

α -Synuclein 聚集与帕金森病*

——影响 α -synuclein 蛋白聚集的因素

金玲 杨慧**

(首都医科大学北京神经科学研究所, 北京神经再生修复研究重点实验室, 北京 100069)

摘要 α -synuclein 基因是最早发现的与帕金森病相关的基因, 在部分家族性帕金森病患者中存在该基因的突变. 而无论是家族性还是散发性帕金森病, 其特征性包涵体——Lewy 小体的主要成分都是聚集的 α -synuclein 蛋白. 目前研究发现的 α -synuclein 蛋白聚集的因素种类繁多. 根据其对 α -synuclein 聚集的影响效应, 主要分为促进聚集与抑制聚集两大类, 不同因素作用于 α -synuclein 聚集的不同阶段或不同状态的 α -synuclein. 值得注意的是, 目前研究认为可溶性寡聚物的毒性要强于聚集状态的 α -synuclein, 因此探讨影响 α -synuclein 蛋白聚集的因素, 尤其是探讨各种因素对 α -synuclein 聚集状态的影响有重要意义.

关键词 α -synuclein, 帕金森病, Lewy 小体

学科分类号 R742.5

1988年 Maroteaux 等^[1]从电鲟鱼 (Torpedo) 的电器官胆碱能神经终末分离出一种由 143 个氨基酸组成的蛋白质, 并将其命名为 synuclein. 此后, 随着该蛋白质同系物的相继发现, 最初的 synuclein 被称为 α -synuclein. 20 世纪末, 研究发现在一些家族性帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 患者中存在 α -synuclein 基因的突变, 从而引起了研究者们对 α -synuclein 的极大兴趣. 而随后又发现不论是家族性还是散发性 PD, α -synuclein 都是 PD 特征性包涵体——Lewy 小体的重要成分, 更进一步证明了 α -synuclein 和 PD 紧密相关. 虽然迄今为止, α -synuclein 与 PD 的关系尚不十分清楚, 但 α -synuclein 的聚集无疑和 PD 的发病密切相关. 研究影响 α -synuclein 聚集的因素一直是研究 α -synuclein 与 PD 发病关系的一个热点.

1 α -synuclein 蛋白的分子结构及其内部各区域对聚集的影响

α -synuclein 由 140 个氨基酸组成, 分子质量 14 ku. 氨基酸序列由三部分组成: a. 氨基端 (1~60), 该区包含四个不完全重复序列 (XKTKGVXXXX), 易形成两性 α 螺旋, 被认为是介导蛋白质与膜及蛋白质与蛋白质之间相互作用

的区域. b. NAC 区 (61~95), 该区是 α -synuclein 序列中疏水性最强的一段, 由 35 个氨基酸残基组成, 包含两个不完全重复序列, 具有很强的形成 β 片层结构的趋向. c. 羧基端 (96~140), 该区富含酸性氨基酸, 如脯氨酸, 带大量负电荷, 与 α -synuclein 在正常状态下保持无规则卷曲状态有关. 这三部分区域在 α -synuclein 的聚集中都起一定作用.

氨基端: 该区在 α -synuclein 的聚集中起重要作用, 目前发现的 α -synuclein 突变中, A53T、A30P 及 E46K 均发生在该区段. A53T 和 A30P 两种突变型 α -synuclein 的寡聚物形成率均高于野生型 α -synuclein, 但成熟纤维的形成率 A53T 增高, A30P 降低^[2]. 运用高清晰度核磁共振技术 (NMR) 对这三种蛋白质的构象进行分析, 发现野生型及 A53T 变异型 α -synuclein 的氨基段在正常状态下有形成螺旋结构的倾向, A30P 突变型则没有. 另外新近发现的另一种家族性 PD 相关突变 E46K 也可加

*国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2006CB500706), 北京市自然科学基金项目、北京市教育委员会科技发展计划重点项目 (KZ200310025009), 北京市教育委员会科技发展计划面上项目 (KM200610025002).

** 通讯联系人. Tel: 010-83911458, E-mail: huiyang@cpums.edu.cn

收稿日期: 2005-10-25, 接受日期: 2005-12-31

强 α -synuclein 聚集. Kessler 等^[3]认为氨基端重复序列的数目对聚集也有影响. 氨基端断裂的 α -synuclein 因其重复序列数目的改变容易形成 β 片层结构, 更容易形成聚集.

