

叶酸对肌萎缩性侧索硬化症线虫 TAR DNA 结合蛋白 43 (TDP-43) 毒性的改善作用

杨柳, 程曼, 王梦影, 梁晓珊, 张绪梅

(天津医科大学公共卫生学院, 天津 300070)

摘要: 为探讨叶酸添加对TAR DNA结合蛋白43 (TDP-43) 毒性导致的肌萎缩性侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 治疗方面产生的作用, 本文选用转入人TDP-43的转基因秀丽隐杆线虫作为受试生物, 探究不同浓度叶酸(0.01 mmol/L、0.025 mmol/L、0.05 mmol/L) 干预对线虫的寿命、生殖能力、瘫痪率、头部摆动频率、捕食能力与学习记忆能力的影响。结果显示, 与对照组相比, 0.025 mmol/L组和0.05 mmol/L组线虫寿命分别提高了22.48%和11.92%; 0.025 mmol/L组线虫的生殖能力增加了25.26%; 0.01 mmol/L组和0.025 mmol/L组线虫的瘫痪率分别降低了20.19%与37.62%; 0.025 mmol/L组线虫头部摆动频率在叶酸干预后的第2、4、6 d分别提高了17.14%、32.88%和39.18%; 三个干预组线虫的捕食能力分别提高了24.58%、60.30%和15.85%, 学习记忆能力也分别提高了36.84%、57.89%和31.58%, 上述结果均具有统计学差异 ($p < 0.05$)。而且, 与0.01 mmol/L组和0.05 mmol/L组比较, 0.025 mmol/L组线虫的瘫痪率显著下降, 其他指标均显著增加, 差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。以上结果表明, 叶酸添加改善了ALS线虫中hTDP-43蛋白引起的毒性效应, 并且0.025 mmol/L浓度的叶酸可能是ALS线虫最佳的干预剂量。

关键词: 叶酸; 肌萎缩性侧索硬化症; 秀丽隐杆线虫; TAR DNA 结合蛋白 43

文章编号: 1673-9078(2020)01-28-34

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.1.005

Improvement of Folic Acid on the Toxicity of TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) in Amyotrophic Lateral Sclerosis *Caenorhabditis elegans*

YANG Liu, CHENG Man, WANG Meng-ying, LIANG Xiao-shan, ZHANG Xu-mei

(School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: To investigate the effect of folic acid supplementation on amyotrophic lateral sclerosis (ALS) caused by the toxicity of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43), the transgenic *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) transformed into human TDP-43 was selected as a model organism. The lifespan, reproductive capacity, paralysis rate, head thrash frequency, feeding ability and learning and memory capacity of nematodes were evaluated after exposure to different concentrations of folic acid (0.01 mmol/L, 0.025 mmol/L, 0.05 mmol/L). The results showed that, compared with the control group, the lifespan of the nematodes in the 0.025 mmol/L group and the 0.05 mmol/L group increased by 22.48% and 11.92%, respectively. The reproductive capacity of the 0.025 mmol/L group increased by 25.26%. The paralysis rate of nematodes in 0.01 mmol/L group and 0.025 mmol/L group decreased by 20.19% and 37.62%, respectively. The frequency of head thrash in the 0.025 mmol/L group increased by 17.14%, 32.88% and 39.18% on the 2nd, 4th and 6th day after folic acid intervention, respectively. The feeding ability of the three intervention groups increased by 24.58%, 60.30% and 15.85%, respectively, and the learning and memory ability also increased by 36.84%, 57.89% and 31.58%, respectively. The above data were statistically significant ($p < 0.05$). Compared with the 0.01 mmol/L group and the 0.05 mmol/L group, the paralysis rate of the 0.025 mmol/L group decreased significantly ($p < 0.05$), and other indexes increased significantly ($p < 0.05$). The results showed that folic acid supplementation could improve the toxic effects caused by hTDP-43 protein in ALS nematodes, and folic acid at the concentration of 0.025 mmol/L might be the optimal intervention dose for ALS nematodes.

Key words: folic acid; ALS; *Caenorhabditis elegans*; TDP-43 protein toxicity

收稿日期: 2019-08-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81373003; 81874262)

作者简介: 杨柳(1994-), 女, 硕士生, 研究方向: 营养与神经退行性疾病

通讯作者: 张绪梅(1976-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 营养与神

经退行性疾病

肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种选择性侵犯脑与脊髓的上、下运动神经元的神经系统变性疾病^[1]。ALS发病机制复杂, 由TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)引起的蛋白质毒性是ALS发病机制的一个重要方面。秀丽隐杆线虫以通体透明、

生命周期短、基因与人类基因具有高度同源性等优势成为研究ALS的良好模型^[2],转入人TDP-43的秀丽隐杆线虫,具有与ALS患者相似的“不协调的”表型并有异常的运动神经元突触^[3],故而在本研究中选用转入人TDP-43的转基因秀丽隐杆线虫为模式生物。

