

线粒体未折叠蛋白反应 在 Sir2 抑制帕金森转基因果蝇中的作用

戚欣欣¹, 肖志超², 范晓丽¹, 孙莉¹, 李清华³

摘要 目的 探讨 Sir2 对帕金森病(PD)转基因果蝇是否具有神经保护作用及与线粒体未折叠蛋白反应(UPR^{mt})的相关性。方法 选用 Mhc-GAL4 启动子,利用经典的 GAL4-UAS 系统构建 Mhc-GAL4/UAS 系统 Pink1^{B9} PD 转基因果蝇模型,通过遗传干预使 Sir2 在 Mhc-GAL4/UAS 系统 PD 转基因果蝇运动神经元内过表达,观察 Sir2 过表达对果蝇运动神经元变性是否具有神经保护作用,然后通过 RNAi 技术抑制 UPR^{mt} 相关基因热休克蛋白 60(Hsp60)、GCN-2 的表达,观察 Sir2 过表达对抑制果蝇运动神经元变性的作用,以及验证这种作用是否与 UPR^{mt} 相关。结果 Sir2 过表达明显抑制了 PD 转基因果蝇运动神经元变性,显著改善了果蝇运动能力,而在 UPR^{mt} 被抑制后,Sir2 的保护作用明显减弱。结论 Sir2 对 PD 转基因果蝇具有神经保护作用,而这种神经保护作用与 UPR^{mt} 相关。

关键词 帕金森病; Sir2; 转基因果蝇; 线粒体未折叠蛋白反应

中图分类号 R 74; R 394

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)11-1559-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.002

帕金森病又称特发性帕金森病(idiopathic Parkinson's disease, PD),简称 PD,也称为震颤麻痹,是第二大常见的中枢神经系统退行性疾病,仅次于阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD),临床表现为面具脸、静止性震颤、行动迟缓、随意运动缺失、肌张力增高、关节僵硬等一系列症状^[1]。研究^[2]指出 PINK1 的缺失能够导致线粒体形态功能异常。而近几十年的研究^[3]表明,线粒体的功能紊乱是 PD 发病的一个重要原因。沉默信息调节因子 2(silent in-

formation regulator 2, Sir2) 是一类从古细菌到人类进化都高度保守的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 依赖的组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)^[4],是 sirtuin 蛋白家族的一员,在 DNA 损伤修复、细胞周期控制、抑制细胞凋亡、抵抗氧化应激、能量代谢、线粒体功能保护等方面起着重要作用^[5-7]。最近的研究^[8]表明, Sir2 可增加线粒体编码的 MTCO1(线粒体氧化呼吸链复合物 IV 亚单位)和核编码的 ATP5A(线粒体氧化呼吸链复合物 IV 亚单位)之间的比率,破坏线粒体核蛋白失衡,诱导线粒体未折叠蛋白反应(mitochondrial unfolded protein response, UPR^{mt}),改善线粒体功能并显著延长了线虫的寿命。由此,该研究利用已建立的 PD 转基因果蝇模型,探讨 Sir2 是否能够保护 PD 转基因果蝇的神经变性,以及抑制 UPR^{mt} 后 Sir2 还能否抑制 PD 转基因果蝇的神经变性,进一步研究 UPR^{mt} 在 Sir2 神经保护的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 果蝇品系:野生型基因 w1118、Mhc-GAL4、Sir2、Hsp60 RNAi、GCN-2 RNAi 购自美国 Bloomington 果蝇种系中心。UAS-PINK1B9 及双平衡系果蝇 *sco*/CyO; TM3/TM6 由中南大学医学遗传学国家重点实验室惠赠。

1.2 方法

1.2.1 果蝇杂交

1.2.1.1 构建 w1118/+; Mhc-GAL4/+ 的果蝇 将 w1118 的处女蝇与 Mhc-GAL4 的雄果蝇杂交,收取 F1 代雄果蝇,即基因型为 w1118/+; Mhc-GAL4/+ 的目的果蝇,此为 PD 转基因果蝇的正常对照组果蝇(control)。

1.2.1.2 构建 PINK1^{B9}/y; Mhc-GAL4/+ 的果蝇 将 PINK1^{B9}/FM6; Mhc-GAL4 的处女蝇与 w1118 的雄果蝇杂交,收取 F1 代雄果蝇,即基因型为 PINK1^{B9}/y; MHC-GAL4/+ 即为 PD 转基因疾病组果蝇(PD flies)。

1.2.1.3 构建 PINK1^{B9}/y; Sir2/+; Mhc-GAL4/+

2016-06-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81160163、81460180)

作者单位:¹ 桂林医学院基础医学院 桂林 541000

桂林医学院附属医院² 心胸外科、³ 神经内科,桂林 541000

作者简介:戚欣欣,女,硕士研究生;

孙莉,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: 635109710@qq.com;

