

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.45.028 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

张艳华, 卢蕾, 董静, 宋磊, 何春珂, 章圆. X盒结合蛋白1转染神经干细胞移植帕金森大鼠黑质中相关递质及核蛋白的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(45):8510-8513.

## X盒结合蛋白1转染神经干细胞移植帕金森大鼠黑质中相关递质及核蛋白的表达

张艳华<sup>1</sup>, 卢蕾<sup>2</sup>, 董静<sup>1</sup>, 宋磊<sup>3</sup>, 何春珂<sup>4</sup>, 章圆<sup>5</sup>

<sup>1</sup> 吉林医药学院附属医院神经内科, 吉林省吉林市132013; <sup>2</sup> 哈励逊国际和平医院神经内科, 河北省衡水市 053000; 吉林大学白求恩第一医院, <sup>3</sup> 神经内科, <sup>4</sup> 新生儿科, 吉林省长春市130021; <sup>5</sup> 吉林省中西医结合医院骨科, 吉林省长春市130021

张艳华, 女, 1973年生, 吉林省吉林市人, 汉族, 2004年北华大学毕业, 主治医师, 主要从事脑血管病及病理生理研究。  
 neurology@139.com

中图分类号: R394.2  
 文献标识码: B  
 文章编号: 2095-4344(2012)45-08510-04

收稿日期: 2012-02-19  
 修回日期: 2012-04-22  
 (20111229003/D·C)

**文章亮点:** 通过测定转染后神经干细胞移植对帕金森大鼠模型黑质内单胺类递质和 $\alpha$ -突触核蛋白水平的影响表明, 在帕金森病中X盒结合蛋白1转染的神经干细胞分化为多巴胺能神经元的分化率高, 转染后可增加黑质内多巴胺和3,4-二羟基苯乙酸水平, 并降低 $\alpha$ -突触核蛋白的聚集, 从而改善帕金森症状起到治疗目的。

**关键词:** X盒结合蛋白1; 神经干细胞; 帕金森病;  $\alpha$ -突触核蛋白; 多巴胺

**缩略语:** X盒结合蛋白1: X-box binding protein 1, xbp-1; 神经干细胞: neural stem cells, NSCs

### 摘要

**背景:** 既往研究发现, X盒结合蛋白1基因可以转染至神经干细胞中并稳定过表达X盒结合蛋白1, 转染后的神经干细胞移植对脑梗死的治疗作用优于普通神经干细胞。

**目的:** 通过测定转染后神经干细胞移植对帕金森大鼠模型黑质内单胺类递质和 $\alpha$ -突触核蛋白水平的影响, 研究转染后的神经干细胞移植对帕金森病的治疗作用。

**方法:** 将27只帕金森病大鼠随机数字表法均分为3组。对照组侧脑室内移植PBS, 神经干细胞组移植空白神经干细胞悬液, 转染组移植X盒结合蛋白1基因修饰神经干细胞悬液。分别于移植后7, 14, 21, 28 d对各组大鼠进行诱导旋转实验观察神经功能; Western blot检测 $\alpha$ -突触核蛋白水平; 黑质切片后免疫组化染色测酪氨酸羟化酶(+)神经细胞。

**结果与结论:** 转染组大鼠黑质内 $\alpha$ -突触核蛋白表达量降低, 酪氨酸羟化酶(+)神经细胞数高于神经干细胞组和对照组, 且大鼠旋转实验中旋转行为改善。表明在帕金森病中, X盒结合蛋白1转染的神经干细胞分化为多巴胺能神经元的分化率高, 转染后可降低 $\alpha$ -突触核蛋白的聚集, 从而改善帕金森症状起到治疗目的。

### Effects of X binding protein-1 gene-modified neural stem cells transplantation on expression of related neurotransmitters and nucleoprotein in the substantia nigra of rat Parkinson's disease model

Zhang Yan-hua<sup>1</sup>, Lu Lei<sup>2</sup>, Dong Jing<sup>1</sup>, Song Lei<sup>3</sup>, He Chun-ke<sup>4</sup>, Zhang Yuan<sup>5</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Previous studies have shown that X binding protein-1 gene can be transfected into the neural stem cells and is steadily expressed. X binding protein-1 gene transfected neural stem cells transplantation for cerebral infarction treatment is better than ordinary neural stem cells.

