

韦梦晨,范胜涛,吴海婷,等. 核定位人源 α -突触核蛋白转基因小鼠的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 307-316.
WEI M C, FAN S T, WU H T, et al. Establishment of the human α -synuclein nuclear localization signal transgenic mice [J]. Acta
Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 307-316.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.004

核定位人源 α -突触核蛋白转基因小鼠的建立

韦梦晨, 范胜涛, 吴海婷, 张艺薇, 王子鸥, 黄璋琼*

(北京协和医学院 中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

【摘要】 目的 建立一种核定位人源 α -突触核蛋白 (α -synuclein, α -syn) 转基因小鼠, 并探究人源 α -syn 核输入对小鼠行为的影响。**方法** 构建 hSNCA-NLS 和 EGFP 的慢病毒载体, 利用显微注射法建立转基因小鼠模型, 通过 PCR 和 Western Blot 方法鉴定转基因首建鼠及其子代基因型和蛋白表达情况。采用免疫荧光鉴定人源 α -syn 在小鼠脑组织中的共定位情况, 同时采用旷场、转棒、O 迷宫实验评价转基因小鼠的行为改变情况。**结果** hSNCA-NLS 基因成功插入小鼠基因组中, 人源 α -syn 成功表达, 并且有明显的核定位现象。进一步研究发现, 核定位人源 α -syn 转基因小鼠在 2 月龄时开始表现出了运动功能障碍, 发生了星形胶质细胞增生和炎症反应, 于 9 月龄时表现出了明显的焦虑样症状, γ -氨基丁酸 (GABA) 基因表达减少, 这些表现一直持续到小鼠 12 月龄。**结论** 成功构建了核定位人源 α -syn 转基因小鼠, 小鼠表现出明显的运动功能障碍和焦虑样症状。该模型的成功建立可以为研究 α -syn 核定位现象在帕金森病中的作用提供一定的研究基础。

【关键词】 人源 α -突触核蛋白; 小鼠; 核定位; 转基因; 运动功能障碍

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0307-10

Establishment of the human α -synuclein nuclear localization signal transgenic mice

WEI Mengchen, FAN Shengtao, WU Haiting, ZHANG Yiwei, WANG Ziou, HUANG Zhangqiong*

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union
Medical College, Kunming 650118, China)

Corresponding author: HUANG Zhangqiong. E-mail: hzhq2013@163.com

【Abstract】 Objective To establish a human α -synuclein nuclear localization signal transgenic mouse model and investigate the effects of α -synuclein nuclear localization on the behavior of mice. **Methods** Human α -synuclein nuclear localization signal and EGFP lentiviral vectors were constructed. Transgenic mice were created with the microinjection method. Using PCR and Western Blot method to identify the genotypes and protein expression of the transgenic founder mice and their offsprings. The immunofluorescence was used to examine the localization of human α -synuclein in the mouse brain tissue. The behavioral changes of the transgenic mice were evaluated by the open field test, rotarod test, and O maze test. **Results** The hSNCA-NLS gene was successfully inserted into the mouse genome, the human α -syn was successfully expressed, and the human α -syn has localized with the nuclear. Further studies found that human α -synuclein nuclear localization signal transgenic mice had significant motor dysfunction, astrocyte proliferation and inflammatory response at 2 months of age and exhibited significant anxiety-like symptoms and reduced expression of the γ -aminobutyric acid (GABA) gene at 9 months of age, which persisted until 12 months of age. **Conclusions** A human α -synuclein nuclear localization signal transgenic mouse model has been successfully established. The mice exhibit significant motor dysfunction and

【基金项目】 云南省技术创新人才培养对象项目 (202105AD160018, 202005AD160006), 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-043), 国家自然科学基金联合基金项目 (U2202214), 科技创新 2030-重大专项 (2023ZD0406306)。

Funded by Technology Innovation Talents Project of Yunnan Province (202105AD160018, 202005AD160006), CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) (2021-I2M-1-043), Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China (U2202214), Scientific and Technological Innovation 2030 (2023ZD0406306).

【作者简介】 韦梦晨, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 药理学及人类疾病转基因动物模型建立。Email: 1633494575@qq.com

【通信作者】 黄璋琼, 女, 主任技师, 研究方向: 药理学及人类疾病转基因动物模型建立。Email: hzhq2013@163.com

anxiety-like symptoms. The successful establishment of this model provides a foundation for studying the role of α -syn nuclear localization in Parkinson's disease.

[Keywords] human α -synuclein; mouse; nuclear localization; transgenic; motor dysfunction

