

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.24.002

GDNF 基因治疗对帕金森病小鼠 TH 阳性神经元 损害及胃肠功能障碍的影响*

吴少璞, 祁亚伟, 李 学, 杨红旗, 马建军[△]

(河南省人民医院神经内科, 郑州 450002)

[摘要] **目的** 研究巨噬细胞介导的胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)基因治疗对帕金森病小鼠临床症状,以及对黑质酪氨酸羟化酶(TH)阳性神经元损害和胃肠功能障碍的影响。**方法** 60 只小鼠分为对照组、实验组和健康组。实验组小鼠接受表达 GDNF 的慢病毒骨髓干细胞转导,对照组和健康组小鼠注射生理盐水。移植后对照组和实验组通过 MPTP 建立帕金森模型,健康组注射生理盐水。比较 3 组小鼠建模后行为学变化、TH 阳性(H⁺)多巴胺能神经神经元细胞免疫组织化学染色结果和神经元数目数目、体质量变化、胃排空率和肠推进率。**结果** GDNF 在移植后的小鼠中成功表达。实验组小鼠爬杆时间明显长于健康组并明显短于对照组($P < 0.05$),实验组小鼠转棒停留时间明显短于健康组并明显长于对照组($P < 0.05$)。对照组、实验组和健康组小鼠的(TH⁺)多巴胺能神经神经元数目分别为:(8 610.26±833.64)、(1 117.54±1 037.18)、(1 369.87±1 440.16)×10⁻⁴/μm³,差异有统计学意义($P < 0.01$);实验组小鼠黑质中的 TH⁺多巴胺神经元纤维比对照组更密、颜色更深,比健康组更疏、颜色更浅。造模前后对照组和实验组小鼠体质量明显下降;实验组小鼠体质量、胃排空率、小肠推进率明显低于健康组且高于对照组($P < 0.05$)。**结论** GDNF 基因疗法能够明显改善帕金森病小鼠的运动协调能力,修复 TH⁺神经元细胞损伤,改善胃肠道功能障碍。

[关键词] 帕金森病;基因;胶质细胞源性神经营养因子;黑质酪氨酸羟化酶阳性;胃肠功能障碍

[中图分类号] R741.05 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)24-3129-05

Effect of GDNF gene therapy in treating tyrosine hydroxylase positive neuron damage and gastrointestinal dysfunction in Parkinson mice*

WU Shaopu, QI Yawei, LI Xue, YANG Hongqi, MA Jianjun[△]

(Department of Neurology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of macrophage-mediated glial-derived neurotrophic factor (GDNF) therapy on clinical symptoms, tyrosine hydroxylase (TH) positive neuron damage and gastrointestinal dysfunction in Parkinson mice. **Methods** Sixty mice were divided into the control group, experimental group and healthy group. The experimental group mice received the transduction of bone marrow stem cells expressing GDNF lentivirus, the control group and healthy group were injected with normal saline. After transplantation, the control group and experimental group built the Parkinson model by MPTP, while the healthy group was injected by normal saline. The behavior change, immunohistochemical staining results of substantia nigra tyrosine hydroxylase positive (H⁺) dopaminergic neuron and neurons number, body mass change, gastric emptying rate and intestinal propulsive rate after constructing the model were compared among 3 groups. **Results** GDNF was expressed successfully in mice after transplantation. The pole-climbing time in the experimental group was significantly longer than that in the healthy group and significantly shorter than that in the control group ($P < 0.05$); the stick-turning standing time in the experimental group was significantly shorter than that in the healthy group and significantly longer than that in the control group ($P < 0.05$). The numbers of TH⁺ dopaminergic neuron in the control group, experimental group and healthy group were (8 610.26±833.64), (1 117.54±1 037.18) and (1 369.87±1 440.16)×10⁻⁴/μm³ separately, which showed statistically significant difference ($P < 0.01$); the substantia nigra TH⁺ dopaminergic neurofibrils in the experimental group were more dense and darker compared with the control group, and more scatter and lighter compared with the healthy group. The body mass before and after constructing the model in the experi-

mental and control group was significantly decreased; the body mass, gastric emptying rate and intestinal propulsive rate in the experimental group were significantly lower than those in the healthy group and higher than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The GDNF gene therapy could significantly improve the motor coordination ability of PD mice, meanwhile repair TH⁺ neuron damage and improves gastrointestinal dysfunction.

