

老龄帕金森病模型小鼠氧化应激相关基因的表达差异

马晓伟 张忠霞 王彦永 李晓丽 王铭维

摘要 目的 探讨老龄帕金森病(PD)模型小鼠行为学改变及黑质纹状体系统氧化应激相关基因的表达差异。方法 10月龄快速老化P8系(SAMP8)小鼠16只,随机均分为对照组和模型组。模型组小鼠背部皮下注射1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)制成急性损伤模型,对照组小鼠给予同量生理盐水。给药后72h进行行为学测试,高效液相色谱法检测黑质多巴胺(DA)含量,PCR Array检测其纹状体氧化应激相关基因的表达。结果 与对照组相比,模型组小鼠DA水平下降,行为学成绩下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);环氧化酶-2、可诱导型一氧化氮合酶2、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶基因表达上调;而谷胱甘肽过氧化物酶3、6、8等9种基因明显下调(改变倍数 > 2)。结论 老龄PD模型小鼠氧化应激相关的基因发生上调或下调,导致氧化应激反应的发生。

关键词 老龄;帕金森病;氧化应激;SAMP8;MPTP

中图分类号 R 742.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0029-04

老化是导致帕金森病(parkinson disease, PD)的主要危险因子之一。随着社会的老龄化,PD的发

病率也逐年增长。快速老化小鼠(senescence-accelerated mouse, SAM)是应用于老化相关性疾病研究的常用模型^[1],尤其是其中的P8系小鼠(senescence-accelerated mouse prone 8, SAMP8),寿命短(10~17个月),老化早发(4~6个月即开始出现衰老特征),更加有助于PD病理机制的研究^[2]。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6 tetrahydropyridine, MPTP)可以导致黑质纹状体系统多巴胺能神经元的退行性变^[3],诱发PD几乎所有的症状,包括运动不能、肌僵直、震颤、步调与姿势异常等^[4],并且这些行为缺陷可以通过治疗PD的经典方法多巴胺(dopamine, DA)的替代治疗缓解^[5]。这些优点使MPTP成为制作PD模型的经典毒素。该研究在应用MPTP的基础上,选用老龄SAMP8代替传统的C57BL/6小鼠制备PD模型,同时兼具环境毒素与老化的影响,与临床PD的发病及病理情况更接近。通过PCR Array检测模型组与对照组小鼠氧化应激相关基因的差异表达,为寻找PD的诊断指标与临床治疗靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SAMP8小鼠,雌性,10月龄,共16只,26~30g,清洁级,由香港中文大学解剖学系惠赠。

1.2 主要试剂与仪器 MPTP(美国Sigma公司);TRIzol试剂(美国Invitrogen公司);RNeasy Mini Kit; RT2 First Strand Kit; RT2 SYBR Green Master Mix

2014-09-24 接收

基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划(编号:20110302、20130272)

作者单位: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,石家庄 050031

作者简介:马晓伟,女,硕士,副主任医师;

王铭维,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: wmw@hebmu.edu.cn

tetraiodothyronine(T₄), thyroid-stimulating hormone(TSH) were measured by radioimmunoassay kits, acetylcholine concentration in frontal lobe was determined by alkaline hydroxylamine colorimetry and the expression and distribution of munc-18 in frontal cortex were evaluated by immunohistochemistry. **Results** In the hypothyroid rats, the levels of serum T₃ and T₄ decreased with the increase of TSH($P < 0.01$), the content of acetylcholine in frontal lobe was significantly decreased($P < 0.05$), and the expression of munc-18 was at significantly lower levels in the II, III, IV, V layers of frontal cortex($P < 0.05$). In addition, donepezil treatment reversed the content of acetylcholine to normal values. L-T₄ monotherapy normalized the level of serum thyroid hormone and acetylcholine content while the expression of munc-18 was not. Munc-18 was normalized completely by co-administration of L-T₄ and donepezil. **Conclusion** The alteration of acetylcholine content and expression of munc-18 in the frontal lobe of a dult-onset hypothyroidism can be better ameliorated by co-administration of L-T₄ and donepezil.

