

褪黑素对帕金森病大鼠 Nrf2/HO-1 通路及小胶质细胞活化的影响

尚平平¹, 刘晓宁², 陈 勇¹, 庞红利¹, 范军朝¹, 宋俊杰¹

1. 河南大学第一附属医院 麻醉与围术期医学科, 河南 开封 475000

2. 开封市中医院 心病科, 河南 开封 475000

摘要: **目的** 探讨褪黑素对帕金森病大鼠转录因子 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶 1 (HO-1) 的调控作用及其对小胶质细胞活化的影响。**方法** 取 SD 大鼠 72 只, 按照随机数字表法分为对照组、模型组、褪黑素 (5 mg/kg) 组、Nrf2 抑制剂全反式维甲酸 (ATRA, 7 mg/kg) 组、Nrf2 抑制剂阴性对照 (Nrf2-NC) (植物油, 10 mL/kg) 组、褪黑素 + ATRA (5 mg/kg + 7 mg/kg) 组, 每组 12 只。除对照组外, 其余各组大鼠通过脑黑质区内注射 6-羟多巴胺 (6-OHDA) 建立帕金森病模型。造模成功后各组开始给药, 模型组和对照组 ip 等量生理盐水, 各组连续给药 8 周, 2 次/d。末次给药后对大鼠进行行为学评分; 免疫组化法检测黑质部多巴胺能神经元及小胶质细胞活化阳性染色细胞数目; 免疫荧光共定位检测 Nrf2、活化小胶质细胞 (IBA1 标记) 重合表达的细胞数目; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测黑质部代谢产物 α -突触核蛋白 (α -Syn) 和 β 淀粉样蛋白 (β)。采用 Western blotting 检测黑质部 Nrf2、HO-1、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、环氧化酶 2 (COX-2)、小胶质细胞活化特异性标记物 (OX-42) 蛋白相对表达水平。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠出现单侧或双侧后肢部分瘫痪及行走、进食困难现象, 行为学评分显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 褪黑素组大鼠出现行走时转圈, 很少有瘫痪及行走困难症状, 且行为评分降低 ($P < 0.05$)。ATRA 组大鼠单侧或双侧后肢部分瘫痪大鼠例数增多, 行为学评分最高 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 模型组大鼠黑质区 Nrf2 与 IBA1 重合表达细胞数目、小胶质细胞活化数目、 α -Syn 和 β 水平及 HO-1、OX-42、TNF- α 、COX-2 水平和细胞核中 Nrf2 表达水平升高 ($P < 0.05$), 多巴胺能神经元数目减少。与模型组相比, 褪黑素组大鼠黑质 Nrf2 与 IBA1 重合表达细胞数目、多巴胺能神经元阳性染色数目、HO-1 及细胞核中 Nrf2 表达升高 ($P < 0.05$), 小胶质细胞活化数目、 α -Syn 及 β 水平、TNF- α 、COX-2、OX-42 表达降低 ($P < 0.05$); ATRA 组黑质区 Nrf2 与 IBA1 重合表达细胞数目、多巴胺能神经元数目、HO-1 水平及细胞核中 Nrf2 水平降低 ($P < 0.05$), 小胶质细胞活化数目、 α -Syn 和 β 水平、TNF- α 、COX-2、OX-42 表达水平进一步升高 ($P < 0.05$)。褪黑素 + ATRA 组大鼠上述指标变化与褪黑素组相反 ($P < 0.05$)。褪黑素 + ATRA 组及 Nrf2-NC 组上述指标与模型组相比差异无统计学意义。**结论** 褪黑素可能通过激活 Nrf2/HO-1 通路, 抑制炎症反应及小胶质细胞活化, 减少帕金森病大鼠黑质多巴胺能神经元丢失。

关键词: 褪黑素; 帕金森病; 转录因子 NF-E2 相关因子 2; 血红素加氧酶 1; 小胶质细胞活化

中图分类号: R964 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2021)12-2464-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.12.002

Effects of melatonin on Nrf2/HO-1 pathway and microglia activation in rats with Parkinson's disease

SHANG Ping-ping¹, LIU Xiao-ning², CHEN Yong¹, PANG Hong-li¹, FAN Jun-chao¹, SONG Jun-jie¹

1. Department of Anesthesia and Perioperative Medicine, the First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, China

2. Department of Cardiology, Kaifeng Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kaifeng 475000, China

Abstract: Objective To investigate the regulatory effect of melatonin on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in rats with Parkinson's disease, and its effect on microglia activation. **Methods** Seventy-two SD rats were divided into control group, model group, melatonin (5 mg/kg), Nrf2 inhibitor (ATRA, 7 mg/kg), Nrf2 inhibitor negative (Nrf2-NC) group (vegetable oil, 10 mL/kg), melatonin + ATRA (5 mg/kg + 7 mg/kg) group according to the random number table, with twelve in each group. In addition to the control group, Parkinson's disease models were established by injecting 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into substantia nigra. After successful modeling, the drug was administered, and the model group and control group were intraperitoneally

收稿日期: 2021-04-08

基金项目: 河南高等学校重点科研项目 (19A320021)

