

王嫚诗,张玲,秦川,等. α -突触核蛋白 A53T 突变损伤小鼠认知功能 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 7-13.

Wang MS, Zhang L, Qin C, et al. α -synuclein A53T mutation impairs cognitive function in mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(5): 7-13.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.05.002

α -突触核蛋白 A53T 突变损伤小鼠认知功能

王嫚诗^{1,2}, 张玲¹, 秦川¹, 丛斌^{2*}

(1. 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021;

2. 河北省法医学重点实验室, 河北医科大学法医学院, 河北省法医分子鉴定协同创新中心, 石家庄 050017)

【摘要】 目的 探索 α -突触核蛋白 A53T 转基因小鼠认知功能, 运动功能与焦虑样行为学的改变以及病理学变化特点。**方法** 选用背景为 C57BL/6 的 α -突触核蛋白 A53T 转基因小鼠作为实验组, 同窝阴性小鼠为对照组。采用旷场及圆筒实验检测小鼠的焦虑状态; 转棒及抓力实验评价小鼠的运动协调能力以及前肢张力; 水迷宫及条件恐惧实验评价小鼠的认知能力。通过免疫组织化学染色法研究模型小鼠脑内病理特征; 通过电镜观察模型小鼠脑内线粒体变化。**结果** 与对照组比较, α -突触核蛋白 A53T 转基因小鼠运动距离增加, 呈现过度活跃状态; 对条件恐惧记忆的时间缩短, 出现认知障碍; 圆筒、转棒与抓力实验及水迷宫实验未见统计学差异。模型组小鼠黑质、纹状体、梨状皮层及海马的 α -synuclein 磷酸化水平增加, 前额叶路易小体沉积, 黑质纹状体 α -synuclein 沉积增多, 黑质 TH 阳性细胞数量显著减少; 与对照组比较, 电镜观察模型组小鼠脑内线粒体嵴及其内容物不清, 线粒体形态改变。**结论** 突触核蛋白 A53T 转基因小鼠出现认知功能受损, 并且早于运动障碍发生; 病理特征表现为 α -synuclein/LBs 沉积于前额叶、皮层, 黑质多巴胺能神经元缺失以及线粒体形态改变, 可作为一种突触核蛋白相关认知障碍性疾病如路易氏体痴呆和帕金森病痴呆的动物模型。

【关键词】 A53T 转基因小鼠; 动物模型; 行为学; 认知; 线粒体

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 05-0007-07

α -synuclein A53T mutation impairs cognitive function in mice

WANG Manshi^{1,2}, ZHANG Ling¹, QIN Chuan¹, CONG Bin^{2*}

(1. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of the People's Republic of China; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China. 2. Hebei Key Laboratory of Forensic Medicine; College of Forensic Medicine, Hebei Medical University; Hebei Collaborative Innovation Center of Forensic Medical Molecular Identifications, Shijiazhuang 050017)

【Abstract】 Objective To explore changes in motor coordination, cognitive function, and anxiety-like behavior as well as pathological characteristics in α -synuclein A53T transgenic mice. **Methods** We used α -synuclein A53T transgenic mice with a C57BL/6 background as the experimental group, and included a negative control group. The open field and cylinder tests were used to examine mouse anxiety levels, the rotarod and grip tests were used to evaluate movement disorders, and the Morris water maze and a fear conditioning test were used to evaluate cognitive ability. Pathological features were studied using immunohistochemical staining and mitochondrial morphology was observed via electron microscopy. **Results**

【基金项目】 国家自然科学基金(31970510); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-2-006, 2016-I2M-1-010)。

【作者简介】 王嫚诗(1994—), 女, 硕士研究生, 专业: 病理学与病理生理学。E-mail: wangmanshi007@163.com

【通信作者】 丛斌(1957—), 男, 院士, 博士生导师, 主要从事法医学研究, 病理生理学研究。E-mail: hbydcongbin@126.com

Compared with the control group, α -synuclein A53T transgenic mice moved a greater distance, indicating that the mice were overactive. Further, freezing time was decreased, indicating cognitive impairment. We found no differences in performance in the cylinder test, rotarod test, grip test, or Morris water maze. In the α -synuclein A53T transgenic mice, levels of phosphorylated α -synuclein in the substantia nigra, striatum, piriform cortex, and hippocampus were increased, and we found Lewy bodies in the prefrontal cortex. Further, increased deposition of α -synuclein in the substantia nigra and striatum was observed, and the number of TH cells in the substantia nigra decreased significantly. Compared with the control group, mitochondria fission in the amygdala was increased, and the mitochondrial contents were unclear. **Conclusions** Cognitive function was impaired in α -synuclein A53T transgenic mice. Pathological characteristics included α -synuclein/LBs deposits in the prefrontal and piriform cortex, decreases in dopaminergic neurons in the substantia nigra, and altered mitochondrial morphology in the amygdala. α -synuclein A53T transgenic mice may be an appropriate model of synucleinopathy-related cognitive disease such as Lewy body dementia and dementia related to Parkinson's disease.

