

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2026.08.008  
文章编号: 1005-8982 (2026) 08-0043-08

实验研究·论著

## 构建稳定表达TDP-43<sup>A315T</sup>突变的肌萎缩侧索硬化细胞模型并重现TDP-43蛋白病理特征的实验研究\*

苗璐<sup>1</sup>, 李傅尧<sup>1</sup>, 魏明清<sup>1</sup>, 李婷<sup>1</sup>, 倪敬年<sup>1</sup>, 李可心<sup>2</sup>, 时晶<sup>1</sup>  
(北京中医药大学东直门医院 1. 脑病三科, 2. 国际部, 北京 100010)

**摘要: 目的** 通过在Neuro-2a细胞中构建稳定表达TDP-43<sup>A315T</sup>的肌萎缩侧索硬化(ALS)体外模型, 以期作为药物筛选和致病机制的研究提供实验基础。**方法** 通过慢病毒介导的转染技术, 在Neuro-2a细胞株中构建稳定表达野生型TDP-43与TDP-43<sup>A315T</sup>突变型的细胞株。该研究设置3个分组, 分别为空载组(GFP-Control组, 简称GL组)转染质粒pSLenti-EF1-EGFP-P2A-Puro-CMVCS-3xFLAG-WPRE; 对照组(野生型人类TDP-43序列, 简称WT组)转染质粒pSLenti-EF1-EGFP-P2A-Puro-CMV-TARDBP-3xFLAG-WPRE; 模型组(人类TDP-43A315T突变序列, 简称M组)转染质粒pSLenti-EF1-EGFP-P2A-Puro-CMV-TARDBP(A315T)-3xFLAG-WPRE。采用CCK-8法和腺苷三磷酸(ATP)含量检测评估细胞活力与能量代谢; 通过Western blotting检测和免疫荧光染色实验分析TDP-43的亚细胞定位、剪切片段形成、泛素化聚集及凋亡相关蛋白的表达; 利用生化试剂盒检测氧化应激相关酶活性变化。**结果** GL组、WT组ATP蛋白相对表达量均高于M组( $P < 0.05$ )。M组的cleaved Caspase-3、B淋巴细胞瘤-2基因相关启动子、Bcl-2相关X蛋白的表达量均高于GL组及WT组( $P < 0.05$ )。M组TDP-43免疫荧光染色在细胞质中的占比高于WT组( $P < 0.05$ )。M组细胞质TDP-43蛋白水平高于WT组( $P < 0.05$ )。M组5、15、20  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢干预后细胞存活率均高于GL组、WT组( $P < 0.05$ ), 40、50  $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢干预后细胞存活率均低于GL组、WT组( $P < 0.05$ )。M组T-AOC、T-GSH均高于GL组、WT组( $P < 0.05$ )。M组Nrf2、HO-1表达水平均低于WT组、GL组( $P < 0.05$ )。**结论** 该研究成功构建了1个稳定表达和典型病理特征的TDP-43<sup>A315T</sup>Neuro-2a细胞模型。TDP-43<sup>A315T</sup>突变通过诱导线粒体功能障碍、细胞凋亡、TDP-43蛋白病理改变及氧化应激防御系统失调, 协同导致神经元损伤, 为解析ALS发病机制及药物筛选提供了体外研究工具。

**关键词:** 肌萎缩侧索硬化症; TDP-43<sup>A315T</sup>突变; 体外模型; TDP-43蛋白

**中图分类号:** R746.4

**文献标识码:** A

## Construction of a stable TDP-43<sup>A315T</sup> mutant cell model for amyotrophic lateral sclerosis recapitulating TDP-43 proteinopathy\*

Miao Lu<sup>1</sup>, Li Fu-yao<sup>1</sup>, Wei Ming-qing<sup>1</sup>, Li Ting<sup>1</sup>, Ni Jing-nian<sup>1</sup>, Li Ke-xin<sup>2</sup>, Shi Jing<sup>1</sup>  
(1. Department of Neurology III, 2. International Department, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100010, China)

**Abstract: Objective** The core pathology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) involves cytoplasmic

收稿日期: 2025-11-12

\* 基金项目: 国家重点研发计划(2023YFC3504304); 北京中医药大学解码中医项目(BZY-JMZY-2022-002)

[通信作者] 时晶, E-mail: sshijing87@163.com

mislocalization and aggregation of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) coupled with its nuclear clearance. The TDP-43<sup>A315T</sup> mutation is a well-established pathogenic mutation. This study aimed to construct a stable in vitro ALS model by expressing human TDP-43<sup>A315T</sup> in Neuro-2a cells to facilitate new drug development and genetic screening.

