文章编号:1000-5404(2009)18-1761-05

论著

优化 hα-syn 基因疫苗预防注射对 MPTP 急性帕金森病小鼠的神经保护作用

王法祥[1],彭国光[1],王加才[2],王少君[3],何卿玮[1] ([1]重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016;[2]乐山市人民医院神经内分泌科,四川 乐山 614000;[3]咸阳中铁二十局中心医院神经内科,陕西 咸阳 712000)

摘 要:目的 探讨预防注射优化 hα-syn 基因疫苗对多巴胺神经元在遭受急性神经毒素损害时的保护作用。**方法** 在小鼠双侧后肢胫骨前肌部位分别注射优化基因疫苗、空重组质粒或 PBS 各 50 μl,共 3 次。末次注射 3 周后,优化基因疫苗组皮下注射 MPTP 30 mg/kg,对照组用等容量的 PBS 背部皮下注射,每日 1 次,连续 5 d。最后 1 次模型注射后,观察行为学和病理生理改变。**结果** 优化基因疫苗组小鼠的爬杆分数与空重组质粒组比较明显减少($P<0.05$),与 PBS 对照组比较,爬杆分数增多,但差异无统计学意义($P>0.05$)。优化基因疫苗组与空重组质粒组相比,黑质区酪氨酸羟化酶阳性细胞数明显增多,凋亡细胞数明显减少($P<0.05$),α-突触核蛋白表达略减少($P>0.05$)。空重组质粒组与 PBS 对照组相比,黑质区酪氨酸羟化酶阳性细胞数明显减少,凋亡细胞明显增多($P<0.05$),α-突触核蛋白表达明显增多($P<0.05$)。**结论** 优化 hα-syn 基因疫苗预防注射能够较好的防止神经毒素对黑质多巴胺细胞的损害,对多巴胺神经细胞具有保护作用。

关键词: 帕金森病;免疫预防;基因疫苗;MPTP
中图法分类号: R-332;R392.7;R742.5 **文献标识码:** A

Preventative immunization of optimized human α-synuclein DNA vaccine protects acute mouse with MPTP-induced Parkinson's disease

WANG Fa-xiang[1], PENG Guo-guang[1], WANG Jia-cai[2], WANG Shao-jun[3], HE Qing-wei[1] ([1]Department of Neurology, Key Laboratory of Neurology of Chongqing, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Neurology and Endocrinology, People's Hospital of Leshan, Leshan 614000, Sichuan Province; [3]Department of Neurology, Central Hospital of China Railway 20 Bureau Group, Xianyang 712000, Shaanxi Province, China)

Abstract: Objective To explore the neuroprotective effects of optimized human α-synuclein DNA vaccine on dopaminergic neurons after acute neurotoxin damage. **Methods** Totally 24 C57BL/6J mice were randomly divided into 3 groups: the optimized human α-synuclein (α-syn) DNA vaccine group (pVAX1-Igk-hαS1-140), the empty plasmid group (pVAX1), and the PBS group. Before the immunizing of mice every time, anterior tibial muscles of mice hind legs were respectively injected with 50 μl 0.5% bupivacaine unilaterally. In 72 h later, those mice were injected unilaterally at the same site and in the same depth with 50 μl corresponding agents. The immunization was given once every three weeks for totally 3 times. Two weeks after the last immunization, those mice of pVAX1-Igk-hαS1-140 group and pVAX1 group were intraperitoneally injected with 250 mg/kg probenecid followed by injection with MPTP ($25\ mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1} \times 5\ d$, s.c.; dissolved in 0.9% NS) in the back, and those mice of PBS group were injected with the same volume of PBS. The mice were sacrificed on the second day after last MPTP injection and their brain was taken out for immunofluorescence and immunostaining. From the next day after the last immunization injection to the day of death, the behavior of all mice were observed by pole testing. **Results** Compared with empty plasmid group, the scores of pole test of pVAX1-Igk-hαS1-140 DNA vaccine group was decreased with significant differences ($P<0.05$). Compared with PBS group, the scores of pole test were increased but there was no significance differences ($P>0.05$). Compared with empty plasmid group, the number of tyrosine hydroxylase-positive cells of pVAX1-Igk-hαS1-140

