

摘要

目的：帕金森病是全球第二大中枢神经系统退行性病变，多发于中老年人。目前基因治疗在前期临床试验中未发现与目的基因、病毒载体相关的并发症，很可能成为帕金森病治疗可行的新方法。LRRK2 在帕金森病中可能作为联系遗传与环境这两大因素的核心和共同通路，在帕金森病发病机制中影响 α -突触核蛋白并与其共同介导神经元的变性。移植后的细胞有可能受到 α -突触核蛋白毒性作用影响其功能。本研究基于 CRISPR/Cas9 技术敲除移植细胞中的 LRRK2 基因后探讨其在帕金森病大鼠模型中的疗效以及可能的作用机制。

方法：我们利用 CRISPR/Cas9 单载体慢病毒转染技术敲除 PC12 细胞中的 LRRK2 基因以构建敲除 LRRK2 基因的 PC12 细胞株，采用 CCK-8 法、蛋白免疫印迹法、PCR 法在 RNA 以及蛋白水平验证敲除的效率和细胞活力的改变确定敲除 LRRK2 对 PC12 细胞的影响。

采用鱼藤酮构建慢性帕金森病大鼠模型，实验组和阴性对照组分别立体定向注射敲除 LRRK2 基因的 PC12 细胞和正常的 PC12 细胞。利用爬杆实验和旷场实验检测大鼠的运动功能的改变；利用蛋白免疫印迹法、免疫组化检测大鼠纹状体区多巴胺能神经元的存活情况凋亡相关蛋白以及 α -突触核蛋白的表达，同时，HE 染色法明确大鼠纹状体移植区中是否有肿瘤形成。

结果：PCR 以及免疫印迹法结果显示 CRISPR/Cas9 单载体慢病毒成功构建 LRRK2 基因敲除的 PC12 细胞系，CCK8 法验证了 LRRK2 基因敲除后未影响 PC12 细胞的增殖功能。

动物试验中，旷场实验和爬杆试验结果表明纹状体移植敲除 LRRK2 基因的 PC12 细胞可更好地改善帕金森病大鼠的运动功能。蛋白免疫印迹法、免疫组化结果提示纹状体移植敲除 LRRK2 基因的 PC12 细胞可提高纹状体区的多巴胺含量，降低移植细胞 α -突触核蛋白的含量，降低移植后细胞凋亡的发生率。

结论：纹状体移植敲除 LRRK2 基因的 PC12 细胞可以提高帕金森病大鼠模型中纹状体区的多巴胺含量，改善帕金森病大鼠的运动功能，其可能的机制是降低移植细胞 α -突触核蛋白的含量，降低移植后细胞凋亡的发生率。

关键词：帕金森病；LRRK2；细胞移植；基因敲除；细胞凋亡

Abstract

Objective: Parkinson's disease is the second largest neurodegenerative disease of the central nervous system in the world, which mostly occurs in the middle-aged and elderly. There were no complications related to the target gene and virus vector in the preliminary clinical trials of gene therapy, which may become a new feasible method for the treatment of Parkinson's disease. LRRK2 may be the core and common pathway connecting genetic and environmental factors in Parkinson's disease, which will influence the aggregation of α -synuclein and mediate neuronal degeneration with α -synuclein. The transplanted cells may be damaged by the toxicity of α -synuclein, resulting in a decline of its function. This study was based on CRISPR/cas9 technology to knock out LRRK2 gene in transplanted cells in order to explore its efficacy and possible mechanism in Parkinson's disease rat model.

Method: We used CRISPR / Cas9 single vector lentivirus transfection technology to knock out the LRRK2 gene in PC12 cells to construct a PC12 cell line with LRRK2 gene knockout. CCK-8, Western blot and PCR were used to verify the knockout efficiency and changes of cell viability at the RNA and protein levels to determine the effect of LRRK2 knockout on PC12 cells.

The rat model of chronic Parkinson's disease was induced by rotenone. The experimental group and the negative control group were injected with LRRK2-KO PC12 cells and normal PC12 cells respectively. The changes of motor function were detected by pole test and open field test; The survival of dopaminergic neurons in rat striatum, the expression of apoptosis related proteins and α -synuclein were detected by Western blot and immunohistochemistry. At the same time, HE staining was used to determine whether there was tumor formation in the transplantation area of rat striatum.