李清华,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: qhli1999@163.com.cn

的果蝇 将 PINK1^{B9}/FM6; Mhc-GAL4/+ 的处女蝇与 Sir2 的雄果蝇杂交,收取 F1 代雄果蝇,即基因型为 PINK1^{B9}/y; Sir2/+; Mhc-GAL4/+ ,此为 Sir2 过表达干预 PD 转基因果蝇 [Sir2(+) PD flies]。

1.2.1.4 构建 PINK1^{B9}/y; Sir2/+; Mhc-GAL4, Hsp60 RNAi 的果蝇 将 Sir2 处女蝇与双平衡系果蝇 sco/CyO; TM3/TM6 雄果蝇杂交构建 Sir2/sco; TM3/+ 的平衡果蝇;同时 Hsp60 RNAi 的处女蝇与双平衡系果蝇 sco/CyO; TM3/TM6 雄果蝇杂交,构建 +/CyO; Hsp60 RNAi/TM6 的平衡果蝇。然后将 Sir2/sco; TM3/+ 处女蝇与 +/CyO; Hsp60 RNAi/TM6 雄果蝇杂交,得到 Sir2/CyO; Hsp60 RNAi/TM3 的双平衡系果蝇,再将此雄果蝇与 PINK1^{B9}/FM6; Mhc-GAL4/+ 处女蝇杂交,收取 F1 代不带卷翅且不带短刚毛的雄性目的果蝇,即基因型 PINK1^{B9}/y; Sir2/+; Mhc-GAL4, Hsp60 RNAi 此为抑制 UPR^{mt} 干预组 1 敲除分子伴侣 Hsp60 而 Sir2 过表达的 PD 转基因果蝇 [Sir2(+) PD flies Hsp60(-)]。

1.2.1.5 构建 PINK1^{B9}/y; Sir2/+; Mhc-GAL4, GCN-2 RNAi 的果蝇 将 GCN-2 RNAi 的处女蝇与双平衡系果蝇 sco/CyO; TM3/TM6 雄果蝇杂交,构建 +/CyO; GCN-2 RNAi/TM6 的平衡果蝇。然后将已构建好的 Sir2/sco; TM3/+ 处女蝇与 +/CyO; GCN-2 RNAi/TM6 雄果蝇杂交,得到 Sir2/CyO; GCN-2 RNAi/TM3 的双平衡系果蝇,再将此雄果蝇与 PINK1^{B9}/FM6; Mhc-GAL4/+ 处女蝇杂交,收取 F1 代不带卷翅且不带短刚毛的雄性目的果蝇,即基因型 PINK1^{B9}/y; Sir2/+; Mhc-GAL4, GCN-2 RNAi, 此为抑制 UPR^{mt} 干预组 2, GCN-2 基因敲除而 Sir2 过表达的果蝇 [Sir2(+) PD flies GCN-2(-)]。

1.2.2 数据采集

1.2.2.1 果蝇形态学检测 观察五组果蝇体态:基因型 w1118/+; Mhc-GAL4/+ 的果蝇为对照组 (control); 基因型 PINK1^{B9}/y; Mhc-GAL4/+ 的果蝇为 PD 疾病模型组 (PD flies); 基因型 PINK1^{B9}/y; Sir2/+; Mhc-GAL4/+ 的果蝇为 Sir2(+) PD flies; 基因型 PINK1^{B9}/y; Sir2/+; Mhc-GAL4, Hsp60 RNAi 果蝇为 Sir2(+) PD flies Hsp60(-); 基因型 PINK1^{B9}/y; Sir2/+; Mhc-GAL4, GCN-2 RNAi 的果蝇为 Sir2(+) PD flies GCN-2(-)。

1.2.2.2 果蝇飞行试验 观察分组同 1.2.2.1 果蝇的翅膀异常率、飞行率。将 5 d 的各组果蝇随机挑选 100 只雄性果蝇,CO₂ 麻醉后,每 5 只装入 1 个空的果蝇培养管中,半小时果蝇完全复苏后,观察果

蝇翅膀异常率,轻轻敲打培养管壁计算果蝇飞起数。在同样的恒温恒湿及相同观察时间,重复至少 3 次实验。

1.2.2.3 果蝇线粒体三磷酸腺苷(ATP)浓度检测

分别取 control、PD flies、Sir2(+) PD flies 三组第 5 天的雄性果蝇各 50 只,切取果蝇胸部组织,分别放入液氮研磨,并加入 200 μl HClO₄ 继续研磨,研磨后 3 500 r/min 离心 15 min,取上清液,缓慢加入 0.2 mol/L KOH,调节 pH 至 7.5,再 3 500 r/min 离心 15 min 后取上清液至新 EP 管,得到样品。采用高效液相色谱仪(HPLC)检测制备成功的样品中 ATP 含量。以上实验至少重复 3 次。

1.2.2.4 果蝇 mRNA 水平检测

果蝇分组同 1.2.2.1,切取 5 d 的雄性果蝇胸部各 40 只,分别提取各组的总 RNA,使用 TaKaRa Code No. RR047A 试剂盒对提取的总 RNA 进行逆转录得到各组果蝇的 cDNA,再以 cDNA 为模板,应用 7500Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) 仪器进行 qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平。应用 primer 5.0 软件设计合成引物,合成 18S、Sir2、Hsp60、Hsc70-5、Hsp10、Clpx 的各引物序列(美国 Invitrogen 有限公司)。见表 1。

