出现进行性神经元退行性变、运动障碍及死亡。其脑干及脊髓神经元出现轴索肿胀、核固缩, 皮质神经元及脊髓运动神经元胞浆出现嗜酸性路易体样包涵体, 这些包涵体包含 h- $\alpha$ -syn 及硝化  $\alpha$ -syn。电子显微镜证实细胞及轴索变性并显示树突及轴突胞浆包涵体, 一些包涵体是退化的线粒体及阳性 h- $\alpha$ -syn。研究表明, A53Th- $\alpha$ -syn 转基因小鼠产生突触包涵体, 线粒体 DNA 损害及退化, 脑干运动神经元, 新皮质细胞凋亡样死亡。该模型能有效模拟 PD 路易体样包涵体形成及运动障碍, 但无黑质 DA 能神经元缺失。

## 2.2 不同病毒载体介导过表达 $\alpha$ -syn 转基因动物模型

虽然不同启动子过表达 WT 或突变 h- $\alpha$ -syn 转基因小鼠展示了 PD 的一些特征, 如  $\alpha$ -syn 聚集、 $\alpha$ -syn 包涵体形成及运动障碍。但这些模型只提供很少或无关于黑质多巴胺能神经元损伤机制的信息。最近有研究报道, 通过病毒载体如腺相关病毒 (rAAV)<sup>[11-15]</sup> 及慢病毒载体<sup>[16,17]</sup> 介导 h- $\alpha$ -syn 过表达可导致黑质多巴胺能神经元缺失, 能更好的模拟 PD 的特征性病理改变。

### 2.2.1 慢病毒载体介导过表达 $\alpha$ -syn 转基因动物模型

Lo Bianco 等<sup>[16]</sup>通过将编码 WT、突变型 A53T、人或鼠 A30P  $\alpha$ -syn 的重组慢病毒载体立体定向注射入大鼠黑质建立过表达  $\alpha$ -syn 转基因大鼠模型。他们的研究发现, 无论是过表达 WT 或突变 h- $\alpha$ -syn 转基因大鼠, 都可看到黑质纹状体选择性 DA 能神经元丢失。注射编码 WT、A53T、A30P h- $\alpha$ -syn 重组慢病毒载体大鼠, TH 阳性神经元分别减少 35%、33%、24%, 损失局限于黑质区域。过表达鼠  $\alpha$ -syn 的转基因大鼠中 TH 免疫反应性神经元无明显减少。这些转基因大鼠, 黑质神经元轴

突及胞体大量  $\alpha$ -syn 免疫反应性聚集, 但这些包涵体缺少人 Lewy 小体典型纤维结构。慢病毒介导过表达  $\alpha$ -syn 转基因动物模型能重现 PD 突出的特点, 如细胞质  $\alpha$ -syn 聚集结构类似路易小体及路易突起, 选择性黑质 DA 能神经元变性。但慢病毒介导  $\alpha$ -syn 损失是一个较快时间过程 (6 周), 不能很好模拟人 PD 缓慢渐进性疾病过程。

### 2.2.2 腺相关病毒载体介导过表达 $\alpha$ -syn 转基因动物模型

腺相关病毒的基因组结构简单, 遗传背景清楚, 感染细胞的病毒 DNA 不会整合到宿主染色体上, 不会引起插入突变, 易改造操作, 易纯化, 感染率高, 靶细胞种类多, 可感染分裂期或非分裂期细胞<sup>[18]</sup>。重组腺相关病毒 (rAAV) 能转导神经系统有丝分裂后神经元, 在大脑维持长时期转基因表达。rAAV 载体能有效转导黑质纹状体神经元, 对黑质 DA 能神经元有高度亲和力, 可以在成年大鼠黑质纹状体 DA 能神经元稳定高水平转基因表达, 而且转导限于一个大脑半球, 对侧可作为对照。2002 年, Kirik 等<sup>[11]</sup>将编码 WT、A53T h- $\alpha$ -syn 的腺相关病毒载体立体定向注射到成年大鼠黑质建立过表达  $\alpha$ -syn 转基因大鼠,  $\alpha$ -syn 转基因表达长达 6 个月。在这些转基因大鼠中观察到细胞及轴突病变, 包括  $\alpha$ -syn 阳性包涵体, 突起营养不良性肿胀, 类似 PD 病人大脑中见到的, 并随时间进行性加重。这些病理改变优先发生在黑质多巴胺能神经元, 在同一载体转导动物的其他非多巴胺能神经元中未观察到这些病理改变。转基因大鼠黑质中 30% ~ 80% 多巴胺能神经元丢失, 纹状体 DA 含量减少 40% ~ 50%。当动物 DA 能神经元丢失 50% ~ 就会明显出现运动障碍。这些结果表明高水平 WT, 突变  $\alpha$ -syn 选择性损伤黑质 DA 能神经元, 显示出  $\alpha$ -syn 在 PD 发病机制中起了重要的作用; 而且靶向黑质纹状体过表达  $\alpha$ -syn 建立了一个新的 PD 动物模型, 可重现人类疾病重要病理、神经化学和行为学的特征。