[Keywords] α -synuclein A53T transgenic mice; mouse model; behavior; cognitive; mitochondria

突触核蛋白相关路易体病是一种常见的中老年人痴呆性疾病,主要包括帕金森病痴呆(PDD)、路易氏体痴呆(DLB)^[1-2]。其病理特征主要为多巴胺能神经元缺失以及突触核蛋白(α -synuclein)的沉积即路易氏小体(Lewy bodies, LBs)的形成^[3]。突触核蛋白相关路易体病的主要症状表现为认知功能障碍以及帕金森病症状,包括早期出现进展性痴呆,后期伴随锥体外系症状表现^[4-5],并且其 SNCA 基因中特定的遗传变异可以影响临床表型^[6],其 A53T 突变起病年龄早,生存期短^[7]。但在目前,没有针对 DLB 及 PDD 确切的治疗以及理想的动物模型。

此外,研究表明 α -synuclein 沉积可以通过干扰线粒体外膜,影响线粒体融合与裂变,从而导致线粒体结构破坏^[8-10],并且其 A53T 突变能够直接抑制线粒体呼吸链中复合物的活性,从而导致线粒体氧化应激,进而影响神经细胞的正常功能^[11-12]。在认知功能方面,神经突触内的线粒体含量变化、电子传递链的改变直接影响神经元的传递^[13-14],因此,保护线粒体形态,维持线粒体稳定可作为潜在的治疗方向。

突触核蛋白相关疾病至今仍无确切的治疗措施,而有效的动物模型的建立及应用是解决问题的关键。因此,本实验通过行为学实验对该模型进行运动,焦虑样行为以及认知方面评价;结合免疫组化观察小鼠不同脑区的突触核蛋白沉积,多巴胺能神经元的变化;应用电镜观察其对线粒体的影响,进而评价该模型的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级,雌雄各半,表达人 α -synuclein A53T 突

变的转基因模型小鼠和野生型 C57BL/6 小鼠各 30 只,10 月龄,体重 20~30 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0004],饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所屏障环境动物房[SYXK(京)2018-0019]。动物实验方案获中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会(IACUC)的批准(ILAS-QC-19004),并根据 3R 原则对实验动物的使用及饲养给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

引物购买于中国生工生物工程股份有限公司; Mouse Direct PCR Kit 购买于美国 Biotool 公司; TH (EP1532Y)抗体, α -synuclein (EP1536Y)抗体, P- α -synuclein (ab59264)抗体购买于美国 Abcam 公司; HRP 标记兔抗购买于北京中杉金桥生物技术有限公司; BSA(牛血清白蛋白)购买于德国 SIGMA 公司;免疫组化试剂盒购买于北京中杉金桥生物技术有限公司;尼氏染色试剂盒购买于北京索莱宝科技有限公司。EthoVision XT 动物轨迹跟踪于行为观察记录分析系统购自荷兰 Noldus 公司;条件恐惧分析系统购于美国 MED Associates 公司;转棒分析系统购于中国淮北正华公司;抓力分析系统购于法国 BIOSEB 公司;圆筒实验装置为自行设计;冰冻切片机购于美国 SAKURA Tissue-Tek 公司;电镜 JEM-1400 购于日本电子公司;显微镜购于德国莱卡公司。

1.3 实验方法

1.3.1 转基因阳性动物鉴定

子代小鼠出生 8~14 d 内剪鼠尾,按照试剂盒说明加入组织消化液,配置 20 μ L 反应体系,上下游引物为: 5'-GAGGAAGGGTATCAAGACTACGAAC-3'; 5'-GCCGATCATAATCAGCC ATACCAC-3',参

