

# 帕金森病模型小鼠黑质纹状体系统 氧化应激的增龄性改变

张忠霞,马晓伟,王彦永,李晓丽,王铭维

(河北医科大学第一医院神经内科,河北省脑老化与认知神经科学实验室,河北 石家庄 050031)

**摘要:**目的 观察不同月龄小鼠帕金森病(PD)模型黑质纹状体系统氧化应激损伤的增龄性改变并检测老龄PD小鼠氧化应激相关基因的差异性表达。方法 选用健康雌性3、6、10月龄快速老化小鼠P8系(SAMP8)42只,各月龄小鼠随机平均分为MPTP组与对照组,分别给予背部皮下急性注射1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)及等量0.9%NaCl处理。给药后72h,采用开放旷场实验观察其运动功能,高效液相色谱法检测黑质DA含量,分光光度计法检测纹状体超氧化物歧化酶(SOD1)活性和丙二醛(MDA)含量,比较不同月龄小鼠黑质DA系统、纹状体氧化应激相关指标损伤的差异。采用PCR Array检测两组10月龄小鼠纹状体氧化应激相关基因表达的差异。结果 与对照组相比,MPTP组各月龄小鼠水平运动距离与站立次数均减少,DA水平、SOD活性明显下降,MDA含量明显增加( $P < 0.05$ );与3、6月龄相比,10月龄小鼠上述指标变化更明显;与对照组相比,10月龄MPTP组小鼠环氧化酶-2表达明显上调,而谷胱甘肽过氧化物酶3、6、8,乳酸过氧化物酶、核氧化还原酶、肌红蛋白、神经珠蛋白酶、过氧化物还原酶1和嗜酸粒细胞过氧化物酶9种基因明显下调(倍数改变 $> 2$ )。结论 月龄是影响PD模型黑质纹状体系统损伤的重要因素;与氧化应激相关的基因的上调或下调可能参与了PD的早期发病。

**关键词:**帕金森病;氧化应激;增龄;快速老化小鼠P8系;基因差异表达

中图分类号:R741 文献标志码:A

## Impact of aging on the nigro-striatal oxidative stress in a mice model of Parkinson's disease

ZHANG Zhongxia, MA Xiaowei, WANG Yanyong, LI Xiaoli, WANG Mingwei

(Department of Neurology, the First Hospital of Hebei Medical University, Brain Aging and Cognitive Neuroscience Laboratory of Hebei Province, Shijiazhuang 050031, Hebei, China)

**Abstract: Objective** To observe the age-related changes of nigro-striatal oxidative stress in a mice model of Parkinson's disease (PD) at different ages and detect the differential expression of oxidative stress related genes in aged PD mice by using PCR Array. **Methods** Forty-two healthy female senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice aged 3, 6 and 10-month were averagely and randomly divided into 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) group and control group, which were subcutaneously injected with MPTP or the same volum of 0.9% NaCl, respectively. After the first injection for 72 hours, behavioral changes in mice were examined by the open field test. The levels of dopamine (DA) in nigro-striatal system was measured by a high performance liquid chromatography with electrochemical detector (HPLC-ECD). The activities of superoxide dismutase 1 (SOD1) and the content of malondialdehyde (MDA) were detected by the spectrophotometer. The injuries of nigraldopamine system and striatal oxidative stress related indexes were compared among mice at different ages. The expression of striatal oxidative stress related gene expression in 10-month mice was detected by PCR Array. **Results** Compared with control group, the levels of DA and

SOD 1, the performance in the open field test all decreased in MPTP group at three ages, while the content of MDA in tissue remarkably increased ( $P < 0.01$ ). Moreover, the above changes in 10-month mice were more obvious than 3- and 6-month mice ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the PCR Array results of MPTP group showed that COX-2 was up-regulated, while glutathione peroxidase 3, 6 and 8, lactoperoxidase, nucleoredoxin, myoglobin, neuroglobin, peroxiredoxin 1, eosinophil peroxidase were all down-regulated (fold change  $> 2$ ). **Conclusion** Aging plays an important role in nigro-striatal system injury of PD model. Up- or down- regulation of oxidative stress related genes may participate in the early phase of PD.