**Methods** Lentivirus-mediated transduction was used to establish stable Neuro-2a cell lines expressing either wild-type (WT) or A315T mutant human TDP-43 (hTDP-43). The study established three groups: the empty vector group (GFP-Control group, abbreviated as GL group) transfected with the plasmid pSLenti-EF1-EGFP-P2A-Puro-CMV-MCS-3xFLAG-WPRE; the control group (wild-type human TDP-43 sequence, abbreviated as WT group) transfected with the plasmid pSLenti-EF1-EGFP-P2A-Puro-CMV-TARDBP-3xFLAG-WPRE; and the model group (human TDP-43 A315T mutant sequence, abbreviated as M group) transfected with the plasmid pSLenti-EF1-EGFP-P2A-Puro-CMV-TARDBP (A315T)-3xFLAG-WPRE. Cell viability and energy metabolism were assessed using CCK-8 assay and ATP level measurement. The subcellular localization of TDP-43, formation of cleaved fragments, ubiquitinated aggregates, and expression of apoptosis-related proteins were analyzed by Western Blotting and immunofluorescence staining. Activities of key enzymes related to oxidative stress were measured using biochemical assay kits. **Results** The relative expression of ATP protein in the GL and WT groups was higher than that in the M group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of cleaved Caspase-3, BAD, and BAX in the M group were higher than those in the GL and WT groups ( $P < 0.05$ ). The proportion of cytoplasmic TDP-43 immunofluorescence staining in the M group was higher than that in the WT group ( $P < 0.05$ ), and the cytoplasmic TDP-43 protein level was also higher in the M group than in the WT group ( $P < 0.05$ ). After exposure to 5, 15, and 20  $\mu\text{mol/L}$  hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), the cell viability in the M group was higher than that in the GL and WT groups ( $P < 0.05$ ), whereas after 40 and 50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  exposure, cell viability in the M group was lower than that in the GL and WT groups ( $P < 0.05$ ). The levels of total antioxidant capacity (T-AOC) and total glutathione (T-GSH) in the M group were higher than those in the GL and WT groups ( $P < 0.05$ ). In contrast, the expression levels of Nrf2 and HO-1 in the M group were lower than those in the WT and GL groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** A stable TDP-43<sup>A315T</sup> Neuro-2a cell model with typical pathological features was successfully established. The TDP-43<sup>A315T</sup> mutation induces mitochondrial dysfunction, apoptosis, pathological TDP-43 protein alterations, and dysregulation of the oxidative stress defense system, which collectively contribute to neuronal injury, providing an in vitro model for elucidating the pathogenesis of ALS and for drug screening.

**Keywords:** amyotrophic lateral sclerosis; TDP-43A315T mutation; in vitro model; TDP-43 proteinopathy

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种进行性神经退行性病变, 是运动神经元病 (motor neuron disease, MND) 最常见的临床表型, 出现上运动神经元和/或下运动神经元进行性丢失, 导致肌肉进行性无力、肌肉萎缩, 包括呼吸肌无力相关呼吸衰竭等临床表现<sup>[1]</sup>。近年来, 随着分子生物学和基因技术的发展, ALS 研究取得了显著进展。约 10% 的 ALS 患者是家族遗传, 目前已发现超过 40 个 ALS 相关基因, 其中 C9orf72<sup>[2]</sup>、SOD1<sup>[3]</sup>、TARDBP 和 FUS<sup>[4]</sup> 是最主要的致病基因<sup>[5]</sup>。尽管 TARDBP 突变仅占家族性 ALS 患者的 3% ~ 5%<sup>[6]</sup>, 在特发性 ALS 患者中不到 1%, 但超过 97% 的 ALS 患者 (包括散发性和家族性) 可以在大脑和脊髓中找到 TDP-43 蛋白的细胞质包涵体, 同时存在 TDP-43 蛋白的异常聚集与核清除现象, 这是 ALS 的核心病理标志<sup>[7]</sup>。因此, TARDBP 基因被认为是 ALS 生物学模型构建的候选基因。

在细胞中, TDP-43 蛋白主要定位于细胞核中, 并在细胞质和细胞核之间穿梭<sup>[8]</sup>。而在病理条件下, TDP-43 蛋白从细胞核错位到细胞质, 在细胞质中磷酸化、泛素化、裂解和/或形成不溶性聚集体, 导致 RNA 代谢、蛋白质稳态、线粒体功能、氧化应激、轴突转运和局部翻译的下游途径功能障碍<sup>[9]</sup>。2008 年 GITCHO 等<sup>[10]</sup> 首次报道在家族性 ALS 患者中发现 TDP-43<sup>A315T</sup> 突变, 携带此突变的患者表现出典型的 ALS 症状, 而在 1 505 例健康对照受试者中未发现该突变, 确立了其与疾病的直接因果关系, 而非无害的多态性。在后续的研究中, 与其他一些可能表型较弱的突变相比, TDP-43<sup>A315T</sup> 突变能够引起 ALS 模型 TDP-43 蛋白的错误折叠和聚集倾向<sup>[11]</sup>, 并表现出活力下降等强烈的毒性表型。

ALS 细胞模型构建可选择使用诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC) 诱导分化运动神经元<sup>[12]</sup>、小鼠原代神经元<sup>[13]</sup>、运动神经元样细胞

NSC-34<sup>[14]</sup>、小鼠神经母细胞瘤细胞 (Neuro-2a, N2a)<sup>[15]</sup>、人胚胎肾细胞 HEK293T<sup>[16]</sup>等。NSC-34 细胞具有神经元特征,但分化不均一、转染效率低,难以获得稳定传代的突变模型<sup>[17]</sup>。因此本研究使用 Neuro-2a 细胞系构建 TDP-43<sup>A315T</sup> 突变体外模型,其成本低、转染效率高、蛋白均一表达,从而有更好的模型可重现性,便于新药物的开发或基因筛选。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

Neuro-2a 细胞系购自武汉普诺赛生命科技有限公司。细胞培养使用 MEM (含 NEAA、10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素) 的 Neuro-2a 细胞专用培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:CM-0168),放入 37 °C、5% 二氧化碳细胞培养箱 (美国赛默飞世尔科技公司,Forma Steri-Cycle i160 CR CO<sub>2</sub> 培养箱),2~3 d 更换培养基 1 次,细胞融合度达 80% 时传代。