作者简介:王法祥,男,河南省信阳市人,博士,主治医师,主要从事帕金森病发病机制方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:(023)66540612,E-mail:wang200888cn@yahoo.com.cn
通信作者:彭国光,E-mail:penwan233@sina.com
收稿日期:2008-12-26;修回日期:2009-04-09

DNA vaccine group was increased and that of apoptotic cells was decreased significantly ($P<0.05$). At the same time, the number of α-synuclein expression-positive cells was decreased for a little, but there was no statistically significant difference ($P>0.05$). Compared with PBS group, the number of tyrosine hydroxylase-positive cells of empty plasmid group was decreased and that of apoptosis cells was increased significantly ($P<0.05$). At the same time, the number of α-synuclein-positive cells was increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** The optimized DNA vaccine improves the behavior of mice with Parkinson's disease, and at the same time it plays a positive role in strengthening immunogenicity and exerting neuroprotective effects on dopaminergic neuron against acute neurotoxin damage.

Key words: Parkinson's disease; immune neuroprotection effects; DNA vaccine; MPTP

目前,已知多种神经系统变性疾病均与异常蛋白质的沉积有关,如帕金森患者脑中 Lewy 小体中 α-突触素蛋白(α-synuclein,α-syn),亨廷顿患者脑中的亨廷顿蛋白等[1]。帕金森病(Parkinson's disease,PD)是一种进展性神经变性疾病,其病理标志是黑质致密部(substantia nigra pars compacta,SNc)多巴胺能神经元严重缺失和残存神经元内 Lewy 小体出现异常聚集的 α-syn 蛋白[2]。α-syn 聚集的抑制可能作为有效治疗方法[3]。

本课题组前期研究用全长人 α-syn(hα-syn)核酸疫苗免疫慢性帕金森病 C57BL/6J 小鼠,观察到这类疫苗可明显诱导机体的免疫反应,对帕金森病小鼠产生较好的免疫治疗作用[4]。结果显示,利用核酸疫苗治疗 MPTP 慢性模型小鼠取得显著疗效,可使 α-syn 蛋白表达减少约 39%,酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)阳性细胞数增多 46% ~55%[5]。本研究旨在观察预防注射优化 hα-syn 基因疫苗对 MPTP 处理的急性帕金森病小鼠的行为学和神经病理变化,探讨基因疫苗对多巴胺神经细胞在遭受急性神经毒素损害时的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与动物

可表达人 α-syn 蛋白和 Igk 信号肽的 pVAX1-Igk-hαS1-140 重组真核表达质粒基因疫苗由本实验室成功构建和制备。GenElute HP 去内毒素核酸大量纯化试剂盒、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6 四氢吡啶(MPTP)、丙磺舒(Sigma,美国);鼠抗酪氨酸羟化酶多克隆抗体、生物素化抗兔二抗、免疫组化检测试剂盒(博士德,武汉);Hoechst 33258 染色液(碧云天);绵羊抗 α-syn 多克隆抗体(Millipore,美国),生物素化抗绵羊二抗(Santa Cruz,美国);其他常规试剂均为国产分析纯。实验动物:24 只雄性 C57BL/6J 小鼠,5 ~7 周龄,体质量 15 ~20 g,购于重庆医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 基因疫苗质粒大量去内毒素抽提 按 GenElute HP 去内毒素核酸大量纯化试剂盒抽提去内毒素质粒 pVAX1-Igk-hαS1-140 和 pVAX1 2 种质粒并测定光密度值。$D(260)/D(280)$均在 1.8 ~2.0 之间,纯度符合要求。后用无菌去离子水进行稀释,浓度为 100 μg/100 μl。贮于 -80 ℃备用。

1.2.2 分组及基因疫苗的免疫接种 24 只雄性 C57BL/6J 小鼠,分为 3 组:pVAX1-Igk-hαS1-140 基因疫苗组、pVAX1 空质粒组和 PBS 对照组,每组 8 只。基因疫苗组小鼠在双侧后肢胫骨前肌部位多点、深度一致地注射 0.5% 布比卡因 50 μl,注射 72 h 后,在同样部位、同样深度情况下,根据分组不同分别在基因疫苗组注射 pVAX1-Igk-hαS1-140 基因疫苗,空质粒组、PBS 组注射 pVAX1 空质粒和 PBS 各 50 μl,共 3 次,每次间隔 3 周。

