

沉默信息调节因子 2 对 SCA3/MJD 转基因果蝇的神经保护作用及其与自噬的相关性研究*

曾爱源^{1)**} 朱惊雷^{1)**} 洪亢亢¹⁾ 张灼华²⁾ 段然慧²⁾ 孙莉¹⁾ 刘承伟¹⁾

魏小莉¹⁾ 韦荔莉¹⁾ 陈梅玲¹⁾ 林小慧¹⁾ 陈薇¹⁾ 李清华^{1)***}

(¹⁾ 桂林医学院附属医院神经内科, 桂林 541001; ²⁾ 中南大学医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078)

摘要 为探讨沉默信息调节因子 2(Sir2)在 SCA3/MJD 发病机制中的作用. 选用 GMR-GAL4 和 Nrv2-GAL4 驱动子, 利用经典的 GAL4-UAS 系统, 将含有 78 个 CAG 重复扩增的 ataxin-3 蛋白片段(MJDtr-Q78)分别在果蝇眼睛和运动神经元内选择性表达, 构建 GMR-GAL4/UAS 和 Nrv2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇模型, 然后分别在抑制和不抑制自噬的情况下, 使 Sir2 在 SCA3/MJD 转基因果蝇眼睛和运动神经元内过表达. 结果发现, Sir2 过表达明显抑制了 SCA3/MJD 转基因果蝇眼睛视网膜光感受神经元变性, 显著改善了果蝇运动能力, 而在自噬被抑制后, Sir2 的作用效果明显减弱, 表明 Sir2 对 SCA3/MJD 转基因果蝇具有神经保护作用, 而这种神经保护作用需要依赖自噬的功能.

关键词 遗传性脊髓小脑性共济失调 3 型, 沉默信息调节因子 2(Sir2), 转基因果蝇, 自噬, 神经保护

学科分类号 R74, R394

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00367

SCA3/MJD(spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease, SCA3/MJD)是遗传性脊髓小脑型共济失调(spinocerebellar ataxia, SCA)中最常见的亚型, 在中国人群中, 该型几乎占有 SCA 患者的 50%, 临床表现为小脑性共济失调、眼球运动障碍、视神经萎缩、锥体束征、锥体外系征、肌萎缩, 甚至周围神经损害^[1-2].

Sirtuins 是一类依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotin amide adenine dinucleotide, NAD)的组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)家族, 与能量代谢、抗氧化应激、抗凋亡、延长细胞寿命等细胞过程密切相关, 从原核生物到真核生物均高度保守^[3-4]. 在酵母、线虫和果蝇中, 沉默信息调节因子 2(silent information regulator 2, Sir2)则是 Sirtuins 家族最重要的成员. 研究表明, Sir2 具有广泛的生物学作用, 如抗炎、抗氧化、清除自由基等^[5].

为研究 Sir2 对 SCA3/MJD 是否具有神经保护作用, 我们采用遗传干预使 Sir2 在 GMR-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇视网膜光感受神

经元和 Nrv2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇运动神经元内过表达, 观察 Sir2 过表达对 GMR-GAL4/UAS 系统和 Nrv2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇是否具有保护作用, 并进一步验证这种保护作用是否与自噬有关.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 果蝇品系. 基因型 w[1118]; P{w[+mC]=EP}Sir2^[EP2300] DnaJ-H^[EP2300]/CyO 的 24859 果蝇品系(简称 Sir2^{EP2300} 果蝇), 购自美国 Bloomington 果蝇中心. 基因型 p{w[+mC]=longGMR-GAL4}2/CyO

* 国家自然科学基金(30960112, 81160163), 广西自然科学基金(0991259, 0899014), 广西卫生厅课题(Z2007197)和桂林市科技与开发课题(20080707)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0773-2823730, E-mail: qhli1999@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-08-10, 接受日期: 2011-09-26

