

復旦大學

本科毕业论文（设计）



论文题目：胶质细胞在神经元核内包涵体疾病（NIID）中的调控作用与机制研究

姓 名：郑瑞童

学 号：21307110360

院 系：生命科学学院

专 业：生物科学

指导教师：鲁伯坝

职 称：研究员

单 位：复旦大学 生命科学学院

完成日期：2025 年 5 月 12 日

胶质细胞在神经元核内包涵体疾病 (NIID) 中的调控作用与机制研究

完成人

郑瑞童

指导小组成员

鲁伯坝 研究员

张柿平 副研究员

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
一、前 言.....	1
1.1 短串联重复扩增疾病及其发病机制	1
1.2 神经元核内包涵体病特征与致病机制研究现状	1
1.3 胶质细胞在神经退行性疾病中的作用	3
1.4 关于胶质细胞在 NIID 中的调控作用的研究现状	4
1.5 果蝇模型在重复扩增疾病研究中的应用	5
1.6 本课题主要研究内容	6
二、材料与方法.....	7
2.1 实验材料	7
2.1.1 实验对象.....	7
2.1.2 实验试剂.....	7
2.1.3 抗体信息.....	8
2.1.4 实验仪器.....	8
2.2 实验方法	9
2.2.1 果蝇培养.....	9
2.2.2 果蝇大脑免疫荧光.....	10
2.2.3 果蝇头部蛋白质免疫印迹（Western Blot）	11
2.2.4 果蝇寿命统计.....	12
2.2.5 果蝇爬管实验.....	12

2.2.6 果蝇头部蛋白免疫沉淀-质谱分析 (IP-MS)	13
2.2.7 Mito-Tracker 果蝇脑组织线粒体染色	13
2.2.8 果蝇头部总 RNA 提取	14
2.2.9 RNA 反转录	14
2.2.10 实时荧光定量 PCR	15
三、研究结果	17
3.1 构建分别在神经元和胶质细胞中表达 uN2CpolyG 蛋白的果蝇 NIID 模型	17
3.2 果蝇神经元或胶质细胞特异性表达 uN2CpolyG 的病理特征检测	19
3.3 果蝇神经元或胶质细胞特异性表达 uN2CpolyG 蛋白的行为学检测 ...	21
3.4 胶质细胞与神经元来源 uN2CpolyG 结合蛋白质质谱分析	25
3.5 比较胶质细胞和神经元表达 uN2CpolyG 蛋白引起的细胞死亡水平 ...	28
3.6 比较胶质细胞和神经元表达 uN2CpolyG 引起线粒体形态与功能差异 .	30
四、讨 论	33
参考文献	35
致 谢	39

摘要

神经元核内包涵体病（Neuronal intranuclear inclusion disease，简称 NIID）是以神经元核内包涵体为特征的神经退行性疾病。研究表明，核内包涵体不仅出现在神经元中，还广泛出现在患者的胶质细胞等多种类型细胞中。尽管神经退行性病变与神经元中的致病蛋白毒性密切相关，但胶质细胞中致病蛋白表达也可能对疾病的病理和症状产生影响。

本研究希望探究胶质细胞和神经元中 *NOTCH2NLC* 上游开放阅读框翻译的多聚甘氨酸（uN2CpolyG）蛋白表达如何影响 NIID 的疾病发生发展。

我们首先使用 GAL4/UAS 系统分别在果蝇中分别构建神经元和胶质细胞特异性表达 uN2CpolyG 蛋白的模型；其次通过免疫荧光、寿命统计和爬管等实验对比病理和行为学表型；最后对细胞特异性表达的 uN2CpolyG 结合蛋白进行质谱检测，对比差异蛋白，揭示可能的调控机制。

实验结果表明胶质细胞较神经元表达 uN2CpolyG 蛋白形成更大的聚集体并引起较弱的寿命缩短和更晚更弱的运动能力减退表型，免疫沉淀耦联质谱分析（IP-MS）揭示不同来源 uN2CpolyG 结合蛋白中的差异蛋白富集于线粒体功能和细胞死亡通路，初步验证发现胶质细胞与神经元来源 uN2CpolyG 引起细胞凋亡的时间和程度存在差异。

本研究揭示了胶质细胞对 NIID 发病与疾病进程的影响，阐释细胞类型特异性表达致病蛋白的潜在致病机制，为疾病诊断和治疗提供新的思路。

关键词：神经退行性疾病，神经元核内包涵体病，胶质细胞，免疫沉淀耦联质谱分析，细胞凋亡

Abstract

Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID) is a neurodegenerative disease characterized by the existing of neuronal intranuclear inclusions. Current research shows that intranuclear inclusions not only exist in the neuron of NIID patients but also widely be found in other cell types including glial cells. Although neurodegeneration is closely related to the toxicity of pathogenic proteins in neuron, but the expression of pathogenic proteins in glial cells can also influence the disease pathology and symptoms.

This study aims to investigate whether and how the expression of poly-glycine protein (uN2CpolyG) translated from the upstream open reading frame of *NOTCH2NLC* gene in glial cells and neurons affects the pathogenesis and phenotypic progression of NIID.

First, we use GAL4/UAS system to construct NIID *Drosophila* models with glia- and neuron-specific expression of uN2CpolyG protein, respectively. Next, pathological and behavioral phenotypes were compared through immunofluorescence staining, lifespan analysis, and climbing assays. Finally, detecting differentially uN2CpolyG-binding proteins between cell-specific expressing models by mass spectrometry to reveal potential regulatory mechanisms.

Compared with neuron, expression of uN2CpolyG in glial cells results in larger protein aggregates, slighter shortening of lifespan and later and milder decline of motility. Immunoprecipitation coupled with Mass Spectrometry (IP-MS) result shows the enriched differentially binding protein of uN2CpolyG expressed by glial cells or neurons are associated with cell death and mitochondria biological process. Preliminary validation experiments demonstrate temporal and quantitative difference in apoptosis between glia- and neuron-specific uN2CpolyG expressing flies.

Revealing the impact of glial cells on the pathogenesis and progression of NIID contributes to the underlying pathogenic mechanisms of cell type-specific expression of disease-associated proteins, thereby providing novel insights for disease diagnosis

and therapeutic development.

Key words: neurodegenerative diseases, Neuronal Intranuclear Inclusion Disease, glial cell, Immunoprecipitation coupled with Mass Spectrometry, apoptosis

一、前言

1.1 短串联重复扩增疾病及其发病机制

短串联重复序列（STR）异常扩增会导致蛋白质水平的氨基酸串联重复，与多种疾病相关联。在蛋白质编码区域，CAG 重复序列扩展会引起多聚谷氨酰胺的氨基酸序列延伸，形成蛋白质聚集体并影响细胞正常生理功能的，导致亨廷顿舞蹈症以及脊髓小脑共济失调I型等疾病；在启动子、非编码区或内含子区域的三核苷酸串联重复数扩增（如 CGG,CCG,CTG,GAA 等）可能会影响基因的转录，在脆性 X 综合征和弗里德希共济失调中发挥致病作用；位于基因 3'端非翻译区（3'UTR）的三核苷酸重复扩增会导致 RNA 的积累，从而干扰 RNA 结合蛋白的正常功能以及 RNA 剪接过程；此外，在 5'端非翻译区（5'UTR）的一个上游开放阅读框中的 GGC 重复序列扩增会导致病理性多聚甘氨酸（polyG）蛋白的表达，是神经元核内包涵体疾病（Neuronal intranuclear inclusion disease，NIID）和脆性 X 相关震颤/共济失调综合征的主要致病机理^[4, 5]。

短串联重复扩增相关疾病的致病分子机制可以从 DNA、RNA 和蛋白质三个层次总结。在 DNA 层面，异常的串联重复数目能够通过影响 DNA 表观修饰，如启动子区域的过度甲基化导致转录沉默；或形成 R 环（R-loop），激活 DNA 损伤反应途径，加剧体细胞重复的不稳定性；在 RNA 层面，RNA 可能会形成复杂的空间结构阻碍其翻译，或招募 RNA 结合蛋白使之被隔离和亚细胞定位发生改变，影响其正常功能；在蛋白质层面，突变体蛋白质或是在没有经典 AUG 起始密码子的情况下通过重复相关的非 AUG 起始翻译产生的多聚肽段会形成聚集体，产生细胞毒性^[6]。

1.2 神经元核内包涵体病特征与致病机制研究现状

神经元核内包涵体疾病以核内包涵体为主要特征，临床表现具有异质性，包括肌无力、帕金森病、痴呆、脑白质病、特发性震颤视网膜病、自主神经功能障碍等^[7]。NIID 患者的组织病理检验发现核内包涵体广泛分布于中枢神经系统，包括神经元和星形胶质细胞，同时也出现在皮肤、肺、淋巴腺、肾等器官的体细胞中，直径 1.5-10 μ m，定位于核仁附近，p62 和泛素染色结果呈阳性（图 1-1）^[3, 8]。

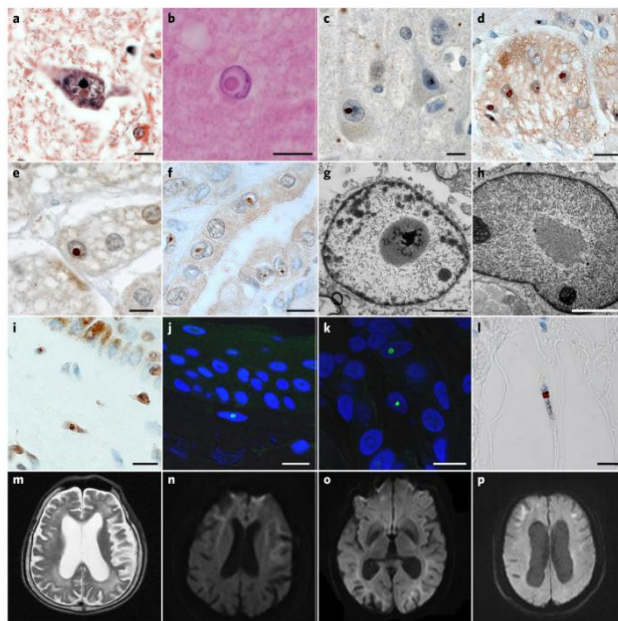


图 1-1 NIID 患者组织病理学特征和核磁共振成像（MRI）结果^[3]

图片摘自 Sone, J., S. Mitsuhashi, A. Fujita, et al., Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease;

a, 颈脊髓前角神经元核内包涵体; b, 大脑皮层星形胶质细胞核内包涵体; c-f, 泛素免疫染色, 中央前回 (c), 肌肠丛 (d), 肾上腺皮质 (e) 和肾小管 (f); g, 颈脊髓星形胶质细胞核内包涵体电镜; h, 皮肤成纤维细胞电镜; i-l, 皮肤活检样本泛素免疫染色, 成纤维细胞 (i-j), 汗腺 (k), 脂肪细胞 (l); m-p, 患者核磁共振成像结果

2019 年, 来自中国和日本的研究团队相继报道了 *NOTCH2NLC* 基因 5'非翻译区 (5'UTR) 的 GGC 三核苷酸重复扩增是 NIID 的致病基因^[3, 8-10]。该突变主要发生在亚洲病例中, 欧洲报告的病例几乎为阴性^[11]。人类特异性基因 *NOTCH2NLC* 主要在放射状胶质细胞中表达, 在神经元分化和皮层神经发生中起重要作用^[7]。临床上, *NOTCH2NLC* 基因的 GGC 重复数目可用于基因诊断, 正常人的重复数目小于 40 次, 在患者中以 60 个重复作为诊断阈值, 处于中间值的 40-60 个重复被报道与 PD 和 ALS 有关^[7]。研究表明该基因除了与 NIID 相关, 与其它许多神经系统疾病如眼咽远端肌病^[12, 13]、肌萎缩侧索硬化^[14]、帕金森病^[15, 16]、阿尔茨海默病^[17]、脑淀粉样血管病^[18]等也存在关联。

随后针对 *NOTCH2NLC* 的研究发现其中的 GGC 重复片段位于该基因的上游开放阅读框 (*upstream reading frame, uORF*), 能够被翻译为含有多聚甘氨酸的 uN2CpolyG 蛋白, 该突变蛋白聚集在细胞、小鼠以及患者的核内包涵体中, 导致小鼠的运动能力下降、神经元丢失和寿命缩短等疾病表型 (图 1-2) ^[1, 19]。这些结果证明重复扩增的 GGC 序列被翻译为一种致病性多聚甘氨酸 (polyG) 蛋白,

导致核内包涵体形成以及神经退行性病变^[1, 19]。同时，脆性 X 相关震颤/共济失调综合征、眼肌型肌营养不良症也是由于多聚甘氨酸突变蛋白所导致，可以被归纳为一类多聚甘氨酸（polyG）疾病^[1, 19]。研究人员们进一步探究 uN2CpolyG 蛋白具体的致病机制以及其它可能的致病因素，发现 uN2CpolyG 蛋白聚集会引起 DNA 损伤修复功能异常^[1]、核层和核质运输受损^[20]、核糖体生物发生和翻译功能障碍^[21]、线粒体功能障碍^[22]、hnRNPM 功能障碍^[23]、小胶质细胞介导的神经炎症^[24]、自噬受阻^[25, 26]、血脑屏障受损^[27]等结果，从而影响细胞的正常功能并导致患病个体的疾病发生。

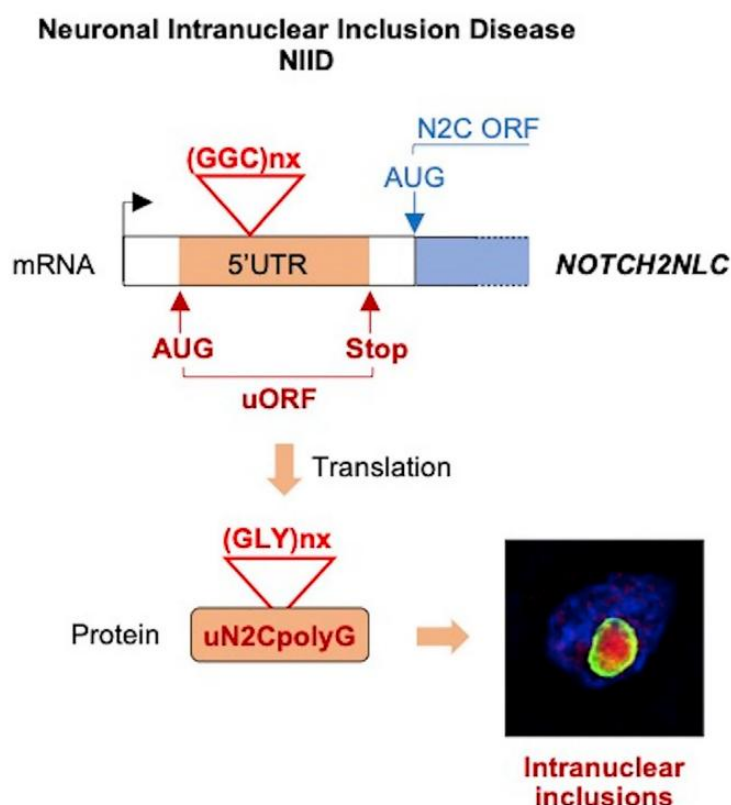


图 1-2 神经元核内包涵体病（NIID）致病机制^[1]

图片摘自 Boivin, M., J. Deng, V. Pfister, et al., Translation of GGC repeat expansions into a toxic polyglycine protein in NIID defines a novel class of human genetic disorders: The polyG diseases; NIID 的基因层面致病原因是 *NOTCH2NLC* 基因的 5'UTR 区域的 GGC 重复扩增，包含该重复扩增区域的上游开放阅读框能够翻译为含有多聚甘氨酸的 uN2CpolyG 蛋白，形成核内包涵体并产生蛋白毒性

1.3 胶质细胞在神经退行性疾病中的作用

胶质细胞是中枢神经系统重要的组成部分，对神经发育、支持和维持微环境稳态等方面发挥着重要作用^[28]。在病理状态下，胶质细胞能够感知环境变化并做出响应，从而对疾病的发生发展产生影响^[29-31]。小胶质细胞和星形胶质细胞作为

