

瞬时受体电位通道蛋白在多功能性 系统萎缩中的调控作用*

王海龙** 邓玉林** 张泽波** 王 晨 杨祖业 李福涛 马 宏***

(北京理工大学生命学院, 北京 100081)

摘要 多系统萎缩(multiple system atrophy, MSA)是一类神经系统退行性疾病, 其病理特征是胶质细胞中出现含有不溶性 α 突触核蛋白(α -synuclein)的胞质包涵体。研究显示, α -synuclein 在多系统萎缩的发病机制中有重要作用, 但其毒性的分子机制目前还不清楚。本文在前期研究氧化应激条件下 α -synuclein 引起细胞内钙稳态失衡, 提出了以氧化应激为连接的多系统萎缩中, 胶质细胞死亡的新假说的基础上, 深入分析了 α -synuclein 过表达导致 U251 细胞变性死亡的分子机制。首先证明过表达 α -synuclein 的 U251 细胞出现生长速度减慢、氧化应激水平增加和钙离子瞬时受体电位通道蛋白(transient receptor potential channel-1, TRPC1)表达量升高, 而且细胞存活率的变化可通过下调 TRPC1 的表达得以恢复, 说明 TRPC1 在 α -synuclein 过表达细胞死亡中发挥了重要作用; 其次, 研究发现 α -synuclein 稳转 U251 细胞中出现了明显的自噬水平增加和细胞凋亡的特征, 表明 α -synuclein 通过作用于内质网钙泵以及细胞膜上的瞬时受体电位钙通道 TRPC1, 破坏了细胞内的钙稳态, 进而影响自噬和凋亡, 增加了 U251 细胞对于过氧化氢的敏感性, 这可能是导致多系统萎缩病人脑内胶质细胞死亡的原因。

关键词 α -synuclein, 多系统萎缩, 钙离子通道, TRPC1(transient receptor potential channel-1), MAP1LC3B (microtubule associated protein 1 light chain 3 beta), DR5(death receptor 5)

学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00616

多系统萎缩(multiple system atrophy, MSA)是一种迟发性神经系统变性疾病, 以自主神经功能障碍、帕金森病(MSA-P)及小脑性共济失调(MSA-C)为特征性表现, 临床早期诊断极为困难^[1-4]。虽然该疾病的对症治疗能在一定程度上缓解患者的帕金森病和自主神经衰竭的症状, 但并不能彻底治愈该病。该病的确切机制迄今不明。近年研究显示, MSA 也是由 α 突触核蛋白(α -synuclein)引起的疾病^[5], 由 α -synuclein 组成的胶质细胞胞质包涵体(glial cytoplasmic inclusions, GCIs)被认为是 MSA 疾病细胞水平的标志物^[4-10]。

瞬时受体电位通道蛋白(transient receptor potential channel-1, TRPC1)是第一个被克隆的哺乳类 TRP, 与果蝇 TRP 有约 40%的同源性, 多分布于脑、心脏、睾丸、卵巢、唾液腺等组织, 也少量分布于肝和肾上腺^[11]。研究表明, TRPC1 能够数倍增强细胞的钙库依赖性钙流入(store operated

calcium entry, SOCE), 同时细胞内源性 SOCE 能够通过 TRPC1 的反义 cDNA 表达而极大削弱^[1], 在小肠内皮细胞中 TRPC1 介导的钙离子内流能够抑制 NF- κ B(nuclear factor κ B)的激活诱导细胞凋亡。现已证实细胞内钙离子浓度与细胞损伤有一定的关联性, TRPC1 能够导致细胞内钙离子浓度的变化。如果钙离子浓度增高将会启动相应的细胞凋亡机制^[2]。已有研究证实, TRPC1 通道阻断剂能够显著降低体外培养的海马神经细胞凋亡, 以 MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium)为工具药物, 建立多

* 国家自然科学基金资助项目(31200636), 北京理工大学基础研究基金资助项目(3160012211108, 3160012231102)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 010-68914607, E-mail: 04656@bit.edu.cn

收稿日期: 2013-05-21, 接受日期: 2013-09-06

巴胺能神经细胞(MN9D)损伤模型,证实 TRPC3 能够拮抗 MPP⁺ 对细胞的毒性损伤,说明作为钙通道的 TRPC3 的下调参与了某些退行性疾病(如帕金森病)的病理生理变化。此外, Wenning 等^[3]研究发现,铁离子通过 TRPC6 进入具有神经性状的 PC12 细胞内,出现细胞内铁离子的聚集。有研究发现给脑室内注射铁离子后星型胶质细胞自噬增加^[4],而给予铁离子螯合剂去铁敏治疗后 LC3-II 和组织蛋白 D 表达下降。最近又有新的研究发现通过脑室内注射铁离子能够引起慢性脑积水^[12]。本实验室前期研究表明,在内质网压力增加情况下, Ca²⁺ 对细胞的死亡起到了关键的作用,并对 Ca²⁺ 内流进行了简单的探讨,证明 α -synuclein 对细胞内 Ca²⁺ 浓度有影响,对细胞死亡有作用^[13]。

