

α-syn 在不同月龄 A53T 小鼠小肠中表达变化

刘玫秋,陈曦,姜宏

(青岛大学国家生理学重点(培育)学科,山东 青岛 266071)

**[摘要]** 目的 探讨不同月龄 A53T 小鼠小肠组织中 α-突触核蛋白(α-syn)表达变化。方法 取 3 月龄和 6 月龄的野生型(WT)小鼠和 A53T 小鼠的小肠组织,利用蛋白免疫印迹法和免疫荧光实验检测 α-syn 的表达水平。结果 与同月龄 WT 组小鼠相比,3 月龄、6 月龄 A53T 组小鼠小肠组织 α-syn 表达量显著增高,差异均有统计学意义( $F=3.107,2.955,P<0.05$ );6 月龄 A53T 组小鼠小肠组织 α-syn 表达量比 3 月龄 A53T 组小鼠增加 21.71%,两组相比差异具有显著性( $F=2.836,P<0.05$ )。免疫荧光实验显示,与同月龄 WT 组小鼠相比,A53T 组小鼠小肠组织 α-syn 表达量显著增高;6 月龄 A53T 组小鼠小肠组织 α-syn 表达量明显高于 3 月龄 A53T 组。结论 A53T 小鼠小肠组织 α-syn 表达量高于同月龄 WT 小鼠,且其小肠组织 α-syn 表达量随年龄增长而增加。

**[关键词]** 帕金森病;α 突触核蛋白;小鼠,突变型;小肠

**[中图分类号]** R338.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2022)03-0349-04

**doi:**10.11712/jms.2096-5532.2022.58.062

**[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]**



**[网络出版]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1517.R.20220320.1549.001.html>; 2022-03-22 09:06:47

EXPRESSION OF α-SYNUCLEIN IN THE SMALL INTESTINE OF A53T MICE WITH DIFFERENT AGES IN MONTHS LIU Meiqiu, CHEN Xi, JIANG Hong (State Key Discipline: Physiology (in Incubation), Department of Physiology, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the expression of α-synuclein (α-syn) in the small intestine of A53T mice with different ages in months. **Methods** The small intestine tissue samples were collected from wild-type (WT) mice and A53T mice with an age of 3 and 6 months, and Western blotting and immunofluorescence assay were used to measure the expression level of α-syn. **Results** Compared with the WT mice with the same age, the A53T mice had a significant increase in the expression of α-syn in the small intestine ( $F=3.107,2.955;P<0.05$ ), and the expression level of α-syn was increased significantly by 21.70% in the A53T mice aged 6 months compared with those aged 3 months ( $F=2.836,P<0.05$ ). Immunofluorescence assay showed that compared with the WT mice with the same age, the A53T mice had a significant increase in the expression of α-syn in the small intestine, and the A53T mice aged 6 months had a significantly higher expression level of α-syn than those aged 3 months. **Conclusion** A53T mice have a higher expression level of α-syn in the small intestine than WT mice with the same age, and the expression level of α-syn in the small intestine increases with age in A53T mice.

**[KEY WORDS]** Parkinson disease; alpha-synuclein; mice, mutant strains; intestine, small

帕金森病(PD)是一种常见的神经退行性疾病,临床表现主要包括静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势步态障碍等<sup>[1]</sup>。PD 主要病理特征是黑质致密部多巴胺能神经元的进行性丧失以及路易小体的出现。路易小体由异常聚集的 α-突触核蛋白(α-syn)所形成。α-syn 是一种小分子酸性蛋白质,主要表达于突触前末端,在 PD 致病中的关键作用已被广泛证实<sup>[2]</sup>。α-syn 在细胞内聚集,可促进线粒体损伤,破坏溶酶体和高尔基体等,并增加细胞对氧化应

激的易感性,进而促进细胞死亡<sup>[3-6]</sup>。研究结果表明,PD 病人非运动症状出现比运动症状提前 10~20 年,胃肠功能障碍是 PD 最常见的非运动症状,严重影响着病人的生活质量<sup>[7-9]</sup>。根据 BRAAK 等<sup>[10-11]</sup>的学说,α-syn 的聚集可能始于外周(包括肠神经系统),并由外周沿迷走神经向中枢神经系统传播。在 PD 的不同阶段,α-syn 在肠中的表达量可能会不同程度地影响胃肠功能。A53T 小鼠是携带人 A53T 突变型 α-syn 基因的 PD 模型小鼠。在体内,基因突变诱导的 α-syn 的高表达可导致路易小体的形成和黑质多巴胺能神经元的丢失<sup>[12-13]</sup>。纯合子的 A53T 小鼠从 6 月龄开始表现出 PD 的运动症状,并表现出更早和更严重的胃肠运动功能下降。但是,在运动症状出现之前小鼠胃肠

