DOI:10.16016/j.1000-5404.201504025

论著

pVAX1-IL-4/SYN-B 核酸疫苗对帕金森病模型小鼠纹状体神经营养因子表达的影响

陈亚兰,雷 朋,张玉平,楼金核,鲁凤娇,贾 桢,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** 探索预防注射 pVAX1-IL-4/SYN-B 核酸疫苗对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的慢性帕金森病模型小鼠纹状体神经营养因子表达的影响,进一步探讨核酸疫苗神经保护作用的具体机制。**方法** 48 只 C57BL/6 雄性小鼠完全随机分为 4 组:正常对照组、空质粒组、PBS 组和核酸疫苗组,每组 12 只;分别肌注 PBS、空质粒、PBS 和 pVAX1-IL-4/SYN-B 核酸疫苗,然后给予后 3 组小鼠注射 MPTP 建立慢性帕金森病模型。采用自由活动实验观察小鼠行为学变化;Western blot、免疫组化检测纹状体区酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)表达;Western blot 检测小鼠纹状体胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor,BDNF)表达。**结果** 与 PBS 组和空质粒组比较,核酸疫苗组小鼠运动迟缓症状明显改善($P<0.05$),纹状体区 GDNF、BDNF 表达升高($P<0.05$),TH 丢失明显减少($P<0.05$)。**结论** pVAX1-IL-4/SYN-B 核酸疫苗预防免疫可增加慢性 MPTP 帕金森病模型小鼠纹状体区神经营养因子表达,具有一定的神经保护作用。

[关键词] 帕金森病;核酸疫苗;神经营养因子
[中图法分类号] R341;R392.7;R742.5 [文献标志码] A

Effect of pVAX1-IL-4/SYN-B DNA vaccine on expression of neurotrophic factors in MPTP-induced chronic Parkinson's disease mice

Chen Yalan, Lei Peng, Zhang Yuping, Lou Jinhe, Lu Fengjiao, Jia Zhen, Peng Guoguang (Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the effect of pVAX1-IL-4/SYN-B DNA vaccines on the expression of neurotrophic factors in the striatum of mice with chronic Parkinson's disease (PD) induced with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group, blank plasmid group, PBS group, and DNA vaccine group ($n=12$ for each group). The anterior tibial muscles of the mice hind leg were injected with PBS, empty plasmid, PBS, and pVAX1-IL4/SYN-B, respectively. Then the chronic PD mice were built by intraperitoneal injection of MPTP, while the normal control group was injected with the same volume of PBS. The behavior changes of the mice were observed. The expression of tyrosine hydroxylase (TH) in the striatum of mice was detected by Western blotting and immunohistochemistry, and the expression of glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the striatum was detected by Western blotting. **Results** Compared with the PBS group or blank plasmid group, the DNA vaccine group showed improved motor symptoms ($P<0.05$), reduced TH loss ($P<0.05$), and increased expression of GDNF and BDNF ($P<0.05$). **Conclusion** The pVAX1-IL-4/SYN-B DNA vaccine shows neuroprotective effect in MPTP-induced chronic PD mice by enhancing the expression of neurotrophic factors GDNF and BDNF in the striatum.

[**Key words**] Parkinson's disease; DNA vaccine; neurotrophic factors

Corresponding author: Peng Guoguang, E-mail: penwan233@sina.com

[通信作者] 彭国光,E-mail:penwan233@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151016.1247.014.html(2015-10-16)

帕金森病(Parkinson's disease,PD)是一种缓慢进展的神经退行性疾病,尽管PD的病因和发病机制还未完全清楚,但研究发现PD患者黑质、纹状体等部位的胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor,BDNF)含量下降,其下游信号通路也出现了损害[1-2]。作为一种内源性蛋白质,神经营养因子可促进多种神经元存活、协调突触传递、维持神经环路的稳态,尤其对多巴胺能神经元有较强的保护作用[3]。

