



# 从分子机制研究抗帕金森病中药的线虫模型

王香明\*, 汪晓燕, 高会丽, 王丹巧

(中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

**[摘要]** 中药在治疗帕金森病方面取得了较好效果,但对其治病分子机制了解相对较少,而阐明其分子机制是了解其发挥功能的基础。采用适合分子机制研究的模式生物线虫转基因帕金森病模型,从分子机制探索中药抗帕金森病的机制,可能是行之有效的方法。本文简要介绍帕金森病分子机制研究进展,进而介绍线虫转基因帕金森病模型研究中中药干预帕金森病的分子机制。

**[关键词]** 帕金森病;线虫;中药;分子机制

帕金森综合症(Parkinson's disease, PD)是一种黑质纹状体系统多巴胺(dopamine, DA)神经功能受损所致多巴胺与乙酰胆碱平衡失调的一种慢性疾病,以运动迟缓、静止性震颤和强直为主要特征。帕金森病病程呈进行性发展,随着年龄的增长,患病率逐渐增高。帕金森病人黑质多巴胺神经元发生退行性病变,数目减少,导致多巴胺分泌减少,并在神经元中出现 Lewy Bodies(Lewy 小体)<sup>[1]</sup>。PD 是老年人的高发病,给正在老龄化的世界带来更重的负担,因此开发高效的抗帕金森药物对提高患者生活质量,减轻社会负担尤为重要。中药在防治帕金森病方面取得了较好效果,其机制研究多是生理生化方面,对其治病分子机制研究较少,而阐明其分子机制是了解其发挥功能的基础。为此作者拟采用适合分子机制研究的模式生物线虫转基因帕金森病模型,采用实时定量 PCR(有针对性的检测已知的和帕金森病机制相关的基因如 *parkin*, *pdr-1*, *ubc-7*, *pas-5* 等),基因芯片(从全基因组水平检测可能的药物靶点)等分子生物学手段,结合国际最新的关于帕金森病分子机制研究来探索中药抗帕金森病的分子机制,为进一步开发有效的抗帕金森病中药制剂提供分子基础。本文简要介绍帕金森病分子机制研究进展,进而对应用模式生物线虫研究中中药干预帕金森病分子机制这一思路进行探讨。对于帕金森病发病机制的研究层出不穷但却莫衷一是,科学家提出如下相关的因素:遗传、感染、中毒、脑血管病、神经细胞变性<sup>[2]</sup>。

## 1 现代生物学对帕金森病发病机制研究进展<sup>[3]</sup>

**1.1 线粒体功能缺陷** 线粒体呼吸链是体内氧自由基产生的主要部位,呼吸链中任何部位受到抑制都可能会使自由基产生增多,从而破坏细胞内核酸、蛋白、脂类等大分子,导致

细胞死亡。

**1.2 氧化应激学说** 近年来生化分析研究发现,PD 病人黑质致密区内铁水平增高,铁代谢紊乱,过量铁作为一种神经毒素诱发了氧化应激,生成细胞毒性的羟自由基,继而引起膜脂过氧化等一系列氧化损伤,最终导致了细胞死亡。

**1.3 细胞凋亡学说** 为探讨细胞凋亡在 PD 发病机制中的作用,科学家做了大量的研究。结果表明 PD 可能是在多种因素的作用下通过一条共同的最后通路,即细胞凋亡而致。

**1.4 发现大量和帕金森病相关的基因** 如 *α-synuclein*, *PINK1*, *DJ1*, *UCHL1*, *PARK2*, *LRRK2*, 线粒体相关基因,泛素-蛋白酶体通路,溶酶体相关基因,膜泡运输相关基因等,对帕金森病发病分子通路有了更进一步的了解<sup>[4]</sup>。总之现在帕金森病研究热点集中在其发病的分子机制方面。

