

帕金森病模型大鼠脑内 CDNF 表达变化

张彤宇¹, 薛莹¹, 周鹏飞¹, 潘士锋^{1,2}, 邢华^{1,2*}

(1. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009; 2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州 225009)

摘要: 为了探讨帕金森病(PD)发病过程中大脑多巴胺能神经营养因子(CDNF)表达的变化, 以大鼠为模型, 研究了帕金森病 CDNF 及相关基因的表达变化, 从而为基因治疗帕金森病提供理论依据。实验采用单侧黑质内单点注射 6-羟多巴胺的方法制备帕金森病大鼠模型; 运用免疫组织化学、Western blot 及 Q-PCR 方法检测 CDNF 和多巴胺合成限速酶—酪氨酸羟化酶(TH)在模型大鼠黑质中表达的变化。研究结果发现, PD 模型大鼠黑质区 CDNF 和 TH 阳性细胞数明显减少; 进一步研究表明, 与正常大鼠相比, 模型大鼠 CDNF mRNA 表达水平虽未见显著改变 ($P>0.05$), 但 CDNF 及 TH 蛋白表达极显著降低 ($P<0.01$)。提示帕金森病的发病可能与黑质中 CDNF 和 TH 表达量降低, 进而抑制多巴胺合成有关。

关键词: 大鼠; 帕金森病; 大脑多巴胺能神经营养因子; 表达

中图分类号: R339.34; S865.12

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)01-0050-05

Expression of CDNF in the brain of the parkinson's disease rat

ZHANG Tongyu¹, XUE Ying¹, ZHOU Pengfei¹, PAN Shifeng^{1,2}, XING Hua^{1,2}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009;

2. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009)

Abstract: In order to investigate the expression of CDNF in the process of Parkinson's disease (PD), we used rat as an experimental model to determine the expression of dopaminergic neurotrophic factor and its related genes in the brain of PD to provide a theoretical basis for gene therapy of PD. The rat model of PD was prepared by single-point injection of 6-hydroxydopamine in unilateral substantia nigra. Immunohistochemistry, western blot and Q-PCR methods were used to detect the expression of CDNF and threonine-hydroxylase (TH) in the substantia nigra of the model rats. We found that the number of CDNF and TH positive cells in the substantia nigra of the model rats was significantly decreased. Further research showed that when compared with the normal control rats, CDNF mRNA expression showed no change in the model rats ($P>0.05$), while CDNF and TH protein expression were significantly reduced ($P<0.01$). These results suggested that the incidence of PD may be relevant to the decreased expression of CDNF and TH in the substantia nigra, which further inhibit dopamine synthesis.

Key words: rat; Parkinson's disease; cerebral dopamine neurotrophic factor; expression

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种多发于老年的神经退行性疾病, 对生活质量产生严重的影响。已有研究证明多巴胺能神经元功能的减退是 PD 发病的主要机制, 虽然多巴胺能神经元的衰亡机制还不完全清楚, 但是已经发现基因以及环境因素都涉及其中^[1]。此外, 研究发现目前关于 PD 的治疗方法虽有一定的效果, 但并不能改变疾病的发展进程, 而且这些方法的疗效并不持久^[2]。因此,

开辟新的治疗途径势在必行, 基因治疗用于帕金森病有较好的前景。神经营养因子 (neurotrophin, NT) 是一类由神经支配的组织和星形胶质细胞所产生的蛋白质分子, 在神经元生长与存活过程中起着至关重要的作用。已有研究发现, 中脑星形胶质细胞源性神经营养因子 (mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor, MANSF) 对多巴胺 (dopamine, DA) 神经元具有很好的营养支撑效用^[3]。大脑多巴

收稿日期: 2017-06-27

基金项目: 国家自然科学基金(31172284)和江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)共同资助。

作者简介: 张彤宇, 硕士研究生。E-mail: 619709525@qq.com

* 通信作者: 邢华, 博士, 教授。E-mail: hxing@yzu.edu.cn

胺能神经营养因子 (cerebral dopamine neurotrophic factor, CDNF) 与 MANF 间接同源, 且已有实验证实 CDNF 对大鼠脊髓损伤有治疗效果^[4]。然而, 关于帕金森病发生过程中脑黑质内 CDNF 表达是否会发生改变报道还较少见。因此, 本研究对其进行进一步探讨。

