

维生素 B3 对 PINK1^{B9} 突变转基因果蝇模型的保护作用研究

陈盼¹ 林小慧¹ 曾爱源¹ 李清华¹ 陈梅玲¹ 张鑫磊²

摘要 目的 探讨维生素 B3 对 PINK1^{B9} 突变转基因果蝇的保护作用及其可能机制。方法 选用 TH-Gal4/UAS 系统的 PD 转基因果蝇模型,按处理方式分为正常对照组、PD 转基因果蝇模型组、PD 转基因果蝇模型 + 维生素 B3 干预组,PD 转基因果蝇模型用 GAPDH2 RNAi 基因干预 + 维生素 B3 干预组,进行果蝇形态学、ATP 水平、果蝇的 mRNA 水平和蛋白印记检测。结果 适当浓度的维生素 B3 能部分挽救 PINK1^{B9} 果蝇的飞行能力和降低翅膀异常率。并且上调了 GAPDH 和 NDUFS3 蛋白的表达,增加 ATP 生成的相对水平。再用 GAPDH2 RNAi 干预 PINK1^{B9} 转基因果蝇后 GAPDH 和 NDUFS3 蛋白表达相应下降。结论 维生素 B3 可能通过上调 GAPDH 和 NDUFS3 水平发挥调控糖酵解和氧化磷酸化起到保护作用。

关键词 维生素 B3; PINK1^{B9} 转基因果蝇; 糖酵解; 氧化磷酸化

中图分类号 R 74; R 394

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1642-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.013

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经退行性疾病,其发病机制目前尚不完全清楚,线粒体呼吸链复合物 I (complex I, CI) 功能损害导致的氧化磷酸化功能障碍近年来被认为是 PD 发病的重要因素^[1-2]。而 PINK1^{B9} 果蝇是研究 PD 发病机制和药物治疗的经典模型^[2]。同源性磷酸酶-张力蛋白诱导激酶 1 (PTEN-induced putative kinase1, PINK1) 突变的 PD 患者脑细胞中的 CI 活性显著下降^[3-4]。研究^[5]显示线粒体呼吸链电子载体辅酶 Q 虽然能显著增加线粒体膜电位,提高 CI 活性,但不能显著改善 PINK1 突变的 PD 转基因果蝇模型的症状,提示 PD 患者除 CI 损害外,还存在其

它发病机制。糖酵解是线粒体氧化磷酸化的准备阶段,以供氧化呼吸链中合成腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)^[6]。维生素 B3 的一种存在形式烟酰胺(niacinamide, NAM)不但可以合成 NAD⁺,还能诱导 GAPDH 表达^[7-8],可以补充糖酵解减少引起的氧化磷酸化的底物短缺,改善症状。该课题将用不同浓度的维生素 B3 对 PINK1^{B9} 果蝇进行干预,来研究维生素 B3 与糖酵解和氧化磷酸化的关系。

1 材料与方法

1.1 主要材料 果蝇的品系: UAS-PINK1^{B9}/FM7; TH-Gal4/T2 果蝇和 W1118(野生型)两种果蝇品系为中南大学医学遗传学国家重点实验室赠给; GAPDH2RNAi 果蝇、TH-GAL4 果蝇购自美国 Bloomington 果蝇中心,选择性启动基因在果蝇多巴胺神经元表达的启动子。

1.2 果蝇的培养 将酵母粉、琼脂、玉米粉、葡萄糖、蔗糖、水 6 种食材按一定的比例加热并搅拌 30 min 左右至煮沸,后冷却至 70 °C 左右,加入溶解于无水乙醇的对羟基苯甲酸甲酯,再加入溶解在 ddH₂O 中初始浓度为 0.2 mol/L 的维生素 B3(美国 Sigma 公司)按体积比配成需要浓度(正常对照组加入等量的 ddH₂O),加入到培养基中搅拌均匀,冷却后制成培养基。果蝇置入培养基后于 25 °C、湿度 60%~70%、光照周期 12 h/12 h 的恒温培养箱中培养。