**Key words:** Parkinson's disease; Oxidative stress; Aging; Senescence-accelerated mouse prone 8; Gene differential expression

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是目前发病率仅次于阿尔茨海默病的神经退行性疾病,其发病率随年龄的增长而增高。2003 年报道其发病率为 1%,近年已增至 2%<sup>[1-2]</sup>。尽管其典型的临床和病理特征已经明确,但病因与发病机制仍不清楚。许多细胞内机制如氧化应激、线粒体/溶酶体功能障碍、神经免疫学改变等均可能参与了 PD 的发生和发展,而环境因素、基因突变及年龄增长也与 PD 的发生存在潜在联系,PD 逐渐被认同为一种多因素导致的综合征。本研究在应用经典的神经毒素 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6 tetrahydropyridine, MPTP)制作 PD 模型的基础上,选用不同月龄的快速老化小鼠 P8 系(senescence-accelerated mouse prone 8, SAMP8)进行实验,同时纳入环境毒素和老化两种致病因素,检测黑质纹状体系统氧化应激损伤的增龄性改变及氧化应激相关基因的差异性表达,为明确 PD 的病因及发病机制提供依据<sup>[3-4]</sup>。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 清洁级 SAMP8 雌性小鼠 42 只(香港中文大学解剖学系惠赠),3、6、10 月龄小鼠分别 12、12、18 只,体质量分别( $21 \pm 2$ )、( $28 \pm 2$ )、( $32 \pm 2$ )g,自由饮食、水。各月龄小鼠均按照随机数字表平均分为 MPTP 组和对照组。MPTP 组小鼠背部皮下急性注射 MPTP(14 mg/kg),每 2 h 注射 1 次,连续 4 次;对照组每次均注射等体积无菌 0.9% NaCl。所有小鼠于第 1 次注射后 72 h 处死。

1.2 主要试剂与仪器 MPTP(美国 Sigma 公司),RNeasy Mini 试剂盒、RT2 First Strand 试剂盒及 RT2 SYBR Green Master Mix(美国 Qiagen 公司),小鼠氧化应激和抗氧化 PCR 芯片(美国 SABiosciences 公司),Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),蛋白酶抑制剂(美国 Amresco 公司),SOD、MDA 试剂盒

(南京建成科技有限公司);A7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),Nanodrop ND-1000 紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),多功能酶标仪(美国 Thermo Labsystems 公司,型号 SN 354-01015)、超低温离心机(德国 Eppendorf 公司,型号 5417R)。

### 1.3 方法

1.3.1 行为学检测 采用开放旷场实验检测各组小鼠给药后 72 h 的自主活动水平。实验方法参照文献[5-6]。将小鼠单独置于灰色实验装箱(50 cm × 30 cm × 15 cm,箱底被划分为 10 cm × 10 cm 的方格)中,自由活动 3 min,计数其跨过的方格数用于计算移动距离,计数其垂直站立次数,作为自主探索性活动次数。每只小鼠实验结束,用乙醇擦拭箱底,以免留下气味影响其它小鼠。

1.3.2 标本留取 使用体积分数 10% 的水合氯醛麻醉小鼠,迅速断头取脑,在冰上剥离出中脑黑质、纹状体组织,电子天平称重,置于液氮中冷冻, -80 °C 保存备用。

1.3.3 脑黑质 DA 水平的检测 采用高效液相-电化学法(HPLC-ECD)检测黑质 DA 的含量,样本送检于首都医科大学神经科学研究所。

1.3.4 纹状体组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的检测 在纹状体组织中加入组织裂解液,冰上匀浆,提取蛋白,用 Lorry 法进行蛋白定量,采用分光光度计测定 SOD 的活性及 MDA 的水平,按试剂盒说明书进行操作。

