

帕金森病

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.001797

Survivin在帕金森病大鼠中对神经元凋亡的调控作用

赵聪聪¹, 朱 英¹, 唐鹏程¹, 赵敏珠¹, 张 丽¹, 代亚磊¹, 李红卫², 李剑波¹

(1. 重庆医科大学基础医学院法医学教研室, 重庆 400016; 2. 重庆市公安局刑警总队技术处, 重庆 400021)

【摘要】目的:研究生存素(Survivin)在大鼠帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型中对黑质神经元凋亡的调控作用。**方法:**成年健康雄性 SD 大鼠, 随机分为 4 组, 对照组($n=8$); PD 模型组($n=8$); PD 模型+腺病毒空载体组($n=8$); PD 模型+Survivin 治疗组($n=8$)。造模成功 1 周后, 对照组和 PD 模型组不予以处理, PD 模型+腺病毒空载体组在大鼠纹状体的同一坐标点注射腺病毒空载体, PD 模型+Survivin 治疗组在大鼠纹状体的同一坐标点注射携带 Survivin 基因腺病毒, 治疗结束后每周对大鼠颈部皮下注射阿扑吗啡(Apomorphine, APO)进行行为学评价, 行为学上出现差异后收集各组大鼠脑组织标本。分别运用 TUNEL 法观察黑质神经元凋亡情况, qRT-PCR 检测 Caspase 3 和 Caspase 9 的 mRNA 表达情况水平, Western blot 检测 Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-Caspase 9 的蛋白水平, 评价 Survivin 对神经元凋亡的调控作用。**结果:**治疗结束后第 3 周, PD 模型+Survivin 治疗组与同期 PD 模型组及 PD 模型+腺病毒空载体组比较, 大鼠旋转圈数减少($F=22.315, P=0.000, P=0.000$); TUNEL 结果显示, 与对照组比较, PD 模型组及 PD 模型+腺病毒空载体组大鼠脑黑质神经元细胞凋亡明显; 与 PD 模型组及 PD 模型+腺病毒空载体组比较, PD 模型+Survivin 治疗组黑质神经元细胞凋亡程度明显减轻($F=38.912, P=0.000, P=0.000$); 此外, qRT-PCR 和 Western blot 的结果显示, 与 PD 模型组及 PD 模型+腺病毒空载体组比较, Survivin 能够显著抑制神经元细胞中 Caspase 3/9 在 mRNA 水平($F=338.429, P=0.000, P=0.000; F=283.352, P=0.000, P=0.000$)和 Cleaved-Caspase 3/9 在蛋白水平($F=640.262, P=0.000, P=0.000; F=354.210, P=0.000, P=0.000$)的表达。**结论:**Survivin 能够通过抑制 PD 大鼠脑组织中 Caspase 3 和 Caspase 9 的表达, 减少脑内黑质神经元的凋亡, 进而达到对脑黑质退行性病变的治疗作用, 减轻 PD 相关症状。

【关键词】帕金森病; 神经元凋亡; 生存素**【中图分类号】**R742.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-12-06

Role of Survivin during the process of neuronal apoptosis in a rat model of Parkinson's disease

Zhao Congcong¹, Zhu Ying¹, Tang Pengcheng¹, Zhao Minzhu¹, Zhang Li¹, Dai Yalei¹, Li Hongwei², Li Jianbo¹

(1. Teaching and Research Section of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University; 2. Technical Department of Interpol Corps of the Chongqing Police Bureau)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of Survivin on neuronal apoptosis in the substantia nigra in a rat model of Parkinson's disease (PD). **Methods:** Healthy adult male Sprague Dawley rats were randomly divided into 4 groups: control ($n=8$); PD ($n=8$); PD + adenovirus empty vector ($n=8$); and PD + Survivin ($n=8$). Following 1 week of model induction, rats from the control and PD group received normal stimulation with no intervention, rats from the PD + adenovirus empty vector group received an empty adenovirus vector injection in the substantia nigra, and rats from the PD + Survivin treatment group received an injection of Survivin adenovirus in the substantia nigra. Behavioral evaluation of spontaneous rotation was performed by injecting apomorphine (APO) every week following completion of the treatment. Following behavioral testing, brain tissue was collected. Neuronal apoptosis in the substantia nigra was determined by TUNEL staining. qRT-PCR and western blot were used to determine mRNA and protein levels of Caspase 3 and 9, respectively. **Results:** Compared to the PD + adenovirus empty vector group, the PD + Survivin treatment group exhibited significantly fewer spontaneous rotations following treatment ($F=22.315, P=0.000, P=0.000$). Compared with the PD group and the PD + adenovirus empty vector group, neuronal apoptosis was significantly reduced in the PD + Survivin treatment group ($F=38.912, P=0.000, P=0.000$). Compared with the control group, mRNA expression of Caspase-3 and 9 ($F=338.429, P=0.000, P=0.000; F=283.352, P=0.000, P=0.000$) and protein expression of cleaved