[Key words] Parkinson disease; gene therapy; glial-derived neurotrophic factor; TH⁺; gastrointestinal dysfunction

帕金森病(PD)是一种中枢神经退行性疾病,其临床症状除了静止性震颤、姿势不稳等运动障碍以外,还表现为胃肠道功能障碍等非运动障碍。PD主要是由于患者大脑黑质多巴胺能神经元发生退行性病变而导致的神经元坏死和神经功能受损。目前对于PD发病的具体机制尚不明确,但普遍认为PD是由于多巴胺含量下降引起的;其临床治疗以减轻临床症状、促进神经元修复为主^[1]。胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)能修复退化的多巴胺神经元,促进黑质纹状体多巴胺系统的再生,是目前活性最强的神经元保护因子^[2]。目前关于GDNF与PD动物模型的研究主要有两种,除了通过GDNF直接输注,还有通过病毒为载体的基因改造疗法或经基因工程改造后再通过细胞介导输注^[3]。GDNF相对分子质量大,难以透过血脑屏障,且必须通过持续性给予才能起到较好的神经修复作用,直接输注的效果不佳。本文通过GDNF基因疗法研究其对PD小鼠模型的神经修复作用和对胃肠功能的影响,为基因治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 健康雄性 C57BL/6J 小鼠 60 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[许可证编号 SCXK(京)2006-0009]。(24±2)℃、(55±5)%相对湿度、12 h 日夜循环适应性喂养 7 d,6 周龄,体质量(20±2)g。小鼠分为对照组($n=15$)、实验组($n=30$)和健康组($n=15$)。

1.2 方法

1.2.1 GDNF 慢病毒质粒巨噬细胞特异性合成启动子构建 慢病毒载体的巨噬细胞特异性合成启动子构建参照 BIJU 等^[4]报道,该序列包含两个顺式作用元件:CAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α)和融合蛋白-1(AML-1),采用 CD68 迷你启动子代替质粒中原来的 p47phox 的迷你基因启动子以提高特异性,然后用大鼠 GDNF 基因(Genbank 编号:nm019139,STS 50-685)取代报告基因(GFP)。设计引物的上游引物为 5'-CGG AAT TCG GTA CCG AGC TCT TAC GC-3',下游引物为 5'-CGA CCG GTA CTG GGT GGC CTC CAG TG-3';使用标准的 PCR 分子扩增程序,PCR 反应条件为 30 s 30 次 94℃,56℃ 30 s,72℃ 1 min。并对产生的结构进行测序,以验证插入位点,以及 GDNF 基因的完整性。获得由慢病毒载体的 293T 细胞瞬时转染产生的 3 个包装质粒(pmdlG/pMDlg-

pRRE,pRSV Rev 和 PMD.G)构成的慢病毒质粒。

1.2.2 慢病毒转导与骨髓细胞移植^[5] 在骨髓注射前 4 d 给供体小鼠注射 150 mg/kg 氟尿嘧啶。用 stempro-34-sfm 完全培养基(Gibco 公司)冲洗供体小鼠的股骨和胫骨骨髓获得骨髓细胞,添加 200 mmol/L 谷氨酰胺,100 IU/mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素,5 U/mL 肝素制作单细胞悬液。使用淋巴细胞培养基富集骨髓间充质干细胞并采用密度梯度分离法分离,进行体外过夜培养,第 2 天使用 400 μ L 浓缩病毒上清液重悬获得的细胞悬液。在含有 RetroNectin 蛋白(Takara)的图层板上,4 μ g/mL 硫酸鱼精蛋白存在下进行 6 h 感染。感染后经小鼠尾静脉注射(1~2) $\times 10^6$ 细胞。实验组小鼠接受表达 GDNF 的慢病毒骨髓干细胞转导,对照组和健康组小鼠进行等量灭菌生理盐水注射。

1.2.3 PD 模型建立^[6] 移植后 8 周,给予对照组和观察组小鼠 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP,美国 Sigma 公司)生理盐水腹腔注射:第 1 天 15 mg/kg,第 2 天 25 mg/kg,第 3~7 天 30 mg/kg。前两天进行低剂量注射是为了避免周围毒性导致动物死亡。健康组在相同的方案下进行生理盐水腹腔注射。建立模型第 7 天对造模小鼠进行 PD 行为学检测,从对照组和观察者中分别挑选 12、24 只造模成功的小鼠入组;健康组选取 12 只健康小鼠入组。在最后 1 次 MPTP/生理盐水注射 1 周后处死动物。