帕金森病的治疗迄今仍以左旋多巴替代治疗来改善运动症状,然而在治疗后期会出现严重的运动并发症,且左旋多巴并不能改善非运动症状,亦不能延缓PD病程进展[4]。由于以错误折叠的α-突触核蛋白(alpha-synuclein,α-syn)为主要成分的路易小体是PD的病理标志物,本课题组先期以α-syn蛋白为靶点构建了α-syn全长核酸疫苗,发现α-syn全长核酸疫苗免疫小鼠可产生炎性副反应[5],故进一步对其优化构建了pVAX1-IL-4/SYN-B核酸疫苗,并在多种帕金森病模型中证实了pVAX1-IL-4/SYN-B核酸疫苗具有更好的有效性和安全性[6-7]。然而核酸疫苗神经保护作用的具体机制还不清楚,其可能通过多种途径促进多巴胺能神经元存活,在前期研究中已经发现核酸疫苗可降低帕金森病小鼠黑质炎症因子的表达,具有抗炎症反应的作用[8];此外,我们推测核酸疫苗对多巴胺能神经的保护作用还可能与疫苗促进纹状体内神经营养因子内源性分泌增加有关。故本研究旨在检测pVAX1-IL-4/SYN-B核酸疫苗免疫后小鼠纹状体内GDNF和BDNF含量,进一步探讨核酸疫苗神经保护作用的具体机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

核酸疫苗(pVAX1-IL-4/SYN-B)和空质粒(pVAX1)由课题组前期构建并保存于大肠杆菌中,兔抗GDNF多克隆抗体(Santa Cruz公司)、兔抗BDNF单克隆抗体(Abcam公司)、MPTP(Sigma公司)、兔抗TH多克隆抗体(Millipore公司)、丙磺舒(Sigma公司)。

1.2 质粒的提取

按照质粒中提试剂盒步骤,从大肠杆菌中提取出核酸疫苗质粒和空质粒,然后用生理盐水将其浓度配为1 μg/μL用于免疫接种。

1.3 免疫接种及慢性MPTP小鼠模型构建

C57BL16/6雄性小鼠48只(6~8周龄),由重庆医科大学实验动物中心供养。将其完全随机分为正常对照组、PBS组、空质粒组、核酸疫苗组,每组12只。先给予每只小鼠双侧后肢胫前肌注射布比卡因50 μL以促进质粒的吸收,72 h后各组小鼠再于相同部位分别注射PBS、PBS、空质粒、pVAX1-IL-4/SYN-B质粒50 μL(1次/3周,共3次)。末次免疫后3周,给予后3组小鼠腹腔注射丙磺舒(100 mg/kg)和1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methy-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)(25 mg/kg,2次/周,共5周),构建慢性帕金森病模型[9],正常对照组注射等量PBS。末次注射1周后麻醉处死小鼠,取纹状体进行检测。

1.4 小鼠行为学观察

全程观察小鼠有无体质量减轻、震颤、竖毛等异常变化,于末次注射MPTP 1周后,采用自由活动实验[8]检测各组小鼠运动迟缓情况:自制1个玻璃箱,在箱底划上6 cm×6 cm的格子,将小鼠放入玻璃箱内让其自由活动,分别计数5 min内移动的格子数和下肢站立的次数,连续测量5次取其均值。

1.5 Western blot检测酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)、GDNF、BDNF蛋白表达

取双侧纹状体加入RIPA裂解液提取总蛋白,BCA测定蛋白浓度,经上样、电泳、电转、封闭后滴加相应一抗TH(1∶1 000),GDNF(1∶200),BDNF(1∶1 000),β-actin(1∶1 000),4 ℃孵育过夜后加入山羊抗兔IgG二抗37 ℃孵育2 h,暗室中ECL显影,Fusion软件分析蛋白表达水平(目的蛋白/β-actin)。

1.6 免疫组化检测TH神经纤维表达

将石蜡切片经过脱蜡、水化、微波热修复、去除内源性过氧化物酶、血清封闭后,滴加一抗TH(1∶500),4 ℃孵育过夜后相继加入山羊抗兔IgG二抗和HRP-链霉卵白素,DAB显色,苏木精复染,盐酸乙醇分化,碳酸锂返蓝,脱水,封片后用Image-Pro Plus 6.0软件测量TH的累积光密度值。

1.7 统计学分析

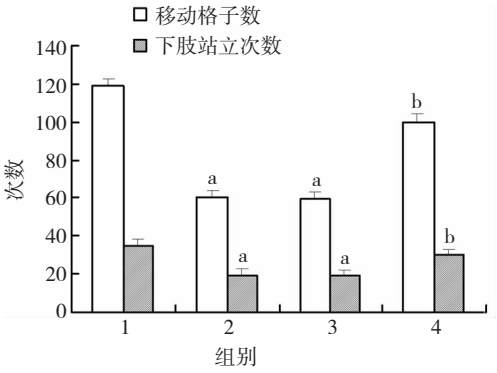
使用SPSS 17.0统计软件,数据以$\bar{x} \pm s$表示,组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD-t检验。