1.3.5 纹状体组织的基因芯片检测 小鼠氧化应激和抗氧化 PCR 芯片共有 84 个基因,包括抗氧化基因、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)代谢基因和氧运载基因。检测步骤为:①使用 RNeasy Mini 试剂盒提取冻存纹状体组织的 RNA;②采用 NanoDrop 超微量分光光度计测定 RNA 浓度及质量,2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性;③取

RNA 1  $\mu\text{g}$ , 使用 RT2 First Strand 试剂盒逆转录为单链 cDNA; ④使用小鼠氧化应激和抗氧化 PCR Array, 检测 10 月龄的两组小鼠氧化应激相关基因的差异表达; ⑤使用 SABiosciences PCR Array 数据分析 Excel 模板对基因差异表达的结果进行分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间差异比较应用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较使用 SNK (Student-Newman-Keuls) 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 行为学检测 结果与对照组相比, MPTP 组各月龄小鼠的水平运动距离及垂直站立次数均减少 ( $P < 0.01$ ); 与 3、6 月龄小鼠相比, 10 月龄小鼠的自主活动次数下降更明显, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.2 DA 水平的改变 与对照组相比, MPTP 组各月龄小鼠 DA 水平均明显下降 ( $P < 0.01$ ), 而 10 月龄小鼠比 3、6 月龄下降更明显 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

2.3 SOD 活力及 MDA 水平 与对照组相比, MPTP 组各月龄小鼠 SOD 活力下降、MDA 水平升高 ( $P < 0.01$ ); 与 3、6 月龄小鼠相比, 10 月龄小鼠 SOD、MDA 水平改变均更显著, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。对照组 10 月龄与 3、6 月龄小鼠相比, 其 SOD 活力及 MDA 水平分别有减低和升高的趋势, 但是差异无统计学意义。见表 2。

表 1 两组小鼠旷场实验成绩 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | n | 水平运动距离(m)                           | 垂直站立次数                              |
|-------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 对照组   |   |                                     |                                     |
| 3月龄   | 6 | 23.61 ± 1.23                        | 7.63 ± 0.92                         |
| 6月龄   | 6 | 21.48 ± 1.25                        | 7.14 ± 0.85                         |
| 10月龄  | 9 | 19.32 ± 1.02                        | 7.33 ± 0.87                         |
| MPTP组 |   |                                     |                                     |
| 3月龄   | 6 | 13.46 ± 1.44*                       | 1.83 ± 0.33*                        |
| 6月龄   | 6 | 16.12 ± 1.36*                       | 1.86 ± 0.41*                        |
| 10月龄  | 9 | 7.34 ± 0.73** <sup>#</sup> $\Delta$ | 1.25 ± 0.27** <sup>#</sup> $\Delta$ |

\*  $P < 0.01$  vs 对照组; #  $P < 0.05$  vs 3 月龄;  $\Delta P < 0.05$  vs 6 月龄。

表 2 两组小鼠 DA、SOD 和 MDA 的表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| 组别    | DA (nmol/L)                            | SOD (U/mg 蛋白)                        | MDA (nmol/mg 蛋白)                     |
|-------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 对照组   |  |                                      |                                      |
| 3月龄   | 740.71 ± 105.60                        | 76.28 ± 11.23                        | 5.15 ± 1.03                          |
| 6月龄   | 736.37 ± 80.53                         | 74.13 ± 8.26                         | 4.94 ± 0.14                          |
| 10月龄  | 720.12 ± 110.21                        | 70.14 ± 13.11                        | 5.74 ± 0.11                          |
| MPTP组 |  |                                      |                                      |
| 3月龄   | 219.83 ± 52.37*                        | 24.44 ± 5.03*                        | 12.77 ± 1.20*                        |
| 6月龄   | 191.34 ± 74.49*                        | 21.06 ± 5.43*                        | 10.94 ± 1.45*                        |
| 10月龄  | 130.22 ± 45.65** <sup>#</sup> $\Delta$ | 14.77 ± 2.20** <sup>#</sup> $\Delta$ | 14.37 ± 0.72** <sup>#</sup> $\Delta$ |

