

## 漆黄素对帕金森病小鼠模型的保护作用及机制研究

陈天骄<sup>1</sup>, 冯娅<sup>1</sup>, 刘特<sup>2</sup>, 吴婷婷<sup>1</sup>, 陈雅静<sup>1</sup>, 李璇<sup>1</sup>, 吴云成<sup>1</sup>

1. 上海交通大学附属第一人民医院神经内科, 上海 200080

2. 上海中医药大学/上海市中医老年医学研究所中心实验室, 上海 200031

**摘要:**目的 探讨漆黄素对帕金森病的神经保护作用及具体机制。方法 采用 MPTP 腹腔注射复制亚急性 PD 小鼠模型, 漆黄素灌胃给药, 实验分为 3 组: control 组、MPTP 组、漆黄素 + MPTP 组。通过旷场实验、爬杆实验、悬挂实验等行为学指标评估小鼠的运动行为。采用 Western blotting 和免疫荧光技术检测纹状体中 TH 水平和黑质中 TH 阳性神经元数量。采用尼氏染色检测黑质区神经元的损伤状况。通过检测纹状体区 GSH、SOD、T-AOC、MDA 含量, 评估脑组织中氧化应激水平。结果 与 MPTP 组相比, 漆黄素 + MPTP 组, 小鼠的运动总距离及运动速度提高 ( $P < 0.05$ ); 爬杆总时间及转头时间缩短 ( $P < 0.05$ )。悬挂实验评分提高 ( $P < 0.05$ )。尼氏染色结果发现, 漆黄素可缓解 MPTP 小鼠黑质区神经元损伤 ( $P < 0.05$ )。TH 免疫印迹及免疫荧光实验发现漆黄素可改善 MPTP 诱导的小鼠 TH 表达量水平下降及阳性神经元丢失 ( $P < 0.05$ )。同时, 漆黄素处理后, 提高了 MPTP 小鼠 GSH、SOD、T-AOC 水平, 降低了 MPTP 小鼠 MDA 的含量 ( $P < 0.05$ )。结论 漆黄素能有效改善帕金森病模型小鼠的运动功能, 缓解黑质-纹状体多巴胺能神经元损伤, 其机制可能与漆黄素的抗氧化作用有关。

**关键词:** 帕金森病; 漆黄素; 神经保护; 氧化应激; 小鼠

中图分类号: R742.5

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.04.002

## Neuroprotective effect and mechanism of fisetin on MPTP-induced mouse model of Parkinson disease

CHEN Tian-Jiao<sup>1</sup>, FENG Ya<sup>1</sup>, LIU Te<sup>2</sup>, WU Ting-Ting<sup>1</sup>, CHEN Ya-Jing<sup>1</sup>, LI Xuan<sup>1</sup>, WU Yun-Cheng<sup>1</sup>. 1. Department of Neurology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China; 2. Central Laboratory, Shanghai Geriatric Institute of Chinese Medicine, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200031, China

Corresponding author: WU Yun-Cheng, Email: yunchw@medmail.com.cn

**Abstract: Objective** To explore the neuroprotective effect and mechanism of fisetin on Parkinson's disease (PD). **Methods** A subacute PD mouse model was established by intraperitoneal injection of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). The mice were randomly divided into three groups: control, MPTP, and fisetin + MPTP, with five mice in each group. Mouse behavior was assessed by open field test, pole test, and wire hanging test. Western blotting and immunofluorescence were used to measure the expression of TH protein in the striatum and the number of TH-positive neurons in the substantia nigra. Nissl staining was used to detect neuronal damage in the substantia nigra. The level of oxidative stress in brain tissue was evaluated by measuring glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (T-AOC), and malondialdehyde (MDA) in the striatum. **Results** Fisetin attenuated the MPTP-induced decreases in total distance traveled and mean velocity ( $P < 0.05$ ). Moreover, compared with the control group, MPTP increased the total time and turn time in pole test, which were alleviated by fisetin treatment ( $P < 0.05$ ). In wire hang-

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81671251;81971185)

