

模拟肽 Gap27 抑制缝隙连接蛋白 43 在帕金森病小鼠模型中的作用

权会会, 徐卫星, 祁宇泽, 李清如, 周 辉, 黄 婧[△]

(北京大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系, 北京 100191)

[摘 要] **目的:** 探索在 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 诱导的帕金森病(Parkinson's disease, PD) 小鼠模型中, 应用缝隙连接蛋白 43(connexin 43, Cx43) 选择性抑制剂模拟肽 Gap27 能否改善多巴胺神经元死亡以及对 Cx43 表达的影响。**方法:** 将 18 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、6-OHDA 组与 6-OHDA + Gap27 组, 每组 6 只, 进行双侧黑质脑立体定位注射。对照组注射抗坏血酸盐溶液, 6-OHDA 组注射 6-OHDA 溶液, 6-OHDA + Gap27 组注射 6-OHDA 和 Gap27 混合溶液, 用免疫组织化学法对多巴胺神经元标志物酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH) 染色检测多巴胺神经元数量, 实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 Cx43 信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid, mRNA) 表达, 免疫荧光染色检测 Cx43 蛋白分布, Western blot 法检测小鼠中脑 Cx43 蛋白及 Cx43 的第 368 位点丝氨酸磷酸化(Cx43 phosphorylation at serine 368, Cx43-ps368) 蛋白含量。**结果:** 注射 6-OHDA 后, 小鼠出现黑质多巴胺神经元大量死亡, 6-OHDA 组 TH 阳性神经元数量降为对照组的 $27.7\% \pm 0.02\%$ ($P < 0.01$), 模拟肽 Gap27 的使用减少了多巴胺神经元死亡数量, 6-OHDA + Gap27 组 TH 阳性神经元数量为 6-OHDA 组的 (1.64 ± 0.16) 倍 ($P < 0.05$); 此外, 6-OHDA 引起 Cx43 蛋白含量增加, Cx43-ps368 蛋白含量降低。Gap27 减弱了 6-OHDA 引起的 Cx43 蛋白与 Cx43-ps368 蛋白含量变化, 6-OHDA 组中脑总 Cx43 蛋白含量为 6-OHDA + Gap27 组的 (1.44 ± 0.07) 倍 ($P < 0.05$), 为对照组的 (1.68 ± 0.07) 倍 ($P < 0.01$), 且 6-OHDA 组 Cx43-ps368 蛋白含量及占总 Cx43 蛋白比例显著低于 6-OHDA + Gap27 组 ($P < 0.05$)。**结论:** 模拟肽 Gap27 在 6-OHDA 诱导的小鼠模型中可减少黑质多巴胺神经元死亡从而发挥神经保护作用, 6-OHDA 引起的 Cx43 蛋白过表达对多巴胺神经元可能存在神经毒性, 而降低 Cx43 蛋白水平及维持 Cx43-ps368 蛋白水平可能是 Gap27 发挥保护作用的机制。

[关键词] 缝隙连接蛋白 43; 6-羟基多巴胺; 模拟肽 Gap27; 帕金森病

[中图分类号] R392.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2022)03-0421-06

doi: 10.19723/j.issn.1671-167X.2022.03.005

Inhibition connexin 43 by mimetic peptide Gap27 mediates protective effects on 6-hydroxydopamine induced Parkinson's disease mouse model

QUAN Hui-hui, XU Wei-xing, QI Yu-ze, LI Qing-ru, ZHOU Hui, HUANG Jing[△]

(Department of Occupational and Environmental Health, Peking University School of Public Health, Beijing 100191, China)