\*  $P < 0.01$  vs 对照组; #  $P < 0.05$  vs 3 月龄;  $\Delta P < 0.05$  vs 6 月龄。

2.4 氧化应激相关基因的表达 与对照组相比, MPTP 组 10 月龄小鼠环氧合酶-2 基因上调了 8.61 倍, 谷胱甘肽过氧化物酶 3、6、8, 核氧化还原蛋白、肌红蛋白、乳酸过氧化物酶、神经珠蛋白酶等 7 个基因表达分别下调 3.37、2.74、2.68、2.23、3.44、2.85、2.23 倍, 过氧化物氧化还原酶 1 和嗜酸粒细胞过氧化物酶基因的表达分别下调了 4.29 倍和 4.32 倍。

## 3 讨论

PD 是最常见的神经退行性疾病之一。黑质致密部多巴胺能神经元的丢失与损伤是其病理性标志的一种, 也是导致 PD 患者出现震颤、肌强直、动作迟缓等运动功能障碍的主要原因, 而氧化应激反应

增强是导致多巴胺能神经元损伤的可能因素之一<sup>[7]</sup>。

利用选择性损伤 DA 能神经元的神经毒素 MPTP 制作 PD 模型, 已成为目前公认的研究 PD 的理想方法<sup>[8]</sup>。MPTP 在胶质细胞中转化为 MPP<sup>+</sup> 后被多巴胺转运体摄取到多巴胺能神经元内, 通过抑制线粒体内复合体 I 的功能, 导致细胞内 ROS 的过量产生, 损伤包括核酸、脂类和蛋白等在内的所有大分子, 引起氧化应激的发生, 从而导致生理机能的进行性下降。而老龄机体对氧化应激反应过程中的中间产物解毒与处理能力下降, 更易受到氧化应激的损伤<sup>[9]</sup>。

本研究选用生长周期快的 SAMP8 小鼠进行实验, 这种小鼠的寿命仅 12~17 个月, 因此 3、6、10 月龄可分别代表青年、中年和老年<sup>[4,10]</sup>。分别对这三

种月龄的小鼠进行 MPTP 注射,制备 PD 动物模型。中脑黑质 DA 含量检测及行为学测试结果发现,各月龄小鼠中脑的 DA 含量均降低,自主活动次数减少,而 10 月龄小鼠的改变比 6、3 月龄小鼠更加明显,说明衰老可以加剧其多巴胺能神经元的损伤,与毒素在 PD 的发病过程中起到协同作用。

SOD 与 MDA 是反映氧化应激的两个常用指标。SOD 通过歧化反应清除自由基,对氧化损伤起保护作用;MDA 是体内脂质过氧化反应的最终代谢产物,间接反映组织受自由基攻击的程度。本研究发现,MPTP 可致 SAMP8 小鼠体内 SOD 活性下降,MDA 含量增加,表明其氧化应激反应增强而抗氧化能力受损;与 3、6 月龄小鼠相比,10 月龄小鼠受到 MPTP 损伤后 SOD 的下降与 MDA 的上升更显著,说明老龄小鼠氧化应激反应更强。同时发现,对照组 SOD 的活力随月龄的增加而下降,而 MDA 水平随月龄的增加而增加,说明 SAMP8 小鼠本身即存在随月龄增加而加重的氧化应激反应的失衡,与 Nomura 等<sup>[11]</sup>和 Farr 等<sup>[12]</sup>的报道一致。上述结果提示,年龄本身即是影响氧化应激的因素,而衰老可以加重机体的氧化应激反应。

