

# 低分子量硫酸软骨素对MPTP致帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元的保护作用<sup>Δ</sup>

高 钦<sup>1\*</sup>, 丁红光<sup>2</sup>, 孙福生<sup>3</sup>, 杨志宏<sup>1</sup>, 王 井<sup>1</sup>, 丁慧婷<sup>1</sup>, 高 华<sup>1</sup>, 鞠传霞<sup>1#</sup>(1. 青岛大学药学院, 山东 青岛 266012; 2. 青岛市市立医院普外科, 山东 青岛 266011; 3. 青岛市市立医院药学部, 山东 青岛 266011)

中图分类号 R964 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1025-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.04

**摘要** 目的: 观察低分子量硫酸软骨素(CS)对1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)致帕金森病(PD)模型小鼠多巴胺能神经元的保护作用。方法: 将C57BL/6小鼠随机分为对照组、MPTP损伤组以及低分子量CS低、高剂量组(100、400 mg/kg)。对照组和MPTP损伤组小鼠均灌胃等容生理盐水, 各给药组小鼠均灌胃相应药物, 每天1次, 连续17 d。自给药后第11天开始, 除对照组外, 其余各组小鼠均于给药后腹腔注射MPTP溶液(20 mg/kg), 每天1次, 连续5 d, 以复制PD模型。末次给药后, 采用转棒式疲劳仪评价小鼠(每组10只)行为学的改变情况, 采用免疫组织化学法和免疫荧光法检测小鼠(每组3只)中脑黑质中多巴胺能神经元的损伤情况[酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞百分比、荧光强度百分比], 采用高效液相色谱法检测小鼠(每组6只)脑纹状体中多巴胺的含量, 采用化学比色法检测小鼠(每组6只)中脑黑质中氧化应激指标[超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)]水平。结果: 与对照组比较, MPTP损伤组小鼠在转棒上的滞留时间显著缩短, 中脑黑质中TH阳性细胞明显减少、荧光强度明显减弱, 其阳性细胞百分比和荧光强度百分比, 脑纹状体中多巴胺的含量以及中脑黑质中SOD、GSH-Px的活性均显著降低, MDA的含量显著升高( $P < 0.01$ )。与MPTP损伤组比较, 低分子量CS各剂量组小鼠在转棒上的滞留时间显著延长, 中脑黑质中TH阳性细胞明显增加、荧光强度明显增强, 其阳性细胞百分比、荧光强度百分比以及脑纹状体中多巴胺的含量均显著升高, 且高剂量组上述指标均显著长于或高于低剂量组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); 低分子量CS各剂量组小鼠中脑黑质中SOD、GSH-Px的活性均显著升高, 低分子量CS高剂量组小鼠中脑黑质中MDA的含量显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论: 预防性给予低分子量CS可剂量依赖性地减轻MPTP致PD模型小鼠中脑黑质中多巴胺能神经元的损伤, 增加其脑纹状体中多巴胺的分泌。这种作用可能与抑制脂质过氧化反应、提高组织的抗氧化能力相关。

**关键词** 低分子量硫酸软骨素; 中脑黑质; 脑纹状体; 多巴胺能神经元; 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶; 酪氨酸羟化酶; 氧化应激; 帕金森病; 小鼠

## Neuroprotective Effects of Low-molecular-weight Chondroitin Sulfate on Dopaminergic Neurons in MPTP-induced Parkinson's Disease Model Mice

