

研究论文

SH-SY5Y 细胞 α -突触核蛋白的过表达可部分抵抗鱼藤酮诱导的氧化应激

刘延英, 赵焕英, 赵春礼, 段春礼, 鲁玲玲, 杨慧*

首都医科大学北京神经科学研究所, 北京市神经再生修复研究重点实验室, 教育部神经变性病重点实验室, 北京 100069

摘要: 帕金森病(Parkinson's disease, PD)的发病机制涉及到遗传和环境因素。环境因素通过线粒体导致氧化应激和 α -突触核蛋白(α -synuclein)聚集, 但其确切的作用机制尚不明确。本文利用过表达 α -突触核蛋白-增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的人多巴胺能神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 为模型, 研究 α -突触核蛋白对鱼藤酮诱导氧化应激的影响, 从而进一步了解 α -突触核蛋白和细胞存活之间的关系。(1)用荧光显微镜观察融合绿色荧光蛋白的 α -突触核蛋白的表达情况;(2)用实时定量 PCR 检测 α -突触核蛋白基因的表达;(3)用免疫细胞化学测定 α -突触核蛋白的分布;(4)用不同浓度的鱼藤酮作用细胞后, 以 MTT 法测细胞的活力、DCF 法检测细胞的氧化应激状态、黄嘌呤氧化酶法检测超氧化物歧化酶的活力, 并用流式细胞仪分析细胞的凋亡。实时定量 PCR 结果显示, α -突触核蛋白基因表达量在 α -突触核蛋白过表达的细胞要高于 SH-SY5Y 细胞, 在荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白和 α -突触核蛋白的表达。鱼藤酮使细胞活力下降、线粒体 complex I 的活性降低, 诱导细胞内氧化应激, 而过表达 α -突触核蛋白的细胞可以部分抵抗鱼藤酮的毒性作用, 表现为细胞抗氧化能力迅速增高($P<0.05$)和鱼藤酮诱导的细胞凋亡数目明显降低。本研究证明 α -突触核蛋白对鱼藤酮产生的氧化应激有部分抵抗作用, 而使过表达 α -突触核蛋白的 SH-SY5Y 细胞对鱼藤酮的毒性作用表现出一定的耐受性。这种耐受性也可能是细胞对外界损害的一种代偿反应, 从而促进细胞的存活。

关键词: α -突触核蛋白; 氧化应激; 鱼藤酮; 帕金森病

中图分类号: R742.5

Overexpression of α -synuclein in SH-SY5Y cells partially protected against oxidative stress induced by rotenone

LIU Yan-Ying, ZHAO Huan-Ying, ZHAO Chun-Li, DUAN Chun-Li, LU Ling-Ling, YANG Hui*

Beijing Institute for Neuroscience, Beijing Center for Neural Regeneration and Repair, Key Laboratory for Neurodegenerative Disease of the Ministry of Education of China, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Both genetic and environmental factors are involved in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD). Epidemiological studies showed that environmental factors shared with the common mechanisms of resulting in α -synuclein aggregation by inhibiting complex I of mitochondria and leading to oxidative stress. To investigate the relationship between α -synuclein and oxidative stress, we used human dopaminergic SH-SY5Y cells transfected with α -synuclein-enhanced green fluorescent protein (EGFP). α -synuclein gene expression was determined by immunocytochemistry and real-time quantitative PCR. Both SH-SY5Y and α -synuclein overexpressed SH-SY5Y (SH-SY5Y/Syn) cells were treated with various concentrations of rotenone for different time. Cell viability and oxidative stress were detected by MTT assay and DCF assay. Superoxide dismutase (SOD) activity was assessed with xanthine peroxidase method. Cell apoptosis was detected with flow cytometry. Results showed that α -synuclein gene was constantly overexpressed in SH-SY5Y/Syn cells. After treatment with rotenone, both cell viability and complex I activity in these cells were reduced in a concentration-dependent manner. Oxidative stress was also found in these cells. Compared with SH-SY5Y cells, SOD activity in SH-SY5Y/Syn cells was increased distinctly

Received 2006-01-27 Accepted 2006-06-02

This work was supported by the National Basic Research Priorities Programme of China (No. 2006CB500706) and the Science and Technology Developmental Program of Beijing Municipal Education Commission (No. KM200610025002) and National Natural Science Foundation of China (No.30670655).

*Corresponding author. Tel: +86-10-83911458; Fax: +86-10-83911458; E-mail: huiyang@ccmu.edu.cn

($P < 0.05$) and α -synuclein significantly attenuated rotenone-induced cell apoptosis. These results suggest that the α -synuclein overexpression in SH-SY5Y cells has a tendency to partially resist oxidative stress induced by rotenone and this response may assist cell survival.

