

α -突触核蛋白对线粒体膜造成孔道样损伤

汪志鹏, 高歌, 段春礼, 杨慧*

(首都医科大学基础医学院神经生物学系; 北京脑重大疾病研究院帕金森病研究所,
教育部神经变性病重点实验室, 北京 100069)

摘要 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)作为第一个发现的帕金森病(Parkinson's disease, PD)致病基因,在PD发生发展过程中具有重要作用。尽管有研究发现, α -syn对线粒体功能有损伤作用,但其对线粒体膜的损害机制尚不明确。本实验旨在探究 α -syn对线粒体膜形态的影响,并找到更加微观的方式观察线粒体膜的变化。Thy-1- α -syn转基因动物与野生型动物相比,线粒体膜电势降低17% ($P < 0.01$),膜通透性增加20.5% ($P < 0.01$),转基因组线粒体细胞色素C释放增多64% ($P < 0.01$),这有可能引起线粒体自噬和细胞凋亡。原子力显微镜结果显示,野生型小鼠脑组织线粒体表面光滑, α -syn转基因小鼠脑组织线粒体表面发现有锯齿状改变,而且在过表达 α -syn的原代神经元线粒体膜表面有许多小凹陷,出现口径60~200 nm,深达20~60 nm的孔道。这可能是 α -syn对线粒体膜造成的孔道样损伤。过表达 α -syn全长组和N端组的原代神经元电镜结果显示,线粒体膜被破坏,并且出现空泡样线粒体和自噬小泡。本研究发现,过表达 α -syn可能在线粒体表面形成孔道样改变, α -syn的N端是引起线粒体膜损伤主要结构域。

关键词 帕金森病; α -突触核蛋白; α -syn N端结构域; 线粒体膜损伤; 原子力显微镜

中图分类号 R34

α -Synuclein Induces Pore-like Impairments of Mitochondrial Membrane

WANG Zhi-Peng, GAO Ge, DUAN Chun-Li, YANG Hui*

(Department of Neurology, School of Basic Science and Medicine, Capital Medical University, Center for Parkinson's Disease,
Beijing Institute for Brain Disorders, Key Laboratory for Neurodegenerative Disease of the Ministry of Education, Beijing 100069, China)

Abstract As the first pathogenic gene of Parkinson's disease (PD), α -synuclein (α -syn) was found to play an important role in the development of PD. Although studies have found that α -syn has damage effect on mitochondria, its mechanism of damage to the mitochondrial membrane is not yet clear. The purpose of this study was to investigate the effect of α -syn on the morphology of the mitochondrial membrane and to find more microscopic observations of mitochondrial membrane changes. The mitochondrial membrane potential was decreased by 17% ($P < 0.01$), and the mPTP opening was increased by 20.5% ($P < 0.01$) in α -syn transgenic animals as compared with the wild type animals. Moreover, the release of mitochondrial cytochrome-C in the transgenic group ($P < 0.01$) was increased by 64%, which might lead to mitophagy and apoptosis. Atomic force microscopy (AFM) showed that the surface of mitochondrial membrane of α -syn transgenic group is unsmooth. After overexpression of α -syn in primary neurons, there are many small pores on the mitochondrial membrane, and the pores with a

收稿日期: 2018-03-09; 修回日期: 2018-05-08; 接受日期: 2018-05-23

国家重点研究发展计划(No. 2016YFC1306000); 国家自然科学基金(No. 81371398, No. 81371200)和北京市自然科学基金(No. 7131001)资助

* 通讯作者 Tel: 010-83950069; E-mail: huiyang@ccmu.edu.cn

Received: March 9, 2018; Revised: May 8, 2018; Accepted: May 23, 2018

Supported by National Key R&D Program of China (No. 2016YFC1306000); National Natural Science Foundation of China (No. 81371398, No. 81371200) and Natural Science Foundation of Beijing (No. 7131001)

* Corresponding author Tel: 010-83950069; E-mail: huiyang@ccmu.edu.cn

diameter of 60-200 nm and a depth of 20-60 nm might be caused by α -syn. The primary neurons overexpressing full-length and N-terminal of α -syn were observed by transmission electron microscope and vacuolar mitochondria and autophagy vesicles were detected, which indicated that the N-terminal of α -syn caused the damage of mitochondria. This study found that overexpression N-terminal of α -syn could induce pore-like damage on the mitochondrial membrane.

Key words Parkinson's disease (PD); α -synuclein (α -syn); N-terminal of α -syn; atomic force microscopy