照文献设置循环参数进行 PCR 扩增基因型鉴定^[15]。

1.3.2 认知、焦虑样及运动行为学检测

旷场行为学实验可以反应小鼠的自主运动能力、探索能力及焦虑程度。旷场实验箱为 40 cm×40 cm×40 cm 正方体,未有顶部遮盖,上方悬挂摄像机。设置实验箱内观察区,中央区及边缘区,记录小鼠 5 min 内运动时间,距离,平均运动速度,中央区及边缘区停留时间。圆筒实验用于检测小鼠在圆筒内的自发活动,主要包括小鼠在圆筒内的站立,理毛和前肢活动情况。圆筒为一直径 7.5 cm 的圆柱型透明有机玻璃,未有顶部遮盖,在圆筒前后方分别放有摄像机和镜子,用于全方位观测和量化小鼠自发活动情况。实验时将小鼠放入圆筒内,记录 3 min 内小鼠的站立次数和理毛时间。转棒实验用于评价小鼠的运动协调能力。转棒仪主要由转轴和独立隔间组成,实验分 3 d 进行,前 2 d 为训练期,转速为 10 r/min,每天训练 3 次,每次持续 5 min;第 3 d 为测试期,从初始逐渐加速至 40 r/min 共计 5 min,每只小鼠检测 3 次,每次间隔 20 min,取 3 次均值记为在棒时间,实验期间小鼠掉落系统自动停止记录。

抓力实验用于检测小鼠的前肢肌张力,主要由抓力网格以及计算机检测系统组成。实验时提起小鼠尾部,让小鼠前肢抓取网格,由上至下轻拉小鼠尾部拖动小鼠,记录拉力最大值,每只小鼠测试三次,取平均值。

Morris 水迷宫实验用于检测小鼠空间学习记忆行为。设置水池内四个象限及隐藏平台。操作者每次从不同象限放入小鼠,共训练 7 d,第 8 天撤掉平台,进行探索实验测试,记录小鼠穿越平台所在象限时间及次数。

条件恐惧实验用于评价小鼠对恐惧场景的记忆,包括场景性条件恐惧及线索性条件恐惧,通过记录小鼠僵直时间反应小鼠的恐惧程度。实验分 4 d 进行,第 1 天为适应期,第 2 天给予电击及声音刺激,第 3 天无任何刺激,第 4 天更换场景仅给予声音刺激。第 1 天设置光照强度为 130 lx,将小鼠放入条件恐惧箱内适应 10 min;第 2 天设置光照强度为 130 lx,电击强度 0.5 mA,声音强度为 80 db,刺激频率为 5000 Hz。将小鼠放入条件恐惧箱内,3 min 后给予单一频率声音刺激(30 s),于声音刺激的最后 2 s 给予电击刺激,每段间隔 1 min,10 min 内给予 5

次声音及电击刺激,记录小鼠在恐惧箱 10 min 内的僵直时间;第 3 天设置光照强度为 130 lx,无任何条件刺激,记录小鼠 5 min 内的僵直时间。第 4 天更换场景,放置黑板遮光,并在其侧壁涂有带有气味的果汁。光照强度、声音刺激及检测时间同第 2 天,记录小鼠在恐惧箱内僵直时间。

1.3.3 免疫组化观察突触核蛋白/路易小体沉积,TH 细胞变化

1) TH 染色及 α -synuclein 染色

PBS 洗脑片后置于 3% 过氧化氢封闭液室温孵育 10 min,再次用 PBS 冲洗 3 次,每次 10 min,置于 BSA 孵育 30 min,一抗(TH 抗体 1:5000 稀释; α -synuclein 抗体 1:1000 稀释)孵育过夜。PBS 洗脑片后,二抗(兔抗 1:1000;鼠抗 1:1000)室温孵育 30 min,PBS 洗脑片 4 次,每次 5 min,DAB 显色 30 s。取相同层面纹状体,黑质,海马贴片,烤片 1 h,置于氯仿及酒精混合溶液(1:1)过夜。

2) 尼氏染色及计数

将玻片置于 100% 乙醇、95% 乙醇梯度脱水各 30 s,自来冲洗后甲酚紫染色,再用 95% 乙醇、100% 乙醇梯度脱水各 10 s,置于二甲苯 30 s 后中性树胶封片。将染色后的黑质及纹状体置于显微镜下观察并画出黑质区域,用 image J 软件计数 TH 阳性细胞数。

1.3.4 电镜观察线粒体形态变化

生理盐水及多聚甲醛灌注后,取纹状体经 2.5% 的戊二醛固定过夜后用 1% 锇酸 4℃ 固定 2 h,蒸馏水冲洗后梯度乙醇脱水,环氧丙烷处理,树脂浸透,包埋,制备超薄切片,染色后置于电镜下观察。