[收稿日期] 2021-01-10; [修订日期] 2021-06-23  
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31701020);山东省自然科学基金资助项目(ZR2019ZD31)  
[第一作者] 刘玫秋(1994-),女,硕士研究生。  
[通信作者] 陈曦(1980-),女,博士,副教授,硕士生导师。E-mail:casey1201@163.com。姜宏(1973-),女,博士,教授,博士生导师。E-mail:hongjiang@qdu.edu.cn。

道中  $\alpha$ -syn 的表达是否已有改变尚不清楚。因此, 本实验观察了  $\alpha$ -syn 在 3 月龄和 6 月龄的 A53T 小鼠小肠中的表达变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物

野生型 (WT) 小鼠购于北京维通利华公司; A53T 小鼠 (B6; C3-Tg (PrnpSNCA \* A53T) 83Vle/J) 购自南京大学模式动物研究所。两种小鼠均按照 SPF 级别标准, 饲养于温度为  $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、湿度为  $(50 \pm 10)\%$ 、12 h 昼夜循环光照的安静环境中, 可自由饮水、进食。选用 3 月龄和 6 月龄 A53T 纯合子转基因小鼠和 WT 小鼠, 每组 4 只。

1.2 实验试剂

$\alpha$ -syn 抗体、Beta tubulin 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司; NFH 抗体购于美国 Santa 公司; 山羊抗兔和山羊抗鼠抗体购于英国 Thermo Fisher Scientific 公司; PVDF 膜、ECL 发光液均购于美国 Millipore 公司; 山羊血清购于中国 Solarbio 公司; DAPI 染液购于中国 Roche 公司; 冷冻切片包埋剂购于日本 TaKaRa 公司; Triton X-100 购于韩国 Biosharp 公司; Tween-20 购于美国 Sigma 公司。

1.3 蛋白免疫印迹法检测小鼠小肠组织中  $\alpha$ -syn 蛋白表达

将小鼠麻醉后, 取其邻近十二指肠的空肠 1 cm。向装有小肠组织的 EP 管内加入 300  $\mu\text{L}$  组织裂解液, 用研磨器充分研磨, 在冰上进行裂解, 静置 30 min 后, 在  $4^\circ\text{C}$  下以 1 200 r/min 离心 20 min, 吸取上清置于新的 EP 管中, 采用 BCA 法检测蛋白浓度。按照每孔 20  $\mu\text{g}$  蛋白计算上样量, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳 (80 V、30 min, 120 V、60 min) 后, 电转到 0.22  $\mu\text{m}$  的 PVDF 膜上, 加 100 g/L 脱脂奶粉于室温摇床孵育 2 h; 加入相应的一抗 ( $\alpha$ -syn 滴度为 1 : 1 000, Beta tubulin 滴度为 1 : 10 000),  $4^\circ\text{C}$  摇床孵育过夜 (时间  $>16$  h), 用 TBST 溶液洗 3 次, 每次 10 min; 分别加入山羊抗兔和山羊抗鼠 (滴度均为 1 : 10 000) 的 HRP-IgG 二抗并室温孵育 1.5 h, 然后使用 TBST 溶液洗 3 次, 每次 10 min。ECL 发光液显影后用 Image J 软件读取条带灰度值, 对  $\alpha$ -syn 表达水平进行分析。

1.4 免疫荧光实验

取小鼠近十二指肠的空肠 1 cm, 放入 40 g/L

多聚甲醛内浸泡 1 周, 之后将小肠分别置于 200 g/L 和 300 g/L 蔗糖溶液中梯度沉糖。将沉糖处理后的小肠于冷冻切片机上切成 15  $\mu\text{m}$  厚的冷冻切片, 并贴到多聚赖氨酸处理过的病理级别载玻片上, 在常温下晾干 (24 h)。用 0.01 mol/L 的 PBS 清洗包埋剂, 然后用体积分数 0.1 的山羊血清封闭 2 h; 加入  $\alpha$ -syn (滴度 1 : 250) 和 NFH (滴度 1 : 500) 一抗  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, 用 0.01 mol/L PBST 溶液洗 3 次, 每次 10 min; 分别加入山羊抗兔 (滴度 1 : 500) 和山羊抗鼠 (滴度 1 : 500) 的二抗并室温孵育 1.5 h, 然后用 0.01 mol/L PBST 溶液洗 3 次, 每次 10 min。封片, 加入体积分数 0.7 的甘油后盖上盖玻片, 晾干后进行荧光观察。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 25.0 统计分析软件进行数据分析。计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 不同月龄 WT 小鼠和 A53T 小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 表达比较采用析因设计的方差分析。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同月龄 WT 和 A53T 小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 表达比较