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是仅次于阿尔兹海默症的第二大神经退行性疾病。PD 主要病理学特征是中脑多巴胺能神经元丢失,在残存的神经元中出现路易体,它的主要成分是 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)^[1,2]。 α -syn 是由 140 个氨基酸组成的蛋白质,其 N 端由 1 ~ 60 位氨基酸残基构成,核心部分的 5 个氨基酸重复序列(KTKEGV)高度保守,可与细胞膜可逆结合,中间部分是高度疏水的 NAC 区(61 ~ 95),含有 2 个 KTKEGV 重复序列,与形成富含 β 片层的淀粉样纤维有关;C-末端(96 ~ 140)含有较多的酸性氨基酸^[3],可抑制 α -syn 纤维的装配并可能使其行使类似分子伴侣的功能。随着病情的发展,路易体从脑干散播到中脑最后遍布整个大脑皮层,帕金森患者主要表现为行动迟缓、肌僵直、静止性震颤和姿势不稳。同时,其他神经调节和神经递质系统也受到影响,导致各种非运动性症状,产生认知能力降低、抑郁、睡眠紊乱、嗅觉障碍、排尿和胃肠道异常等症状^[2]。PD 的发病是多种因素造成的,但主要是年龄、环境因素和基因的改变共同作用造成线粒体功能障碍,最终导致细胞死亡。根据研究发现, α -syn 可以定位于神经元的线粒体上。而且有报道称, α -syn 可以损伤线粒体功能^[4]。在 PD 患者的脑组织中,可见受损的线粒体^[5];但是 α -syn 对线粒体形态的损伤机制尚不清楚。本研究主要观察 α -syn 过表达后对线粒体膜电势和膜通透性的改变^[6]。并使用原子力显微镜观察线粒体膜形态的损伤^[7],原子力显微镜已经普遍用于医学和生物学的研究^[8],特别是观察在微观结构的改变上常有应用。本实验通过观察 α -syn 对线粒体形态造成的改变,或许能为通过保护线粒体完整性从而改善 PD 症状的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

Thy1- α -syn line15 雄性小鼠从美国独立科研机构 The Jackson Laboratory 引进^[9],该品系小鼠会在神经元内过表达 α -syn,取新鲜皮层组织提取线粒

体。线粒体荧光观察使用德国 Leica 公司的 TCS SP5 激光共聚焦显微镜,线粒体结构观察使用日本电子的 JEM-1400PLUS 透射电子显微镜,线粒体膜形态观察使用美国 VEECO 公司的 Nanoscope 3D 原子力扫描探针显微镜。线粒体提取使用 Invent 线粒体分离试剂盒(MP-007);线粒体膜电势检测使用 Sigma 公司 5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-甲基苯并咪唑氢碘化物(JC-1, T4069);线粒体膜通透性检测使用 Invitrogen 公司的线粒体膜通透性转运孔检测试剂盒;原子力显微镜使用云母片购自 EMS 公司。 α -突触核蛋白抗体(#610786, 1:1 000)和细胞色素 C 抗体(#5564333, 1:500)购自 BD Biosciences 公司,VDAC-1 抗体(ab1473),COX-IV 抗体(ab16056)和 β -微管蛋白抗体(ab18207)均购自 Abcam 公司,稀释比例均为 1:1 000,二抗购买自 LI-COR 公司,稀释比例 1:10 000,使用 Odyssey 成像系统进行扫描。

1.2 线粒体提取

(1)根据线粒体提取试剂盒说明书操作,将缓冲液 A 和缓冲液 B 完全解冻后摇匀,放置于冰上。将离心管柱和接收管套管放置于冰上预冷。(2)低速离心(500 ~ 600 g, 5 min)收集 5 ~ 40 $\times 10^6$ 个细胞。(3)用预冷的 PBS 清洗细胞 1 次,弃去上清,加入 250 μ L 缓冲液 A 涡旋震荡重悬细胞。冰上孵育 5 ~ 10 min,涡旋震荡 20 ~ 30 s。将细胞悬液转入离心管柱中,接转步骤 4。对于组织样品,将新鲜组织或冷冻组织(20 ~ 30 mg)放置于离心管柱上。加入 250 μ L 缓冲液 A,用塑料棒反复扭转研磨组织 1 min(如果样品是骨骼肌,在研磨前加入 100 ~ 120 mg 组织分离粉),开盖冰上孵育 5 min,接转步骤 4。(4)14 000 r/min(16 000 g)离心 30 s,弃去离心管柱,涡旋震荡重悬沉淀。(5)涡旋震荡重悬沉淀,3 000 r/min 离心 1 min(沉淀为细胞核),将上清液转移到新的 2.0 mL 离心管中,加入 400 μ L 缓冲液 B,涡旋震荡 10 s 混合溶液。(6)14 000 r/min(16 000 g)离心 10 min。弃去上清液(上清液包含细胞浆和膜蛋白质),加入 200 μ L 缓冲液 B 涡旋震荡 10 s 重悬沉淀。10 000 r/min(7 800 g)离心 5

min(沉淀为比线粒体大的细胞器)。将上清液转移到新的2.0 mL离心管中,加入1.6 mL预冷的PBS,14 000 r/min(16 000 g)离心15 min,弃去上清液(上清为比线粒体小的细胞器),保存沉淀(沉淀为分离出的线粒体)。

1.3 线粒体膜电势检测

取提取后的小鼠脑组织线粒体,用工作浓度为8 mg/mL的JC-1染液在37℃培养箱内孵育10 min。吸取50 μL线粒体悬液,滴加在载玻片上,用盖玻片覆盖,共聚焦显微镜下进行检测,全程避光。图片使用Image J分析结果,每组随机挑取3个视野进行全视野分析。对发荧光的线粒体进行计数,重复3次,分析膜电势正常线粒体(红色荧光)占全部线粒体的比例。