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是世界上常见的神经系统退行性疾病,60 岁以上老人的发病率约为 1%^[1],PD 的主要临床特征表现为运动功能障碍,如静止性震颤、肌肉僵直和运动迟缓,病理特征表现为中脑黑质致密部和其他神经系统区域神经元的丢失,路易体和路易神经突的存在^[2]。而路易体主要是由 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn) 构成^[3], α -syn 在生理状态下作为单体存在,参与调节突触功能和可塑性,囊泡转运和神经递质释放^[4],但当与其他蛋白质相互作用或在某些特定的应激诱导条件下时, α -syn 可能聚集或发生构象变化^[5]形成纤维体或者多聚体,使 α -syn 成为毒性蛋白。因此,了解清楚 α -syn 的结构和功能及其在帕金森病形成和发展过程中的作用对帕金森病的研究起着至关重要的作用。而以往针对 α -syn 的研究主要集中于其定位在细胞质中的研究^[4-8],而细胞核中 α -syn 的功能研究并不多^[9]。在特定条件下, α -syn 会出现向细胞核聚集的现象^[10],而且也在路易体痴呆患者死后的尸体组织中检测到了很明显的 α -syn 核定位的现象^[11]。有研究表明, α -syn 在细胞核中能够与组蛋白发生相互作用,从而调节自己的构象及聚集特性^[12],通过抑制组蛋白的乙酰化促进神经毒性^[13]。除此之外, α -syn 还能够与细胞核中的双链 DNA 作用,并促进 α -syn 纤维的形成,从而形成 PD 的病理性标志^[14]。编码 α -syn 的基因 SNCA 在发生 G51D 突变时会在哺乳动物细胞和初级神经元中产生明显的核定位现象^[15],也有研究发现 SNCA 基因发生 A53T、A30P 突变时, α -syn 会在细胞核中聚集加剧毒性,同时 α -syn 的核定位还会加速细胞的死亡^[13],这表明 α -syn 的核定位可能与 PD 密切相关。因此,本研究旨在通过构建 hSNCA-NLS 和 EGFP 的慢病毒载体,利用显微注射法建立核定位人源 α -syn 转基因小鼠,并初步探究核定位人源 α -syn 对小鼠的行为影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠,雌性 60 只(供体,超

排),雄性 15 只(供体),7 ~ 8 周龄,体重 20 ~ 23 g; SPF 级 ICR 小鼠,雌性 40 只(受体),雄性 20 只(结扎),7 ~ 8 周龄,体重 21 ~ 25 g;购自中国医学科学院医学生物学研究所小动物部【SCXK(滇)K2022-0002】。小鼠饲养在由中国医学科学院医学生物学研究所小动物部提供的温度 20 ~ 24 ℃,湿度 30% ~ 70% 屏障环境中【SYXK(滇)K2022-0006】,自由进水和进食,采用昼夜 12 h 间断照明。实验经中国医学科学院医学生物学研究所实验动物伦理委员会审核批准(DWSP202209 006),实验过程按实验动物使用的 3R 原则给予动物人道关怀。

1.1.2 主要试剂与仪器

孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)购自宁波三生物技术有限公司;鼠尾基因型快速鉴定试剂盒(货号: D7283 M)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 5 × (货号: P0015 L)购自碧云天生物技术有限公司;RIPA 裂解液(货号: CW2333)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号: CW0014 S)购自康为科技有限公司;人源 α -syn 单克隆抗体 α -synuclein (MJFR1) (货号: ab138501)、DAPI(货号: ab104139)购自英国 Abcam;GFAP 鼠单克隆抗体(货号: G3893)、RNA 提取试剂 TRIzol reagent(货号: T9424)和 TEMED(货号: 17919)购自美国 Sigma;预染蛋白 Marker(货号: MP102-02)购自诺唯赞生物科技股份有限公司;聚丙烯酰胺凝胶(货号: 1610183)购自美国 Bio-Rad;qPCR 试剂盒(货号: PM160A)、GoScript 反转录系统(货号: PRA5000)购自美国 Promega;氯仿(货号: 865-49-6)、过硫酸铵(货号: 7727-54-0)购自国药集团化学试剂有限公司;磁珠(货号: P3031300)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;BSA(货号: 4240GR500)、脱脂奶粉(1172GR500)、Tris-base(货号: 1115GR500)、甘氨酸(1275KG001)购自德国 BioFRoxx;蛋白酶抑制剂(货号: P2714)、M2 培养液、磷酸酶抑制剂(货号: 4906845001)购自德国 Millipore,EDTA 抗原修复液(货号: SL1860)购自北京酷来搏科技有限公司;4%多聚甲醛固定液(货号:

G1101)、1 × PBS、(货号:G4202)、环保型脱蜡透明液(货号:G1128)购自塞维尔生物科技有限公司;即用型麻醉剂(货号:M2910)购自南京爱贝生物科技有限公司;无水乙醇(货号:32061)、异丙醇(货号:67-63-0)购自西陇科学股份有限公司;594 波长免疫荧光兔二抗(货号:A-11001)购自美国 Invitrogen; Western Blot 800 nm 近红外鼠源荧光二抗(货号:926-32210)、Western Blot 800 nm 近红外兔源荧光二抗(926-32211)、Western Blot 700 nm 近红外鼠源荧光二抗(926-68070)和 Western Blot 700 nm 近红外兔源荧光二抗(926-68071)购自美国 Licor。

荧光定量 PCR 仪、电泳槽、转膜仪和 Western Blot 电泳仪购自美国 Bio-Rad; SMART 小动物行为学检测系统购自深圳瑞沃德公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒载体的构建及小鼠超排、显微注射及移植

哺乳动物基因表达慢病毒载体 pLV-hSNCA-NLS 和空载体 pLV-EGFP,使用的是 EF1A 启动子,人 SNCA 的 cDNA 为表达基因,由云舟生物技术有限公司构建及包装,病毒滴度为 1.37×10^9 TU/mL。以 7 ~ 8 周龄 ICR 雌性小鼠为假孕鼠,7 ~ 8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠为供体鼠。超数排卵:第 1 天腹腔注射 10 IU PMSG,48 h 后注射 hCG。将超排卵后的 C57BL/6J 雌性小鼠与 C57BL/6J 雄性小鼠交配,见栓后从输卵管中收集受精卵。注射 hCG 后 24 ~ 25 h 后,将 pLV-hSNCA-NLS 和 pLV-EGFP 注射到原核明显的受精卵中,注射完毕后置于 37 ℃ 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。直至受精卵发育至 2-细胞期,移植到 0.5 dpc 的假孕 ICR 雌性小鼠输卵管中,移植后饲养于屏障环境。