本文在前期研究基础上,利用构建好的稳定表达 α -synuclein 的 U251 细胞系,研究了细胞内 TRPC1 基因表达的变化,并通过干扰 RNA 技术敲低 TRPC1 基因表达,有效地改变了细胞的存活率,进一步发现膜上钙调蛋白 TRPC1 参与钙的内流,在内质网压力增加时表达量增加,同时调节细胞的存活。结果首次表明 α -synuclein 通过作用于细胞膜上的瞬时受体电位钙通道 TRPC1,破坏了细胞内的钙稳态,细胞内氧化应激水平升高,细胞自噬和凋亡水平增加,这可能是导致多系统萎缩病人脑内胶质细胞死亡的原因。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM(GIBCO)、胎牛血清(fetal calf serum, FBS)(Hyclone 公司); 过氧化氢检测试剂盒、丙二醛测定试剂盒(南京建成生物公司); TRIZOL (Invitrogen 公司); 乙醇、异丙醇、氯仿(分析纯)、逆转录酶(Promega 公司); TRPC-1 抗体(Abcam 公司)。可见-紫外分光光度计(Shimadzu, UV-2550); 超声细胞破碎仪(Cole-Parmer, CP100); caspase3 与 caspase8 酶活检测试剂盒(Promega 公司); 自噬染色试剂盒(ENZO); pSilencer2.1(Ambion 公司)。

1.2 氧化应激水平测定

1.2.1 丙二醛浓度测定。贴壁细胞用胰酶消化或刮下来后, 3 000 r/min 离心 10 min, 搜集沉淀, 在沉淀中加入一定量的生理盐水或缓冲液(细胞密度达到 1×10^6 个/ml), 在冰浴中超声破碎或手动匀浆破碎, 取悬浮液进行丙二醛和蛋白质浓度测定。

1.2.2 过氧化氢浓度测定。贴壁细胞用胰酶消化或刮下来后, 3 000 r/min 离心 10 min, 搜集沉淀, 在沉淀中加入一定量的生理盐水或缓冲液(细胞密度达到 1×10^6 个/ml), 在冰浴中超声破碎或匀浆破碎, 取悬浮液进行过氧化氢和蛋白质浓度测定。

1.3 MTT 法测定细胞存活率

转染后细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板。培养 36 h 后, 弃去培养基, 加入终浓度为 0.5 g/L MTT 后培养 4 h。弃去培养基, 每孔加入 200 μ l DMSO, 震荡混匀, 测量 570 nm 下的吸光度值, 计算细胞存活率。实验设置为重复 3 次, 每次 5 个平行孔。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{处理组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

1.4 细胞凋亡活性的测定

通过细胞计数的方法分别取 U251、空载体稳转对照细胞系(control)、稳转 α -synuclein 细胞系(α -syn)的细胞各 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中, 贴壁培养 8 h 后, 依据细胞凋亡活性检测试剂盒的操作说明, 分别加入 caspase3 及 caspase8 酶活检测试剂, 常温孵育 2 h 后, 用荧光素酶检测仪(GLOMAX 20 LUMINOMETER)进行酶活检测。实验设置为重复 3 次, 每次 5 个平行孔。

1.5 自噬小泡的检测

通过细胞计数的方法分别取 U251、空载体稳转对照细胞系(control)、稳转 α -synuclein 细胞系(α -syn)的细胞各 1×10^4 个, 接种于 6 孔培养板中, 贴壁培养 24 h 后, 依据自噬小泡检测试剂盒的操作说明进行自噬小泡与细胞核的染色操作, 封片后激光共聚焦显微镜观测拍照。

1.6 TRPC1 RNAi 载体的构建

选择 TRPC1 干扰表达目标序列片段, 序列组成为 GGACTACGGTTGTCAGAAA, 通过酶切连接结合到 pSilencer2.1 的载体上, 重组克隆经酶切鉴定和序列分析证实获得阳性克隆, 目的序列与预期相同。通过对稳转 α -synuclein 细胞系(α -syn)的细胞进行转染, 测定干扰序列重组载体的干扰效果, 空载体 pSilencer2.1 设为阴性对照。

