

沉默信息调节因子 1/p53 信号通路参与 MPTP 诱导的帕金森病小鼠多巴胺能神经元丢失

郭彦杰^{1,2}, 冯娅², 李璇², 赵文娟³, 马金旺¹, 吴云成²

1. 新乡医学院第三附属医院神经内科, 河南省新乡市 453003

2. 上海交通大学附属第一人民医院神经内科, 上海市 200080

3. 上海交通大学药学院, 上海市 200240

摘要:目的 研究沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 和 p53 在 MPTP 诱导的帕金森病 (PD) 小鼠模型多巴胺能神经元凋亡中的可能作用。方法 将健康雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、MPTP 组, 采用行为学方法检测行为学改变, 高效液相色谱 (HPLC) 检测多巴胺 (DA)、二羟基苯乙酸 (DOPAC) 和高香草酸 (HVA) 的含量变化, 免疫荧光染色法观察两组小鼠黑质酪氨酸羟化酶 (TH) 阳性神经元数目的变化及 SIRT1 表达情况, TUNEL 法观察黑质细胞凋亡情况, Western blot 法检测 TH、SIRT1、p53、乙酰化 p53 (ac-p53)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2) 和 Bax 的表达情况。结果 行为学结果显示 MPTP 组小鼠爬杆转向时间及爬杆总时间均较对照组小鼠显著延长 ($P < 0.01$)。HPLC 结果提示 MPTP 组的 DA、DOPAC 及 HVA 含量较对照组显著下降 ($P < 0.01$)。免疫荧光结果显示 MPTP 小鼠黑质区 TH 阳性神经元数目及 SIRT1 表达较对照组均显著减少。TUNEL 检测结果显示, 与对照组相比, MPTP 组凋亡阳性细胞数明显增多。Western blot 结果显示, 与对照组相比, MPTP 组的 TH、SIRT1、Bcl-2 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$), p53、ac-p53、Bax 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。结论 MPTP 模型小鼠行为学异常、TH 阳性神经元减少、DA 及其代谢产物下降提示成功复制 PD 动物模型, 同时 MPTP 模型小鼠的 SIRT1、p53 及凋亡相关蛋白表达异常, 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; 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶; p53; 小鼠

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.01.009

Silent information regulator1/p53 signaling pathway is involved in loss of dopaminergic neurons induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice with Parkinson's disease

GUO Yan-Jie^{1,2}, FENG Ya², LI Xuan², ZHAO Wen-Juan³, MA Jin-Wang¹, WU Yun-Cheng². 1. Department of Neurology, The Third Affiliated Hospital, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China; 2. Department of Neurology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China; 3. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

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

Abstract: Objective To investigate the possible effect of silent information regulator 1 (SIRT1) and p53 in loss of dopaminergic neurons induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in a mouse model of Parkinson's disease (PD). **Methods** Healthy male C57BL/6 mice were randomly divided into control group and MPTP group. Behavioral test was conducted to observe behavioral changes; high-performance liquid chromatography (HPLC) was used to measure the changes in the levels of dopamine (DA), dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), and homovanillic acid (HVA); immunofluorescent staining was used to observe the change in

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81371410, 81171205, 81471232, 81671251, 81971185); 上海交通大学医工交叉基金 (YG2014MS31)

收稿日期: 2019-05-20; **修回日期:** 2019-11-11

郭彦杰与冯娅为共同第一作者。

作者简介: 郭彦杰 (1990-), 女, 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。

冯娅 (1989-), 女, 在读博士, 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, 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。

E-mail: yunchw@medmail.com.cn.

the number of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons and the expression of SIRT1 in substantia nigra; the TUNEL method was used to observe cell apoptosis in the substantia nigra; Western blot was used to measure the expression of TH, SIRT1, p53, acetylated p53 (ac-p53), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bax. **Results** The behavioral analysis showed that compared with the control group, the MPTP group had longer turning time and total pole-climbing time in pole-climbing test ($P < 0.01$). HPLC results showed that the MPTP group had significantly lower levels of DA, DOPAC, and HVA than the control group ($P < 0.01$). Immunofluorescence assay showed that compared with the control group, the MPTP group had significantly lower number of TH-positive neurons and expression of SIRT1 in the substantia nigra. The TUNEL results showed that the MPTP group had a significantly higher number of apoptosis-positive cells than the control group. Western blot showed that compared with the control group, the MPTP group had significant reductions in the protein expression of TH, SIRT1, and Bcl-2 ($P < 0.01$) and significant increases in the protein expression of p53, ac-p53, and Bax ($P < 0.01$). **Conclusions** Behavioral abnormalities, reduction in TH-positive neurons, and reductions in DA and its metabolites in MPTP model mice suggest that the animal model of PD is successfully established. Abnormal expression of SIRT1, p53, and apoptosis-related proteins in MPTP model mice indicates that the SIRT1/p53 signaling pathway may be involved in the development of PD.

