

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.32.010

辛伐他汀对帕金森病大鼠的治疗作用及其作用机制

陈冬, 欧阳存, 张淑琴, 邓立军, 胡昉
(江汉大学附属武汉市第六医院神经内科 430015)

[摘要] **目的** 探讨辛伐他汀对帕金森病(PD)大鼠的治疗作用及其作用机制。**方法** 选取 SD 雄性成年大鼠 54 只,分为对照组、模型组、治疗组,每组 18 只。模型组和治疗组采用脂多糖诱导法建立 PD 大鼠模型,治疗组分别于造模前 1 h 及造模后腹腔注射辛伐他汀 5 mg/kg,连续 14 d;模型组和对照组给予等量生理盐水腹腔注射;比较 3 组大鼠对侧旋转圈数,采用 ELISA 检测各组大鼠血清 C 反应蛋白(CRP)、肿瘤细胞坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)水平,Western blot 检测各组大鼠黑质区一氧化氮合酶(iNOS)的表达,免疫组化检测法分析各组大鼠黑质区脑源性神经营养因子(BDNF)及其受体(TrKB)、神经肽 Y(NPY)的表达情况。**结果** 模型组和治疗组大鼠的旋转圈数明显多于对照组($P<0.05$),治疗组明显小于模型组($P<0.05$);模型组和治疗组大鼠的血清 CRP、TNF- α 、IL-6 水平及黑质区 iNOS 表达强度明显高于对照组($P<0.05$),治疗组明显低于模型组($P<0.05$);模型组和治疗组大鼠的黑质区 BDNF、TrKB、NPY 表达强度低于对照组($P<0.05$),治疗组明显高于模型组($P<0.05$)。**结论** 辛伐他汀能明显降低 PD 大鼠的炎症反应水平,提高 BDNF、TrKB、NPY 的活性及降低 iNOS 表达,达到治疗 PD 大鼠的效果。

[关键词] 辛伐他汀;帕金森病;作用机制**[中图分类号]** R742.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)32-4123-03**Therapeutic effect of simvastatin on Parkinson's disease rats and its mechanism**

CHEN Dong, OUYANG Cun, ZHANG Shuqin, DENG Lijun, HU Fang

(Department of Neurology, the Sixth Hospital of Wuhan Affiliated Jiangnan University, Wuhan, Hubei 430015, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effect and mechanism of simvastatin on Parkinson's disease (PD) in rats. **Methods** A total of 54 male SD rats were divided into the control group, the model group and the experimental group, with 18 rats in each group, the model group and the experimental group used lipopolysaccharide to establish the rat model of PD. In the experimental group, simvastatin (5 mg/kg) was intraperitoneally injected for 1 h before modeling and after modeling keeping 14 days. The model group and the control group received normal saline intraperitoneal injection; contralateral rotations were compared, C-reactive protein (CRP), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were detected by ELISA, the expressions of nitric oxide synthase (iNOS) in the substantia nigra of rats was detected by Western blot, the expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor (TrKB) and neuropeptide Y (NPY) in the substantia nigra of rats were analyzed by immunohistochemistry. **Results** The number of rotations, the levels of CRP, TNF- α and IL-6, the expression of iNOS in the model group and the experimental group were more than those in the control group ($P<0.05$), and those in the experimental group was less than the model group ($P<0.05$); the expressions of BDNF, TrKB and NPY in the model group and the experimental group were less than those in the control group ($P<0.05$), and those in the experimental group was more than the model group ($P<0.05$). **Conclusion** Simvastatin can significantly reduce the inflammatory response, increase the activity of BDNF, TrKB and NPY decrease the expression of iNOS, and achieve the effect of treating PD rats.

[Key words] simvastatin; parkinson disease; mechanism of action

帕金森病(parkinson disease, PD)主要是因中脑黑质区多巴胺能神经元进行性丢失而诱发的中枢神经系统退行性疾病。但现阶段 PD 的发病机制尚不明晰^[1]。多巴胺受体激动剂替代疗法是现阶段治疗 PD 的重要方法,虽可在一定程度上缓解 PD 临床症状,但

无法阻止 PD 病程的进展^[2]。此外,该类药物的长期应用还可诱发多种不良反应。以辛伐他汀为代表的他汀类药物是高脂血症临床治疗的重要药物,具有抗氧化、改善内皮功能、抗增生、抗炎、抗凝和稳定斑块等多种作用^[3],可透过血脑屏障,在临床上被广泛用