叶酸(folic acid, FA)作为一碳物质代谢过程的辅助因子,在保持神经细胞可塑性和维持神经元的完整性方面起重要作用。有学者通过流行病学研究提出,一碳物质代谢紊乱与神经变性疾病及神经精神类疾病有关,如神经管缺陷、阿尔茨海默病和帕金森病及其并发的痴呆或抑郁等心理疾病^[4]。大量的研究显示叶酸能够通过降低神经细胞凋亡,发挥神经保护作用^[5,6]。也有学者经研究证明ALS患者血清叶酸水平降低^[7,8]。同时叶酸单独用药及叶酸和维生素B₁₂联合用药能够显著降低G93A-Sod1 ALS模型小鼠血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)的水平,延缓疾病的发生和延长模型小鼠的生存时间^[9],这说明叶酸在ALS的治疗方面有一定的潜力。

本文用转入人TDP-43的转基因线虫作为模式生物,以线虫的寿命、子代数、瘫痪率、头部摆动频率、捕食能力与学习记忆能力为测量指标,来探索叶酸对ALS线虫中的TDP-43蛋白毒性导致的损伤是否能产生良好效果,为研究叶酸在肌萎缩性侧索硬化症的预防和治疗方面提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 线虫、菌株与药物

转基因线虫hTDP-43由Johns Hopkins University, Dr. Wang惠赠,本实验室保存;大肠杆菌OP50由北京中医药大学线虫评价中心惠赠,本实验室保存;叶酸,纯度为97%,购自美国Sigma公司;碳酸氢钠(NaHCO₃)、氯化钠(NaCl)、琼脂粉、胰蛋白胨、酵母粉、氯化钙(CaCl₂)、硫酸镁(MgSO₄)、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、磷酸氢二钾(K₂HPO₄)等均为分析纯,购自北京浩赛科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 线虫分组

实验以转基因线虫hTDP-43为实验对象,分为对照组(control组)、0.01 mmol/L浓度叶酸添加组、0.025 mmol/L浓度叶酸添加组、0.05 mmol/L浓度叶酸添加组。

1.2.2 线虫培养基以及试剂的配置

(1)线虫生长培养基(Nematode Growth Media,

NGM)的配制参照Brenner等^[10]的方法:称取氯化钠3 g、琼脂粉17 g、胰蛋白胨2.5 g,加入975 mL蒸馏水,高压灭菌后加入1 mol/L CaCl₂、1 mol/L MgSO₄、5 mg/mL胆固醇、以及1 mol/L K₃PO₄缓冲液,混匀后倒入培养皿。

(2)M9缓冲液:称取KH₂PO₄粉末3 g、K₂HPO₄粉末6 g、NaCl粉末5 g于锥形瓶内,加蒸馏水至1 L。高压灭菌后,加入1 mL浓度为1 mol/L的MgSO₄溶液,分装使用。

(3)LB液体培养基:分别称取胰蛋白胨2 g,酵母粉1 g, NaCl粉末1 g加入200 mL蒸馏水,121 °C高压灭菌30 min,冷却后用于摇菌。

(4)叶酸干预组的NGM培养基:叶酸用1%碳酸氢钠溶液溶解,0.22 μm的微孔滤过膜除菌, LB液体培养基中叶酸终浓度分别为0.01、0.025、0.05 mmol/L。将大肠杆菌OP50加入到含有不同浓度叶酸的LB液体培养基中进行摇菌,再将菌液涂布到NGM培养基,对照组的菌液中只含有1%碳酸氢钠。

1.2.3 线虫的培养与同步化^[11]

用4.5 mL M9缓冲液将大量处于产卵期的成虫从NGM固体培养基表面冲洗下来并转移到10 mL EP管中,加入0.25 mL次氯酸钠溶液、0.25 mL浓度为5 mol/L的NaOH上下颠倒混匀裂解5 min,然后3000 r/min离心2 min,弃上清。然后用无菌M9缓冲液反复清洗3次,充分去除裂解液成分,最后将虫卵置于NGM培养基上,于20 °C培养箱中培养。

1.2.4 暴露方法

将同步化后生长至L4期的线虫转移至中央均匀涂布含有1%碳酸氢钠OP50菌液以及含有不同浓度叶酸的OP50菌液的NGM培养基上,测量各项指标,同时进行三次平行试验。

1.2.5 寿命实验^[11]

将L4期野线虫挑至各组培养基,约30条/板,每隔24 h将其挑入新培养基,直至线虫不产卵,才改为隔天转1次板。每隔24 h统计各板线虫的死亡及存活数,从转移当天(寿命实验第0 d)起计算存活天数,直至各组线虫无存活个体。线虫死亡标准为虫体本身丧失运动能力,多次触碰没有反应。剔除标准:①钻入琼脂中;②逃离至皿壁干死;③虫卵在线虫体内不排出,而孵化为幼虫。每组设3个平行板。

1.2.6 子代数测量^[12]