**OBJECTIVE:** To study the treatment effect of X binding protein-1 transfected neural stem cells transplantation on Parkinson's disease through detecting the influence on monoamine neurotransmitters and  $\alpha$ -synuclein levels in the substantia nigra of rat Parkinson's disease model.

**METHODS:** Twenty-seven rat Parkinson's disease models were divided into three groups randomly, and 9 rats in each group. The rats in control group were transplanted with PBS through the lateral ventricle, while neural stem cells group was transplanted with blank neural stem cell suspension, and transfection group was transplanted with X binding protein-1 gene-modified neural stem cells. In 7, 14, 21 and 28 days after transplantation, neurobehavioral score of the rats was estimated respectively,  $\alpha$ -synuclein level was examined by Western blot, and the tyrosine hydroxylase positive cells were revealed by immunohistochemical staining.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The expression of  $\alpha$ -synuclein was decreased in the transfection group. The number of tyrosine hydroxylase positive cells in the transfection group was higher than that in the neural stem cells group and control group, and the rotation speed of transfection group was decreased obviously. The results show that the differentiation rate of binding protein-1 gene-modified neural stem cells differentiating into dopaminergic neurons is higher and the transfection can reduce  $\alpha$ -synuclein content in rat substantia nigra, so as to treat Parkinson's symptoms.

Zhang YH, Lu L, Dong J, Song L, He CK, Zhang Y. Effects of X binding protein-1 gene-modified neural stem cells transplantation on expression of related neurotransmitters and nucleoprotein in the substantia nigra of rat Parkinson's disease model. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(45): 8510-8513.

<sup>1</sup>Department of Neurology, Affiliated Hospital of Jilin Medical College, Jilin 132013, Jilin Province, China;

<sup>2</sup>Department of Neurology, Harrison International Peace Hospital, Hengshui 053000, Hebei Province, China;

<sup>3</sup>Department of Neurology,

<sup>4</sup>Department of Neonatology, Norman Bethune First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China;

<sup>5</sup>Department of Orthopedics, Jilin Hospital of Integrated Traditional Chinese Medicine with Western Medicine, Changchun 130021, Jilin Province, China

Zhang Yan-hua, Attending physician, Department of Neurology, Affiliated Hospital of Jilin Medical College, Jilin 132013, Jilin Province, China  
neurology@139.com

Received: 2012-02-19  
Accepted: 2012-04-22

## 0 引言

内质网应激帕金森病主要发病机制之一<sup>[1]</sup>, 作为内质网应激过程中一种重要的效应转录因子——X盒结合蛋白1, 可以清除异常蓄积的蛋白, 对细胞的生存和分化有重要的作用。最新研究, X盒结合蛋白1则可以通过对抗内质网应激起到延缓帕金森病情的作用<sup>[2]</sup>。既往研究发现, X盒结合蛋白1基因可以转染至神经干细胞中, 并且可稳定过表达X盒结合蛋白1, 相比普通神经干细胞, X盒结合蛋白1-神经干细胞生长速度增快, 在缺氧情况下生存率高<sup>[3]</sup>。经移植入大鼠缺血再灌注损伤大鼠模型的脑室后, 相比于普通神经干细胞, X盒结合蛋白1-神经干细胞的迁徙和分化能力显著增强, 梗死区域Bcl-2含量上升, Bax含量下降, 证实了X盒结合蛋白1-神经干细胞移植对脑梗死的治疗作用优于普通神经干细胞<sup>[4]</sup>。因此实验推测, 将X盒结合蛋白1-神经干细胞移植至病变部位, 不仅起到干细胞治疗的作用, 还确保了X盒结合蛋白1的稳定、持续表达从而对抗内质网应激发挥对帕金森基因治疗的作用。