ABSTRACT Objective: To explore whether the using of mimetic peptide Gap27, a selective inhibitor of connexin 43 (Cx43), could block the death of dopamine neurons and influence the expression of Cx43 in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced Parkinson's disease mouse models. **Methods:** Eighteen C57BL/6 mice were randomly divided into control group, 6-OHDA group and 6-OHDA + Gap27 group, with 6 mice in each group. Bilateral substantia nigra stereotactic injection was performed. The control group was injected with ascorbate solution, 6-OHDA group was injected with 6-OHDA solution, and 6-OHDA + Gap27 group was injected with 6-OHDA and Gap27 mixed solution. Immuno-histochemical staining was used to detect the number of dopamine neurons, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of Cx43 messenger ribonucleic acid (mRNA), immunofluorescence staining was used to detect the distribution of Cx43 protein, the contents of Cx43 protein and Cx43 phosphorylation at serine 368 (Cx43-ps368) in mouse midbrain were detected by Western blot. **Results:** After injection of 6-OHDA, numerous dopamine neurons in substantia nigra died as Cx43 content increased, Cx43-ps368 content decreased. Mixing Gap27 while injecting 6-OHDA could reduce the number of death dopamine neurons and weaken the changes of Cx43 and Cx43-ps368 content caused by

基金项目: 国家自然科学基金(21577004)和北京市自然科学基金(7162104) Supported by the National Natural Science Foundation of China (21577004) and the Beijing Natural Science Foundation of (7162104)

[△] Corresponding author's e-mail, jing_huang@bjmu.edu.cn

网络出版时间:2022-4-20 11:30:55 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20220418.1835.002.html>

6-OHDA. The number of tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactive positive neurons in 6-OHDA group decreased to $27.7\% \pm 0.02\%$ of the control group ($P < 0.01$); The number of TH immunoreactive positive neurons in 6-OHDA + Gap27 group was (1.64 ± 0.16) times higher than that in 6-OHDA group ($P < 0.05$); The content of total Cx43 protein in 6-OHDA group was (1.44 ± 0.07) times higher than that in 6-OHDA + Gap27 group ($P < 0.05$) while (1.68 ± 0.07) times higher than that in control group ($P < 0.01$). In 6-OHDA group, the content of Cx43-ps368 protein and its proportion in total Cx43 protein were significantly lower than that in 6-OHDA + Gap27 group ($P < 0.05$). **Conclusion:** In 6-OHDA mouse models, mimetic peptide Gap27 played a protective role in reducing the damage to substantia nigra dopamine neurons, which was induced by 6-OHDA. The overexpression of Cx43 protein might have neurotoxicity to dopamine neuron. Meanwhile, decreasing Cx43 protein level and keeping Cx43-ps368 protein level may be the protective mechanisms of Gap27.

KEY WORDS Connexin 43; 6-hydroxydopamine; Peptide Gap27; Parkinson's disease

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种神经退行性疾病,运动表现有震颤,僵硬,运动迟缓和姿势不稳,其病理特征是黑质多巴胺(dopaminergic, DA)神经元的进行性丧失,以及形成路易体(Lewy body, LB)和路易神经突(Lewy neurite, LN)^[1]。6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)是一种选择性的儿茶酚胺能神经毒素,常用于PD动物模型建立,其化学结构与DA神经递质相似,对DA转运蛋白具有高亲和力,在黑质(substantia nigra, SN)部位注射6-OHDA能够引起黑质-纹状体通路的顺行性病变^[2]。

星形胶质细胞是中枢神经系统中最丰富的胶质细胞,星形胶质细胞网络在神经退行性病变中起着关键作用^[3]。在病理性脑损伤后,星形胶质细胞由静止状态转变为激活状态,但其功能存在争议,据报道A1与A2型激活态星形胶质细胞同时发挥神经保护和神经退行性作用^[4]。星形胶质细胞的一个独特特征是它们通过连接蛋白(connexin, Cx)进行细胞间高水平通讯,其中缝隙连接蛋白43(connexin 43, Cx43)作为星形胶质细胞的一种主要缝隙连接蛋白,可形成缝隙连接(gap junctions, GJs)允许细胞间物质信号传递,或形成半通道(hemichannels, HCs)允许细胞膜内外物质交换^[5]。Cx43 GJs与HCs在调节细胞内外谷氨酸、 Ca^{2+} 、ATP水平中起着重要的生物学功能,与神经元功能障碍和死亡密切相关^[6],在PD进程中发挥着不可忽视的作用。