每组挑取L4期秀丽隐杆线虫10条,放置在20 °C的培养箱内培养,在产卵期内每天将线虫转移到新的NGM培养基内,直至线虫生殖能力丧失。含有虫卵的旧平板继续放置在20 °C的培养箱内培养48 h后计数

子代数(本实验以子代线虫数目间接反映线虫的产卵量)。等到线虫的排卵期结束后,计算每条线虫总的子代数。

1.2.7 头部摆动频率测定^[13]

随机挑取不同组别的秀丽隐杆线虫置于含有60 μL M9缓冲液的载玻片上,观察其头部摆动频率。观察前先让秀丽隐杆线虫自由摆动1 min,行为恢复稳定后,在体视显微镜下观察并记录1 min内秀丽隐杆线虫的头部摆动次数,作为头部摆动频率的指标。头部摆动频率的标准为1 min内头部从一侧摆到另一侧再摆回来的次数。每次试验随机挑选10条线虫,重复3次。

1.2.8 瘫痪测定

如果线虫在观察期间未能移动并且在头部周围显示清除细菌的“晕圈”(表明身体运动不足以进入食物),卵堆积在身体附近或者用铂丝轻触线虫头部,如果线虫仅能移动头部不能移动全身,则将线虫评分为瘫痪。每次试验挑选30条线虫,重复3次。

1.2.9 捕食行为能力检测

叶酸添加对线虫摄食行为能力的影响,参考Kohra的方法^[14]。将同步化至L3期的线虫分别加入到含有0.01、0.025、0.05 mmol/L叶酸的NGM板中。暴露培养48 h后,用M9溶液将线虫洗下,1000 r/min离心1 min后,移取约30只线虫在专用NGM培养皿上测试。测试前,事先准备好测试培养皿:在 $\phi 90$ mm中下部设置一起始点,距起始点4 cm竖直方向上涂出半径为1 cm的一个菌落目标圈,并添加1 μL 0.5 mol/L的叠氮钠,使得进入菌面采食的线虫麻醉不能爬出,移取的线虫添加到起始点,8 h后利用显微镜观察目标圈内的线虫数目。每次试验3个平行处理,重复3次。

捕食率=(接触目标圈的线虫数目/测试培养皿中线虫总数) $\times 100\%$

1.2.10 学习记忆行为能力的测定

线虫学习记忆能力的测定采用化学趋向性与饥饿联系起来的一种测定方法,主要参考 Saeki 等^[15]建立的线虫对 NaCl 的趋向性学习测定方法。在含有 5 mmol/L KPO_4 buffer, 1 mmol/L CaCl_2 , 1 mmol/L MgSO_4 , 20 g/L 琼脂粉的测试培养皿上放置一个含 100 mmol/L NaCl 的直径为 5 mm 的圆柱状琼脂块,处理 14~24 h。测试前将该小块除去,在放置小块的中央滴加 1 μL 0.5 mol/L 的叠氮钠。在距离放置 NaCl 小块中央 4 cm 地方也滴加叠氮钠,作为对照区。将暴露处理后的秀丽隐杆线虫在无 NaCl 无大肠杆菌 OP50 培养基上培养 3 h,然后用 M9 缓冲液清洗秀丽隐杆线虫,将其放置在与两叠氮钠液滴等距离的地方(约 3.5 cm),让秀丽隐杆线虫自由运动 45 min。然后分别记录距两

叠氮钠液滴 1.5 cm 范围内的秀丽隐杆线虫数目及测试培养皿上秀丽隐杆线虫的总数,计算化学趋向性指数(CI)。CI按如下方法计算:CI=(处于NaCl区的秀丽隐杆线虫数-对照区的秀丽隐杆线虫数)/测试培养皿上的秀丽隐杆线虫总数。每个测试培养皿上秀丽隐杆线虫总数约为100条,每个处理组设置3个平行。

1.2.11 统计学方法

采用SPSS 25.0软件分析数据,多个不同组别之间的比较使用方差分析(ANOVA),若组间差异有统计学意义,各组间两两比较采用SNK-q检验,各组率间的比较采用 χ^2 检验,生存曲线分析采用Wilcoxon检验,显著水平设定为 $p < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 叶酸添加对hTDP-43线虫寿命的影响

