

利用果蝇模型研究帕金森病的发病机制

梁洁, 罗建红, 金静华 综述

(浙江大学医学院神经生物研究所, 浙江 杭州 310058)

[摘要] 帕金森病(Parkinson's disease PD)是发病率仅次于阿尔兹海默症的一类神经退行性疾病,其基本病理特征是黑质致密区多巴胺(DA)神经元变性伴胞浆内嗜酸性包涵体即Lewy小体形成,导致尾状核、壳核中DA含量减少及黑质纹状体通路破坏。迄今为止,导致多巴胺能神经元退变的原因仍不十分清楚。目前与家族性PD有关的基因位点已经发现了13个,其中鉴定并报道有突变的有6个: α -SYN(PARK1/4)、Parkin(PARK2)、UCHL1(PARK5)、PINK1(PARK6)、DJ-1(PARK7)和LRRK2(PARK8)。果蝇因其遗传学上的优势而被广泛地应用于人类疾病的研究。果蝇神经系统DA的合成与人类类似,同时果蝇的DA系统也参与了运动控制,因此,目前普遍认为,果蝇DA神经元的死亡导致运动功能障碍与PD发病的情况具有可比性。果蝇含有Parkin、PINK1、DJ-1和LRRK2等PD发病相关基因的同源基因,因此它是一种非常重要的PD模型。文中综述了目前以果蝇模型为主要方法研究PD发病机制的最新进展。

[关键词] 帕金森病; 果蝇属; 突变基因; 多巴胺

[中图分类号] R 742.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2013)06-0685-08

Study of Parkinson's disease based on drosophila model

LIANG Jie, LUO Jianhong, JIN Jinghua (Department of Neurobiology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder of the central nervous system, affecting 1 in 50 people over the age of 60 years. PD is the result of loss of a majority of dopamine (DA) neurons in the midbrain substantia nigra. The basic pathological feature of PD is the formation of intracytoplasmic eosinophilic inclusion bodies, Lewy bodies. So far, what leads to DA neuron degeneration is uncertain. Thirteen familial PD related loci have been identified, including six mutations: α -SYN(PARK1/4), Parkin(PARK2), UCHL1(PARK5), PINK1(PARK6), DJ-1(PARK7) and LRRK2(PARK8). Drosophila has been widely used in the study of human diseases because of its genetic advantages. The drosophila DA synthesis is similar to human, and drosophila DA system is also involved in motion control, so it is generally considered that DA neuron death of drosophila can be a perfect model of PD. In this article we review the progress of research methods based on drosophila model

收稿日期:2012-10-15 修回日期:2013-03-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171199)资助项目;浙江省神经精神疾病转化医学科技创新团队基金资助项目(2-206999-11-002)。

作者简介:梁洁(1987-),女,硕士研究生,主要从事帕金森病发病机制研究。

通讯作者:金静华(1975-),女,博士,硕士生导师,主要从事帕金森病发病机制研究;E-mail:jhjin@zju.edu.cn

in study of mechanisms related to Parkinson's disease.

[Key words] Parkinson's disease; *Drosophila*; Mutation; Dopamine

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2013,42(6):685-692.]

果蝇作为一种广泛应用于神经科学领域的模式生物,具有很多优势。首先,它成长周期快速(10~14 d),寿命短暂(50~60 d)。其次,果蝇含有人类疾病相关基因中至少75%同源基因,许多最初在果蝇中鉴定的基因和信号通路,被发现在人类等许多生物也都是保守的。此外,果蝇的一些细胞生理通路中的核心功能组件也是与人类保守的^[1]。相比较以啮齿类动物作为PD模型,果蝇①性状表型丰富。突变类型多,并易于观察如复眼、体色、翅膀形状等;②染色体数目少,其核型只包括4对同源染色体,其中1对为性染色体;③幼虫的唾液腺细胞中含有巨大的多线染色体,利用组织化学的特异性染色法可以准确地观察到DNA和RNA在染色体上的变化,便于研究染色体的重复、缺失、倒位和易位的细胞遗传学特征及其所产生的遗传学效应等。啮齿类动物的寿命要比人类的短得多,因而,尽管啮齿类的这种年龄依赖性的缺点可以通过给予神经毒物或多重转基因的方法来弥补,但是用它们来制作年龄依赖性的疾病模型仍然受到一定的限制。而1988年,研究发现了果蝇基因组中含有P转座子——一段特异的具有转位特性的独立的DNA序列,能够在基因组内对DNA进行剪切和粘贴--使果蝇成为退行性疾病研究的理想模型^[2]。