中枢神经系统炎症反应的关键调节因子,其功能异常所引发的神经炎症被报道与神经退行性疾病有关,如阿尔茨海默病、帕金森病和肌萎缩侧索硬化症^[32-34]。越来越多的研究发现在蛋白质异常聚集相关的疾病中,功能失调的胶质细胞可能在不同情况下起到神经保护或神经毒性这两种相反的作用,延缓或加剧疾病进展^[30]。因此胶质细胞对这类疾病的影响是复杂的,存在疾病类型、疾病进展阶段以及病人个体差异等多方面的异质性影响因素。

此前有研究者建立了在少突胶质细胞中选择性表达突变亨廷顿蛋白的转基因小鼠,验证了突变的亨廷顿蛋白通过下调髓鞘调节因子(myelin regulatory factor, MYRF)介导的髓鞘基因表达,影响成熟少突胶质细胞功能,导致年龄依赖性的脱髓鞘、进行性神经系统症状和寿命缩短,也表明在特定类型胶质细胞中特异性表达突变蛋白能够研究该类型细胞相关的致病机制^[35]。

1.4 关于胶质细胞在 NIID 中的调控作用的研究现状

根据对 NIID 患者样本的研究,核内包涵体在神经元和星形胶质细胞中均能够被检出。一项研究中分别对散发性 NIID 患者脑组织和家族性 NIID 患者的脑组织进行了研究,统计发现在大脑皮层、基底神经节区含有核内包涵体阳性的神经元比例约 5-30%,海马体略低,而核内包涵体阳性的星形胶质细胞中占比在 10% 到 30%之间(图 1-3)^[2]。

因此尽管该疾病以神经元核内包涵体为特征,但越来越多的临床病例报道反映在星形胶质细胞中也存在与神经元中比例相近的核内包涵体。在 2024 年报告的两例经基因证实的成人 NIID 病例中,患者表现为脑病样症状,组织病理学检测发现其脑组织中的核内包涵体阳性细胞以星形胶质细胞为主^[36]。考虑到星形胶质细胞对皮层发育和支持的功能,以及这类患者的症状相似性,推测星形胶质细胞核内包涵体为主的病例可能是 NIID 的一个亚型,具有特征性疾病表型。

目前对胶质细胞在 NIID 中的作用及其对病理特征贡献的研究较少。有研究者根据转录组学数据发现,在表达 uN2CpolyG 蛋白的小鼠中与小胶质细胞病理状态相关的基因表达发生变化,实验验证了 polyG 蛋白表达激活小胶质细胞,而消除小胶质细胞可以部分挽救运动和寿命相关表型,但不影响 polyG 蛋白聚集体的形成及其特性^[24]。然而,现有研究尚无法解答胶质细胞对 NIID 病理表现的调

控作用以及背后的机制。

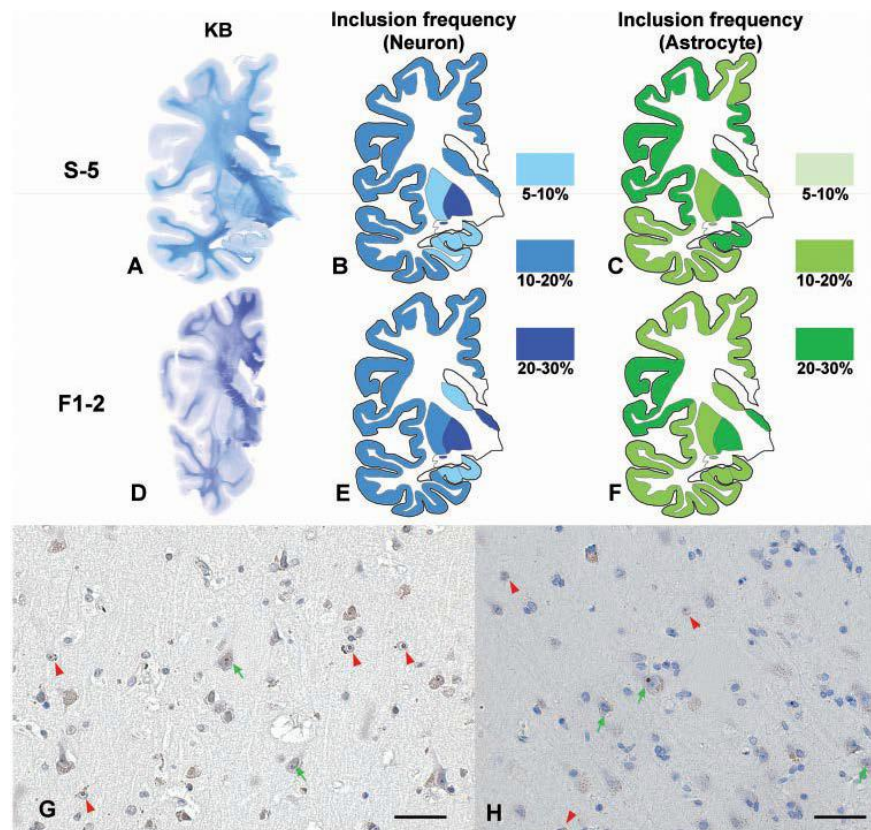


图 1-3 NIID 患者大脑中核内包涵体阳性神经元与星形胶质细胞比例^[2]

图片摘自 Sone, J., K. Mori, T. Inagaki, et al., Clinicopathological features of adult-onset neuronal intranuclear inclusion disease; A-C, 散发性 NIID 病例; D-F, 家族性 NIID 病例; A 和 D, 大脑半球冠状切片 Klüver-Barrera 染色, 前额叶白质出现显著脱髓鞘现象; B 和 E, 神经元中的核内包涵体比例与分布示意图; C 和 F, 星形胶质细胞中的核内包涵体比例与分布示意图; G 和 H, 前额叶大脑皮层 p62 免疫染色, 绿色箭头指示核内包涵体阳性神经元, 红色箭头指示核内包涵体阳性星形胶质细胞

1.5 果蝇模型在重复扩增疾病研究中的应用

动物模型的建立能够深入体内研究。果蝇作为一种受到广泛使用的模式生物, 具有遗传背景清晰、生长周期短、繁殖快、生物学结构相对简洁、遗传操作工具丰富等优势, 被广泛用于多种神经退行性疾病的研究^[37-39]。

GAL4/UAS 系统是果蝇研究中广泛使用的控制基因表达的遗传工具。该系统由 GAL4 和 UAS 两部分组成, GAL4 是一种酵母衍生的转录因子, 能够与上游激活序列 UAS 结合, 从而启动 UAS 下游基因的表达。通过调控 GAL4 的表达空间和时间可以控制 UAS 下游基因的时空表达模式^[40]。

2022 年有研究者建立了 NIID 果蝇模型, 用于致病机制以及治疗方法的研究

[22]。在果蝇中分别转入 GFP、uN2C-GFP（带有 9×GGC 重复扩增的 NOTCH2NLC 上游开放阅读框融合 GFP 蛋白序列）和 uN2CpolyG-GFP（带有 100×GGC 重复扩增的 NOTCH2NLC 上游开放阅读框融合 GFP 蛋白序列），采用 GAL4/UAS 系统构建在眼睛和全身细胞中表达目标蛋白的转基因果蝇品系。该果蝇模型能够模拟 p62 阳性和泛素阳性核内包涵体的形成、寿命缩短以及运动能力下降等 NIID 病理表型[22]。

果蝇胶质细胞在形态和功能、神经发育过程中发挥着与哺乳动物中相似的功能[28,31]。成年果蝇胶质细胞可分为五大亚型：皮质胶质细胞包裹着大脑整个皮质区域的神经元细胞体；星形胶质细胞调节神经元信号传导；鞘状神经胶质细胞包裹着整个神经元轴突束；神经下神经胶质细胞和神经周围神经胶质细胞具有类似血脑屏障的结构和功能[28]。果蝇胶质细胞除了能够匹配人类胶质细胞的主要功能，还被用于多种神经退行性疾病相关胶质细胞功能或表型的研究，为这类疾病的机制和神经胶质细胞的具体贡献提供新的见解[31]。目前已有成熟的神经元和胶质细胞特异性表达的 GAL4 果蝇品系，可用于相关研究。

因此，从研究方法的多样性、可操作性以及疾病模型的成熟性上来考量，果蝇是研究胶质细胞在 NIID 中的影响与功能的有力工具

1.6 本课题主要研究内容

本项目以 NIID 果蝇模型作为主要研究对象，使用分子、生化、显微成像和行为学分析等技术对 NIID 致病机制进行探究，重点关注胶质细胞在疾病中发挥的作用。首先，基于现有的 polyG 果蝇品系，使用 GAL4/UAS 系统分别在神经元与胶质细胞中表达 uN2CpolyG 蛋白，通过共聚焦显微成像对比不同细胞类型表达模式中 polyG 蛋白聚集体的数量、大小和形态等病理表型。其次，通过果蝇寿命统计和爬管运动等实验探究神经元或胶质细胞表达 uN2CpolyG 所产生的行为学表型，揭示神经元与胶质细胞在致病方面的不同作用。最后，对神经元与胶质细胞中表达的 uN2Cpoly 蛋白以及对照组蛋白的结合蛋白进行质谱检测，通过对比找出潜在关键调控分子和基因，揭示可能的调控机制。

二、材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验对象

本研究使用的 *UAS-GFP*、*UAS-uN2C-GFP*、*UAS-uN2CpolyG-GFP* 品系果蝇来北京大学第一医院王朝霞实验室^[22]。*GMR57C10-GAL4*、*repo-GAL4*、*Alrm-GAL4* 品系果蝇来源和具体基因型信息见参考文献^[41]。

2.1.2 实验试剂

表 2-1 主要实验试剂

试剂名称	公司	货号
葡萄糖	沪试	10010518
琼脂	沪试	10000561
红糖	古松	——
酵母粉	金龙鱼	——
玉米粉	野三坡	——
磷酸	沪试	10015418
丙酸	沪试	81011918
对羟基苯甲酸甲酯	沪试	30119470
95%乙醇	沪试	10009164
20×PBS 缓冲液	生工	B548117
4%组织细胞固定液	索莱宝	P1110
Triton X-100	生工	A110694-0100
含 DAPI 抗荧光猝灭封片液	VECTASHIELD	H-1500
指甲油	——	——
PIPA 裂解液（中）	碧云天	P0013C
蛋白酶抑制剂混合物	Roche	4693132001
超级核酸酶	碧云天	D7121-100KU
BSA 溶液	生工	A600332
BCA 试剂 A	碧云天	P0011-1
BCA 试剂 B	碧云天	P0011-2
LDS 蛋白上样缓冲液（4×）	invitrogen	2915176
DTT	BBI Life Sciences	A600332
SurePAGErM	GenScript	M00654
20×MOPS 缓冲液	磐超生物	PCDBE075
转膜缓冲液	雅酶	PS109
甲醇	沪试	10014118
三色预染蛋白 marker	雅酶	WJ103
无蛋白快速封闭液	雅酶	PS108P

TBS/Tween 缓冲液 (10×)	雅酶	PS103
快速剥离缓冲液	雅酶	PS107
SuperSignal™ West Pico PLUS 化学发光底物	Thermo Fisher	34580
Anti-GFP 琼脂糖磁珠	MedChemExpress	HY-K0246
Mito-Tracker Red CMXRos	碧云天	C1049B
Trizol	Ambion	15596-018
异丙醇	沪试	80109218
三氯甲烷	常试	
75%乙醇	沪试	80176961
FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂	天根	KR118
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	Toyobo	QPK-201

2.1.3 抗体信息

表 2-2 主要抗体信息

抗体英文名称	种属	公司	货号
Anti-GFP antibody	兔	Abcam	ab290
Anti-Ubiquitin antibody	小鼠	Enzo Life Sciences	BML-PW8810
Anti-Ref(2)P antibody	兔	Abcam	ab178440
Anti-Cleaved caspase3(Asp175) antibody	兔	Cell Signaling Technology	9661T
Anti-β-Actin (HRP-conjugated) antibody	小鼠	康城	KC-5A08

2.1.4 实验仪器

表 2-3 主要实验仪器

仪器名称	公司	型号
恒温恒湿培养箱	宁波江南仪器厂	HWS-500
体式显微镜	Motic	SMZ-171
旋转培养器	其林贝尔	QB-328
组织研磨器	天根	OSE-Y30/50
荧光定量 PCR 仪	Agilent	Mx3000P
共聚焦显微镜	尼康	A1
干式转印系统	Thermo Fisher	Iblot2
Eblot 电子压片成像仪	易学特	Touch Imager
Envision 多模式读板仪	PerkinElmer	EnVision 2105
NanoDrop One 微量紫外-可见分光光度计	ThermoScientific	ND-ONE-W

2.2 实验方法

2.2.1 果蝇培养

表 2-4 果蝇培养基配方

组分	体积/质量
葡萄糖	525 g
琼脂	100 g
红糖	262 g
酵母粉	600 g
玉米粉	591 g
ddH ₂ O	10.8 L
防腐剂 I	101 mL
防腐剂 II	125 mL

表 2-5 防腐剂 I 配方

组分	体积
85% 磷酸	41.5 mL
丙酸	418 mL
ddH ₂ O	定容到 1 L

表 2-6 防腐剂 II 配方

组分	质量/体积
对羟基苯甲酸甲酯	200 g
95%乙醇	定容到 1 L

1) 按照果蝇培养基配方依次称量除防腐剂外的组分并加入到电饭锅中, 搅拌均匀, 加热至沸腾后停止加热, 持续搅拌至温度下降到 55-60℃, 加入防腐剂 I 和 II 搅拌均匀;

2) 使用定制的分装器将培养基分装至塑料果蝇管中, 静置于室温环境中盖上纱布放置过夜, 待培养基冷却凝固且冷凝水蒸发后, 塞上海绵塞, 置于 4℃ 冰箱保存;

3) 果蝇培养于装有培养基的培养管中, 置于 25℃ 培养箱。

2.2.2 果蝇大脑免疫荧光

表 2-7 PBT 缓冲液配方

组分	体积
1×PBS 缓冲液	485 mL
10% Triton X-100	15 mL

1) 准备以下实验器材以及试剂用于解剖果蝇大脑：体式显微镜、常规镊子 1 个、解剖镊 2 个、透明解剖盘 1 个、冰盒、1×PBS 缓冲液、1.5 mL 离心管；

2) 首先根据平衡子表型挑选在杂交后代中挑选目的基因型的雄性果蝇，使用二氧化碳进行麻醉，装入 1.5 mL 离心管中置于冰上保持麻醉状态；

3) 在解剖盘中倒入约 5 mL 1×PBS 缓冲液覆盖中央部分，将麻醉的果蝇倒于解剖盘无液体部分，使用解剖针从胸部插入果蝇身体，将其仰面固定住，全部固定好后连同解剖针将果蝇移至液体中，保证果蝇完全浸没于缓冲液中；

4) 先使用解剖镊将果蝇口器拔除，再从空洞处将脑子的外壳向两侧撕扯开，剥离果蝇头部外壳、复眼和脂肪组织，使得大脑完全暴露的同时保留与身体的连接部分；

5) 将解剖好的果蝇转移到装有 PBS 缓冲液的 1.5 mL 离心管中置于冰上，相同基因型果蝇放在一起，约 10-15 只每管；

6) 待全部果蝇解剖完毕后弃去 PBS 缓冲液，每管加入 1 mL 4%组织细胞固定液，将离心管固定于旋转培养器上，室温固定 45 分钟。

7) 弃去固定液，每管加入 1 mL 1×PBT 溶液洗去残余固定液，室温混匀 10 分钟，此过程重复三次，最后加入 PBS 缓冲液；

8) 将固定后的果蝇和少量 PBS 缓冲液重新转移到解剖盘上，将大脑与身体分离，对大脑上附着的脂肪和丝状物进行进一步的清理，将完成精细解剖的果蝇大脑转移到装有 PBS 缓冲液的 0.6 mL 离心管中；

