

梓醇对 MPTP 诱导帕金森病模型小鼠的神经保护作用及其机制

唐梦奇, 王琰萍, 包怡心, 沈敏慧, 任湘鹏, 周蓓群

【摘要】目的 探究梓醇对甲基苯骈三氮唑(MPTP)诱导帕金森病模型小鼠的神经保护作用,并探索其作用机制。**方法** 利用 MPTP 构建帕金森病模型小鼠模型,根据实验目的将实验小鼠分成空白对照组, MPTP 模型组和 MPTP+梓醇组。利用开放场实验(OFT)、爬杆实验和 Rota-rod 实验检测小鼠行为学,处死小鼠后收集其脑组织,检测小鼠脑组织中活性氧(ROS)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性,Western blot 法检测凋亡相关分子的表达量,免疫组织化学检测小鼠脑黑质和纹状体中酪氨酸羟化酶(HT)的表达。**结果** 3 组小鼠的 OFT 总距离,爬杆试验结果和 Rota-rod 时间差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),但 MPTP+梓醇组小鼠的区域中心距离和进入竞技场中心的次数均优于 MPTP 组(均 $P < 0.05$)。MPTP 组小鼠脑组织中 ROS 含量高于空白对照组($P < 0.05$),而 SOD 活性低于空白对照组($P < 0.05$);MPTP+梓醇组小鼠脑组织中 ROS 含量低于 MPTP 组($P < 0.05$),而 SOD 活性高于 MPTP 组($P < 0.05$)。MPTP 模型组小鼠 Cleaved-Caspase-9 和 Cleaved-Caspase-3 的相对表达量均高于空白对照组(均 $P < 0.05$);MPTP+梓醇组小鼠的 Cleaved-Caspase-9 和 Cleaved-Caspase-3 的相对表达量均低于 MPTP 组(均 $P < 0.05$)。MPTP+梓醇组小鼠的 p-MKK4/MKK4、p-JNK/JNK 和 p-cjun/jun 的相对表达量均低于 MPTP 组(均 $P < 0.05$)。MPTP 模型组小鼠黑质和纹状体中 HT 的含量均低于空白对照组(均 $P < 0.05$),而 MPTP+梓醇组小鼠黑质和纹状体中 HT 的含量均高于 MPTP 模型组(均 $P < 0.05$)。**结论** 梓醇不仅可以抑制氧化反应,还可以调高 HT 的表达,进而发挥抗帕金森的作用,而 MKK4/JNK/c-jun 信号通路可能是 MPTP 氧化应激传导的信号通路。

【关键词】 梓醇;帕金森;小鼠模型;信号通路

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.08.005

【中图分类号】 R742.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)08-0999-05

Neuroprotective effect of Catalpol on MPTP induced Parkinson's disease model mice and its mechanism

TANG Mengqi, WANG Yanping, BAO Yixin, SHEN Minhui, REN Xiangpeng, ZHOU Beiqun (Jiaxing Second Hospital, Jiaxing 314001, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To explore the neuroprotective effect of Catalpol on MPTP induced Parkinson's disease model mice, and analyse its mechanism. **Methods** Parkinson's disease model mice were made by MPTP, and divided into blank group, MPTP model group and MPTP+Catalpol group. The open field test (OFT), Pole climbing test, and Rota-rod test were used to observe the behavior of the mice. Killed the mice, collected their brain tissue, and detected the content of reactive oxygen species (ROS). The activity of superoxide dismutase (SOD), the expression of apoptosis related molecules was detected by Western blot. The expression of tyrosine hydroxylase (HT) in substantia nigra and striatum were detected by immunohistochemistry. **Results** There were no significant differences in the total distance traveled, pole climbing times, and Rota-rod times among the three groups (all $P > 0.05$). MPTP+Catalpol group had a better distance to the center area and a higher number of entries into the center of the arena compared to MPTP group ($P < 0.05$). The content of ROS in MPTP group was significantly higher than that in the blank group ($P < 0.05$), the activity of SOD was significantly lower than that in MPTP group ($P < 0.05$). The content of ROS in MPTP+Catalpol group was significantly lower than that in MPTP group ($P < 0.05$), the activity of SOD was significantly higher than that in MPTP group ($P < 0.05$). The relative expression of cleaved-caspase-9 and cleaved-caspase-3 in

