

多巴胺能神经元保护的研究进展

罗彦妮(综述) 沈岳飞(审校)

【关键词】 多巴胺; 多巴胺能神经元; 神经保护; 帕金森病

doi:10.3969/j.issn.1009-6574.2009.02.027

Progress in protection of dopaminergic neurons Luo Yan-ni, Shen Yue-fei. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

【Key words】 Dopamine; Dopaminergic neurons; Neuroprotection; Parkinson's disease

一提到多巴胺(dopamine, DA)能神经元,我们就会想到帕金森病(Parkinson's Disease, PD)。人们最初是先认识了PD,而后在对其发病机制的不断探索中,才开始慢慢解开DA能神经元的神秘面纱,并确立了DA能神经元在PD发病机制的中心地位。近年来,人们对PD的治疗逐渐倾向于神经保护治疗,除了保护DA受体、抑制DA降解及干细胞替代治疗等,保护DA能神经元是关键措施。本文先简单介绍DA能神经元的解剖生理基础,并就目前DA能神经元保护的热点研究做一综述。

1 DA能神经元的解剖与神经生理学

DA能神经元,即以合成分泌单胺类神经递质DA为主的神经元,它广泛分布在中枢神经系统,大部分DA能神经元(80%)位于中脑黑质致密部,少部分分布在视网膜、嗅球、脑室附近和自主神经节。DA能神经元发出神经纤维投射到端脑、间脑、脑干及脊髓,形成4个主要的投射通路,包括黑质纹状体通路、中脑边缘皮质系统、结节漏斗系统和下丘脊髓束,分别控制运动、情感、感知、行为和垂体分泌功能,而这些作用是与神经递质DA密切相关的。DA主要在DA能神经元的胞质中合成,血液中的酪氨酸被摄取进入胞质后,在限速酶酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)催化作用下生成左旋多巴,后者脱羧生成DA,胞浆中的DA被突触囊泡膜上的单胺转运体摄取储存在囊泡内,以胞裂外排形式释放到突触间隙,与受体结合后发挥作用。DA合成主要受限速酶TH调节:一是TH可被蛋白激酶A、蛋白激酶C、钙/钙调节蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ(calcium calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ, CaMK Ⅱ)等激酶磷酸化,酶活性增加;二是细胞内腺苷酸环化酶活力增高,cAMP合成增多,TH基因的cAMP反

应元件迅速对此做出反应,进而使其mRNA表达增多,从而增加胞质内TH的含量。

2 导致脑内DA能神经元受损,使其合成分泌功能减低甚至丧失的可能因素

DA能神经元的发现源于对PD的研究,自1817年英国医师詹姆斯·帕金森首次正式报道了该疾病的临床特征,大量的尸检报告发现PD患者的黑质含黑色素细胞数目减少,20世纪60年代后期运用荧光和免疫组化技术发现这些细胞实际上是DA能神经元,从而得知PD的病理生理基础是DA能神经元变性丢失,导致DA合成分泌减少。那么,有哪些因素造成DA能神经元变性丢失,目前仍在探索中,有研究认为与年龄、氧化应激、基因易感性、炎症反应、细胞凋亡等因素有关。

3 如何保护DA能神经元,保证脑内DA分泌量

3.1 抗氧化剂

包括单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)抑制剂、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dimutase, SOD)及过氧化氢酶(catalase, CAT)。

3.1.1 MAO是脑内DA酶解失活的主要代谢酶,有A和B两种亚型,DA在MAO酶解作用下产生大量氧自由基,从而氧化损伤DA能神经元,因此抑制MAO活性,减少DA酶解,可以保护DA能神经元。丙炔苯丙胺是第一代MAO-B抑制剂,在体外细胞研究中,戚晨等^[1]发现丙炔苯丙胺可以通过减少DA能神经元活性氧的生成,促进GSH合成而抑制细胞氧化应激。

