

帕金森病转基因动物模型研究进展

梁建庆 何建成

摘要 帕金森病是中老年人常见的神经系统变性疾病,以黑质多巴胺能神经元的变性缺失和胞质内包涵体——路易小体的出现为病理特征。但是其发病机制还不清楚,治疗及预后较差。建立与人类临床病理特征相似的帕金森病动物模型是研究其发病机制及寻求有效治疗方法的新常态途径。本文主要介绍了帕金森病转基因动物模型的种类,并对其未来发展前景进行了展望。

关键词 帕金森病 转基因动物模型

中图分类号 R742

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.002

在生物医学研究领域,基础研究与临床实际之间的差异令人瞩目。造成这种情况的原因之一是实验动物模型与患病机体双方相比有很大的差异性,绝大多数疾病动物模型着重模仿特定疾病的某一阶段的最典型特征,难以反映整个病情过程中的演变规律,令基础研究的可信度大打折扣。同样的问题也困扰着帕金森病(Parkinson's disease, PD)的基础研究,PD是中老年人常见的神经系统变性疾病,以黑质多巴胺(DA)能神经元的变性缺失和胞质内包涵体——路易(Lewy)小体的出现为病理特征。目前PD的发病机制尚不清楚,临床治疗无特效药物,因此研究合适的动物模型有助于阐明该病因以及研发有效治疗药物。

一、传统PD动物模型的回顾与反思

过去几年,PD动物模型应用最广泛的是6-羟基多巴胺(6-hydroxydopa, 6-OHDA)和1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)动物模型,上述神经毒素造模的共同特点是产生氧化应激,进而引起DA能神经元细胞的死亡^[1]。令人遗憾的是,6-OHDA动物模型不能完全模拟PD患者的所有临床症状及Lewy小体的病理特征性改变。MPTP可直接损伤DA能神经元,能较好模拟PD的症状和发病过程。缺点是MPTP在动物体内代谢快速,一旦停药小

鼠的行为学功能障碍和黑质损伤病变可很快恢复,因此不能完全模拟慢性神经退行性疾病PD的特征。其他如鱼藤酮PD模型、细菌脂多糖(LPS)PD模型、利血平PD模型、去氧麻黄碱(METH)PD模型、3-硝基酪氨酸(3-NT)PD模型、甲基苯丙胺PD模型、百草枯(PQ)PD模型、蛋白酶抑制剂模型、体外细胞模型等,限于自身的局限性,有各种各样的缺陷,临床应用不广泛,处于观察、假设与验证阶段^[2]。因此,转基因动物模型的出现,为PD发病机制的阐明提供了新的实验手段。

二、PD转基因动物模型发展概况

目前与家族性PD有关的基因位点已经发现了13个,其中鉴定并报道有突变的有6个: α -synuclein(PARK4)、UCH-L1(PARK5)、LRRK2(PARK8)、Parkin(PARK2)、DJ-1(PARK7)、PINK1(PARK6)^[3],为PD转基因动物模型的构建奠定了基础。

1. α -synuclein基因(PARK4)模型:最早是在一个意大利裔美国大家系中发现的,属常染色体显性遗传。致病基因定位于4q21~23,分析确定编码 α -突触核蛋白基因的3号外显子有突变。 α -synuclein基因的G209A单基因突变,导致 α -synuclein53位丙氨酸突变为苏氨酸。在3个希腊显性遗传PD家系的受累个体中也发现了此突变。在另一个德国国家系中发现了 α -synuclein基因的A30P突变。其突变引起强毒性的蛋白质积聚最终导致DA(多巴胺)能神经元的死亡。Feany等^[4]以果蝇为模式生物构建 α -synuclein基因突变和野生型PD模型,该模型出现与年龄相关的运动功能障碍及DA能神经元缺失,神经元内含类Lewy小体的包涵体。Prasad等^[5]建立PD小鼠模型,通过表达人类野生型 α -synuclein基因,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973722);上海市科委新药开发研究项目(12401900302)

作者单位:201203 上海中医药大学基础医学院

通讯作者:何建成,教授,博士生导师,电子信箱:hejc8163@163.

com

结果显示小鼠运动功能障碍,黑质纹状体内酪氨酸羟化酶(TH)活性下降。高宁等^[6]建立了转人 α -synuclein基因的PD小鼠模型,实验结果显示转基因小鼠表现出明显的进行性运动能力障碍。

