

## · 基础研究 ·

# Mdivi-1 对帕金森病大鼠多巴胺能神经元损伤的保护作用研究

郭欣,朱子建,白雅,张云,刘学东

**[摘要]** **目的** 研究线粒体分裂引发帕金森病(Parkinson's disease, PD)大鼠模型中多巴胺能神经元损伤作用及线粒体分裂抑制剂1(mitochondrial division inhibitor 1, Mdivi-1)对神经元损伤的保护作用机制。**方法** 将大鼠随机分成对照组(生理盐水组)、模型组、美多巴组和 Mdivi-1 组,采用 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)注射大鼠单侧纹状体的方法建立 PD 动物模型,利用阿朴吗啡(apomorphine, APO)引起的大鼠旋转实验和转棒实验来观察行为学变化。利用免疫组化方法评估酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)在中脑黑质中阳性细胞比例以及纹状体中 TH 阳性纤维数量,采用 ELISA 法检测大鼠黑质和纹状体中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、一氧化氮(nitric oxide, NO)及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的含量。**结果** 与对照组相比,PD 模型组大鼠在 APO 诱发第 3 周和 6 周后旋转圈数均显著增加,同时转棒上停留时间均显著缩短;大脑黑质 TH 阳性细胞数和纹状体中 TH 阳性纤维数目显著减少;组织内 SOD、GSH-Px、CAT 的活性显著降低,而 NOS 活性显著升高,MDA 和 NO 含量升高,而 GSH 含量则降低。美多巴及 Mdivi-1 处理 3 周和 6 周后均可显著改善 PD 大鼠的相关行为学症状,并增加黑质 TH 阳性细胞数和纹状体中 TH 阳性纤维数目,同时增加组织内 SOD、GSH-Px、CAT、GSH 含量,降低 NOS 活性,减少 MDA 和 NO 含量。**结论** Mdivi-1 对 6-OHDA 诱导 PD 大鼠的多巴胺能神经元损伤具有保护作用,其机制可能与其抗氧化能力有关。

**[关键词]** 帕金森病;线粒体分裂抑制剂 1;6-羟基多巴胺;黑质;纹状体;抗氧化

**[中图分类号]** R742.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-3097(2019)03-0135-06  
doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2019.03.002

## Protective effect of Mdivi-1 on dopaminergic neuron damage in rats with Parkinson's disease

GUO Xin<sup>1</sup>, ZHU Zijian<sup>2</sup>, BAI Ya<sup>1</sup>, ZHANG Yun<sup>1</sup>, LIU Xuedong<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an Shaanxi 710032, China;

2. Student Brigade, Air Force Medical University, Xi'an Shaanxi 710032, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of mitochondrial division on the dopaminergic neuron injury in a rat model of Parkinson's disease (PD) and the protective effect of mitochondrial division inhibitor 1 (Mdivi-1). **Methods** The rats were randomly divided into control group, model group, Madopar group and Mdivi-1 group. Then the animal model of PD was established by injecting 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into rat unilateral striatum. The expression of mitochondrial dynamics-related regulatory molecules was detected by real-time quantitative PCR, and differentially expressed genes were explored. Apomorphine (APO)-induced rat rotation test and rotating rod experiment to observe behavioral changes. Immunohistochemical method was used to evaluate the proportion of tyrosine hydroxylase (TH) positive cells in the substantia nigra and the number of TH positive fibers in the striatum. The activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and reduced glutathione (GSH) and the contents of catalase (CAT), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), and nitric oxide synthase (NOS) in the substantia nigra and striatum of rats were measured by ELISA. **Results** Compared with control group, the number of rotations of the rats in model group increased significantly after APO induction, and the residence time on the rotating rod was significantly decreased in three and six weeks. At the same time, the number of TH-positive cells in the substantia nigra and the number of TH-positive fibers in the striatum were significantly re-

duced. Further studies found that the activity of SOD, GSH-Px, and CAT in tissues was significantly decreased, while the activity of NOS was significantly increased. The corresponding MDA and NO levels increased, while the GSH content decreased. The behavioral symptoms of PD rats were significantly improved by Mardopa treatment and Mdivi-1 treatment in three and six weeks. Meanwhile, the number of TH cells in the substantia nigra and the number of TH-positive fibers in the striatum were significantly increased in the Mardopa group and the Mdivi-1 group. At the same time, the activity of SOD, GSH-Px, CAT and GSH in tissues was increased, while the activity of NOS was decreased in Mardopa group and Mdivi-1 group. The content of MDA and NO was decreased in Mardopa group and Mdivi-1 group. **Conclusion** Mdivi-1 has a protective effect on 6-OHDA-induced dopaminergic neurons in PD rats and its mechanism may be related to its antioxidant capacity.