1.4 线粒体膜通透性检测

(1)将提取的脑组织线粒体用HBSS(含 Ca^{2+})重悬,对照组和实验组各2管,都加入1 μL Calcein AM。由于是小分子所以会进入线粒体内,并且发出绿色荧光,在实验组里加入氯化钴淬灭剂,它可使Calcein AM荧光淬灭,但由于分子质量较大无法进入线粒体内,所以线粒体内部的荧光会保留,避光在37℃培养箱内孵育15 min。(2)将4个样品在14 000 r/min离心20 min,用PBS重悬样品,清洗荧光染色液。(3)吸取50 μL样品滴加在载玻片上,用盖玻片覆盖,在共聚焦显微镜下进行观察。(4)将实验结果用Image J软件进行分析。分析方法与膜电势检测相似。

1.5 Western印迹分析α-突触核蛋白和细胞色素C的表达

提取同窝对照组与转基因组小鼠皮层线粒体蛋白与细胞浆蛋白质,并用BCA法测蛋白质浓度。采用SDS-PAGE,半干转方法将蛋白质转印至PVDF膜,脱脂牛奶封闭1 h,孵育抗体(α-突触核蛋白抗体、细胞色素C抗体、VDAC-1抗体、COX-IV抗体、β-微管蛋白抗体),4℃过夜,TBST洗膜3次,孵育相应二抗1 h,TBST洗膜3次,Odysey扫描仪成像。

1.6 线粒体微观形态观察

从动物脑组织及原代神经元提取线粒体后,将线粒体悬液用JC-1染色10 min,在荧光显微镜下观察确认为线粒体后,吸取2 μL涂在干净的云母片上,晾干后用多聚甲醛固定10 min,用超纯水轻冲洗多聚甲醛颗粒,放在烘箱内晾干,使用原子力显微镜观察。使用OTR8-10型号探针检测线粒体,其纵向分辨率为0.1 nm,横向分辨率为2 nm,采用敲击模

式进行检测,扫描范围为2 μm×2 μm,图片分析采用Nanoscope5.31r1软件分析,重建线粒体三维图像,做表面径向分析。

1.7 原代神经元的线粒体电镜形态观察:

培养孕17 d胎鼠的皮层原代神经元。培养第3 d,加入全长α-syn病毒,α-syn N端病毒,病毒空载对照组,第4 d换培养液(24 h后),于第7 d收集神经元。各组原代神经元样品经戊二醛固定后进行包埋切片,观察。

1.8 统计学方法

应用GraphPad prism 6.0软件进行统计学分析处理。数据统计描述以均数±标准误($\bar{x} \pm SEM$)表示,组间比较采用非配对t检验(unpaired t-test), $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 α-突触核蛋白转基因小鼠脑皮层组织线粒体膜电势明显降低

Thy1-α-syn line15小鼠只在神经元内过表达α-syn,表达量可以达到普通野生型小鼠的2倍,是较好的帕金森病模型。从它大脑皮层中提取的线粒体,会受到过表达的α-syn的影响。线粒体膜电势正常时,JC-1会聚集在线粒体膜上,此时显示红色荧光。当线粒体膜电势降低后,JC-1无法聚集,此时单体JC-1显示绿色荧光,在低倍镜视野下可以拍到尽可能多的线粒体。使用Image J统计红色荧光/红色荧光+绿色荧光的比例代表膜电势变化^[10]。结果显示,转基因小鼠脑皮层组织线粒体膜电势与野生型相比,降低17%($n=3$, $P < 0.01$, Fig. 1),说明α-syn可导致线粒体膜电势减低。

2.2 α-突触核蛋白转基因组小鼠脑皮层组织线粒体膜孔开放程度异常增大

正常线粒体膜仅允许小分子通过,有的大分子虽然可以通过线粒体外膜,但是无法通过内膜进入线粒体内部。使用线粒体膜孔检测试剂盒进行检测,如果线粒体膜通透性增大,则线粒体内的Calcein AM会被进入的氯化钴淬灭,反之则不会。用Image J统计,加入淬灭剂后绿色荧光线粒体个数/全部线粒体表示线粒体膜通透性正常的比例。结果显示,转基因组绿色荧光个数比野生型组少20.5%($n=3$, $P < 0.01$)(Fig. 2),说明其线粒体膜通透性与野生型相比明显增大。α-syn过表达会损伤线粒体膜,使大分子通过线粒体内膜进入线粒体或者线粒体内容物流出。