Cx43蛋白包含4个跨膜区以及2个胞外环^[7], Gap27是Cx43蛋白第二个胞外环的模拟肽,可以抑制Cx43 HCs活性及新的GJs形成^[8]。目前已发现Gap27在缺血性脑损伤^[9]、伤口愈合^[10]等方面的保护作用,其作用机制可能涉及调节Cx43 GJs的解离、内化,或模拟关键的细胞外环序列与未偶联的连接蛋白相互作用,从而破坏互补HCs的对接以减少GJs的数量^[8]。此外,Gap27可直接与GJs相互作用从而改变离子通道门控,或改变Cx43蛋白与其他蛋

白间的相互作用调节GJs功能^[11]。Cx43蛋白的羧基末端是磷酸化作用的区域,易受到蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)、蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)、蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)等激酶的调节,其中PKC介导的Cx43第368位丝氨酸磷酸化(Cx43 phosphorylation at serine 368, Cx43-ps368)蛋白在形成的GJs通道的功能中具有重要调节作用,Cx43-ps368蛋白与Cx43 GJs的组装/拆卸以及降低GJs通透性等过程高度相关^[12-13]。此前的研究工作观察到,Gap27在脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导的体外原代神经元-胶质细胞模型中对DA神经元存在保护作用^[14]。本研究将进一步观察Gap27在6-OHDA小鼠模型中的作用,并观察Gap27对Cx43蛋白及Cx43-ps368蛋白表达的影响。

1 资料与方法

1.1 实验动物

采用8周无特定病原体(specific pathogen free, SPF)雄性野生型C57BL/6小鼠建立6-OHDA模型。小鼠购自北京大学医学部实验动物科学部,3~4只一笼,自由摄食和饮水,保持人工昼夜12 h/12 h循环,温度 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$,湿度 $50\% \pm 5\%$ 。本研究已通过北京大学生物医学伦理委员会审查(批准号:LA2018282),符合动物福利伦理要求。

1.2 脑立体定位注射

对小鼠进行双侧黑质注射6-OHDA建立PD动物模型,建模过程参照既往研究^[15-16]。将18只小鼠随机分为对照组、6-OHDA组与6-OHDA + Gap27组,每组6只。将小鼠麻醉后,放置在耳鼻梁固定的立体定位支架中。对照组注射0.1 g/L的抗坏血酸盐水1 μL ; 6-OHDA组注射1 μL 的6-OHDA(6-OHDA为2.5 g/L,抗坏血酸盐水为0.1 g/L); 6-OHDA + Gap27组注射1 μL 6-OHDA + Gap27混合溶液(6-OHDA为2.5 g/L, Gap27为4 g/L,抗坏血

酸盐水为 0.1 g/L)。药品定向注入双侧黑质,以前囟为原点,向左或向右 1.5 mm,向下 3.0 mm,深度 4.5 mm,定位参照《小鼠脑立体定位图谱》(第三版)^[17]。给药时针头以 1.5 mm/min 的速度下降,以 1 μ L/min 速度给药,给药后静置 5 min,将针头以 1.5 mm/min 的速度抽回。2 周后进行心脏灌流取全脑,选择每组内 3 只小鼠脑组织用于免疫组织化学染色与免疫荧光染色检测,另外 3 只小鼠取中脑组织,一半中脑用于 Western blot 检测,剩余中脑用于实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测。

1.3 酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)免疫组织化学染色定量

取脑组织置于 4% (体积分数)多聚甲醛溶液固定 24 h, 30% (质量分数)蔗糖脱水,至脑组织沉底后进行冰冻切片,每片厚度为 35 μ m, 4 $^{\circ}$ C 保存。取第 1、5、10、15、20、25、30 片黑质部脑片进行多巴胺神经元标志物 TH 染色,将脑片置于 6 孔板中,每孔加入 500 μ L 3% (体积分数) H_2O_2 , 反应 10 min 后漂洗,每孔再加入 500 μ L 封闭液封闭 1 h,加入 300 μ L TH 一抗抗体(1 : 1 000), 4 $^{\circ}$ C 过夜。漂洗后每孔加入 300 μ L 对应二抗抗体(1 : 1 000), 室温孵育 1 h。漂洗后加入 500 μ L 亲和素生物素化酶复合物(avidin biotinylated enzyme complex, ABC), 室温孵育 1 h。漂洗后入二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色 2 min, 之后进行梯度脱水,脱水后使用二甲苯透明,中性树脂封片。使用 Panoramic SCAN II 拍照系统(3DHSTECH 公司, 匈牙利)和 Case-viewer 软件(3DHISTECH 公司, 匈牙利)观察并进行拍摄。由其他 2 名不知情人员使用 Image J 软件手动计数 SN 中 TH 阳性细胞的数量。