[**Key words**] Parkinson's disease (PD); Mitochondrial division inhibitor 1 (Mdivi-1); 6-hydroxydopamine (6-OHDA); Substantia nigra; Striatum; Antioxygenation

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是临床上常见的神经系统性疾病,其主要临床表现为静止性震颤和肌强直等,其病理特征为黑质纹状体中多巴胺能神经元受损,导致多巴胺(dopamine, DA)的含量显著减少,引起相应的病理改变<sup>[1]</sup>。目前普遍认为PD的发病可能与遗传、环境因素以及氧化应激等相关<sup>[2]</sup>,但其具体机制仍远未明确。临床上治疗PD的药物多为左旋多巴胺类,但该类药物治疗只能改善临床症状和延缓病程进展,不能阻止疾病向前发展。而且为达到治疗效果需要不断加大剂量,其产生的不良反应如排尿困难等往往令患者难以忍受。因此,开发有效性高且不良反应小的药物已然成为该领域的研究热点之一。

线粒体是真核细胞内一种重要的细胞器,参与能量产生、氧化应激、细胞凋亡等诸多生命活动。研究发现,线粒体功能异常与PD的发病密切相关,例如线粒体ATP产生异常及氧自由基的含量异常升高都参与PD的发生<sup>[3-4]</sup>。新近研究表明,线粒体处于分裂融合的动态平衡当中,这种平衡对于维持线粒体功能及细胞稳态有重要意义<sup>[5]</sup>。参与线粒体分裂的分子主要为动力相关蛋白1(dynamamin-related protein 1, DRP1)、线粒体分裂蛋白1(mitochondria fission protein 1, FIS1)、线粒体分裂因子(mitochondria fission factor, MFF),参与线粒体融合的主要为线粒体融合蛋白1(mitofusin 1, MFN1)、线粒体融合蛋白2(mitofusin 2, MFN2)和视神经萎缩症蛋白1(optic atrophy 1, OPA1)<sup>[5-6]</sup>。线粒体分裂异常可导致多种疾病的发生<sup>[7-9]</sup>。 $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -syn)的氧化损伤被认为是PD的重要发病机制之一<sup>[10-11]</sup>。有学者研究发现线粒体分裂融合异常可能导致 $\alpha$ -syn的氧化损伤,从而参与PD的发生发展<sup>[12]</sup>。然而,关于线粒体分裂融合异常参与PD进展的具体分子机制尚未研究。本研究从调控线粒体分裂融合的具体分子出发,探究其在PD中的作用及初步机制,并以此为靶点进行干预,为开发

治疗PD的药物进行初步探索。

## 1 材料与方法

1.1 试剂 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)(上海容创生物技术有限公司,货号RKY2061);阿朴吗啡(apomorphine, APO)(美国Sigma公司,货号A4393);美多巴(上海罗氏制药有限公司,批准文号:国药准字H10930198);线粒体分裂抑制剂1(mitochondrial division inhibitor 1, Mdivi-1)(美国Sigma公司,货号M0199);SYBR Green Master Mix试剂盒(日本TAKARA公司,货号RR820A);抗酪氨酸羟化酶抗体(英国Abcam公司,货号ab112);免疫组化试剂盒(北京中杉金桥公司,货号SP-9000-110ml);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(上海信裕生物科技有限公司,货号XY-1560);丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(美国Sigma公司,货号MAK085);还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒(美国Sigma公司,货号CS0260);谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒(美国Sigma公司,货号CGP1);一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒(美国Biovision公司,货号K252-200);一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)检测试剂盒(台湾Abnova公司,货号KA1345)。

1.2 仪器 实时定量PCR仪(美国伯乐公司,型号CFX 384);脑立体定位仪(成都仪器厂,型号ST-5ND-C);Panlab旋转记录仪(美国Harvard Apparatus公司,型号LE902);转棒疲劳仪(北京金洋万达科技有限公司,型号JY-YLS-4C);显微镜(日本奥林巴斯奥林巴斯公司,型号SZ51);酶标仪(美国伯乐公司,型号iMark)。

1.3 实验动物分组和处理 将周龄6~8周、体重220~240g的SPF级大鼠[许可证号:SCXK(陕)2018-001]随机分为对照组(生理盐水组)、模型组、Mdivi-1组和美多巴组,每组6只。Mdivi-1组给予

Mdivi-1 50 mg/(kg·d),美多巴组给予美多巴 50 mg/(kg·d),模型组、对照组给予相同剂量的 0.5%羧甲基纤维素钠水溶液(灌胃给药),给药 6 周,1/d。

1.4 PD 大鼠模型制备方法 将大鼠采用剂量为 3.5 mL/kg 水合氯醛麻醉后,利用脑定位仪固定大脑,消毒后手术切开充分暴露前囟。参照 Paxinos 等方法确定的脑图谱,并按照 Liu 等<sup>[13]</sup>提供的方法对纹状体三点进行注射。每点用微量注射器缓慢注射 6-OHDA(浓度为 4 g/L,母液为含 0.02%抗坏血酸的生理盐水) 1.0 μL,结束后针头继续放置 5 min。待针头缓慢拔出后缝合切口并预防感染。对照组采用上述方法注射相同剂量的生理盐水。术后第 5 周,采用 APO(0.5 mg/kg)皮下注射的方法诱发大鼠旋转并记录从开始到 30 min 内旋转的圈数。将向损伤侧旋转的圈数与向健侧旋转的圈数差值大于 80 r/h 的视为造模成功。

