

纹状体 GDNF 调控 Glu 兴奋性毒性影响 PD 运动症状

陈 静¹ 徐娜娜¹ 高殿帅²

摘要 目的 探讨纹状体胶质细胞系源性神经营养因子(GDNF)含量降低加重帕金森病(PD)运动症状的机制。方法 雄性 C57/BL 小鼠(6~8 周龄),纹状体立体定位注射(PBS、AAV-GDNF、AAV-shGDNF),联合亚急性 PD 模型,腹腔注射 1-甲基-4-苯基-L-2,3,6-四氢吡啶(MPTP) 30 mg/(kg·d) 连续 5 d,随机分为 PBS 组、阴性对照组(NC 组)、AAV-shGDNF 组、MPTP 组、MPTP + AAV-GDNF 组、MPTP + AAV-shGDNF 组;采用行为学实验(转棒、爬杆和旷场)评估小鼠运动能力,ELISA 试剂盒检测纹状体谷氨酸(Glu)含量,Western blot 等技术检测 GLAST、GLT-1、GluN2B 等表达及分布,TUNEL 染色观察纹状体神经元凋亡。结果 与 NC 组比较,AAV-shGDNF 组小鼠纹状体 GDNF 表达下调,小鼠运动能力下降,Glu 含量升高,Glu 转运体(GLAST、GLT-1)表达分布减少。与 PBS 组比较,MPTP 组小鼠纹状体 Glu 含量升高,GluN2B 表达降低。与 MPTP 组比较,MPTP + AAV-GDNF 组小鼠运动能力提高、纹状体 Glu 含量降低、GluN2B 表达升高、神经元凋亡减少;而 MPTP + AAV-shGDNF 组小鼠运动能力下降、纹状体 Glu 含量升高、GluN2B 表达降低、神经元凋亡增多。结论 PD 病理进程中,纹状体 GDNF 表达降低可能通过下调 Glu 转运体的表达,促进 Glu 对神经元的兴奋性毒性损伤,加重运动症状。

关键词 帕金森病;胶质细胞系源性神经营养因子;谷氨酸;纹状体;运动症状

中图分类号 R 742.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1858-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.002

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是中枢神经系统第 2 大神经退行性疾病,主要病理改变为黑质纹状体通路多巴胺(dopamine, DA)能神经元进行性缺失,并由此引发一系列运动症状^[1]。纹状体是 PD 运动症状的核心脑区。PD 典型的黑质纹状体通

路 DA 缺失,可导致皮质纹状体通路谷氨酸(glutamic acid, Glu)兴奋性作用增强^[2]。临床数据显示 PD 患者血浆中的 Glu 水平显著增高^[3];而 MPTP 处理后的小鼠纹状体 Glu 也明显升高,并且与运动功能呈负相关^[4]。

Glu 兴奋性作用可通过 Glu 转运蛋白清除细胞外过量 Glu 进行调控。纹状体中主要高表达谷氨酸-天冬氨酸转运蛋白(glutamate-aspartate transporter, GLAST)和谷氨酸转运蛋白-1(glutamate transporter-1, GLT-1)^[5]。胶质细胞系源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)被广泛应用于 PD 治疗研究^[6]。有文献^[7]报道,在 GDNF 敲除小鼠的黑质中,观察到 GLT-1 表达下调, Glu 含量升高。PD 患者脑内以及 PD 模型动物纹状体中均存在 GDNF 含量降低^[8-9]。纹状体 GDNF 含量降低是否通过影响 Glu 兴奋性作用,成为 PD 运动症状不断进展的一个风险因素。该研究拟通过干扰正常小鼠及 PD 模型小鼠纹状体 GDNF 的表达,评估小鼠运动功能,并检测相应分子指标,从而明确纹状体 GDNF 含量降低是否能促进 Glu 对神经元的兴奋性毒性损伤,加重 PD 运动症状。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 100 只 C57/BL 小鼠(SPF 级),雄性 6~8 周龄,体质量 20~23 g,购自江苏集萃药康生物科技有限公司,动物使用许可证号:SCXK(苏)2018-0008。

1.1.2 试剂与仪器 腺相关病毒(上海和元生物技术股份有限公司),TUNEL 试剂盒(瑞士 Roche 公司),ELISA 试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司),GDNF 抗体(美国 Affinity 公司),GLAST 抗体、GLT-1 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司),GluN2B 抗体、 β -actin 抗体(美国 Proteintech 公司),MPTP(美国 Sigma 公司),小鼠转棒仪 ZH-600(合肥正华生物仪器设备有限公司),冷冻切片机、荧光显微镜 DM2500(德国 Leica 公司),激光成像系统 Odyssey CLX(美国 LI-COR 公司),酶标仪(美国

2022-08-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81971006);徐州市推动科技创新项目(编号:KC19016);徐州医科大学校级课题(编号:2018KJ06)

作者单位:徐州医科大学¹形态学实验教学中心、²神经生物学教研室,徐州 221004

作者简介:陈 静,女,硕士;

