论著

文章编号:1000-5404(2011)14-1432-05

鱼藤酮和MPTP慢性帕金森病小鼠黑质共同差异蛋白研究

周长青,杨 旭,杨云鹏,万金城,赵臣勇,彭国光 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科)

[摘要] **目的** 通过比较鱼藤酮和1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,MPTP)两种慢性帕金森病(Parkinson's disease,PD)模型小鼠与对照组小鼠黑质蛋白表达谱,找出两种PD模型小鼠共同的差异蛋白,探索筛选出PD的疾病特异性蛋白。**方法** 构建鱼藤酮和MPTP慢性PD小鼠模型组以及其各自的对照组1和对照组2,并进行行为学评价以及黑质酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)免疫组化。分别挖取黑质,提取总蛋白,进行双向凝胶电泳。运用PDQuest 8.0图像分析软件对鱼藤酮组与对照组1、MPTP与对照组2的电泳图谱分别进行分析,找出各自的差异表达蛋白。差异蛋白酶切后,MALDI-TOF-MS进行质谱鉴定。最后将所得到的肽质量指纹图(PMF)进行数据库搜索以及生物信息学分析。**结果** 鱼藤酮组与对照组1、MPTP组与对照组2小鼠间行为学差异具有统计学意义($P<0.05$),且黑质TH阳性细胞计数差异也具有统计学意义($P<0.05$)。鱼藤酮组与对照组1比较发现有22个差异蛋白,MPTP组与对照组2比较发现有28个差异蛋白,其中有7个为共同的差异蛋白。我们成功鉴定其中3个共同的差异蛋白:PPP2R1A、吡哆醛激酶、peroxiredoxin-2。**结论** 鉴定出3个在PD蛋白质组学中少见报道的蛋白。这些蛋白水平的上调或下调可能与PD的发病密切相关,可作为PD的疾病特异性蛋白。

[关键词] 慢性帕金森病小鼠模型;蛋白质组学;疾病特异性蛋白

[中图法分类号] R-332;R742.5;R341 [文献标志码] A

Common differentially expressed proteins in substantia nigra of mouse models with chronic Parkinson's disease induced by rotenone and MPTP

Zhou Changqing, Yang Xu, Yang Yunpeng, Wan Jincheng, Zhao Chenyong, Peng Guoguang (Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To search for the common differentially expressed proteins in the substantia nigra of mouse models with Parkinson's disease (PD) induced by rotenone and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), and to screen out the disease-specific proteins (DSPs) of PD. **Methods** Forty-eight mice were randomly divided into a rotenone group and its control group 1, as well as an MPTP group and its control group 2. In the rotenone group and MPTP group, rotenone and MPTP were given separately by injection to construct mouse models with chronic PD. Behavioral evaluation of the mice in the four groups was performed, and immunohistochemistry was carried out to detect the tyrosine hydroxylase (TH)-positive cells in the substantia nigra. Proteins were extracted from the substantia nigra and subjected to two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoretogram analysis was performed using PDQuest 8.0 to find out the differentially expressed proteins between the rotenone group and control group 1 and between the MPTP group and control group 2. The differentially expressed proteins, after digestion, were subjected to MALDI-TOF-MS to obtain their peptide mass fingerprints for searching in a database and biological information analysis. **Results** There were significant behavioral differences between the rotenone group and control group 1 and between the MPTP group and control group 2 ($P<0.05$). The numbers of TH-positive cells also showed significant differences between the rotenone group and control group 1 and between the MPTP group and control group 2 ($P<0.05$). Twenty-two differentially expressed proteins were found between the rotenone group and control group 1, and twenty-eight were found between the MPTP group and control group 2, with seven common differentially expressed proteins. Three of the seven common differentially expressed proteins, PPP2R1A, pyridoxal kinase and peroxiredoxin-2, were identified in the database. **Conclusion** Three common differentially expressed proteins, not reported in the previous

[基金项目] 国家自然科学基金(30370499)

[通信作者] 彭国光,电话:(023)89014069,E-mail: penwan233@sina.com

proteomic research on PD, are identified. Their up-regulated or down-regulated expression may be intimately related to the pathogenesis of PD. The three common differentially expressed proteins may be DSPs of PD.

