

雷沙吉兰对 MPTP 诱发急性帕金森病小鼠模型的神经保护和行为学改善作用

颜瑞佐 郭宝剑 于沛 张在军*

(暨南大学药学院新药研究所, 广州 510632)

摘要 通过免疫组化方法检测黑质酪氨酸羟化酶阳性神经元的变化, HPLC-ECD 检测纹状体内多巴胺(DA)及其代谢产物含量变化, Western blot 检测黑质酪氨酸羟化酶的表达, 探讨雷沙吉兰对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP) 诱发 C57BL/6 小鼠帕金森病模型的疗效和行为学影响。结果显示, 腹腔注射 MPTP 的小鼠出现一系列的急性行为学改变, 雷沙吉兰(20 mg/kg) 治疗后黑质致密部酪氨酸羟化酶阳性细胞数目较模型组显著增加, 纹状体内 DA 及 DA 代谢产物 HVA 和 DOPAC 含量也明显升高, 雷沙吉兰明显改善 MPTP 诱导帕金森小鼠的运动行为学障碍, 对帕金森小鼠模型的多巴胺系统具有保护作用。

关键词 雷沙吉兰; 帕金森病; 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶; 神经保护; 行为改善

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)05-0603-06

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20160517

引用本文 颜瑞佐, 郭宝剑, 于沛, 等. 雷沙吉兰对 MPTP 诱发急性帕金森病小鼠模型的神经保护和行为学改善作用[J]. 中国药科大学学报 2016 47(5): 603-608.

Cite this article as: YAN Ruizuo, GUO Baojian, YU Pei, et al. Effect of rasagiline on neuroprotection and behavior improvement in MPTP-induced acute mouse model of Parkinson's disease [J]. *J China Pharm Univ* 2016 47(5): 603-608.

Effect of rasagiline on neuroprotection and behavior improvement in MPTP-induced acute mouse model of Parkinson's disease

YAN Ruizuo, GUO Baojian, YU Pei, ZHANG Zaijun*

Institute of New Drug Research, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract This study aimed at investigating the neuroprotective effect and behavior improvement of rasagiline on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) model mice of Parkinson's disease. The tyrosine hydroxylase (TH)-positive dopaminergic neurons in substantia nigra were observed by immunocytochemistry. HPLC-ECD was used to detect the dopamine and its metabolite levels. Western blot was used to examine the protein expression of TH. The results showed that the mice appeared a series of acute behavior change after the injection of MPTP. Rasagiline (20 mg/kg) exerted significant protection against MPTP-induced loss of TH-positive dopaminergic neurons. The TH-positive neurons in rasagiline-treated mice brain increased significantly compared with those of MPTP-treated group. Rasagiline also enhanced dopamine and its metabolite levels in striatum significantly. In conclusion, rasagiline has protective effect on the acute mouse model of MPTP-induced Parkinsonism.

Key words rasagiline; Parkinson's disease; 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; neuroprotection; behavior improvement

This study was supported by China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2010ZX09103-401-055)

收稿日期 2015-04-18 * 通信作者 Tel: 020-85225030 E-mail: zaijunzhang@163.com

基金项目 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(No. 2010ZX09103-401-055)

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是常见于老年人并有发病年轻化趋势的一种神经退行性疾病,其典型的病理特征为中脑黑质多巴胺能神经元缺失以及黑质纹状体通路中多巴胺含量的降低^[1]。该病的主要临床表现为运动迟缓、僵直、姿势不稳和静止时的肌肉震颤等。在PD研究中,常用的动物模型以诱导剂分类,主要有1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)模型、6-羟基多巴胺(6-OHDA)模型、百草枯(paraquat)模型和鱼藤酮(retonone)模型等。在上述模型中,由于MPTP诱发的PD动物模型在神经生化、病理和行为学方面与人类PD最为相似,因此MPTP动物模型已被广泛用于PD发病机制的研究。