2 结果

2.1 行为学变化

正常对照组小鼠无发病。注射MPTP后,PBS组、空质粒组和核酸疫苗组小鼠均出现动作缓慢、震颤、竖毛、自发活动减少等症状。与正常对照组比较,PBS组

和空质粒组小鼠自由活动实验测得 5 min 内移动格子数与下肢站立次数明显减少($P<0.05$)。与 PBS 组和空质粒组比较,核酸疫苗组小鼠运动迟缓症状改善明显($P<0.05$,图 1)。

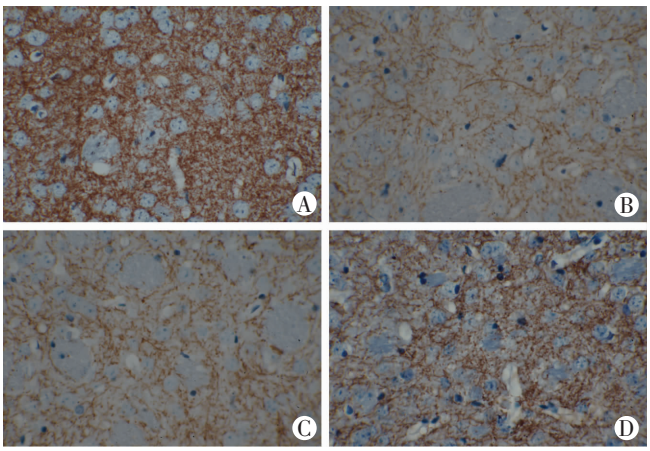


1:正常对照组;2:PBS 组;3:空质粒组;4:核酸疫苗组;a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与 PBS 组和空质粒组比较

图 1 各组小鼠自由活动实验结果

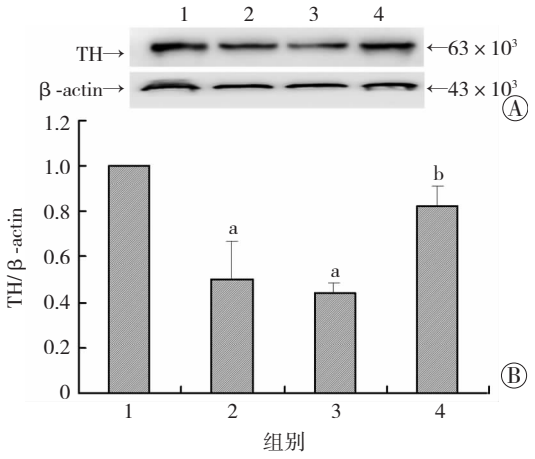
2.2 各组小鼠纹状体 TH 表达

免疫组织化学标记 TH,各组小鼠纹状体区均出现棕黄色阳性纤维表达,累积光密度值分析显示:与正常对照组(2 379 183.00 ± 244 060.40)比较,PBS 组(819 523.10 ± 77 739.95)和空质粒组(819 673.30 ± 122 743.90)纹状体区 TH 表达水平明显降低($P<0.05$),TH 阳性纤维稀疏、染色较浅;而核酸疫苗组(1 800 066.00 ± 111 802.00)明显高于 PBS 组和空质粒组($P<0.05$,图 2)。Western blot 检测结果显示:与正常对照组比较,PBS 组和空质粒组纹状体区 TH 表达水平明显降低($P<0.05$),与 PBS 组和空质粒组比较,核酸疫苗组纹状体区 TH 表达水平明显增加($P<0.05$,图 3)。



A:正常对照组;B:PBS 组;C:空质粒组;D:核酸疫苗组

图 2 免疫组化观察各组小鼠纹状体 TH 阳性纤维表达(S-P ×400)



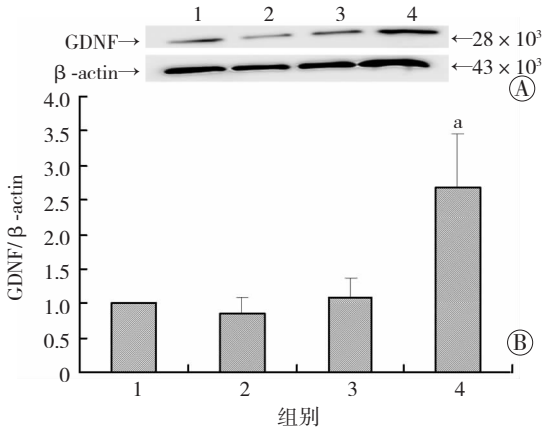
1:正常对照组;2:PBS 组; 3:空质粒组;4:核酸疫苗组;a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与 PBS 组和空质粒组比较