1.5 PD 大鼠行为学观察 在注射 APO 第 3 周和第 6 周后,分别观察和记录 30 min 内大鼠向健侧旋转的圈数。同时,采用旋转棒实验观察大鼠术后第 3 和第 6 周的行为学变化。将大鼠置于旋转棒上,旋转棒启动后立即计时。大鼠为稳定在旋转棒上需不断转动,随着旋转棒加速,大鼠最终从旋转棒上掉下,结束计时。

1.6 ELISA 法检测氧化应激相关指标 大鼠安乐死后,取出脑组织,将纹状体和中脑黑质区域剥离并称量,放于生理盐水中,制成终浓度为 10%的匀浆液。在 3 000 r/min 条件下离心后小心吸取上清液为待测样品。采用商品化的试剂盒,按照操作步骤分别检测 SOD、过氧化氢酶(catalase, CAT)、GSH-Px、NOS 活性和 MDA、GSH、NO 含量。

1.7 实时定量 PCR 检测线粒体分裂融合相关分子 取出各组脑组织的纹状体和中脑后,按照组织 RNA 提取试剂盒说明书步骤提取 RNA,反转录成 cDNA。采用实时定量 PCR 法检测 DRP1、FIS1、MFF、MFN1、MFN2 和 OPA1 的 mRNA 表达水平。以 GAPDH 为内参,每个样品设 3 个复孔。所用引物分别如下:DRP1, F: 5'-CGTAGTGGGAACGCAGAG-3' 和 R: 5'-ACAGG CACCTTGCTCATT-3'; FIS1, F: 5'-AAAGGGAGCAAGC AGGAA-3' 和 R: 5'-GGAGAACAGGGAAAGGACA3'; MFF, F: 5'-ACATGCGCATTGGAGCAGTA-3 和 R: 5'-GCCCCACTCACCAAATGAGA-3'; MFN1, F: 5'-GTTT TTCCCTGGGCTGGTCT-3' 和 R: 5'-CTCCTTGGCATG GGTGGTC-3'; MFN2, F: 5'-GGGACCGCATCTTCTTTG-3' 和 R: 5'-GTCTTGCCGCTCTTCACG-3'; OPA1, F: 5'-TC ATGGATCCGAAAGTGACA-3' 和 R: 5'-ATCCTTCTGC AGCACCAACT-3'。

1.8 免疫组化检测大鼠脑组织酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)表达 将大鼠处死后取出脑

组织后制成冰冻切片。放入 0.3% Triton X-100 溶液中处理 30 min。在 3%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中封闭 15 min,在山羊血清中封闭 20 min,加入 TH 一抗(1:200 稀释)溶液 4 ℃孵育过夜。山羊抗鼠二抗孵育 20 min,辣根酶标记的链霉卵白素孵育 30 min。DAB 显色后,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明后封片。根据 TH 染色强度,分析并统计黑质区 TH 阳性细胞数和纹状体区 TH 阳性纤维密度。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析;以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PD 大鼠模型制备成功 与对照组相比,模型组在术后第 5 周给予 APO 诱导后旋转圈数显著增多(*P*<0.05),对照组则无明显旋转。同时转棒实验显示模型组在转棒上的停留时间显著短于对照组(*P*<0.05),表明 PD 大鼠模型制备成功,表 1、表 2。

表 1 APO 诱导大鼠旋转圈数改变( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	造模后第 5 周	给药后第 3 周	给药后第 6 周
对照组	0.6±0.2	1.6±0.5	0.7±0.1
模型组	78.2±7.5	121.3±9.4	131.2±13.4

表 2 APO 诱导大鼠转棒停留时间改变( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	造模后第 5 周	给药后第 3 周	给药后第 6 周
对照组	58.4±7.4	73.3±9.6	85.4±8.2
模型组	38.2±8.7	61.2±9.1	53.4±9.7

2.2 PD 大鼠线粒体分裂融合相关分子表达 进一步实时定量 PCR 结果显示,模型组大鼠脑组织中线粒体分裂关键调控因子 DRP1 的 mRNA 表达水平显著高于对照组(*P*<0.001),而其他线粒体分裂相关分子 FIS1 及 MFF,融合相关分子 MFN1、MFN2 及 OPA1 的表达未见明显变化(图 1)。