### 1.2 慢病毒载体构建与稳定株筛选

质粒构建方案为空载组 (GFP-Control 组,以下简称 GL 组) 转染质粒 pSLenti-EF1-EGFP-P2A-Puro-CMVCS-3xFLAG-WPRE; 对照组 (野生型人类 TDP-43 序列,以下简称 WT 组) 转染质粒 pSLenti-EF1-EGFP-P2A-Puro-CMV-TARDBP-3xFLAG-WPRE; 模型组 (人类 TDP-43<sup>A315T</sup> 突变序列,以下简称 M 组) 转染质粒 pSLenti-EF1-EGFP-P2A-Puro-CMV-TARDBP (A315T) -3xFLAG-WPRE。通过上海和元生物技术股份有限公司构建慢病毒包装质粒并筛选稳定株,将 Neuro-2a 细胞按 30% 汇合度接种到 6 孔板,12~20 h 后感染病毒,加 10 μL polybrene/孔 (1 mg/mL),最终在细胞样品中 polybrene 终浓度为 5 μg/mL。慢病毒感染 12~20 h 后换培养基,每孔加入 2 mL 新鲜的培养基。72 h 后加入终浓度 2 μg/mL puromycin 进行筛选,每隔 2~3 d 换液,药物筛选约 2 周后获得稳定表达目的基因的细胞株。

### 1.3 CCK-8 法及过氧化氢刺激实验

将对数生长期的细胞消化、重悬,细胞铺板密度为  $2 \times 10^4$  个/孔,接种到 96 孔板中,每孔加入 100 μL 培养基或不同浓度过氧化氢溶液 (由 3% 过氧化氢配制,上海赛徕克生物科技有限公司) 培养 24 h 后弃原培养基,每孔加入 100 μL 高糖培养

基 (杭州思拓凡生物科技有限公司,货号 SH30022.01) 及 10 μL CCK-8 试剂 (北京翱擎生物科技有限公司,货号: AQ308),在 37 °C,含 5% 二氧化碳培养箱中避光孵育 90 min 后,使用 Varioskan LUX 多功能酶标仪 (美国赛默飞世尔科技公司) 检测 450 nm 波长的光密度 (optical density, OD) 值并计算细胞存活率,细胞存活率 = [(实验孔吸光度 - 空白孔吸光度) / (对照孔吸光度 - 空白孔吸光度)] × 100%。

### 1.4 腺苷三磷酸含量检测

将对数生长期的细胞以 70% 密度接种于 6 孔板中,检测前 PBS 洗 1 次,收集细胞置于冰上,根据腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 检测试剂盒 (美国 MedChemexpress 生物科技公司,货号: HY-K0314) 说明书进行裂解,使用多功能酶标仪测定相对光单位,根据 BCA 蛋白定量归一化,比较各组细胞内 ATP 含量。

### 1.5 免疫荧光染色

将细胞接种在 35 mm 共聚焦培养皿中,使其密度在染色时达 60%~80% 汇合度。PBS 冲洗 1 遍,4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗 3 遍,5 min/遍,10% 山羊血清常温封闭 1 h,加入 TDP-43 一抗 [(human specific) Monoclonal antibody, Mouse, 1:10 000, 武汉三鹰生物技术有限公司,货号: 60019-2-Ig; Anti-Ubiquitin antibody, rabbit, 1:500, 上海艾博抗贸易有限公司,货号: ab134953], 4 °C 过夜后, PBS 洗 3 遍,10 min/遍,加入对应种属二抗,稀释比例为 1:1 000 (Ms-Alexa Fluor™594, 美国英杰生命技术有限公司,货号: A-11005; Rb-Alexa Fluor™594, 美国英杰生命技术有限公司,货号: A-11012) 室温孵育 1 h,后 PBS 洗 3 遍,10 min/遍,用滴加抗荧光淬灭剂 (含 DAPI) 封片染液 (上海碧云天生物技术股份有限公司,货号: P0131) 核染色及封片,在 BZ-810 型显微镜 (中国基恩士有限公司) 下观察并采集图像。所有步骤于避光条件下进行,以避免荧光信号损失。荧光强度定量分析通过 Image J 软件完成,每组重复 3 次,其中, TDP43 细胞质分布占比 = (细胞质区域总荧光强度/整个细胞区域总荧光强度) × 100%。

