

## MPTP 小鼠脑沉默信息调节因子 1 和缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 的表达及行为学检测

崔新新<sup>1</sup>, 董素艳<sup>1</sup>, 郭彦杰<sup>2</sup>, 赵文娟<sup>3</sup>, 吴云成<sup>1</sup>

1. 上海交通大学附属第一人民医院神经内科, 上海市 200080

2. 新乡医学院第三附属医院神经内科, 河南省新乡市 453003

3. 上海交通大学药学院, 上海市 200240

**摘要:**目的 本研究旨在研究 MPTP 模型小鼠中沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 和缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 的表达情况以及行为学的变化。方法 选用 MPTP 处理 C57BL/6 小鼠构建 PD 动物模型, 采用行为学实验、高效液相色谱 (HPLC)、免疫组化等方法检验模型的建立是否成功, 并在小鼠模型中检测 SIRT1 和 HIF-1 $\alpha$  的表达情况。结果 MPTP 处理的小鼠表现出显著的行为学异常, 主要体现在自主活动减少 ( $P < 0.001$ )、步距缩短 ( $P < 0.001$ ), 且有显著运动迟缓 ( $P < 0.001$ )。HPLC 结果发现, 模型组小鼠纹状体区域多巴胺 (DA) 及其代谢产物减少 ( $P < 0.001$ )。免疫组化结果提示黑质区域多巴胺能神经元标志物酪氨酸羟化酶 (TH) 和多巴胺转运体 (DAT) 的表达明显下调 ( $P < 0.01$ )。分子生物学方面, PD 模型小鼠的 SIRT1 表达降低 ( $P < 0.05$ ), HIF-1 $\alpha$  表达增加 ( $P < 0.05$ )。结论 PD 模型小鼠表现出明显的行为学异常, 多巴胺能神经元标志物检测提示成功复制 PD 动物模型, 同时发现模型小鼠的 SIRT1/HIF-1 $\alpha$  的表达异常, 提示该信号通路可能参与了 PD 的疾病过程。

**关键词:** 帕金森病; 沉默信息调节因子 1; 缺氧诱导因子 1 $\alpha$ ; 去乙酰化; 行为学改变; 小鼠

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.01.007

## Expression of silent information regulator 1 and hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ and behavioral changes in MPTP mice

CUI Xin-Xin, DONG Su-Yan, GUO Yan-Jie, ZHAO Wen-Juan, WU Yun-Cheng. Department of Neurology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China

Corresponding author: WU Yun-Cheng, E-mail: yunchw@medmail.com.cn

**Abstract: Objective** To investigate the expression of silent information regulator 1 (SIRT1) and hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and behavioral changes in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mice. **Methods** C57BL/6 mice were treated with MPTP to establish a Parkinson's disease (PD) model. The successful establishment of PD model was confirmed by behavioral test, high-performance liquid chromatography (HPLC), and immunohistochemistry. The expression of SIRT1 and HIF-1 $\alpha$  in PD model mice was determined by Western blot. **Results** The mice treated with MPTP showed significant behavioral abnormalities: reduced autonomic activity, shortened step length, and bradykinesia (all  $P < 0.001$ ). The HPLC results showed that the PD model mice had significantly lower levels of dopamine and its metabolites in the striatum than the control mice ( $P < 0.001$ ). The immunohistochemistry results showed that the levels of tyrosine hydroxylase and dopamine transporter (dopaminergic neuron markers) in the substantia nigra of PD model mice were significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ). The PD model mice had a significantly lower level of SIRT1 and a significantly higher level of HIF-1 $\alpha$  compared with the control mice ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The PD model mice have significant behavioral abnormalities. The decrease in levels of dopaminergic neuron markers suggests that the PD model is successfully estab-

**基金项目:** 国家自然科学基金(81371410; 81671251); 上海交通大学医工交叉基金(YG2014MS31)

**收稿日期:** 2016-10-10; **修回日期:** 2016-12-30

**作者简介:** 崔新新(1989-), 女, 在读硕士, 主要研究方向为帕金森病和运动障碍疾病的临床与基础研究。

**通信作者:** 吴云成(1972-), 男, 医学博士, 教授, 博士生导师, 科主任, 主要从事脑血管病、神经变性病及运动障碍疾病的临床与基础研究。

Email: yunchw@medmail.com.cn.

lished. The abnormal expression of SIRT1/HIF-1 $\alpha$  in the PD model mice indicates that the SIRT1/HIF-1 signaling pathway may be involved in the development of PD.