根据MPTP在小鼠中注射的总剂量、注射间隔时间、注射方式的不同,模拟了不同类型的PD模型,目前实验中常用的MPTP模型有急性模型和慢性或者亚急性小鼠模型,这些模型虽然在一定程度上均模拟了帕金森病作为一种神经退行性疾病神经元损伤的病理特征,但慢性或亚急性模型的行为学表现不能令人满意,模型组动物和正常对照组之间无显著性差异。雷沙吉兰(rasagiline)是一种帕金森病治疗药物,属于不可逆性B型单胺氧化酶(MAO-B)选择性抑制剂,可以通过抑制MAO-B活性,升高体内多巴胺水平,提高多巴胺能活性,从而调节多巴胺能运动功能障碍^[2]。为了探讨雷沙吉兰对MPTP诱发C57BL/6小鼠帕金森病模型的疗效和形为学影响,在本课题组报道selegiline在MPTP亚急性小鼠模型中的神经保护和行为学改善效果的基础上^[3],验证雷沙吉兰的神经保护和行为学改善作用。

1 材料

1.1 试剂

Anti-TH兔抗鼠单克隆抗体(美国Millipore公司);1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)和甲磺酸雷沙吉兰(美国Sigma公司);GTVision™ III抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒(上海基因科技有限公司);多聚甲醛(上海碧云天生物技术有限公司)。其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);高效液相库仑阵列电化学检测系统(美国ESA公司);

C18反相色谱柱(美国Agilent公司);台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);Carestream MI SE系统成像系统(美国Kodak公司);半干转印槽(美国Bio-rad公司);石蜡切片机、摊片机(德国Leica公司)、电子天平(德国Sartorius公司)。

1.3 动物

8周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠[(23±2)g,中山大学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2010-0004]。动物饲养于暨南大学医学院SPF级实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2011-0029,室内温度保持在(23±2)℃,房间保持12h昼夜节律,动物自由进食水。实验中所有操作均遵循NIH及暨南大学实验动物伦理委员会的规定。

2 方法

2.1 动物分组及模型建立

8周龄雄性C57BL/6小鼠30只,普通饲料喂养一周后随机分为生理盐水组($n=10$)、MPTP组($n=10$)和雷沙吉兰组($n=10$)。MPTP组腹腔注射MPTP 20 mg/kg,每间隔2h腹腔左右交替注射1次,连续注射4次,建立急性帕金森病模型^[4]。正常对照组经腹腔注射相同体积的生理盐水,雷沙吉兰组在第1次与最后一次给予MPTP前1h预先腹腔注射雷沙吉兰1 mg/kg进行预保护,从第2天开始,给药组腹腔注射给予1 mg/kg雷沙吉兰,每天给药1次,连续给药7d,对照组和模型组给予相同体积的生理盐水,行为学测试分别在第1、4、7天给药1h后进行。

2.2 体重变化

由于MPTP的全身毒性作用,给予MPTP后小鼠表现为营养障碍和体重下降,因此体重变化可以作为观察指标之一。在腹腔注射MPTP前一天,注射MPTP后第1、4、7天分别称量小鼠的体重,统计小鼠体重的变化。

2.3 雷沙吉兰对小鼠四肢协调能力的影响

按照文献[5]和[7]的方法,通过爬杆测试和脚印实验对小鼠的四肢协调运动能力进行测试。分别记录造模前一天、腹腔注射MPTP后各组小鼠在第1、3、7天的爬杆时间(测定时限60s,小鼠不能持杆完全自然下滑者,记录其爬杆时间为60s),以及小鼠通过木槽所用时间及脚印长度(stride length)和跨距(step width),并进行统计学分析。

2.4 免疫组化染色检测黑质多巴胺神经元数量

造模第 7 天行为学测试完毕后,每组随机挑选 5 只小鼠,按文献[6]方法处死后取脑,石蜡包埋后切片。大脑切片的免疫组化和 TH-阳性神经元的计数方法参照文献报道的方法^[7-8]。