1.4 免疫荧光染色检测 Cx43 蛋白分布

挑选 DA 神经元数量较多的 2 片黑质部脑片,进行星形胶质细胞标志物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和 Cx43 蛋白免疫荧光共染。每孔加入 500 μ L 封闭液 5% (质量分数)牛血清白蛋白室温孵育 1 h 封闭非特异性位点后,然后加入 500 μ L GFAP(1 : 800)和 Cx43 一抗(1 : 150)混合液, 4 $^{\circ}$ C 过夜。漂洗后,加入 500 μ L 荧光标记抗鼠(1 : 500)和荧光标记抗兔(1 : 500)二抗, 室温孵育 1 h; 漂洗后,将脑片贴在载玻片上,用含 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)防荧光淬灭剂封片,徕卡激光共聚焦显微镜(Leica 公司, 德国)观察、拍摄, Image J 软件分析荧光强度。

1.5 Western blot 检测 Cx43 蛋白表达

使用组织裂解液提取中脑组织总蛋白,用聚氰基丙烯酸正丁酯(bicinchoninic acid, BCA)试剂检测蛋白浓度,取 20 μ g 总蛋白上样,使用 10% (体积分数)的分离胶和 4% (体积分数)的浓缩胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。电泳后,使用 120 mA 恒流对聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜转膜 2 h。转膜后将 PVDF 膜置于封闭液中,室温摇床封闭 1 h。封闭后 4 $^{\circ}$ C 下分别孵育 Cx43 一抗(1 : 1 000)、Cx43-ps368 一抗(1 : 1 000)和 GAPDH 一抗(1 : 2 000)过夜。漂洗后,按照一抗类型加入辣根过氧化物酶标记抗兔(1 : 1 000)二抗或辣根过氧化物酶标记抗鼠二抗(1 : 1 000), 室温孵育 1 h。电化学发光法显色,曝光。Image J 软件分析光密度值。

1.6 qRT-PCR 检测 Cx43 信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid, mRNA)表达

使用 RNA 抽提试剂提取中脑组织总 RNA,按说明书配置逆转录体系进行反转录后进行 qRT-PCR。以 GAPDH 为内参照,按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 6-OHDA 组与 6-OHDA + Gap27 组目标基因相对于对照组的变化倍数。

Cx43 基因正引物序列(5' ~ 3')为: CTGACT-GCGGTCTACACCTG; 反引物序列(5' ~ 3')为: GAGCGAGAGACACCAAGGAC。

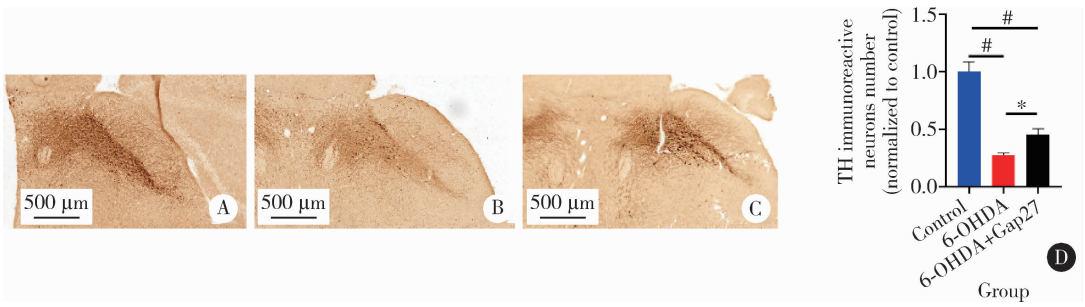
1.7 统计学分析

实验独立重复 3 次及以上,使用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析,实验结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均值比较用单因素方差分析, Tukey 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黑质 TH 阳性神经元变化