1.3 果蝇杂交 正常对照组:用 W1118 的处女蝇和 TH-GAL4 雄性果蝇杂交,收取 F1 代,基因型为 W1118/+; TH-GAL4/+ 目的果蝇。构建基因型为 UAS-PINK1^{B9}/y; TH-GAL4/+ 的 PD 转基因果蝇模型组:将 UAS-PINK1^{B9}/FM7; TH-Gal4/T2 的处女蝇与 W1118 雄果蝇杂交,收取 F1 代即可。PD 转基因果蝇模型 + 维生素 B3 干预组: UAS-PINK1^{B9}/FM7; TH-Gal4/T2 的处女蝇与 W1118 雄果蝇杂交,置于含有维生素 B3 的培养基中,收取 F1 代基因型为 UAS-PINK1^{B9}/y; TH-GAL4/+。PD 转基因果蝇模型用 GAPDH2 RNAi 基因干预 + 维生素 B3 干预:将

2017-06-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81560582,81360488)

作者单位:¹桂林医学院附属医院神经内科 桂林 541001

²桂林医学院临床学院 桂林 541004

作者简介:陈盼,女,硕士研究生;

林小慧,女,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: 1209414711@qq.com;

曾爱源,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: 973964667@qq.com

UAS-PINK1^{B9}/FM7; TH-GAL4 的处女蝇与 GAPDH2 RNAi 果蝇的雄果蝇, 收取 F1 代, 基因型为 UAS-PINK1^{B9}/y; GAPDH2RNAi/+; TH-GAL4/+ 放入含有药物的培养基中。

1.4 果蝇形态学检测 用二氧化碳麻醉, 并选出 100 只左右第 5 天目的果蝇, 按每管 5 只, 随机分入空果蝇培养管。1 h 左右果蝇完全苏醒, 观察果蝇翅膀形态以及飞行率。在相同条件下, 重复上述试验 3 次, 统计学分析实验结果。

1.5 ATP 检测 上述各组果蝇, 随机挑选 30 只目的果蝇, 切取果蝇头部, 按 ATP Determination Kit(上海 Thermo Fisher 公司) 说明书步骤逐步进行, 得到目的果蝇 ATP 组织测定液, 使用 Tecani-control infinite 50 多功能酶标仪检测。上述实验独立重复 3 次, 并进行统计学分析。

1.6 检测果蝇的 mRNA 水平 随机取 30 只目的果蝇头部, 用 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司) 提取总 RNA, 用实时荧光定量 PCR 检测上述 4 组果蝇 GAPDH 及 ND42 mRNA 表达水平。PCR 引物序列如下: 18S 上游: 5'-TCTAGCAATATGAGATTGAGCA-ATAAG-3'; 下游: 5'-AATACACGTTGATACTTTCATTGTAGC-3'; GAPDH 上游: 5'-GCCAAAAGGGTCATC-ATCTC-3'; 下游: 5'-GTAGAGGCCAGGGATGATGTTTC-3'; ND42 上游: 5'-CGTTTCGATGTCCCGGAGCT-3'; 下游: 5'-GTCTGCATTGTAGCCAGGAC-3'。

1.7 Western blot 检测蛋白质表达水平 随机选出上述 4 组目的果蝇 30 只, 切取果蝇头部, 按 1:100 加入 RIPA 裂解液及蛋白磷酸酶抑制剂(ThermoFisher 公司), 提取总蛋白。取 6 μl 蛋白样品使用 mini-PROTEIN 3-电泳模块组件(上海 Bio-Rad 公司) 通过 12% SDS-PAGE 分离, 并将蛋白转至 NC 膜上, 随后在室温下孵育 120 min, 5% 胎牛血清蛋白(北京索来宝公司)。加入相应一抗 β-actin 抗体(1:1000 稀释, Abcam 公司)、GAPDH 抗体(1:1000 稀释, Santa Cruz 公司)、NADH 脱氢酶辅酶铁硫蛋白 3(NADH dehydrogenase ubiquinoneiron-sulfur protein 3, NDUFS3) 抗体(1:1000 稀释, Abcam 公司) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜后滴加化学发光试剂(ThermoFisher 公司) 发光液, 通过 Image Lab 5.1 显现。胶片扫描后进行光密度分析, Image Pro Plus 图像分析软件分析。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件, 对实验数据进行处理及分析, 计算出的数值用 $\bar{x} \pm s$ 表