2.5 HPLC-ECD 技术检测纹状体内多巴胺(DA)、高香草酸(HVA)及 3,4-二羟苯乙酸(DOPAC)的含量变化

每组剩余的 5 只小鼠,水合氯醛麻醉后,断头后迅速取出大脑,低温分离双侧纹状体。组织称重后按每 1 mg 组织加入 0.1 mol/L 高氯酸提取液 10 μ L,冰浴匀浆后 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液备用。纹状体内 DA、HVA 乙基 DOPAC 的测量参照文献[9-11]报道的方法。以各标准品的浓度为横坐标(X),各组分的峰面积为纵坐标(Y)进行回归,得到标准曲线。

2.6 Western blot 检测黑质酪氨酸羟化酶的含量表达^[12]

小鼠大脑取出纹状体后,继续分离中脑黑质部位,提取蛋白。利用 12% 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白后,加入 TH-一抗(1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,再与辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG(1:2 000)于室温下孵育 2 h,采用增强型化学发光液显色,Carestream MI SE 系统成像显示蛋白条带,通过灰度计算衡量黑质酪氨酸羟化酶的表达。

2.7 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 5 软件进行处理,采用 Student's *t* 检验分析组间差异, $P < 0.05$ 表示存在显著性差异。

3 结果

3.1 动物一般行为学表现

C57BL/6 小鼠在第 1 次腹腔注射 MPTP 后 10 ~ 20 min 内出现明显的震颤、竖毛、呼吸急促、尾巴过伸、弓背、运动适当减少、步态不稳等表现。在第 3 次腹腔注射 MPTP 后,小鼠自主活动明显减少,

肢体僵硬、后肢分开、运动不能,有的小鼠甚至出现流涎现象,小鼠震颤现象更加严重。竖毛、弓背、震颤症状 24 h 内消失,肢体僵硬、运动减少、平衡障碍也于 24 h 内减退,而生理盐水组小鼠则无明显异常表现。

3.2 小鼠腹腔注射 MPTP 后的体重变化

从图 1 可以看出,C57BL/6 小鼠在造模前后的体重发生变化,与生理盐水组相比,模型组小鼠在第 1 ~ 4 天体重均明显逐渐减轻($P < 0.05$),到第 7 天时,体重略微增加,与 MPTP 组相比,雷沙吉兰组在造模后第 1 天小鼠体重也明显下降,但是从第 4 ~ 7 天小鼠的体重逐渐升高,显著高于 MPTP 组($P < 0.05$)。

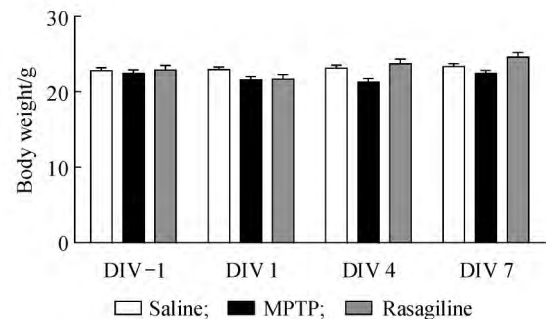


Figure 1 Rasagiline prevents body weight decrease in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced mice model of Parkinson's disease (PD) ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

DIV-1: the day before MPTP iv administration; DIV 1, DIV 4, DIV 7: 1st, 4th, 7th day after MPTP iv administration

* $P < 0.05$ vs saline group; # $P < 0.05$ vs MPTP group

3.3 雷沙吉兰对 MPTP 引起的急性 PD 模型行为学改善作用

3.3.1 爬杆实验 C57BL/6 小鼠爬杆实验结果如表 1 所示。给 MPTP 前一天(DIV-1),各组间小鼠爬杆时间无显著差异。给 MPTP 后第 1 天(DIV 1)与生理盐水正常对照组比较,MPTP 与雷沙吉兰组小鼠爬杆时间均显著延长,但雷沙吉兰组小鼠爬杆时间比 MPTP 组明显缩短,证明雷沙吉兰对 MPTP 引起的肢体运动协调下降有一定的改善效果。给 MPTP 后第 4 天(DIV 4)和第 7 天(DIV 7),各组间爬杆时间无显著性差异。