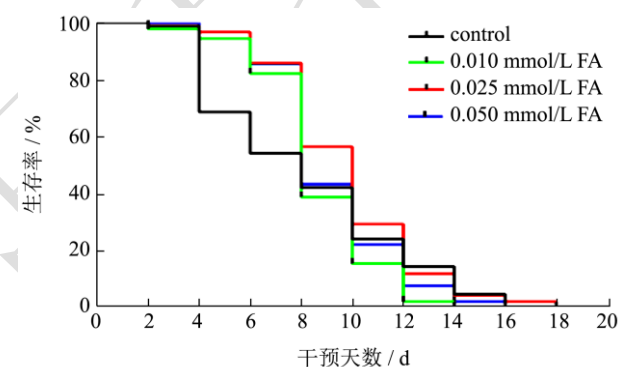


图1 叶酸添加对hTDP-43线虫寿命的影响

Fig.1 Effect of folic acid supplement on the lifespan of hTDP-43 nematodes

不同浓度叶酸添加对hTDP-43线虫的寿命影响如图1所示。根据各组线虫生存率制作生存曲线,对生存曲线进行评估可得,在相对较早时期(4~12 d),0.025 mmol/L组线虫生存曲线持续右移。由统计分析可得,0.025 mmol/L组和0.05 mmol/L组线虫平均寿命与对照组相比差异具有统计学意义($p < 0.05$),平均寿命分别提高了22.48%和11.92%。三个叶酸干预组两两比较可得,与0.01 mmol/L组比较,0.025 mmol/L组的平均寿命提高了15.66%,差异有统计学意义($p < 0.05$)。0.01 mmol/L、0.025 mmol/L组与0.05 mmol/L组相比,寿命无明显变化,尚不能认为差异有统计学意义($p > 0.05$)。综合上述结果,0.025 mmol/L叶酸干预在延长线虫寿命方面效果最佳。Rathor L等^[16]研究发现,用0.01 mmol/L与0.025 mmol/L浓度的叶酸干预 N_2 线虫后,线虫寿命分别提高了17.14%与26.57%,而0.05 mmol/L组的线虫寿命却没有显著延长。而且,相比于用0.01 mmol/L,0.025 mmol/L组的线虫寿命得到了最

大程度的延长,与本研究寿命试验的分析结果相一致。

2.2 叶酸添加对线虫产卵量的影响

线虫寿命延长与生殖能力之间存在一定的关系,有研究显示,线虫寿命延长的同时要以牺牲线虫生殖能力为代价^[17],也有研究表明,某些抗衰老药物干预在延长秀丽隐杆线虫寿命的同时,不影响秀丽隐杆线虫生殖能力^[18,19],但进一步的研究发现,一些药物在延长线虫寿命的同时能提高其生殖能力,如淫羊藿总黄酮^[20]。本文的研究结果如图2所示,当叶酸浓度为0.025 mmol/L时,子代数最多,相比于对照组增加25.26%,且与对照组相比,差异有统计学意义($p < 0.05$)。三个叶酸干预组两两比较可得,与0.01 mmol/L组和0.05 mmol/L组相比,0.025 mmol/L组的子代数分别提高了28.90%和38.97%,且差异有统计学意义($p < 0.05$),0.01 mmol/L组与0.05 mmol/L组的子代数相比,差异无统计学意义($p > 0.05$)。综合上述叶酸对寿命的影响结果分析可得,0.025 mmol/L叶酸在延长线虫寿命的同时提高线虫产卵能力,与蔡外娇^[20]等人的研究结果一致。

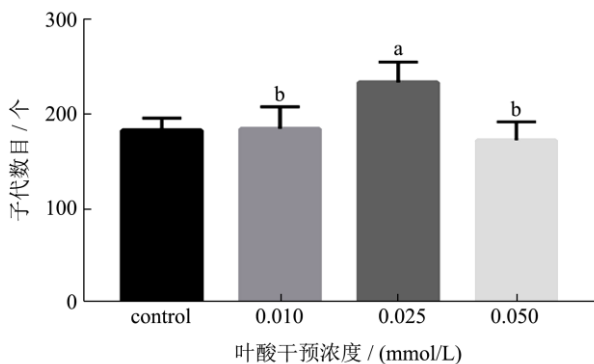


图2 叶酸添加对hTDP-43线虫子代数目的影响

Fig.2 Effect of folic acid supplementation on the number of progeny of hTDP-43 nematodes

