

原儿茶酸对帕金森病模型小鼠中脑和纹状体 D2DR、iNOS 和 TH 表达的影响

尹 雪, 苏新云, 王秀华, 苏佳丽, 廉 艳, 张秀丽*

滨州医学院药学院, 山东 烟台 264003

摘 要: 目的 考察原儿茶酸对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 致帕金森病 (PD) 小鼠中脑和纹状体多巴胺 D2 受体 (D2DR)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和酪氨酸羟化酶 (TH) 表达的影响。方法 选用 C57BL 褐鼠为实验动物, 连续 7 d ip MPTP (25 mg/kg) 制备 PD 动物模型。造模前后分别 ip 给予原儿茶酸 (10 mg/kg) 或阳性对照药美多芭 (125 mg/kg) 进行预防和治疗。应用 Western blotting 的方法, 观察原儿茶酸对 PD 模型小鼠中脑和纹状体内 D2DR、iNOS 和 TH 表达的影响。结果 PD 模型小鼠脑组织内 iNOS 表达升高, D2DR 和 TH 表达下降, 而原儿茶酸能够显著降低 PD 模型小鼠脑中 iNOS 的表达, 提高 D2DR 和 TH 的表达量。结论 原儿茶酸对 MPTP 诱导的 PD 模型小鼠有保护作用, 可能通过提高 PD 模型小鼠中脑和纹状体内 D2DR 和 TH 的表达, 降低 iNOS 的表达发挥作用。

关键词: 帕金森病; 原儿茶酸; 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶; 多巴胺 D2 受体; 诱导型一氧化氮合酶; 酪氨酸羟化酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)06-0866-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.06.015

Effects of protocatechuic acid on expression of D2DR, iNOS, and TH in striatum and midbrain of Parkinson's disease model mice

YIN Xue, SU Xin-yun, WANG Xiu-hua, SU Jia-li, LIAN Yan, ZHANG Xiu-li

Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

Abstract: Objective The aim of this paper is to investigate the effects of protocatechuic acid (PCA) on the expression of D2DR, iNOS, and TH in striatum and midbrain of Parkinson's disease (PD) mice induced by MPTP. **Methods** C57BL brown mice were used as experimental animals and were injected with MPTP (25 mg/kg.d) for 7 d to build PD model mice. PCA (10 mg/kg.d) and Madopar (125 mg/kg.d) had been ip administered to the PD mice for the precaution and treatment at the first and lasted for 7 d. The expression of D2DR, iNOS, and TH in the striatum and midbrain of PD mice induced by MPTP was detected by Western blotting method. **Results** The results showed that iNOS expression increased while D2DR and TH expression decreased in the striatum and midbrain of MPTP-induced PD mice. However, PCA significantly decreased the expression of iNOS while obviously increased the expression of D2DR and TH in the striatum and midbrain of MPTP-induced PD mice. **Conclusion** PCA has a neuroprotective effect on the PD mice induced by MPTP, and its protective effects on mice brain are achieved at least partly by increasing TH and D2DR expression while decreasing iNOS expression. **Key words:** Parkinson's disease; protocatechuic acid; MPTP; dopamine D2 receptor; inducible nitric oxide synthase; tyrosine hydroxylase

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种严重影响中老年人身体健康和生活质量的常见疾病, 是锥体外系的一种变性疾病, 主要临床特点为静止性震颤、肌强直、姿势异常和运动减少。该病平均发病年龄为 55 岁, 65 岁以上人群发病率 1%~2%, 显著降低了老年人的生活质量和预期寿命, 社会危害很大^[1]。目前发病机制仍不十分清楚, 研究显示其主要病理特

征为选择性黑质多巴胺 (DA) 神经元缺失, 残存神经元呈现 α -突触核蛋白和泛素染色阳性的胞浆内包涵体形成, 黑质-纹状体通路 DA 释放减少, 患者出现静止性震颤、肌张力增高、运动减少等一系列症状^[2-3]。

目前, PD 的治疗方法有药物治疗、外科手术治疗和细胞基因移植治疗, 其中以药物治疗最为广泛。PD 模型的建立对阐明其发病机制、发现药物

收稿日期: 2014-11-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102828, 81273037); 山东省自然科学基金项目 (ZR2011HM011, J11LF-86); 山东省高等学校科技计划项目 (J11LF-86)