**Key words:** Parkinson's disease; silent information regulator 1; hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ; deacetylation; behavioral change; mouse

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是中老年人中第二大常见的神经退行性疾病,在大于 65 岁的人群中,PD 发病率接近 1%<sup>[1]</sup>。尸检和致病基因的生物学效应等研究发现,线粒体功能异常、氧化应激、炎症及蛋白质处理异常等可能参与了 PD 的细胞功能异常和死亡机制<sup>[2]</sup>。但其具体发病机制尚未完全阐明。

沉默信息调节因子 (silent information regulation 2 homolog, SIRT), 是 NAD<sup>+</sup> 依赖性的 III 型组蛋白去乙酰化酶 (HDACs), 包括 SIRT1-7<sup>[3]</sup>。研究发现, SIRT1 在大脑中高度表达, 而 PD 细胞模型中其表达受损<sup>[4]</sup>, 而 SIRT1 激活物可缓解多巴胺能神经元的损伤<sup>[5]</sup>; 深入的机制研究发现, 过表达 SIRT1 可通过激活分子伴侣, 抑制  $\alpha$ -突触核蛋白的聚集<sup>[6]</sup>。

缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  两个亚基组成, 其中, HIF-1 $\alpha$  含量受氧浓度调节<sup>[7]</sup>, 缺氧状态下, HIF-1 $\alpha$  的降解受抑制, 与靶基因的缺氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) 结合, 促进靶基因转录<sup>[8]</sup>。研究发现多巴胺 (dopamine, DA) 合成关键酶酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 的启动子区域存在 HRE 可与 HIF-1 结合; 条件性敲除小鼠的 HIF-1 $\alpha$  基因, 可致黑质区域 TH 表达下调; 低氧及去铁胺可以通过上调 HIF-1, 增加大鼠中脑 TH 的表达; 而增加 HIF-1 的活性, 可增加中脑黑质区域 DA 的合成和分泌<sup>[9]</sup>。之前研究显示, HIF-1 $\alpha$  的稳定性和功能受翻译后修饰调控<sup>[9]</sup>, 但具体机制尚未明确。

蛋白质的乙酰化修饰是机体中一种重要的翻译后修饰方式, 可能参与 HIF-1 $\alpha$  的修饰调控。而 SIRT1 的保护作用, 主要是通过对组蛋白和非组蛋白类转录因子的去乙酰化作用实现的, 其中包括 p53、FOXO 和 HIF-1 $\alpha$  等<sup>[10,11]</sup>。有研究显示, SIRT1 可直接作用于 HIF-1 $\alpha$  674 位点赖氨酸、使其去乙酰化, 减少含量及转录活性<sup>[12]</sup>。低氧抑制糖酵解时, 发现 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-2 $\alpha$  可以导致 SIRT1 表达上调<sup>[13]</sup>。肝癌细胞系内, 下调 SIRT1 蛋白表达或抑制其活性后, 则严重损害 HIF-1 $\alpha$  蛋白的积聚及其转录活性<sup>[14]</sup>。以上研究多集中在细胞水平, 少见

活体水平研究。本实验在动物活体水平探讨 SIRT1 与 HIF1 $\alpha$  在 MPTP 处理的小鼠中变化, 探讨二者在 PD 发病过程中的变化, 为阐明 SIRT1/HIF-1 $\alpha$  信号通路参与 PD 的发病机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雄性 C57BL/6 小鼠, 8~10 周龄, 体重 24~28 g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供 (生产许可证编号: SCXK (沪) 2012-0002)。小鼠每笼 4~5 只, 自由进食和饮水, 室温 20~25℃, 相对湿度 40%~50%, 12 h 昼夜节律, 饲养于上海交通大学实验动物中心 (使用许可证编号: SYXK (沪) 2013-0052)。

### 1.2 实验动物分组给药

雄性 C57BL/6 小鼠适应 1 周后, 进行行为学训练 1 周, 随机分为对照组和模型组, 各 10 只。模型组小鼠腹腔注射 MPTP (30 mg/kg, Sigma, USA), 对照组腹腔注射等量生理盐水, 连续注射 5 d。最后一次给药后 21 d 处死小鼠, 取材, 进行后续实验。

### 1.3 行为学实验

在首次给药前 1 d、及末次给药后第 1、7、14、21 d 分别进行行为学测试。各行为学测试重复一次, 两次间隔 1 h。

1.3.1 开场实验 开场实验 (open field) 主要用于评价小鼠自发行为活动情况。将小鼠置于实验箱预订位置, 摄像机连续拍摄 5 min 全程记录活动情况, 开场实验视频分析系统 (上海移数信息科技有限公司) 分析其行走的总路程 (total distance)、中央活动路程 (center distance) 及运动轨迹等。同时, 观察并计数小鼠全程中竖立次数 (rearing)。