示, 单因素方差分析进行组间比较; LSD 法进行两组间比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的维生素 B3 对 PINK1^{B9} 转基因果蝇运动的影响 预实验结果显示维生素 B3 对 PINK1^{B9} 果蝇表型和飞行有一定的改善。因此, 为了进一步探索维生素 B3 对其影响, 本研究在食物培养基中加入 0、10、20、40 mmol/L 维生素 B3, 结果显示 20 mmol/L 时保护果蝇的飞行和翅膀异常作用最好。在后期的实验中, 维生素 B3 采用的浓度是 20 mmol/L。见图 1。

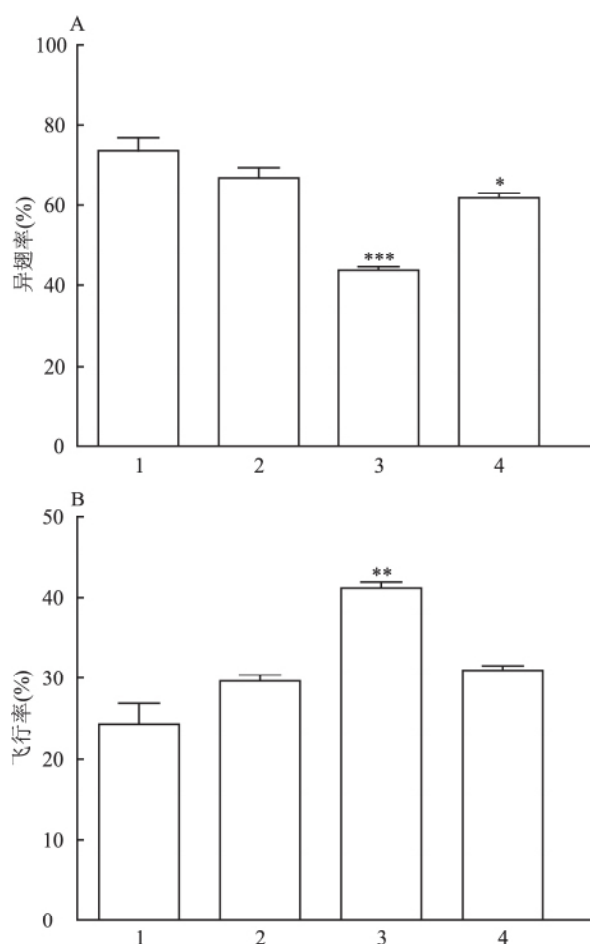


图1 不同浓度的维生素 B3 干预 PINK1^{B9} 转基因果蝇的影响

A: 果蝇异翅率; B: 果蝇飞行率; 1: 0 mmol/L 维生素 B3; 2: 10 mmol/L 维生素 B3; 3: 20 mmol/L 维生素 B3; 4: 40 mmol/L 维生素 B3; 与 0 mmol/L 维生素 B3 (正常对照组) 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.2 维生素 B3 对 TH-GAL4/UAS 系统的 PINK1^{B9} 转基因果蝇及 GAPDH RNAi 基因敲低果蝇模型表型及运动能力的影响 正常对照组

W1118/y; TH-GAL4/+ 的果蝇,背面观其翅膀大部分重叠完好,侧面观翅膀与身体呈水平状态(图 2A),PINK1^{B9} 转基因模型果蝇出现翅膀下垂、分叉、竖立等异常(图 2B)。维生素 B3 处理后 PINK1^{B9} 转基因模型果蝇翅膀变好(图 2C)。统计分析显示,正常对照组果蝇翅膀异常率为 14.4%,PINK1^{B9} 转基因果蝇异常率为 80.4%,两者差异有统计学意义($P < 0.001$),见图 2D。与正常对照组果蝇 93.0% 的飞行率相比,PINK1^{B9} 转基因果蝇飞行能力明显降低,仅为 6.8% ($P < 0.001$),见图 2E。用维生素 B3 干预后的 PINK1^{B9} 转基因果蝇翅膀表型变好,该组果蝇异翅率的百分比从 80.4% 降低到 48.3% ($P < 0.01$),飞行率百分比也从 6.8% 升高到 36.0% ($P < 0.01$),见图 2D、E。然而,用 GAPDH2 RNAi 基因干预后的 PINK1^{B9} 转基因果蝇,在维生素 B3 处理后,果蝇的表型变差,异翅率变为 60.3% ($P < 0.001$),飞行率变为 25.5% ($P < 0.01$)。