1.2.4 观察指标

1.2.4.1 RT-PCR 检测 GDNF 表达 分别于移植 GDNF 的慢病毒骨髓干细胞转染后第 1、3、5、8 周从实验组挑选 3 只小鼠验证 GDNF 的表达:使用 8%水合氯醛进行麻醉,在麻醉成功后,向小鼠心脏注射肝素化冰生理盐水,断头取脑。提取小鼠黑质总 RNA,提取方法为 TRzol 试剂提取法,按照试剂盒(购自江莱生物)说明进行反转录。取反转录产物进行 RT-PCR 检测,以 β -actin mRNA 转录水平作为内参,反应循环参数设置。预变性:94℃ 5 min;PCR 反应:94℃ 30 s,56℃ 60 s,72℃ 2 min,共 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。

1.2.4.2 行为学观察 通过爬杆试验和转棒行为试验来评价小鼠的四肢运动协调能力。(1)爬杆试验:测试时间为 MPTP 注射第 1、5、7 天及最后 1 次注射

后 7 d;在 0.5 m 长(直径 0.8 cm)的木棍一侧固定直径 0.25 m 的软木球,木杆上缠绕纱布,记录小鼠从软木球上出发走完整个木棍的时间,即爬杆时间。(2)转棒行为学检测:测试时间为注射第 7 天及最后 1 次注射后 7 d,提前 3 d 开始使用转棒行为学仪器训练 3 组动物,每天转速 12 r/min,训练 5 min,测试时记录 3 组小鼠在 20 r/min 转速下的棒上停留时间。

1.2.4.3 黑质酪氨酸羟化酶阳性(Tyrosine hydroxylase⁺, TH⁺)多巴胺能神经神经元数目 于最后 1 次注射 MPTP/生理盐水后第 7 天,使用 8%水合氯醛进行麻醉,在麻醉成功后,向小鼠心脏注射肝素化冰生理盐水,断头取脑。于冰上进行小鼠脑组织冠状切片,厚度约为 1 mm,然后进行免疫组织化学染色,在光学显微镜下观察结果,详细操作严格按照说明书进行,试剂盒由江莱生物提供。同时采用光学分流法对 3 组小鼠脑组织中的多巴胺能神经细胞进行计数。

1.2.4.4 体质量变化 MPTP 具有全身毒性作用,会导致小鼠发生营养障碍,体质量下降。分别在皮下注射前 1 天,注射第 1 天,注射第 7 天,最后 1 次注射后第 7 天对 3 组小鼠进行称重,比较 3 组动物的体质量变化。

1.2.4.5 胃肠道功能 配置淀粉糊:向 125 mL 蒸馏水中添加 5.0 g 羧甲基纤维素钠,8.0 g 奶粉,4.0 g 蔗糖,4.0 g 淀粉,1.5 g 活性炭末,搅拌配置成均匀的糊状物。所有小鼠在最后一次注射 MPTP/生理盐水后第 7 天处死前 18 h 进行禁食,然后进行淀粉糊灌胃,灌胃剂量 0.025 mL/g,灌胃后 20 min 处死小鼠,结扎幽门和贲门,分离胃和小肠,称胃的质量,质量记为 M;对胃进行解剖除去内容物生理盐水冲洗晾干,

再次称重,记为 m。同时平铺小肠,测量幽门至盲肠的长度 L₁、幽门至小肠中淀粉糊处的长度 L₂。胃排空率=[1-(M-m)/灌胃质量]×100%;小肠推进率=L₂/L₁×100%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 进行,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料用率表示,组间采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脑组织中 GDNF 在 mRNA 水平的表达 在移植 GDNF 的慢病毒骨髓干细胞转染后,GDNF 在小鼠脑组织中成功表达,并且从第 1 周到第 8 周小鼠脑组织中 GDNF 的表达逐渐增强,见图 1。



图 1 实验组小鼠脑组织中 GDNF 的表达

2.2 行为学观察 注射 MPTP/生理盐水造模第 1、7 天,以及最后 1 次注射后 7 d,3 组小鼠爬杆时间比较差异有统计学意义($P<0.05$),实验组小鼠爬杆时间明显长于健康组且短于对照组($P<0.05$)。注射 MPTP/生理盐水造模第 7 天,以及最后 1 次注射后 7 d,3 组小鼠转棒停留时间差异有统计学意义($P<0.05$),实验组小鼠停留时间明显短于健康组且长于对照组($P<0.05$),见表 1。

