

原儿茶酸对 1-甲基-4-苯基吡啶离子损伤中脑多巴胺能神经元保护作用研究

宁巧庆¹, 刘 爽¹, 李亚晨², 李 岚¹, 于 燕¹, 赵文香¹, 张秀丽^{1*}

1. 滨州医学院, 山东 烟台 264003

2. 大连医科大学, 辽宁 大连 116044

摘 要: **目的** 探讨原儿茶酸对 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺)干预后的小鼠胚胎中脑多巴胺能神经元损伤的保护作用。**方法** 分离培养孕 14 d 小鼠胚胎中脑神经元细胞, 连续培养 7 d, 以 MPP⁺体外损伤小鼠胚胎中脑多巴胺能神经元诱导帕金森病(PD)模型, 实验分为对照组, 模型组, 原儿茶酸低(0.05 mmol/L)、中(0.1 mmol/L)、高(0.5 mmol/L)剂量组。采用 MTT 比色法测定神经元活力, 测定细胞内乳酸脱氢酶(LDH)、活性氧物质(ROS)的量, 检测线粒体复合物 I 活性及膜电位。**结果** 原儿茶酸可增强 MPP⁺损伤的中脑多巴胺能神经元活力, 减少 LDH 释放, 降低 ROS 产生, 抑制线粒体复合物 I 活力下降, 阻止线粒体膜电位降低。**结论** 原儿茶酸对 MPP⁺诱导的中脑多巴胺能神经元损伤具有保护作用。

关键词: 1-甲基-4-苯基吡啶离子; 原儿茶酸; 中脑; 多巴胺能神经元; 神经保护; 乳酸脱氢酶; 活性氧; 膜电位

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)14-2497-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.14.018

Protective effect of protocatechuic acid on midbrain dopaminergic neurons injured by 1-methyl-4-phenylpyridinium

NING Qiao-qing¹, LIU Shuang¹, LI Ya-chen², LI Lan¹, YU Yan¹, ZHAO Wen-xiang¹, ZHANG Xiu-li¹

1. Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

2. Dalian Medical University, Dalian 116044, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of protocatechuic acid (PCA) on the midbrain dopaminergic neurons injured by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺). **Methods** Midbrain neuron cells from KM mice pregnant 14 d were used in this experiment, and divided into control group, model group, low-, mid-, and high-dose (0.05, 0.1, and 0.5 mmol/L) groups. MTT method was used to determine the neuronal survival rate. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) in culture, content of intracellular reactive oxygen species (ROS), activity of mitochondrial complex I, and mitochondrial membrane potential were further determined. **Results** PCA can enhance the viability of dopaminergic neurons damaged by MPP⁺, reduce the release of LDH and the generation of ROS, increase the activity of the mitochondrial complex I, and prevent the reduction of mitochondrial membrane potential. **Conclusion** PCA has the neuroprotective effects against MPP⁺-induced damage of midbrain dopaminergic neurons.

Key words: 1-methyl-4-phenylpyridinium; protocatechuic acid; midbrain; dopaminergic neuron; neuroprotection; lactate dehydrogenase; reactive oxygen species; membrane potential

帕金森病(PD)是一种锥体外系的变性疾病, 研究显示其主要病理标志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, 泛素染色阳性的胞浆内形成包涵体, 导致黑质-纹状体通路DA释放减少。患者可出现静止性震颤、肌张力增高、运动减少等一系列症状^[1-3], 显著降低了患者的生活质量和预期寿命, 危害性极大^[4-6]。PD是多种机制协同

作用的结果, 目前研究显示主要与遗传、环境因素、感染、衰老、氧化应激、过多的自由基形成及神经生长因子缺乏等有关, 但具体发病机制尚未明确^[7]。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)是一种能被单胺氧化酶B(MAO-B)代谢的神经毒性物质, MPTP可被MAO-B代谢生成1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺), 进而MPP⁺转运到多巴胺能神经元末梢,

收稿日期: 2016-03-23

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资助项目(2015ZR014548)

作者简介: 宁巧庆(1989—), 女, 硕士在读, 研究方向为麻醉药理学。Tel: (0535)6913254

*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)6913254 E-mail: zhangxiuli2008@163.com

