

· 帕金森病专题 ·

4-氨基吡啶靶向 TMEM175 调控自噬对帕金森病小鼠的神经保护作用研究

王子豪 夏欢 高美蓉 邓安霞 王晓蓓 杜心雨 杨新玲

830000 乌鲁木齐, 新疆医科大学第二附属医院神经内科(王子豪、夏欢、王晓蓓、杨新玲);
130021 长春, 吉林大学白求恩第二医院中心实验室(高美蓉); 830000 乌鲁木齐, 新疆医科大学第一附属医院省部共建重点实验室(邓安霞); 211166 南京医科大学附属江苏省人民医院神经内科(杜心雨)

通信作者: 杨新玲, Email: yangxinling2014@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2025.05.003

【摘要】目的 探讨4-氨基吡啶(4-AP)作为跨膜蛋白175(TMEM175)抑制剂在帕金森病(PD)小鼠模型中的神经保护作用及自噬调控。**方法** 采用1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(MPTP)诱导的PD小鼠模型, 实验动物为60只C57BL/6系小鼠, 随机分为对照组、MPTP组、4-AP组及4-AP+MPTP组4组, 每组15只。通过行为学检测、分子对接、免疫组化、Western blot、RT-qPCR及ELISA, 评估4-AP对多巴胺神经元、TMEM175表达及自噬水平的影响。**结果** 行为学结果显示, MPTP组小鼠速度为 (5.4 ± 1.1) cm/s, 低于对照组的 (6.8 ± 0.6) cm/s和4-AP+MPTP组的 (6.4 ± 0.9) cm/s, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。MPTP组小鼠的自由活动时间和前肢抓力分别为 (155.1 ± 9.0) s和 (173.8 ± 13.5) g, 分别低于4-AP+MPTP组的 (164.2 ± 9.2) s和 (191.3 ± 16.1) g, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与MPTP组相比, 4-AP+MPTP组的小鼠TMEM175蛋白($P < 0.001$)及mRNA($P < 0.01$)表达下降, TH蛋白($P < 0.05$)及mRNA($P < 0.01$)水平有所提升。在MPTP组中, 自噬标志物LC3A($P < 0.01$)及Beclin-1($P < 0.001$)水平升高, 而在4-AP+MPTP组中表达降低($P < 0.05$)。**结论** 4-AP通过靶向TMEM175通道调节自噬相关蛋白水平, 改善PD模型小鼠的运动功能, 并减少多巴胺神经元丢失。

【关键词】 帕金森病; 4-氨基吡啶; TMEM175; 自噬调控; 小鼠

基金项目: 国家自然科学基金(82371258); 新疆维吾尔自治区重点研发计划项目(2023B03003); 科技创新领军人才项目(2022197449); “新疆地区高发疾病研究”教育部重点实验室开放课题(2024B06)

Neuroprotective effects of 4-aminopyridine-targeted TMEM175 and modulating autophagy in Parkinson disease mice

Wang Zihao, Xia Huan, Gao Meirong, Deng Anxia, Wang Xiaobei, Du Xinyu, Yang Xinling
Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China (Wang ZH, Xia H, Wang XB, Yang XL); Central Laboratory, the Second Norman Bethune Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China (Gao MR); Provincial-Ministry Joint Key Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China (Deng AX); Department of Neurology, Jiangsu Provincial People Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China (Du XY)
Corresponding author: Yang Xinling, Email: yangxinling2014@163.com

【Abstract】Objective To explore the neuroprotective effects and autophagy regulation of 4-aminopyridine (4-AP) as a transmembrane protein 175 (TMEM175) inhibitor in Parkinson disease (PD) mice. **Methods** A 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced PD mouse model was used, involving 60 C57BL/6 mice, which were randomly divided into four groups, including control group, MPTP group, 4-AP group and 4-AP+MPTP group, with 15 mice in each group. The effects of 4-AP on dopamine neurons, TMEM175 expression and autophagy levels were assessed by behavioral testing, molecular docking, immunohistochemistry, Western blot, RT-qPCR and ELISA. **Results** Behavioral analysis showed that the speed of mice in MPTP group was (5.4 ± 1.1) cm/s, which was lower than that of (6.8 ± 0.6) cm/s in control group and (6.4 ± 0.9) cm/s in 4-AP+MPTP group, and the difference was statistically significant (all $P < 0.05$). The free movement time and forelimb grip strength of mice in MPTP group were (155.1 ± 9.0) s and (173.8 ± 13.5) g,

respectively, which were lower than those of 4-AP+MPTP group (164.2 ± 9.2) s and (191.3 ± 16.1) g, respectively, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). Compared with MPTP group, the expression of TMEM175 protein ($P < 0.001$) and mRNA ($P < 0.01$) was decreased, and the levels of TH protein ($P < 0.05$) and mRNA ($P < 0.01$) were elevated in 4-AP+MPTP group of mice, and the differences were statistically significant. The levels of autophagy markers LC3A ($P < 0.01$) and Beclin-1 ($P < 0.001$) were increased in MPTP group, whereas the expression was reduced in 4-AP+MPTP group ($P < 0.05$), and the differences were statistically significant. **Conclusions** 4-AP improves motor function and reduces dopamine neuron loss in PD mice by targeting TMEM175 channels and regulating autophagy-related protein levels.