Result: The results of PCR and Western blot showed that CRISPR / cas9 single vector lentivirus successfully constructed PC12 cell line with LRRK2 gene knockout, and CCK8 method verified that LRRK2 gene knockout did not affect the proliferation of PC12 cells.

In animal experiments, the results of the open field test and the pole test showed that the striatum transplantation of PC12 cells with LRRK2 gene knockout could improve the motor function of Parkinson's disease rats. Western blot and immunohistochemical results showed that striatal transplantation of PC12 cells with LRRK2 gene knockout could increase the content of dopamine in the striatum, reduce the content of α -synuclein in transplanted cells and the incidence rate of apoptosis after transplantation.

Conclusion: Striatal transplantation of PC12 cells with LRRK2 gene knocking out can increase

the content of dopamine in the striatum and improve the motor function of Parkinson's disease rats. Reducing the α -synuclein expression of transplanted cells and the incidence of apoptosis after transplantation may be the possible mechanism.

Key words: Parkinson's disease; LRRK2; Cell transplantation; Gene knockout; Apoptosis

目录

摘要	I
Abstract.....	II
英文缩略词表	V
第一章 绪论	1
第二章 验证 CRISPR/Cas9 单载体慢病毒对 PC12 细胞 LRRK2 基因的敲除效率.....	11
一、实验材料	11
二、实验方法	16
三、实验结果	25
四、本章小结	26
第三章 移植敲除 LRRK2 基因的 PC12 细胞对帕金森病大鼠的疗效及机制研究.....	27
一、实验材料	27
二、实验方法	29
三、实验结果	36
四、本章小结	47
讨论	48
结论	51
参考文献	52
攻读硕士学位期间取得的研究成果	57
致谢	58

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
PD	Parkinson's disease	帕金森病
DBS	deep brain stimulation	脑深部电刺激
LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2	富含亮氨酸重复激酶 2
α -syn	α -synuclein	α -突触核蛋白
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCD	Programmed cell death	程序性死亡
WB	Western blot	免疫蛋白印迹
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
DMEM	dulbecco's modified eagle medium	培养基
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20	含吐温 20 的 tris 缓冲液
MOMP	mitochondrial membrane permeability	线粒体膜通透性
SPF	Specific pathogen Free	无特定病原体
TH	tyrosine hydroxylase	酪氨酸羟化酶
OD	optical density	光密度
MOD	Mean optical density	平均光密度
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
rpm	Revolutions per minute	每分钟转速
OFT	Open Field Test	旷场实验
6-OHAD	6-Hydroxydopamine hydrobromide	6-羟基多巴胺
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶
LB	Lewy body	路易小体
CCK8	Cell Counting Kit-8	细胞活力检测试剂盒
L-DOPA	Levodopa	左旋多巴

COMT	catecholamine-O-methyltransferase	儿茶酚-O-甲基转移酶
GWAS	Genome-Wide Association Studies	全基因组关联分析
AIF	apoptosis inducing facto	细胞凋亡诱导因子

第一章 绪论

帕金森病（Parkinson's disease, PD）是以中脑黑质多巴胺神经元进行性减少为特征的神经退行性病变，其发生率仅次于阿尔兹海默病。据相关研究结果显示，在过去 20 年中，帕金森病的发病率和患病率迅速上升^[1, 2]，2016 年全世界约有 610 万人受影响^[3]。随着社会老龄化以及人均寿命的不断增长，预计到 2030 年帕金森病的患病人数会比目前增长 50%^[4]。帕金森病是慢性进展性疾病，病程长，其持续时间可长达数十年，随着疾病的进展，可导致帕金森病患者渐进性的残疾^[5]。帕金森病不仅会影响患者的运动功能，还会影响认知、情绪以及自主神经系统的功能，严重损害患者的生活质量，给患者及其家庭带来精神和经济上的沉重负担^[6]。虽然目前对于帕金森病的治疗手段尚未能够完全减缓帕金森病的临床进展，但是从认识帕金森病至今，医学界对此的研究已经获得了极大地进展。