这一过程抑制了线粒体复合物 I 的活性^[8-9]。

原儿茶酸存在于益智仁、鸡血藤、丹参等多种中药中,可以抑制 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞凋亡、抑制 MPP^+ 导致的 PC12 细胞损伤,其机制与抑制神经细胞凋亡、提高细胞抗氧化能力有关^[10-12]。此外,体内动物实验表明,原儿茶酸能提高衰老大鼠学习记忆能力和脑组织内源性抗氧化酶活力^[13]。前期研究^[14]表明,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多巴胺 2 型受体 (D_2DR) 和抗酪氨酸羟化酶 (TH) 的表达,降低诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达发挥作用。本实验通过在 MPP^+ 损伤中脑多巴胺能神经元诱导 PD 模型的基础上,进一步探讨原儿茶酸对 MPP^+ 诱导的多巴胺能神经元损伤的保护作用及其机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

原儿茶酸 (中国食品药品检定研究院,批号 110809-201205); 二甲基亚砜 (DMSO)、 MPP^+ 、MTT、罗丹明 123 (Sigma 公司); DMEM/F12 (Hyclone 公司); 牛血清白蛋白 (BM 公司); 抗酪氨酸羟化酶 (TH) 单克隆抗体 (Chemicon 公司); SABC 试剂盒 (华美生物工程公司); 乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒 (南京建成生物有限公司); 活性氧检测试剂盒 (碧云天生物工程公司); β -阿拉伯糖呋喃糖苷、鱼藤酮 (Sigma 公司), 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 动物

昆明种孕 14 d 小鼠,烟台绿叶制药有限公司提供,合格证号 SCXK (鲁) 2009-0009。

2 方法

2.1 多巴胺能神经元培养及 MPP^+ 损伤模型制备

无菌条件下分离小鼠胚胎的腹侧中脑 (胎龄 14 d), 培养液中吹打破碎分离出的腹侧中脑, 1 500 r/min 离心 10 min, 沉淀细胞重悬后, 以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞密度接种到 4 孔培养板中, 48 h 后加入 β -阿拉伯糖呋喃糖苷 ($10 \mu\text{mol/L}$) 抑制胶质细胞增殖。待多巴胺能神经元生长融合 $\geq 95\%$, 加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 MPP^+ , 48 h 后利用 MTT 法于 570 nm 处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞活力。

2.2 实验分组及给药

实验设 5 个组: 对照组, 模型组, 原儿茶酸低、中、高浓度 (0.05、0.1、0.5 mmol/L) 组。多巴胺能神经元生长融合 $\geq 95\%$, 分别加入 0.05、0.1、0.5 mmol/L 的原儿茶酸预处理 30 min 后, 加入 $10 \mu\text{mol/L}$

MPP^+ 共孵育 48 h, 利用 MTT 法检测细胞活力。

2.3 观察指标及测定方法

2.3.1 LDH 的测定 收集实验各组培养液及细胞, LDH 通过 LDH 检测试剂盒测定。丙酮酸是通过 LDH 催化乳酸生成的, 丙酮酸二硝基苯胺又是丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼反应生成的, 其在碱性溶液中显棕红色, 依照此原理按照比色法计算酶活力。

2.3.2 免疫细胞化学染色与细胞计数 室温下, 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, PBS 清洗 3 次, 1% 过氧化氢浸泡 20 min; PBS 清洗 3 次, 固定剂固定 20 min; 加入一抗 (TH 1 : 300) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; PBS 用力震荡清洗 10 min, 重复 3 次, 生物素化二抗 (1 : 200) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 震荡漂洗 10 min $\times$ 3 次; 加入 SABC 试剂孵育 30 min, PBS 清洗 3 次, 二氨基联苯胺染色。置于光学显微镜下, 观察计数, 结果用对照组细胞数目 (或平均突触长度) 的百分比表示。

2.3.3 细胞内活性氧 (ROS) 测定 细胞内 ROS 的定量利用 2,7-dichlorodihydrofluorescein (DCFH-DA) 检测。DCFH-DA 进入细胞后在酯酶脱乙酰化的作用下转化成非荧光的 DCFH。其与 ROS 反应生成荧光探针的产物 DCF。收集实验各组样品细胞, PBS 清洗 2 次后加入 $10 \mu\text{mol/L}$ DCFH-DA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次, 485 nm 激发波长, 530 nm 发射波长下通过荧光分光光度计测量荧光强度。