注: a 表示与对照组相比有统计学意义, b 表示与 0.025 mmol/L 组相比有统计学意义。

2.3 叶酸添加对线虫头部摆动频率的影响

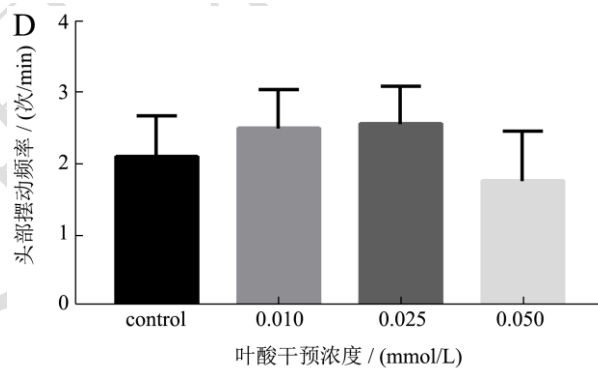
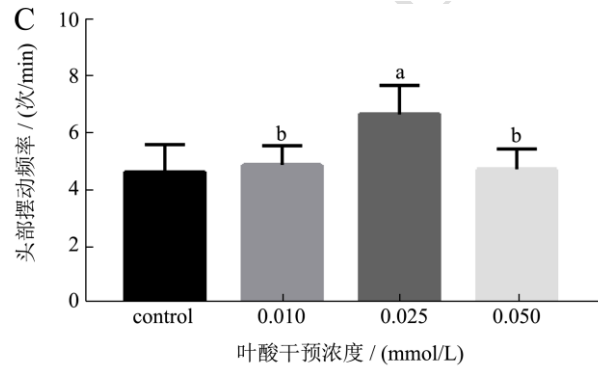
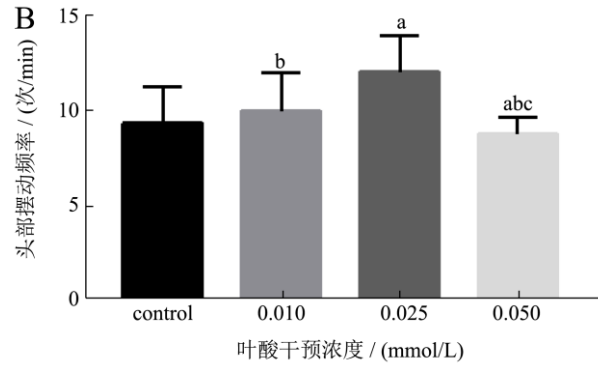
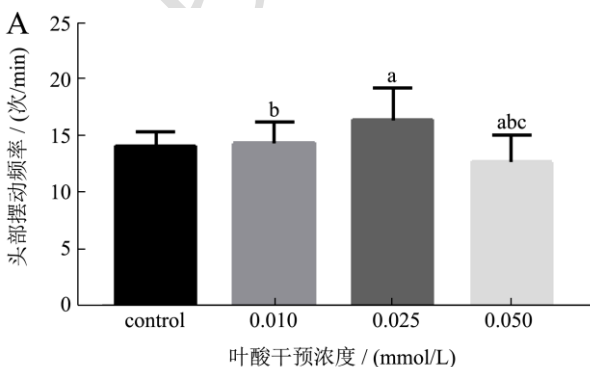


图3 叶酸添加对 hTDP-43 线虫头部摆动频率的影响

Fig.3 Effect of folic acid supplementation on the head thrash frequency of hTDP-43 nematodes

注: a 表示与对照组相比有统计学意义, b 表示与 0.025 mmol/L 组相比有统计学意义, c 表示与 0.01 mmol/L 组相比有统计学意义。A 叶酸干预线虫的第 2 d, B 叶酸干预线虫的第 4 d, C 叶酸干预线虫的第 6 d, D 叶酸干预线虫的第 8 d。

肌萎缩侧索硬化症(ALS)是一种影响运动神经元的神经退行性疾病,头部摆动频率是运动能力的体现,为了探究叶酸添加是否能改善hTDP-43线虫的运动缺陷,用0.01、0.025、0.05 mmol/L浓度叶酸干预hTDP-43线虫,分别于干预第2、4、6、8 d对线虫头部摆动频率进行测量(在第10 d线虫接近完全瘫痪)。结果如图3所示,叶酸干预至第2 d时,与对照组比较,0.01 mmol/L组的头部摆动频率无明显变化,差异无统计学意义($p > 0.05$),0.025 mmol/L组的头部摆动频率增加了17.14%,而0.05 mmol/L组的头部摆动频率却降低了12.85%,差异均有统计学意义($p < 0.05$,图3A)。三个

叶酸干预组两两比较可得,与0.01 mmol/L组和0.05 mmol/L组相比,0.025 mmol/L组的头部摆动频率分别增加了13.89%与34.42%,差异有统计学意义($p < 0.05$),0.01 mmol/L组与0.05 mmol/L组的头部摆动频率也增加了18.03%,差异亦有统计学意义($p < 0.05$)。第4 d的统计结果与第2 d相同(图3B)。在干预至第6 d时,与对照组比较,0.01 mmol/L组和0.05 mmol/L组的头部摆动频率无明显变化,差异无统计学意义($p > 0.05$),0.025 mmol/L组的头部摆动频率增加了39.18%,同时,0.025 mmol/L组线虫头部摆动频率与0.01 mmol/L组和0.05 mmol/L组相比,分别提高了32.30%与36.31%,差异均有统计学意义($p < 0.05$),0.01 mmol/L组和0.05 mmol/L组相比,差异无统计学意义($p > 0.05$) (图3C)。叶酸干预至第8 d时,各组之间均没有统计学差异($p > 0.05$,图3D)。以上结果说明0.025 mmol/L是提高线虫运动能力的最佳浓度。Shi Quan Wong等^[21]研究人员发现,0.025 mmol/L的 α -甲基- α -苯基琥珀酰亚胺提高了TDP-43蛋白病的秀丽隐杆线虫基因模型(A315T)在较大年龄段(5~9 d)的身体弯曲频率,与叶酸对hTDP-43线虫运动行为的实验结果一致,说明叶酸具有改善线虫运动缺陷的作用。