作者简介: 尹 雪 (1987—), 女, 硕士在读, 研究方向为药理学。Tel: (0535)6913251

*通信作者 张秀丽, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药理和毒理研究。Tel: (0535)6913251 E-mail: zhangxiuli2008@163.com

作用靶标和新药研发具有重要意义。自从 1982 年发现 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 能在人类产生酷似 PD 的症状以来, 人们对 MPTP 的神经毒性作用进行了大量研究^[4]。由于 MPTP 对黑质多巴胺神经元有选择性破坏作用, 从而使其成为诱导 PD 模型的有效药物。MPTP 进入体内通过血脑屏障在神经胶质细胞中单胺氧化酶的作用下转化为其有效成分 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) 发挥其毒性作用。MPTP/MPP⁺ 诱导的 PD 实验模型成为最常用的并最具有代表性的 PD 模型^[5-6]。

原儿茶酸是天然存在于许多蔬菜和果实中的一种酚酸类物质, 并且是很多中药中的活性成分, 如丹参、芙蓉等^[7]。早期的研究已经证明, 原儿茶酸具有抗血小板凝集、降低心肌耗氧量、抑菌、镇痛等多方面药理活性, 是一种重要的天然活性物质。近年来研究发现原儿茶酸可以抑制 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞凋亡、抑制 MPP⁺ 导致的 PC12 细胞损伤^[8-9]。其机制与抑制神经细胞凋亡、提高细胞抗氧化能力有关。体内动物实验表明原儿茶酸能提高脑组织内源性抗氧化酶活力^[10]。这些结果表明原儿茶酸对神经损伤具有显著的保护作用, 进一步在动物模型上研究原儿茶酸对 PD 的作用机制非常必要。本实验以 MPTP 致小鼠 PD 为模型, 考察原儿茶酸对 MPTP 致 PD 小鼠保护作用。应用 Western blotting 的方法检测纹状体和中脑中的酪氨酸羟化酶 (TH)、多巴胺 D2 受体 (D2DR)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达情况, 观测原儿茶酸的调控作用, 为其开发和临床应用奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

原儿茶酸 (质量分数 > 99%, 批号 110809-201205), 中国食品药品检定研究院; 美多芭 (上海罗氏制药有限公司生产, 批号 SH0884); 抗 iNOS 抗体, Cell Signaling 生产; 兔抗鼠 (1:1 000) 抗 D2DR 抗体, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY 生产; 兔抗鼠 (1:200) 抗 TH 抗体, Cell Signaling 生产; 兔抗鼠 (1:1 000) 二抗, HRP 标记的山羊抗兔的抗体 (1:2 000~1:10 000) 碧云天生产; 化学发光试剂 (A 和 B 两种): 北京中山公司; Tris、PMSF、SDS、丙烯酰胺、亚甲双丙烯酰胺、聚山梨酯 20、TritonX-100、考马斯亮蓝 G250、BSA、TEMED、甘氨酸购于 Sigma 公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 实验动物饲养、分组

健康 C57BL 褐鼠 (2 月龄), 购于北京华康生物科技股份有限公司, 动物合格证号 11401300020700, 体质量 (25±5) g, 分笼饲养于室温控制在 (24±1) °C 的室内, 自由进食进水。将小鼠随机分成 6 组, 每组 15 只, 分别为对照组、模型组、原儿茶酸预防组、原儿茶酸治疗组、阳性对照预防组、阳性对照治疗组。

1.3 造模及给药方案

预防药物组在实验第 1~10 天每天 ip 给予原儿茶酸 (10 mg/kg) 或阳性对照药美多芭 (125 mg/kg), 在实验第 4~10 天给药后再 ip 给予 MPTP (25 mg/kg) 造模; 治疗药物组在实验第 4~10 天 ip MPTP 造模, 在实验第 4~13 天造模后再 ip 给予原儿茶酸 (10 mg/kg) 或美多芭 (125 mg/kg), 对照组与模型组均 ip 等量生理盐水。

1.4 脑组织处理及脑总蛋白的提取

给药结束后, 动物禁食后于第 14 天颈椎脱臼处死, 在冰袋上小心快速剥离脑组织, 用 0.9% 冰冷生理盐水洗净表面血液后, 分离出中脑和纹状体, 放入 -80 °C 冰箱保存。将取出的脑组织放入玻璃匀浆管中, 根据记录的中脑的质量按照 1:9 的比例加入裂解液于匀浆器中, 进行匀浆。冰上反复研磨, 裂解 30 min 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液分装于 0.5 mL 离心管中, 置于 -20 °C 保存。