表 1 引物序列

引物	F	R
18S	TCTAGCAATATGAGATTGAG- CAATAAG	AATACACGTTGATACCTTTCATTG- TAGC
Sir2	CCAAGTGTCTTTCAAGTGC	CCACGCTCTGCCTCCTTATTG
Hsp60	CTGTGCTGAAGTGGCCTTG	GAACTGCGAAACGGAACAT
Hsc70-5	GCAATTGATATCCGCAAGGA	TCAGCTTCAGGTTTCATGTGC
Hsp10	CCCGCATCTAGCGAGAATAG	CTCCTTTCGCTTGGTCAGC
Clpx	AAAATGCTCGAAGGCACAGT	TTGAGACGACGTGCGATAAG

1.2.2.5 Western blot 检测烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶铁-硫蛋白 3(NDUFS3)、Hsp60、p-eIF2α 等蛋白的表达 果蝇分组同 1.2.2.1,切取 5 d 的雄性果蝇胸部,各称重 10 mg,按比例加入 RIPA 裂解液提取各组总蛋白,与 5 × loading buffer 混合后上样,经聚丙烯酰胺凝胶(10% 分离胶 + 5% 浓缩胶)电泳后转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h, TBST 洗涤,一抗孵育 4 ℃ 过夜,回收抗体, TBST 洗涤后,二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤,与免疫印迹发光试剂进行反应,暗室压胶片显影、定影。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件及 GraphPad Prism5 软件进行分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计采用 One-Way ANOVA 分析。P < 0.05 为



图1 果蝇形态学观察

A: Control(基因型为 $w^{1118}/+$; $Mhc-GAL4/+$, 果蝇翅膀重合率较好); B: PD flies(基因型为 $PINK1^{B9}/y$; $Mhc-GAL4/+$, 果蝇翅膀分叉异常); C: Sir2(+) PD flies(基因型为 $PINK1^{B9}/y$; $Sir2/+$; $Mhc-GAL4/+$, 改善了 PD 转基因果蝇表型)

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sir2 过表达对 PD 转基因果蝇的神经变性作用 在 $Mhc-GAL4$ 肌肉启动子启动下,利用果蝇 $GAL4-UAS$ 系统将靶基因特异性地在肌肉组织中表达,表现在翅膀异翅率与飞行能力的变化。与 control 比较,PD 转基因果蝇的翅膀有明显翅膀分叉、下垂、甚至竖立不闭合的异常表现,并且飞行能力明显减弱,见图 1。Sir2 过表达对 PD 转基因果蝇干预后,翅膀异翅率明显得到改善,飞行能力提高,见图 1、2。检测 3 组果蝇 Sir2 的 mRNA 水平, Sir2 过表达干预组 Sir2(+) PD flies 较 control、PD flies 表达水平均较高,见图 3。检测 ATP 水平,结果显示 PD 转基因果蝇组 ATP 水平明显较 Sir2(+) PD flies 及 control 低,见图 4。Western blot 检测通过条带灰度分析检测 NDUFS3 蛋白水平表达量(将 β -actin 蛋白表达水平设置成内参进行校准比较),Sir2(+) PD flies 中 NDUFS3 蛋白的表达量增高,挽救了线粒体 Complex I,见图 5。

2.2 抑制 UPR^{mt}后 Sir2 过表达对 PD 转基因果蝇的神经变性作用 敲除 PD 转基因果蝇神经元内 UPR^{mt}的标志物 Hsp60、GCN-2 基因,抑制 UPR^{mt}而 Sir2 过表达,对 PD 转基因果蝇进行干预,翅膀异常较 Sir2(+) PD flies 低,异常表现显著,飞行能力也较弱,抑制 UPR^{mt}而 Sir2 过表达干预并未挽救 PD 转基因果蝇,见图 6。

2.3 Sir2 过表达对 PD 转基因果蝇神经元 UPR^{mt}的诱导作用 检测 control、PD flies 及三个干预组果蝇 Hsp60 及其他分子伴侣的 mRNA 水平, Sir2(+) PD flies 干预后诱导 UPR^{mt}相关分子伴侣 mRNA 表达水平升高,阻断 UPR^{mt}的干预组较低,见图 7。Western blot 检测,通过条带灰度分析检测 Hsp60、Total eIF2 α 、eIF2 α 磷酸化蛋白水平表达量(将 β -ac-

tin 蛋白表达水平设置成内参进行校准比较,所有结果重复 3 次),Hsp60 表达水平 Sir2(+) PD flies 较 control、PD flies 及其它两组干预组都高,与 qRT-PCR Hsp60 mRNA 水平表达一致;Total eIF2 α 表达水平相似,eIF2 α 磷酸化蛋白表达水平 PD flies 较 control 升高,低于 Sir2(+) PD flies,抑制 UPR^{mt}干预组 2 的 eIF2 α 磷酸化蛋白表达水平最低,见图 8。