2.4 叶酸添加对hTDP-43线虫瘫痪率的影响

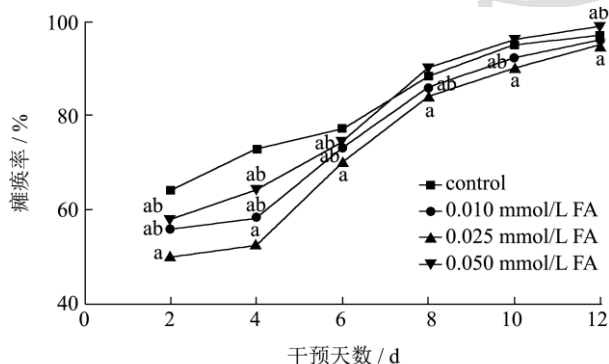


图4 叶酸添加对hTDP-43线虫瘫痪率的影响

Fig.4 Effect of folic acid supplementation on the paralysis rate of hTDP-43 nematodes

TDP-43蛋白表达会导致瘫痪,为了鉴定叶酸是否可以减少神经元蛋白毒性的表达,用0.01、0.025、0.05 mmol/L浓度叶酸干预hTDP-43线虫12 d并分别于第干预第2、4、6、8、10、12 d对线虫瘫痪率进行测量,结果如图4所示。由统计分析可得,与对照组相比,0.01 mmol/L组和0.025 mmol/L组线虫的平均瘫痪率分别降低了20.19%与37.62%,差异有统计学意义($p < 0.05$)。三个叶酸干预组两两比较可得,与0.01 mmol/L组和0.05 mmol/L组比较,0.025 mmol/L组线虫的平均瘫痪率分别下降了22.41%与29.69%,差异有统计学意义

($p < 0.05$),0.01 mmol/L组与0.05 mmol/L组的瘫痪率相比,差异没有统计学意义($p > 0.05$)。Catherine Aaron等人^[22]研究结果表明4%枫糖浆是降低瘫痪率的最佳浓度,本文中,0.025 mmol/L的叶酸浓度是降低线虫瘫痪率的最佳浓度。

2.5 叶酸添加对hTDP-43线虫捕食行为能力的影响

捕食行为受神经系统影响,并且可以快速简易地定量反映神经系统的损伤程度,为了探究叶酸是否对TDP-43蛋白毒性导致的神经变性具有改善作用,对hTDP-43线虫进行了捕食行为能力的检测,结果如图5所示。与对照组比较,三个干预组的线虫捕食率分别提高24.58%、60.30%、15.85%,差异有统计学意义($p < 0.05$)。三个叶酸干预组两两比较可得,0.025 mmol/L线虫的捕食率比0.01 mmol/L和0.05 mmol/L组提高了28.67%和38.81%,差异有统计学意义($p < 0.05$),0.01 mmol/L组与0.05 mmol/L组的捕食率相比,差异无统计学意义($p > 0.05$),所以,0.025 mmol/L叶酸浓度是能够发挥神经保护作用的最佳浓度。

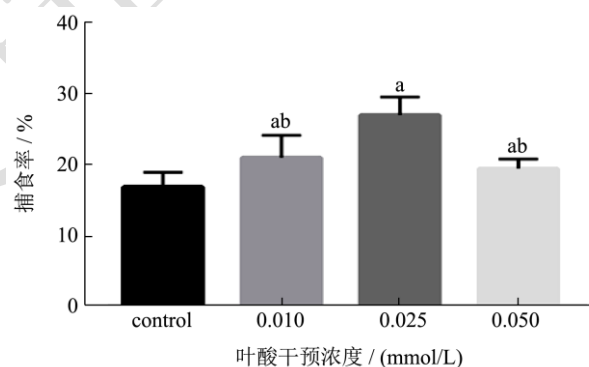


图5 叶酸添加对hTDP-43线虫捕食行为能力的影响

Fig.5 Effect of folic acid supplementation on the feeding ability of hTDP-43 nematodes

注: a表示与对照组相比有统计学意义, b表示与0.025 mmol/L组相比有统计学意义。

2.6 叶酸添加对hTDP-43线虫学习记忆能力的影响

化学趋向性学习模型是基于秀丽隐杆线虫的一种典型的联合性学习行为,在这个测试中,线虫对化学物质的趋向行为是由神经系统调控的一种相对简单的神经可塑性行为。叶酸添加对hTDP-43线虫学习记忆能力的影响通过比较不同组别的化学趋向性指数(CI)来表现。在通常情况下,正常生长的线虫经过无NaCl

无 OP50 培养训练后会表现出对 NaCl 的依赖趋向性,表现出较高的 CI 值。由结果可知,与对照组相比,三个干预组的线虫 CI 值分别提高了 36.84%、57.89% 和 31.58%,并且 0.025 mmol/L 组提高最多,比其他两个干预组分别提高了 13.65% 和 18.35%,差异均有统计学意义($p < 0.05$),表明 0.025 mmol/L 叶酸浓度是提高线虫学习记忆能力的最佳浓度。