1.7 逆转录 PCR

按照说明书进行 RNA 常规提取操作, 测定 RNA 浓度, 取等量 RNA 进行逆转录, 反应结果通过琼脂糖凝胶电泳进行检测, TRPC1 以及内参 β -actin 的引物序列为: β -actin Forward 5' ATGGTGGGCATGGGTCAGAAG 3', Reverse 5' CACGC-

AGCTCATTGTAGAAGG 3'; TRPC1 Forward 5' GCTCTAGAATGAGCAATGATACC 3', Reverse 5' GGGGTAGCACGATGCACTAGGCA 3'. PCR 反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 52℃ ~60℃ 30 s, 72℃ 30 s; 72℃ 10 min.

1.8 蛋白质印记

分别取培养 72 h 的细胞, 加入细胞裂解液提取细胞总蛋白. 蛋白质定量后进行 SDS-PAGE 分离和转膜, 蛋白质印记法检测 TRPC-1 蛋白和内参 β -actin 蛋白的表达情况, 抗体浓度按试剂盒说明操作. 以 TRPC-1 蛋白条带与 β -actin 条带的比值表示目的蛋白的相对表达量.

1.9 统计学分析

本研究中所有实验数据采用 SPSS 12.0 统计学软件进行分析. 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. 所有给出显著性分析的实验中, 重复样本数 $n \geq 3$.

2 结 果

2.1 α -synuclein 过表达降低细胞增殖速率

将 U251、空载体对照细胞系(control)、稳转 α -synuclein 细胞系(α -syn)和稳转 α -synuclein+EGFP 细胞系(α -syn+EGFP)^[13]以相同的密度接种于培养板中, 每 24 h 进行一次细胞计数, 连续计数 3 次, 绘制 4 种细胞的增殖曲线(图 1).

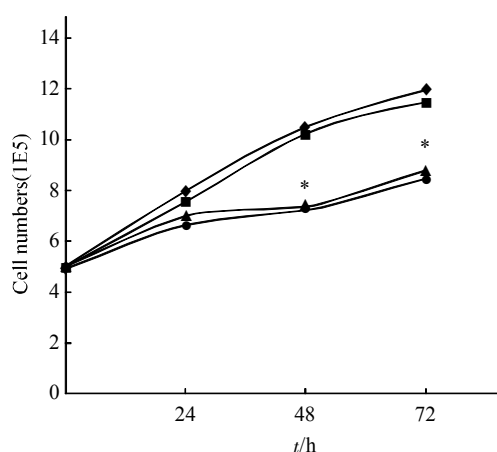


Fig. 1 The assay of cell proliferation after α -synuclein overexpressed

◆—◆: U251; ■—■: Control; ▲—▲: α -syn; ●—●: α -syn+EGFP.

从图中可以看出, 过表达 α -synuclein 的细胞生长速度明显慢于 U251 及其空载体对照细胞株, 48 h 和 72 h 时的细胞数量存在显著性差异($*P < 0.05$),

表明 α -synuclein 过量表达明显减慢了 U251 的增殖速率, 有可能促进了胶质瘤细胞凋亡.

2.2 α -synuclein 过表达引起细胞内氧化应激水平升高

细胞内过氧化氢的含量是反映细胞氧化应激水平的一种指标. 丙二醛(MDA)是脂质过氧化的终产物, 其含量也可反映细胞的氧化应激程度. 图 2 显示了 U251、空载体对照细胞系(control)、稳转 α -synuclein 细胞系(α -syn)和稳转 α -synuclein+EGFP 细胞系(α -syn+EGFP) 4 种细胞的胞内过氧化氢和丙二醛的含量.

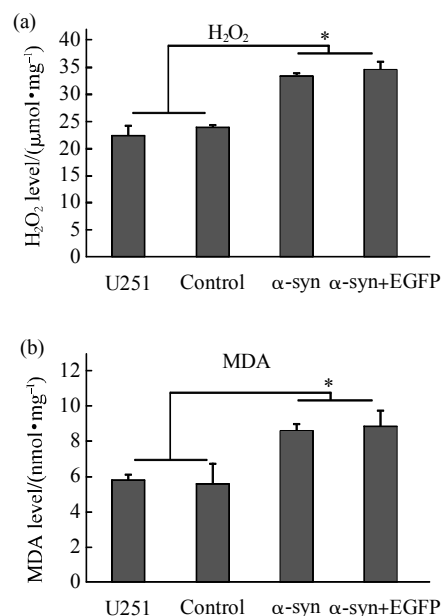


Fig. 2 The assay of cell oxidative stress after α -synuclein overexpressed

(a) The level of H₂O₂ in U251 cells. (b) The level of MDA in U251 cells.