GAO Qin<sup>1</sup>, DING Hongguang<sup>2</sup>, SUN Fusheng<sup>3</sup>, YANG Zhihong<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, DING Huiting<sup>1</sup>, GAO Hua<sup>1</sup>, JU Chuanxia<sup>1</sup>(1. School of Pharmacy, Qingdao University, Shandong Qingdao 266012, China; 2. Dept. of General Surgery, Qingdao Municipal Hospital, Shandong Qingdao 266011, China; 3. Dept. of Pharmacy, Qingdao Municipal Hospital, Shandong Qingdao 266011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To observe neuroprotective effects of low-molecular-weight chondroitin sulfate (CS) on dopaminergic neurons in Parkinson's disease (PD) mice model induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). METHODS: C57BL/6 mice were randomly divided into control group, MPTP injury group, low-molecular-weight CS low-dose and high-dose groups (100, 400 mg/kg). Control group and MPTP injury group were given constant volume of normal saline intragastrically, administration groups were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 17 d. Since 11th day after medication, except for control group, other groups were given MPTP solution (20 mg/kg) intraperitoneally to induce PD model, once a day, consecutive 5 d. After last medication, behavioral changes of mice (10 mice in each group) were evaluated by rotary rod fatigue tester. The damage of dopamine neurons (the percentage of TH positive cell and the percentage of fluorescence intensity) in substantia nigra of mice (3 mice in each group) was detected by immunohistochemistry and immunofluorescence. The content of dopamine in striatum was determined by HPLC (6 mice in each group). The changes of oxidant stress indexes (SOD, GSH-Px, MDA) in substantia nigra of mice were determined by chemical colorimetry (6 mice in each group). RESULTS: Compared with control group, retention time of mice on rotating rods was shortened significantly in MPTP injury group; TH positive cells of substantia nigra were

<sup>Δ</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81441094); 山东省自然科学基金资助项目(No.ZR2013HQ010); 山东省医药卫生科技发展计划项目(No.2013WS0256)

\* 硕士研究生。研究方向: 糖生物学、神经药理学。E-mail: 18790670712@163.com

# 通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 糖生物学、神经药理学。E-mail: juxc@qdu.edu.cn

decreased significantly, fluorescence intensity was obviously weakened; the percentage of positive cells and fluorescence intensity, the content of dopamine in striatum, the activities of SOD and GSH-Px in substantia nigra were decreased significantly, while the content of MDA was increased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with MPTP injury group, retention time of mice on the rotating rods was prolonged significantly in low-molecular-weight CS groups, the number of TH positive cells was increased significantly in substantia nigra and fluorescence intensity was increased significantly; the percentage of positive cells, the percentage of fluorescence intensity and the content of dopamine in striatum were increased significantly, while above indexes of high-dose group were significantly longer or higher than those of low-dose group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The activities of SOD and GSH-Px in substantia nigra were increased significantly in low-molecular-weight CS groups, while the content of MDA in substantia nigra was decreased significantly in low-molecular-weight CS high-dose group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: Prophylactic administration of low-molecular-weight CS can relieve the damage of dopaminergic neurons in substantia nigra of PD model mice induced by MPTP in a dose-dependent manner, and increase the secretion of dopamine in striatum. The effect may be related to the inhibition of lipid peroxidation and the enhancement of antioxidant capacity of tissues.

**KEYWORDS** Low-molecular-weight chondroitin sulfate; Substantia nigra; Striatum; Dopaminergic neurons; 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; Tyrosine hydroxylase; Oxidant stress; Parkinson's disease; Mice

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种中枢神经系统退行性疾病,主要临床表现为肌肉强直、静止性震颤、运动迟缓等,其主要病理改变是中脑黑质多巴胺能神经元丢失,从而导致纹状体轴突末梢多巴胺耗竭<sup>[1]</sup>。随着全球人口老龄化进程的加快,PD的发病率逐年上升<sup>[2]</sup>,且目前尚无足够成熟的有效药物能够阻止或逆转PD病情的进展。虽然PD的病因和发病机制并未阐明,但氧化应激、线粒体功能障碍、细胞凋亡和炎症反应等机制共同参与了PD发病过程中多巴胺能神经元的损伤<sup>[3-4]</sup>。因此,具有抗炎、抑制细胞凋亡等药理活性的物质均可作为PD治疗的潜在候选药物。

硫酸软骨素(Chondroitin sulfate, CS)是广泛分布于动物组织细胞外基质和细胞表面的一类糖胺聚糖,由N-乙酰氨基半乳糖和葡糖醛酸组成,具有抗氧化、抗炎、清除自由基、改善线粒体功能障碍等多种药理活性,可用于防治冠心病、心绞痛、心肌梗死、关节炎、角膜炎、耳聋耳鸣、神经痛等疾病<sup>[5-6]</sup>。此外,CS还具有神经保护作用,能促进神经元生长<sup>[7]</sup>;能延迟兴奋性氨基酸诱导的皮层和海马神经元死亡<sup>[8]</sup>;能拮抗慢性氟中毒所致的神经损害<sup>[9]</sup>;能有效抑制 $\beta$ -淀粉样蛋白25-35对PC12细胞和SH-SY5Y细胞的毒性作用,并明显改善 $\beta$ -淀粉样蛋白1-40所致老年痴呆模型小鼠的学习记忆障碍<sup>[10]</sup>;能改善慢性不可预知性温和应激所致小鼠的抑郁症状<sup>[11]</sup>。本课题组及其他研究团队分别利用6-羟基多巴胺、过氧化氢及过表达 $\alpha$ -突触核蛋白损伤SH-SY5Y细胞多巴胺能神经元,建立PD细胞模型,发现CS在体外可明显减轻SH-SY5Y细胞的损伤,并可提高其生存率,且这种作用主要是通过抗氧化应激和抗线粒体介导的细胞凋亡来实现的<sup>[12-14]</sup>。由此推测,CS可能对中脑黑质纹状体系统内的多巴胺能神经元具有一定的保护作用。