2.3 维生素 B3 改善 PINK1^{B9} 果蝇的能量代谢紊乱

Western blot 结果显示,维生素 B3 可使 PINK1^{B9} 果蝇中 GAPDH 和 NDUFS3 的蛋白水平增加;然而敲除 GAPDH 后,即使用维生素 B3 处理,GAPDH 和 NDUFS3 蛋白水平均下调(图 3A、B、C)。荧光定量

PCR 结果显示(图 3D、E),PD 转基因果蝇模型组与正常对照组比较,GAPDH 和 ND42 的 mRNA 水平增加,当 GAPDH 敲低,再用维生素 B3 处理,GAPDH 和 ND42 的 mRNA 水平均下调。通过 ATP 测定试剂盒检测果蝇相对 ATP 水平(图 3F),PD 转基因果蝇模型 + 维生素 B3 干预组的相对 ATP 水平约为 PD 转基因果蝇模型组的 3 倍($P < 0.01$),而 PD 转基因果蝇模型用 GAPDH2 RNAi 基因干预 + 维生素 B3 干预组敲低产生的相对 ATP 水平为 PD 转基因果蝇模型 + 维生素 B3 干预组的 0.64 倍($P < 0.05$)。

3 讨论

PINK1 基因是家族性遗传性 PD 的致病基因,在散发性 PD 患者的发病中起着相对重要的作用,PINK1^{B9} 果蝇是 2006 年由 Park et al^[9] 构建,将 PINK1 基因敲除 570 bp,PINK1 基因缺失导致线粒体功能障碍。

GAPDH 是糖酵解的关键酶,在糖酵解时由于 GAPDH 等酶的作用,1 分子的葡萄糖被分解为 2 分子氧化呼吸所需的丙酮酸,同时 GAPDH 将氧化呼吸所产生的 2 分子的 NAD⁺ 还原成 2 分子的