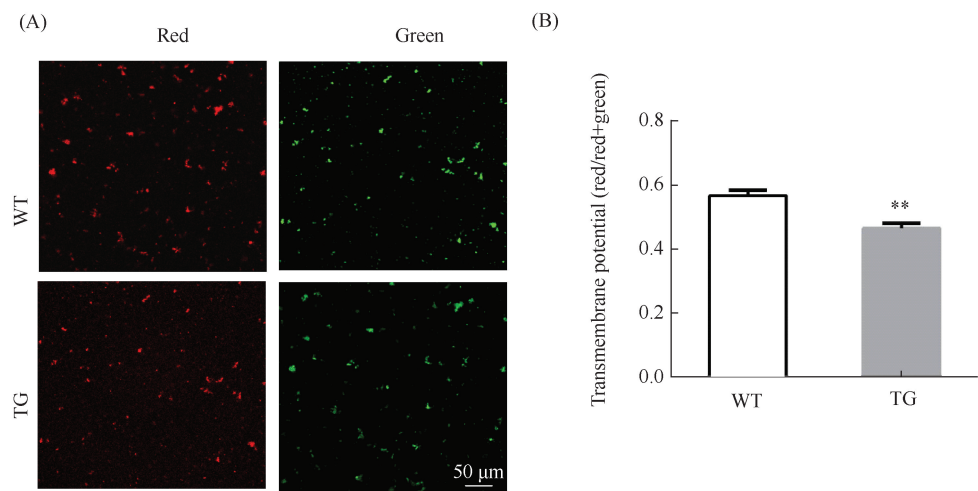


Fig. 1 α -Syn overexpression results in a decrease in mitochondrial membrane potential Mitochondria were isolated from mouse brain cortex tissue, and then incubated with JC-1 (1 μ L) at 37 $^{\circ}$ C for 10 minutes. (A) As the mitochondrial membrane potential was decreased, the fluorescence changed from red to green. (B) Quantitative analysis of mitochondrial membrane potential was shown as the ratio of red mitochondria to all mitochondria. Values were presented as the mean \pm SEM of three independent experiments. Unpaired *t*-test, ** *P* < 0.01, compared with WT group (WT: wild type; TG: α -syn transgenic)

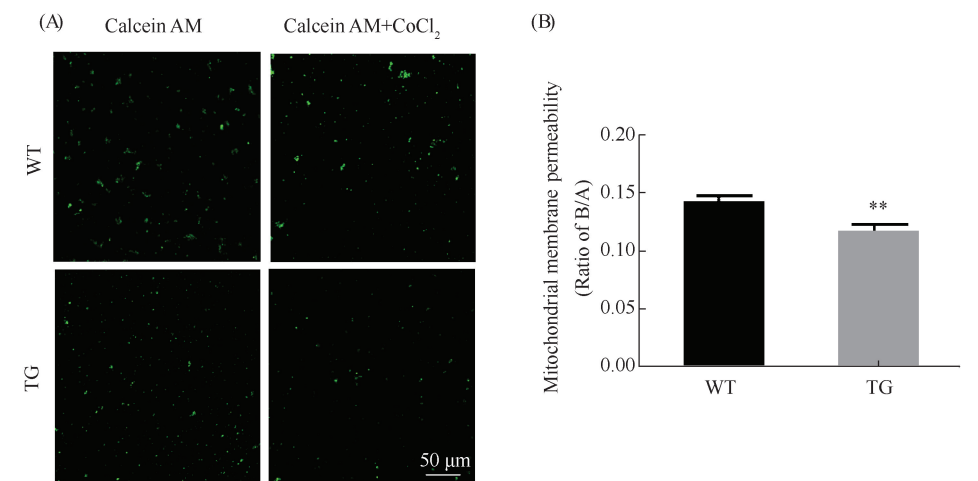


Fig. 2 α -Syn leads to mPTP open abnormally Mitochondria was isolated from mouse brain cortex tissue and incubated with Calcein AM (1 μ L) at 37 $^{\circ}$ C for 15 minutes, which has green fluorescence in the mitochondria endothelium, then CoCl₂ (1 μ L) was added. CoCl₂ could enter the mitochondria to cancel green fluorescence when the mPTP abnormally open (A). Quantitative analysis of mitochondria membrane potential was shown as the ratio of Calcein AM in the group of mitochondria treated with CoCl₂ over the group without CoCl₂ treatment (B). Values are presented as the mean \pm SEM for three independent experiments. Unpaired *t*-test, ** *P* < 0.01, compared with WT group (WT: wild type, TG: α -syn transgenic)

2.3 转基因小鼠脑皮层组织细胞浆蛋白质中细胞色素 C 释放增多

Western 印迹检测发现, α -syn 转基因小鼠脑皮层组织的细胞浆蛋白质中细胞色素 C 增多 64% (*n* = 3, *P* < 0.01) (Fig. 3)。这可能与线粒体膜电势降低以及膜孔开放增大有关, 细胞色素 C 可以通过对凋亡信号的传导和放大促进细胞发生凋亡^[11]。细胞色素 C 的释放机制有多种假说, 包括通过线粒体膜孔开放, 或者与线粒体外膜上的特异性通道有关,

也可能由于线粒体外膜直接受到机械性损伤导致内容物外流。

2.4 转基因组小鼠脑皮层组织线粒体膜表面出现凹陷并伴有孔道数量增多

原子力显微镜可直接观察到线粒体膜表面的变化^[12]。野生型 (WT) 小鼠脑组织表面光滑的线粒体, 使用 Nanoscope 软件分析后发现, 线粒体膜表面未见异常, 形状为长棒状。 α -syn 转基因 (TG) 小鼠脑组织线粒体, 其膜表面出现许多凹陷 (Fig. 4A)。