Table 1 Rasagiline decreased the pole time in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Group	DIV-1	DIV 1	DIV 4	DIV 7
Saline	15.5 \pm 3.3	19.1 \pm 8.8	14.1 \pm 6.5	7.3 \pm 1.6
MPTP	12.4 \pm 7.7	60 \pm 0 ^{##}	12.5 \pm 6.4	8.6 \pm 2.8
Rasagiline	17.6 \pm 6.0	34.3 \pm 17.7 ^{**}	13.6 \pm 6.4	10.6 \pm 4.5

^{##} $P < 0.01$ vs saline group; ^{**} $P < 0.01$ vs MPTP group

3.3.2 脚印实验 从图2可以看出,与正常对照组小鼠相比,MPTP组小鼠穿过相同距离木槽所用步数增加,步伐凌乱,平均步长显著缩短($P < 0.001$),后肢步宽明显增加($P < 0.001$)。雷沙吉兰组小鼠平均步长与MPTP组相比显著增长($P < 0.001$),后肢步宽显著缩短($P < 0.001$)。给药一

周后MPTP模型组小鼠通过木槽所用时间显著高于正常生理盐水组($P < 0.01$),雷沙吉兰组小鼠通过木槽所用时间短于MPTP组,这表明雷沙吉兰能显著改善PD小鼠肢体僵硬程度(步幅与步宽),提高小鼠运动速度(通过时间)和平衡能力。

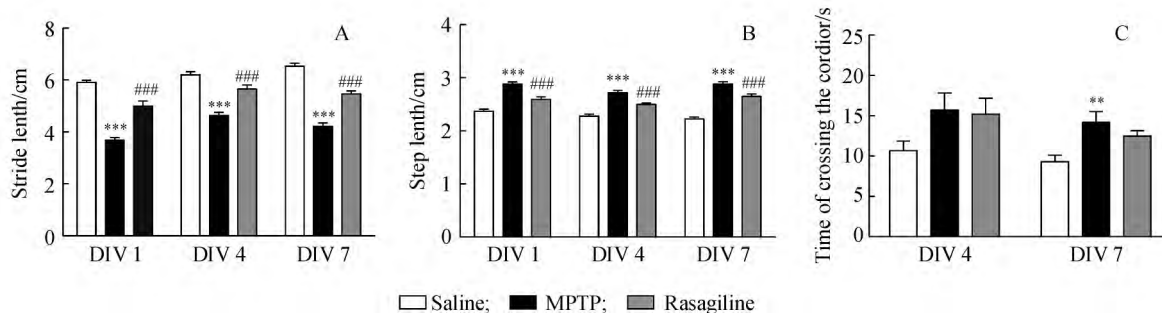


Figure 2 Effect of rasagiline on the motor behavior dysfunction of MPTP-treated mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

A: Stride length; B: Step width; C: Time crossing the corridor

*** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs MPTP group

3.4 雷沙吉兰对黑质酪氨酸羟化酶(TH)阳性神经元数目的影响

TH是多巴胺合成的限速酶,多巴胺神经元中含量丰富,黑质致密部TH免疫反应阳性可作为脑内多巴胺神经元的标志。正常小鼠黑质中TH免疫阳性神经元清晰可见,神经元的胞体和纤维颜色较深,有明显的免疫阳性突起(如图3-A所示),免

疫组化结果显示,MPTP造模后,小鼠黑质致密部TH免疫阳性神经元数目较正常对照组数量明显降低($P < 0.001$),神经元胞体损伤,边界模糊不清。雷沙吉兰治疗组TH免疫阳性神经元数目较模型组显著增加(如图3-B所示),结果提示雷沙吉兰能显著减少MPTP诱发的PD小鼠黑质中多巴胺神经元的死亡。