1.3.2 足迹实验 足迹实验 (stride length) 根据文献<sup>[15]</sup>实验装置是长 55 cm, 宽 10 cm, 高 10 cm 木制走道, 一边盲端, 另一边接黑色的鼠笼。实验时将小鼠放于盲端, 光源照射走道, 小鼠自然爬向鼠笼端。分别测量 3 个最长的前肢步长 (fore limb)、后肢 (hind limb), 取平均值。

1.3.3 爬杆实验 爬杆实验 (pole test) 的装置<sup>[16]</sup>是长 60 cm, 直径约 1 cm, 上端覆以直径约 2.5 cm

的球形突起。实验时将小鼠头朝上置于球形突起,记录其自放置于杆顶到头转向下的时间(T-turn)和自放置杆顶至爬至杆底后肢着地的总时间(T-total)。每只小鼠测试3次取平均值,每次间隔10 min以上。

#### 1.4 小鼠心脏灌注及取材

末次行为学检测结束后,小鼠心脏灌注取全脑用于组织病理学检测。按40 mg/kg腹腔注射10%水合氯醛进行麻醉,之后心脏灌注流操作,断头,小心剥离全脑,置于4%PFA进行后固定24 h后,石蜡包埋,冠状位切6  $\mu$ m切片,切片需包括完整的黑质致密部,用于免疫组织化学分析。每组另外5只颈椎脱臼处死,冰上迅速解剖黑质纹状体,液氮和-80℃储存,用于高效液相色谱或其他后续处理。

#### 1.5 高效液相色谱检测神经递质

取剥离纹状体称重,按10  $\mu$ l/mg加入含有10 mM EDTA的PBS。冰上15 min,超声破碎组织。4℃,15000 rpm,离心10 min,取上清,记录样品上清量。上清中加入等体积分含10 mM EDTA的0.4 M的冷冻HClO<sub>4</sub>混匀。冰上避光静置15 min后,4℃,15000 rpm,离心15 min,取中间层进行高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)电化学检测,检测DA及其代谢产物。

#### 1.6 免疫组化

脑组织的免疫组织化学检测酪氨酸羟化酶(TH)、多巴胺转运体(DAT)、SIRT1和HIF-1 $\alpha$ 。脑组织石蜡切片室温下0.3%过氧化氢孵育10 min,再放于封闭液(含10%山羊血清、0.2% Triton X-100的0.01 M PBS(pH 7.2))37℃封闭30 min。切片用0.01 M PBS清洗3次,每次5 min。小鼠源性的一抗anti-TH、anti-DAT、anti-SIRT1(Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA), anti-HIF1 $\alpha$ (Abcam, San Francisco, USA)按抗体说明书稀释,4℃孵育过夜。第二日,生物素标记的抗小鼠IgG处理30 min,然后加亲和素-过氧化物酶复合物(ABC kit, Vector, USA)。0.05% DAB(含0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的Tris-Hcl缓冲液)显色。

#### 1.7 蛋白质免疫印迹

组织总蛋白分离和提取方法按照试剂(sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)说明书进行,相同含量的蛋白质用SDS-PAGE进行分离,转移至PVDF膜上,经5%脱脂奶粉室温封闭45 min。PVDF膜

分别置于特定一抗anti-SIRT1、anti-TH、anti- $\beta$ Actin(Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA)、anti-HIF-1 $\alpha$ (abcam, San Francisco, USA)稀释液中孵育,4℃过夜。第二日,PVDF膜用TBST漂洗3次,孵育二抗,孵育结束后TBST洗膜。NIR扫描设备(Odyssey scanner, I-COR Bioscience)检测免疫活性,Image J软件分析蛋白条带的灰度值。

#### 1.8 RNA提取、反转录和qRT-PCR

用Trizol reagent(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)提取样品总RNA,测定提取RNA浓度。逆转录反应根据ReverTra Ace- $\alpha$  First Strand cDNA Synthesis Kit(TOYOBO CO, LTD)的说明进行,反转录RNA样品为cDNA。利用SYBR-Green real-time PCR Master Mix(Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan),以各组样品cDNA为模板,进行qRT-PCR反应。以18sRNA为内参,反应结束后,采用 $\Delta\Delta$ CT法计算目的基因的相对含量。用于扩增的每个基因的引物序列如下:

HIF1 $\alpha$ -F: GCGCGAACGACAAGAAAA

HIF1 $\alpha$ -R: GAAGTGGCAACTGATGAGCA

18s rRNA-F: CAGCCACCCGAGATTGAGCA

18s rRNA-R: TAGTAGCGACGGCGCGTGTG

#### 1.9 统计学分析

所有数据均用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。行为学数据的比较使用重复测量数据的方差分析(one-way repeated measures ANOVA),组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),组内两两比较采用Dunnett's T3检测或LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 MPTP处理小鼠表现出行为学异常

