

二苯乙烯苷对A53T α -突触核蛋白转基因小鼠运动功能和黑质多巴胺能神经元的影响

张旭 张如意 陈晨 张丽 张兰 李林

【摘要】 目的 研究二苯乙烯苷(TSG)对A53T突变型 α -突触核蛋白(α -syn)转基因小鼠运动功能和病理变化的影响。方法 6月龄A53T α -syn转基因阳性小鼠分为模型组(Tg+)、模型+TSG小剂量组(50 mg/kg)、模型+TSG大剂量(100 mg/kg)组。同窝转基因阴性小鼠随机分为对照组(Tg-)、对照+TSG大剂量组(100 mg/kg)组。给药组每天灌胃给予TSG,共9个月,至15月龄;对照组和模型组每天灌胃给予等容积蒸馏水。应用爬杆试验和筑巢试验检测小鼠的运动能力;应用免疫组织化学方法检测小鼠黑质酪氨酸羟化酶(TH)标记的神经元。结果 与转基因阴性的对照组小鼠比较,模型组小鼠在爬杆试验中的潜伏期延长,筑巢行为评分减低,黑质致密部的TH阳性神经元数量减少。TSG灌胃给药9个月能够明显缩短模型小鼠在爬杆试验中的潜伏期,增高筑巢行为评分,增加黑质致密部TH阳性细胞数量。结论 TSG能够明显改善A53T α -syn转基因小鼠的运动功能,增高黑质多巴胺能神经元数量,提示TSG可能有利于治疗帕金森病等突触核蛋白相关疾病。

【关键词】 帕金森病; α -突触核蛋白; 小鼠,转基因; 二苯乙烯苷; 行为学; 多巴胺能神经元
doi: 10.3969/j.issn.1009-6574.2017.03.003

Effects of tetrahydroxy-stilbene glucoside on motor function and dopaminergic neurons in substantia nigra of A53T α -synuclein transgenic mice ZHANG Xu, ZHANG Ru-yi, CHEN Chen, et al. Department of Pharmacology, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing Engineering Research Center for Nerve System Drugs, Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases of Ministry of Education, Beijing 100053, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of tetrahydroxy-stilbene glucoside (TSG) on the behavioral and pathological changes in A53T mutant α -synuclein (α -syn) transgenic mice. **Methods** Six months old A53T α -syn transgenic mice were divided into model group (Tg+ group), model+ low dose group (50 mg/kg) and model+high dose group (100 mg/kg). Brood negative transgenic mice were divided into control group (Tg-) and high dose group (100 mg/kg). The administration groups were given TSG by gavage everyday for 9 months, while the control and model groups were given equal volume of distilled water. The movement abilities of mice were measured by pole test and nest building test. The immunohistochemical method was used to detect tyrosine hydroxylase (TH)-labeled neurons in the substantia nigra of mice. **Results** Compared to negative transgenic mice, the latency prolonged in pole test and the score of nest building were decreased, and the number of TH positive neurons were declined in substantia nigra compacta of A53T α -syn transgenic mice. Intra-gastrical administration of TSG for 9 months significantly shortened the latency in pole test, increased the score of nest building, and increased the number of TH positive neurons in substantia nigra compacta of α -syn transgenic mice. **Conclusions** TSG could obviously improve the motor function and increase the number of dopaminergic neurons in substantia nigra of A53T α -syn mice. It is suggested that TSG may be beneficial to the treatment of synuclein-related neurodegenerative diseases such as Parkinson disease.

【Key words】 Parkinson disease; Alpha-synuclein; Mice, transgenic; Tetrahydroxy-stilbene glucoside; Behavior; Dopaminergic neuron

基金项目: 国家自然科学基金项目(81273498); 国家重大新药创制科技重大专项(2015ZX09101016001); 首都卫生发展科研专项(2016-2-1033); 北京市教委新医药学科群项目(XK100270569); 北京市高层次卫生技术人才项目(2011-1-7, 2014-2-014)