9) 使用 PBT 配制一抗溶液，加入 5%NDS 和适当稀释比例的一抗；

10) 弃去 PBS 后每管加入约 50 mL 一抗溶液，置于 4℃冰箱中的摇床上过夜孵育，取出后先于室温放置 20 分钟，回收一抗，再用 PBT 清洗三次，每次 10 分钟；

11) 使用于一抗相同方法配制二抗溶液，每管加入约 50 mL 二抗溶液，避光

室温孵育 2 小时，使用 PBT 清洗三次，每次 10 分钟，最后加入适量 PBS；

12) 在载玻片上标记好样品基因型、年龄、抗体信息和实验日期，贴上空心垫圈，在中央滴加一滴含 DAPI 抗荧光猝灭封片液，使用解剖镊将果蝇大脑转移到封片液中，调整大脑位置并使其全部正面/背面朝上，盖上盖玻片后在边缘轻轻涂上适量指甲油，待晾干后存放于玻片盒中，于 4℃ 保存；

13) 使用 Nikon A1 正置激光扫描共聚焦显微镜对样品进行拍摄。

2.2.3 果蝇头部蛋白质免疫印迹 (Western Blot)

1) 在冰上使用 RIPA (中) 配置裂解液，加入超级核酸酶和蛋白酶抑制剂；

2) 根据平衡子表型挑选杂交后代中的目的基因型果蝇，于所需年龄麻醉后转移到 15 mL 离心管中，冻存在 -80℃ 冰箱；

3) 在冰盒中装入干冰，并在干冰上放铺上一张纸，将装有果蝇的离心管从 -80℃ 冰箱取出，立即剧烈敲击桌面 5~10 次，将果蝇头部与身体分离，随即将果蝇从离心管中倒在滤网上，使果蝇头部通过筛网收集在垫在干冰上的纸张上，而身体部分由于体积更大不通过滤网而被弃去；

4) 对过筛的果蝇头部使用毛刷进一步进行分选和计数，收集于 1.5 mL 离心管中，各基因型约 50 只，加入裂解液，每个脑子 1.5 μ L，静置约 30 分钟；

5) 裂解后的样品在 4℃，13000rpm 离心 10 分钟，取上清液；

6) 超声处理上清液，4℃，13000rpm 离心 10 分钟，再次取上清液；

7) 通过 BCA 定量试剂盒对蛋白质进行定量；

8) 配置煮样体系，用裂解液将蛋白溶液稀释至相同浓度，LDS: DTT: 蛋白样品=5: 2: 13；

9) 95℃ 金属浴 10 分钟；

10) 准备电泳缓冲液，根据目的蛋白大小选择合适的 PAGE 胶和蛋白 marker，对样品进行上样，两侧用 35% LDS DTT 压槽，上样完成后建立冰浴环境开始跑胶至 marker 跑到合适位置；

11) 根据实验需求和目的蛋白性质选择使用干转或湿转方法进行转膜；

12) 将转好的膜转移至小盒子中用快速封闭液进行封闭，在摇床上缓慢摇晃 1 小时；

- 13) 封闭好的膜用 TBST 洗三次, 每次 5 分钟;
- 14) 使用通用抗体稀释剂稀释一抗, 加入到装有膜的盒子中, 4°C 摇床孵育过夜;
- 15) 回收一抗保存于 4°C, 用 TBST 洗膜三次, 每次 5 分钟;
- 16) 用抗体稀释液配制二抗, 加入到盒子中, 室温孵育 1 小时, TBST 洗膜三次, 每次 5 分钟;
- 17) 1: 1 配制发光液, 将膜充分浸泡在发光液中, 转移至 eblot 样品台上进行曝光;
- 18) 若需孵育其它抗体, 加入 10 mL 抗体剥离液洗脱 30 分钟, 用 TBST 洗膜三次, 每次 5 分钟, 重复封闭、抗体孵育、显影步骤。

2.2.4 果蝇寿命统计

- 1) 每日收集目的基因型的杂交子代果蝇, 雌雄分开放置在装有含酵母果蝇培养基的培养管中, 每管约 20 只, 记录基因型和羽化日期;
- 2) 每 3 天将果蝇转移到新的培养管中, 并记录死去的果蝇数目;
- 3) 待果蝇全部死亡后, 汇总数据绘制生存曲线。

2.2.5 果蝇爬管实验

- 1) 提前准备无酵母培养基, 配方同表 2-4 果蝇培养基配方, 不添加酵母粉;
- 2) 每日收集目的基因型的杂交子代果蝇, 雌雄分开放置在装有含酵母果蝇培养基的培养管中, 25°C 培养, 在进行爬管实验前 12-24 小时将果蝇麻醉, 以每管 10 只分装到装有无酵母培养基的培养管中, 25°C 培养;
- 3) 将待检测果蝇倒入爬管设备^[42]的透明管中, 安装于检测设备上, 记录实验时间、果蝇性别、年龄、基因型和放置顺序;
- 4) 安装 DV, 保证视野内包含整个塑料管且底部处于同一水平线;
- 5) 设置设备程序为每隔 10 秒连续震动三次, 通过剧烈的上下震动将果蝇全部震落到透明管底部, 视频记录果蝇从管底向上攀爬的过程, 此过程重复三次;
- 6) 通过视频剪辑软件截取视频中果蝇从管底开始爬行 5 秒后的位置截图;
- 7) 利用 RflyDetection 软件对截图中的果蝇爬行距离进行测量, 每管 10 只果

蝇的爬行距离取平均值，记录测量结果^[42]。

2.2.6 果蝇头部蛋白免疫沉淀-质谱分析 (IP-MS)

- 1) 组织裂解、蛋白质提取和蛋白质浓度测试步骤同 Western Blot 实验;
- 2) 磁珠预处理: 取适量 Anti-GFP 琼脂糖磁珠混悬液至 1.5 mL 离心管中, 使用磁性分离器弃去上清液, 加入与悬浮液等体积的平衡缓冲液 (50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4), 反复吹打充分混匀, 磁性分离弃上清, 重复两至三次;
- 3) 向磁珠中加入蛋白样品, 置于旋转培养器上室温孵育 1 小时;
- 4) 磁性分离取出上清, 使用磁珠体积 5 倍的洗涤缓冲液 (50 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4) 清洗磁珠, 磁性分离弃上清, 重复两至三次, 得到目的蛋白与靶蛋白和磁珠的复合物;
- 5) 采用变性洗脱方法, 向磁珠中加入等体积的 2× SDS-PAGE Loading Buffer, 混匀后 95°C 金属浴 10 分钟, 磁性分离收集上清液, 用于后续 SDS-PAGE 检测和质谱检测。

2.2.7 Mito-Tracker 果蝇脑组织线粒体染色

- 1) 使用 DMSO 配制 200 μ M 储存液, 保存于 -20°C;
- 2) 使用 PBS 将储存液 1: 1000 稀释至 200 nM 工作液, 37°C 预热;
- 3) 在 PBS 中解剖约 5 只雄性果蝇大脑, 转移到装有 Mito-Tracker Red CMXRos 溶液的 0.6 mL 离心管中;
- 4) 瞬时离心使果蝇大脑完全浸入溶液中, 在摇床上室温避光孵育 5 分钟;
- 5) 弃去 Mito-Tracker 工作液, 使用 PBS 清洗一次果蝇大脑;
- 6) 在载玻片上标记好样品基因型、年龄、抗体信息和实验日期, 贴上空心垫圈, 在中央滴加适量 PBS 缓冲液, 使用解剖镊将果蝇大脑转移到垫圈中央, 调整大脑位置并使其全部背面朝上, 盖上盖玻片后再边缘轻轻图上适量指甲油;
- 7) 制片完成后立即使用 Nikon A1 正置激光扫描共聚焦显微镜对样品进行拍摄。

2.2.8 果蝇头部总 RNA 提取

- 1) 根据平衡子表型挑选杂交后代中的目的基因型果蝇, 于所需年龄麻醉后转移到 15 mL 离心管中, 冻存在-80℃冰箱;
- 2) 在冰盒中装入干冰, 并在干冰上放铺上一张纸, 对实验环境使用 75%乙醇或 RNase-away 试剂进行清洁, 去除 RNA 酶;
- 3) 将装有果蝇的离心管从-80℃冰箱取出, 立即剧烈敲击将果蝇头部与身体分离, 过筛使果蝇头部收集在垫有干冰的纸张上;
- 4) 对过筛的果蝇头部使用毛刷进一步进行分选和计数, 收集于 1.5 mL 离心管中, 约 50 个果蝇头每管;
- 5) 每管加入 1 mL Trizol, 使用手持式组织研磨仪进行研磨, 静置 5 分钟;
- 6) 加入 200 μ L 三氯甲烷, 缓慢上下颠倒混匀。静置 5 分钟;
- 7) 12000rpm, 4℃离心 15 分钟, 液体分成上层水相、下层有机相和中间层; 将上层水相转移到新的 1.5 mL 离心管中;
- 8) 以 1: 1 比例向水相中加入异丙醇, 充分混匀后在冰上静置 30 分钟;
- 9) 12000rpm, 4℃离心 10 分钟, 得到白色胶状沉淀, 弃上清;
- 10) 加入 500 μ L 75%乙醇重悬沉淀, 7500g, 4℃离心 5 分钟;
- 11) 重复步骤 10) 两次
- 12) 弃去上清, 7500g, 4℃离心 5 分钟;
- 13) 弃去上清, 开盖在超净台晾干 15 分钟;
- 14) 加入 30 μ L RNase-free ddH₂O 溶解 RNA, 55℃水浴 10 分钟, 使用 NanoDrop 测定 RNA 浓度和纯度;
- 15) 提取的 RNA 立即反转录或保存于-80℃。

2.2.9 RNA 反转录

- 1) 使用天根 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂, 实验方法参考试剂盒说明书;
- 2) 将模板 RNA 在冰上解冻, 5× FastKing-RT SuperMix 和 RNase-Free ddH₂O 在室温解冻, 解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀, 瞬时离心;
- 3) 在冰上配置反转录体系, 如下表所示;

表 2-8 反转录反应体系

组分	体积
5× FastKing-RT SuperMix	4 μL
Total RNA	1.5 μg
RNase-Free ddH ₂ O	补足到 20 μL

4) 使用 PCR 仪运行反转录程序，如下表所示；

表 2-9 反转录程序

反应温度	反应时间
42°C	15 分钟
95°C	3 分钟

5) 反转录得到的 cDNA 保存于 -80°C。

2.2.10 实时荧光定量 PCR

1) 本实验采用 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒，实验方法参考说明书；

2) 根据目的基因设计引物，本研究使用到的引物如下表所示；

表 2-10 引物序列

引物名称	引物序列
<i>act5C</i> -F	AGGCCAACCGTGAGAAGATG
<i>act5C</i> -R	GGGGAAGGGCATAACCCTC
<i>cnc</i> -F	GTTTTCAAGCTCACCACCAAT
<i>cnc</i> -R	TCGCTGCTTCTTCTTCTCCTG
<i>CG17544</i> -F	GTA CTATGCTCTGACGCGCT
<i>CG17544</i> -R	GGTGGTCATGTGCTTCTCCA
<i>acox3</i> -F	TGCAGCCAACATCTACGATGA
<i>acox3</i> -R	CGCTCACGGTACTCTTCCAA
<i>FASN1</i> -F	CGCTCCACTCCAAGA ACTCG
<i>FASN1</i> -R	CAGGTTTAGTTGTAGGGGCTAGA

3) 将 cDNA、SYBR Green Realtime PCR Master Mix 和引物于冰上解冻，引物稀释至 10 μM；

4) 如下表所示配置反应液, 将除样品外的组分预混后分装到各孔中再加入样品;

表 2-11 实时定量 PCR 体系

组分	体积
ddH ₂ O	6.4 μ L
SYBR Green Realtime PCR Master Mix	10 μ L
上游引物 (10 μ M)	0.8 μ L
下游引物 (10 μ M)	0.8 μ L
样品溶液	2 μ L

5) 每个样品分别检测目的基因和内参基因, 各设置三个复孔, 在冰上的 96 孔 PCR 板中进行加样, 振荡混匀后, 离心避免液体残留在管壁上;

6) 运行 PCR 程序, 95°C 30 秒-[95°C 5 秒-57°C 15 秒-72°C 30 秒]循环 40 次-95°C 60 秒-55°C 30 秒-72°C 30 秒;

7) 用 $\Delta \Delta C_t$ 法对 qPCR 数据进行处理。

三、研究结果

3.1 构建分别在神经元和胶质细胞中表达 uN2CpolyG 蛋白的果蝇 NIID 模型

据报道，在神经元核内包涵体疾病（NIID）患者的神经系统、泌尿系统和皮肤组织的神经元、星形胶质细胞、肾小管细胞等细胞类型中均能够检测到嗜酸性核内包涵体。现有研究表明 uN2CpolyG 蛋白毒性是 NIID 的主要致病因素，但目前对于 uN2CpolyG 蛋白在不同类型细胞中表达对疾病发生的作用尚不明确。

已报道的 NIID 果蝇模型证明在果蝇中全身性表达 uN2CpolyG 蛋白能够模拟 NIID 的主要病理表型和行为学表型，包括 p62 和泛素阳性聚集体的形成、运动能力减退以及寿命的缩短。本研究在此基础上使用神经元特异性 GAL4 品系 *GMR57C10*-GAL4 和胶质细胞特异性 GAL4 品系 *repo*-GAL4 分别与已报道的 *UAS*-GFP、*UAS*-uN2C-GFP（带有 9×GGC 重复扩增的 *NOTCH2NLC* 上游开放阅读框融合 GFP 蛋白序列）、*UAS*-uN2CpolyG-GFP（带有 100×GGC 重复扩增的 *NOTCH2NLC* 上游开放阅读框融合 GFP 蛋白序列）品系果蝇进行杂交，得到能够在神经元或胶质细胞中特异性表达目的蛋白的如下基因型子代果蝇：
GMR57C10>GFP，*GMR57C10>uN2C-GFP*，*GMR57C10>uN2CpolyG-GFP*，*repo>GFP*，*repo>uN2C-GFP*，*repo>uN2CpolyG-GFP* (图 3-1)。

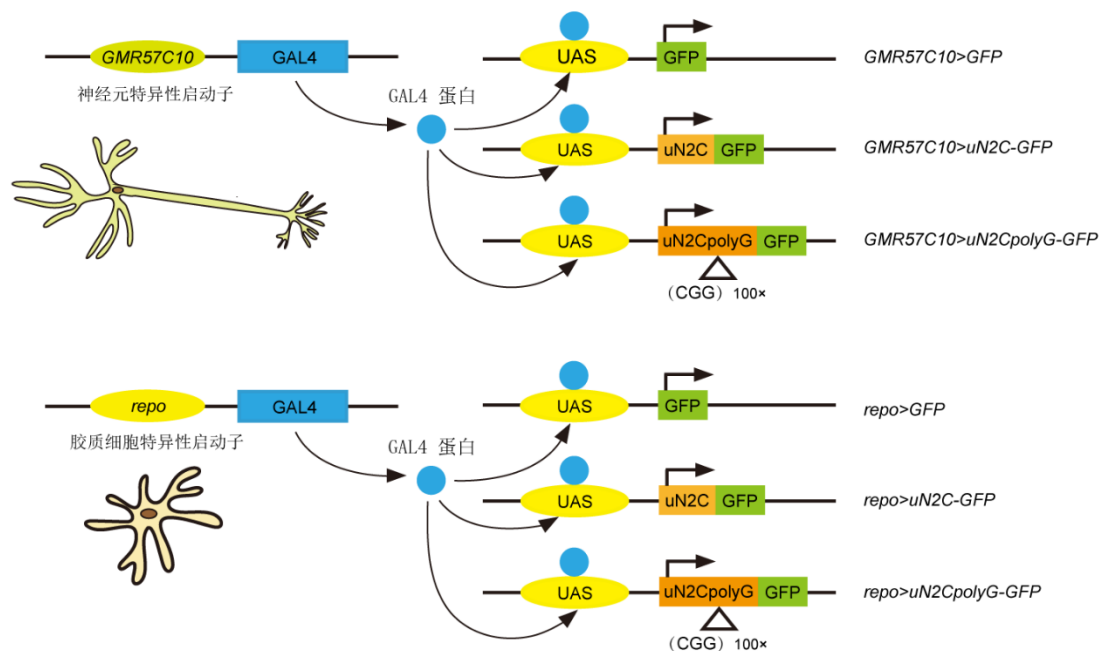


图 3-1 神经元或胶质细胞特异性表达 uN2CpolyG 蛋白 NIID 果蝇模型

使用 GAL4/UAS 系统构建细胞特异性表达 uN2CpolyG 蛋白的果蝇品系。使用 *GMR57C10*-GAL4 品系分别和 *UAS-GFP/uN2C-GFP/uN2CpolyG-GFP* 杂交，在神经元中特异性表达 GAL4 蛋白，GAL4 蛋白与 UAS 结合驱动下游目的蛋白表达。使用 *repo*-GAL4 品系分别和 *UAS-GFP/uN2C-GFP/uN2CpolyG-GFP* 杂交，在胶质细胞中特异性表达 GAL4 蛋白，GAL4 蛋白与 UAS 结合驱动下游目的蛋白表达

