·论　　著·

绿茶多酚对帕金森病小鼠多巴胺能神经元保护作用研究*

陈　敏[1]，黄雪芳[2]，叶　俊[3]，于　兰[1]，刘承伟[1△]

（1.桂林医学院人体解剖学教研室，广西桂林 541004；2.广西壮族自治区桂林市南溪山医院药剂科　541002；3 桂林医学院附属医院急诊科，广西桂林 541001）

摘　要：目的　探索绿茶多酚（GTPs）对神经毒素 1-甲基-4-苯基－1，2，3，6-四氢吡啶（MPTP）诱导的帕金森病（PD）小鼠黑质多巴胺能神经元预防性保护作用及机制。**方法**　采用 C57BL/6J 小鼠共 60 只，分为空白对照组、预防组、MPTP 组和治疗组（n=15）。MPTP 组以 MPTP 腹腔注射 7 d（30 mg·kg^{-1}·d^{-1}）；预防组同以上述剂量注射 MPTP 前 3 个月开始 GTPs 干预至 MPTP 处理后 3 个月；治疗组以相同 MPTP 处理后开始 GTPs 干预 3 个月；空白对照组：腹腔注射同体积的生理盐水，连续 7 d，饮水中未加入 GTPs，余处理方法及时长同治疗组。免疫组织化学法观察黑质多巴胺能神经元计数，比色法观察中脑超氧化物歧化酶（SOD）和丙二醛（MDA）反映氧化应激水平。**结果**　预防组、MPTP 组和治疗组黑质多巴胺能神经元数量显著减少（P<0.05），氧化应激水平明显升高（P<0.05）。**结论**　预防性使用 GTPs 对 PD 小鼠的多巴胺能神经元具有高于治疗的保护作用，其机制可能为预先增强抗氧化应激能力，提高发生病理改变的阈值。

关键词：帕金森病；绿茶多酚；预防保护；多巴胺能神经元；氧化应激

doi：10.3969/j.issn.1671-8348.2013.07.001　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1671-8348（2013）07-0721-03

Protective effect of green tea polyphenols on substantia nigra dopaminergic neurons of MPTP induced Parkinson′s disease mice*

Chen Min[1]，*Huang Xuefang*[2]，*Ye Jun*[3]，*Yu Lan*[1]，*Liu Chengwei*[1△]

（1. *Department of Human Anatomy*，*Guilin Medical College*，*Guilin*，*Guangxi*，541004，*China*；

2. *Department of Pharmacy*，*Nanxishan Hospital*，*Guilin*，*Guangxi* 541002，*China*；

3. *Department of Emergency*，*Affiliated Hospital*，*Guilin Medical College*，*Guilin*，*Guangxi* 541001，*China*）

Abstract：Objective　To investigate the preventive protection effect of green tea polyphenols（GTPs）on substantia nigra dopaminergic neurons in 1-methyl-1-4-phenyl-1，2，3，6-tetrahydropyridine（MPTP）induced Parkinson′s disease mice and its mechanism. **Methods**　C57BL/6J mice（n=60）were divided into the blank control group，prevention group，MPTP group and treatment group equally. The MPTP group was given with MPTP by intraperitoneal injection for 7 d（30 mg·kg^{-1}·d^{-1}）. The prevention group began GTPs intervention at 3 months before injection of MPTP with above dose until 3 months after MPTP treatment. The treatment group began GTPs intervention for 3 months after the same MPTP treatment. The blank control group was intraperitoneally injected with the same volume of normal saline for continuous 7 d without adding GTPs to drinking water，the other treatment measures and duration were same to the treatment group. The immunohistochemical was adopted for detecting the number of substantia nigra dopaminergic neurons. Superoxide dismutase（SOD）and malonaldehyde（MDA）in midbrain were determined by colorimetry，which reflecting the oxidative stress level. **Results**　The number of substantia nigra dopaminergic neurons in the prevention group，MPTP group and treatment group was significantly decreased（P<0.05），and the oxidative stress level was obviously increased（P<0.05）. **Conclusion**　Preventive use of GTPs has the protective role on the dopaminergic neurons of Parkinson′s disease mice，which is higher than treatment. The possible mechanisms are to enhance the antioxidant stress ability in advance and increase the threshold value of pathological change.