蛋白免疫印迹法检测结果显示, 与同月龄 WT 组小鼠相比, 3 月龄、6 月龄 A53T 组小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 表达量显著增高, 差异均有统计学意义 ( $F = 3.107, 2.955, P < 0.05$ ); 6 月龄 A53T 组小鼠小肠的  $\alpha$ -syn 表达量比 3 月龄 A53T 组小鼠增加 21.71%, 两组相比差异具有统计学意义 ( $F = 2.836, P < 0.05$ )。说明 A53T 小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 的表达远高于 WT 小鼠, 6 月龄 A53T 小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 的表达高于 3 月龄 A53T 小鼠。见表 1。

表 1 不同月龄 WT 和 A53T 小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 表达的比较 ( $n=4, \bar{x} \pm s$ )

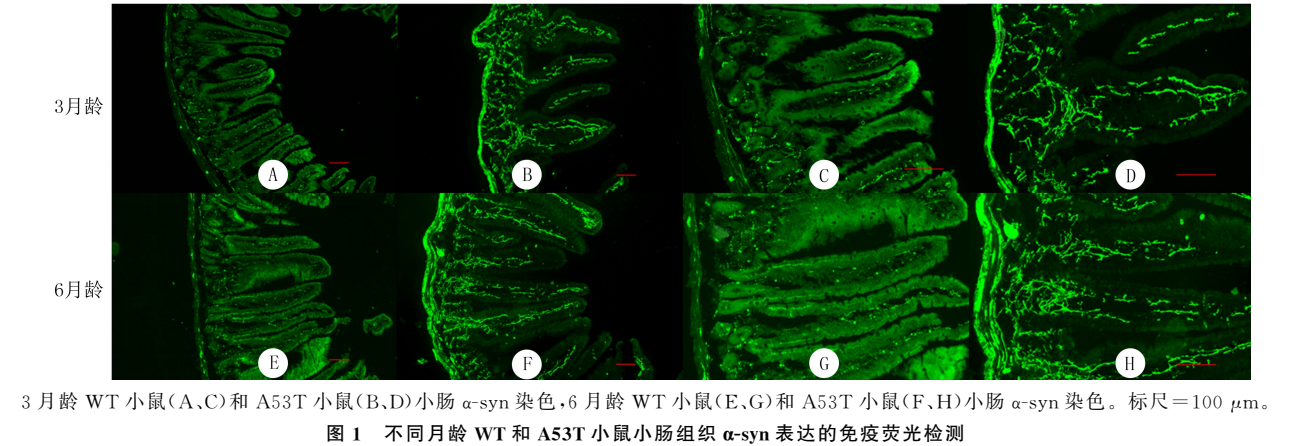
组别	3 月龄	6 月龄
WT 组	$0.46 \pm 0.09$	$0.69 \pm 0.24$
A53T 组	$0.92 \pm 0.10^*$	$1.12 \pm 0.12^{* \#}$

注:  $F_{\text{月龄}} = 29.550, P < 0.01$ ;  $F_{\text{组别}} = 8.859, P < 0.01$ 。与同月龄 WT 组相比,  $* F = 3.107, 2.955, P < 0.05$ ; 与 3 月龄 A53T 组相比,  $^\# F = 2.836, P < 0.05$ 。

2.2 免疫荧光检测不同月龄 WT 和 A53T 小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 表达

免疫荧光实验结果显示, 与同月龄 WT 组小鼠相比, 3 月龄、6 月龄 A53T 组小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 表

达量显著增高;6 月龄 A53T 组小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 表达量明显高于 3 月龄 A53T 组小鼠。见图 1。



3 讨 论

本实验通过蛋白免疫印迹和免疫荧光方法证实,与同月龄的 WT 小鼠相比较,3 月龄和 6 月龄 A53T 小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 表达显著增加,且随年龄的增长,A53T 小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 的表达增加。