1.5 SDS-PAGE 电泳

考马斯亮蓝法测定蛋白的量, 计算含 50 µg 蛋白的溶液体积即为上样量。上样前将样品至沸水中煮 5 min, 使蛋白质变性。加上样缓冲液后进行恒压电泳 2~3 h, 电压为 100 V, 至溴酚蓝到底线停止电泳, 进行转膜。印迹后的膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 30 min (室温), 然后用特异的抗体在 4 °C 孵育过夜, α -tubulin 作为内参。次日, 用杂交膜清洗液洗膜 3 次, 每次 5 min; 然后用辣根过氧化物酶标记的 IgG 孵育 1 h, 洗膜后加入化学发光液, 曝光后进行扫描和拍照, 用凝胶图像处理系统分析目标条带的灰度值。

1.6 统计学处理

利用 SPSS 13.0 软件进行数据分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Student's-t 检验进行组间比较。

2 结果

2.1 对 PD 模型小鼠中脑和纹状体 TH 表达的影响

模型组小鼠中脑和纹状体中 TH 表达量明显减少;

原儿茶酸预防组和治疗组明显提高了 TH 表达量。结果说明原儿茶酸能够增加 PD 模型小鼠中脑中 TH 的表达量, 且作用效果和阳性对照药美多芭相当。见图 1。

2.2 对 PD 模型小鼠中脑和纹状体 D2DR 表达的影响

与对照组比较, 模型组小鼠中脑和纹状体内的

D2DR 的表达量明显降低 ($P < 0.01$); 原儿茶酸预防组和治疗组及阳性药物美多芭都能明显提高 D2DR 表达量 ($P < 0.01$), 说明原儿茶酸能增加 MPTP 诱导的 PD 小鼠中脑和纹状体中的 D2DR 的表达量, 效果接近于阳性药物美多芭。见图 2。

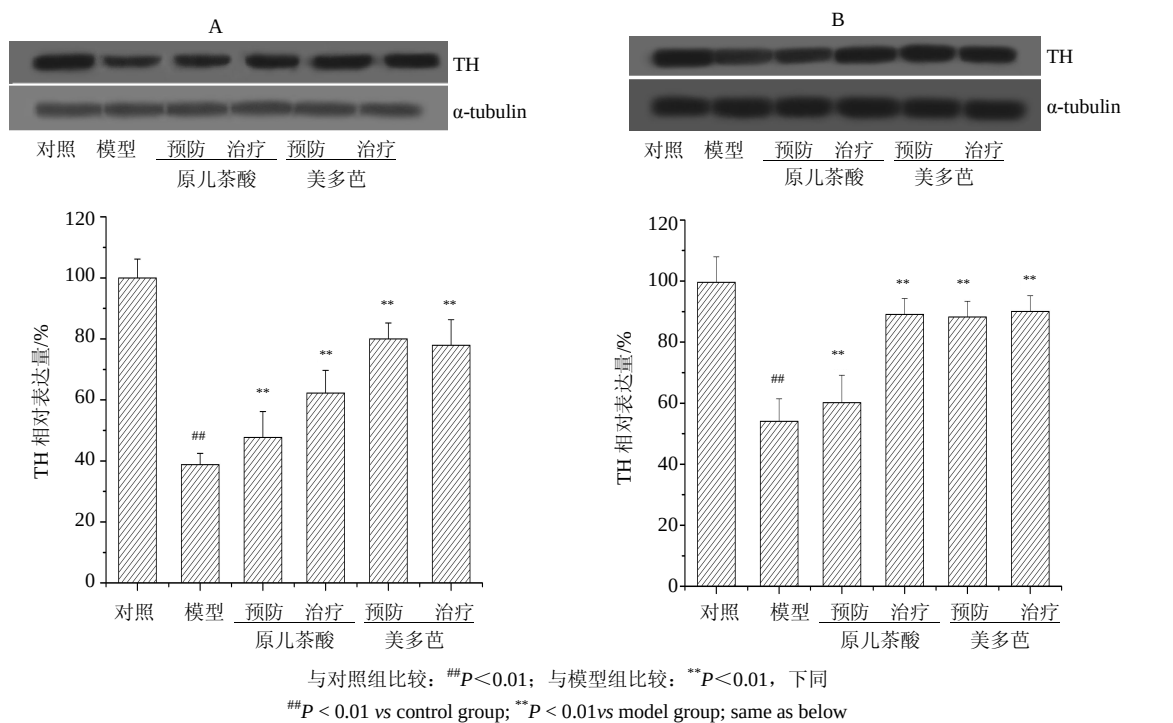


图 1 原儿茶酸对 PD 模型小鼠中脑 (A) 和纹状体 (B) TH 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effects of protocatechuic acid on TH expression in striatum (A) and midbrain (B) of PD model mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