Key words: α -synuclein; oxidative stress; rotenone; Parkinson's disease

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是临床上最常见的神经系统退行性疾病之一。它的主要神经病理学特征为中脑黑质多巴胺(dopamine)能神经元变性、缺失;变性的神经元胞浆内存在纤维性嗜酸性包涵物—Lewy 体。 α -突触核蛋白(α -synuclein)是 Lewy 体的主要组成成分,而 α -突触核蛋白的基因突变 A30P、A53T 和 E46K 与少数早发性家族性 PD 有关。因此, α -突触核蛋白与 PD 的发病机制及病理过程有一定的关系。

α -突触核蛋白是由 140 个氨基酸组成的蛋白质,它广泛分布于中枢和周围神经组织尤其是突触前末梢。尽管对 α -突触核蛋白进行了长期大量的研究,至今它的结构和功能尚未完全明确。据报道它可能参与了突触可塑性、神经元的发育分化、多巴胺的释放和信号传递等过程^[1]。一般认为它具有某些毒性蛋白质的特性, α -突触核蛋白的聚集将导致细胞发生死亡。但也有研究表明 α -突触核蛋白在外界因素作用下的聚集是细胞本身的一种代偿反应,通过 α -突触核蛋白聚集体的形成而抵抗外界毒素对细胞造成的损害,从而挽救细胞免于死亡^[2]。由于 α -突触核蛋白的聚集易受多种环境因素的影响,这些因素往往存在共同的作用机制,即通过抑制线粒体 complex I 的活性而发挥作用^[3,4]。

鱼藤酮是一种 complex I 抑制剂,通常用作杀虫剂。因为鱼藤酮是具有疏水性特征的一种脂溶性化合物,所以它容易通过血脑屏障。它的转运不通过多巴胺转运体(dopamine transporter, DAT)即可进入多巴胺能神经元。虽然鱼藤酮不蓄积于多巴胺能神经元,但可以选择性地诱导多巴胺能神经元死亡。这也证明了多巴胺能神经元对 complex I 抑制剂的损害很敏感。在实验动物模型中,长期慢性系统地吸收鱼藤酮可使大鼠产生类似 PD 的临床症状。病理检查证明有以 α -突触核蛋白和泛素为主要组成成分的 Lewy 体的存在和线粒体的功能异常^[5]。细胞模型也证明鱼藤酮的暴露能够加速和诱导 α -突触核蛋白的聚集和导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生^[6,7]。鱼藤酮诱导 α -突触核蛋白发生聚集的机制尚不明确。这种聚集体的形成是否影响了

鱼藤酮的毒性及 α -突触核蛋白和鱼藤酮的毒性之间存在一种什么样的关系?目前尚未见报道。本实验采用人多巴胺能神经元 SH-SY5Y 细胞转染入 α -突触核蛋白后,用不同浓度的鱼藤酮作用于细胞。在不同作用时间,比较转染和未转染细胞的氧化应激状态和细胞凋亡,以判定 α -突触核蛋白对鱼藤酮诱导的氧化应激作用的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和转染 人多巴胺能神经母瘤细胞株(SH-SY5Y 细胞,首都医科大学提供)培养在含有 DMEM 培养基的 35 mm 的培养皿中。当细胞生长至 70% 融合时,用 Lipofectamine 试剂(Invitrogen)和质粒 α -突触核蛋白-增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP) (本课题组构建)对其进行转染。转染 36 h 后用荧光显微镜(Leica)检测基因 α -synuclein-pEGFP 的表达产物。加入 600 μ g/ml G418 (Sigma)筛选,待用。

1.2 实时定量 PCR 2×10^6 个细胞加入 1 ml TRIzol 裂解细胞提取总 RNA。按照 ProtoScript™ 第一链 cDNA 合成试剂盒(New England Biolabs)的操作步骤,反转录生成 cDNA。实时定量 PCR 所用的荧光染料为 SYBR Green I,它是一种双链 DNA 结合染料,当与双链 DNA 结合后其荧光值大大增强,因此在一个体系内其信号强度代表了双链 DNA 的分子数量。PCR 中所用的引物分别为: β -actin 上游引物: 5'-ACCACCATGTACCCAGGCATT-3', β -actin 下游引物: 5'-CCACACAGAGTACTTGCGCTCA-3'; α -突触核蛋白上游引物: 5'-TGACGGGTGTGACAGCAGTAG-3', α -突触核蛋白下游引物: 5'-CAGTGGCTGCTGCAATGC-3'。PCR 反应液包含: (1) α -突触核蛋白上游引物和下游引物各 0.4 μ l, SYBR Green PCR master mix 10 μ l, cDNA 1 μ l, DEPC-H₂O 8.2 μ l。 (2) β -actin 上游引物和下游引物各 0.4 μ l, 其余同(1)。实时定量 PCR 反应条件: 50℃ 预热 2 min; 95℃ 变性 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环。整个实时定量 PCR 的过程在 7300 实时 PCR 反应系统(Applied

Biosystems)完成。荧光信号用 7300 系统 SDS 软件进行分析。

1.3 细胞免疫化学 未转染 α -突触核蛋白基因的 SH-SY5Y 细胞和 α -突触核蛋白基因过表达的 SH-SY5Y/Syn 细胞分别计数 1.5×10^4 个/ml 接种于 24 孔板中, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。4% 多聚甲醛和 1% 戊二醛 4℃ 固定细胞 1 h。PBS 洗 30 min。2% 山羊血清室温下封闭非特异性抗体 30 min。鼠抗人的 α -突触核蛋白抗体(宣武医院于顺博士惠赠, 1:1 000 溶于 PBS), 4℃ 过夜。次日加入 cy3 标记的羊抗鼠 IgG (1:1 000 溶于 PBS) 室温孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。Hoechst 33342 (Sigma) 复染细胞核, 于倒置荧光显微镜观察、照像。