**2 秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* (以下简称线虫)在抗帕金森病研究中的优势及不足**

**2.1 线虫模型的优势** 帕金森病发病机制复杂,以大鼠,小鼠等高等生物研究分子机制在实验设计,操作,分析等方面有一定困难,有必要先应用较为简单,易于操作的模式生物来研究中中药干预帕金森病的分子机制,而模式生物线虫具有的独特的优势为这一想法提供了充分的可行性。线虫具有以下优点使其十分适合作为研究帕金森病的模式生物<sup>[5-6]</sup>:①易培养,廉价;②世代周期短,适合快速观察实验结果;③后代数目多,适合统计分析;④分子遗传技术成熟;⑤细胞谱系清楚,线虫共有 8 个多巴胺神经元,4 个 cephalic cells (CEPs),2 个 anterior deirids (ADEs),2 个 posterior deirids (PDEs),可以通过转基因 GFP 显示出来<sup>[7]</sup>;⑥身体透明,可以很清楚的在显微镜下观察活体的结构;⑦线虫和人在基因和分子通路方面保守,比如在线虫中首先发现的细胞凋亡通路,RNAi 通路在高等生物中保守。在神经系统方面,大部分哺乳动物中 DA 信号通路的基因和线虫中的相关基因保守,如 *cat-2*, *cat-4*, *dat-1* 等。基因组比对发现,线虫在以下基因组成方面与哺乳动物保守<sup>[7]</sup>:离子通道,神经递质

**[收稿日期]** 2009-09-23

**[基金项目]** 中国中医科学院基本科研业务费课题(ZZ2007011)

**[通信作者]** \*王香明,从事中药延缓衰老及干预帕金森病分子机制研究, Tel: (010)64014411-3339, E-mail: xm224@sohu.com



合成酶(包括酪氨酸羟化酶 TH, 芳香族氨基酸脱羧酶 AAAD 等)突触囊泡和突触前蛋白(包括 syntaxins, synaptotagmin, synaptobrevin), 神经递质受体(包括谷氨酸, 乙酰胆碱, GABA, 神经肽等), 神经递质转运体(如乙酰胆碱转运体 VChAT, 多巴胺转运体 DAT 等);⑧适合大规模, 高通量筛选药物;⑨线虫中许多遗传通路研究相对清楚。另外以线虫为模式的帕金森病模型也已经建立, 并且已经显示了在该病分子机制方面研究的优越性(发现很多新的和帕金森病相关的基因)。Kawahara 等在线虫多巴胺神经元中特异过表达野生型或突变型(A30P, A53T)人  $\alpha$ -synuclein 基因, 造成线虫多巴胺神经元特异性功能损伤<sup>[8]</sup>: 由多巴胺神经元控制的对食物反应下降, 并且多巴胺神经元神经突起坏死, 从而引起多巴胺分泌减少。行为学上的缺陷可以通过应用多巴胺而得到缓解, 显示了和人帕金森病的相似性。Vartiainen 等应用过表达人  $\alpha$ -synuclein 基因线虫品系进行基因芯片分析发现 433 个基因上调和 67 个基因下调。其中 7 个在泛素-蛋白酶体系统发挥功能的基因(*pdn-1*, *ubc-7*, *pas-5*, *pas-7*, *pbs-4*, *RPT2*, *PSMD9*) 表达上调; 35 个在线粒体中发挥功能的基因上调<sup>[9]</sup>。Kawahara 等应用过表达人  $\alpha$ -synuclein 基因线虫品系对 1 673 个基因进行 RNAi 筛选, 筛选到 10 个基因可以特异性的在转基因品系造成运动障碍, 其中包括和胞吞通路相关的 4 个基因(*apa-2*, *aps-2*, *eps-8*, *rab-7*), 显示了胞吞通路和帕金森病的相关性<sup>[10]</sup>。总之以过表达人  $\alpha$ -synuclein 基因线虫品系为模型研究帕金森病发病机制已经取得了可喜的成绩, 显示了线虫在研究帕金森病及药物抗帕金森病分子机制的优越性。