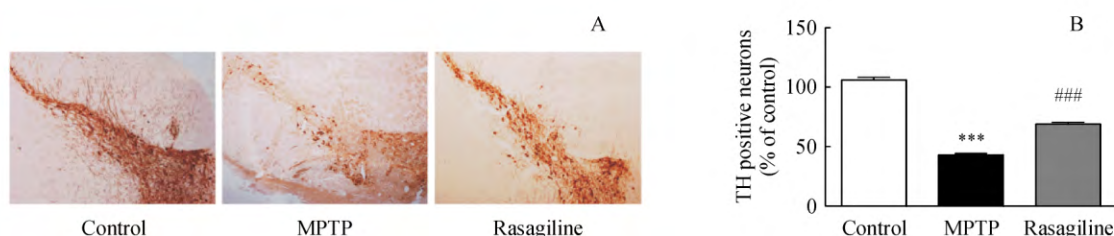


Figure 3 Effect of rasagiline on the damage of TH-positive cells in the substantia nigra of MPTP-treated mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

A: Microphotograph of TH immunostaining of mouse brain sections; B: Quantification of TH-positive neurons in various treatment groups

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs MPTP group

3.5 雷沙吉兰对MPTP诱导的急性PD模型纹状体中DA及其代谢产物的影响

HPLC-ECD检测DA、DOPAC和HVA标准品的回归方程及相关系数(r)如下:DA, $Y = 7.668 2X + 0.994 2$ ($r = 0.999 9$);DOPAC, $Y = 7.556 3X + 1.835 4$ ($r = 1$);HVA, $Y = 1.483 4X + 14.574$ ($r = 0.999 9$)。脑内DA含量降低是PD最直接的生化指标。在本实验中,模型组小鼠纹状体中DA及其代谢产物的含量较正常对照组显著降低

($P < 0.001$),雷沙吉兰给药1周后,如图4所示,纹状体内DA、HVA较模型组显著升高($P < 0.05$),DOPAC的含量较模型组也显著升高($P < 0.001$),这一结果说明雷沙吉兰能够增加PD小鼠脑内DA及代谢产物含量。

3.6 Western blot检测雷沙吉兰对MPTP诱导的PD模型黑质TH蛋白表达的影响

为了进一步确证雷沙吉兰对黑质TH阳性神经元的保护作用,用Western blot检测黑质组织TH

蛋白的表达。结果如图 5 所示, MPTP 显著降低了小鼠中脑黑质组织 TH 蛋白表达 ($P < 0.05$); 经雷沙吉兰治疗后, TH 蛋白表达水平较 MPTP 组明显

上调 ($P < 0.05$)。该结果与免疫组化计数黑质多巴胺神经元 (图 5) 一致, 说明雷沙吉兰能抑制 MPTP 诱导的多巴胺神经元数目减少。

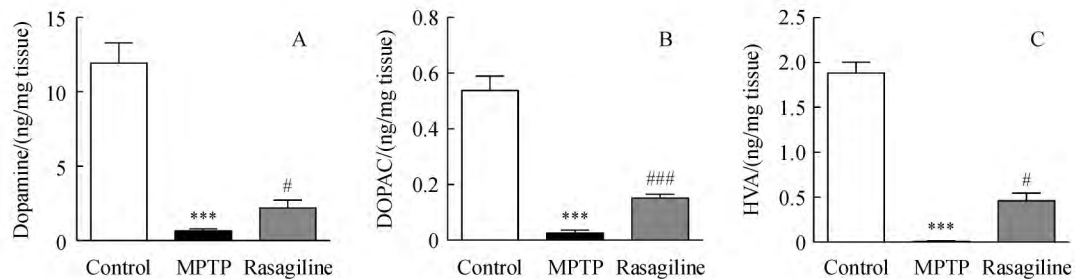


Figure 4 Effect of rasagiline on levels of striatal dopamine (DA) β -4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) (B) and homovanillic acid (HVA) (C) in mice analyzed by HPLC ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

*** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs MPTP group

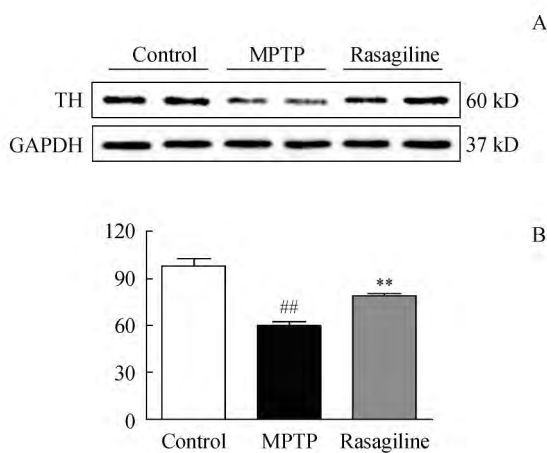


Figure 5 Effect of rasagiline on protein expression of tyrosine hydroxylase (TH) in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of MPTP-treated mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

A: Representative blots of TH protein expression; B: Densitometric analysis of blots. ## $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs MPTP group

4 讨论

帕金森病常见临床特征包括静止性震颤、运动迟缓和姿势不稳等行为, 因此研究药物对改善 PD 动物模型神经运动障碍具有十分重要的意义。通过对上述多种行为学评估及多个生化病理指标的检测, 客观地考察了雷沙吉兰对 PD 小鼠的治疗作用。通过建立 MPTP 诱导的急性 PD 小鼠模型; 采用 MAO-B 抑制剂雷沙吉兰给药治疗后, 在爬杆实验^[13]中第 1 天和第 4 天可以看出雷沙吉兰明显缩短小鼠的爬杆时间, 而在第 7 天 MPTP 组小鼠的爬杆时间长于假手术组, 一方面这可能是由于机体自身的调节作用所致^[14], 另一方面有研究认为训练

次数的增多可以逐渐促使帕金森病小鼠行为学障碍恢复^[15]。因此, 研究者认为应在 MPTP 最后一次注射后第 3 天或第 4 天, 即多巴胺神经元损伤完全时进行行为学测试, 从而更客观地检测小鼠 PD 模型的行为学变化^[16]。

脚印实验具有适合分辨持久的运动功能损伤与暂时性运动活性降低, 获取数据更客观, 人为影响干扰小等优点, 目前已成为检测 PD 运动协调性的重要方法之一。在脚印实验中, 雷沙吉兰能够明显改善 PD 小鼠四肢僵硬程度、增大小鼠运动步幅、缩短步宽和提高运动速度。实验结果进一步说明雷沙吉兰在改善 PD 小鼠四肢协调性方面具有一定的效果。最后采用神经生化、免疫病理和 Western blot 实验确证了雷沙吉兰能够显著提高纹状体内多巴胺含量和增加中脑黑质致密部位 TH 阳性神经元数目。

有文献报道 PD 的行为学障碍并非单一形式, 而常常是多种形式的综合结果, 而且这些功能障碍也常常相互影响^[17]。以往实验研究中, 给予 MPTP 后虽然均可以导致小鼠出现与人类 PD 患者类似的黑质多巴胺能神经元减少和纹状体多巴胺水平降低, 但行为学检测结果差异很大, 甚至出现相反的结果, 其原因可能与实验中 MPTP 给药的途径、检测的时间点、采用评价方法差别有关。本实验建立的急性 PD 模型方法具有周期短、操作简便、方法可靠和重现性好等优点, 在一定程度上可以为药物的体内药效评价提供数据支持, 从而为建立一种更为统一、权威和标准的帕金森病模型检测评价方