1 材料与方法

1.1 供试动物

Wistar 大鼠 (清洁级, 雄性, 200 g 左右) 由扬州大学比较医学中心提供 [实验动物使用许可证号 SYXK (苏) 2017-0044]。大鼠饲养在 24~26℃ 温度下, 自由饮水采食, 人工光照 (12 h 明/12 h 暗), 湿度 60%~70%, 实验过程中饲喂 Co⁶⁰ 灭菌商品化大鼠饲料。

1.2 仪器和试剂

单臂脑立体定位仪、KDS310 脑立体微量注射泵、10 μL 气相注射器、微型手持式颅钻, 均购自深圳瑞沃德公司; RM2126 型石蜡切片机、倒置显微镜, 均购自 Leica 公司; 5331 型 PCR 仪、常温离心机、高速冷冻离心机、Mini 离心机, 均购自德国

Eppendorf 公司; Thermal Cycler2720 型 PCR 仪, 购自美国 ABI 公司; DYY-6D 型电泳仪, 购自北京六一仪器; 紫外/可见光分光光度计, 购自 Thermo 公司; INFINITY 凝胶成像系统, 购自法国 VL 公司; Step One™ Real-Time PCR System, 购自 Applied Biosystems 公司; 垂直电泳仪, 购自 Bio-Rad 公司; 多功能酶标仪, 购自 Tecan Infinite M200 Pro 公司。

戊巴比妥钠、6-羟基多巴胺 (6-OHDA)、阿扑吗啡 (APO)、多聚甲醛, 均购自 Sigma 公司; 兔抗 TH 多克隆抗体、羊抗 CDNF 多克隆抗体, 均购自 Abcam 公司; RIPA 蛋白裂解液, 购自普利莱公司; 即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒、DBA 显色试剂盒, 均购自武汉博士德生物工程有限公司; 双氧水, 购自上海恒利试剂厂; PMSF, 购自天根公司。

1.3 大鼠帕金森病模型的制备

1.3.1 大鼠帕金森病模型的制备方法 大鼠以 40 mg·kg⁻¹ 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 头顶部除毛、保定于脑立体定位仪上, 颅顶消毒后, 头皮正中中线剪开皮肤, 暴露颅骨的前囟点, 参照 Paxinos 和 Watson 主编的《大鼠脑立体定向图谱》^[5], 确定黑质位点, 具体参数见表 1。

表 1 帕金森病模型大鼠黑质立体定位参数

Table 1 Stereotaxic parameters of substantia nigra in Parkinson's disease model rats

项目 Item	X 轴/mm X axis	Y 轴/mm Y axis	Z 轴/mm Z axis	注射量/μL Injection volume
位点 1 Site 1	- 2.5	- 1.8	- 8.0	4
位点 2 Site 2	- 2.5	- 1.8	- 7.5	4

注: 以前囟点为基点, X 轴: 前囟左计为“-”, 前囟右计为“+”; Y 轴: 前囟前计为“+”, 前囟后计为“-”; Z 轴, 前囟上计为“+”, 前囟下计为“-”。

Note: Base on the bregma, X-axis:bregma in the left gauge“-”,bregma in the right gauge“+”;Y-axis:bregma in front gauge“+”,bregma in back gauge“-”;Z-axis:bregma in above gauge“+”,bregma in below gauge“-”.

牙科钻颅顶实验位点钻孔, 首先使用微量进样针 (10 μL) 吸取 8 μL 的 6-OHDA 按上表数据分两位点通过自动进样泵各注 4 μL, 注射速度 1 mm·min⁻¹, 每注射一位点, 停针 5 min, 后缓慢退针, 缝合创口, 待其苏醒后正常饲养, 第一周每天注射抗生素防止感染。对照组大鼠注射等量生理盐水。

1.3.2 PD 模型大鼠的行为学筛选 术后 2 周对实验鼠进行旋转行为测试, 腹腔注射阿扑吗啡 (APO) 0.4 mL·只⁻¹, 5 min 后开始计时 30 min, 大鼠以左侧后肢为支点, 首尾相接原地旋转 360° 记为一圈, ≥7 r·min⁻¹ 即为成功 PD 模型。保留成功模型, 其余淘汰。