NAC 区: 目前认为该区是 α -synuclein 发生聚集的关键. NAC 区疏水性强, 具有很强的形成 β 片层结构的趋向, 在体外容易发生聚集, 并且可以促进全长 α -synuclein 的聚集. 但 NAC 区并非整个区域对聚集都有重要作用. Bodles 等^[4]认为 NAC 区氨基端序列对聚集起关键作用, 原因是其氨基端容易形成 β 片层结构而羧基端易形成 α 螺旋, 而且 NAC 区氨基端序列与 β 淀粉样肽, prion 蛋白 (PrP) 和胰岛淀粉样多肽 (IAPP) 等几种淀粉样蛋白发生聚集的过程中起关键作用的氨基酸序列有一定的同源性. Giasson 等^[5]则认为该区一段由 12 个氨基酸残基组成的片段 (71-VTGVTAVAQKTV-82) 对 α -synuclein 的聚集起决定性作用. 原因是: 缺失这

一区段的 α -synuclein 不能发生聚集, 人 β -synuclein 与 α -synuclein 高度同源, 但缺乏这段氨基酸残基, 它在体外并不形成聚集. 此外 NAC 区一段由 9 个氨基酸残基组成的肽段 (66-VGGAVVTGV-74) 也被认为与 α -synuclein 的聚集密切相关, 缺失该区段的 α -synuclein 不能发生聚集^[6].

羧基端: 该区带有大量净负电荷, 对 α -synuclein 保持无规则卷曲状态有重要作用. 体外实验发现羧基端缺失部分氨基酸残基的 α -synuclein 更易聚集, 其中长度为 1~102 和 1~110 的两个片段还可促使全长的 α -synuclein 发生聚集, 而长度为 1~120 的片段不触发聚集, 原因可能是羧基端 104、105 和 114、115 位带有负电荷的残基, 负电荷抑制了 α -synuclein 的聚集^[7]. 另外, 羧基端能介导金属离子, 如铜等对 α -synuclein 的作用. 羧基端含有的三个保守的酪氨酸残基, 与硝化因素对聚集的影响也紧密相关 (图 1).

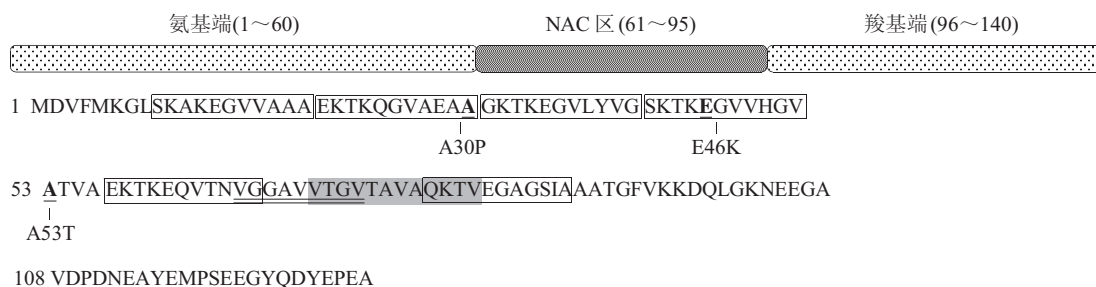


Fig. 1 α -synuclein sequence.

图 1 α -synuclein 蛋白氨基酸序列

图中框内所示为 6 个 XKTKEGVXXXX 重复序列, 黑体字所示为迄今发现的 α -synuclein 的 3 个突变位点; 下划线及阴影部分为 NAC 区与聚集紧密相关的两段序列, 着重号所示为羧基端 3 个保守的酪氨酸残基, 与 α -synuclein 硝化相关.

2 α -synuclein 蛋白发生聚集的可能机制与过程

α -synuclein 蛋白在体内发生聚集的机制和过程尚不明确, 但有关 α -synuclein 的体外聚集已有大量研究报道. 重组 α -synuclein 蛋白在体外可发生聚集, 根据所形成聚集物的结构不同, 可分为纤维性聚集和无定形聚集, 前者中蛋白质构象为 β 片层, 后者中蛋白质不具有规律的空间结构. 这两种状态的聚集物在 Lewy 小体中均可观察到^[8], 现在, 越来越多的研究者认为 α -synuclein 的聚集可能通过两条相关而不相同的路径, 一条形成纤维性聚集,

另一条形成可溶性寡聚物, 可溶性寡聚物在一定条件下可以形成无定形聚集. 多种因素, 如溶液 pH、盐浓度以及蛋白质修饰 (如氧化、硝化) 等, 都可以影响 α -synuclein 进入何种聚集路径.