高殿帅,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: gds@xzhmu.edu.cn

BioTek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 脑立体定位注射 小鼠腹腔注射戊巴比妥钠 60 mg/kg 进行麻醉,固定于脑立体定位仪上,去除毛发后剪开头皮,烧灼骨膜,坐标(AP: 1.10, DV: 3.25, ML: 1.25)钻孔;微量注射器分别吸取 0.5 μ l 注射液(NC、AAV-shGDNF、AAV-GDNF、PBS) 0.05 μ l/min,留针 5 min 后缓慢拔针、缝合,并将小鼠置于恒温加热垫,待清醒后放回原笼饲养;术后第 5 周进行行为学实验(其中,MPTP 亚急性造模于术后第 4 周进行)随后分别新鲜取材和灌注固定进行后续指标检测及观察;小鼠随机分为 PBS 组、NC 组、AAV2-shGDNF 组、MPTP 组、MPTP + AAV-GDNF 组、MPTP + AAV-shGDNF 组,每组 12 只。

1.2.2 转棒实验 小鼠以隔板为界各自隔开 6 r/min 匀速转动训练 1 min;间隔 10 min 后开始测试 5 min 内匀加速从 0 r/min 速度加速至 40 r/min 速度,随后 6~10 min 以 40 r/min 匀速转动转棒,记录小鼠在转棒上停留的时间,掉落或随转棒转动 3 周均视为停止。

1.2.3 爬杆实验 直径 1 cm、长 50 cm 且顶端固定有一个直径为 1.5 cm 小球,竖直放置。小鼠头向上放置于小球上,记录小鼠从开始运动到完全转为头向下的时间和爬至杆底的时间。每只小鼠进行 3 次实验,记录数值,取均值。

1.2.4 旷场试验 将 4 个小正方形旷场反应箱底面分别平均划分成 16 个小方格,由正上方数码摄像头拍摄并自动采集数据,将 4 只小鼠分别放入 4 个反应箱内中心区域,同时点击鼠标识别小鼠,记录小鼠 10 min 内的自发活动总距离,距离越长表示活动性越高。

1.2.5 ELISA 检测 行为学实验完成后,小鼠脑组织新鲜取材,分离出纹状体,用匀浆器进行组织匀浆 3 000 r/min 离心 20 min 后取上清液,于 -20 $^{\circ}$ C 保存。按照 ELISA 试剂盒说明书进行 Glu 含量的检测。

1.2.6 Western blot 实验 取小鼠纹状体,组织匀浆,12 000 r/min 离心 20 min,取上清液,测定蛋白浓度,取等量蛋白样品,用(8%、10%、12.5%) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,电转至 NC 膜上,5%脱脂奶粉封闭后,加入一抗 Anti-GDNF(1:1 000)、Anti-GLAST(1:1 000)、Anti-GLT-1(1:1 000)、Anti-GluN2B(1:2 000)、Anti- β -actin(1:25 000) 4 $^{\circ}$ C 过夜;washing buffer 洗膜,加入二抗

(1:15 000) 室温 2 h,洗膜,Odyssey 激光成像系统扫描,Image J 图像分析软件进行分析。

1.2.7 免疫荧光实验 小鼠灌注固定(20 ml 生理盐水、4%多聚甲醛)后取脑组织,4%多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定 6 h,随后 20%、30%蔗糖梯度脱水(放置至脑组织沉底);oct 包埋剂包埋,制备冷冻切片,PBS 洗 3 次,山羊血清封闭室温 1 h,分别加入一抗 Anti-GLAST(1:100)、Anti-GLT-1(1:50) 4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 洗 3 次,加入荧光二抗(1:400) 室温 1 h,PBS 洗 3 次,DAPI 室温 10 min,PBS 洗 3 次,封片,显微镜扫描拍照。

1.2.8 TUNEL 染色实验 冷冻切片 37 $^{\circ}$ C 蛋白酶 k 孵育 15 min,PBS 洗 2 次,制备 TUNEL 反应液 50 μ l TdT + 450 μ l dUTP,玻片干燥后加入 50 μ l TUNEL 反应液 37 $^{\circ}$ C 1 h,PBS 洗 3 次,加 1 滴 PBS 镜下观察,加入 50 μ l converter-POD 37 $^{\circ}$ C 30 min,PBS 洗 3 次,加入 50~100 μ l DAB 底物 15~25 $^{\circ}$ C 2 min,水洗,苏木精复染,水洗封片,镜下观察并拍照,Image J 图像分析软件进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件分析数据, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。计量资料中正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料的组间比较,若满足正态分布方差齐性采用 One-way ANOVA,两组间比较采用 t 检验。采用 GraphPad Prism 8.0 以及 Adobe illustrator 2019 软件作图。

