

• 药理与临床 •

蝎毒耐热蛋白对帕金森病模型小鼠脑内一氧化氮合酶的影响

于德钦¹, 殷盛明¹, 彭岩^{2*}, 高溪¹, 赵杰¹, 唐一源³, 张万琴¹

(1. 大连医科大学 生理学教研室, 辽宁 大连 116027; 2. 大连医科大学 机能实验室, 辽宁 大连 116027;

3. 大连理工大学神经信息研究所, 辽宁 大连 116027)

摘要:目的 观察蝎毒耐热蛋白(SVHRP)对1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)致帕金森病小鼠运动协调性和脑内神经型一氧化氮合酶(nNOS)免疫反应(IR)阳性神经元的影响。方法 C57BL/6小鼠颈部sc MPTP 20 mg/kg,连续8 d造模型。同时设立SVHRP治疗组,测定小鼠爬竿和游泳时间以检测其运动协调性。应用免疫细胞化学方法观察脑内黑质酪氨酸羟化酶(TH)和nNOS免疫反应阳性神经元的变化。结果 MPTP致模型小鼠在黑质致密部多巴胺能神经元损伤后,运动协调能力下降,同时在尾核的nNOS免疫反应阳性神经元细胞数较正常组增多。治疗组小鼠运动协调能力与正常对照组比较没有明显改变,尾核的nNOS免疫反应阳性神经元细胞数较模型组明显减少。结论 SVHRP可以保护中脑黑质致密部多巴胺能神经元及改善MPTP引起的运动协调性降低,逆转MPTP引起的尾核nNOS免疫反应活性增强。而NO可能参与其保护机制。

关键词:1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP);帕金森病;神经型一氧化氮合酶(nNOS);蝎毒耐热蛋白(SVHRP)

中图分类号:R282.74

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)09-1359-04

Effects of scorpion venom heat-resistant protein on intracerebral NO synthase of mice with Parkinson's disease

YU De-qin¹, YIN Sheng-ming¹, PENG Yan², GAO Xi¹, ZHAO Jie¹,
TANG Yi-yuan³, ZHANG Wan-qin¹

(1. Department of Physiology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 2. Department of Function Laboratory, Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 3. Institute of Neuroinformatics, Dalian University of Technology, Dalian 116027, China)

Abstract: Objective To observe the effects of scorpion venom heat-resistant protein (SVHRP) on the locomotor ability and immunoreactivity (IR) of neural nitric oxide synthase (nNOS) in C57BL/6 mice with Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). **Methods** C57BL/6 Mice were sc injected with MPTP (20 mg/kg) for 8 d, then the pole test and swimming test were conducted to testify their motor harmony in SVHRP group. Immunocytochemistry was used to observe the change of TH-IR positive neurons in substantia nigra and nNOS-IR positive neurons in caudatum, respectively. **Results** The results indicated that MPTP model mice showed locomotor deficits after the damage of dopaminergic neurons. Meanwhile, the number of nNOS-IR positive neurons in caudatum increased as compared to the normal group. Furthermore, the therapy group had no difference in locomotor harmony compared with the normal control group, but the number of nNOS-IR positive neurons in caudatum decreased significantly as compared to the model group. **Conclusion** This study suggests that the increase of nNOS in caudatum may play a role in improvement of locomotor disability. SVHRP exerts neuroprotection in MPTP-treated C57BL/6 mice via decreasing nNOS in the caudatum. NO may be related to the protective mechanism.

Key words: 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP); Parkinson's disease; neural nitric oxide synthase (nNOS); scorpion venom heat-resistant protein (SVHRP)

收稿日期:2005-12-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(60472017)

作者简介:于德钦(1962—),男,辽宁大连人,大连医科大学生理教研室实验师,大专,长期从事神经变性疾病的治疗和发病机制的研究,在该领域已发表论文8篇,获省级科技进步奖1项。

Tel: (0411) 84720032 Fax: (0411) 84720655 E-mail: yudeqin62@yahoo.com.cn

* 通讯作者 彭岩 Tel: (0411) 84720143 Fax: (0411) 84720655 E-mail: pengyan830@yahoo.com.cn

