

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00864

· 论 著 ·

## 依达拉奉对帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元的保护作用

苑振云\*, 姜相明, 杨芳, 顾平, 王铭维, 苏冠丽, 李斌, 王彦霞

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

**[摘要]** **目的** 探讨依达拉奉(edaravone)对1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导的C57BL/6J帕金森病模型小鼠的保护作用及相关机制。**方法** 90只雄性C57BL/6J小鼠随机分为依达拉奉组(ED组)、帕金森病模型组(PD组)和生理盐水对照组(NS组),每组30只。ED组和PD组小鼠给予皮下注射MPTP建立PD模型后,ED组给予依达拉奉(3 mg/kg)治疗。用滚轴实验检测小鼠的旋转次数,用免疫组织化学实验检测小鼠黑质酪氨酸羟化酶(TH)的表达,用RT-PCR和免疫印迹实验分别检测小鼠黑质源性神经营养因子(BDNF) mRNA与蛋白的表达。**结果** 与NS组比较,ED组、PD组小鼠在滚轴实验中的旋转次数下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),黑质TH表达减少( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),黑质BDNF的mRNA( $P$ 均 $<0.01$ )和蛋白( $P$ 均 $<0.05$ )表达降低;与PD组比较,ED组小鼠在滚轴实验中的旋转次数增加( $P<0.05$ ),黑质TH表达增加( $P<0.05$ ),黑质BDNF的mRNA( $P<0.01$ )和蛋白( $P<0.05$ )表达升高。**结论** 依达拉奉可增加C57BL/6J PD模型小鼠黑质区BDNF的mRNA及蛋白表达,降低MPTP对小鼠黑质的损伤,对多巴胺能神经元有保护作用。

**[关键词]** 依达拉奉;帕金森病;MPTP中毒;多巴胺;脑源性神经营养因子**[中图分类号]** R 742.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)08-0864-04

### Neuroprotective effects of edaravone on dopaminergic neurons in Parkinson's mice

YUAN Zhen-yun\*, JIANG Xiang-ming, YANG Fang, GU Ping, WANG Ming-wei, SU Guan-li, LI Bin, WANG Yan-xia  
First Hospital of Hebei Medical University, Brain Aging and Cognitive Neuroscience Laboratory of Hebei Province, Shijiazhuang 050031, Hebei, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the neuroprotective effects of edaravone in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-C57BL/6J-Parkinson's disease (PD) model mice and the related mechanisms. **Methods** Totally 90 male C57BL/6J mice were evenly randomized into edaravone (ED) group, PD model group and normal saline (NS) group. Subcutaneous injection of MPTP was used to make PD model, and ED group was then administered with ED(3 mg/kg). Rotarod number was detected by rotarod test. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive (TH-ir) neurons expression in the substantia nigra (SN) of mice was observed by immunohistochemistry staining. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein expression in the SN of mice were tested by RT-PCR and Western blotting analysis, respectively. **Results** Compared with NS group, rotarod numbers in ED and PD groups were significantly less ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), the number of TH-ir neurons in SN was significantly reduced ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and BDNF mRNA (all  $P<0.01$ ) and protein (all  $P<0.05$ ) expression was significantly decreased. Compared with PD mice, rotarod number in ED mice was significantly more ( $P<0.05$ ), the number of TH-ir neurons in the SN was significantly increased ( $P<0.05$ ), and BDNF mRNA ( $P<0.01$ ) and protein ( $P<0.05$ ) expression was significantly enhanced. **Conclusion** ED can increase the expression of BDNF mRNA and protein in the SN of C57BL/6J-PD model mice, alleviate MPTP damage, and has a protection effect on dopaminergic neurons.