2 结果

2.1 纹状体 GDNF 对小鼠运动功能及纹状体 Glu 含量的影响 ELISA 结果显示(图 1A),与 NC 组相比,AAV-shGDNF 组小鼠纹状体 Glu 含量升高($P < 0.01$)。转棒实验结果显示(图 1B),与 NC 组相比,AAV-shGDNF 组小鼠在棒持续时间缩短($P < 0.05$)。爬杆实验结果显示(图 1C、D),与 NC 组相比,AAV-shGDNF 组小鼠完全到达地面所用时间延长($P < 0.05$)。

2.2 纹状体 GDNF 对 Glu 转运体表达分布的影响 Western blot 结果显示(图 2),与 NC 组相比,AAV-shGDNF 组小鼠纹状体 GDNF、GLAST、GLT-1 表达均降低($P < 0.01$)。免疫荧光结果显示(图 3),与 NC 组相比,AAV-shGDNF 组小鼠纹状体 GLAST、GLT-1 分布减少。

2.3 纹状体 GDNF 对 PD 小鼠运动功能以及神经元兴奋性损伤的影响 ELISA 结果显示(图 4A),与 PBS 组相比,AAV-shGDNF 组和 MPTP 组小鼠纹状

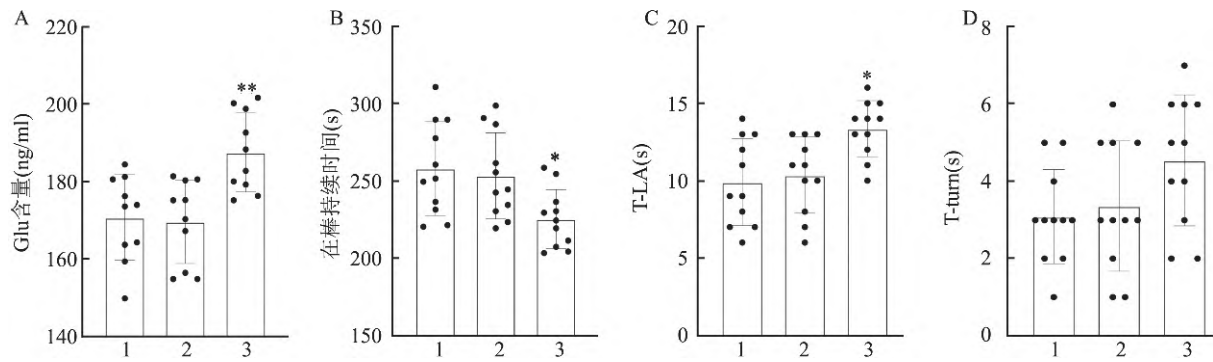
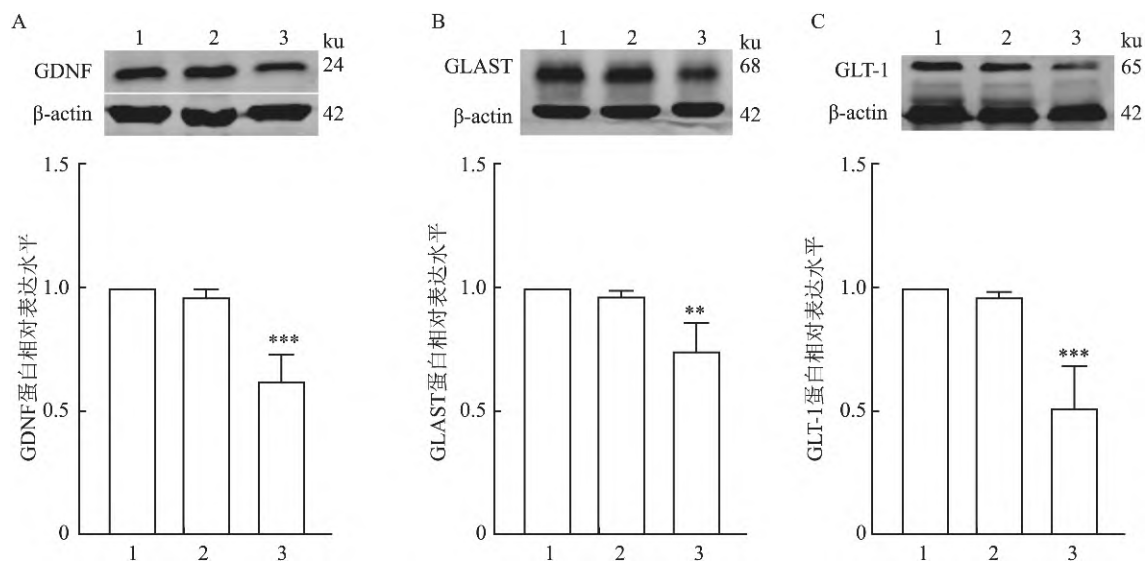