[**Key words**] chronic mouse models of Parkinson's disease; proteomics; disease-specific proteins

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370499). Corresponding author: Peng Guoguang, Tel: 86-23-89014069, E-mail: penwan233@sina.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经变性疾病。我国65岁以上老年人中患病率约为2%,且随年龄增长有增加的趋势[1]。但是,PD的病因和发病机制十分复杂,至今仍未完全阐明;还没有特异敏感的生化指标和影像学改变可作为临床确诊PD的依据。

目前大量致力于PD的蛋白质组学研究,是希望发现疾病特异性蛋白(disease-specific proteins, DSPs)作为PD早期诊治的依据[2]。因临床上脑组织取材困难,目前PD特异性蛋白的研究主要集中在脑脊液和血液等其他体液上。动物模型也以单个、急性、转基因模型为主,尚未发现一种或一组与PD密切相关的特异性蛋白可以作为诊断标记物[3-4]。慢性PD动物模型取材方便,其病理改变更接近临床PD患者[5]。但国内外目前对多个、慢性PD动物模型的蛋白质组学研究较少。本研究突破传统的单个、急性PD动物模型蛋白质组学的研究模式,以本课题组前期鱼藤酮和1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)慢性PD小鼠模型的成功构建和小鼠黑质双向凝胶电泳的成功优化为基础[6-7],期望寻找鱼藤酮和MPTP两种慢性PD小鼠模型黑质共同的差异蛋白质,来筛选出与PD发病相关的DSPs,为深入研究其发病机制和新的药物作用靶点奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 鱼藤酮、二甲基亚砜(DMSO)、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)(Sigma公司),兔抗小鼠酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)多克隆抗体、免疫组化检测试剂盒(武汉博士德),尿素、硫脲、二硫苏糖醇(DTT)、3-[(3-胆碱胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、碘乙酰胺(IAA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵(APS)、三氯醋酸(TCA)、碳酸钠、五水硫代硫酸钠(BBI公司),clean-up kit试剂盒、固相pH梯度(IPG)pH 4~7的17 cm胶条以及Bio-Lyte(Bio-Rad公司),40%丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺、Bradford蛋白定量试剂盒(上海生物工程有限公司)。

1.1.2 主要仪器 第一向等电聚焦单元以及其组件垂直电泳系统(PROTEAN Ⅱ Cell)、PDQuest2D图像分析软件、CCD成像仪ChemiDoc XRS均购自美国Bio-Rad公司,酶标仪Multiskan spectrum以及Forma控温摇床420型均购自Thermo公司。

1.1.3 标本来源 健康、雄性、8周龄的C57/BL6系小鼠50只,清洁级,体质量18~22 g,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 48只小鼠按随机数字表法随机分为鱼藤酮组和其对照组1、MPTP组和其对照组2。5只/笼,自由饮水取食,每天保持12 h明暗环境,室温(20±2)℃。

1.2.2 模型构建 小鼠适应环境1周后,鱼藤酮组以1 mg/kg鱼藤酮(鱼藤酮:DMSO:生理盐水为1 g:3.5 L:0.5 L)背部皮下注射,每天1次,连续注射40 d;对照组1经相同方式给予同体积的DMSO和生理盐水混合液(DMSO:生理盐水为3.5 L:0.5 L)。MPTP组先在腹腔注射丙磺舒250 mg/kg(丙磺舒:0.1 mol/L的NaOH为1 g:40 ml),30 min后,以25 mg/kg MPTP(MPTP:生理盐水为0.1 g:40 ml)背部皮下注射,2次/周,连续5周。对照组2先同MPTP组注射丙磺舒,30 min后,在背部皮下注射同体积的生理盐水,2次/周,连续5周。