Key words：Parkinson′s disease；green tea polyphenols；prevention and protection；dopaminergic neurons；oxidative stress

帕金森病（Parkinson′s disease，PD）是中老年常见的神经系统退行性疾病，其复杂的病因和发病机制至今尚未阐明，更无有效的治疗手段，在早期如何通过一系列的干预手段预防或延缓 PD 的发生、发展具有重大意义[1-2]。目前倾向于认为氧化应激水平的提高是 PD 重要的病理生理机制之一[3-5]。绿茶多酚（green tea polyphenols，GTPs）是一种抗氧化剂，GTPs 是绿茶中所提取的多酚类化合物，含丰富的儿茶素，其中以表没食子儿茶素没食子酸酯（epigallocatechin-3-gallate，EGCG）含量最多，占儿茶素含量的 50%～60%，被认为是 GTPs 的主要活性物质，具有抗氧化、清除自由基的积极作用[6-7]，在许多神经变性疾病中如阿尔茨海默病（Alzheimer′s disease，AD）显示出神经保护作用[8-10]。本研究以神经毒素 1-甲基-4-苯基-1，2，

*　**基金项目：**广西自然科学基金资助项目（2012GXNSFBA053110）；广西科学研究与技术开发项目（10124002B-58）；广西卫生医疗重点科研项目（重 2011012）；广西高等学校一般资助科研项目（201203YB115）；广西高等学校立项科研项目（201204LX253）；桂林市科学研究与技术开发项目（20100511）。　**作者简介：**陈敏（1979～），讲师，硕士，主要从事帕金森病早期标志物研究。　△　**通讯作者**，Tel：1367736890；E-mail：chengweiliu@163.com。

3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride,MPTP)注射 C57BL/6J 小鼠建立 PD 模型,研究 GTPs 是否存在对 PD 多巴胺能神经元的保护和修复作用并进一步探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 C57BL/6J 小鼠,SPF 级,6～8 周龄,60 只,体质量 20～25 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证编号:SCXK(京)2009-0004;饲养条件:桂林医学院 SPF 级实验动物饲养室,许可证号:SYXK 桂 2007-0001。饲以实验动物中心提供的饲料(成分为大米粉、玉米粉、鱼粉等)。自由摄食、饮水,适应环境 1 周后进行实验。实验室温度 25～28 ℃,通风、自然采光。

1.2 主要试剂 GTPs 由浙江东方茶业科技有限公司提供,生产批号为 20070518,GTPs 纯度 100%,其中 EGCG 含量为 70.75%。MPTP 购自 Sigma 公司。兔酪氨酸羟化酶抗体(TH)由 Bioworld 公司提供,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)和脂质过氧化物丙二醛(malondialdehyde,MDA)试剂盒均购自南京建成公司。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 动物分组 实验动物随机分成预防组、MPTP 组、治疗组和空白对照组各 15 只。MPTP 组:每天上午腹腔注射 MPTP 30 mg/kg 体质量,每天 1 次,连续 7 d;GTPs 干预方式为在小鼠饮水中掺入 GTPs,含量为 0.1%(W/V)。预防组:注射 MPTP 前 3 个月开始 GTPs 干预至 MPTP 处理后 3 个月。治疗组:MPTP 处理后开始 GTPs 干预 3 个月。空白对照组:腹腔注射同体积的生理盐水,连续 7 d,饮水中未加入 GTPs,余处理方法及时长同治疗组。