图1 纹状体 GDNF 对小鼠运动功能及纹状体 Glu 含量的影响

A: ELISA 结果统计图; B: 转棒实验结果统计图; C、D: 爬杆实验结果统计图; T-LA: 小鼠完全到达地面所用时间; T-turn: 小鼠头完全朝下所用时间; 1: PBS 组; 2: NC 组; 3: AAV-shGDNF 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图2 纹状体 GDNF 对 Glu 转运体表达的影响 ($n = 3$)

A、B、C: GDNF、GLAST 以及 GLT-1 的 Western blot 结果及统计图; 1: PBS 组; 2: NC 组; 3: AAV-shGDNF 组; 与 NC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

体 Glu 含量均升高 ($P < 0.05$); 与 MPTP 组相比, MPTP + AAV-GDNF 组小鼠纹状体 Glu 含量降低 ($P < 0.05$), MPTP + AAV-shGDNF 组小鼠纹状体 Glu 含量升高 ($P < 0.01$)。Western blot 结果显示 (图 4B), 与 PBS 组相比, AAV-shGDNF 组和 MPTP 组小鼠纹状体 GluN2B 表达均降低 ($P < 0.05$); 与 MPTP 组相比, MPTP + AAV-GDNF 组小鼠纹状体 GluN2B 表达增多 ($P < 0.001$), MPTP + AAV-shGDNF 组小鼠纹状体 GluN2B 表达降低 ($P < 0.001$)。TUNEL 染色结果显示 (图 5), 与 MPTP 组相比, MPTP + AAV-GDNF 组小鼠纹状体神经元凋亡减少 ($P < 0.05$), MPTP + AAV-shGDNF 组小鼠纹状体神经元凋亡增多 ($P < 0.05$)。旷场试验结果显示 (图 6A), 与 MPTP 组相比, MPTP + AAV-GDNF 组小鼠活动总距离增加 ($P < 0.05$), MPTP + AAV-shGDNF 组小鼠

活动总距离减少 ($P < 0.01$)。转棒实验结果显示 (图 6B), 与 MPTP 组相比, MPTP + AAV-GDNF 组小鼠在棒持续时间延长 ($P < 0.05$), MPTP + AAV-shGDNF 组小鼠在棒持续时间缩短 ($P < 0.01$)。

3 讨论

PD 运动症状的不断进展严重威胁患者的生命安全, 临床治疗 PD 并不能缓解运动症状的发展。因此, 探讨 PD 运动症状不断进展的调控机制具有重要意义。该课题组前期临床研究^[8]表明, PD 患者外周血 GDNF 含量降低。有文献^[10]报道, 纹状体 GDNF 含量降低与运动能力下降密切相关。该研究通过脑立体定位注射腺相关病毒抑制正常小鼠纹状体 GDNF 的表达, 观察到小鼠运动能力下降, 并检测到纹状体 Glu 含量升高; 而与 Glu 清除相关的转运