蘑菇体（mushroom body, MB）是果蝇大脑中的一对神经元组成的结构，包含大约 2200 个 Kenyon 细胞，负责嗅觉学习和记忆处理，功能上类似于哺乳动物的海马体。Kenyon 细胞的细胞体聚集在果蝇大脑的后部，其轴突汇聚并向前延伸形成 5 个叶状结构（lobe）。本研究选取神经元细胞核密集分布的蘑菇体后部所在区域作为主要观察对象（图 3-2），对于目的蛋白的形态以及病理特征进行检测。

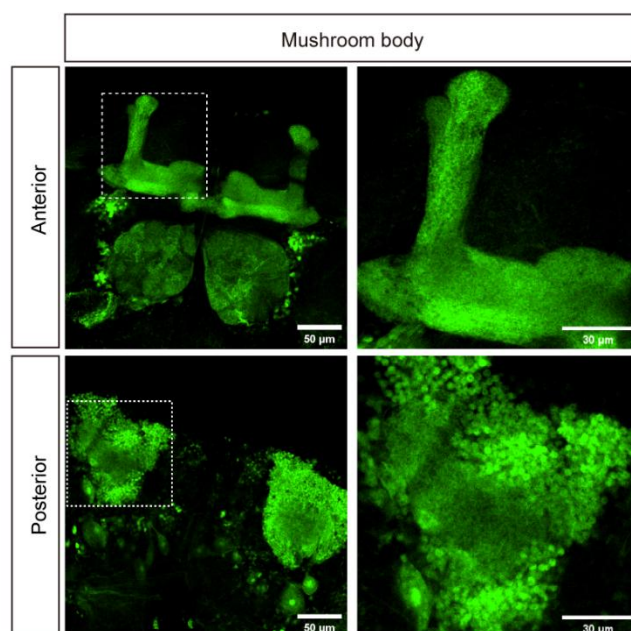


图 3-2 果蝇大脑蘑菇体（Mushroom body）结构示意图

分别展示从果蝇大脑前侧（Anterior）和后侧（Posterior）观察的蘑菇体形态，右图为左图虚线区域局部放大图像，右下角白色直线为标尺，标尺代表实际长度 50 μm （左图）或 30 μm （右图）

为确定基因型构建是否成功，我们首先对细胞特异性表达目的蛋白的果蝇进行了荧光成像和蛋白质水平的检测。由于目的蛋白均已携带绿色荧光蛋白（GFP），对杂交后得到的神经元或胶质细胞特异性表达组果蝇进行大脑解剖、固定和细胞核染色，制成封片后使用共聚焦显微镜进行观察，可见 *GMR57C10>GFP* 和 *repo>GFP* 基因型果蝇分别在神经元或胶质细胞中有 GFP 表达；无 GGC 重复扩增的 *GMR57C10>uN2C-GFP* 和 *repo>uN2C-GFP* 基因型果蝇分别在神经元或胶

质细胞中有相对较弱的 GFP 表达； *GMR57C10>uN2CpolyG-GFP* 和 *repo>uN2CpolyG-GFP* 基因型果蝇均能够形成聚集体，但是在形态上具有差异，前者形成的聚集体较小，后者形成的聚集体较大且形状不规则（图 3-3A）。随后进一步通过蛋白质免疫印迹实验检测到了以上基因型果蝇中均有相应的 GFP、uN2C-GFP、uN2CpolyG-GFP 蛋白表达（图 3-3B）。

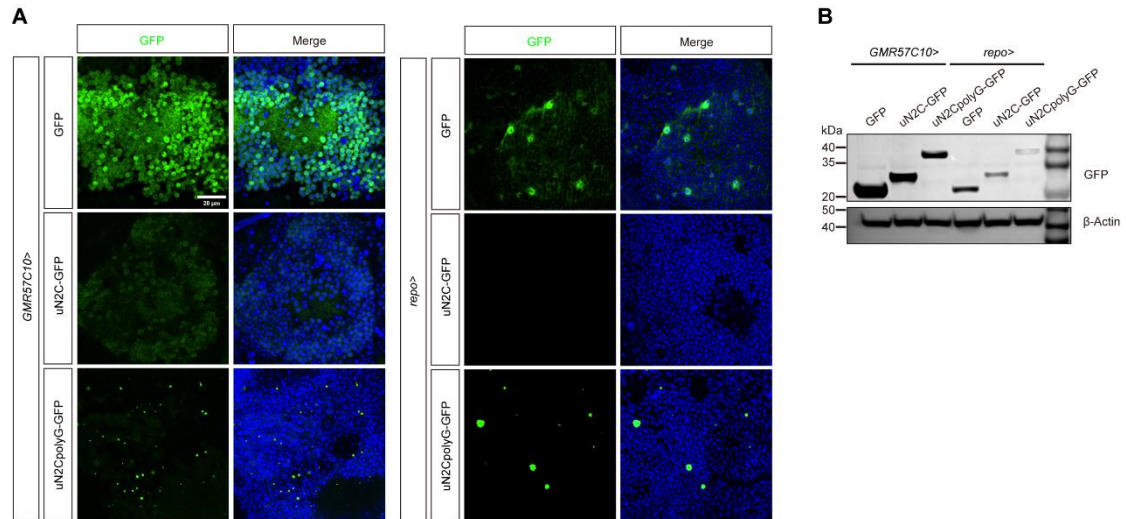


图 3-3 果蝇神经元或胶质细胞来源 uN2CpolyG 蛋白表达情况

A，神经元特异性表达的 *GMR57C10>GFP*，*GMR57C10>uN2C-GFP*，*GMR57C10>uN2CpolyG-GFP* 与胶质细胞特异性表达的 *repo>GFP*，*repo>uN2C-GFP*，*repo>uN2CpolyG-GFP* 果蝇的 GFP 荧光共聚焦成像结果，绿色信号展示 GFP 表达情况，蓝色信号展示 DAPI 染色的细胞核，右下角白色直线为标尺，代表实际长度 20 μm；B，蛋白质免疫印迹实验 (Western Blot) 检测相应基因型果蝇的 GFP、uN2C-GFP、uN2CpolyG-GFP 蛋白表达情况，以 β-actin 作为内参蛋白

以上 GFP 融合蛋白荧光成像和蛋白质免疫印迹实验结果证明本研究成功构建在神经元或胶质细胞中特异性表达 GFP/uN2C-GFP/uN2CpolyG-GFP 蛋白的果蝇模型，可用于后续对于细胞特异性 uN2CpolyG 蛋白对 NIID 疾病发生发展影响的研究。

3.2 果蝇神经元或胶质细胞特异性表达 uN2CpolyG 的病理特征检测

NIID 患者组织切片免疫荧光染色结果显示嗜酸性核内包涵体为 p62 和泛素阳性。在此前的小鼠和果蝇 NIID 模型中也检测到了 p62 和泛素阳性核内包涵体的形成^[22, 23]。为验证在果蝇中的神经元和胶质细胞特异性表达的 uN2CpolyG 是否具有 NIID 包涵体的主要病理特征，我们分别对神经元和胶质细胞中表达 uN2CpolyG 形成的聚集体进行了 Ref(2)P (果蝇中的 p62)和泛素免疫荧光染色。

经过 Ref(2)P 和泛素免疫共染色实验，我们在 *GMR57C10>uN2CpolyG-GFP* 果蝇脑组织中观察到聚集体与 Ref(2)P 和泛素的共定位现象（图 3-4）。

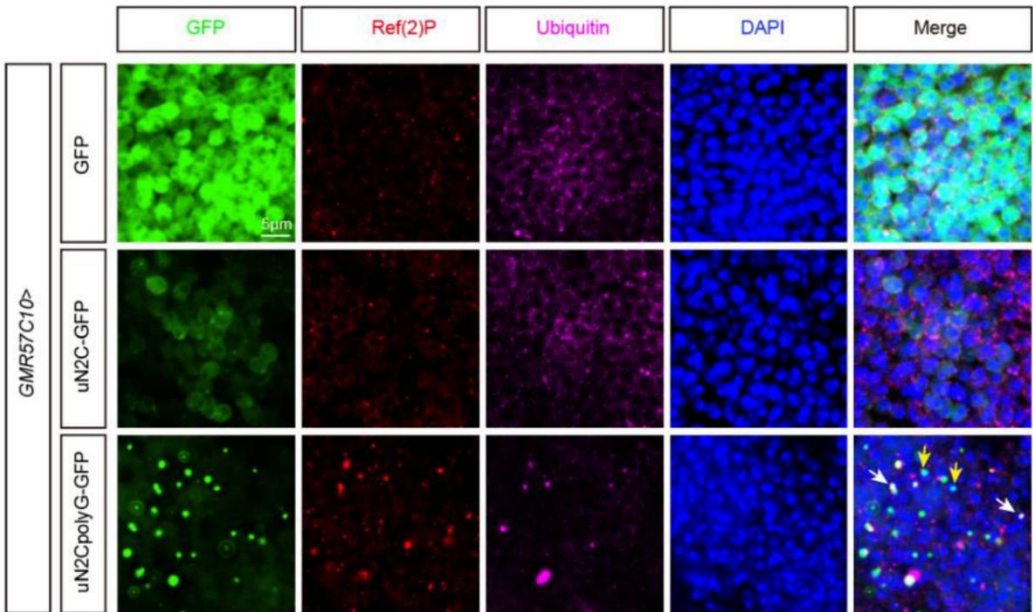


图 3-4 神经元表达的 uN2CpolyG 蛋白与 p62 和泛素共定位

神经元特异性表达 GFP、uN2C-GFP、uN2CpolyG-GFP 蛋白的果蝇大脑 Ref(2)P 与泛素 (Ubiquitin) 免疫荧光染色结果，绿色信号展示 GFP 表达情况，红色信号为 Ref(2)P 抗体信号，紫色信号为 Ubiquitin 抗体信号，蓝色信号展示 DAPI 染色的细胞核，白色箭头指示 uN2CpolyG 聚集体与 Ref(2)P 和 Ubiquitin 共定位信号，右下角白色直线为标尺，代表实际长度 5 μm

由于 *repo>uN2CpolyG-GFP* 果蝇的聚集体信号较强，为避免荧光信号串扰，我们选择激发光波长与 GFP 距离较远的荧光通道分别进行 Ref(2)P 和泛素免疫荧光染色，可见 Ref(2)P 与 uN2CpolyG 聚集体以及泛素与 uN2CpolyG 聚集体的共定位，皮尔逊相关性分析结果显示 uN2CpolyG-GFP 与 Ref(2)P 和泛素有显著的相关性，而在对照组中这两组信号无显著相关性(图 3-5)。

以上结果表明，神经元和胶质细胞表达 uN2CpolyG 蛋白的果蝇模型均能够模拟 NIID 患者中发现的主要聚集体病理特征。

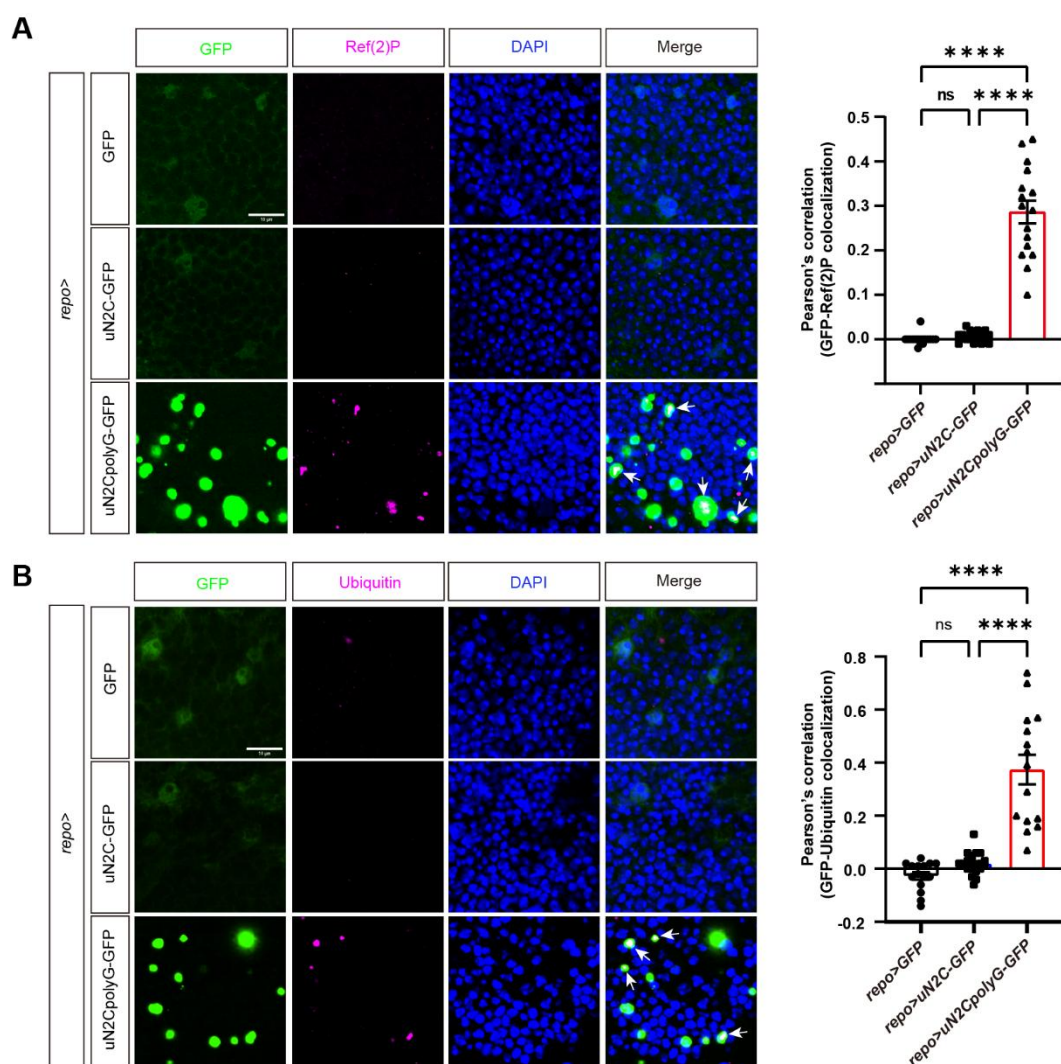


图 3-5 胶质细胞表达 uN2CpolyG 蛋白与 p62 和泛素共定位

A, 胶质细胞特异性表达 GFP、uN2C-GFP、uN2CpolyG-GFP 蛋白的果蝇大脑 Ref(2)P 免疫荧光染色结果, 绿色信号展示 GFP 表达情况, 紫色信号为 Ref(2)P 抗体信号, 蓝色信号展示 DAPI 染色的细胞核, 白色箭头指示 uN2CpolyG 聚集体与 Ref(2)P 共定位信号, 右侧为皮尔森相关系数分析结果; B, 胶质细胞特异性表达 GFP、uN2C-GFP、uN2CpolyG-GFP 蛋白的果蝇大脑 Ubiquitin 免疫荧光染色结果, 绿色信号展示 GFP 表达情况, 紫色信号为 Ubiquitin 抗体信号, 蓝色信号展示 DAPI 染色的细胞核, 白色箭头指示 uN2CpolyG 聚集体与 Ubiquitin 共定位信号, 右侧为皮尔森相关系数分析结果。皮尔森相关系数分析结果先进行正态检验, 符合正态分布使用 One-way ANOVA 统计检验, 不符合正态分布使用 Kruskal-Wallis 统计检验方法, *表示 p 值<0.05, **表示 p 值<0.01, ***表示 p 值<0.001, ****表示 p 值<0.0001。免疫荧光图右下角白色直线为标尺, 代表实际长度 10 μm