6-OHDA 组黑质 TH 阳性神经元数较对照组显著降低,表征模型建立成功^[16]。在注射 6-OHDA 后,为确定抑制 Cx43 蛋白对黑质 DA 神经元细胞死亡产生的影响,通过计数 TH 阳性神经元的数量表示 DA 神经元细胞死亡程度。注射 6-OHDA 2 周后,与对照组相比,6-OHDA 组小鼠黑质中 TH 阳性神经元数量减少了 72.3% \pm 0.02% ($P < 0.01$)。6-OHDA + Gap27 组较对照组小鼠黑质中 TH 阳性神经元数量减少了 54.6% \pm 0.04% ($P < 0.01$), 6-OHDA + Gap27 组 TH 阳性神经元数量与 6-OHDA 组相比,为后者的(1.64 \pm 0.16)倍($P < 0.05$, 图 1)。



A, TH immunoreactive neurons of control group (DAB staining, $n = 3$); B, TH immunoreactive neurons of 6-OHDA group (DAB staining, $n = 3$); C, TH immunoreactive neurons of 6-OHDA + Gap27 group (DAB staining, $n = 3$); D, relative number of TH positive neurons in substantia nigra. * $P < 0.05$, # $P < 0.01$. TH, tyrosine hydroxylase; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine.

图 1 黑质 TH 阳性神经元数量变化

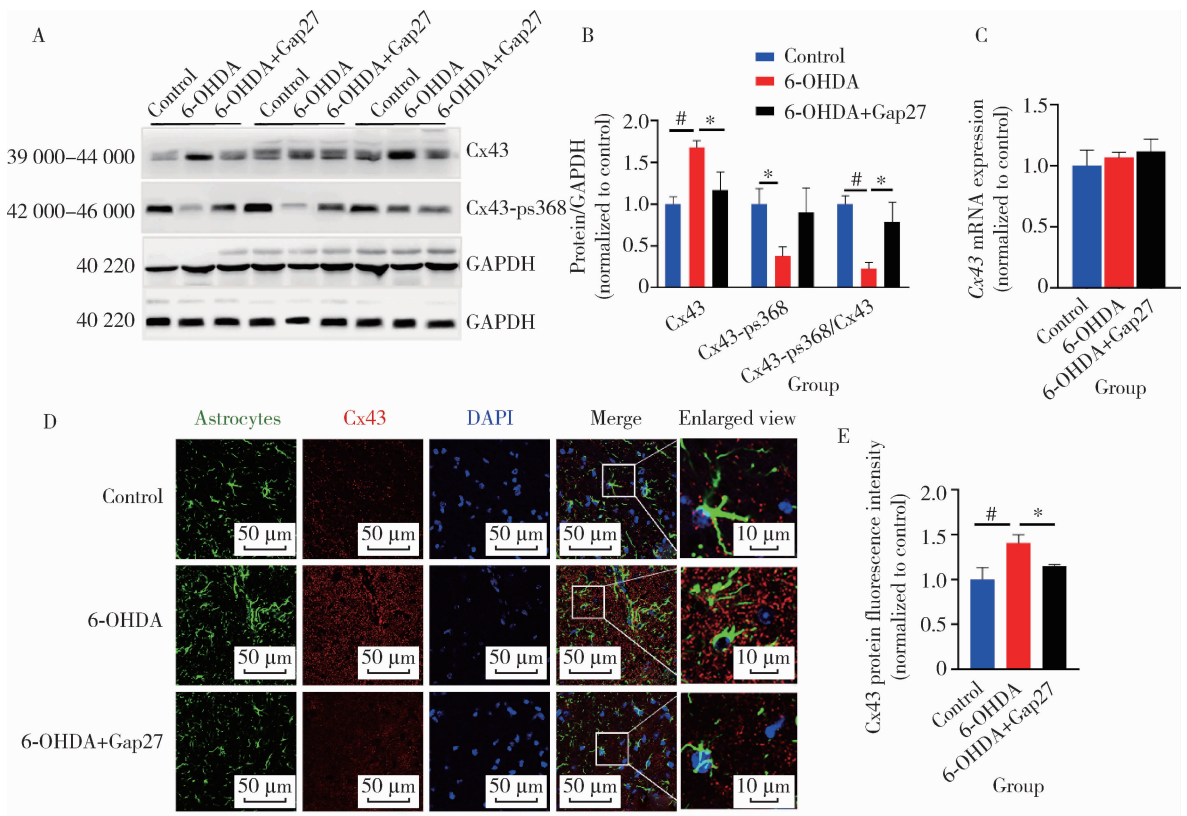
Figure 1 Variation of DA neuron number in substantia nigra