α -synuclein 蛋白在聚集过程中存在以下几种结构状态: 单体、中间体、中间体寡聚物、 α -synuclein 纤维性聚集或无定形聚集. 正常状态的 α -synuclein 为单体, 呈无规则卷曲状态, 可溶于水溶液. 受某些因素影响, 如 pH 降低、温度增高等时, α -synuclein 蛋白构象发生部分折叠, 出现一些 β 片层结构, 但整体仍表现为无规则卷曲, 仍为可溶状态, 这时称为中间体^[9]. 中间体疏水基团的暴

露使其相互作用形成寡聚体, 根据所处条件不同, 中间体寡聚物可以成为纤维化的核, 触发快速的纤维化发生, 产生纤维性聚集, 也可以量不断增加, 表现为可溶性寡聚物的增多, 不发生聚集. 在一个完整的体外聚集实验中, α -synuclein 的纤维性聚集经历以下三个阶段: 首先是延迟相, 在这个阶段, 可溶性的中间体寡聚物逐渐形成, 溶液呈过饱和状态, 但尚未出现不溶性聚集体, 这一阶段对于野生型 α -synuclein 为 280 h, A30P 突变型为 180 h, A53T 突变型最短, 为 100 h, 之后进入第二期, 即快速聚集期, 此时寡聚物形成到一定程度, α -synuclein 出现聚集, 并且聚集迅速增加, 直至聚集体与单体达到平衡状态时, 进入第三期, 即稳定期. 这提示 α -synuclein 的聚集是成核依赖性的, 类似 Alzheimer 病的 β 淀粉样沉淀的形成过程, 即

α -synuclein 发生纤维性聚集的过程中存在一个限速步骤, 这个限速步骤, 可能是中间体寡聚物的形成. 目前, 对纤维性聚集的研究较多, 对无定形聚集的研究则较少. 有许多因素可以促进 α -synuclein 可溶性寡聚物的形成和保持, 但可溶性寡聚物在何种条件下形成无定形聚集尚不清楚.

3 影响 α -synuclein 蛋白聚集的因素分类

影响 α -synuclein 蛋白聚集的因素多种多样, 根据其对聚集的影响, 可分为促进聚集与抑制聚集两大类, 此外, 还有一些因素对聚集的影响具有两面性, 在不同条件下对聚集的影响不同, 如膜对 α -synuclein 聚集的影响等. 目前研究发现影响 α -synuclein 蛋白聚集的因素可归纳为下表(表 1).

Table 1 Classification of factors affecting the aggregation of α -synuclein
表 1 影响 α -synuclein 蛋白聚集的因素分类

主要影响因素	体内(<i>in vivo</i>)或 体外实验(<i>in vitro</i>)	具体影响因素和 / 或影响方式	对聚集的影响
物理因素	<i>in vitro</i>	溶液温度增高、pH 值降低、 α -synuclein 浓度增加、细胞内过表达 α -synuclein	促进
环境毒物	<i>in vivo</i>	过表达 α -synuclein 的动物模型	促进
	<i>in vitro</i>	鱼藤酮、百草枯、DDC、dieldrin 等	促进
	<i>in vivo</i>	鱼藤酮	促进
金属离子	<i>in vitro</i>	Al^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ti^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Pb^{2+}	多数促进, Mg^{2+} 抑制
蛋白酶体系统	<i>in vitro</i>	抑制蛋白酶体功能	促进
细胞色素 c	<i>in vitro</i>	与细胞色素 c/ 过氧化氢共同孵育	促进
α -synuclein 相关蛋白	<i>in vitro</i>	synphilin-1、Tau 蛋白、tubulin	促进
其他促进因素	<i>in vitro</i>	β - 淀粉样肽、载脂蛋白 E、双链 DNA	促进
		细胞内多胺、伊红染料	促进
		硝化的 α -synuclein 单体及二聚体	促进
氧化 / 硝化	<i>in vitro</i>	氧化及硝化	稳定已形成的聚集
		铜和过氧化氢组成的氧化系统	促进可溶性寡聚物形成, 不抑制聚集
		金属离子(铁或铜)、氧、及还原剂组成的金属离子催化的氧化系统(MCO)、甲硫氨酸氧化、 α -synuclein 单体的硝化反应以及硝化的 α -synuclein 寡聚体	促进可溶性寡聚物形成, 抑制聚集
膜	<i>in vitro</i>	膜中蛋白比例高时	促进
		膜中磷脂比例高, 且为酸性磷脂时	抑制
热休克蛋白	<i>in vitro</i>	共同孵育及共转染细胞	抑制
	<i>in vivo</i>	共转基因小鼠	抑制
β -synuclein	<i>in vitro</i>	共同孵育	抑制
	<i>in vivo</i>	共转基因小鼠	抑制
DA	<i>in vitro</i>	共同孵育	抑制
其他抑制因素	<i>in vitro</i>	利福平、格尔德霉素(geldanamycin ,GA)、黄芩素(baicalein)	抑制

4 促进 α -synuclein 蛋白聚集的因素

4.1 物理因素

在体外聚集实验中, 溶液 pH 降低、温度增高都会促进 α -synuclein 向部分折叠的中间构象转变, 加快聚集的发生^[9]. 低 pH 主要是减少了在中性溶液中 α -synuclein 蛋白的负电荷, 减少了分子内的电荷排斥作用, 使疏水区相互作用增加, 更容易形成部分折叠的构象. 温度增高时疏水区相互作用也会增强. 随着蛋白质浓度的增高, 聚集也加速. 在过表达 α -synuclein 的细胞和动物模型中, 均可观察到 α -synuclein 的聚集.