表 1 3 组小鼠爬杆时间和转棒停留时间比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	爬杆时间(min)			F	P	转棒停留时间(s)		t	P
		第 1 天	第 7 天	注射后 7 d			第 7 天	注射后 7 d		
对照组	12	6.05±1.32	7.42±1.36	7.69±1.38	5.064	0.012	32.21±5.06	29.04±3.23	1.829	0.081
实验组	12	4.98±1.01 ^a	6.27±1.15 ^{ab}	5.32±1.29 ^{ab}	4.016	0.027	40.92±4.81 ^{ab}	45.37±4.05 ^{ab}	2.452	0.023
健康组	12	4.61±0.94	4.53±1.07 ^a	4.67±1.11 ^a	0.067	0.934	81.45±9.16 ^a	78.56±10.17 ^a	1.245	0.226
F		5.521	17.654	18.947			187.408	166.64		
P		0.008	<0.01	<0.01			<0.01	<0.01		

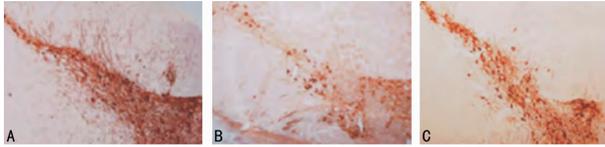
^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与健康组比较

表 2 3 组小鼠体质量变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	注射前 1 d	第 1 天	第 7 天	注射后 7 d	F	P
对照组	12	26.37±1.54	22.12±1.40 ^b	14.63±1.25	17.35±1.24	174.12	<0.01
实验组	12	25.88±1.37	23.92±1.48 ^b	18.14±1.80 ^{ab}	21.06±1.19 ^{ab}	62.863	<0.01
健康组	12	25.69±1.46	26.29±1.46	26.06±1.39 ^a	25.13±1.31 ^a	1.554	0.213
F		0.694	25.067	183.255	116.738		
P		0.506	<0.01	<0.01	<0.01		

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与健康组比较

2.3 TH⁺多巴胺能神经神经元数目 对照组、实验组和健康组小鼠的 TH⁺多巴胺能神经神经元数目分别为:(8 610.26±833.64)、(1 117.54±1 037.18)、(1 369.87±1 440.16)×10⁻⁴/μm³。3组两两比较差异有统计学意义($P<0.05$)。免疫组织化学染色结果显示实验组小鼠黑质中的 TH⁺多巴胺神经纤维比对照组更密,颜色更深;实验组小鼠黑质中的 TH⁺多巴胺神经纤维比健康组更疏,颜色更浅,见图 2。



A:健康组;B:对照组;C:实验组

图 2 3组小鼠黑质中 TH⁺多巴胺神经染色结果(×20)

2.4 体质量变化 造模前 1 d 3组小鼠体质量无明显差异;注射 MPTP/生理盐水第 1、7 天,以及最后 1 次注射后 7 d 时 3组小鼠体质量比较差异有统计学意义($P<0.05$),其中实验组小鼠注射第 7 天及注射后 7 d 体质量均明显低于健康组且高于对照组($P<0.05$),见表 2。

2.5 胃肠道功能 实验组小鼠的胃排空率、小肠推进率均明显低于健康组且高于对照组($P<0.05$),见表 3。

表 3 3组小鼠的胃排空率和肠推进率比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	胃排空率(%)	肠推进率(%)
对照组	12	42.27±10.50	48.01±12.24
实验组	12	51.89±11.62 ^{ab}	54.47±11.35 ^{ab}
健康组	12	63.15±9.14 ^a	66.83±13.75 ^a
F		11.957	7.039
P		<0.01	0.028