Key words hypothyroidism; frontal cortex; acetylcholine; munc-18; levothyrocine; donepezil

(美国 QIAGEN 公司); Real-time PCR Array(Mouse Oxidative Stress and Antioxidant Defense; PAMM-065A; 美国 SABiosciences 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); 5417R 超低温离心机(德国 eppendorf 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组与给药 按随机数字表法将小鼠随机分为生理盐水对照组(8 只)和模型组(8 只)。模型组小鼠背部皮下注射 MPTP,连续注射 4 次,每次 14 mg/kg,每次间隔 2 h。对照组每次均注射等体积无菌生理盐水。于第 1 次注射 72 h 进行行为学测试后处死。

1.3.2 行为学检测 用药后 72 h 对两组小鼠进行行为学测试,采用悬尾实验检测其运动功能。实验方法同文献[6]描述。实验在隔音、安静的房间进行。将小鼠倒置悬挂于实验箱中(长×宽×高为 30 cm×25 cm×25 cm,悬挂鼠尾的吊钩距离鼠尾 15 mm,通过一连接装置与鼠尾相连),与实验箱连接的电脑分析系统记录 5 min 内小鼠的静止时间。

1.3.3 DA 水平的检测 各组取 4 只小鼠处死,冰上迅速剥离出中脑黑质部分,加入遇冷的高氯酸进行匀浆,低温离心机中 4 ℃离心 30 min,10 000 r/min,取上清液,采用高效液相-电化学法(HPLC-ECD)检测 DA 含量。电化学检测器的工作电压为 0.7 V,进样量为 20 μl,流速为 0.6 ml/min。

1.3.4 PCR Array 检测 氧化应激和抗氧化 PCR 芯片共有 84 个基因,包括抗氧化基因、ROS 代谢基因和氧运载基因。首先将小鼠迅速断头取脑,在冰上剥离出纹状体组织,电子天平称重后即刻使用 RNeasy Mini Kit 提取纹状体组织的 RNA,微量分光光度计测定 RNA 浓度及质量;使用 RT2 First Strand Kit 将 1 000 ng RNA 逆转录为单链 cDNA;使用小鼠氧化应激及抗氧化聚合酶链反应产物序列分析(Mouse Oxidative Stress and Antioxidant Defense RT2 Profiler PCR Array),检测模型组及对照组老龄 SAMP8 小鼠氧化应激相关基因的差异表达。PCR Array 结果使用 SABiosciences PCR Array 数据分析 Excel 模板进行分析,上调或下调水平 2 倍及以上的基因为有意义。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 悬尾实验结果 与对照组相比,模型组小鼠悬挂的静止时间明显延长,差异有统计学意义($t = 11.27, P < 0.01$)。见图 1。

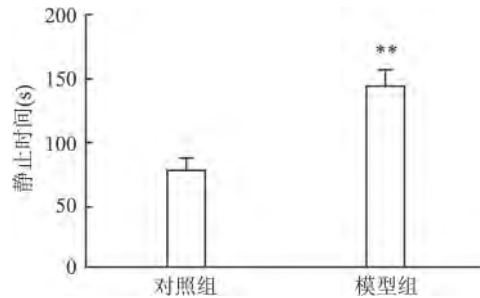


图 1 老龄 SAMP8 小鼠悬尾实验成绩 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2 DA 水平的改变 与对照组相比,模型组小鼠在注射 MPTP 后 72 h DA 水平下降了 81.67%,差异有统计学意义($t = 16.86, P < 0.01$)。见图 2。

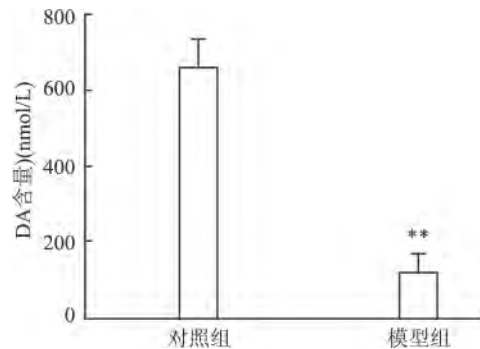


图 2 老龄 SAMP8 小鼠 DA 含量($\bar{x} \pm s$) 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 氧化应激相关基因的表达 PCR Array 结果显示:与对照组相比,模型组小鼠嗜酸粒细胞过氧化物酶(eosinophil peroxidase, EPX)、生长因子受体结合蛋白 2 相关结合蛋白 1 (growth factor receptor bound protein 2-associated protein 1, GAB1)、谷胱甘肽过氧化物酶 3、6、8(glutathione peroxidase 3, 6, 8, GPX3, 6, 8)、乳酸过氧化物酶(lactoperoxidase, LPO)、肌红蛋白(myoglobin, MB)、膜蛋白棕榈酰化 4 (membrane protein palmitoylated 4, MPP4)、神经球蛋白(neuroglobin, NGB)、核氧化还原蛋白(nucleoredoxin, NXN)、过氧化物氧化还原酶 1(peroxiredoxin 1, PRDX1)、溶质运载蛋白家族 41 成员 3