1.4 PD 模型大鼠脑内 CDNF 表达变化的研究

选取成功模型 20 只, 于注射 6-OHDA 5 周后采集脑组织, 分别以免疫组织化学 (10 只)、荧光定

量 PCR 和 Western bolt (10 只) 检测大鼠黑质内 CDNF 表达水平。同时取空白大鼠作为对照。

1.4.1 免疫组织化学染色法 (SABC) 检测脑黑质 CDNF 阳性细胞 采用 ABC (avidin-biotin- peroxidase complex) 免疫组织化学法检测脑黑质 CDNF 阳性细胞。常规石蜡切片脱蜡复水; 滴加正常大鼠血清, 室温孵育 20 min, 封闭非特异性反应部位; 倾去血清, 滴加一抗 (兔抗大鼠 CDNF 单克隆抗体, 稀释倍数 1:200), 4℃ 过夜; PBS 浸洗 3 次, 滴加二抗, 37℃ 孵育 30 min, PBS 浸洗 3×2 min; 滴加 ABC 试剂, 37℃ 孵育 30 min; PBS 浸洗 4×5 min, DAB 显色, 蒸馏水洗涤; 苏木素轻度复染, 常规脱水透明, 封固。将各组染色标本在 200 倍显微镜下观察、拍照。同时, 随机选取 5 个视野/片标本计数 CDNF 阳性细胞。

表 2 用于 *CDNF* mRNA 表达的引物序列Table 2 Primer sequences for *CDNF* mRNA expression

目的基因 Target gene	GeneBank 号 GeneBank No.	引物序列 (5'-3') Primer sequence(5'-3')
<i>CDNF</i>	NM_001037543	F:AAAGAAAACCGCTGTGCTA
		R:TCATTTTCCACAGGTCCACA
<i>GAPDH</i>	BC059110	F:GTGCTGAGTATGTCGTGGAG
		R:CAGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT

1.4.2 RTFQ-PCR 法检测 *CDNF* mRNA 相对表达量 在 NCBI 数据库中查找到大鼠 *CDNF* 基因以及内参 *GAPDH* 的基因。根据 PCR 引物设计的原则, 应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计引物 (表 2)。PCR 反应条件为: 95°C 预变性 30 s; 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 34 s, 72°C 延伸 30 s, 共 40 个循环。熔解曲线检测条件: 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s。cDNA 第 1 条链合成反应 (反转录, RT), 使用快速反转录试剂盒 (去基因组 DNA, 批号为 Cat.KR106) 进行 RT。

1.4.3 Western blot 法检测 *CDNF* 蛋白表达 分别将正常大鼠、模型鼠脱颈处死, 取出右脑, 用于总蛋白的提取; 加入裂解液, 研磨匀浆, 使其充分裂解, 再转入无 RNase EP 管中, 冰上静置 30min, 每 5 min 混匀 1 次; 4°C、13 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 取上清液, 分装至 1.5 mL 离心管中, 采用 BCA 蛋白浓度检测法, 对上清液中的蛋白进行浓度测定, 并将蛋白浓度调为一致, 将 6×SDS-PAGE Loading Buffer 和样品蛋白按体积比 1:5 混合后, 隔水煮沸 5 min; 瞬离, 分装后置于 -20°C 保存; 采用 10% 的分离胶和 5% 浓缩胶, 电泳结束后转印至 NC 膜, 5% 脱脂乳封闭 2 h; 加羊抗大鼠 *CDNF* 抗体 (1:500 稀释) 4°C 孵育过夜; 按照 ECL 试剂盒的操作说明书进行 ECL 显色反应, 以 β -actin (1:1 000 稀释) 作为内参。

1.5 PD 模型大鼠脑内 TH 表达变化的研究

1.5.1 免疫组织化学法染色检测脑黑质 TH 阳性细胞 *CDNF* 阳性细胞 具体操作与免疫组织化学染色法测定 *CDNF* 阳性细胞相同。

1.5.2 Western blot 法检测 TH 蛋白表达 蛋白提取及总蛋白浓度测定等方法同 *CDNF* 蛋白检测。10% 的分离胶, NC 膜 120V 转膜 2 h, 兔抗 TH 抗体 (1:10 000) 及鼠抗 β -actin 抗体 (1:1 000) 4°C 孵育过夜, TBST 洗 5 遍, 每次 5 min; 相应的 HRP 标记二抗室温孵育 2 h, TBST 洗 5 次, 化学发光显影并分析。