1.4 MTT 细胞活性检测 4×10^3 个/ml 细胞接种于 96 孔板中, 加入不同浓度的鱼藤酮(0, 25, 50, 100 nmol/L), 5% CO_2 、37℃ 培养 72 h, 加入 5 mg/ml 噻唑蓝(Thiazolyl blue, MTT) 染色液(Sigma) 20 μl /孔, 5% CO_2 、37℃ 继续培养 4 h。弃去上清液, 加 100 μl 二甲基亚砜(DMSO), 振荡 10 min, 酶标仪(BIO-RAD)测定 570 nm 处的吸光值。

1.5 线粒体 complex I 活性和超氧阴离子浓度测定 收集培养的细胞, 按照 Troughton 等^[8]创建的方法进行了部分修改。细胞经 300 g 离心 5 min 后重悬于 0.5 ml MSET 缓冲液中(210 mmol/L 甘露醇、70 mmol/L 蔗糖、0.5 mmol/L EDTA、10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4), 1 500 g 离心 3 min。收集上清, 12 000 g 离心 8 min。再次将沉淀重悬在 0.5 ml MSET 缓冲液中, 12 000 g 离心 10 min, 沉淀物即是线粒体。取 20 μg 蛋白质与含有 0.13 mmol/L NADH 的 complex I 缓冲液混合。用 SmartSpec™ 3000 (BIO-RAD) 检测 340 nm 处吸光度的变化。线粒体超氧阴离子浓度的检测是按照 Turrens 和 Boveris^[9]的方法。将 100 μg 线粒体蛋白置于 0.01 mol/L 的 PB 缓冲液中和 10 μl 的四唑氮蓝(NBT)混合。37℃ 孵育 30 min。加入 200 μl DMSO 检测 570 nm 处吸光度的变化。

1.6 氧自由基的检测——DCF-DA 法 细胞 3×10^4 个/ml 接种于 96 孔板中, 100 nmol/L 鱼藤酮培养 24 h, 加入 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA , 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma) 细胞标记液 1 ml, 37℃ 避光作用 15 min; 弃标记液, DMEM 充分洗涤, 细胞内的荧光强度于 Wallac 1420 workstation (Perkin Elmer) 进行测定。激发波长为 485 nm, 发射波长为 535 nm。

1.7 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的测定 采用 SOD 试剂盒(南京建成生物工程研究所), 通过黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力。细胞经离心收集后加入 200 μl 的 0.9% 生理盐水, 低温超声破碎。确定最佳取样量后将样品与试剂盒中的试剂按次序加入充分混匀, 37℃ 恒温水浴 40 min。室温放置 10 min, 于波长 550 nm 蒸馏水调零后进行比色。记录吸光度的变化, 然后换算成 SOD 值。

1.8 细胞凋亡检测 通过流式细胞术检测外化磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)而检测细胞凋亡。PS 是位于细胞膜内侧的正常组分。Annexin-V 是一种 35~36 kDa 的钙离子依赖的磷脂结合蛋白, 它对 PS 具有较高的亲和力。当细胞凋亡发生时, 由于细胞膜外翻而使 PS 暴露于细胞膜外。外露的 PS 可以与 Fitc 标记的 Annexin-V 紧密结合, 从而应用流式细胞仪检测凋亡细胞。鱼藤酮作用后的细胞经胰蛋白酶消化离心收集后, 用 Annexin-V-Fitc 凋亡检测试剂盒(CN Biosciences, Inc.), 通过流式细胞仪(Becton Dickinson, USA)分析细胞的凋亡情况。抗氧化剂对细胞凋亡的测定则是提前 1 h 用 10 mmol/L 维生素 C (vitamin C, Sigma) 孵育细胞后加入鱼藤酮, 再将细胞收集进行凋亡测定。

1.9 数据分析 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用 SPSS11.5 软件进行统计分析, 组间数据比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 基因表达检测

在转染 α -突触核蛋白的 SH-SY5Y/Syn 细胞, 荧光显微镜下可直接观察到细胞内有明显的分布不均匀的绿色荧光, 且荧光在细胞核周围有增强(图 1A)。免疫细胞化学检测表明在转染的细胞有 α -突触核蛋白的高表达, 均匀分布于细胞浆(图 1B), 在相同的曝光时间下, SH-SY5Y 细胞内则表现为较弱的荧光(图 1C)。实时定量 PCR 检测细胞内基因的表达, 结果显示 SH-SY5Y/Syn 细胞内 α -突触核蛋白基因的表达式明显高于正常 SH-SY5Y 细胞。实验数据代表 3 次独立的实时定量 PCR 结果, 取均值(图 1D)。上述结果证明 α -突触核蛋白在转染的 SH-SY5Y/Syn 细胞中能够稳定持续地表达。