为了检测MPTP对完整脑回路中多巴胺能神经元的影响,我们检测开场实验、足迹实验、爬杆实验,检测MPTP处理后小鼠运动功能改变。实验结果显示,模型组小鼠运动的总路程(total distance)、中央路程(center distance)及竖立次数(rearing)在给予MPTP处理后第1、7、14、21天均较对照组小鼠显著下降(图1A~图1C)。给予MPTP处理后,模型组小鼠前肢及后肢步长均较对照组小鼠显著缩短(图1F~图1G)。模型组的转向时间(T-turn)及爬杆总时间(T-total)均较对照组小鼠显著延长(图1D~图1E)。以上行为学的实验结果表明,MPTP能够明显诱导小鼠行为学损伤。

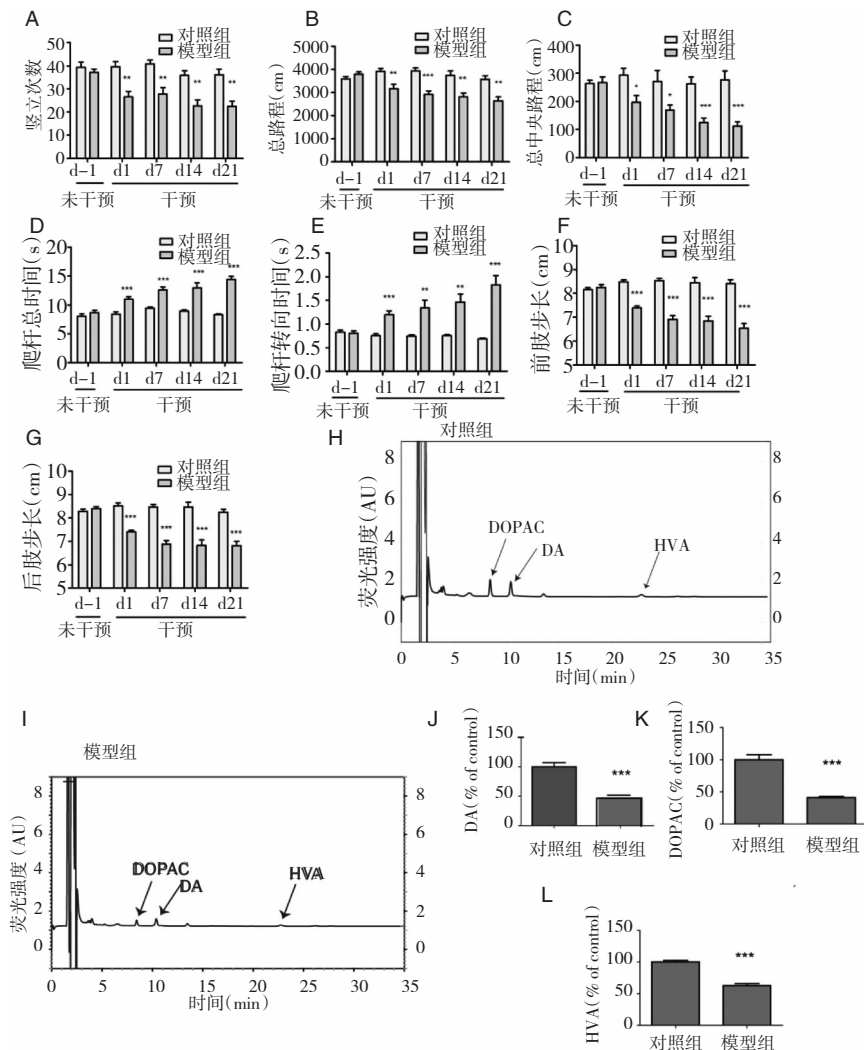


图 1 MPTP 对小鼠行为学、多巴胺及其代谢产物的影响

开场实验 ( $n = 10$ ): 检测竖立次数 (A)、总路程 (B)、中央路程 (C); 爬杆实验: 检测爬杆总时间 (D), 转向时间 (E); 足迹实验 ( $n = 10$ ): 前肢步长 (F), 后肢步长 (G)。HPLC 检测 (H-I) 纹状体中 DA (J)、DOPAC (K) 和 HVA (L) 的表达情况, 即荧光强度 (fluorescence intensity) ( $n = 5$ )。\*  $P < 0.05$ ; \* \*  $P < 0.01$ ; \* \* \*  $P < 0.001$  均为与对照组比较。

