

ALS 相关突变 SOD1-G93A

对小鼠骨骼肌细胞几种凋亡相关信号转导分子的影响

张磊 郭爽 徐俊杰*

吉林医药学院 吉林 132013

摘要: 目的 探讨 ALS 相关突变 SOD1-G93A 对小鼠骨骼肌细胞几种凋亡相关信号转导分子表达的影响。方法 应用脂质体, 在小鼠成肌细胞 C2C12 中转入人 SOD1 基因或 SOD1-G93A 突变基因, 采用 Western-Blot 检测转染效果, 以 Western-Blot 分析细胞中信号转导分子 p-p38、DR6、Bax、pAkt 表达情况。并与携带人 SOD1-G93A 突变基因的 ALS 模型小鼠(症状期)后肢腓肠肌组织内该几种分子表达变化进行比较。结果 与 SOD1WT 转染组相比, SOD1-G93A 转染后, p38 和 pAKT 明显异常激活, 而 DR6 和 Bax 表现为过表达, 与动物实验的结果一致。结论 SOD1-G93A 突变可影响骨骼肌内细胞凋亡相关信号转导途径, 这可能是 ALS 的机制之一。

关键词: ALS; SOD1-G93A; 骨骼肌; 细胞凋亡

肌萎缩侧索硬化症(Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)是一种进行性、致死性神经退行性疾病, 特征为大脑皮层、脑干和脊髓运动神经元选择性丢失, 导致进行性肌萎缩、无力、瘫痪及呼吸衰竭致死^[1]。多数 ALS 为散发性, 约 10% 为家族性(fALS)。超氧化物歧化酶 1(SOD1)基因突变是 fALS 最早鉴定且深入研究的致病因素^[1]。SOD1-G93A 突变体因在小鼠模型中稳定重现人类 ALS 核心病理特征, 成为研究该病机制和治疗的常用转基因模型^[2]。当前研究聚焦脊髓运动神经元及其微环境, 发现突变 SOD1 蛋白的毒性获得功能引发多种细胞内病理过程, 包括蛋白质稳态失衡、线粒体异常、氧化应激、轴突运输障碍及神经炎症异常激活等^[3], 这些信号通路的紊乱共同促进了运动神经元的进行性变性和死亡。

但 ALS 并非单纯的“神经元中心”疾病, 已有研究^[1,4]支持其“非细胞自主性”发病机制, 包括骨骼肌细胞在内的多种细胞类型均参与疾病进程。但骨骼肌病变与神经元退变的因果关系尚未明确, 骨骼肌不仅是运动神经元退化的被动靶点, 其本身在疾病早期就可能发生结构和功能的原发性改变。深入探究 SOD1-G93A 对骨骼肌关键信号分子的影响, 对于揭示骨骼肌自主性病理机制在 ALS 病程中的作用, 开发针对肌肉的保护性治疗策略至关重要。

1 材料与方法

1.1 实验材料

兔抗鼠 p-p38 及 pAKT(S473) 抗体购自 Cell signaling;

兔抗鼠 DR6 及 Bax 抗体购自 Santa; GAPDH 单克隆抗体购自 Millipore; 兔抗人 SOD1 抗体购自 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG 二抗、DMSO 购自 Sigma 公司; 脂质体 LipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司; 基因组 DNA 和质粒提取试剂盒、RIPA 裂解液、ECL 化学发光试剂盒及蛋白含量测定试剂盒购自上海碧云天; 胎牛血清、Opti-MEM 及 DMEM 购自 Gibco 公司; PVDF 膜购自 millipore 公司; SDS、TEMED、过硫酸铵等试剂购自 Sigma 公司。空白对照质粒 pcDNA3.1myc、对照质粒 pcDNA3.1(+) SOD1WT、质粒 pcDNA3.1(+) SOD1-G93A 购自 Addgene 公司; 鼠成肌细胞株 C2C12 购自中国科学院细胞库。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及转染

小鼠 C2C12 细胞常规复苏传代, 37℃、5%CO₂ 培养箱中用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养。对数生长期细胞接种于 6 孔板, 待细胞融合度达 60% 左右进行转染, 采用 Lipofectamine 2000 作为转染试剂, 按照说明书进行转染。分为空白组和质粒 pcDNA3.1myc、对照质粒 pcDNA3.1(+) SOD1WT、质粒 pcDNA3.1(+) SOD1-G93A 转染组。转染 4h 后及时更换新鲜培养基, 继续培养 48h。

1.2.2 动物饲养及分组

本实验使用的携带人 SOD1-G93A 突变基因的 ALS 模型小鼠和同窝 WT 小鼠, 由 Jackson Laboratory (Bar Harbor,

ME) 提供。雌雄各半, 12 周龄, 体重 20 ± 2 g, 每天光照 12h, 饲养温度为 22 ± 2 °C, 环境湿度为 50 ± 20 %, 定期给予灭菌饲料及饮水。ALS 模型小鼠, 按照 Jackson Laboratory 提供的说明进行交配、繁殖和鉴定。将雌性 WT 小鼠与雄性 ALS 小鼠杂交, 后代小鼠出生 4 周剪尾处理, PCR 鉴定, 筛选 SOD1-G93A 基因突变小鼠^[5]。检测用症状末期组小鼠为出生 130d 以上, 双下肢丧失行动能力, 仰卧 30 秒后无法自主完成翻身动作; 同窝的 WT 小鼠作为对照。