## 1 材料和方法

**设计:** 分子生物学随机对照试验。

**时间及地点:** 实验于2011年3至9月在吉林大学白求恩第一医院医学转化中心神经病学实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 健康清洁级8-10周龄SD大鼠45只, 雄性, 体质量220-250 g, 由吉林大学动物实验中心提供, 动物许可证号: SCXK(吉)2003-0002。在室温(21±2) °C、相对湿度30%-35%、人工12 h昼/夜循环照明环境中用全价营养饲料分笼饲养, 自由摄食及饮水。各组间暴露因素无差异, 实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[5]</sup>。

**细胞:** 神经干细胞和X盒结合蛋白1-神经干细胞由吉林大学白求恩第一医院医学转化中心神经内科实验室制备。

**主要仪器和试剂:**

试剂及仪器	来源
鱼藤酮、阿扑吗啡	恒远生物科技有限公司, 中国上海
聚乳酸聚乙醇酸共聚物、二氯甲烷、3%聚乙烯醇	光华科技有限公司, 中国上海
小鼠抗大鼠酪氨酸羟化酶单克隆抗体 IgG、羊抗小鼠 IgM-CY3	BD 公司, 中国上海
eppendorf 管	eppendorf 公司, 中国北京
HClO <sub>4</sub> 、柠檬酸钾、K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 和 EDTA·2Na	政成化学制品有限公司, 中国天津
TBST、BSA	博士德, 中国武汉
小鼠抗大鼠 α-突触核蛋白单克隆抗体 IgG、兔抗小鼠多克隆抗体 IgM	R&D Systems, 中国上海

**方法:**

**帕金森大鼠模型的建立:** 根据Huang等<sup>[6]</sup>所报道的鱼藤酮缓释微球皮下注射法建立大鼠帕金森模型。在室温20-25 °C, 8-12AM和监测血气、血糖下, 将SD大鼠经10%水合氯醛(3.2 mL/kg)腹腔注射麻醉后, 皮下注射制备的鱼藤酮缓释微球(60 mg/kg)。大鼠复苏后在20-25 °C饲养, 饲料每只12 g/d, 自由饮水。20 d后所有大鼠阿扑吗啡颈部皮下注射诱导旋转, 合格帕金森模型大鼠(平均转速≥ 7 r/min)者入组, 共27只大鼠符合入组条件。

**分组及行为学检测:** 将27只帕金森大鼠模型随机数字表法均分为3组。对照组: 移植入20 μL的PBS; 神经干细胞组: 移植空白神经干细胞悬液20 μL; X盒结合蛋白1-神经干细胞组: 移植基因修饰后神经干细胞悬液20 μL。移植前, 将神经干细胞及X盒结合蛋白1-神经干细胞溶解于PBS中, 调整细胞浓度为1×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>。根据Yang等<sup>[7]</sup>采用KOPF鼠立体定向仪, 经微量注射泵进行移植, 移植速度为5 μL/min, 移植部位为右侧侧脑室, 即A: -0.5 R: 3.5 D: 5.0 mm。分别于移植后7, 14, 21, 28 d对各组大鼠进行阿扑吗啡皮下注射诱导旋转试验, 记录各组大鼠的平均旋转速度, 转速低代表神经功能恢