1.4 统计学方法

实验数据采用 GraphPad Prism 6 软件处理数据、作图,结果采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 转基因阳性动物的鉴定

部分 α -synuclein A53T 小鼠基因鉴定结果见图 1,携带 α -synuclein A53T 基因的阳性鼠可见清晰 PCR 扩增条带,与目的片段大小相符,阴性鼠无条带(图 1)。

2.2 α -synuclein A53T 转基因小鼠认知行为学改变

在旷场实验中, α -synuclein A53T 转基因小鼠表

现为运动距离增加,但在中央区停留时间未见明显统计学差异(图 2A~2C);在圆筒实验、转棒实验、抓力实验(图 2D~2E、图 3)及水迷宫实验(图 4A~4C)中, α -synuclein A53T 转基因小鼠与 Control 组小鼠相比均未见明显统计学差异;在条件恐惧实验中, α -synuclein A53T 转基因小鼠在第场景依赖条件恐惧(海马依赖,0~330 s)与线索依赖条件恐惧(杏仁核依赖,180~570 s)中表现为僵直时间缩短(图 4D~4E),具有统计学差异。

2.3 免疫组化观察 α -synuclein 沉积增多,TH 细胞减少

应用免疫组化染色评价 α -synuclein A53T 转基因小鼠 α -synuclein,TH 变化。P- α -synuclein 显示 α -synuclein A53T 转基因小鼠纹状体、黑质、梨状皮层及海马 P- α -synuclein 沉积增多(图 5A);P- α -synuclein 染色观察小鼠前额叶路易氏小体的沉积,LB 的典型外观是一个或多个嗜酸性球体,中间为致密核心,周边为晕圈^[16]如箭头所示(图 5B),纹状体、黑质 α -synuclein 增多(图 6);TH 染色显示 A53T 转基因小鼠黑质 TH 阳性多巴胺能神经元减少(图 7),结果表明 A53T 转基因小鼠具有不同脑区 α -synuclein 沉积及 TH 细胞减少的病理特征。

2.4 电镜观察小鼠脑线粒体形态变化

文献表明 α -synuclein 可以直接影响线粒体呼吸链复合物的活性,从而导致线粒体氧化应激损伤。电镜结果显示 α -synuclein A53T 转基因小鼠线粒体内容物,线粒体嵴结构不清;线粒体形态改变,裂变增多,提示 α -synuclein 的沉积可以影响线粒体

的结构及形态(见图 8)。

3 讨论

α -synuclein A53T 相关小鼠模型具有 α -synuclein 的聚集以及 TH 细胞的减少,常被用做 PD 模型。研究表明,不同外源启动子调控表达的 α -synuclein A53T 小鼠模型的表型有所差别,朊病毒启动子主要在神经元表达^[12];Teto 启动子主要在四环素诱导下表达^[17];thy1 启动子主要在皮层以及皮层下神经元表达^[18]。此外,AAV1/2-A53T- α -synuclein 诱导的小鼠模型,可在 SN 中引起 α -synuclein 的广泛过表达,从而导致多巴胺能纤维丢失和纹状体中多巴胺能神经递质的减少,早期可伴有运动障碍^[19]。

本实验采用的小鼠为血小板源生长因子启动子(PDGF-h- α -Synuclein) A53T 突变小鼠,PDGF- β 启动子可以在新皮层、嗅球、胶质细胞以及神经元中广泛表达,并且据报道该小鼠具有 α -synuclein 的沉积以及进行性运动障碍^[20]。