1.2.3 Western blot 检测

收集各组细胞后, 使用蛋白裂解液裂解, 提取总蛋白; 小鼠断头处死, 取后肢腓肠肌, 用含 PMSF 的 RIPA 裂解液提取各组总蛋白; 细胞及组织总蛋白均利用 BCA 法测定蛋白浓度, 各取 20 μ g 蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳并转移至 PVDF(polyvinylidene fluoride) 膜, 用封闭液 (10% 脱脂奶粉/TBST) 室温封闭 1h, 分别加入兔源多克隆抗体 p-p38 (1: 3000)、Bax (1: 2000)、pAkt (S473) (1: 3000)、DR6 (1: 1000)、GAPDH (1:3000)、抗人 SOD1 抗体 (1: 2000) 一抗, 4°C 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体 (1:5000) 室温孵育 1h, TBST 漂洗 3 次, 加入 ECL 进行发光反应, 暗室 X 胶片显影。

1.2.4 统计学分析

运用 Image J 软件对 Western blot 条带的灰度进行分析, 采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计学处理。两组数据

比较时, 先经正态检验和方差齐性检验, 再使用 t 检验, 3 组以上数据比较, 则先进行方差分析, 再进行多重比较。统计结果用平均数 $\pm$ SD 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

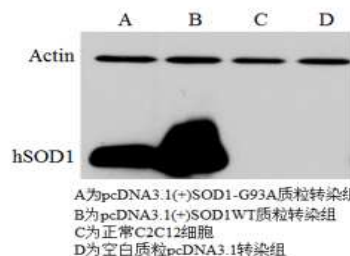
2 结果

2.1 SOD1-G93A 的转染引起 C2C12 细胞几种信号转导分子表达变化

图 1 表明, 转染人 SOD1WT 和 SOD1-G93A 基因的细胞成功表达了相应蛋白, 转染效果良好。Western blot (图 2A) 显示, SOD1-G93A 基因转染组与对照组相比, p-p38、pAkt (S473)、DR6 和 Bax 的表达均显著升高 (图 2B-E)。

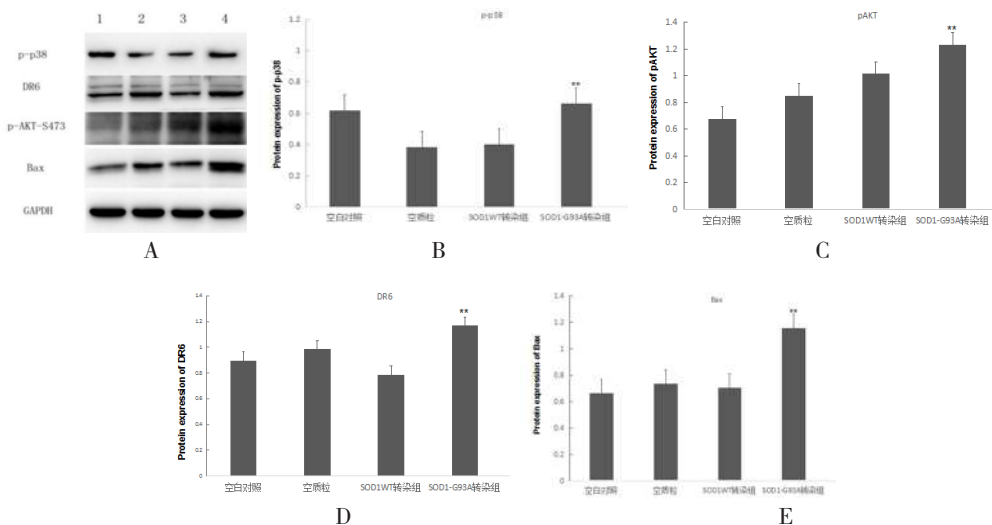
2.2 ALS 小鼠骨骼肌中几种信号转导分子表达显著升高

Western blot 分析 (图 3) 显示, 与 WT 小鼠相比, 症状末期 ALS 小鼠后肢腓肠肌中 p-p38、pAkt (S473)、DR6 和 Bax 的表达均显著升高 (图 2B)。



(A) pcDNA3.1(+)-SOD1-G93A 转染组; (B) pcDNA3.1(+)-SOD1WT 转染组; (C) 质粒 pcDNA3.1 myc 转染组; (D) 空白对照

图 1 Western blot 检测 SOD1 基因转染情况



A 为 p-p38、pAkt (S473)、DR6 及 Bax 表达水平的 Western blot 检测 (1 为空白对照组; 2-4 分别为 pcDNA3.1myc、pcDNA3.1(+)-SOD1WT、pcDNA3.1(+)-SOD1-G93A 质粒转染组); B-E 依次为 p-p38、pAKT、DR6、Bax 的 Western 定量结果; SOD1-G93A 组与空质粒和 SOD1WT 组比较, ** $P < 0.01$