3.3 果蝇神经元或胶质细胞特异性表达 uN2CpolyG 蛋白的行为学检测

NIID 的全身性症状包括对患者寿命以及运动能力的影响, 先前的研究表明在小鼠和果蝇模型中也均能够检测到此表型, 果蝇中全身性表达 uN2CpolyG 会导致显著的寿命缩短和年龄依赖性的运动能力丧失^[22]。为探究特异性在神经元

或胶质细胞表达 uN2CpolyG 是否会产生寿命和运动能力的影响，并比较不同毒性蛋白来源对于果蝇个体的寿命和运动能力影响是否存在差异，本研究统计了各基因型果蝇的寿命和不同日龄的运动能力。

我们分别统计和绘制了各基因型雌、雄果蝇成虫 ($n > 200$) 的生存曲线并进行统计分析，结果显示在神经元中表达 uN2CpolyG 蛋白的果蝇出现显著的寿命缩短表型，而在胶质细胞中表达 uN2CpolyG 蛋白也会导致果蝇寿命的缩短，但影响程度显著低于神经元表达组 (图 3-6)。雌性 *GMR57C10>GFP*、*GMR57C10>uN2C-GFP*、*GMR57C10>uN2CpolyG-GFP* 果蝇的寿命中位数分别是 96 天、90 天和 30 天，*repo>GFP*、*repo>uN2C-GFP*、*repo>uN2CpolyG-GFP* 果蝇的寿命中位数分别为 72、54 和 54 天；雄性 *GMR57C10>GFP*、*GMR57C10>uN2C-GFP*、*GMR57C10>uN2CpolyG-GFP* 果蝇的寿命中位数分别是 66 天、66 天和 18 天，*repo>GFP*、*repo>uN2C-GFP*、*repo>uN2CpolyG-GFP* 果蝇的寿命中位数分别为 57、42 和 48 天，表明神经元表达 uN2CpolyG 蛋白对果蝇寿命的影响比胶质细胞表达该蛋白更为显著。

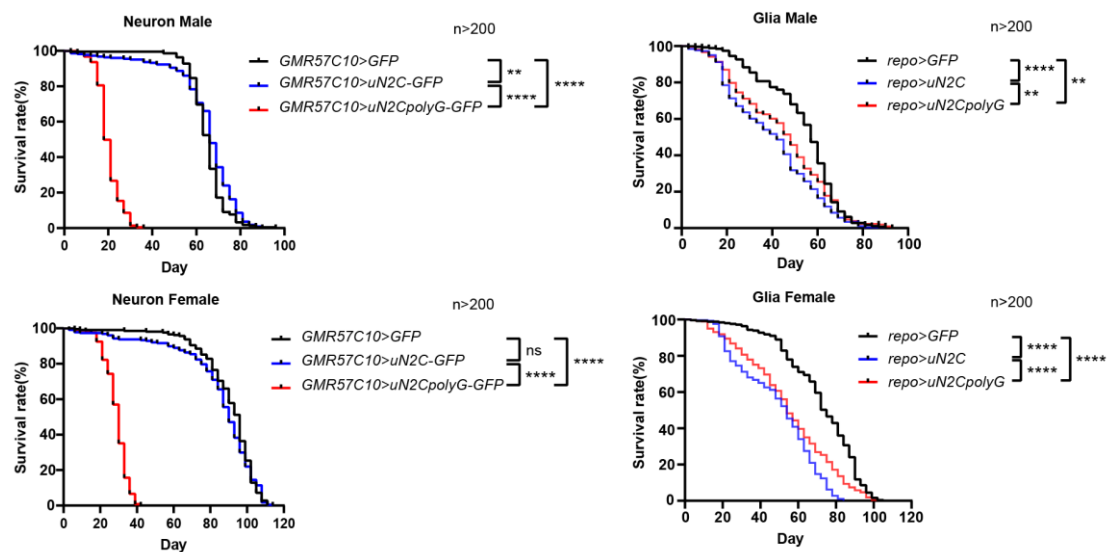


图 3-6 果蝇胶质细胞或神经元表达 uN2CpolyG-GFP 组与对照组生存曲线

雄性神经元表达组 (左上)、雄性胶质细胞表达组 (右上)、雌性神经元表达组 (左下)、雌性胶质细胞表达组 (右下) 果蝇生存曲线。样本量各基因型各性别大于 200 只，统计方法采用 Log-rank (Mantel-Cox) 检验，*表示 p 值 < 0.05 ，**表示 p 值 < 0.01 ，***表示 p 值 < 0.001 ，****表示 p 值 < 0.0001

在运动能力上，本研究采用快速迭代背地性检测方法对果蝇成虫的攀爬行为进行检测从而评估运动能力^[42]。根据基因型、性别和年龄进行分组，分别对 1 日龄、3 日龄、10 日龄、20 日龄和 40 日龄 (仅胶质细胞组) 的雌、雄果蝇攀爬能

力进行检测，测定其 5s 内的纵向攀爬距离。实验结果显示 1 日龄和 3 日龄果蝇中表达 uN2CpolyG 蛋白对运动能力无显著影响。*GMR57C10>uN2CpolyG-GFP* 果蝇在 10 日龄的时候相比较于对照组开始出现显著的运动能力下降，在第 20 天几乎丧失运动能力；雄性 *repo>uN2CpolyG-GFP* 果蝇截至 40 天未检测到显著的运动能力下降，而雌性在 40 天出现运动能力的下降（图 3-7）。

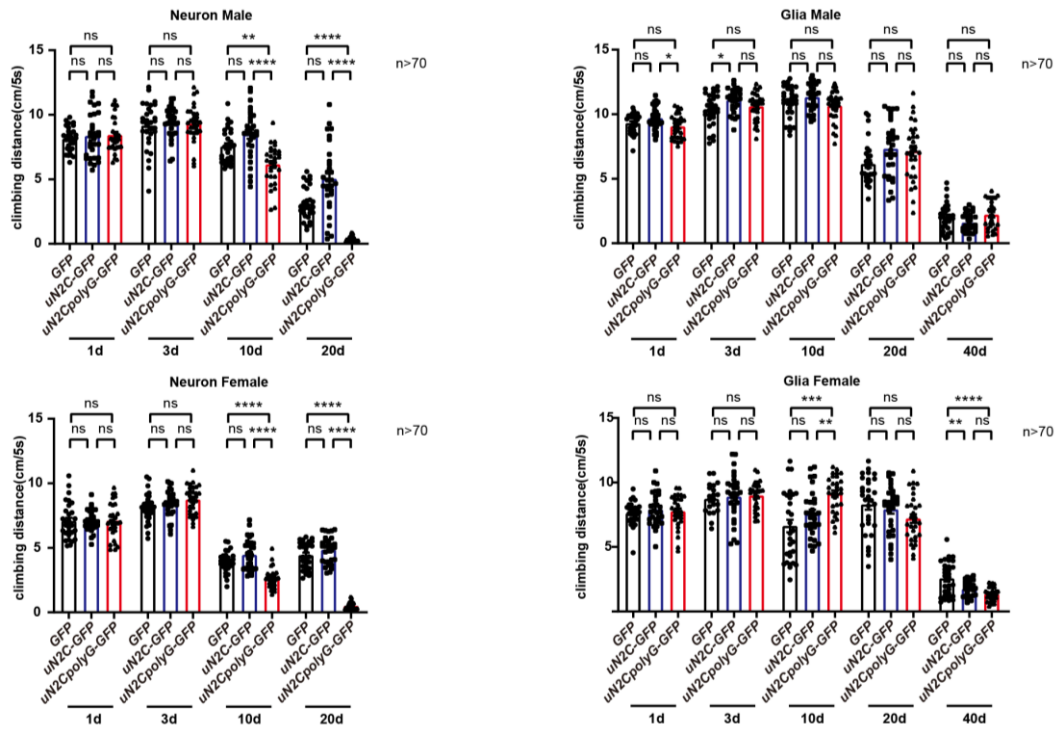


图 3-7 果蝇胶质细胞或神经元表达 uN2CpolyG-GFP 组与对照组攀爬能力统计

采集雌性、雄性神经元表达组果蝇 1、3、10、20 日龄攀爬数据，雌性、雄性胶质细胞表达组果蝇 1、3、10、20、40 日龄攀爬数据，记录被震落到透明塑料管底部的果蝇在 5s 内的垂直攀爬距离进行统计分析。样本量各基因型各性别大于 70 只，统计方法为先进行正态检验，符合正态分布使用 One-way ANOVA 统计检验，不符合正态分布使用 Kruskal-Wallis 统计检验方法，*表示 p 值<0.05，**表示 p 值<0.01，***表示 p 值<0.001，****表示 p 值<0.0001

对各基因型果蝇以 1 日龄果蝇的攀爬速度对后续时间点的攀爬速度进行归一化处理，得到运动能力指数（Performance Index, PI）。结果显示整体上果蝇运动能力随年龄增长而下降，神经元中表达 uN2CpolyG 蛋白在果蝇羽化 10 天后导致运动能力的显著下降，并且与对照组产生显著差异。胶质细胞表达组雄性果蝇在 20 日龄和 40 日龄时分别出现 *repo>uN2CpolyG-GFP* 与 *repo-GFP* 和 *repo>uN2C-GFP* 的 PI 显著性差异。雌性胶质细胞表达组果蝇在 10 日龄时出现 *repo>uN2CpolyG-GFP* 与对照组果蝇的显著性差异；从 20 日龄开始出现

repo>uN2CpolyG-GFP 相较于 *repo>GFP* 果蝇的 PI 显著性下降,而在 *repo>uN2C-GFP* 与 *repo>uN2CpolyG-GFP* 之间则不存在显著性差异 (图 3-8)。以上结果表明胶质细胞中表达 uN2CpolyG 蛋白对果蝇运动能力的影响显著低于神经元表达组。

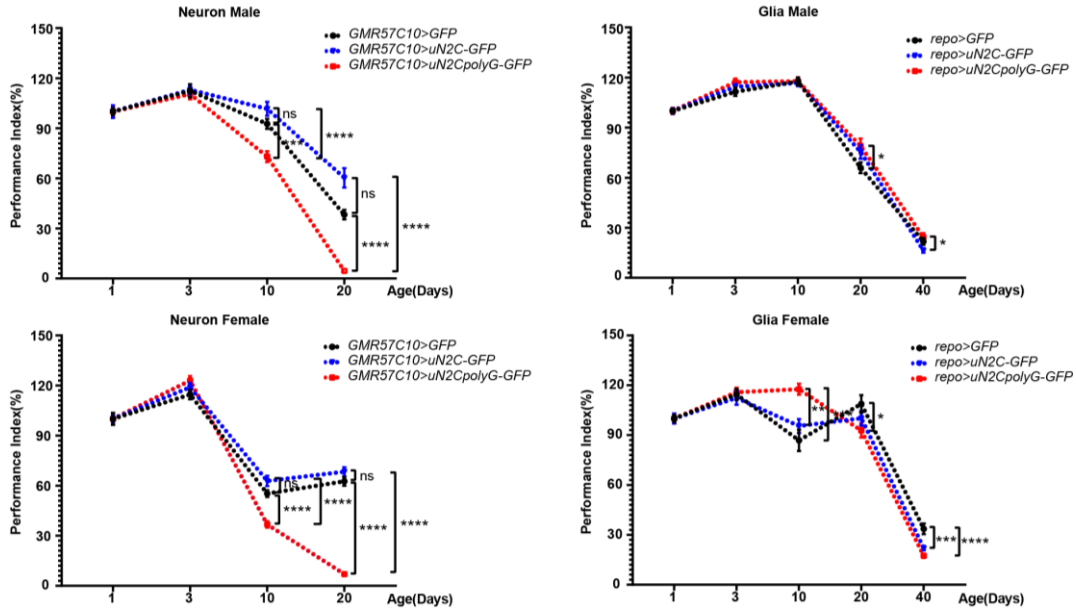


图 3-8 果蝇胶质细胞或神经元表达 uN2CpolyG-GFP 组与对照组运动能力指数折线图

以各组别、各基因型 1 日龄果蝇的攀爬距离对后续时间点攀爬距离数据进行归一化处理得到运动能力指数 (Performance Index, PI), 绘制折线图。统计方法为先进进行正态检验, 符合正态分布使用 One-way ANOVA 统计检验, 不符合正态分布使用 Kruskal-Wallis 统计检验方法, *表示 p 值 <0.05 , **表示 p 值 <0.01 , ***表示 p 值 <0.001 , ****表示 p 值 <0.0001

此外, 由于在 NIID 患者胶质细胞中发现的核内包涵体主要集中于星形胶质细胞, 本研究还使用了星形胶质细胞特异性表达的 *Alrm-GAL4* 品系分别与 *UAS-GFP*、*UAS-uN2C-GFP*、*UAS-uN2CpolyG-GFP* 品系进行杂交获得 *Alrm>GFP*、*Alrm>uN2C-GFP*、*Alrm>uN2CpolyG-GFP* 基因型的果蝇, 并对其进行了运动能力检测。雄性 *Alrm>uN2CpolyG-GFP* 果蝇在 10 日龄时开始出现相较于对照组显著的运动能力下降, 雌性 *Alrm>uN2CpolyG-GFP* 果蝇在 1 日龄时检测到相较于对照组的运动能力差异, 40 日龄时开始出现相较于对照组显著的运动能力下降。PI 指数分析结果表明星形胶质细胞表达 uN2CpolyG 蛋白在雄性 10 日龄、雌性 40