的 8605 果蝇品系(简称 GMR-GAL4 果蝇), 基因型 $w[*]; P\{w[+mC]=UAS-Hsap/MJDtr-Q78\}c211.2$ 的 8150 果蝇品系(简称 UAS-MJDtr-Q78 果蝇), 基因型 $w[*]; P\{w[+mC]=UAS-Hsap/MJDtr-Q27\}N18.3$ 的 8149 果蝇品系(简称 UAS-MJDtr-Q27 果蝇), 基因型 $w[*]; P\{Nrv2-GAL4.S\}8 P\{UAS-GFP.S65T\}T10$ 的 6794 果蝇品系(简称 Nrv2-GAL4 果蝇), 基因型 $w1118, Act-Gal4/CyO, w[1118]; P\{GD11671\}v45558$ (简称 UAS-Atg7^{RNAi} 果蝇), $Sco/CyO, TM3/TM6$ 果蝇均由中南大学医学遗传学国家重点实验室提供。

1.1.2 试剂. 葡萄糖(国药基团化学试剂有限公司); 蔗糖(天津大茂化学试剂厂); 琼脂糖(日本); 对羟基苯甲酸甲酯(上海山浦化工); 酵母粉(梅山-马利酵母公司); 玉米粉及苹果绿色素(市场购买)。

1.2 方法

1.2.1 GMR-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇.

a. 构建 $w; GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/CyO$ 果蝇. 将 UAS-MJDtr-Q78 雄性果蝇与 GMR-GAL4 处女蝇杂交, 构建基因型为 $w; GMR-GAL4/UAS-MJDtr-Q78$ 的 GMR-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇模型. 将 w^{1118} 处女蝇与 $Act-GAL4/CyO$ 雄性果蝇杂交, 构建基因型为 $w; +/CyO$ 的果蝇, 再将此雄性果蝇与 $w; GMR-GAL4/UAS-MJDtr-Q78$ 处女蝇杂交, 筛选复眼色素脱失且卷翅的子代, 即基因型为 $w; GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/CyO$ 的果蝇。

b. 构建 $GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}$ 果蝇. 将 $Sir2^{EP2300}$ 与上述构建的 $GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/CyO$ 果蝇杂交, 筛选基因型为 $GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}$ 果蝇。

c. 构建 $GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}, UAS-Atg7^{RNAi}/+$ 果蝇. 通过双平衡系果蝇(基因型 $w; CyO/Sco; TM3/TM6$)对 $Sir2^{EP2300}$ 果蝇品系进行平衡, 构建 $w; Sir2^{EP2300}/CyO; TM3/TM6$; 挑选处女蝇与 $UAS-Atg7^{RNAi}$ 果蝇品系(基因型 $Sco/CyO; UAS-Atg7^{RNAi}/TM3$)进行杂交, 筛选基因型为 $Sir2^{EP2300}/CyO; UAS-Atg7^{RNAi}/TM3$, 与上述构建的 $GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/CyO$ 果蝇杂交, 在子代中筛选基因型为 $GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; UAS-Atg7^{RNAi}/+$ 的果蝇。

d. 观察 Atg7 被 RNA 干扰后, $Sir2$ 对 $GMR-GAL4/UAS$ 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇的影

响. 通过电脑体视显微镜观察第 7 天的 $GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/CyO$ 果蝇, $GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}$ 果蝇以及 $GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; UAS-Atg7^{RNAi}/+$ 果蝇的复眼结构和色泽, 通过电镜分别在 180 倍和 1000 倍下观察其单眼结构。

e. 用半定量 RT-PCR 检测 $GMR-GAL4/UAS$ 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇 $Sir2$ 或 $Atg7$ mRNA 表达水平. 取第 7 天的 $GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/CyO$ 果蝇, $GMR-GAL4/+; UAS-MJDtr-Q27/+$ 果蝇(对照), $GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}$ 果蝇; $GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; UAS-Atg7^{RNAi}/+$ 果蝇各 50 只, 将这些果蝇脑组织切下, 提取总 RNA. 以 $rp49$ 基因为内参, 根据文献[6]合成 $Sir2$ 或 $Atg7$ 和 $rp49$ 引物, 进行实时半定量 PCR 检测各果蝇品系 $Sir2$ 或 $Atg7$ mRNA 表达水平。