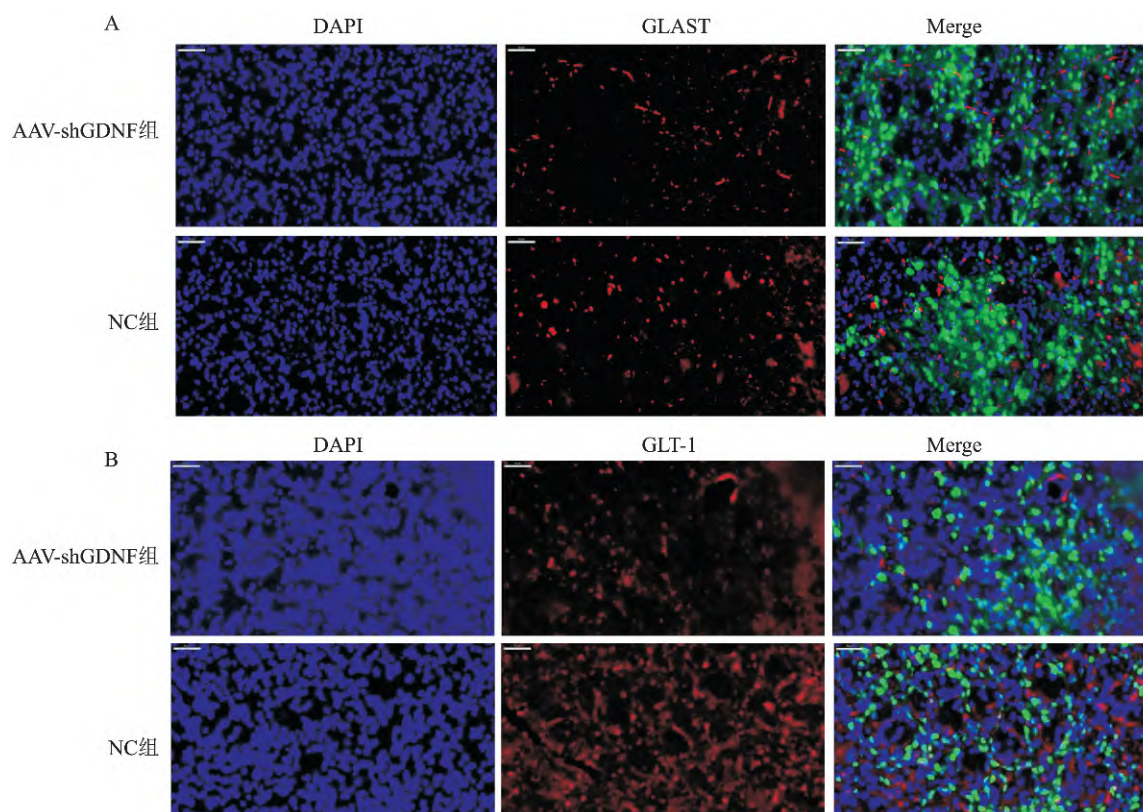
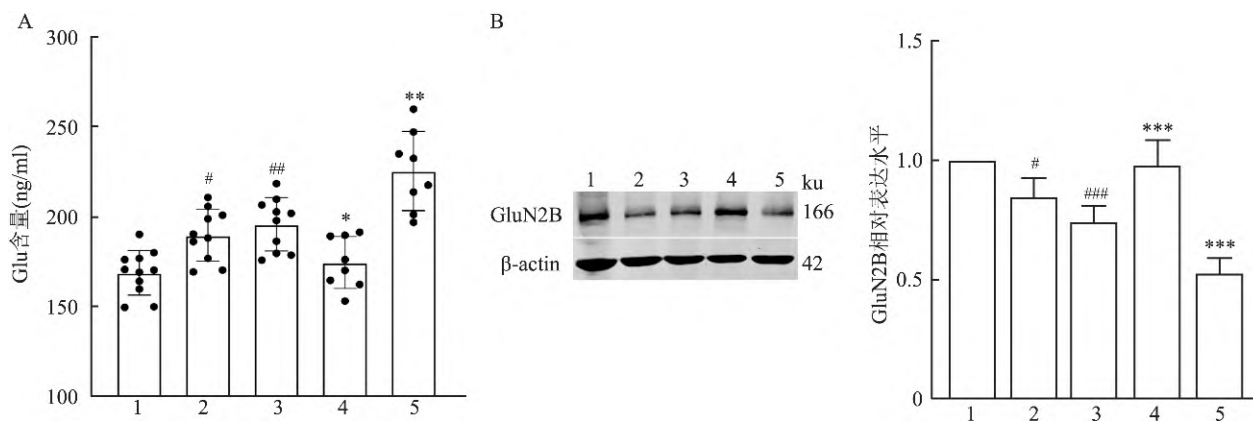
图3 纹状体 GDNF 对 Glu 转运体分布的影响($n = 6$)A、B: GLAST、GLT-1 免疫荧光结果图 $\times 40$ 

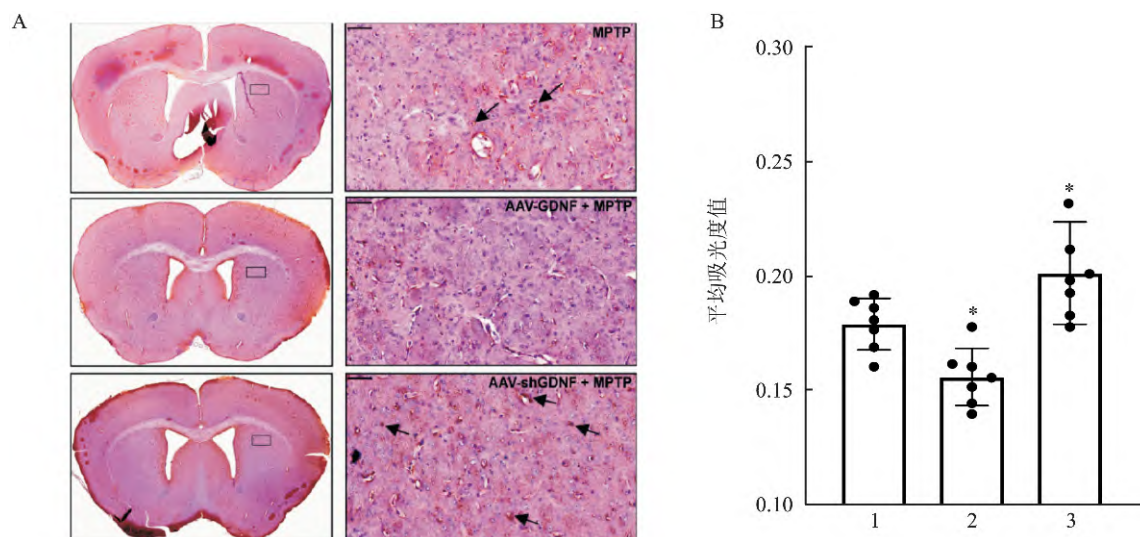
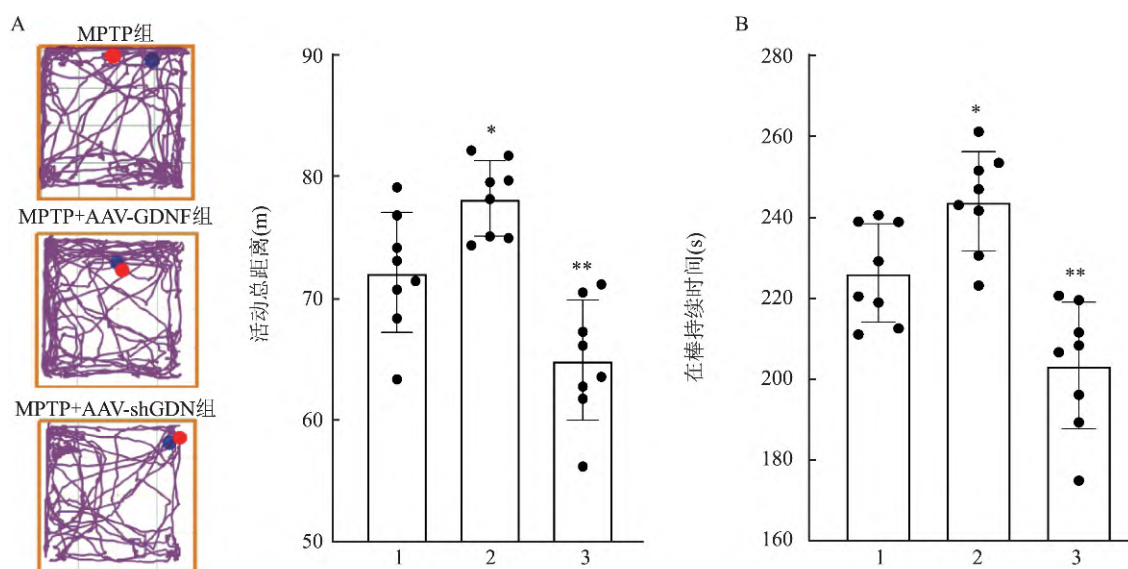
图4 纹状体 GDNF 对 PD 小鼠纹状体 Glu 兴奋性毒性的影响