日龄时导致果蝇的攀爬能力显著下降（图 3-9）。

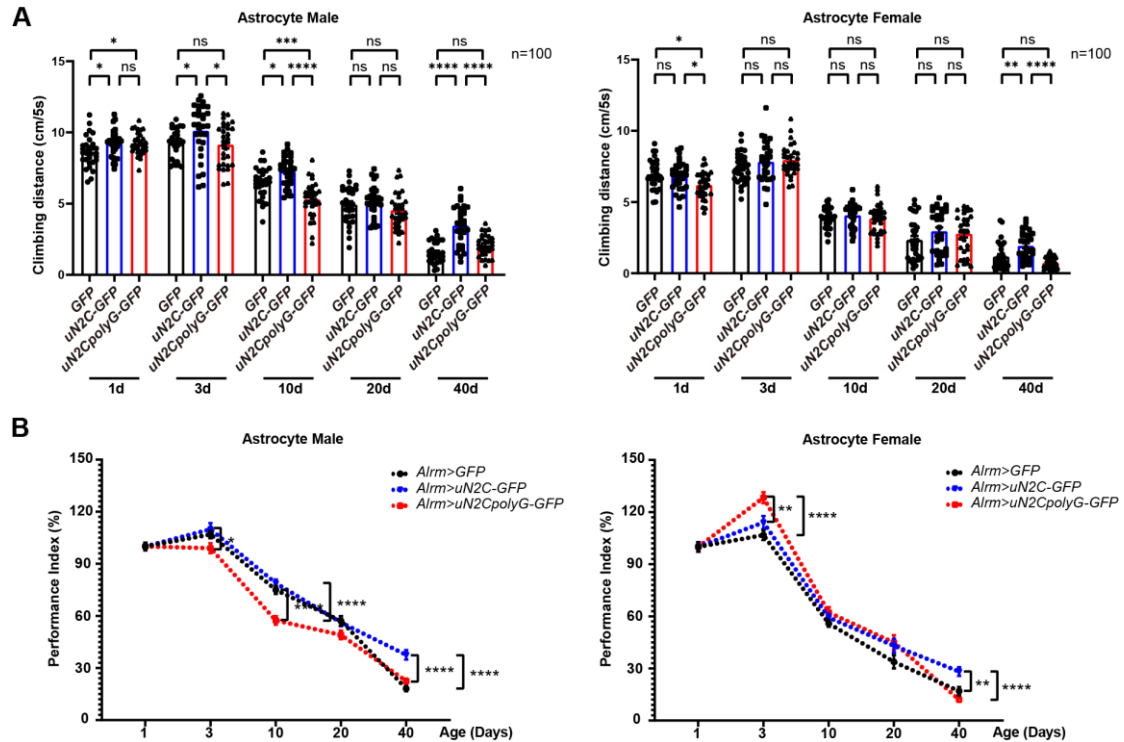


图 3-9 星形胶质细胞表达 uN2CpolyG-GFP 与对照组果蝇攀爬能力统计

A, 采集雌性、雄性星形胶质细胞表达组果蝇 1、3、10、20、40 日龄攀爬数据，记录被震落到透明塑料管底部的果蝇在 5s 内的垂直攀爬距离进行统计分析；B, 以 1 日龄果蝇的攀爬距离对各基因型后续时间点攀爬距离数据进行归一化处理得到 PI 指数，绘制折线图。样本量各基因型各性别大于 100 只，统计方法先进行正态检验，符合正态分布使用 One-way ANOVA 统计检验，不符合正态分布使用 Kruskal-Wallis 统计检验方法，*表示 p 值 < 0.05 ，**表示 p 值 < 0.01 ，***表示 p 值 < 0.001 ，****表示 p 值 < 0.0001

综上，胶质细胞表达 uN2CpolyG 蛋白与神经元表达 uN2CpolyG 蛋白相比较对于果蝇寿命以及运动能力的影响更低，这提示该蛋白对于不同类型细胞的毒性可能存在差异，在神经元和胶质细胞中引起不同的下游通路响应。与此前报道的全身性表达 uN2CpolyG 蛋白的寿命和运动能力检测结果相比较，神经元表达组与全身性表达所产生的疾病表型更加贴近，推测在胶质细胞中可能存在抵抗 uN2CpolyG 蛋白毒性的机制，或存在不同于神经元为主导的疾病表型贡献。

3.4 胶质细胞与神经元来源 uN2CpolyG 结合蛋白质谱分析

通过上述实验，我们验证了神经元或胶质细胞特异性表达 uN2CpolyG 蛋白的病理学特征和行为学表型差异。本研究希望进一步探究引起胶质细胞特异性 uN2CpolyG 蛋白表达模型寿命和运动能力表型较全身性或神经元表达组更弱的原因，寻找参与该过程的关键蛋白，揭示背后的分子机制。

在此前已发表的研究中，分别有研究者在 HEK293 细胞和 SY5Y 细胞中表达 uN2CpolyG 与对照蛋白，采用免疫沉淀耦联质谱分析（IP-MS）鉴定该致病蛋白的互作蛋白^[1, 23]。为了分别鉴定在果蝇模型中神经元和胶质细胞表达的 uN2CpolyG 蛋白的互作蛋白，并对比两者差异，本研究采用 IP-MS 方法对六组基因型的果蝇样本进行了检测和分析。

首先，我们通过分离果蝇头部并进行裂解获取总蛋白，使用抗 GFP 的磁珠分别结合其中的 GFP、uN2C-GFP、uN2CpolyG-GFP 蛋白进行免疫沉淀，对于 GFP 磁珠免疫沉淀蛋白进行验证，结果显示磁珠成功结合到了含有 GFP 的目的蛋白。随后，洗脱 GFP 磁珠结合蛋白作为质谱检测样品，SDS-PAGE 银染显示待测样品中蛋白条带清晰且分布正常，各泳道行为差异不明显，存在一定程度的高丰度蛋白（图 3-10）。

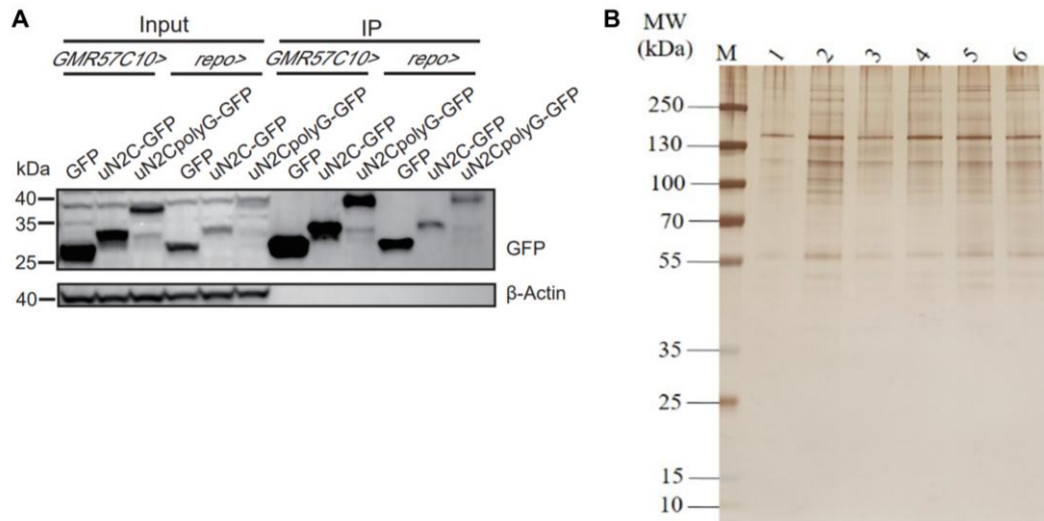


图 3-10 果蝇 IP-MS 检测样本本质控检测结果

A，每个基因型收集大于 150 只 10 日龄雄果蝇成虫，分离果蝇头部进行裂解得到总蛋白（input 组），用 GFP 磁珠免疫沉淀得到携带 GFP 标签的融合蛋白及其结合蛋白（IP 组），对以上两组蛋白样本进行 Western Blot 实验检测各基因型相应 GFP、uN2C-GFP、uN2CpolyG-GFP 蛋白，以 β-actin 作为内参；B，IP 组蛋白样品 SDS-PAGE 银染实验结果，泳道 1-3: *GMR57C10>GFP/uN2C-GFP/uN2CpolyG-GFP* 果蝇 IP 样品，泳道 4-6: *repo>GFP/uN2C-GFP/uN2CpolyG-GFP* 果蝇 IP 样品

经过蛋白质样品质控检验后，对共 6 组免疫沉淀样品进行质谱检测和搜库分析，经数据过滤后共鉴定到 39119 个肽段、29937 个独特肽段（unique peptides）、5289 个蛋白和 5249 个可定量比较的蛋白，将各基因型结果进行两两比对得到表达上调和下调的蛋白（图 3-11）。

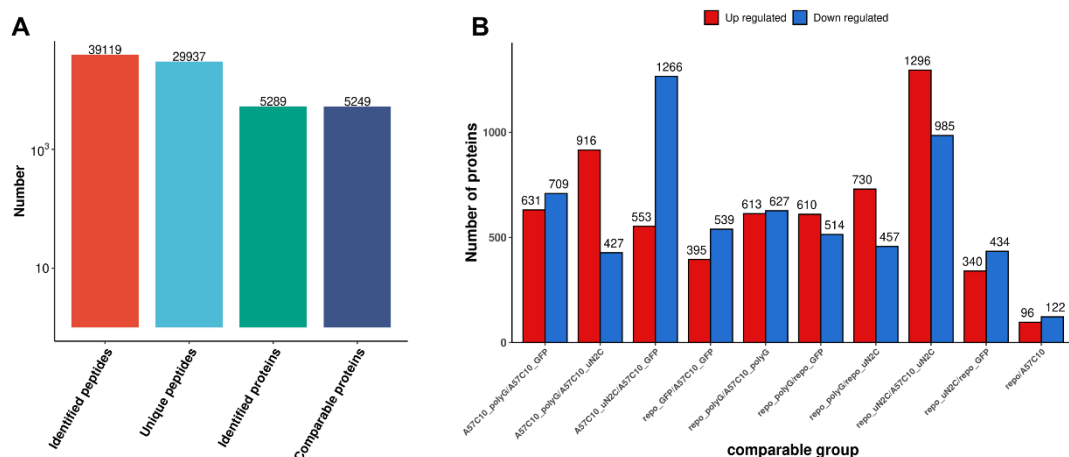


图 3-11 胶质细胞与神经元来源 uN2CpolyG 蛋白 IP-MS 肽段鉴定与差异蛋白总览

A, 将质谱检测结果进行搜库分析, 经数据过滤后鉴定到的肽段结果, 其中鉴定肽段数 (Identified peptides) 为 39119, 鉴定独特肽段数 (Unique peptides) 为 29937, 鉴定蛋白数为 5289, 可定量比较的蛋白数 (Comparable proteins) 为 5249; B, 不同基因型样品两两比较得到表达量上调和下调的差异蛋白分布柱状图, 将蛋白在两个样本中的相对定量值之比作为差异倍数 (Fold Change, FC), 以差异表达量变化超过 1.5 作为显著上调的变化阈值, 小于 1/1.5 作为显著下调的变化阈值

随后, 为了进一步鉴定这些差异蛋白相关的生物学功能从而揭示可能的差异性调控机制, 本研究对于筛选得到的差异蛋白进行了功能富集分析。GO 分类富集分析对比胶质细胞表达的 *repo>uN2CpolyG-GFP* 组与神经元表达的 *GMR57C10>uN2CpolyG-GFP* 组之间的差异蛋白, 发现与线粒体和能量代谢相关的蛋白显著上调 (图 3-12)。

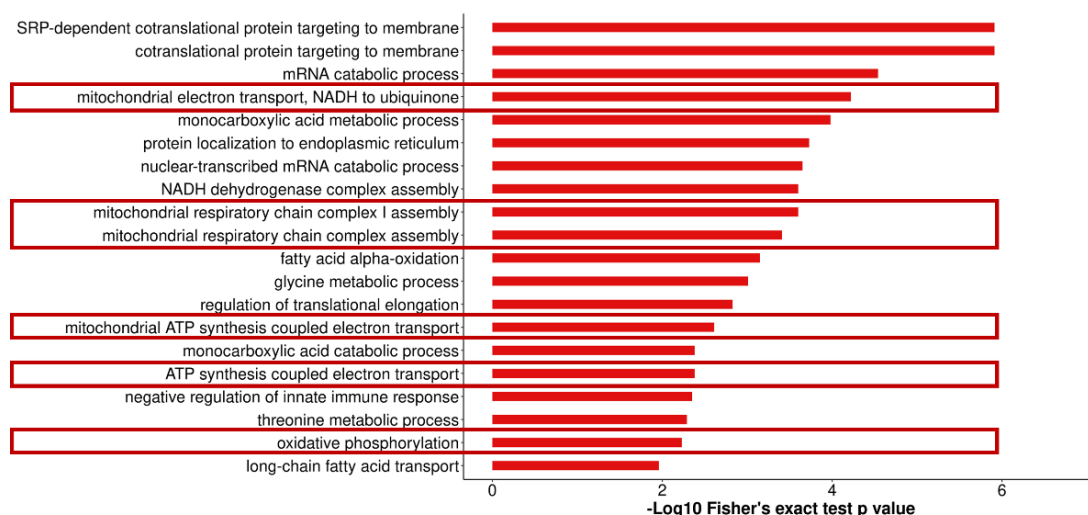


图 3-12 果蝇 IP-MS 差异蛋白 GO 分析富集条形图

对 *repo>uN2CpolyG-GFP* 和 *GMR57C10>uN2CpolyG-GFP* 两组样本直接的差异表达蛋白进行 GO 富集分析, 使用富集条形图展示最显著富集的 20 个表达上调的功能, 纵轴为对应 GO 功能描述信息, 横轴表示 -Log10 转换的富集显著性 P value, 数值越大代表富集显著性越强, 其中可见多条线粒体功能相关通路 (红色方框标出)

差异蛋白聚类分析结果显示神经元表达组中 *GMR57C10>uN2CpolyG-GFP* 与对照组之间细胞死亡和线粒体功能相关蛋白差异较胶质细胞组更为显著，*GMR57C10>uN2CpolyG-GFP* 与 *repo>uN2CpolyG-GFP* 两组之间在线粒体和细胞死亡相关功能蛋白中存在显著差异（图 3-13）。

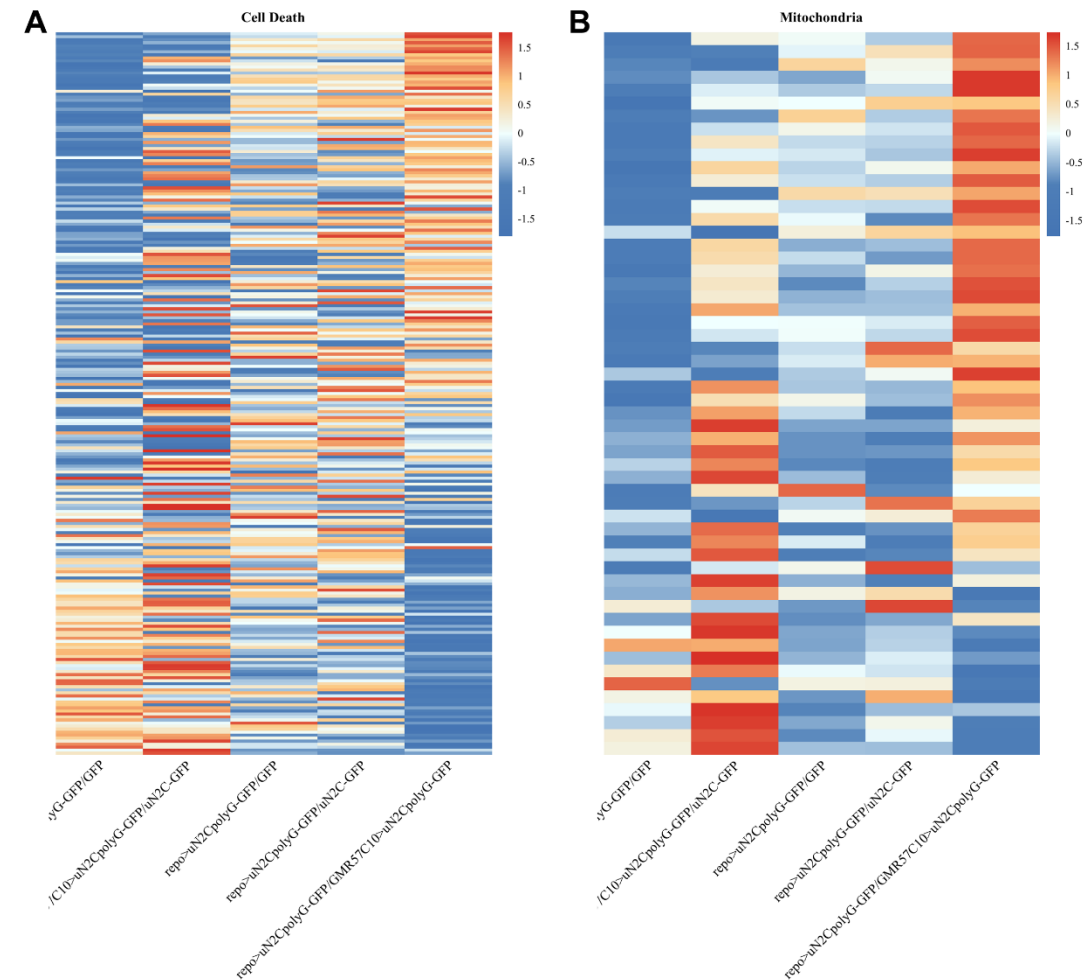


图 3-13 果蝇 IP-MS 差异蛋白 GO 富集通路差异蛋白聚类热图

A，对生物学功能为细胞死亡（GO: GO:0008219）的差异蛋白进行样本间比较，绘制聚类热图；B，对生物学功能为线粒体呼吸链复合体组装（GO: 0033108）的差异蛋白进行样本间比较绘制聚类热图

