

肌萎缩侧索硬化症小鼠骨骼肌几种细胞凋亡相关信号转导分子的表达变化

张磊 郭爽 徐俊杰^{通讯作者}

吉林医药学院, 吉林, 132013;

摘要: 目的 检测几种细胞凋亡相关信号转导分子在肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 小鼠模型骨骼肌内表达的变化情况。方法 选取携带人 SOD1-G93A 突变基因的 ALS 模型小鼠, 按病程分为无症状期 (30 d)、症状前期 (60 d)、症状期 (90 d) 及症状终末期 (130-150 d) 组, 于出生后相应时间点取后肢腓肠肌, 应用 Western blot 技术检测组织内 p-p38、DR6、Bax、pAkt 表达变化, 分别以相同时间点同窝野生型小鼠 (WT 小鼠) 作为对照组, 采取相同操作进行检测。结果 与 WT 小鼠相比, ALS 小鼠的骨骼肌中, 多种信号转导分子异常激活或过表达, 即使在无症状期, 也呈现出 p38、Bax 的异常激活和 DR6 的过表达。结论 SOD1-G93A 突变可通过持续影响 ALS 小鼠骨骼肌内细胞凋亡信号转导而影响 ALS 的病程进展。

关键词: ALS; SOD1-G93A; 骨骼肌; 信号转导

DOI:10.69979/3029-2808.25.06.049

肌萎缩侧索硬化是一种以大脑皮层、脑干及脊髓运动神经元进行性退变为核心特征的致死性神经退行性疾病, 临床表现为不可逆的肌肉萎缩、运动功能障碍及呼吸衰竭^[1]。其发病机制涉及多通路交互作用, 包括遗传突变、氧化应激损伤、线粒体动力学异常、神经炎症级联反应以及蛋白质稳态失衡等病理过程^[2]。在家族性 ALS 中, 超氧化物歧化酶 1 (SOD1) 基因突变占致病因素的 20%-25%^[3], 其中 SOD1-G93A 突变型转基因“小鼠”模型因可稳定重现人类 ALS 的神经病理表型, 已成为研究该疾病机制的常用动物模型^[4]。

近年来, 针对 SOD1-G93A 模型的研究已深入解析脊髓运动神经元退变的分子基础, 包括神经炎症信号通路的异常活化、凋亡执行蛋白的时序性调控紊乱, 以及突触可塑性相关分子的动态失衡等。然而, 作为神经肌肉接头的功能终端, 骨骼肌在 ALS 发展过程中的作用较少受到关注。有研究提示 SOD1-G93A 小鼠骨骼肌存在 TNF- α 和 IL-1 β ^[5] 表达异常, 但骨骼肌病变与神经元退变的因果关系尚未明确; 另外现有研究较多关注症状显著期 ALS 模型小鼠中各分子的变化, 而对疾病无症状期 (30-60 日龄) 骨骼肌内源性病理机制的探索还较少, 缺乏对疾病全程骨骼肌分子事件的系统追踪。

本研究拟聚焦 SOD1-G93A 模型小鼠骨骼肌中一些与细胞凋亡密切相关的信号转导分子, 重点解析疾病早期阶段至症状显著期不同阶段这些重要信号转导分子的变化, 以揭示骨骼肌自主性病理机制在 ALS 病程中的潜在驱动力, 为靶向神经肌肉交互作用的治疗策略提供理

论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

兔抗鼠 p-p38 抗体及 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 二抗购自 Sigma 公司; 基因组 DNA 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; PVDF 膜购自 millipore 公司; SDS、TEMED、过硫酸铵等电泳用试剂均购自 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 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, 提取基因组 DNA 并进行 PCR 鉴定, 以确定转基因小鼠基因型, 筛选 SOD1-G93A 基因突变小鼠^[6]。留取 SOD1-G93A 显性突变型半合子小鼠用于后续实验, 并将小鼠根据病程分为无症状期、症状前期、症状期及症状终末期, 并按每组 5 只进行分组。选取同窝

的 WT 小鼠作为对照。

1.2.2 疾病早期诊断及症状期划分

无症状期（出生 30 d 左右），无发病表现；症状前期（出生 60 d 左右），几乎无明显发病表现。症状期（出生 90 d 左右），出现体重降低、双下肢弯曲和走路姿势异常等状况。终末期（出生 130-150 d），体重锐减，双下肢丧失行动能力，仰卧 30 秒后无法自主完成翻身动作。