作者简介: 尚平平 (1987—), 女, 主治医师, 本科, 研究方向为麻醉相关。E-mail: shangpingping21@sohu.com

injected with the same amount of normal saline, twice daily for 8 weeks. After the last administration, the rats were scored for behavior, the positive staining numbers of dopaminergic neurons and microglia in substantia nigra were detected by immunohistochemistry, immunofluorescence co localization was used to detect the number of Nrf2 and activated microglia (Iba1 labeled) co expressing cells, the metabolites of substantia nigra, α -Syn and A β , were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blotting was used to detect the relative expression levels of Nrf2, HO-1, tumor necrosis factor (TNF- α), cyclooxygenase-2 (COX-2), microglia activation specific marker (OX-42) in substantia nigra. **Results** Compared with the control group, rats in model group showed unilateral or bilateral partial paralysis of hind limbs and difficulty in walking and eating, and behavioral score was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the rats in the melatonin group showed little symptoms of paralysis and difficulty in walking, and the behavioral score was decreased ($P < 0.05$). The number of cases of unilateral or bilateral hindlimb partial paralysis was increased in ATRA group, and the behavioral score was the highest ($P < 0.05$). Compared with those in the control group, the number of Nrf2 and Iba1 co expressing cells, the activated number of microglia, the levels of α -Syn and A β , the expression of HO-1, OX-42, TNF- α , Cox2, and Nrf2 in the nucleus of rats in the model group were increased ($P < 0.05$), the number of dopaminergic neurons was decreased. Compared with those in the model group, the number of Nrf2 and Iba1 co expressing cells, the number of dopaminergic neurons positive staining, expression of HO-1, and Nrf2 in nucleus in melatonin group were further increased ($P < 0.05$), the activated number of microglia, the levels of α -Syn and A β , the expression of TNF- α , Cox2 and OX-42 were decreased ($P < 0.05$); the number of Nrf2 and Iba1 co expressing cells, the number of dopaminergic neurons positive staining, expression of HO-1, and Nrf2 in nucleus in ATRA group were decreased ($P < 0.05$), the activated number of microglia, the levels of α -Syn and A β , the expression of TNF- α , Cox2 and OX-42 were further increased ($P < 0.05$). The changes of the above indexes in melatonin + ATRA group were opposite to those in melatonin group ($P < 0.05$). There was no significant difference between melatonin + ATRA group and Nrf2-NC group. **Conclusion** Melatonin may inhibit inflammation and microglia activation, and reduce the loss of dopaminergic neurons in substantia nigra of Parkinson's disease rats by promoting the activation of Nrf2/HO-1 pathway.

Key words: melatonin; Parkinson's disease; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; heme oxygenase 1; microglia activation

帕金森病属于第二类神经退行性疾病^[1]。目前研究发现, 帕金森病的病理特点主要为脑黑质多巴胺能神经元凋亡变性^[2]。但文献资料研究证实, 小胶质细胞活化与帕金森病多巴胺能神经元凋亡及神经炎症损伤关系密切^[3]。但小胶质细胞活化与帕金森病多巴胺能神经元凋亡的分子生物学机制还不甚明确。研究证实, 小胶质细胞活化及神经系统炎症反应过程中释放的促炎及氧化因子会促进核转录因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) /血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 通路激活, 实现机体抗氧化及抗炎的自我保护, 保护神经系统免受炎症损伤^[4]。但 Nrf2/HO-1 通路在帕金森病黑质多巴胺能神经元凋亡变性过程中的调控机制研究相对较少。近来研究发现, 褪黑素可延缓衰老, 具有神经保护及抗氧化作用^[5], 且研究证实, 褪黑素可显著减少黑质多巴胺能神经元的凋亡, 改善帕金森病大鼠运动功能障碍^[6-7], 但其具体分子生物学机制还不甚明确。本研究建立帕金森病大鼠模型, 探究褪黑素对 Nrf2/HO-1 途径及帕金森病小胶质细胞活化的影响, 以期阐明褪黑素改善帕金森病多巴胺能神经元凋亡的其他可能分子机制, 为褪黑素的开发应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 SD 雄性大鼠, 清洁级, 72 只, 体重 280~300 g, 8 周龄, 生产许可证号为 SCXK(京)2019-0014, 使用许可证号: SYXK(京)2019-0039, 均购自中国医学科学院医学实验研究所。本实验经本院伦理委员会批准(伦理批号: 20180326), 实验动物符合 3R 原则。

1.1.2 主要试剂及仪器 褪黑素(上海宝曼生物科技有限公司, 货号: D1380, 规格: 20 mg, 白色或类白色结晶, 高效液相色谱质量分数 $\geq 98\%$); Nrf2 抑制剂: 全反式维甲酸(ATRA, 美国 Sigma 公司, 货号: R2625-50MG); 6-羟多巴胺(6-OHDA, 北京百奥莱博科技有限公司, 货号: BY12246, 规格: 100 mg); α -突触核蛋白(α -Syn)酶联免疫试剂盒(上海美轩生物科技有限公司, 货号 MRZ004), β 淀粉样蛋白(A β)酶联免疫 ELISA 试剂盒(南京赛泓瑞生物科技有限公司, 货号 CEA864Hu03); 兔抗 Nrf2、HO-1、肿瘤坏死因子(TNF- α)、环氧化酶 2(COX-2)、小胶质细胞活化特异性标记物(OX-42)、山羊抗小胶质细胞活化标记物(IBA1)、驴抗兔 IgG、驴抗山羊 IgG(美国 Abcam 公司, 货号分别为 ab89443、ab189491、ab191522、ab179800、ab76302、