1.2.2 转基因鼠的鉴定

(1)PCR 基因鉴定

获得首建鼠后与野生型小鼠杂交,获得的子代鼠经 PCR、Western Blot 和免疫荧光鉴定为阳性后即为核心定位人源 α -syn 转基因小鼠。鉴定首建鼠和子代鼠的上下游引物序列见表 1。实验前用 75%乙醇冲洗剪刀和镊子,取约 0.5 cm 的鼠尾尾尖置于配制好的 100 μ L 消化液中,将样品置于 55 ℃ 水浴,孵育 15 min。之后将样品置于 95 ℃ 水浴,孵育 5 min 最后向上述样品中加入 100 μ L 的 Stop Solution,涡旋混匀。配制 20 μ L 的 PCR 体系:ddH₂O 8 μ L,引物混合物 1 μ L,模板 1 μ L,PCR Master Mix 10 μ L,

PCR 反应参数设置为 94 ℃ 起始变性 3 min,循环参数为 94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,35 个循环后 72 ℃ 延伸 10 min。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因名称 Gene name	引物 Primer
SNCA	F:5'-TGTGGCTGCTGCTGAGAAAACC-3' R:5'-TTCCTTCTCTGTGGGGCTCCTTC-3'
EGFP	F:5'-CCTCGTGACCACCCTGACCTAC-3' R:5'-GATGTTGCCGTCCTCCTGAAGTC-3'

(2)Western Blot

处死小鼠后取小鼠脑组织于 1.5 mL 的 Ep 管中,将 Ep 管置于冰上,之后加入磁珠和 RIPA 裂解液进行研磨提取组织中的蛋白,待研磨结束后,将样本置于冰上静置 20 min,之后 12 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min,取上清用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量。蛋白浓度统一调整为 3 μ g/ μ L。之后加 5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液煮沸 10 min,待用。配制 SDS-PAGE 胶,上样,80 V 电压跑 30 min 后将电压调至 120 V 继续跑 60 min,之后用半干转仪进行转膜,5% BSA 室温封闭 60 min 后,4 ℃ 抗体过夜孵育, TBST 洗膜每次 10 min,共 3 次,之后用 Western Blot 鼠或兔源荧光二抗室温孵育 60 min, TBST 洗膜每次 10 min,共 3 次,Odyssey 红外激光扫描系统进行显影。

(3)免疫荧光

先用麻醉剂将小鼠深度麻醉,然后用 4%多聚甲醛对小鼠进行灌注,取出脑组织后用 4%多聚甲醛对组织固定 48 h,脱水机脱水处理,包埋处理后切片厚度为 4 μ m。切好的片子 65 ℃ 烘箱烤片,常规脱蜡水化,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,EDTA 抗原修复液微波炉煮沸进行抗原修复 25 min,抗原修复结束后将切片放至室温,山羊血清室温封闭 60 min 后,滴加相应一抗,4 ℃ 过夜孵育,孵育结束后先将切片取出置于室温,放至与环境温度相同,PBS 洗 3 次,每次 5 min,后滴加相应荧光二抗,DAPI 封片后用 Panoramic MIDI 病理切片扫描仪获取图片。

1.2.3 行为学实验

(1)旷场实验

实验开始前 2 d 每天抚摸小鼠 1 ~ 2 min。在正式实验当天,提前 2 h 将小鼠放置在实验区域内,让小鼠适应周围环境。先用 75%乙醇清洁实验箱,然后在软件中设置好相应的参数,记录好动物的编

号、日期、状态等信息等,75%乙醇挥发完后正式开始实验。先将实验动物从饲养笼中轻轻取出,将实验动物迅速放置于实验箱的中央区域,并立即离开,打开动物行为学分析软件,自动记录动物在箱体内的活动,实验时间为 5 min。每只小鼠测试完毕后用 75%乙醇清洁实验箱,待乙醇完全挥发后开始下一只小鼠的测试。

(2)O 迷宫实验

将实验动物由 O 迷宫的开放区域放置于 O 迷宫上,并立即离开,打开动物行为学分析软件,自动记录动物在箱体内的活动,实验时间为 5 min。

(3)转棒实验

在正式实验前 1 h,每只小鼠训练 5 min,使其能够在转棒仪上停留。仪器设置为总转动时长为 5 min,前 2 min 为匀加速运动,初始速度为 5 r/min,加速至 40 r/min,后 3 min 为匀速运动,转速 40 r/min。将小鼠放置在旋转杆上,启动仪器,记录每只小鼠于转棒上停留的时间,小鼠休息 30 min 后再次进行测试,共测 3 次,取 3 次的平均值为小鼠停留在转棒上的时间。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(qPCR)