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与健康组比较

3 讨论

PD 是因多巴胺能神经元发生退行性变化而导致神经退化坏死所致,其临床特征主要为运动障碍。此外,98%以上的患者还会出现非运动障碍,其中胃肠道功能障碍是 PD 患者最明显的非运动障碍,发生率约为 80%^[7]。目前 PD 尚无根治之法,临床治疗以缓解患者症状为主,既不能恢复坏死的神经元也不能很好地终止病理进程。GDNF 是目前公认最佳神经保护因子,具有促进神经细胞分化和再生长的功能^[8]。但 GDNF 是一种大分子,直接注射难以透过血脑屏障,疗效不佳。GDNF 基因修饰是改善 PD 的最有效途径,但目前尚处于动物实验摸索研究阶段^[9]。慢病毒载体介导通过基因重组构建表达 GDNF 的慢病毒,再包装、注射进入体内,免疫反应小,安全性高^[10]。本文通过慢病毒质粒巨噬细胞获得表达 GDNF 的慢病

毒质粒并进行转染,使得 GDNF 在小鼠脑组织中成功表达。

本文采用爬杆试验、转棒试验比较 3 组小鼠的运动协调能力。结果表明,实验组小鼠的运动协调能力明显优于对照组并明显弱于健康组,巨噬细胞介导基因治疗能有效改善 PD 小鼠的运动障碍。PD 发病的一个最重要原因是其脑内黑质中的多巴胺含量下降,导致神经元细胞受损。MPTP 的体内代谢产物能够通过抑制多巴胺合成酶 TH 的活性来降低小鼠黑质中多巴胺含量^[11];TH 是多巴胺合成的限速酶^[12]。本研究中实验组小鼠脑组织中神经元数目明显低于健康组且高于对照组($P<0.05$)。免疫组织化学染色结果显示,实验组小鼠黑质中的 TH⁺多巴胺神经纤维比对照组更密集,颜色更深,比健康组更疏,颜色更浅。说明 GDNF 基因移植后能明显促进小鼠脑组织中的神经元细胞的再生,改善修复受损的神经元。分析认为通过基因工程改造后的骨髓干细胞经过小鼠尾静脉移植能够跨过血脑屏障,与局部组织整合,并表达 GDNF,进一步通过丝裂原活化蛋白激酶-蛋白激酶 C 信号通路提高 TH 阳性表达^[13],提高多巴胺的合成,抑制神经元细胞凋亡,有助于神经纤维修复^[14]。段奎甲等^[15]通过 GDNF 基因修饰神经干细胞并移植 PD 大鼠体内发现 GDNF 基因修饰移植的大鼠较 GFP 基因移植的大鼠的多巴胺神经分化更多,其 TH⁺阳性表达也明显更高,该方法能够明显改善 PD 大鼠的运动障碍,与本文研究结果类似。

除了典型的运动障碍、神经元损害外,PD 患者胃肠道功能障碍的最明显的表现是胃排空延迟;胃肠道功能损害会进一步引起体质量下降,并且随着病情发展,胃肠道功能障碍会随之加重^[16]。本研究结果发现注射 MPTP 第 1 天对照组和实验组小鼠表现出明显的体质量下降,且对照组明显低于实验组;造模第 7 天及造模后第 7 天对照组小鼠体质量无明显变化,对照组和试验组小鼠体质量明显下降,且对照组明显低于实验组。同时实验组小鼠的胃排空率、小肠推进率均明显低于健康组且高于对照组,说明实验组小鼠的胃排空功能和肠道蠕动明显优于对照组但明显弱于健康组,GDNF 的基因治疗能明显改善 PD 小鼠的胃肠道功能障碍。研究认为 PD 患者发生胃肠道功能障碍的原因可能是脑组织中的中枢神经系统发生变性退化,导致神经递质的减少,对胃肠道蠕动的调控变弱^[17]。同时有学者报道 PD 大鼠体内的胃肠道多巴胺神经数量明显低于健康大鼠^[18]。分析认为小鼠移植表达 GDNF 的巨噬细胞,能够促进脑组织中多巴胺合成,修复与胃肠道蠕动相关的受损神经,改善 PD 小鼠的胃肠道功能障碍。

综上所述,GDNF 基因疗法治疗 PD 小鼠能够明

显改善 PD 小鼠的运动障碍,促进脑组织中受损的 TH 阳性神经元细胞再生,修复神经纤维,提高胃肠道蠕动,改善胃肠道功能障碍。但是其具体机制尚不清楚,还需要进行进一步的分子生物学研究。