高分子量CS由于黏度高、结构复杂以及细胞膜选

择通透性等因素,使得其生物利用度低、口服吸收差及疗效不稳定,而低分子量CS具有生物利用度高和活性强的优点<sup>[15]</sup>。因此,本研究以1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导的PD模型小鼠为对象,初步评价预防性应用低分子量CS对小鼠体内多巴胺能神经元的保护作用,以期挖掘CS防治PD的药理活性提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Ti型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司);Fluoview FV500型激光共聚焦扫描显微镜(日本Olympus公司);600-717-2465型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Waters公司);RM2255型自动石蜡切片机(德国Leica公司);KQ-100DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ZWY-240型恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司);5424型低温离心机(德国Eppendorf公司);X1R型高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);03061836型涡旋混合器(美国Labnet公司);754型紫外-可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);ZS-YLS-4C型转棒式疲劳仪(北京众实迪创科技发展有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

低分子量CS(青岛贝尔特生物科技有限公司,批号:20140912,纯度:95%,分子量:4 296 Da);MPTP、多巴胺、Triton X-100溶液(美国Sigma公司);兔抗小鼠酪氨酸羟化酶(TH)抗体(美国Cell Signaling Technology公司);生物素标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(欣博盛生物科技有限公司);亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)试剂盒(上海新睿生物科技有限公司);Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG二抗(美国Invitrogen公司);超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研

究所);山羊血清、DAB染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司);苏木精染色液(北京索莱宝科技有限公司);磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2)、磷酸盐聚山梨酯缓冲溶液(PBST,pH 7.5)均由本实验室自制;其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

### 1.3 动物

SPF级雄性C57BL/6J小鼠,8周龄,体质量20~22g,由常州卡文斯实验动物有限公司提供[动物生产许可证:SCXK(苏)2011-0003]。所有动物均于(22±2)℃、12h光照/黑暗循环条件下饲养,并自由进食、饮水。

## 2 方法

### 2.1 分组、造模与给药

所有小鼠均适应性喂养7d后,随机分为对照组、MPTP损伤组以及低分子量CS低、高剂量组(100、400mg/kg,剂量设置参考本研究前期研究结果<sup>[11]</sup>)。对照组和MPTP损伤组小鼠均灌胃等容生理盐水,各给药组小鼠均灌胃相应药物(以生理盐水为溶剂),每天1次,连续17d。自给药后第11天开始,除对照组外,其余各组小鼠均于给药后腹腔注射MPTP溶液(20mg/kg,以生理盐水为溶剂),每天1次,连续5d,以复制PD模型。

### 2.2 旋转法测试各组小鼠行为学改变情况

按“2.1”项下方法分组、造模与给药,每组10只。末次给药后,采用转棒式疲劳仪测试各组小鼠行为学的改变情况。设置转棒式疲劳仪的转速为40r/min,每只小鼠连续测试5次,每次测试间隔1min,记录小鼠在转棒式疲劳仪上的停留时间,取5次测试结果的平均值作为最终结果。正式测试之前,所有小鼠应均适应性测试5次。