2. 泛素羧基末端水解酶(UCH-L1)基因(PARK5)模型:UCH-L1属于泛素化蛋白酶体通路家族成员,PARK5定位于染色体4P14,共有9个外显子,包含212个氨基酸残基。UCH-L1的93位异亮氨酸Ile突变为蛋氨酸(Met),与家族性PD发病有关。Son等^[7]利用斑马鱼为载体,克隆和表达UCH-L1 cDNA及其启动子,序列分析显示斑马鱼的UCH-L1与人类具有高度的同源性,达到79%。通过原位杂交技术,研究者检测到UCH-L1 mRNA表达于斑马鱼胚胎,在胚胎发育的第1天观察到神经元细胞,UCH-L1的表达域与TH重叠,TH是DA能神经元的分子标志物,进一步分析了UCH-L1基因表达的组织特异性调节,测试了其基因启动子活性和转基因斑马鱼胚胎神经元的表达。研究发现UCH-L1表达的蛋白质在斑马鱼腹侧间脑表达。这些结果显示UCH-L1基因在早期胚胎神经元细胞发育和成人大脑神经元细胞退行性变方面扮演重要角色。

3. 亮氨酸丰富区重复激酶2(leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2)基因(PARK8)模型:LRRK2是由PARK8基因编码的一种蛋白激酶。LRRK2基因编码的蛋白包括1个富含亮氨酸重复(LRR)结构域,激酶结构域,1个DFG样基序,1个RAS域,1个GTP酶域,MLK-域和WD40结构域。该蛋白质主要分布在细胞质中,但在线粒体外膜也有分布。LRRK2蛋白的突变会引起PD。Liu等^[8]研究发现LRRK2基因突变导致培养细胞的神经元变性,利用GAL4/UAS系统产生表达人野生型LRRK2或LRRK2-G2019S的转基因果蝇,引起DA能神经元损失,运动功能障碍。左旋多巴治疗改善了该模型的运动障碍,但无法阻止TH阳性神经元的丢失。该模型概括了PARK8基因导致PD的一些关键特征表现,为研究LRRK2基因突变的相关病理和PD未来的干预治疗提供了有用的动物模型。

4. Parkin基因(PARK2)模型:Parkin属于保守的泛素样蛋白(UBL)家族,具有指环模序结构,是一种泛素连接酶(E3)。首先在日本的常染色体隐性遗传青少年型PD家系中发现。此基因定位在6q25.2~27,有12个外显子,所编码蛋白含465个氨基酸残基。免疫组化显示PD患者脑内缺乏Parkin蛋白的

表达。泛素-蛋白酶体系统负责胞质内、膜内和内质网分泌通路内异常蛋白的分解代谢,是降解胞质内异常蛋白的基本生化通路,其功能障碍会导致异常蛋白的聚积和细胞死亡。PARK2基因的病理性突变会导致Parkin蛋白功能障碍,导致酶活性减弱或丧失,影响机体对蛋白的调控和异常蛋白的清除。Hasegawa等^[9]研究揭示E3在细胞模型和体内具有介导神经保护的作用。Parkin蛋白对DA能神经元的保护作用是通过抑制蛋白激酶途径激活介导的细胞凋亡。Haywood^[10]发现在过表达 α -syn的果蝇PD模型中过表达Parkin, Parkin能够抑制 α -syn蛋白对DA的毒性作用,显示了parkin在PD发病中的保护作用。

5. 核受体相关因子1(Nurr1)基因模型:Nurr1是一种转录因子,属于核受体/甲状腺激素受体超家族成员,在中脑高度表达。学界普遍认为它对中脑DA能神经元的发育、生存及其功能维持起重要作用,Nurr1的激活可增加DA表型标志基因如TH、多巴胺转运蛋白(DAT)等靶基因表达。Zetterström等^[11]构建Nurr1基因敲除大鼠模型,研究发现孤儿核受体Nurr1在DA能神经细胞的表型特征出现以前就在发育的DA能神经元中表达,缺乏基因的大鼠中脑无法产生DA能神经元,有活动减退的特征,出生后很快死亡。建议采用Nurr1配体治疗PD和中脑多巴胺系统功能失调。Le等^[12]将Nurr1基因在DA能细胞中表达以对抗MPTP导致的细胞毒性。王小同^[13]认为Nurr1基因敲除模型具有症状相类性、病理一致性、慢性进行性等类PD的特点,可作为中医药抗PD研究理想的动物模型。