## 2.2 MPTP 处理小鼠表现出病理学改变

为了明确 MPTP 对小鼠纹状体 DA 及其代谢产物的影响, 我们选用 HPLC 检测小鼠纹状体多巴胺 (DA)、二羟基苯乙酸 (DOPAC) 及高香草酸 (HVA) 的含量 (图 1H ~ 图 1L)。MPTP 处理可以导致纹状体中 DA 含量显著下降 (对照组:  $100.00\% \pm 7.06\%$ ; 模型组:  $47.83\% \pm 4.99\%$ ;  $P = 0.0003$ ;  $n = 5$ ); 多巴胺的代谢产物 DOPAC (对照组:  $100.00\% \pm 8.02\%$ ; 模型组:  $40.96\% \pm 1.97\%$ ;  $P < 0.0001$ ;  $n = 5$ ) 以及 HVA (对照组:  $100.00\% \pm$

$2.58\%$ ; 模型组:  $62.62\% \pm 3.08\%$ ;  $P < 0.0001$ ;  $n = 5$ ) 在 MPTP 处理 21 d 后同样显著下降。为了进一步检测 MPTP 对多巴胺能神经元的神经毒性损害, 我们检测黑质致密部中 TH 和 DAT 阳性神经元含量。从图 2A ~ 图 2D 中我们发现, 与对照组相比, MPTP 降低了黑质中 TH (对照组:  $17.26\% \pm 0.28\%$ ; 模型组:  $10.82\% \pm 0.36\%$ ;  $P = 0.0048$ ,  $n = 5$ ) 和 DAT (对照组:  $19.25\% \pm 0.34\%$ ; 模型组:  $10.83\% \pm 0.16\%$ ;  $P = 0.0020$ ,  $n = 5$ ) 阳性神经元含量。