## 3 前景和展望

迄今为止, 纵观国内外过表达  $\alpha$ -syn 转基因动物模型, 可以看出并非所有转基因动物都能表现出黑质 DA 能神经元退行性变、Lewy 小体的出现等 PD 的特征性改变。病毒介导  $\alpha$ -syn 转基因动物模型中观察到 TH 阳性神经元减少也存在差异, 可能有以下几个原因: 首先是病毒转染黑质的程度不同, 靶向小鼠黑质立体定向注射具有挑战性; 其次

是存在病毒或物种的差异性。目前没有一个 PD 动物模型能完美地复制人类 PD 的所有特征,  $\alpha$ -syn 过表达转基因 PD 动物模型能模拟人类 PD 行为学改变、神经生化改变及黑质 DA 能神经元病理改变, 故已成为 PD 动物模型研究的热点和前沿。研究发现病毒介导过表达  $\alpha$ -syn 导致选择性黑质 DA 能神经元缺失, 但却始终没有发现特征性 Lewy 小体的出现, 这可能是由于转基因表达的时间不够长, 如果能使基因表达时间延长至一定程度, 可能将会发现 Lewy 小体。随着腺病毒的研究发展, 转基因表达的时间在不断延长, 因此建立新一代腺病毒载体介导的  $\alpha$ -syn 过表达转基因 PD 动物模型将成为未来研究的重点。

### 参 考 文 献

- [1] McNaught KS, Olanow CW. Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 2006, 27(4): 530-45.
- [2] Lehmsiek V, Tan EM, Schwarz J, et al. Expression of mutant alpha-synuclein enhances dopamine transporter--mediated MPP<sup>+</sup> toxicity in vitro. *Neuroreport*, 2002, 13(10): 1279-1283.
- [3] Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in a-synuclein mice: Implications for neurodegenerative disorders. *Science*, 2000, 287(18): 1265-1269.
- [4] Wu N, Joshi PR, Masliah E, et al. Aalpha-synuclein overexpression in mice alters synaptic communication in the corticostriatal pathway. *J Neurosci Res*, 2010, 88(8): 1764-1776.
- [5] Fleming SM, Tetreault NA, Masliah E, et al. Olfactory deficits in mice overexpressing human wild type alpha-synuclein. *Eur J Neurosci*, 2008, 28(2): 247-256.
- [6] van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, et al. Neuro-pathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci*, 2000, 20(16): 6021-6029.
- [7] Richfield EK, Thiruchelvam MJ, Cory-slechta DA, et al. Behavioural and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Exp Neurol*, 2002, 175(1): 35-48.
- [8] Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S, et al. Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiol*, 2001, 8(3): 535-539.
- [9] Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, et al. Neuronal a-synucleinopathy with Severe Movement Disorder in Mice Expressing A53T Human a-synuclein. *Neuron*, 2002, 5(34): 521-533.
- [10] Martin LJ, Pan Y, Price AC, et al. Parkinson's Disease a-Synuclein Transgenic Mice Develop Neuronal Mitochondrial Degeneration and Cell Death. *J Neurosci*, 2006, 26(1): 41-50.
- [11] Kirik D, Rosenblad C, Burger C, et al. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of a-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci*, 2002, 22(7): 2780-2791.
- [12] Dong Z, Ferger B, Feldon J, et al. Overexpression of Parkinson's disease-associated alpha-synuclein A53T by recombinant adeno-associated virus in mice does not increase the vulnerability of dopaminergic neurons to MPTP. *J Neurobiol*, 2002, 53: 1-10.
- [13] Kirik D, Annett LE, Burger C, et al. Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100(5): 2884-2889.
- [14] Klein RL, King MA, Hamby ME, et al. Dopaminergic cell loss induced by human A30P alpha-synuclein gene transfer to the rat substantia nigra. *Hum Gene Ther*, 2002, 3(13): 605-612.
- [15] St Martin JL, Klucken J, Outeiro TF, et al. Dopaminergic neuron loss and up-regulation of chaperone protein mRNA induced by targeted over-expression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra. *J Neurochem*, 2007, 100: 1449-1457.
- [16] Lo Bianco C, Ridet JL, Schneider BL, et al. Alpha-synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99(16): 10813-10818.
- [17] Lauwers E, Debyser Z, Van Dorpe J, et al. Neuropathology and neurodegeneration in rodent brain induced by lentiviral vector-mediated overexpression of alpha-synuclein. *Brain Pathol*, 2003, 13: 364-372.
- [18] 崔建玲, 郭志远. 腺病毒载体的优化. *河北医科大学报*, 2006, 27(40): 301-306.