【Key words】 Parkinson disease; 4-Aminopyridine; TMEM175; Autophagy regulation; Mice

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (82371258); Key Research and Development Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2023B03003); Science and Technology Innovation Leading Talent Project (2022197449); Open Project of Key Laboratory of the Ministry of Education for Research on High-Incidence Diseases in Xinjiang Region (2024B06)

PD 是一种与年龄相关的神经退行性疾病,主要表现为姿势平衡障碍、肌肉强直、静止性震颤和动作迟缓^[1]。PD 的病理特征包括黑质纹状体内多巴胺神经元丢失及 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)异常聚集^[2]。临床上,患者通过服用多巴胺类药物或多巴胺受体激动剂进行治疗,这种疗法虽然能够在一定程度上改善症状,但无法阻止神经元的进一步丢失^[3]。目前,多巴胺能神经元的死亡机制尚未完全明确。遗传学和生物化学研究表明,溶酶体和线粒体功能损伤在 PD 发病机制中起着重要作用^[4]。4-氨基吡啶(4-aminopyridine, 4-AP)是唯一已知的跨膜蛋白 175(transmembrane protein 175, TMEM175)抑制剂和广谱 K 通道抑制剂^[5],并且美国食品和药物管理局批准的一种治疗多发性硬化症的药物^[6]。4-AP 已被证明能够缓解阿扑吗啡诱导 PD 大鼠的旋转行为。研究表明,4-AP 可以改善海马神经元和突触的结构,减少氧化应激,并调节细胞凋亡相关蛋白,从而改善小鼠的认知功能^[7]。在创伤性周围神经损伤小鼠模型中,4-AP 促进了髓鞘再生并增加了轴突面积。此外,4-AP 改善肌萎缩侧索硬化症患者运动神经元的活性和兴奋性,延缓了疾病的进展,提高患者的生活质量^[8]。然而,4-AP 是否具有神经保护作用,尤其是对黑质-纹状体系统的神经退行性变的影响,目前尚不明确。遗传研究表明, TMEM175 基因的某些变异与 PD 的发病风险增加有关^[9]。TMEM175 编码溶酶体 K⁺通道,其功能缺陷会影响溶酶体的酸化过程,导致细胞内环境的稳态失调^[10]。作为目前唯一已知的 TMEM175 抑制剂,4-AP 在 PD 病理机制中的作用值得进一步探索。故本研究探讨 4-AP 对于 PD 小鼠行为学改善及相关机制,为 4-AP 在 PD 中的应用提供参考价值。

一、材料与方法

1. 实验动物:选择 60 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,8 周龄,体重(20 ± 2)g,购自斯贝福北京生物技术

有限公司,生产许可证编号:SCXK(京)2019-0010。小鼠饲养于新疆医科大学实验动物中心,饲养条件为室温 24℃,湿度约 50%,并实行 12 h 明暗交替,提供自由进食和饮水。在适应性饲养小鼠 7 d 后开始实验,期间遵循实验动物使用的 3R 原则,给予人道关怀。本研究已获得新疆医科大学第二附属医院医学伦理委员会(伦理批号:2022K004)审核批准。

2. 主要仪器与试剂:1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP; 批号:23007-85-4,德国 Sigma-Aldrich);兔源抗体酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体(批号:ab137869,英国 Abcam 公司);TMEM175 多克隆抗体(批号:19925-1-AP,武汉三鹰公司);GAPDH 单克隆抗体(批号:60004-1-IG,武汉三鹰公司);HRP 标记羊抗兔二抗(批号:S0001,江苏 Affinity 公司);抗体稀释液(批号:A1810,北京 Solarbio 公司);TBST 缓冲液(批号:BL315B,北京 Biosharp 公司);ECL 化学发光底物(特超敏)(批号:BL520A,北京 Biosharp 公司);彩色预染蛋白 Marker(批号:BL712A,北京 Biosharp 公司);BCA 试剂盒(批号:PC0020,北京 Solarbio 公司);高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液(批号:R0010,北京 Solarbio 公司);5 × Tris-甘氨酸电泳缓冲液(批号:T1070,北京 Solarbio 公司);10 × 电泳转移缓冲液(批号:D1060,北京 Solarbio 公司);脱脂奶粉(批号:1172GR100,德国 BioFroxx 公司);Beclin 1 ELISA 试剂盒(批号:ELK9229,武汉科鹿公司);LC3A ELISA 试剂盒(批号:EM1509,武汉菲恩公司);环保浸蜡脱蜡透明液(批号:BL170A,北京 Biosharp 公司);SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒(批号:BL565B,北京 Biosharp 公司);DAB 显色试剂盒(批号:ZLI-9018,北京中杉金桥公司);兔二步法检测试剂盒(批号:PV-9001,北京中杉金桥公司);封闭用正常羊血清(批号:ZLI-9056,北京中杉金桥公司);PBS-磷酸盐缓冲盐水(10X)(批号:AM9625,美国 Thermo Fisher Scientific

