

细胞因子 FAM3C 在携带人突变型 α -突触核蛋白 A53T 纯合子小鼠黑质区表达的研究

张培 焦倩 杜希恂 姜宏

(青岛大学国家生理学重点(培育)学科,山东 青岛 266071)

[摘要] **目的** 探讨细胞因子 FAM3 家族成员 FAM3C 在帕金森病(PD)模型小鼠黑质(SN)区的表达及其意义。**方法** 选取 3 及 6 月龄携带人突变型 α -突触核蛋白 A53T 纯合子(α -SynA53T^{+/+})小鼠和同窝野生型(WT)小鼠,提取 SN 区蛋白,采用 Western Blot 方法检测 FAM3C 蛋白的表达水平。**结果** 3 月龄 α -SynA53T^{+/+} 小鼠 SN 区 FAM3C 蛋白表达水平与 WT 小鼠相比差异无显著意义($t=1.245, P>0.05$),6 月龄 α -SynA53T^{+/+} 小鼠 SN 区 FAM3C 蛋白表达水平与 WT 小鼠相比明显升高,差异有统计学意义($t=8.865, P<0.05$)。**结论** 3 月龄小鼠 SN 区 FAM3C 蛋白表达水平不变,而 6 月龄小鼠 SN 区 FAM3C 蛋白表达水平升高,说明 SN 区 FAM3C 蛋白随 PD 病情进展表达增加,可能参与了 PD 的发病过程。

[关键词] FAM3C 蛋白;黑质;帕金森病;疾病模型,动物

[中图分类号] R742.5

[文献标志码] A

EXPRESSION OF THE CYTOKINE FAM3C IN THE SUBSTANTIA NIGRA OF HOMOZYGOUS MICE CARRYING A53T HUMAN α -SYNUCLEIN ZHANG Pei, JIAO Qian, DU Xixun, JIANG Hong (State Key Disciplines: Physiology(in Incubation), Department of Physiology, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the expression of FAM3C, a member of the cytokine FAM3 family, in the substantia nigra (SN) of mice with Parkinson's disease (PD) and its clinical significance. **Methods** The homozygous mice carrying A53T human α -synuclein (α -SynA53T^{+/+} mice), aged 3 and 6 months, and their littermate wild-type (WT) mice were selected. The protein in the SN was extracted, and Western Blot was used to measure the protein expression of FAM3C. **Results** There was no significant difference in the expression of FAM3C protein in the SN between the α -SynA53T^{+/+} mice aged 3 months and the WT mice ($t=1.245, P>0.05$). Compared with the WT mice, the α -SynA53T^{+/+} mice aged 6 months had significantly higher expression of FAM3C protein in the SN ($t=8.865, P<0.05$). **Conclusion** The expression of FAM3C protein in the SN has no change in mice aged 3 months, but shows an increase in mice aged 6 months, suggesting that the expression of FAM3C in the SN increases with the progression of PD and that FAM3C may be involved in the pathogenesis of PD.

[KEY WORDS] FAM3C protein; Substantia nigra; Parkinson's disease; Disease models, animal

帕金森病(PD)是一种发病率仅次于阿尔茨海默病(AD)的第 2 大神经系统退行性疾病。许多研究表明,遗传、环境、老龄化和氧化应激等因素均参与了 PD 的发病的过程^[1-2]。目前,临床上用于治疗 PD 的药物只能在一定程度上改善疾病的相关症状,而不能阻止 PD 病情的发展^[3-5]。因此,阐明 PD 的发病原因及可能机制成为现代医学研究亟需解决的难题。

FAM3 基因家族(FAM3)是 2002 年新发现的一个细胞因子样基因家族,目前已知包括 FAM3A、FAM3B、FAM3C 和 FAM3D 4 个成员^[5]。FAM3 基因家族成员的蛋白序列由 224~235 个氨基酸残基组成,具有高度的同源性,而与其他已知的蛋白均没有发现同源性^[6-7]。目前的研究已初步揭示 FAM3