**[Key words]** edaravone; Parkinson disease; MPTP poisoning; dopamine; brain-derived neurotrophic factor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(8):864-867]

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是神经系统退行性疾病之一,65岁以上人群的发病率约为1%~3%<sup>[1]</sup>,其典型的病理改变是黑质致密部多巴胺能神经元进行性退化、缺失<sup>[2]</sup>,目前尚缺乏特异性

**[收稿日期]** 2013-02-26 **[接受日期]** 2013-03-18**[基金项目]** 河北省卫生厅课题(20120056),河北省引进留学人员经费资助项目(2011-2013)。Supported by Program of the Health Department of Hebei Province (20120056) and Project for Introduced Scholars who have studied abroad of Hebei Province (2011-2013)。**[作者简介]** 苑振云,博士,主任医师,硕士生导师。

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0311-85917301, E-mail: yuanzy2001@aliyun.com

的治疗方法。氧化应激在PD的发生发展中起着重要作用,针对氧化应激的治疗可以改善PD症状或延缓病情进展<sup>[3]</sup>。

依达拉奉(edaravone,3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮)是一种广泛用于脑卒中患者的氧自由基清除剂<sup>[4-5]</sup>,它可以通过抗氧化应激和调控凋亡抑制细胞死亡,从而发挥神经保护作用。目前,依达拉奉在PD治疗中的作用已有少许报道。本研究通过应用依达拉奉对PD模型小鼠进行治疗,观察小鼠黑质脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)表达的改变,探讨依达拉奉对PD模型小鼠的脑保护机制。

## 1 材料和方法

1.1 动物分组及处理 选用90只10~12周龄、体质量19~20g清洁级健康成年雄性C57BL/6J小鼠[由河北医科大学动物中心提供;生产许可证号:SCXK(冀)2008-1-003,使用许可证号:SYXK(冀)2008-0026],自由进食饮水,室温20~22℃,人工昼夜节律(光照与黑暗时间为12h:12h)。采用完全随机方法将动物分为3组:依达拉奉组(ED组)、PD模型组(PD组)、生理盐水对照组(NS组),每组30只。ED组与PD组小鼠颈部皮下注射MPTP(用生理盐水溶解,终浓度为1g/L),每次15mg/kg,连续注射4次,每次间隔2h,建立急性PD小鼠模型。NS组在相同时间点以相同方式注射等容量的生理盐水。成功建模24h后,ED组给予依达拉奉注射液(3mg/kg)腹腔注射,每日1次,连续2周,PD组及NS组给予注射等剂量的生理盐水。

1.2 滚轴实验(rotarod实验)检测小鼠的旋转次数 依达拉奉治疗后第2天,使用JXDP-1型小动物疲劳仪测试小鼠的旋转行为表现。测试时将小鼠置于20r/min、直径2.5cm的旋转杆上,每次同时测定5只小鼠,每个隔室中1只,测试小鼠从旋转杆开始旋转到离开旋转杆所旋转的圈数,测定时间为5min,每次检测间隔5min,连续测5次取平均值。

1.3 免疫组织化学染色检测小鼠黑质酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)的表达 在滚轴实验24h后,ED、PD、NS组各取10只小鼠,取鼠脑并将鼠脑固定。24h后将固定好的组织块常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、连续切片。将切片常规脱蜡至水,0.3%过氧化氢室温下孵育20min,0.1mol/L枸橼酸缓冲液(pH 6.0)微波炉内修复,10%

山羊血清37℃温箱湿盒内孵育30min,加入一抗(兔抗TH多克隆抗体,1:5000;美国Chemicon公司生产),4℃过夜。滴加二抗工作液,37℃温箱湿盒内孵育30min。滴加HRP标记链霉卵白素工作液,37℃温箱湿盒内孵育30min。DAB显色2~5min。用自来水充分冲洗,终止显色。封片。用JD801图像采集及图像分析系统对各组切片进行观察,选取3个相同的黑质致密部切面,100倍光镜下计数一侧TH免疫反应阳性(TH-ir)细胞数,并计算一个切面的平均值。

1.4 RT-PCR检测小鼠黑质BDNF mRNA的表达 在滚轴实验24h后,ED、PD、NS组各取10只小鼠,取出脑组织并分离出黑质,用TRIzol法提取总RNA,合成cDNA。 $\beta$ -actin上游引物:5'-TCA GGA GGA GCA ATG ATC TTG-3',下游引物:5'-TCC TCC CTG GAG AAG AGC TA-3',扩增片段长度302bp。BDNF上游引物:5'-TCG CTT CAT CTT AGG AGT-3',下游引物:5'-TCA ACA TAA ACC ACC AAC-3',扩增片段长度445bp。循环参数:94℃预变性2min进入循环,94℃变性45s,55℃退火45s,72℃延伸1min,经30个循环扩增后72℃延伸5min。BDNF和 $\beta$ -actin的PCR反应产物进行15g/L琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析系统进行图像分析,计算二者的比值作为BDNF mRNA蛋白的相对表达量。