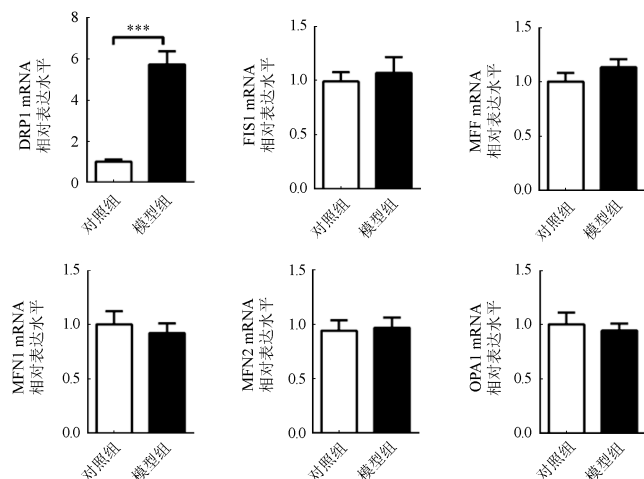


图 1 实时定量 PCR 检测 APO 诱导大鼠线粒体分裂融合相关分子表达

2.3 DRP1 抑制剂 Mdivi-1 对 PD 大鼠行为学影响与模型组比较, 经过 Mdivi-1 处理后第 3 周及 6 周, 大鼠的旋转圈均数显著减少 ( $P < 0.05$ ), 同时, 经美多巴处理后第 3 周及 6 周大鼠的旋转圈数均较模型组显著减少, 但略高于 Mdivi-1 组 ( $P < 0.05$ , 表 3)。旋转棒实验结果显示 Mdivi-1 组及美多巴组在给药后第 3 周及 6 周停留在旋转棒上的时间均长于模型组 ( $P < 0.05$ , 表 4)。

表 3 Mdivi-1 对 APO 诱导大鼠旋转圈数改变 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	造模后第 5 周	给药后第 3 周	给药后第 6 周
对照组	0.5 ± 0.3	1.2 ± 0.6	0.8 ± 0.2
模型组	80.2 ± 8.2 *	114.3 ± 8.0 *	124.0 ± 11.7 *
Mdivi-1 组	70.2 ± 8.7 *	50.9 ± 8.3 #	35.1 ± 7.9 #
美多巴组	64.8 ± 8.9 *	74.1 ± 10.0	61.2 ± 14.1 #

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

表 4 Mdivi-1 对 APO 诱导大鼠转棒停留时间改变 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	造模后第 5 周	给药后第 3 周	给药后第 6 周
对照组	63.4 ± 8.1	68.7 ± 8.9	79.6 ± 9.0
模型组	41.0 ± 8.2 *	52.9 ± 8.5 *	50.8 ± 10.5 *
Mdivi-1 组	74.4 ± 8.5 *	62.6 ± 14.6	67.1 ± 11.9 #
美多巴组	64.8 ± 8.9 *	60.6 ± 9.9	65.3 ± 8.3

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

2.4 DRP1 抑制剂 Mdivi-1 对 PD 大鼠脑组织内 TH 表达影响 与对照组相比, 模型组的大鼠脑组织左右两侧黑质的 TH 阳性细胞数都显著减少 ( $P < 0.05$ ), 同时左右两侧纹状体中 TH 阳性纤维密度与对照组比较也都显著降低 ( $P < 0.05$ )。采用 Mdivi-1 及美多巴处理后第 3 周和 6 周, 该组大鼠左右两侧黑

质 TH 阳性细胞数均较模型组增多 ( $P < 0.05$ ), 左右两侧纹状体中 TH 阳性纤维密度均高于模型组 ( $P < 0.05$ )。表 5、表 6。

表 5 Mdivi-1 对大鼠黑质 TH 表达影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	左侧	右侧
对照组	213.7 ± 17.4	250.7 ± 17.2
模型组	110.7 ± 20.8 *	151.7 ± 15.7 *
Mdivi-1 组	158.0 ± 16.3 #	221.5 ± 16.6 #
美多巴组	155.8 ± 26.3 #	233.2 ± 24.2 #

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

表 6 Mdivi-1 对大鼠纹状体 TH 表达影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	左侧	右侧
对照组	3931 ± 348	4895 ± 23
模型组	1281 ± 136 *	3755 ± 182 *
Mdivi-1 组	2854 ± 152 #	4279 ± 152 #
美多巴组	2809 ± 142 #	4266 ± 207 #

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

2.5 DRP1 抑制剂 Mdivi-1 对 PD 大鼠 SOD, GSH-Px, CAT, NOS 活性和 MDA, GSH, NO 含量的影响 模型组中损伤侧的黑质和纹状体中 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性显著低于对照组; 同时 NOS 的表达以及 MDA、GSH、NO 含量显著上升 ( $P < 0.05$ )。Mdivi-1 组和美多巴组在处理 3 周后, 大鼠损伤侧的黑质和纹状体中 SOD、GSH-Px、GSH 和 CAT 活性均显著高于模型组 ( $P < 0.05$ ), 而 NOS 的表达均显著下降, 同时 MDA、NO 含量均较模型组显著下降 ( $P < 0.05$ )。表 7、表 8。