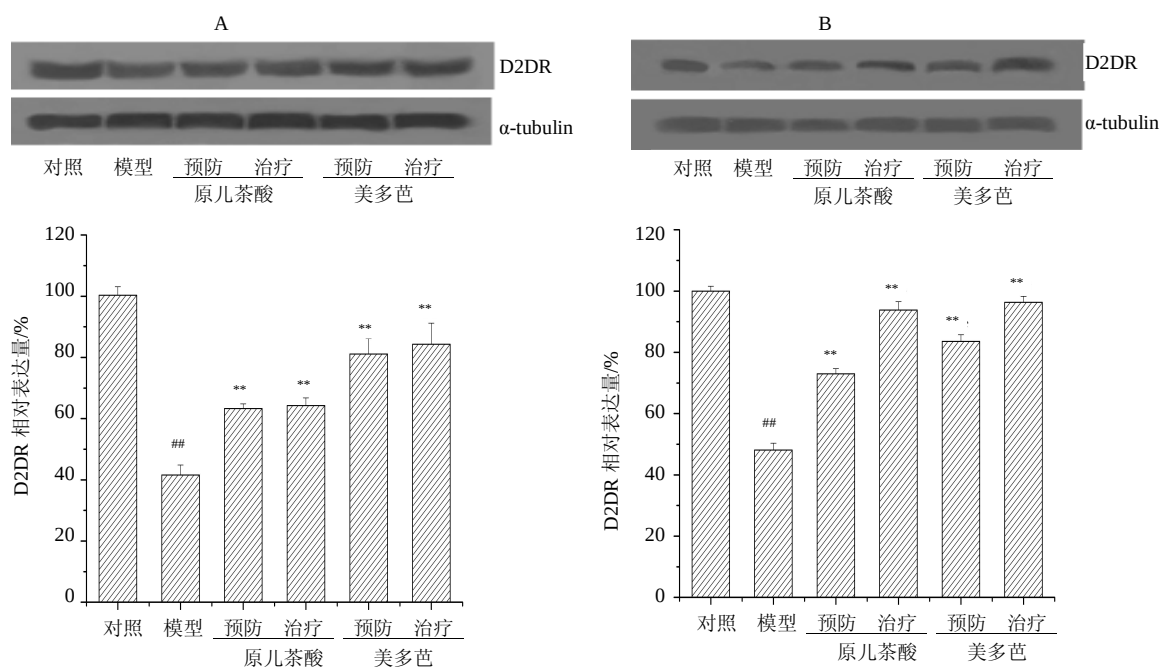


图 2 原儿茶酸对 PD 模型小鼠中脑 (A) 和纹状体 (B) D2DR 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effects of protocatechuic acid on D2DR expression in striatum (A) and midbrain (B) of PD model mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.3 对 PD 模型小鼠中脑和纹状体 iNOS 表达的影响

模型组小鼠中脑和纹状体中 iNOS 的表达量比对照组明显增多 ($P < 0.01$); 原儿茶酸预防组和治疗组明显减少了 iNOS 的表达量 ($P < 0.01$); 阳性

药物美多芭亦能减少 iNOS 的表达量 ($P < 0.01$)。说明原儿茶酸能减少 PD 小鼠脑中 iNOS 的表达量, 进而减轻脑中氧化损伤, 药物治疗组效果更加明显。见图 3。