1.2.3 行为学观察

1.2.3.1 一般活动 每天观察各组是否出现类似PD样症状。

1.2.3.2 自由活动(open-field test)计数 实验均在末次注射后第2天观察。参照Kawai等[8]的测试方法,自制30 cm×30 cm×15 cm的玻璃盒,底部划出6 cm×6 cm的格子,在安静、光线较暗的环境中检测。小鼠适应环境10 min后,计数5 min内小鼠移动的格子数和站立的次数,连续测5次取平均值。

1.2.4 免疫组化 各组在完成末次注射后第3天取材。在3.5%水合氯醛麻醉后,开胸以4%的多聚甲醛灌注固定、取脑,石蜡包埋、黑质部连续冠状位切片。免疫组化染色:切片脱蜡至水,微波热修复抗原,PBS冲洗,血清封闭后,滴加TH多克隆抗体(1:150),4 ℃过夜;PBS冲洗后加生物素的二抗工作液37 ℃孵育20 min;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液37 ℃孵育20 min,冲洗后用3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色。梯度脱水、透明、封片后分析结果。

1.2.5 双向电泳

1.2.5.1 黑质蛋白提取以及蛋白定量 小鼠麻醉后,迅速开胸,以冰生理盐水灌注,断头,冰上快速分离脑组织,参照小鼠解剖图谱[9]及Heffner等[10]的方法挖取黑质。提取黑质蛋白:①将称量后的黑质剪碎,放入机械匀浆器中。向裂解液[2 mol/L硫脲、7 mol/L尿素、40 mol/L Tris-base、4%(质量体积分数)CHAPS]中加入PMSF(终浓度为1 mmol/L)再加入匀浆器中,在冰浴中对组织进行匀浆数分钟,然后向其中加入含有DTT(终浓度为65 mmol/L)的裂解液继续匀浆。②用EP管收集匀浆液,在冰浴中进行超声匀浆(100 W,超声4 s,间隔6 s,总时间3 min)至液体澄清。③再加入RNaseA,DNase Ⅰ 4 ℃冰箱作用30 min。然后40 000×g,4 ℃,离心30 min。注意避开脂质层,吸去中层清亮液体作为蛋白粗提物。再用clean-up试剂盒对蛋白粗提物进行预处理。④最后采用改良Bradford法

进行蛋白定量。

1.2.5.2 一向 IPG-IEF 以 IPG-IEF 为第一向。从 -80 ℃冰箱中取样本室温溶解,取 180 μg 蛋白加入上样水化液[2 mol/L 硫脲、7 mol/L 尿素、4%(质量体积分数) CHAPS、0.2% Bio-Lyte、65 mmol/L DTT、痕量溴酚蓝]使总体积为 400 μl。采用被动水化的方式进行上样。设置等电聚焦电压:水化 12 h,250 V,0.5 h;500 V,1 h;1 000 V,2 h;5 h 线性升压至 10 000 V 后,10 000 V 维持,使总电压时间为 60 000 Vh。

1.2.5.3 平衡与二向 SDS-PAGE 将等电聚焦后的 IPG 胶条置于 5 ml 平衡缓冲液Ⅰ(6 mol/L 尿素、2% SDS、0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8、2% DTT、20%甘油)中摇床振荡平衡 15 min;再换用平衡缓冲液Ⅱ(6 mol/L 尿素、2% SDS、0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8、2.5% IAA、20%甘油)振荡平衡 15 min。将平衡好的胶条转移至 12% 的聚丙烯酰胺凝胶上端,上部用 0.5% 低熔点琼脂糖封胶。设置 SDS-PAGE 电泳参数进行二向垂直电泳。