利用果蝇研究遗传性疾病主要是通过三个相互关联的方法:①在果蝇中错义表达人类疾病基因的野生型或突变型;②在果蝇中过表达或敲除与人类疾病基因同源的果蝇基因;③通过基因筛选的方式,确定一些能够调控1和2表型的增强或抑制。通过使用GAL4/上游激活序列(UAS)系统能够实现这三种方法,控制果蝇目的基因时间特异性和组织特异性的表达^[3]。

PD是发病率仅次于阿尔兹海默病的常见的神经退行性疾病之一,60岁以上的人群中有

1%~2%的人患有此病。PD的主要症状表现为运动障碍:运动徐缓;肌张力增加导致四肢、颈强直及面部缺乏表情;静止性震颤和姿势运动异常。患者还会有一些自主神经功能紊乱和认知能力障碍的表现。

PD主要是由于投射到脑干纹状体黑质的DA神经元的退变所致,引起小胶质细胞的激活增加及残存的DA神经元中蛋白聚集体路易小体(Lewy body)的形成。但是迄今为止,导致DA神经元退变的原因仍不十分清楚。目前与家族性PD有关的基因位点已经发现了13个,其中鉴定并报道有突变的有6个: α -SYN (PARK1/4)、Parkin (PARK2)、UCHL1 (PARK5)、PINK1 (PARK6)、DJ-1 (PARK7)和LRRK2 (PARK8)。此外,还发现 α -SYN、UCHL1、PINK1和LRRK2这4个基因与原发性PD有关。

果蝇神经系统DA的合成与人类类似,同时果蝇的DA系统也参与了运动控制,因此目前普遍认为果蝇DA神经元的死亡导致运动功能障碍与PD发病的情况具有可比性,果蝇也是研究PD的一种理想的模式生物^[4]。在果蝇模型中,已经在进行着 α -SYN (PARK1/4)、Parkin (PARK2)、PINK1 (PARK6)、DJ-1 (PARK7)和LRRK2 (PARK8)等基因的功能研究。

1 α -Synuclein 在果蝇中的研究

α -Synuclein (α -Syn)是PD的病理标志路易小体的主要组成成分^[5]。 α -Syn基因是家族性PD的致病基因之一,还会增加散发性PD的发病风险。错义突变A53T、A30P及 α -Syn基因组重复等都能引发常染色体显性遗传性PD^[6-7]。关于表达 α -Syn的转基因动物模型的研究表明, α -Syn在突触核蛋白病变的发病机制中起着关键作用。果蝇本身不表达 α -Syn,

在果蝇神经元中过表达人的 α -Syn 或突变体 A53T、A30P 蛋白,成功重现了人类 PD 的几个特点:①运动器官功能障碍;②路易小体样包涵体的形成;③随年龄增加的 DA 神经元的死亡,而不对其他类型的神经元产生影响^[8],因此,这一果蝇 PD 模型已经广泛用于由 α -Syn 诱导的神经退行性疾病的分子发病机制的研究。

α -Syn 的异常聚集是 PD 的主要病理特征之一,其中错误折叠的 α -Syn 形成聚集体,在 PD 发病中占有重要地位。在果蝇中过表达缺失 C 端 71~82 位氨基酸(NAC 结构域)的不具备聚集化能力的 α -Syn 后,果蝇无明显 DA 神经元死亡,而过表达聚集化能力增强的截短形式的 α -Syn 后则表现出明显的神经毒性,进一步实验证实可能是由于 NAC 结构域在 α -Syn 的解蛋白过程会由钙蛋白酶-1 介导形成高分子量聚集物——一种 B-片状结构^[9]所致。不溶性纤维状聚集化 α -Syn 的形成也与 PD 发病紧密相关。在果蝇神经元及 DA 神经元中过表达纤维状聚集化 α -Syn 后发现,它并非 PD 运动障碍症状出现的始因,会引发异常睡眠,异常节律周期等非运动型症状,这些非运动型症状在早期神经元功能受损时就已经出现^[10]。