A: ELISA 结果图; B: Western blot 结果及统计图; 1: PBS 组; 2: AAV-shGDNF 组; 3: MPTP 组; 4: MPTP + AAV-GDNF 组; 5: MPTP + AAV-shGDNF 组; 与 MPTP 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 PBS 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

体 GLAST、GLT-1 则表达降低。Glu 兴奋性作用增强可诱发纹状体神经元毒性损伤,从而导致丘脑对运动皮质的激活减弱;而运动皮质的兴奋性不足是运动症状的主要原因。提示,GDNF 可能通过 Glu 转运体调控 Glu 兴奋性作用,进而成为 PD 运动症状不断进展的关键因素之一。

临床研究^[11]表明,PD 患者纹状体中输入外源性 GDNF 可改善患者的运动症状。该研究通过

MPTP 诱导亚急性 PD 小鼠模型,并在此基础上干预纹状体 GDNF 的表达。行为学实验结果显示,上调 GDNF 可改善 PD 小鼠运动症状,与临床研究^[11]结果相符;而 GDNF 含量降低可加重 PD 小鼠运动症状。ELISA 试剂盒检测结果显示,PD 小鼠纹状体 Glu 含量升高,这与文献^[4]研究结果一致,而抑制纹状体 GDNF 的表达可进一步上调 Glu 含量。过量 Glu 可通过激活 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-

图5 纹状体 GDNF 对 PD 小鼠神经元兴奋性损伤的影响 ($n=6$)A: TUNEL 检测结果 $\times 40$; B: 检测结果统计图; 1: MPTP 组; 2: MPTP + AAV-GDNF 组; 3: MPTP + AAV-shGDNF 组; 与 MPTP 组比较:* $P < 0.05$ 图6 纹状体 GDNF 对 PD 小鼠运动功能的影响 ($n=8$)

A: 旷场试验结果及统计图; B: 转棒实验结果统计图; 1: MPTP 组; 2: MPTP + AAV-GDNF 组; 3: MPTP + AAV-shGDNF 组; 与 MPTP 组比较:

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

D-aspartate receptors, NMDARs) 损伤神经元^[12]。TUNEL 染色结果显示,抑制纹状体 GDNF 表达,PD 小鼠纹状体神经元凋亡增多;反之,上调 GDNF 表达,纹状体神经元凋亡减少。提示,纹状体 GDNF 含量降低可通过促进 Glu 对神经元的兴奋性损伤,加重 PD 运动症状。

6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)损伤的 PD 大鼠纹状体 NMDARs 亚基 GluN2A 与 GluN2B 比值升高^[13],而纹状体 GluN2B 在运动技能