作者介绍: 赵聪聪, Email: 879926735@qq.com,

研究方向: 法医病理学。

通信作者: 李剑波, Email: ljb2032008@163.com。

基金项目: 重庆市科学技术委员会资助项目(编号: cstc2014jcyjA10034)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180615.1151.018.html>
(2019-04-16)

Caspase-3 and 9 ($F=640.262, P=0.000, P=0.000; F=354.210, P=0.000, P=0.000$) were significantly decreased. **Conclusion:** Survivin can inhibit apoptosis in the brain by inhibiting Caspase-3 and -9 at the mRNA and protein expression level in rat model of Parkinson's disease, resulting in protection against neurodegeneration in the substantia nigra and reduced Parkinson's disease-related symptoms.

【Key words】Parkinson's disease; neuronal apoptosis; Survivin

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种以静止性震颤、肌强直、运动迟缓、姿势不稳、认知和精神障碍为主要特征的进行性神经系统退行性疾病,常见于中老年人群,病程呈进行性发展。随着年龄的增长,患病率逐渐增高^[1]。目前,PD的病因仍未明确,但普遍认为与遗传、环境、毒物、年龄、氧化应激、线粒体功能异常、兴奋性毒性和免疫异常等多种因素有关^[2]。大量研究发现,以上不同因素所引起的PD最终均表现为黑质致密部多巴胺能神经元的凋亡,也即是PD的发病有一条共同的通路——神经元的凋亡^[3-4]。因此,进一步探索阻断PD中神经元凋亡的药物,对于抑制或延缓PD的发生发展具有重要的意义。

生存素(Survivin)是凋亡抑制蛋白家族中的一员,具有控制细胞有丝分裂、阻断凋亡过程的作用^[5-6]。有研究发现,颅脑损伤后,星形胶质细胞和神经元亚细胞结构中Survivin表达上调以降低DNA的裂解,进而抑制星形胶质细胞的凋亡^[7-8];还有研究发现,在脑梗死发生后,Survivin可促进血管内皮细胞增殖,抑制内皮细胞凋亡,促进血管生成。前期研究结果发现,Survivin能够剂量依赖性地抑制MPP⁺诱导的SH-SY5Y细胞凋亡,其机制可能与阻断Caspase信号通路相关,提示Survivin可能对神经细胞具有抑制凋亡及保护作用^[9]。因此,本研究通过药物注射法建立大鼠PD模型^[10],通过向其脑内注射Survivin腺病毒,探讨Survivin在PD中对神经元细胞凋亡的调控作用,为进一步探索PD的药物研发、临床治疗提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康成年(sprague-dawley, SD)雄性大鼠58只,体质量(200 ± 20)g,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要仪器 脑立体定位仪,微型手持式颅钻,Mini-Protein 3电泳仪,PCR仪,实时荧光定量PCR仪,全自动化学发光分析仪由重庆医科大学提供;10 μ L微量进样器购自上海高鸽公司。

1.1.3 主要药品及试剂 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)、阿朴吗啡(Apomorphine, APO)购自Sigma公司;Trizol购自ambion公司;SYBR Green PCR试剂盒购自KAPA Biosystems公司;ECL化学发光试剂盒购自Millipore公司;Survivin一抗购自Abcam公司;Cleaved-Caspase 3一抗、Cleaved-Caspase 9一抗购自Immunoway公司;GAPDH一抗购自CST公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Survivin腺病毒构建及验证 Ad-GFP及Ad-Survivin由吉满生物协助完成携带Survivin基因重组腺病毒的构建及包装。参照大鼠Survivin基因CDS(NM 022274.1)合成目的基因, *Nhe* I、*Hind* III双酶切后琼脂糖电泳并回收,连入pDC316-mCMV-ZsGreen1腺病毒载体(上海吉满生物科技有限公司),转化大肠杆菌菌株,PCR鉴定阳性得到阳性重组子并进行测序鉴定。经Western blot验证,构建成功的过表达载体有较好的过表达效果,经包装及多次扩增获得高滴度重组腺病毒。