## 1.6 Western blotting 检测蛋白表达

将达到 80% 汇合度的细胞收集, 全蛋白使用 RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术股份有限公司, 货号: P0013B) 裂解, 核质分离使用细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒 (上海碧云天生物技术股份有限公司, 货号: P0028), 进行 BCA 蛋白定量, 取等量蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离, 转入 PVDF 膜, 快速封闭液 (上海伯乐生命医学产品有限公司, 货号: 12010020) 封闭 10 min, 一抗孵育 4 ℃ 过夜 [B 淋巴细胞瘤-2 基因相关启动子 (Bcl-2 associated death promoter, BAD), rabbit, 1:1 000, 上海艾博抗贸易有限公司, 货号: ab32445; Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, BAX), rabbit, 1:2 000, 上海艾博抗贸易有限公司, 货号: ab32503; B 细胞淋巴瘤 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2), rabbit, 1:2 000, 上海艾博抗贸易有限公司, 货号: ab32503; cleaved Caspase-3, rabbit, 1:500, 上海艾博抗贸易有限公司, 货号: ab32042; Ho-1, rabbit, 1:5 000, 上海艾博抗贸易有限公司, 货号: ab189491; TDP-43, Mouse, 1:10 000, 武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: 60019-2-Ig; Nrf2, rabbit, 1:1 000, 武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: 16396-1-AP;  $\beta$ -actin, Mouse, 1:5 000, 武汉爱博泰克生物科技有限公司;  $\beta$ -tubulin, rabbit, 1:10 000, 上海艾博抗贸易有限公司, 货号: ab6046], TBST 洗膜 3 次后, 对应二抗 (HRP 标记山羊抗兔, 1:10 000, 武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号: GB23303; HRP 标记山羊抗鼠, 1:10 000, 上海艾博抗贸易有限公司, 货号: ab205719) 室温孵育 1 h, ECL 显色, 采用 ChemiDoc MP 成像系统 (美国伯乐生命科学研究公司) 采集图像, 通过 Image J 软件分析条带灰度值定量。

## 1.7 氧化应激相关酶活性检测

采用生化试剂盒检测细胞内氧化应激相关酶活性, 包括总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) (北京索莱宝科技有限公司, 货号: BC1315)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) (上海碧云天生物技术股份有限公司, 货号: S0101S)、总谷胱甘肽 (total glutathione, T-GSH) (上海碧云天生物技术股份有限公司, 货号: S0052)。按照说明书步骤操作, 收集细胞裂解液后

测定蛋白浓度, 分别加入对应反应体系, 孵育一定时间后通过多功能酶标仪检测 OD 值, 计算酶活性。每组设置 3 个重复样本, 并设置复孔。总抗氧化能力的测定采用 FRAP 法, 以评估样本在酸性环境下的总氧化还原能力。SOD 活性测定遵循 WST-8 显色反应的原理, GSH-Px 活性以 NADPH 的消耗速率予以体现。

## 1.8 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 10.1.2 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用 *t* 检验或方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TDP-43<sup>A315T</sup> 突变降低 Neuro-2a 细胞活力水平并诱导凋亡

GL 组、WT 组和 M 组 ATP 蛋白相对表达量分别为 (1 500.45  $\pm$  251.37)、(1 301.73  $\pm$  143.51)、(1 041.57  $\pm$  135.60), 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 8.916$ ,  $P = 0.004$ ), GL 组、WT 组 ATP 蛋白相对表达量均高于 M 组 ( $P < 0.05$ )。

各组 BAD、BAX、cleaved Caspase-3 比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), M 组的 cleaved Caspase-3、BAD、BAX 的表达量高于 GL 组及 WT 组 ( $P < 0.05$ )。各组 Bcl-2、Bcl-2/BAX 比较, 经方差分析, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。提示该突变可诱导 Neuro-2a 细胞发生凋亡。见表 1 和图 1。

表 1 各组 BAD、BAX、Bcl-2 蛋白和 Bcl-2/BAX 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	BAD	BAX	Bcl-2	Bcl-2/ BAX	cleaved Caspase-3
GL 组	0.45 $\pm$ 0.14	0.73 $\pm$ 0.19	0.98 $\pm$ 0.12	1.40 $\pm$ 0.33	0.47 $\pm$ 0.13
WT 组	0.46 $\pm$ 0.12	0.76 $\pm$ 0.20	0.98 $\pm$ 0.03	1.14 $\pm$ 0.21	0.45 $\pm$ 0.11
M 组	0.69 $\pm$ 0.07	1.02 $\pm$ 0.16	1.20 $\pm$ 0.12	1.17 $\pm$ 0.07	0.70 $\pm$ 0.06
<i>F</i> 值	4.329	5.003	4.696	1.146	10.020
<i>P</i> 值	0.039	0.022	0.059	0.379	0.003

### 2.2 TDP-43<sup>A315T</sup> 突变 Neuro-2a 细胞模型表达典型 TDP-43 病理

WT 组与 M 组 TDP-43 免疫荧光染色细胞质分布占比分别为 (26.37  $\pm$  9.95)%、(47.73  $\pm$  14.35)%, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ( $t = 3.819$ ,  $P =$

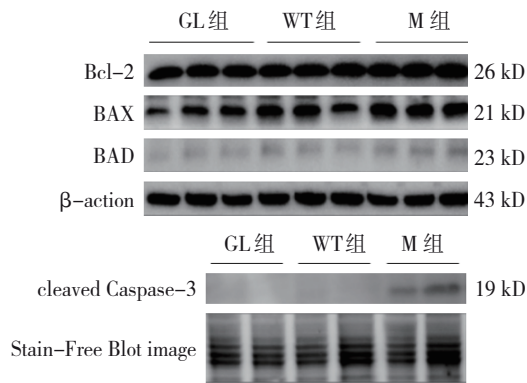


图 1 蛋白条带图

0.001); M 组 TDP-43 免疫荧光染色在细胞质中的占比均高于 WT 组 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

免疫荧光标记泛素基团后, M 组细胞中发现泛素化聚集体, GL 组、WT 组无明显阳性信号 (见图 3)。各组细胞质、全细胞 TDP-43 蛋白水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), M 组细胞质 TDP-43 蛋白水平高于 WT 组 ( $P < 0.05$ )。同时, M 组全细胞裂解液中 25 kDa TDP-43 毒性剪切片水平明显增加, 符合 TDP-43 病理特征性裂解模式。见表 2 和图 4。