ab1211、ab48004、ab15007、ab6566); TCSSP8 激光扫描共聚焦显微镜、CM3050S 冰冻切片机(德国 Leica 公司); Cargille Type3000 光学显微镜(美国 Cargille); KW-DWY-S 脑立体定向仪(南京卡尔文生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立及分组给药 用随机数字表法将 72 只 SD 大鼠,随机分为对照组、模型组、褪黑素(5 mg/kg)组、Nrf2 抑制剂(ATRA, 7 mg/kg)组、Nrf2 抑制剂阴性对照(Nrf2-NC)(植物油, 10 mL/kg)组、褪黑素+ATRA(5 mg/kg+7 mg/kg)组,每组 12 只。除对照组外,其余各组大鼠均参照文献方法^[8]用 3%戊巴比妥钠麻醉后,用脑立体定向仪向大鼠脑黑质区内注射 6.8 μ L 6-OHDA(溶于 0.02%抗坏血酸无菌盐水溶液)建立帕金森病模型,手术结束后 15 d,观察大鼠行为变化,参照文献方法^[9]若大鼠出现动作迟缓、步态不稳、不能直线行走或行走时向一侧旋转和倾斜等症状视为造模成功。对照组用脑立体定向仪于黑质部注射 0.02%抗坏血酸无菌盐水溶液。大鼠均于术后第 16 天开始给药,褪黑素、ATRA 及其阴性对照试剂参考文献方法^[7, 10]设置剂量,褪黑素用生理盐水配成质量浓度为 0.50 mg/mL 的混悬液,ATRA 用植物油溶解成质量分数为 0.70 mg/kg 的溶液,Nrf2-NC ip 植物油作为阴性对照,各组均按 10 mL/kg 的体积 ip 给药,对照组及模型组 ip 外给予等量生理盐水,连续给药 8 周,1 次/d。

1.2.2 大鼠行为学观察 末次给药后 12 h 后根据文献报道^[9]的评分方法对大鼠进行行为学评分,评分越高预示运动障碍越严重。

1.2.3 免疫组化检测大鼠黑质部多巴胺能神经元数目及小胶质细胞活化数目 随机取 6 只大鼠麻醉,生理盐水及 4%多聚甲醛常规灌注取脑,并分离中脑组织置于 4%多聚甲醛中固定 72 h 后,用蔗糖溶液脱水、OCT 包埋后,切成厚度为 20 μ m 的冠状切片,并于防冻液中储存一段时间后保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。取部分切片参照文献中方法^[10]进行抗原修复、封闭及酪氨酸羟化酶(TH)、IBA1 抗体(1:200)孵育、洗涤后,用辣根过氧化物酶(HRP)二抗试剂盒说明书方法加入抗体孵育及二氨基联苯胺(DAB)显色后,用苏木精复染、二甲苯固定、中性树脂封片后,置于显微镜下观察,每张切片随机取 5 个视野计算阳性染色细胞数目。

1.2.4 免疫荧光共定位检测 Nrf2 与活化小胶质细胞 IBA1 重合表达的细胞数目取“1.2.3”项下的部分切片,进行抗原修复及封闭液封闭 2 h 后,加入兔抗 Nrf2 和山羊抗 IBA1 一抗(稀释比 1:200)后经 4 $^{\circ}$ C 室温孵育过夜后,加入二抗(驴抗兔 IgG 和驴抗山羊 IgG)室温避光孵育 2 h。漂洗 3 次,DAPI 显色漂洗,漂洗,封片后,用荧光显微镜观察并拍照,并通过 Image Pro Plus 5.0 图像分析系统测定阳性染色细胞数目。

1.2.5 酶联免疫吸附法检测黑质部 α -Syn、A β 水平 取剩余大鼠,麻醉后处死,取全脑并剥离黑质部纹状体组织约 0.5 g,用组织匀浆器匀浆、16 000 r/min 离心 30 min 后,取上清液,按 ELISA 试剂盒说明书方法测定 α -Syn、A β 水平。

1.2.6 Western blotting 法检测脑组织黑质区 Nrf2、HO-1、TNF- α 、COX-2、OX-42 蛋白相对表达水平 取各组大鼠黑质部纹状体组织,一部分提取组织中总蛋白,一部分用细胞核蛋白及浆蛋白抽提试剂盒说明书方法,提取细胞核中蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,取 50 μ g 蛋白进行电泳和转膜反应,TBST 溶液清洗后,加入 5%牛血清蛋白封闭液于室温下封闭 1 h 后,加入一抗 Nrf2、HO-1、TNF- α 、COX-2、OX-42(稀释倍数为 1:500)及内参 β -actin、核纤层蛋白 B1(Lamin B1)抗体(稀释倍数为 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜后,加入羊抗兔二抗(稀释倍数 1:1 000)在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 4 h,增强化学发光法显色后,以化学发光成像仪观察条带并拍照,Image-J 软件分析检测细胞总蛋白中 HO-1、TNF- α 、COX-2、OX-42 及细胞核中 Nrf2 蛋白相对表达水平。

1.3 统计学分析

实验数据以 SPSS 22.0 软件进行分析,以表示计量资料,单因素方差分析进行多组间比较,SNK-*q* 检验进行两组间比较。

2 结果

2.1 褪黑素对大鼠行为学变化的影响

对照组大鼠饮食及行为活动正常。模型组大鼠出现单侧或双侧后肢部分瘫痪及行走、进食困难现象,且有 1 只死亡,行为学评分较对照组升高($P<0.05$)。与模型组相比,褪黑素组大鼠出现行走时转圈,很少有瘫痪及行走困难症状,且行为评分降低($P<0.05$)。ATRA 组大鼠有 2 只死亡,单侧或双侧后肢部分瘫痪大鼠例数增多,行为学评分最高($P<0.05$)。Nrf2-NC 组及褪黑素+ATRA 组大鼠均有 1

只死亡,与褪黑素组比较,行为学评分升高;与模型组相比,行为学评分差异无统计学意义,见表1。

表1 各组大鼠神经行为学评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of neurobehavioral scores in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	剂量/(mg·kg ⁻¹)	行为学评分
对照	12	—	0.00±0.00
模型	11	—	7.63±0.54*
褪黑素	12	5	4.05±0.37*▲
ATRA	10	7	8.51±0.46*▲△
褪黑素+ATRA	11	5+7	7.59±0.58*△
Nrf2-NC	11	植物油10 mL·kg ⁻¹	7.62±0.57*△