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是常见的神经系统退行性疾病,其发病机制不清。目前治疗 PD 的药物只能对症治疗,有许多不良反应。蝎毒作为传统中药,早有记载可以治疗 PD^[1],但其治疗机制尚不清楚。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 建立 PD 模型的方法应用了近 20 年。在人类和啮齿类动物,MPTP 可以引起与 PD 患者相似的临床、生化和神经化学的改变^[2]。C57BL/6 小鼠对 MPTP 的毒性作用高度敏感,被广泛用于研究 PD 的发病和治疗机制^[2]。已有研究表明一氧化氮 (NO) 可能参与 PD 的发病机制^[3,4]。神经元型一氧化氮合酶 (nNOS) 主要存在于脑内,与 NO 的产生密切相关。为了进一步探讨 PD 的发病机制和寻找新的治疗 PD 的药物,本研究制备 C57BL/6 小鼠的 MPTP 模型,同时给予蝎毒耐热蛋白 (SVHRP) 治疗,观察相应脑区酪氨酸羟化酶 (TH) 阳性多巴胺能神经元和 nNOS 阳性神经元的变化,探讨蝎毒耐热蛋白对 PD 小鼠运动协调能力的改善及其可能的机制。

1 材料

1.1 药品与试剂:MPTP,015K1187,美国 Sigma 公司。第一抗体 (TH-Ab, 1:1000; nNOS-Ab, 1:300) 购于 Sigma 公司。生物素化的羊抗兔的 IgG (1:400),购于武汉 Boster 公司。蝎毒耐热蛋白 (SVHRP),由大连医科大学中试基地提供,蝎毒耐热蛋白 (含蛋白 0.02 mg/mL) 由东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 提取,经特殊工艺处理,其毒性明显降低,药效明显提高 (国家发明专利:ZLO1106166.9)。其余试剂均为市售分析纯。

1.2 动物:C57BL/6 小鼠 (大连医科大学动物实验中心提供)。

1.3 仪器:HPIAS 系列彩色病理图文分析系统,购于华海电子有限公司。ZPQ-86 型振动切片机,购于上海海天电子仪器有限公司。U-3010 日立分光光度计。

2 方法

2.1 PD 模型制备和分组:选取健康 C57BL/6 小鼠 (雌雄各半,体重 18~22 g),随机分为模型组 (MPTP+NS, $n=24$)、治疗组 (MPTP+SVHRP, $n=8$)、实验对照组 (NS+SVHRP, $n=8$)、空白对照组 (NS+NS, $n=24$)。MPTP+NS 组,sc MPTP (溶于三蒸水, pH 8.5) 20 mg/(kg·d), 2 h 后 ip NS, 连续 8 d; NS+NS 组给予容积相等的 NS, MPTP+SVHRP 组和 NS+SVHRP 组在 sc

MPTP 或 NS 2 h 后,分别 ip SVHRP 1.1 mg/(kg·d) (剂量由预实验确定),连续 8 d。

2.2 行为学实验:实验前 4 d,各组小鼠进行爬杆、游泳行为训练,每日 2 次^[5]。实验第 2、4、6、8 日给药后分别进行行为学实验以检测其肢体运动协调情况。

2.2.1 爬杆实验:将一直径为 2.5 cm 的泡沫塑料小球固定于一根长 50 cm、直径 1 cm 的木杆顶端,木杆上缠 2 层纱布以防打滑。将小鼠放到球顶,分别记录:小鼠爬完杆长的上半部分所需时间;小鼠爬完杆长的下半部分所需时间;小鼠爬完杆长的全长所需时间。按以下标准评分:3 s 内完成上述某一动作记 3 分;6 s 内完成记 2 分;超过 6 s 记 1 分。将这 3 个时间的分数相加即为被测小鼠本次爬杆实验的最后分数。

2.2.2 游泳实验:将小鼠放入一个 20 cm×30 cm×20 cm 规格的水箱中,水温为 22~25 ℃。按以下标准评分:在 90 s 内能连续不断游泳记 3 分;偶尔漂浮,大部分时间游泳记 2.5 分;漂浮时间占整个受试时间 50% 以上记 2 分;偶尔游泳记 1.5 分;偶尔用后肢游并漂浮在一边记 1 分。