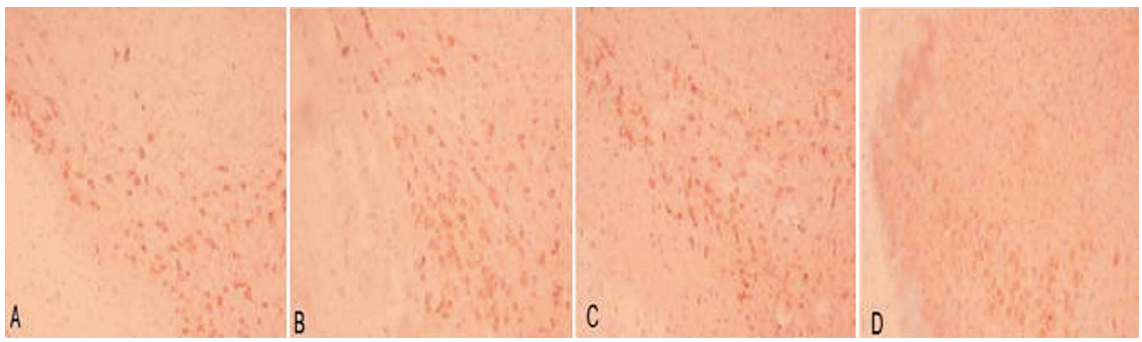
1.4 黑质多巴胺能神经元计数 各组动物按分组处理方式结束后 5 d 各取 7 只进行免疫组织化学方法测定黑质多巴胺能神经元数目。麻醉动物后以 4%多聚甲醛经心灌注,断头取脑后固定,常规脱水,石蜡包埋,连续冠状切片(片厚 4 μm)后行 TH 染色:二甲苯梯度脱蜡,无水乙醇,95%乙醇,蒸馏水进行水化处理,0.01 M 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution,PBS)洗 3 次;切片甩干,用免疫组织化学专用油笔在脑切片周围画圈;3%过氧化氢室温孵育 30 min;0.01 M PBS 洗 3 次;加封闭液室温 20 min;加 TH(1∶200)4 ℃过夜;0.01 M PBS 洗 3 次;加二抗(1∶200)室温,2 h 孵育;0.01 M PBS 洗 3 次;加链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶(1∶100),室温 1 h。DAB 液显色 3～10 min;PBS 终止反应;苏木素复染 5 min;梯度乙醇脱水,中性树脂封片。

1.5 SOD 和 MDA 含量测定 4 组动物按分组处理方式结束后 5 d 各取 8 只进行 SOD 和 MDA 含量测定。小鼠迅速断头取脑,冰上分离中脑腹侧组织,吸干称重后置于匀浆器内充分匀浆,低温 14 000 r/min 离心 30 min,参照试剂盒说明书分别测定氧化应激标志物 SOD 和过氧化物 MDA 含量。

1.6 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计学数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差齐性检验、t 检验和 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 黑质多巴胺能神经元计数 空白对照组、预防组、治疗组及 MPTP 组 TH 阳性细胞计数结果分别为(249.0±32.70)、(214.0±26.50)、(198.0±30.90)和(156.0±28.20)个/视野。预防组、治疗组及 MPTP 组与空白对照组比较,TH 阳性细胞明显减少($P<0.05$),见图 1。预防组、治疗组、MPTP 组减少率依次增高($P<0.05$),见图 2。



A:预防组;B:治疗组;C:空白对照组;D:MPTP 组。

图 1 小鼠脑组织黑质 TH 阳性细胞(免疫组织化学染色,×100)

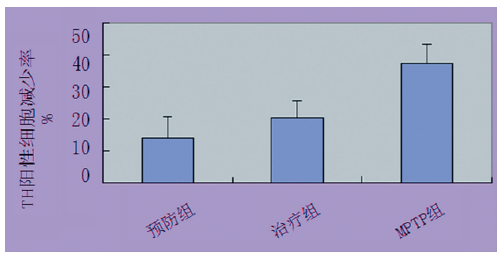


图 2 TH 阳性细胞减少率

2.2 SOD 和 MDA 含量测定结果 MPTP 组、预防组和治疗组 SOD 含量均较空白对照组降低,而 MDA 含量则相反,4 组 SOD 和 MDA 变化的幅度比较差异有统计学意义,见表 1 和图 3。

表 1 4 组 SOD 和 MDA 含量测定结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)
空白对照组	15	80.00±9.12	0.92±0.27
预防组	15	71.00±7.85*	1.26±0.28*
治疗组	15	62.00±7.43*	1.53±0.29*
MPTP 组	15	51.00±8.81*	1.74±0.35*

*:$P<0.05$,与空白对照组比较。

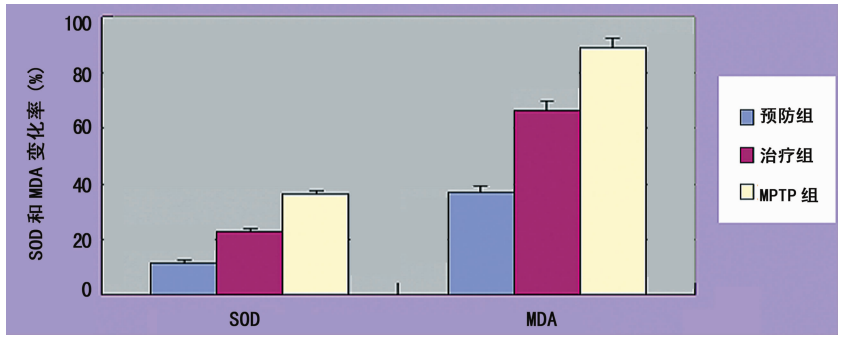


图 3　SOD 和 MDA 变化率

3 讨　论

本研究以 MPTP 诱导 C57BL/6J 小鼠建立 PD 模型[11]，并用 GTPs 进行干预，发现 GTPs 能够减轻 MPTP 造成的黑质多巴胺神经元的丢失，降低 SOD 及提高 MDA 含量和活性，增加抗氧化能力，尤其是在造模前使用 GTPs 干预的预防组各个指标均优于 GTPs 后处理的治疗组。