研究发现,组蛋白去乙酰化酶-6(HDAC6)能够以促进 α -Syn 形成包涵体的方式抑制 α -Syn 对神经元的毒性作用。过表达 α -Syn 的果蝇敲除 HDAC6 后观察到 α -Syn 引起的 DA 神经元死亡加剧,HDAC6 突变的果蝇的 DA 神经元中过表达 α -Syn 后相较野生型形成的 α -Syn 的包涵体变少,提示 HDAC6 能够抑制 α -Syn 形成毒性寡聚物,而是形成非毒性的包涵体^[11]。另一个被关注的具有保护 DA 神经元的蛋白质是溶酶体蛋白酶组织蛋白酶 D(CathD),它能够有效地降解 DA 神经元中冗余的 α -Syn,缺失 CathD 会增强 α -Syn 的毒性作用^[12]。

磷酸化在 α -Syn 的寡聚化、纤维化和路易小体的形成中起了非常重要的作用。通过免疫学和生化的方法发现,PD 发病相关的磷酸化位点在 Ser129、Ser87 和 C 端的三个位置(Tyr125、Tyr 133 和 Tyr136)^[13]。在正常的老化过程中,人和果蝇 Tyr125 位点的磷酸化逐渐减少,PD 患者的大脑皮层组织几乎检测不到 Tyr125 磷

酸化,提示 Tyr125 位点的磷酸化能够抑制毒性寡聚体的形成。突触核蛋白病变中 Ser87 的磷酸化增强,也能够抑制 α -Syn 的寡聚化,并影响突触核蛋白与膜蛋白的相互作用。Ser129 的磷酸化会促进 α -Syn 的寡聚体的形成。研究提示,PD 发病相关的 α -Syn 的神经毒性与 Ser87/Tyr125 位点的磷酸化与 Ser129 的失衡相关^[14]。

α -Syn 的聚集化与分子伴侣也密切相关。过表达 α -Syn 的果蝇中过表达 hsp70 后能够改善 DA 神经元的损伤,但不影响包涵体的形成。表达 hsp70 结构域功能缺失的突变体 hsc4. K71S 后,加速了 DA 神经元的死亡。进一步研究发现,hsp90 抑制剂格尔德霉素和热休克转录因子 1 的激活剂,也能诱导 hsp70 的表达而抑制 α -Syn 对神经元的毒性作用^[15]。

2 Parkin 在果蝇中的研究

Parkin 是 parkin 编码的 E3 泛素连接酶,由 N 端的泛素样结构域和 C 端的两个指环状结构域组成的,能够泛素化并降解多种蛋白质,包括 CDCrel-1, parkin 相关内皮素受体样受体(Pael-R),细胞周期素 E, α/β -tubulins, RanBP2, β -amyloid 等。Parkin 基因的突变是目前公认的遗传性帕金森病的最主要原因之一,50% 的家族性早发性 PD 和 2%~6% 的迟发性 PD 的发病都与之相关。Parkin 的突变包括外显子缺失,基因重复以及一些错义突变,最初认为 Parkin 只与隐性 PD 相关,但后来进一步研究发现杂合子 parkin 增加 PD 易感性^[16-17]。

果蝇基因组中包含人类 parkin 的同源基因,敲除 parkin 的果蝇成虫表现出明显的 DA 神经元-特别是前桥背侧(protocolar posterior lateral PPL1)区神经元的死亡,运动能力的损伤,线粒体病变和间接飞行肌的退变,此外其表型还包括寿命缩短、雄性不育、对氧化应激损伤敏感等。在 parkin 敲除的果蝇中过表达调控重金属动态平衡的金属应答转录因子 1(MTF-1)有解毒作用,能够显著的缓解其病理表型,延长了果蝇的寿命,改善了果蝇运动能力,在肌肉细胞水平和线粒体结构也明显改善,这提示在金属代谢过程中 parkin 与 MTF-1 功能上互补,也

提示了 MTF-1 基因多态性能影响帕金森病的严重程度^[18]。在 parkin 敲除的果蝇中发现,当降低真核翻译起始因子 4E (eIF4E) 的活性后能缓解 parkinP23 突变型的雄性不育表型和一些其他缺陷,进一步降低 eIF4E 结合蛋白(4EBP)的水平也有同样的结果,这支持了 parkin 和 eIF4E 是在一个共同通路上的观点^[19]。

PD 发病相关的 Parkin 突变体在果蝇中也有明确的表型。果蝇过表达 parkin 的突变体 R275W 后,也表现出明显的年龄依赖的 PPL1 区 DA 神经元的退变,运动能力下降,并对鱼藤酮引起的氧化应激损伤更敏感,但过表达其另一个突变体 G328E 则无明显改变^[20]。过表达另外两个重要 PD 发病相关的 parkin 的突变体 Gln311Stop (Q311X) 和 Thr240Arg (T240R) 也有典型的病理特征^[21]。在这一 PD 模型中研究发现,过表达或抑制表达调控 DA 代谢平衡的囊泡单胺转运子,对应产生缓解或加剧 parkin 突变体表达引起的症状,提示 parkin 影响胞浆内多巴胺代谢特异性针对 DA 产生毒性作用。