处死小鼠后取小鼠脑组织于 1.5 mL 的 Ep 管中,将 Ep 管置于冰上,之后加入磁珠和 1 mL TRIzol 进行研磨提取组织中的 RNA,待研磨结束后,置于冰上静置 10 min,之后于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 2 min,取 800 μL 上清至新的离心管中并加入 200 μL 氯仿,剧烈震荡,静置 5 min 后于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min。离心后分为 3 层,用枪头吸取 400 μL 上清至新的 Ep 管中,之后加入 600 μL 异丙醇,上下颠倒混匀,室温静置 10 min 后于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,即可看见 RNA 沉淀。用 1 mL 75%的

乙醇洗涤 RNA 沉淀,之后于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 2 min,重复两次,充分洗涤 RNA 沉淀,最后用移液枪除去乙醇溶液,并将 Ep 管盖打开,干燥 15 min 后,加入 20 μL DEPC 水充分溶解,测定 RNA 浓度,本实验将每个 RNA 样本浓度统一调整为 1000 ng/μL, qPCR 引物信息见表 2。用逆转录试剂盒按照说明书进行逆转录,获取 cDNA。20 μL 逆转录体系为:RNA 5 μL、Mix 4 μL、ddH₂O 11 μL。逆转录程序设置为:退火 25 ℃ 5 min、延伸 42 ℃ 60 min、酶失活 70 ℃ 15 min。然后按照 qPCR 试剂盒说明书进行荧光定量,20 μL 的 qPCR 反应体系为:Mix 10 μL,引物混合物 1 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 8 μL。qPCR 程序设置为 95 ℃ 预变性 30 s, 循环参数为 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 95 ℃ 15 s, 35 个循环后 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s。最后采集荧光信号, 进行统计分析。

1.3 统计学分析

所有行为学图像与数据均采用 SMART V3.0 行为学视频分析系统监控捕获,实验数据的统计采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示,应用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析,实验组和对照组之间的比较采用非配对 *t* 检验,以 *P* < 0.05 表示差异具有显著性,图像采用 Adobe Illustrator 2020 软件处理和排版。

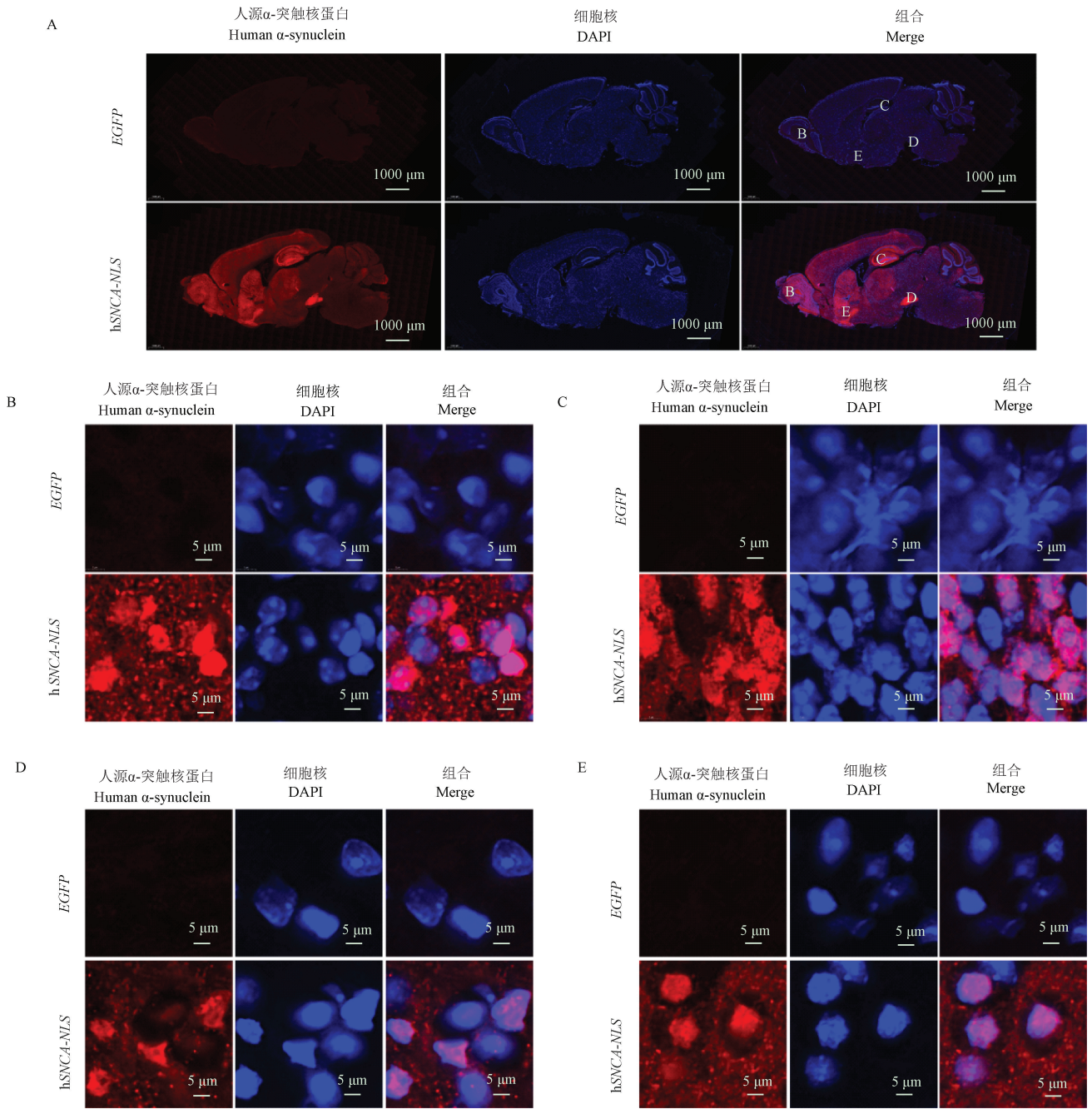
2 结果

2.1 哺乳动物基因表达慢病毒载体构建结果

将设计好的 hSNCA-NLS 质粒和 EGFP 空质粒送云舟生物技术有限公司进行哺乳动物基因表达慢病毒载体 pLV-hSNCA-NLS 和空载体 pLV-EGFP 的构建和包装,构建完成的载体图谱结果见图 1。