3 讨论

PD 是仅次于 AD 的第二大神经退行性疾病^[1],

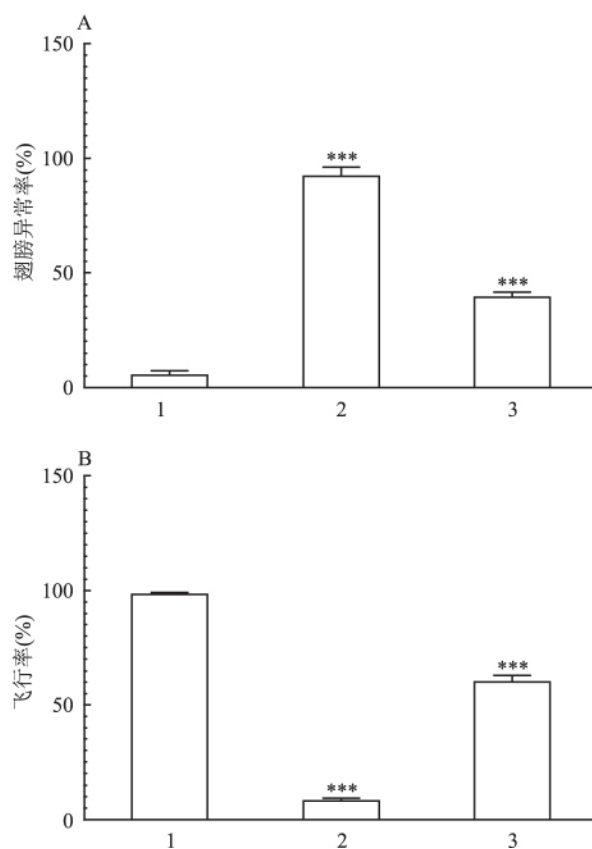


图2 果蝇飞行结果

1: Control; 2: PD flies; 3: Sir2(+) PD flies; A: 果蝇翅膀异常率; B: 果蝇飞行率; 与 control 比较: *** $P < 0.001$