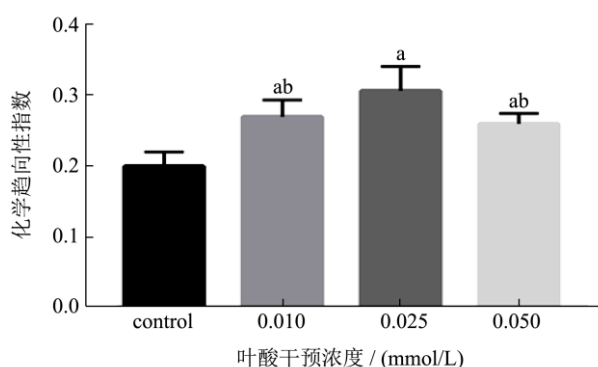


图6 叶酸添加对 hTDP-43 线虫学习记忆能力的影响

Fig.6 Effect of folic acid supplementation on learning and memory ability of hTDP-43 nematodes

注: a 表示与对照组相比有统计学意义, b 表示与 0.025 mmol/L 组相比有统计学意义。

3 结论

3.1 肌萎缩侧索硬化症(ALS)是一种具有遗传基础和病理生理学特征的无法治愈的神经退行性疾病,并且在绝大多数家族性和散发性 ALS 病例中都观察到 TDP-43 蛋白的表达, TDP-43 在细胞质聚集体引起的毒性,对正常细胞质功能产生干扰,从而引起一系列的病理反应^[23]。叶酸是 B 族维生素的一种,与多种神经退行性疾病相关,有研究表明补充叶酸可以延缓阿尔兹海默病和帕金森症的进展^[24,25],并且相关的动物实验证明叶酸对 ALS 疾病模型小鼠具有神经保护作用^[9]。另外在 ALS 患者脑中也发现同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)的增高,而血浆 Hcy 的升高通常伴随着叶酸浓度的降低^[8],这可能是叶酸具有 ALS 保护作用的另一重要间接证据,但叶酸对 ALS 保护作用的机制尚不清楚。本文通过添加叶酸来研究其对 hTDP43 线虫寿命、瘫痪、生殖能力、运动行为和神经行为改变的作用,从而探索叶酸对 ALS 线虫 TDP-43 蛋白毒性的影响。研究结果显示适量浓度的叶酸干预延长 hTDP43 线虫的寿命、降低了瘫痪率、提高了与运动系统和神经系统相关的行为能力,这说明叶酸可能是通过降低 TDP-43 蛋白的毒性而对 ALS 起到保护作用。

3.2 在以前的研究中,Laxmi Rathor 等^[26]已经证实 FA

通过抑制雷帕霉素(mTOR)和胰岛素/胰岛素生长因子 1(IGF-1)信号通路延长了 N₂ 野生型秀丽隐杆线虫的寿命。但是也有研究发现叶酸添加不仅没有延长线虫的寿命,反而导致线虫的提前衰老和死亡^[27],这说明合适的叶酸浓度干预才能对线虫起到积极的作用。在本研究中,我们设置了三个不同剂量的叶酸干预 hTDP43 线虫,从而探索一个防治肌萎缩性侧索硬化症的最佳浓度。0.025 mmol/L 浓度叶酸干预下的 hTDP43 线虫的生存时间最长、产卵能力最强,并且在干预后的第 2、4、6 d 对线虫的头部摆动能力改善起到了良好的效果,线虫的捕食能力与学习记忆能力均有明显提高。综合上述结果,0.025 mmol/L 浓度的叶酸补充对 hTDP43 线虫起到了最好的保护效果。

3.3 本研究显示叶酸干预对 hTDP43 线虫对线虫的寿命、产卵能力、瘫痪率、头部摆动频率、捕食能力、学习记忆能力均产生显著的影响,并且 0.025 mmol/L 浓度的叶酸可能是最佳的干预剂量,为选择叶酸干预线虫的浓度提供了借鉴,另外也为通过分子生物学等手段,继续探索并解析叶酸防治肌萎缩性侧索硬化症的分子生物学机制提供理论基础。

参考文献

- [1] 李玲,银兰,马腾.内外肌萎缩性侧索硬化症发病相关蛋白研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志,2014,31(10):953-955
LI Ling, YIN Lan, MA Teng. Advances in the study of pathogenesis-related proteins in atrophic lateral sclerosis of internal and external muscles [J]. Journal of Apoplexy and Nervous Diseases, 2014, 31(10): 953-955
- [2] 马淑梅,刘莉.秀丽隐杆线虫模型在肌肉萎缩症研究中的应用[J].中国药理学通报,2018,34(4):449-452
MA Shu-mei, LIU Li. Application of *Caenorhabditis elegans* model in the study of muscular atrophy [J]. Chinese Journal of Pharmacology, 2018, 34(4): 449-452
- [3] Ash P E, Zhang Y J, Roberts C M, et al. Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in *C. elegans* [J]. Human Molecular Genetics, 2010, 19(16):3206-3218
- [4] 于诗嘉,于明军,冯娟.叶酸与神经变性疾病相关性研究进展[J]. 实用药物与临床,2017,20(5):603-605
YU Shi-jia, YU Ming-jun, FENG Juan. Advances in research on the relationship between folic acid and neurodegenerative diseases [J]. Practical Drugs and Clinical, 2017, 20(5): 603-605
- [5] Kang W B, Chen Y J, Lu D Y, et al. Folic acid contributes to peripheral nerve injury repair by promoting Schwann cell proliferation, migration, and secretion of nerve growth factor