2.2 细胞活性检测

MTT 法检测细胞活性可见鱼藤酮明显抑制细胞的生长。随着鱼藤酮浓度的增加, 转染 α -突触核

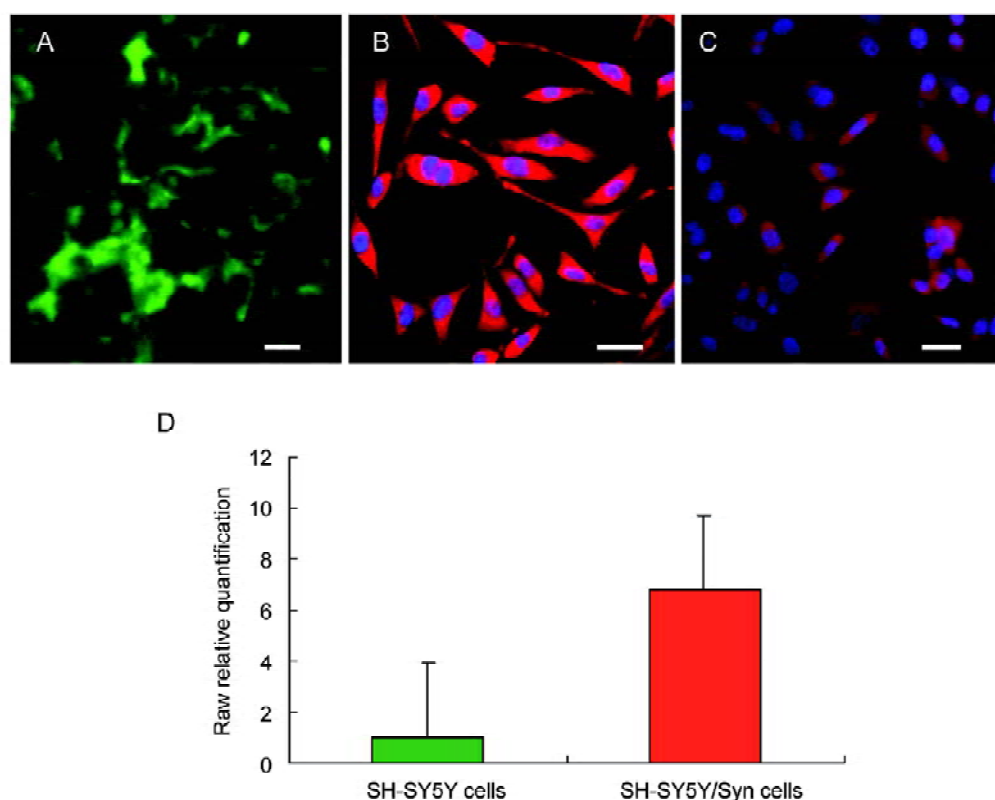


图 1 α -突触核蛋白在 SH-SY5Y 细胞的表达

Fig. 1. α -synuclein expression in SH-SY5Y cells. A: Expression of α -synuclein-GFP in SH-SY5Y/Syn cells was observed under fluorescent microscope. Green fluorescence showed overexpression of α -synuclein-GFP. B: Verification of α -synuclein overexpression was performed with immunocytochemistry. Red fluorescence showed the localization of α -synuclein in SH-SY5Y/Syn cells. C: α -synuclein expression in normal SH-SY5Y cells was determined with immunocytochemistry. Scale bar, 20 μ m. D: Real-time quantitative PCR showed the difference of α -synuclein gene expression between SH-SY5Y and SH-SY5Y/Syn cells. Values are from three independent experiments.

蛋白的细胞和未转染的细胞活力明显降低。用 100 nmol/L 的鱼藤酮作用 72 h 后, 与 SH-SY5Y 细胞相比, SH-SY5Y/Syn 细胞表现出相对较高的细胞活力 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 线粒体 complex I 活性和超氧阴离子浓度测定

Complex I 活性检测显示, 鱼藤酮降低 complex I 的活性。但 SH-SY5Y/Syn 细胞 complex I 的活性明显高于 SH-SY5Y 细胞 ($P < 0.05$) (图 3)。

超氧阴离子浓度的检测结果显示鱼藤酮可导致细胞内超氧阴离子浓度的增加。SH-SY5Y/Syn 细胞和 SH-SY5Y 细胞内超氧阴离子浓度无明显差异 (图 4)。

另外, DCF-DA 检测也显示经过鱼藤酮作用的活细胞内存在氧化应激。虽然 α -突触核蛋白的转染

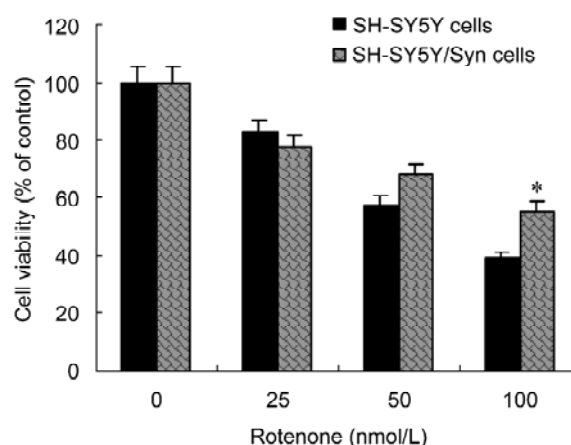


图 2 鱼藤酮降低细胞活力

Fig. 2. Cell viability was reduced by rotenone treatment. Cells were treated with rotenone at various concentrations for 72 h. MTT assay showed that cell viability was significantly decreased by rotenone treatment. * $P < 0.05$ vs SH-SY5Y cells.