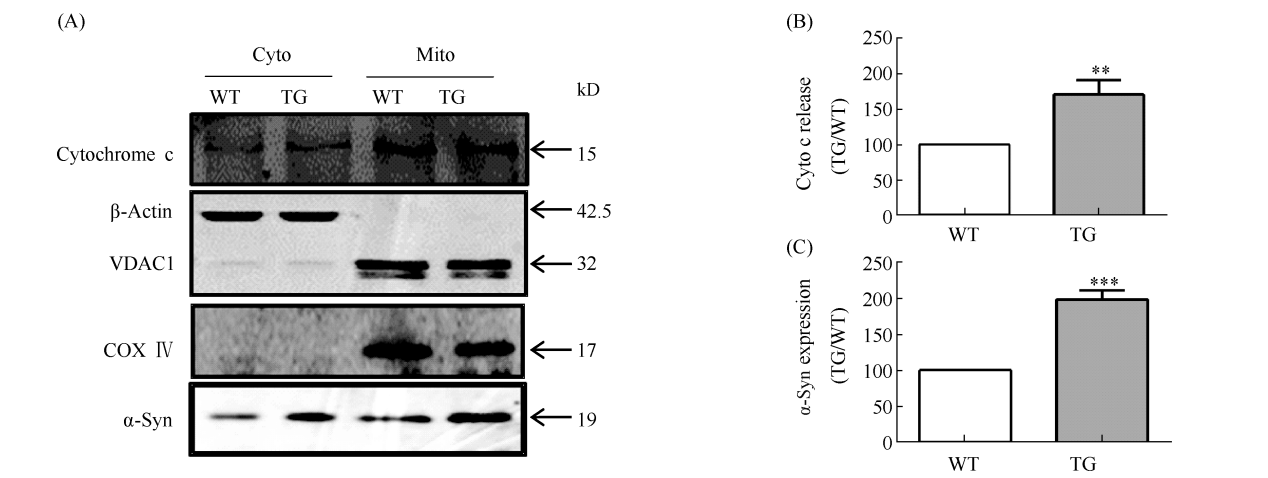


Fig.3 Increased release of Cyto c in α-syn transgenic mice (A) Western blot analysis of Cyto c expression in α-syn transgenic mice. Mitochondria were isolated from mouse cortex tissue, using Invent kit (MP-007), and the proteins in lysates were separated by 12% SDS-PAGE. The COX IV and β-actin were used as loading control. Quantitative analysis of Cyto c release and overexpression of α-syn are shown as the ratio of TG to WT (B, C). Values are presented as the mean ± SEM for three independent experiments. Unpaired *t*-test, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with WT group (WT: wild type, TG: α-syn transgenic)

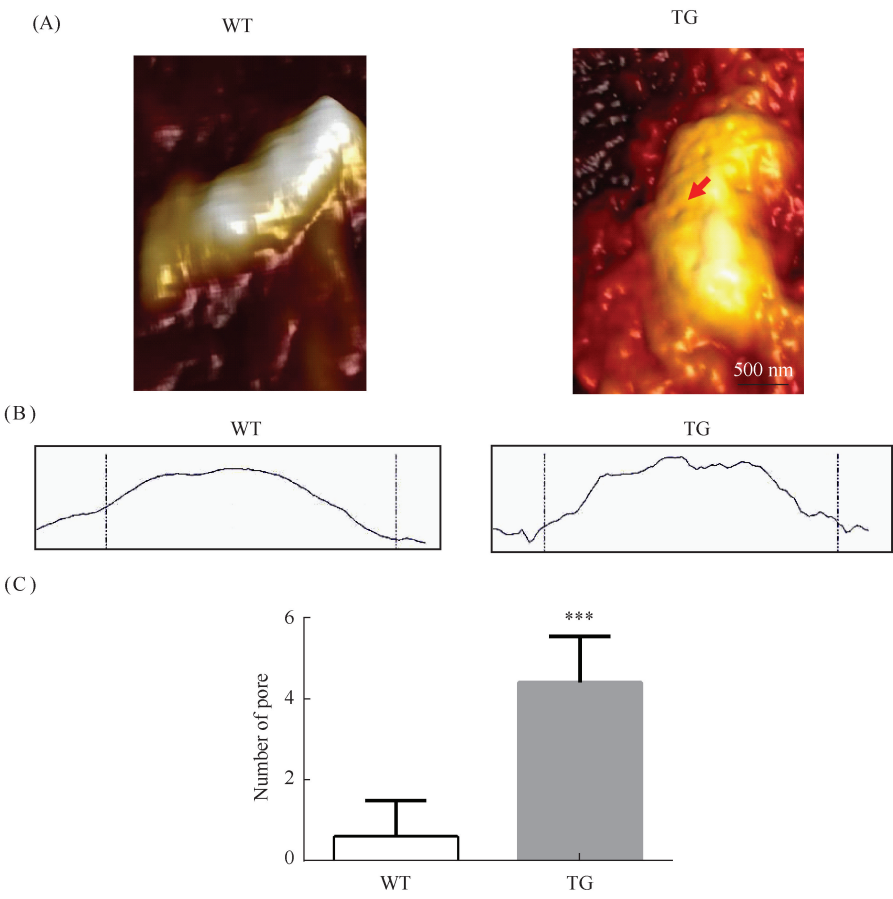


Fig.4 Mitochondria of α-syn transgenic group become swollen with unsmooth surface Mitochondria were isolated from mouse brain and fixed on the mica plate by 4% polyoxymethylene for 10 minutes. (A) AFM was used to scan the mitochondria. (B) The lines of mitochondrial membrane were drawn by nanoscope. (C) The depth more than 10 nm was defined as a pore and the pores were counted in 30 mitochondria of each group. Values are presented as the mean ± SD for three independent experiments. Unpaired *t*-test, *** $P < 0.001$, compared with WT group (WT: wild type, TG: α-syn transgenic)