1.1 帕金森病简介及其治疗现状

1.1.1 帕金森病简介

1817 年，詹姆斯·帕金森（James Parkinson）在《论震颤性麻痹》的文章中描述了这种临床综合征，通常被称为“帕金森病”，其主要特征是运动迟缓、静止性震颤、肌强直和姿势平衡障碍等运动症状及睡眠障碍、情绪障碍、疼痛及感觉异常等非运动症状^[7, 8]。运动障碍是帕金森病的重要诊断依据，根据运动症状大致可将帕金森病患者分为震颤和非震颤两种临床亚型^[9]。早期人们主要关注的是帕金森病的运动症状，但近年来越来越多人认识到非运动症状如嗅觉减退、抑郁、焦虑、认知障碍等^[10]的重要性，这些非运动症状同样影响着帕金森病患者的生活质量，在很大程度上也导致了帕金森病患者生理性残疾的发生^[11]。值得注意的是，许多非运动症状可能出现于运动症状前，鉴别帕金森病的非运动症状的发生有助于帕金森病的早期诊断，并为其早期地进行干预治疗提供可能。

目前来说，帕金森病的发病因素尚未完全明确，但总的观点可以归纳为环境因素与遗传因素两个部分，遗传易感与环境因素共同参与了帕金森病的发生发展。有研究表明，包括农药、重金属接触、农村生活、农业职业、创伤性头部损伤、黑色素瘤病史、乳制品消费和 2 型糖尿病（可通过使用抗糖尿病药物减少）等危险因素参与了帕金森病的发生发展^[12]。另外最近有一项涉及对各种环境暴露的

定量和定性的 Meta 分析, 表明对其中一些与环境暴露相关的诸如农村生活、井水消耗、农业和农药暴露等因素对帕金森病的发生发展缺乏强有力的一致性证据^[13]。而另外一项 Meta 分析则重申了与农药暴露的正相关性^[14]。

1997 年, 一些早期的对双胞胎的研究和对几个表现出孟德尔遗传模式(显性和隐性)的家族的鉴定为帕金森病的遗传原因提供了证据, 并于当年发现了第一个帕金森病相关基因 α -突触核蛋白(SNCA)^[15]。随着遗传技术和群体研究的进步, 如全基因组关联研究(Genome-Wide Association Studies, GWAS), 已经描述了超过 20 种单基因形式的 PD, 超过 100 个位点被确定为 PD 的风险因素^[16-18]。其中, 帕金森病常染色体显性遗传的突变基因有 α -突触核蛋白基因(SNCA)、富亮氨酸重复激酶 II(LRRK2)、空泡蛋白 35(VPS35)、真核翻译起始因子 4 γ I(EIF4G1)、动力蛋白激动蛋白 I(DCTN1)、葡糖脑苷脂酶(GBA)、热休克蛋白 40 同源亚型 13(DNAJC13)、共济失调蛋白 2(ATX2)等, 已知的常染色隐形遗传型帕金森病存在 Parkin、PTEN 诱导激酶 I(PTEN)、DJ-1、P 型 ATP 酶(ATP13A2)、磷脂酶 A2(PLA2G6)、FBXO7 以及热休克蛋白 40 同源亚型 VI(DNAJC6)等基因突变^[19]。

帕金森病的神经病理学特征是黑质致密部中多巴胺能神经元的选择性丧失和路易体(Lewy body, LB)沉积, 多巴胺神经元的进行性丢失导致黑质-纹状体通路所产生的多巴胺神经递质进行性减少, 引起帕金森病的各种临床症状。

帕金森病是一种多系统性 α -突触核蛋白病, 路易体沉积在中脑。路易小体是以错误折叠和聚集的 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)聚集为特征的蛋白质包涵体, 其广泛分布于多个大脑区域, 包括纹状体系统、皮质、丘脑、下丘脑、嗅球和脑干^[20]。路易小体也存在于神经突中, 主要存在于轴突, 称为神经内路易小体或路易小体神经轴突。产生这种病理表现的可能原因包括基因组因素、表观遗传变化、各种对人体有毒的因素、集体的氧化应激异常、个体的神经免疫或神经炎症反应、可能的缺氧缺血状况、代谢缺陷以及泛素-蛋白酶体系统功能障碍^[21-23]。