用 RNAi 干扰的方法能够特异性降低 DA 神经元中 parkin 的表达量,但这种干扰效果不足以引起明显的 DA 神经元的死亡。研究显示,parkin 的下游作用物 Pael-R 的异常聚集会引起 DA 神经元的死亡,抑制 parkin 的表达水平会加速 Pael-R 的毒性作用^[22]。

此外,在过表达 α -Syn 的果蝇 PD 模型中过表达 parkin,parkin 能够抑制 α -Syn 对 DA 的毒性作用,但没有明显影响胞浆的 α -Syn 水平,提示了 parkin 在 PD 发病中的保护作用^[23]。

3 PINK1 在果蝇中的研究

PINK1 是一个定位在线粒体的丝氨酸/苏氨酸激酶,对氧化应激诱导的细胞凋亡具有保护作用。PINK1 参与细胞呼吸链的组成,与丝氨酸蛋白酶 HtrA2、parkin 以及分子伴侣 Hsp90 和 CDC37 相互作用^[24]。HtrA2 的同源蛋白参与线粒体质量控制体系,但目前对于 HtrA2 是否参与 PINK1 的降解尚无定论。PINK1 与 parkin 相互作用影响 PINK1 的泛素化和降解。PINK1 能够与 parkin、DJ-1 形成一个功能性 E3

连接酶复合物通过泛素-蛋白酶体系统(UPS),促进降解错误折叠的 parkin 底物。同时,PINK1 与 Hsp90-CDC37 复合物的相互作用改变全长 PINK1 稳定性和 42 kDa 的裂解产物。UPS 严重依赖 ATP,而 PINK1 功能缺失会降低 ATP 水平,UPS 受损,因此积累的错误折叠的蛋白质和泛素化蛋白质通过自噬途径降解^[25]。

果蝇 PINK1 基因编码 721 个氨基酸的多肽与两个特征性基序:一个线粒体定位基序和一个丝氨酸/苏氨酸激酶结构域,与人 PINK1 类似,激酶结构域与人 PINK1 具有 60% 的相似性(42% 完全一致)。果蝇 PINK1 与人 PINK1 同样是定位于线粒体的^[26]。

敲除 PINK1 的果蝇会出现雄性不育,肌细胞变性凋亡,线粒体形态缺陷并增加对应激损伤,包括对氧化应激损伤的敏感性。PINK1 突变体果蝇品系也表现出飞行肌和多巴胺能神经元退变导致运动功能障碍,这些病理变化与 parkin 突变体的表型非常类似。2006 年,研究发现在 PINK1 突变体果蝇中过表达 parkin 后,能够改善其雄性不育肌肉退变等病理表型,反之则无类似效果,而同时突变 PINK1 和 parkin 的表型与单独突变其中一种的表型一致,提示了 PINK1 与 parkin 在同一条通路中,且 PINK1 在 parkin 的上游,它们共同调控线粒体动态和功能^[25]。在果蝇神经元中的研究显示,PINK1 能够招募 parkin 定位至功能障碍的线粒体上促进其降解。PINK1 和 parkin 能够介导线粒体外膜上线粒体融合蛋白(Mfn)的泛素化,敲除 PINK1 或 parkin 导致 Mfn 含量升高伴随线粒体伸长,提示 Mfn 泛素化可能参与标记晚期受损线粒体并通过自噬降解的过程^[27]。

在 PINK1 突变果蝇品系中过表达人 PINK1 能够挽救病理表型,证明人 PINK1 与果蝇 PINK1 在功能上的保守性。电镜下观察到果蝇 Bcl-2 也能够改善 PINK1 突变体的表型。研究发现,通过抑制视萎缩基因 1(OPA1)和 Mfn 的融合线粒体功能,或增强动力蛋白相关蛋白 1(drp1)的线粒体分裂能力,均能改善病理表型,提示 PINK1 引起病变与线粒体功能障碍息息相关^[28]。

利用 RNAi 手段抑制果蝇 PINK1 表达后,

发现了一个 PINK1 下游参与线粒体分裂作用的底物 PGAM5,降低 PGAM5 的表达能够抑制肌肉退变,运动障碍及寿命缩短等表型的发生,而过表达 PGAM5 则加速病变,但 PGAM5 对 parkin 突变型无影响,提示 PGAM5 可能是独立与 parkin 的一条 PINK1 的下游途径^[29]。