### 2.3 免疫组织化学法检测各组小鼠中脑黑质中多巴胺能神经元损伤情况

按“2.1”项下方法分组、造模与给药,每组3只。末次给药后,以10%水合氯醛(2.5mL/kg)进行麻醉,于左心室依次灌注生理盐水15mL和4℃的4%多聚甲醛溶液15mL后,断头取脑。脑组织置于4℃的4%多聚甲醛溶液中固定过夜,随后依次转移至10%蔗糖溶液、30%蔗糖溶液中,直至下沉。脑组织经石蜡包埋后,于中脑黑质部位行冠状连续切片(厚度约为20μm),切片于室温下用3%过氧化氢处理10min以抑制内源性过氧化物酶活性,随后用PBS清洗5min×3次,再置于封闭液(含0.2%Triton X-100溶液和10%山羊血清,以PBS为溶剂)中封闭1h后,加入TH抗体(1:4000),于4℃孵育过夜;用PBS清洗后,加入生物素标记二抗(1:1000),于室温下孵育30min,用ABC试剂盒按其说明书进行染色,以DAB显色、苏木精复染;经乙醇梯度脱水后,以中

性树脂封片,置于倒置荧光显微镜下观察。每只小鼠随机选取5张切片、每张切片随机选取4个视野进行阳性细胞计数(染色后显紫红色的即为TH阳性细胞),每个视野计数2次,取其平均值为TH阳性细胞数;同时,计算TH阳性细胞百分比,即各试验组与对照组TH阳性细胞的百分比。

### 2.4 免疫荧光法检测各组小鼠中脑黑质中多巴胺能神经元损伤情况

按“2.1”项下方法分组、造模与给药,每组3只。末次给药后,按“2.3”项下方法取脑。脑组织于中脑黑质部位行冠状连续冰冻切片(厚度约为20μm),将切片放至含有PBS的24孔培养板中,置于恒温摇床(室温,转速60r/min,下同)上,用PBST清洗5min×3次,加入TH抗体(1:2000)后,于4℃孵育过夜;用PBS清洗5min×3次,加入Alexa Fluor 488标记二抗(1:2000),置于恒温摇床上于室温下孵育2h;用PBST清洗5min×3次。以70%甘油封片后,用激光共聚焦扫描显微镜观察并记录荧光强度(染色后显红色的即为TH阳性细胞,其荧光强度越高,表明多巴胺能神经元损伤越轻),并计算荧光强度百分比(即各试验组与对照组荧光强度的百分比)。

### 2.5 HPLC法检测各组小鼠脑纹状体中多巴胺含量

按“2.1”项下方法分组、造模与给药,每组6只。末次给药后,按“2.3”项下方法取脑。取脑组织适量,于冰上分离纹状体,置于液氮中冷冻,于-80℃保存,备用。取纹状体组织适量,加入0.4mol/L高氯酸溶液300μL预处理后,超声(功率:100W,频率:40kHz)匀浆10s,在冰浴条件下静置1h,于4℃下以12000r/min离心20min,取上清液240μL,加入样品预处理液(含20mmol/L柠檬酸钾、300mmol/L磷酸氢二钾、2mmol/L乙二胺四乙酸二钠,以水为溶剂)120μL,涡旋混匀,12000r/min离心20min,取上清液进行HPLC分析。色谱条件:色谱柱为Symmetryshield™ RP<sub>18</sub>(250mm×4.60mm,5μm),检测器为电子俘获检测器(ECD),检测波长为280nm,柱温为30℃,流速为1mL/min,进样量为20μL。参考文献[16]行方法学考察,多巴胺检测质量浓度的线性范围为1.78~156.50mg/mL( $r=0.9457$ ),定量下限为1.78mg/mL,精密度、准确度、稳定性等均符合2015年版《中国药典》(四部)<sup>[17]</sup>的相关要求。

### 2.6 化学比色法检测各组小鼠中脑黑质中氧化应激指标水平

按“2.1”项下方法分组、造模与给药,每组6只。末次给药后,按“2.3”项下方法取脑。取脑组织适量,于冰上分离中脑黑质并以PBS制成10%组织匀浆,于4℃下以3000r/min离心15min,收集上清液,于-80℃保存,备用。采用化学比色法、以紫外-可见分光光度计检测



中脑黑质中SOD、GSH-Px活性以及MDA含量,严格按照相应试剂盒说明书操作。

## 2.7 统计学方法

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。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(One-way ANOVA),两组间比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 低分子量CS对PD模型小鼠行为学的影响

与对照组比较,MPTP损伤组小鼠在转棒式疲劳仪上的停留时间显著缩短,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与MPTP损伤组比较,低分子量CS各剂量组小鼠停留时间均显著延长,且高剂量组显著长于低剂量组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),详见表1。