表 7 Mdivi-1 对大鼠黑质中 SOD、GSH-Px、CAT、NOS 活性和 MDA、GSH、NO 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	SOD (U/mL)	MDA (μmol/g)	GSH-Px (U)	GSH (mg/g)	CAT (U/mg)	NOS (U/mg)	NO (μmol/g)
对照组	51.9 ± 11.6	3.4 ± 1.1	405.5 ± 25.1	9.5 ± 2.7	32.9 ± 7.6	0.7 ± 0.2	2.1 ± 0.2
模型组	28.7 ± 10.2 *	9.6 ± 2.1 *	132.4 ± 19.6 *	5.2 ± 1.1 *	8.8 ± 1.7 *	2.5 ± 0.8 *	5.8 ± 1.1 *
Mdivi-1 组	40.1 ± 12.1 #	5.4 ± 1.0 #	325.0 ± 26.0 #	6.8 ± 1.0 #	18.6 ± 4.8 #	1.8 ± 0.3 #	2.1 ± 0.4 #
美多巴组	39.1 ± 9.5 #	5.3 ± 0.6 #	304.4 ± 22.1 #	7.1 ± 0.7 #	19.6 ± 7.7 #	1.5 ± 0.2 #	1.9 ± 0.2 #

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

表 8 Mdivi-1 对大鼠纹状体中 SOD、GSH-Px、CAT、NOS 活性和 MDA、GSH、NO 含量影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	SOD (U/mL)	MDA (μmol/g)	GSH-Px (U)	GSH (mg/g)	CAT (U/mg)	NOS (U/mg)	NO (μmol/g)
对照组	46.3 ± 10.1	4.3 ± 0.9	456.3 ± 29.8	10.1 ± 1.2	36.0 ± 10.1	13.3 ± 0.3	1.2 ± 0.4
模型组	26.8 ± 7.4 *	12.2 ± 0.8 *	153.2 ± 21.7 *	5.3 ± 1.1 *	14.6 ± 4.9 *	2.3 ± 0.4 *	5.9 ± 1.0 *
Mdivi-1 组	38.3 ± 9.2 #	8.4 ± 1.1 #	359.8 ± 62.2 #	7.4 ± 0.7 #	22.9 ± 8.9 #	1.9 ± 0.4 #	2.3 ± 0.6 #
美多巴组	37.0 ± 10.8 #	7.0 ± 0.8 #	317.3 ± 22.2 #	8.8 ± 1.2 #	24.0 ± 6.1 #	1.6 ± 0.3 #	2.4 ± 0.3 #

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

### 3 讨论

目前研究认为氧化应激在 PD 发病过程中起着非常重要作用<sup>[14]</sup>,而线粒体是产生氧自由基的主要细胞器,因此线粒体异常与 PD 发病的相关性研究已成为该领域的热点<sup>[15-16]</sup>。线粒体分裂融合是调控线粒体结构与功能的重要方式。因此,干预线粒体分裂融合有望成为治疗 PD 的重要手段。但到目前为止,关于线粒体分裂融合异常与 PD 的发生进展尚未进行系统研究。此前,Bido 等<sup>[17]</sup>利用病毒,使大鼠人类 A53T- $\alpha$ -突触核蛋白(human A53T- $\alpha$ -synuclein, hA53T- $\alpha$ -syn)过表达并注射 Mdivi-1,结果显示,Mdivi-1 可阻止 DA 的减少以及 hA53T- $\alpha$ -syn 所引起的神经毒性作用,而且 Mdivi-1 有抑制  $\alpha$ -syn 氧化应激的作用。而本研究利用 6-OHDA 注射单侧纹状体方法建立 PD 大鼠模型。对 PD 大鼠模型的行为学进行观察,并通过 DA 受体激动剂 APO 诱发的旋转实验和转棒实验作为判断 PD 大鼠模型是否构建成功的标准<sup>[18]</sup>。本研究发现,PD 大鼠模型组在 APO 诱导后出现明显的旋转,且该组大鼠在转棒上停留时间显著缩短。同时通过免疫组化实验发现,PD 大鼠黑质中 TH 阳性细胞比例显著下降,在纹状体中 TH 阳性表达纤维的数量显著减少,与 PD 的病理特征相符。这表明我们利用 6-OHDA 注射单侧纹状体的方法成功构建 PD 大鼠模型,在此模型基础上可进行下一步研究。

在 PD 大鼠模型组,利用实时定量 PCR 检测线粒体分裂融合相关分子的表达变化。线粒体分裂关键调控分子 DRP1 在 PD 大鼠脑组织中的表达显著高于正常对照组。本研究初步提示线粒体分裂关键调控分子异常增多可能在 PD 发生进展中扮演重要角色。本研究以 DRP1 为切入点,探究干预 DRP1 后能否改善 PD 大鼠多巴胺能神经元受损状况。