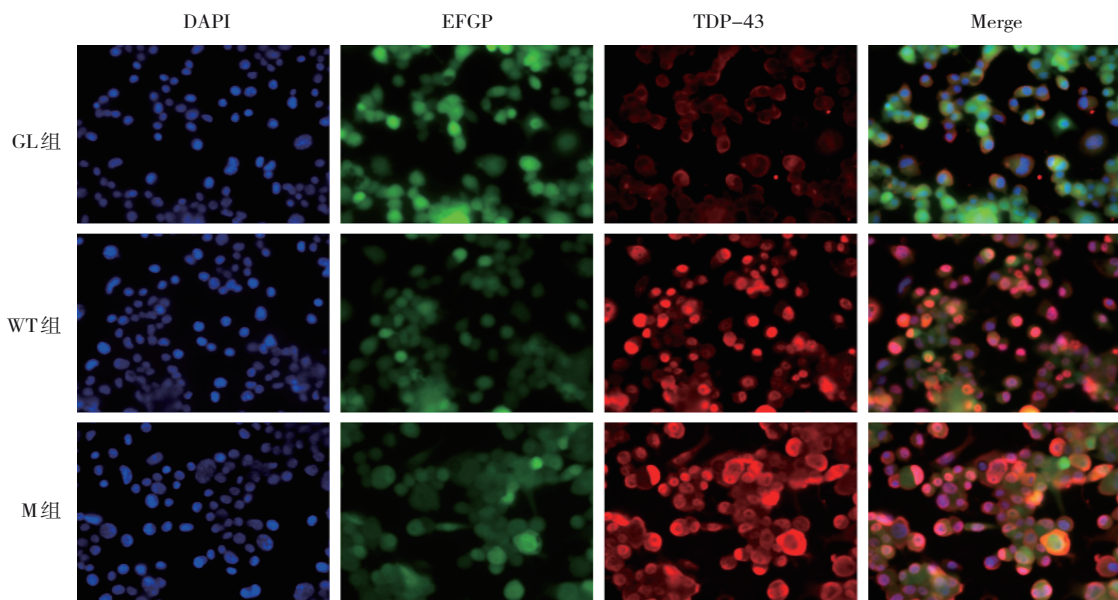


图 2 各组 TDP-43 免疫荧光染色 (× 40)

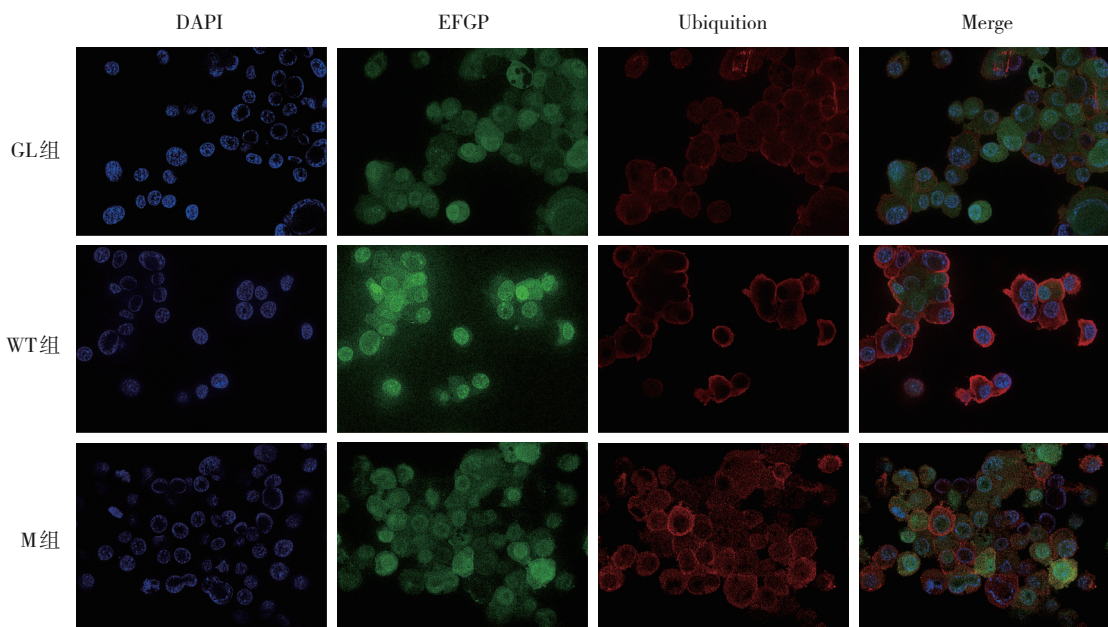


图 3 各组 Ubiquitin 免疫荧光染色 (× 60)

表 2 各组全细胞、细胞质 TDP-43 蛋白水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞质 TDP-43	全细胞 TDP-43
GL 组	0.07 ± 0.05	0.11 ± 0.04
WT 组	1.04 ± 0.27	1.05 ± 0.36
M 组	1.68 ± 0.25	1.53 ± 0.68
F 值	57.950	23.100
P 值	0.000	0.002