(solute carrier family 41 member3, SLC41A3) 12 种基因分别依次下调 4.32、2.01、3.37、2.74、2.68、2.85、3.44、2.38、2.23、2.32、4.29 及 2.11 倍;可诱导型一氧化氮合酶 2(inducible Nitric oxide synthase 2, iNOS2)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸环氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase, NOX) 及环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2) 基因分别上调 2.57、2.01 及 8.61 倍。见表 1。

表 1 模型组与对照组小鼠氧化应激相关差异表达基因

基因名称	基因全称	差异倍数 (模型组/对照组)
Ptgs2(COX2/Cox-2)	前列腺素-内源性过氧化物合酶 2	8.61
Epx(EPO)	嗜酸粒细胞过氧化物酶(促红细胞生成素)	-4.32
Gab1	生长因子受体结合蛋白 2 相关结合蛋白 1	-2.01
Gpx3	谷胱甘肽过氧化物酶 3	-3.37
Gpx6	谷胱甘肽过氧化物酶 6	-2.74
Gpx8	谷胱甘肽过氧化物酶 8	-2.68
Lpo	乳酸过氧化物酶	-2.85
Mb	肌红蛋白	-3.44
Mpp4(DLG6)	膜蛋白 棕榈酰化 4(膜相关鸟苷酸激酶 p55 亚家族成员 4)	-2.38
Ngf	神经生长蛋白(脑红蛋白)	-2.23
Nos2	一氧化氮合酶 2, 可诱导型	2.57
Nox1	NADPH 氧化酶	2.01
Nxn	核氧化还原蛋白	-2.32
Prdx1	过氧化物氧化还原酶 1	-4.29
Slc41a3	溶质运载蛋白家族 41 成员 3	-2.11

3 讨论

MPTP 是广泛用于 PD 研究的神经毒素,因其高亲脂性可以迅速通过血脑屏障进入大脑,之后在单胺氧化酶 B 的作用下于神经胶质细胞中转变为 MPP⁺,在细胞膜上多巴胺转运体(DAT)的作用下进入 DA 能神经元,之后聚集在突触小泡中,抑制线粒体内电子呼吸链的传递,损伤复合体 I 的功能,导致中脑 ATP 水平下降,细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS) 与活性氮自由基(reactive nitrogen species, RNS) 产生增多,引起氧化应激的发生^[7]与 DA 能神经元的损伤。

本实验在应用 MPTP 的基础上,选用生长周期快并具有老化特征的 10 月龄 SAMP8 小鼠用于老龄 PD 模型的制作,结合毒素与衰老两种致病因素,对于 PD 病理机制的研究比使用传统小鼠模拟 PD 更具优势。为了明确 PD 模型是否制作成功,本实验在给模型组小鼠注射 MPTP 之后,检测其中脑黑质

的 DA 含量并进行悬尾实验。悬尾实验是一种经典而又能快速评价药物毒性或药效的方法,研究者在 MPTP 干预的 PD 模型鼠中,通过评测其悬尾实验中静止的持续时间来反映小鼠黑质纹状体系统 DA 能神经元的退行性变,认为静止时间的延长是 PD 模型小鼠运动障碍的结果^[6-8]。本实验结果发现其中脑的 DA 含量下降 81.67%,悬尾实验中静止时间增加了 85.7%,证实老龄 SAMP8 对于 MPTP 的易感性,复制老龄 PD 模型成功。

PCR Array 结果显示,与氧化应激相关的基因在 mRNA 水平发生改变。与对照组相比,模型组共有 12 种基因的改变超过 2 倍,其中 3 种上调,9 种下调。ROS 与 RNS 是体内主要的两种自由基。NOX 是生成 ROS 的主要酶体^[9],iNOS2 可催化合成 RNS 及 NO,二者在模型组小鼠分别上调了 2.01 倍和 2.57 倍;COX-2 通过产生活性氧将体内的 DA 氧化为有活性的 DA-醌类,使 α -突触核蛋白聚集,之后导致 PD 的病理性标志物路易小体的形成^[10],临床已使用其抑制剂治疗 PD^[11],本结果显示其水平显著上调。

氧化应激反应增强的同时,抗氧化防御体系功能下降。GPX 是生物体内重要的抗氧化酶之一,通过促进过氧化氢及脂质过氧化物的分解,保护细胞膜的结构及功能^[12]。本研究中 GPX3、6、8 分别下降了 3.37 倍、2.74 倍和 2.68 倍,反映出机体抗氧化应激能力的下降。PRDX1 通过硫氧还蛋白还原过氧化物或超氧化物,消除代谢产生的过氧化物^[13],结果显示其表达下调了 4.29 倍。NXN 在氧化应激状态下可与其相结合的 Dvl 蛋白解离,激活下游的 Wnt 信号通路影响细胞状态与功能。LPO 可抑制脂质过氧化,清除羟基自由基并具有抗菌活性^[14]。此外,还有肌红蛋白、促红细胞生成素、神经生长蛋白等几种基因表达均下调 2 倍以上。