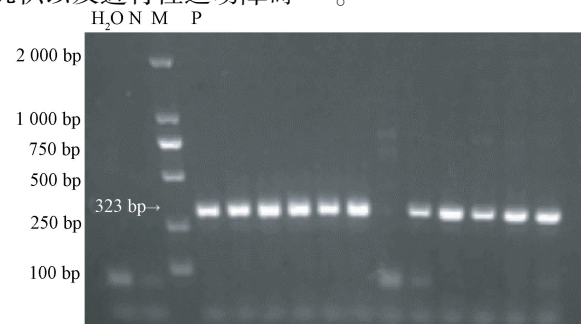
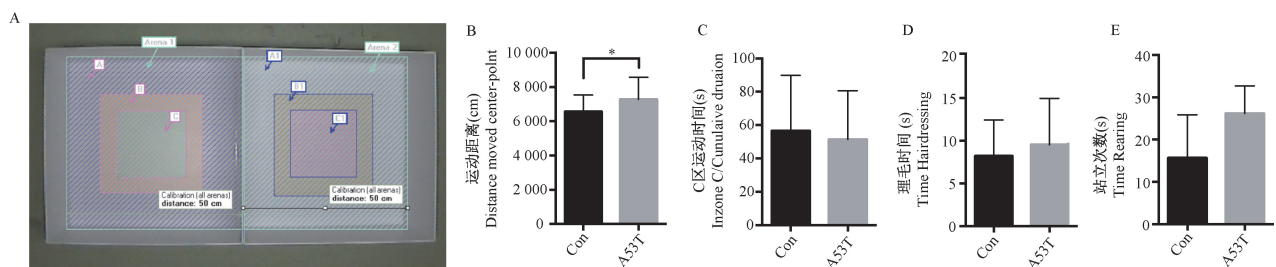


图 1 部分 α -synuclein A53T 小鼠 PCR 鉴定凝胶电泳图

Figure 1 PCR identification of α -synuclein A53T mice by gel electrophoresis



注: A:旷场实验区域划分(C 为中央区;A、B 为边缘区);B~C:旷场实验中小鼠运动距离、中央区停留时间比较;D~E:圆筒实验中小鼠理毛时间、站立次数比较;与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

图 2 α -synuclein A53T 小鼠焦虑样行为学表现

Note. A, The experimental area of the open field test. B~C, Comparison of distance moved and cumulative duration spent in zone C. D~E, Comparison of grooming and rearing time in the Cylinder test. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

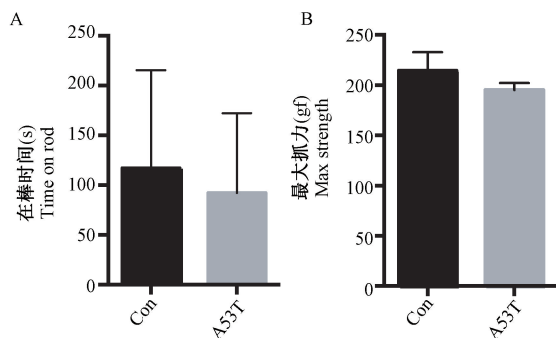
Figure 2 Anxiety behavior in α -synuclein A53T mice

在 α -synuclein A53T 转基因小鼠模型中, 12 月龄 A53T 小鼠可以出现明显的运动学障碍表现^[21], 此外, 朊病毒启动子调控表达的 α -synuclein A53T 小鼠在 6 月龄出现空间记忆障碍, 以及减少的焦虑样行为, 并且空间记忆缺陷随着月龄增长而发展^[12]。但对于 PDGF- β 启动子调控表达的 α -synuclein A53T 小鼠并未有系统的认知、运动及焦虑样行为学评价。

在本实验中, PDGF- β 启动子调控表达的 α -synuclein A53T 小鼠运动距离增加, 呈现过度活跃状态, 同之前的研究相符^[22]; 而焦虑样及运动学评价未显示明显统计学差异, 表明 10 月龄时 α -synuclein A53T 转基因小鼠并未有焦虑症状以及明显运动学症状改变, 在认知行为学评价中, 海马及杏仁核依赖的条件孔恐惧记忆时间缩短, 表明 10 月龄 α -

synuclein A53T 转基因小鼠出现认知记忆障碍, 但是对于水迷宫实验中空间学习记忆能力并未有明显改变, 因此在 PDGF- β 启动子调控表达的 10 月龄 α -synuclein A53T 小鼠模型中, 行为学检测表现为条件恐惧认知功能障碍, 并且其发生早于运动功能障碍, 以及未见明显的焦虑样行为改变。免疫组化实验中, 在黑质、纹状体、梨状皮层、海马观察到 P- α -synuclein 沉积, 前额叶皮层中观察到 LBs, 并且研究表明, 在突触核蛋白相关路易氏体疾病中, 大部分 α -synuclein 沉积在 129 位丝氨酸是磷酸化的, 而在正常人中仅有少部分是磷酸化的^[23]。此外, 在 α -synuclein 染色中黑质纹状体 α -synuclein 有明显改变, TH 染色观察黑质中多巴胺能神经元减少, 符合突触核蛋白相关路易氏体疾病中类似 PD 的病理表现, 并且电镜观察显示, 与对照组相比, 10 月龄 α -synuclein A53T 转基因小鼠线粒体内容物不清, 形态发生改变, 裂变增多^[24], 以上实验结果符合突触核蛋白相关疾病(路易氏体痴呆/帕金森病痴呆)报道^[1-2]。