Mdivi-1 是一种小分子化合物,是 DRP1 的有效抑制剂。本研究根据上述结果,采用 Mdivi-1 抑制 DRP1 后,观察其对 6-OHDA 诱导的 PD 大鼠模型的干预效果,并将实验结果与已知 PD 治疗药物美多巴进行对比,初步探讨其可能的机制。本研究发现,Mdivi-1 组与美多巴组的实验结果相似,都可显著改善 PD 大鼠的行为学特征。例如 PD 大鼠模型组在 Mdivi-1 处理后,可显著减轻 APO 诱发的旋转圈数,同时大大延长 PD 大鼠在旋转棒上停留的时间。此外,经过 Mdivi-1 干预后,PD 大鼠脑组织黑质中 TH 阳性细胞数目和纹状体中 TH 阳性染色纤维密度较未干预 PD 组显著增加。本研究表明 Mdivi-1 可对 6-OHDA 注射法诱导的 PD 大鼠多巴胺神经元有着重要的保护作用。

线粒体是氧化应激的重要场所<sup>[19]</sup>,氧化应激已是公认的 PD 重要病因之一<sup>[20]</sup>。本研究从氧化应激角度初步探索 Mdivi-1 显著改善 PD 大鼠受损的多巴胺能神经元的机制。在 6-OHDA 引发的 PD 大鼠黑质及纹状体中,抗氧化酶系统活性如 SOD、GSH-Px、CAT 显著降低,同时抗氧化物质 GSH 含量降低,导致氧自由基如 MDA 和 NO 含量升高,且增强 NOS 的表达水平,表明机体抗氧化系统异常,机体处于氧化应激状态。而对 Mdivi-1 处理后的 PD 大鼠黑质和纹状体中的抗氧化酶系统活性以及相关物质含量检测后发现,SOD、GSH-Px、CAT 和 GSH 活力显著提高,MDA 和 NO 含量明显降低,与美多巴实验结果相近,同时 NOS 的表达降低,与美多巴组实验结果相近。本研究表明 Mdivi-1 可显著提高 6-OHDA 诱发的 PD 大鼠抗氧化能力。

综上,DRP1 抑制剂 Mdivi-1 可显著修复 PD 大鼠受损的多巴胺能神经元,改善 PD 症状,且提高机体的抗氧化能力。这表明 Mdivi-1 具有保护 6-OHDA 诱发的 PD 大鼠神经元功能,且这种功能可能与增强其抗氧化能力有关。进一步研究 Mdivi-1 修复多巴胺能神经元和对抗氧化应激的机制,对探索治疗 PD 的新方法具有重要意义。

### 【参考文献】

- [1] Smeyne M, Smeyne RJ. Glutathione metabolism and Parkinson's disease[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 62:13-25.
- [2] Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease[J]. J Parkinsons Dis, 2013, 3(4):461-491.
- [3] Jin H, Kanthasamy A, Ghosh A, et al. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: pre-clinical and clinical outcomes[J]. Biochim Biophys Acta 2014; 1842:1282-1294.
- [4] Ferretta A, Gaballo A, Tanzarella P, et al. Effect of resveratrol on mitochondrial function: implications in parkin-associated familial Parkinson's disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(7):902-915.
- [5] Nasrallah CM, Horvath TL. Mitochondrial dynamics in the central regulation of metabolism[J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10(11):650-658.
- [6] Hoppins S. The regulation of mitochondrial dynamics[J]. Curr Opin Cell Biol, 2014, 29:46-52.
- [7] Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(10):634-646.
- [8] Pareyson D, Saveri P, Sagnelli A, et al. Mitochondrial dynamics and inherited peripheral nerve diseases[J]. Neurosci Lett, 2015, 596:66-77.

# 转录因子 ZBTB18 对结直肠癌细胞转移的影响

田力, 刘波, 彭朝胜, 夏菁, 吕贯廷

**[摘要]** 目的 观察转录因子 ZBTB18 对结直肠癌细胞的生长的影响。方法 从 NCBI GEO 数据库中下载肿瘤基因表达芯片数据, 对 ZBTB18 基因的表达水平进行分析; 同时通过 RNA 干扰和 Transwell 实验研究 ZBTB18 对结直肠癌细胞迁移的影响。结果 ZBTB18 蛋白表达于结直肠癌细胞系, 且高转移能力的细胞系中该蛋白的表达水平远高于原发性结直肠癌肿瘤细胞系 ( $P < 0.05$ )。RNA 干扰试验可特异性地显著沉默结直肠癌细胞 HT29 中 ZBTB18 的表达, Transwell 实验发现在 ZBTB18 沉默后 HT29 细胞的侵袭和迁移能力显著降低 ( $P < 0.05$ )。结论 转录因子 ZBTB18 可以促进结直肠癌细胞的侵袭与迁移, 可能参与结直肠癌的转移。