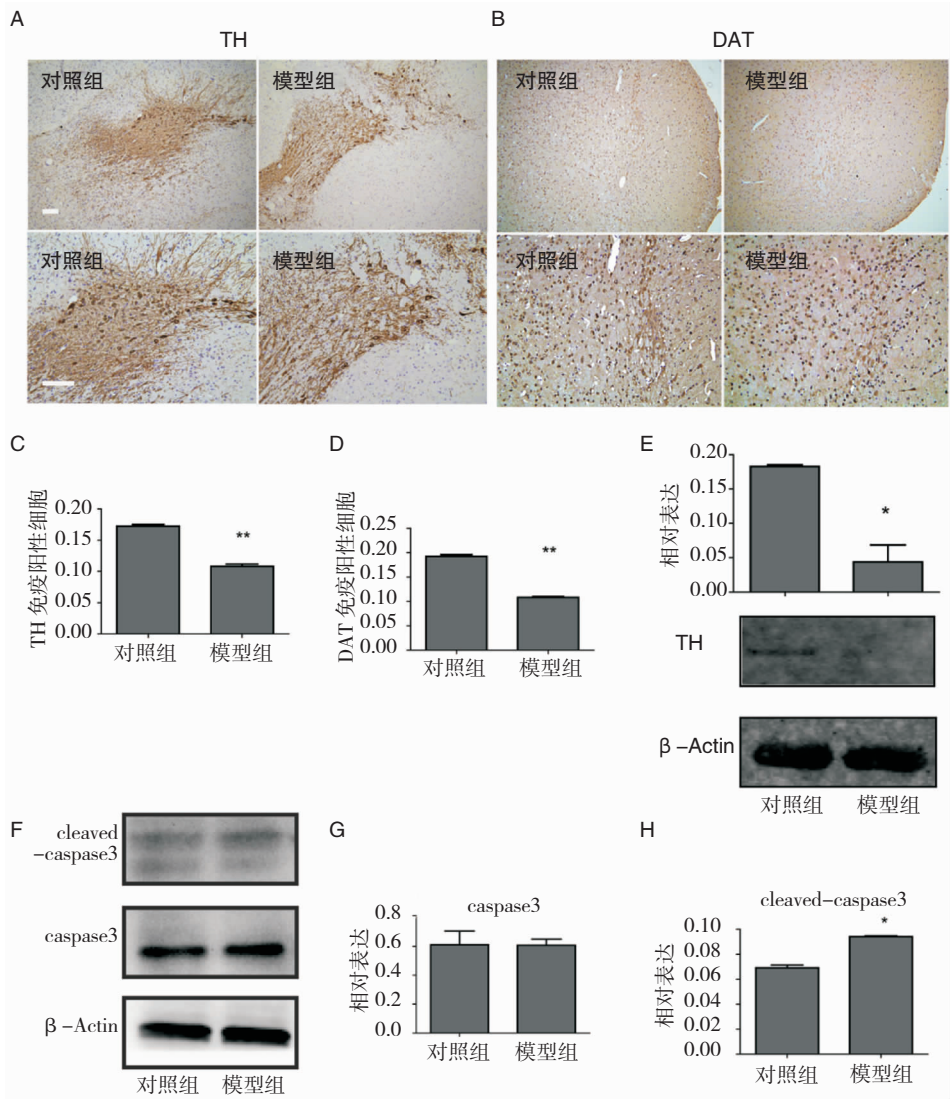


图2 MPTP对纹状体区域TH和DAT阳性神经元及TH蛋白表达的影响

纹状体区DA神经元TH(A和C)和DAT(B和D)染色的典型图片及相应的阳性神经元(immu-positive cells)计数统计图。Scale bars: 20  $\mu$ m。纹状体区TH蛋白免疫印迹图及灰度统计图(E), caspase 3和cleaved caspase 3蛋白免疫印迹图及相对表达(relative expression)灰度统计图(G和H)。\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ 均为与对照组比较( $n = 5$ )。

### 2.3 MPTP处理小鼠显著改变SIRT1和HIF-1 $\alpha$ 的含量

采用免疫组织化学检测实验动物脑组织中SIRT1和HIF-1 $\alpha$ 的表达情况。如图3A和图3C,与对照组相比,模型组SIRT1阳性细胞明显下降(对照组:5.10%  $\pm$  0.06%;模型组:3.12%  $\pm$  0.01%; $P = 0.0011$ ;  $n = 5$ );相反的是,HIF1 $\alpha$ 阳性细胞数量较对照组增加(对照组:5.17%  $\pm$  0.15%;模型组:8.06%  $\pm$  0.27%; $P = 0.0120$ ;

$n = 5$ )(图3B和图3D)。为进一步验证结果,采用蛋白印迹和qRT-PCR分别检测SIRT1和HIF-1 $\alpha$ 的蛋白质和HIF-1 $\alpha$  mRNA的含量(图3E~图3H)。与上述结果相一致,SIRT1蛋白表达下降,HIF1 $\alpha$ 的水平增加,同时,HIF-1 $\alpha$  mRNA显著增加(图3H)。纹状体蛋白印迹分析结果显示,MPTP组中TH的蛋白质含量下降,凋亡相关的蛋白剪切形式的caspase3被激活,而总的caspase3未见明显变化(图2E~图2H)。