于降低血浆胆固醇水平。最新的流行病学研究发现,辛伐他汀可通过神经保护效应发挥治疗神经变性疾病的作用^[4]。然而,关于辛伐他汀对神经退行性疾病的影响和机制还未被完全阐明。本研究旨在探讨辛伐他汀对 PD 大鼠的治疗作用及其作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)实验动物:选取 SD 雄性成年大鼠 54 只,体质量 220~250 g,平均(234.1±8.2)g,光照间隔时间 12 h、相对湿度 45%~60%、温度 23~25℃、自由进食进水。(2)实验仪器与药品:阿普吗啡、脂多糖(LPS)购于美国 Sigma 公司;C 反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)试剂盒购于南京建成生物研究所;抗离子钙结合蛋白 1 和酪氨酸羟化酶购于美国 R&D 公司;兔抗大鼠多克隆抗体购于南京凯基生物有限公司;大鼠定位仪购于上海高鸽公司;酶标仪购于美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、造模及处理方法 选取 SD 雄性成年大鼠 54 只,采用随机数字表法分为对照组、模型组、治疗组各 18 只,模型组和治疗组采用 LPS 诱导法建立 PD 大鼠模型,大鼠立体定位黑质区 2 μL LPS 注射(5 μg/μL);对照组大鼠黑质区注射等量生理盐水。治疗组分别于造模前 1 h 及造模后每天 17 点腹腔注射辛伐他汀 5 mg/kg,连续 14 d,模型组和对照组给予等量生理盐水腹腔注射^[5]。

1.2.2 观察指标 (1)行为学观察方法:大鼠连续给药 14 d 后,腹腔注射阿普吗啡 0.05 mg/kg,记录大鼠的旋转圈数和方向;以大鼠后右侧肢为支点,毁损对侧开始旋转,5 min 记录 1 次,连续观察 30 min^[6]。(2)Western blot 检测各组大鼠黑质区一氧化氮合酶(iNOS)表达:行为学观察结束第 2 天,大鼠断头处死,冰冻切片机取黑质区,称重后裂解液匀浆并离心取上清液;BCA 试剂盒检测蛋白浓度;蛋白质样品(50 μg)SDS-PAGE 电泳并转至 PVDF 膜,2 h 脱脂奶粉封闭后加入一抗并 4℃过夜;加入二抗后摇床 2 h 孵育,转至 PVDF 膜上 DAB 显色^[7]。(3)ELISA 检测各组大鼠血清 CRP、TNF-α、IL-6 水平:大鼠断头处死,冰冻切片机取黑质区,称重后裂解液匀浆并离心取上清液,检测 CRP、TNF-α、IL-6 水平,实验操作严格按照试剂盒说明书进行。(4)免疫组织化学(IHC)染色:取大鼠黑质区和纹状体,石蜡切片后抗离子钙结合蛋白抗体、胶质纤维酸性蛋白及酪氨酸羟化酶 IHC 染色法检测各组大鼠黑质区脑源性神经营养因子(BDNF)及其受体(TrKB)、神经肽 Y(NPY)的表达,最后结果使用 Image-Pro 图形软件进行分析^[8]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析法,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠行为学观察 对照组、模型组、治疗组大鼠旋转圈数分别为(2.80±1.10)、(154.20±13.80)、(87.60±10.30)圈/分,治疗组和模型组大鼠的旋转圈数明显多于对照组($P < 0.05$),而治疗组的旋转圈数明显少于模型组($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠血清炎症因子水平比较 治疗组和模型组大鼠的血清 CRP、TNF-α、IL-6 明显高于对照组($P < 0.05$),而治疗组的血清 CRP、TNF-α、IL-6 水平明显低于模型组($P < 0.05$);见表 1。

表 1 各组大鼠血清炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s, n=18$)

组别	CRP(mg/L)	TNF-α(pg/mL)	IL-6(pg/mL)
对照组	2.44±0.62	47.30±14.90	23.40±8.60
模型组	4.98±1.75 ^a	95.80±21.70 ^a	62.20±14.30 ^a
治疗组	3.30±0.85 ^{ab}	72.90±18.60 ^{ab}	39.80±10.60 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与模型组比较