2.3.4 线粒体膜电位测定 收集实验各组样品细胞, 加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 罗丹明 123 (罗丹明 123 是一种阳性荧光染料, 其进入线粒体是因线粒体膜电位的负极化而实现的。当细胞损伤发生去极化时, 存在于线粒体内的罗丹明 123 将会减少, 从而导致细胞内荧光强度降低)。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min, PBS 清洗 3 次, 485 nm 激发波长, 530 nm 发射波长下通过荧光分光光度计测量荧光强度。

2.3.5 线粒体复合物 I 活性测定^[15] 收集各组样品细胞, PBS 清洗后用缓冲液 (250 mmol/L 蔗糖、0.1 mmol/L EGTA、2 mmol/L HEPES; pH 7.4) 重悬。4 $^{\circ}\text{C}$ 、500 $\times g$ 离心 5 min, 收集上清液。12 000 $\times g$, 离心 10 min, 将沉淀悬浮在蔗糖缓冲液中。Bradford 的方法测定蛋白浓度、牛血清白蛋白制作标准曲线, 将溶液调整至 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。在石英比色杯中加入 990 μL 测定缓冲液 (250 mmol/L 蔗糖、1 mmol/L EDTA、50 mmol/L Tris-HCl、2 mmol/L KCN、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗酶素 A、0.1 mmol/L NADH、0.15 mmol/L 辅酶 Q1, pH 值为 7.2), 将其放入恒温分光光度计中 (30

℃) 预热 2 min 后, 立即加入 10 μL 线粒体蛋白溶液混合, 5 s 后记录 340 nm 处 A 值的降低速率。在另一石英杯中加入 989 μL 的测定缓冲液, 1 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ 的鱼藤酮, 重复上述实验, 同样记录 340 nm 处 A 值的降低速率。根据加入鱼藤酮前后 340 nm 处 A 值的降低速率的差值计算线粒体复合物 I 的活性。

2.4 统计学处理

实验结果均为计量资料, 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间的两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验进行统计学分析。

3 结果

3.1 对 MPP^+ 损伤的多巴胺能神经元活力的影响

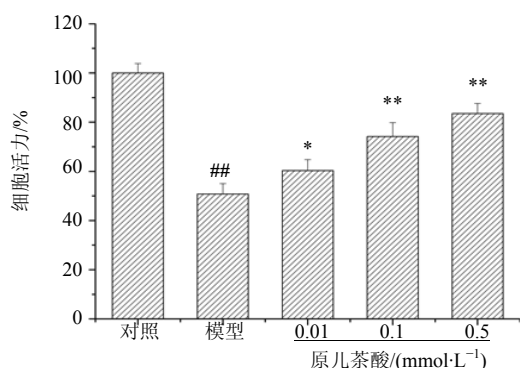
与对照组相比, 模型组 (MPP^+ 培养 48 h) 细胞活力下降至 $(50.8 \pm 4.2)\%$ 。与模型组相比, 原儿茶酸低、中、高剂量组细胞的活力明显升高, 并表现出剂量依赖性, 其中原儿茶酸 0.5 mmol/L 剂量组, 细胞活力提高到了 $(83.5 \pm 4.1)\%$, 见图 1。

3.2 对 MPP^+ 损伤的多巴胺能神经元内 LDH 的影响

与对照组相比, 模型组 (10 $\mu\text{mol/L}$ MPP^+ 处理 48 h) 导致细胞中 LDH 的大量释放。原儿茶酸低、中、高剂量组依赖性地减轻了 LDH 的漏出 (图 2)。该结果进一步证实了原儿茶酸能够减轻 MPP^+ 造成的细胞活力的下降, 保护质膜完整性, 从而减少 LDH 的漏出。

3.3 对 MPP^+ 损伤的多巴胺能神经元数目和形态的影响

利用抗体 TH 进行免疫细胞化学染色, 计数培养体系中 TH 阳性 (TH-IR) 细胞数目。实验结果



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 1 原儿茶酸对 MPP^+ 损伤的多巴胺能神经元活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of PCA on cell viability of dopaminergic neurons damaged by MPP^+ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