表1 低分子量CS对PD模型小鼠行为学及中脑黑质中多巴胺能神经元损伤的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Effects of low-molecular-weight CS on behaviour and damage of dopaminergic neurons in substantia nigra of PD model mice( $\bar{x} \pm s$ )

组别	停留时间(n=10),s	TH阳性细胞百分比(n=3),%	荧光强度百分比(n=3),%
对照组	190.50 ± 8.83	100	100
MPTP损伤组	139.00 ± 5.59**	51.60 ± 3.45**	53.20 ± 3.39**
低分子量CS低剂量组	154.00 ± 5.76 <sup>#</sup>	62.30 ± 3.20 <sup>#</sup>	62.70 ± 4.34 <sup>#</sup>
低分子量CS高剂量组	168.00 ± 8.27 <sup>##</sup> <sup>ΔΔ</sup>	73.50 ± 2.32 <sup>##</sup> <sup>ΔΔ</sup>	70.70 ± 1.46 <sup>##</sup> <sup>ΔΔ</sup>

注:与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与MPTP损伤组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与低分子量CS低剂量组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$

Note: vs. control group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. MPTP injury group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; vs. low-molecular-weight CS low-dose group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ , <sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$

### 3.2 低分子量CS对PD模型小鼠中脑黑质中多巴胺能神经元损伤的影响

与对照组比较,MPTP损伤组小鼠中脑黑质中TH阳性细胞的表达均明显减弱,其TH阳性细胞百分比显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与MPTP损伤组比较,低分子量CS各剂量组小鼠中脑黑质中TH阳性细胞的表达均有所增强,其TH阳性细胞百分比均显著升高,且高剂量组显著高于低剂量组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),详见图1、表1。

对照组小鼠中脑黑质中TH阳性细胞形态清晰,排列密集有序,荧光强度高;MPTP损伤组小鼠中脑黑质中TH阳性细胞稀疏、零散,荧光强度明显降低,其荧光强度百分比显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );低分子量CS各剂量组小鼠中脑黑质中TH阳性细胞均有所增多,荧光强度均有所升高,其荧光强度百分比均显著升高,且高剂量组显著高于低剂量组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),详见图2、表1。

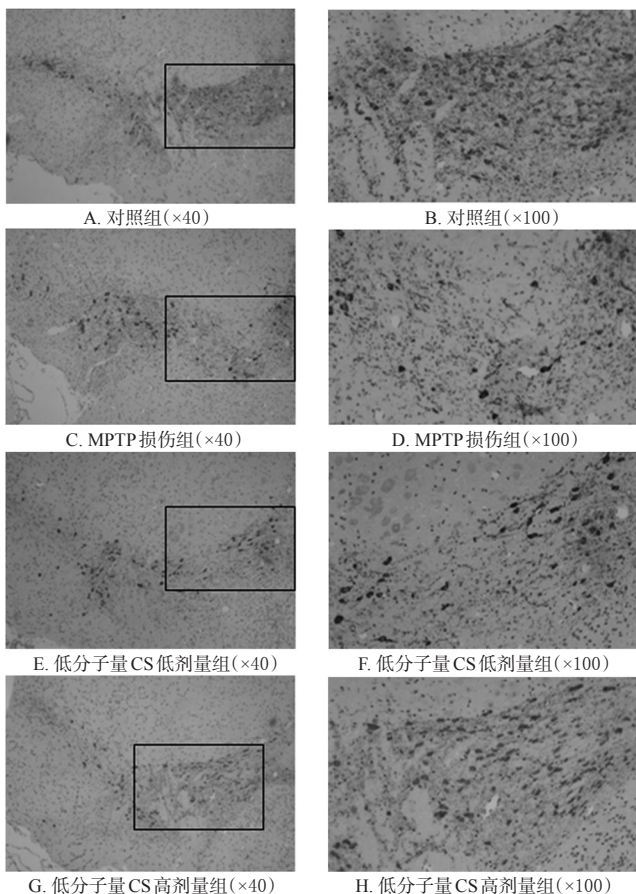


图1 各组小鼠中脑黑质中多巴胺能神经元TH阳性细胞的显微图(免疫组织化学法)

Fig 1 Micrographs of TH-positive cells of dopaminergic neurons in substantia nigra of mice in each group (immunohistochemistry method)