2.3 各组大鼠黑质区 iNOS 表达水平比较 对照组、模型组、治疗组大鼠黑质区 iNOS 表达水平分别为(0.22±0.08)、(0.65±0.12)、(0.42±0.10)/NADPG%,治疗组和模型组大鼠的黑质区 iNOS 表达强度明显高于对照组($P < 0.05$),而治疗组的黑质区 iNOS 表达强度水平明显低于模型组($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠黑质区 BDNF、TrKB、NPY 表达水平比较 治疗组和模型组大鼠的黑质区 BDNF、TrKB、NPY 表达强度明显低于对照组($P < 0.05$),而治疗组的黑质区 BDNF、TrKB、NPY 水平明显高于模型组($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠黑质区 BDNF、TrKB、NPY 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=18, OD$)

组别	BDNF	TrKB	NPY
对照组	14.39±1.67	7.44±1.33	5.48±1.62
模型组	8.20±0.96 ^a	4.30±0.97 ^a	3.29±1.04 ^a
治疗组	10.35±1.44 ^{ab}	6.20±1.24 ^{ab}	4.31±1.40 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与模型组比较

3 讨论

PD 是一类神经退行性疾病,临床症状多样,存在认知功能障碍、疲劳症状等非运动症状及部分运动症状。但由于 PD 相关机制尚未明晰,导致现阶段临床缺乏有效的治疗手段。有研究已证实辛伐他汀等他汀类药物可以在改善神经退行性疾病方面发挥显著的治疗作用^[9],但目前对其神经保护作用的具体机制尚不明确。相关研究发现,他汀类药物可经过免疫分子机制降低对神经元的损伤进而改善痴呆的临床表征^[10];张阳等^[11]通过多项临床和基础实验对他汀类药物从分子层面进行了总结,认为其具有抗氧化、抗炎和神经保护等多项功能,进而降低 PD、脑血管病和癫痫等神经性疾病的发病率。本研究通过 LPS 建立大鼠 PD 模型,探讨辛伐他汀对 PD 大鼠的治疗作用

及其作用机制,希望能够为临床 PD 的治疗提供数据参考。本研究结果显示治疗组和模型组大鼠的旋转圈数明显多于对照组 ($P < 0.05$),而治疗组的旋转圈数明显低于模型组 ($P < 0.05$)。该结果从行为学角度研究认为辛伐他汀能明显改善 PD 大鼠的临床表征。

有基础实验发现,黑质多巴胺神经元的退行性病变与 TNF- α 和炎症因子具有密切联系,并认为 TNF- α 与 IL-6 的表达可损伤 DA 神经^[12]。CRP 是机体非特异性免疫机制的一部分,可激活补体的经典途径,增强白细胞的吞噬作用,调节淋巴细胞或单核/巨噬系统功能,促进巨噬细胞组织因子的生成^[13]。本研究发现治疗组和模型组大鼠的血清 CRP、TNF- α 、IL-6 明显高于对照组 ($P < 0.05$),治疗组的血清 CRP、TNF- α 、IL-6 水平明显低于模型组 ($P < 0.05$)。该结果提示辛伐他汀可通过炎症反应水平改善 PD 大鼠的临床症状。

SHALBAY 等^[14]研究发现,AD、PD 等多种疾病和神经系统功能损伤均存在 iNOS 的表达。本研究发现治疗组和模型组大鼠的黑质区 iNOS 表达强度明显高于对照组 ($P < 0.05$),治疗组的黑质区 iNOS 表达强度水平明显低于模型组 ($P < 0.05$)。上述结果提示辛伐他汀可通过对激活的神经胶质细胞介导的氧化应激反应产生抑制作用。治疗组和模型组大鼠的黑质区 BDNF、TrkB、NPY 表达强度明显低于对照组 ($P < 0.05$),但治疗组的黑质区 BDNF、TrkB、NPY 水平明显高于模型组 ($P < 0.05$)。该结果说明辛伐他汀可通过改善 BDNF、TrkB、NPY 的活性达到治疗 PD 大鼠的效果。相关研究发现,TrkB 受体可通过自动磷酸化与配体 BDNF 共价结合激活细胞内信号转导途径;轴突切断后,脊髓内运动神经元可出现 TrkB-BmRNA 表达增加^[15],提示 BDNF 有可能通过其受体 TrkB 受体发挥再生与存活效应。

综上所述,辛伐他汀能明显降低 PD 大鼠的炎症反应水平、改善 BDNF、TrkB、NPY 的活性及降低 iNOS 表达,从而达到治疗 PD 大鼠的效果。

参考文献

[1] 王焱,唐北沙,曹学兵,等.辛伐他汀对脂多糖诱导帕金森病大鼠多巴胺神经元损伤的保护作用[J].中华行为医学与脑科学杂志,2015,24(3):193-197.