复较好, 采用SPSS软件对结果进行方差分析, 并根据结果绘制行为学评分变化曲线。

**酪氨酸羟化酶(TH)免疫组化染色:** 取神经干细胞组、X盒结合蛋白1-神经干细胞组石蜡切片, 脱蜡和水化后室温复温半小时。0.01 mol/LPBS洗3次, 每次5 min, 37 °C下加入适量HCl 2 mol/L变性半小时。再使用0.01 mol/LPBS洗3次, 每次5 min, 0.1 mol/L硼砂清洗2次, 每次5 min, 再使用0.01 mol/L PBS洗3次, 每次5 min。37 °C下加入0.5%Triton X-100破膜30 min后0.01 mol/L PBS洗3次, 每次5 min, 再加入5%NSS封闭。切片避光晾干后。加入一抗小鼠抗大鼠酪氨酸羟化酶单克隆抗体IgG(1:400), 37 °C孵育2 h, 0.01 mol/L PBS洗3次, 每次5 min。再加二抗羊抗小鼠IgM-CY3(1:100), 室温孵育2 h后凉干。使用荧光显微镜观察对酪氨酸羟化酶免疫阳性细胞进行计数, 在随机选取5个高倍视野, 计数阳性细胞数。

**Western blot检测 $\alpha$ -突触核蛋白水平:** 取移植后第28天各组大鼠组织标本检测 $\alpha$ -突触核蛋白的表达, 其具体过程如下: 切取50 mg左右大鼠组织剪碎, 加入已添加蛋白酶抑制剂的组织裂解液, 冰上裂解30 min, 再用匀浆器匀浆30 s完毕后离心12 000 r/min, 20 min。取上清, 再以合适比例裂解液稀释后用采取BCA法测定总蛋白浓度<sup>[9]</sup>。每个样品取总蛋白15  $\mu$ g与4  $\mu$ L 6 $\times$ loading buffer混合, 沸水变性5 min, 行10%SDS-PAGE不连续凝胶电泳80 V 40 min, 110 V 90 min, 湿法电转膜200 mA 60-90 min, BSA加脱脂牛奶封闭2 h, TBST洗脱6次(10 min/次), 加一抗小鼠抗大鼠 $\alpha$ -突触核蛋白单克隆抗体IgG 1:2 000于4 °C孵育过夜, 次日TBST洗脱6次, 10 min/次, 再加入辣根过氧化物酶标记的二抗兔抗小鼠多克隆抗体IgM, 室温孵育2 h后行ECL化学发光法显示结果。

**主要观察指标:** Western blot检测 $\alpha$ -突触核蛋白水平; 免疫组化染色酪氨酸羟化酶(+)神经细胞。

**统计学分析:** 使用SPSS 17.0软件进行数据处理。计量资料均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 分组资料以相对数表示。组间比较采用方差分析及 $q$ 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 纳入大鼠数量分析** 共有45只大鼠行鱼藤酮微球注射, 10 d内共有7只大鼠死亡, 至注射后20 d, 共11只大鼠死亡, 死亡原因为严重体质量下降、腹泻。34只存活大鼠经皮下注射阿扑吗啡诱导旋转行动, 以平均转速 $\geq 7$  r/min为造模成功标准, 共27只大鼠符合条件, 造

模成功率53.3%。造模成功的大鼠爬行活动缓慢, 对外界刺激无自主竖毛, 逃避反应较慢。分组实验期间, 对照组有3只大鼠因摄食过少死亡, 神经干细胞组和X盒结合蛋白1-神经干细胞组无脱失。