公司); 4%PFA固定液(批号: BL539A, 北京 Biosharp 公司); 引物(上海生工生物工程有限公司); TRIzol™ 试剂(批号: 15596018CN, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(批号: 6210A, 日本 Takara 公司); SYBR Premix Ex Taq(批号: RR390Q, 日本 Takara 公司); 旷场分析系统(批号: DigBehv-002, 上海吉量软件有限公司); 正置荧光拍照显微镜(型号: Eclipse Ci-L, 日本 Nikon 公司); 高速冷冻离心机(型号: 5810R, 德国 Eppendorf 公司); 抓力计(型号: 47200, 意大利 Ugo Basile 公司); 真空恒温干燥箱(型号: DZF-6096, 上海一恒公司); 化学发光分析仪(型号: WD-9423B, 北京 LIUYI 公司); 电泳仪(型号: BR90518, 美国 Bio-rad 公司); 电子天平(批号: BS224S, 德国 Sartorius 公司); 超纯水纯化系统(美国 Milipore 公司)。

3. 实验分组及处理: 小鼠随机分为对照组、MPTP 组、4-AP 组、4-AP+MPTP 组, 各 15 只。适应性饲养 1 周后, MPTP 组小鼠每日腹腔注射 25 mg/kg 的 MPTP, 连续 5 d; 对照组小鼠每日腹腔注射等体积的 0.9% 氯化钠溶液; 4-AP 组小鼠每天腹腔注射 1 mg/kg 4-AP, 连续 5 d; 4-AP+MPTP 组小鼠每日注射 1 mg/kg 的 4-AP 和 25 mg/kg 的 MPTP, 连续 5 d, 在注射 MPTP 前 30 min 先注射 4-AP。小鼠实验设计流程见图 1。当小鼠出现明显的运动能力下降、自主活动减少、步态不稳及震颤等症状, 提示 PD 模型制备成功。

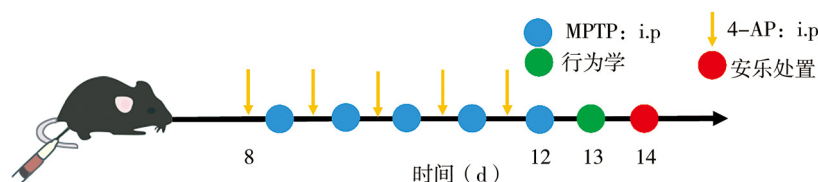
4. 小鼠行为学检测: 药物处理完成后, 采用旷场实验评估小鼠行为学变化, 实验装置为 50 cm × 30 cm × 20 cm 的旷场实验箱, 将小鼠置于箱角, 记录其在 5 min 内的运动功能变化, 主要评估指标为总行走路程(cm) 和中央区域行走路程(cm)。使用抓力计测量小鼠四肢抓力(g), 每只小鼠测试 3 次, 取平均值。

5. TMEM175 与 4-AP 的对接结合力实验: 从 RCSB 蛋白数据库(<http://www.rcsb.org>)下载 TMEM175 的三维结构, 在 AutoDock 中进行配置: 去除水分子、添加氢原子, 并将其设为受体。从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)下载 4-AP 的结构

文件, 使用 OpenBabelGUI 将 SDF 格式转换为 PDB 格式。将受体和配体的 PDBQT 文件导入 AutoDock, 定义分子对接的范围。以目标蛋白的结构为中心, 调整对接的中心坐标(center x/y/z) 和网格盒子的尺寸(size x/y/z), 确保蛋白质完全包含在对接盒内。在 AutoDock Vina 中, 设置对接参数, 完成分子对接并计算最小结合能, 使用 PyMol 2.5 和 Discovery Studio 2019 对复合物的 PDB 文件进行可视化。

6. 免疫组化染色: 在处理脑黑质致密部的石蜡切片时, 首先进行脱蜡至水, 随后通过柠檬酸钠高压进行抗原修复, 并用 TBS+Triton 透化 30 min。使用内源性过氧化物酶阻断剂, 并在 5% BSA 封闭后, 用 TBS+Triton 洗涤。滴加 TH 兔单克隆抗体(1 : 300), 在 4℃ 湿盒中孵育 12 h, 随后进行洗涤并加入反应增强液。再次洗涤后, 滴加山羊抗兔生物素化二抗, 在室温下孵育 1 h, 洗涤并使用 DAB 显色。切片经过脱水并用中性树胶封片, 在显微镜下观察结果。

7. Western blot 实验: 使用 1% 戊巴比妥钠对各组小鼠($n=3$) 进行腹腔注射麻醉, 待小鼠完全失去反应后, 处死并迅速取出中脑区域的黑质组织。黑质组织取出后立即置于 -80℃ 冰箱中保存备用。进行蛋白提取时, 将冷冻保存的黑质组织加入含有 1% PMSF 的 RIPA 裂解液中, 裂解后的样本静置 30 min, 并间隔性振荡。提取的蛋白裂解液 12 000 r/min 高速离心, 持续时间为 20 min。采用 BCA 法进行定量分析, 向样本中加入 5 × Loading Buffer, 并使用 PBS 稀释以确保每组样本的蛋白浓度一致。将样本在水浴锅中煮沸 10 min, 使蛋白充分变性, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳过程中每组样本上样量为 10 μg。蛋白分离完成后, 将蛋白从凝胶转移至 PVDF 膜上。转膜后, 将 PVDF 膜置于含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中, 在室温下封闭 2 h, 以阻断非特异性结合位点。加入适当稀释的一抗: TH(1 : 1 000)、TMEM175(1 : 1 000) 并在 4℃ 摇床上孵育过夜。次日, 将抗体孵育盒从 4℃ 取出, 置于室温下复温 30 min 后, 用 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 15 min。加入与一抗对应的二抗, 在室温下孵育 1 h, 再次用 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 15 min。完成洗膜后, 在 PVDF 膜上