从图中可以看出, 稳定表达 α -synuclein 的细胞系(α -syn 和 α -syn+EGFP)胞内过氧化氢和丙二醛的浓度显著高于对照细胞($*P < 0.05$). 表明 α -synuclein 高表达引起了 U251 细胞氧化应激水平的升高, 而转染空载体对细胞的氧化应激水平没有影响.

2.3 α -synuclein 过表达细胞 TRPC1 表达量升高

为了探寻 α -synuclein 过表达的神经胶质瘤细胞存活能力的下降是否与钙离子通道蛋白 TRPC1 有相关性, 我们对几种已建立的稳转细胞株进行了 TRPC1 表达水平的检测, 鉴于两种稳定表达 α -synuclein 的细胞系(α -syn 和 α -syn+EGFP)在细胞

活性方面差异不显著, 故以下实验均选择非融合表达 α -synuclein 的细胞株进行测定(图 3).

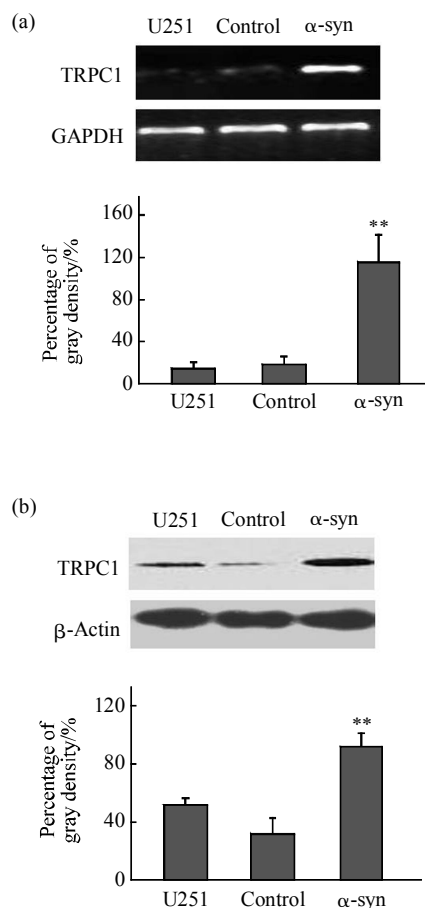


Fig. 3 The level of TRPC1 expressed in α -synuclein overexpression cells

(a) The level of RNA expression. (b) The level of protein expression.

从图 3 中我们可以看出, α -synuclein 过表达的神经胶质瘤细胞的 TRPC1 含量, 在蛋白质水平上和 mRNA 水平上均显著高于对照细胞(** $P < 0.01$). 结果说明 U251 细胞因由 α -synuclein 过表达, 有可能通过引起内质网压力增加, 进而引起 TRPC-1 的表达量增加.

2.4 下调 TRPC1 的表达后细胞毒性降低

α -synuclein 过表达的细胞 TRPC1 钙离子通路激活, 引起 Ca^{2+} 内流增加, 细胞毒性增强. 因此

根据人 TRPC1 基因的序列, 我们设计了 4 段可能具有敲低 TRPC1 基因表达效果的 siRNA 序列, 并根据 shRNA 设计原则, 最终确定了能在真核细胞中表达并敲低 TRPC1 基因的 DNA 内插序列如下:

Forward 5' gatccGGACTACGGTTGTCAGAA-AttcaagagaTTTCTGACAACCGTAGTCCAAa 3' , Reverse 5' agcttTTGGACTACGGTTGTCA GAAA-tctcttgaaTTTCTGACAACCGTAGTCCg 3'.

通过基因干扰技术下调 U251 细胞 TRPC1 的表达量, 干扰表达载体(pTRPC1)构建及活性鉴定正确(图 4), 进一步转染 α -synuclein 过表达的神经胶质瘤细胞株(α -syn), 72 h 后光学显微镜下观察可见, 转染靶基因干扰序列 α -synuclein 过表达的神经胶质瘤细胞(简称为 T), 生长密度明显不同于转染空载体 α -synuclein 过表达的神经胶质瘤对照细胞(简称为 CK)(图 5a), MTT 法细胞存活率测定结果显示, 下调 TRPC1 的表达量可提高 U251 细胞的存活率, 促进细胞增殖(图 5b, * $P < 0.05$), 并且 TRPC1 敲低的 α -synuclein 稳转细胞与 α -synuclein 过表达的神经胶质瘤对照组细胞相比, 细胞内过氧化氢和丙二醛的含量降低, 细胞氧化应激水平降低(图 6, * $P < 0.05$).