3.1.2 GSH是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽类硫基物质,在脑内它既可以与嗜电子毒物结合,阻断毒性化合物对细胞的损害,还可以作为重要的还原剂,保护细胞免遭氧化损伤。外界补充GSH不易透过细胞膜,但可以通过提高内源性GSH的含量起到抗氧化作用,Liang等^[2]研究发现新一代亲脂性锰卟啉AEOL11207可以透过血脑屏障,提高细胞内GSH的含量,降低SOD活性,减少4-羟壬烯醛

基金项目:广西自然科学基金资助项目(桂科自0832140)

作者单位:530021 广西医科大学第一附属医院神经内科

作者简介:罗彦妮(1981-),女,硕士,医师。研究方向:帕金森病、神经再生。

(4-hydroxynonenal, 4-HNE)生成和3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3-NT)释放而抑制中脑细胞脂质过氧化反应。谷胱甘肽乙酯(glutathione ethyl ester, GEE)作为合成GSH的前体物质,较GSH更易透过细胞膜,经过一系列脱脂反应生成GSH。Zeevalk等^[3]发现不管是在体外细胞还是体内动物模型,随着GEE浓度增高GSH合成增加,且GEE作用比GSH单独作用时更能抑制1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)引起的细胞氧化应激,由此可见中脑内GSH合成需要GEE的参与,同时补充GEE能更好地发挥GSH抗氧化、保护DA能神经元的作用。

3.1.3 线粒体呼吸链中清除自由基的酶亦被认为有DA能神经元保护作用,其中锰超氧化物歧化酶(MnSOD)和过氧化氢酶(CAT)在抗细胞氧化应激中起重要作用。Peng等^[4]通过体外培养DA能神经细胞株及胚胎中脑细胞,将盐溶性锰复合物EUK-134、EUK-189作用于这两种细胞,发现二者可以模拟MnSOD和CAT作用,清除细胞内过多的自由基,起到DA能神经元保护作用。

3.2 血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的DA能神经元保护作用 HO-1是血红素加氧酶的同工酶,即氧化应激诱导型。HO-1代谢血红素形成一氧化碳(carbon monoxide, CO)、游离铁(Fe^{2+})和胆绿素,胆绿素进一步还原生成胆红素。在非神经组织研究中发现CO、 Fe^{2+} 和胆红素是重要的生物效应分子,其中CO具有抗炎、抗凋亡作用^[5-6];胆红素能有效保护细胞膜抵抗脂质过氧化,其抗氧化能力甚至超过 V_E 和 V_C ^[7]; Fe^{2+} 有促氧化促炎症作用,但许多体外模型研究证实实在HO-1被诱导而活性增高的同时,铁蛋白的水平也同时升高,后者与 Fe^{2+} 结合,减少铁介导的细胞毒性^[8]。因此,HO-1的活性增强对组织细胞有保护效应,许多研究证实了这一效应,如将转染有HO-1基因的病毒载体移植入体内可以抑制缺氧引起的肺损伤^[9]、肝移植术后肝脏再灌注损伤^[10]及动脉粥样硬化的进展^[11],HO-1表达增高亦可以保护星型胶质细胞对抗血红素代谢引发的氧化损伤^[12]。那么HO-1对DA能神经元是否有保护效应,是如何保护呢?

Hung等^[13]证实了HO-1对DA能神经元有保护作用,在MPTP作用前或同时给予重组有人HO-1基因的腺病毒发现:活体内表达增强的HO-1可以减轻1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridium ion, MPP⁺)毒性作用,增加黑质DA能神经元存活数目,提高纹状体内DA

含量及减少黑质内炎症因子(白介素-1、肿瘤坏死因子)的产生;活体外HO-1显著减少TH表达阳性细胞的死亡率,还可以维护细胞轴突的正常形态。该研究除了证实了HO-1高表达通过抗氧化、抗炎反应来保护DA能神经元外,更为重要的一点是发现HO-1可以增强DA能神经元源性神经生长因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)和DA能神经元周围胶质细胞的胶质源性神经生长因子(glia-derived neurotrophic factor, GDNF)的表达,说明HO-1保护DA能神经元效应是多途径的。内源性HO-1仅存在于小部分神经元和胶质细胞,通过诱导激活内源性HO-1,增加其表达量同样可以保护DA能神经元,而有此诱导作用的有咖啡因^[14]和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)^[15]。