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LTGD23H090002)

作者单位: 314001 浙江省嘉兴,嘉兴市第二医院(唐梦奇、王琰萍、包怡心、沈敏慧、周蓓群);嘉兴学院医学院(任湘鹏)

通信作者: 周蓓群, Email: tzhgmyz@163.com

MPTP model group were significantly higher than those in the blank group (all $P < 0.05$), while MPTP+Catalpol group were significantly lower than those in MPTP group (all $P < 0.05$). The relative expression levels of p-MKK4/MKK4, p-JNK/JNK, and p-cjun/jun in MPTP+Catalpol group were significantly lower than those in MPTP group (all $P < 0.05$). The content of HT in substantia nigra and striatum of MPTP model group were significantly lower than those in the blank group (all $P < 0.05$), while MPTP+Catalpol group were significantly higher than those in MPTP model group (all $P < 0.05$). **Conclusions** Catalpol can not only inhibit the oxidative reaction, but also increase the expression of HT, thus playing its anti Parkinson effect. The MKK4/JNK/c-Jun signaling pathway may exist as the signal pathway of MPTP oxidative stress transmission.

【Key words】 Catalpol; Parkinson's disease; Mouse model; Signal pathway

[Modern Practical Medicine, 2024, 36(8):999-1003]

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 多见于老年人群, 可降低患者的生活质量^[1-2]。PD 发病与线粒体功能异常密切相关, 其中线粒体呼吸链复合体 I 的功能障碍与 PD 发病呈正相关^[3-4]。另外, 氧化应激反应在 PD 发病中起到较为重要的作用, 可致线粒体膜破坏, 导致能量合成障碍, 进一步加剧 PD 症状^[5-6]。杨鹿鸣等^[7]研究证明, 梓醇可以降低肝脏的氧化应激反应, 从而对肝脏起到一定的保护作用。刘薇等^[8]研究证明, 梓醇可以通过改善大鼠骨骼肌的线粒体功能, 缓解肌肉萎缩, 增强运动能力。但梓醇是否对 PD 的发病和进展起到一定的作用, 需要进一步研究证明。利用甲基苯骈三氮唑(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 构建 PD 模型小鼠是可靠的方案之一, MPTP 可以抑制线粒体辅酶 I 的活性, 从而启动细胞的凋亡程序, 导致小鼠 PD 症状的产生, 其临床表现与原发性 PD 具有一定相似性, 是目前较为常用的诱导方案^[9-10]。因此, 本研究利用 MPTP 诱导 PD 模型小鼠, 探究梓醇对 MPTP 诱导 PD 模型小鼠的神经保护作用及其机制, 以期对 PD 治疗提供新的思路, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 动物和材料 15 只 SPF 级 C57BL/15 小鼠, 购自广东省广州市实验动物中心 [许可证号: SCXK (粤) 2019-2889]。周龄 9 ~ 13 个周, 体质量 39 ~ 42 g。Rotarod 大小鼠转棒仪购自美国 Bio-rad 公司, 超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒和活性氧 (ROS) 试剂盒购自中国南京建城生物有限公司。

1.2 实验动物分组 根据实验目的将小鼠分成空白对照组, MPTP 模型组和 MPTP+梓醇组, 每组 5 只。

MPTP 模型组构建方案: 腹腔注射 MPTP $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 7 d 后小鼠脑内的多巴胺水平显著下降, 认为模型构建成功。MPTP 小鼠模型构建成功后第 1 ~ 4 天, MPTP+梓醇组小鼠腹腔注射梓醇 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。空白对照组注射 PBS 溶液, 作为对照。

1.3 小鼠行为学检测

1.3.1 开放场实验(OFT) 用于评估小鼠自发运动功能和探索行为。试验前, 允许小鼠适应新环境, 然后放在竞技场的中心, 整个实验持续 5 min。利用 SMART v.3.0 软件记录小鼠探索轨迹、总距离、区域中心距离和小鼠进入竞技场中心的时间。