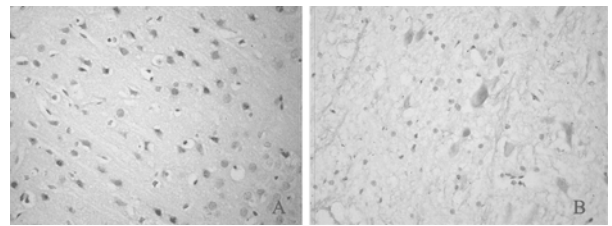
1.6 统计学方法

应用 SPSS19.0 统计软件进行统计学处理, 计量资料用 Means \pm SE 表示, 组间比较用 *t* 检验。

2 结果与分析

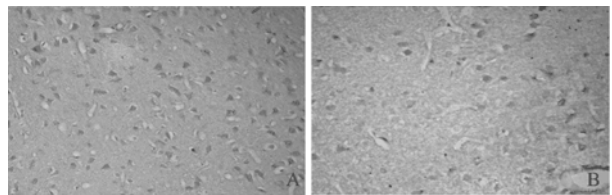
2.1 脑内 *CDNF* 阳性细胞与 TH 阳性细胞变化

对脑切片的免疫组化样本的镜检, 可见对照组大鼠右脑 (造模注射侧) 黑质区 *CDNF* 阳性棕染细胞广泛分布, 这些细胞多呈三角形、多角形 (图 1A), 密度为每个视野内 106.57 个; 模型组大鼠右脑黑质区棕染的 *CDNF* 阳性细胞密度明显下降, 只有少量散在分布的 *CDNF* 阳性细胞 (图 1B), 密度为每个视野内 20.45 个。说明 PD 模型大鼠的病理生理改变可能与大鼠脑黑质区 *CDNF* 阳性细胞数降低密切相关。



A: 对照组大鼠 B: 模型组大鼠

A: Control group rats B: Model group rats

图 1 大鼠脑黑质区 *CDNF* 阳性细胞 ($\times 200$)Figure 1 *CDNF* positive cells in substantia nigra of rat brain ($\times 200$)

A: 对照组大鼠 B: 模型组大鼠

A: Control group rats B: Model group rats

图 2 大鼠脑黑质区 TH 阳性细胞 ($\times 200$)Figure 2 TH positive cells in substantia nigra of rat brain ($\times 200$)

对照组大鼠右脑黑质区 TH 免疫组化结果可见该区域内 TH 阳性细胞广泛分布, 明显多于模型组, 计数得密度为每个视野内 140.69 个, 方法同计数 *CDNF* 阳性细胞, 提示本组脑多巴胺神经元未变性坏死 (图 2A); 模型组大鼠右脑黑质区域 TH 棕染颗粒有散在分布, TH 阳性细胞数明显降低, 残存

细胞也出现萎缩现象, 计数得密度为每个视野内 74.47 个, 提示该组的多巴胺神经元变性坏死 (图 2B)。

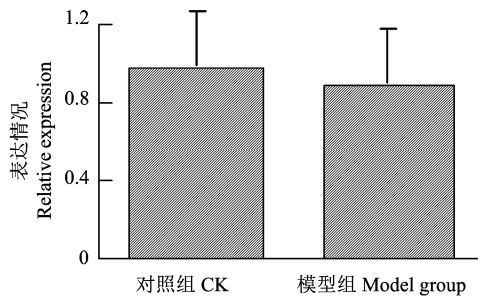


图 3 大鼠脑内 CDNF 的 mRNA 表达情况($n=10$)
Figure 3 Expression of CDNF mRNA in rat brain ($n=10$)