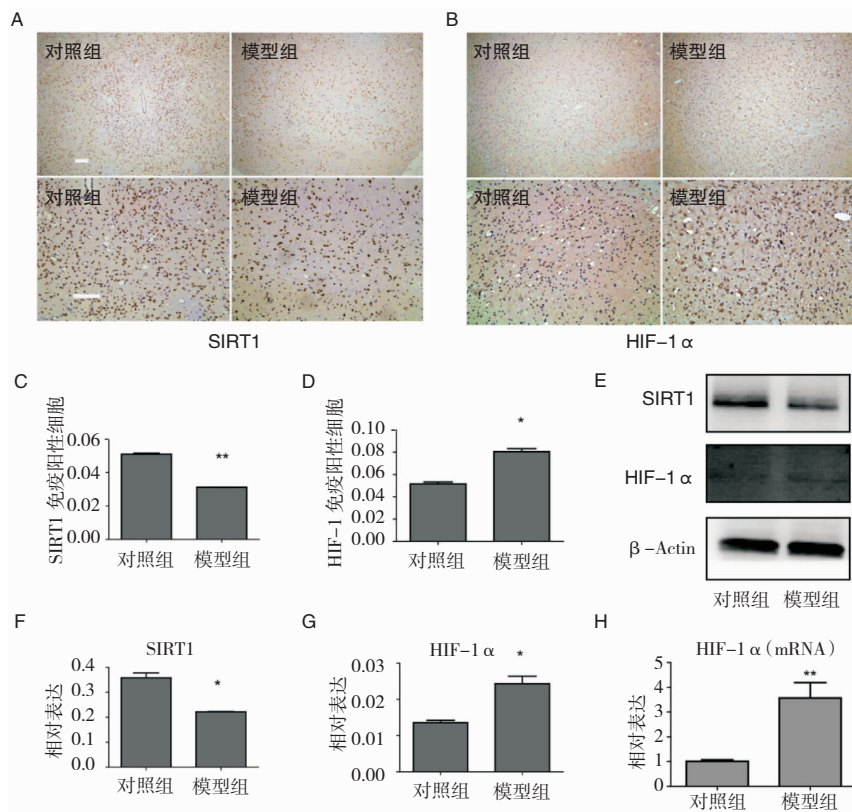


图 3 MPTP 处理小鼠对 SIRT1 和 HIF-1- $\alpha$  表达影响

SIRT1 (A 和 C) 和 HIF-1 $\alpha$  (B 和 D) 免疫组化染色的典型图片及相应的免疫阳性细胞 (immunopositive cells) 定量统计图。Scale bars: 20  $\mu$ m。纹状体区 SIRT1 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白的免疫印迹分析 (E) 及相对表达 (relative expression) 灰度统计图 (F 和 G)。纹状体区 HIF-1 $\alpha$  mRNA qRT-PCR 相对表达 (relative expression) 分析图 (H)。\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  均为与对照组比较 ( $n = 5$ )。

### 3 讨论

目前有多种 PD 动物模型的建立方法。小鼠一般采用腹腔注射造模剂构建模型。常用药物有 MPTP (30 mg/kg) 和百草枯 (10 mg/kg) 等。对于 MPTP 造模又分为急性、亚急性和慢性模型。慢性小鼠 PD 模型更适于研究药物的治疗效果<sup>[7]</sup>而急性模型多用于神经炎性和神经保护研究<sup>[17]</sup>。本研究中采用了亚急性造模方法,避免了急性造模时大剂量易致死的弊端,又避开了慢性造模时间过长混杂因素过多结果不稳定。PD 病人主要临床特点为静止性震颤、运动迟缓、肌强直等<sup>[18]</sup>。本研究中,检测多种行为学指标:开场实验用于评估小鼠的自主活动状态,是检测 MPTP 损伤后小鼠少动的常用指标;足迹试验检测步态异常,爬杆试验用于评价运动迟缓。综合各指标证实 MPTP 模型小鼠表现出明显的自主运动异常,步态异常,运动缓慢。

最近研究表明, SIRT1 和 HIF-1 $\alpha$  可能参与了 PD 的发生和发展。SIRT1 在大脑中高度表达, PD

细胞模型中其表达受损<sup>[4]</sup>, SIRT1 激活物可对抗多巴胺能神经元的损伤<sup>[8]</sup>;其机制可能是激活分子伴侣,抑制  $\alpha$ -共核蛋白的聚集<sup>[6]</sup>。HIF-1 参与 PD 疾病发生主要涉及 TH,因其启动子区域存在 HRE 可与 HIF-1 结合;条件性敲除 HIF-1 $\alpha$  基因,可致黑质区域 TH 表达受损;而条件性上调 HIF-1,能增加大鼠中脑 TH 的表达;另外增加 HIF-1 的活性,也能增加中脑黑质区域 DA 的合成和分泌<sup>[9]</sup>。但两者间具体的调控机制尚不清楚。

有研究显示,在 HT1080 细胞中, SIRT1 可直接作用于 HIF-1 $\alpha$  赖氨酸 674 位点、促进 HIF-1 $\alpha$  去乙酰化,增加其降解,降低其转录活性<sup>[12]</sup>。对多个细胞系的研究发现,低氧抑制糖酵解时, HIF-1 $\alpha$  和 HIF-2 $\alpha$  可以导致 SIRT1 表达上调<sup>[13]</sup>。另有研究提示, SIRT1 可以促进 PHD 去乙酰化,间接减少 HIF-1 $\alpha$  降解。有研究者发现,肝癌细胞系内,缺氧未改变 SIRT1 mRNA 或蛋白的表达,但可引起 HIF-1 $\alpha$  蛋白累积并上调其靶基因的表达,但下调 SIRT1 蛋

白表达或抑制其活性后,则严重损害 HIF-1 $\alpha$  蛋白的积聚及其转录活性<sup>[14]</sup>。因此认为 HIF-1 $\alpha$  是 SIRT1 去乙酰化调控的下游靶标;缺氧条件下, SIRT1 是 HIF-1 $\alpha$  蛋白积聚和激活其靶基因的必需条件<sup>[14]</sup>。另有研究对心肌细胞给予低氧预处理后,得出类似结论, SIRT1 也可以通过去乙酰化 PHD 下调其表达最终升高 HIF-1 $\alpha$  水平<sup>[19]</sup>。最新报道, MPP<sup>+</sup> 处理 SHSY-5Y 后, SIRT1 表达下降, 导致与 HIF-1 $\alpha$  启动子区域结合的组蛋白 H3K14 的乙酰化升高, 激活 HIF-1 $\alpha$  的转录使其表达水平上调<sup>[20]</sup>。Lim 等人发现 SIRT1 可结合并去乙酰化 HIF-1 $\alpha$  的第 674 位氨基酸, 进而干扰其靶基因启动子区域招募辅因子 p300, 进一步抑制后者的转录活性<sup>[9]</sup>。SIRT1 可以通过去乙酰化修饰下调脯氨酸羟化酶 PHD2 的表达, 而抑制 SIRT1 后 PHD2 的表达上调, 进而使 HIF-1 $\alpha$  降解增多, 含量减少<sup>[21]</sup>。在几个不同的肿瘤细胞系中的研究均发现, SIRT1 可以抑制 HIF-1 的活性<sup>[22]</sup>。以上研究揭示 SIRT1 和 HIF-1 间存在相互作用, 可能涉及多种调控机制, 但多数研究局限于体外实验, 本研究在体内水平, 探讨了二者在 PD 模型中的变化。为进一步深入了解二者间联系打下基础。