Nanoscope 软件分析发现,TG 组线粒体膜表面出现锯齿样改变(Fig. 4B),说明线粒体膜不是平滑连续的。线粒体膜不平滑是由于 α -syn 导致线粒体膜的坚固性降低。这些凹陷是 α -syn 损伤线粒体膜后形成的膜孔。将深度大于 10 nm 定义为 1 个孔道。野生型小鼠线粒体表面孔道数量为(0.6 ± 0.4)个,而转基因组线粒体膜单面孔道数为(4.4 ± 0.51)个。

2.5 原代神经元过表达 α -syn 全长及 N 端会导致线粒体出现孔道样变化

α -Syn 的 N 端由 1 ~ 60 位氨基酸残基构成,

核心部分的 5 个氨基酸(KTKEGV)高度重复,可与细胞膜可逆结合^[3]。为了研究是否 α -syn 的 N 端结构域在损伤线粒体过程中发挥重要作用,将携带 α -syn 全长的病毒、 α -syn N 端的病毒以及 α -syn 去 N 端的病毒分别感染原代神经元,7 d 后提取线粒体。利用原子力显微镜观察(Fig. 5)发现,过表达 α -syn 全长及 α -syn 的 N 端组会引起线粒体膜出现孔道样改变。经 nanoscope 分析后发现,线粒体膜表面出现锯齿样改变,膜孔可深达 20 nm,已经贯穿了脂质双层膜结构,而去 N

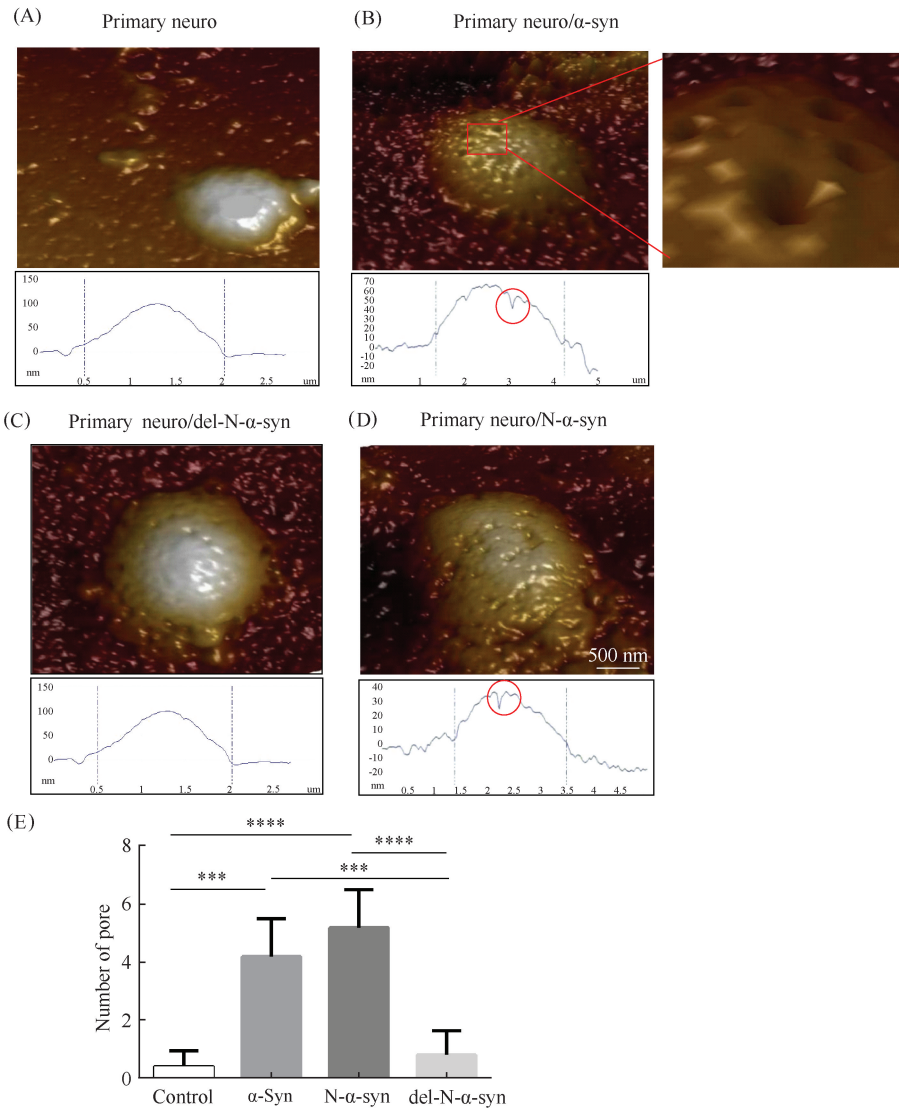


Fig. 5 Overexpression of α -syn and N terminal leads to pore-like damage Mitochondria were isolated from primary neuro cells (A), overexpressed α -syn primary neuro cells (B), or cells overexpressed plasmids of deleted N-terminal of α -syn (C) or N-terminal of α -syn (D) infected with lentivirus. AFM results showed that the N-terminal was the major domain of α -syn in the induction of pore-like damage on the mitochondria. The magnified image and red circles refer to the pore-like damage. Values are presented as the mean \pm SD for three independent experiments. Unpaired *t*-test, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, compared with control group and del-N- α -syn