综上所述, 在本实验研究中, 10 月龄 PDGF- β 启动子调控表达的 α -synuclein A53T 小鼠在行为学表现为认知功能障碍先于运动功能障碍, 在病理学表现为磷酸化突触核蛋白的沉积以及多巴胺能神经元减少, 线粒体裂变增多, 进而提出该小鼠可作为一种突触核蛋白相关认知障碍性疾病如(路易氏体痴呆/帕金森病痴呆)相关的动物模型, 为 α -synuclein 引起的认知障碍性疾病的机制研究与药物开发提供支撑。

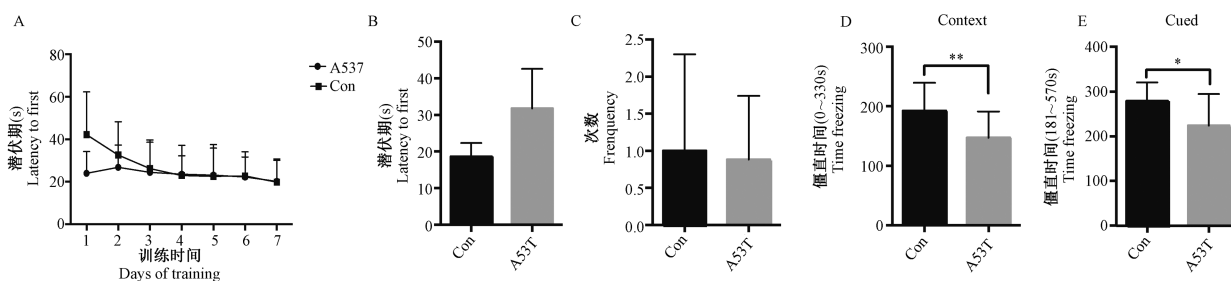


注: A: 小鼠在棒时间比较; B: 小鼠最大抓力比较。

图 3 α -synuclein A53T 小鼠运动行为学表现

Note. A, Comparison of duration in the rotating rod test. B, Comparison of maximum strength.

Figure 3 Motor behavior in α -synuclein A53T mice

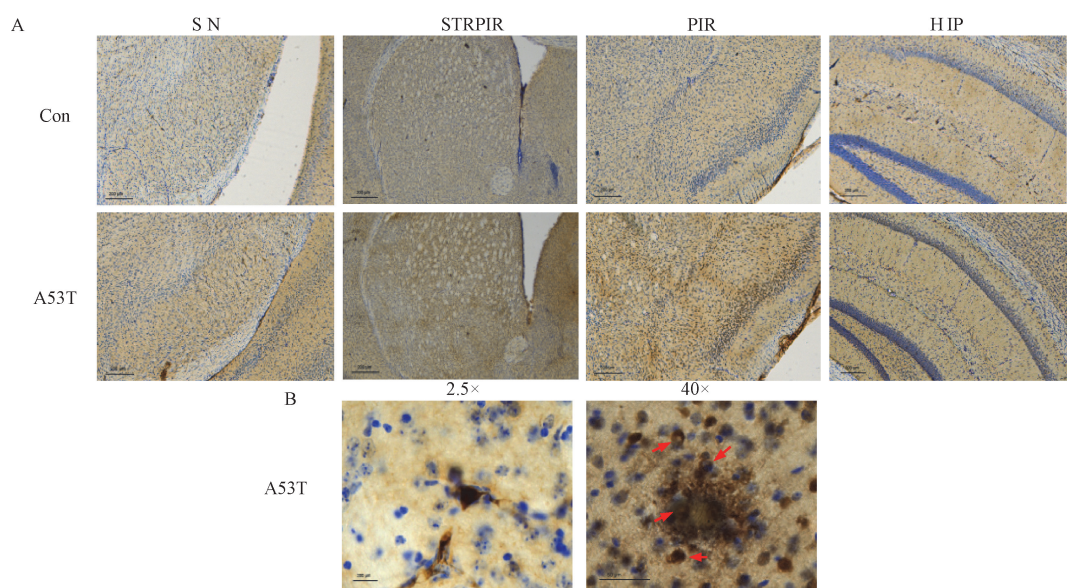


注: A: 隐藏平台实验中小鼠寻找平台所用的潜伏期; B-C: 探索实验中小鼠穿越平台所用潜伏期、次数比较; D-E: 场景依赖、线索依赖条件恐惧实验中小鼠僵直时间比较; 对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 α -synuclein 小鼠认知行为学表现