基因家族成员有可能在包括糖尿病、肿瘤及神经退行性疾病等在内的多种重大疾病的发生、发展过程中发挥重要作用^[8-10]。FAM3C 是 FAM3 基因家族的第 3 个成员,研究发现 FAM3C 在人与小鼠的全身组织中均有表达^[11]。目前越来越多的研究表明,FAM3C 是葡萄糖和脂质代谢的重要调节剂^[12],而且 FAM3C 的异常表达参与了多种肿瘤的形成及转移过程^[13-14]。HASEGAWA 等^[15]研究显示,AD 的发生和大脑中淀粉样斑块的形成密切相关,FAM3C 通过破坏淀粉样 β 前体的稳定来改善阿尔茨海默病。然而,FAM3C 在 PD 发病中的作用尚不明确。本研究选用携带人突变型 α -突触核蛋白 A53T 纯合子(α -SynA53T^{+/+})小鼠,通过检测不同月龄的 α -SynA53T^{+/+} 小鼠黑质(SN)区 FAM3C 蛋白的表达水平,探究 FAM3C 在 PD 发生、发展中的作用,为阐明 PD 发生和发展的分子机制提供实验基础。现将结果报告如下。

[收稿日期] 2018-11-19; **[修订日期]** 2018-12-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31771110);国家自然科学基金(青年基金)项目(31500837)

[通讯作者] 姜宏,Email:jhkyk@163.com

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 α -SynA53T^{+/+} 小鼠购于南京大学模式动物研究所,按 SPF 级别饲养,置于室温(22±2)℃下,12-12 h 昼夜循环光照下生活,自由饮水取食。鉴定基因型后,选取 3、6 月龄雄性 α -SynA53T^{+/+} 小鼠和同窝野生型(WT)小鼠各 4 只。所有关于实验动物的操作均符合青岛大学实验动物操作规则中的要求。

1.2 仪器与试剂

大鼠源 FAM3C 抗体购买于美国 R&D SYSTEMS 公司,小鼠源 Alpha-Synuclein 抗体购买于英国 Abcam 公司,HRP 标记山羊抗大鼠 IgG 购买于 MDBio.Inc 公司,HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 购买于 Absin 公司,RIPA 裂解液、分离胶缓冲液和浓缩胶缓冲液购于康为公司,ECL 发光试剂盒购买于美国 Millipore 公司。

1.3 实验仪器

电泳槽 Mini-VE、电转仪(湿转)Trans-Blot 和电泳仪 Power-Pac200 购买于美国 BIO-RAD 公司。

1.4 Western Blot 方法鉴定小鼠基因型及检测小鼠 SN 区 FAM3C 蛋白表达水平

以水合氯醛深度麻醉小鼠,迅速断头,完整取出包括中脑 SN 区的脑组织,置于冰盒内,迅速准确取出 SN 部分,放入预冷的 EP 管中,准确称质量后,在冰上用加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液充分研磨、裂解 30 min 以后,4℃下以 12 000 r/min 离心 20 min,取上清液于新的 EP 管中,应用酶标仪以 BCA 法测定波长 562 nm 处的吸光度值,进行蛋白浓度测定。按每孔 25 μ g 蛋白上样,通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳将不同分子质量的蛋白分开,然后电转移到 PVDF 膜上,于室温下以 100 g/L 的脱脂奶粉封闭 2 h;分别加入大鼠源 FAM3C 一抗(1:300)和小鼠源 Alpha-Synuclein 一抗(1:1 000),4℃孵育过夜,在 PBST 中洗 3 次后,分别与辣根过氧化物酶标记的山羊抗大鼠 IgG(1:5 000)和山羊抗小鼠 IgG(1:10 000)在室温下孵育 1 h,在 PBST 中洗涤 3 次,ECL 发光液显影,UVP 凝胶成像系统成像后用 Image J 软件对蛋白条带进行半定量分析。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 α -SynA53T^{+/+} 小鼠的鉴定

Western Blot 方法检测结果显示,3 月龄 α -SynA53T^{+/+} 小鼠 SN 区 Human- α -Syn 蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义($t = 9.884, P < 0.05$)。6 月龄 α -SynA53T^{+/+} 小鼠 SN 区 Human- α -Syn 蛋白的表达水平显著升高,差异具有统计学意义($t = 3.779, P < 0.05$)。见图 1。

2.2 不同月龄 α -SynA53T^{+/+} 小鼠 SN 区 FAM3C 蛋白表达变化

Western Blot 方法检测结果显示,3 月龄 α -SynA53T^{+/+} 小鼠 SN 区 FAM3C 蛋白水平与 WT 小鼠相比,差异无统计学意义($t = 1.245, P > 0.05$);而 6 月龄 α -SynA53T^{+/+} 小鼠 SN 区 FAM3C 蛋白表达水平与 WT 小鼠相比明显升高,差异有统计学意义($t = 8.865, P < 0.05$)。见图 2。