A: Western blot 检测;B:半定量分析

图 3 Western blot 检测各组小鼠纹状体 TH 蛋白表达

2.3 各组小鼠纹状体 GDNF 表达

Western blot 检测结果显示:与正常对照组比较,PBS 组和空质粒组 GDNF 的表达差异无统计学意义($P>0.05$),而核酸疫苗组 GDNF 的表达较 PBS 组和空质粒组明显增加($P<0.05$,图 4)。



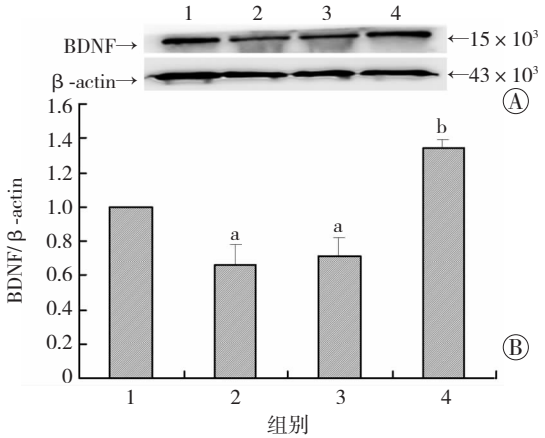
1:正常对照组;2:PBS 组;3:空质粒组;4:核酸疫苗组;a:$P<0.05$,与 PBS 组和空质粒组比较

A: Western blot 检测;B:半定量分析

图 4 Western blot 检测各组小鼠纹状体 GDNF 蛋白表达

2.4 各组小鼠纹状体 BDNF 表达

与正常对照组比较,PBS 组和空质粒组纹状体 BDNF 表达量减少($P<0.05$),与 PBS 组和空质粒组比较,核酸疫苗组 BDNF 的表达明显增加($P<0.05$),而核酸疫苗组与正常对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$,图 5)。



1：正常对照组；2：PBS 组；3：空质粒组；4：核酸疫苗组；a：$P<0.05$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，与 PBS 组和空质粒组比较

A：Western blot 检测；B：半定量分析

图 5 Western blot 检测各组小鼠纹状体 BDNF 蛋白表达

3 讨论

帕金森病中研究得最多的神经营养因子是 GDNF 和 BDNF，其中 GDNF 对多巴胺能神经元具有特异性的营养作用，被认为是保护多巴胺能系统最有效的神经营养因子。本研究通过 Western blot 检测发现预防注射 pVAX1-IL-4/SYN-B 核酸疫苗可促进纹状体区 GDNF 表达增加，保护多巴胺能神经纤维。临床试验也表明纹状体内灌注外源性 GDNF，可增加黑质纹状体系统 TH 免疫反应性及多巴胺能纤维的出芽，并能明显改善 PD 患者的临床症状[10]。然而与正常对照组比较，PBS 组和空质粒组纹状体 GDNF 表达并未显著减少，Xu 等[11]也发现在 MPTP 模型中 GDNF 并未降低。Sanchez-Guajardo 等[12]采用 α-syn 重组蛋白预防免疫过表达人 α-syn 帕金森病大鼠模型，可明显增加纹状体 GDNF 的表达，与本实验结果一致。纹状体内的 GDNF 还可沿着轴突逆向运输到黑质，进一步促进黑质多巴胺能神经元的存活[13]。因此，我们推测除纹状体外，核酸疫苗还可促进黑质等其他部位的神经营养因子分泌增加。

本研究通过 Western blot 检测还发现核酸疫苗组小鼠 BDNF 表达增加。研究表明 BDNF 也可促进多巴胺能神经元存活，且 BDNF 对突触可塑性、记忆和认知功能具有调节作用，而左旋多巴诱导的异动症与突触可塑性异常有关[14]。因此，BDNF 分泌减少可引起纹状体区突触可塑性异常进而增加 PD 异动症的风险，而核酸疫苗可促进纹状体区 BDNF 表达上调，可能将会有助于延缓异动症和认知功能障碍的发生，对 PD 患者多巴胺能系统和非多巴胺能系统损伤同时具有治疗作用。

以往研究者们都着眼于研究颅内灌注神经营养因子，虽然显示出了一定的疗效，但反复颅内灌注易产生抗 GDNF 抗体，且不能准确到达靶器官，或者到达靶位点的药物浓度不足，以及置管相关的并发症和撤药后疗效消失等隐患，给临床应用带来很大困难。而核酸疫苗可促进纹状体神经营养因子内源性分泌增加，营养多巴胺能神经、改善运动迟缓症状，因此具有显著的临床实用价值。