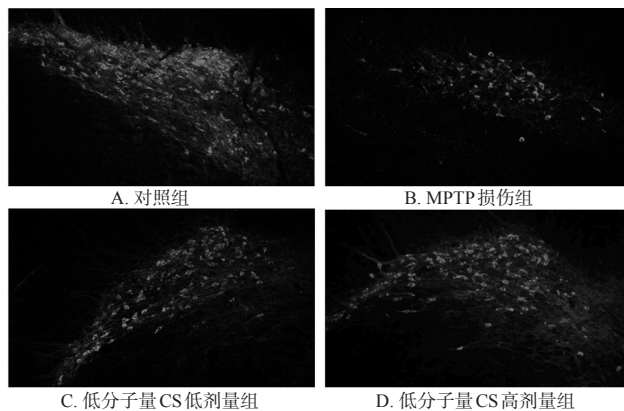


图2 各组小鼠中脑黑质中多巴胺能神经元TH阳性细胞的显微图(免疫荧光法,×100)

Fig 2 Micrographs of TH-positive cells of dopaminergic neurons in substantia nigra of mice in each group (immunofluorescence method, ×100)

### 3.3 低分子量CS对PD模型小鼠脑纹状体中多巴胺含量的影响

与对照组比较,MPTP损伤组小鼠脑纹状体中多巴胺的含量显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与

MPTP损伤组比较,低分子量CS各剂量组小鼠脑纹状体中多巴胺的含量均显著升高,且高剂量组显著高于低剂量组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),详见表2。

表2 低分子量CS对PD模型小鼠脑纹状体中多巴胺含量以及中脑黑质中SOD、GSH-Px活性和MDA含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Tab 2 Effects of low-molecular-weight CS on the dopamine contents in striatum, the activities of SOD and GSH-Px and MDA content in substantia nigra of PD model mice( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	多巴胺, $\mu\text{g/g}$	SOD, U/mg	GSH-Px, U/mg	MDA, nmol/mg
对照组	11.32 $\pm$ 2.28	163.37 $\pm$ 13.34	25.35 $\pm$ 7.14	6.44 $\pm$ 2.38
MPTP损伤组	2.76 $\pm$ 0.87**	82.77 $\pm$ 10.56**	8.93 $\pm$ 2.97**	13.67 $\pm$ 3.19**
低分子量CS低剂量组	4.31 $\pm$ 0.98 <sup>#</sup>	107.41 $\pm$ 11.56 <sup>#</sup>	13.70 $\pm$ 2.84 <sup>#</sup>	11.50 $\pm$ 3.24
低分子量CS高剂量组	6.64 $\pm$ 1.29 <sup>#,Δ</sup>	125.03 $\pm$ 15.97 <sup>#</sup>	15.50 $\pm$ 4.77 <sup>#</sup>	8.95 $\pm$ 2.03 <sup>#</sup>

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与MPTP损伤组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与低分子量CS低剂量组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.01$

Note: vs. control group, \*\* $P<0.01$ ; vs. MPTP injury group, <sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ; vs. low-molecular-weight CS low-dose group, <sup>Δ</sup> $P<0.01$

### 3.4 低分子量CS对PD模型小鼠中脑黑质中氧化应激指标水平的影响

与对照组比较,MPTP损伤组小鼠中脑黑质中SOD、GSH-Px活性均显著降低,MDA含量显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.01$ );与MPTP损伤组比较,低分子量CS各剂量组小鼠脑黑质中SOD、GSH-Px活性均显著升高,低分子量CS高剂量组小鼠脑黑质中MDA含量显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),详见表2。

## 4 讨论

MPTP是一种神经毒素,可透过血脑屏障,在脑内经单胺氧化酶B催化转变为活性1-甲基-4-苯基-吡啶离子(MPP<sup>+</sup>),后者可选择性地通过高通量多巴胺转运体积累,从而诱导多巴胺神经元凋亡或死亡,最终诱导人和动物产生PD症状,是PD基础研究的常用诱导剂<sup>[18]</sup>。鉴于此,本研究以MPTP致PD模型小鼠为对象,在前期研究的基础上,初步探讨了低分子量CS对其体内多巴胺能神经元的保护作用,以及对相关指标的影响。