4.2 环境毒物

在体外, 鱼藤酮、百草枯等多种杀虫剂都可以直接和 α -synuclein 蛋白作用, 促进聚集的发生^[9]. 随着杀虫剂浓度增加, 纤维化速度也加快. 以鱼藤酮为例: 加入鱼藤酮浓度为 10 mmol/L 时, 延迟相由 74.5 h 缩短到 41.8 h, 100 mmol/L 时延迟相缩短到 35.2 h, 1 000 mmol/L 时延迟相仅为 2.7 h. 利用圆二色性(CD)检测发现, 在加入杀虫剂后, α -synuclein 蛋白构象发生转变, 出现了部分二级结构, 并且随着时间的延长, 二级结构的数量逐渐增加. 傅立叶变换红外光谱仪(FTIR)检测证实了这种构象转变包含 β 片层结构的增多. 杀虫剂引起 α -synuclein 构象转变的机制在于杀虫剂属于相对无极性的物质, 相对疏水却又可溶于水, 它容易与部分折叠的中间构象的 α -synuclein 相结合, 破坏无结构状态与中间构象之间的平衡, 促进中间构象 α -synuclein 的产生, 从而促进聚集发生.

4.3 金属离子

人们对金属离子与 PD 关系的关注始于几个大的流行病学调查, 调查结果显示, 职业性接触重金属如铁、锌、铝等的人群, PD 发病率高. PD 患者脑部黑质纹状体中铁、锌、铝的含量明显高于非 PD 患者. 在 Lewy 小体中也检测到高水平的铁, 铝离子存在. Uversky 等^[10]研究了在体外多种金属离子对 α -synuclein 构象和聚集的影响. 体外聚集实验中, 相同条件下, 不加入金属离子时 α -synuclein 聚集的延迟相 > 2 周, 加入 AlCl_3 、 FeCl_3 、 CoCl_3 或 CuCl_2 , 聚集延迟相 ≤ 24 h, 显著加快了 α -synuclein 的聚集. Ti^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 等一些金属离子还可促进甲硫氨酸残基氧化的 α -synuclein 发生聚集^[11]. Ca^{2+} 与 α -synuclein 结合, 可促进 α -synuclein 寡聚物的形成^[12]. 金属离子促进

α -synuclein 聚集的可能机制如下: 正常状态下, α -synuclein 保持无结构状态与其带有的净负电荷相互排斥有关, 金属离子可以中和一部分电荷, 减弱排斥, 同时, 多价阳离子还可通过交连或桥连的方式使两个或更多的羧基连接, 这是增强金属离子对 α -synuclein 构象产生影响的另一重要因素^[10]. 不同金属离子因其大小及所带电荷属性的不同对聚集的影响差别很大. Mg^{2+} 可以抑制 α -synuclein 聚集^[13], 产生抑制的机制尚不明确, 有可能是 Mg^{2+} 使 α -synuclein 转变为一种抑制聚集的构象. 这些证据提示金属离子有可能通过对 α -synuclein 的影响在 PD 的发病中起一定作用.

4.4 蛋白酶体系统

蛋白酶体系统(proteasome)可以介导 α -synuclein 蛋白的降解, α -synuclein 不经泛素化即可被 20 S 蛋白酶体直接降解. lactacystin 是 20 S 蛋白酶体专一的抑制剂. 在体外培养的 PC12 细胞及胎鼠中脑多巴胺(dopamine, DA)神经元中加入 lactacystin 能引起细胞死亡, 并在胞浆内出现 α -synuclein/泛素免疫反应阳性的包涵体^[14,15]. 体外实验模拟功能不全的蛋白酶体系统, 发现蛋白酶体功能下降时, 可将 α -synuclein 剪切成一些片段, 类似 Lewy 小体中所发现的 α -synuclein 片段, 这些片段能触发全长 α -synuclein 的聚集, 聚集物又会抑制蛋白酶体的功能, 使断裂片段不断产生, 聚集进一步发生^[16]. McNaught^[14]等认为黑质细胞蛋白酶体活性下降引起 α -synuclein 降解受阻和异常聚集, 是导致散发性 PD 患者 Lewy 小体形成的一个重要原因. 但也有研究发现, Lewy 小体病变的脑区并没有普遍的蛋白酶体活性下降. 由此可见, 蛋白酶体抑制无疑可以引起 α -synuclein 的聚集, 但在 PD 发病中, 蛋白酶体是否对 Lewy 小体的形成起关键作用还有待进一步研究.