1.3.2 爬杆试验 将一根 50 cm 长的柱子一分为二, 每一段长 25 cm, 杆子中间做好记号。一个小球放在杆子的顶部, 用纱布盖住, 防止它滑落。将小鼠放在横杆上, 记录下小鼠到达标记线所用的时间。> 6 s 为 1 分, 3 ~ 6 s 为 2 分, < 3 s 为 3 分。

1.3.3 Rota-rod 行为学检测 用来评价小鼠运动协调能力。其由 5 个监测道组成, 每个道都具有同样的转轴及对应的感应板, 中间以黑色隔板分离, 当小鼠由转轴上落下触及感应板时, 仪器会自动记录小鼠停留在转轴上的时间并由打印机输出。

1.4 小鼠脑组织的分子表达水平 各组小鼠经行为测试后, 腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉, 并用断头法处死各组小鼠。一侧半脑用 4% 多聚甲醛固定进行形态学分析; 另一侧半脑快速冷冻在干冰中, 并在 -80°C 下储存, 进行免疫组化分析。

1.4.1 ROS 检测 收集 1 mg 左右脑黑质组织, 使其均匀化于冰 PBS 中, 然后在 4°C , 500 r/min 离心 10 min, 取上清液。根据 ROS 试剂盒的说明, 使用氧化剂敏感探针 2, 7-二氯荧光素二乙酸酯检测 ROS。

荧光强度在 485 nm 激发和 525 nm 发射波长下用微板阅读器测量,ROS 水平表示为每微克蛋白质的荧光强度。

1.4.2 SOD 活性测定 收集脑黑质组织,称重后在冰冷的 SOD 样品制备溶液中均匀化,将裂解产物在 4 ℃,4 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液。采用 SOD 检测试剂盒检测脑黑质组织中 SOD 的含量,并通过紫外光谱法测定 SOD 活性。

1.4.3 Western blot 法检测凋亡相关分子的表达量 收集各组小鼠新鲜脑组织,称重约 1 mg,加入 RIPA 裂解液后,提取总蛋白,利用 BCA 试剂盒确定蛋白浓度。按照 SDS-PAGE 说明书要求配置 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,根据需要,插入分子梳。取 30 μg 蛋白质上样,先使用 80 V 电压进行电泳;待条带跑至浓缩胶和分离胶的交接点后,改为 120 V 电压;待条带跑至分离胶底部,停止电泳。利用 PVDF 膜和滤纸进行转膜,设置转膜电流为 200 mA,转膜槽放到冰袋中低温处理。转膜成功后浸入封闭液中,摇床封闭 2 h,加入 Caspase-9、Caspase-3、Bcl-2、Bax、MKK4、JNK 和 c-jun 分子蛋白的一抗稀释液(1 : 10 000),4 ℃ 孵育过夜,TBST 溶液清洗 3 次,5 min/次,加入稀释好的 HRP 二抗溶液(1 : 2 000),孵育二抗,TBST 缓冲液漂洗 3 次,5 min/次,加入 Super-signal west femto 试剂盒显影液,分光发光成像分析仪显影并拍照。

1.4.4 免疫组织化学染色法检测脑组织中黑质和纹状体中酪氨酸羟化酶(HT)的含量 收集各组小鼠新鲜脑组织,甲醛固定后制备石蜡切片,厚度为 6 μm,然后加入酪氨酸羟化酶抗体,一抗稀释液(1 : 500)过夜孵育,时长 > 12 h,然后 PBS 清洗 3 次,使用 HRP 二抗进行避光孵育,二抗稀释液(1 : 5 000)孵育 2 h,PBS 清洗 3 次后,进行封片处理,倒置荧光显微镜下进行观察。

1.5 统计方法 应用 SPSS 23.0 统计软件进行分析,计数资料用均数±标准差表示,多组比较采用方差分析,多重比较采用 *q* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组小鼠行为学检测结果 3 组小鼠的总距离、