3.3 神经营养因子对DA能神经元的保护 研究显示,DA能神经元的发育、分化受多种因子如BDNF、GDNF等神经营养因子调控。GDNF主要在胶质细胞表达,营养神经元,有关GDNF保护DA能神经元的研究较多,保护效果确切^[16],但其保护机制非单一因素,目前尚在研究中。减轻氧化应激是其机制之一,可以抑制DA能神经元氧化应激标志物4-HNE的产生^[17]。当抑制细胞内蛋白合成时,GDNF未发挥保护作用^[18],那么GDNF的保护作用是否与蛋白合成增多有关,在GDNF作用的同时另外途径增加蛋白的合成是否能增强GDNF的保护作用,有待进一步研究。

3.4 激素的保护作用

3.4.1 雌激素 因其亲脂性和小分子量的特点,由外周性腺分泌后随血液循环能较易通透血脑屏障,特异性与细胞核受体结合调控基因的转录,也与质膜上的特异性的受体结合激活细胞内信号转导,在中枢神经系统内通过多种机制发挥神经保护作用。17 α -雌二醇和17 β -雌二醇可以拮抗抗氧化性除草剂百草枯对PC12细胞的氧化应激反应^[19],能显著减少谷氨酸、过氧化氢、超氧阴离子引起的DA能神经元凋亡,且这种保护作用不被雌激素受体拮抗剂ICI 182780所阻断,说明雌激素的抗氧化作用与受体途径无关^[20]。最近发现雌激素能激活胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)系统,IGF-1拮抗剂可以阻断17 β -雌二醇对PD大鼠黑质DA能神经元的保护作用^[21]。雌激素还能对抗神经毒素诱发的DA能神经元凋亡,其抗凋亡作用是通过作用于雌激素受体后,抑制凋亡效应分子半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)下游的蛋白激活物-1(activator protein-1, AP-1)位点的转录,阻断C

一 Jun 氨基末端激酶 (C-Jun amino-terminal kinase, JNK)/AP-1 级联反应来实现的^[22]。

3.4.2 褪黑素 (melatonin, MT) 是一种主要由松果腺分泌的激素, 主要作用部位是脑, 脑中 MT 的含量为血清中的 5 倍。长期以来, 人们认为 MT 的生物活性主要是调节昼夜节律、睡眠-觉醒生物节律相位转换, 改善睡眠。随着研究深入, 发现 MT 还能对抗氧化应激, 保护线粒体, 抗凋亡, 调节免疫, 延缓衰老, 又易于穿越血脑屏障, 能够保护神经元免于氧化应激损伤^[23]。自 20 世纪 90 年代初, MT 的 DA 能神经元保护作用受到广泛关注, 它通过清除氧自由基^[24], 恢复 TH 活性^[25], 提高线粒体复合体 I 的活力^[26]等多种途径保护 DA 能神经元。

3.5 尿酸对 DA 能神经元的保护作用 尿酸是人体嘌呤代谢的终产物, 与痛风联系在一起, 但同时它也是一种天然的抗氧化剂。早在 20 世纪 80 年代, 就有科学家推测尿酸可能有抗氧化、抑制氧自由基损伤细胞膜的作用^[27], 在后续的研究中证实了这一假说^[28], 并指出其抗氧化作用主要表现为抑制过氧化硝酸盐介导的硝酸化反应、增强 SOD 活性及对 Fe²⁺ 的强螯合力。流行病学研究发现血尿酸水平升高可以明显减低 PD 的发病率, 尿酸水平高患 PD 的概率下降 55%^[29]; 且尸解发现 PD 患者黑质中尿酸水平显著低于对照组, 减低 54%^[30], 提示血尿酸对 PD 可能有保护作用, 而这一作用的主要靶点是黑质 DA 能神经元。尿酸可以减轻鱼藤酮对 DA 能神经元的氧化损伤作用^[31], 腹腔内注射一定剂量的尿酸不仅可以提高血尿酸浓度, 也可以增加黑质内尿酸含量, 因此能保护 DA 能神经元免遭 6-羟基多巴胺 (6-Hydroxydopamine, 6-OHDA) 的损害^[32]。目前关于尿酸保护 DA 能神经元的机制尚在研究中, 除了抗氧化作用, 研究发现尿酸的前体物质腺苷、腺嘌呤、鸟苷、鸟嘌呤、黄嘌呤可以影响 DA 的合成代谢^[33], 而尿酸前体物质肌苷对 MPTP 所致的 PD 小鼠有神经保护作用^[34], 这不禁令人思考尿酸的保护作用不仅仅与它本身有关, 整个嘌呤代谢途径中的不同产物亦有潜在的保护作用。