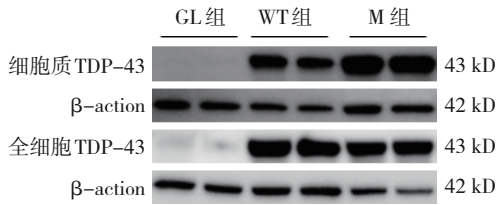


图 4 蛋白条带图

### 2.3 TDP-43<sup>A315T</sup> 突变 Neuro-2a 细胞模型存在氧化应激失衡

各组 5、15、20、40、50 μmol/L 过氧化氢干预

后细胞存活率比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), M 组 5、15、20 μmol/L 过氧化氢干预后细胞存活率均高于 GL 组、WT 组 ( $P < 0.05$ ), 40、50 μmol/L 过氧化氢干预后细胞存活率均低于 GL 组、WT 组 ( $P < 0.05$ ), 表明 TDP-43<sup>A315T</sup> 突变使细胞处于氧化应激失衡状态, 外界弱刺激下细胞氧化应激反应性上调, 随着氧化应激刺激增强, 细胞耐受性变差, 进而出现活力下降和细胞凋亡。见表 3。

各组 T-AOC、T-GSH 比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), M 组 T-AOC、T-GSH 均高于 GL 组、WT 组 ( $P < 0.05$ )。各组 SOD 比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 4。

各组 Nrf2、HO-1 比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), M 组 Nrf2、HO-1 表达水平均低于 WT 组、GL 组 ( $P < 0.05$ )。见表 5 和图 5。

表 3 各组不同浓度过氧化氢刺激后细胞存活率比较 ( $\%, \bar{x} \pm s$ )

组别	0 μmol/L	5 μmol/L	10 μmol/L	15 μmol/L	20 μmol/L	25 μmol/L	30 μmol/L	40 μmol/L	50 μmol/L
GL 组	101.47 ± 11.04	116.21 ± 9.63	108.41 ± 7.38	105.88 ± 6.17	92.56 ± 11.90	97.70 ± 9.27	95.41 ± 16.04	104.93 ± 12.95	59.96 ± 16.74
WT 组	100.00 ± 6.25	97.79 ± 9.54	99.05 ± 11.96	99.91 ± 8.69	97.32 ± 6.29	96.62 ± 8.56	91.93 ± 14.50	76.21 ± 5.55	38.93 ± 4.30
M 组	100.00 ± 13.43	116.01 ± 7.30	121.26 ± 15.13	128.66 ± 28.59	120.94 ± 13.43	114.42 ± 27.90	94.10 ± 6.58	45.20 ± 28.85	33.74 ± 2.37
F 值	0.026	4.347	3.496	2.495	7.667	1.100	0.073	10.390	6.273
P 值	0.974	0.036	0.075	0.044	0.011	0.378	0.931	0.005	0.023

表 4 各组 T-AOC、SOD、T-GSH 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	T-AOC	SOD	T-GSH
GL 组	1.23 ± 0.19	39.59 ± 4.02	1.32 ± 0.04
WT 组	0.92 ± 0.10	37.19 ± 3.29	1.30 ± 0.03
M 组	1.50 ± 0.02	39.81 ± 2.13	1.43 ± 0.06
F 值	24.940	1.120	15.050
P 值	0.000	0.355	0.000

表 5 各组 Nrf2、HO-1 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Nrf2	HO-1
GL 组	0.99 ± 0.12	1.09 ± 0.14
WT 组	1.13 ± 0.11	0.94 ± 0.16
M 组	0.87 ± 0.16	0.73 ± 0.16
F 值	2.956	7.340
P 值	0.017	0.007

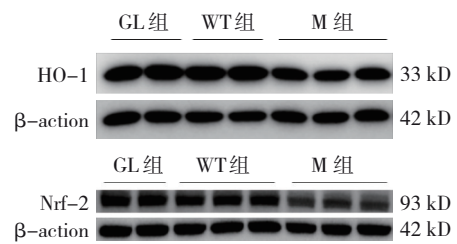


图 5 蛋白条带图

### 3 讨论

本研究在 Neuro-2a 小鼠神经母细胞瘤细胞中构建了稳定表达 TDP-43<sup>A315T</sup> 突变的 ALS 体外模型, 该模型复现了 ALS 核心 TDP-43 蛋白病理特征, 并且表现出能量代谢障碍、蛋白病理改变、氧化应激失衡及凋亡激活的多维度交联机制导致的神经元损伤, 为 ALS 致病机制解析与靶向药物研发提供了稳定、可重复的体外工具。

ALS 体外模型的转化潜力首先取决于细胞系选择能否兼顾病理模拟度与实验实用性。当前常用的 ALS 模型细胞系主要使用 NSC-34 运动神经元样细胞、iPSC 诱导分化运动神经元、HEK293T 肾上皮细胞, NSC-34 细胞系作为最接近运动神经元的细胞系, 国内难以购买, 多由国外实验室捐赠, 且细胞增殖过程中分化不均一; HEK293T 肾上皮细胞缺乏神经元特有的生理功能, 无法真实反映神经元病理损伤过程; iPSC 诱导分化运动神经元虽能还原患者特异性表型, 但培养周期长、成本高、操作复杂, 严重限制大规模药物筛选应用。