1.1.2 帕金森病治疗现状

帕金森病是一种复杂的神经退行性疾病, 具有广泛的运动和非运动特征。目前对帕金森病运动功能障碍对症治疗的干预策略包括替代药物治疗、物理治疗、

基因治疗、细胞移植治疗等。

替代药物治疗方面,除了多巴胺前体(L-DOPA),其他针对帕金森病的对症治疗药物包括多巴胺激动剂、单胺氧化酶抑制剂、儿茶酚-O-甲基转移酶抑制剂和金刚烷胺等^[24]。药物治疗在治疗初期可取得一定的疗效,但是随着病情的进展,长期的使用替代药物治疗的过程中会出现“开关”现象,亦或者在使用左旋多巴或者多巴胺激动剂的过程中由于帕金森病患者其对药物的敏感性的降低及病情进展会出现诸如症状波动、异动症、冲动控制障碍、幻觉、嗜睡等不良反应^[24,25]。由于症状波动、异动症或左旋多巴无反应症状,药物治疗的帕金森病中晚期疾病患者的生活质量较差。

物理治疗方面,包括脑深部电刺激术(deep brain stimulation, DBS)、磁共振引导下聚焦超声等。使用植入脉冲发生器 DBS 的手术是治疗帕金森病药物治疗必要的补充,可间接增加纹状体区多巴胺的代谢能力,改善帕金森病的运动症状,但其成功与否取决于患者的适当选择以及立体定向外科医生的经验和技能^[26]。磁共振引导下聚焦超声^[27]属于无创治疗技术的一种,其将超声波传递至特定部位的组织内部,在治疗靶区产生能量转换释放瞬间的高温,诱导治疗靶区的组织凝固性坏死来达到治疗的目的。但目前治疗帕金森病症状的最佳靶点以及是否应该针对不同的患者使用不同的靶点均不清楚,该技术仍处在临床前研究阶段。

基因治疗方面,包括神经营养因子基因治疗(GDNF、NTN 等)、酶替代基因治疗(AADC、GCH1、TH)以及 GAD 基因治疗,选用的载体包括 AAV 和慢病毒载体。多项研究表现基因治疗对缓解帕金森病的临床运动症状的进展,改善帕金森病患者的运动功能有较好的疗效,在前期的临床试验治疗过程中未出现与目的基因、病毒载体相关的并发症,可能成为帕金森病治疗的新方法^[28]。

细胞移植方面,移植物的选择很多,包括 PC12 细胞、胚胎干细胞、神经干细胞以及诱导多功能干细胞(iPSC)移植等。PC12 细胞是大鼠来源的肾上腺嗜铬细胞瘤细胞,能分泌多巴胺和去甲肾上腺素等神经递质,将其移植入纹状体中可以提高纹状体多巴胺的表达含量,但其可能会因同种异体间的免疫排斥造成移植细胞的死亡。虽有用微囊包裹 PC12 细胞后再进行移植以此解决肿瘤形成和达到免疫隔离的目的,但是微囊也有诸如影响移植物与宿主间的直接接触作用、囊孔堵塞或破裂、微囊表面结构消失等问题降低其治疗效果^[29]。干细胞移植方面研

究最多的是 iPSC，将其移植到帕金森病动物模型中可以分化为多巴胺神经元，提高多巴胺的释放来改善帕金森病模型的症状。但 iPSC 移植后其增殖能力不受控制，在动物模型脑中移植后分化的神经元后代其表观遗传等特性是否会发生改变仍有待确定^[27]。这些研究验证实脑内移植细胞是治疗帕金森病的一种有效手段，然而移植后细胞存活率仅 5%-20%这一问题极大的限制了细胞移植的疗效。寻找更合适的移植物或者通过基因修饰移植细胞等方式或许可以提高细胞移植治疗帕金森病的疗效^[30]。