1.2.5.4 凝胶染色 凝胶采用室温进行固定过夜、增敏、硝酸银染色、显色,显色满意后立即加终止液终止,保存。

1.2.5.5 凝胶扫描与图像分析 双向电泳凝胶采用 GS-800 Calibrated Densitometer 图像扫描仪透射扫描,将扫描后的图像在用 PDQuest 8.0 双向凝胶分析软件进行均一化、蛋白点检测、匹配、获取差异点等分析。

1.2.6 质谱分析以及数据库搜索 将差异蛋白点从胶上切下置于 EP 管中,进行脱色、干燥、酶解,再加入基质和质谱靶点样。制备好的样品用美国 ABI 公司的 Voyager DE-PROMAL-DI-TOF 质谱分析仪进行分析,得到的肽质量指纹谱数据(http://www.matrixscience.com)进行数据库搜索。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 慢性 PD 小鼠模型

2.1.1 一般活动 鱼藤酮组和 MPTP 组小鼠在给药均出现竖毛、震颤、自发活动减少、对刺激逃避反应低下等表现。随着注射时间的延长,上述症状越来越明显,而且持续时间也越来越长,但在第 2 天均能恢复。对照组 1 和对照组 2 小鼠在则无明显上述改变。

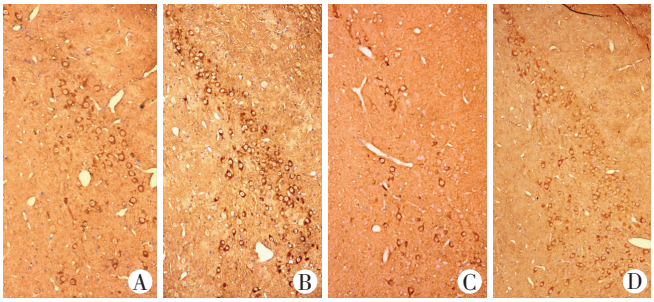
2.1.2 自由活动计数 鱼藤酮组和 MPTP 组分别较对照组 1 和对照组 2 小鼠移动的格子数和站立的次数明显减少($P<0.05$),而鱼藤酮组与 MPTP 组,对照组 1 与对照组 2 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 实验组和对照组小鼠自由活动计数(次,$n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	移动格子数	站立次数
鱼藤酮组	59.34 ± 4.36^{a}	19.66 ± 1.65^{a}
对照组 1	93.02 ± 7.20	27.52 ± 3.51
MPTP 组	60.14 ± 3.06^{b}	20.02 ± 1.44^{b}
对照组 2	94.68 ± 6.37	26.88 ± 2.37

a:$P<0.05$,与对照组 1 比较;b:$P<0.05$,与对照组 2 比较

2.1.3 免疫组化 鱼藤酮组和 MPTP 组较对照组 1 和对照组 2 小鼠中脑黑质 TH 阳性细胞细胞质染色较浅,细胞数明显减少(图 1)。鱼藤酮组和对照组 1 TH 阳性细胞计数分别为(41.00 ± 2.00)、(105.67 ± 3.51)个;MPTP 组和对照组 2 TH 阳性细胞计数分别为(41.67 ± 1.53)、(106.67 ± 2.52)个。鱼藤酮组和对照组 1、MPTP 组和对照组 2 TH 免疫反应阳性神经元计数均有统计学差异($P<0.05$),而鱼藤酮组和 MPTP 组、对照组 1 和对照组 2 间均无统计学差异($P>0.05$)。