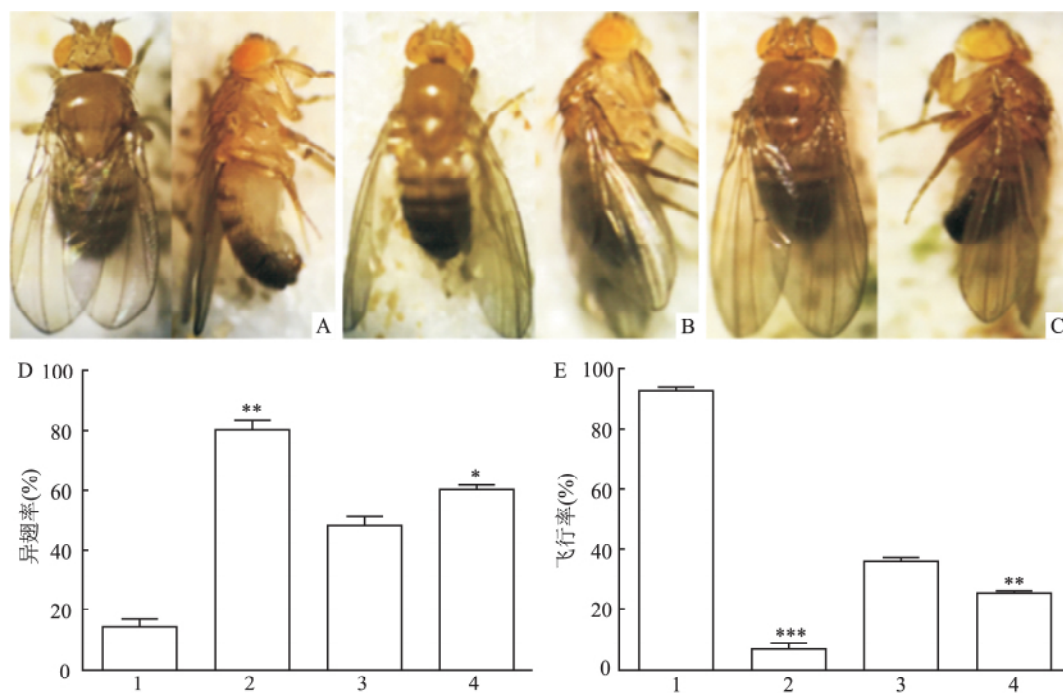


图 2 维生素 B3 对各组果蝇模型的影响

A: 正常对照果蝇(背面,侧面); B: PINK1^{B9} 转基因模型果蝇(背面,侧面); C: 维生素 B3 处理后 PINK1^{B9} 转基因模型果蝇(背面,侧面); D: 各组果蝇异翅率; E: 各组果蝇飞行率; 1: 正常对照组; 2: PD 转基因果蝇模型组; 3: PD 转基因果蝇模型 + 维生素 B3 干预组; 4: PD 转基因果蝇模型用 GAPDH2 RNAi 基因干预 + 维生素 B3 干预组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