作者单位: 100053 首都医科大学宣武医院药物研究室 北京市神经药物工程技术研究中心 神经变性病教育部重点实验室

通讯作者: 李林 Email: linlixw@126.com

帕金森病(Parkinson Disease, PD)是中老年人常见的神经退行性疾病。其主要病理特征是黑质多巴胺能神经元变性死亡、残存神经元内路易小体形成,患者出现静止性震颤、肌张力增高、运动减少等一系列症状。 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)是第一个被确定与PD相关的有基因突变的蛋白,其53位氨基酸的突变(A \rightarrow T)可导致家族性PD的发生。此后,又发现 α -syn是路易小体的主要成分。 α -syn的突变或过度积累导致寡聚体和多聚体的形成,促进神经元死亡^[1-2]。

二苯乙烯苷(2, 3, 5, 4'-Tetrahydroxy-Stilbene Glucoside, TSG)是从何首乌中提取的有效成分,文献报道其具有较强的抗氧化能力。我们的前期研究表明,TSG与 α -syn基因转染COS-7细胞孵育24 h,可明显抑制细胞内 α -syn mRNA和蛋白的过度表达,并可抑制 α -syn的聚集^[3]。本实验进一步研究TSG对A53T α -syn转基因小鼠运动功能和黑质部位多巴胺能神经元的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 TSG由中国中医科学院中药研究所制备。抗酪氨酸羟化酶(Tyrosine Hydroxylase, TH)抗体购自美国Santa Cruz公司;PO-7000一步法抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒购自西雅金桥生物技术有限公司。小鼠爬杆仪:XPS-2型,中国医学科学院药物研究所制作。

1.1.2 实验动物 A53T α -synuclein转基因小鼠[B6; C3-Tg(Pmp-SNCA*A53T)83Vle/NJU],雌雄各半,由南京大学—南京生物医药研究院提供,动物合格证号:201500151。小鼠饲养于首都医科大学宣武医院SPF级实验动物室,昼夜日光节律,自由摄食水。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及给药 6月龄A53T α -syn转基因阳性小鼠随机分为模型组(Tg+)、模型+TSG小剂量组(50 mg/kg)、模型+TSG大剂量组(100 mg/kg)。同窝转基因阴性小鼠随机分为对照组(Tg-)、对照+TSG大剂量组(100 mg/kg)。给药组每天灌胃给予TSG,共9个月,至15月龄;对照组和模型组每天灌胃给予等容积蒸馏水。

1.2.2 小鼠爬杆试验 应用爬杆试验检测小鼠的运动协调能力。小鼠爬杆为长50 cm(直径1 cm)的木质杆,顶端有一个直径2 cm的圆头可供小鼠站立。测试时将小鼠放在杆的顶端,待其调转方向向下,记录爬下杆的时间(即潜伏期)。第1天对每只小鼠进行训练3次,每训练一次休息5 min;24 h后开始正式试验,记录小鼠的潜伏期,每只重复3次。

1.2.3 筑巢试验 应用筑巢试验检测小鼠日常活动的执行能力、肢体的协调和精细运动能力。实验前将小鼠分笼,单独饲养,于标准树脂鼠笼中加入垫

料,厚度约1 cm,使其适应单笼环境至少24 h。放入压缩脱脂棉球,每笼10个,记录小鼠筑巢开始的时间,分别在开始后1, 3, 5, 24 h按如下评分标准打分。0分:完全没有碰棉球;1分:棉球散落于笼内各处,但没有明显撕咬的痕迹;2分:棉球集中于笼子的一边,但没有明显撕咬的痕迹;3分:棉球被集中于一边或一角,且小部分被撕咬,但未形成可见的成型的巢;4分:棉球大部分被撕咬,且初步聚集成巢;5分:棉球全部被撕咬,且聚集成巢;6分:棉球全部被撕咬,巢蓬松成型且有供小鼠出入的通道^[4]。以上结果均采用盲法打分,统计小鼠的筑巢分数。