Key words: Parkinson's disease; silent information regulator 1; 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; p53; mouse

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种常见的神经变性疾病,其主要的病理改变是中脑黑质多巴胺能神经元的变性丢失^[1]。基因突变、环境毒素的接触、线粒体功能障碍和氧化应激等因素共同参与了PD的发病,但是多巴胺能神经元凋亡的具体机制至今未完全阐明。

p53是一种重要的转录因子,因其在细胞凋亡中的重要作用备受关注。p53蛋白含有多个保守的结构域,能够被多种转录后修饰机制所调控,如磷酸化、泛素化和类泛素化、硝基化、甲基化和乙酰化等,其中p53蛋白的乙酰化修饰是介导其转录激活的重要机制之一^[2]。沉默信息调节因子1 (silent information regulation 1, SIRT1)是一种NAD+依赖的去乙酰化酶,通过直接靶向去乙酰化组蛋白或其他转录因子如p53而被认为是一种可能的保护因子^[3,4]。本实验在动物活体水平探讨SIRT1与p53在1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)小鼠模型中的变化,为阐明SIRT1/p53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20只,10~12周龄,体重24~28g,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%,12h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 实验动物分组与给药

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MPTP组,每组各10只。MPTP组小鼠腹腔注射MPTP(30mg/kg, Sigma, USA),对照组腹腔注射等量生理盐水,连续注射5d。最后一次给药后第21天处死小鼠,取材,进行后续实验。

1.3 行为学实验

在首次给药前1天、及末次给药后第1、7、14、21天分别进行行为学测试。爬杆实验(pole test)的装置^[5]是长60cm,直径约1cm,上端覆以直径约2.5cm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,每次测试间隔10min以上。

1.4 小鼠心脏灌注及取材

末次行为学检测结束后,一部分小鼠经心脏灌注取全脑用于组织免疫荧光检测。按40mg/kg腹腔注射10%水合氯醛进行麻醉,之后心脏灌注操作,断头,小心剥离全脑,置于4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)中进行后固定24h,然后依次浸于20%和30%蔗糖溶液中脱水,至脑组织下沉至瓶底。脑组织经OCT包埋后在冰冻切片机上进行冠状切片,脑片厚度为20μm。脑片储存于脑片防冻液中,-20℃保存进行免疫荧光及TUNEL检测。另一部分小鼠经颈椎脱臼处死、断头取脑,冰上迅速分离纹状体和黑质,保存于液氮进行高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)及Western blot检测相关蛋白表达。

1.5 高效液相色谱检测神经递质

取剥离纹状体称重,按10μl/mg加入含有10

mM 依地酸钠钙 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中。冰上避光静置 15 min, 超声破碎组织。以 4℃, 15 000 rpm, 离心 10 min, 取上清, 记录样品上清量。上清中加入等体积含 10 mM EDTA 的 0.4 M 的冷冻 HClO₄ 混匀。冰上避光静置 15 min 后, 以 4℃, 15 000 rpm, 离心 15 min, 取中间层进行 HPLC 检测, 检测 DA 及其代谢产物。

1.6 免疫荧光检测黑质区 TH 阳性神经元及 SIRT1 表达

参照小鼠脑图谱每一个标本取 3 片相同部位脑片, 采用免疫荧光检测黑质区酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 阳性神经元及 SIRT1 表达。主要流程如下: 洗去脑片防冻液→冰冻切片抗原修复液室温修复 5 min→洗去抗原修复液→10% 山羊血清封闭 1 h→一抗孵育: 加 TH 及 SIRT1 抗体, 4℃ 过夜→洗去多余一抗→二抗孵育 (避光): 加抗鼠荧光二抗 (Alexa Fluor 594) 及抗兔荧光二抗 (Alexa Fluor 488), 室温 1 h→洗去多余二抗 (避光)→含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液封片→避光晾干→使用奥林巴斯 BX51 荧光显微镜, 在放大 10 倍、20 倍视野下观察拍摄。