爬杆试验结果和 Rota-rod 时间差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),MPTP+梓醇组小鼠的区域中心距离和进入竞技场中心的次数均优于 MPTP 组(均 $P < 0.05$),与空白对照组差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见封三图 1。

2.2 3 组小鼠脑组织中 ROS 和 SOD 的含量 MPTP 组小鼠脑组织中 ROS 含量高于空白对照组($P < 0.05$),而 SOD 活性低于空白对照组($P < 0.05$);MPTP+梓醇组小鼠脑组织中 ROS 含量低于 MPTP 组($P < 0.05$),SOD 活性高于 MPTP 组($P < 0.05$),见图 1。

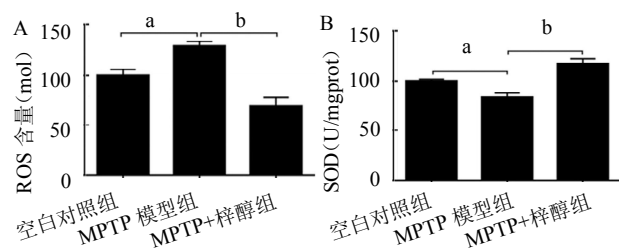
2.3 3 组小鼠脑组织中凋亡因子 Caspase-9、Cleaved-Caspase-9、Caspase-3、Cleaved-Caspase-3 及 Bcl2/BAX 比较 3 组 Caspase-9、Caspase-3 表达量差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);MPTP 模型组 Cleaved-Caspase-9 和 Cleaved-Caspase-3 相对表达量高于空白对照组,Bcl2/BAX 低于空白对照组(均 $P < 0.05$);MPTP+梓醇组 Cleaved-Caspase-9 和 Cleaved-Caspase-3 相对表达量低于 MPTP 模型组,Bcl2/BAX 高于 MPTP 模型组(均 $P < 0.05$),见图 2。

2.4 3 组小鼠 MKK4、JNK 和 c-jun 比较 MPTP 模型组 p-MKK4/MKK4、p-JNK/JNK 和 p-c-jun/c-jun 的相对表达量均高于空白对照组(均 $P < 0.05$);MPTP+梓醇组 p-MKK4/MKK4、p-JNK/JNK 和 p-c-jun/c-jun 的相对表达量均低于 MPTP 组(均 $P < 0.05$),见图 3。

2.5 3 组小鼠脑组织中黑质和纹状体 HT 含量比较 MPTP 模型组黑质和纹状体 HT 含量低于空白对照组(均 $P < 0.05$),MPTP+梓醇组黑质和纹状体 HT 含量高于 MPTP 模型组(均 $P < 0.05$),见图 4。