1.2.2 Nrv2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇.

a. 构建 $UAS-MJDtr-Q78/+; Nrv2-GAL4/+$ 果蝇. 将 $Nrv2-GAL4$ 果蝇直接与 $UAS-MJDtr-Q78$ 果蝇杂交, 在子代中筛选 $UAS-MJDtr-Q78/+; Nrv2-GAL4/+$ 果蝇。

b. 构建 $UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}, Nrv2-GAL4/+$ 果蝇. 将 $Sir2^{EP2300}$ 果蝇平衡成 $CyO/Sir2^{EP2300}; TM3/TM6$ 果蝇. 将 $Nrv2-GAL4$ 果蝇平衡成 $Sco/CyO; Nrv2-GAL4/TM3$ 果蝇, 两者杂交后筛选 $CyO/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/TM3$ 果蝇. 然后与 $UAS-MJDtr-Q78$ 果蝇杂交, 在子代中筛选 $UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/+$ 果蝇。

c. 构建 $UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}, UAS-Atg7^{RNAi}/Nrv2-GAL4$ 果蝇. 将 $UAS-MJDtr-Q78/CyO; TM3/TM6$ 果蝇与 $Sco/CyO; UAS-Atg7^{RNAi}/TM3$ 果蝇杂交, 在子代中筛选 $UAS-MJDtr-Q78/CyO; UAS-Atg7^{RNAi}/TM6$ 果蝇, 然后与 $CyO/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/TM3$ 果蝇杂交, 在子代中筛选 $UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; UAS-Atg7^{RNAi}/Nrv2-GAL4$ 果蝇。

d. 观察自噬抑制与不抑制的情况下, $Sir2$ 对 $Nrv2-GAL4/UAS$ 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇模型的影响。

① 检测果蝇的爬行能力。

即负趋地性(negative geotaxis)试验, 根据参考文献[7], 将第 7 天的 $UAS-MJDtr-Q27/Nrv2-GAL4$ 果蝇(对照), $UAS-MJDtr-Q78/+; Nrv2-GAL4/+$ 果蝇, $UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/+$ 果蝇,

UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; UAS-Atg7^{RNAi}/Nrv2-GAL4 果蝇 4 个品系, 每个品系 100 只雄性果蝇麻醉后放入一个垂直的 20 cm 高的塑料管, 每管放入 10 只, 30 min 后果蝇复苏, 因果蝇的负趋地性特点, 果蝇会离开瓶底向上爬行, 计数在 30 s 后仍留在瓶底的果蝇数量, 计算离开瓶底的果蝇数, 每个实验组(瓶)重复进行 3 次, 统计学方法采用配对 *t* 检验.

② 检测果蝇的飞行能力.

利用 DAM5 果蝇活力监测系统 (DAM5 *drosophila* activity monitor), 观察、记录及分析果蝇运动能力(该仪器通过一个红外光束穿过把果蝇饲养管分成两半, 当果蝇在管内来回走动时, 它们将切割红外光, 这些运动数据则被记录下来); 将第 7 天的 UAS-MJDtr-Q27/Nrv2-GAL4 果蝇(对照), UAS-MJDtr-Q78/+; Nrv2-GAL4/+ 果蝇, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/+ 果蝇, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; UAS-Atg7^{RNAi}/Nrv2-GAL4 果蝇共 4 个品系, 每个品系 8 只果蝇, 每管放入 1 只, 记录每管内单只果蝇切割红外线的的数据, 取每

个品系 8 只果蝇的平均值, 比较每个品系的飞行能力, 重复进行 3 次, 统计学方法采用配对 *t* 检验.

e. 用半定量 RT-PCR 检测 Nrv2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇 Sir2 或 Atg7 mRNA 表达水平. 取第 7 天的 Nrv2-GAL4/UAS-MJDtr-Q27(对照), UAS-MJDtr-Q78/+; Nrv2-GAL4/+ 果蝇, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/+ 果蝇, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/UAS-Atg7^{RNAi} 果蝇各 50 只, 将这些果蝇脑组织切下, 提取总 RNA, 以 rp49 基因为内参, 进行实时半定量 PCR 检测各果蝇品系 Sir2 或 Atg7 mRNA 表达水平.