**[关键词]** 结直肠癌; ZBTB18; 转移

**[中图分类号]** R735.34

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 2095-3097(2019)03-0140-04

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2019.03.003

## Effects of transcription factor ZBTB18 on colorectal cancer cell metastasis

TIAN Li<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>2</sup>, PENG Chaosheng<sup>1</sup>, XIA Jing<sup>1</sup>, LV Guanting<sup>3</sup>

(1. Department of Special Medicine, the Sixth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China;

2. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. Department of Blood

Transfusion, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an Shaanxi 710038, China)

**[Abstract] Objective** To study the effect of ZBTB18 on the colorectal cancer cell growth.

**Methods** The expression profiling data of colorectal cancer was downloaded from the public database NCBI GEO and the expression of ZBTB18 was analyzed specifically. We detected ZBTB18 expression levels by quantitative PCR in multiple colorectal cancer cell lines, reduced its expression level by RNAi and observed the cell invasion and migration by Transwell experiment. **Results** The expression level of ZBTB18 in metastatic tumor cells was higher than that in non-metastatic tumor cells ( $P < 0.05$ ). After reducing the expression of ZBTB18 in HT29 cells by RNAi, we found the down expression of ZBTB18 could significantly inhibit the cell invasion and migration in vitro ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Transcription factor ZBTB18 could promote the invasion and migration of colorectal cancer cells, suggesting that ZBTB18 may promote colorectal cancer metastasis.

**[Key words]** Colorectal cancer; ZBTB18; Metastasis

结直肠癌是目前世界上常见的恶性消化道肿瘤之一, 每年大约有 50 万患者死于结直肠癌<sup>[1-2]</sup>。在我国常见恶性肿瘤中, 结直肠癌死亡率在男性中居第五位, 女性中居第六位<sup>[3]</sup>。随着我国居民饮食和生活习惯的改变, 近二十年来结直肠癌的发病率在逐渐升高<sup>[4]</sup>。肝转移是结直肠癌主要的死亡原因之一<sup>[2]</sup>, 约 20% 的结直肠癌患者在确诊的同时发现有肝转移, 40% 的结直肠癌患者在确诊后一段时间后出现肝转移, 如不及时治疗, 结直肠癌肝转移患者生存 5~10 个月的比例为 50%, 2 年生存率仅为 3%<sup>[5]</sup>, 由此可见肿瘤转移是控制结直肠癌的关键。

ZBTB18 ( 又被称为 ZNF238、RP58、TAZ-1 和 C2H2-171) 是一种含有 C2H2 型锌指结构的蛋白, 可抑制脑细胞内相关的基因表达, 参与神经系统的

发育, 该基因的突变会导致神经系统发育异常<sup>[6-8]</sup>。有研究发现, ZBTB18 在脑瘤中的高表达可显著抑制肿瘤的生长, 具有肿瘤抑制因子的作用<sup>[9-10]</sup>。

然而 ZBTB18 在结直肠癌中的作用尚不明确。为了研究 ZBTB18 是否在结直肠癌中发挥肿瘤抑制的功能, 我们从 NCBI GEO 数据库中下载肿瘤基因表达谱数据, 对 ZBTB18 在结直肠癌中的表达水平进行分析, 并在具有不同转移水平的结直肠癌细胞系中的表达进行检测, 同时结合 Transwell 实验来分析 ZBTB18 在结直肠癌中的作用。

## 1 资料与方法

**1.1 资料** 从 NCBI GEO (Gene Expression Omnibus) 公共数据库中下载人基因表达谱数据 GSE1035129<sup>[11]</sup>。该数据集包括了 65 个乳腺癌组织及 10 个对照组织、57 个结直肠癌组织及 12 个对照组织、60 个非小细胞肺癌组织及 9 个对照组织和 60 个前列腺癌组织及 7 个对照组织, 以上样本使用 Affymetrix HT-U133plus-2-PM 芯片 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) 进行检测。我们从 GSE1035129 数据中, 收集

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81101490)

**[作者单位]** 100048 北京, 中国人民解放军总医院第六医学中心特需医疗部 (田力, 彭朝胜, 夏菁); 100101 北京, 中国科学院北京基因组研究所 (刘波); 710038 陕西西安, 空军军医大学唐都医院输血科 (吕贯廷)