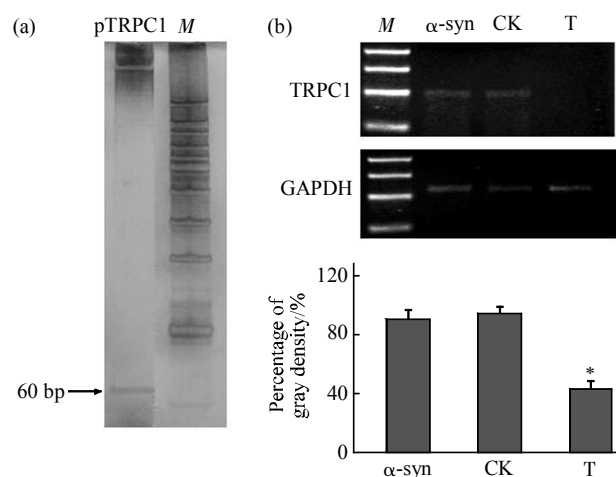


Fig. 4 The activity of the expression system for down-regulating TRPC1

(a) The result of digestion by restricted enzyme of recombinant vector.

(b) The transcriptional level of TRPC1 expression after transfected by RNA referencing vector in α -synuclein overexpression U251 cell.

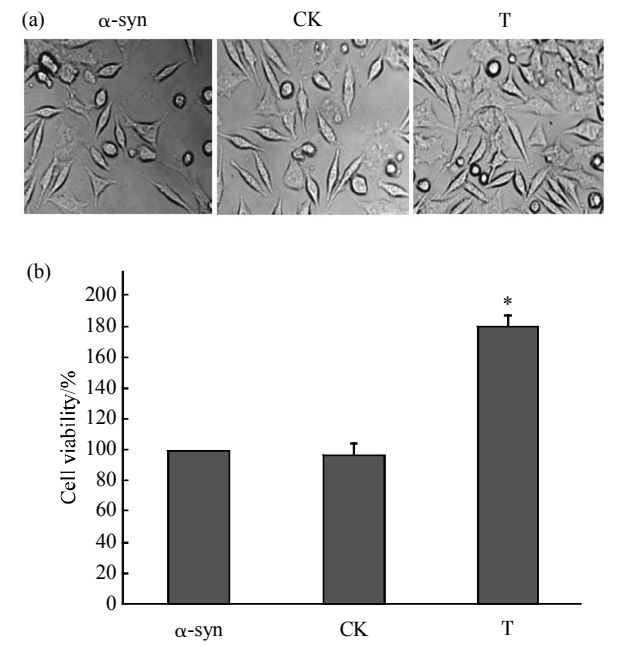


Fig. 5 The analysis of cell survival with down-regulating TRPC1
(a) Microscopy assay of U251 glioma cells with different treatment (200 ×). (b) The assay of U251 cells viability with TRPC1 down-regulation.

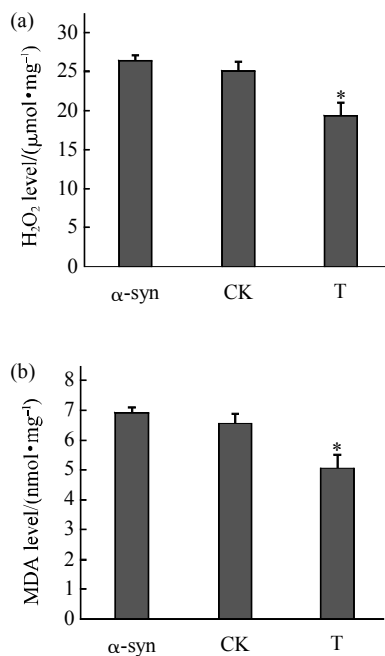


Fig. 6 The assay of cell oxidative stress with TRPC1 down-regulation
(a) The level of H₂O₂ in U251 cells. (b) The level of MDA in U251 cells.

2.5 α-synuclein 过表达细胞损伤分子效应

2.5.1 α-synuclein 过表达引起细胞凋亡效应升高.
死亡受体 5(death receptor DR5)是死亡受体家族的

重要成员, 其活化可传导细胞凋亡信号. DR5 结合后可募集死亡结构域连接蛋白 FADD, 启动凋亡信号, 而 FADD 又可募集 pro-caspase8 到 DR5 受体复合物上, 并将其剪切活化成为活性 caspase8, 从而激活相关的下游凋亡信号通路, 最终导致细胞凋亡. 图 7 是对 α-synuclein 过表达时细胞内 DR5 的含量及其下游激活的 caspase8 的活性及凋亡执行蛋白 caspase3 活性的检验.