2 结 果

2.1 GMR-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇

2.1.1 Sir2 过表达显著抑制了 GMR-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇神经变性. 正常对照组野生型果蝇复眼结构完整、纹路清晰、色泽鲜艳呈红色; 高电压下观察果蝇单眼结构完整, 刚毛排列整齐. GMR-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果

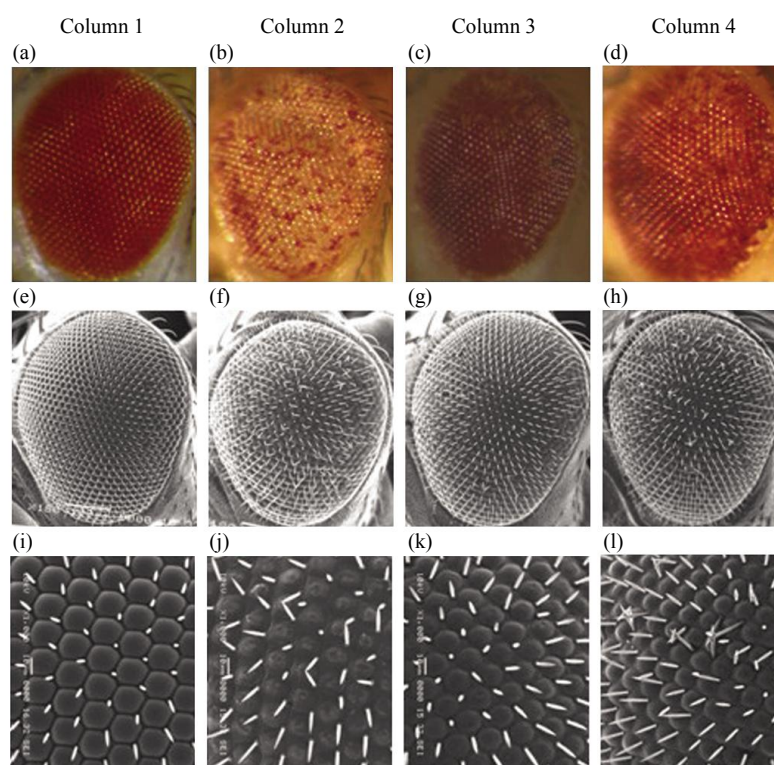


Fig. 1 Overexpression of Sir2 suppresses polyglutamine induced degeneration in *Drosophila*

(a)~(d): Light microscopy images of fly eyes (x54). (e)~(h): Scanning electron microscopy (SEM) images of fly eyes (x180). (i)~(l): Scanning electron microscopy (SEM) images of fly eyes (x1000). Column 1: Flies expressing GMR-GAL4 with MJDtr-Q27. The eye is normal. Genotype of flies is GMR-GAL4/+; MJDtr-Q27/+. Column 2: Flies expressing the MJDtr-Q78 shows rough eyes. Genotype of flies is GMR-GAL4, MJDtr-Q78/CyO. Column 3: Flies coexpressing MJDtr-Q78 with the Sir2 transgenes. Degeneration was suppressed by expression of Sir2. Genotype of flies is GMR-GAL4, MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}. Column 4: Flies coexpressing MJDtr-Q78 with the Sir2 in a background of Atg7 knockdown. RNAi knockdown of Atg7 inhibited Sir2 suppressing degeneration in fly eyes expressing MJDtr-Q78. Genotype of flies is GMR-GAL4, MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; Atg7^{RNAi}/+.

蝇模型复眼外形不规则, 纹路消失, 正常红色色泽缺失严重; 高电压下可见塌陷, 单眼不清楚, 刚毛短且折断, 刚毛排列紊乱; 过表达 Sir2 后, 果蝇复眼较前者呈现明显的好转, 纹路较清晰, 果蝇复眼色素明显增多; 高电压下单眼结构基本成型, 界限清楚, 刚毛较 SCA3/MJD 转基因果蝇明显增多、整齐(图 1)。

2.1.2 抑制自噬后, Sir2 过表达对 GMR-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇神经变性的抑制作用明显减弱。 *Atg7* 基因被 RNA 干扰后, Sir2 过表达的 GMR-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果