为了明确与衰老相关 PD 模型小鼠与氧化应激相关基因表达的改变,本研究采用 PCR Array 检测了老龄 SAMP8 小鼠注射 MPTP 后纹状体组织氧化应激基因表达的变化,结果显示,谷胱甘肽过氧化物酶等具有抗氧化活性酶类的表达明显下调,反映出机体抗氧化应激能力下降;而能够引发氧化应激反应的相关酶类的表达明显上调,如环氧化酶-2 可通过产生 ROS 将体内的 DA 氧化为有活性的 DA-醌类,进而使  $\alpha$ -突触核蛋白聚集,导致 PD 的病理性标志物路易小体的形成<sup>[13-14]</sup>,本研究结果显示,环氧化酶-2 在 MPTP 组小鼠纹状体的表达比对照组小鼠上调了 8.61 倍。

总之,本研究结果表明,在 PD 的发生与发展中,与氧化应激相关的基因在 mRNA 水平出现上调或下调,提示氧化应激反应是 PD 的发病机制之一;而且氧化应激的反应程度在老龄机体体内表现更强烈,说明衰老能够加剧环境毒素所致 PD 的发生发展。如何将相关的指标早期用于 PD 的辅助诊断与治疗,仍需要进一步的研究。

#### 参考文献:

[1] Van Den Eeden S K, Tanner C M, Bernstein A L, et al. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity[J]. *Am J Epidemiol*, 2003, 157

- (11):1015-1022.
- [2] Sowell R A, Owen J B, Butterfield D A. Proteomics in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. *Ageing Res Rev*, 2009, 8(1):1-17.
- [3] Zhang L, Li Q, Wolff L T, et al. Changes of brain activity in the aged SAMP mouse[J]. *Biogerontology*, 2007, 8(2):81-88.
- [4] Colas D, Gharib A, Bezin L, et al. Regional age-related changes in neuronal nitric oxide synthase (nNOS), messenger RNA levels and activity in SAMP8 brain [J]. *BMC Neurosci*, 2006, 7:81.
- [5] Luchtman D W, Shao D, Song C. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. *Physiol Behav*, 2009, 98(1-2):130-138.
- [6] Yamada M, Chiba T, Sasabe J, et al. Nasal Colivelin treatment ameliorates memory impairment related to Alzheimer's disease[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33(8):2020-2032.
- [7] 刘萍,罗本燕. 早期帕金森病进展危险因素研究[J]. *中国实用内科杂志*, 2013, 33(7):548-551.
- LIU Ping, LUO Benyan. Risk factors for the progression of early stage Parkinson's disease[J]. *Chinese Journal of Practical Internal Medicine*, 2013, 33(7):548-551.
- [8] Yokoyama H, Kuroiwa H, Yano R, et al. Targeting reactive oxygen species, reactive nitrogen species and inflammation in MPTP neurotoxicity and Parkinson's disease [J]. *Neurol Sci*, 2008, 29(5):293-301.
- [9] Sanders L H, Greenamyre J T. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 62:111-120. doi:10.1016/j.freeradbiomed.
- [10] Liu J, Wang M W, Gu P, et al. Microglial activation and age-related dopaminergic neurodegeneration in MPTP-treated SAMP8 mice [J]. *Brain Res*, 2010, 1345:213-220. doi:10.1016/j.brainres.2010.05.043.
- [11] Nomura Y, Wang B X, Qi S B, et al. Biochemical changes related to aging in the senescence-accelerated mouse[J]. *Exp. Gerontol*, 1989, 24(1):49-55.
- [12] Farr S A, Poon H F, Dogrukul-Ak D, et al. The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice[J]. *J Neurochem*, 2003, 84(5):1173-1183.
- [13] Periquet M, Fulga T, Myllykangas L, et al. Aggregated alpha-synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(12):3338-3346.
- [14] Wang T, Pei Z, Zhang W, et al. MPP<sup>+</sup>-induced COX2 activation and subsequent dopaminergic neurodegeneration[J]. *FASEB J*, 2005, 19(9):1134-1136.