1.2.3 急性 MPTP 帕金森病小鼠模型制备 参照 Petroske 等[1]的方法进行。基因疫苗组、空质粒组末次注射 2 周后制作急性 MPTP 帕金森病小鼠模型;PBS 对照组腹腔注射同等容积的 PBS,取免疫小鼠腹腔注射丙磺舒 250 mg/kg,1 h 后,背部皮下注射 MPTP 25 mg/kg,每日 1 次,连续 5 d。最后 1 次模型注射后第 2 天取脑检测。

1.2.4 免疫后小鼠行为学变化观察 从免疫接种到取脑期间观察小鼠的外界拒抗反应、活动量情况、质量等异常行为变化。同时采用 Ogawa 等[6]和 Matsuura 等[7]爬杆实验的改进方法来检测运动迟缓行为学变化。用直径 0.8 cm,高约 60 cm 的金属杆,顶部覆盖纱布,让小鼠在由上到下滑行过程中进行计分:四肢并用,一次顺利爬下为 0 分;螺旋爬下兼后肢滑行为 0.5 分;间歇停顿滑行数次后爬下,但可抱紧金属杆为 1.0 分;滑行后掉落为 1.5 分;直接掉落为 2.0 分;每次爬杆前 1 h 均对所有小鼠进行提小鼠尾短距离试爬 5 次以上的训练。在检测时每只每次检测 10 min,每天 1 次,共 5 次,计算总分,取平均值。

1.2.5 黑质区免疫荧光染色 取切片脱蜡至水,3% 过氧化氢去除内源性过氧化物酶,微波修复,血清封闭后滴加抗 TH 多抗(1∶200)4 ℃孵育过夜。滴加 FITC 标记山羊抗兔二抗(1∶200),避光室温孵育 7 h 后用 PBS 冲洗 2 遍,加入 0.5 ml Hoechst 33258 染色液,染色 5 min。去染色液,用 PBS 洗 2 遍,每次 3 min,吸尽液体。加抗淬灭封片后荧光显微镜摄像,计数 2 侧黑质 TH 阳性细胞数。如果见到细胞核呈现 3 个或 3 个以上荧光碎片,该细胞即为凋亡细胞。计算细胞中凋亡率,随机选取 3 个视野,对每个高倍视野(×400)进行图像分析,计数凋亡细胞个数,计算凋亡率。

凋亡率(%)=凋亡细胞/细胞总数×100%

1.2.6 小鼠中脑黑质 α-syn 免疫组化 灌注取脑、脱水、包

埋、切片处理后进行免疫组化染色。切片脱蜡、脱水、热修复、血清封闭后分别加入抗 α-syn 多抗（1∶500）4 ℃孵育过夜。PBS 洗后分别滴加抗绵羊二抗（1∶500）。37 ℃孵育 40 min，PBS 冲洗后，加辣根过氧化物酶（HRP）标记的生物素卵白素复合物。最后用 DAB 显色，梯度脱水，二甲苯透明，中性树胶封片、镜检。每张切片随机选取 3 个高倍视野（×400）进行图像分析，测量免疫组化染色的积分光密度值和阳性细胞数。

1.3　统计学方法

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 软件行单因素方差分析，2 组比较采用 t 检验，多组间比较用 Fisher LSD 检验。