学习中起重要作用^[14]。另有文献^[15]报道,间歇 θ 脉冲刺激纹状体可改善 6-OHDA 诱发的运动症状,但抑制 GluN2B 激活,这一改善作用被消除。提示,选择性激活 GluN2B 是 PD 运动症状改善的关键。该研究重点检测纹状体 GluN2B 的表达,结果显示,PD 小鼠纹状体 GluN2B 表达降低,而抑制 PD 小鼠纹状体 GDNF 表达可进一步下调 GluN2B。这一结果同样说明,纹状体 GDNF 含量降低可加重 PD 运动症状。

综上所述,该研究以神经营养因子 GDNF 为源头,从 Glu 清除障碍促进神经元兴奋性毒性损伤的角度出发,探讨 PD 运动症状不断进展的调控机制。该研究可为临床治疗 PD 运动症状提供可靠的实验依据,也为研究 PD 发生发展提供新思路。

参考文献

- [1] De Pablo-Fernandez E, Lees A J, Holton J L, et al. Prognosis and neuropathologic correlation of clinical subtypes of Parkinson disease [J]. *JAMA Neurol*, 2019, 76(4): 470–9.
- [2] Creed R B, Roberts R C, Farmer C B, et al. Increased glutamate transmission onto dorsal striatum spiny projection neurons in Pink1 knockout rats [J]. *Neurobiol Dis*, 2021, 150: 105246.
- [3] Figura M, Kusmierska K, Bucior E, et al. Serum amino acid profile in patients with Parkinson's disease [J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0191670.
- [4] Noguchi J, Nagaoka A, Hayama T, et al. Bidirectional *in vivo* structural dendritic spine plasticity revealed by two-photon glutamate uncaging in the mouse neocortex [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 13922.
- [5] Smaga I, Gawlinska K, Frankowska M, et al. Extinction training after cocaine self-administration influences the epigenetic and genetic machinery responsible for glutamatergic transporter gene expression in male rat brain [J]. *Neuroscience*, 2020, 451: 99–110.
- [6] Gantner C W, de Luzy I R, Kauhausen J A, et al. Viral delivery of GDNF promotes functional integration of human stem cell grafts in Parkinson's disease [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(4): 511–26.
- [7] Farrand A Q, Gregory R A, Scofield M D, et al. Effects of aging on glutamate neurotransmission in the substantia nigra of Gdnf heterozygous mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(3): 1569–76.
- [8] Virachit S, Mathews K J, Cottam V, et al. Levels of glial cell line-derived neurotrophic factor are decreased, but fibroblast growth factor 2 and cerebral dopamine neurotrophic factor are increased in the hippocampus in Parkinson's disease [J]. *Brain Pathol*, 2019, 29(6): 813–25.
- [9] Gavin A M, Walsh S, Wyatt S, et al. 6-Hydroxydopamine induces distinct alterations in GDF5 and GDNF mRNA expression in the rat nigrostriatal system *in vivo* [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 561: 176–81.
- [10] D'Avila L F, Dias V T, Milanesi L H, et al. Interesterified fat consumption since gestation decreases striatal dopaminergic targets levels and gdnf impairing locomotion of adult offspring [J]. *Toxicol Lett*, 2021, 339: 23–31.
- [11] Whone A, Luz M, Boca M, et al. Randomized trial of intermittent intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease [J]. *Brain*, 2019, 142(3): 512–25.
- [12] Verma M, Wills Z, Chu C T. Excitatory dendritic mitochondrial calcium toxicity: implications for Parkinson's and other neurodegenerative diseases [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 523.
- [13] Mellone M, Stanic J, Hernandez L F, et al. NMDA receptor GluN2A/GluN2B subunit ratio as synaptic trait of levodopa-induced dyskinesias: from experimental models to patients [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 245.
- [14] Duan Y H, Wang Q, Zeng Q W, et al. Striatal GluN2B involved in motor skill learning and stimulus-response learning [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 135: 73–85.
- [15] Natale G, Pignataro A, Marino G, et al. Transcranial magnetic stimulation exerts "rejuvenation" effects on corticostriatal synapses after partial dopamine depletion [J]. *Mov Disord*, 2021, 36(10): 2254–63.

Striatal GDNF affects the motor symptoms of PD by regulating Glu excitotoxicity

Chen Jing¹, Xu Nana¹, Gao Dianshuai²

(¹Experiment Teaching Center of Morphology, ²Teaching and Research Section of Neurobiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004)

Abstract Objective To explore the mechanism of motor symptoms in Parkinson's disease (PD) aggravated by decreased glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in striatum. **Methods** Male C57/BL mouse (6–8 weeks), were administered of PBS, AAV-GDNF or AAV-shGDNF in striatum by brain stereoscopic injection, combined with sub-acute PD model, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) 30 mg/(kg·d) was administered through intraperitoneal injection for five consecutive days; subsequently, mice were randomly divided into PBS group, negative control (NC) group, AAV-shGDNF group, MPTP group, MPTP + AAV-GDNF group, MPTP + AAV-shGDNF group. Behavior tests (rotarod, pole and field) were applied for assessing the motor ability of mice; ELISA kit was used to detect striatal glutamic acid (Glu) content; Western blot and other techniques were carried out to detect the expression and distribution of GLAST, GLT-1 and GluN2B in striatum; TUNEL staining