PD的主要临床特征包括运动平衡和协调能力受损,其主要病理改变为中脑黑质致密部多巴胺能神经元进行性变性缺失,而多巴胺合成的减少则可进一步导致纹状体内多巴胺含量的降低<sup>[1,19]</sup>。TH是多巴胺能神经元的标记酶,可通过观察中脑黑质中TH阳性细胞的数量来评估多巴胺能神经元的损伤情况<sup>[20]</sup>。为此,本研究采用免疫组织化学法和免疫荧光法从不同角度对各组小鼠中脑黑质中TH阳性细胞的表达情况进行检测。其中,前者利用生物素标记的特异性抗体在组织细胞原位

通过抗原抗体反应和组织化学显色反应,对相应抗原进行定位、定性、定量;后者则采用荧光素标记的已知抗体(或抗原)作为探针,当其对待测组织/细胞中的靶抗原(或抗体)发生反应后,形成的抗原抗体复合物可发射荧光,进一步借助荧光定量技术来检测靶抗原(或抗体)的含量<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,MPTP损伤组小鼠在转棒式疲劳仪上的停留时间较对照组显著缩短,中脑黑质中的TH阳性细胞较对照组明显减少,其TH阳性细胞百分比、荧光强度百分比以及脑纹状体中多巴胺的含量均显著降低。这表明小鼠出现了明显的运动障碍,其中脑黑质中的多巴胺神经元受到了明显的损伤,其脑纹状体中多巴胺的分泌受到了明显的抑制,提示PD模型复制成功。经低分子量CS预处理后,各剂量组小鼠在转棒式疲劳仪上停留时间显著延长,其中脑黑质中的TH阳性细胞明显增多,其TH阳性细胞百分比、荧光强度百分比以及脑纹状体中多巴胺的含量均显著升高,且高剂量组显著长于或高于低剂量组。这提示低分子量CS可剂量依赖性地对抗MPTP的神经毒性,改善PD模型小鼠的运动障碍,减轻其中脑黑质中多巴胺能神经元的损伤,增加其脑纹状体中多巴胺的分泌,对其多巴胺能神经元损伤具有一定的保护作用。

氧化应激是PD核心致病因素之一<sup>[22]</sup>,因此对抗氧化应激损伤是PD治疗的一个重要方向。已有研究证实,抗氧化剂(如益智药等)可改善PD模型动物的行为异常<sup>[23]</sup>。本课题组前期的体外研究结果显示,CS可通过抑制活性氧释放、增加核内因子E2相关因子2(Nrf2)蛋白水平、增强抗氧化酶活性等机制来保护多巴胺能神经元<sup>[13-14]</sup>。由此笔者推测,CS对动物多巴胺能神经元的保护作用可能也与上述机制有关。为此,本研究检测了小鼠中脑黑质中氧化应激相关指标(SOD、GSH-Px、MDA)水平。其中,SOD是机体内重要的抗氧化酶之一,可清除自由基,其活性的高低可间接反映机体清除自由基的能力;GSH-Px在机体内广泛存在,其可催化谷胱甘肽(GSH)对过氧化氢的还原反应,并具有特异性,是一种重要的催化过氧化氢分解的酶,可消除过氧化物对细胞结构及功能的干扰和损害;MDA是脂质氧化的最终产物,其含量的多少可反映组织或细胞氧化损伤的程度<sup>[24-25]</sup>。本研究结果还显示,MPTP损伤组小鼠中脑黑质中SOD、GSH-Px的活性均较对照组显著降低,MDA的含量较对照组显著升高。这提示小鼠中脑黑质受到氧化应激损伤。预防性给予低分子量CS后,各剂量组小鼠中脑黑质中SOD、GSH-Px的活性均显著升高,高剂量组小鼠中脑黑质中MDA的含量均显著降低。这提示低分子量CS对上述氧化应激损伤具有一定的抑制作用。

综上所述,预防性给予低分子量CS可剂量依赖性



地减轻MPTP致PD模型小鼠中脑黑质中多巴胺能神经元的损伤,增加其脑纹状体中多巴胺的分泌。这种作用可能与抑制脂质过氧化反应、提高组织抗氧化能力相关。但本研究只从氧化应激的角度探讨了低分子量CS抗PD的可能机制,而其余作用及确切机制有待后续研究进一步探索。