PD 是与衰老密切相关的神经系统退行性疾病，其特征性病理变化为黑质多巴胺能神经元的大量变性，缺失达到 60%～80%含量时就会出现典型的运动症状[12]。本实验应用 GTPs 干预后证实，GTPs 能够减少多巴胺能神经元的缺失，起到保护作用，而在损伤前进行预防性用药则能达到更佳效果。PD 发病机制至今不甚明了，但是，随年龄增长同时升高的氧化应激含量已为大多数学者所关注和认同[13]。SOD 和 MDA 等抗氧化指标的测定是研究氧化应激含量的常用手段。GTPs 的重要活性成分是 EGCG，后者主要以原型存在于血液和靶器官中，且能够通过血脑屏障渗入神经系统[14]，成为其发挥神经保护作用的前提。预防性使用 GTPs，将整体内环境包括神经系统在内的抗氧化能力和清除自由基的功能在病变之前先提升到更高水平[15]，同时促进内源性抗氧化酶如 SOD 的生成，从而提高发生病理改变的阈值，在同等的致病条件下能降低被损伤程度和范围，最大限度地保护包括黑质多巴胺能神经元在内的神经系统，其效果远远大于病变之后的治疗性用药的神经修复作用。GPTs 通过抗氧化、抗炎等广泛的生物活性途径起到神经保护作用，作为防治 PD 和其他神经系统退行性疾病的潜在性药物，具有良好的应用前景。

参考文献：

[1] Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, et al. Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson′s disease: an 8-year prospective study[J]. Arch Neurol, 2003, 60(3): 387-392.

[2] Poewe W. Treatments for Parkinson′s disease——past achievements and current clinical needs[J]. Neurology, 2009, 72(7): 65-73.

[3] Chen WQ, Zhao XL, Hou Y, et al. Protective effects of green tea polyphenols on cognitive impairments induced by psychological stress in rats[J]. Behav Brain Res, 2009, 202(1): 71-76.

[4] Avila I, Reilly MP, Sanabria F, et al. Modeling operant behavior in the Parkinsonian rat[J]. Behav Brain Res, 2009, 198(2): 298-305.

[5] Sanyal J, Bandyopadhyay SK, Banerjee TK, et al. Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson′s disease[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2009, 13(2): 129-132.

[6] Guo Q, Zhao B, Li M, et al. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1304(3): 210-222.

[7] Nanjo F, Goto K, Seto R, et al. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical[J]. Free Radic Biol Med, 1996, 21(6): 895-902.

[8] Mandel SA, Amit T, Kalfon L, et al. Targeting multiple neurodegenerative diseases etiologies with multimodal-acting green tea catechins[J]. J Nutr, 2008, 138(8): 1578-1583.

[9] Rezai-Zadeh K, Arendash GW, Hou H, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice[J]. Brain Res, 2008, 1214: 177-187.

[10] Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, et al. Green tea catechins preventcognitive deficits caused by Abeta1-40 in rats[J]. J Nutr Biochem, 2008, 19(9): 619-626.

[11] Petroske E, Meredith GE, Callen S, et al. Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP probenecid treatment[J]. Neuroscience, 2001, 106(3): 589-601.

[12] Olanow CW, Stern MB, Sethi K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson′s disease(2009)[J]. Neurology, 2009, 72(21 Supple 4): S131-S136.

[13] Raut A, Ratk A. Oxidative damage and sensitivity to nociceptive stimulus and opioids in aging rats[J]. Neurobiol Aging, 2009, 30(6): 910-919.

[14] Abd EI, Mohsen MM, Kuhnle G, et al. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33(12): 1693-1702.

[15] Ounjaijean S, Thephinlap C, Khansuwan U, et al. Effect of green tea on iron status and oxidative stress in iron-loaded rats[J]. Med Chem, 2008, 4(4): 365-370.

（收稿日期：2012-06-08　修回日期：2012-09-29）