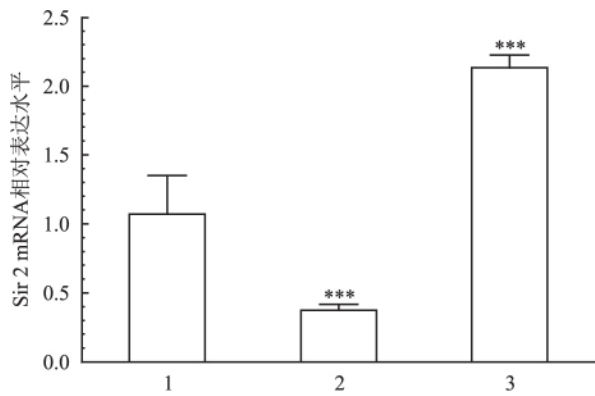


图3 qRT-PCR检测 Sir2 mRNA 表达水平

1: control; 2: PD flies; 3: Sir2(+) PD flies; 与 control 比较: *** $P < 0.001$

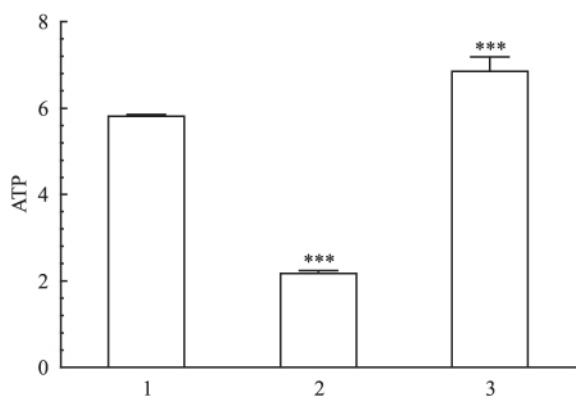


图4 Sir2 过表达对 PD 转基因果蝇模型的线粒体功能的影响

1: control; 2: PD flies; 3: Sir2(+) PD flies; 与 control 比较: *** $P < 0.001$

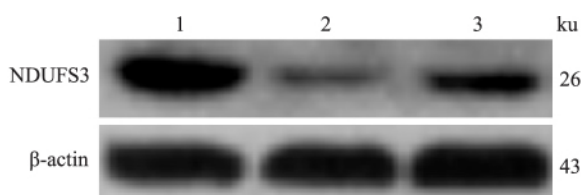
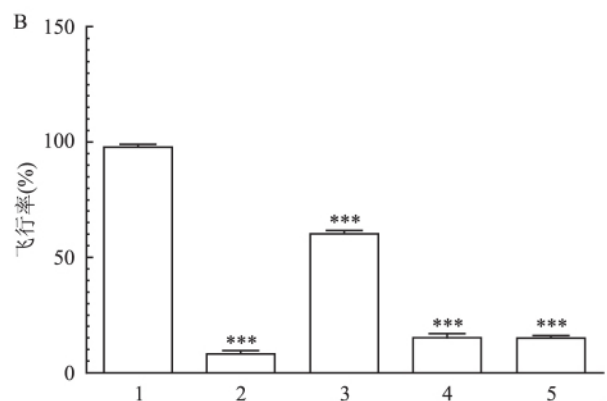
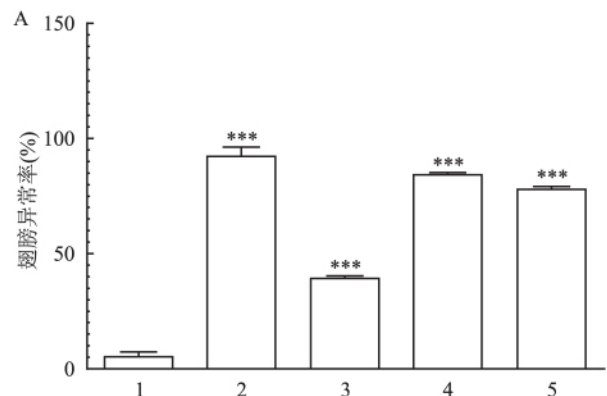


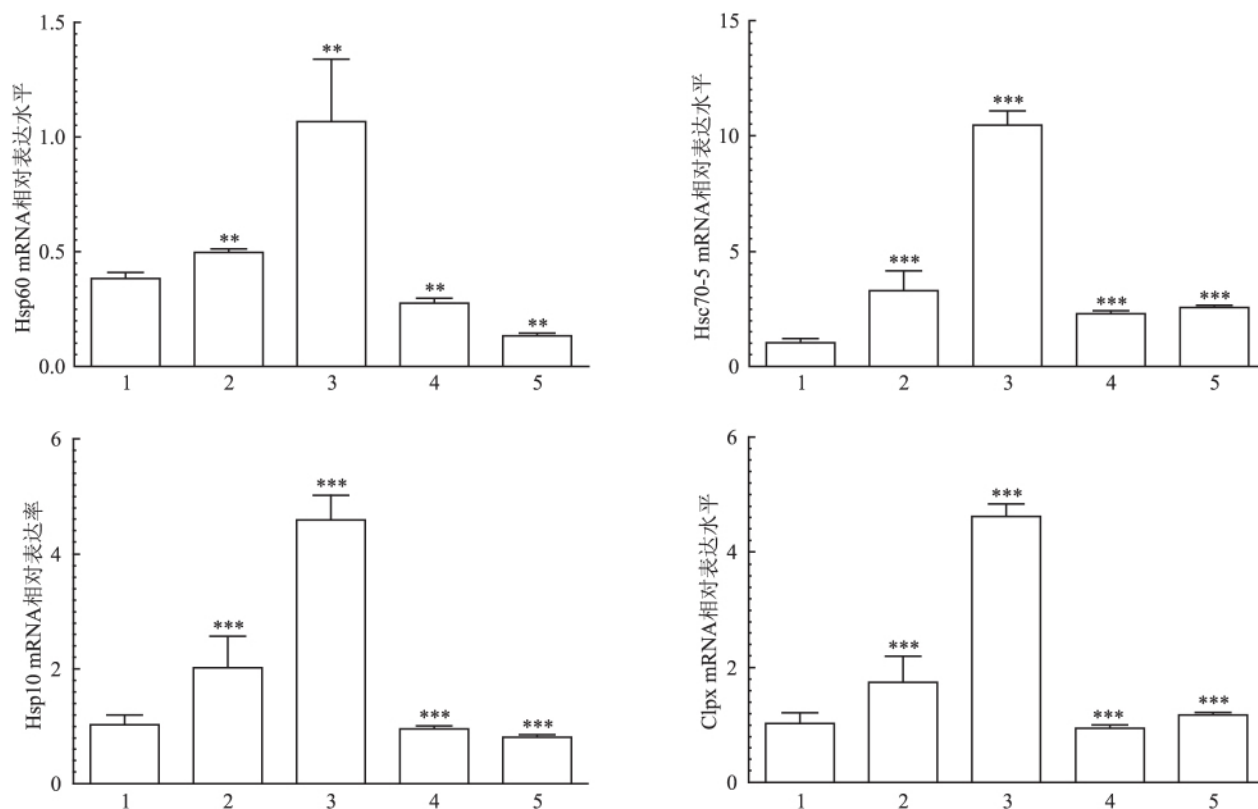
图5 Western blot 检测 Complex I 的组分 NDUF3 蛋白的表达量

1: control; 2: PD flies; 3: Sir2(+) PD flies; 与 control 比较: *** $P < 0.001$

图6 阻断 UPR^{mt}对 Sir2 过表达抑制 PD 转基因果蝇作用的影响

1: control; 2: PD flies; 3: Sir2(+) PD flies; 4: 抑制 UPR^{mt}干预组 1; 5: 抑制 UPR^{mt}干预组 2; A: 果蝇翅膀异常率; B: 果蝇飞行率; 与 control 比较: *** $P < 0.001$