收稿日期: 2020-04-23; 修回日期: 2020-07-10

作者简介: 陈天骄(1996-), 硕士研究生, 主要研究方向: 帕金森病和运动障碍疾病。

冯娅(1989-), 医师, 医学博士, 主要研究方向: 帕金森病和运动障碍疾病。

陈天骄, 冯娅为共同第一作者

通信作者: 吴云成(1972-), 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 神经变性疾病和运动障碍疾病、脑血管病的发病机制和临床诊治。

Email: yunchw@medmail.com.cn.

ing test, fisetin increased the score of mice compared with the MPTP group ( $P < 0.05$ ). Nissl staining showed that fisetin could ameliorate the neuronal damage in the substantia nigra of MPTP mice ( $P < 0.05$ ). Western blot and immunofluorescence showed that fisetin could alleviate the decrease in TH expression and the loss of positive neurons induced by MPTP ( $P < 0.05$ ). Treatment with fisetin increased the levels of GSH, SOD, and T-AOC in MPTP mice, but decreased the content of MDA in the striatum of MPTP mice ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Fisetin can significantly improve the motor function of MPTP-induced PD model mice and ameliorate the dopaminergic neuronal damage in the substantia nigra-striatum, and the underlying mechanism might be closely related to the antioxidant effect of fisetin.

**Key words:** Parkinson's disease; fisetin; neuroprotective; oxidative stress; mouse

帕金森病(Parkinson's disease, PD)主要病理特征是黑质致密部多巴胺能神经元(dopaminergic neurons, DAn)内 $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -syn)的异常累积以及黑质DAn变性<sup>[1-2]</sup>。PD患者尸检发现,脑组织中DNA和蛋白质的高度氧化、脂质过氧化水平增高及谷胱甘肽含量的减少<sup>[3]</sup>,并发现活性氧(reactive oxygen species, ROS)形成和线粒体功能受损与DAn凋亡有关<sup>[4]</sup>。目前,研发具有抗氧化剂等特性的天然药物成为预防和治疗PD的重要方向<sup>[5]</sup>。

漆黄素是一种具有多种生物活性的天然类黄酮物质。最新研究表明,漆黄素在阿尔茨海默病、亨廷顿舞蹈病、抑郁症等多种神经精神疾病模型中发挥了神经保护作用,这可能与漆黄素的抗氧化应激、线粒体保护、抗炎抗免疫等多靶点神经保护活性有关<sup>[6]</sup>。然而,漆黄素在PD中的作用及其机制尚不明确。本研究拟通过行为学实验、病理及分子生物学、氧化应激指标等多方面评估漆黄素对PD模型小鼠的神经保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

漆黄素(3,7,3',4'-四羟基黄酮, fisetin)、MPTP(1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶)、TH抗体(Sigma,美国); $\beta$ -actin抗体(proteintech,美国);还原型谷胱甘肽(GSH)、总超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒(南京建成生物,中国);甲苯胺蓝染液(Servicebio,美国)。

### 1.2 实验动物

雄性C57BL/6小鼠,12~13周龄,体重24~28 g,由上海南方模式生物公司提供。每笼饲养5只小鼠,自由进食和饮水,相对湿度40%~50%,室温20~25℃,12 h/12 h昼夜节律。实验操作流程严格遵循中国实验动物操作指南,已通过上海南方模式生物中心伦理委员会的批准(IACUC:

2018-0005)。

### 1.3 实验动物分组及造模

将小鼠随机分为3组:control组、MPTP组和漆黄素+MPTP组,每组5只,共15只。MPTP组按照30 mg/kg的剂量连续5 d腹腔注射,复制亚急性PD小鼠模型。漆黄素+MPTP组小鼠给予100 ng/kg漆黄素<sup>[7]</sup>(溶于含1% DMSO的PBS溶液配制)连续灌胃30 d,control组和MPTP组同时给予等量含1% DMSO的PBS溶液灌胃。在漆黄素给药的第26~30 d,漆黄素+MPTP组给予MPTP连续腹腔注射5 d。

### 1.4 行为学实验

1.4.1 旷场实验 实验开始前,将小鼠放至实验环境中适应半小时。将小鼠放置于实验箱(40 cm×40 cm)底部的中央区域。利用旷场工作站(MED Associates, Georgia, VT, USA),连续采集并分析15 min内小鼠的平均速度、运动总距离等指标。