PD 是一种多系统受累的神经退行性疾病,其临床症状不仅包括运动症状,还包括便秘、胃排空延迟、唾液分泌过多、吞咽困难、恶心以及嗅觉障碍、抑郁和睡眠障碍等非运动症状<sup>[8]</sup>。其中,胃肠道功能障碍是 PD 发展过程中一种常见非运动症状<sup>[14]</sup>。2003 年,BRAAK 等的学说认为,肠道中的  $\alpha$ -syn 可向中枢神经系统传播,最初传播到舌咽和迷走神经背侧运动核以及嗅球,随后逐渐传播到脑黑质区,最终达到皮质层<sup>[15]</sup>。由于在 PD 病人的疾病早期已经发现了肠道中  $\alpha$ -syn 的异常沉积,故推测肠神经系统可能是  $\alpha$ -syn 的一个起始病理位点。 $\alpha$ -syn 主要位于 Meissner 和 Auerbach's 神经丛的肠神经元中<sup>[16-18]</sup>。最近的研究结果还表明,多种危险因素可能单独或共同导致  $\alpha$ -syn 在肠道表达的增加,例如肠道菌群、肠道炎症和肠神经胶质细胞功能障碍等<sup>[19-21]</sup>。了解肠道中的  $\alpha$ -syn 是如何开始聚集的,将有助于治疗胃肠功能障碍,并可能有助于预防或延缓 PD 的发生和发展。

与 PD 相关的特异性遗传突变首先发现于 1997 年,其中 A53T 点突变属于常染色体显性遗传,该突变引起的 PD 通常具备早发性以及病情进展迅速等特点<sup>[22-23]</sup>。 $\alpha$ -syn 第 53 位的丙氨酸被苏氨酸替代后,能促进可溶性的  $\alpha$ -syn 寡聚体或原纤维的形成,并可以作为种子促进  $\alpha$ -syn 在神经元之间的传播。在转基因小鼠模型中,表达人突变型  $\alpha$ -syn 的 A53T

转基因小鼠应用最为广泛。过度表达人 A53T 突变型  $\alpha$ -syn 的小鼠随年龄增长会表现出严重的运动障碍以及  $\alpha$ -syn 病<sup>[14,24]</sup>。研究发现,在 A53T 小鼠脑皮质神经元和脊髓运动神经元的细胞质中存在包裹体,包裹体中包含人  $\alpha$ -syn 和硝基化的  $\alpha$ -syn,并且运动神经元在 A53T 小鼠中耗竭可达 75%<sup>[13,25]</sup>。有研究通过检测 A53T 纯合子小鼠的食物摄入量、结肠动力以及结肠和回肠环形肌的收缩活动发现,3 月龄纯合子 A53T 小鼠的进食量与非转基因小鼠相比虽然无明显变化,但肠道运输时间比非转基因小鼠延迟 2 h 左右,同时结肠和回肠环形肌运动反应幅度也明显下降;6 月龄纯合子 A53T 小鼠的胃肠道运输功能逐渐降低,肠道运输时间延迟超过 3 h,与此同时,结肠和回肠环形肌运动反应幅度进一步降低<sup>[26-27]</sup>。本实验结果显示,3 月龄 A53T 小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 的表达已经较同月龄 WT 小鼠出现明显增加,6 月龄 A53T 小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 表达亦比 3 月龄 A53T 小鼠增加。这说明小肠组织  $\alpha$ -syn 和 PD 的胃肠功能障碍可能存在联系。A53T 小鼠在 3 月龄出现结肠动力障碍时,并未出现 PD 的运动症状,中枢神经系统中也未出现  $\alpha$ -syn 的病理性聚集,甚至到 6 月龄时,中枢神经系统也未有  $\alpha$ -syn 的病理性聚集<sup>[26]</sup>,但事实上此时肠道中的  $\alpha$ -syn 已经增加。因此,肠内  $\alpha$ -syn 的表达量可能作为 PD 的一项早期诊断指标,本实验结果为此提供了数据支持。

综上所述,在未出现运动症状的 3 月龄 A53T 小鼠小肠中组织有  $\alpha$ -syn 的表达增加,并且随年龄增长,A53T 小鼠小肠组织  $\alpha$ -syn 表达也增加。

[参考文献]