4 DJ-1 在果蝇中的研究

DJ-1 基因突变引起常染色体隐性 PD^[30]。DJ-1 基因编码一个小的二聚体单结构域蛋白,定位于胞浆、细胞核和线粒体上,是 ThiJ/PfPI 超家族成员,但又属于一个不同的分支。DJ-1 能够抑制氧化应激损伤,并保护神经元被毒素损伤^[31],迄今 DJ-1 功能的分子机制仍未明确。

果蝇拥有两个人 DJ-1 的同源基因:DJ-1a 和 DJ-1b。其中 DJ-1a 主要表达在睾丸,而 DJ-1b 则广泛存在于大多数组织,与人 DJ-1 表达模式相类似^[32]。

研究发现,用 RNAi 的方法降低全身 DJ-1a 的表达或通过表达 DJ-1b 的突变体抑制 DJ-1b 的功能,均能导致果蝇对百草枯的毒性更加敏感,寿命缩短,运动功能障碍,但这两种全身性抑制 DJ-1 的果蝇中并未表现出 DA 神经元的死亡。而特异性抑制 DJ-1a 在 DA 神经元表达的果蝇表现出氧化应激损伤,线粒体功能障碍和年龄依赖的 DA 神经元死亡,可作为一种果蝇 PD 模型检测神经保护性药物^[33]。Fiona 的研究中却发现,DJ-1b 的突变体果蝇相较于野生型果蝇表现出 DA 神经元更高的存活能力。20 日龄和 40 日龄的两种果蝇 DA 神经元数量无明显差别,而到 60 日龄 DJ-1b 的突变体果蝇 DA 神经元数量较野生型更多。这可能是由于 DJ-1b 功能缺失导致 DJ-1a 代偿性表达上调,表明该果蝇的同源 DJ-1a 在多 DA 神经元的存活和氧化应激反应中发挥关键作用。

目前,对 DJ-1 的关注主要还是在其对氧化应激损伤的调节作用方面。给 DJ-1b 突变果蝇喂食抗 PD 药物和抗氧化剂后发现,抗氧化剂对 DJ-1b 突变果蝇的寿命等表型有所改善,同时发现,果蝇脑中活性氧簇(ROS)的水平升高,过氧化氢酶活性和脂质过氧化水平升高,提示了 DJ-1b 对氧化应激损伤的作用^[34]。

DJ-1a 和 DJ-1b 双敲除的果蝇对谷胱甘肽(GSH)过氧化物酶抑制物的作用更为敏感,生化的证据显示 DJ-1 能与 RNA 底物有相互作用,包括线粒体基因和 GSH 代谢的相关基因,提示 GSH 等 RNA 底物对 DJ-1 的结合也可能是 DJ-1 功能的一条通路^[35]。

DJ-1a 和 DJ-1b 双敲除的果蝇表现年龄依赖的线粒体功能障碍,其表现型与 PINK1, parkin 突变体的表型相似:雄性不育,寿命缩短,运动能力障碍,以及偶联线粒体减少,降低 ATP 水平。进一步研究发现,当上调 DJ-1 的表达时能够改善 PINK1 突变体的表型,而 parkin 的则不能。其中果蝇 DJ-1 的半胱氨酸 C104 (类似于人类 C106)对 DJ-1 的氧化功能至关重要,也提示了在线粒体功能中 DJ-1 也在 PINK1 的下游或与 PINK1 平行^[36]。

5 LRRK2 在果蝇中的研究

人的富含亮氨酸重复激酶 2(LRRK2)的基因突变与家族性和散发性 PD 的发病相关。LRRK2 属于 ROCO 基因家族,ROCO 基因编码多个蛋白结构域的大蛋白,包括一个特有的 GTP 酶结构域,命名为 ROC 和一个功能未知的结构域 COR。LRRK2 还含有 LRR 和 WD40 结构域,在此外还含有一个蛋白激酶域,具有不依赖 GTP 的磷酸化活性^[37]。在众多已经确定的 LRRK2 的突变体中,G2019S^[38]和 G2385R^[39]是最为常见的,其引起发病的机制是改变蛋白激酶的活性。