核酸疫苗促进神经营养因子内源性分泌增加的机制并不清楚。有研究发现 PD 的 BDNF 表达降低与神经元内 α-syn 沉积相关，过表达 α-syn 可损害 PKC 及其下游信号通路，最终导致 BDNF 表达的下调[15]，因此，核酸疫苗可通过降低脑内 α-syn 负荷进而促进 BDNF 表达上调。此外，聚集化的 α-syn 可引起小胶质细胞的激活，启动了神经炎症的级联反应过程，而本课题组前期研究还发现预防注射核酸疫苗可刺激机体产生 α-syn 抗体、下调脑内炎症因子表达[8]。因此，我们认为疫苗对神经营养因子的促分泌作用可能与疫苗免疫产生 α-syn 抗体，降低纹状体区 α-syn 寡聚体，下调小胶质细胞的促炎症状态，促使小胶质细胞分泌神经营养因子增加有关。由于多巴胺神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞都可分泌神经营养因子，所以这 3 种细胞可能都协同参与了核酸疫苗对神经营养因子的促分泌作用。当然，核酸疫苗促进神经营养因子内源性分泌增加的具体机制还有待进一步研究。

综上所述，我们可以初步认为核酸疫苗对慢性 PD 小鼠多巴胺能神经纤维的保护作用与疫苗促进内源性神经营养因子 GDNF、BDNF 的产生，改变了黑质纹状体紊乱的微环境、营养多巴胺神经纤维有关。本研究初步探索核酸疫苗对纹状体神经营养因子表达的影响，研究中仅涉及 GDNF 和 BDNF 两个检测指标，要证实疫苗是通过神经营养因子来起神经保护作用目前仍然证据不足。本课题组下一步将细化研究参数，从多个层面深入研究以求提供更多的证据。

参考文献：

[1] Luk K C, Kehm V, Carroll J, *et al*. Pathological α-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice[J]. Science, 2012, 338(6109): 949-953.

[2] Aron L, Klein R. Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors[J]. Trends Neurosci, 2011, 34(2): 88-100.

[3] Rodrigues T M, Jeronimo-Santos A, Outeiro T F, *et al*. Challenges and promises in the development of neurotrophic factor-based therapies for Parkinson's disease[J]. Drugs Aging, 2014, 31(4): 239-261.

[4] Schapira A H. Treatment options in the modern management of Parkinson's disease[J]. Arch Neurol, 2007, 64(8): 1083-1088.

[5] 王少君, 罗琴, 王加才, 等. 核酸疫苗免疫帕金森病小鼠加重黑质炎性反应[J]. 中国免疫学杂志, 2009, 25(6): 528-531.

[6] 杨云鹏, 杨旭, 陈中美, 等. 优化hα-syn核酸疫苗免疫反应效果及安全性的评价[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(11): 941-944, 948.

[7] 王法祥, 彭国光, 王加才, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(18): 1761-1765.

[8] 陈中美, 杨云鹏, 杨旭, 等. 优化核酸疫苗对慢性MPTP帕金森病小鼠的免疫作用[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(11): 926-931.

[9] Carta A R, Carboni E, Spiga S. The MPTP/probenecid model of progressive Parkinson's disease[J]. Methods Mol Biol, 2013, 964: 295-308.

[10] Love S, Plaha P, Patel N K, *et al*. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain[J]. Nat Med, 2005, 11(7): 703-704.

[11] Xu G, Xiong Z, Yong Y, *et al*. Catalpol attenuates MPTP induced neuronal degeneration of nigral-striatal dopaminergic pathway in mice through elevating glial cell derived neurotrophic factor in striatum[J]. Neuroscience, 2010, 167(1): 174-184.

[12] Sanchez-Guajardo V, Annibali A, Jensen P H, *et al*. α-Synuclein vaccination prevents the accumulation of Parkinson disease-like pathologic inclusions in striatum in association with regulatory T cell recruitment in a rat model[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2013, 72(7): 624-645.

[13] Burke R E. Ontogenic cell death in the nigrostriatal system[J]. Cell Tissue Res, 2004, 318(1): 63-72.

[14] Foltynie T, Cheeran B, Williams-Gray C H, *et al*. BDNF val66met influences time to onset of levodopa induced dyskinesia in Parkinson's disease[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2009, 80(2): 141-144.

[15] Yuan Y, Sun J, Zhao M, *et al*. Overexpression of alpha-synuclein down-regulates BDNF expression[J]. Cell Mol Neurobiol, 2010, 30(6): 939-946.

(**收稿**:2015-04-06;**修回**:2015-05-26)

(编辑 王小宴)