- [J]. *Neural Regeneration Research*, 2019, 14(1): 132-139
- [6] Zhang C, Shen L. Folic acid in combination with adult neural stem cells for the treatment of spinal cord injury in rats [J]. *International Journal Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8(7): 10471-10480
- [7] Zoccolella S, Simone I L, Lamberti P, et al. Elevated plasma homocysteine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neurology*, 2008, 70(3): 222-225
- [8] 王敏健,杨志华,冉隆梅,等. 肌萎缩侧索硬化与血浆同型半胱氨酸关系的研究[J]. *中国医学创新*, 2008, 5(33): 3-5
WANG Min-jian, YANG Zhi-hua, RAN Long-mei, et al. Relationship between amyotrophic lateral sclerosis and plasma homocysteine [J]. *Medical Innovation in China*, 2008, 5(33): 3-5
- [9] Zhang X, Chen S, Li L, et al. Folic acid protects motor neurons against the increased homocysteine, inflammation and apoptosis in SOD1 G93A transgenic mice [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 54(7): 1112-1119
- [10] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 1974, 77(1): 71-94
- [11] 周兴华,张晓伟,张飞,等. 双酚A对秀丽隐杆线虫的急性毒性作用研究[J]. *现代食品科技*, 2017, 12(34): 1-5
ZHOU Xing-hua, ZHANG Xiao-wei, ZHANG Fei, et al. Acute toxicity of bisphenol A to *Caenorhabditis elegans* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 12(34): 1-5
- [12] 吴超,王慧,张晓伟,等. L-阿拉伯糖促进秀丽隐杆线虫的生长发育及降低脂肪合成[J]. *现代食品科技*, 2018, 12(34): 7-11
WU Chao, WANG Hui, ZHANG Xiao-wei, et al. L-arabinose promotes the growth and development of *Caenorhabditis elegans* and reduces fat synthesis [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 12(34): 7-11
- [13] Tsalik E L, Hobert O. Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal Neurobiology*, 2003, 56(2): 178-197
- [14] Kohra S, Kuwahara K, Takao Y, et al. Effect of bisphenol A on the feeding behavior of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal of Health Science*, 2002, 48(1): 93-95
- [15] Saeki S, Yamamoto M, Iino Y. Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2001, 204(10): 1757-1764
- [16] Rathor L, Akhoun BA, Pandey S, et al. Folic acid supplementation at lower doses increases oxidative stress resistance and longevity in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Age (Dordr)*, 2015, 30(6): 113
- [17] 王艳菊. 葡萄籽原花青素对秀丽隐杆线虫生命周期的影响[D]. 北京: 北京林业大学, 2014
WANF Yan-ju. Effects of grape seed proanthocyanidins on the life cycle of *C. elegans* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014
- [18] Zhang Y, Lv T, Li M, et al. Anti-aging effect of polysaccharide from *Bletilla striata* on nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2015, 11(43): 449-454
- [19] 周澈,林敬明,王素丽,等. 半枝莲总黄酮对延缓秀丽隐杆线虫和人脐静脉内皮细胞衰老的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(6): 821-826
ZHOU Wei, LIN Jing-ming, WANG Su-li, et al. The Effect of total flavonoids of rhizoma branchiaeon delaying the senescence of *Caenorhabditis elegans* and human umbilical vein endothelial cells [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2017, 37(6): 821-826
- [20] 蔡外娇,张新民,黄建华,等. 淫羊藿总黄酮延缓秀丽隐杆线虫衰老的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2008, 28(6): 522-525
CAI Wai-jiao, ZHANG Xin-min, HUANG Jian-hua, et al. Experimental study on the delay of the aging of *C. elegans* by total flavones of epimedium [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2008, 28(6): 522-525
- [21] Shi Quan Wong, Matthew G Pontifex, Marie M Phelan, et al. α -Methyl- α -phenylsuccinimide ameliorates neurodegeneration in a *C. elegans* model of TDP-43 proteinopathy [J]. *Neurobiology of Disease*, 2018, 118: 40-54
- [22] Aaron C, Beaudry G, Parker JA, et al. Maple Syrup Decreases TDP-43 proteotoxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(17): 3338-3344
- [23] Krug L, Chatterjee N, Borges-Monroy R, et al. Retrotransposon activation contributes to neurodegeneration in a *Drosophila* TDP-43 model of ALS [J]. *PLOS Genetics*, 2017, 13(3): e1006635
- [24] Li W, Jiang M, Zhao S, et al. Folic acid inhibits amyloid β -peptide production through modulating DNA methyltransferase activity in N2a-APP cells [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(10): 25002-25013

(下转第 57 页)