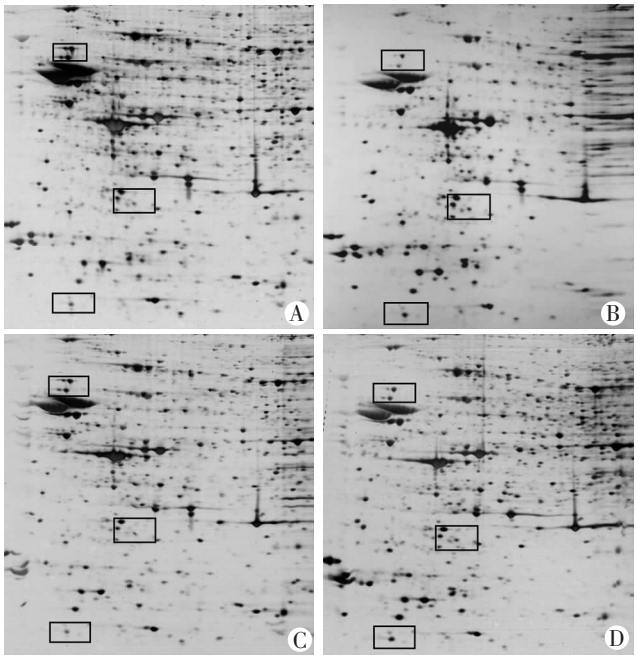


A:鱼藤酮组;B:对照组 1;C:MPTP 组;D:对照组 2

图 1 各组小鼠黑质致密区 TH 免疫组织化学染色 (ABC 法 ×100)

2.2 双向电泳

2.2.1 黑质双向电泳图谱 将得到的 2-DE 图谱通过 PDQuest 8.0 软件进行分析,鱼藤酮组检测到(1 251 ± 36)个蛋白质点,对照组 1 检测到(1 233 ± 35)个蛋白质点,两组比较发现共有 22 个差异蛋白点,其中 12 个蛋白点上调,10 个蛋白点下调。MPTP 组检测到(1 273 ± 47)个蛋白质点,对照组 2 检测到(1 287 ± 39)个蛋白质点,两组比较发现共有 28 个差异蛋白点,其中 10 个蛋白点上调,18 个蛋白点下调。比较两组差异蛋白点发现共同的差异蛋白点有 7 个,其中有 3 个蛋白点上调,4 个蛋白点下调。见图 2。

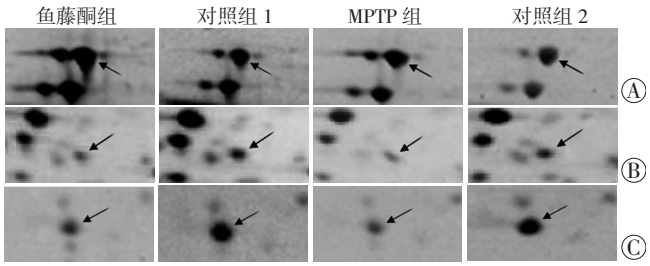


A:鱼藤酮组;B:对照组 1;C:MPTP 组;D:对照组 2 左上角、中间、左下角方框分别为 PPP2R1A、吡哆醛激酶、peroxiredoxin-2(Prx2)在图谱中的位置

图 2 各组小鼠黑质全蛋白 2-DE 图谱

2.2.2 质谱分析以及数据库检索 将差异蛋白点送质谱分析后进行数据库检索成功鉴定出 3 个共同的差异蛋白,其中

PPP2R1A 在 PD 模型组中上调,Prx2 和吡哆醛激酶在 PD 模型组中下调。见图3。



A:PPP2R1A 在图谱中位置;B:吡哆醛激酶在图谱中位置;C:Prx2 在图谱中位置

图3 各组差异蛋白在图谱中的位置 (箭头示)

3 讨论

蛋白质组学不仅直接研究生命活动的功能执行者——蛋白质,而且更符合系统生物学的观点,目前被广泛应用于生命科学研究的各个领域,尤其是人类重大疾病生物标志物和药物靶点的研究。而 PD 的蛋白质组学研究主要集中在单个、急性、转基因模型的研究中,采用能更好代表 PD 病理改变的慢性、多个模型的研究却很少。