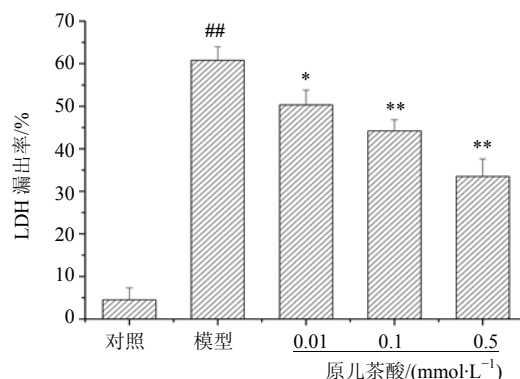


图 2 原儿茶酸对 MPP^+ 损伤的多巴胺能神经元 LDH 漏出的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of PCA on LDH leakage in dopaminergic neurons damaged with MPP^+ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表明, MPP^+ 模型组中 TH-IR 细胞数目降低, 原儿茶酸低、中、高剂量组可增加培养体系中的 TH-IR 细胞数目 (图 3-A)。形态学分析表明, 模型组中 TH-IR 细胞的密度、神经突触的长度均受到影响, 具体表现为细胞密度减少、细胞突触缩短 (图 3-B)。与模型组相比, 原儿茶酸低、中、高剂量组神经突触长度受损程度降低。统计学结果表明, 与对照组相比, 模型组的神经突触平均长度是对照组的 10.7%, 0.5 mmol/L 原儿茶酸组神经突触平均长度是对照组的 79.9%。

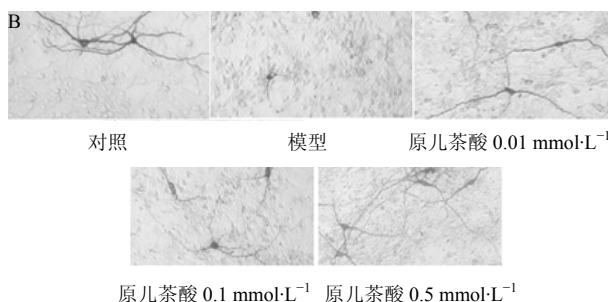
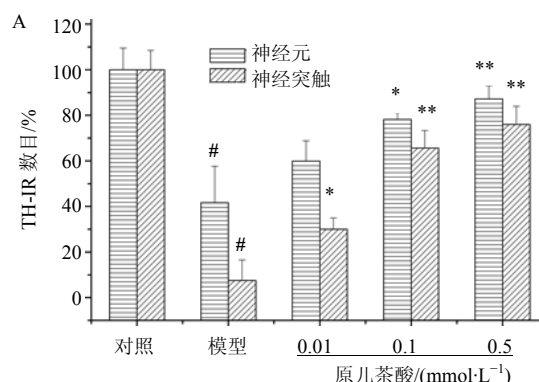


图 3 原儿茶酸对 MPP^+ 损伤的多巴胺能神经元数目 (A) 和形态 (B) 的影响

Fig. 3 Effects of PCA on number (A) and morphology (B) of dopaminergic neurons damaged by MPP^+

3.4 对 MPP⁺损伤的多巴胺能神经元内 ROS 的影响

如图 4 所示,与对照组相比,模型组细胞内 ROS 水平增加至对照组的 (161.4±3.1)%,原儿茶酸组呈剂量依赖性地抑制了 ROS 的形成。与模型组相比,原儿茶酸 (0.5 mmol/L) 组细胞内 ROS 的水平下降至对照组的 (107.8±3.5)%。

3.5 对 MPP⁺损伤的多巴胺能神经元线粒体膜电位的影响

如图 5 所示,与对照组相比,模型组线粒体膜电位下降至对照组的 (60.8±4.2)%,原儿茶酸低、中、高剂量组抑制了线粒体膜电位的降低。其中,与对照组相比,原儿茶酸 (0.5 mmol/L) 剂量组 MMP 为对照组的 (81.7±6.8)%。

3.6 对 MPP⁺损伤的多巴胺能神经元线粒体复合物 I 活性的影响

如图 6 所示,模型组细胞中线粒体复合物 I 的

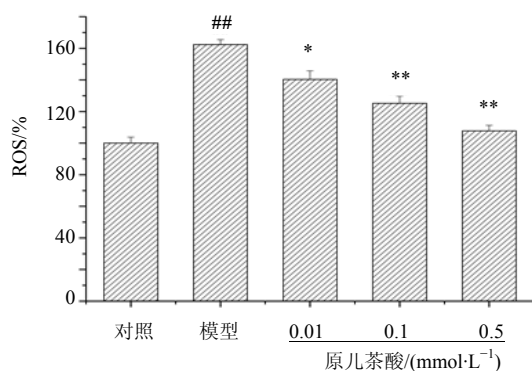


图 4 原儿茶酸对 MPP⁺损伤的多巴胺能神经元内 ROS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of PCA on ROS in dopaminergic neurons damaged by MPP⁺ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