[2] 刘俊华,王勇,王颜颜,等.深部脑磁刺激对帕金森病模型大鼠运动症状治疗的安全性评价[J].首都医科大学学

报,2017,38(2):260-267.

- [3] 何国荣,穆鑫,李晓秀,等.百可利对 6-羟多巴胺不同注射位点帕金森病模型大鼠的治疗作用[J].中国药理学通报,2015,18(5):623-629,630.
- [4] 张海龙,李智高,李玉,等.胚胎中脑神经干细胞移植治疗大鼠帕金森病模型[J].广东医学,2016,37(1):49-51.
- [5] 王晓晓,付文玉,庄文欣,等.慢病毒介导核受体相关因子 1 基因修饰骨髓间充质干细胞移植治疗帕金森病模型大鼠[J].解剖学报,2015,46(6):742-749.
- [6] BRAKEDAL B, HAUGARVOLL K, TZOULIS C. Simvastatin is associated with decreased risk of Parkinson disease[J]. Ann Neurol, 2017, 81(2):329-330.
- [7] 潘士锋,臧娇,薛莹,等.骨髓间充质干细胞移植对帕金森病模型大鼠纹状体多巴胺水平的影响[J].畜牧与兽医,2016,48(11):1-4.
- [8] AHMED L A, DARWISH H A, ABDELSALAM R M, et al. Role of Rho kinase inhibition in the protective effect of fasudil and simvastatin against 3-Nitropropionic Acid-Induced striatal neurodegeneration and mitochondrial dysfunction in rats[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(6):3927-3938.
- [9] 梁建庆,何建成,王政.三七皂苷治疗帕金森病大鼠的作用靶标研究[J].中华中医药杂志,2015,18(5):1575-1579.
- [10] ZHANG C, WU J M, LIAO M, et al. The ROCK/GG-Tase pathway are essential to the proliferation and differentiation of neural stem cells mediated by simvastatin[J]. J Mol Neurosci, 2016, 60(4):474-485.
- [11] 张阳,张志坚,俞晓岚,等.慢病毒介导新型 Tet-On 系统调控大鼠 GDNF 和 TH 双基因表达对帕金森病大鼠的实验研究[J].中国药理学通报,2015,31(2):251-256.
- [12] LIN K D, YANG C Y, LEE M Y, et al. Statin therapy prevents the onset of Parkinson disease in patients with diabetes[J]. Ann Neurol, 2016, 80(4):532-540.
- [13] 王述菊,马彪,马骏,等.电针对帕金森病模型大鼠纹状体相关蛋白 mRNA 表达的影响[J].中国针灸,2015,35(7):697-701.
- [14] SHALABY S Y, LOUIS E D. Statin use and its association with essential tremor and parkinson's disease[J]. Neuroepidemiology, 2016, 47(1):11-17.
- [15] 王述菊,余沛豪,马骏,等.电针对鱼藤酮诱导的帕金森病模型大鼠黑质内自噬相关蛋白表达的影响[J].辽宁中医杂志,2017,38(9):1812-1815.

(收稿日期:2018-03-18 修回日期:2018-06-14)

(上接第 4122 页)

[11] 颜虹,徐勇勇,赵耐清.医学统计学[M].北京:人民卫生出版社,2005:11-12.

[12] 孙东昌,张衍梅,施跃峰.细菌自然转化的分子机制研究进展[J].微生物学报,2012,52(1):6-11.

[13] SABO P J, KUEHN M S, THURMAN R, et al. Genome-scale mapping of DNase I sensitivity in vivo using tiling DNA microarrays[J]. Nature Methods, 2006, 3(7):511-

518.

- [14] 周会霞,杨广龙,李云华,等.链球菌分子分型及传播机制的研究[J].现代医学,2017,45(2):215-220.
- [15] 翁幸璧,糜祖煌.可移动遗传原件:耐药基因的载体[J].中国人兽共患病学报,2013,29(4):389-397.

(收稿日期:2018-03-11 修回日期:2018-06-12)