3 讨论

PD 的主要病理特征是中脑黑质多巴胺能神经

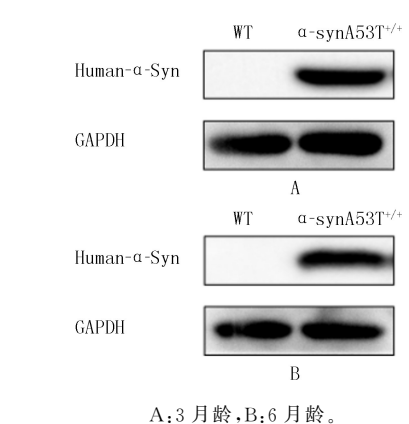


图 1 不同月龄 α -SynA53T^{+/+} 小鼠的基因型鉴定

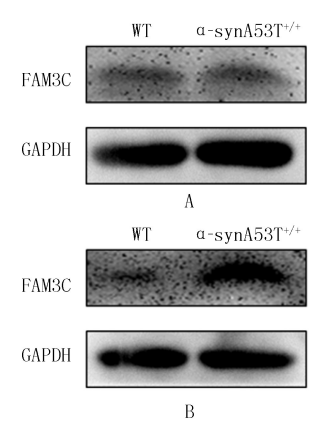


图 2 不同月龄 α -SynA53T^{+/+} 小鼠 SN 区 FAM3C 蛋白表达水平变化

元的退行性变性死亡,黑质多巴胺能神经元渐进性死亡与氧化应激和炎症反应有关。前期研究发现,多种细胞因子参与了 PD 的发生及发展过程,PD 病人脑脊液中的肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素 1 β 和白细胞介素 6 的含量出现了上升^[16-18]。自 FAM3 家族被发现以来,国内外研究者对 FAM3 基因家族成员的生物学功能展开了深入的研究,目前的研究已经初步揭示 FAM3 基因家族在代谢、肿瘤以及蛋白质相互作用等方面具有重要的生理作用^[6,7,10,19]。FAM3A 是 FAM3 细胞因子样基因家族的第 1 个成员,体外研究表明,FAM3A 主要定位在培养肝细胞的线粒体之中,具有促进 ATP 生成以及分泌的作用^[20-21]。FAM3B 是 FAM3 基因家族的第 2 个成员,主要表达于胰腺,具有与炎症因子白细胞介素 6 相似的致细胞凋亡的作用^[22-23],在胰岛素抵抗和 2 型糖尿病发展过程中起重要作用,其可能成为 2 型糖尿病的新干预靶点^[24-25]。FAM3D 被发现可能介入了机体能量代谢异常、结肠癌及嗜睡等的发生发展过程^[18,24,26-27]。FAM3C 是 FAM3 基因家族的第 3 个成员,已被发现在胚胎发育和视网膜功能调控、上皮细胞间质转化以及胰腺癌发生过程中起着重要作用,在肿瘤组织中发现了高水平的 FAM3C 蛋白表达^[15,28-30]。在唾液腺、胰腺、结肠、十二指肠和乳腺中的分泌性上皮细胞中也有 FAM3C 的表达^[13]。近年来 FAM3C 的功能和表达也在哺乳动物大脑中进行了研究,结果显示 FAM3C 水平降低与 AD 的发病有关,脑内 FAM3C 的表达水平在出生后达到峰值,随着年龄的增长而下降,与年龄匹配的正常脑相比,AD 脑中 FAM3C 免疫反应神经元的阳性数量减少^[15,30]。

本实验研究显示,PD 模型小鼠在 6 月龄时 SN 区 FAM3C 蛋白表达水平出现增高,提示 FAM3C 异常表达参与了 PD 的发生及发展过程,为进一步阐述 PD 的发病机制提供了实验依据。

综上所述,在 PD 的发病过程中出现了 SN 区 FAM3C 的异常表达,但其对 PD 发病机制的作用还需要进一步的研究探讨。

[参考文献]

[1] DAWSON T M, DAWSON V L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease[J]. *Science*, 2003,302(5646):819-822.

[2] JIANG H, WANG J, ROGERS J, et al. Brain iron metabolism dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2017,54(4):3078-3101.