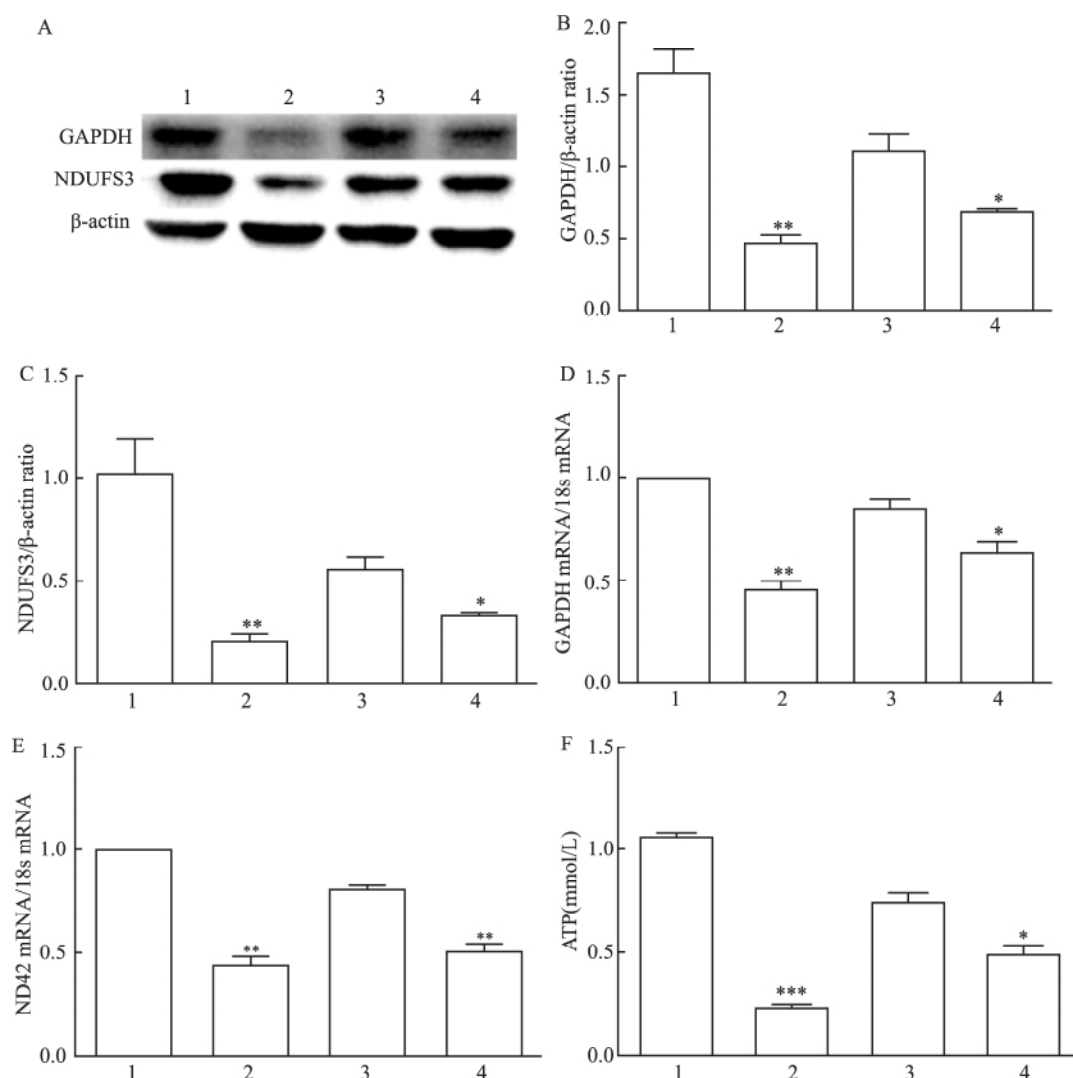


图3 维生素 B3 改善 PINK1^{B9} 果蝇的能量代谢紊乱

A: 各组 Western blot 相关蛋白表达; B: 各组 GAPDH 光密度; C: 各组 NDUFS3 光密度; D: 各组 GAPDH PCR 定量; E: 各组 ND42 PCR 定量; F: 各组 ATP 定量; 1: 正常对照组; 2: PD 转基因果蝇模型组; 3: PD 转基因果蝇模型 + 维生素 B3 干预组; 4: PD 转基因果蝇模型用 GAPDH2 RNAi 基因干预 + 维生素 B3 干预组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

NADH 以供氧化呼吸链中合成 ATP^[6]。当 GAPDH 不足时糖酵解过程受到影响, NADH 的生成不足从而减少了呼吸链 ATP 的合成。同时糖酵解是线粒体氧化磷酸化的准备阶段, 当线粒体氧化磷酸化的过程由于 CI 缺陷阻碍, NADH 积累太多, 使 NADH 或 NAD⁺ 不足或糖酵解的关键酶 GAPDH 下调时, 糖酵解的产物将减少, 导致氧化磷酸化的底物短缺。NDUFS3 是线粒体 CI 其中 1 个亚基, 编码线粒体 NADH CI 其中的 1 个硫铁蛋白组成部分^[10], 在 CI 的装配过程中起关键作用。当 NDUFS3 不足时, CI 功能受到影响使糖酵解的进程受阻, 导致氧化磷酸化的底物短缺。

维生素 B3 已被证明在体内以辅酶 I、辅酶 II

形式作为脱氢酶的辅酶在氧化呼吸中起递氢体的作用, 参与葡萄糖酵解、丙酮酸盐代谢等。维生素 B3 不仅增加线粒体膜电位和 CI 活性, 而且减少氧化损伤, 增加细胞或组织中的 ATP 水平, 并且改善果蝇模型中的运动功能。维生素 B3 有多种形式, 其中 NAM 不但可以合成 NAD⁺ 还能诱导 GAPDH 表达^[10-11]。NAD⁺ 是 NADH 的还原形式, 后者可以促进内源性多巴胺合成, 减少肌肉损伤和改善 PD 患者的运动功能障碍^[11]。因此本研究推测维生素 B3 可通过提高 GAPDH 表达以及多巴胺能神经元中的 NAD⁺ 水平, 促进糖酵解过程中的 NAD⁺ 被还原成 NADH, 从而提高 CI 对 NADH 的摄取而促进线粒体氧化磷酸化。

本研究结果显示维生素 B3 能提高 PINK1^{B9} 转基因果蝇模型飞行能力,恢复翅膀异常率,增加了果蝇头部 GAPDH 和 NDUFS3 蛋白,并且 ATP 水平上升。然而 GAPDH RNAi 干扰 PINK1^{B9} 果蝇后,上述所有指标都下降了。这表明 GAPDH 可能参与了维生素 B3 保护 PINK1^{B9} 转基因果蝇的作用,且 GAPDH 可能是糖酵解和线粒体氧化磷酸化之间的联系。