端组 (Fig. 5D) 和对照组线粒体 (Fig. 5A) 表面平滑, 未见锯齿样改变。经过对每组 10 个线粒体膜孔数量进行统计, 发现过表达 α-syn 组 ((4.2 ± 1.3) 个) 及 α-syn 的 N 端组 ((5.2 ± 1.3) 个) 线粒体膜孔数量明显多于对照组 ((0.4 ± 0.5) 个) (Fig. 5E)。

2.6 原代神经元过表达 α-syn 及 N 端导致线粒体发生自噬

在电镜下观察 (Fig. 6), 正常对照组的线粒体形态正常, 过表达 α-syn 组以及过表达它的 N 端组可见大部分线粒体膜出现破损, 并且发生了空泡样变, 说明 α-syn 的 N 端可以导致线粒体损伤。

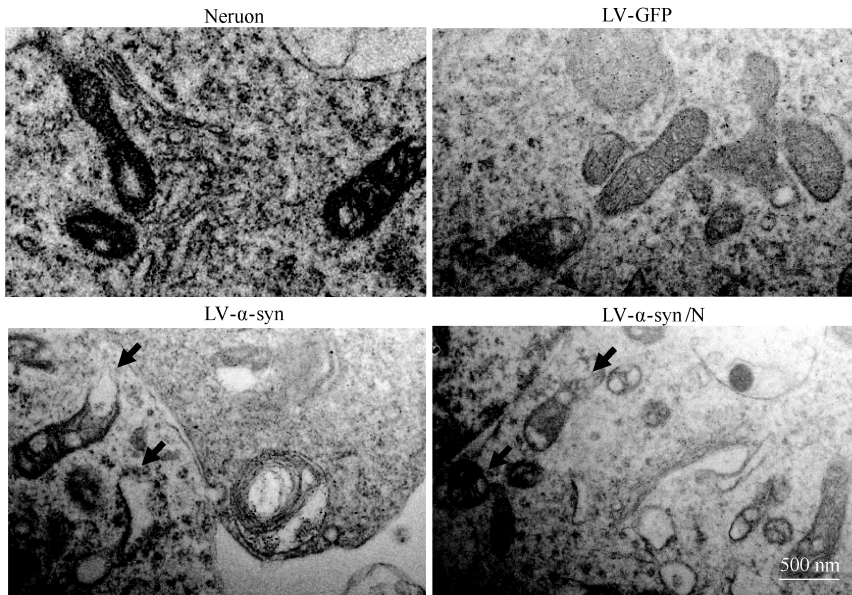


Fig. 6 N-terminal of α-syn leads to the change of mitochondrial shape The primary neuro cells were overexpressed with plasmids of α-syn or N-terminal of α-syn by infection of lentivirus, and then cells were fixed with Glutrral. Representative images scanned by TEM. LV-GFP as a negative control, α-syn and N-terminal of α-syn could induce spongiform of mitochondria (arrow)

3 讨论

α-Syn 不仅对线粒体的功能造成损伤, 也会对线粒体膜的结构造成影响。据文献报道, α-syn 与线粒体共孵育后, 导致线粒体出现膜电势下降、膜通透性增大、线粒体活性减弱、细胞色素 C 释放增多等改变^[21]。本文结果显示, 过表达 α-syn 导致线粒体膜电势降低约 20%, 膜通透性明显增大, 这种膜功能的改变可能是膜的结构发生了改变。有文献报道, α-syn 可损伤线粒体膜的原有结构, 也会使膜的坚固性降低^[14]。本研究使用原子力显微镜, 观察了 α-syn 转基因小鼠脑组织的线粒体, 发现与野生型小鼠的脑组织线粒体相比, 转基因小鼠的线粒体膜发生凹陷, 出现口径约 60 nm, 深约 20 nm 的孔道, 损伤严重的线粒体膜上的孔道已经贯穿脂质双层膜。在统计了线粒体的膜孔数量后, 结果发现与野生型相比, α-syn 转基因小鼠的线粒体膜孔数量明显增多, 而野生型小鼠脑组织线粒体表面光滑平整。我们认为, 从先后顺序上讲, 可能是 α-syn 先导致线粒

体膜出现孔道, 线粒体膜发生膜电势的翻转, 使膜通透性进一步增大。在原子力显微镜结果可见, 线粒体周围有部分细小颗粒, 可能是线粒体内容物流出^[15], 最后引起线粒体自噬甚至是细胞凋亡。鉴于自噬是最后一步, 本文并不认为线粒体孔道样改变是自噬小泡造成的线粒体表面凹陷。当然, 线粒体损伤的根本原因还是年龄增长、基因突变和环境因素相互作用, 导致帕金森病患者的多巴胺能神经元丢失, 并会逐渐出现帕金森病的症状^[16]。α-Syn 的 N 端由 1 ~ 60 位氨基酸组成, 包含 5 个重复序列, 这 5 个重复序列组成易与线粒体膜结合的膜序。本文中设计 N 端和去 N 端的 α-syn; 同时也添加病毒载体组来排除体系的影响。本室前期结果证明, 通过过表达 α-syn 的 N 端结构域和去除 N 端结构域进行比较, 证明了 N 端是 α-syn 发挥线粒体损伤作用的主要结构域。α-Syn 穿孔可能有 2 种机制, 一种是有文献报道的 α-syn 可在人造的生物膜上形成孔道, 故其本身具有穿膜的特性^[17,18]。这种机制说明, α-syn 在线粒体膜上可能是随机穿孔。但是根