### 参考文献

- [1] TRĂISTARU R, KAMAL D, MATEI D, et al. Kinetic program and functional status in patients with Parkinson's disease[J]. *Curr Health Sci J*, 2016, 42(1): 51-60.
- [2] PRINGSHEIM T, JETTE N, FROLKIS A, et al. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis[J]. *Mov Disord*, 2014, 29(13): 1583-1590.
- [3] JUNN E, MOURADIAN MM. Human alpha-synuclein over expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine[J]. *Neurosci Lett*, 2002, 320(3): 146-150.
- [4] ORTH M, SCHAPIRA AH. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease[J]. *Neurochem Int*, 2002, 40(6): 533-541.
- [5] EGEA J, GARCÍA AG, VERGES J, et al. Antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective actions of chondroitin sulfate and proteoglycans[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. DOI: 10.1016/j.joca.2010.01.016.
- [6] VOLPI N. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: new functions from an old natural macromolecule [J]. *Inflammopharmacology*, 2011, 19(6): 299-306.
- [7] GALTREY CM, FAWCETT JW. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system[J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1): 1-18.
- [8] OKAMOTO M, MORI S, ENDO H. A protective action of chondroitin sulfate proteoglycans against neuronal cell death induced by glutamate[J]. *Brain Res*, 1994, 637(1/2): 57-67.
- [9] 王胜远, 邱志伟, 官志忠, 等. 硫酸软骨素对实验性慢性氟中毒脑损害大鼠的保护作用及机制研究[J]. *中华地方病学杂志*, 2018, 37(4): 271-277.
- [10] 张倩. 低分子量硫酸软骨素对A $\beta$ 引起神经毒性的防治作用及机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2015.
- [11] SI XM, TIAN YH, JIN JY, et al. Low molecular mass chondroitin sulfate suppresses chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behavior in mice[J]. *Acta Pharmaceutica*, 2018, 68(3): 361-371.
- [12] CAÑAS N, VALERO T, VILLARROYA M, et al. Chondroitin sulfate protects SH-SY5Y cells from oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 323(3): 946-953.
- [13] JU C, HOU L, SUN F, et al. Anti-oxidation and antiapoptotic effects of chondroitin sulfate on 6-hydroxydopamine: induced injury through the up-regulation of Nrf2 and inhibition of mitochondria-mediated pathway[J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(7): 1509-1519.
- [14] JU C, GAO J, HOU L, et al. Neuroprotective effect of chondroitin sulfate on SH-SY5Y cells overexpressing wild-type or A53T mutant  $\alpha$ -synuclein[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8721-8728.
- [15] 刘宁, 刘雅南, 刘涛, 等. 硫酸软骨素的制备研究及发展现状[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(3): 392-395.
- [16] 吴林, 薛丹丹, 杨晶, 等. 淫羊藿总黄酮对帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元保护作用[J]. *青岛大学医学院学报*, 2013, 49(1): 4-6.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 363-368.
- [18] PUPYSHEV AB, TIKHONOVA MA, AKOPYAN AA, et al. Therapeutic activation of autophagy by combined treatment with rapamycin and trehalose in a mouse MPTP-induced model of Parkinson's disease[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2018. DOI: 10.1016/j.pbb.2018.12.005.
- [19] 刘响. 纹状体中神经元活动的多巴胺调节[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(1): 5-8.
- [20] TABREZ S, JABIR NR, SHAKIL S, et al. A synopsis on the role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012, 11(4): 395-409.
- [21] 王卉. 免疫组织化学技术在临床中的应用及进展[J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(14): 2178-2181.
- [22] DIAS V, JUNN E, MOURADIAN MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease[J]. *J Parkinson Dis*, 2013, 3(4): 461-491.
- [23] ABUSHOUK AI, NEGIDA A, AHMED H, et al. Neuroprotective mechanisms of plant extracts against MPTP induced neurotoxicity: future applications in Parkinson's disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.11.074.
- [24] LU C, WEI Y, HU R, et al. Transcranial direct current stimulation ameliorates behavioral deficits and reduces oxidative stress in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease[J]. *Neuromodulation*, 2015, 18(6): 442-447.
- [25] YOUNUS H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase[J]. *I J Health Sci: Qassim*, 2018, 12(3): 88-93.

(收稿日期: 2018-11-10 修回日期: 2019-02-01)

(编辑: 张元媛)