综上所述,维生素 B3 对 PINK1^{B9} 转基因果蝇具有保护作用。本研究显示维生素 B3 作为 PD 预防的潜在治疗可能不仅与 CI 相关,而且与 GAPDH 相关。其预防 PD 可能通过上调 GAPDH 和 NDUFS3 水平发挥调控糖酵解和氧化磷酸化起到保护作用。

参考文献

- [1] Morais V A , Haddad D , Craessaerts K , et al. PINK1 loss-of-function mutations affect mitochondrial complex I activity *via* Ndufa10 ubiquinone uncoupling[J]. *Science* 2014 ,344(6180) :203 - 7.
- [2] Pogson J H , Ivatt R M , Sanchez-Martinez A , et al. The complex I subunit NDUFA10 selectively rescues drosophila pink1 mutants through a mechanism independent of mitophagy[J]. *PLoS Genet* , 2014 ,10(11) : e1004815.
- [3] Sing A , Tsatskis Y , Fabian L , et al. The atypical cadherin fat directly regulates mitochondrial function and metabolic state [J]. *Cell* 2014 ,158(6) :1293 - 308.
- [4] She H , Yang Q , Shepherd K , et al. Direct regulation of complex I by mitochondrial MEF2D is disrupted in a mouse model of Parkinson disease and in human patients[J]. *J Clin Invest* 2011 ,121(3) :930 - 40.
- [5] Vos M , Esposito G , Edirisinghe J N , et al. Vitamin K2 is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency[J]. *Science* 2012 ,336(6086) :1306 - 10.
- [6] Moussaieff A , Rouleau M , Kitsberg D , et al. Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells[J]. *Cell Metab* 2015 ,21(3) :392 - 402.
- [7] Khan N A , Auranen M , Paetau I , et al. Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside , a vitamin B3 [J]. *EMBO Mol Med* 2014 ,6(6) :721 - 31.
- [8] Chi Y , Sauve A A. Nicotinamide riboside , a trace nutrient in foods , is a vitamin B3 with effects on energy metabolism and neuroprotection[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013 ,16(6) :657 - 61.
- [9] Park J , Lee S B , Lee S , et al. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin [J]. *Nature* , 2006 ,441(7097) :1157 - 61.
- [10] Jaokar T M , Patil D P , Shouche Y S , et al. Human mitochondrial NDUFS3 protein bearing Leigh syndrome mutation is more prone to aggregation than its wild-type[J]. *Biochimie* 2013 ,95(12) :2392 - 403.
- [11] Kuhn W , T Müller. Therapy of Parkinson disease. 2: New therapy concepts for treating motor symptoms[J]. *Fortschr Neurol Psychiatr* ,1997 ,65(8) :375 - 85.

Protective effect of vitamin B3 on PINK1^{B9} transgenic *Drosophila*

Chen Pan , Lin Xiaohui , Zeng Aiyuan , et al

(*Dept of Neurology , Affiliated Hospital of Guilin Medical University , Guilin 541001*)

Abstract Objective To explore the protective effect of vitamin B3 on PINK1^{B9} transgenic *Drosophila* and its possible mechanism. **Methods** The PD-transgenic *Drosophila* model of TH-Gal4/UAS system was used. They were divided into normal control group , PD transgenic *Drosophila melanogaster* model group , PD transgenic fruit fly model + vitamin B3 intervention group , PD transgenic fruit fly model and GAPDH2 RNAi gene intervention + vitamin B3 intervention group. The morphology , ATP levels , mRNA levels and protein imprinting of *Drosophila melanogaster* were examined. **Results** The appropriate concentration of vitamin B3 could save the capacity of PINK1^{B9} *Drosophila* , reduce the rate of abnormal wings , and up-regulate the expression of GAPDH and NDUFS3 proteins. It also increased the relative level of ATP production. The GAPDH and NDUFS3 protein expression were decreased when the GAPDH knockdown(GAPDH2 RNAi) in PINK1^{B9}. **Conclusion** Vitamin B3 may play a protective role by increasing the levels of GAPDH and NDUFS3 to regulate the glycolysis and oxidative phosphorylation.

Key words vitamin B3; PINK1^{B9} transgenic *Drosophila*; glycolysis; oxidative phosphorylation