1.4.2 爬杆实验 自制爬杆装置<sup>[8]</sup>,并对各组小鼠进行爬杆训练。MPTP末次注射后的次日进行爬杆实验。将小鼠头朝上,上肢放在杆顶端(高80 cm,直径1 cm)。小鼠从放置到全身朝下的时间为掉头时间,从放置到后肢着陆的时间为总时间。每只小鼠测试3次,每次测试间隔1 h以上。

1.4.3 悬挂实验 自制悬挂实验装置(中间铁丝直径2 mm,长50 mm;两端平台高35 cm),将小鼠前爪放于铁丝中间以悬挂小鼠。记录180 s内小鼠掉落的次数以及到达两端平台的次数,并根据参考文献<sup>[9]</sup>计算得分。小鼠的基础分数设为10分,每掉落1次减去1分,到达平台1次则加1分。小鼠中途掉落或者到达平台后将其重新悬挂,直至计时达到180 s。

### 1.5 蛋白免疫印迹

行为学实验结束后,对小鼠进行灌注并取材。取小鼠一侧新鲜脑组织,将纹状体剥离并加入适量的含PMSF的RIPA裂解液匀浆后,4℃、12 000 r/min,离

心 15 min。取上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳分离蛋白,将分离的蛋白质转移至 0.45  $\mu\text{m}$  的 PVDF 膜上。5% 的脱脂牛奶封闭膜 120 min 以抑制非特异性结合。随后按照蛋白分子量裁剪目标条带,对应 TH 抗体和  $\beta$ -actin 抗体 4℃ 冰箱摇床孵育过夜。次日, TBST 清洗 3 次后,将目标条带与对应种属的二抗室温孵育 1 h,蛋白印迹智能成像系统扫描。

### 1.6 免疫荧光

取小鼠另一侧半脑,放入 4% 的多聚甲醛中固定 24 h 后,参考小鼠脑图谱制备小鼠脑组织黑质区的石蜡切片。将石蜡切片放入二甲苯中脱蜡后,放入不同梯度的乙醇中水合。随后将切片置于 pH 6.0 的柠檬酸钠缓冲液中煮沸修复 8 min,用组化笔在脑组织周围画阻水圈,向阻水圈内滴加免疫荧光封闭液,37℃ 封闭 2 h 后,加入 TH 抗体于 4℃ 冰箱孵育过夜。次日, PBST 清洗后加入免疫荧光二抗,放置于湿盒中 37℃ 避光孵育 30 min。用含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片后,在荧光显微镜下观察。

### 1.7 尼氏染色

将小鼠脑组织黑质的石蜡切片依次放入二甲苯和梯度乙醇中脱蜡和水合。在切片上滴加甲苯胺蓝染液染色 5 min,流水洗净。加入 1% 的冰醋酸适当分化后,二甲苯中透明 5 min 并用中性树胶封片。

### 1.8 氧化应激指标测定

取适量的小鼠纹状体组织,加入 9 倍预冷的生理盐水于冰上制备 10% 的组织匀浆,随后 3 000 ~ 4 000 r/min,离心匀浆液 10 min,取上清液并严格按照说明书操作,进行氧化应激指标 GSH、SOD、T-AOC、MDA 的检测。

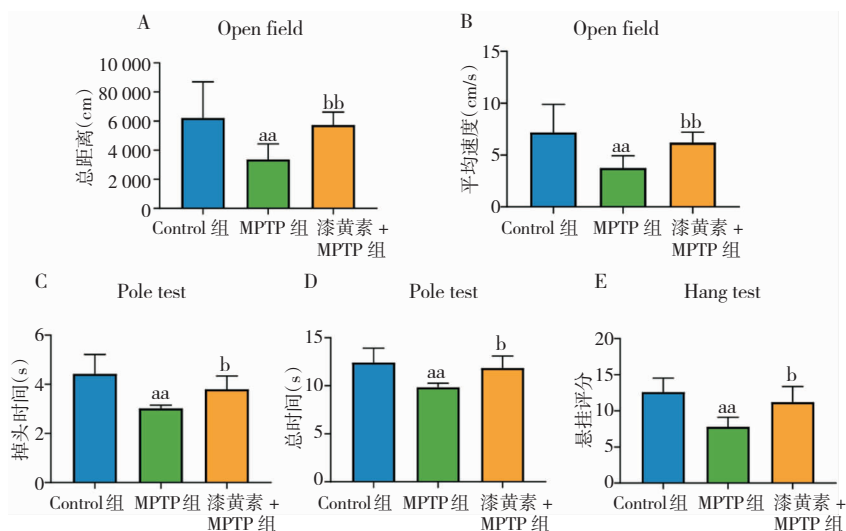
### 1.9 统计学方法

使用 SPSS 21.0 软件和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较采用单因素方差 (One-Way ANOVA) 分析。检验水准取双侧  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。Adobe Illustrator CC 2018 绘图。