4.5 细胞色素 c

重组 α -synuclein 蛋白与细胞色素 c/过氧化氢共同孵育, 可促使 α -synuclein 发生聚集^[17]. α -synuclein 单独与细胞色素 c 或过氧化氢孵育时则不能产生聚集, 这一过程还可被抗氧化剂如 N-乙酰-L-半胱氨酸阻断, 这说明氧化反应的存在是细胞色素 c 诱导 α -synuclein 聚集的基础. 该反应还可被铁螯合剂明显抑制, 提示铁催化的氧化反应很可能参与了这个过程. 同时, 用免疫双标的方法发现细胞色素 c 与 α -synuclein 在 PD 患者 Lewy 小体中共存, 一半以上 α -synuclein 阳性的 Lewy 小体中细

胞色素 c 也为阳性. 这些提示细胞色素 c 可能参与 PD 患者 Lewy 小体的形成.

4.6 α -synuclein 相关蛋白

Synphilin-1: synphilin-1 是 Engelender 等^[18]利用酵母双杂交系统寻找 α -synuclein 相关蛋白时发现并得名的. 用免疫共沉淀的方法发现在神经元内 synphilin-1 与 α -synuclein 共存. HEK293 细胞共转染表达 synphilin-1 以及 α -synuclein 蛋白 NAC 段的载体, 可在细胞内形成包涵体, 这提示 synphilin-1 有可能与蛋白质水解 α -synuclein 时形成的一些包含 NAC 段的多肽相互作用, 促进聚集形成. 此外, tau 蛋白与微管结合蛋白 (tubulin) 也可促进 α -synuclein 聚集.

4.7 其他促进因素

还有一些研究显示, β -淀粉样肽、载脂蛋白 E、双链 DNA、细胞内多胺、伊红染料等都可以促进 α -synuclein 聚集.

5 对 α -synuclein 蛋白聚集具有两面性影响的因素

5.1 α -synuclein 的氧化/硝化对聚集的影响

氧化应激与多种神经退行性疾病的发病相关. 在 PD 患者 Lewy 小体中, 可以检测到氧化/硝化的 α -synuclein 蛋白, 这提示了氧化/硝化可能影响和参与了 α -synuclein 的聚集. 体外实验中, 氧化反应对聚集的影响受氧化试剂和氧化程度的影响, 不同氧化系统对 α -synuclein 聚集产生的影响不同. 在 Cole 等^[19]的实验中, 利用一个由具有氧化还原活性的金属离子(铁或铜)、氧及还原剂组成的金属离子催化的氧化系统(MCO), 该氧化系统可以明显促进 α -synuclein 寡聚物的形成, 同时抑制纤维形成, 这种作用可被铁螯合剂及抗氧化剂拮抗. Uversky 等^[20]发现甲硫氨酸氧化可促进寡聚物形成, 抑制纤维形成. 在铜和过氧化氢组成的氧化系统中, 也观察到寡聚物的形成加速, 但并没有观察到对纤维形成的抑制. 氧化作用对 α -synuclein 纤维化所产生的不同影响可能是因为不同氧化系统作用于 α -synuclein 蛋白不同的氨基酸残基或侧链, 当修饰发生在 α -synuclein 氨基端或 NAC 区时, 分子间产生的交联, 会抑制纤维的形成. 如果交联发生在羧基端, 则不会影响纤维形成^[19]. 体外实验中, 对于 α -synuclein 单体, 硝化反应可以促进其寡聚物的形成, 抑制纤维形成^[21]. 它主要是通过修饰 α -synuclein 蛋白的酪氨酸残基发挥作用, 缺少酪氨

酸残基的 α -synuclein, 硝化反应对纤维形成的抑制作用明显减弱. Hodara 等^[22]发现硝化的 α -synuclein 寡聚体可以抑制未修饰的 α -synuclein 蛋白的纤维化, 但硝化的 α -synuclein 单体和二聚体却可以促进其纤维化. 对于已形成的 α -synuclein 聚集, 硝化反应则起稳定聚集的作用, 使其抵抗蛋白酶的水解. 其机制可能是硝化反应使 α -synuclein 分子间形成了双酪氨酸共价交连.