蝇复眼色素明显减少, 纹路模糊, 高电压下, 果蝇单眼结构不完整, 且刚毛折断, 排列紊乱(图 1)。

2.1.3 GMR-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇 Sir2 或 *Atg7* mRNA 水平。 相较于 GMR-GAL4/+; UAS-MJDtr-Q27/+ 果蝇或 GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q27/CyO 果蝇, GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q27/Sir2^{EP2300}; UAS-*Atg7*^{RNAi}/+ 果蝇和 GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q27/Sir2^{EP2300} 果蝇的 Sir2 表达量增加了约 5.6 倍, 而 *Atg7* 被 RNA 干扰后, 果蝇的 *Atg7* mRNA 量明显下降, 约为 RNA 干扰前的 25% 左右(图 2)。

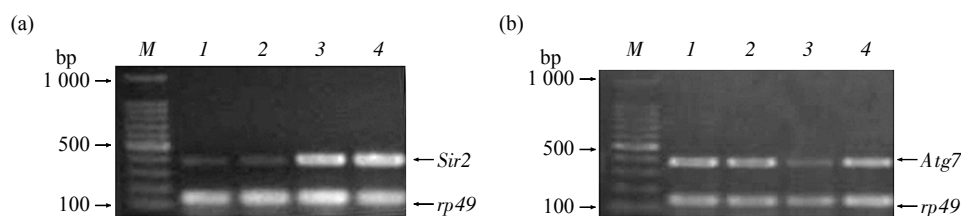


Fig. 2 Difference in the level of expression of *Sir2* and *Atg7* genes among fly lines with GMR-GAL4/UAS

RNA was extracted for reverse transcription. Semi-quantitative PCR was performed to determine the inducible mRNA expression levels of *Sir2* (a) and *Atg7* (b) genes with *rp49* as control. *Sir2* (a), from 2 to 4, 1, 5.6, 5.6-fold increase for *Sir2* mRNA level compared to the control (1) respectively; *Atg7* (b), from 2 to 4, 1, 0.25, 1-fold decrease for *Atg7* mRNA level compared to the control (1) respectively. 1: Flies expressing MJDtr-Q27 with GMR-GAL4/UAS. Genotype of flies GMR-GAL4/+; UAS-MJDtr-Q27/+; 2: Flies expressing MJDtr-Q78 with GMR-GAL4/UAS. Genotype of flies GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/CyO; 3: Flies co-expressing expanded polyglutamine protein and Sir2 in the background of *Atg7* knockdown. Genotype of flies is GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}, UAS-*Atg7*^{RNAi}/+; 4: Flies co-expressing expanded polyglutamine protein and Sir2 gene. Genotype of flies is GMR-GAL4, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}.

2.2 Nrv2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇的运动能力

2.2.1 Sir2 过表达显著改善了 Nrv2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇的爬行能力。 与 UAS-MJDtr-Q27/Nrv2-GAL4 果蝇比较, UAS-MJDtr-Q78/+; Nrv2-GAL4/+ 果蝇的爬行能力下降了 46%, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/+ 果蝇的爬行能力达到了 UAS-MJDtr-Q27/Nrv2-GAL4 果蝇的 82%, 较 UAS-MJDtr-Q78/+; Nrv2-GAL4/+ 果蝇的爬行能力增强了 28%(图 3)。

2.2.2 抑制自噬后, Sir2 过表达对 Nrv2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇爬行能力的改善作用减弱。 UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/UAS-*Atg7*^{RNAi} 果蝇的爬行能力较 UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/+ 果蝇下降了 24%(图 3)。

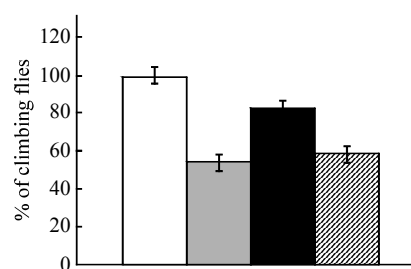


Fig. 3 RNAi knockdown of *Atg7* suppressed Sir2 improving climbing ability of SCA3 *Drosophila* model