1.2.2 PD大鼠模型的建立及分组 采用6-OHDA两点注射法建立大鼠PD模型,具体操作如下:50只大鼠用水合氯醛(10%, 0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉;麻醉成功后,根据《大鼠脑立体定位图谱》^[11]选择大鼠右侧纹状体定位注射6-OHDA。将大鼠固定在立体定位仪上(用耳棒固定好双侧耳道,用牙棒固定好门牙)进行常规备皮消毒。沿正中纵线切开头皮,擦拭,分离皮下组织,暴露颅骨;用30%双氧水擦拭,去脑膜,暴露前囟,并标记前囟位置,以前囟点为基点,选用的两点坐标为:AP-0.2 mm, ML+3 mm, DV+4.6 mm; AP: -0.2 mm, ML+3 mm, DV+6 mm,根据坐标确定好注射点并做好标记,用牙科钻钻孔,用10 μ L微量进样器分别吸取8 μ L 6-OHDA(溶于0.2%抗坏血酸的生理盐水中)后,分别以1 μ L/min速度缓慢注射,留针10 min,再以1 mm/min退针。常规缝合伤口,消毒,编号,放入笼中饲养。连续3 d腹腔注射青霉素(100 000 U/100 g),以防止感染并光照保暖。在术后前3周,每周1次对大鼠进行旋转行为学检测:在同一环境条件下对实验大鼠颈部皮下注射APO,剂量0.05 mg/kg,注射后开始观察,从大鼠开始向健侧转圈起开始计转圈数,其中平均转数>7 r/min的

大鼠为成功 PD 大鼠模型。6 只 SD 大鼠于术后 4 周内死亡,死亡率为 12%;29 只 SD 大鼠成功建立 PD 模型,成功率为 58%。

1.2.3 实验分组及处理 29 只成功构建 PD 模型的大鼠按照随机抽样法选取 24 只,分为 PD 模型组、PD 模型+腺病毒空载体组、PD 模型+Survivin 治疗组,每组 8 只;另取不予任何处理的 8 只大鼠为对照组。PD 模型组:术后不给予任何处理;PD 模型+腺病毒空载体组:在大鼠纹状体的同一坐标点注射腺病毒空载体 2 μ L(滴度: 3.0×10^{10} PFU/mL);PD 模型+Survivin 治疗组:在大鼠纹状体的同一坐标点注射携带 Survivin 基因腺病毒 2 μ L(滴度: 2.6×10^{10} PFU/mL);治疗次数均为 1 次。术后每周对大鼠颈部皮下注射阿扑吗啡(剂量 0.05 mg/kg)诱导行为学检测,行为学上出现差异后用过量麻醉法处死所有实验动物,收集脑组织标本并进行后续检测。

1.2.4 TUNEL 法检测黑质神经元凋亡情况 用 10%水合氯醛麻醉处死大鼠,立即取出受损侧脑组织,10%中性福尔马林固定保存 7 d。之后依据大鼠脑解剖图谱在大鼠脑黑质处取材,进行常规脱水、石蜡包埋。选择 5 μ m 厚度连续切片,捞片后置 60 $^{\circ}$ C 的烤箱中烘干后进行 TUNEL 染色及封片。采用病理图像分析系统,每张切片至少计数 500 个细胞,计算每 100 个细胞内的阳性细胞数,取其平均值,以百分数表示作为凋亡指数。

1.2.5 qRT-PCR 检测各组大鼠脑黑质中 Caspase 3 和 Caspase 9 表达 用 10%水合氯醛麻醉处死大鼠,立即取出受损侧脑组织,分离出黑质组织,提取总 RNA 并纯化,逆转录合成 cDNA。反应条件:95 $^{\circ}$ C,3 min;95 $^{\circ}$ C,5 s;56 $^{\circ}$ C,10 s;72 $^{\circ}$ C,25 s;39 个循环;65 $^{\circ}$ C,5 s;95 $^{\circ}$ C,50 s。以 GAPDH 为内参照,引物具体序列信息如下:Caspase 3(F:5'-CATGGAGATG-AAGGAGTA-3',R:5'-CCTGAATGATGAAGAGTT-3');Caspase 9(F:5'-CTCTGGCTTCATT CTTGC-3',R:5'-ACTACT-TTCTGCTCCTTT-3'),GAPDH(F:5'-GCAAGTCAACGGCA-CAG-3',R:5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3')。用 Caspase 3 和 Caspase 9 引物进行扩增,检测 Caspase 3 和 Caspase 9 的特异性,利用 qBASE plus 进行数据分析。

1.2.6 Western blot 检测各组大鼠脑黑质中 Cleaved-Caspase 3、Cleaved-Caspase 9 和 Survivin 表达 用 10%水合氯醛麻醉后,处死大鼠,立即取出受损侧脑组织,分离出黑质组织,移入已用液氮预冷的研钵中,加入液氮充分研磨,以 180 μ L 裂解液/20 mg 组织的比例加入蛋白裂解液,继续研磨至无明显组织形态的溶液状;转移至 EP 管中,摇床上 4 $^{\circ}$ C 裂解