5.2 膜对 α -synuclein 聚集的影响

正常状态下, 细胞内的 α -synuclein 一部分存在于胞浆内, 还有一部分与膜结合. 提取大鼠脑组织中的膜成分与胞浆成分, 相同条件下孵育, 膜成分中出现 α -synuclein 聚集明显早于胞浆成分. 用鱼藤酮作用于细胞诱导 α -synuclein 聚集, 作用 24 h 后即可从膜成分中检测到 α -synuclein 的寡聚物, 而胞浆成分在作用 48 h 后仍不能检出 α -synuclein 的聚集物. 此外, 膜成分中的 α -synuclein 还可促进胞浆成分中的 α -synuclein 发生聚集^[23]. 因此, Lee 等^[23]认为与膜结合的 α -synuclein 虽然只占脑内总 α -synuclein 的一小部分, 但其在 α -synuclein 的聚集中却可能起着重要作用. Zhu 等^[24]研究不同大小、含不同脂质成分及比例的囊泡与 α -synuclein 的相互作用, 发现脂质囊泡能抑制 α -synuclein 纤维形成, 并且抑制程度与 α -synuclein 由无结构状态转变为 α 螺旋明显相关. 因此他们认为与膜结合会抑制 α -synuclein 的聚集和纤维化. 在随后的研究中他们发现, 膜对 α -synuclein 聚集的影响, 取决于其对 α -synuclein 二级结构的影响. 而 α -synuclein 二级结构发生何种变化, 又取决于膜中脂质的种类及其与蛋白质的比例. 当蛋白质比例高时, α -synuclein 容易转变为中间体构象, 促进纤维聚集形成. 当磷脂比例高且为酸性磷脂时, α -synuclein 则易形成 α 螺旋, α -synuclein 的纤维化被抑制. 所以很难确切说明在神经元内, 膜对 α -synuclein 的聚集究竟起何种作用.

6 抑制 α -synuclein 蛋白聚集的因素

6.1 热休克蛋白

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是分子伴侣家族中的一类, 对于蛋白质的合成、加工、维持其正常结构, 以及蛋白质的重新折叠、降解有重要作用. 对 Lewy 小体型痴呆症患者的黑质纹状体区进行分析, 发现 66% 的 Lewy 小体中存在 Hsp70, 71% 的 Lewy 小体中存在 Hsp27, 50% 的

Lewy小体中还含有 Hsp40、Hsp110, 这提示热休克蛋白可能与 Lewy 小体的形成有一定关系. 在果蝇和小鼠模型中已经证明 Hsp70 能够抑制 α -synuclein 的聚集, Klucken 等^[25]在细胞模型中也得到了类似的结果. 即在人的 H4 神经胶质瘤细胞中共表达 synphilin-1 和 C 端加尾的 α -synuclein, 细胞内可形成 α -synuclein 阳性包涵体, 如果同时转染 Hsp70 的表达质粒, α -synuclein 的聚集就会被显著抑制. 在体外实验中, 将 α -synuclein 与 Hsp70 共同孵育, 也可明显抑制纤维形成^[25]. Hsp70 对纤维形成的抑制作用受其浓度影响, 当 Hsp70 低于关键浓度时, 它不能抑制 α -synuclein 纤维的形成. 当高于关键浓度时它对纤维形成的抑制程度也不会发生变化, Hsp70 加入的时间点是影响其对 α -synuclein 作用的另一个重要因素, 如果聚集已进入稳定期, 加入 Hsp70 对纤维化不能产生影响. 这说明 Hsp70 不是通过降解成熟的纤维发挥作用. 同时偏光二色性分析发现, 加入 Hsp70 后多数 α -synuclein 蛋白保持无规则卷曲状态, β 片层结构的形成被抑制, 但核磁共振显示 Hsp70 并不与 α -synuclein 单体直接作用. 用凝胶过滤的方法分析发现, Hsp70 是通过与可溶性的中间状态的 α -synuclein 结合, 使 α -synuclein 保持可溶状态, 从而抑制纤维形成^[26].

6.2 β -synuclein

人 β -synuclein 由 134 个氨基酸残基组成, 与 α -synuclein 有 78% 的同源性, 主要在脑中表达. 在体外, β -synuclein 与 α -synuclein 共同孵育可以明显抑制 α -synuclein 纤维的形成. 在 α -synuclein, β -synuclein 共转基因小鼠脑中, 可以观察到 α -synuclein 聚集减少. 在体外细胞模型中也观察到类似的改变. Uversky 等^[27]认为产生抑制的原因是, β -synuclein 参与了 α -synuclein 中间体寡聚物的形成, 稳定寡聚体的结构, 阻止了可溶性寡聚体向不溶性纤维的转变, 从而抑制 α -synuclein 纤维形成.