注: MPTP 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶; 4-AP 4-氨基吡啶; i.p 腹腔注射

图1 小鼠实验设计流程

滴加 ECL 化学发光底物, 并使用化学发光成像系统对膜上的条带进行成像。

8. RNA 提取、逆转录 PCR 和实时定量: RT-PCR 按照制造商的说明, 使用 TRIzol™ 试剂提取小鼠黑质总 RNA。采用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 将总 RNA 逆转录为 cDNA, 逆转录程序为 37℃ 60 min, 然后 85℃ 5 s。qPCR 使用 SYBR Premix Ex Taq 进行, 热循环条件为: 95℃ 初始变性 2 min; 接着进行 40 个循环的 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火和延伸 60 s, 最后 95℃ 再变性 15 s。加热至 94℃ 2 min 后, 在 10 μl 反应体积中进行 32 个循环, 包括 94℃ 30 s、61℃ 30 s 和 72℃ 30 s。相对基因表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 方法计算。引物序列为: TH 正向引物: 5'-AGCCCTACCAAGACCAGACG-3', 反向引物: 5'-CACCTAGCCAATGGCACTCA-3'; TMEM175 正向引物: 5'-GCTATGCCTTCCACTTCCACATC-3', 反向引物: 5'-AAAGACAGCCGCAACAAAACACAG-3'; GAPDH 正向引物: 5'-CAAGGCTGTGGGCAAGGTCATC-3', 反向引物: 5'-TCTCCAGGCGGCACGTCAG-3'。

9. ELISA 自噬水平检测: 将各组小鼠脑黑质样本($n=6$)进行适当稀释后, 采用酶联免疫吸附法测定其 LC3A 和 Beclin-1 的含量, 实验步骤严格按照试剂盒说明书进行操作。为确保结果的准确性和可靠性, 实验重复 3 次。最终, 通过标准曲线计算小鼠脑黑质 LC3A 及 Beclin-1 的浓度。

10. 统计学方法: 采用 R 4.1.0 和 SPSS 19.0 进行统计分析。采用 GraphPad Prism 7.0 软件绘图。通过 Shapiro-Wilk 检验评估数据正态性, 方差齐性通过 Levene 检验检测; 对于不满足正态分布的数据, 方差齐性检验选择 Brown-Forsythe 检验以增强稳健性。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 方差齐的计量资料组间比较采用独立样本 t 检验; 方差不齐的计量资料组间比较采用 Welch 方差分析, 并结合 Games-Howell 检验进行组间差异分析。非正态分布的计量资料以中位数和四分位数 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。分子对接实验中, 4-AP 与 TMEM175 的结合能通过 AutoDock Vina 软件计算。此外, 结合 PyMol 和 Discovery Studio 软件对分子对接结果进行可视化分析。双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 各组小鼠行为学检测结果: 旷场实验结果显示, MPTP 组小鼠的速度为 (5.4 ± 1.1) cm/s, 低于对照组的 (6.8 ± 0.6) cm/s 和 4-AP 组的 (6.8 ± 0.8) cm/s, 差

异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。在 4-AP+MPTP 组中, 小鼠的速度为 (6.4 ± 0.9) cm/s。对照组小鼠的自由活动时间为 (168.2 ± 6.4) s, 4-AP 组小鼠的自由活动时间为 (167.9 ± 6.8) s, 4-AP+MPTP 组小鼠的自由活动时间为 (164.2 ± 9.2) s, 均长于 MPTP 组小鼠的自由活动时间 (155.1 ± 9.0) s, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。总路程数据显示, MPTP 组小鼠的活动量为 $(1\ 173 \pm 75.5)$ cm, 低于对照组的 $(1\ 241 \pm 46.0)$ cm 和 4-AP 组的 (1241 ± 40.8) cm(均 $P < 0.05$)。前肢抓力测试结果表明, MPTP 组小鼠的抓力为 (173.8 ± 13.5) g, 低于对照组的 (201.9 ± 16.2) g 和 4-AP+MPTP 组的 (191.3 ± 16.1) g, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 1。

2. TMEM175 与 4-AP 分子对接: 4-AP 与 TMEM175 的对接评分为 -4.1 kcal/mol, 表明两者可自发结合。4-AP 与 TMEM175 之间的结合主要通过氢键、疏水作用力及静电相互作用实现。其中, TMEM175 的 GLU-262 和 ASP-266 通过氢键与 4-AP 的氨基结合, GLU-262 还与吡啶环发生静电相互作用。此外, TMEM175 的 HIS-328 与吡啶环之间形成了 2 根非常规氢键和 1 个 Pi-Pi T 形疏水作用力。见图 2。