表 2 qPCR 引物序列
Table 2 qPCR primer sequences

基因名称 Gene name	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
GAPDH	5'-TTCAACGGGCACAGTCAAGGC-3'	5'-GACTCCACGACATACTCAGCACCC-3'
IL-1α	5'-GTCTGGGAGGAGACGACTCTAA-3'	5'-GTTTCTGGCAACTCCTTCAGC-3'
IL-1β	5'-ATGCCACCTTTTGACAGTGAT-3'	5'-ATGTGCTGCTGCGAGATTTG-3'
IL-6	5'-TAGTCCTTCTACCCCAATTTC-3'	5'-TTGCTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
IFN-γ	5'-GAGGAACTGGCAAAAGGATGCTG-3'	5'-GCTGATGGCCTGATTGTCTTTC-3'
NF-κB	5'-ACAACTATGAGATGAACTCCGGG-3'	5'-GATAGCACTGGGCTGTCTCC-3'
NOS2	5'-GACGAGACGGATAGGCAGAGATTG-3'	5'-AACTCTTCAAGCACCTCCAGGAAC-3'
GABA	5'-TTCAGTGGTTGTAGCAGAAGATGG-3'	5'-TCAAGTGAAGTGAGTCGTCATAAC-3'



注:A:人源 α -syn 在整个脑区的表达,其中 B、C、D、E 分别代表嗅球、海马、中脑、伏隔核,图 B、C、D、E 则为局部放大共定位图;B:人源 α -syn 在嗅球的共定位;C:人源 α -syn 在海马的共定位;D:人源 α -syn 在中脑的共定位;E:人源 α -syn 在伏隔核的共定位。

图 3 人源 α -syn 在各个脑区的定位情况

Note. A. Expression of human α -synuclein in the entire brain region, where B, C, D, E represent the olfactory bulb, hippocampus, midbrain, ventral tegmental area respectively, picture B, C, D, E are partial enlarged co-localization view. B. Co-localization of human α -synuclein in the olfactory bulb. C. Co-localization of human α -synuclein in the hippocampus. D. Co-localization of human α -synuclein in the midbrain. E. Co-localization of human α -synuclein in the ventral tegmental area.

Figure 3 Localization of human α -synuclein in various brain regions

鼠于 2 月龄时便表现出运动能力的显著性差异,表明核定位人源 α -syn 转基因小鼠较早出现了运动功能障碍,并且这种行为的异常一直持续到小鼠 12 月龄。

2.6 核定位人源 α -syn 转基因小鼠出现焦虑样症状

将鉴定为阳性的 15 只子代核定位人源 α -syn 小鼠设置为实验组,15 只 EGFP 小鼠设置为对照

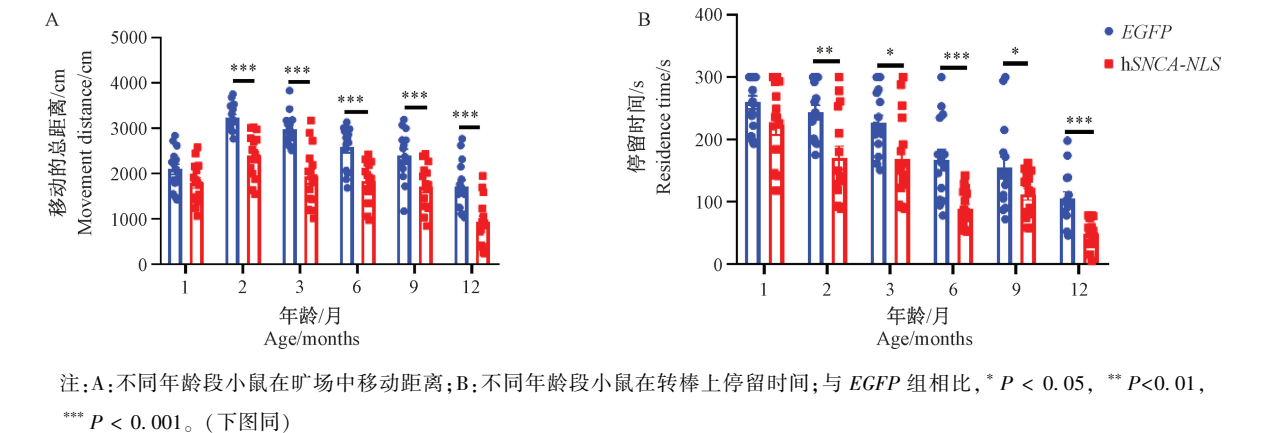
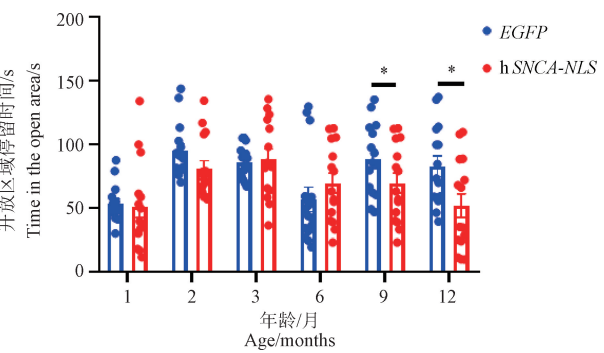