2.3 免疫细胞化学实验

2.3.1 方法:动物经 4% 水合氯醛 (400 mg/kg, ip) 麻醉后,分别用 1% 和 4% 多聚甲醛进行灌注,取脑放入 4% 多聚甲醛中固定,再换入 20% 蔗糖磷酸缓冲液 4 ℃ 过夜。用振动切片机切取 30 μ m 厚的脑片,进行下列免疫细胞化学反应:脑片经 PBS 漂洗 10 min×3 次,与 1% BSA 孵育 30 min;分别加入第一抗体 (TH-Ab, 1:1000, nNOS-Ab, 1:300), 4 ℃ 孵育过夜, PBS 漂洗 10 min×3 次;与生物素化的羊抗兔的 IgG 室温振荡孵育 1 h, PBS 漂洗 10 min×3 次;卵白素生物素复合物 A-B-PBS (1:1:400) 室温振荡孵育 2 h, DAB 法显色。处理空白对照脑片时,第一抗体用 PBS 代替。

2.3.2 结果观察:用 HPIAS 系列彩色病理图文分析系统对 TH 和 nNOS 免疫反应阳性神经元进行定量计数。选取各组小鼠 5 只。脑片的选取部位根据 George Paxinos & Charles Watson 大鼠脑图谱,先在 10 倍的物镜下观察脑片,选取黑质致密部 (SNR)、尾核 (CPU),在荧光屏上测定 nNOS 免疫反应阳性神经元测量框的面积为 2 816 μ m² (44 μ m×64 μ m),测定 TH 免疫反应阳性神经元测量框的面积为 2 919.35 μ m² (43.9 μ m×66.5 μ m),选取 4 个部位计数,取其平均值。计算测量框内

TH、nNOS 免疫反应阳性神经元的个数。

2.4 数据处理:实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理,显著性检验用方差分析法。

3 结果

3.1 运动行为学改变

3.1.1 爬杆实验:MPTP+NS 组小鼠注药后出现暂时性躯干震颤、竖毛、竖尾、动作减少,对外界刺激反应低下,症状于 24 h 后完全消失。MPTP+NS 组小鼠的爬竿时间较 NS+NS 组延长,测试分数比 NS+NS 组降低,出现运动障碍。MPTP+SVHRP 组与 NS+NS 组相比没有明显改变(表 1)。

表 1 SVHRP 对小鼠爬杆行为的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	爬杆实验评分			
		第 2 天	第 4 天	第 6 天	第 8 天
NS+NS	—	8.2±0.9	8.6±0.5	8.5±0.5	8.8±0.4
NS+SVHRP	0±1.1	8.3±0.5	8.5±0.5	8.2±0.6	8.5±0.5
MPTP+NS	20±0.0	3.4±0.7△△	3.8±0.8△△	4.7±1.2△△	5.4±1.6△△
MPTP+SVHRP	20±1.1	8.2±0.4**	8.0±0.5**	8.1±0.7**	8.1±0.6**

与 NS+NS 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

与 MPTP+NS 组比较: ** $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs NS+NS group

** $P < 0.01$ vs MPTP+NS group

3.1.2 游泳实验:MPTP+NS 组小鼠的游泳实验测试分数较空白对照组降低,游泳能力降低,出现运动障碍。MPTP+SVHRP 与 NS+NS 组相比没有明显改变(表 2)。

表 2 SVHRP 对小鼠游泳行为的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of SVHRP on swimming test in mice ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	游泳实验评分			
		第 2 天	第 4 天	第 6 天	第 8 天
NS+NS	—	2.95±0.16	2.95±0.16	2.95±0.16	3.00±0.00
NS+SVHRP	0±1.1	2.75±0.49	2.90±0.21	2.95±0.16	2.85±0.24
MPTP+NS	20±0	1.45±0.5△△	1.55±0.50△△	1.35±0.41△△	1.30±0.35△△
MPTP+SVHRP	20±1.1	2.70±0.35**	2.75±0.26**	2.85±0.24**	2.75±0.49**

与 NS+NS 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

与 MPTP+NS 组比较: ** $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs NS+NS group

** $P < 0.01$ vs MPTP+NS group

3.2 对 C57BL/6 小鼠黑质致密部 TH 阳性神经元的影响:与 NS+NS 组相比,MPTP+NS 组小鼠黑质致密部的 TH 免疫反应阳性多巴胺能神经元明显脱失,残存 TH 免疫反应阳性多巴胺能神经元灰度降低,免疫反应活性代偿性增加。MPTP+SVHRP 组与 NS+NS 组相比没有明显改变(表 3)。