也是中老年人最常见的锥体外系疾病, 65 岁以上老人发病率约为 1 000/10 万, 随年龄而增高, 通常从发病至诊断平均为 2.5 年。主要病理标志为中脑黑质致密部多巴胺神经元缺失, 剩余存活神经元 α-突触核蛋白 (α-synuclein, α-syn) 和胞质内包涵体 (Lewy body, LB) 形成, 黑质-纹状体通路多巴胺释放减少。目前已经鉴定了 18 个与 PD 相关的致病基因, 如 parkin、PINK1、DJ-1、LRRK2、HtrA2、ATP13A2, 其中 PINK1 (phosphatase and tensin-homolog (PTEN)-induced kinase J, PINK1) 的突变与常染色体隐性遗传的 PD 有关。其发病机制相当复杂^[2], PD 并非单一因素致病, 可能多种因素参与, 如年龄老化、环境因素、遗传因素、氧化应激和自由基生成、免疫学异常、线粒体功能缺陷等^[3]。线粒体是细胞内生成 ATP 主要的能量场所^[9], 也是各种细胞应激损伤最为敏感的细胞器^[10-11]。线粒体损伤所产生的氧自由基累积被认为导致了 PD 等许多神经退行性疾病的发生^[12-13]。最近有关线虫的研究^[14]表明, 激活 UPR^{mt}, 线粒体应激并未导致线粒体功能障碍, 反而

图7 qRT-PCR 检测 UPR^{mt} 相关线粒体分子伴侣 mRNA 表达水平

1: control; 2: PD flies; 3: Sir2(+) PD flies; 4: 抑制 UPR^{mt} 干预组 1; 5: 抑制 UPR^{mt} 干预组 2; 与 control 比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

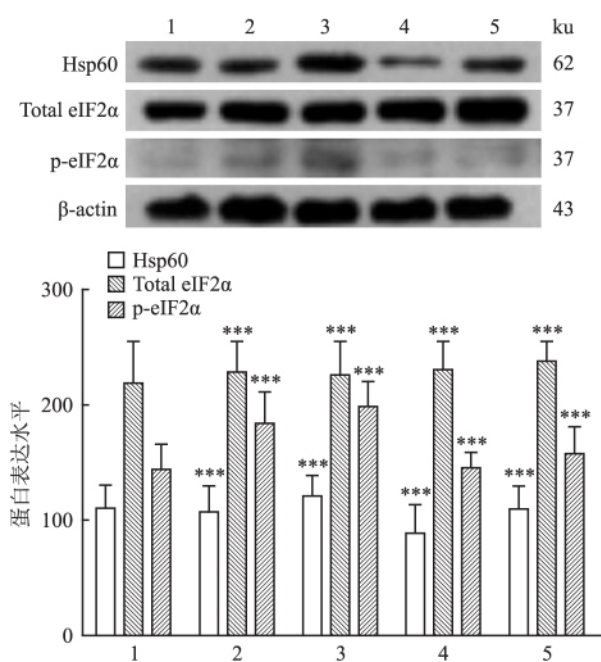


图8 Western blot 检测神经元内 eIF2α 磷酸化及 Hsp60 蛋白表达水平

1: control; 2: PD flies; 3: Sir2(+) PD flies; 4: 抑制 UPR^{mt} 干预组 1; 5: 抑制 UPR^{mt} 干预组 2; 与 control 比较: *** $P < 0.001$

增加了 ATP 生成,延长了线虫寿命。

UPR^{mt}是近年来发现的一种线粒体应激保护机制,当线粒体遭遇某些应激而致功能紊乱时,打破了线粒体核蛋白平衡,诱导更多线粒体分子伴侣如 Hsp60、Hsp10、Hsc70-5 的表达,进而更好地促进蛋白正确折叠或降解^[15],并促进 GCN-2 对真核细胞翻译起始因子 eIF2α 的磷酸化,抑制了除线粒体应激反应外的其它蛋白合成,减少了蛋白向线粒体的输入,降低线粒体分子伴侣的负荷^[9]。

Sir2 是依赖的 NAD⁺ 去乙酰化酶,在线粒体功能保护中具有十分显著的作用。Sir2 能够打破线虫线粒体核蛋白平衡,诱导 UPR^{mt}^[8]。本实验选用 Mhc-GAL4 启动子,利用经典的 GAL4-UAS 系统,构建 Mhc-GAL4/UAS 系统 Pink1^{B9} PD 转基因果蝇模型,通过遗传干预使 Sir2 在 Mhc-GAL4/UAS 系统 PD 转基因果蝇运动神经元内过表达,Sir2 过表达对 PD 转基因果蝇同样具有神经保护作用,挽救了 PINK1^{B9} PD 转基因果蝇模型表型,抑制 PD 转基因果蝇的神经变性,提高了果蝇运动能力,使飞行得到改善,以及提高其线粒体的功能,增加了 ATP 的生成。