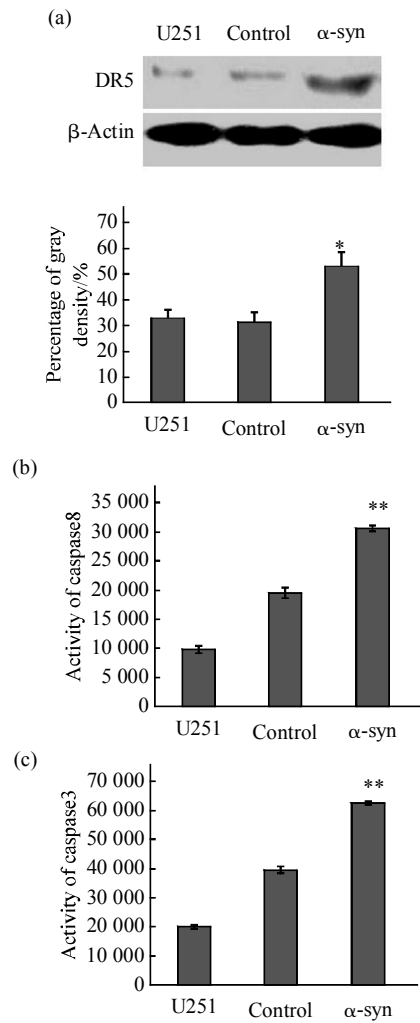


Fig. 7 The effect of α-synuclein overexpressed on the levels of death receptors (a), and activated caspase8 (b) or caspase3 (c) in glioma cells

由此结果可以看出, α-synuclein 过表达细胞内 DR5 含量比对照组高, 同时 α-synuclein 过表达细胞与正常细胞或空载体稳转株相比 caspase 活性均出现显著性增高(***P* < 0.01), 这说明 α-synuclein 过表达有可能激活了经典的细胞凋亡的外源性信号

通路,增加了细胞的凋亡活性.

2.5.2 α -synuclein 过表达引起细胞自噬效应升高.

MAP1LC-3(微管相关蛋白 1 轻链蛋白 3)是自噬标记蛋白,正常机体自噬发生水平较低.当细胞自稳态发生改变,MAP1LC-3 I 型向 II 型转化,自噬即刻被诱导,细胞借此途径清除胞内多余或损伤的细胞器及胞内成分.与此同时,当有自噬发生时,该过程中一些损坏的蛋白或细胞器将被双层膜结构的

自噬小泡包裹,因此自噬小泡的形成也是检测自噬发生的特征性标志.我们对 α -synuclein 过表达时细胞内 MAP1LC3 的变化及自噬小泡的形成进行检测.由图 8 可见,只有 α -synuclein 过表达细胞内出现 MAP1LC-3 II,同时, α -synuclein 过表达细胞内形成了大量自噬小泡,这说明 α -synuclein 过表达增加了细胞自噬的发生.

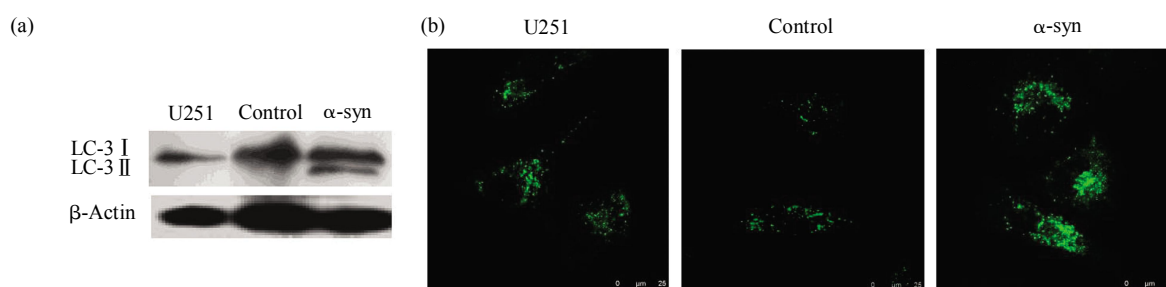


Fig. 8 The effect of α -synuclein overexpressed on autophagy marker protein in glioma cells

(a) The level of MAP1LC-3 expression. (b) The increased staining autophagosomes after α -synuclein overexpression.