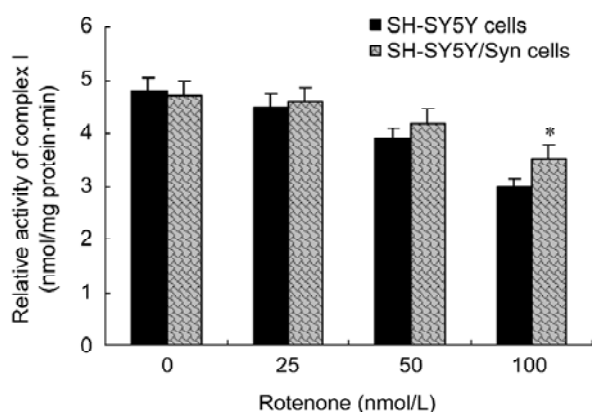


图 3 线粒体 complex I 活性

Fig. 3. Activity of mitochondria complex I. Cells were treated with various concentrations of rotenone for 24 h. Mitochondria were isolated from cells for complex I activity measurement. mean $\pm$ SD. * P <0.05 vs SH-SY5Y cells.

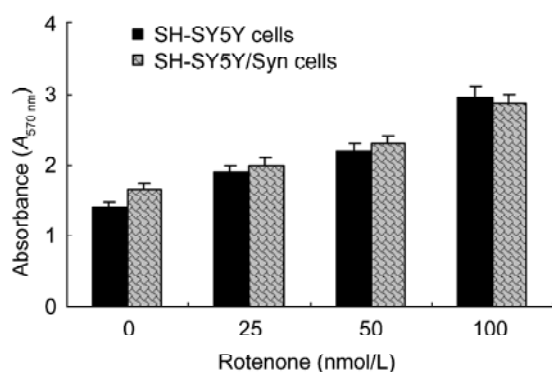


图 4 超氧阴离子含量

Fig. 4. Generation of super oxide anion (O_2^-). Cells treated with various concentrations of rotenone were collected and the O_2^- content in cells was measured. mean $\pm$ SD. $n=3$.

可使细胞内产生氧化应激,但是经过鱼藤酮处理后,SH-SY5Y/Syn 细胞内氧化应激的状态要好于 SH-SY5Y 细胞(P <0.01, P <0.05)(图 5)。

2.4 SOD 活力检测

SOD 检测结果表明 SH-SY5Y/Syn 细胞的 SOD 活力增高。当用不同浓度的鱼藤酮处理细胞后所有细胞内的 SOD 值发生相应变化。随着鱼藤酮浓度的增加, SOD 值也相应降低(图 6)。SH-SY5Y/Syn 细胞内 SOD 活力显著高于 SH-SY5Y 细胞(P <0.01, P <0.05)。

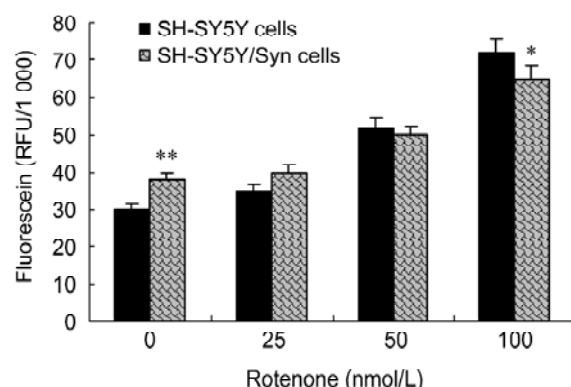


图 5 DCF 测定氧化应激

Fig. 5. Detection of oxidative stress in cells by DCF assay. DCF assay showed that oxidative stress was generated in SH-SY5Y/Syn cells. After treatment with 100 nmol/L rotenone for 24 h, less ROS generation was found in SY5Y/Syn cells than that in SH-SY5Y cells. ** P <0.01, * P <0.05 vs SH-SY5Y cells.

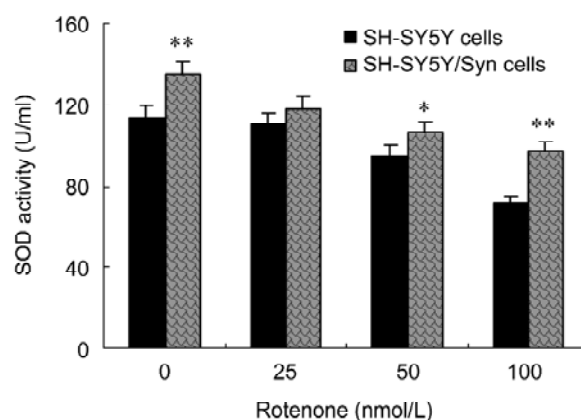


图 6 细胞 SOD 活力测定

Fig. 6. SOD activity analysis in cells. Cells were treated with indicated concentrations of rotenone for 24 h and collected for measurement of the SOD activity. All values are means $\pm$ SEM ($n=3$). ** P <0.01, * P <0.05 vs SH-SY5Y cells.