法提供科学参考。

参考文献

- [1] Qu D ,Rashidian J ,Mount MP ,*et al.* Role of Cdk5-mediated phosphorylation of Prx2 in MPTP toxicity and Parkinson's disease [J]. *Neuron* 2007 **55**(1) : 37 - 52.
- [2] Gu X ,Zhang Y ,Song M *et al.* Food effects on the human pharmacokinetics of rasagiline mesylate [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报) 2013 **44**(1) : 85-88.
- [3] Lai DX ,Guo BJ ,Cheng JH *et al.* Effect of selegiline on athletic ability in Parkinson's disease in mice [J]. *Cent South Pharm*(中南药学) 2013 **11**(6) : 421 - 424.
- [4] Jackson-Lewis V ,Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. *Nat Protoc* 2007 **2**(1) : 141 - 151.
- [5] Guo B ,Xu D ,Duan H *et al.* Therapeutic effects of multifunctional tetramethylpyrazine nitron on models of Parkinson's disease *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biol Pharm Bull* 2014 **37**(2) : 274 - 285.
- [6] Richter F ,Richter A. Chronic rotenone treatment induces behavioral effects but no pathological signs of parkinsonism in mice [J]. *J Neurosci Res* 2007 **85**(3) : 681 - 691.
- [7] He XJ ,Yamauchi H ,Uetsuka K *et al.* Neurotoxicity of MPTP to migrating neuroblasts: studies in acute and subacute mouse models of Parkinson's disease [J]. *Neurotoxicology* ,2008 **29**(3) : 413 - 420.
- [8] Yokoyama H ,Takagi S ,Watanabe Y *et al.* Role of reactive nitrogen and reactive oxygen species against MPTP neurotoxicity in mice [J]. *J Neural Transm* 2008 **115**(6) : 831 - 842.
- [9] Ferro MM ,Bellissimo MI ,Anselmo-Franci JA *et al.* Comparison of bilaterally 6-OHDA-and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological ,neurochemical , motor and memory alterations [J]. *J Neurosci Methods* 2005 **148**(1) : 78 - 87.
- [10] Gal S ,Zheng H ,Fridkin M *et al.* Novel multifunctional neuroprotective iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases. *In vivo* selective brain monoamine oxidase inhibition and prevention of MPTP-induced striatal dopamine depletion [J]. *J Neuro Chem* 2005 **95**(1) : 79 - 88.
- [11] Li JW ,Hu GX ,Wang P *et al.* Rapid determination of dopamine and its metabolites by HPLC-ECD in mice [J]. *Guangdong Trace Element Sci*(广东微量元素科学) 2012 **18**(11) : 32 - 36.
- [12] Salvatore MF ,Waymire JC ,Haycock JW. Depolarization-stimulated catecholamine biosynthesis: involvement of protein kinases and tyrosine hydroxylase phosphorylation sites *in situ* [J]. *J Neurochem* 2001 **79**(2) : 349 - 360.
- [13] Matsuura K ,Kabuto H ,Makino H *et al.* Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion [J]. *J Neurosci Methods* ,1997 **73**(1) : 45 - 48.
- [14] Gerlach M ,Riederer P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man [J]. *J Neural Transm* ,1996 **103**(8/9) : 987 - 1041.
- [15] Tillerson JL ,Caudle WM ,Reverón ME *et al.* Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease [J]. *Neuroscience* 2003 **119**(3) : 899 - 911.
- [16] Weissman J ,Trevor A ,Chiba K *et al.* Metabolism of the nigrostriatal toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by liver homogenate fractions [J]. *J Med Chem* ,1985 **28**(8) : 997 - 1001.
- [17] Yao QH ,Gao GD. Behavioral characteristics in mice models of Parkinson's disease and its detecting method [J]. *Chin J Clin Rehabil*(中国临床康复) 2004 **8**(28) : 6177 - 6179.