3 讨 论

多种神经系统退行性疾病都与钙稳态和氧化应激水平引起的钙稳态失衡相关,在我们的实验中也观察到了由于 α -synuclein 过表达导致的氧化应激水平的升高.脂质过氧化过程中生成的脂质氧自由基、脂质过氧自由基等活性氧自由基参与脂质过氧化的链引发和链增长反应,脂质过氧自由基可以通过分子内双键加成,形成环过氧化物和环内过氧化物自由基,最后断裂生成各种醛类,主要是丙二醛(MDA)以及短链的酮、羧酸和烃类.因此,丙二醛的量常被用作脂质过氧化的量度.实验中,我们看到 α -synuclein 过表达胶质细胞内 MDA 的含量显著高于 U251 和空载体对照细胞中的 MDA 含量(图 2).当运用 RNA 干扰技术使稳转细胞内 TRPC1 表达量下降后,MDA 含量也随之下降(图 6).

生物体内的过氧化氢的重要来源是超氧阴离子自由基的歧化反应.过氧化氢能穿透细胞膜,但超氧阴离子自由基不具备这一能力.进入细胞后,过氧化氢通过 Fenton 反应生成反应性极强的羟自由基,进而损伤细胞.此外,葡萄糖氧化酶、D-氨基酸氧化酶和黄嘌呤氧化酶等酶催化的酶促反应,

可不经由超氧阴离子自由基而直接产生过氧化氢.因此,细胞内过氧化氢含量升高,也会导致细胞氧化应激水平上升.从图 2 中可以看出, α -synuclein 过表达胶质细胞内过氧化氢的含量要显著高于 U251 和空载体对照细胞中的过氧化氢含量.上述实验都表明, α -synuclein 在 U251 细胞内过表达,引起了细胞氧化应激水平的升高.当运用 RNA 干扰技术使稳转细胞内 TRPC1 表达量下降后, H_2O_2 含量也随之下降(图 6).以上研究结果均提示 α -synuclein 过表达胶质细胞内氧化应激的程度与 TRPC1 的表达水平密切相关.

我们的研究表明, α -synuclein 过表达胶质细胞中存在细胞凋亡和细胞自噬效应的增强(图 7, 8),推测其分子机制可能是细胞内 TRPC1 的表达水平升高使胞内 Ca^{2+} 的浓度增加,激活胞内与 Ca^{2+} 相关蛋白的调控信号,不仅可产生 caspase 家族起始成员 caspase8 的激活,进而激活 caspase3 凋亡效应分子的活化,引起细胞凋亡,而且也可通过 CaMKK- β 的活化激活自噬的发生.而细胞内自噬和凋亡的双重作用对细胞增殖产生抑制,所以 α -synuclein 过表达胶质细胞的存活率下降,当对 TRPC-1 蛋白的表达进行抑制时,细胞存活率显著

上升(图 5)。以上研究结果均提示 α -synuclein 过表达胶质细胞的损伤效应也与 TRPC1 的表达水平密切相关。

最近有些研究关注了 TRPC1 与神经相关细胞损伤效应的关联性, Bhattacharya 等^[14]发现在人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 中激活或过表达 TRPC1 可减轻 MPP⁺ 诱导的细胞凋亡。Brooks 等^[15]发现在小肠内皮细胞中 TRPC1 介导的钙离子内流抑制 NF- κ B 激活诱导的细胞凋亡。尽管上述研究结论与我们的结果不一致, 但已证实的是细胞内钙离子浓度与细胞损伤密切相关, TRPC1 可导致细胞内钙离子浓度的变化^[16], TRPC1 通道阻断剂可显著减轻体外培养的海马神经元的凋亡。如果钙离子浓度增高, 将会启动细胞凋亡机制^[17]。综上所述, 在 α -synuclein 过表达的神经胶质细胞中 TRPC1 可通过引起钙稳态的变化最终导致细胞死亡。