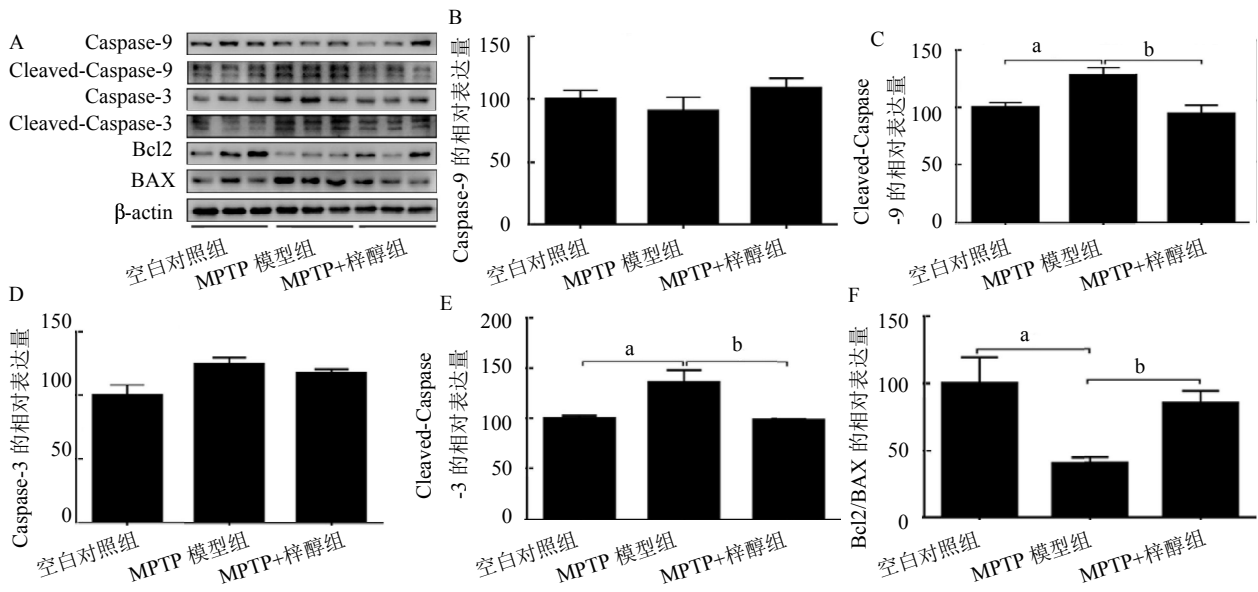
3 讨论

Mustapha 等^[11]研究证明,MPTP 诱导 PD 模型具



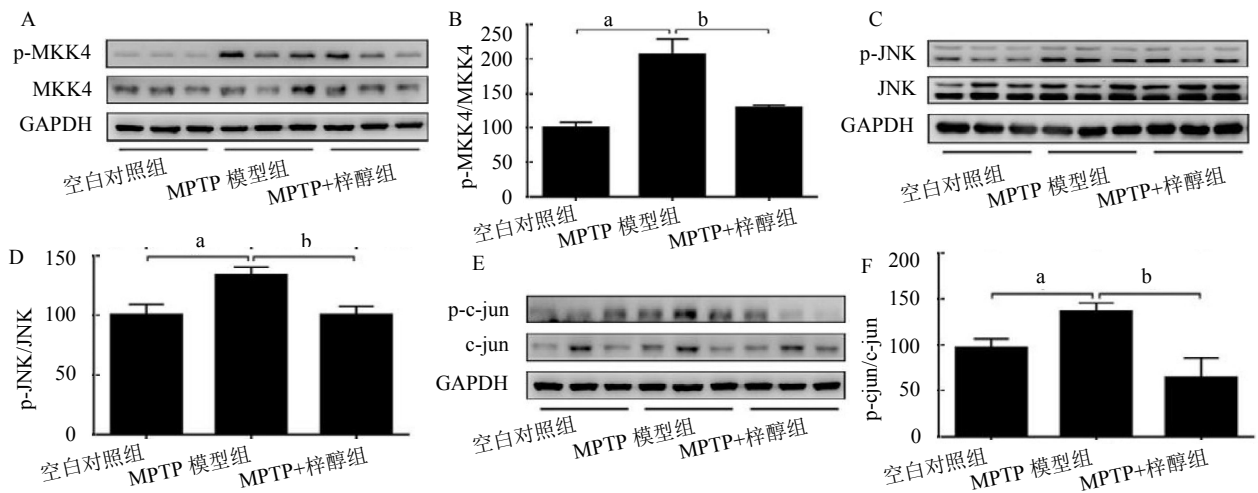
注:ROS 为活性氧,SOD 为超氧化物歧化酶。与空白对照组相比,a $P < 0.05$;与 MPTP 模型组相比,b $P < 0.05$