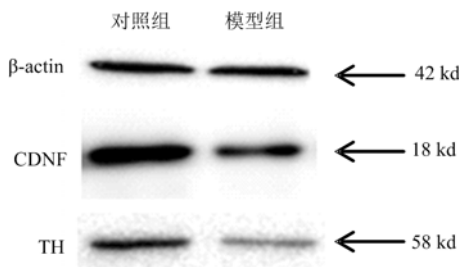


图 4 大鼠脑黑质内 CDNF、TH 蛋白的表达
Figure 4 Expression of CDNF and TH protein in substantia nigra of rat brain

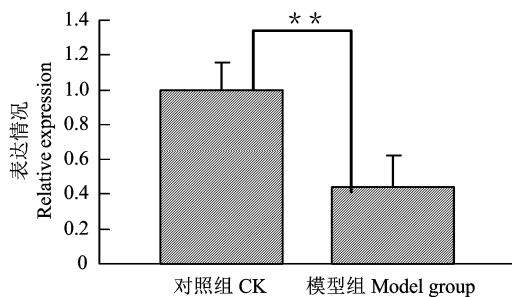


图 5 大鼠脑内 CDNF 的表达分析($n=10$)
Figure 5 Expression of CDNF in rat brain ($n=10$)

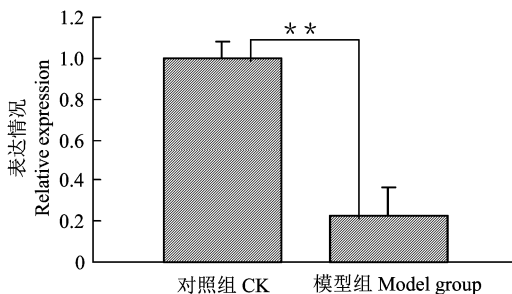


图 6 大鼠脑内 TH 的表达分析($n=10$)
Figure 6 Expression of TH in rat brain ($n=10$)

2.2 脑内 CDNF 的 mRNA 表达变化

2 组大鼠脑内 CDNF 的 mRNA 表达量(见图 3)

分析显示, 模型大鼠 (5 周成功模型) 与对照大鼠 CDNF 的 mRNA 表达量之间无显著差异 ($P>0.05$, $n=10$)。

2.3 脑内 CDNF 与 TH 蛋白表达变化

实验(模型)鼠与对照(正常)鼠脑内 CDNF 及 TH 的表达结果见图 4, 灰度值分析结果见图 5 和 6。

由图 4 看见, 正常大鼠与 PD 模型大鼠黑质内 CDNF 及相应的 TH 均有表达, 但模型大鼠右脑(损毁侧)黑质内的表达量降低。对两种蛋白的灰度值分析(图 5 和图 6), 发现模型大鼠脑内 CDNF 和 TH 蛋白极显著低于正常对照组 ($P<0.01$, $n=10$)。提示 TH 蛋白的下降可能与 PD 模型大鼠黑质内 CDNF 表达量明显下降相关。

3 讨论与结论

本实验首先通过脑内注射 6-OHDA 进行 PD 大鼠模型的构建, 通过检测脑内 DA 的含量及旋转圈数等指标, 确认了 PD 大鼠模型的成功^[6]。实验动物共分为 2 组: 正常组和 PD 模型组。用 WB(wester blot), 免疫组织化学和荧光定量 PCR 实验分别从蛋白和基因表达水平探讨 PD 模型大鼠脑黑质内的 CDNF 表达改变, 并以 TH 含量变化作为模型损伤评价标准。

胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF)^[7], 它的同构体神经铁蛋白 (NRTN)^[8], 以及 2 种新发现的神经营养因子, 大脑多巴胺能神经营养因子 (CDNF)^[9]及中脑星形胶质细胞源性神经营养因子 MANF (mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor)^[10]都已被发现对多巴胺神经系统具有保护和修复作用。但对帕金森病模型大鼠黑质内 CDNF 表达含量的研究比较罕见, 本实验室前期已建立了黑质注射 6-OHDA 构建稳定帕金森病模型大鼠的方法^[11]。6-OHDA, 一种神经毒素, 其结构与多巴胺相似, 能选择性的破坏多巴胺能神经元, 引发帕金森病。实验中, WB 结果显示, PD 模型大鼠黑质内 CDNF 蛋白同 TH 蛋白表达一致, 都明显降低^[1]; 在免疫组织化学实验中, 黑质区 CDNF 和 TH 阳性细胞密度也明显低于对照组。提示 PD 模型的发生与黑质内 CDNF 蛋白表达的下降相关。荧光定量 PCR 结果显示 PD 模型大鼠黑质内 mRNA 表达与对照组之间并无明显差异, 这可能与调控 mRNA 表达蛋白的通路复杂多样相关。