综上所述,本研究显示,老龄 PD 模型小鼠在急性损伤后 72 h,氧化应激相关基因发生差异性改变,促氧化反应的基因上调,抗氧化基因下调,氧化应激系统与抗氧化应激体系二者的失衡导致机体病理生理的改变。相关基因的明确为以后临床寻找辅助诊断指标与治疗靶点提供依据。

参考文献

- [1] Morley J E, Armbrecht H J, Farr S A, et al. The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and

- Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822(5): 650–6.
- [2] 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: 213–20.
- [3] Zaitone S A, Hammad L N, Farag N E. Antioxidant potential of melatonin enhances the response to L-dopa in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-parkinsonian mice [J]. *Pharmacol Rep*, 2013, 65(5): 1213–26.
- [4] Kosloski L M, Kosmacek E A, Olson K E, et al. GM-CSF induces neuroprotective and anti-inflammatory responses in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxicated mice [J]. *J Neuroimmunol*, 2013, 265(1–2): 1–10.
- [5] Rekha K R, Selvakumar G P, Santha K, et al. Geraniol attenuates α -synuclein expression and neuromuscular impairment through increase dopamine content in MPTP intoxicated mice by dose dependent manner [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440(4): 664–70.
- [6] Kida K, Yamada M, Tokuda K, et al. Inhaled hydrogen sulfide prevents neurodegeneration and movement disorder in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Antioxidants Redox Signal*, 2011, 15(2): 343–52.
- [7] Ahn E H, Kim D W, Shin M J, et al. PEP-1-ribosomal protein S3 protects dopaminergic neurons in an MPTP-induced Parkinson's disease mouse model [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 55: 36–45.
- [8] Mori A, Ohashi S, Nakai M, et al. Neural mechanisms underlying motor dysfunction as detected by the tail suspension test in MPTP-treated C57BL/6 mice [J]. *Neurosci Res*, 2005, 51(3): 265–74.
- [9] Hernandez M S, Café-Mendes C C, Britto L R. NADPH oxidase and the degeneration of dopaminergic neurons in parkinsonian mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 157857.
- [10] Rubattu S, Menzuni S, Testa M, et al. Pathogenesis of chronic cardiorenal syndrome: is there a role for oxidative stress? [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(11): 23011–32.
- [11] Akula K K, Dhir A, Kulkarni S K. Rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor increases pentylenetetrazol seizure threshold in mice: possible involvement of adenosinergic mechanism [J]. *Epilepsy Res*, 2008, 78: 60–70.
- [12] Cojocaru I M, Cojocaru M, Sapira V, et al. Evaluation of oxidative stress in patients with acute ischemic stroke [J]. *Rom J Intern Med*, 2013, 51(2): 97–106.
- [13] Kruzel M L, Actor J K, Zimecki M, et al. Novel recombinant human lactoferrin: differential activation of oxidative stress related gene expression [J]. *J Biotechnol*, 2013, 168(4): 666–75.
- [14] Funato Y, Miki H. Redox regulation of Wnt signalling via nucleoredoxin [J]. *Free Radic Res*, 2010, 44(4): 379–88.

Oxidative stress related gene expression difference in aging Parkinson's disease model mice

Ma Xiaowei, Zhang Zhongxia, Wang Yanyong, et al

(Dept of Neurology, The First Hospital of Hebei Medical University, Brain Aging and Cognitive Neuroscience Laboratory, Shijiazhuang 050031)

Abstract Objective To explore the behavior changes and oxidative stress related gene expression difference in nigro-striatal system of aging Parkinson's disease model mice. **Methods** Senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) aged 10-month old in sum of 16 were randomly divided into control group and model group. Acute injury was made by subcutaneous injections of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice in model group, while a corresponding volume of saline was given to the control. 72 hours after injection, all the animals were tested by the behavioral test. Dopamine (DA) contents in nigro were measured by a high performance liquid chromatography with electrochemical detector, and the oxidative stress related genes expression was detected by polymerase chain reaction array (PCR Array). **Results** Compared with the control group, the DA levels and behavioral performance were both remarkably decreased in model group ($P < 0.01$). Cyclooxygenase-2, inducible Nitric oxide synthase 2, reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase were up-regulated, while 9 genes such as glutathione peroxidase 3, 6, 8 were all down-regulated significantly (fold change > 2). **Conclusion** Up- or down-regulation of oxidative stress related genes may result in the occurrence of oxidative stress in aging PD model mice.

Key words aging; Parkinson's disease; oxidative stress; SAMP8; MPTP