6. DJ-1基因(PARK7)模型:DJ-1是PARK7基因编码的属于肽酶C56的蛋白质家族的一个成员。DJ-1基因突变首先是在荷兰和意大利2个常染色体隐性遗传的早发PD家系中发现,迄今为止,已发现的DJ-1突变有11种,包括点突变和大片段缺失。该基因定位于染色体1p36,长24kb,含7个外显子,外显子2~7包含开放阅读框,编码含189个氨基酸残基的DJ-1蛋白。这个基因的缺陷会导致常染色体隐性遗传早发性PD。DJ-1蛋白作为体内的抗氧化物质或是氧化应激的感受器,可直接参与缓解胞质内的氧化还原状态,保护DA能神经元免受氧化应激的损伤。Hennis等^[14]构建DJ-1和Parkin基因敲除小鼠模型,神经行为学、神经化学和免疫组化分析表明小鼠神经递质系统功能失调,特别是在谷胱甘肽过氧化物酶-1(GPX1)不足背景下,DA和5-

羟色胺发生了适应性变化。张梅英等^[15]构建 pcDNA3.1 - myc - his - DJ - 1^{L166P}真核表达载体,利用显微注射方法将 DJ - 1^{L166P}基因片段(约 3.9kb)导入 BDF1 小鼠受精卵雄原核并移植到同期受孕的 ICR 假孕母鼠输卵管中,成功获得 1 只 DJ - 1^{L166P}基因突变转基因小鼠模型。

7. HtrA2/Omi 基因模型:HtrA2/Omi 是 HtrA 丝氨酸蛋白酶家族的一个新成员,该基因位于人类染色体 2p13.1,含 8 个外显子,转录生成 2.1kb 和 4.5kb 两种不同的 mRNA。HtrA2/Omi 蛋白含有 458 个氨基酸,在人体大部分组织器官中都有表达,主要定位于真核生物线粒体的丝氨酸蛋白酶。在人类细胞系中,可以观察到分子质量 38000 和分子质量 40000 的两种多肽。有细胞保护和致细胞凋亡的双重作用。在凋亡信号的刺激下,Omi 蛋白和其他促凋亡因子,如细胞色素 C 等从线粒体中释放到细胞质,促发细胞凋亡。人类 HtrA2 的 PARK13 位点的点突变者易遭受 PD。Martins 等^[16]构建 HtrA2/Omi 及 HtrA2/OmiSmac/DIABLO 双基因敲除的小鼠模型,小鼠表现出严重的神经行为异常,纹状体内神经元的大量减少,线粒体功能障碍。

8. PINK1 基因(PARK6)模型:PINK1 是一种蛋白激酶,含有 581 个氨基酸残基,该蛋白存在于脑内组织和细胞线粒体的内外膜上,具有抗凋亡和抗氧化作用,该基因变异使其功能受损,引起的氧化损伤可能是常染色体隐性遗传早发性 PD 的发病原因。Kitada 等^[17]构建 PINK1 基因缺陷小鼠,探讨该基因缺陷如何导致黑质纹状体 DA 通路变性和功能障碍,发现小鼠 DA 能神经元的数量、DA 含量和 DA 受体含量水平无明显变化。然而,纹状体 DA 的释放量下降,儿茶酚胺的释放频率和释放量降低。这些结果表明,PINK1 基因在黑质纹状体通路中纹状体突触可塑性和 DA 释放方面扮演关键角色,认为 DA 生理的改变可能是黑质纹状体变性的发病前兆。原相等^[18]成功构建了 PINK1 - pcDNA3.1 - myc - his - (-)B 真核表达载体,稳定转染 SH - SY5Y 细胞后,经提取 gDNA 扩增、RT - PCR 及 Western blot 法检测到了野生型 PINK1 基因在基因组的整合、转录和蛋白水平表达。证明获得了 PINK1 基因真核表达载体和稳定表达 PINK1 蛋白的 SH - SY5Y 细胞株,为进一步研究 PINK1 基因功能及常染色体隐性遗传早发性帕金森综合征(AREP)发病机制提供了一个转基因细胞模型。

三、PD 转基因动物模型的发展前景令人瞩目

人类要想揭开 PD 发病的病因,彻底根治 PD,首先要建立能模拟人体 PD 发病机制的动物模型,目前 PD 遗传基因动物模型包括过表达基因模型、转基因模型、基因敲除以及基因突变模型等。未来 PD 基因动物模型可望能更好地模拟人类的 PD,应具备如下基本特征:可检测到 PD 的运动缺陷,可反映随年龄发展出现的选择性和渐进性 DA 能神经元损伤,有 Lewy 小体的形成,而且 PD 动物模型相应还应有较短的疾病病程周期,便于经济快速地进行病因病理机制研究及药物筛选,揭示 PD 中 DA 能神经元死亡的分子机制和发现潜在的治疗靶点^[19]。总之,转基因动物模型的出现是实验动物学领域发展的里程碑式事件,转基因技术为人类疾病动物模型研究提供了一种新的方法^[20]。该模型的出现必将对认识和治疗人类疾病起到重要的推动作用,将在医学研究领域得到广泛应用,具有广阔的发展前景。