1.2.3 Western blot 检测

小鼠断头处死，取后肢腓肠肌。使用含 PMSF 的 RIPA 裂解液提取各组实验动物腓肠肌组织总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度，取 20 μ g 蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳并转移至 PVDF 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），一抗 4℃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。进行两组数据比较时，先经正态检验和方差齐性检验，再使用 t 检验，3 组以上数据进行比较，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 ALS 转基因小鼠骨骼肌中 p-p38、DR6 和 Bax 表达显著升高

Western blot 结果（图 1）显示，与同窝 WT 小鼠比较，ALS 转基因小鼠后肢腓肠肌中 p-p38、DR6 和 Bax 的表达在 30d、60d、90d 和 130d 均显著升高（图 2-A、B、D）。

2.2 ALS 转基因小鼠骨骼肌中 pAkt（S473）表达变化

Western blot 分析（图 1）显示，与 WT 小鼠相比，ALS 小鼠骨骼肌中 pAkt（S473）的表达在 30d、90d 和 130d 显著升高，而在 60d 无显著差异（图 2B）。

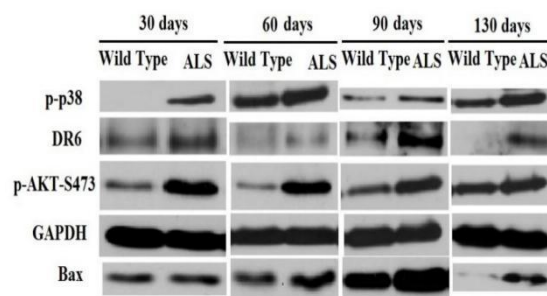


图1 不同日龄 ALS 转基因小鼠及同窝 WT 小鼠骨骼肌中 p-p38、pAkt（S473）、DR6 及 Bax 表达水平的 Western blot 检测

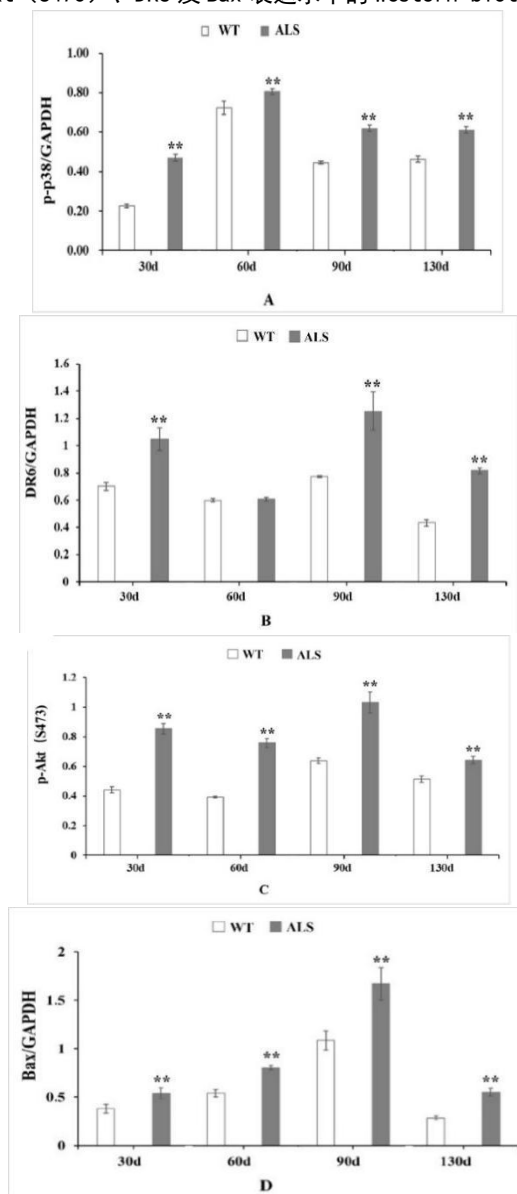


图2 ALS 转基因小鼠及同窝 WT 小鼠骨骼肌中 (A) p-p38 (B) pAkt (C) DR6 (D) Bax 表达水平的统计分析；** $P<0.01$