图 4 核定位人源 α -syn 小鼠运动功能出现障碍($n = 15$)

Note. A. Movement distance of mice at different age in the open field. B. Residence time of mice at different age on the rotating rod. Compared with EGFP group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 4 Impaired motor function in nuclear localization of human α -synuclein mice($n = 15$)

组,分别于 1、2、3、6、9、12 月龄时进行 O 迷宫实验,发现小鼠于 9 月龄时表现出焦虑样症状的显著性差异,且一直持续到 12 月龄,如图 5 所示。



注:不同年龄段小鼠在 O 迷宫中开放区域停留时间。

图 5 核定位人源 α -syn 小鼠出现焦虑样症状($n = 15$)

Note. Residence time of mice at different age in the open area of the O maze.

Figure 5 Anxiety-like symptoms in nuclear localization of human α -synuclein mice($n = 15$)

2.7 核定位人源 α -syn 转基因小鼠脑组织中发生了星形胶质细胞增生和炎症反应

取测完行为学的两组小鼠脑组织进行检测,发现核定位人源 α -syn 转基因小鼠于 2 月龄时星形胶质细胞标志物胶质纤维状酸性蛋白(GFAP)表达量开始出现显著性差异,且这种显著性差异一直持续到小鼠 12 月龄,如图 6A 所示。由于在病理条件下,星形胶质细胞会产生炎性细胞因子^[16],因此设计了炎性细胞因子引物进一步验证小鼠脑组织中是否发生了炎症反应,结果发现核定位人源 α -syn 转基因小鼠脑组织中的炎症因子在 2 月龄时开始有