鱼藤酮和 MPTP 是目前帕金森病动物模型中运用较多的神经毒物[11]。鱼藤酮和 MPTP 两种慢性 PD 小鼠模型病理改变更接近临床 PD,但二者的致病机制有所不同,因此对这两种 PD 模型的比较分析所寻找到的共同差异蛋白,有可能代表了疾病共同作用的靶点。本研究在前期研究的基础上[6-7],突破传统的蛋白质组学研究模式,分别比较了 MPTP 和鱼藤酮两种慢性 PD 小鼠模型组与对照组蛋白表达谱的差异蛋白,并对两组的差异蛋白作进一步比较,筛选出其中 3 个共同的差异蛋白作为 PD 的 DSPs。

3.1 PPP2R1A

PPP2R1A 即丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 2A 65 × 10^3调节亚基 α 亚型,属于蛋白磷酸酶 2A 调节 α 亚基家族。PPP2R1A 自身作为调节 A 亚基与含有共同异构核心酶催化 C 亚基共同组成蛋白磷酸酶 2A(PP2A)。PP2A 为丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酯酶家族成员,与蛋白激酶一起参与细胞内磷酸化与去磷酸化的调控。

PP2A 在细胞凋亡中起着十分重要的作用[12]。Chatfield 等[13]使用较大剂量丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 2A 抑制剂能阻止茴香素诱导的细胞凋亡。其具体机制可能与抑制剂能阻止 Bax 移位到线粒体有关,也就是说 PP2A 的靶点是促凋亡因子的激活,其作用早于 Bcl-2 家族。有研究显示,PP2A 通过影响 Bcl-2 家族蛋白在转录或翻译后的磷酸化,来实现对细胞凋亡的调控[14]。在咖啡酸苯乙酯(CAPE)介导的 CCRF-CEM 细胞凋亡研究中发现,PP2A 抑制剂与 CAPE 有协同促凋亡作用。在检测到 PP2A 亚基下调的同时,还检测到端粒酶逆转录酶活性下降,因此 PP2A 可能是通过影响端粒酶逆转录酶活性来参与细胞的凋亡[15]。Chung 等[16]发现,PP2A 参与了 6-OHDA 介导的 PD 发病。G-substrate 是 PP2A 脑内过度表达的内源性抑制剂,可减轻 6-OHDA 的神经毒作用。当敲出 G-substrate 后,则可加重 6-OHDA 的神经毒作用。这也与黑质区 DA 神经元 G-substrate 表达少,易受 6-OHDA 影响;腹侧被盖区 G-substrate 表达多,不易受影响相一致。进一步的研究证实,6-OHDA 可能通过激活 PP2A 降低 Akt、糖原合酶激酶 3β 和细胞外信号调节激酶 2 的磷酸化水平,来介导 PD 的发病。

本实验 PPP2R1A 在鱼藤酮组和 MPTP 组慢性 PD 小鼠模型中均出现了明显的上调。PPP2R1A 作为 PP2A 调节亚基,对 PP2A 正常水平的抑制,能减少细胞的凋亡和 6-OHDA 的神经毒性作用。我们认为,PPP2R1A 上调可降低相关激酶的磷酸化水平,促进凋亡的发生,参与 PD 的发病,很有可能是 PD 的 DSPs。

3.2 吡哆醛激酶

吡哆醛激酶属于维生素 B6 激酶家族,主要分布在细胞质,参与维生素 B6 的代谢。在辅因子锌或者镁的参与下,吡哆醛激酶通过转磷作用合成 5-磷酸吡哆醛。5-磷酸吡哆醛是维生素 B6 中唯一有活性的形式,作为辅因子参与氨基酸、脂肪的代谢和糖原异生。研究证实,维生素 B6 能减轻 PD 的发病[17]。

Sorolla 等[18]对亨廷顿舞蹈病(HD)的研究发现,HD 患者以及其模型鼠脑中均有吡哆醛激酶的氧化,进而使 5-磷酸吡哆醛合成减少,最终影响 GABA 和多巴胺的合成,参与神经变性过程。一项多中心临床研究分析了 PD 患者黑质的全基因表达谱与标记 SNPs 差异表达基因,发现编码吡哆醛激酶 PDXK 基因的变异增加了 PD 的发病[19]。