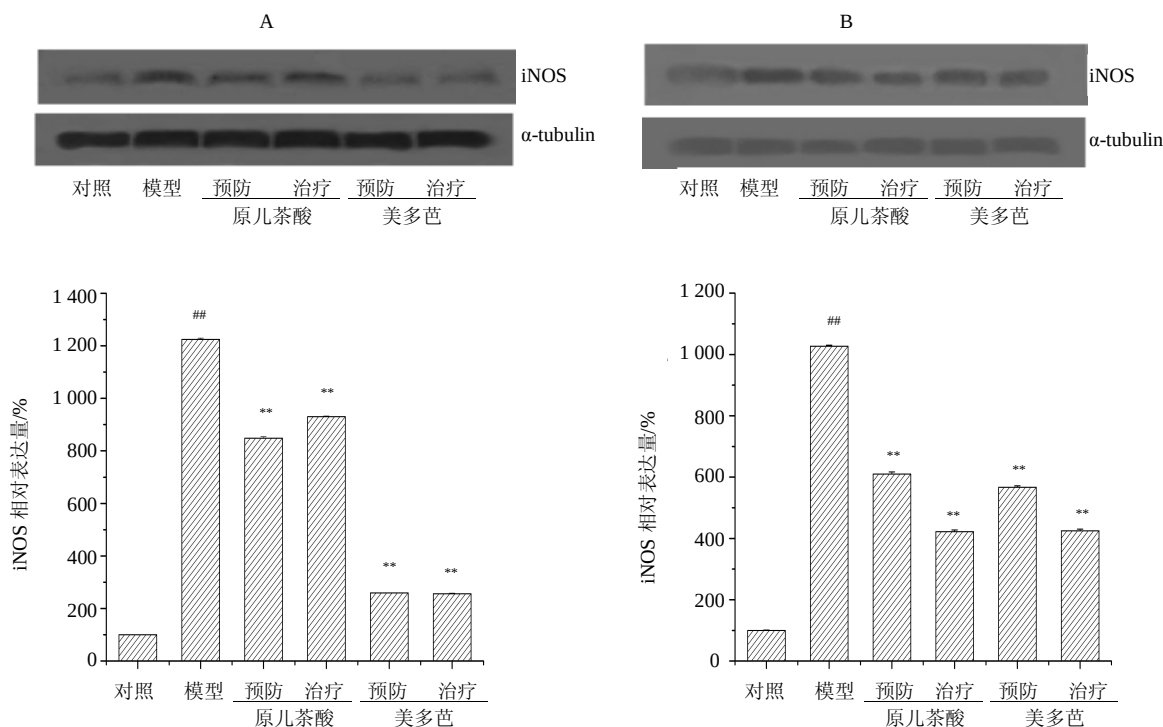


图 3 原儿茶酸对 PD 模型小鼠中脑 (A) 和纹状体 (B) iNOS 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effects of protocatechuic acid on iNOS expression in striatum (A) and midbrain (B) of PD model mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

PD 是威胁老年人健康的一类重大疾病, 文献报道 PD 的自然发病率为 0.1%~0.2%, 其中在 55 岁以上人群发病率上升为 1.4%, 75 岁以上人群为 3.4%。随着社会老龄化进程加快, PD 患者发病率及致残率在世界范围内显著增加。美国目前约有 50 万 PD 患者, 且以每年 5 万例的速度递增^[11]。我国临床上 PD 患者已达到 200 万人, 每年新增 PD 患者近 20 万人。如不及时进行治疗, 患者病情呈进行性加重, 晚期往往全身僵硬以致活动受限, 约 30% 中晚期患者生活不能自理, 常死于各种并发症^[12]。因此, PD 的有效治疗不仅有助于缓解患者疾苦, 而且能够极大地减轻其家庭及社会负担。

PD 的主要病变部位在中脑黑质及纹状体, 中脑黑质产生 DA 的神经细胞大量变性坏死、减少或消失, 导致 DA 生成减少, 纹状体缺乏 DA。DA 为丘脑纹状体的抑制性神经递质, 乙酰胆碱是兴奋性神经递质, 正常人体内这两种神经递质处于动态平

衡状态, 在 PD 时, 由于 DA 减少, 从而引起乙酰胆碱作用的相对亢进, 出现静止性震颤、运动减少、动作迟缓、肌强直和姿势平衡障碍等一系列胆碱能增多的症状。当黑质多巴胺神经元缺失超过 90% 时, 出现多巴胺受体超敏现象。随着时间延长, 黑质多巴胺细胞不断减少, 分泌输送到纹状体的 DA 量不断减少, 最终导致受体上调应激反应下降, 受体数目也下降^[13]。D2DR 是位于中枢突触后多巴胺能神经元的一种 G 蛋白偶联受体, 在 PD 发病机制中不仅由于脑中 DA 的量降低, D2DR 的损害也起重要作用。一氧化氮 (NO) 是一种自由基性质的生物活性分子, 在中枢神经系统具有多种生理功能, 但在一定条件下产生过多则可能成为毒性物质^[14], 可能通过脂质过氧化、线粒体损伤和抗氧化作用的抑制等几种机制引起神经元的凋亡。iNOS 可以诱导产生 NO, 在 PD 病人体内发现脑内 iNOS 的表达^[15]。TH 是 DA 生物合成途径的关键酶, PD 是由于黑质纹状体 DA 严重不足导致的一种神经变性疾病^[16]。