图 2 突变体 SOD1-G93A 对 C2C12 细胞几种信号转导分子的影响

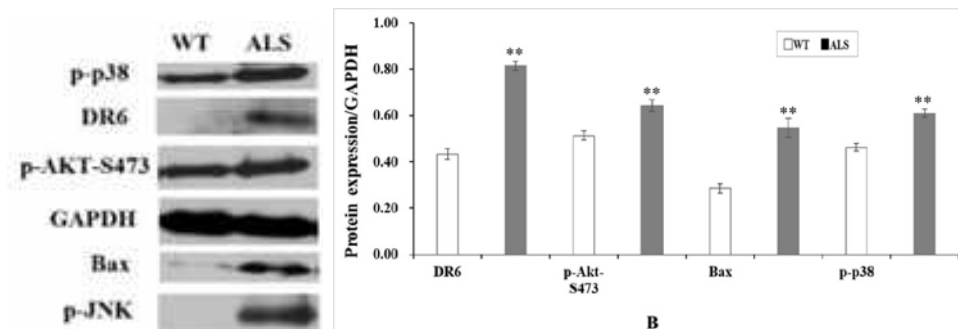


图3 症状末期ALS小鼠及同窝WT小鼠骨骼肌p-p38、pAkt(S473)、DR6及Bax表达水平的Western blot检测及分析(**P<0.01)

3 讨论

在ALS的病理进程中,运动神经元丧失的核心驱动因素之一是细胞凋亡^[6]。死亡受体通路的异常活化也能影响凋亡信号,并与内质网应激协同,加剧神经元损伤^[7],DR6已被证明参与了ALS病理过程。相关研究证实,应用Bax或caspase抑制剂阻断关键凋亡分子,可有效延缓SOD1-G93A小鼠疾病进程,靶向凋亡调控对ALS治疗有一定研究价值。

p38是丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)家族成员,磷酸化修饰其苏氨酸与酪氨酸位点可将其激活,p-p38可上调促凋亡蛋白的表达。促凋亡蛋白中的Bax是线粒体凋亡途径核心调控分子。p-p38与Bax之间存在正向调控。ALS模型小鼠脊髓中p-p38和Bax表达升高,共同驱动运动神经元的凋亡进程。

本研究可见ALS小鼠骨骼肌p-p38、Bax、DR6表达均显著高于同窝WT小鼠,与报道的ALS小鼠脊髓中的表达呈现相同趋势。本研究发现ALS小鼠骨骼肌中出现pAkt的显著升高,可能是代偿性的保护。SOD1-G93A转染C2C12细胞也可引起p-p38、Bax、DR6及pAkt的异常激活或过表达,且与ALS模型小鼠呈现相同趋势,这说明骨骼肌内信号转导分子和代谢的异常也参与了ALS的病理进程,SOD1-G93A的骨骼肌细胞模型也可用于ALS的研究。

参考文献

- [1] Feldman EL, Goutman SA, Petri S, et al. Amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Lancet*, 2022, 400(10360): 1363-1380.
- [2] 罗莲莲,袁艳春,王俊岭,等.肌萎缩侧索硬化症小鼠模型研究进展[J/OL]. *实验动物与比较医学*, 1-18[2025-04-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1954.Q.20250314.1353.009.html>.

[3] 周昱君,陈秋宇,孙卓,等.肌萎缩侧索硬化症发病机制及药物研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(02): 201-207.

[4] Helmold BR, Ahrens A, Fitzgerald Z, et al. Spastin and alsin protein interactome analyses begin to reveal key canonical pathways and suggest novel druggable targets[J]. *Neural Regen Res*, 2025, 20(3): 725-739.

[5] 滕展,刘树民,张娜.基于ALS-SOD1G93A小鼠的腓肠肌病理分析探讨健脾通络方对ALS的干预作用[J]. *中医药学报*, 2023, 51(02): 21-26.

[6] Landry C, Costanzo J, Mitne-Neto M, et al. Mitochondrial dysfunction heightens the integrated stress response to drive ALS pathogenesis. *bioRxiv [Preprint]*. 2024 May 14:2024.05.13.594000. doi: 10.1101/2024.05.13.594000. PMID: 38798645; PMCID: PMC11118434.

[7] Huang G, Lee X, Bian Y, et al. Death receptor 6 (DR6) antagonist antibody is neuroprotective in the mouse SOD1G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Dis*. 2013 Oct 10;4(10):e841. doi: 10.1038/cddis.2013.378. PMID: 24113175; PMCID: PMC3824687.

作者简介:

张磊(1981—),女,汉,吉林省吉林市,硕士,副教授,研究方向:医学检验

郭爽(2001—),女,汉,吉林省东丰县,本科,学生,研究方向:临床医学

通讯作者:徐俊杰(1981—),女,汉,吉林省公主岭市,博士,教授,研究方向:辐射损伤防护及神经退行性疾病

基金课题:吉林省教育厅科学研究项目(JJKH20210497KJ)