1.7 黑质细胞凋亡检测

取 1.4 中制备的各组脑组织切片, 根据 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒操作步骤进行常规脱水、透明和封片。使用奥林巴斯 BX51 荧光显微镜, 在放大 10 倍、20 倍、40 倍视野下观察拍摄。

1.8 Western blot 检测纹状体区 TH、SIRT1、p53、ac-p53、Bcl-2、Bax 蛋白的表达

取各组小鼠纹状体组织, 称重, 按照适当比例分别加入包含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上组织匀浆器破碎 30 s, 置于冰上摇床裂解 30 min, 在 4℃、16 000 rpm 条件下离心 30 min, 收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度。各标本取 40 μg, 上样, 使用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 电泳结束后将蛋白转印到 PVDF 膜上, 完成转膜后使用 5% BSA 液室温封闭 1 h, 分别加入不同一抗 TH (1:2 000)、SIRT1 (1:1 000)、p53 (1:1 000)、ac-p53 (1:1 000)、Bcl-2 (1:1 000)、β-actin (1:2 000)、Bax (1:1 000), 4℃ 孵育过夜。次日用 TBST 清洗, 再分别加入辣根过氧化物酶标记的抗兔或抗小鼠二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, ECL 显色照相, 结果用 Image-J 软件分析图像。

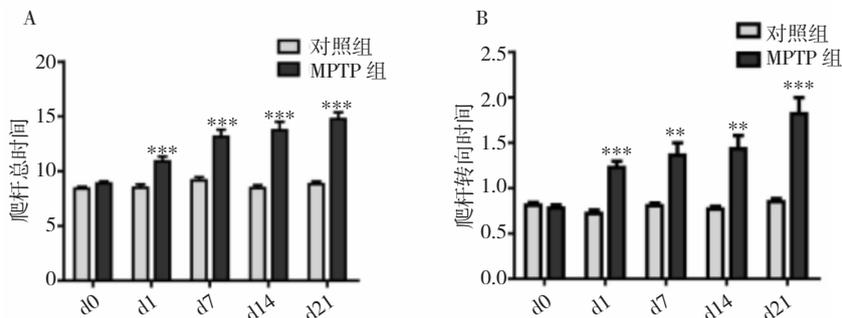
1.9 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。所有数据均用均数 ± 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; 组间比较用单因素方差分析; 组内两两比较采用 Dunnett's T3 检测或 LSD 法。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MPTP 诱导的帕金森病小鼠表现出行为学异常

爬杆试验是常用的评价 MPTP 模型小鼠运动迟缓的指标。PD 患者临床上也常常表现为运动迟缓。我们发现给予 MPTP 后的各个时间点, MPTP 组的转向时间 (T-turn) (P < 0.01) 及爬杆总时间 (T-total) (P < 0.001) 均较对照组小鼠显著延长。见图 1。



注: A: 爬杆总时间 (T-total); B: 转向时间 (T-turn)。** P < 0.01、*** P < 0.001 均为与对照组比较 (n = 10)

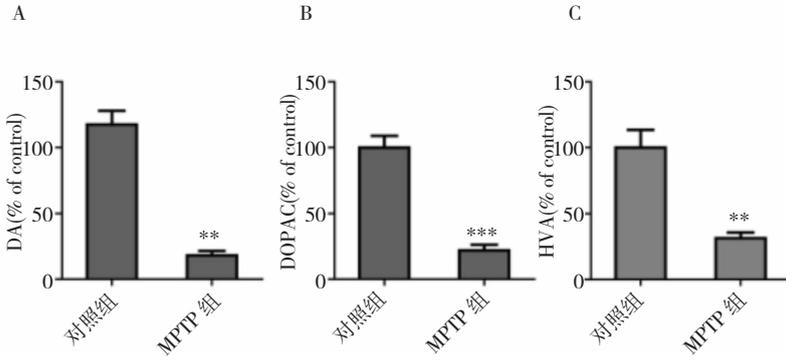
图 1 MPTP 对小鼠行为学的影响

2.2 MPTP 诱导的帕金森病小鼠纹状体多巴胺及其代谢产物含量下降

我们使用 HPLC 检测两组小鼠脑纹状体组织多

巴胺 (DA)、二羟基苯乙酸 (DOPAC) 及高香草酸 (HVA) 的含量。我们发现 MPTP 组 DA (P < 0.01)、DOPAC (P < 0.001) 及 HVA (P < 0.01) 含