2.5 细胞凋亡测定

鱼藤酮 100 nmol/L 作用于 SH-SY5Y/Syn 和 SH-SY5Y 细胞, 24 h 后可导致细胞发生凋亡。SH-SY5Y/Syn 细胞凋亡数目小于 SH-SY5Y 细胞(图 7A、B)。提前 1 h 用 10 mmol/L 的维生素 C 孵育细胞后再加入鱼藤酮处理细胞, 可使两种细胞的凋亡数目均降到 3% 左右(图 7C、D)。

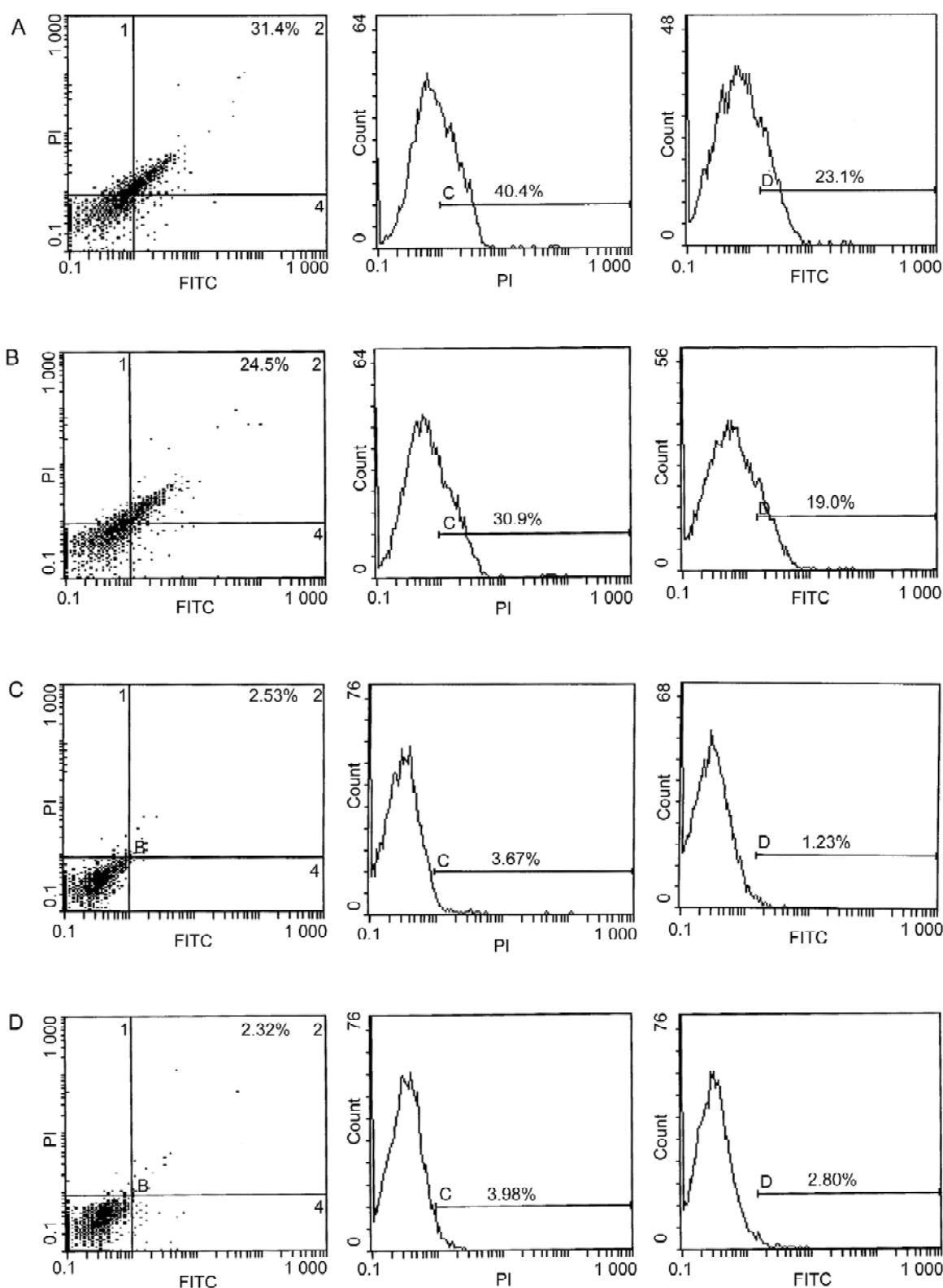


图 7 流式细胞仪分析细胞凋亡

Fig. 7. Cell apoptosis monitored by flow cytometry. Cells were treated with rotenone (100 nmol/L) at 37 °C, 5% CO₂ for 24 h and incubated with Annexin-V-Fitc and PI for 30 min. Cells were then collected for flow cytometry analysis. A: SH-SY5Y cells. B: SH-SY5Y/Syn cells. C: SH-SY5Y cells pretreated with vitamin C for 1 h. D: SH-SY5Y/Syn cells pretreated with vitamin C for 1 h. Numbers on each gate show the percentage of apoptotic cells in that histogram.