2　结果

2.1　行为学观察

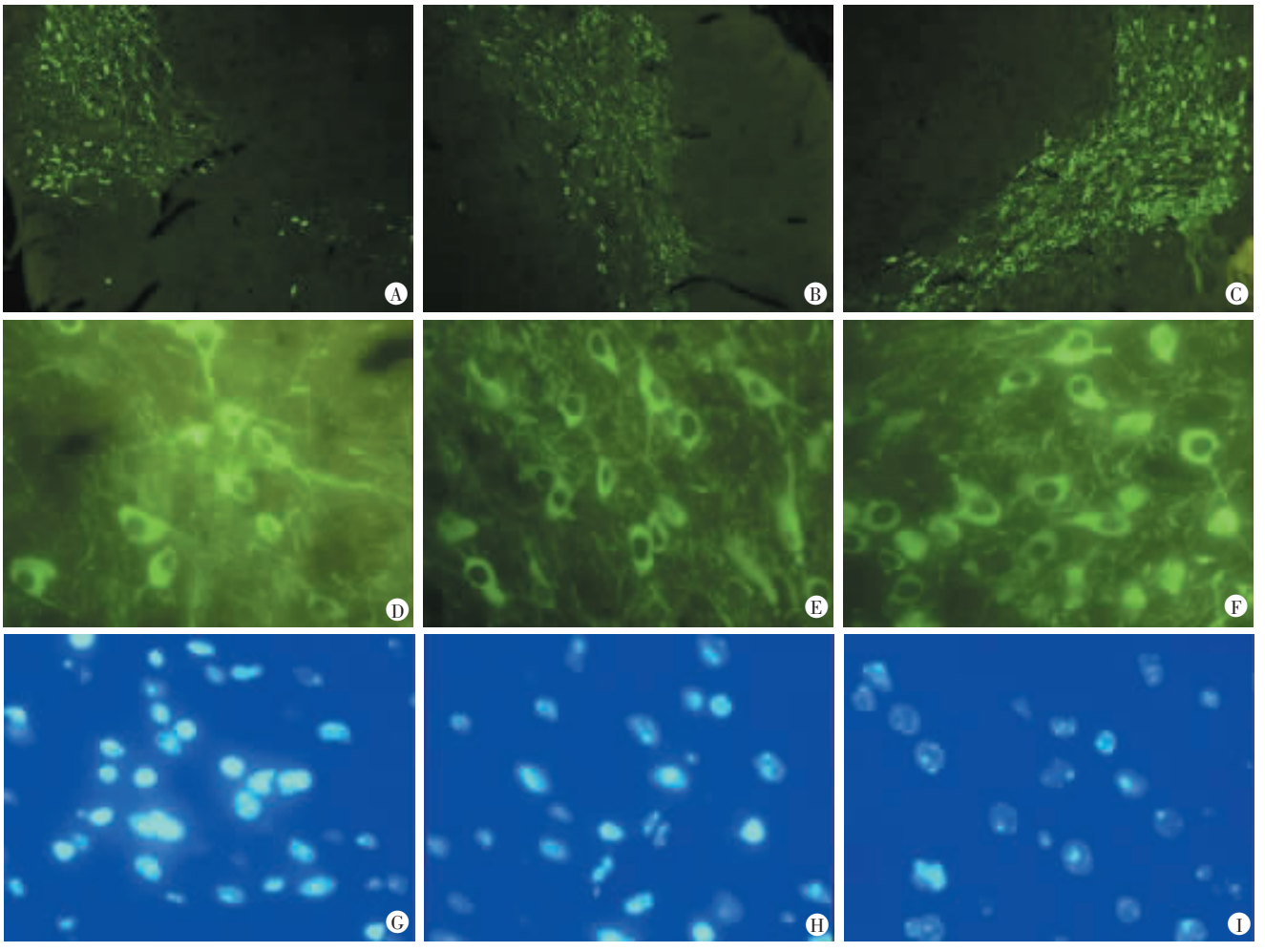
3 组小鼠在急性 MPTP 小鼠模型成功后，均表现为自发性活动量明显减少，行动缓慢，爬笼能力下降，对外界刺激抗拒力下降，精神迟钝，体质量日渐减轻。优化基因疫苗组与空质粒组相比，上述行为症状明显较轻。在爬杆分数上，空质粒组（1.21 ± 0.54）与优化基因疫苗组（0.67 ± 0.33）间差异有统计学意义（$P < 0.05$），并且空质粒组与 PBS 对照组（0.13 ± 0.23）间差异有统计学意义（$P < 0.05$），但是优化基因疫苗组与 PBS 对照组比较差异无统计学意义（$P > 0.05$）。

2.2　中脑黑质细胞凋亡的改变

图 1 显示，小鼠脑黑质部位有大量阳性细胞核固缩呈不规则形，部分裂解为多个凋亡小体。各组小鼠中脑黑质 TH 阳性细胞表达可以看出，基因疫苗组、空质粒组与 PBS 对照组相比，黑质区凋亡细胞明显增多［分别为（18 ± 1）、（37 ± 1）、（8 ± 1），$P < 0.05$］，优化基因疫苗组与空质粒组相比，黑质区凋亡细胞明显减少（$P < 0.05$）。