本研究也发现,鱼藤酮和 MPTP 两种慢性 PD 小鼠模型,吡哆醛激酶均出现了明显下调。吡哆醛激酶可能是 PD 的 DSPs。

3.3 peroxiredoxin-2

peroxiredoxins(Prxs)蛋白是近年新发现的一类硫氧还蛋白依赖性过氧化物酶,其蛋白序列和催化活性与其他抗氧化剂不同。Prxs 在蛋白和脂质抗氧化损伤、细胞增殖与分化、凋亡调控中发挥着重要的作用[20]。Prx2 属于典型 2 个半胱氨酸 Prxs 类,由 198 个氨基酸组成,主要位于细胞质中,心、脑、肾等多种组织中均有表达。

文献[21]报道,在胶质瘤细胞对抗癌症治疗的耐

受中,Prx2 过度表达对活性氧类物质(ROS)的防御起着重要的作用。Prx2 基因敲出细胞对氧化应激非常脆弱。Prx2 通过增加细胞内 ROS,抑制谷胱甘肽还原酶活性,减少谷胱甘肽的生成,最终提高细胞对电离辐射治疗的敏感性。因此,Prx2 可作为胶质瘤治疗的新靶点。Lim 等[22]研究发现,Prx2 参与了甲醛引起的肺上皮细胞凋亡。给予甲醛 24 h 和 48 h 后,Prx2 减少,同时观察到细胞凋亡。而 Prx2 过度表达就可阻止甲醛引起的凋亡。Prx2 过度表达可阻断甲醛引起的促凋亡蛋白 Bax 的增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 减少,以及凋亡相关蛋白的变化。Prx2 抗凋亡作用还与 p38MAPK 通路相关。对 PD 的研究还发现[23],Prx2 的 C51 和 C172 残基被 NO 硝基化后,所形成的 SNO-Prx2 将失去 Prx2 酶的活性,丧失在氧化应激中清除过氧化物的保护作用。同时,PD 患者脑中也发现 SNO-Prx2 增高。

本研究表明,Prx2 在鱼藤酮组中和 MPTP 组中均出现了明显下调。研究证实,氧化应激是 PD 发病的重要中间环节。Prx2 作为细胞内重要的过氧化物酶,参与抗氧化、抗凋亡等过程。Prx2 在两个 PD 模型组中均出现下调,极有可能是 PD 的 DSPs。

总之,本课题运用鱼藤酮和 MPTP 两种慢性 PD 模型,进一步筛选出 3 个共同的差异蛋白作为 PD 的特异性蛋白。在 PD 相关蛋白质组学研究中,这 3 个蛋白尚少见报道。其详尽的作用机制尚有待于后期工作深入研究。从多个模型或疾病的多个阶段深入研究疾病的特异性蛋白为蛋白质组学的研究开创了一种新的研究模式,将有助于 PD 的生物标志物的发现以及新的药物靶点的研究。

参考文献:

[1] Zhang Z X, Roman G C, Hong Z, *et al*. Parkinson's disease in China: prevalence in Beijing, Xian, and Shanghai[J]. Lancet, 2005, 365(9459): 595 - 597.

[2] Pienaar I S, Daniels W M, Gotz J. Neuroproteomics as a promising tool in Parkinson's disease research[J]. J Neural Transm, 2008, 115(10): 1413 - 1430.

[3] Antoniades C A, Barker R A. The search for biomarkers in Parkinson's disease: a critical review[J]. Expert Rev Neurother, 2008, 8(12): 1841 - 1852.

[4] Sowell R A, Owen J B, Butterfield D A. Proteomics in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. Ageing Res Rev, 2009, 8(1): 1 - 17.

[5] 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.