[3] ALKHUJA S. Parkinson disease; Research update and clinical management[J]. *South Med J*, 2013,106(5):334.

[4] KANSARA S, TRIVEDI A, CHEN S, et al. Early diagnosis and therapy of Parkinson's disease; Can disease progression be curbed[J]? *J Neural Transm (Vienna)*, 2013,120(1):197-210.

[5] SVEINBJORNSDOTTIR S. The clinical symptoms of Parkinson's disease[J]. *J Neurochem*, 2016,139(Suppl 1):318-324.

[6] YANG J, GUAN Y. Family with sequence similarity 3 gene family and nonalcoholic fatty liver disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013,28(Suppl 1):105-111.

[7] ZHU Y H, ZHANG B, LI M, et al. Prognostic significance of FAM3C in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Diagn Pathol*, 2015,10:192.

[8] KRAL M, KLIMEK C, KUTAY B, et al. Covalent dimerization of interleukin-like epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) inducer (ILEI) facilitates EMT, invasion, and late aspects of metastasis[J]. *FEBS J*, 2017,284(20):3484-3505.

[9] SONG Q, GOU W L, ZHANG R. FAM3A protects HT22 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through activation of PI3K/Akt but not MEK/ERK pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015,37(4):1431-1441.

[10] ZHANG X, YANG W, WANG J, et al. FAM3 gene family: A promising therapeutic target for NAFLD and type 2 diabetes[J]. *Metabolism*, 2018,81:71-82.

[11] PILIPENKO V V, REECE A, CHOO D I, et al. Genomic organization and expression analysis of the murine Fam3c gene[J]. *Gene*, 2004,335:159-168.

[12] CHEN Z, DING L, YANG W, et al. Hepatic activation of the FAM3C-HSF1-CaM pathway attenuates hyperglycemia of obese diabetic mice[J]. *Diabetes*, 2017,66(5):1185-1197.

[13] WAERNER T, ALACAKAPTAN M, TAMIR I, et al. ILEI: A cytokine essential for EMT, tumor formation, and late events in metastasis in epithelial cells[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(3):227-239.

[14] ZHAO X, LUO G, FAN Y, et al. ILEI is an important intermediate participating in the formation of TGF-beta1-induced renal tubular EMT[J]. *Cell Biochem Funct*, 2018,36(2):46-55.

[15] HASEGAWA H, LIU L, TOOYAMA I, et al. The FAM3 superfamily member ILEI ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by destabilizing the penultimate amyloid-beta precursor[J]. *Nat Commun*, 2014,5:3917.

[16] FOULDS P G, YOKOTA O, THURSTON A, et al. Post mortem cerebrospinal fluid alpha-synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other alpha-synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies[J]. *Neurobiol Dis*, 2012,45(1):188-195.

[17] HALL S, JANELIDZE S, SUROVA Y, et al. Cerebrospinal fluid concentrations of inflammatory markers in Parkinson's disease and atypical parkinsonian disorders[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):13276.