显著性差异,且这种显著性差异也一直持续到小鼠 12 月龄,如图 6B 所示。

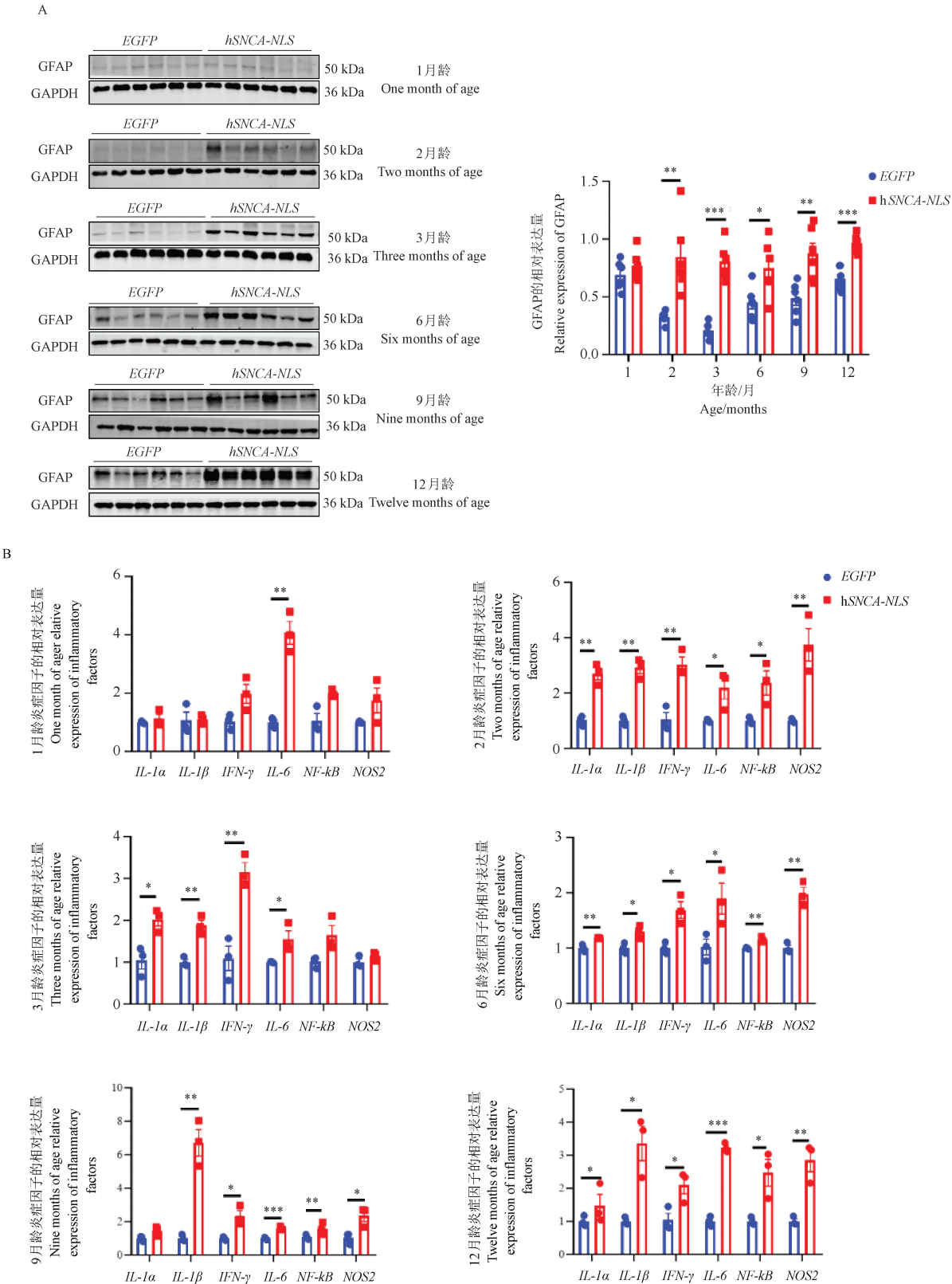
2.8 核定位人源 α -syn 转基因小鼠 GABA 基因表达减少

由于核定位人源 α -syn 转基因小鼠在行为学测试中表现出焦虑样症状,于是设计了小鼠情绪因子 γ -氨基丁酸(GABA)的引物进行检测,发现小鼠体内 GABA 基因的表达式的确在小鼠 9 月龄时表现出显著性差异,且这种显著性差异一直持续到小鼠 12 月龄,如图 7 所示。

3 讨论

近年来 α -syn 在细胞核中核定位现象在越来越多的神经退行性疾病患者的组织中被发现^[11],可是 α -syn 核定位与 PD 等神经退行性疾病有什么关系这个问题尚未有答案,于是研究人员便试图通过设计一种核定位人源 α -syn 转基因小鼠来尝试回答这个问题。首先,通过慢病毒载体将其注射到小鼠的受精卵中,建立了核定位人源 α -syn 转基因小鼠模型,之后通过 PCR、Western Blot 和免疫荧光技术验证了该模型建立成功。这为之后研究 α -syn 核定位在 PD 发生发展过程中的作用和机理奠定了一定的研究基础。

在子代鼠成长到 1 个月时,开始对其进行行为学检测,发现实验组小鼠于 2 月龄时便出现了明显的运动功能障碍,并且持续到 12 月龄,这一结果与之前关于内源性 α -syn 在细胞核中的积累可导致小鼠在 2 月龄时出现运动功能障碍的结果一致^[17],而仅用过表达 α -syn 的转基因小鼠进行行为学检测的

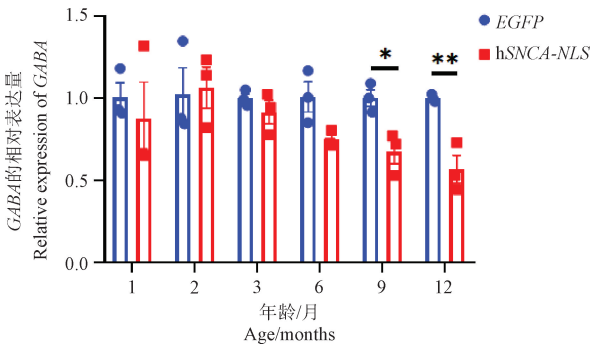


注:A:不同年龄段小鼠脑组织中 GFAP 检测结果($n = 6$);B:不同年龄段小鼠脑组织中炎症因子检测结果($n = 3$)。

图 6 人源 α -syn 核输入激发了星形胶质细胞增生和炎症反应

Note. A. Result of GFAP in brain tissue of mice at different age($n = 6$). B. Result of inflammatory factors in brain tissue of mice at different age($n = 3$).

Figure 6 Nuclear input of human α -synuclein triggers astrocyte proliferation and inflammatory response



注:不同年龄段小鼠脑组织中 GABA 检测结果。

图 7 γ -氨基丁酸 mRNA 的检测($n = 3$)

Note. Result of GABA in brain tissue of mice at different age.

Figure 7 Detection of γ -aminobutyric acid mRNA levels($n = 3$)

实验结果显示:小鼠于 14 个月时才表现出运动功能障碍^[18]。之前建立的 α -syn 相关转基因小鼠出现运动功能障碍时间均有所不同,但是,最早出现运动功能障碍也是在 α -syn 相关转基因小鼠 6 月龄时表现出来的^[19],与这些研究结果相比,在人源 α -syn 后面加入核定位信号之后,核定位人源 α -syn 转基因小鼠在 2 月龄便出现运动功能障碍,这提示 α -syn 核定位会加速小鼠出现运动功能障碍,可以用此模型做有关小鼠运动功能障碍方面的研究。Western Blot 结果表明,与 EGFP 小鼠相比,GFAP 在核定位人源 α -syn 小鼠 2 月龄时表达上调,之前的研究认为,星形胶质细胞及小胶质细胞参与的神经炎症与 PD 的发生发展密切相关^[20-21],于是采用 qPCR 技术检测了验证炎症因子 IL-1 α 、IL-1 β 、INF- γ 、IL-6、NF- κ B 和 NOS2 的表达情况,结果表明,在 GFAP 表达水平上升的同时,这些炎症因子的表达水平也明显增高,这个时间点与小鼠运动功能障碍出现的时间点相吻合,提示核定位的人源 α -syn 诱导的神经炎症可能参与到小鼠的运动功能障碍中,具体的影响机制有待下一步研究。更有趣的是,在 9 月龄时,核定位人源 α -syn 转基因小鼠表现出焦虑样行为,并一直持续到 12 月龄,qPCR 结果表明,与情绪有关的 GABA 基因在 9 月龄时表达水平下降,这提示小鼠的焦虑样行为可能与 GABA 基因表达下调有关,但是需要进一步进行研究确认。