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: ▲ $P < 0.05$; 与褪黑素组比较: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs melatonin group

2.2 褪黑素对大鼠黑质多巴胺能神经元及活化小胶质细胞数目的影响

与对照组相比,模型组大鼠多巴胺能神经元数目减少,活化小胶质细胞数目增多 ($P < 0.05$)。与模型组相比,褪黑素组多巴胺能神经元数目增多,活化小胶质细胞数目减少 ($P < 0.05$); ATRA 组大鼠多巴胺能神经元数目进一步减少,活化小胶质细胞数目显著增多 ($P < 0.05$)。褪黑素+ATRA 组大鼠上述指标变化与褪黑素组相反 ($P < 0.05$)。褪黑素+ATRA 组及 Nrf2-NC 组上述指标与模型组相比差异无统计学意义,见图1、表2。

2.3 褪黑素对大鼠黑质部 Nrf2 和 IBA1 重合表达细胞数目变化的影响

与对照组相比,模型组大鼠黑质部 Nrf2 和 IBA1 重合表达细胞数目增加 ($P < 0.05$)。与模型组相比,褪黑素组大鼠黑质部 Nrf2 和 IBA1 重合表达细胞进一步增加 ($P < 0.05$); ATRA 组 Nrf2 和 IBA1 重合表达细胞数目减少 ($P < 0.05$)。褪黑素+ATRA 组大鼠上述指标变化与褪黑素组相反 ($P < 0.05$)。褪黑素+ATRA 组及 Nrf2-NC 组上述指标与模型组相比差异无统计学意义,见图2、表3。

2.4 褪黑素对大鼠黑质部 α -Syn、A β 水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠黑质区 α -Syn、A β 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比,褪黑素组大鼠黑质 α -Syn、A β 水平显著降低 ($P < 0.05$); ATRA 组黑质区 α -Syn、A β 水平进一步升高 ($P < 0.05$)。褪黑素+ATRA 组大鼠上述指标水平变化与褪黑素组相反 ($P < 0.05$)。褪黑素+ATRA 组及 Nrf2-NC 组上述指标与模型组相比差异无统计学意义,见表4。

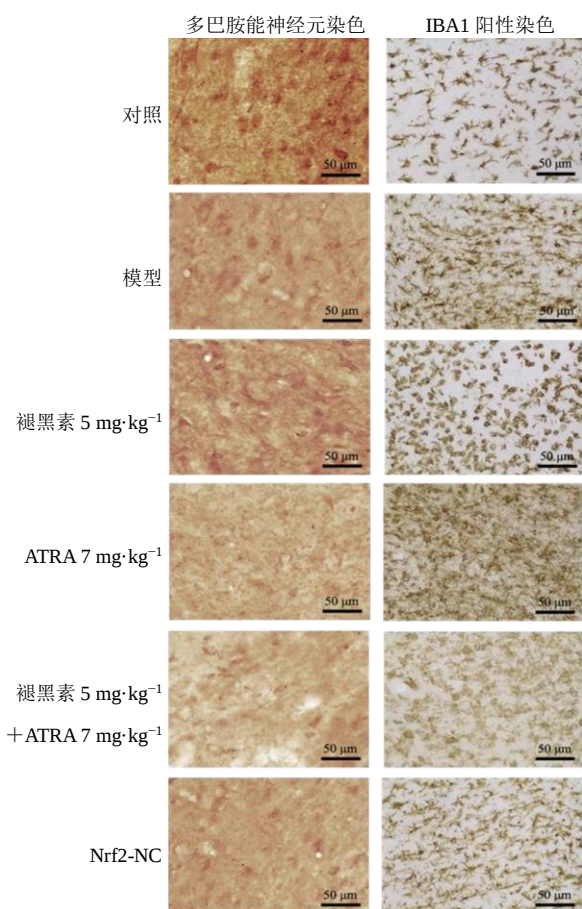


图1 大鼠黑质多巴胺能神经元及小胶质细胞活化免疫组化染色图 (×400)

Fig. 1 Activated immunohistochemical staining of dopaminergic neurons and microglia in rat substantia nigra (×400)

表2 各组大鼠黑质多巴胺能神经元及小胶质活化细胞数目比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Comparison of the number of dopaminergic neurons and microglia-activated cells in the substantia nigra in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	数目/(个·视野 ⁻¹)	
		神经元	小胶质细胞活化
对照	—	43.26±4.00	26.12±2.03
模型	—	14.03±1.29*	64.28±6.01*
褪黑素	5	33.23±3.43*▲	48.09±4.52*▲
ATRA	7	8.03±0.82*▲△	76.19±7.23*▲△
褪黑素+ATRA	5+7	14.05±1.21*△	65.26±6.19*△
Nrf2-NC	植物油10 mL·kg ⁻¹	13.99±1.23*△	64.92±6.31*△

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: ▲ $P < 0.05$; 与褪黑素组比较: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs melatonin group