果蝇 LRRK(CG5483)基因编码一段含有 2 351 个氨基酸的多肽,其中包含高度保守的特征性基序,一个 LRR 结构域,一个 ROC 结构域和一个丝氨酸/苏氨酸激酶结构域。这些基序与人 LRRK2 的基序分别有 38%、46% 和 44% 的相似性,同时 LRRK2 在果蝇成虫脑的表达量很高^[40]。

在果蝇感光器中过表达野生型人 LRRK2 和 LRRK2-G2019S 突变体后会引发视网膜退变,在神经元中过表达野生型人 LRRK2 和 LRRK2-G2019S 突变体导致成虫选择性 DA 神经元死亡,运动功能障碍,寿命缩短,表达突变型所引起的症状更为显著。喂食左旋多巴之后

果蝇能够改善运动损伤的状况,但无法控制 TH 阳性神经元的死亡^[41]。

LRRK2 抑制剂 GW5074 和索拉非尼能够改善 G2019S-LRRK2 引起的神经退行性变,在果蝇中表达一个缺失 C 端激酶活性的 LRRK2 突变体后观察到未表现出 PD 表型,提示增加 LRRK2 激酶活性会增加神经毒性,抑制激酶活性则能够降低神经毒性的影响^[42]。

eIF4E 的结合蛋白(4E-BP)是 eIF4E 翻译的负反馈调节蛋白,也是各种应激反应的一个重要调控介质。果蝇过表达人 LRRK2 和 dLRRK2 都能磷酸化 4E-BP,对氧化应激损伤更敏感,DA 神经元死亡加剧^[43]。

LRRK2 能够直接磷酸化叉头框转录因子(FoxO1)并增强其转录活性。FoxO1 参与控制各种细胞过程:细胞周期、细胞死亡、代谢和氧化应激、调节 4E-BP 的转录。在果蝇模型中发现 LRRK2 会增强 FoxO1 的神经毒性,FoxO1 突变后不被 LRRK2 的磷酸化从而抑制其神经毒性。该结果提示 FoxO1 在 LRRK2 相关 PD 发病中的重要地位^[44]。

此外,有研究提示 LRRK2 与 Parkin、DJ-1 和 PINK1 都有相互作用。在 LRRK2 相关果蝇 PD 模型中过表达 Parkin、DJ-1 和 PINK1 后对 PD 表型都有不同程度的影响^[45]。

6 结 语

在过去的十几年里越来越多的研究组利用无脊椎动物模拟人类退行性疾病,果蝇在研究药物干预、改善疾病中作出了显著的贡献,如揭示了格尔德霉素和分子伴侣能够调控 α -Syn 的毒性等。这些成果表明未来果蝇将继续为研究人类退行性疾病做出贡献。需要指出的是,利用果蝇模型研究 PD 具有局限性,果蝇毕竟是较低等的动物,与人类进化关系较远,果蝇 DA 神经系统的功能也比人类要复杂,因此果蝇模型只能用于前期研究,由它获得的信息可以使用推测相似的人体基因的功能,最终功能的确认还是要依赖于人类亲缘关系较近的模型的验证。

References:

- [1] SHUBIN N, TABIN C, CARROLL S. Fossils, genes and the evolution of animal limbs [J]. **Nature**, 1997, 388: 639-648.
- [2] CASTRO J P, CARARETO C M. Drosophila melanogaster p transposable elements: Mechanisms of transposition and regulation [J]. **Genetica**, 2004, 121: 107-118.
- [3] BRAND A H, PERRIMON N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes [J]. **Development**, 1993, 118: 401-415.
- [4] LUNDELL M J, HIRSH J. Temporal and spatial development of serotonin and dopamine neurons in the drosophila cns [J]. **Dev Biol**, 1994, 165: 385-396.
- [5] SPILLANTINI M G, SCHMIDT M L, LEE V M, et al. Alpha-synuclein in lewy bodies [J]. **Nature**, 1997, 388: 839-840.
- [6] KRUGER R, KUHN W, MULLER T, et al. Ala30pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in parkinson's disease [J]. **Nat Genet**, 1998, 18: 106-108.
- [7] POLYMERPOULOS M H, LAVEDAN C, LEROY E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with parkinson's disease [J]. **Science**, 1997, 276: 2045-2047.
- [8] FEANY M B, BENDER W W. A drosophila model of parkinson's disease [J]. **Nature**, 2000, 404: 394-398.
- [9] KARPINAR D P, BALIJA M B, KUGLER S, et al. Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure increase neurotoxicity in parkinson's disease models [J]. **EMBO J**, 2009, 28: 3256-3268.
- [10] GAJULA BALIJA M B, GRIESINGER C, HERZIG A, et al. Pre-fibrillar alpha-synuclein mutants cause parkinson's disease-like non-motor symptoms in drosophila [J]. **PLoS One**, 2011, 6: e24701.
- [11] DU G, LIU X, CHEN X, et al. Drosophila histone deacetylase 6 protects dopaminergic neurons against α -synuclein toxicity by promoting inclusion formation [J]. **Mol Biol Cell**, 2010, 21: 2128-2137.
- [12] CULLEN V, LINDFORS M, NG J, et al. Cathepsin d expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo [J].
- [1] SHUBIN N, TABIN C, CARROLL S. Fossils, genes