2.2 Cx43 蛋白及 Cx43 基因表达变化

为分析 Gap27 对 Cx43 表达的影响,对中脑组织 Cx43 蛋白及 Cx43 mRNA 表达量进行检测。Western blot 检测结果显示 6-OHDA 组 Cx43 蛋白含量显著高于对照组和 6-OHDA + Gap27 组(图 2),为对照组的 (1.68 ± 0.07) 倍 ($P < 0.01$),为 6-OHDA + Gap27 组的 (1.44 ± 0.07) 倍 ($P < 0.05$)。6-OHDA + Gap27 组 Cx43 蛋白含量略高于对照组(图 2),为对照组的 (1.17 ± 0.17) 倍,差异无统计学

意义。qRT-PCR 结果显示,三组 Cx43 mRNA 表达量差异无统计学意义(图 2)。

对星形胶质细胞标志蛋白 GFAP 和 Cx43 蛋白进行免疫荧光共染色,结果显示黑质部位 Cx43 蛋白含量变化与 Western blot 结果一致(图 2)。6-OHDA 处理后 Cx43 蛋白含量增加,6-OHDA 组蛋白含量是对照组的 (1.41 ± 0.08) 倍 ($P < 0.01$),是 6-OHDA + Gap27 组的 (1.22 ± 0.07) 倍 ($P < 0.05$,图 2)。



A, the differences of Cx43 and Cx43-ps368 protein content among groups ($n = 3$); B, relative expression of Cx43 protein, Cx43-ps368 protein, and Cx43-ps368/Cx43; C, relative expression of Cx43 mRNA ($n = 3$); D, immunofluorescence co-staining of astrocytes (green) and Cx43 protein (red) in substantia nigra ($n = 3$); E, relative expression of Cx43 protein fluorescence intensity. * $P < 0.05$, # $P < 0.01$. 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

图 2 Cx43 蛋白含量、基因表达及分布变化

Figure 2 Changes of Cx43 protein content, gene expression and distribution

2.3 Cx43-ps368 蛋白含量变化

有研究显示 Cx43-ps368 蛋白水平升高与 Cx43 GJs 通讯水平降低相关^[18]。为研究 Gap27 是否引起 Cx43-ps368 蛋白含量变化,使用 Western blot 对 Cx43-ps368 蛋白进行检测,结果显示:6-OHDA 组 Cx43-ps368 蛋白含量较对照组与 6-OHDA + Gap27 组降低,为对照组的 37.5% ± 0.09% ($P < 0.05$),6-OHDA + Gap27 组的 40.6% ± 0.10% (图 2);在 Cx43-ps368 蛋白与总 Cx43 蛋白比值方面,6-OHDA 组 Cx43-ps368 蛋白占比显著低于对照组与 6-OHDA + Gap27 组 (图 2),分别为对照组的 22.6% ± 0.06% ($P < 0.01$),6-OHDA + Gap27 组的 28.8% ± 0.08% ($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究旨在探讨模拟肽 Gap27 抑制 Cx43 蛋白在 6-OHDA 诱导的 PD 小鼠模型中对 DA 神经元死亡及对 Cx43 表达的影响。目前在 PD 中 Cx43 蛋白的研究多为观察性研究^[19-22],并且缺乏对 DA 神经元状态的观察,Cx43 蛋白在 PD 中的作用有待明确,因此,本研究通过加入模拟肽 Gap27 来观察其在 6-OHDA 诱导的 PD 小鼠模型中的作用。本研究结果显示,注射 6-OHDA 后小鼠 DA 神经元数量较对照组显著减少,Gap27 则降低了黑质 DA 神经元损失,这提示 Gap27 在黑质部位对 DA 神经元存在保护作用。此外,Gap27 显著逆转了 6-OHDA 引起的 Cx43 蛋白含量增加与 Cx43-ps368 蛋白含量降低,但未发现 Gap27 对 Cx43 mRNA 水平和 Cx43 蛋白空间分布的影响。