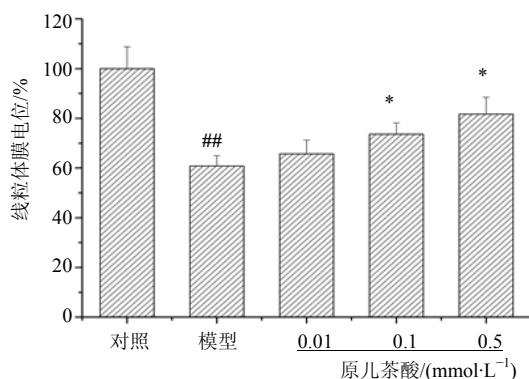


图 5 原儿茶酸对 MPP⁺损伤的多巴胺能神经元线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of PCA on mitochondrial membrane potential of dopaminergic neurons damaged by MPP⁺ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

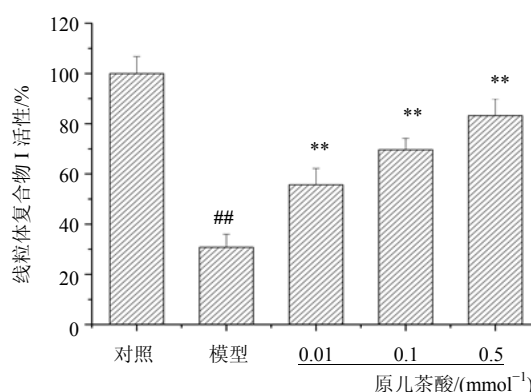


图 6 原儿茶酸对 MPP⁺损伤的多巴胺能神经元线粒体复合物 I 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of PCA on mitochondrial complex I activity of dopaminergic neurons damaged by MPP⁺ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

活性明显降低,原儿茶酸低、中、高剂量组可提高线粒体复合物 I 的活性,并呈剂量依赖性。

4 讨论

PD 是一种常见的中老年神经系统退行性疾病,病因复杂。大量研究表明,其发病与遗传背景、氧化应激、年龄、自身免疫、细胞骨架异常、兴奋毒性脑内炎症等许多风险因子有关^[16]。PD 是由多巴胺生成障碍所引起的,以中脑黑质纹状体多巴胺能神经元的变性缺失为其主要病理改变。左旋多巴为 DA 的前体,临床通过服用左旋多巴以弥补脑内 DA 的不足,多巴胺替代疗法是 PD 目前的主要治疗手段。除 DA 本身可诱导神经元的凋亡外,多巴胺能神经元在临床替代疗法过程中仍是继续凋亡的。此外,左旋多巴的副作用也限制了其应用。因此,对于治疗 PD 探寻一种既对多巴胺能神经元有保护作用又副作用小的药物是十分必要的。

在多巴胺能神经元变性坏死中,线粒体功能障碍和脑内氧化应激反应起到重要的作用。MPP⁺可进入多巴胺能神经元,其途径是通过多巴胺转运体实现的,进入到多巴胺能神经元的 MPP⁺通过进一步抑制线粒体复合物 I 的活性,导致 ATP 合成障碍,最终导致 PD 的发生^[17]。线粒体功能损伤在 PD 中主要表现为线粒体呼吸链中的复合物 I 功能损伤,其主要存在于线粒体的内膜,与氧化磷酸化密切相关,对于 ATP 的产生起着决定性的作用。