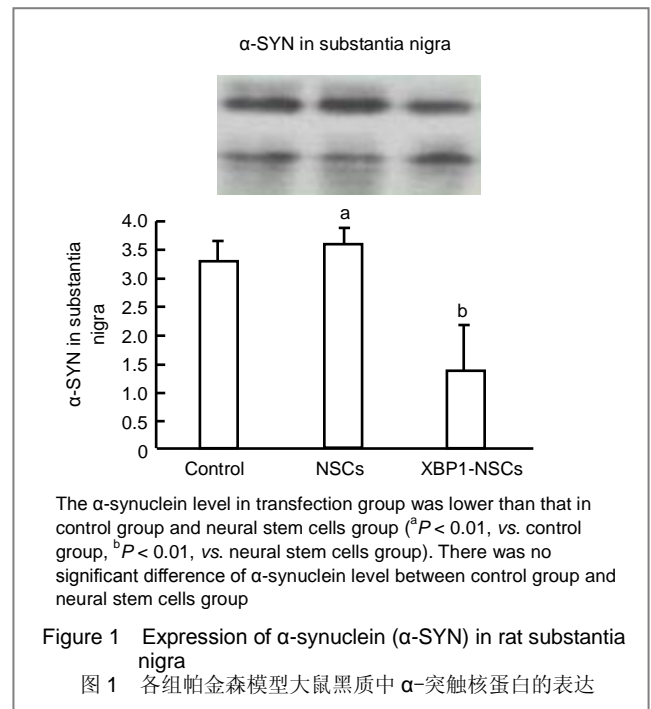
**2.2 细胞移植后帕金森大鼠行为学变化** 对照组的旋转行为随时间变化无明显改善( $P > 0.05$ ); 神经干细胞组模型旋转次数逐渐下降, 旋转行为得到改善, 14, 21, 28 d时与对照组比较, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); X盒结合蛋白1-神经干细胞组旋转行为随时间变化明显改善, 随时间变化明显下降, 与神经干细胞组相比, 第21, 28天差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见表1。

表1 大鼠在旋转实验中的平均旋转速度  
Table 1 The average rotation speed of rats in rotation test ( $\bar{x}\pm s$ , r/min)

Time	Control group	Neural stem cells group	Transfection group
0 wk	11.07 $\pm$ 1.19	12.04 $\pm$ 1.09	12.11 $\pm$ 2.17
1 wk	12.14 $\pm$ 2.15	11.74 $\pm$ 1.72	10.87 $\pm$ 0.93
2 wk	10.90 $\pm$ 2.07	10.02 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	9.27 $\pm$ 2.02
3 wk	11.77 $\pm$ 2.11	8.43 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>	7.07 $\pm$ 0.77 <sup>b</sup>
4 wk	12.06 $\pm$ 0.97	7.82 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	6.22 $\pm$ 2.06 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. control group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs. neural stem cells group

**2.3 移植后帕金森大鼠黑质中 $\alpha$ -突触核蛋白的表达** 见图1。



$\alpha$ -突触核蛋白在各组大鼠黑质内均有表达, 其中神经干细胞组 $\alpha$ -突触核蛋白含量与对照组比较, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); 与对照组及神经干细胞组相比, X

盒结合蛋白1-神经干细胞组大鼠黑质内 $\alpha$ -突触核蛋白含量显著降低( $P < 0.01$ )。

2.4 移植后神经干细胞的成活与分化 3组黑质中均可见酪氨酸羟化酶(+)阳性的细胞存在, X盒结合蛋白1-神经干细胞组黑质中酪氨酸羟化酶(+)细胞数为 $69.38 \pm 7.96$ , 高于神经干细胞组 $56.21 \pm 10.09$  ( $P < 0.05$ ), 明显高于对照组 $34.76 \pm 8.83$  ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

X盒结合蛋白1具有促进细胞分化的作用, 被认为是肝细胞、浆细胞生长、成熟与分化所必不可少的转录因子<sup>[12]</sup>。在缺血再灌注大鼠模型中, 实验首次发现X盒结合蛋白1有促进神经干细胞分化为神经细胞的作用。本实验进一步研究在帕金森致病环境中, X盒结合蛋白1是否可以促进神经干细胞存活与分化为多巴胺能神经元。实验结果发现, X盒结合蛋白1-神经干细胞组大鼠黑质中酪氨酸羟化酶阳性细胞明显多于神经干细胞组。TH是多巴胺能神经源的特异性标志物<sup>[13]</sup>, X盒结合蛋白1-神经干细胞组多巴胺能神经元高于神经干细胞组的原因除了有上述的X盒结合蛋白1-神经干细胞较强分化能力因素外, 其原因认为还和X盒结合蛋白1-神经干细胞分泌的X盒结合蛋白1蛋白具有保护黑质中原有残存的多巴胺能神经元免于凋亡的作用有关。