Climbing ability of flies expressing MJDtr-Q78 is 54% compared with the control flies (flies expressing MJDtr-Q27, Genotype of them is Nrv2-GAL4/UAS-MJDtr-Q27), and climbing ability of flies expressing MJDtr-Q78 in the presence of Sir2 increase 28%, however, climbing ability of flies coexpressing MJDtr-Q78 and Sir2 in the background of *Atg7* knockdown decrease 24%. Each line includes 100 flies. □: UAS-MJDtr-Q27/Nrv2-GAL4; ■: UAS-MJDtr-Q78/+; Nrv2-GAL4/+; ■: Sir2^{EP2300}/UAS-MJDtr-Q78; Nrv2-GAL4/+; ▨: Sir2^{EP2300}/UAS-MJDtr-Q78; UAS-*Atg7*^{RNAi}/Nrv2-GAL4.

2.2.3 Sir2 过表达显著改善了 Nrv2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇的飞行能力. 根据 DAM5 果蝇活力监测系统记录的结果分析, Nrv2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇的飞行能力较正常对照果蝇下降近 73%, 而 Sir2 过表达的 Nrv2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇的爬行能力则达到正常对照果蝇的 95%, 较干预前提高了 22%(图 4).

2.2.4 抑制自噬后, Sir2 过表达对 Nrv2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇的飞行能力的改善作用减弱. Atg7 表达下调后, 果蝇飞行能力下降至正常对照果蝇的 40%, 较干预前下降了 55% (图 4).

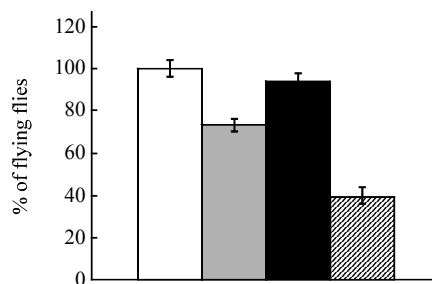


Fig. 4 RNAi knockdown of Atg7 suppressed Sir2 improving flight ability of SCA3 *Drosophila* model

Flight ability of flies expressing MJDtr-Q78 is 73% compared with the control flies (flies expressing MJDtr-Q27, Genotype of them is Nrv2-GAL4/UAS-MJDtr-Q27), and flight ability of flies expressing MJDtr-Q78 in the presence of Sir2 increase by 95%, however, flight ability of flies coexpressing MJDtr-Q78 and Sir2 in the background of Atg7 knockdown decrease to 40%. Each line includes 100 flies. □: UAS-MJDtr-Q27/Nrv2-GAL4; ■: UAS-MJDtr-Q78/+; Nrv2-GAL4/+; ■: Sir2^{EP2300}/UAS-MJDtr-Q78; Nrv2-GAL4/+; ▨: Sir2^{EP2300}/UAS-MJDtr-Q78; UAS-Atg7^{RNAi}/Nrv2-GAL4.

2.2.5 Nrv2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇 Sir2 及 Atg7 mRNA 表达水平检测结果. 与 GMR-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇类似, UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/+果蝇和 UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/UAS-Atg7^{RNAi}果蝇中 Sir2 的表达量也增加了 5.2 倍. 而 Atg7 被 RNA 干扰后, 果蝇的 Atg7 mRNA 量明显下降, 约为 RNA 干扰前的 10%左右(图 5).

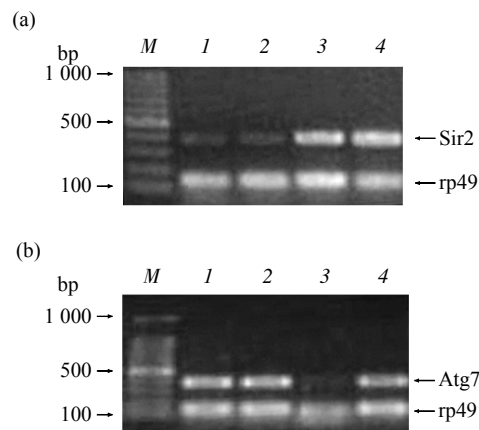


Fig. 5 Difference in the level of expression of Sir2 and Atg7 genes among fly lines with Nrv2-GAL4/UAS