6.3 多巴胺

帕金森病的主要病理特征是中脑 DA 能神经元进行性缺失以及残存的 DA 能神经元内 Lewy 小体的形成, 为什么 DA 神经元会发生特异性死亡, 这让研究者把目光投向了 DA 与 α -synuclein 的关系. Conway 等^[28]在研究中发现, DA 能抑制 α -synuclein 纤维形成, 机制是 DA 通过氧化连接作用与 α -synuclein 原纤维形成共价化合物, 稳定原纤维的结构, 抑制原纤维向纤维的转变, 造成原纤维的聚

集. 原纤维状态的 α -synuclein 目前被认为毒性最强^[29], 所以 DA 引起的原纤维堆积势必会加重细胞损伤, 这可能是 DA 神经元特异性死亡的原因之一.

6.4 其他抑制因素

Li 等^[30]报道利福平可以抑制 α -synuclein 的聚集, 并且可以降解已经形成的聚集, 且效应为剂量依赖性. 利福平抑制 α -synuclein 聚集的机制是稳定单体及中间体寡聚物的结构, 抑制其形成聚集. 发挥抑制作用的主要有效成分是利福平的氧化产物, 而氧化与否对其降解 α -synuclein 聚集的能力没有明显影响. 黄芩素(baicalein)与利福平有相似作用, 也可以抑制 α -synuclein 聚集, 降解已形成的聚集. 在细胞模型中, 格尔德霉素(geldanamycin, GA)也可以抑制 α -synuclein 聚集^[31], 机制是诱导 Hsp70 表达上调, 通过 Hsp70 发挥效应. 同时在细胞及果蝇模型中均发现 GA 可抑制 α -synuclein 的毒性. 这些发现为 PD 的药物治疗带来了新的希望.

综上所述, 影响 α -synuclein 聚集的因素纷繁复杂, 许多因素对聚集的影响还不甚明确, 但 α -synuclein 的聚集无疑与 PD 紧密相关. 研究影响 α -synuclein 聚集的因素, 探寻体内 α -synuclein 聚集的机制, 对于研究 PD 的发病及治疗有重要意义. 同时, 值得注意的是, 目前认为对细胞产生毒性作用的主要是可溶性的 α -synuclein 中间体寡聚物, 而并非聚集状态的 α -synuclein^[29,32]. 因此研究 α -synuclein 聚集与 PD 的关系时, 研究各种因素对 α -synuclein 聚集状态的影响就显得更有意义.

参考文献

- 1 Maroteaux L, Campanelli J T, Scheller R H. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*, 1988, **8** (8): 2804~2815
- 2 Conway K A, Lee S J, Rochet J C, *et al.* Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (2): 571~576
- 3 Kessler J C, Rochet J C, Lansbury P T Jr, *et al.* The N-terminal repeat domain of alpha-synuclein inhibits beta-sheet and amyloid fibril formation. *Biochemistry*, 2003, **42** (3): 672~678
- 4 Bodles A M, Guthrie D J, Harriott P, *et al.* Toxicity of non- α -synuclein component of Alzheimer's disease amyloid, and N-terminal fragments thereof, correlates to formation of beta-sheet structure and fibrils. *Eur J Biochem*, 2000, **267** (8): 2186~2194
- 5 Giasson B I, Murray I V, Trojanowski J Q, *et al.* A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is