1.2.4 免疫组织化学法检测TH阳性细胞 TH是多巴胺能神经元的标志酶,本实验应用免疫组织化学方法检测小鼠脑内黑质区TH阳性细胞。(1)取材:用10%水合氯醛(0.4 g/kg)腹腔注射小鼠。麻醉成功后将其仰卧于平台上,伸展固定四肢,开胸腹充分暴露心脏和肝脏。剪开左侧心尖部,经左心室一升主动脉迅速插管灌注并固定,同时剪开右心耳,先快速灌注生理盐水60 ml,待肝脏完全变白、右心耳流出澄清液体后,改灌4℃预冷的4%多聚甲醛灌注固定液50 ml,至肝脏变硬、四肢僵硬即固定完成。断头取脑,投入含30%蔗糖的多聚甲醛溶液中固定。至脑下沉后,换一次后固定液,即可行冰冻切片。(2)冰冻切片:将固定好的小鼠脑组织修块,置于有少量异戊烷的冻存管中,然后放在液氮中冷冻约10 s,迅速放入冰冻切片舱内,包埋鼠脑,切片时温度-22℃,片厚20 μ m。将切片放入盛有0.01 mmol/L磷酸盐缓冲液(PBST)的24孔板内。(3)染色:每只动物选3张冰冻切片,PBST清洗,5 min \times 3次;用3% H_2O_2 室温孵育10 min,去除内源性过氧化物酶活性;PBST清洗,5 min \times 3次;用10%封闭羊血清室温孵育1 h。加入抗TH抗体(1:5 000稀释),4℃过夜;次日PBST清洗,5 min \times 3次。加入试剂盒中的A液(工作液),37℃孵育1 h;PBST清洗,5 min \times 3次。DAB显色,脱水,透明,封片,显微镜下观察TH免疫阳性细胞数量。

1.3 统计学方法 采用SPSS 18.0软件进行统计分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,检验采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,双侧检验。

2 结果

2.1 TSG对A53T α -syn转基因小鼠运动协调能力的影响 见表1。结果显示,A53T α -syn转基因模型小鼠的潜伏期较同龄转基因阴性对照组小鼠的潜伏期明显延长($P < 0.05$);两种剂量的TSG灌胃给药9个月均可显著缩短模型小鼠的潜伏期($P < 0.05$)。

2.2 TSG对A53T α -syn转基因小鼠肢体协调和精细运动能力的影响 见表2。结果显示,在给予棉花后3, 5和24 h,A53T α -syn转基因模型组小鼠的筑巢分数较对照组明显下降($P < 0.05$);TSG大剂量给

药组小鼠在给予棉花后24 h的筑巢分数较模型组显著升高($P < 0.05$)。

表1 TSG对A53T α -syn转基因小鼠爬杆试验的影响($s, \bar{x} \pm s$)

组别	动物数	潜伏期
对照组	16	8.35 \pm 2.75
对照+TSG大剂量组	15	7.73 \pm 2.77
模型组	14	16.07 \pm 7.67*
模型+TSG小剂量组	14	7.95 \pm 1.72#
模型+TSG大剂量组	11	8.51 \pm 2.46#

注: $F=10.88, P < 0.01$; 与对照组比较* $P < 0.05$, 与模型组比较# $P < 0.05$

2.3 TSG对A53T α -syn转基因小鼠黑质多巴胺能神经元的影响 见图1(见本期封三),表3。结果显示,与对照组比较,A53T α -syn转基因模型组小鼠脑黑质致密部TH阳性细胞数明显减少($P < 0.01$);与模型组比较,TSG大小剂量给药组黑质致密部TH阳性细胞数量均显著增加($P < 0.01$)。

3 讨论

编码 α -syn的SNCA是第1个被发现的与PD有关的基因,单一或多个位点的突变会导致常染色体遗传性早发性PD的发生^[5]。有证据表明, α -syn在PD的发病过程中起到重要作用^[6],A53T是SNCA最常见的突变形式。A53T α -syn的积累会导致8~12月龄的 α -syn转基因小鼠出现一些明显的运动障碍^[7],因此本实验应用A53T突变型人 α -syn转基因小鼠作为动物模型。

何首乌是我国传统的补益肝肾药物,二苯乙烯苷(TSG)是何首乌的标志性活性成分。我们前期的研究表明,TSG与 α -syn基因转染COS-7细胞孵育24 h,可明显抑制细胞内 α -syn mRNA和蛋白的过度表达,并可抑制 α -syn的聚集^[3]。TSG(50, 100, 200 mg/kg)灌胃给药3个月能够明显改善自然衰老小鼠的学习记忆及运动协调能力,保护海马和纹状体的突触,抑制 α -syn聚集^[8]。考虑到本研究中TSG的用药周期较长,我们选取了50 mg/kg和100 mg/kg两个用药剂量,进一步观察了TSG灌胃口服对A53T转基因小鼠运动功能及黑质部位多巴胺能神经元的影响。