**2.2 线虫模型的不足** 由于线虫是无脊椎动物, 相对于高等哺乳动物来说进化上和人类关系较远, 所以各方面产生的差异较大, 保守性不如高等哺乳动物, 获得的研究资料有可能不能应用于人。一些抗虫和对线虫有害的中药不能进行筛选。

### 3 中药抗帕金森病研究进展及阐明中药抗帕金森病分子机制的必要性

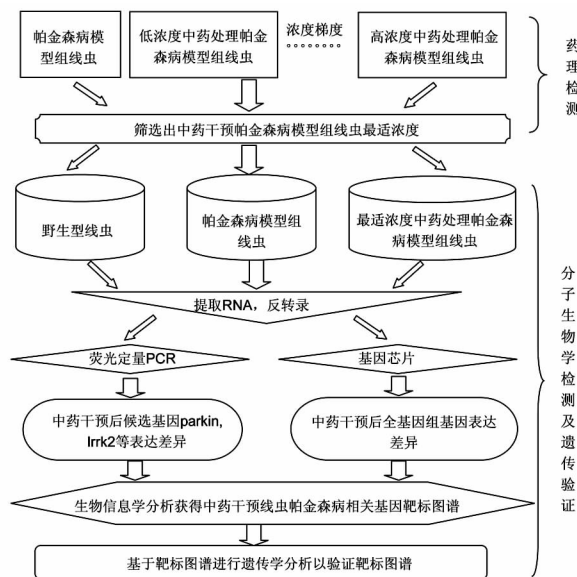
有研究提示, 中药具有提高帕金森病治疗效果的作用<sup>[11-12]</sup>, 而要确定其疗效, 并提高疗效, 还要通过大量的药理学研究加以证实。关于中药在抗帕金森病中的抗病机制经过研究总结如下<sup>[13]</sup>: 中药的抗胆碱能作用; 中药抗氧化作用; 中药作为多巴胺受体激动剂的作用; 中药对纹状体多巴胺系统的保护作用; 中药对帕金森病神经和细胞凋亡的保护作用。

从分子生物学水平研究中药药理已经取得了一定的进展, 如在抗衰老, 癌症等中药的研究中。对中药在抗帕金森病中的分子机制了解相对较少, 而阐明分子机制是从更深层次了解中药发挥功能的基础: ①找到中药抗帕金森病的分子靶标可以帮助人们理解帕金森病的致病机制, 比如发现某基因在用药后表达升高, 则暗示可能是由于该基因表达不足导

致了帕金森病, 反之亦然。②找到中药抗帕金森病的分子靶标图谱可以为进一步的药物筛选提供分子依据, 为获得高效抗帕金森病中药或复方服务。③彻底阐明中药抗帕金森病的有效成分和分子机制有利于促进中药的现代化和国际化。

### 4 中药干预帕金森病分子机制研究方法

在荧光显微镜下很容易观察线虫帕金森病转基因品系多巴胺神经树突减少, 非常适合筛选到可以对多巴胺神经树突发挥保护功能的中药, 进而研究其分子机制。具体方法(图 1)是采用不同浓度中药干预线虫帕金森病转基因品系, 和对照对比寻找可以恢复或部分恢复多巴胺神经树突形态的中药及其适合浓度。筛选到合适浓度中药后并以此浓度干预线虫, 收集线虫提取 RNA 分别进行定量 PCR 和基因芯片检测, 寻找中药干预线虫帕金森病分子靶点。获得候选靶点后进行遗传检测, 即订购相应基因突变或过表达品系, 并用相应中药干预这些突变体, 观察是否仍具有干预线虫帕金森病模型的功能, 以判断靶点的真实性。



### 5 结语

线虫作为一个研究分子机制极好的模式生物, 已经在帕金森病发病机制研究中发挥了重要作用, 中药在抗帕金森病方面也显示了极好的前景, 两者的有机结合必将在中药抗帕金森病分子机制研究中大显身手。