3 讨论

细胞凋亡是 ALS 中运动神经元退化的核心机制之一。

在 ALS 患者及转基因小鼠模型中, 脊髓运动神经元和周围神经系统的凋亡级联反应显著激活。此外, 死亡受体通路异常激活也可放大凋亡信号, 与内质网应激协同加剧神经元损伤^[7]。研究表明, 抑制凋亡关键分子可延缓 ALS 小鼠的疾病进展, 提示靶向凋亡通路具有潜在治疗价值^[8]。

p38 属于丝裂原活化蛋白激酶家族, 主要被细胞应激信号激活。在 ALS 转基因小鼠脊髓中, 磷酸化 p38 MAPK (p-p38) 的表达显著上调, 其激活与神经炎症和凋亡信号密切相关^[9]。p-p38 可通过调控下游转录因子, 促进促凋亡蛋白的表达。Bax 作为线粒体凋亡通路的关键调控因子, 在 ALS 小鼠脊髓中表达升高^[9]并易位至线粒体膜, 诱导细胞色素 C 释放和 caspase-3 活化。

p-p38 与 Bax 之间存在正向调控关系, p-p38 可通过磷酸化 Bax 增强其促凋亡活性, 而 Bax 的积累又可反馈激活 p38 通路, 两者协同驱动运动神经元凋亡。针对 p-p38/Bax 通路的干预已被证实可减少神经元丢失并延长小鼠生存期, 为 ALS 治疗提供了新方向^[8]。

本研究发现在 ALS 转基因小鼠的骨骼肌中 p-p38 和 Bax 表达均显著高于同窝 WT 小鼠, 这与以往报道的 ALS 小鼠脊髓中 p-p38 和 Bax 的表达呈现了相同的趋势, 而且不仅在症状前期 (60 d)、症状期 (90 d) 及症状终末期 (130-150 d), 即使是无症状期 (30d) p-p38 和 Bax 也呈现了显著的异常升高。DR6 作为肿瘤坏死因子受体超家族成员, 与神经元凋亡相关信号通路相互作用, 可加剧脊髓运动神经元死亡, 已被证明参与了 ALS 病理过程, 在本次研究中发现, 在 ALS 小鼠骨骼肌中也出现了过表达, 且贯穿整个进展过程。pAkt 属于 PI3K-Akt 通路, 由生长因子 (如 IGF-1、EGF) 等信号激活, Akt 通过磷酸化促凋亡蛋白使其失活, 或激活抗凋亡通路, 促进细胞存活。但在本研究中发现在 30d、90d 和 130d 日龄 ALS 小鼠骨骼肌中出现了 pAkt 的显著升高, 可能是代偿性的保护反应。

ALS 转基因小鼠骨骼肌中几种细胞凋亡相关分子的异常表达或激活, 尤其是在无症状期即显示了显著异常, 可能说明 ALS 的病理进程不仅仅是脊髓运动神经元变性的结果, 骨骼肌内信号转导分子和代谢的持续异常也参与了病理进程, 可能为揭示 ALS 的发病机制及开发新型治疗策略提供重要线索。

参考文献

[1] Ilieva H, Vullaganti M, Kwan J. Advances in molecular pathology, diagnosis, and treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ*. 2023 Oct 27;

383:e075037.

[2] 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.

[3] Feldman EL, Goutman SA, Petri S, et al. Amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Lancet*, 2022, 400 (10360): 1363-1380.

[4] 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>.

[5] 李昊, 刘少波, 王绍晔, 等. 肌萎缩侧索硬化症小鼠骨骼肌和脊髓内 TNF- α 、IL-1 β 表达变化[J]. 潍坊医学院学报, 2020, 42 (05): 360-362.

[6] 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.

[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.

[8] Wang W, Wen D, Duan W, et al. Systemic administration of scAAV9-IGF1 extends survival in SOD1G93A ALS mice via inhibiting p38 MAPK and the JNK-mediated apoptosis pathway. *Brain Res Bull*. 2018 May; 139: 203-210.

[9] 孙嫫, 韩敏娟, 李娜, 等. 电针干预对肌萎缩侧索硬化 SOD1 G93A 转基因小鼠脊髓 SOD1、GSH-Px 含量和 Bax、Bcl2 表达的影响[J]. 环球中医药, 2021, 14 (11): 1932-1937.

作者简介: 张磊 (1981.11-), 女, 汉, 吉林省吉林市人, 硕士研究生, 吉林医药学院检验学院, 副教授, 研究方向: 医学检验, 邮编: 132013

郭爽 (2001.09-), 女, 汉, 吉林省东丰县人, 本科, 吉林医药学院, 学生, 研究方向: 临床医学, 邮编: 132013

通讯作者: 徐俊杰 (1981.11-), 女, 汉, 吉林省公主岭市人, 博士、研究生, 吉林医药学院, 教授, 研究方向: 辐射损伤防护及神经退行性疾病, 邮编: 132013

项目来源“项目名称”: ALS 相关突变体 SOD1-G93A 对骨骼肌细胞的作用机制研究 (JJKH20210497KJ)