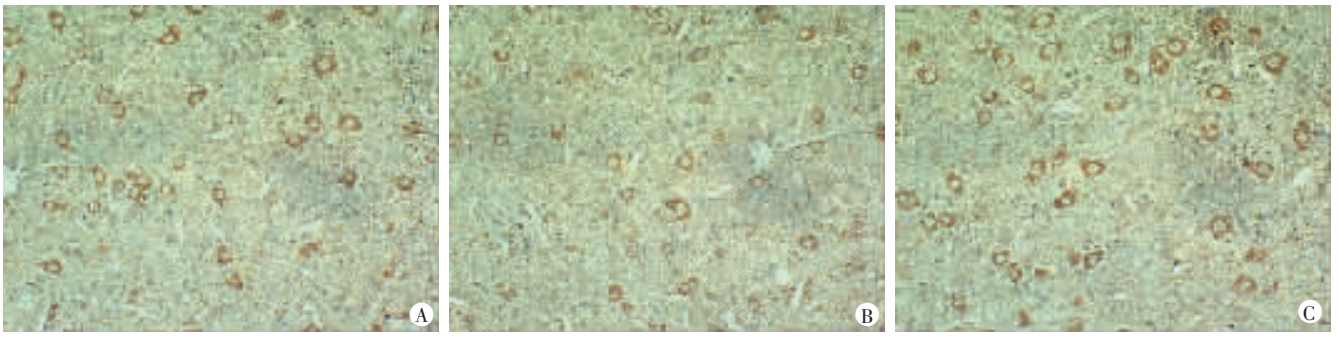
2.3　中脑黑质 TH 阳性细胞的改变

图 1 显示小鼠中脑黑质部位可见有大量阳性细胞。与空质粒组相比，优化基因疫苗组黑质区细胞明显增多［分别为（7.31 ± 1.35）、（22.13 ± 2.78），$P < 0.05$］，但是与 PBS 对照组（41.63 ± 4.22）相比，黑质区细胞数明显减少（$P < 0.05$）。空质粒组与 PBS 对照组相比，黑质区细胞数明显减少（$P < 0.05$）。



A，D，G：空重组质粒组；B，E，H：基因疫苗组；C，F，I：PBS 对照组；A，B，C：SNc 区 TH 免疫荧光低倍视图（×150）；D，E，F：SNc 区 TH 免疫荧光高倍视图（×400）；G，H，I：SNc 区 DA 神经元 Hoechst 33258 染色（×400）

图 1　各组小鼠黑质 TH 免疫反应阳性细胞与凋亡形态学观察



A:基因疫苗组; B:PBS 对照组; C:空重组质粒组

图2 各组小鼠黑质 α-syn 免疫反应阳性细胞形态学观察 (SABC ×400)

2.4 中脑黑质 α-syn 表达改变

图2显示各组小鼠黑质均有呈深染、棕黄色的 α-syn 阳性细胞表达。与空质粒组和 PBS 对照组相比,基因疫苗组小鼠中脑黑质 α-syn 阳性细胞表达差异均没有统计学意义[分别为(23 329 ±4 172)、(13 823 ±499)、(16 687 ±3 403),$P>0.05$]。与 PBS 对照组相比,空质粒组 α-syn 阳性细胞染色略多,积分光密度值明显增多($P<0.05$)。

3 讨论

本研究通过对小鼠预防注射基因疫苗后,再采用 MPTP 注射来制备急性帕金森动物模型。结果显示,优化基因疫苗组与空重组质粒组相比,在活动量、行动敏捷度、精神状态、质量下降等表现总体状态都得到明显改善,爬杆分数明显减低,细胞凋亡减少,TH 数目明显增多($P<0.05$)。说明行为学与多巴胺神经的损害程度有一定的相关性。但是两者之间 α-syn 蛋白表达量却没有明显差异($P>0.05$),可能与在短时期内异常 α-syn 蛋白聚集量有关。由此可见,在行为学方面基因疫苗可以改善 MPTP 引起的运动协调力降低;在病理生理上能够减少 α-syn 蛋白的过度表达和积聚,防止神经毒素诱导的多巴胺神经细胞凋亡发生,减轻多巴胺神经元的损害,对多巴胺神经元起到保护作用。