其次, ALS 体外模型的核心价值在于能否模拟疾病核心病理特征, 该模型复现了 ALS 患者脑组织中核心的 TDP-43 病理表型——核内 TDP-43 缺失、胞质 TDP-43 异常聚集、泛素化阳性包涵体形成及 25 kDa 毒性 C 端片段生成。TDP-43 蛋白的正常生理功能依赖其核质穿梭平衡<sup>[18]</sup>, 核内 TDP-43 参与 RNA 转录、剪接及稳定性调控, 细胞质中 TDP-43 则参与 mRNA 转运与局部翻译。本研究通过免疫荧光染色与 Western blotting 检测证实, TDP-43<sup>A315T</sup> 突变导致 TDP-43 蛋白核内缺失与胞质异常聚集, 这一核质定位异常引发毒性效应<sup>[19]</sup>。此外, 本研究在突变组中检测到 25 kD 的 TDP-43 C 端片段<sup>[20]</sup>, 同时, 免疫荧光结果显示模型细胞胞质中存在泛素化阳性聚集体, 这与 ALS 患者脑组织中发现的病理包涵体高度相似, 提示细胞的泛素-蛋白酶体系统与自噬系统无法有效清除异常聚集的 TDP-43 蛋白及其片段, 导致毒性物质持续积累, 进一步加重神经元损伤<sup>[21]</sup>。这与 2025 年 BALENDRA 等<sup>[9]</sup>在 TARDBP 突变 ALS 患者脑组织中观察到的病理特征高度一致, 为后续机制研究与药物筛选奠定了可靠基础。

此外, 神经元作为高耗能细胞, 其膜电位维持、神经递质释放等核心功能高度依赖线粒体提供的稳定 ATP 供应, LANDRY 等<sup>[22]</sup>已证实线粒体功能障碍是 ALS 发病的关键上游事件。本研究发现 TDP-43<sup>A315T</sup> 突变显著降低 Neuro-2a 细胞 ATP 水平, 提示该突变可能破坏线粒体呼吸链复合体活性引发能量危机; 而 Western blotting 结果提示突变组促凋亡蛋白 BAX、BAD 及 cleaved Caspase-3 表达显著上调, 但 Bcl-2/BAX 比值无明显变化, 这与

SILVESTRI 等<sup>[23]</sup>在人 iPSC 来源 ALS 模型中发现的非 Bcl-2-2 依赖凋亡激活机制相符。ATP 耗竭破坏神经元内环境稳态, 激活凋亡信号通路; 而凋亡程序的启动又会进一步损伤线粒体结构与功能, 加剧能量危机, 导致神经元不可逆死亡。

氧化应激失衡是 ALS 病理进程的重要放大器, 本研究发现的代偿性抗氧化物质上调与核心通路功能受损的矛盾现象, 推测突变通过双重机制加剧氧化应激: 一是 TDP-43 功能异常导致抗氧化酶基因 mRNA 稳态失衡, 二是异常聚集的 TDP-43 作为应激源持续产生氧化压力, 且氧化应激与 TDP-43 聚集形成正反馈循环, 推动疾病进展<sup>[24]</sup>, 最终导致细胞在高浓度过氧化氢刺激下活力急剧下降。MINJ 等<sup>[25]</sup>研究证实激活 Nrf2/HO-1 通路可显著改善 ALS 模型的病理表型, 这为本模型在抗氧化治疗药物筛选中的应用提供了理论支撑。

从以上机制研究来看, 本模型存在“能量代谢障碍-凋亡激活-TDP-43 蛋白病理-氧化应激失衡”的 ALS 多维度发病机制, 适合研究以下干预靶点: 其一, Nrf2/HO-1 通路可作为抗氧化治疗的核心靶点<sup>[26]</sup>, 通过开发特异性通路激活剂增强细胞抗氧化能力, 打破“氧化应激-TDP-43 聚集”的正反馈循环; 其二, TDP-43 蛋白的异常剪切与聚集可作为靶向治疗的关键靶点<sup>[27]</sup>, 通过开发小分子抑制剂阻止 TDP-43 蛋白剪切或促进异常聚集蛋白的降解(如调控自噬通路), 减轻其毒性效应; 其三, 线粒体功能保护可作为治疗靶点, 通过改善线粒体功能恢复神经元能量代谢, 延缓凋亡激活<sup>[28]</sup>。

综上所述, 本模型的易获得性、稳定性与可重复性使其成为大规模药物筛选的理想工具, 并可用于筛选同时调控多个致病通路的多靶点药物, 为 ALS 治疗药物的研发提供了高效模型工具。

#### 参 考 文 献 :

- [1] XIE Q J, LI K Z, CHEN Y N, et al. Gene therapy breakthroughs in ALS: a beacon of hope for 20% of ALS patients[J]. *Transl Neurodegener*, 2025, 14(1): 19.
- [2] MIZIELINSKA S, HAUTBERGUE G M, GENDRON T F, et al. Amyotrophic lateral sclerosis caused by hexanucleotide repeat expansions in C9orf72: from genetics to therapeutics[J]. *Lancet Neurol*, 2025, 24(3): 261-274.
- [3] CHIDAMBARAM S B, ANAND N, VARMA S R, et al. Superoxide dismutase and neurological disorders[J]. *IBRO*