据实验结果推测, α -syn 在线粒体膜上产生的孔道大小不一, 说明孔道的产生可能不仅是随机的; 另一种可能的机制是, α -syn 有时也作为细胞膜蛋白质发挥穿膜作用^[14], 而且它的寡聚体形式^[19]毒性要强于单体和纤维状态^[20]。本室前期结果证实, α -syn 的 N 端可与 mPTP 中的电压依赖性阴离子通道蛋白 1 (voltage-dependent anion channel, VDAC1) 发生相互作用^[21], α -syn 的单体和寡聚体与线粒体膜蛋白质相互作用引起膜孔异常开放, 导致出现孔径尺寸不同的孔道, 而 Del-N 则不存在这种相互作用^[21]。本室下一步计划, 准备将线粒体与 α -syn 在体外共孵育, 检测线粒体的膜电势和线粒体功能, 并且在原子力显微镜下进行对膜孔的观察; 或者采用双重免疫金标电镜, 观察 α -syn 的 N 端在线粒体膜上的具体分布情况, 与原子力显微镜结果相结合, 以期对 α -syn 对线粒体膜损伤的特异性提供依据。

参考文献 (References)

- [1] Wong YC, Krainc D. α -synuclein toxicity in neurodegeneration; mechanism and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2017, **23** (2): 1-13
- [2] Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2015, **386**(9996): 896-912
- [3] Kang L, Janowska MK, Moriarty GM, *et al.* Mechanistic insight into the relationship between N-terminal acetylation of alpha-synuclein and fibril formation rates by NMR and fluorescence [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(9): e75018
- [4] Nakamura K. α -Synuclein and mitochondria: partners in crime? [J]. *Neurotherapeutics*, 2013, **10**(3): 391-399
- [5] Tsui L C, Dorfman R. The cystic fibrosis gene: a molecular genetic perspective [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013, **3**(2): a009472
- [6] Bender A, Desplats P, Spencer B, *et al.* TOM40 mediates mitochondrial dysfunction induced by alpha-synuclein accumulation in Parkinson's disease [J]. *PLoS One*, 2013, **8** (4): e62277
- [7] Zhu Y, Duan C, Lu L, *et al.* alpha-Synuclein overexpression impairs mitochondrial function by associating with adenylate translocator [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, **43** (5): 732-741
- [8] Ge G, Zhipeng W, Lu L, *et al.* Morphological analysis of mitochondria for evaluating the toxicity of α -synuclein in transgenic mice and isolated preparations by atomic force microscopy [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, **96**: 1380-1388
- [9] Chesselet MF, Richter F, Zhu C, *et al.* A progressive mouse model of Parkinson's disease: the Thy1-aSyn ("Line 61") mice [J]. *Neurotherapeutics*, 2012, **9**(2): 297-314
- [10] Ghio S, Kamp F, Cauchi R, *et al.* Interaction of α -synuclein with biomembranes in Parkinson's disease--role of cardiolipin [J]. *Prog Lipid Res*, 2016, **61**: 73-82
- [11] Kinnally KW, Peixoto PM, Ryu SY, *et al.* Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, **1813**(4): 616-622
- [12] Lee YJ, Lee GJ, Kang SW, *et al.* Label-free and quantitative evaluation of cytotoxicity based on surface nanostructure and biophysical property of cells utilizing AFM [J]. *Micron*, 2013, **49**: 54-59
- [13] Sarafian TA, Ryan CM, Souda P, *et al.* Impairment of mitochondria in adult mouse brain overexpressing predominantly full-length, N-terminally acetylated human alpha-synuclein [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(5): e63557
- [14] Yu S, Li X, Liu G, *et al.* Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody [J]. *Neuroscience*, 2007, **145** (2): 539-555
- [15] Wang LM, Li QY, Zu YG, *et al.* Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of CPT13, a novel camptothecin analog, on human colon cancer HCT8 cell line [J]. *Chem Biol Interact*, 2008, **176**(2-3): 165-172
- [16] Shinde S, Pasupathy K. Respiratory-chain enzyme activities in isolated mitochondria of lymphocytes from patients with Parkinson's disease: preliminary study [J]. *Neurol India*, 2006, **54**(4): 390-393
- [17] Quist A, Doudevski I, Lin H, *et al.* Amyloid ion channels; a common structural link for protein-misfolding disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**(30): 10427-10432
- [18] Hu R, Diao J, Li J, *et al.* Intrinsic and membrane-facilitated α -synuclein oligomerization revealed by label-free detection through solid-state nanopores [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 20776
- [19] Luth ES, Stavrovskaya IG, Bartels T, *et al.* Soluble, prefibrillar α -synuclein oligomers promote complex I-dependent, Ca^{2+} -induced mitochondrial dysfunction [J]. *J Biol Chem*, 2014, **289** (31): 21490-21507
- [20] Tsigelny IF, Sharikov Y, Wrasidlo W, *et al.* Role of α -synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation [J]. *FEBS J*, 2012, **279**(6): 1000-1013
- [21] Shen J, Du T, Wang X, *et al.* α -Synuclein amino terminus regulates mitochondrial membrane permeability [J]. *Brain Res*, 2014, **1591**: 14-26