TH是儿茶酚胺类神经递质合成过程中的限速酶,催化酪氨酸转变成多巴胺(Dopamine, DA),是DA能神经元的标志酶。PD的特异病理变化是脑黑质部位DA能神经元显著减少^[9]。Al-Wandi等^[10]发现 α -syn转基因老年鼠的黑质纹状体中DA降低了36%,并伴有TH阳性纤维减少,TH和DA转运体减少,而缺乏 α -syn的老年鼠黑质纹状体中TH阳性神经元没有明显减少;并认为 α -syn的增高对突触功能造成损害,可能是动物神经系统中黑质纹状体病理发展的诱因。本研究发现15月龄A53T α -syn转基因小鼠脑黑质致密部TH表达显著减少,TSG能够明显增强模型小鼠TH表达,表明TSG能够显著提高黑质DA能神经元数量,改善PD的特异病理变化,具有神经保护作用。

动物行为学变化与患者的临床症状密切相关。在PD小鼠模型中,爬杆试验常用于检测其运动协调能力。本研究发现A53T α -syn转基因小鼠在爬杆试验中的潜伏期较对照组小鼠明显延长,这与Bai等^[11]的研究结果一致;TSG用药后可显著缩短模型小鼠的潜伏期,表明TSG能够改善PD模型小鼠的运动协调能力,且TSG 50 mg/kg组与TSG 100 mg/kg组的潜伏期接近,两组间差异无统计学意义。这可能是由于给药时间较长,小剂量TSG(50 mg/kg)也发挥了良好的改善作用。此外,本研究在行为学实验中还应用了筑巢试验。小鼠筑巢行为包括与感觉运动功能相关的基础活动(如面部、口唇、前肢运动等)和与动机目的(如保持体温、躲避天敌、繁殖)等因素相关的复杂活动^[12]。由于筑巢行为需要小鼠撕咬、搬运筑巢材料,该行为需要口和四肢尤其是前肢协调运动,因此分析筑巢行为可以评估啮齿类动物黑质纹状体的感觉运动功能^[13-14],同一时间点筑巢评分降低说明小鼠肢体协调和精细运动功能受损。本研究发现15月龄A53T α -syn转基因小鼠的筑巢分数减低,TSG 100 mg/kg能够增高模型小鼠24 h测定点的筑巢分数,表明TSG可改善PD动物模型的肢体协调和精细运动功能。

综上所述,本研究发现TSG能够提高A53T α -syn转基因小鼠黑质DA能神经元数量,改善其运动功能,

表2 TSG对A53T α -syn转基因小鼠筑巢试验的影响($分, \bar{x} \pm s$)

组别	动物数	1 h	3 h	5 h	24 h
对照组	16	1.93 \pm 0.99	3.93 \pm 0.44	4.37 \pm 0.71	4.87 \pm 0.61
对照+TSG大剂量组	16	2.18 \pm 0.91	3.68 \pm 0.70	4.25 \pm 0.93	4.93 \pm 0.77
模型组	14	1.42 \pm 0.64	3.14 \pm 0.86*	3.35 \pm 0.74*	4.29 \pm 0.61*
模型+TSG小剂量组	14	1.71 \pm 0.91	3.42 \pm 0.75	3.57 \pm 0.75	4.64 \pm 0.84
模型+TSG大剂量组	13	1.61 \pm 0.86	3.00 \pm 0.70	3.23 \pm 0.83	4.92 \pm 1.11#
F值		1.67	4.38	6.31	2.93
P值		> 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.05

注: 与对照组比较* $P < 0.05$, 与模型组比较# $P < 0.05$

提示TSG可能有利于治疗突触核蛋白相关的神经退行性疾病(如PD、帕金森病痴呆、路易体痴呆等),具有较好的应用前景。

表3 TSG对A53T α -syn转基因小鼠黑质致密部TH阳性细胞数量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	TH阳性细胞数
对照组	3	174.8 \pm 11.7
对照+TSG大剂量组	3	179.2 \pm 5.7
模型组	3	111.2 \pm 4.9*
模型+TSG小剂量组	3	150.6 \pm 8.1#
模型+TSG大剂量组	3	216.5 \pm 15.8#