图 1 3 组小鼠脑组织中 ROS (A) 和 SOD (B) 的含量



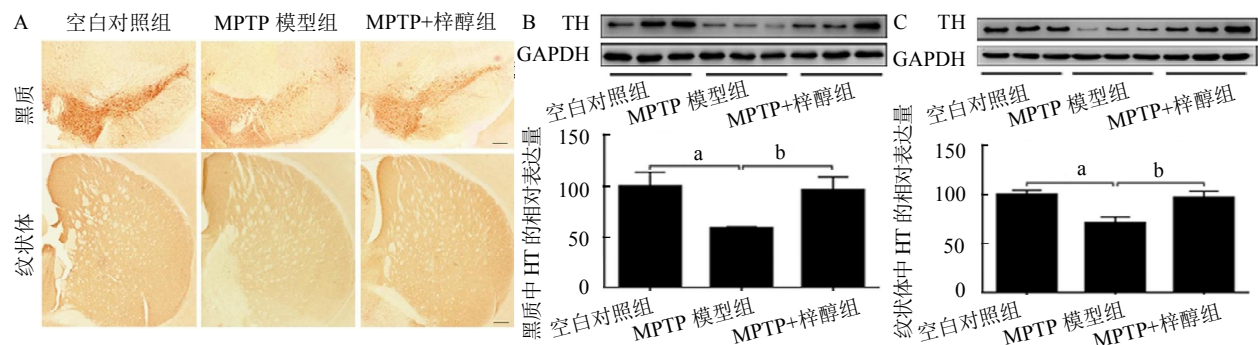
注: A 为各组小鼠蛋白印迹, B 为 Caspase-9 的相对表达量, C 为 Cleaved-Caspase-9 的相对表达量, D 为 Caspase-3 的相对表达量, E 为 Cleaved-Caspase-3 的相对表达量, F 为 Bcl2/BAX 的相对表达量。与空白对照组相比, $aP < 0.05$; 与 MPTP 模型组相比, $bP < 0.05$

图 2 3 组小鼠脑组织中凋亡因子 Caspase-9, Caspase-3 及降解产物的相对表达量和 Bcl2/BAX 比值情况



注: A, B 为各组小鼠 p-MKK4/MKK4 的相对表达量; C, D 为各组小鼠 p-JNK/JNK 的相对表达量; E, F 为各组小鼠 p-c-jun/c-jun 的相对表达量。与空白对照组相比, $aP < 0.05$; 与 MPTP 模型组相比, $bP < 0.05$

图 3 3 组小鼠 MKK4, JNK 和 c-jun 的相对表达量情况



注: A 为免疫组织化学染色结果($\times 200$), B 为黑质中 HT 的含量, C 为纹状体中 HT 的含量。与空白对照组相比, $aP < 0.05$; 与 MPTP 模型组相比, $bP < 0.05$

图 4 3 组小鼠脑组织中黑质和纹状体中酪氨酸羟化酶(HT)的含量

有简单、实用、价格适中、更高临床相关性等优点。本研究利用 MPTP 诱导 C57BL/15 小鼠产生 PD 模型。氧化应激反应与 PD 的发病密切相关,Curtis 等^[12]认为,ROS 的增加,可促进 PD 疾病进展。本研究结果表明,梓醇可以抑制 MPTP 的氧化作用,另外,MPTP+梓醇组小鼠脑组织中 SOD 活性高于 MPTP 组,可以充分证明梓醇的抗氧化性。徐粲瑶等^[13]认为,梓醇能够抑制 TNF- α 诱导的氧化应激反应,从而发挥细胞保护作用,本研究结果与之相似。这可能是梓醇通过降低 ROS 和升高 SOD 水平,发挥抗氧化作用,从而在一定程度上缓解 PD 症状。