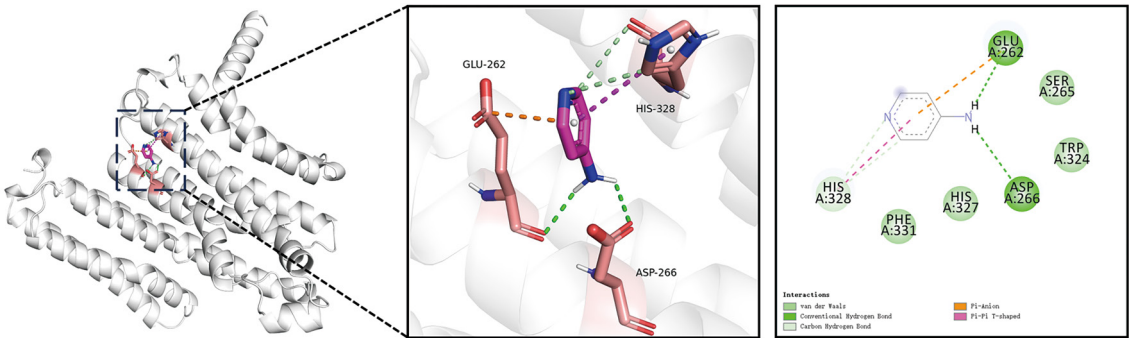
3. 4-AP 对 MPTP 诱导 PD 小鼠多巴胺神经元丢失的保护作用: 免疫组化实验结果显示, MPTP 组小鼠脑内 TH 表达水平低于对照组, 4-AP+MPTP 组小鼠 TH 神经元数量高于 MPTP 组, 见图 3A。Western blot 实验结果显示, 4-AP 组的小鼠脑内 TH 蛋白表达水平与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); MPTP 组的 TH 蛋白表达水平低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 4-AP+MPTP 组的 TH 蛋白表达高于 MPTP 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 3B、表 2。在 mRNA 表达水平上, 4-AP 组小鼠 TH mRNA 表达与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); MPTP 组的小鼠 TH mRNA 表达低于对照组, 4-AP+MPTP 组的 TH mRNA 表达水平高于 MPTP 组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 2。

4. 各组小鼠黑质 TMEM175 表达: 在 Western blot 实验中, 与对照组比较, 4-AP 组的小鼠 TMEM175 蛋白表达水平下降($P < 0.05$); MPTP 组的 TMEM175 蛋白水平高于对照组($P < 0.05$), 在 4-AP+MPTP 组中, TMEM175 蛋白表达相较 MPTP 组有所下降($P < 0.001$), 见图 4、表 3。4-AP 组小鼠 TMEM175 mRNA 表达下降; MPTP 组 TMEM175 mRNA 表达高于对照组($P < 0.01$), 4-AP+MPTP 组的小鼠 TMEM175 mRNA 水平较 MPTP 组有所降低($P < 0.01$)。

表1 各组小鼠行为学实验结果比较($\bar{x} \pm s$)

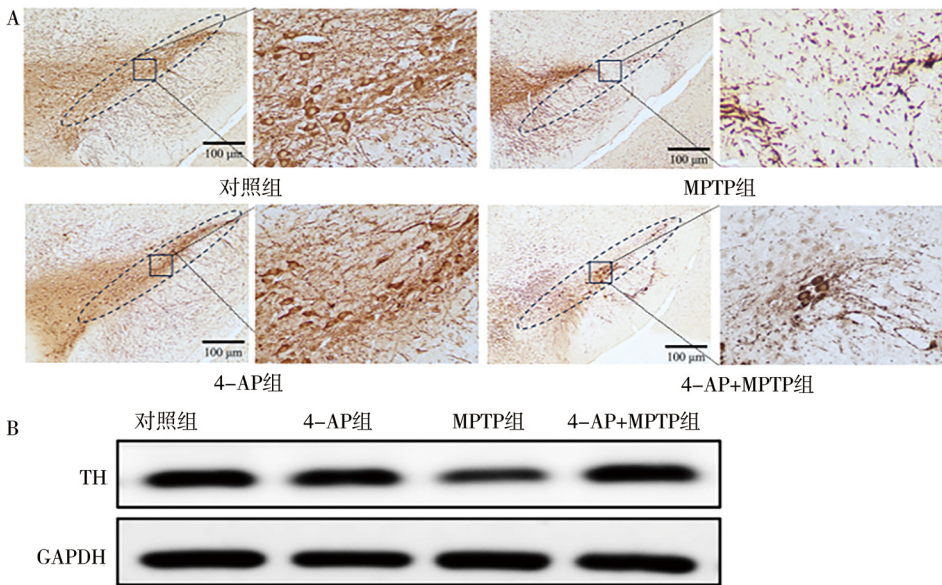
组别	只数	速度(cm/s)	自由活动时间(s)	总路程(mm)	前肢抓力(g)
对照组	15	6.8 ± 0.6	168.2 ± 6.4	1 234.3 ± 48.7	200.7 ± 15.7
4-AP组	15	6.8 ± 0.8 ^a	167.9 ± 6.8 ^a	1 235.9 ± 43.7 ^b	199.4 ± 14.1 ^a
MPTP组	15	5.4 ± 1.1 ^c	155.1 ± 9.0 ^c	1 174.9 ± 81.5 ^d	173.8 ± 13.5 ^c
4-AP+MPTP组	15	6.4 ± 0.9 ^b	164.2 ± 9.2 ^b	1 139.6 ± 68.1	191.3 ± 16.1 ^b