综上，IP-MS 结果表明胶质细胞和神经元来源的 uN2CpolyG 蛋白的互作蛋白存在显著差异，并且差异蛋白集中在线粒体和细胞死亡相关通路中，提示该致病蛋白可能引起了不同途径或不同程度的线粒体功能异常和细胞死亡，因此后续实验主要聚焦于以上两个方向进行探究。

3.5 比较胶质细胞和神经元表达 uN2CpolyG 蛋白引起的细胞死亡水平

基于 IP-MS 结果中发现的细胞死亡通路蛋白组差异，以及此前研究中报道

的 NIID 细胞模型中致病蛋白的表达导致细胞死亡的结果^[1]，本研究检测了神经元和胶质细胞表达组中的细胞死亡情况。

细胞凋亡是一种在物种间高度保守的细胞死亡形式，受到严格的程序性调控，已被报道与多种神经退行性疾病相关，因此本研究选择对果蝇大脑中的细胞凋亡情况进行检测^[43]。在细胞凋亡通路中，外源或内源信号通过不同途径引起 Caspase 级联反应，汇聚到下游引起效应因子 caspase3 的激活导致其切割，故检测切割后的 caspase3（cleaved caspase3）能够反映细胞凋亡的发生。

由于运动能力检测结果表明在神经元 uN2CpolyG 表达组中 10 日龄果蝇即发生显著的表型差异，我们首先通过免疫荧光染色检测了 10 日龄果蝇大脑中的细胞凋亡情况。共聚焦显微成像结果显示在 *GMR57C10>uN2CpolyG-GFP* 基因型果蝇大脑中能够检测到相较于其他基因型显著更强的 cleaved caspase3 信号，表明在神经元中表达 uN2CpolyG 蛋白在 10 日龄成虫中会导致细胞凋亡的显著增加，而在胶质细胞中表达该蛋白则不影响细胞凋亡水平（图 3-14A）。随后蛋白质免疫印迹结果也检测到了与免疫荧光一致的 *GMR57C10>uN2CpolyG-GFP* 组 cleaved caspase3 水平显著上调（图 3-14B）。

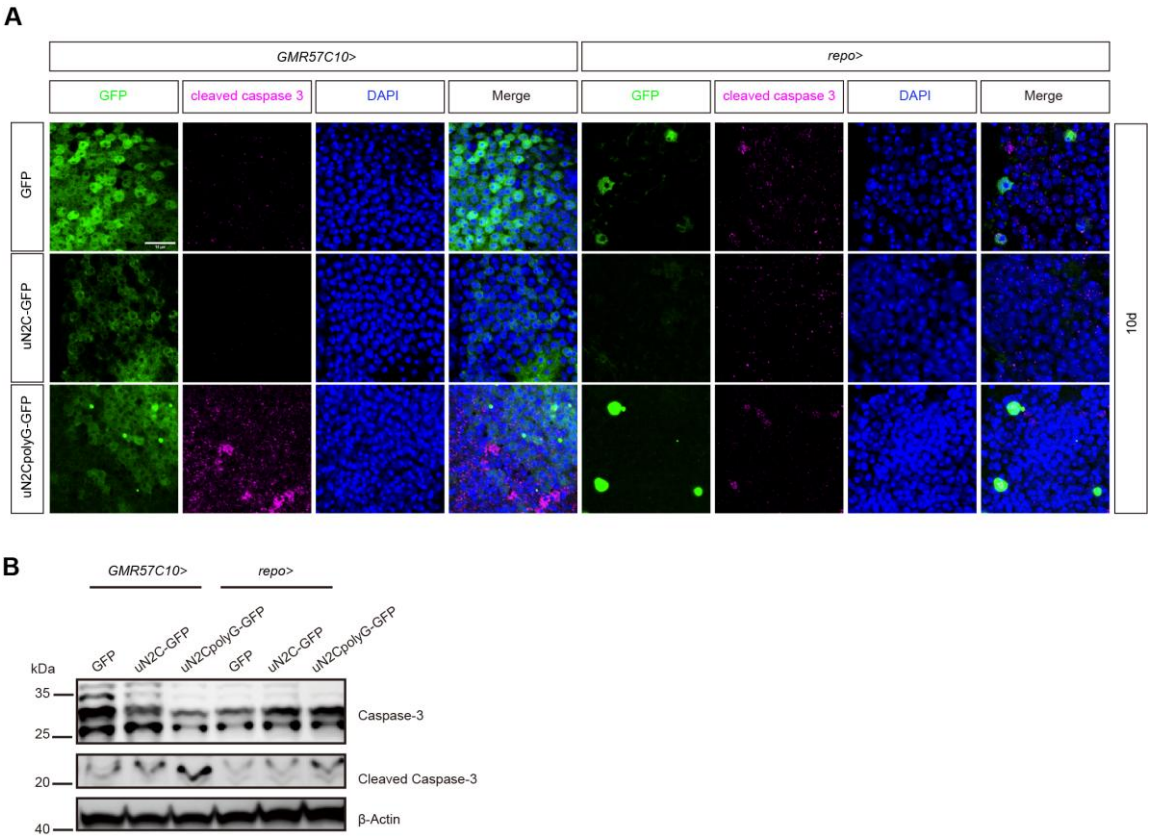


图 3-14 神经元表达 uN2CpolyG 蛋白引起 10 日龄果蝇大脑中细胞凋亡水平上升

A, 神经元或胶质细胞特异性表达 GFP、uN2C-GFP、uN2CpolyG-GFP 蛋白的 10 日龄果蝇大脑 cleaved caspase3 免疫荧光染色结果, 绿色信号展示 GFP 表达情况, 紫色信号为 cleaved caspase3 抗体信号, 蓝色信号展示 DAPI 染色的细胞; B, Western Blot 检测 10 日龄果蝇头部蛋白样品的 cleaved caspase3 水平, 以 β -actin 作为内参蛋白, 免疫荧光图右下角白色直线为标尺, 代表实际长度 10 μ m

随后, 为了明确胶质细胞表达 uN2CpolyG 蛋白是否会在更晚的时间点导致细胞凋亡增加的现象发生, 本研究进一步对 20 日龄的果蝇的脑组织进行了 cleaved caspase3 免疫荧光染色。共聚焦荧光成像结果显示在神经元和胶质细胞中表达 uN2CpolyG 蛋白均能引起细胞凋亡 (图 3-15)。同时, 我们也观察到凋亡细胞并不局限于表达聚集体的细胞中, 提示随着衰老过程, 果蝇大脑整体的细胞死亡增多。

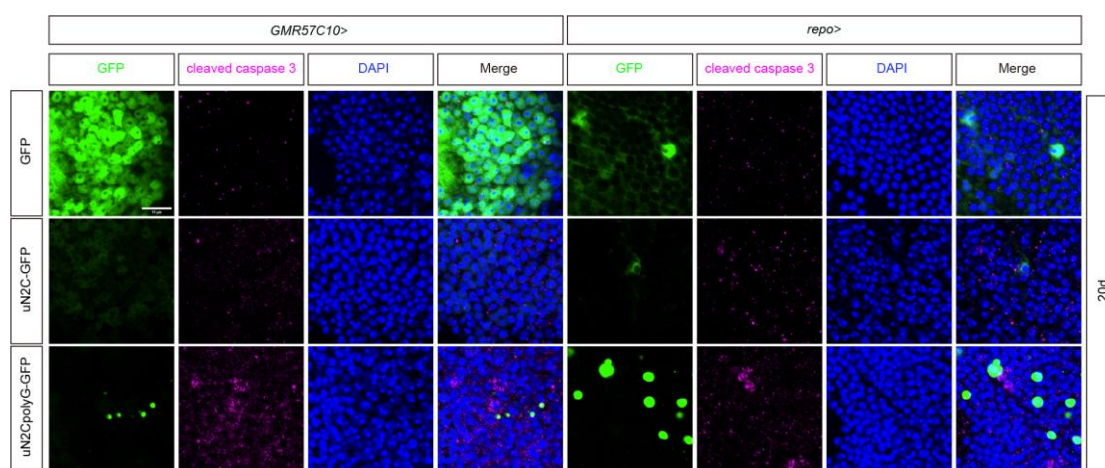


图 3-15 神经元或胶质细胞表达 uN2CpolyG 蛋白引起 20 日龄果蝇大脑中细胞凋亡水平上升
神经元或胶质细胞特异性表达 GFP、uN2C-GFP、uN2CpolyG-GFP 蛋白的 20 日龄果蝇大脑 cleaved caspase3 免疫荧光染色结果, 绿色信号展示 GFP 表达情况, 紫色信号为 cleaved caspase3 抗体信号, 蓝色信号展示 DAPI 染色的细胞, 右下角白色直线为标尺, 代表实际长度 10 μ m

综上, 胶质细胞和神经元中表达 uN2CpolyG 蛋白均会引起细胞凋亡, 但在胶质细胞中该现象的发生更晚, 与行为学表型相符, 即胶质细胞表达致病蛋白的疾病进展相较于神经元表达组更慢。

3.6 比较胶质细胞和神经元表达 uN2CpolyG 引起线粒体形态与功能差异

根据质谱检测结果中发现的线粒体相关蛋白差异, 本研究从线粒体途径进行了初步探究。

首先，本研究使用了线粒体红色荧光探针 Mito-Tracker Red CMXRos 对活体果蝇大脑中具有生物活性的线粒体进行标记并检测线粒体膜电位。染色结果显示在神经元或胶质细胞中表达 uN2CpolyG 蛋白对线粒体的形态、数量、大小和线粒体膜电位均未检测到显著的影响（图 3-16）。考虑到 NIID 作为一种神经退行性疾病，对于线粒体的损伤程度可能较低且为年龄依赖性累积的，导致其无法通过该探针检出。

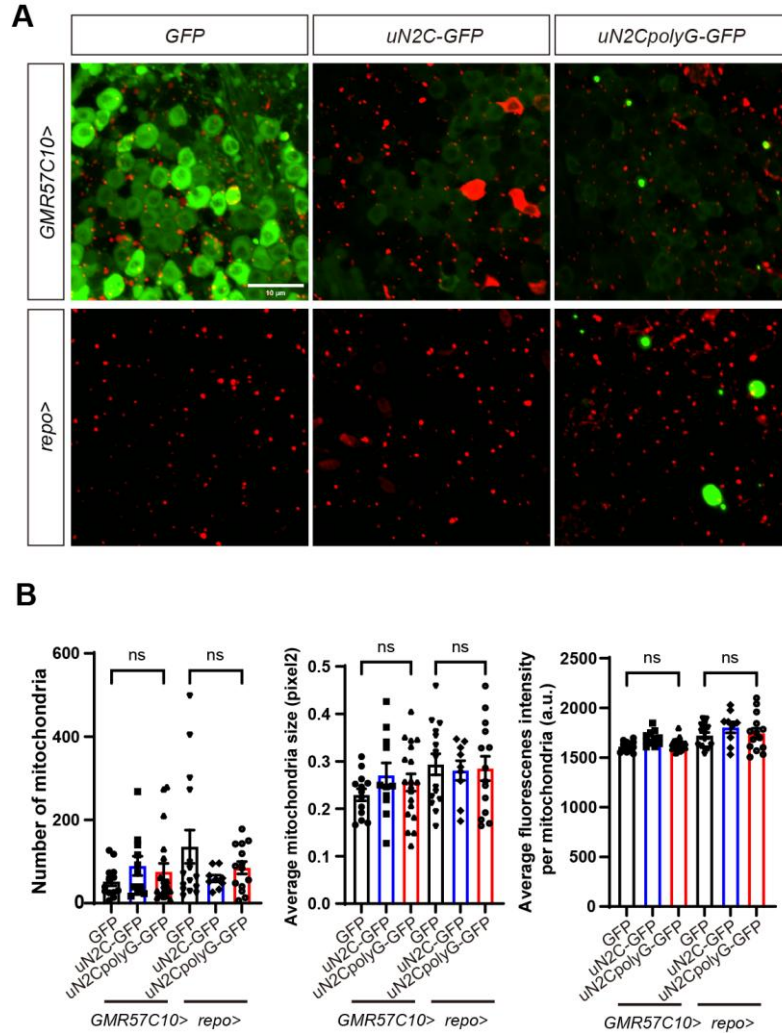


图 3-16 果蝇大脑的 Mito-Tracker Red CMXRos 染色与定量分析结果

A, 活体果蝇大脑 Mito-Tracker Red CMXRos 染色后的共聚焦荧光成像结果，绿色为 GFP 信号（由于组织未经过固定直接拍摄，repo>GFP、repo>uN2C-GFP 和 GMR57C10>uN2C-GFP 组 GFP 信号较弱），红色为线粒体荧光探针信号，右下角白色直线为标尺，代表实际长度 10 μ m；B, 对荧光成像结果进行定量分析，统计线粒体数目、大小和每个线粒体的平均荧光强度，样本量 $n \geq 9$ ，统计方法为先进行正态检验，符合正态分布使用 One-way ANOVA 统计检验，不符合正态分布使用 Kruskal-Wallis 统计检验方法，*表示 p 值 < 0.05 ，**表示 p 值 < 0.01 ，***表示 p 值 < 0.001 ，****表示 p 值 < 0.0001

本研究还选择了与氧化应激相关的关键基因进行实时荧光定量 PCR 实验 (qRT-PCR)，探究这些关键分子的表达是否受到影响。其中 *cnc* 基因是 *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (*Nrf2*) 同源基因；*acox3* 编码酰基辅酶 A 氧化酶 3，参与脂肪酸 β -氧化；*CG17544* 是人类 *acox3* 同源基因；*FASN1* 编码脂肪酸合成酶 I，参与糖原代谢和甘油三酯生物合成。研究结果显示 *cnc*、*CG17544*、*acox3* 和 *FASN1* 的表达在不同基因组之间均无显著差异 (图 3-17)。

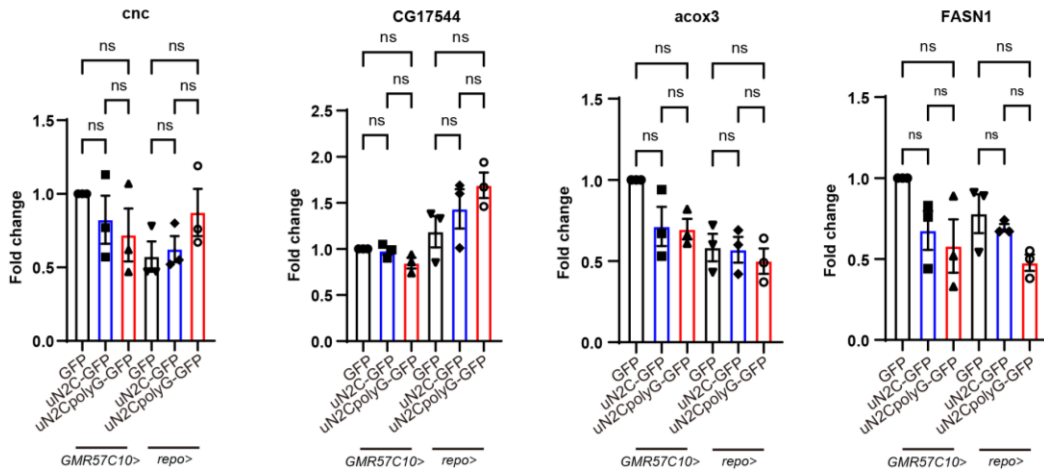


图 3-17 qRT-PCR 检测氧化应激相关基因表达水平

分别检测在神经元或胶质细胞中表达 uN2CpolyG 或对照组蛋白的果蝇头部 RNA 样品中的 *cnc*、*CG17544*、*acox3* 和 *FASN1* 基因转录水平，以 *act5C* 作为内参，统计方法为先进行正态检验，符合正态分布使用 One-way ANOVA 统计检验，不符合正态分布使用 Kruskal-Wallis 统计检验方法，*表示 p 值 < 0.05 ，**表示 p 值 < 0.01 ，***表示 p 值 < 0.001 ，****表示 p 值 < 0.0001