- essential for filament assembly. *J Biol Chem*, 2001, **276** (4): 2380~2386
- 6 Du H N, Tang L, Luo X Y, *et al.* A peptide motif consisting of glycine, alanine, and valine is required for the fibrillization and cytotoxicity of human alpha-synuclein. *Biochemistry*, 2003, **42**(29): 8870~8878
 - 7 Murray I V, Giasson B I, Quinn S M, *et al.* Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation *in vitro*. *Biochemistry*, 2003, **42** (28): 8530~8540
 - 8 Uversky V N, Li J, Fink A L. Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem*, 2001, **276** (14): 10737~10744
 - 9 Uversky V N, Li J, Fink A L. Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS Lett*, 2001, **500** (3): 105~108
 - 10 Uversky V N, Li J, Fink A L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 2001, **276** (47): 44284~44296
 - 11 Yamin G, Glaser C B, Uversky V N, *et al.* Certain metals trigger fibrillation of methionine-oxidized alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 2003, **278** (30): 27630~27635
 - 12 Nielsen M S, Vorum H, Lindersson E, *et al.* Ca^{2+} binding to alpha-synuclein regulates ligand binding and oligomerization. *J Biol Chem*, 2001, **276** (25): 22680~22684
 - 13 Golts N, Snyder H, Frasier M, *et al.* Magnesium inhibits spontaneous and iron-induced aggregation of alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 2002, **277** (18): 16116~16123
 - 14 McNaught K S, Mytilineou C, Jnobaptiste R, *et al.* Impairment of the ubiquitin-proteasome causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *J Neurochem*, 2002, **81** (2): 301~306
 - 15 Rideout H J, Larsen K E, Sulzer D, *et al.* Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J Neurochem*, 2001, **78** (4): 899~908
 - 16 Liu C W, Giasson B I, Lewis K A, *et al.* A precipitating role for truncated alpha-synuclein and the proteasome in alpha-synuclein aggregation: implications for pathogenesis of Parkinson disease. *J Biol Chem*, 2005, **280** (24): 22670~22678
 - 17 Hashimoto M, Takeda A, Hsu L J, *et al.* Role of cytochrome c as a stimulator of alpha-synuclein aggregation in Lewy body disease. *J Biol Chem*, 1999, **274** (41): 28849~28852
 - 18 Engelender S, Kaminsky Z, Guo X, *et al.* Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet*, 1999, **22** (1): 110~114
 - 19 Cole N B, Murphy D D, Lebowitz J, *et al.* Metal-catalyzed oxidation of alpha-synuclein: helping to define the relationship between oligomers, protofibrils and filaments. *J Biol Chem*, 2005, **280** (10): 9678~9690
 - 20 Uversky V N, Yamin G, Souillac P O, *et al.* Methionine oxidation inhibits fibrillation of human alpha-synuclein *in vitro*. *FEBS Lett*, 2002, **517** (1~3): 239~244
 - 21 Norris E H, Giasson B I, Ischiropoulos H, *et al.* Effects of oxidative and nitrative challenges on alpha-synuclein fibrillogenesis involve distinct mechanisms of protein modifications. *J Biol Chem*, 2003, **278** (29): 27230~27240
 - 22 Hodara R, Norris E H, Giasson B I, *et al.* Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation. *J Biol Chem*, 2004, **279** (46): 47746~47753
 - 23 Lee H J, Choi C, Lee S J. Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J Biol Chem*, 2002, **277** (1): 671~678
 - 24 Zhu M, Fink A L. Lipid binding inhibits alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem*, 2003, **278** (19): 16873~16877
 - 25 Klucken J, Shin Y, Masliah E, *et al.* Hsp70 reduces alpha-synuclein aggregation and toxicity. *J Biol Chem*, 2004, **279** (24): 25497~25502
 - 26 Dedmon M M, Christodoulou J, Wilson M R, *et al.* Heat shock protein 70 inhibits alpha-synuclein fibril formation via preferential binding to prefibrillar species. *J Biol Chem*, 2005, **280** (15): 14733~14740
 - 27 Uversky V N, Li J, Souillac P, *et al.* Biophysical Properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins. *J Biol Chem*, 2002, **277** (14): 11970~11978
 - 28 Conway K A, Rochet J C, Bieganski R M, *et al.* Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science*, 2001, **294** (5545): 1346~1349
 - 29 Volles M J, Lee S J, Rochet J C, *et al.* Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry*, 2001, **40** (26): 7812~7819
 - 30 Li J, Zhu M, Rajamani S, *et al.* Rifampicin inhibits alpha-synuclein fibrillation and disaggregates fibrils. *Chem Biol*, 2004, **11** (11): 1513~1521
 - 31 McLean P J, Klucken J, Shin Y, *et al.* Geldanamycin induces Hsp70 and prevents alpha-synuclein aggregation and toxicity *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **321** (3): 665~669
 - 32 Volles M J, Lansbury P T Jr. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry*, 2002, **41** (14): 4595~4602

α -Synuclein Aggregation and Parkinson's Disease: Factors Affecting The Aggregation of α -Synuclein*

JIN Ling, YANG Hui**

(Beijing Institute for Neuroscience, Capital University of Medical Sciences,
Beijing Center of Neural Regeneration and Repairing, Beijing 100069, China)

Abstract Parkinson's disease (PD) is one of the most frequent neurodegenerative disorders. α -Synuclein was the first "PD gene" to be discovered. The involvement of α -synuclein in PD was first suspected after two different α -synuclein mutations were identified in two kindreds with autosomal-dominant PD. However, the discovery that α -synuclein is the major component of Lewy bodies-pathological hallmarks of PD, confirmed its role in PD pathogenesis. Pathological aggregation of α -synuclein might be responsible for neurodegeneration. Multiple factors have been shown to affect α -synuclein aggregation *in vitro* or *in vivo*. In addition, soluble oligomers of α -synuclein might be even more toxic than the insoluble fibrils found in degenerative diseases. So it is significant to investigate factors affecting α -synuclein aggregation, especially their accurate effects on the aggregation process.

Key words α -synuclein, Parkinson's disease, Lewy bodies

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2006CB500706), The Natural Sciences Foundation of Beijing, Science Technology Developmental Planning of Beijing Municipal Education Commission (KZ200310025009) and Science Technology Developmental Planning of Beijing Municipal Education Commission (KM200610025002).

**Corresponding author. Tel: 86-10-83911458, E-mail: huiyang@cpums.edu.cn

Received: October 25, 2005 Accepted: December 31, 2005