30 min;4 $^{\circ}$ C 条件下以 12 000 r/min 离心 30 min。取上清做好标记保存于 -80 $^{\circ}$ C,其中各取适量用于蛋白浓度的测定。提取蛋白标本后,配胶后加样。电泳,转膜。将 PVDF 膜室温封闭 90 min 后分别加入 TBST 稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C 摇床反应过夜。TBST 漂洗 3 次后加入二抗孵育 2 h,TBST 漂洗 3 次后加入 ECL 发光液(A 液和 B 液等量混匀),加在膜的正面与之充分接触,然后将膜置于全自动化学发光分析仪中检测,GAPDH 作为内参对蛋白质条带进行校正。

1.3 统计分析

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行处理,计量资料用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用重复检测方差分析,组间多重比较采用 Tukey 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 阿扑吗啡诱导大鼠行为学观察

行为学观察结果见表 1。旋转圈数指标采用重复测量方差分析法,分别进行组间、组内比较。对照组大鼠治疗前、后各时间点旋转圈数均为 0。组间比较:治疗前及第 1 周,PD 模型+Survivin 治疗组与 PD 模型组及 PD 模型+腺病毒空载体组比较,旋转圈数均无统计学差异($F=0.444, P=0.642, P=0.642; F=1.037, P=0.530, P=0.530$);第 2 周,PD 模型+Survivin 治疗组与 PD 模型组及 PD 模型+腺病毒空载体组比较,大鼠旋转圈数无统计学差异($F=2.291, P=0.097, P=0.064$);第 3 周,PD 模型+Survivin 治疗组与 PD 模型组及 PD 模型+腺病毒空载体组比较,大鼠旋转圈数均明显减少($F=22.315, P=0.000, P=0.000$)。各时间点组内比较,第 3 周与其余时间点比较,PD 模型组及 PD 模型+腺病毒空载体组大鼠旋转圈数均有统计学差异($F=4.599, P=0.002, P=0.007, P=0.013; F=5.398, P=0.001, P=0.003, P=0.048$);第 3 周与治疗前相比,PD 模型+Survivin 治疗组大鼠旋转圈数有统计学差异($F=1.833, P=0.036$)。

2.2 黑质神经元凋亡观察

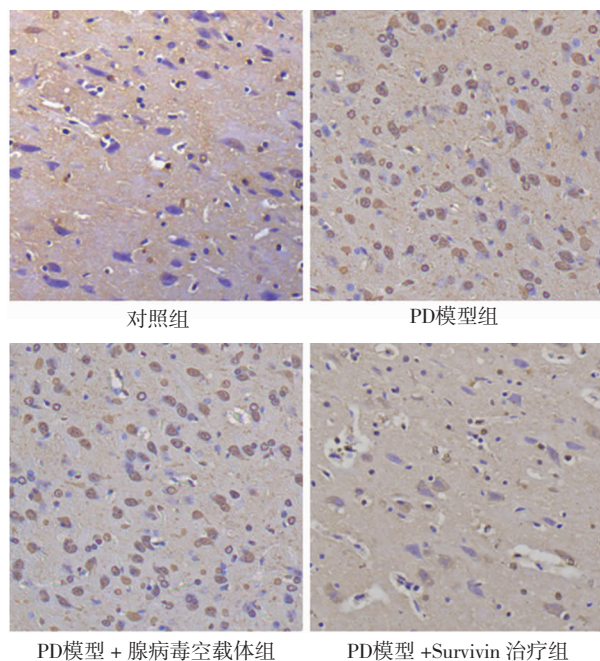
光镜下观察结果显示(图 1),对照组大鼠脑黑质中活性神经元排列及数目正常,呈淡蓝色,未发现明显的 TUNEL 染色阳性细胞[阳性率: $(4.40 \pm 1.02)\%$],即凋亡神经元;与对照组比较,PD 模型组[阳性率: $(26.60 \pm 1.37)\%$]及 PD 模型+腺病毒空载体组[阳性率: $(25.40 \pm 1.50)\%$]大鼠脑黑质中活性神经元数量明显减少,TUNEL 染色阳性细胞(凋亡神经元)数目明显增加($P=0.000$);与 PD 模型组及 PD 模型+腺病毒空载体组相比,PD 模型+Survivin 治疗组[阳性率: $(18.80 \pm$

表 1 各组大鼠治疗前后旋转行为测定结果 ($n=8, \bar{x} \pm s, r/min$)