## 2 结果

### 2.1 漆黄素对 MPTP 诱导的 PD 模型小鼠行为学障碍的影响

旷场实验结果发现, MPTP 组小鼠的总运动距离和平均速度低于 control 组,而漆黄素 + MPTP 组小鼠的总运动距离和平均速度都有提高 (图 1A、图 1B)。与 control 组相比, MPTP 组小鼠的爬杆及掉头动作较慢,漆黄素 + MPTP 组小鼠的总运动时间和掉头时间均缩短 (图 1C、图 1D)。悬挂实验中 MPTP 组小鼠的掉落次数增多,而到达平台的次数减少,总评分更低,而漆黄素干预能改善 PD 小鼠悬挂实验的掉落情况 (图 1E)。



A: 总运动距离; B: 平均移动速度; C: 爬杆总时间; D: 掉头时间; E: 悬挂评分。aa 为与 control 组比较,  $P < 0.01$ ; b 为与 MPTP 组比较,  $P < 0.05$ ; bb 为与 MPTP 组比较,  $P < 0.01$

图 1 漆黄素改善 PD 模型小鼠行为学障碍

## 2.2 漆黄素对 MPTP 诱导的小鼠黑质区神经元损伤的影响

Nissl 染色结果发现, control 组小鼠黑质区神经元核仁及 Nissl 体呈浅蓝色且细胞结构完整, 而 MPTP 模型小鼠黑质区神经元呈固缩深染状态。与 MPTP 组相比, 漆黄素干预可显著改善小鼠黑质区的神经元损伤情况。见图 2。

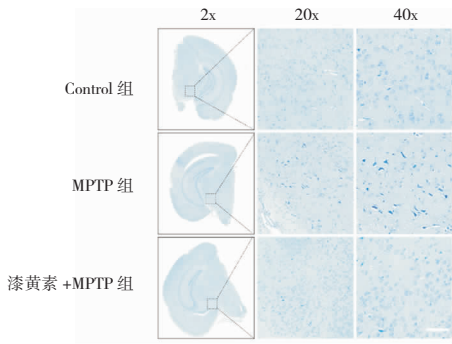
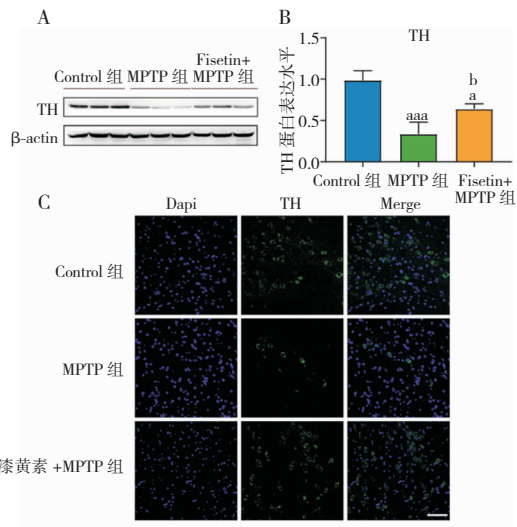


图2 漆黄素可以缓解 MPTP 诱导的神经元损伤(标尺=100  $\mu\text{m}$ )

## 2.3 漆黄素对 MPTP 诱导的小鼠 TH 水平下降及阳性神经元丢失的影响

免疫荧光结果发现, 相比于 control 组, MPTP 组 TH 阳性神经元的数量下降, 表明 PD 模型构建成功。而给予漆黄素处理后小鼠黑质区的 TH 阳性神经元较 MPTP 组增多。蛋白免疫印迹结果显示 MPTP 组小鼠 TH 蛋白水平相较于 control 组下降, 而漆黄素干