1.2 LRRK2 与帕金森病

1.2.1 LRRK2 的生物学和功能

富含亮氨酸重复激酶 2(leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2)基因别称 PARK8 基因。在人类中其定位于染色体 12p11.2-q13.1，包含 51 个外显子，基因长度为 144kb。LRRK2 基因在细胞中进行转录、翻译后合成具有生物学功能的由 2527 个氨基酸残基组成的蛋白激酶，别称富含亮氨酸重复激酶 2 或 dardarin 蛋白。

LRRK2 蛋白是一种大型的多结构域蛋白，蛋白分子量为 280kDa，属于 ROCO 激酶超家族。一项基因序列分析显示 LRRK2 激酶包括 6 个独立结构域（ANK、LRR、Roc、COR、Kinase 和 WD40）^[31]。在这些结构域中，Roc 表现为 GTP 酶活性；Kinase 表现为 ATP 激酶活性；ANK、LRR、WD40 均是由重复结构组成的结构域，可介导蛋白质相互作用^[31, 32]。研究发现，LRRK2 蛋白可通过激酶域催化磷酸化、通过 ROC-GTPase 域参与 GTP 和 GDP 的水解过程从而发挥其生物学功能^[33, 34]。

LRRK2 参与了多种生理功能的调控，例如调控神经突触的生长、调节细胞内囊泡的运输、维持细胞骨架的稳定、调节自噬蛋白的降解平衡以及跟个体的自身免疫系统也有一定的联系^[35]。

1.2.2 LRRK2 在帕金森病发病机制中的作用

LRRK2 基因是晚发型常染色体显性遗传性帕金森病的最常见致病基因，并且在典型晚期发病的散发性帕金森发病中也起作用。有研究发现有 13% 的家族性帕金森病和 3% 的散发性帕金森病存在 LRRK2 基因突变^[36, 37]。有研究用 PCR 分析了患者不同脑组织的 LRRK2 表达水平后发现整个脑组织均持续低水平表达

LRRK2,但是在壳核与黑质中表达较高。另外也有动物实验中发现帕金森病模型鼠基底节 LRRK2 表达水平较高^[38]。这些研究共同提示 LRRK2 的突变或者过表达在帕金森病的发生发展过程中起到了重要的作用。

LRRK2 可能通过激酶依赖性的形式对神经元自身产生毒性。在一些关于神经元的原代培养中, LRRK2 G2019S 或 I2020T 的持续过度表达会诱导神经元毒性的产生,引起原代培养的神经元的神经突起缩短、细胞内细胞器功能的受损或直接导致神经元的死亡^[39-42]。在此基础上,通过引入非活性的激酶、GTP 结合缺陷的突变或使用 LRRK2 的化学抑制剂进行干预,这些研究中神经元的许多致病性表现得到了缓解^[39,43]。在 LRRK2 转基因果蝇模型中,表达 LRRK2 G2019S 或 I2020T 的转基因果蝇随着年龄的增长,出现了体内的多巴胺的稳态破坏、多巴胺神经元进行性丢失、运动障碍等表现^[44,45]。而在啮齿动物的模型试验中,单纯疱疹病毒或腺病毒介导的 LRRK2 G2019S 突变在小鼠或大鼠纹状体,引起了黑质致密部中多巴胺神经元的强烈退化并且导致了神经元细胞发生细胞凋亡,而这些多巴胺神经元的损伤退化等表现可以通过服用 LRRK2 激酶的药物抑制剂来预防^[46]。另外有研究发现 LRRK2 基因突变会增加核糖体蛋白的磷酸化,导致核糖体生成过多蛋白,而 LRRK2 中的致病突变也会增加它对两个核糖体蛋白(s11 和 s15)的磷酸化,并且在 LRRK2 突变携带者的脑组织样本中,s15 的磷酸化水平也比对照组高。随后,研究人员将大鼠和人类的胚胎干细胞诱导成为神经细胞,并通过基因工程使其携带 LRRK2 基因突变。他们发现,这种突变会增加细胞死亡率和磷酸化 s15 的含量,而如果 LRRK2 突变细胞中的 s15 蛋白发生突变,使其无法被 LRRK2 磷酸化,这些细胞就能够免于死亡^[47]。这些细胞及动物的模型均表明 LRRK2 过度表达对神经元会产生毒性作用。