Note. A, Latency to find the hidden platform during 7 consecutive days of training. B-C, Time and frequency of crossing of the quadrant containing the platform. D-E, Freezing time in the context memory test and cued memory test. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Cognitive behavior in α -synuclein A53T mice



注：A:P-α-synuclein 沉积在小鼠脑黑质(SN)、纹状体(STR)、梨状皮层(PIR)、海马(HIP)部位沉积;B:前额叶路易小体。

图 5 不同脑区 P-α-synuclein 沉积

Note. A, P-α-synuclein accumulation in the substantia nigra (SN), striatum (STR), piriform cortex (PIR), and hippocampus (HIP) of α-synuclein A53T mice. B, Lewy-body (LBs) deposition in the prefrontal cortex.

Figure 5 P-α-synuclein deposition in different brain regions in α-synuclein A53T mice

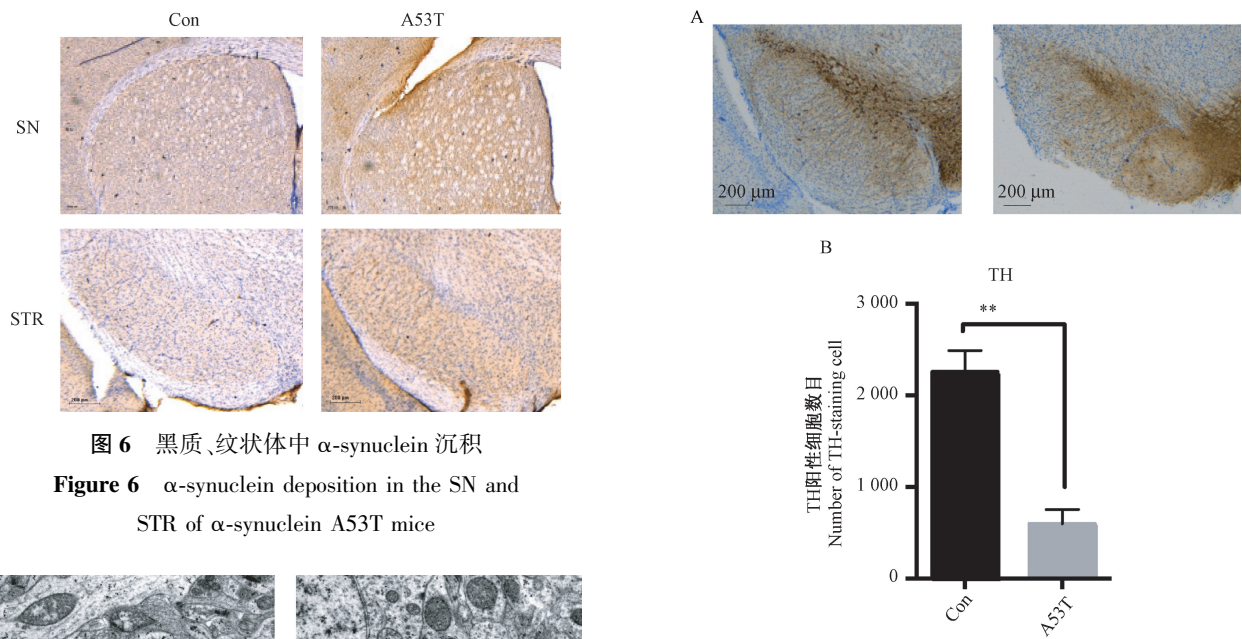


图 6 黑质、纹状体中 α-synuclein 沉积

Figure 6 α-synuclein deposition in the SN and STR of α-synuclein A53T mice

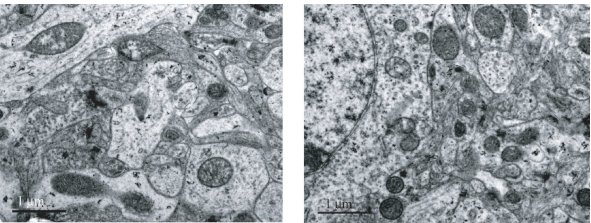


图 8 电镜下小鼠脑线粒体变化

Figure 8 Mitochondrial morphology in the amygdala of α-synuclein A53T mice

注：A:小鼠脑黑质多巴胺能神经元变化;B:显微镜计数 TH 阳性细胞数目 (n≥3)。

图 7 小鼠脑黑质多巴胺能神经元变化

Note. A, Immunohistochemical staining showed TH expression in the SN. B, Quantification of TH-positive cells in the SN.