生理条件下,  $\alpha$ -突触核蛋白可能具有维护突触、调节多巴胺合成及神经细胞保护的功能。但病理条件下, 其合成过程中错误折叠和寡聚化之间的动态平衡一旦被打破, 则迅速聚集成大分子形成Lewy小体, 最终导致细胞的凋亡或死亡<sup>[14]</sup>。实验发现, 神经干细胞组大鼠黑质中 $\alpha$ -突触核蛋白水平较对照组中无明显差异, 说明普通神经干细胞对 $\alpha$ -突触核蛋白和合成或降解并无作用, 而X盒结合蛋白1-神经干细胞组 $\alpha$ -突触核蛋白水平较上两组明显降低, 证实了过表达X盒结合蛋白1基因的神经干细胞具有清除 $\alpha$ -突触核蛋白的作用。且发现X盒结合蛋白1-神经干细胞组大鼠神经功能恢复明显改善, 因此认为X盒结合蛋白1-神经干细胞移植治疗帕金森效果要明显优于普通神经干细胞移植。但由于实验时间限制, X盒结合蛋白1如何促进神经干细胞向多巴胺能神经元分化, 以及其清除异常蓄积的 $\alpha$ -突触核蛋白的具体机制还未清楚, 需要行体外实验以进一步研究阐述。

### 4 参考文献

- [1] Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *Mutat Res.* 2005;569(1-2):29-63.
- [2] Sado M, Yamasaki Y, Iwanaga T, et al. Protective effect against Parkinson's disease-related insults through the activation of XBP1 *Brain Research.* 2009;1257:16-24.
- [3] Sha Y, Liu BH, Liu Q, et al. Effects of transfected adenovirus-mediated transcription factor X-box binding protein 1 on hippocampal-derived neural stem cell proliferation and apoptosis under hypoxia. *Neural Regen Res.* 2010;5(13):981-986.
- [4] Wang Y, SONG L, Liu Q, et al. Transplantation of X box binding protein 1 gene modified neural stem cells in the lateral ventricle of brain ischemia rats. *Neural Regen Res.* 2011;6(1):6-11.
- [5] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions (Instructions) for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
- [6] Huang J, Liu H, Gu W, et al. A delivery strategy for rotenone microspheres in an animal model of Parkinson's disease. *Biomaterials.* 2006; 27(6):937-946.
- [7] Yang DB, Li YL, Yang LZ, et al. Experimental study of intraventricular neural stem cell transplantation for rat focal cerebral ischemia. *Chinese Journal of Minimally Invasive Neurosurgery.* 2006;11:27-29.
- [8] Aoki S, Inukai K, Sakurai M, et al. Monitoring of dopamine metabolism by in vivo voltammetry and high performance liquid chromatography in L-dopa-treated rats. *Jpn J Pharmacol.* 1987;43(1):98-102.
- [9] Li H, Sun NL, Wang J, et al. Circadian expression of clock genes and angiotensin II type 1 receptors in suprachiasmatic nuclei of sinoaortic-denervated rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2007; 28(4):484-492.
- [10] Ekstrand MI, Galter D. The MitoPark Mouse - an animal model of Parkinson's disease with impaired respiratory chain function in dopamine neurons. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009;15 Suppl 3:S185-188.
- [11] Greenamyre JT, Cannon JR, Drolet R, et al. Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31(4):141-142.
- [12] Iwakoshi NN, Lee AH, Vallabhajosyula P, et al. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol.* 2003;4(4):321-329.
- [13] Benavides-Piccione R, DeFelipe J. Distribution of neurons expressing tyrosine hydroxylase in the human cerebral cortex. *J Anat.* 2007;211(2):212-222.
- [14] Santner A, Uversky VN. Metalloproteomics and metal toxicology of  $\alpha$ -synuclein. *Metallomics.* 2010;2(6):378-392.

来自本文课题的更多信息—

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。