[1] KANSARA S, TRIVEDI A, CHEN S, et al. Early diagnosis

- and therapy of Parkinson's disease; can disease progression be curbed[J]? *Journal of Neural Transmission* (Vienna, Austria; 1996), 2013,120(1):197-210.
- [2] DEHAY B, BOURDENX M, GORRY P, et al. Targeting  $\alpha$ -synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations[J]. *The Lancet Neurology*, 2015,14(8):855-866.
  - [3] STEFANIS L, LARSEN K E, RIDEOUT H J, et al. Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2001,21(24):9549-9560.
  - [4] GOSAVI N, LEE H J, LEE J S, et al. Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002,277(50):48984-48992.
  - [5] HSU L J, SAGARA Y, ARROYO A, et al. Alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress[J]. *The American Journal of Pathology*, 2000,157(2):401-410.
  - [6] OSTREROVA N, PETRUCCELLI L, FARRER M, et al. alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins[J]. *The Journal of Neuroscience*, 1999,19(14):5782-5791.
  - [7] POIRIER A A, AUBÉ B, CÔTÉ M, et al. Gastrointestinal dysfunctions in Parkinson's disease: symptoms and treatments[J]. *Parkinson's Disease*, 2016, 2016:6762528.
  - [8] LEE H M, KOH S B. Many faces of Parkinson's disease; non-motor symptoms of Parkinson's disease[J]. *Journal of Movement Disorders*, 2015,8(2):92-97.
  - [9] STIRPE P, HOFFMAN M, BADIALI D, et al. Constipation; an emerging risk factor for Parkinson's disease[J]? *European Journal of Neurology*, 2016,23(11):1606-1613.
  - [10] BRAAK H, DEL TREDICI K, RÜB U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease[J]. *Neurobiology of Aging*, 2003,24(2):197-211.
  - [11] BRAAK H, GHEBREMEDHIN E, RÜB U, et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology[J]. *Cell and Tissue Research*, 2004,318(1):121-134.
  - [12] KAHLE P J, NEUMANN M, OZMEN L, et al. Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain[J]. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2000,20(17):6365-6373.
  - [13] LU J Q, SUN F Y, MA H, et al. Comparison between  $\alpha$ -synuclein wild-type and A53T mutation in a progressive Parkinson's disease model[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015,464(4):988-993.
  - [14] MARTINEZ-MARTIN P. The importance of non-motor disturbances to quality of life in Parkinson's disease[J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2011,310(1-2):12-16.
  - [15] RIETDIJK C D, PEREZ-PARDO P, GARSSSEN J, et al. Exploring Braak's hypothesis of Parkinson's disease[J]. *Frontiers in Neurology*, 2017,8:37.
  - [16] ZHONG C B, CHEN Q Q, HAIKAL C, et al. Age-dependent alpha-synuclein accumulation and phosphorylation in the enteric nervous system in a transgenic mouse model of Parkinson's disease[J]. *Neuroscience Bulletin*, 2017,33(5):483-492.
  - [17] WANG W W, SONG N, JIA F, et al. Genomic DNA levels of mutant alpha-synuclein correlate with non-motor symptoms in an A53T Parkinson's disease mouse model[J]. *Neurochemistry International*, 2018,114:71-79.
  - [18] WANG L, MAGEN I, YUAN P Q, et al. Mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein display alterations in colonic myenteric ganglia and defecation[J]. *Neurogastroenterology & Motility*, 2012,24(9):e425-e436. doi:10.1111/j.1365-2982.2012.01974.x.
  - [19] SCHEPERJANS F, AHO V, PEREIRA P A B, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype[J]. *Movement Disorders*, 2015,30(3):350-358.
  - [20] DEVOS D, LÉBOUVIER T, LARDEUX B, et al. Colonic inflammation in Parkinson's disease[J]. *Neurobiology of Disease*, 2013,50:42-48.
  - [21] CLAIREMBAULT T, LECLAIR-VISONNEAU L, NEUNLIST M, et al. Enteric glial cells: new players in Parkinson's disease[J]? *Movement Disorders*, 2015,30(4):494-498.
  - [22] HIGUCHI S, ARAI H, MATSUSHITA S, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene and sporadic Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and dementia with lewy bodies[J]. *Experimental Neurology*, 1998,153(1):164-166.
  - [23] LOTANKAR S, PRABHAVALKAR K S, BHATT L K. Biomarkers for Parkinson's disease: recent advancement[J]. *Neuroscience Bulletin*, 2017,33(5):585-597.
  - [24] MARTIN L J. Parkinson's disease-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death[J]. *Journal of Neuroscience*, 2006,26(1):41-50.
  - [25] LUK K C, LEE V M. Modeling Lewy pathology propagation in Parkinson's disease[J]. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2014,20(Suppl 1):S85-S87.
  - [26] ROTA L, PELLEGRINI C, BENVENUTI L, et al. Constipation, deficit in colon contractions and alpha-synuclein inclusions within the colon precede motor abnormalities and neurodegeneration in the central nervous system in a mouse model of alpha-synucleinopathy[J]. *Translational Neurodegeneration*, 2019,8:5.
  - [27] CHAUDHURI K R, HEALY D G, SCHAPIRA A H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management[J]. *The Lancet Neurology*, 2006,5(3):235-245.

(本文编辑 马伟平)