注:与MPTP组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与对照组比较,^c $P < 0.01$,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.001$;4-AP 4-氨基吡啶;MPTP 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶



注:图中配体通过氢键与靶蛋白的残基相连接,残基旁英文与数字标识为残基名称;TMEM175 跨膜蛋白175;4-AP 4-氨基吡啶

图2 TMEM175与4-AP分子对接结果



注:MPTP 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶;4-AP 4-氨基吡啶;方框内图像放大倍数:×200

图3 4组小鼠中脑黑质多巴胺神经元表达情况

5. 各组小鼠脑黑质自噬水平比较: MPTP组小鼠的LC3A浓度高于对照组($P < 0.01$), 4-AP+MPTP组LC3A浓度相较于MPTP组降低($P < 0.05$)。MPTP组Beclin-1浓度升高($P < 0.001$), 4-AP+MPTP组Beclin-1浓度相较MPTP组下降($P < 0.05$),见表4。

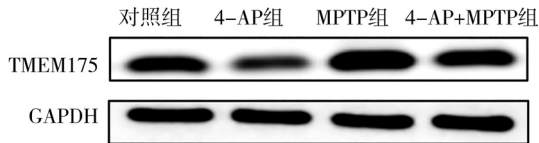
讨论 本研究系统性评估了4-AP在PD小鼠模型中的神经保护作用,并探讨其调控自噬的潜力。本研究结果显示,4-AP能够改善MPTP诱导

的PD小鼠模型的运动功能,通过降低TMEM175表达及调节自噬水平,恢复多巴胺能神经元功能。TMEM175是一种钾离子通道,对于维持细胞自噬和降解途径至关重要。4-AP分子结构中含有1个吡啶环和1个氨基,作为一种有效的电压门控钾通道阻断剂,最早被用于治疗神经传导障碍^[11]。本研究结果显示,4-AP与TMEM175通道的分子对接结果表明,两者能够通过氢键和疏水作用形成稳定结合。

表 2 各组小鼠 TH 表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TH/GAPDH 蛋白	TH/GAPDH mRNA
对照组	3	1.01 ± 0.14	1.04 ± 0.18
4-AP 组	3	0.92 ± 0.11 ^a	0.93 ± 0.16 ^b
MPTP 组	3	0.44 ± 0.07 ^c	0.31 ± 0.07 ^d
4-AP+MPTP 组	3	0.84 ± 0.09 ^a	0.88 ± 0.06 ^b

注: 与 MPTP 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与对照组比较, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.001$; 4-AP 4-氨基吡啶; MPTP 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶; TH 酪氨酸羟化酶



注: TMEM175 跨膜蛋白 175; 4-AP 4-氨基吡啶; MPTP 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶

图 4 Western blotting 法检测各组小鼠 TMEM175 蛋白的表达水平

表 3 各组小鼠 TMEM175 表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TMEM175/GAPDH 蛋白水平	TMEM175/GAPDH mRNA 水平
对照组	3	0.37 ± 0.06	0.86 ± 0.09
4-AP 组	3	0.23 ± 0.05 ^{ab}	0.59 ± 0.09 ^b
MPTP 组	3	0.81 ± 0.11 ^a	1.12 ± 0.01 ^c
4-AP+MPTP 组	3	0.33 ± 0.09 ^b	0.61 ± 0.02 ^d

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; 与 MPTP 组比较, ^b $P < 0.001$, ^d $P < 0.01$; 4-AP 4-氨基吡啶; MPTP 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶; TMEM175 跨膜蛋白 175

表 4 各组小鼠中脑黑质 LC3A、Beclin-1 表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	LC3A (pg/ml)	Beclin-1 (ng/mL)
对照组	6	324.34 ± 125.38	0.75 ± 0.17
4-AP 组	6	301.94 ± 66.52 ^a	0.78 ± 0.23 ^b
MPTP 组	6	484.45 ± 65.70 ^c	1.89 ± 0.24 ^d
4-AP+MPTP 组	6	348.01 ± 25.88 ^c	1.45 ± 0.30 ^c

注: 与 MPTP 组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$, ^c $P < 0.05$; 与对照组比较, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.001$; 4-AP 4-氨基吡啶; MPTP 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶; TMEM175 跨膜蛋白 175; LC3A 微管相关蛋白 1 轻链 3A

TMEM175 作为溶酶体钾通道, 其功能缺陷与溶酶体功能失调密切相关, 而溶酶体功能失常在 PD 的病理机制中占据核心地位。Western blot 和 qPCR 检测显示, 与对照组比较, PD 小鼠的 TMEM175 表达显著上调, 而在 4-AP+MPTP 组中, TMEM175 的蛋白及 mRNA 表达水平均有下降。结果表明, 4-AP 可能通过抑制 TMEM175 通道的活性, 从而调控溶酶体的功能。