1.5 免疫印迹分析检测小鼠黑质BDNF蛋白的表达 在滚轴实验24h后,ED、PD、NS组各取剩余10只小鼠,取出脑组织并分离出黑质。提取组织总蛋白,分离蛋白质。转膜,结合兔源BDNF多克隆抗体(美国Chemicon公司生产)。采用Quantity One软件进行条带光密度分析,以 $\beta$ -actin光密度值为内对照,BDNF/ $\beta$ -actin值作为BDNF蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SAS 8.1软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两组间比较采用SNK检验。检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 滚轴实验结果 NS组、ED组和PD组小鼠停留于滚轴上的旋转次数分别为(93.4±5.9)次、(81.8±3.1)次和(72.2±5.6)次。与NS组比较,ED组、PD组小鼠停留于滚轴上的旋转次数下降(ED组: $P<0.05$ ,PD组: $P<0.01$ );与PD组比较,ED组小鼠

停留于滚轴上的旋转次数增加 ( $P < 0.05$ )。

2.2 小鼠黑质 TH 免疫组织化学染色结果 TH 阳性染色表现为细胞质和突起呈棕黄色。NS 组黑质区 TH-ir 细胞密集,着色深,突起较长,胞体较大。与 NS 组比较,PD 组黑质区 TH-ir 细胞数量减少 ( $98.16 \pm 9.12$  vs  $48.58 \pm 5.76$ ,  $P < 0.01$ ),减少比例为 51%,胞质着色浅,分布稀疏。与 PD 组比较,ED 组黑质区 TH-ir 细胞胞质着色较深,分布较密集,细胞计数较 PD 组增加 ( $68.97 \pm 4.31$  vs  $48.58 \pm 5.76$ ,  $P < 0.05$ ),但少于 NS 组 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

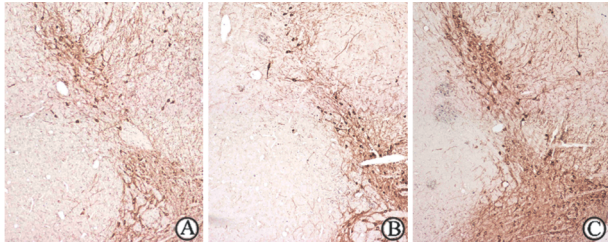


图 1 3 组小鼠黑质 TH-ir 细胞的表达

Fig 1 Expression of tyrosine hydroxylase-immunoreactive (TH-ir) cells in substantia nigra of mice in three groups

A: ED (edaravone) group; B: PD (Parkinson's disease) group; C: NS (normal saline) group. Immunohistochemistry staining. Original magnification:  $\times 100$

2.3 小鼠黑质 BDNF mRNA 表达 NS 组、ED 组和 PD 组小鼠黑质 BDNF mRNA 表达量分别为  $0.874 \pm 0.052$ 、 $0.697 \pm 0.064$  和  $0.534 \pm 0.067$ 。与 NS 组比较,ED 组、PD 组小鼠黑质 BDNF mRNA 的表达降低 ( $P$  均  $< 0.01$ );与 PD 组比较,ED 组小鼠黑质 BDNF mRNA 表达升高 ( $P < 0.01$ )。见图 2。

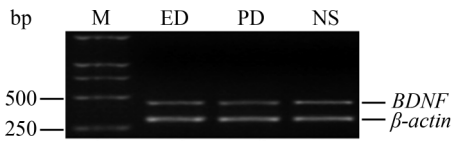


图 2 3 组小鼠黑质 BDNF mRNA 的表达

Fig 2 Expression of BDNF mRNA

in substantia nigra of mice in three groups

M: Marker; ED: Edaravone; PD: Parkinson's disease; NS: Normal saline; BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