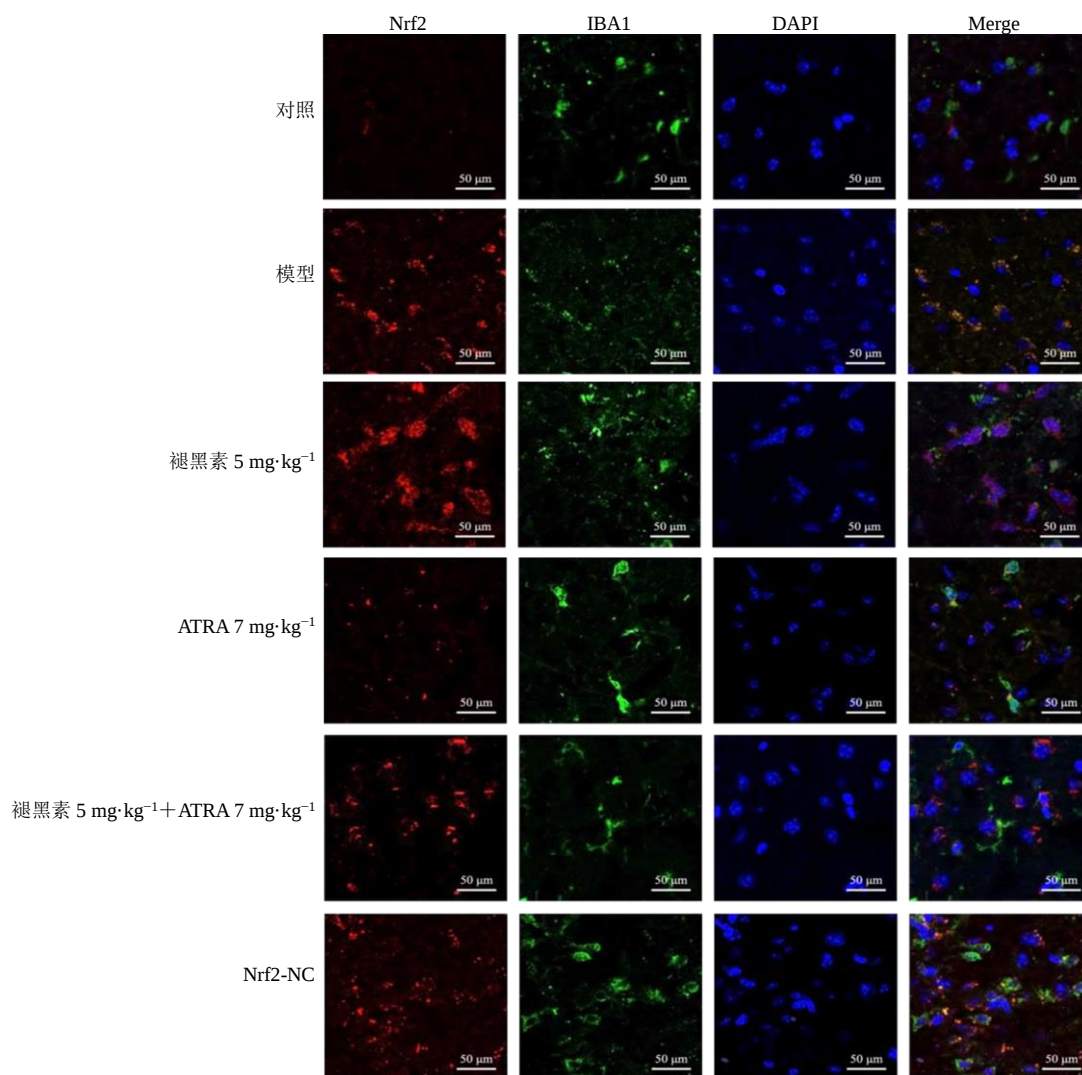


图 2 大鼠黑质部 Nrf2 和 IBA1 免疫荧光共定位图 (×400)

Fig. 2 Immunofluorescence co-localization of Nrf2 and IBA1 in the substantia nigra of rats (× 400)

表 3 各组大鼠黑质部 Nrf2 与 IBA1 重合表达细胞数目比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Table 3 Comparison of the number of Nrf2 and IBA1 superexpressed cells in the substantia nigra of each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Nrf2与IBA1重合表达 细胞数目/(个·mm ⁻²)
对照	—	0.30 ± 0.06
模型	—	3.09 ± 0.34*
褪黑素	5	12.52 ± 1.19* [▲]
ATRA	7	1.09 ± 0.11* ^{▲△}
褪黑素+ATRA	5+7	3.15 ± 0.31* [△]
Nrf2-NC	植物油10 mL·kg ⁻¹	3.11 ± 0.29* [△]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [▲] $P < 0.05$; 与褪黑素组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [▲] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs melatonin group

2.5 褪黑素对大鼠黑质区 Nrf2、HO-1、OX-42 蛋白表达的影响

与对照组相比, 模型组大鼠黑质区 HO-1、OX-42 及细胞核中 Nrf2 水平升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 褪黑素组大鼠黑质 HO-1 及细胞核中 Nrf2 水平进一步升高, OX-42 水平降低 ($P < 0.05$); ATRA 组黑质区 HO-1 及细胞核中 Nrf2 水平降低, OX-42 水平进一步升高 ($P < 0.05$)。褪黑素+ATRA 组大鼠上述指标变化与褪黑素组相反 ($P < 0.05$)。褪黑素+ATRA 组及 Nrf2-NC 组上述指标与模型组相比差异无统计学意义, 见图 3、表 5。

2.6 褪黑素对大鼠黑质区 TNF- α 、COX-2 蛋白表达的影响

与对照组相比, 模型组大鼠黑质区 TNF- α 、

表 4 各组大鼠黑质区 α -Syn、 $A\beta$ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of α -Syn and $A\beta$ levels in substantia nigra of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	剂量/(mg·kg ⁻¹)	α -Syn/(mg·L ⁻¹)	$A\beta$ /(μ g·L ⁻¹)
对照	6	—	500.53 ± 25.05	56.92 ± 5.69
模型	5	—	800.89 ± 38.08*	89.91 ± 8.26*
褪黑素	6	5	600.69 ± 30.06* [▲]	65.38 ± 6.05* [▲]
ATRA	4	7	999.69 ± 46.10* [▲] ^Δ	109.42 ± 9.12* [▲] ^Δ
褪黑素 + ATRA	5	5+7	806.85 ± 39.09* ^Δ	88.99 ± 7.19* ^Δ
Nrf2-NC	5	植物油 10 mL·kg ⁻¹	809.83 ± 38.98* ^Δ	87.89 ± 7.25* ^Δ