- [18] MAGDALINOU N K, PATERSON R W, SCHOTT J M, et al. A panel of nine cerebrospinal fluid biomarkers may identify patients with atypical parkinsonian syndromes[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2015,86(11):1240-1247.
- [19] WILSON C G, ROBERT-COOPERMAN C E, BURKHARDT B R. PANcreatic-DErived factor: Novel hormone PAN-DEriving to glucose regulation[J]. FEBS Lett, 2011,585(14): 2137-2143.
- [20] JIA S, CHEN Z, LI J, et al. FAM3A promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration and exacerbates neointima formation in rat artery after balloon injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014,74:173-182.
- [21] WANG C, CHI Y, LI J, et al. FAM3A activates PI3K p110alpha/Akt signaling to ameliorate hepatic gluconeogenesis and lipogenesis[J]. Hepatology, 2014,59(5):1779-1790.
- [22] CAO X, YANG J, BURKHARDT B R, et al. Effects of over-expression of pancreatic derived factor (FAM3B) in isolated mouse islets and insulin-secreting betaTC3 cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005,289(4): E543-550.
- [23] HOU X, WANG O, LI Z, et al. Upregulation of pancreatic derived factor (FAM3B) expression in pancreatic beta-cells by MCP-1 (CCL2)[J]. Mol Cell Endocrinol, 2011,343(1-2):18-24.
- [24] HE L, FU Y, DENG J, et al. Deficiency of FAM3D (family with sequence similarity 3, member D), a novel chemokine, attenuates neutrophil recruitment and ameliorates abdominal aortic aneurysm development[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018,38(7):1616-1631.
- [25] MARELIA C B, KUEHL M N, SHEMWELL T A, et al. Circulating PANDER concentration is associated with increased HbA1c and fasting blood glucose in Type 2 diabetic subjects[J]. J Clin Transl Endocrinol, 2018,11:26-30.
- [26] CAO T, YANG D, ZHANG X, et al. FAM3D inhibits glucagon secretion via MKP1-dependent suppression of ERK1/2 signaling[J]. Cell Biol Toxicol, 2017,33(5):457-466.
- [27] DE WIT N J, IJSSENNAGGER N, OOSTERINK E, et al. Oit1/Fam3D, a gut-secreted protein displaying nutritional status-dependent regulation[J]. J Nutr Biochem, 2012,23(11): 1425-1433.
- [28] GAO Z H, LU C, WANG Z N, et al. ILEI: A novel marker for epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis in colorectal cancer[J]. Histopathology, 2014,65(4):527-538.
- [29] LAHSNIG C, MIKULA M, PETZ M, et al. ILEI requires oncogenic ras for the epithelial to mesenchymal transition of hepatocytes and liver carcinoma progression[J]. Oncogene, 2009,28(5):638-650.
- [30] LIU L, WATANABE N, AKATSU H, et al. Neuronal expression of ILEI/FAM3C and its reduction in Alzheimer's disease[J]. Neuroscience, 2016,330:236-246.

(本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 541 页)

- [11] SCHRIEWER A, BRINK M, GIANMOENA K, et al. Oxalic acid quantification in mouse urine and primary mouse hepatocyte cell culture samples by ion exclusion chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017,1068-1069:239-244.
- [12] HIRSOVA P, IBRAHIM S H, KRISHNAN A, et al. Lipid-induced signaling causes release of inflammatory extracellular vesicles from hepatocytes [J]. Gastroenterology, 2016, 150 (4):956-967.
- [13] NOVIK E I, DWYER J, MORELLI J K, et al. Long-enduring primary hepatocyte-based co-cultures improve prediction of hepatotoxicity[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017,336:20-30.
- [14] SOLDATOW V, PEFFER R C, TRASK O J, et al. Development of an in vitro high content imaging assay for quantitative assessment of CAR-dependent mouse, rat, and human primary hepatocyte proliferation[J]. Toxicol In Vitro, 2016, 36: 224-237.
- [15] CZAYA B, SINGH S, YANUCIL C, et al. Induction of an inflammatory response in primary hepatocyte cultures from mice [J]. J Vis Exp, 2017,121:e55319.
- [16] CHOI Y Y, KIM J, LEE S H, et al. Lab on a chip-based hepatic sinusoidal system simulator for optimal primary hepatocyte culture[J]. Biomed Microdevices, 2016,18(4):58.
- [17] 张丁丁,辛永宁,罗兵,等. 一种简化的分离与培养小鼠原代肝细胞的方法[J]. 青岛大学医学院学报, 2014,50(1):34-36.
- [18] 王宇明. 分离小鼠肝细胞的一种简易灌注法[J]. 中国应用生理学杂志, 1993,9(1):65-67.
- [19] SONG R, WANG X, MAO Y, et al. Resistin disrupts glycogen synthesis under high insulin and high glucose levels by down-regulating the hepatic levels of GSK3β[J]. Gene, 2013, 529(1):50-56.
- [20] FRACZEK J, BOLLEYN J, VANHAECKE T, et al. Primary hepatocyte cultures for pharmaco-toxicological studies: At the busy crossroad of various anti-dedifferentiation strategies[J]. Arch Toxicol, 2013,87(4):577-610.
- [21] WANG S, CHEN L, WANG Q, et al. Strain differences between CD-1 and C57BL/6 mice in expression of metabolic enzymes and DNA methylation modifications of the primary hepatocytes[J]. Toxicology, 2018,412:19-28.
- [22] PENG W C, LOGAN C Y, FISH M, et al. Inflammatory cytokine TNFα promotes the long-term expansion of primary hepatocytes in 3D culture[J]. Cell, 2018,175(6):1607-1619.

(本文编辑 厉建强)