参考文献

- 1 东惟玲,方琪,单立冬. 新型 PD 模型研究进展[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2014,21(3):211 - 214
- 2 裴媛,马进,李娜. 帕金森病模型的研究进展[J]. 中国老年学杂志,2014,34(2):543 - 547
- 3 梁洁,罗建红,金静华,等. 利用果蝇模型研究帕金森病的发病机制[J]. 浙江大学学报:医学版,2013,42(6):685 - 692
- 4 Feany MB, Bender WW. A drosophila model of Parkinson's disease [J]. Nature, 2000, 404(6776): 394 - 398
- 5 Prasad K, Tarasewicz E, Strickland PA, et al. Biochemical and morphological consequences of human α - synuclein expression in a mouse α - synuclein null background[J]. Eur J Neurosci, 2011, 33(4): 642 - 656
- 6 高宁,全雄志,陈炜,等. 帕金森病 α - Synuclein 转基因小鼠模型的建立[J]. 中国比较医学杂志,2008,18(5):28 - 31
- 7 Son OL, Kim HT, Ji MH, et al. cloning and expression analysis of a Parkinson's disease gene, UCH - L1, and its promoter in zebrafish [J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,312(3):601 - 607
- 8 Liu Z, Wang X, Yu Y, et al. A drosophila model for LRRK 2 - linked parkinsonism [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2008,105(7):2693 - 2698
- 9 Hasegawa T, Treis A, Patenge N, et al. Parkin protects against tyrosinase - mediated dopamine neurotoxicity by suppressing stress - activated protein kinase pathways [J]. J Neurochem, 2008, 105(5): 1700 - 1715
- 10 Haywood AF, Staveley BE. Mutant alpha - synuclein - induced degeneration is reduced by parkin in a fly model of parkinson's disease[J]. Genome,2006,49:505 - 510
- 11 Zetterström RH, Solomin L, Jansson L, et al. Dopamine neuron agenesis in Nurr1 - deficient mice[J]. Science,1997,276(5310):248 - 250

(下转第 9 页)

制抑郁情绪,减轻体重,降低糖化血红蛋白水平,推荐用于糖尿病合并抑郁症者。

随着生物-心理-社会医学模式的逐步推广,心理、社会因素与躯体疾病的关系日益受到重视。现代医学把糖尿病归属于心身疾病,糖尿病与抑郁症可互相影响,形成恶性循环,增加疾病治疗的难度。目前,现代医学仍处于重生物疗法、轻心理疗法的状态,对糖尿病的管理也有待加强。如何加强早期的心理干预,是改善医患沟通、提高疗效的重要环节,并需要重视个性化的抗抑郁治疗,力求打断循环链,为糖尿病合并抑郁症患者提供全面及优化的诊疗方案。

参考文献

- 1 Morris A. Long-term patterns of depression and associations with health and function in a panel study of rheumatoid arthritis[J]. J Health Psychol,2011,16(4):667-677
- 2 石媛. 2 型糖尿病患者抑郁症的患病率及控制血糖后抑郁评分的变化[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2014:15
- 3 李雪芹. 糖尿病人群伴发抑郁症临床分析[J]. 亚太传统医药,2013,9(11):135-136
- 4 杨坤,胡义秋,崔景秋,等. 糖尿病抑郁综合征的研究进展[J]. 国际精神病学杂志,2015,42(1):90-94
- 5 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 版)[M]. 北京:北京大学医学出版社,2014:67
- 6 廖虎平,徐启明. 中老年 2 型糖尿病患者抑郁症的临床干预观察[J]. 中国实用医药,2011,6(22):110-111
- 7 利玉欢,刘帅,潘志信,等. 新诊断 2 型糖尿病抑郁症的患病率及独立危险因素分析[J]. 中国医药导报,2013,10(5):53-55
- 8 黄远航,刘璟瑜,何辉,等. 2 型糖尿病患者抑郁患病情况与危险因素调查[J]. 四川生理科学杂志,2011,33(4):170
- 9 刘妮妮,张永莉. 2 型糖尿病患者抑郁症发病风险预测及验证[J]. 河北医学,2013,19(2):232-234
- 10 钱永明,王步军. 2 型糖尿病合并抑郁症的相关危险因素分析[J]. 中国误诊学杂志,2010,10(1):53