[6] 万金城, 张玉平, 龙汉春, 等. 鱼藤酮对慢性帕金森病小鼠中脑黑质致密部 α-突触核蛋白表达的影响[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(6): 667 - 670.

[7] 周长青, 龙汉春, 陈莹, 等. 小鼠黑质双向凝胶电泳技术的优化[J]. 生物技术通报, 2010, (12): 178 - 181, 185.

[8] Kawai H, Makino Y, Hirobe M, *et al*. Novel endogenous 1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline derivatives: uptake by dopamine transporter and activity to induce parkinsonism[J]. J Neurochem, 1998, 70(2): 745 - 751.

[9] Paxinos G, Franklin K B J. The mouse brain in stereotaxic coordinates[M]. 2nd ed. California: Academic Press, 2001: 349 - 347.

[10] Heffner T G, Hartman J A, Seiden L S. A rapid method for the regional dissection of the rat brain[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1980, 13(3): 453 - 456.

[11] 梁亚杰, 李淑蓉, 苏炳银, 等. 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.

[12] Garcia A, Cayla X, Guergnon J, *et al*. Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis[J]. Biochimie, 2003, 85(8): 721 - 726.

[13] Chatfield K, Eastman A. Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A differentially prevent intrinsic and extrinsic apoptosis pathways[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(4): 1313 - 1320.

[14] Huang S T, Cidlowski J A. Phosphorylation status modulates Bcl-2 function during glucocorticoid-induced apoptosis in T lymphocytes[J]. FASEB J, 2002, 16(8): 825 - 832.

[15] Avci C B, Sahin F, Gunduz C, *et al*. Protein phosphatase 2A (PP2A) has a potential role in CAPE-induced apoptosis of CCRF-CEM cells *via* effecting human telomerase reverse transcriptase activity[J]. Hematology, 2007, 12(6): 519 - 525.

[16] Chung C Y, Koprich J B, Endo S, *et al*. An endogenous serine/threonine protein phosphatase inhibitor, G-substrate, reduces vulnerability in models of Parkinson's disease[J]. J Neurosci, 2007, 27(31): 8314 - 8323.

[17] De-Lau L M, Koudstaal P J, Witteman J C, *et al*. Dietary folate, vitamin B12, and vitamin B6 and the risk of Parkinson disease[J]. Neurology, 2006, 67(2): 315 - 318.

[18] Sorolla M A, Rodriguez-Colman M J, Tamarit J, *et al*. Protein oxidation in Huntington disease affects energy production and vitamin B6 metabolism[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(4): 612 - 621.

[19] Elstner M, Morris C M, Heim K, *et al*. Single-cell expression profiling of dopaminergic neurons combined with association analysis identifies pyridoxal kinase as Parkinson's disease gene[J]. Ann Neurol, 2009, 66(6): 792 - 798.

[20] Chen V T, Huang C L, Lee Y C, *et al*. The roles of the thioredoxin system and peroxiredoxins in 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma cells[J]. Toxicol *In Vitro*, 2010, 24(6): 1577 - 1583.

[21] Smith-Pearson P S, Kooshki M, Spitz D R, *et al*. Decreasing peroxiredoxin Ⅱ expression decreases glutathione, alters cell cycle distribution, and sensitizes glioma cells to ionizing radiation and H(2)O(2)[J]. Free Radic Biol Med, 2008, 45(8): 1178 - 1189.

[22] Lim S K, Kim J C, Moon C J, *et al*. Formaldehyde induces apoptosis through decreased Prx 2 *via* p38 MAPK in lung epithelial cells[J]. Toxicology, 2010, 271(3): 100 - 106.

[23] Fang J, Nakamura T, Cho D H, *et al*. S-nitrosylation of peroxiredoxin 2 promotes oxidative stress-induced neuronal cell death in Parkinson's disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(47): 18742 - 18747.

(**收稿**:2010-12-27;**修回**:2011-01-30)

(编辑 王小寒)