Western blot 检测结果显示线粒体氧化呼吸链中 Complex I 的组分 NDUFS3 蛋白的表达量也明显升高。本研究探讨 Sir2 过表达对 PD 转基因果蝇的作用是否通过诱导 UPR^{mt} 而增加线粒体的应激适应性,从而提高了线粒体功能而具有的神经保护作用。敲除与 UPR^{mt} 相关的基因分子伴侣 Hsp60 及与 eIF2 α 磷酸化有关的 GCN-2 的基因后, Sir2 过表达并未挽救 PD 转基因果蝇 PINK1^{B9} 的神经毒性,其翅膀分叉竖立较多残翅较明显,飞行率较低。qRT-PCR 检测 5 组果蝇的分子伴侣 mRNA 的表达量, PD 转基因果蝇的 Hsp60 相关分子伴侣 mRNA 水平较 control 升高,线粒体发生应激反应,而 Sir2 过表达干预后其 mRNA 表达水平较其它各组均较高,提示 Sir2 过表达诱导 UPR^{mt} 提高了果蝇线粒体的应激适应性从而改善线粒体功能。在果蝇转录水平 Sir2 过表达干预组分子伴侣表达量较高,同样 Western blot 检测 Hsp60 蛋白表达量也是升高的,以及提高了真核细胞翻译起始因子 eIF2 α 的磷酸化水平,明确 UPR^{mt} 在 Sir2 过表达抑制 PD 转基因果蝇神经变性中的作用。PD 等许多神经退行性疾病的发病机制并非单一因素,目前其发病机制并不明确,临床上并无有效的药物进行治疗,线粒体的损伤及功能障碍与 PD 密切相关, Sir2 通过诱导 UPR^{mt} 提高线粒体应激适应性抑制 PD 转基因果蝇的神经变性,为临床探索利用 UPR^{mt} 诱导药物治疗 PD 疾病提供理论依据。

参考文献

- [1] Huang Y, Halliday G M. Aspects of innate immunity and Parkinson's disease[J]. *Front Pharmacol* 2012 3:33.
- [2] 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.
- [3] Winklhofer K F, Haass C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Biochim Biophys Acta* 2010 1802(1):29–44.
- [4] Yang X J, Seto E. HATs and HDACs: from structure function and regulation to novel strategies for therapy and prevention[J]. *Oncogene* 2007 26(37):5310–8.
- [5] Herskovits A Z, Guarente L. SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence[J]. *Neuron* 2014 81(3):471–83.
- [6] Banerjee K K, Ayyub C, Sengupta S, et al. Fat body dSir2 regulates muscle mitochondrial physiology and energy homeostasis nonautonomously and mimics the autonomous functions of dSir2 in muscles[J]. *Mol Cell Biol* 2013 33(2):252–64.
- [7] Koh H, Kim H, Kim M J, et al. Silent information regulator 2 (Sir2) and Forkhead box O (FOXO) complement mitochondrial dysfunction and dopaminergic neuron loss in Drosophila PTEN-induced kinase 1 (PINK1) null mutant[J]. *Biol Chem* 2012 287(16):12750–8.
- [8] Papa L, Germain D. SirT3 Regulates the mitochondrial unfolded protein response[J]. *Mol Cell Biol* 2014 34(4):699–710.
- [9] Ma T, Trinh M A, Wexler A J. Suppression of eIF2 α kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits[J]. *Nat Neurosci* 2013 16(9):1299–305.
- [10] Exner N, Lutz A K, Haass C, et al. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences[J]. *EMBO J* 2012 31(14):3038–62.
- [11] Winklhofer K F, Haass C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Biochim Biophys Acta* 2010 1802(1):29–44.
- [12] Sai Y, Zou Z, Peng K, et al. The Parkinson's disease-related genes act in mitochondrial homeostasis[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2012 36(9):2034–43.
- [13] Dillin A, Hsu A L, Arantes-Oliveira N, et al. Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development[J]. *Science* 2002 298(5602):2398–401.
- [14] Houtkooper R H, Mouchiroud L, Ryu D, et al. Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism[J]. *Nature*, 2013 497(7450):451–7.
- [15] Haynes C M, Ron D. The mitochondrial UPR-protecting organelle protein homeostasis[J]. *J Cell Sci* 2010 123(Pt 22):3849–55.