- 11 李增宏. 抑郁症的自愈疗法[M]. 北京:人民军医出版社,2010:3-5
- 12 刘晓玲,曾朝阳,田晓年,等. 住院 2 型糖尿病患者抑郁情况临床分析[J]. 中华全科医学,2012,10(9):1416-1417
- 13 俞晓薇,郭瑞芳,俞子彬. 抑郁情绪负性心态对糖尿病患者血糖影响[J]. 临床荟萃,2011,26(8):712
- 14 Gold PW. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness[J]. Mol Psychiat,2015,20(1):32-47
- 15 刘钊,陈建军,周健,等. 血液 C 反应蛋白水平与抑郁症关系的 Meta 分析[J]. 重庆医科大学学报,2014,5(1):193-198
- 16 Carvalho AF, Miskowiak KK, Hyphantis TN, et al. Cognitive dysfunction in depression-pathophysiology and novel targets[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets,2014,13(10):1819-1835
- 17 王丽. 2 型糖尿病患者抑郁患病率及相关因素分析[J]. 医学综述,2013,1(6):1127-1129
- 18 刘华明. 糖尿病合并抑郁状态肝(脾)胃不和、心阴亏损证患者内分泌激素相关性研究[D]. 北京:北京中医药大学,2013:11
- 19 徐蕾,金蓓,朱俊峰. 219 例社区糖尿病患者抑郁情绪的调查分析[J]. 中华疾病控制杂志,2011,15(2):178-180
- 20 Szémán B, Nagy G, Varga T, et al. Changes in cognitive function in patients with diabetes mellitus[J]. Orv Hetil,2012,153(9):323-329
- 21 Strachan MW, Reynolds RM, Marioni RE, et al. Cognitive function, dementia and type 2 diabetes mellitus in the elderly[J]. Nat Rev Endocrinol,2011,7(2):108-114
- 22 Cheng G, Huang C, Deng H, et al. Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies[J]. Intern Med J,2012,42(8):484-491
- 23 郑玲,刘秋爽,金晶,等. 糖尿病并发症治疗靶点的研究进展[J]. 海峡医学,2014,26(1):13-16
- 24 蓝宇涛,旷焱,平陈垦. 氧化应激介导糖尿病血管内皮损伤的研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2015,36(10):1494-1496
- 25 陈娜,陆连生,康梅,等. 糖尿病患者早期合并焦虑抑郁的相关因素分析[J]. 疑难病杂志,2011,10(2):101

(收稿日期:2015-08-23)

(修回日期:2015-09-05)

(上接第 6 页)

- 12 Le W, Conneely OM, He Y, et al. Reduced Nurrl expression increases the vulnerability of mesencephalic dopamine neurons to MPTP-induced injury[J]. J Neurochem,1999,73(5):2218-2221
- 13 王小同. 中医药抗帕金森病理想的动物模型——Nurrl 基因敲除小鼠[J]. 中华中医药学刊,2007,25(6):1117-1118
- 14 Hennis MR, Marvin MA, Taylor CM, et al. Surprising behavioral and neurochemical enhancements in mice with combined mutations linked to Parkinson's disease[J]. Neurobiol Dis,2014,62(9):113-123
- 15 张梅英,吴红联,蒯美娜,等. 突变 DJ-1 转基因小鼠模型的建立[J]. 中国医科大学学报,2009,38(11):820-823
- 16 Martins LM, Morrison A, Klupsch K, et al. Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted

deletion in mice[J]. Mol Cell Biol,2004,24(22):9848-9862

- 17 Kitada T, Pisani A, Porter DR, et al. Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2007,104(27):11441-11446
- 18 原相丽,张玉虎,廖书胜,等. 稳定表达野生型 PINK1 蛋白 SH-SY5Y 细胞株的建立[J]. 新乡医学院学报,2008,25(3):240-244
- 19 张健,徐阿晶. 帕金森病动物模型研究进展[J]. 药学服务与研究,2012,12(5):382-386
- 20 杨玉琪,赵远. 人类疾病的转基因动物模型研究概述[J]. 中国比较医学杂志,2005,15(3):170-173

(收稿日期:2015-03-09)

(修回日期:2015-09-11)