**[通讯作者]** 吕贯廷, E-mail: guantlv@126.com

- [7] Depienne C, Nava C, Keren B, et al. Genetic and phenotypic dissection of 1q43q44 microdeletion syndrome and neurodevelopmental phenotypes associated with mutations in ZBTB18 and HNRNPU [J]. *Hum Genet*, 2017, 136 (4): 463-479.
- [8] Cohen JS, Srivastava S, Farwell Hagman KD, et al. Further evidence that de novo missense and truncating variants in ZBTB18 cause intellectual disability with variable features [J]. *Clin Genet*, 2017, 91 (5): 697-707.
- [9] Fedele V, Dai F, Masilamani AP, et al. Epigenetic regulation of ZBTB18 promotes glioblastoma progression [J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15 (8): 998-1011.
- [10] Tataru VM, Xiang C, Biegel JA, et al. ZNF238 is expressed in postmitotic brain cells and inhibits brain tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2010, 70 (3): 1236-1246.
- [11] Brouwer-Visser J, Cheng WY, Bauer-Mehren A, et al. Regulatory T-cell genes drive altered immune microenvironment in adult solid cancers and allow for immune contextual patient subtyping [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2018, 27 (1): 103-112.
- [12] Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis; an imbalance of positive and negative regulation [J]. *Cancer Res*, 1991, 51 (18 Suppl): 5054s-5059s.
- [13] Sobel ME. Metastasis suppressor genes [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82 (4): 267-276.
- [14] Mannava S, Grachtchouk V, Wheeler LJ, et al. Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells [J]. *Cell cycle*, 7 (15): 2392-2400.
- [15] Hartman DJ, Davison JM, Foxwell TJ, et al. Mutant allele-specific imbalance modulates prognostic impact of KRAS mutations in colorectal adenocarcinoma and is associated with worse overall survival [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131 (8): 1810-1817.
- [16] Dizdar L, Werner TA, Drusenheimer JC, et al. BRAF (V600E) mutation: a promising target in colorectal neuroendocrine carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144 (6): 1379-1390.
- [17] Delfino FJ, Stevenson H, Smithgall TE. A growth-suppressive function for the c-fes protein-tyrosine kinase in colorectal cancer [J]. *T J Biol Chem*, 2006, 281 (13): 8829-8835.
- [18] Webb MW, Sun J, Sheard MA, et al. Colony stimulating factor 1 receptor blockade improves the efficacy of chemotherapy against human neuroblastoma in the absence of T lymphocytes [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143 (6): 1483-1493.
- [19] Maroni P, Matteucci E, Bendinelli P, et al. Functions and epigenetic regulation of wwox in bone metastasis from breast carcinoma; comparison with primary tumors [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (1): E75.
- [20] Kumar A, Hatwal D, Batra N, et al. Role of nm23H1 in predicting metastases in prostatic carcinoma [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2018, 61 (1): 70-75.
- [21] Shen SM, Ji Y, Zhang C, et al. Nuclear PTEN safeguards pre-mRNA splicing to link Golgi apparatus for its tumor suppressive role [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 2392.
- [22] Aaberg-Jessen C, Sorensen MD, Matos A, et al. Co-expression of TIMP-1 and its cell surface binding partner CD63 in glioblastomas [J]. *BMC cancer*, 2018, 18 (1): 270.
- [23] Okado H. Regulation of brain development and brain function by the transcriptional repressor RP58 [J]. *Brain Res*, 2018, 1705: 15-23.

(收稿日期: 2019-01-06 本文编辑: 冯博)

(上接第 139 页)

- [9] Williams M, Caino MC. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes and cancer [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 211.
- [10] Roberts RF, Wade-Martins R, Alegre-Abarrategui J. Direct visualization of alpha-synuclein oligomers reveals previously undetected pathology in Parkinson's disease brain [J]. *Brain*, 2015, 138 (Pt 6): 1642-1657.
- [11] Zhou M, Xu S, Mi J, et al. Nuclear translocation of alpha-synuclein increases susceptibility of MES23.5 cells to oxidative stress [J]. *Brain Res*, 2013, 1500: 19-27.
- [12] Xie W, Chung KK. Alpha-synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 2012, 122 (2): 404-414.
- [13] Liu DZ, Zhu J, Jin DZ, et al. Behavioral recovery following sub-chronic paeoniflorin administration in the striatal 6-OHDA lesion rodent model of Parkinson's disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 112 (2): 327-332.
- [14] Gaki GS, Papavassiliou AG. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Neuromolecular Med*, 2014, 16 (2): 217-230.
- [15] Luo Y, Hoffer A, Hoffer B, et al. Mitochondria: a therapeutic target for parkinson's disease? [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (9): 20704-20730.
- [16] Yadav A, Agarwal S, Tiwari SK, et al. Mitochondria: prospective targets for neuroprotection in Parkinson's disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20 (35): 5558-5573.
- [17] Bido S, Soria FN, Fan RZ, et al. Mitochondrial division inhibitor-1 is neuroprotective in the A53T- $\alpha$ -synuclein rat model of Parkinson's disease [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 7495.
- [18] Mandel RJ. Effect of acute L-Dopa pretreatment on apomorphine-induced rotational behavior in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*, 2000, 161 (1): 212-219.
- [19] Lyakhovich A, Graifer D. Mitochondria-mediated oxidative stress: old target for new drugs [J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22 (26): 3040-3053.
- [20] Bhat AH, Dar KB, Anees S, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 74: 101-110.

(收稿日期: 2018-10-18 本文编辑: 冯博)