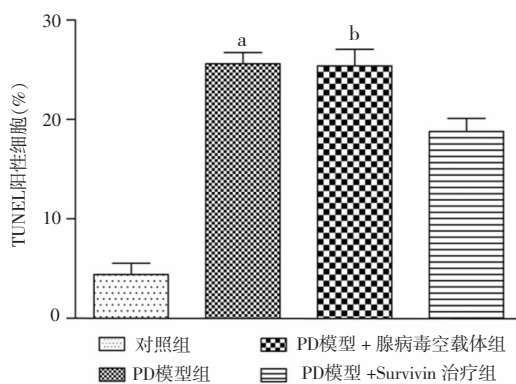
组别	治疗前	治疗后第 1 周	治疗后第 2 周	治疗后第 3 周	F 值	P 值
PD 模型组	10.38 $\pm$ 1.30	10.63 $\pm$ 0.92	10.75 $\pm$ 1.04	12.12 $\pm$ 0.83	6.407 ^a	0.003 ^a
PD 模型 + 腺病毒空载体组	9.88 $\pm$ 1.41	10.13 $\pm$ 1.13	10.86 $\pm$ 1.25	11.88 $\pm$ 1.13	9.867 ^b	0.000 ^b
PD 模型 + Survivin 治疗组	10.13 $\pm$ 0.99	9.88 $\pm$ 1.13	9.75 $\pm$ 1.16	8.88 $\pm$ 1.25	4.821 ^c	0.019 ^c

注:a,组间比较 F 值和 P 值;b:各时间点比较 F 值和 P 值;c:交互作用的 F 值和 P 值

1.17%)大鼠脑黑质中活性神经元数目有所增多,而 TUNEL 染色阳性细胞(凋亡神经元)数目明显减少($F=38.912, P=0.000, P=0.000$)。



A. 大鼠黑质神经元 TUNEL 染色



a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 PD 模型 + Survivin 治疗组比较, $P < 0.05$; c: 与 PD 模型组比较, $P < 0.05$

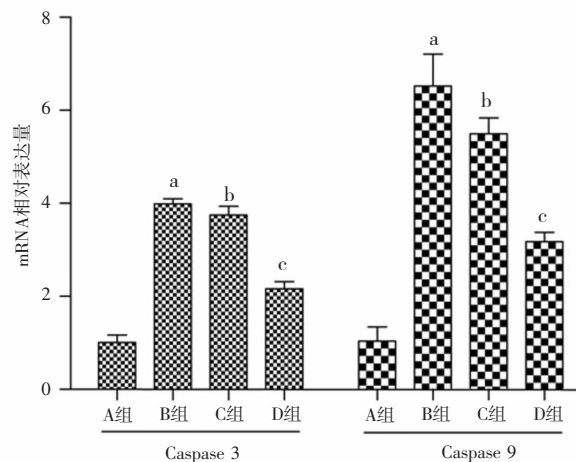
B. TUNEL 阳性细胞计数

图 1 光镜下各组大鼠黑质神经元凋亡观察及阳性细胞计数结果 (TUNEL, $200\times$)

2.3 qRT-PCR 检测脑黑质组织 Caspase 3 和 Caspase 9 mRNA 的表达

每组随机选取 3 只大鼠的脑黑质组织提取 RNA 进行 qRT-PCR 实验,检测对照组、PD 模型组、PD 模型+腺病毒空载体组、PD 模型+Survivin 治疗组中的相关 mRNA 相对表达水平。结果显示(图 2),各组大鼠脑黑质组织中 Caspase 3 基因相对表达量分别为 $1.04 \pm 0.16, 4.03 \pm 0.20, 3.78 \pm 0.18, 2.12 \pm 0.22$ ($F=338.429, P=0.000$), Caspase 9 基因相对表达量分别为 $1.03 \pm 0.23, 6.27 \pm 0.52, 5.76 \pm 0.36, 3.17 \pm 0.22$ ($F=$

$283.352, P=0.000$)。PD 模型组较对照组, Caspase 3 和 Caspase 9 的 mRNA 表达水平明显升高 ($P=0.000, P=0.000$)。与 PD 模型组比较, PD 模型+腺病毒空载体组 Caspase 3 和 Caspase 9 的 mRNA 表达水平无统计学差异 ($P=0.127, P=0.086$)。而应用 Survivin 治疗后,与 PD 模型组及 PD 模型+腺病毒空载体组比较, Caspase 3 和 Caspase 9 的 mRNA 表达水平明显降低 ($P=0.000, P=0.000$)。



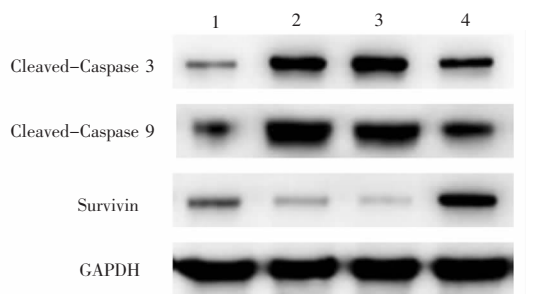
a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 PD 模型 + Survivin 治疗组比较, $P < 0.05$; c: 与 PD 模型组比较, $P < 0.05$