本研究结果中 6-OHDA 组中脑 Cx43 蛋白含量增加,与之前在 6-OHDA、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrapyrindine, MPTP)、鱼藤酮等神经毒性物质诱导的动物纹状体及星形胶质细胞中发现 Cx43 蛋白含量增加的结果一致^[19-22]。本研究中模拟肽 Gap27 可逆转 6-OHDA 引起的 Cx43 蛋白含量增加,并减少 DA 神经元数量损失,提示 Cx43 蛋白过表达可能存在神经毒性。本研究还发现 6-OHDA 引起中脑 Cx43-ps368 蛋白含量降低,Gap27 则减弱了这一变化。据报道 Cx43-ps368 蛋白可降低 Cx43 GJs 生物学活性,Gap27 维持 Cx43-ps368 蛋白水平可能是其发挥神经元保护作用的机制之一^[18]。本研究中 qRT-PCR 与免疫荧光染色结果显示 Cx43 mRNA 水平和 Cx43 蛋白的分布没有受到 Gap27 影响,在其他 Cx43 蛋白水平升高的 PD 动物模型研究中也观察到相同的

结果^[20],这可能与 Cx43 蛋白半衰期较短 ($t_{1/2} < 2$ h),转录翻译处于高表达状态相关^[23],Cx43 半衰期短这一特点也使得 Gap27 可较快发挥抑制作用。由于 Cx43 mRNA 水平没有改变,6-OHDA 组 Cx43 蛋白含量的增加则可能与 Cx43-ps368 蛋白去磷酸化的转变相关。另外,免疫荧光染色结果显示黑质部位血管区域以及非血管区域 Cx43 蛋白免疫阳性点都有所增加,此前 Charron 等^[24]发现 6-OHDA 处理后大鼠纹状体中只观察到血管周围 Cx43 免疫阳性点增加,但无血管区域 Cx43 变化不显著。造成结果不同的原因可能有:(1)观察脑区不同,本研究观察脑区为黑质,文献[24]中为纹状体;(2)本研究与文献[24]中使用的 6-OHDA 剂量不同,导致 Cx43 免疫阳性点分布不同。

Cx43 GJs 与 HCs 功能及数量的降低可防止过量的有害物质经过星形胶质细胞网络传递,进而减少神经元损伤,综合本研究结果,6-OHDA 引起了黑质 DA 神经元大量死亡、Cx43 蛋白增加和 Cx43-ps368 蛋白降低,模拟肽 Gap27 则减弱了 6-OHDA 引起的上述变化,提示 6-OHDA 引起的 Cx43 蛋白过表达可能对 DA 神经元存在神经毒性。Gap27 降低 Cx43 蛋白含量可能间接影响了 Cx43 GJs 与 HCs 的组装形成,Cx43-ps368 蛋白水平升高可降低 Cx43 GJs 活性,Gap27 的保护作用可能与降低 Cx43 蛋白表达并维持 Cx43-ps368 蛋白水平相关。综上所述,本研究通过使用模拟肽 Gap27 发现了 Cx43 蛋白及 Cx43-ps368 蛋白在 PD 病理机制中的重要作用,为阐明 PD 的分子机制提供了实验依据。

参考文献

- [1] Hayes MT. Parkinson's disease and Parkinsonism [J]. Am J Med, 2019, 132(7): 802-807.
- [2] Luo H, Xiang Y, Qu X, et al. Apelin-13 suppresses neuroinflammation against cognitive deficit in a streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease through activation of BDNF-TrkB signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 395.
- [3] 苏晓梅,张丹参. 星形胶质细胞与神经退行性疾病的相关性 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(10): 868-869.
- [4] Phatnani H, Maniatis T. Astrocytes in neurodegenerative disease [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(6): a020628.
- [5] Diaz EF, Labra VC, Alvear TF, et al. Connexin 43 hemichannels and pannexin-1 channels contribute to the α -synuclein-induced dysfunction and death of astrocytes [J]. Glia, 2019, 67(8): 1598-1619.
- [6] Orellana JA, S tez PJ, Cort es-Campos C, et al. Glucose increases intracellular free Ca²⁺ in tancytes via ATP released through