参 考 文 献

- [1] Gilman S, Wenning G K, Low P A, *et al.* Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology*, 2008, **71**(9): 670-676
- [2] Quinn N. Multiple systems atrophy the nature of the beast. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1989, **52**(Suppl): 78-89
- [3] Wenning G K, Benshlomo Y, Magalhaes M, *et al.* Clinical features and natural history of multiple system atrophy. An analysis of 100 cases. *Brain*, 1994, **117**(4): 835-845
- [4] Wenning G K, Colosimo C, Geser F, *et al.* Multiple system atrophy. *Lancet Neurol*, 2004, **3**(2): 93-103
- [5] Dickson D W, Lin W, Liu W K, *et al.* Multiple system atrophy: a sporadic synucleinopathy. *Brain Pathol*, 1999, **9**(4): 721-732
- [6] Lantos P L. The definition of multiple system atrophy: a review of recent development. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998, **57** (12): 1099-1111
- [7] Papp M I, Kahn J E, Lantos P L. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *J Neurol Sci*, 1989, **94**(1-3): 79-100
- [8] Spillantini M G, Crowther R A, Jakes R, *et al.* Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett*, 1998, **251**(3): 205-208
- [9] Tu P H, Galvin J E, Baba M, *et al.* Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein. *Ann Neurol*, 1998, **44**(3): 415-422
- [10] Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, *et al.* Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci Lett*, 1998, **249**(2-3): 180-182
- [11] Graham J G, Oppenheimer D R. Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1969, **32**(1): 28-34
- [12] Wenning G K, Stefanova N. Recent developments in multiple system atrophy. *J Neuro*, 2009, **256**(11): 1791-1808
- [13] Ying Z X, Lin F K, Gu W H. Alpha-synuclein increases U251 cells vulnerability to hydrogen peroxide by disrupting calcium homeostasis. *J Neural Transmittsion*, 2011, **118**(8): 1165-1172
- [14] Bhattacharya K, Saadia D, Eisenkraft B, *et al.* Brain magnetic resonance imaging in multiple system atrophy and Parkinson's disease: a diagnostic algorithm. *Arch Neuro*, 2002, **59**(5): 835-842
- [15] Brooks D J, Seppi K. Proposed neuroimaging criteria for the diagnosis of multiple system atrophy. *Mov Disord*, 2009, **24** (7): 949-964
- [16] Lyoo C H, Jeong Y, Ryu Y H, *et al.* Effects of disease duration on the clinical features and brain glucose metabolism in patients with mixed type multiple system atrophy. *Brain*, 2008, **131**(2): 438-446
- [17] Lee E A, Kim B J, Lee W Y. Diagnosing multiple system atrophy with greater accuracy: combined analysis of the clonidine growth hormone test and external anal sphincter electromyography. *Mov Disord*, 2002, **17**(6): 1242-1247

Molecular Regulation of TRPC1 on The Toxicity mediated by α -synuclein in Multiple System Atrophy*

WANG Hai-Long**, DENG Yu-Lin**, ZHANG Ze-Bo**, WANG Chen,
YANG Zu-Ye, LI Fu-Tao, MA Hong***

(School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract Multiple system atrophy (MSA) is a progressive neuron degenerative disease characterized by glial cytoplasmic inclusions containing insoluble α -synuclein and autonomic failure associated with either poorly levodopa-responsive TRPC1-sonism or cerebellar ataxia or both. Studies have shown that α -synuclein plays very important role in the pathogenesis of MSA, but the molecular mechanism of the toxicity is still unclear. On the basis of many previous studies about calcium dyshomeostasis caused by the intracellular oxidative stress conditions, we put forward a new hypothesis of Bergmann glia death which is closely related to the oxidative stress during the progress of MSA. In order to compare the difference between α -synuclein overexpressed U251 cells with or without TRPC1 RNA interference in response to free iron, we investigated the cell apoptosis by Western-blot and measuring activated caspase activity. The interrelations of autophagy and neuron death were studied by assessing the level of LC-3 protein and autophagosomes; and then the cell survival was measured by cell count and MTT assay. In this study, we gave a deep analysis of the molecular mechanism of neuron death in α -synuclein overexpressed U251 cells in some respects of cell apoptosis, autophagy and calcium ion channels and so on. Firstly, we analysed the relation of α -synuclein and overexpressed TRPC1. Our results indicated that α -synuclein overexpression in U251 cells could inhibit cell growth and increase the level of oxidative stress. And then, the expression of some important proteins such as calcium channels protein TRPC1, autophagy related protein LC-3B and death receptor DR5 were increased obviously. Meanwhile, with the downregulation of TRPC1, we investigated the change of cell death and the oxidative level of α -synuclein overexpression U251 cells during the progress, and we can see the cell toxicity of U251 cells with α -synuclein overexpression was effectively changed. All results demonstrated that α -synuclein overexpression can destroy cell calcium homeostasis by increasing the level of membranous calcium channels protein TRPC1. Besides, it can increase the level of apoptosis and autophagy, and the level of oxidative stress which might be the reason of MSA. We tried to give a reasonable explanation and provide a clue for the prevention and treatment of MSA.

Key words α -synuclein, MSA, calcium ion channel, TRPC1, MAP1LC3B, DR5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00616

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31200636), BIT Basic Science Fund(3160012211108, 3160012231102).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-10-68914607, E-mail: 04656@bit.edu.cn

Received: May 21, 2013

Accepted: September 6, 2013