2.4 小鼠黑质 BDNF 蛋白表达 NS 组、ED 组和 PD 组小鼠黑质 BDNF 蛋白的表达量分别为  $0.877 \pm 0.049$ 、 $0.804 \pm 0.062$  和  $0.686 \pm 0.057$ 。与 NS 组比较,ED 组、PD 组小鼠黑质 BDNF 蛋白的表达降低 ( $P$  均  $< 0.05$ );与 PD 组比较,ED 组小鼠黑质 BDNF 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

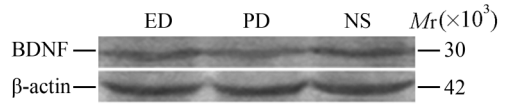


图 3 3 组小鼠黑质 BDNF 蛋白的表达

Fig 3 Expression of BDNF protein

in substantia nigra of mice in three groups

ED: Edaravone; PD: Parkinson's disease; NS: Normal saline; BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

### 3 讨论

PD 的发病机制和病因至今仍不十分清楚,目前治疗 PD 的主要药物仍然为左旋多巴类药物,但治疗后多巴胺 (DA) 氧化应激产物蓄积常引起症状波动,抗氧化治疗已成为近年 PD 治疗的研究热点。依达拉奉作为一种新的氧自由基清除剂,已用于治疗脑血管病<sup>[6]</sup>、脑创伤<sup>[7]</sup>、扩张型心肌病<sup>[8]</sup>等方面。另有研究表明依达拉奉能够保护黑质多巴胺能神经元,其潜在机制可能与其抗凋亡、抗氧化应激和抗炎作用有关<sup>[9]</sup>。但依达拉奉对黑质 BDNF 的影响未见报道。

PD 患者的运动障碍表现为运动协调能力降低,在本实验中,用滚轴实验作为测定动物协调运动能力的指标。该实验需要动物在旋转杆上保持平衡并连续运动,是被广泛采用的检测运动协调性的实验方法<sup>[10]</sup>。结果显示:与 NS 组比较,ED 组、PD 组小鼠停留于滚轴上的旋转次数下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );而 ED 组小鼠停留于滚轴上的旋转次数较 PD 组增加 ( $P < 0.05$ )。结果表明 ED 组、PD 组小鼠的协调能力下降,但 ED 组的协调能力优于 PD 组,间接说明了依达拉奉的神经保护作用。

本研究探讨了依达拉奉对黑质多巴胺能神经元的保护作用。TH 是催化酪氨酸合成多巴胺的限速酶,在黑质多巴胺能神经元中含量丰富,是脑内多巴胺能神经元的标志。黑质区其他神经元缺乏 TH,故 TH-ir 神经元即多巴胺能神经元<sup>[11-12]</sup>。本研究用 C57BL/6J 小鼠给予皮下注射 MPTP 复制 PD 模型,对比了 ED 组、PD 组、NS 组 TH-ir 神经元数量和形态的变化。实验结果显示,NS 组黑质区 TH-ir 细胞密集,着色深,突起较长,胞体较大;与 NS 组比较,PD 组黑质区 TH-ir 细胞数量减少 ( $P < 0.01$ ),减少比例为 51%,胞质着色浅,分布稀疏。与 PD 组比较,ED 组黑质区 TH-ir 细胞胞质着色较深,分布较密集,细胞计数较 PD 组增加 ( $P < 0.05$ ),但少于 NS 组 ( $P <$

0.05)。说明用 C57BL/6J 小鼠皮下注射 MPTP 成功复制了 PD 模型,并进一步证实了依达拉奉能够保护多巴胺能神经元,降低 MPTP 所致的神经损伤。

关于 PD 的病因及发病机制近年来提出了神经营养因子(NTF)缺乏假说,认为各种神经营养因子的缺乏可能是黑质神经元退变的原因<sup>[13]</sup>。BDNF 能促进啮齿类动物受损多巴胺能神经元的存活,BDNF 缺乏在 PD 发生中起重要作用<sup>[14]</sup>。本研究表明,与 NS 组比较,ED 组、PD 组小鼠黑质 BDNF mRNA( $P$  均 $<0.01$ )及蛋白( $P$  均 $<0.05$ )的表达降低;而 ED 组小鼠黑质 BDNF mRNA( $P<0.01$ )及蛋白( $P<0.05$ )的表达高于 PD 组。这说明依达拉奉能够上调黑质 BDNF 的表达,从而对多巴胺能神经元有保护作用。本实验室前期的报道也证明上调 BDNF 的表达可以保护黑质多巴胺能神经元<sup>[15]</sup>。

本实验证实了依达拉奉可上调黑质 BDNF 表达,对中脑黑质多巴胺能神经元具有较好的保护作用,可为临床上应用依达拉奉治疗 PD 提供依据。但依达拉奉能否上调其他神经营养因子,有待进一步研究。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Pan-Montojo F, Anichtchik O, Dening Y, Knels L, Pursche S, Jung R, et al. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice[J]. PLoS One, 2010, 5: e8762.