帕金森病是一种复杂的多系统疾病,与运动症状相关的临床病理诊断是帕金森病的诊断金标准^[48]。目前帕金森病的病理标准包括黑质致密部中多巴胺神经元的丢失和路易小体形成。路易小体是以错误折叠和聚集的 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)聚集为特征的蛋白质包涵体,其广泛分布于多个大脑区域,包括纹状体系统、皮质、丘脑、下丘脑、嗅球和脑干^[20]。路易小体也存在于神经突触中,主要存在于轴突,称为神经内路易小体或路易小体神经轴突。临床的研究发现, LRRK2 突变的帕金森病患者的病理切片显示脑组织中有路易小体以及神

经纤维缠结等病理特征，且免疫组化中路易小体和 α -突触核蛋白呈现阳性^[49]。另外在各种尸检的研究中，约有 100 多种蛋白质已通过免疫组织化学分析被鉴定为存在于路易小体中，而值得注意的是 LRRK2 蛋白包含在内^[50-52]，推测 LRRK2 蛋白在路易小体的形成中可能通过与 α -突触核蛋白存在分子和功能的相互作用。

LRRK2 可能在帕金森病中诱导 α -突触核蛋白过度产生。而 α -突触核蛋白是一种会在脑组织中高度表达的神经元蛋白，研究表明其与正常的神经元轴突末端的突出囊泡有关^[53]。有研究提出， α -突触核蛋白在人体中存在未折叠的单体和螺旋折叠的四聚体，这种单体和多聚体间处于动态的平衡中，生理性的四聚体长期慢性地转变为过量单体的情况与类帕金森病状态有一定的相关性^[54]。而当人体处在病理条件下时， α -突触核蛋白单体会不断产生并且过量的蛋白单体会产生聚集并开始形成原纤维和不溶性纤维^[55]。预制原纤维 (PFF) 是人工生成的短纤维片段，这种短纤维片段可触发内源性的 α -突触核蛋白使其转化为致病的原纤维形式，这种特性使 PFF 可作为产生不溶性原纤维或路易小体样内含物的启动器。在 α -突触核蛋白的 PFF 模型中，LRRK2 G2019S 转基因小鼠表现出了 α -突触核蛋白的快速聚集、黑质致密部中多巴胺神经元的退化和神经炎症等表现^[56]。另外一项临床研究发现无症状 LRRK2 突变携带者的脑脊液中的 α -突触核蛋白单体水平与年龄匹配的健康对照组相比显著升高，这提示寡聚的 α -突触核蛋白可能在疾病的临床表现之前就已经形成，提示 LRRK2 可能通过促进具有毒性的 α -突触核蛋白寡聚物的过度形成在帕金森病出现早期症状前就已经发挥作用^[57]。支持这一观点的另一项研究表明，与年龄匹配的 LRRK2 野生型小鼠相比，月龄 15 和月龄 18 的 LRRK2 R1441G KI 小鼠的纹状体和皮质中，寡聚 α -突触核蛋白的积累程度与小鼠的年龄成正相关。这些研究提示我们 LRRK2 可能在帕金森病中诱导具有毒性的寡聚 α -突触核蛋白的过度产生从而参与其发病机制^[58]。

LRRK2 在调节 α -突触核蛋白的细胞间传递中发挥作用。研究人员发现，与仅表达 α -突触核蛋白的神经元细胞相比，共表达 LRRK2 G2019S 和 α -突触核蛋白的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞 α -突触核蛋白表达分泌量呈现上升趋势且聚集程度更加明显。此外，与从单独表达 α -突触核蛋白的细胞收集条件培养基相比，从共表达 LRRK2 G2019S 和 α -突触核蛋白的细胞收集的条件培养基检测到更多的 α -突触核蛋白阳性的神经元细胞^[59]。这些结果表明 LRRK2 可能参与了 α -

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/945101340030011123>