预能缓解 MPTP 诱导的 TH 水平下降。见图 3。

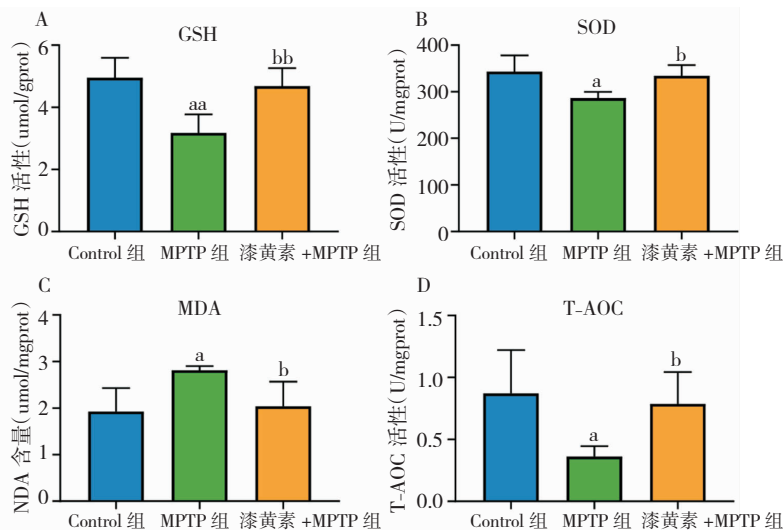


A,B:纹状体 TH 蛋白表达水平;C:黑质 TH 阳性神经元染色(标尺=100  $\mu\text{m}$ ); a, aaa 为与 control 组比较,  $P$  值分别为  $<0.05$ 、 $<0.001$ ; b 为与 MPTP 组比较,  $P < 0.05$

图3 漆黄素缓解 MPTP 诱导的神经元损伤

## 2.4 漆黄素对 MPTP 诱导的 PD 模型小鼠氧化应激的影响

与 control 组相比, MPTP 组小鼠的 MDA 含量升高, 而 GSH、SOD、T-AOC 水平较 control 组下降; 而漆黄素灌胃处理后 MDA 含量下降, GSH、SOD、T-AOC 水平升高 ( $P < 0.05$ )。见图 4。



a, aa 为与 control 组比较,  $P$  值分别为  $<0.05$ 、 $<0.01$ ; b, bb 为与 MPTP 组比较,  $P$  值分别为  $<0.05$ 、 $<0.01$

图4 漆黄素改善 MPTP 诱导的小鼠氧化应激损伤

## 3 讨论

PD 病理机制中的多巴胺代谢、线粒体功能障

碍、蛋白质错误折叠及神经炎症均可导致 DAn 神经元发生氧化应激损伤<sup>[10]</sup>, 而细胞氧化还原失衡后的

ROS 累积会导致脂质、蛋白质、DNA 和 RNA 的氧化损伤,从而损害神经元功能和结构的完整性<sup>[11]</sup>。

漆黄素具有抗癌、抗炎、抗病毒、免疫调节等多种生物学特性<sup>[12]</sup>。已有研究表明,漆黄素可通过激活 ERK 改善与 SOD1 基因突变相关的肌萎缩性侧索硬化症模型的氧化应激所致病理损伤<sup>[13]</sup>。

本研究通过旷场实验、爬杆实验以及悬挂实验评估小鼠的自主活动状态、有无运动迟缓以及运动协调性。行为学结果发现,漆黄素处理可改善 MPTP 小鼠的总运动距离,同时其平均速度提高、掉头时间及总时间缩短以及悬挂评分提高。

酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 是多巴胺合成的关键酶,常用于验证 PD 模型的成功建立及 PD 病理严重程度的评估。通过免疫荧光结果发现,漆黄素可显著提高 MPTP 诱导的 TH 水平,并增加 TH 阳性神经元数量。神经元损伤时,典型形态变化可用 Nissl 染色检测,表现为神经元萎缩及嗜碱性异常。尼氏染色结果发现漆黄素可显著缓解 TH 阳性神经元损伤。笔者认为,漆黄素可有效改善 MPTP 诱导的 PD 模型小鼠的行为学障碍和多巴胺能神经元损伤。