参 考 文 献

- [1] Emamzadeh FN. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions[J]. J Res Med Sci, 2016, 21:29.
- [2] Michel PP, Hirsch EC, Hunot S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease[J]. Neuron, 2016, 90(4):675-691.
- [3] 刘莹, 李林, 杨慧, 等. 二苯乙烯苷对过度表达 α -synuclein 蛋白的转基因 COS-7 细胞株的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(4):338-340; 插1.
- [4] Paumier KL, Sukoff Rizzo SJ, Berger Z, et al. Behavioral characterization of A53T mice reveals early and late stage deficits related to Parkinson's disease[J]. PLoS One, 2013, 8(8):e70 274.
- [5] Schildknecht S, Gerding HR, Karreman C, et al. Oxidative and nitrative alpha-synuclein modifications and proteostatic stress: implications for disease mechanisms and interventions in synucleinopathies[J]. J Neurochem, 2013, 125(4):491-511.
- [6] Ozansoy M, Başak AN. The central theme of Parkinson's disease: α -synuclein[J]. Mol Neurobiol, 2013, 47(2):460-465.
- [7] Oaks AW, Frankfurt M, Finkelstein DI, et al. Age-dependent effects of A53T alpha-synuclein on behavior and dopaminergic function[J]. PLoS One, 2013, 8(4):e60 378.
- [8] Shen C, Sun FL, Zhang RY, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside ameliorates memory and movement functions, protects synapses and inhibits α -synuclein aggregation in hippocampus and striatum in aged mice[J]. Restor Neurol Neurosci, 2015, 33(4):531-541.
- [9] Wang D, Yu T, Liu Y, et al. DNA damage preceding dopamine neuron degeneration in A53T human α -synuclein transgenic mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 481(1/2):104-110.
- [10] Al-Wandi A, Ninkina N, Millership S, et al. Absence of α -synuclein affects dopamine metabolism and synaptic markers in the striatum of aging mice[J]. Neurobiol Aging, 2010, 31:796-804.
- [11] Bai X, Wey MC, Fernandez E, et al. Rapamycin improves motor function, reduces 4-hydroxynonenal adducted protein in brain, and attenuates synaptic injury in a mouse model of synucleinopathy[J]. Pathobiol Aging Age Relat Dis, 2015, 5:28 743.
- [12] Fleming SM. Behavioral outcome measures for the assessment of sensorimotor function in animal models of movement disorders[J]. Int Rev Neurobiol, 2009, 89:57-65.
- [13] Hofele K, Sedelis M, Auburger GW, et al. Evidence for a dissociation between MPTP toxicity and tyrosinase activity based on congenic mouse strain susceptibility[J]. Exp Neurol, 2001, 168(1):116-122.
- [14] Szczypka MS, Kwok K, Brot MD, et al. Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine deficient mice[J]. Neuron, 2001, 30(3):819-828.

(收稿日期:2016-02-13)

· 消息 ·

《神经疾病与精神卫生》杂志2017年征稿通知

《神经疾病与精神卫生》杂志是神经、精神科学及精神卫生领域的学术性期刊(CN23-1479/R, ISSN1009-6574)。为更好地服务神经科学、精神科学以及精神卫生领域的专家、作者和读者,构建理想的学术交流平台,配合本刊2017年的重点号刊发,特发出征稿通知,希望相关学科方向的医护工作者和学者能多给予支持。

解 读 本 刊

中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)

征 稿 内 容

1. 帕金森及运动障碍疾病;2. 精神疾病的流行病学调查;3. 认知行为治疗;4. 癫痫与电生理;5. 神经肌肉病;6. 中西医结合治疗精神疾病;7. 精神疾病的基因学研究;8. 神经介入及内镜治疗;9. 睡眠障碍;10. 颅脑创伤研究;11. 脑血管疾病的基础研究;12. 双相障碍。此外,以上所列方向相关的护理研究同为本刊重点征稿范围。

来 稿 要 求

详见稿约。

相 关 事 宜

(1) 来稿请注明为征稿稿件,并备注相对应的征稿方向及编号(如:1. 帕金森及运动障碍疾病);(2) 所有符合征稿方向的稿件均享受优先审稿、优先发表的权利。

联 系 方 式

地址:北京市宣武门外大街香炉营东巷2号院1-7-302 神经疾病与精神卫生杂志社 邮编:100052

电话:010-83191160 传真:010-83191161 电子信箱:ndmh@ndmh.com