3 讨论

α -突触核蛋白是 PD 的特征性病理标志—Lewy 体的主要组成成分之一。以往的研究证明,过度表达 α -突触核蛋白不仅直接参与神经元的退行性病变,而且也能够增加神经元对某些神经毒素的敏感性^[10]。例如, α -突触核蛋白裸鼠对抗由 MPTP 所致的神经元的丢失^[11]。当具有人 α -突触核蛋白基因双倍体突变形式的转基因鼠接触百草枯(paraquat)时更容易引起多巴胺能神经元的丢失和进行性的运动功能障碍^[12]。在某些转基因的细胞模型中也证明 α -突触核蛋白具有毒性蛋白的特性^[4,22]。但是,并非所有的实验均证明 α -突触核蛋白具有毒性作用。有研究报道 α -突触核蛋白在小鼠中过表达可对抗百草枯诱导的神经退行性病变^[13]。Seo 等也发现 α -突触核蛋白的神经保护作用与其浓度有关,低浓度的 α -突触核蛋白促进细胞生存,高浓度的 α -突触核蛋白则促进细胞死亡,证明了 α -突触核蛋白在神经退行性病变中发挥双重作用^[14]。在本实验中,SH-SY5Y 细胞过表达 α -突触核蛋白后表现为对抗鱼藤酮诱导的氧化应激,增强了细胞的抗氧化能力从而部分降低了鱼藤酮对 SH-SY5Y 细胞的毒性。

鱼藤酮是线粒体呼吸链中 complex I 的抑制剂,它能够阻断电子传递过程,降低细胞内 ATP 水平,增加线粒体内 ROS 的产生^[15,16]。在 HL-60 细胞,鱼藤酮诱导核内 DNA 断裂形成 DNA ladder。促进过氧化氢的产生和线粒体膜电位的改变最终影响 caspase-3 的活性^[17]。因为线粒体不仅是生成 ATP 的主要场所,也是超氧阴离子产生的主要部位。生理量的 ROS 是机体维持正常的生理功能所必需。当体内有大量的活性氧存在时,ROS 可以造成细胞膜、蛋白质和酶、甚至是染色体的功能受损从而对机体造成危害。机体内存在完整的抗氧化防御系统,SOD 就是其中一种主要的抗氧化作用的酶。以往的研究证明 α -突触核蛋白的过表达导致细胞内发生氧化应激^[18]。在本实验中,鱼藤酮作用于 SH-SY5Y 细胞表现为细胞活力降低、超氧阴离子浓度升高和 DCF 荧光强度增高,提示有氧化应激的存在。抗氧化功能检测显示,由于 α -突触核蛋白的过表达而使 SH-SY5Y/Syn 细胞内 SOD 活力升高。用不同浓度的鱼藤酮作用细胞 24 h 后,随着鱼藤酮浓度的增加,SOD 活力下降。在 SH-SY5Y/Syn 细胞 SOD 活力明显高于 SH-SY5Y 细胞,证明在 SH-SY5Y/Syn 细胞内抗氧化应激的能力增强。 α -突触核蛋白过表达

的细胞在一定程度上可部分抵抗鱼藤酮诱导的氧化应激从而发挥了对细胞的保护性作用,其机制可能是由于 α -突触核蛋白的转染使细胞产生了一定程度的氧化应激而产生了氧化应激的预适应,当再次受到鱼藤酮诱导的氧化应激作用时,则表现为对氧化应激的耐受性。但是,这种耐受性有一定的限度,超过一定范围则发生失代偿和细胞死亡。

最近的研究证明 ROS 也参与了细胞信号转导通路的调控^[19]。因为 α -突触核蛋白本身具有与脂质结合的特性并与细胞信号转导通路的 14-3-3 蛋白具有一定的同源性,所以在此氧化应激的条件下它可能参与了细胞内某些信号转导通路的调节。Seo 等曾报道低浓度的 α -突触核蛋白通过调节 Bcl-2 激活了 PI3K/Akt 信号通路促进细胞的生存^[14]。过多的 ROS 产生的氧化应激也可能使 α -突触核蛋白本身的结构发生变化,如发生硝基化或与多巴胺等物质结合后改变了原有的某些特征后激活了促进细胞生存的信号转导通路^[20]。细胞凋亡检测也进一步证明过表达 α -突触核蛋白对鱼藤酮诱导的细胞凋亡有抑制作用(图 7)。维生素 C 的预处理可以使细胞的凋亡恢复到接近于未加鱼藤酮的正常状态,进一步证实了氧化应激在细胞的凋亡过程中起关键的作用。当然,也不排除 α -突触核蛋白和鱼藤酮之间存在的相互作用改变了它们本身的某些理化特性而提高了细胞的抗氧化应激的能力,其详细的作用机制有待进一步的探讨。由于我们仅仅观察了 24 h,此种细胞抗氧化能力的增强也可能是细胞本身的一种代偿反应。当此种代偿能力超过一定的限度就会发生失代偿,最终导致细胞死亡。