量与对照组比较均明显减少。见图2。



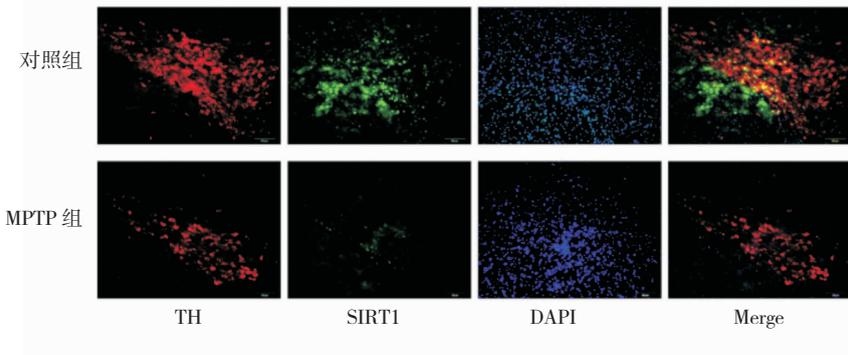
注：A：DA；B：DOPAC；C：HVA。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 均为与对照组比较 ($n = 4$)

图2 MPTP对小鼠纹状体DA及其代谢产物的影响

2.3 MPTP诱导的小鼠TH阳性神经元丢失与SIRT1蛋白表达下降一致

PD患者主要的病理改变为黑质致密部DA能神经元变性丢失。在本研究中,我们首先利用免疫

荧光双标同时染色TH阳性神经元(红色荧光)及SIRT1蛋白(绿色荧光)。我们发现MPTP组小鼠黑质区TH阳性神经元数目减少的同时,SIRT1蛋白表达也明显减少。见图3。

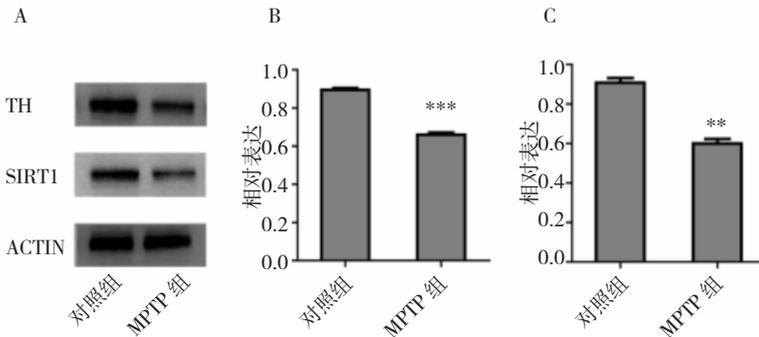


注:黑质区TH阳性神经元(红色荧光)与SIRT1免疫荧光(绿色荧光)双染典型图片,图中标尺:50 μm

图3 MPTP对小鼠黑质区TH阳性神经元及SIRT1蛋白表达的影响

进一步通过Western blot检测两组小鼠纹状体区TH及SIRT1蛋白表达水平。我们发现,MPTP组小鼠纹状体区TH及SIRT1蛋白表达与对照组比较

均明显减少(图4)。该结果与黑质区免疫荧光双标结果一致。



注:A:纹状体区TH及SIRT1蛋白Western blot图谱;B:纹状体区TH与ACTIN灰度比统计图;C:纹状体区SIRT1与ACTIN灰度比统计图。* $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 均为与对照组比较

图4 MPTP对纹状体区TH及SIRT1蛋白表达的影响

2.4 MPTP 对小鼠黑质细胞凋亡及凋亡相关蛋白的影响

细胞凋亡在 PD 的发病机制中扮演重要的角色。TUNEL 检测结果显示,与对照组相比,MPTP 组黑质区凋亡阳性细胞数明显增多(图 5)。细胞凋亡的途径通常包括外部信号途径和内部细胞凋亡途径,其中线粒体介导的细胞内部凋亡通路主要是由 DNA 损伤后激活的 p53 蛋白诱导,而 p53 蛋白的乙酰化修饰是介导其转录激活的重要机制之一。本实验中,我们发现,MPTP 组小鼠纹状体区 SIRT1 蛋白下降的同时,乙酰化的 p53 蛋白含量较对照组明显升高,同时 p53 总蛋白的含量也升高(图 6)。因此我们推测,MPTP 能通过抑制 SIRT1 而引起乙酰化的 p53 蛋白含量的升高,进而促进黑质多巴胺能细胞凋亡。