- connexin 43 hemichannels[J]. *Glia*, 2012, 60(1): 53–68.
- [7] Leithe E, Mesnil M, Aasen T. The connexin 43 C-terminus: a tail of many tales[J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2018, 1860(1): 48–64.
- [8] Evans WH, Boitano S. Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication[J]. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(Pt 4): 606–612.
- [9] Li X, Zhao H, Tan X, et al. Inhibition of connexin43 improves functional recovery after ischemic brain injury in neonatal rats[J]. *Glia*, 2015, 63(9): 1553–1567.
- [10] Faniku C, O’Shaughnessy E, Lorraine C, et al. The connexin mimetic peptide gap27 and Cx43-knockdown reveal differential roles for connexin43 in wound closure events in skin model systems[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 9(2): 604.
- [11] Evans WH, Leybaert L. Mimetic peptides as blockers of connexin channel-facilitated intercellular communication[J]. *Cell Commun Adhes*, 2007, 14(6): 265–273.
- [12] Solan JL, Lampe PD. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects[J]. *Biochem J*, 2009, 419(2): 261–272.
- [13] Ek-Vitorin JF, King TJ, Heyman NS, et al. Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation[J]. *Circ Res*, 2006, 98(12): 1498–1505.
- [14] 黄焕焕, 赵雨佳, 张慧峰, 等. 抑制星形胶质细胞 Cx43 可保护 LPS 诱导的多巴胺神经元损伤[J]. *毒理学杂志*, 2018, 32(3): 186–194.
- [15] Wang ZY, Lian H, Zhou L, et al. Altered expression of d1 and d2 dopamine receptors in vagal neurons innervating the gastric muscularis externa in a Parkinson’s disease rat model[J]. *J Parkinsons Dis*, 2016, 6(2): 317–323.
- [16] 张蓓, 淫羊藿苷对 6-OHDA 诱导的帕金森病小鼠模型的保护作用及机制研究[D]. 贵州: 遵义医科大学, 2019.
- [17] Franklin-Keith BJ, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates [M]. 3th ed. New York: Academic Press, 2007: 360.
- [18] Cotter ML, Boitano S, Lampe PD, et al. The lipidated connexin mimetic peptide SRPTEKT-Hdc is a potent inhibitor of Cx43 channels with specificity for the pS368 phospho-isoform[J]. *Am J Physiol*, 2019, 317(4): C825–C842.
- [19] Rufer M, Wirth SB, Hofer A, et al. Regulation of connexin-43, GFAP, and FGF-2 is not accompanied by changes in astroglial coupling in MPTP-lesioned, FGF-2-treated Parkinsonian mice[J]. *J Neurosci Res*, 1996, 46(5): 606–617.
- [20] Kawasaki A, Hayashi T, Nakachi K, et al. Modulation of connexin 43 in rotenone-induced model of Parkinson’s disease[J]. *Neuroscience*, 2009, 160(1): 61–68.
- [21] Wang Y, Wu Z, Liu X, et al. Gastrodin ameliorates Parkinson’s disease by downregulating connexin 43[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(2): 585–590.
- [22] 韩雪洁, 哈力达·巴合提汗, 高华, 等. 黄芩苷可影响帕金森病模型大鼠纹状体星形胶质细胞缝隙连接蛋白 43 的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(16): 2542–2548.
- [23] Epifantseva I, Shaw RM. Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels[J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2018, 1860(1): 40–47.
- [24] Charron G, Doudnikoff E, Canron MH, et al. Astrocytosis in Parkinsonism: considering tripartite striatal synapses in physiopathology? [J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6: 1–12.

(2020-08-31 收稿)

(本文编辑:刘淑萍)