Figure 7 TH expression in the SN of α-synuclein A53T mice

参考文献:

- [1] Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of α -synuclein in familial and sporadic Lewy body disease [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(40): 29739–29752.
- [2] Barker RA, Williams-Gray CH. Review: The spectrum of clinical features seen with α -synuclein pathology [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2016, 42(1): 6–19.
- [3] Dar KB, Bhat AH, Amin S, et al. Elucidating critical proteinopathic mechanisms and potential drug targets in neurodegeneration [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 40(3): 313–345.
- [4] Abe K. Reader response: Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium [J]. *Neurology*, 2018, 90(6): 298–299.
- [5] Sezgin M, Bilgic B, Tinaz S, et al. Parkinson's disease dementia and lewy body disease [J]. *Semin Neurol*, 2019, 39(2): 274–282.
- [6] Vergouw LJM, van Steenoven I, van de Berg WDJ, et al. An update on the genetics of dementia with Lewy bodies [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2017, 43: 1–8.
- [7] Fuchs J, Nilsson C, Kachergus J, et al. Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication [J]. *Neurology* 2007, 68(12): 916–922.
- [8] Nakamura K, Nemani VM, Azarbal F, et al. Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein α -synuclein [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(23): 20710–20726.
- [9] Guardia-Laguarta C, Area-Gomez E, Rub C, et al. α -Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(1): 249–259.
- [10] Pozo Devoto VM, Falzone TL. Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease: a role for α -synuclein? [J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10(9): 1075–1087.
- [11] Cali T, Ottolini D, Vicario M, et al. SplitGFP technology reveals dose-dependent ER-mitochondria interface modulation by α -Synuclein A53T and A30P Mutants [J]. *Cells*, 2019, 8(9): 1072.
- [12] Paumier KL, Sukoff Rizzo SJ, Berger Z, et al. Behavioral characterization of A53T mice reveals early and late stage deficits related to Parkinson's disease [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70274.
- [13] Rezin GT, Amboni G, Zugno AI, et al. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders [J]. *Neurochem Res* 2009, 34(6): 1021–1029.
- [14] Muller WE, Eckert A, Kurz C, et al. Mitochondrial dysfunction: common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease—therapeutic aspects [J]. *Mol Neurobiol*, 2010, 41(2–3): 159–171.
- [15] 高宁,全雄志,陈炜,等. 帕金森 α -synuclein 转基因模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(5): 28–31.
- [16] Huang, Y, Halliday, G. Can we clinically diagnose dementia with Lewy bodies yet? [J]. *Transl Neurodegener*, 2013, 2(1): 4.
- [17] Lin X, Parisiadou L, Sgobio C, et al. Conditional expression of Parkinson's disease-related mutant α -synuclein in the midbrain dopaminergic neurons causes progressive neurodegeneration and degradation of transcription factor nuclear receptor related 1 [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(27): 9248–9264.
- [18] Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, et al. Subcellular localization of wild-type and parkinson's disease-associated mutant α -Synuclein in human and transgenic mouse brain [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(17): 6365–6373.
- [19] Ip CW, Klaus LC, Karikari AA, et al. AAV1/2-induced overexpression of A53T- α -synuclein in the substantia nigra results in degeneration of the nigrostriatal system with Lewy-like pathology and motor impairment: a new mouse model for Parkinson's disease [J]. *Acta Neuropathol Commun* 2017, 5(1): 11.
- [20] Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in α -synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders [J]. *Science*, 2000, 287(5456): 1265–1269.
- [21] Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, et al. Neuronal α -synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human α -synuclein [J]. *Neuron*, 2002, 34: 521–533.
- [22] Graham DR, Sidhu A. Mice expressing the A53T mutant form of human α -synuclein exhibit hyperactivity and reduced anxiety-like behavior [J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88(8): 1777–1783.
- [23] Wakabayashi K, Umahara T, Hirokawa K, et al. 14–3–3 protein sigma isoform co-localizes with phosphorylated α -synuclein in Lewy bodies and Lewy neurites in patients with Lewy body disease [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 674: 171–175.
- [24] Xie W, Chung KK. α -synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 2012, 122(2): 404–414.

[收稿日期] 2019–10–21