Bcl-2 家族在调控细胞凋亡中具有重要作用,其可分为促进凋亡和抑制凋亡蛋白两类。Bcl-2 和 Bax 是该家族中最主要的抑制凋亡和促进凋亡的蛋白质,细胞内此两种蛋白表达的异常与细胞凋亡的发生密切相关^[6]。我们发现,MPTP 组小鼠 Bcl-2 蛋白质的水平较对照组明显下降,与之相对应的是,MPTP 组 Bax 蛋白质水平较对照组显著升高(图 6)。

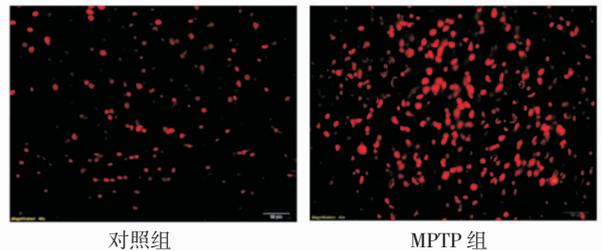
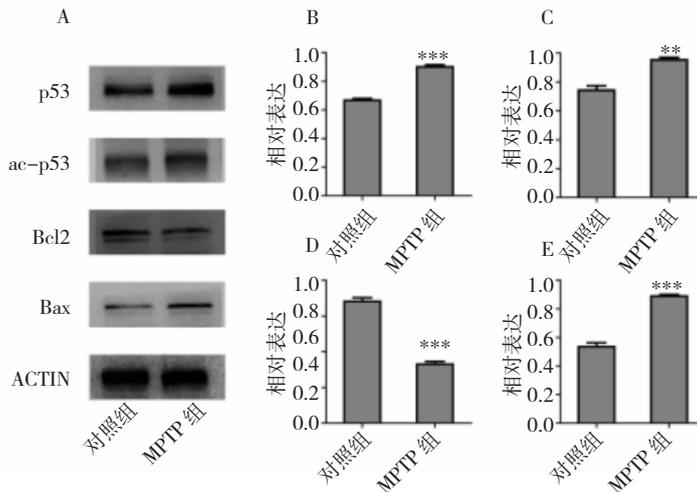


图 5 MPTP 对小鼠黑质区细胞凋亡的影响。图中标尺:20 μm



注:A:纹状体区 p53、ac-p53、Bcl-2、Bax 蛋白 Western blot 图谱;B:纹状体区 p53 与 ACTIN 灰度比统计图;C:纹状体区 ac-p53 与 ACTIN 灰度比统计图;D:纹状体区 Bcl-2 与 ACTIN 灰度比统计图;E:纹状体区 Bax 与 ACTIN 灰度比统计图。* $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 均为与对照组比较

图 6 MPTP 对纹状体区 p53、ac-p53 及凋亡相关蛋白表达的影响

3 讨论

PD 最主要的病理改变是中脑黑质多巴胺能神经元的变性丢失,且目前的多巴胺替代疗法只能缓解临床症状,未能减少多巴胺能神经元的凋亡,缓解疾病的进展^[1,7,8]。目前对 PD 的研究主要是通过神经毒素特异性的损伤中脑黑质多巴胺能神经元,模拟 PD 的病理改变和临床症状而实现的。MPTP 是常用的制备 PD 动物模型的药物^[9]。与既往研究结果一致^[10],本研究发现,MPTP 小鼠的爬杆总时间及爬杆转向时间均较对照组明显延长,因爬杆实

验是常用的评价 MPTP 模型小鼠运动迟缓的指标,爬杆动作的完成同时需要姿势调整及平衡协调能力的参与,说明本实验中 MPTP 小鼠行为学上出现运动迟缓及姿势协调障碍。同时,我们利用 HPLC 对 DA 及其代谢产物的检测结果及利用免疫荧光对小鼠黑质区 TH 阳性神经元的检测结果,共同证实本实验中 MPTP 小鼠能复制出 PD 的病理及生化改变。总之,本研究利用 MPTP 亚急性造模方式^[11],即 MPTP 按 30 mg/kg 连续腹腔注射 5 天,能够产生稳定的 PD 病理生化及行为学改变,此种造