- Mol Brain**,2009,2;5.
- [13] CAVALLARIN N, VICARIO M, NEGRO A. The role of phosphorylation in synucleinopathies: Focus on parkinson's disease [J]. **CNS Neurol Disord Drug Targets**,2010,9;471-481.
- [14] CHEN L, PERIQUET M, WANG X, et al. Tyrosine and serine phosphorylation of alpha-synuclein have opposing effects on neurotoxicity and soluble oligomer formation [J]. **J Clin Invest**,2009,119;3257-3265.
- [15] 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]. **J Biol Chem**,2005,280;14733-14740.
- [16] KITADA T, ASAKAWA S, HATTORI N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism [J]. **Nature**,1998,392;605-608.
- [17] MOORE D J, WEST A B, DAWSON V L, et al. Molecular pathophysiology of parkinson's disease [J]. **Annu Rev Neurosci**,2005,28;57-87.
- [18] SAINI N, GEORGIEV O, SCHAFFNER W. The parkin mutant phenotype in the fly is largely rescued by metal-responsive transcription factor (mtf-1) [J]. **Mol Cell Biol**,2011,31;2151-2161.
- [19] KOH H, CHUNG J. Pink1 and parkin to control mitochondria remodeling. *Anat* [J]. **Cell Biol**,2010,43;179-184.
- [20] WANG C, LU R, OUYANG X, et al. Drosophila overexpressing parkin r275w mutant exhibits dopaminergic neuron degeneration and mitochondrial abnormalities [J]. **J Neurosci**,2007,27;8563-8570.
- [21] SANG T K, CHANG H Y, LAWLESS G M, et al. A drosophila model of mutant human parkin-induced toxicity demonstrates selective loss of dopaminergic neurons and dependence on cellular dopamine [J]. **J Neurosci**,2007,27;981-992.
- [22] YANG Y, NISHIMURA I, IMAI Y, et al. Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by pael-r in drosophila [J]. **Neuron**,2003,37;911-924.
- [23] HAYWOOD A F, STAVELEY B E. MUTANT alpha-synuclein-induced degeneration is reduced by parkin in a fly model of parkinson's disease [J]. **Genome**,2006,49;505-510.
- [24] GANDHI S, MUQIT M M, STANYER L, et al. Pink1 protein in normal human brain and parkinson's disease [J]. **Brain**,2006,129;1720-1731.
- [25] CLARK I E, DODSON M W, JIANG C, et al. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin [J]. **Nature**,2006,441;1162-1166.
- [26] PARK J, LEE S B, LEE S, et al. Mitochondrial dysfunction in drosophila pink1 mutants is complemented by parkin [J]. **Nature**,2006,441;1157-1161.
- [27] ZIVIANI E, TAO R N, WHITWORTH A J. Drosophila parkin requires pink1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**,2010,107;5018-5023.
- [28] LIU S, LU B. Reduction of protein translation and activation of autophagy protect against pink1 pathogenesis in drosophila melanogaster [J]. **PLoS Genet**,2010,6:e1001237.
- [29] IMAI Y, KANAO T, SAWADA T, et al. The loss of pgam5 suppresses the mitochondrial degeneration caused by inactivation of pink1 in drosophila [J]. **PLoS Genet**,2010,6:e1001229.
- [30] BONIFATI V, RIZZU P, VAN BAREN M J, et al. Mutations in the dj-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism [J]. **Science**,2003,299;256-259.
- [31] LIU F, NGUYEN J L, HULLEMAN J D, et al. Mechanisms of dj-1 neuroprotection in a cellular model of parkinson's disease [J]. **J Neurochem**,2008,105;2435-2453.
- [32] MENZIES F M, YENISETTI S C, MIN K T. Roles of drosophila dj-1 in survival of dopaminergic neurons and oxidative stress [J]. **Curr Biol**,2005,15;1578-1582.
- [33] LAVARA-CULEBRAS E, MUNOZ-SORIANO V, GOMEZ-PASTOR R, et al. Effects of pharmacological agents on the lifespan phenotype of drosophila dj-1beta mutants [J]. **Gene**,2010,462;26-33.
- [34] YANG Y, GEHRKE S, HAQUE M E, et al. Inactivation of drosophila dj-1 leads to impairments of oxidative stress response and

- phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2005, 102: 13670-13675.
- [35] VAN DER BRUG M P, BLACKINTON J, CHANDRAN J, et al. Rna binding activity of the recessive parkinsonism protein dj-1 supports involvement in multiple cellular pathways [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2008, 105: 10244-10249.
- [36] HAO L Y, GIASSEN B I, BONINI N M. Dj-1 is critical for mitochondrial function and rescues pink1 loss of function [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2010, 107: 9747-9752.
- [37] TAYLOR J P, MATA I F, FARRER M J. Lrrk2: A common pathway for parkinsonism, pathogenesis and prevention [J]. **Trends Mol Med**, 2006, 12: 76-82.
- [38] LESAGE S, DURR A, TAZIR M, et al. Lrrk2 g2019s as a cause of parkinson's disease in north african arabs [J]. **N Engl J Med**, 2006, 354: 422-423.
- [39] TAN E K, SCHAPIRA A H. Uniting chinese across asia: The lrrk2 gly2385arg risk variant [J]. **Eur J Neurol**, 2008, 15: 203-204.
- [40] LEE S B, KIM W, LEE S, et al. Loss of lrrk2/park8 induces degeneration of dopaminergic neurons in drosophila [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2007, 358: 534-539.
- [41] LIU Z, WANG X, YU Y, et al. A drosophila model for lrrk2-linked parkinsonism [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2008, 105: 2693-2698.
- [42] LIU Z, HAMAMICHI S, LEE B D, et al. Inhibitors of lrrk2 kinase attenuate neurodegeneration and parkinson-like phenotypes in caenorhabditis elegans and drosophila parkinson's disease models [J]. **Hum Mol Genet**, 2011, 20: 3933-3942.
- [43] IMAI Y, GEHRKE S, WANG H Q, et al. Phosphorylation of 4e-bp by lrrk2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in drosophila [J]. **EMBO J**, 2008, 27: 2432-2443.
- [44] KANAO T, VENDEROVA K, PARK D S, et al. Activation of foxo by lrrk2 induces expression of proapoptotic proteins and alters survival of postmitotic dopaminergic neuron in drosophila [J]. **Hum Mol Genet**, 2010, 19: 3747-3758.
- [45] VENDEROVA K, KABBACH G, ABDEL-MESSIH E, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 interacts with parkin, dj-1 and pink-1 in a drosophila melanogaster model of parkinson's disease [J]. **Hum Mol Genet**, 2009, 18: 4390-4404.

[责任编辑 张荣连]

(上接第 670 页)

- [2] ISHIHARA T, TANAKA K, TASAKA Y, et al. Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase against colitis [J]. **J Pharmacol Exp Ther**, 2009, 328 (1): 152-164.
- [3] LIU J, ZHAO T, TAN H, et al. Pharmacokinetic analysis of in vivo disposition of heparin-superoxide dismutase [J]. **Biomed Pharmacother**, 2010, 64 (10): 686-691.
- [4] SINGHA H, MALLICK A I, JANA C, et al. Co-immunization with interleukin-18 enhances the protective efficacy of liposomes encapsulated recombinant Cu-Zn superoxide dismutase protein against Brucella abortus [J]. **Vaccine**, 2011, 29 (29-30): 4720-4727.
- [5] CELIK O, AKBUĞA J. Preparation of superoxide dismutase loaded chitosan microspheres: characterization and release studies [J]. **Eur J Pharm Biopharm**, 2007, 66 (1): 42-47.
- [6] ZHENG C H, LIANG W Q, YU H Y, et al. Evaluation of different methods to determine the loading of proteins in PLGA microspheres [J]. **Pharmazie**, 2004, 59: 232-233.
- [7] LIU Ling, GE Yu, GAO Junjie, et al (刘玲, 葛宇, 高俊杰, 等). Stability of rhCu, Zn-SOD encapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide acid) microspheres [J]. **Chinese Pharmaceutical Journal (中国药学杂志)**, 2003, 38 (3): 190-193. (in Chinese)

[责任编辑 张荣连]