RNA was extracted for reverse transcription. Semi-quantitative PCR was performed to determine the inducible mRNA expression levels of Sir2 (a) and Atg7 (b) genes with rp49 as control. (a) from 2 to 4, 1, 5.2, 5.2-fold increase for Sir2 mRNA level compared to the control (1) respectively; (b) from 2 to 4, 1, 0.1, 1-fold decrease for Atg7 mRNA level compared to the control (1) respectively. 1: Flies expressing MJDtr-Q27 with Nrv2-GAL4. Genotype of flies Nrv2-GAL4/UAS-MJDtr-Q27; 2: Flies expressing MJDtr-Q78 with Nrv2-GAL4. Genotype of flies UAS-MJDtr-Q78/+; Nrv2-GAL4/+; 3: Flies co-expressing expanded polyglutamine protein and Sir2 in the background of Atg7 knockdown. Genotype of flies is UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/UAS-Atg7^{RNAi}; 4: Flies co-expressing expanded polyglutamine protein and Sir2 gene. Genotype of flies is UAS-MJDtr-Q78/Sir2^{EP2300}; Nrv2-GAL4/+.

3 讨 论

SCA3/MJD 疾病是目前发现的 9 种多聚谷氨酰胺(polyglutamine, PolyQ)疾病中最常见的一种类型, 尽管已知其致病基因 *MJD1* 编码区 3'端 CAG 三核苷酸重复序列异常扩增, 导致其编码蛋白 ataxin-3 羧基端的多聚谷氨酰胺 PolyQ 肽链异常扩展, 因而易于错误折叠而具有神经细胞毒性, 选择性地累及小脑、脑干及脊髓等部位, 导致神经元变性、死亡^[8], 但其确切的发病机制目前仍不清楚, 也无任何有效的治疗方法. Sir2 是依赖 NAD⁺的组蛋白去乙酰化酶 Sirtuins 家族的一员, 具有组蛋白/非组蛋白去乙酰化酶活性, 是卡路里限制(caloric restriction, CR)延长生物寿命的关键蛋白^[9], 在抗

细胞凋亡、抗老化以及调节细胞转录、能量代谢等方面也具有重要作用。为明确 Sir2 对 SCA3/MJD 疾病是否具有神经保护作用, 我们在 GMR-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇模型光感受神经元中过表达 Sir2, 结果发现, 在 Sir2 过表达的情况下, 果蝇复眼结构和色素明显好转, 高电压下单眼结构基本成型, 界限变得清楚。同样, 在果蝇运动方面, Sir2 过表达也显著改善 Nrv-2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇的爬行能力和飞行能力, 提示 Sir2 过表达可以抑制 SCA3/MJD 转基因果蝇神经变性, 改善果蝇的运动能力, Sir2 过表达对 SCA3/MJD 转基因果蝇具有神经保护作用。

在 PolyQ 疾病中, 异常扩展的 PolyQ 蛋白发生错误折叠, 并倾向性聚集, 而具有神经细胞毒性, 被认为是疾病发生的始动因素, 因此, 这些细胞内错误折叠的 PolyQ 蛋白的有效清除对于维持神经细胞正常生理功能至关重要。近年来, 自噬 - 溶酶体通路 (autophagy-lysosome pathway, ALP) 被认为是除泛素 - 蛋白水解酶通路 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 外细胞内另一个主要的蛋白质降解通路^[9], ALP 被证实可有效降解毒性的 PolyQ 蛋白及其聚集物, 在 HD 等 polyQ 疾病的病理生理机制中具有重要作用^[10]。研究表明: Sir2 可参与自噬小泡的形成, 并诱导 ALP, 降解功能受损的蛋白质, 而延长细胞寿命^[11]。在本研究中, 我们敲除了在自噬体形成过程中起重要作用的自噬相关蛋白 Atg7, 发现 Atg7 被敲除后, Sir2 对 GMR-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇神经变性的抑制作用显著减弱, 对 Nrv-2-GAL4/UAS 系统 SCA3/MJD 转基因果蝇的爬行能力和飞行能力的改善作用也明显下降, 提示自噬通路在 Sir2 对 SCA3/MJD 转基因果蝇的神经保护作用机制具有重要功能。