A 组: 对照组; B 组: PD 模型组; C 组: PD 模型 + 腺病毒空载体组; D 组: PD 模型 + Survivin 治疗组

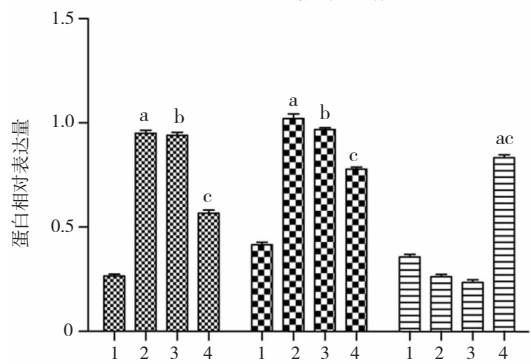
图 2 qRT-PCR 检测各组大鼠脑黑质组织 Caspase 3 和 Caspase 9 表达情况

2.4 Western blot 检测脑黑质组织 Survivin、Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-Caspase 9 蛋白的表达

每组随机选取 3 只大鼠的脑黑质组织提取蛋白进行 Western blot 实验,检测对照组、PD 模型组、PD 模型+腺病毒空载体组、PD 模型+Survivin 治疗组中相关蛋白相对表达水平。结果显示(图 3),各组大鼠脑黑质组织中 Cleaved-Caspase 3 蛋白相对表达量分别为 $0.27 \pm 0.02, 0.95 \pm 0.03, 0.94 \pm 0.03, 0.57 \pm 0.04$ ($F=640.262, P=0.000$), Cleaved-Caspase 9 蛋白相对表达量分别为 $0.42 \pm 0.03, 1.02 \pm 0.02, 0.97 \pm 0.02, 0.78 \pm 0.03$ ($F=354.210, P=0.000$), Survivin 蛋白相对表达量分别为 $0.36 \pm 0.03, 0.26 \pm 0.03, 0.23 \pm 0.03, 0.83 \pm 0.03$ ($F=480.727, P=0.000$)。PD 模型组较对照组, Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-Caspase 9 的蛋白表达水平明显升高 ($P=0.000, P=0.000$), Survivin 的蛋白表达水平明显降低 ($P=0.000$)。与 PD 模型组比较, PD 模型+腺病毒空载体组 Cleaved-Caspase 3、Cleaved-Caspase 9 及 Survivin 的蛋白表达水平无统计学差异 ($P=0.946, P=0.084, P=0.435$)。而应用 Survivin 治疗后,与 PD 模型组及 PD 模型+腺病毒空载体组比较, Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-Caspase 9 的蛋白表达水平明显降低 ($P=0.000, P=0.000$), Survivin 的蛋白表达水平明显升高 ($P=0.000$)。



A. 各组脑黑质中Cleaved-Caspase 3、Cleaved-Caspase 9和Survivin蛋白表达情况



a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 PD 模型 + Survivin 治疗组比较, $P < 0.05$; c: 与 PD 模型组比较, $P < 0.05$

1: 对照组; 2: PD 模型组; 3: PD 模型 + 腺病毒空载体组; 4: PD 模型 + Survivin 治疗组

B. 各组脑黑质中 Cleaved-Caspase 3、Cleaved-Caspase 9 和 Survivin 蛋白相对表达量

图3 各组大鼠脑组织黑质中 Cleaved-Caspase 3、Cleaved-Caspase 9 和 Survivin 蛋白表达情况

3 讨论

PD作为一种典型的老年慢性疾病,其发病率较高(约为0.3%),且随着年龄的增长呈成倍增加趋势:60岁为0.25%,65岁为0.5%,70岁为1%,75岁为1.5%,80岁为2.5%,85岁为3.5%~4.0%^[12]。不同性别人群PD发病的风险也存在差异。Meta分析显示,男性患PD的相对风险约为女性的1.46倍^[13]。PD的发病机制复杂,目前主要存在氧化应激机制、兴奋性氨基酸神经毒性机制、免疫学异常机制等多种学说^[14]。尽管PD的确切发病机制尚不明确,但是目前研究普遍认为,神经元的凋亡在PD的发生发展过程中发挥着极其重要的作用,抑制神经元凋亡的过程可以起到保护神经元、阻断或延缓PD病程发展的作用。因此,探索有效抑制神经元凋亡的药物一直是PD防治与治疗的重点和难点。Birkmayer和Hornykiewicz^[15]研究发现左旋多巴具有治疗PD的作用,这一发现对于PD的治疗具有划时代意义。近