GSH 的主要功能是针对脑组织存在的自由基进行防御。GSH 水平降低可能会阻碍  $H_2O_2$  清除并促进强的羟自由基的形成,导致氧化损伤<sup>[14]</sup>。SOD 是清除活性氧自由基的主要酶,T-AOC 反映机体酶类和非酶类抗氧化物的总水平<sup>[4]</sup>。SOD、GSH、T-AOC 水平的高低反映了机体清除自由基和抗氧化损伤的能力<sup>[15]</sup>。丙二醛 (MDA) 是多不饱和脂肪酸氧化的最终产物,其水平可以间接反映氧自由基的代谢程度,因此可以作为氧化损伤的指标<sup>[17]</sup>。MPTP 诱导的小鼠中 MDA 水平升高表明氧化应激所产生的自由基增加。本研究结果发现,MPTP 组小鼠脑组织中 MDA 含量升高,而 GSH、SOD、T-AOC 水平下降。漆黄素处理可使 MPTP 小鼠脑组织的 GSH、SOD、T-AOC 水平升高,MDA 含量下降,表明漆黄素可以改善 MPTP 诱导的 PD 小鼠脑内 ROS 产生与清除之间的失衡,改善 MPTP 小鼠脑组织的氧化损伤。

综上,漆黄素可抑制 MPTP 诱导的多巴胺能神经元损伤,有效改善 PD 模型小鼠的运动功能障碍。漆黄素的上述神经保护作用可能与其清除自由基、抑制氧化应激密切相关。基于以上研究结果,漆黄素有可能成为预防和治疗 PD 的潜在神经保护药物。

#### 参 考 文 献

- [1] Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2015, 386(9996): 896-912.
- [2] 郭彦杰,冯娅,李璇,等. 沉默信息调节因子 1/p53 信号通路参与 MPTP 诱导的帕金森病小鼠多巴胺能神经元丢失[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2020, 47(1): 38-43.
- [3] Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(6): e13031.
- [4] Jiang T, Sun Q, Chen S. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 147: 1-19.
- [5] Rekha KR, Inmozhi Sivakamasundari R. Geraniol protects against the protein and oxidative stress induced by rotenone in an in vitro model of Parkinson's disease [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(10): 1947-1962.
- [6] Yang W, Tian ZK, Yang HX, et al. Fisetin improves lead-induced neuroinflammation, apoptosis and synaptic dysfunction in mice associated with the AMPK/SIRT1 and autophagy pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 134: 110824.
- [7] Lin J, Nie X, Xiong Y, et al. Fisetin regulates gut microbiota to decrease CCR9/CXCR3/CD4 T-lymphocyte count and IL-12 secretion to alleviate premature ovarian failure in mice [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(1): 203-247.
- [8] Zhang QS, Heng Y, Mou Z, et al. Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(10): 1317-1328.
- [9] Zhu W, Gao YF, Wan JR, et al. Changes in motor function, cognition, and emotion-related behavior after right hemispheric intracerebral hemorrhage in various brain regions of mouse [J]. *Brain Behav Imm*, 2018, 69: 568-581.
- [10] Sharma S, Rabbani SA, Narang JK, et al. Role of rutin nanoemulsion in ameliorating oxidative stress: pharmacokinetic and pharmacodynamics studies [J]. *Chem Phys Lipids*, 2020, 228: 104890.
- [11] Blesa J, Lanciego J, Obeso JA. Editorial: Parkinson's disease: cell vulnerability and disease progression [J]. 2015, 9: 125.
- [12] Rodius S, De Klein N, Jeanty C, et al. Fisetin protects against cardiac cell death through reduction of ROS production and caspases activity [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 2896.
- [13] Wang TH, Wang SY, Wang XD, et al. Fisetin exerts antioxidant and neuroprotective effects in multiple mutant hSOD1 models of amyotrophic lateral sclerosis by activating ERK [J]. *Neuroscience*, 2018, 379: 152-166.
- [14] Kang KA, Piao MJ, Kim KC, et al. Fisetin attenuates hydrogen peroxide-induced cell damage by scavenging reactive oxygen species and activating protective functions of cellular glutathione system [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2014, 50(1): 66-74.
- [15] Singh A, Kukreti R, Saso L, et al. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2019, 24(8): 1583.