总之, 在本研究中, 我们证实了 Sir2 过表达

对 SCA3/MJD 转基因果蝇具有神经保护作用, 而 Sir2 的这种神经保护作用需要依赖自噬的功能, 然而关于 Sir2 抑制 SCA3/MJD 转基因果蝇神经变性的确切机制还需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Zhao Y, Lim S W, Tan E K. Genetic analysis of SCA 27 in ataxia and childhood onset postural tremor. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2007, **144**(3): 395-396
- [2] Jiang H, Tang B, Xia K, *et al.* Spinocerebellar ataxia type 6 in Mainland China: Molecular and clinical features in four families. *J Neurol Sci*, 2005, **236**(1-2): 25-29
- [3] Tong L, Lee S, Denu J M. Hydrolase regulates NAD⁺ metabolites and modulates cellular redox. *J Biol Chem*, 2009, **284**(17): 11256-11266
- [4] Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J, *et al.* Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol*, 2007, **21**(8): 1745-1755
- [5] Han S H. Potential role of sirtuin as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *J Clin Neurol*, 2009, **5**(3): 120-125
- [6] Rogina B, Helfand S L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(45): 15998-16003
- [7] Liu Z, Wang X, Yu Y A. *Drosophila* model for LRRK2-linked Parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(7): 2693-2698
- [8] 李清华, 江 泓, 易继平, 等. Hsp22 对 SCA3/MJD 转基因果蝇的神经保护作用研究. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(12): 1430-1436
- [9] Li Q H, Jiang H, Yi J P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(12): 1430-1436
- [9] Sarkar S, Ravikumar B, Floto R A, *et al.* Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death Differ*, 2009, **16**(1): 46-56
- [10] Wareski P, Vaarmann A, Choubey V, *et al.* PGC-1 α and PGC-1 β regulate mitochondrial density in neurons. *J Biol Chem*, 2009, **284**(32): 21379-21385
- [11] Salminen A, Kaarniranta K. SIRT1: regulation of longevity via autophagy. *Cell Signal*, 2009, **21**(9): 1356-1360

The Neuro-protective Role of Sir2 in The Process of Neuro-degeneration of The SCA3/MJD Model Flies is Dependent on Autophagy Function*

ZENG Ai-Yuan^{1)**}, ZHU Jing-Lei^{1)**}, HONG Kang-Kang¹⁾, ZHANG Zhuo-Hua²⁾, DUAN Ran-Hui²⁾, SUN Li¹⁾, LIU Cheng-Wei¹⁾, WEI Xiao-Li¹⁾, WEI Li-Li¹⁾, CHEN Mei-Ling¹⁾, LIN Xiao-Hui¹⁾, CHEN Wei¹⁾, LI Qing-Hua^{1)***}

¹⁾ Department of Neurology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China;

²⁾ National Laboratory of Medical Genetics of China, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract To confer the influence of Sir2 on pathogenesis of SCA3/MJD. GMR-GAL4 and Nrv2-GAL4 system SCA3/MJD transgenic *Drosophila* models were constructed by using the promoter GMR-GAL4 and Nrv2-GAL4 which drive target selective gene expression in cells of the developing eyes and motor neurons, respectively. Then, Sir2 protein was overexpressed in SCA3/MJD transgenic *Drosophila* models by genetic methods with or without in a background of RNAi knockdown of *Atg7*. Overexpression of endogenous *Drosophila* Sir2 not only notably suppresses the neurotoxicity of MJDtr-Q78 protein, but also significantly improves the movement ability of flies. Moreover, RNAi knockdown of *Atg7* significantly Sir2's protection against SCA3/MJD *Drosophila*. We confirmed that overexpression of Sir2 could protect SCA3/MJD *Drosophila* models, and the protection role of Sir2 on SCA3/MJD *Drosophila* models is autophagy- dependent.

Key words SCA3, ataxin-3, Sir2, transgenic *Drosophila* models, neuroprotection

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00367

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30960112, 81160163) , The Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (0991259,0899014), Project in Guangxi Department of Public Health (Z2007197) and Project in Science and Technology of Guilin city(20080707).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-773-2823730, E-mail: qhli1999@yahoo.com.cn

Received: August 10, 2011 Accepted: September 26, 2011