氧化应激是大多数神经退行性疾病发病的主要因素之一,由超氧化物自由基、羟自由基等 ROS 介导产生。ROS 介导的细胞损伤可被内源性防御体

系保护。目前研究证明,ROS可破坏细胞的完整性及正常的生理功能,并能引起细胞内生物大分子DNA、脂类、蛋白等的氧化损伤。研究表明,抗氧化剂可有效保护MPTP或MPP⁺介导的多巴胺能神经元变性^[18]。原儿茶酸是一种酚酸类抗氧化剂,本实验探寻了原儿茶酸对MPP⁺诱导的中脑多巴胺能神经元的保护作用。实验结果表明,MPP⁺可以诱导中脑多巴胺能神经元损伤,使细胞活力受损,ROS产生增加,同时发生线粒体复合物I功能损伤和线粒体膜电位丧失,原儿茶酸可以通过减少氧自由基、抑制线粒体膜电位降低,有效阻止线粒体功能失调,提高线粒体复合物酶I的活性,从而对中脑的多巴胺能神经元起到保护作用,抑制细胞活力的下降。通过本实验表明,MPP⁺损伤质膜的完整性,导致LDH的大量释放,细胞内ROS水平增加,进而诱导线粒体膜电位的下降,膜通透性增高,线粒体复合物酶I的活性下降,引起中脑多巴胺能神经元的活力降低。原儿茶酸能够减弱MPP⁺诱导的多巴胺神经元破坏,减少细胞中LDH的释放,抑制了ROS的产生,提高了线粒体复合物I的活性,阻止线粒体膜电位的降低,进而增强中脑多巴胺能神经元的活力。原儿茶酸对MPP⁺诱导的中脑多巴胺神经元损伤具有保护作用,可能是潜在的预防和治

参考文献

- [1] 王冬,王亚丽.帕金森病发病机制探讨[J].山西中医,2009,25(7):59-60.
- [2] 吕立,巫世红,巫玲玲,等.帕金森病药物治疗的现状与进展[J].中山大学研究生学刊:自然科学、医学版,2009,30(2):20-25.
- [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] Ghosh A, Langley M R, Harischandra D S, et al. Mitoapocynin treatment protects against neuro-inflammation and dopaminergic neurodegeneration in a preclinical animal model of Parkinson's disease[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2016, 11(2):259-278.
- [5] 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,2009,29(9):1180-1183.
- [6] 毛志峰,朱金华,曾伟.帕金森病治疗药物的研究进展[J].亚太传统医药,2009,5(7):165-169.
- [7] Li H, Park G, Bae N, et al. Anti-apoptotic effect of modified Chunsimyeolda-tang, a traditional Korean herbal formula, on MPTP-induced neuronal cell death in a Parkinson's disease mouse model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 176:336-344.
- [8] Zhou T, Zu G, Zhang X, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rg₁ through the Wnt/ β -catenin signaling pathway in both *in vivo* and *in vitro* models of Parkinson's disease[J]. *Neuropharmacology*, 2016, 101:480-489.
- [9] Zhao Q, Ye J, Wei N, et al. Protection against MPP⁺-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells by tormentic acid via the activation of PI3-K/Akt/GSK3 β pathway[J]. *Neurochem Int*, 2016, 97:117-123.
- [10] Guan S, Bao Y M, Jiang B, et al. Protective effect of protocathechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 538(1/3):73-79.
- [11] An L J, Guan S, Shi G F, et al. Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(3):436-443.
- [12] 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.
- [13] Shi G F, An L J, Jiang B, et al. *Alpinia* protocathechuic acid protects against oxidative damage *in vitro* and reduces oxidative stress *in vivo* [J]. *Neurosci Lett*, 2006, 403(3):206-210.
- [14] 尹雪,苏新云,王秀华,等.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[J].中草药,2015,46(6):866-870.
- [15] Veitch K, Hombroeckx A, Caucheteux D, et al. Global ischemia induces a biphasic response of the mitochondrial respiratory chain. Anoxic pre-perfusion protects against ischaemic damage[J]. *Biochem J*, 1992, 281(pt3):709-715.
- [16] Hwang C J, Choi D Y, Jung Y Y, et al. Inhibition of p38 pathway-dependent MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration in estrogen receptor alpha knockout mice[J]. *Horm Behav*, 2016, 80:19-29.
- [17] Choi J G, Park G, Kim H G, et al. In vitro and in vivo Neuroprotective effects of walnut (*Juglandis semen*) in models of Parkinson's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(1):E108.
- [18] Tseng Y T, Chang F R, Lo Y C. The Chinese herbal formula Liuwei dihuang protects dopaminergic neurons against Parkinson's toxin through enhancing antioxidative defense and preventing apoptotic death[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(5):724-733.