在正常 pH 条件下, TMEM175 对 H⁺ 的通透性高于 K⁺ 和 Na⁺^[12]。相关研究表明, 当 pH 值为 4.5 ~ 5.0

时, TMEM175 介导的 H⁺ 外流较为活跃; 当 pH 值低于 4.5 时, 通道活性增强, 而超过 5.0 时则会受到抑制^[13]。三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)驱动的囊泡型腺苷三磷酸酶(vacuolar-type adenosine triphosphatase, V-ATPase)由 V1 和 V0 2 个结构域组成, 分别负责 ATP 水解及质子传输, 通过协同作用维持溶酶体内的质子浓度梯度稳态。溶酶体的 pH 异常会影响抗原装载^[14]、底物代谢^[15]和胞外转运^[16]等功能, 从而干扰正常的生理功能。本研究利用 ELISA 检测了自噬相关指标 LC3A 及 Beclin-1 的浓度变化, 结果显示, 自噬相关指标 LC3A 及 Beclin-1 水平在 MPTP 组中升高, 这种变化可能与神经元自噬调控的失衡有关。4-AP+MPTP 组中 LC3A 及 Beclin-1 水平降低, 4-AP 处理后能降低这 2 种自噬标志物水平, 提示其可能通过改善溶酶体功能和自噬-溶酶体途径来发挥神经保护作用。然而, 进一步研究需结合 LC3- II /LC3- I 比值及 P62 蛋白降解情况, 以明确自噬流的具体变化。既往研究表明, 4-AP 通过抑制 MPTP 诱导的黑质区域多巴胺能神经元丢失以及纹状体中多巴胺耗竭, 发挥保护作用^[17], 与本研究结果一致。4-AP 能够减少 MPTP 引起的丙二醛水平升高, 从而降低氧化应激。4-AP 恢复了超氧化物歧化酶的活性, 进一步缓解了氧化损伤。4-AP 通过逆转 MPTP 对抗凋亡蛋白 Bcl-2 的抑制和促凋亡蛋白 Caspase3 的激活, 有效减少了神经元的细胞凋亡。TMEM175 具有独特三维结构的 K⁺ 选择性通道, 其与经典 K⁺ 通道在序列和结构上均无同源性, 但其对广谱 K⁺ 通道抑制剂 4-AP 具有敏感性^[18]。冷冻电镜和分子模拟结果表明, 4-AP 通过与 TMEM175 离子传导路径中的高度保守残基(如 Ser45 和 Ile46)相互作用, 实现其抑制作用。国外研究中, Jinn 等^[19]率先从遗传学角度揭示了 TMEM175 基因突变与 PD 发病风险的关联。然而, 以往研究缺乏关于 4-AP 在动物模型中的功能验证。本研究在 PD 小鼠模型中评估 4-AP 作为 TMEM175 抑制剂的神保护作用, 并进一步探讨了其对自噬调控的影响。

综上所述, 本研究推测 4-AP 在 PD 小鼠模型中的作用机制可能与其靶向 TMEM175 通道, 调控溶酶体功能及自噬活性有关。通过降低 TMEM175 通道活性, 4-AP 或许改善了溶酶体的酸化能力, 从而恢复细胞内环境稳态。自噬作为清除异常蛋白和受损细胞器的关键途径^[20], 其在 PD 病理中的作用较为复杂^[21]。通过调控 TMEM175 和自噬途径, 4-AP 在 PD 模型中展现了保护神经元和维持神经元细胞功能稳定的潜力。但由于 PD 的病因多样且人类神

经系统与动物模型存在差异,4-AP的临床治疗效果仍需进一步验证。未来研究建议深入探讨4-AP与TMEM175及自噬途径的关系,同时推进其在其他神经退行性疾病模型中的研究,以全面评估其临床应用价值。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 研究设计为王子豪、夏欢、高美蓉,论文撰写为王子豪,实验实施及数据分析为王子豪、邓安霞、王晓蓓、杜心雨,论文修改为王晓蓓、杜心雨、杨新玲