- Neurosci Rep, 2024, 16: 373-394.
- [4] SHNEIDER N A, HARMS M B, KOROBENYNIKOV V A, et al. Antisense oligonucleotide jacifusen for FUS-ALS: an investigator-initiated, multicentre, open-label case series[J]. Lancet, 2025, 405(10494): 2075-2086.
- [5] 李欢. 家族性肌萎缩侧索硬化症中 SOD1 基因变异的致病机制研究[D]. 长沙: 中南大学, 2023.
- [6] 马海阳. RABGGTB 对肌萎缩侧索硬化细胞模型的影响及机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2024.
- [7] CHONG Z Z, SOUAYAH N. Pathogenic TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis[J]. Drug Discov Today, 2025, 30(5): 104351.
- [8] 潘昊, 荆玮, 王呈蕙, 等. TDP-43 在肌萎缩侧索硬化症中发病机制的研究[J]. 神经病学与神经康复学杂志, 2023, 19(2): 44-50.
- [9] BALENDRA R, SREEDHARAN J, HALLEGGER M, et al. Amyotrophic lateral sclerosis caused by TARDBP mutations: from genetics to TDP-43 proteinopathy[J]. Lancet Neurol, 2025, 24(5): 456-470.
- [10] GITCHO M A, BALOH R H, CHAKRAVERTY S, et al. TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease[J]. Ann Neurol, 2008, 63(4): 535-538.
- [11] DOPLER M B, ABEER M I, AREZOUMANDAN S, et al. A cellular model of TDP-43 induces phosphorylated TDP-43 aggregation with distinct changes in solubility and autophagy dysregulation[J]. FEBS J, 2025, 292(18): 4870-4897.
- [12] WORKMAN M J, LIM R G, WU J, et al. Large-scale differentiation of iPSC-derived motor neurons from ALS and control subjects[J]. Neuron, 2023, 111(8): 1191-1204.e5.
- [13] THAU-HABERMANN N, GSCHWENDTBERGER T, BODEMER C, et al. Parthenolide regulates microglial and astrocyte function in primary cultures from ALS mice and has neuroprotective effects on primary motor neurons[J]. PLoS One, 2025, 20(3): e0319866.
- [14] ZHOU Y J, TANG J S, LAN J Q, et al. Honokiol alleviated neurodegeneration by reducing oxidative stress and improving mitochondrial function in mutant SOD1 cellular and mouse models of amyotrophic lateral sclerosis[J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(2): 577-597.
- [15] FERRARI I, VERPELLI C, CRESPI A, et al. SOD1 stimulates lamellipodial protrusions in Neuro 2A cell lines[J]. Commun Integr Biol, 2018, 11(3): 1-7.
- [16] LIU C, CHEN I S, BARRI M, et al. Structural determinants of M2R involved in inhibition by Sigma-1R[J]. J Biol Chem, 2024, 300(12): 108006.
- [17] LANDRY C, COSTANZO J, MITNE-NETO M, et al. Mitochondrial dysfunction heightens the integrated stress response to drive ALS pathogenesis[J]. (2024-05-14)[2024-07-01]. <https://doi.org/10.1101/2024.05.13.594000>.
- [18] SILVESTRI B, MOCHI M, MAWRIE D, et al. HuD impairs neuromuscular junctions and induces apoptosis in human iPSC and *Drosophila* ALS models[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 9618.
- [19] WALKER A K, SPILLER K J, GE G H, et al. Functional recovery in new mouse models of ALS/FTLD after clearance of pathological cytoplasmic TDP-43[J]. Acta Neuropathol, 2015, 130(5): 643-660.
- [20] BAR AVI O, PERLSON E. Navigating the pathways: TAR-DNA-binding-protein-43 aggregation, axonal transport, and local synthesis in amyotrophic lateral sclerosis pathology[J]. Neural Regen Res, 2025, 20(10): 2921-2922.
- [21] BERNING B A, WALKER A K. The pathobiology of TDP-43 C-terminal fragments in ALS and FTLD[J]. Front Neurosci, 2019, 13: 335.
- [22] LANDRY C, COSTANZO J, MITNE-NETO M, et al. Mitochondrial dysfunction heightens the integrated stress response to drive ALS pathogenesis[J]. bioRxiv[Preprint], 2024, 14: DOI: 10.1101/2024.05.13.594000.
- [23] SILVESTRI B, MOCHI M, MAWRIE D, et al. HuD impairs neuromuscular junctions and induces apoptosis in human iPSC and *Drosophila* ALS models[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 9618.
- [24] MINJ E, UPADHAYAY S, MEHAN S. Nrf2/HO-1 signaling activator acetyl-11-keto-beta boswellic acid (AKBA)-mediated neuroprotection in methyl mercury-induced experimental model of ALS[J]. Neurochem Res, 2021, 46(11): 2867-2884.
- [25] POULIN-BRIÈRE A, POZZI S, JULIEN J P. Antibody targeting TDP-43 mitigates pathogenic pathways induced by the cerebrospinal fluid of ALS[J]. Neurotherapeutics, 2025, 22(6): e00737.
- [26] YU C H, DAVIDSON S, HARAPAS C R, et al. TDP-43 triggers mitochondrial DNA release via mPTP to activate cGAS/STING in ALS[J]. Cell, 2020, 183(3): 636-649.e18.

(李科 编辑)

本文引用格式: 苗璐, 李傅尧, 魏明清, 等. 构建稳定表达 TDP-43<sup>A315T</sup> 突变的肌萎缩侧索硬化细胞模型并重现 TDP-43 蛋白病理特征的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2026, 36(8): 43-50.

Cite this article as: M L, Li F Y, Wei M Q, et al. Construction of a stable TDP-43<sup>A315T</sup> mutant cell model for amyotrophic lateral sclerosis recapitulating TDP-43 proteinopathy[J]. China Journal of Modern Medicine, 2026, 36(8): 43-50.