3.3 对 C57BL/6 小鼠脑内 nNOS 免疫反应活性的影响:见表 4。MPTP+NS 组 nNOS 阳性细胞增加,

表 3 小鼠黑质致密部 TH 免疫反应阳性神经元的数目和灰度

Table 3 Number and mean grey of TH-IR positive dopaminergic neurons in substantia nigra compact

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	TH 阳性神经元	
		细胞数	灰度
NS+NS	—	7.8±0.5	34.1±2.5
NS+SVHRP	0±1.1	7.8±1.6	30.5±3.1△
MPTP+NS	20±0	3.6±0.9△△	25.0±2.7△△
MPTP+SVHRP	20±1.1	6.8±1.5	28.1±0.7**

与 NS+NS 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

与 MPTP+NS 组比较: ** $P < 0.01$

$\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs NS+NS group

** $P < 0.01$ vs MPTP+NS group

表 4 小鼠尾核 nNOS 免疫反应阳性细胞数

Table 4 Number of nNOS-IR positive cells in caudatum of mice

组 别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	nNOS 阳性细胞数
NS+NS	—	8.5±0.8
NS+SVHRP	0±1.1	9.0±0.5
MPTP+NS	20±0	10.4±0.5△△
MPTP+SVHRP	20±1.1	9.6±0.5**

与 NS+NS 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

与 MPTP+NS 组比较: ** $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs NS+NS group

** $P < 0.01$ vs MPTP+NS group

MPTP+SVHRP 组较 MPTP+NS 组明显降低。

4 讨论

在 PD 动物模型中,MPTP 的毒性是通过氧化应激介导的,NO 参与 PD 的发病机制已被许多研究支持^[3,4]。nNOS 主要存在于大脑皮层、海马、纹状体、下丘脑、中脑和小脑等脑区。nNOS 在乙酰胆碱、缓激肽、钙离子以及兴奋性氨基酸等的激活下催化 L-精氨酸生成 NO。MPTP 代谢产物 MPP⁺选择性的与多巴胺摄取系统有高度亲和力,聚集在多巴胺能神经元的线粒体内。MPP⁺抑制多巴胺能神经元线粒体内电子传递链的复合物 I^[1],对细胞具有毒性作用,激活 nNOS 产生大量 NO,进而产生亚硝基化合物,引起自由基氧化反应,尤其是超氧阴离子。MPTP 还可激活 NMDA 受体引起 nNOS 神经元内钙离子浓度增高^[3]。还有研究表明 MPP⁺介导胶质细胞内的 MAO-B 引起的氧化作用^[4]。这些毒性作用最后导致神经元死亡。

有报道 nNOS 抑制剂 7-nitroindazole (7-NI) 能抵抗 MPTP 对小鼠及狒狒的毒性作用,表现在逆转 DA 递质的减少和多巴胺能神经元的丢失,保护机制可能是减少 MPTP 引起的神经元产生的 NO 和亚硝基化合物,也可能是降低了 MPP⁺水平,还

可能是通过抑制 MAO-B 来实现的^[6,7]。有研究证明 nNOS 基因缺陷突变小鼠可以抵抗 MPTP 的神经毒性,表现为纹状体和黑质的损伤明显减轻^[7]。抑制 nNOS 可以减轻 MPTP 的毒性作用^[8]。这些研究为 NO 参与 PD 的发病机制提供了证据。还有研究发现 NO 促进 MPP⁺ 对多巴胺能神经元和培养的星型胶质细胞的毒性作用^[9]。给予单剂量 MPTP 4~12 h 后, nNOS 活性在纹状体增高, MPTP 的毒性作用表现为 NO 及 ONOO⁻ 增高^[10]。

本研究发现小鼠 sc MPTP 20 mg/kg 连续 8 d, 与 NS+NS 组比较, MPTP+NS 组尾核内的 NOS 免疫反应阳性神经元数目明显增加 ($P < 0.01$), 脑内黑质致密部的多巴胺能神经元数目明显减少 ($P < 0.01$)。同时 MPTP+NS 组小鼠运动协调能力降低。而 MPTP+SVHRP 与 NS+NS 组比较没有明显变化。MPTP+SVHRP 组动物黑质致密部多巴胺能神经元受损程度明显减轻, 动物的运动障碍明显改善, 这可能与 SVHRP 明显抑制尾核内 nNOS 的过度表达有关。前期体外实验证实 SVHRP 有明显的抗氧化和清除自由基作用, 但体内抗氧化机制尚不清楚。本研究还发现 SVHRP 一方面可以保护中脑黑质致密部多巴胺能神经元; 另一方面通过降低纹状体 nNOS 的表达改善 MPTP 引起的运动协调性降低, 有良好的治疗作用。逆转 MPTP 引起的尾核 nNOS 免疫反应活性增强。NO 是学习记忆中的重要信号转导分子, 参与学习记忆