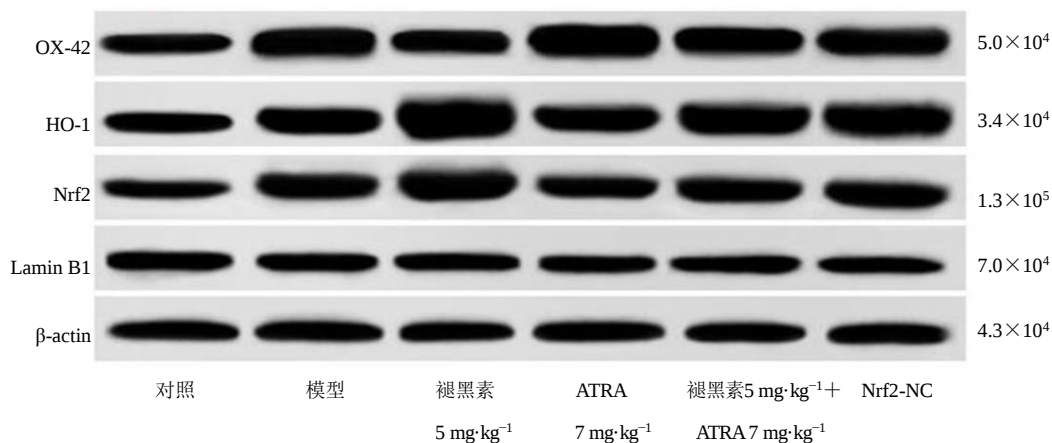
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [▲] $P < 0.05$; 与褪黑素组比较: ^Δ $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; [▲] $P < 0.05$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ vs melatonin group

图 3 各组大鼠黑质区 Nrf2、HO-1、OX-42 蛋白表达免疫印迹图

Fig. 3 Western blotting of Nrf2, HO-1 and OX-42 protein expression in substantia nigra of rats in each group

表 5 各组大鼠黑质区 Nrf2、HO-1、OX-42 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 5 Comparison of Nrf2, HO-1 and OX-42 protein expression in substantia nigra of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

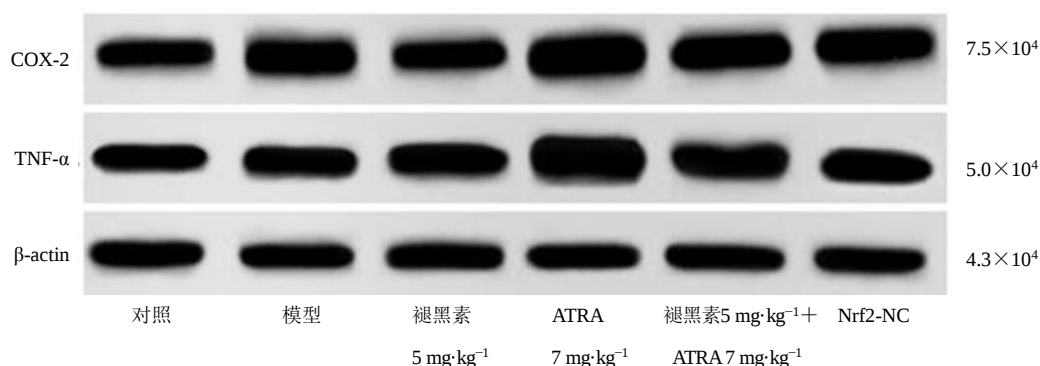
组别	n/只	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Nrf2/Lamin B1	HO-1/β-actin	OX-42/β-actin
对照	6	—	1.09 ± 0.12	1.01 ± 0.10	1.05 ± 0.11
模型	5	—	1.94 ± 0.19*	1.83 ± 0.18*	1.73 ± 0.17*
褪黑素	6	5	2.61 ± 0.12* [▲]	2.92 ± 0.13* [▲]	1.32 ± 0.13* [▲]
ATRA	4	7	1.41 ± 0.10* [▲] ^Δ	1.36 ± 0.09* [▲] ^Δ	2.65 ± 0.09* [▲] ^Δ
褪黑素 + ATRA	5	5+7	1.92 ± 0.18* ^Δ	1.81 ± 0.17* ^Δ	1.71 ± 0.16* ^Δ
Nrf2-NC	5	植物油 10 mL·kg ⁻¹	1.95 ± 0.19* ^Δ	1.86 ± 0.18* ^Δ	1.72 ± 0.17* ^Δ

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [▲] $P < 0.05$; 与褪黑素组比较: ^Δ $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; [▲] $P < 0.05$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ vs melatonin group

COX-2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比,褪黑素组大鼠黑质区 TNF- α 、COX-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); ATRA 组黑质区 TNF- α 、COX-2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。褪黑素 + ATRA 组大鼠上述指标变化与褪黑素组相反 ($P < 0.05$)。褪黑素 + ATRA 组及 Nrf2-NC 组上述指标与模型组相比差异无统计学意义,见图 4、表 6。