许多研究证明, PD 时 TH 明显减少^[17-19]。

本实验选用 MPTP 致小鼠 PD 为动物模型, 主要通过 ip 给予原儿茶酸观察原儿茶酸对 PD 模型小鼠中脑和纹状体的影响, 应用 Western blotting 的方法, 观察 PD 模型小鼠中脑和纹状体内 TH、D2DR 和 iNOS 表达情况及原儿茶酸的干预作用。研究结果表明, MPTP 诱导的 PD 模型小鼠中脑和纹状体中 D2DR 和 TH 表达量减少, 而 iNOS 的表达量增多; 原儿茶酸可以显著降低 PD 模型小鼠脑组织内 iNOS 表达量, 同时能提高 TH 和 D2DR 的表达量, 效果与已应用的治疗 PD 的药物美多芭效果相当; 原儿茶酸预防给药对 PD 模型小鼠脑组织内 TH、D2DR 和 iNOS 的表达有明显作用, 而治疗给药作用更强。

参考文献

- [1] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models [J]. *Neuron*, 2003, 39(6): 889-909.
- [2] 单梯超, 任玉娇, 于学慧, 等. 帕金森病模型研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 5(29): 1180-1183.
- [3] 刘英姿, 刘洁, 周宏灏. 帕金森病药物治疗的遗传药理学研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(10): 1269-1272.
- [4] Langston J W, Ballard P, Tetrud J W, et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis [J]. *Science*, 1983, 219(4587): 979-980.
- [5] Fornai F, Schlüter O M, Lenzi P, et al. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein [J]. *PNAS*, 2005, 102(9): 3413-3418.
- [6] Meredith G E, Totterdell S, Petroske E, et al. Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease [J]. *Brain Res*, 2002, 956(1): 156-165.
- [7] Chan K, Chui S H, Wong D Y, et al. Protective effects of Danshensu from the aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) against homocysteine-induced endothelial dysfunction [J]. *Life Sci*, 2004, 75(26): 3157-3171.
- [8] Guan S, Bao Y M, Jiang B, et al. Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 538(1/3): 73-79.
- [9] Guan S, Jiang B, Bao Y M, et al. Protocatechuic acid suppresses MPP⁺-induced mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death in PC12 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(10): 1659-1666.
- [10] Zhang X L, Shi G F, Liu X Z, et al. Antiaging effects of protocatechuic acid from *Alpinia* on spleen and liver antioxidative system of senescent mice [J]. *Cell Biochem Funct*, 2011, 29(4): 342-347.
- [11] Driver J A, Logroscino G, Gaziano J M, et al. Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age [J]. *Neurology*, 2009, 72(5): 432-438.
- [12] Kuzuhara S. Treatment of Parkinson's disease at present and in the future [J]. *Rinsho Shinkeigaku*, 2008, 48(11): 835-843.
- [13] 赵焕英, 李良, 刘延英, 等. 制备人 II 型多巴胺受体 cRNA 探针检测帕金森病大鼠模型纹状体内 II 型多巴胺受体基因达的变化 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(25): 25-27.
- [14] 李晓峰, 陈建宗. 一氧化氮信号通路与帕金森病的发病机制 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(18): 1836-1838.
- [15] Wallace M N, Geddes J G, Farquhar D A, et al. Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to β -amyloid plaques [J]. *Exp Neurol*, 1997, 144: 266-272.
- [16] 陈锡群. 酪氨酸羟化酶与帕金森病 [J]. 国外医学: 神经病学-神经外科学分册, 2001, 28(1): 59-62.
- [17] 彭湘闽, 蒋雨平. 酪氨酸羟化酶与帕金森病 [J]. 中国临床神经科学, 2002, 10(1): 105-108.
- [18] 徐岩, 孙圣刚, 曹学兵, 等. 离体帕金森病动物模型制作的研究 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2002, 10(4): 226-227.
- [19] 李德鹏, 徐群渊, 张进禄. MPTP 处理的小鼠和 6OHDA 损毁的大鼠帕金森病模型病理变化的比较 [J]. 中风与神经疾病杂志, 1999, 16(2): 79-82.