### 参 考 文 献

- [1] Driver JA, Logroscino G, Gaziano JM, et al. Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age [J]. *Neurology*, 2009, 72: 432-438.
- [2] Schapira AH, Olanow CW, Greenamyre JT, et al. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives [J]. *Lancet*, 2014, 384: 545-555.
- [3] Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins [J]. *Nature*, 2009, 460: 587-591.
- [4] Feng Y, Liu T, Dong SY, et al. Rotenone affects p53 transcriptional activity and apoptosis via targeting SIRT1 and H3K9 acetylation in SH-SY5Y cells [J]. *J Neurochem*, 2015, 134: 668-676.
- [5] Ferretta A, Gaballo A, Tanzarella P, et al. Effect of resveratrol on mitochondrial function: implications in parkin-associated familial Parkinson's disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842: 902-915.
- [6] Donmez G, Outeiro TF. SIRT1 and SIRT2: emerging targets in neurodegeneration [J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5: 344-352.
- [7] Sarkar S, Chigurupati S, Raymick J, et al. Neuroprotective

effect of the chemical chaperone, trehalose in a chronic MPTP-induced Parkinson's disease mouse model [J]. *Neurotoxicology*, 2014, 44: 250-262.

- [8] 崔新新, 吴云成. 缺氧诱导因子-1 在帕金森病发病机制中的研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2015, 42: 294-298.
- [9] Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70: 1469-1480.
- [10] Zhang F, Wang S, Gan L, et al. Protective effects and mechanisms of sirtuins in the nervous system [J]. *Prog Neurobiol*, 2011, 95: 373-395.
- [11] Herskovits AZ, Guarente L. SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence [J]. *Neuron*, 2014, 81: 471-483.
- [12] Lim JH, Lee YM, Chun YS, et al. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 alpha [J]. *Mol Cell*, 2010, 38: 864-878.
- [13] Chen R, Dioum EM, Hogg RT, et al. Hypoxia increases sirtuin 1 expression in a hypoxia-inducible factor-dependent manner [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 13869-13878.
- [14] Laemmle A, Lechleiter A, Roh V, et al. Inhibition of SIRT1 impairs the accumulation and transcriptional activity of HIF-1 alpha protein under hypoxic conditions [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e33433.
- [15] Fernagut PO, Diguët E, Labattu B, et al. A simple method to measure stride length as an index of nigrostriatal dysfunction in mice [J]. *J Neurosci Methods*, 2002, 113: 123-130.
- [16] Drucker-Colin R, Garcia-Hernandez F. A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function [J]. *J Neurosci Methods*, 1991, 39: 153-161.
- [17] Gordon R, Singh N, Lawana V, et al. Protein kinase Cdelta upregulation in microglia drives neuroinflammatory responses and dopaminergic neurodegeneration in experimental models of Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 93: 96-114.
- [18] Feng Y, Jankovic J, Wu YC. Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease [J]. *J Neurol Sci*, 2015, 349: 3-9.
- [19] Hong KS, Park JI, Kim MJ, et al. Involvement of SIRT1 in hypoxic down-regulation of c-Myc and beta-catenin and hypoxic preconditioning effect of polyphenols [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 259: 210-218.
- [20] Dong SY, Guo YJ, Feng Y, et al. The epigenetic regulation of HIF-1 alpha by SIRT1 in MPP(+) treated SH-SY5Y cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470: 453-459.
- [21] Rane S, He M, Sayed D, et al. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1 alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes [J]. *Circ Res*, 2009, 104: 879-886.
- [22] Yoon H, Shin SH, Shin DH, et al. Differential roles of Sirt1 in HIF-1 alpha and HIF-2 alpha mediated hypoxic responses [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 444: 36-43.