本实验结果显示, 在帕金森模型大鼠黑质中 CDNF mRNA 水平虽未见明显变化, 但蛋白水平显著降低, 揭示 PD 模型大鼠脑内 CDNF 的表达可能

有转录后调控机制的存在^[6],但具体是何种 miRNA 起作用,还有待进一步研究。

中脑黑质多巴胺能神经元的衰减是 PD 发病的病理基础,PD 患者脑内 DA 及 DOPAC 合成减少。多巴胺合成途径是:酪氨酸在酪氨酸羟化酶的催化作用下生成多巴,继而多巴在多巴胺脱羧酶的催化作用下形成多巴胺,因此 TH 是多巴胺合成的第一步也是关键的一步,它是多巴胺合成的限速酶,TH 的增加和减少直接影响着 DA 的多少。许多研究表明 PD 时 TH 明显减少,因此可认为 TH 是多巴胺能神经元的特征及可靠标志,也越来越多地被用于评价 PD 模型大鼠黑质纹状体损伤程度^[12-13]。

综上,本研究对帕金森病脑内多巴胺能神经营养因子及相关基因的表达变化进行了检测。结果表明,CDNF 蛋白表达水平下降,提示 CDFN 蛋白在黑质中表达的降低与 PD 发病存在一定的关系,CDNF 作为多巴胺能神经元的特异性营养因子,有可能通过增加脑内 CDFN 的含量来促进神经功能的恢复,为今后转 CDFN 基因治疗 PD 模型大鼠提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 薛莹. CDFN 修饰的骨髓间充质干细胞移植治疗帕金森病的实验研究[D]. 扬州: 扬州大学. 2016.
- [2] LEES A J, HARDY J, REVESZ T. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2009, 373: 2055-2066.
- [3] 汪运红, 沈玉君, 冯利杰, 等. MANF 减轻帕金森病大鼠模型的神经损伤[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(7): 781-785.
- [4] 张辉, 娄永利, 闵有会, 等. CDFN 治疗大鼠脊髓损伤的实验研究[J]. *中外医疗*, 2013(12): 50-51.
- [5] GEORGE P, CHARLES W. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 诸葛启钊, 译. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [6] 潘士锋, 臧娇, 薛莹, 等. BMSCs 移植治疗对 PD 模型大鼠脑纹状体内 AADC 表达的影响及其机制研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2016(11): 5-9.
- [7] ZHANG Z, MIYOSHI Y, LAPCHAK P A, et al. Dose response to intraventricular glial cell line-derived neurotrophic factor administration in parkinsonian monkeys [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 1997, 282: 1396-1401.
- [8] OIWA Y, YOSHIMURA R, NAKAI K, et al. Dopaminergic neuroprotection and regeneration by neurturin assessed by using behavioral, biochemical and histochemical measurements in a model of progressive Parkinson's disease [J]. *Brain Res*, 2002, 947: 271-283.
- [9] LINDHOLM P, VOUTILAINEN M H, LAUREN J, et al. Novel neurotrophic factor CDFN protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo [J]. *Nature*, 2007, 448: 73-77.
- [10] VOUTILAINEN M H, BACK S, PORSTI E, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease [J]. *Neurosci*, 2009, 29: 9651-9659.
- [11] 陈雨松, 薛莹, 潘士锋, 等. CDFN-BMSCs 移植治疗帕金森病的试验研究[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2017, 38(2): 15-20.
- [12] HADLOCK G C, NELSON C C, BAUCUMII A J, et al. Ex vivo identification of protein-protein interactions involving the dopamine transporter [J]. *Neurosci Methods*, 2011, 196: 303-307.
- [13] SOSSI V, DINELLE K, JIVAN S, et al. In vivo dopamine transporter imaging in a unilateral 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson disease using ¹¹C-methylphenidate PET [J]. *Nucl Med*, 2012, 53: 813-822.