总之,我们的研究结果证明,过表达 α -突触核蛋白的 SH-SY5Y 细胞通过增加抗氧化系统的能力而抵抗鱼藤酮诱导的氧化应激,进而保护细胞免于死亡。因此, α -突触核蛋白和氧化应激之间存在密切的关系,它们相互作用、相互影响,共同参与细胞的死亡调控过程促进了 PD 的病理进程。

* * *

致谢: 我们感谢于顺博士和陈彪博士为本研究提供抗体和实验技术方面的指导。

参考文献

- 1 Lücking CB, Brice A. Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1894-1908.
- 2 Gosavi N, Lee HJ, Lee JS, Patel S, Lee SJ. Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar α -synuclein aggregates

- and precedes the formation of fibrillar inclusion. *J Biol Chem* 2002; 277 (50): 48984-48992.
- 3 Dawson TM, Dawson VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 819-822.
 - 4 Kalivendi SV, Cunningham S, Kotamraju S, Joseph J. α -synuclein up-regulation and aggregation during MPP⁺-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 15240-15247.
 - 5 Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α -synuclein aggregation. *Exp Neurol* 2003; 179: 9-16.
 - 6 Kweon GR, Marks JD, Krencik R, Leung EH, Schumacker PT, Hyland K, Kang UJ. Distinct mechanisms of neurodegeneration induced by chronic complex I inhibition in dopaminergic and non-dopaminergic cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 51783-51792.
 - 7 Nakamura K, Kitamura Y, Tsuchiya D, Inden M, Taniguchi T. *In vitro* neurodegeneration model: dopaminergic toxin-induced apoptosis in human SH-SY5Y cells. *Int Congr Ser* 2004; 1260: 287-290.
 - 8 Trounce IA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmittochondrial cell lines. *Method Enzymol* 1996; 264: 484-509.
 - 9 Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase in bovine heart mitochondria. *J Biochem* 1980; 191: 421-427.
 - 10 Prasad JE, Kumar B, Andreatta C, Nahreini P, Hanson AJ, Yan XD, Prasad KN. Overexpression of alpha-synuclein decreased viability and enhanced sensitivity to prostaglandin E₂, hydrogen peroxide, and a nitric oxide donor in differentiated neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 2004; 76: 415-422.
 - 11 Dauer W, Kholodilov N, Vila M, Trillat AC, Goodchild R, Larsen KE, Staal R, Tieu K, Schmitz Y, Yuan CA, Rocha M, Jackson-Lewis V, Hersch S, Sulzer D, Przedborski S, Burke R, Hen R. Resistance of α -synuclein null mice to the Parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14524-14529.
 - 12 Thiruchelvam MJ, Powers JM, Cory-Slechta DA, Richfield EK. Risk factors for dopaminergic neuron loss in human alpha-synuclein transgenic mice. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 845-854.
 - 13 Manning-Bog AB, McCormack AL, Purisai MG, Bolin LM, Di Monte DA. α -synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *J Neurosci* 2003; 23: 3095-3099.
 - 14 Seo JH, Rah JC, Choi SH., Shin JK, Min K, Kim HS, Park CH, Kim S, Kim EM, Lee SH, Lee S, Suh SW, Suh YH. α -synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway. *FASEB J* 2002; 16: 1826-1828.
 - 15 Koopman WJ, Verkaart S, Visch HJ, van der Westhuizen FH, Murphy MP, van den Heuvel LW, Smeitink JA, Willems PH. Inhibition of complex I of the electron transport chain causes oxygen radical-mediated mitochondrial outgrowth. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: 1440-1450.
 - 16 Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, Cookson MR, Greenamyre JT. An *in vitro* model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered α -synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci* 2002; 22: 7006-7015.
 - 17 Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi M, Kawanishi S. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. *Life Sci* 2003; 73: 3277-3288.
 - 18 Zhang YX (张宇新), Zhang ZM, Yang H, Cai Q, Lu Q, Chen B, Xu QY. Overexpression of α -synuclein in SH-SY5Y cells *in vitro* leads to oxidative stress. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)* 2005, 21: 1532-1535 (Chinese, English abstract).
 - 19 Fiskum G, Staukov A, Polster BM, Chinopoulos C. Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective intervention in Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci* 2003; 991: 111-119.
 - 20 Hegde ML, Jagannatha Rao KS. Challenges and complexities of α -synuclein toxicity: new postulates in unfolding the mystery associated with Parkinson's disease. *Arch Biochem Biophys* 2003; 418: 169-178.
 - 21 Newhouse K, Hsuan SL, Chang SH, Cai BB, Wang YP, Xia Z. Rotenone-induced apoptosis is mediated by p38 and JNK MAP kinases in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Toxicol Sci* 2004; 79: 137-146.
 - 22 Orth M, Tabrizi SJ, Schapira AHV, Cooper JM. α -synuclein expression in HEK293 cells enhances the mitochondrial sensitivity to rotenone. *Neurosci Lett* 2003; 351: 29-32.