研究表明,采用免疫治疗可以有效减少细胞外异常聚集的蛋白质,如 Aβ 蛋白、亨廷顿蛋白、膜缔合分子阮病毒蛋白等[8-13]。α-syn 转基因小鼠免疫研究证实,免疫治疗可以减少 α-syn 蛋白在突触内的积聚[14]。因此,近年来陆续开展了免疫对帕金森病神经保护性作用的研究。Benner、Kurkowska 等[15,16]首先使用共聚物-1 细胞、少突胶质细胞髓鞘糖蛋白等免疫可以较好缓解 MPTP 对纹状体中 DA 能神经纤维和黑质细胞体的损害作用。Masliah 等[17]用重组人类质粒表达的人 α-syn 蛋白接种人 α-syn 过表达转基因小鼠,有效减少 α-syn 在多巴胺能神经元和突触的聚集。但是,众多研究都集中于对慢性模型的治疗效果研究,而忽视于对亚急性损害的防护作用。因此,本研究主要集中于对亚急性 MPTP 小鼠模型的预防效果。实验结果显示优化 hα-syn 基因疫苗预防注射可以有效改善神经毒素 MPTP 对小鼠行为学的影响;一定程度上减少 α-突触核蛋白的聚集,防止神经毒素对小鼠黑质多巴胺神经元的损害,减少多巴胺细胞凋亡。

MPTP 引起小鼠 SNc 内多巴胺能神经元明显减少,是目前研究 PD 发生机制的经典模型[18-20]。虽然这些研究都以 MPTP 造成小鼠 DA 神经元损伤,但损伤的方式不尽相同,在时程上可分为急性、亚急性、慢性模型[21]。亚急性模型 MPTP 注射剂量多为每次 30 mg/kg,每日 1 次,连续注射 5 d[22,23]。C57/BL6 雄性小鼠是对 MPTP 敏感的小鼠品系,因此被用作该研究模型的小鼠[24]。

本课题组前期完成了 hα-syn 蛋白核酸疫苗 pVAX1-hαS1-140 的构建,并且在 COS-7 细胞内表达[4],在随后的动物实验研究发现,hα-syn 核酸疫苗可有效减少 MPTP 诱导的多巴胺神经损害,显示了对帕金森病动物模型有较好的治疗作用[5]。为了进一步提高免疫效应以达到对黑质多巴胺细胞的更好保护作用,因此在此次疫苗全长的基础上,我们同时增加 Ig Kappa 信号肽基因片段,来增加免疫细胞分泌功能,通过多功能基因重组制备出一种复合疫苗,成功构建 pVAX1-Igk-hαS1-140 分泌型基因疫苗,通过肌肉注射取得了较好的增强免疫效应。Igk 信号肽有较好的促进基因分泌作用[25,26]。有研究表明,用白细胞介素-1 受体拮抗剂的信号肽、一种人工信号肽和小鼠抗体 Kappa 链信号肽,分别构建 HPO 分泌型表达载体,前2种信号肽引导 HPO 分泌的效率很低,只有来自小鼠抗体 Kappa 链的信号肽能够高效引导 HPO 从细胞中分

泌出来,分泌蛋白以二聚体形式存在[27]。本研究结果证明 Ig Kappa 信号肽基因与 hα-syn 基因重组表达,可以有效减轻多巴胺神经元的应激损害,减少多巴胺神经细胞的凋亡。结果还表明,免疫治疗可以提高行为学的缺陷。但是具体的免疫保护机制、改善与提高免疫强度、减少免疫炎性反应改变情况尚有待进一步论证。

总之,hα-syn 优化基因疫苗能够较好的防止神经毒素对黑质细胞的损害,减少多巴胺神经细胞的凋亡作用,对帕金森病小鼠神经损害有更好的免疫防护与保护作用。

参考文献:

[1] Petroske E, Meredith G E, Callen S, *et al*. Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment[J]. Neuroscience, 2001, 106(3): 589 – 601.

[2] Gorbatyuk O S, Li S, Sullivan L F, *et al*. The phosphorylation state of Ser-129 in human alpha-synuclein determines neurodegeneration in a rat model of Parkinson disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(2): 763 – 768.

[3] Amer D A, Irvine G B, El-Agnaf O M. Inhibitors of alpha-synuclein oligomerization and toxicity: a future therapeutic strategy for Parkinson's disease and related disorders[J]. Exp Brain Res, 2006, 173(2): 223 – 233.