3 讨论

帕金森病患者脑内多巴胺神经元变性凋亡,是导致患者运动功能障碍发生的主要原因,寻找有效途径抑制患者多巴胺能神经元凋亡,对改善帕金森病患者运动功能障碍有一定的临床意义^[11]。近来研究发现,帕金森病患者脑黑质多巴胺能神经元持续性死亡变性的同时,还伴随着周围小胶质细胞的活

图4 各组大鼠黑质区 TNF- α 、COX-2 蛋白表达免疫印迹图Fig. 4 Western blotting of TNF- α and COX-2 protein expression in substantia nigra of rats in each group表6 各组大鼠黑质区 TNF- α 、COX-2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 6 Comparison of TNF- α and COX-2 protein expression in substantia nigra of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α / β -actin	COX-2/ β -actin
对照	6	—	1.09 $\pm$ 0.09	1.18 $\pm$ 0.12
模型	5	—	2.04 $\pm$ 0.21*	2.23 $\pm$ 0.21*
褪黑素	6	5	1.33 $\pm$ 0.12* Δ	1.52 $\pm$ 0.16* Δ
ATRA	4	7	2.81 $\pm$ 0.12* $\Delta\Delta$	2.99 $\pm$ 0.15* $\Delta\Delta$
褪黑素+ATRA	5	5+7	2.12 $\pm$ 0.20* Δ	2.11 $\pm$ 0.19* Δ
Nrf2-NC	5	植物油 10 mL·kg ⁻¹	2.09 $\pm$ 0.19* Δ	2.15 $\pm$ 0.20* Δ

化^[12]。Sabogal-Guáqueta^[13]及 Sironi^[14]等发现帕金森病患者代谢产物 α -Syn 和 A β 均可使小胶质细胞活化,释放大量 TNF- α 、COX-2 等促炎症介质,加重帕金森病患者多巴胺能神经元凋亡及神经炎症损伤。本研究经大鼠脑内注射 6-OHDA 复制人类帕金森病多巴胺能神经元缺失模型^[8],发现大鼠死亡、行走困难及瘫痪现象严重,黑质区多巴胺能神经元数量减少,并伴随着小胶质细胞活化数量增多、代谢产物 α -Syn、A β 升高及促炎介质 TNF- α 、COX-2 蛋白表达异常升高,提示大鼠出现多巴胺能神经元缺失、小胶质细胞活化及促炎介质升高现象,预示帕金森病模型制备成功。

褪黑素具有延缓衰老、神经保护、改善多巴胺能及纹状体神经损伤的作用^[15]。近来研究发现,其对小胶质细胞活化也有影响,且对帕金森病、阿尔茨海默症等神经系统疾病有改善作用。李晓峰等^[16]发现褪黑素可改善脑出血后神经细胞损伤,并推测其改善作用可能与抑制小胶质细胞活化有关。Hu^[17]等发现褪黑素可通过减轻线粒体损伤,调控小胶质细胞激活。Srivastava 等^[6]及王维莘等^[7]发现褪黑素可通过抑制多巴胺能神经元凋亡,改善帕金森病大鼠运动功能障碍。本研究发现,褪黑素干预后,帕

金森病大鼠死亡、行走困难及瘫痪现象缓解,黑质区多巴胺能神经元数量增加显著,黑质区小胶质细胞活化数量明显减少,并伴随着代谢产物 α -Syn 和 A β 分泌减少、促炎介质 TNF- α 、COX-2 蛋白表达降低,提示褪黑素可改善大鼠多巴胺能神经元缺失,且其改善作用可能与抑制小胶质细胞活化及促炎介质分泌有关。

既往研究发现, Nrf2/HO-1 通路介导的抗氧化应激及抗炎反应激活,参与小胶质细胞活化及神经系统炎症反应过程^[18]。研究证实,细胞受到活性氧(ROS)等炎症刺激时, Nrf2 可转位至细胞核,并激活下游抗氧化靶基因 HO-1 表达及抑制核转录因子(NF- κ B)炎症相关信号通路表达,来发挥抗氧化、抗炎反应,从而实现机体自我保护^[19]。Dong 等^[20]体内外实验发现小胶质细胞活化过程中存在 Nrf2 核移位及 HO-1 表达的升高,抑制 Nrf2/HO-1 通路激活后,小胶质细胞活化及炎症损伤进一步加重,神经细胞凋亡也更加明显。吴丹等^[21]发现脑出血后, Nrf2、HO-1 与小胶质细胞标记物(CD11b)阳性共染的细胞数目显著增多,抑制 HO-1 表达可进一步加重小胶质细胞活化及神经功能损伤,提示小胶质细胞活化过程中, Nrf2/HO-1 激活可抑制炎症

反应,减缓炎症介质对小胶质细胞的进一步活化及对神经系统的进一步损伤。本研究检测到在小胶质细胞活化及神经元丢失的帕金森病大鼠黑质部 Nrf2 与 IBA1 重合表达细胞的数目增多,且 HO-1、OX-42 蛋白及细胞核中 Nrf2 蛋白表达、促炎介质 TNF- α 、COX-2 蛋白表达均异常高于正常对照组,推测模型大鼠机体自身 Nrf2/HO-1 的激活可能不足以抵抗小胶质细胞过度活化介导的炎症损伤,可能是多巴胺能神经元丢失的关键因素。