除了氧化应激反应机制外,Caspase 家族蛋白在 PD 疾病进展中的作用也是十分重要的。Caspase-3 是与细胞凋亡密切相关的蛋白分子,其激活可导致细胞死亡^[14-15]。Caspase-9 是 Caspase-3 的上游信号分子,可以介导氧化应激反应,向下传递细胞凋亡的信号^[16]。Cleaved-Caspase-9 和 Cleaved-Caspase-3 是其降解产物,其表达量的增加提示 Caspase-9 和 Caspase-3 的激活。本研究结果显示,MPTP 模型组小鼠脑组织中 Cleaved-Caspase-9 和 Cleaved-Caspase-3 的相对表达量高于空白对照组,MPTP+梓醇组小鼠 Cleaved-Caspase-9 和 Cleaved-Caspase-3 的相对表达量低于 MPTP 组。这可能是 MPTP 启动的氧化应激反应,诱导神经细胞的凋亡,而梓醇可以抑制神经细胞的凋亡。MKK4 信号通路是与氧化应激反应密切相关的一种信号通路^[17]。本研究结果显示,梓醇可以降低 p-MKK4/MKK4、p-JNK/JNK 和 p-c-jun/c-jun 的相对表达量。分析其原因,可能是 MKK4/JNK 信号通路可能作为 PD 氧化应激反应中的信号传递信使,通过提高 ROS 的表达,激活 Caspase-9 和 Caspase-3 的表达水平,进一步促进 PD 疾病的进展;而梓醇可以通过阻断 MKK4/JNK 信号通路,发挥抑制 ROS 水平,抑制 Caspase 蛋白的激活,从而发挥 PD 的保护作用。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 唐梦奇、周蓓群:实验操作、论文撰写;唐梦奇、包怡心、沈敏慧:数据整理、统计学分析;王琰萍、任湘鹏:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] LOTANKAR S, PRABHAVALKAR K S, BHATT L K. Biomarkers for Parkinson's disease: Recent advancement[J]. *Neurosci Bull*, 2017, 33(5): 585-597.
- [2] ASCHERIO A, SCHWARZSCHILD M A. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention[J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(12): 1257-1272.
- [3] TYSNES O B, STORSTEIN A. Epidemiology of Parkinson's disease[J]. *J Neural Transm*, 2017, 124(8): 901-905.
- [4] POSTUMA R B, BERG D, STERN M, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2015, 30(12): 1591-1601.
- [5] ERRO R, BHATIA K P. Novel movement disorder society-Parkinson's disease criteria: What about SWEDD and genetic forms[J]? *Mov Disord*, 2016, 31(3): 431.
- [6] BERG D, POSTUMA R B. Diagnosis of Parkinson's disease: Imaging and genetics[J]. *Mov Disord*, 2016, 31(3): 431-432.
- [7] 杨鹿鸣,董士中,马艳庆.梓醇对甲状腺功能亢进小鼠肝脏氧化应激反应的影响[J].*新中医*,2021,53(17):12-16.
- [8] 刘薇,赵彤彤,李春云,等.梓醇对尘肺大鼠运动能力及骨骼肌功能改善作用研究[J].*药物评价研究*,2022,45(12):2501-2508.
- [9] PARK J S, DAVIS R L, SUE C M. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: New mechanistic insights and therapeutic perspectives[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2018, 18(5): 21.
- [10] GANGULY G, CHAKRABARTI S, CHATTERJEE U, et al. Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: Cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 797-810.
- [11] MUSTAPHA M, MAT TAIB C N. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: a promising direction of therapeutic strategies[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2021, 21(4):422-433.
- [12] CURTIS W M, SEEDS W A, MATTSON M P, et al. NADPH and mitochondrial quality control as targets for a circadian-based fasting and exercise therapy for the treatment of Parkinson's disease[J]. *Cells*, 2022, 11(15): 2416.
- [13] 徐粲瑶,张玉坤,孙慧君,等.梓醇对 TNF- α 诱导的 HAECs 细胞损伤抑制作用的机制研究[J].*中国中药杂志*,2019,44(4):796-802.
- [14] BRETNALL M, RODRIGUEZ-MENOCAL L, DE GUEVARA R L, et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis[J]. *BMC Cell Biol*, 2013, 14: 32.
- [15] JIAO C W, CHEN W, TAN X P, et al. Ganoderma lucidum spore oil induces apoptosis of breast cancer cells in vitro and in vivo by activating caspase-3 and caspase-9[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 247: 112256.
- [16] 万超,朱小虎,程宇核,等.内热针疗法对膝关节炎大鼠软骨细胞凋亡及 Caspase-3 和 Caspase-9 表达的影响[J].*中国针灸*, 2019, 39(4): 409-416.
- [17] 杨慧,万广,高绚照,等.let-7a 通过抑制 MAP4K3/MKK4/JNK 信号通路减少脑出血大鼠神经元凋亡[J].*中国病理生理杂志*,2020, 36(6):1055-1062.

收稿日期:2024-03-01

(本文编辑:孙海儿)