Role of mitochondrial unfolded protein response in Sir2 suppresses the neurodegeneration of PD transgenic *Drosophila*

Qi Xinxin¹, Xiao Zhichao², Fan Xiaoli¹, et al

(¹Basic Medical College, Guilin Medical University, Guilin 541000;

²Dept of Cardiothoracic Surgery Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541000)

Abstract Objective To investigate whether Sir2 has a neuroprotective effect on PD transgenic *Drosophila* and the relevance of UPR^{mt}. **Methods** The Mhc-GAL4 promoter and the classical GAL4-UAS system were used to construct PD transgenic *Drosophila* models-Pink1B9 which could be expressed in *Drosophila* muscles. To investigate whether Sir2 overexpression in PD transgenic *Drosophila* of the Mhc-GAL4/UAS system by genetic intervention had

网络出版时间: 2016-10-12 13:23:00 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161012.1323.003.html>

EIF2AK2 和 NLRP3 相互作用影响细胞分泌 IL-1 β 的研究

鞠小丽¹, 王 强²

摘要 目的 研究真核细胞翻译起始因子 2AK2(EIF2AK2) 蛋白对 Nod 样受体蛋白 3(NLRP3) 炎症体激活及细胞分泌 IL-1 β 的影响。方法 在 HEK-293 细胞中, 通过转染凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、NLRP3、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1) 和促白细胞介素-1 β (pro-IL-1 β) 基因构建 NLRP3 炎症体, 并检测 EIF2AK2 蛋白过表达对细胞分泌炎症性细胞因子 IL-1 β 的影响; 通过免疫共沉淀研究 EIF2AK2 蛋白和 NLRP3 蛋白相互作用。最后在人单核 THP-1 细胞中通过 siRNA 干扰验证 EIF2AK2 对 IL-1 β 分泌水平的影响。结果 在 HEK-293 细胞中, 过表达 EIF2AK2 蛋白能激活 NLRP3 炎症体后诱导细胞分泌 IL-1 β , 并且 IL-1 β 分泌水平随 EIF2AK2 表达水平提高而增加。免疫共沉淀结果显示 EIF2AK2 蛋白能和 NLRP3 蛋白发生相互作用。THP-1 细胞中 siRNA 干扰抑制 EIF2AK2 表达后发现细胞分泌 IL-1 β 减少。结论 EIF2AK2 蛋白能调控 NLRP3 炎症体的激活从而影响细胞分泌促炎症因子 IL-1 β 。

关键词 NLRP3 炎症体; EIF2AK2; IL-1 β 分泌; 蛋白相互作用

中图分类号 R 392.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)11-1565-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.003

先天免疫系统通过各种模式识别相关分子

2016-06-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81502621、81502088), 江苏省自然科学基金(编号: BK20140539), 江苏大学高层次人才启动基金项目((编号: 14JDG065、15JDG021), 中国博士后科学基金(编号: 2015M571677)

作者单位: 江苏大学¹ 医学院病理教研室、² 生命科学研究院, 镇江 212013

作者简介: 鞠小丽, 女, 讲师;

王 强, 男, 助理研究员, 硕士生导师, 责任作者, wan-qiang@ujs.edu.cn

(pathogen-associated molecular patterns, PAMP) 识别各种病原体后抵抗病原体入侵^[1]。炎症体是一种由模式识别相关分子组成的大分子复合物。Nod 样受体蛋白 3(Nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症体由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1(cysteine-containing aspartate-specific proteases-1, caspase-1) 组成的分子量约为 700 ku 的大分子复合物^[2-3]。目前研究^[4] 显示多种 PAMP 如三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、单钠尿酸盐晶体(monosodium urate, MSU)、胆固醇结晶、 β 淀粉样蛋白等内源性危险信号都能引起 NLRP3 炎症体的激活。NLRP3 炎症体异常激活参与多种代谢异常疾病如 II 型糖尿病、阿尔茨海默病和动脉粥样硬化等^[5]。NLRP3 炎症体激活 3 种模型: 线粒体 DNA 假说、活性氧假说和溶酶体破裂假说^[4]。已报道 SGT1 和 Hsp90^[6]、TXNIP、TRIM30^[7] 和 GPSM3 等蛋白能和 NLRP3 相互作用从而调节 NLRP3 炎症体激活。真核细胞翻译起始因子 2AK2(eukaryotic translation initiation factors 2AK2, EIF2AK2) 最初发现是一个病原识别分子, 该蛋白 N 末端能和双链 RNA 结合诱导 C 末端催化区域活化^[8]。该研究通过在 HEK-293 细胞中重构 NLRP3 炎症体研究 EIF2AK2 在 NLRP3 炎症体激活中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料 人胚肾细胞 HEK-293 和人单核细胞 THP-1 购自美国菌种保藏中心(ATCC); DMEM 和 RPMI1640 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公

neuroprotective effects on neurodegeneration. The chaperone Hsp60 and GCN-2 expression associated with UPR^{mt} by RNA interference were inhibited to observe the role of Sir2 overexpression in suppressing neurodegeneration in PD transgenic Drosophila and verify the correlation with UPR^{mt}. **Results** Sir2 overexpression significantly inhibited neurodegeneration in PD transgenic Drosophila and improved the athletic ability. The effect of Sir2 was weakened by inhibiting UPR^{mt}. **Conclusion** Sir2 overexpression has neuroprotective effects on PD transgenic Drosophila which is associated with UPR^{mt}.

Key words PD; Sir2; transgenic Drosophila; UPR^{mt}