40年的临床应用亦证实左旋多巴可以明显改善PD患者症状,提高其生活质量。然而,最近研究表明,长期服用左旋多巴并不能减缓PD的病程和多巴胺神经元的凋亡^[16],且导致异动症和运动反应性波动等多种并发症^[17-18]。因此,研究新的能有效阻止PD中多巴胺能神经元凋亡的药物,仍是临床医学和基础医学的难点,且具有重要的意义和良好的发展前景。

近些年, Survivin 作为肿瘤靶向治疗的靶基因蛋白已被广泛研究^[19-21]。前期研究发现,通过应用 Survivin 反义寡核苷酸,可有效诱导肿瘤细胞的凋亡,减少肿瘤细胞存活及延缓肿瘤生长^[22]。在乳腺癌相关研究中,采用 Survivin 反义寡核苷酸转染可有效抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞中生存素基因的表达,并降低其 MMP-2、MMP-9 表达,提示抑制 Survivin 的表达对乳腺癌具有基因治疗的效果^[23]。同样在喉鳞癌动物模型的相关研究中,采用 siRNA 靶向抑制 Survivin 的表达能明显降低裸鼠成瘤,且 TUNEL 证实治疗组肿瘤细胞凋亡数目明显增多,免疫组化示治疗组 Bcl-2 表达下降,提示 Survivin 的 siRNA 抑制喉鳞癌裸鼠肿瘤生长,其作用机制可能与抑制 Bcl-2 表达诱导肿瘤细胞凋亡相关^[24]。在肺腺癌的相关研究中,通过构建稳定抑制 Survivin 表达的肺腺癌细胞模型,结果发现与对照组相比,反义组 p21 表达及细胞凋亡率明显增加,而 MDM2 表达及细胞增殖明显降低,提示下调 A549 细胞 Survivin 表达后,细胞增殖降低而细胞凋亡增加,其作用机制与 p21 表达增加和 MDM2 降低有关^[25]。这些研究均提示 Survivin 可通过多种途径在抑制癌症方面发挥重要作用。而 Survivin 抑制神经细胞凋亡的相关研究还比较少见。例如,采用稳定表达了 Survivin 基因的转染细胞制作体外缺血/再灌注模型,结果发现 Survivin 基因对缺血/再灌注神经细胞具有抗凋亡作用,这为基因治疗脑血管性疾病奠定了基础^[26]。在大鼠脊髓损伤模型中发现,脊髓损伤后 Survivin 表达呈上升趋势并有一定的规律性,与细胞凋亡成正相关,脊髓损伤后 Survivin 的表达升高参与了抑制神经细胞的凋亡,从而起到减轻脊髓损伤的作用^[27]。而对于 PD, Survivin 在 PD 的脑组织中表达变化如何以及可否通过增加脑组织中 Survivin 的表达抑制神经元的凋亡,从而抑制或延缓 PD 病程的发展,国内外尚无研究。

因此,本实验在前期研究的基础上,采用 6-O-HDA 单侧纹状体两点注射法建立 PD 模型,利用行

为学方法(APO 诱发旋转试验)验证大鼠 PD 模型建立成功,并首次将携带 Survivin 基因的腺病毒直接注射于大鼠 PD 模型中,观察大鼠行为学上的改变,再分别从凋亡水平、基因水平、蛋白水平上评价 Survivin 在黑质神经元凋亡过程中的作用。

本研究发现,与对照组比较,PD 模型组 Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-Caspase 9 蛋白表达水平明显升高,Survivin 蛋白表达水平明显降低。本研究首次发现,与 PD 模型组比较,PD 模型+Survivin 治疗组 Cleaved-Caspase 3 和 Cleaved-Caspase 9 的 mRNA 及蛋白的表达水平均明显降低,从而提示 Survivin 能够有效减少 PD 中黑质神经元的凋亡,抑制或减缓 PD 病程的发生发展。

综上所述,本研究首次发现 Survivin 能够有效减轻大鼠 PD 模型中黑质神经元的凋亡,从而减轻帕金森病相关症状,其机制可能与阻断 Caspase 3 和 Caspase 9 信号通路有关。本研究结果不仅为进一步探索 PD 中黑质神经元凋亡的机制提供了新的研究方向;同时对于临床 PD 药物的研发以及治疗靶点的确定提供了重要参考。