参考文献

- [1] RINALDUZZI S, TROMPETTO C, MARINELLI L, et al. Balance dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Biomed Res Int*, 2015; 434683.
- [2] 王思, 刘菲. 胶质细胞源性神经营养因子治疗帕金森病研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2015, 42(1): 89-92.
- [3] LE GRAND J N, GONZALEZ-CANO L, PAVLOU M A, et al. Neural stem cells in Parkinson's disease; a role for neurogenesis defects in onset and progression[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(4): 773-797.
- [4] BIJU K, ZHOU Q, LI G M, et al. Macrophage-mediated GDNF delivery protects against dopaminergic neurodegeneration: a therapeutic strategy for Parkinson's disease[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(8): 1536-1544.
- [5] HE W J, QIANG M, MA W Q, et al. Development of a synthetic promoter for macrophage gene therapy[J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(9): 949-959.
- [6] 谢金鹿, 耿希文, 何婷婷, 等. 高效帕金森病大鼠模型建立方法的研究[J]. *济南大学学报(自然科学版)*, 2017, 31(2): 159-163.
- [7] 马成猛, 王训, 杨任民. 帕金森病患者胃肠功能障碍研究进展[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2014, 17(8): 122-125.
- [8] 杨晓帆, 韩鹏飞, 臧兆萍, 等. 人胶质细胞源性神经营养因子转染大鼠神经干细胞移植对老年帕金森病大鼠的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(22): 6339-6341.
- [9] TERESHCHENKO J, MADDALENA A, BHR M, et al.

Pharmacologically controlled, discontinuous GDNF gene therapy restores motor function in a rat model of Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 65(4): 35-42.

- [10] 杜向东, 范雁. 慢病毒载体介导的帕金森病基因治疗新进展[J/CD]. *中华脑科疾病与康复杂志(电子版)*, 2015, 5(3): 188-191.
- [11] 胡雅岑, 徐倩, 郭纪峰, 等. MPTP 诱导的帕金森病小鼠模型黑质脑组织 DNA 甲基化研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2015, 42(3): 277-285.
- [12] 张阳, 张志坚, 俞晓岚, 等. 慢病毒介导新型 Tet-On 系统调控大鼠 GDNF 和 TH 双基因表达对帕金森病大鼠的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(2): 251-256.
- [13] RENGMARK A, PIHLSTROM L, LINDER J, et al. Low frequency of GCH1 and TH mutations in Parkinson's disease[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2016, 29(4): 109-111.
- [14] HOANG Q Q. Pathway for parkinson disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(7): 2402-2403.
- [15] 段奎甲, 王向鹏, 杨智勇, 等. GDNF 基因修饰神经干细胞移植治疗大鼠帕金森病[J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(1): 32-38.
- [16] 李静, 陈为安, 张旭, 等. 早期与中晚期帕金森病患者非运动症状的比较研究[J]. *中国全科医学*, 2016, 19(34): 4201-4204.
- [17] 赵振向, 李晔, 刘怡琳, 等. 帕金森病肠道起源的研究进展[J]. *山东医药*, 2017, 57(12): 107-109.
- [18] PFEIFFER R F. Non-motor symptoms in Parkinson's disease[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2016, 22(1): 119-122.

(收稿日期: 2018-02-22 修回日期: 2018-05-10)

(上接第 3128 页)

- on a single homologue of the LytR-CpsA-Psr proteins[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3936.
- [10] 闵迅, 钟文, 赵沙沙, 等. 肺炎链球菌假想转录因子 LytR 的表达, 纯化, 晶体生长及优化[J]. *生物医学工程学报*, 2013, 30(4): 6.
- [11] 刘洪波, 阳广菲, 欧维琳, 等. 柯萨奇病毒 A6 型 VP1 蛋白的生物信息学分析[J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(4): 536-541.
- [12] LIU Y, WANG H, CHEN M, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in China younger than 5 years[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 61(3): 256-263.

- [13] CHAN Y, KIM H, SCHNEEWIND O, et al. The capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus* is attached to peptidoglycan by the LytR-CpsA-Psr (LCP) family of enzymes[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(22): 15680-15690.
- [14] EBERHARDT A, HOYLAND C N, VOLLMER D, et al. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Microb Drug Resist*, 2012, 18(3): 240-255.
- [15] LISZEWSKIZ, CHAN Y, LUNDERBERG J. LytR-CpsA-Psr enzymes as determinants of *Bacillus anthracis* secondary cell wall polysaccharide assembly[J]. *J Bacteriol*, 2015, 197(2): 343-353.

(收稿日期: 2018-02-23 修回日期: 2018-05-08)