总之,用携带人源 α -syn 核定位信号的慢病毒载体构建了人源 α -syn 核定位的转基因鼠,最终人源 α -syn 在小鼠的各个组织中广泛表达,成功与细胞核共定位,在行为学检测中表现出明显的运动功能障碍和焦虑样症状,从行为学表现等方面很好地模拟了人 PD 的行为学表现,因为其具有出现运动

功能障碍的时间较早的特征,所以该转基因鼠模型可以作为一种研究与 PD 有关的运动功能障碍的新的动物模型。由于 α -syn 可以通过多种途径发挥毒性作用,造成神经细胞凋亡和坏死^[22],而 α -syn 在细胞核中发挥毒性作用究竟哪些分子参与了损伤的形成,这些分子又是通过何种机制发挥的作用,都十分复杂,有待于进一步的研究证实。

参 考 文 献 (References)

[1] SAMII A, NUTT J G, RANSOM B R. Parkinson's disease [J]. Lancet, 2004, 363(9423): 1783-1793.

[2] GOEDERT M, SPILLANTINI M G, DAVIES S W. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases [J]. Curr Opin Neurobiol, 1998, 8(5): 619-632.

[3] SPILLANTINI M G, SCHMIDT M L, LEE V M, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies [J]. Nature, 1997, 388(6645): 839-840.

[4] CABIN D E, SHIMAZU K, MURPHY D, et al. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein [J]. J Neurosci, 2002, 22(20): 8797-8807.

[5] LUK K C, SONG C, O' BRIEN P, et al. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(47): 20051-20056.

[6] LASHUEL H A, OVERK C R, OUESLATI A, et al. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target [J]. Nat Rev Neurosci, 2013, 14(1): 38-48.

[7] XILOURI M, BREKK O R, STEFANIS L. Autophagy and alpha-synuclein: relevance to Parkinson's disease and related synucleinopathies [J]. Mov Disord, 2016, 31(2): 178-192.

[8] TEKIRDAG K, CUERVO A M. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: joint by a chaperone [J]. J Biol Chem, 2018, 293(15): 5414-5424.

[9] JIANG P, GAN M, YEN S H, et al. Proaggregant nuclear factor (s) trigger rapid formation of α -synuclein aggregates in apoptotic neurons [J]. Acta Neuropathol, 2016, 132(1): 77-91.

[10] CHEN V, MONCALVO M, TRINGALI D, et al. The mechanistic role of alpha-synuclein in the nucleus: impaired nuclear function caused by familial Parkinson's disease SNCA mutations [J]. Hum Mol Genet, 2020, 29(18): 3107-3121.

[11] KOSS D J, ERSKINE D, PORTER A, et al. Nuclear alpha-synuclein is present in the human brain and is modified in dementia with Lewy bodies [J]. Acta Neuropathol Commun, 2022, 10(1): 98.

[12] GOERS J, MANNING-BOG A B, MCCORMACK A L, et al. Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones [J]. Biochemistry, 2003, 42(28): 8465-8471.

[13] KONTOPOULOS E, PARVIN J D, FEANY M B. Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity [J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(20):

3012–3023.

[14]

CHERNY D, HOYER W, SUBRAMANIAM V, et al. Double-stranded DNA stimulates the fibrillation of alpha-synuclein *in vitro* and is associated with the mature fibrils; an electron microscopy study [J]. J Mol Biol, 2004, 344(4): 929–938.

[15]

FARES M B, AIT-BOUZIAD N, DIKIY I, et al. The novel Parkinson’s disease linked mutation G51D attenuates *in vitro* aggregation and membrane binding of α -synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells [J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(17): 4491–4509.

[16]

MIYAZAKI I, ASANUMA M. Neuron-astrocyte interactions in Parkinson’s disease [J]. Cells, 2020, 9(12): 2623.

[17]

GEERTSMA H M, SUK T R, RICKE K M, et al. Constitutive nuclear accumulation of endogenous alpha-synuclein in mice causes motor impairment and cortical dysfunction, independent of protein aggregation [J]. Hum Mol Genet, 2022, 31(21): 3613–3628.

[18]

LAM H A, WU N, CELY I, et al. Elevated tonic extracellular dopamine concentration and altered dopamine modulation of synaptic activity precede dopamine loss in the striatum of mice overexpressing human α -synuclein [J]. J Neurosci Res, 2011, 89(7): 1091–1102.

[19]

ROSHANBIN S, ANISZEWSKA A, GUMUCIO A, et al. Age-related increase of alpha-synuclein oligomers is associated with motor disturbances in L61 transgenic mice [J]. Neurobiol Aging, 2021, 101: 207–220.

[20]

BARTELS T, DE SCHEPPER S, HONG S. Microglia modulate neurodegeneration in Alzheimer’s and Parkinson’s diseases [J]. Science, 2020, 370(6512): 66–69.

[21]

BOOTH H D E, HIRST W D, WADE-MARTINS R. The role of astrocyte dysfunction in Parkinson’s disease pathogenesis [J]. Trends Neurosci, 2017, 40(6): 358–370.

[22]

MAVROEIDI P, XILOURI M. Neurons and *Glia* interplay in α -synucleinopathies [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4994.

[收稿日期]

2023-08-21

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》(北大核心)等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!