### 【参考文献】

- [1] 郝斌, 周晓平. 帕金森病发病机制的研究[J]. 中国药物与临床, 2004, 4(7): 525.
- [2] 李舜伟. 浅谈帕金森病[J]. 中老年保健, 2004, 4: 6.
- [3] 尹琳琳, 朱兴族. 帕金森的发病机制及其药物治疗研究进展[J]. 国外医学·药学分册, 2006, 33(2): 93.
- [4] Farrer M J. Genetics of Parkinson disease: Paradigm shifts and future prospects[J]. Nat Rev Genet, 2006, 7(4): 306.
- [5] Brenner S. The genetics of Caenorhabditis elegans[J]. Genetics,



- 1974, 77:71.
- [ 6 ] Pu P, W D Le. *C. elegans* as a model system for Parkinson disease[J]. *Neurosci Bull*,2006, 22(2): 124.
- [ 7 ] Nass R, R D Blakely. The *Caenorhabditis elegans* dopaminergic system; Opportunities for insights into dopamine transport and neurodegeneration[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*,2003, 43: 521.
- [ 8 ] Kuwahara T, A Koyama. Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic *Caenorhabditis elegans*[J]. *J Biol Chem*,2006, 281(1): 334.
- [ 9 ] Vartiainen S, P Pehkonen. Identification of gene expression changes in transgenic *C. elegans* overexpressing human alpha-synuclein[J]. *Neurobiol Dis*,2006, 22(3): 477.
- [ 10 ] Kuwahara T, A Koyama. A systematic RNAi screen reveals involvement of endocytic pathway in neuronal dysfunction in alpha-synuclein transgenic *C. elegans*[J]. *Hum Mol Genet*,2008, 17(19): 2997.
- [ 11 ] 崔玲,于向东,崔军. 自拟补肾平颤方配合美多巴片治疗帕金森病的临床疗效观察[J]. *中国中西医结合杂志*,2003, 23(7):504.
- [ 12 ] 王巍,赵德忠,孙晓芳,等. 中药首茸方对左旋多巴诱发帕金森病大鼠脑内羟自由基增高的影响[J]. *中国中西医结合杂志*,2003, 23(特):50.
- [ 13 ] 郑新民,余放争,吴锦屏. 中医药治疗帕金森病现代药理学研究进展[J]. *中国中医药现代远程教育*,2006(5):12.

## Study of molecular mechanism of anti-Parkinson's disease Traditional Chinese Medicine using model of *Caenorhabditis elegans*

WANG Xiangming\*, WANG Xiaoyan, GAO Huili, WANG Danqiao

(*Medical Experimental Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*)

[ **Abstract** ] Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder with a complex, multifactorial aetiology. The brains of patients affected with PD are characterized by a loss of neurons in dopamine neurons in the substantia nigra, decreasing of dopamine secretion, and the deposition of Lewy bodies (LBs) in the cytoplasm of remaining neurons. In China the data show that the incidence of Parkinson's disease increases at least 20 times in recent 20 years, and it makes things worse for the aging society. Developing good anti-PD drugs to improve the patient's quality of life is particularly important. The treatment of PD using traditional Chinese medicine (TCM) has made remarkable effect, while the the molecular mechanisms of it is still not known, while elucidating the molecular mechanism of TCM is the base of better understanding its function. Using genetically modified PD model of *Caenorhabditis elegans*, which is suitable for molecular mechanism study, to explore the interference mechanism of TCM to PD might be an effective way. This review briefly introduces the research progress on molecular mechanism of PD, and then discusses the idea of using *C. elegans* to study molecular mechanism of TCM intervention to PD.

[ **Key words** ] Parkinson's disease; *Caenorhabditis elegans*; traditional Chinese medicine; molecular mechanism

doi: 10.4268/cjcm20100527

[ 责任编辑 张宁宁 ]