本研究结果来自动物试验的基础研究,Survivin 在人 PD 脑组织中表达变化规律如何以及能否用于人 PD 的治疗,将是本课题组在下一阶段深入研究的内容。

参 考 文 献

- [1] 刘疏影,陈 彪. 帕金森病流行现状[J]. 中国现代神经疾病杂志,2016,16(2):98-101.
- [2] 李 政,徐 运. 帕金森病因及发病机制的进展研究[J]. 国际神经病学神经外科学杂志,2014,41(4):345-348.
- [3] Mori T, Hayashi T, Su TP. Compromising σ -1 receptors at the endoplasmic reticulum render cytotoxicity to physiologically relevant concentrations of dopamine in a nuclear factor- κ B/Bcl-2-dependent mechanism: potential relevance to Parkinson's disease[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2012, 341(3):663-671.
- [4] Schulz JB. Mechanisms of neurodegeneration in idiopathic Parkinson's disease[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2007, 13(s3):306-308.
- [5] Colnaghi R, Connell CM, Barrett RM, et al. Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin[J]. J Biol Chem, 2006, 281(44):33450-33456.
- [6] Kanwar JR, Kamalapuam SK, Kanwar RK. Survivin signaling in clinical oncology: a multifaceted dragon[J]. Med Res Rev, 2013, 33(4):765-789.
- [7] Johnson EA, Svetlov SI, Wangkk, et al. Cell-specific DNA fragmentation may be attenuated by a survivin-dependent mechanism after traumatic brain injury in rats[J]. Exp Brain Res, 2005, 167(1):17-26.
- [8] Johnson EA, Svetlov SI, Pikebr, et al. Cell-specific upregulation of

- survivin after experimental traumatic brain injury in rats[J]. J Neurotrauma, 2004, 21(9):1183-1195.
- [9] 刘 梦,朱 英,熊进成,等. Survivin 在 Mpp+诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡过程中的作用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(10):1126-1129.
- [10] Ungerstedt U. 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons[J]. Eur J Pharmacol, 1968, 5(1):107-110.
- [11] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates[M]. New York: Academic Press, 1997:128.
- [12] de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease[J]. Lancet Neurol, 2006, 5(6):525-535.
- [13] Taylor KS, Cook JA, Counsell CE. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2007, 78(8):905-906.
- [14] 张 娜, 窦德强. 帕金森病分子病理机制研究进展[J]. 神经药理学报, 2013, 3(2):35-42.
- [15] Birkmayer W, Hornykiewicz O. The L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) effect in Parkinson's syndrome in man: On the pathogenesis and treatment of Parkinson akinesia[J]. Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr, 1962, 203(203):560-574.
- [16] 汪锡金, 张 煜, 陈生弟. 帕金森病发病机制与治疗研究十年进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2010, 10(1):36-42.
- [17] Talukder MA, Yang F, Nishijima Y, et al. Reduced SERCA2a converts sub-lethal myocardial injury to infarction and affects postischemic functional recovery[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 46(2):285-287.
- [18] Fernandez HH, Standaert DG, Hauser RA, et al. Levodopa-carbidopa intestinal gel in advanced Parkinson's disease: final 12-month, open-label results[J]. Mov Disord, 2015, 30(4):500-509.
- [19] 储冀汝, 谢海棠, 李 娟, 等. Survivin 蛋白在抗肿瘤治疗中的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(7):835-840.
- [20] Cao W, Fan R, Wang L, et al. Expression and regulatory function of miRNA-34a in targeting survivin in gastric cancer cells[J]. Tumor Biol, 2013, 34(2):963-971.
- [21] Chen ZY, Liang K, Lin Y, et al. Study of the UTM-based delivery system to induce cervical cancer cell apoptosis and inhibit proliferation with shRNA targeting survivin[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(1):1763-1777.
- [22] 孙 艳, 底建敏, 陈春宁. Survivin 反义寡核苷酸对人卵巢癌细胞裸鼠腹腔移植瘤生长的影响与机制[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(8):1211-1214, 1221.
- [23] 许 斌, 肖 蔚, 焦 霞, 等. 生存素反义寡核苷酸对乳腺癌 MCF-7 细胞株 MMP-2 及 MMP-9 表达的影响[J]. 江苏大学学报(医学版), 2011, 21(3):203-207.
- [24] 王 琳, 郭 岩, 姚鸿超, 等. 靶向生存素 siRNA 抑制人喉鳞癌裸鼠动物模型的实验研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2013, 47(3):212-215.
- [25] 郑一鸣, 贾卫光, 王鹏程, 等. RNA 干扰生存素基因表达对肺癌癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2013, 17(24):45-47.
- [26] 梅松柳, 高俊霞, 宋俊兰. 生存素基因质粒转染对缺血/再灌注神经细胞的保护作用[J]. 医学综述, 2009, 15(14):2224-2225.
- [27] 孙海中, 周成福, 马晓茹, 等. 大鼠脊髓损伤早期 Survivin 表达规律与细胞凋亡的关系[J]. 黑龙江医药科学, 2013, 36(6):29-31.

(责任编辑:冉明会)