综上，现有研究结果未发现胶质细胞与神经元表达 uN2CpolyG 蛋白对线粒体形态、数量、膜电位和关键脂质氧化调控因子表达水平有影响。然而，由于 Mito-Tracker Red CMXRos 探针染色和 qPT-PCR 实验的检测具有一定局限性，对于线粒体的精细结构、代谢功能等方面仍有待进一步研究。

四、讨 论

本研究创新性构建了分别在胶质细胞和神经元特异性表达 NIID 致病蛋白 uN2CpolyG 的果蝇模型，首次发现了神经元和胶质细胞表达 NIID 致病蛋白 uN2CpolyG 所导致的疾病表型差异，并且通过蛋白质组分析揭示了可能的生物学机制并进行了初步的验证，对于后续针对该疾病的致病机制研究奠定了良好的基础。

然而，本研究尚有需要改进和后续深入研究的部分。

首先，由于果蝇中的胶质细胞较人类大脑中占比较少，胶质细胞整体的目的蛋白表达量相对神经元较低，可能导致对于个体疾病表型的影响存在差异。对此，一方面可以使用其它由于核苷酸重复异常扩增所导致的神经退行性疾病模型，如表达突变体 HTT (mHTT) 蛋白的亨廷顿舞蹈症果蝇模型，比较细胞特异性的致病蛋白表达导致的疾病表型是否存在差异，以此检验在本研究在 NIID 果蝇模型中发现的现象是否为该疾病所特有；另一方面可引入哺乳动物模型，包括原代神经元与胶质细胞和小鼠，对本研究中发现的表型差异进行验证。

其次，胶质细胞中表达 uN2CpolyG 形成的聚集体从形态上较神经元中的聚集体显著更大，其中部分聚集体体积达到单个细胞体积，并且能够观察到多个较小的聚集体汇聚形成不规则形状的大聚集体，该现象尚需在哺乳动物系统中进行验证。对于可能导致这种差异的机制还有待进一步对于聚集体动态形成过程以及精细结构进行探究。

再次，本研究中使用 IP-MS 实验对 GFP、uN2C-GFP、uN2CpolyG-GFP 的结合蛋白进行了质谱分析，得到了与上述蛋白发生互作或结合的蛋白质，但对于较弱或短暂的互作蛋白可能无法捕捉到。为了更加全面的了解胶质细胞或神经元特异性表达 uN2CpolyG 蛋白对果蝇整体蛋白质表达水平的影响，对于总蛋白的质谱分析能够补充部分信息，指导进一步的机制探究。

此外，本研究检测到了 10 日龄和 20 日龄果蝇大脑中的细胞凋亡情况，发现了神经元和胶质细胞表达 uN2CpolyG 蛋白所导致的细胞凋亡发生时间和程度存在差异。在此基础上尚需明确以下三点：一是细胞凋亡发生的时期以及各时期对应的凋亡水平；二是表达 uN2CpolyG 蛋白是否会导致其它形式的细胞死亡，

如有发生则需检测在神经元和胶质细胞表达时是否存在差异；三是可以鉴定发生细胞死亡的细胞类型，了解致病蛋白导致细胞死亡是由内源性表达的致病蛋白所致，还是由细胞间信号传导或组织微环境改变所致。通过遗传学方法引入细胞死亡的标记系统也能够对细胞死亡的发生进行实时和永久的标记，更加准确地记录细胞死亡的发生^[44]。

同时，针对线粒体相关功能差异的初步研究结果尚未发现显著差异。由于荧光探针活体染色易受到实验操作影响，采用遗传学手段引入带荧光标记的线粒体能够优化线粒体标记效果。此前在 NIID 果蝇研究中通过透射电镜观察到了线粒体形态的异常^[22]，透射电镜相较于本研究中采用的 Mito-Tracker Red CMXRos 线粒体探针对线粒体形态、大小的观察更加精细，有助于补充本研究中可能被忽视的细节差异。考虑到质谱结果中线粒体呼吸链复合物相关通路差异蛋白富集结果，后续可以通过 Seahorse 技术实时高通量检测线粒体代谢功能，实现对线粒体功能更为全面的检测。

总体上，本研究发现了 NIID 果蝇模型中胶质细胞表达致病蛋白不同于神经元表达的疾病表型以及聚集体结合蛋白组学的差异，具体机制还有待进一步的研究。本研究为 NIID 疾病中不同来源致病蛋白的差异性影响以及胶质细胞潜在的抵抗致病蛋白毒性机制研究提供了思路，启发针对不同类型细胞及特定通路的潜在治疗方案。此外，结合在 NIID 患者中发现聚集体检出的细胞类型存在个体差异，神经元与胶质细胞表达的聚集体差异可能与疾病的分型相关，能够指导后续的精准化治疗。

参考文献

1. Boivin, M., J. Deng, V. Pfister, et al., Translation of GGC repeat expansions into a toxic polyglycine protein in NIID defines a novel class of human genetic disorders: The polyG diseases. *Neuron*, 2021. **109**(11): p. 1825-1835.e5.
2. Sone, J., K. Mori, T. Inagaki, et al., Clinicopathological features of adult-onset neuronal intranuclear inclusion disease. *Brain*, 2016. **139**(12): p. 3170-3186.
3. Sone, J., S. Mitsuhashi, A. Fujita, et al., Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nature Genetics*, 2019. **51**(8): p. 1215-1221.
4. Depienne, C. and J.-L. Mandel, 30 years of repeat expansion disorders: What have we learned and what are the remaining challenges? *American Journal of Human Genetics*, 2021. **108**(5): p. 764-785.
5. Rajan-Babu, I.-S., E. Dolzhenko, M.A. Eberle, et al., Sequence composition changes in short tandem repeats: heterogeneity, detection, mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews. Genetics*, 2024. **25**(7): p. 476-499.
6. Malik, I., C.P. Kelley, E.T. Wang, et al., Molecular mechanisms underlying nucleotide repeat expansion disorders. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2021. **22**(9): p. 589-607.
7. Huang, X.-R., B.-S. Tang, P. Jin, et al., The Phenotypes and Mechanisms of NOTCH2NLC-Related GGC Repeat Expansion Disorders: a Comprehensive Review. *Molecular Neurobiology*, 2022. **59**(1): p. 523-534.
8. Deng, J., M. Gu, Y. Miao, et al., Long-read sequencing identified repeat expansions in the 5'UTR of the NOTCH2NLC gene from Chinese patients with neuronal intranuclear inclusion disease. *Journal of Medical Genetics*, 2019. **56**(11): p. 758-764.
9. Ishiura, H., S. Shibata, J. Yoshimura, et al., Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nature Genetics*, 2019. **51**(8): p. 1222-1232.
10. Tian, Y., J.-L. Wang, W. Huang, et al., Expansion of Human-Specific GGC Repeat in Neuronal Intranuclear Inclusion Disease-Related Disorders. *American Journal of Human Genetics*, 2019. **105**(1): p. 166-176.
11. Chen, Z., W. Yan Yau, Z. Jaunmuktane, et al., Neuronal intranuclear inclusion disease is genetically heterogeneous. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2020. **7**(9): p. 1716-1725.
12. Ogasawara, M., A. Iida, T. Kumutpongpanich, et al., CGG expansion in NOTCH2NLC is associated with oculopharyngodistal myopathy with neurological manifestations. *Acta Neuropathologica Communications*, 2020. **8**(1): p. 204.
13. Yu, J., J. Deng, X. Guo, et al., The GGC repeat expansion in NOTCH2NLC is associated with oculopharyngodistal myopathy type 3. *Brain : a Journal of Neurology*, 2021. **144**(6): p. 1819-1832.
14. Yuan, Y., Z. Liu, X. Hou, et al., Identification of GGC repeat expansion in the

- NOTCH2NLC gene in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 2020. **95**(24): p. e3394-e3405.
15. Liu, Q., J. Chen, J. Xue, et al., GGC expansions in NOTCH2NLC contribute to Parkinson disease and dopaminergic neuron degeneration. *European Journal of Neurology*, 2024. **31**(2): p. e16145.
 16. Ma, D., Y.J. Tan, A.S.L. Ng, et al., Association of NOTCH2NLC Repeat Expansions With Parkinson Disease. *JAMA Neurology*, 2020. **77**(12): p. 1559-1563.
 17. Wu, W., J. Yu, X. Qian, et al., Intermediate-length CGG repeat expansion in NOTCH2NLC is associated with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 2022. **120**: p. 189-195.
 18. Bao, L., X. Li, J. Tian, et al., GGC repeat expansions in NOTCH2NLC cause uN2CpolyG cerebral amyloid angiopathy. *Brain : a Journal of Neurology*, 2025. **148**(2): p. 467-479.
 19. Liufu, T., Y. Zheng, J. Yu, et al., The polyG diseases: a new disease entity. *Acta Neuropathologica Communications*, 2022. **10**(1).
 20. Zhong, S., Y. Lian, W. Luo, et al., Upstream open reading frame with NOTCH2NLC GGC expansion generates polyglycine aggregates and disrupts nucleocytoplasmic transport: implications for polyglycine diseases. *Acta Neuropathologica*, 2021. **142**(6): p. 1003-1023.
 21. Fan, Y., M.-j. Li, J. Yang, et al., GGC repeat expansion in NOTCH2NLC induces dysfunction in ribosome biogenesis and translation. *Brain*, 2023. **146**(8): p. 3373-3391.
 22. Yu, J., T. Liufu, Y. Zheng, et al., CGG repeat expansion in NOTCH2NLC causes mitochondrial dysfunction and progressive neurodegeneration in *Drosophila* model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022. **119**(41): p. e2208649119.
 23. Liu, Q., K. Zhang, Y. Kang, et al., Expression of expanded GGC repeats within NOTCH2NLC causes behavioral deficits and neurodegeneration in a mouse model of neuronal intranuclear inclusion disease. *Science Advances*, 2022. **8**(47): p. eadd6391.
 24. Zhong, S., Y. Lian, B. Zhou, et al., Microglia contribute to polyG-dependent neurodegeneration in neuronal intranuclear inclusion disease. *Acta Neuropathologica*, 2024. **148**(1).
 25. Ding, N., Y. Song, Y. Zhang, et al., Heat-shock chaperone HSPB1 mitigates poly-glycine-induced neurodegeneration via restoration of autophagic flux. *Autophagy*, 2025.
 26. Shen, Y., K. Jiang, D. Tan, et al., uN2CpolyG-mediated p65 nuclear sequestration suppresses the NF- κ B-NLRP3 pathway in neuronal intranuclear inclusion disease. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 2025. **23**(1): p. 68.
 27. Yoshii, D., T. Ayaki, T. Wada, et al., An autopsy case of adult-onset neuronal intranuclear inclusion disease with perivascular preservation in cerebral white matter. *Neuropathology : Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 2022. **42**(1): p. 66-73.

28. Ou, J., Y. He, X. Xiao, et al., Glial cells in neuronal development: recent advances and insights from *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience Bulletin*, 2014. **30**(4): p. 584-594.
29. Deczkowska, A., H. Keren-Shaul, A. Weiner, et al., Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*, 2018. **173**(5): p. 1073-1081.
30. Li, Q. and M.S. Haney, The role of glia in protein aggregation. *Neurobiology of Disease*, 2020. **143**: p. 105015.
31. Logan, M.A., Glial contributions to neuronal health and disease: new insights from *Drosophila*. *Current Opinion In Neurobiology*, 2017. **47**: p. 162-167.
32. Kwon, H.S. and S.-H. Koh, Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration*, 2020. **9**(1): p. 42.
33. Vainchtein, I.D. and A.V. Molofsky, Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends In Neurosciences*, 2020. **43**(3): p. 144-154.
34. Heneka, M.T., W.M. van der Flier, F. Jessen, et al., Neuroinflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews Immunology*, 2024.
35. Huang, B., W. Wei, G. Wang, et al., Mutant huntingtin downregulates myelin regulatory factor-mediated myelin gene expression and affects mature oligodendrocytes. *Neuron*, 2015. **85**(6): p. 1212-26.
36. Ishizawa, K., T. Komori, T. Homma, et al., The predominance of "astrocytic" intranuclear inclusions in neuronal intranuclear inclusion disease manifesting encephalopathy-like symptoms: A case series with brain biopsy. *Neuropathology : Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 2024. **44**(5): p. 351-365.
37. Atienzar-Aroca, S., M. Kat, and A. López-Castel, Decoding Nucleotide Repeat Expansion Diseases: Novel Insights from *Drosophila melanogaster* Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024. **25**(21).
38. Lu, B. and H. Vogel, *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. *Annual Review of Pathology*, 2009. **4**: p. 315-342.
39. Ma, M., M.J. Moulton, S. Lu, et al., 'Fly-ing' from rare to common neurodegenerative disease mechanisms. *Trends In Genetics : TIG*, 2022. **38**(9): p. 972-984.
40. Duffy, J.B., GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 2002. **34**(1-2).
41. Zhang, S., S. Yi, L. Wang, et al., Cyclin-G-associated kinase GAK/dAux regulates autophagy initiation via ULK1/Atg1 in glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023. **120**(29): p. e2301002120.
42. Cao, W., L. Song, J. Cheng, et al., An Automated Rapid Iterative Negative Geotaxis Assay for Analyzing Adult Climbing Behavior in a *Drosophila* Model of Neurodegeneration. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2017(127).
43. Moujalled, D., A. Strasser, and J.R. Liddell, Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death and Differentiation*, 2021. **28**(7): p. 2029-

2044.

44. Ding, X., G. Sun, Y.G. Argaw, et al., CasExpress reveals widespread and diverse patterns of cell survival of caspase-3 activation during development in vivo. *ELife*, 2016. **5**.

致 谢

首先要感谢我的指导老师鲁伯坝老师和张柿平老师。鲁老师敏锐的学术洞察、开阔的学术视野、严谨的科研态度令人敬佩，在科研中既能够对课题的整体框架做出指导，也能够对实验中的细节问题提供切实的解决方案，及时给予帮助。感谢张老师细致耐心地从零开始教我果蝇相关实验的原理和操作，从实验操作到科研思路都能够及时解答我的疑问和困惑，给予了我许多帮助和鼓励。感谢姜小涵师姐、罗寅堃师兄、沈梓宁同学以及实验室其它师兄师姐对我的帮助。同时也要感谢在本科阶段给予过我科研指导的张景彦老师、姚波师兄和王会师姐。我倍感幸运，在本科的科研实践中遇到了愿意倾囊相授的老师们和认真负责的师兄师姐，为我打开了科研的大门，也让我被他们面对科研的严谨认真、不断求索的精神所感染。

感谢家人对我的精神支持和无微不至的关怀。父母每日的问候和哥哥远隔重洋和我分享的生活点滴令我忽略了空间的距离，感到亲情的温暖；外婆嘱咐我做实验要注意安全的场景则永远留在了记忆之中。这些支持和理解于我而言是面对挫折与挑战的坚实后盾，也是我遵从本心做出选择的底气。也要感谢我的朋友们能够和我分享生活中遇到的或快乐或烦恼的经历，交流情感和感悟，使我不会感到孤单。感谢黄浦江边的落日、感谢公园里无忧无虑奔跑的小狗、感谢徐徐驶来的末班地铁列车，这些会一次又一次重复出现的平淡场景，构筑了我对这四年时光最深刻而温暖的记忆。

犹记得 7 年前，还是个高中生的我，在科创项目的选拔面试中曾大言不惭地说希望有机会迈出科研的第一步。时至今日，行文至此，也许才是真正迈出了科研的第一步，句点亦是起点。感谢复旦，让我如愿在本科阶段看到了人生更多的可能性和更多选择。也感谢自己，在兜兜转转间坚定了最初的选择。