[4] 王加才, 王少君, 彭国光, 等. hα-syn 蛋白核酸疫苗 pVAX1-hαS1-140 的构建及其表达[J]. 重庆医学, 2008, 37(17): 1953 – 1955.

[5] 王少君, 王加才, 彭国光, 等. 含 CpG 基元核酸疫苗免疫慢性 MPTP 帕金森病小鼠的治疗作用[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(3): 179 – 182.

[6] Ogawa N, Hirose Y, Ohara S, *et al*. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice[J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1985, 50(3): 435 – 441.

[7] Matsuura K, Kabuto H, Makino H, *et al*. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion[J]. J Neurosci Methods, 1997, 73(1): 45 – 48.

[8] Schenk D, Barbour R, Dunn W, *et al*. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse [J]. Nature, 1999, 400(6740): 173 – 177.

[9] Games D, Bard F, Grajeda H, *et al*. Prevention and reduction of AD-type pathology in PDAPP mice immunized with A beta 1-42[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 920: 274 – 284.

[10] Luthi-Carter R. Progress towards a vaccine for Huntington's disease [J]. Mol Ther, 2003, 7(5Pt 1): 569 – 570.

[11] Miller T W, Shirley T L, Wolfgang W J, *et al*. DNA vaccination against mutant huntingtin ameliorates the HDR6/2 diabetic phenotype [J]. Mol Ther, 2003, 7: 572 – 579.

[12] Bainbridge J, Walker B. Cell mediated immune responses against human prion protein[J]. Clin Exp Immunol, 2003, 133(3): 310 – 317.

[13] Sigurdsson E M, Brown D R, Daniels M, *et al*. Immunization delays the onset of prion disease in mice[J]. Am J Pathol, 2002, 161(1): 13 – 17.

[14] Masliah E, Hashimoto M. Development of new treatments for Parkinson's disease in transgenic animal models: a role for beta-synuclein [J]. Neurotoxicology, 2002, 23(4 – 5): 461 – 468.

[15] Benner E J, Mosley R L, Destache C J, *et al*. Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(25): 9435 – 9440.

[16] Kurkowska-Jastrzebska I, Balkowiec-Iskra E, Joniec I, *et al*. Immunization with myelin oligodendrocyte glycoprotein and complete Freund adjuvant partially protects dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced damage in mouse model of Parkinson's disease[J]. Neuroscience, 2005, 131(1): 247 – 254.

[17] Masliah E, Rockenstein E, Adame A, *et al*. Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Neuron, 2005, 46(6): 857 – 868.

[18] Fornai F, Schluter O M, Lenzi P, *et al*. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: JP2convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(9): 3413 – 3418.

[19] Potashkin J A, Kang U J, Loomis P A, *et al*. MPTP administration in mice changes the ratio of splice isoforms of fosB and rgs9[J]. Brain Res, 2007, 1182: 1 – 10.

[20] 陈晓宇, 陈晓蓉, 李　俊, 等. 帕金森病大鼠中脑腹侧被盖区多巴胺能神经元的改变[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2005, 40(6): 1064 – 1066.

[21] Vila M, Vukosavic S, Jackson-Lewis V, *et al*. Alpha-synuclein upregulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP[J]. J Neurochem, 2000, 74(2): 721 – 729.

[22] Meredith G E, Sonsalla P K, Chesselet M F. Animal models of Parkinson's disease progression[J]. Acta Neuropathol, 2008, 115(4): 385 – 398.

[23] Meredith G E, Totterdell S, Potashkin J A, *et al*. Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2008, 14 (Suppl 2): S112 – S115.

[24] 梁亚杰, 李淑蓉, 苏炳银. MPTP 致小鼠黑质致密部多巴胺能神经元损伤及定量研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(5): 454 – 457.

[25] Beerens A M, Rots M G, Bermudez B, *et al*. Secretion of thymidine kinase to increase the effectivity of suicide gene therapy results in the loss of enzymatic activity[J]. J Drug Target, 2008, 16(1): 26 – 35.

[26] Okura Y, Miyakoshi A, Kohyama K, *et al*. Nonviral Abeta DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease: long-term effects and safety [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(25): 9619 – 9624.

[27] 周淑萍, 王清明, 吴祖泽. 有效引导肝细胞生成素分泌的外源信号肽的确定[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(7): 1390 – 1393.

(编辑　汪勤俭)