模方法可应用于临床医学生科研和实践教学。

p53 是一种常见的转录因子,通过多种信号通路参与了细胞周期、细胞代谢和自噬、细胞凋亡等过程的调节,尤其在细胞凋亡中的作用备受瞩目。研究发现,鱼藤酮处理 PC12 细胞后,通过激活 p38MAPK 诱导 p53 蛋白向细胞核内的转移而上调 Bax 的表达,最终引起线粒体依赖的细胞凋亡^[12]。脂多糖处理 PC12 细胞后,通过激活 p53-caspase3 途径诱导细胞凋亡^[13]。神经元接触 6-羟基多巴胺后,仅 p53 蛋白丝氨酸-15 位点发生磷酸化的细胞发生死亡,表明 p53 信号通路的激活可能是 6-羟基多巴胺暴露引起细胞凋亡的始动因素^[12]。以上提示,p53 蛋白是 PD 模型多巴胺能神经元死亡的重要中介因子。p53 蛋白含有多个保守的结构域,能够被多种转录后修饰机制所调控,如磷酸化、泛素化和类泛素化、硝基化、甲基化和乙酰化等。其中 p53 蛋白的乙酰化修饰是介导其转录激活的重要机制之一。

SIRT1 是一种 NAD⁺ 依赖的去乙酰化酶,通过直接靶向去乙酰化组蛋白或其他转录因子如 p53 而被认为是一种可能的保护因子。本实验在动物活体水平探讨 SIRT1、p53 及相关凋亡蛋白在 MPTP 小鼠中变化,发现 MPTP 模型小鼠 TH 阳性神经元凋亡的同时,SIRT1 蛋白表达下调,p53 蛋白表达及其乙酰化活性上调,促凋亡蛋白 Bax 表达上调,抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,提示 SIRT1-p53 信号通路参与了 PD 的发病过程,激活或上调 SIRT1 可能通过调控 p53 蛋白乙酰化水平,进而抑制 p53 介导的细胞凋亡。未来研究靶向激活或上调 SIRT1 相关药物,可能为 PD 的治疗提供新的思路。

参 考 文 献

[1] Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease [J]. Lancet, 2015, 386(9996): 896-912.

[2] Ong ALC, Ramasamy TS. Role of Sirtuin1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming [J]. Ageing Res Rev, 2018, 43: 64-80.

[3] Feng Y, Liu T, Dong SY, et al. Rotenone affects p53 tran-

scriptional activity and apoptosis via targeting SIRT1 and H3K9 acetylation in SH-SY5Y cells [J]. J Neurochem, 2015, 134(4): 668-676.

- [4] Shi X, Pi L, Zhou S, et al. Activation of Sirtuin 1 Attenuates High Glucose-Induced Neuronal Apoptosis by Deacetylating p53 [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 9: 274.
- [5] Drucker-Colin R, Garcia-Hernandez F. A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function [J]. J Neurosci Methods, 1991, 39(2): 153-161.
- [6] Hwang GH, Jeon YJ, Han HJ, et al. Protective effect of butylated hydroxyanisole against hydrogen peroxide-induced apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes [J]. J Vet Sci, 2015, 16(1): 17-23.
- [7] 李璇,吴云成.线粒体功能障碍及相关药物在帕金森病中的作用 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2018, 45(2): 178-181.
- [8] 郭彦杰,董素艳,赵文娟,等.白藜芦醇通过 SIRT1/AMPK 信号通路减轻 MPTP 诱导的小鼠多巴胺能神经元丢失 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2016, 43(2): 97-102.
- [9] Jackson-Lewis V, Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. Nat Protoc, 2007, 2(1): 141-151.
- [10] Guo YJ, Dong SY, Cui XX, et al. Resveratrol alleviates MPTP-induced motor impairments and pathological changes by autophagic degradation of alpha-synuclein via SIRT1-deacetylated LC3 [J]. Mol Nutr Food Res, 2016, 60(10): 2161-2175.
- [11] 崔新新,董素艳,郭彦杰,等. MPTP 小鼠脑沉默信息调节因子 1 和缺氧诱导因子-1 α 的表达及行为学检测 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2017, 44(1): 28-34.
- [12] Wu F, Wang Z, Gu JH, et al. p38(MAPK)/p53-Mediated Bax induction contributes to neurons degeneration in rotenone-induced cellular and rat models of Parkinson's disease [J]. Neurochem Int, 2013, 63(3): 133-140.
- [13] Ye J, Liu Z, Wei J, et al. Protective effect of SIRT1 on toxicity of microglial-derived factors induced by LPS to PC12 cells via the p53-caspase-3-dependent apoptotic pathway [J]. Neurosci Lett, 2013, 553: 72-77.