[2] Perfeito R, Cunha-Oliveira T, Rego A C. Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease — resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53: 1791-1806.

[3] Koppula S, Kumar H, More S V, Kim B W, Kim I S, Choi D K. Recent advances on the neuroprotective potential of antioxidants in experimental models of Parkinson's disease[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13: 10608-10629.

[4] Feng S, Yang Q, Liu M, Li W, Yuan W, Zhang S, et al. Edaravone for acute ischaemic stroke[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011(12): CD007230.

[5] Lu F, Nakamura T, Toyoshima T, Liu Y, Hirooka K, Kawai N, et al. Edaravone, a free radical scavenger, attenuates behavioral deficits following transient forebrain ischemia by inhibiting oxidative damage in gerbils[J]. Neurosci Lett, 2012, 506: 28-32.

[6] Ahmad A, Khan M M, Javed H, Raza S S, Ishrat T, Khan M B, et al. Edaravone ameliorates oxidative stress associated cholinergic dysfunction and limits apoptotic response following focal cerebral ischemia in rat[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 367(1-2): 215-225.

[7] Yamashita S, Hasuo H, Tokutomi T, Shigemori M, Akasu T. Edaravone attenuates impairment of synaptic plasticity in granule cell layer of the dentate gyrus following traumatic brain injury[J]. Kurume Med J, 2011, 58: 47-58.

[8] Arumugam S, Thandavarayan R A, Veeraveedu P T, Nakamura T, Arozal W, Sari F R, et al. Beneficial effects of edaravone, a novel antioxidant, in rats with dilated cardiomyopathy[J]. J Cell Mol Med, 2012, 16: 2176-2185.

[9] Yuan W J, Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Agari T, Kameda M, et al. Neuroprotective effects of edaravone-administration on 6-OHDA-treated dopaminergic neurons[J]. BMC Neurosci, 2008, 9: 75.

[10] Hutter-Saunders J A, Gendelman H E, Mosley R L. Murine motor and behavior functional evaluations for acute 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) intoxication[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2012, 7: 279-288.

[11] Dowd E, Monville C, Torres E M, Wong L F, Azzouz M, Mazarakis N D, et al. Lentivector-mediated delivery of GDNF protects complex motor functions relevant to human Parkinsonism in a rat lesion model[J]. Eur J Neurosci, 2005, 22: 2587-2595.

[12] Ahn T B, Kim J M, Kwon K M, Lee S H, Jeon B S. Survival and migration of transplanted neural stem cell-derived dopamine cells in the brain of parkinsonian rat[J]. Int J Neurosci, 2004, 114: 575-585.

[13] Youdim M B, Maruyama W, Naoi M. Neuropharmacological, neuroprotective and amyloid precursor processing properties of selective MAO-B inhibitor antiparkinsonian drug, rasagiline[J]. Drugs Today (Barc), 2005, 41: 369-391.

[14] Chen C M, Chen I C, Chang K H, Chen Y C, Lyu R K, Liu Y T, et al. Nuclear receptor NR4A2 IVS6 +18insG and brain derived neurotrophic factor (BDNF) V66M polymorphisms and risk of Taiwanese Parkinson's disease[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2007, 144B: 458-462.

[15] 苑振云, 王铭维, 顾平, 崔冬生, 王彦永, 耿媛. 丰富环境对 MPTP 致快速老化小鼠脑损伤的干预效应[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31: 1179-1183.

Yuan Z Y, Wang M W, Gu P, Cui D S, Wang Y Y, Geng Y. Intervention effects of enriched environment on brain damage of MPTP-induced senescence-accelerated prone mice[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31: 1179-1183.