的功能调控。所以 NO 很可能参与其保护机制。

References:

- [1] Xu D L, Chen S D, Liu Z G. *Clinical Advanced Technique in Parkinson's Disease* (帕金森病临床新技术) [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2002.
- [2] Heikkila K E, Manzino L, Cabbat F S, et al. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors [J]. *Nature*, 1984, 311: 467-469.
- [3] Christopherson K S, Hillier B J, Lim W A, et al. PSD-95 Assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 27467-27473.
- [4] Tipson K F, Singer T P. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds [J]. *J Neurochem*, 1993, 61: 1191-1206.
- [5] Donnan G A, Willis G L, Kaczmarek S J, et al. Motor function in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-treated mouse [J]. *J Neurosci*, 1987, 77: 185-191.
- [6] Hijiiri W, Yasuko M, Rumiko K, et al. Protective effects of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in mouse brain against MPTP neurotoxicity: an immunohistological study [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2004, 14: 93-104.
- [7] Matthews R T, Beal M F, Fallon J, et al. MPP⁺ induced substantia nigra degeneration in attenuated in nNOS knock-out in mice [J]. *Neurobiol Dis*, 1997, 4: 114-121.
- [8] Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced-parkinsonism in baboons [J]. *Nat Med*, 1996, 2: 1017-1021.
- [9] Santiago M, Machado A, Cano J. Effect of L-arginine/nitric oxide pathway on MPP (1)-induced cell injury in the striatum of rats [J]. *Br J Pharmacol*, 1994, 111: 837-842.
- [10] Halász A S, Pálfi M, Tábi T, et al. Altered nitric oxide production in mouse brain after administration of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine or methamphetamine [J]. *Neurochem Internat*, 2004, 44: 641-646.

大明胶囊对高脂血症大鼠心肌 M 受体各亚型 mRNA 表达的影响

邢 妍, 岳 朋, 李 惠, 张 勇, 林道红, 董德利, 吕延杰, 杨宝峰*

(哈尔滨医科大学 药理教研室, 黑龙江省生物医药工程重点实验室-省部共建国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:目的 通过检测 M 受体各亚型在心肌上的 mRNA 表达量, 研究大明胶囊对高脂血症大鼠降血脂作用的分子机制。方法 制备高脂血症大鼠模型, 尾静脉取血清测血清中的总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL)、高密度脂蛋白 (HDL)、游离脂肪酸 (FFA)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 等血脂指标; Trizol 法提取心肌总 RNA, 利用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定 M₂、M₃、M₄、M₅ 4 种 M 受体亚型 mRNA 的表达, 观察其在高脂、正常和给药 3 种条件下的差异。结果 高脂血症时血清中的 TC、TG、LDL、FFA 及 MDA 水平升高 ($P < 0.05$), HDL 与 SOD 降低 ($P < 0.05$), 经大明胶囊治疗后 TC、TG、LDL、FFA 及 MDA 水平降低 ($P < 0.05$), HDL 与 SOD 水平上调 ($P < 0.05$) 至近正常水平; 比较高脂模型组与正常组 M 受体各亚型 mRNA 表达, 结果 M₂、M₄、M₅ 受体亚型表达减弱, M₃ 受体亚型表达增强, 差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。给大明胶囊后与高脂模型组比较 M₃ 受体亚型 mRNA 表达增强, M₂ 受体亚型表达减弱, 且具有显著差异 ($P < 0.05$), M₄、M₅ 受体亚型 mRNA

收稿日期: 2006-01-27

基金项目: 重大基础研究前期专项 (2004CCA06700)

作者简介: 邢 妍 (1981—), 女 (蒙古族), 辽宁阜新人, 硕士在读, 研究方向为心血管药理学。Tel: (0451) 86671354

* 通讯作者 杨宝峰 Tel: (0451) 86671354 E-mail: yangbf@ems.hrbmu.edu.cn