本研究还发现,采用 ATRA 抑制黑质部 Nrf2/HO-1 通路激活后,大鼠黑质小胶质细胞活化数目进一步增加,并伴随着 TNF- α 、COX-2 等促炎症介质表达的进一步升高及黑质多巴胺能神经元的减少,大鼠死亡及瘫痪现象也进一步加重,证实抑制 Nrf2/HO-1 激活后,其对小胶质细胞过度活化介导的炎症反应的抑制作用丧失,是进一步导致黑质神经元丢失及减少的主要原因,与文献^[18-19]研究机理相一致。褪黑素组大鼠黑质部 Nrf2 与 IBA1 重合表达细胞数目、HO-1 蛋白及细胞核中 Nrf2 蛋白表达最高,黑质部炎症介质 TNF- α 、COX-2 表达及小胶质细胞活化数目最低,且多巴胺能神经元数目增多,提示褪黑素抑制帕金森病大鼠多巴胺能神经元减少、胶质细胞活化作用,可能与激活 Nrf2/HO-1 通路有关。而褪黑素与 ATRA 联合应用后,帕金森病大鼠黑质区 Nrf2 与 IBA1 重合表达细胞数目、HO-1 蛋白及细胞核中 Nrf2 蛋白表达与 MT 组相比显著降低的同时,炎症介质、多巴胺能神经元、小胶质细胞活化数目均显著升高,提示 ATRA 可逆转褪黑素促进 Nrf2/HO-1 通路激活及抑制小胶质细胞活化作用。

综上所述,褪黑素可能通过促进 Nrf2/HO-1 通路激活,抑制小胶质细胞活化及炎症反应,缓解帕金森病大鼠黑质多巴胺能神经元丢失。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Rusholt E H L, Salvesen L, Brudek T, et al. Pathological changes in the cerebellum of patients with multiple system atrophy and Parkinson's disease-a stereological study [J]. *Brain Pathol*, 2020, 30(3): 576-588.
- [2] 张森,赵晓悦,梁宇,等.帕金森病致病因素及发病机制研究进展 [J]. *药学报*, 2020, 55(10): 2264-2272.
- [3] 武静,刘芳,张敬法.小胶质细胞活化在年龄相关性黄斑变性及其他神经退行性病变发病中的作用 [J]. *国际眼科纵览*, 2020, 44(3): 187-191.
- [4] Huang B X, He D W, Chen G X, et al. A-Cyperone inhibits LPS-induced inflammation in BV-2 cells through activation of Akt/Nrf2/HO-1 and suppression of the NF- κ B pathway [J]. *Food Funct*, 2018, 9(5): 2735-2743.
- [5] Li L, Kitazawa H, Zhang X, et al. Melatonin retards senescence via regulation of the electron leakage of postharvest white mushroom (*Agaricus bisporus*) [J]. *Food Chem*, 2021, 340: 127833.
- [6] Srivastava A K, Roy Choudhury S, Karmakar S. Melatonin/polydopamine nanostructures for collective neuroprotection-based Parkinson's disease therapy [J]. *Biomater Sci*, 2020, 8(5): 1345-1363.
- [7] 王维苹,朱耀峰,张金,等.褪黑素对帕金森病模型大鼠代谢机能和 DA 能神经元的保护作用 [J]. *解剖学研究*, 2017, 39(2): 81-84.
- [8] 张思妍,王宝,陶凯,等.帕金森病大鼠模型的建立及超声影像评价 [J]. *中华超声影像学杂志*, 2020, 29(6): 540-544.
- [9] 张兴博,梁健芬,徐柳炎.加味五虎追风散对帕金森病模型大鼠多巴胺能神经元氧化应激水平的影响 [J]. *广西中医药*, 2020, 43(2): 62-65.
- [10] 吴莉,杜洪印,喻文立,等. Nrf2/HO-1 信号通路在饱和氢盐水减轻大鼠原位肝移植术后急性肾损伤中的作用 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2016, 36(7): 796-800.
- [11] 郭建新,孙学平,李平,等. TGF- β 1 通过抑制小胶质细胞活化对帕金森病大鼠神经保护作用及机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(14): 3477-3481.
- [12] Hinkle J T, Perepezko K, Rosenthal L S, et al. Markers of impaired motor and cognitive volition in Parkinson's disease: Correlates of dopamine dysregulation syndrome, impulse control disorder, and dyskinesias [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2018, 47: 50-56.
- [13] Sabogal-Guáqueta A M, Marmolejo-Garza A, de Pádua V P, et al. Microglia alterations in neurodegenerative diseases and their modeling with human induced pluripotent stem cell and other platforms [J]. *Prog Neurobiol*, 2020, 190: 101805.
- [14] Sironi L, Restelli L M, Tolnay M, et al. Dysregulated interorganellar crosstalk of mitochondria in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Cells*, 2020, 9(1): 233.
- [15] 黄姣娟,王文春,张安仁.褪黑素对脊髓损伤神经保护作用机制的研究进展 [J]. *西南军医*, 2019, 21(2): 139-142.
- [16] 李晓峰,李吕力,肖继东.褪黑素对急性脑出血小胶质细胞激活的影响 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2015, 24(1):

- 46-50.
- [17] Hu L, Zhang S, Wen H, *et al.* Melatonin decreases M1 polarization via attenuating mitochondrial oxidative damage depending on UCP2 pathway in prorenin-treated microglia [J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0212138.
- [18] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, *et al.* Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17): 3221-3247.
- [19] Xian Z, Choi Y H, Zheng M, *et al.* Imperatorin alleviates ROS-mediated airway remodeling by targeting the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(5): 898-910.
- [20] Dong L S, Dongzhi Z M, Jin Y L, *et al.* Taraxacum officinale wigg. attenuates inflammatory responses in murine microglia through the Nrf2/HO-1 and NF- κ B signaling pathways [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(2): 445-462.
- [21] 吴丹, 张曼青, 殷小平, 等. 锌原卟啉-9 腹腔注射对脑出血大鼠神经功能的改善作用及其机制 [J]. *山东医药*, 2018, 58(39): 43-48.

【责任编辑 高源】