乳源六肽通过 FoxO3a-MnSOD 通路 减少酒精诱导的氧化应激缓解肝损伤

李安琪¹, 祝晓梅², 黄九九¹, 秦宜德¹, 戚楠¹

摘要 目的 研究乳源六肽脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-脯氨酸-天冬酰胺(PGPIP)和其截短五肽脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-脯氨酸(PGPIP)缓解小鼠慢性酒精性肝损伤及其相关的分子机制。方法 60只昆明小鼠随机均分为对照组、模型组、谷胱甘肽(GSH)组、PGPIP组、截短五肽PGPIP组。采用梯度酒精灌胃的方法建立小鼠慢性酒精性肝损伤模型,造模的同时给予药物干预,共12周。肝脏HE染色分析各处理组对小鼠酒精性肝损伤的病理学影响。体外分离培养小鼠原代肝细胞和人正常肝细胞系L-02,水溶性四氮唑-1(WST-1)细胞增殖及细胞毒性检测确定各种细胞合适的PGPIP诱导浓度。持续诱导L-02细胞不同时间,Western blot检测人叉头框蛋白O3(FoxO3a)和磷酸化FoxO3a蛋白质的表达,确定合适的诱导时间。免疫荧光染色检测FoxO3a在L-02细胞中的亚细胞定位。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测不同处理组小鼠原代肝细胞和L-02细胞FoxO3a和锰超氧化物歧化酶(MnSOD)基因mRNA的变化。结果 PGPIP组和PGPIP组病理学检查类似GSH组,小鼠肝脏损伤明显减轻。分别选择中浓度和高浓度PGPIP诱导小鼠原代肝细胞和L-02细胞。在16h,L-02细胞FoxO3a蛋白表达显著增加,并且FoxO3a

蛋白主要表达于细胞核内。此外,在相应剂量PGPIP诱导后,两种类型细胞中mRNA水平的显著增加。结论 PGPIP和截短五肽PGPIP能减少小鼠慢性酒精性肝损伤,其机制可能是通过FoxO3a-MnSOD信号通路,减少酒精诱导的氧化应激从而发挥作用。

关键词 PGPIP; 酒精性肝损伤; 氧化应激; FoxO3a; MnSOD
中图分类号 R 575.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1864-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.003

牛乳来源的六肽脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-脯氨酸-天冬酰胺(Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn,PGPIP)是位于A2 β -酪蛋白的63~68残基上,被酶解产生的肽段,可以通过化学方法人工合成。PGPIP含有3个脯氨酸(proline,Pro),在体内不易被蛋白酶分解。PGPIP已被报道^[1-3]有许多重要的生物学功能,例如抗癌、免疫调节及减轻慢性酒精性脂肪肝和急性肝脏损伤。临床上对酒精性脂肪肝的治疗通常使用激素和抗氧化药物,副作用较多。目前口服谷胱甘肽(glutathione,GSH)阿拓莫兰已经被作为处方药用于防治多种类型肝脏疾病^[4],但是口服GSH容易被消化系统蛋白酶降解。有研究^[5]报道多肽类药物氨基酸序列中天冬酰胺(asparagine,Asn)的酰胺基在体内易发生脱酰胺化,侧链的酰胺基团脱去转变为羧基,从而使药物治疗效果不稳定。该研究在前期研究的基础上,使用

2022-09-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81472448); 安徽省自然科学基金(编号: 1908085MH280)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院¹ 生物化学与分子生物学教研室、² 组织学与胚胎学教研室, 合肥 230032

作者简介: 李安琪,女,硕士研究生;

戚楠,男,博士,副教授,责任作者, E-mail: 2002500034@ahmu.edu.cn

was applied for observing the apoptosis of neurons in striatum. **Results** Compared with the NC group, the mice of the AAV-shGDNF group, with down-regulation of GDNF in striatum, had poor motor ability, decreased Glu transporter (GLAST and GLT-1), and increased Glu content. Compared with the PBS group, the mice of the MPTP group had increased Glu content and decreased GluN2B in striatum. Compared with the MPTP group, the mice of the MPTP + AAV-GDNF group showed enhanced motor ability, along with decreased Glu content, increased GluN2B and less neurons apoptosis in striatum; while, the mice of the MPTP + AAV-GDNF group showed worse motor ability, along with augmented Glu content, reduced GluN2B and more neurons apoptosis in striatum. **Conclusion** In PD pathological process, decreased striatal GDNF may promote the neurons apoptosis by enhancing Glu excitotoxicity, thereby leading to the aggravation of motor symptoms.

Key words Parkinson's disease; glial cell line-derived neurotrophic factor; glutamic acid; striatum; motor symptom