参 考 文 献

- [1] Ballanger B, Boulinguez P. Motor compensation in Parkinson's disease: an empirical challenge with clinical implications[J]. Brain, 2024, 147(11): 3648-3650. DOI: 10.1093/brain/awae328.
- [2] 张佳, 陈旭. 帕金森病致病基因 Parkin 与突触相关蛋白 synaptotagmin1 的相互作用研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2020, 22(9): 979-982. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0126.2020.09.021.
- [3] Zhang J, Chen X. Study on the interaction between Parkinson's disease pathogenic gene Parkin and synapse-related protein synaptotagmin1 [J]. Chin J Cardiovasc Dis Elderly, 2020, 22(9): 979-982.
- [4] Liu X, Zhang Y, Weng Y, et al. Levodopa therapy affects brain functional network dynamics in Parkinson's disease[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2025, 136: 111169. DOI: 10.1016/j.pnpb.2024.111169.
- [5] Jiao F, Meng L, Du K, et al. The autophagy-lysosome pathway: a potential target in the chemical and gene therapeutic strategies for Parkinson's disease[J]. Neural Regen Res, 2025, 20(1): 139-158. DOI: 10.4103/NRR.NRR-D-23-01195.
- [6] Oh S, Stix R, Zhou W, et al. Mechanism of 4-aminopyridine inhibition of the lysosomal channel TMEM175 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(44): e2208882119. DOI: 10.1073/pnas.2208882119.
- [7] Peikert K, Naumann M, Günther R, et al. Off-label treatment of 4 amyotrophic lateral sclerosis patients with 4-aminopyridine[J]. J Clin Pharmacol, 2019, 59(10): 1400-1404. DOI: 10.1002/jcph.1437.
- [8] Chiang CC, Lin CC, Ju MS, et al. High frequency stimulation can suppress globally seizures induced by 4-AP in the rat hippocampus: an acute in vivo study[J]. Brain Stimul, 2013, 6(2): 180-189. DOI: 10.1016/j.brs.2012.04.008.
- [9] Naujock M, Stanslowsky N, Bufler S, et al. 4-aminopyridine induced activity rescues hypoexcitable motor neurons from amyotrophic lateral sclerosis patient-derived induced pluripotent stem cells[J]. Stem Cells, 2016, 34(6): 1563-1575. DOI: 10.1002/stem.2354.
- [10] Palomba NP, Fortunato G, Pepe G, et al. Common and rare variants in TMEM175 gene concur to the pathogenesis of Parkinson's disease in Italian patients[J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(4): 2150-2173. DOI: 10.1007/s12035-022-03203-9.
- [11] Wu L, Lin Y, Song J, et al. TMEM175: a lysosomal ion channel associated with neurological diseases[J]. Neurobiol Dis, 2023, 185: 106244. DOI: 10.1016/j.nbd.2023.106244.
- [12] Yang C, Tian F, Hu M, et al. Characterization of the role of TMEM175 in an in vitro lysosomal H(+) fluxes model[J]. FEBS J, 2023, 290(19): 4641-4659. DOI: 10.1111/febs.16814.
- [13] Oh S, Marinelli F, Zhou W, et al. Differential ion dehydration energetics explains selectivity in the non-canonical lysosomal K+ channel TMEM175 [J]. Elife, 2022, 11: e75122. DOI: 10.7554/eLife.75122.
- [14] Zhang J, Zeng W, Han Y, et al. Lysosomal LAMP proteins regulate lysosomal pH by direct inhibition of the TMEM175 channel[J]. Mol Cell, 2023, 83(14): 2524-2539.e7. DOI: 10.1016/j.molcel.2023.06.004.
- [15] Maeda FY, van Haaren JJ, Langley DB, et al. Surface-associated antigen induces permeabilization of primary mouse B-cells and lysosome exocytosis facilitating antigen uptake and presentation to T-cells[J]. Elife, 2021, 10: e66984. DOI: 10.7554/eLife.66984.
- [16] Rout AK, Strub MP, Piszczek G, et al. Structure of transmembrane domain of lysosome-associated membrane protein type 2a(LAMP-2A) reveals key features for substrate specificity in chaperone-mediated autophagy[J]. J Biol Chem, 2014, 289(51): 35111-35123. DOI: 10.1074/jbc.M114.609446.
- [17] Eldeeb MA, Zorca CE, Goiran T. Extracellular protein degradation via the lysosome[J]. Commun Chem, 2020, 3(1): 149. DOI: 10.1038/s42004-020-00397-8.
- [18] Shi L, Jia L, Wang Y, et al. 4-Aminopyridine Protects Nigral Dopaminergic Neurons in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease[J]. Neurochem Res, 2023, 48(6): 1707-1715. DOI: 10.1007/s11064-022-03845-0.
- [19] Feng T, Zheng H, Zhang Z, et al. Mechanism and therapeutic targets of the involvement of a novel lysosomal proton channel TMEM175 in Parkinson's disease[J]. Ageing Res Rev, 2024, 100: 102373. DOI: 10.1016/j.arr.2024.102373.
- [20] Jinn S, Drolet RE, Cramer PE, et al. TMEM175 deficiency impairs lysosomal and mitochondrial function and increases α -synuclein aggregation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(9): 2389-2394. DOI: 10.1073/pnas.1616332114.
- [21] 顾雪彤, 李晓宁. 线粒体动力学和线粒体自噬在缺血性脑卒中中的作用及机制研究进展[J]. 神经疾病与精神卫生, 2023, 23(5): 328-333. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2023.05.005.
- [22] Gu XT, Li XN. Research progress on the role and mechanisms of mitochondrial dynamics and mitophagy in ischemic stroke[J]. Journal of Neuroscience and Mental Health, 2023, 23(5): 328-333.
- [23] Palmer JE, Wilson N, Son SM, et al. Autophagy, aging, and age-related neurodegeneration[J]. Neuron, 2025, 113(1): 29-48. DOI: 10.1016/j.neuron.2024.09.015.

(收稿日期: 2024-10-20)

(本文编辑: 王影)