3.6 中药及中药提取物 绿茶多酚 (绿茶提取物) 的主要成分是黄烷醇类的多种儿茶素, 其中以表没食子儿茶素没食子酸酯含量最高, 有清除自由基及抗氧化作用^[35]。在细胞培养和动物实验中均已证实绿茶多酚具有 DA 能神经元保护作用, 其保护机制主要有: (1) 增强 SOD 和 CAT 活性, 促进抗氧化作用^[36]; (2) 抑制 DA 转运体活性, 减少 MPP⁺ 进入 DA 能神经元胞质内^[37]; (3) 保护线粒体膜、抑制 caspase-3 活性及凋亡前体蛋白的表达^[38]; (4) 减弱小胶质

细胞活性, 减轻细胞炎性反应^[39]。文献报道具有 DA 能神经元保护作用的中草药还有人参皂甙 Rg1、何首乌、番荔枝酰胺的衍生物 FLZ 及花椰菜的提取物莱菔硫烷 (sulforaphane) 等。

4 结论

由于引起 DA 能神经元变性死亡的病因非单一因素, 且目前很多研究仍就这一难题寻求更令人信服的答案, 所以保护 DA 能神经元只能从已知的多个相关致病因素进行干预。虽然这方面的很多研究还处于实验阶段, 但其结果有助于更好的认识与 DA 能神经元有关的神经科疾病如 PD 的发病机制, 也为将来 DA 能神经元保护的进一步研究打下坚实的基础。

参考文献

- [1] 戚辰, 刘振国, 范国华, 等. 丙炔苯丙胺对多巴胺能神经细胞的保护机制[J]. 上海医学, 2007, 30(5): 315-318.
- [2] Liang LP, Huang J, Fulto R, et al. An orally active catalytic metalloporphyrin protects against 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine in viro[J]. Neurosci, 2007, 27(16): 4326-4333.
- [3] Zeevalk GD, Sonsalla MPK, Bernard LP. Characterization of intracellular elevation of glutathione (GSH) with glutathione Monoethyl ester and GSH in brain and neuronal cultures; relevance to Parkinson's disease[J]. Exp Neurol, 2007, 203(2): 512-520.
- [4] Peng J, Stevenson FF, Doctrow SR. Superoxide dismutase/catalase mimetics are neuroprotective against selective paraquat-mediated dopaminergic neuron death in the substantia nigra[J]. Biol Chem, 2005, 280(32): 29194-29198.
- [5] Petrache I, Otterbein LE, Alam J, et al. Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α -induced apoptosis in culture fibroblasts[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 278(2): L312-L319.
- [6] Sawle P, Foresti R, Mann BE, et al. Carbon monoxide releasing molecules (co-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages[J]. Br J Pharmacol, 2005, 145(6): 800-810.
- [7] Kapitulnik J. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties[J]. Mol Pharmacol, 2004, 66(4): 773-779.
- [8] Vile GF, Tyrrell RM. Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin[J]. Biol Chem, 1993, 268(20): 14678-14681.
- [9] Otterbein LE, Kolls JK, Mantell LL, et al. Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury[J]. Clin Invest, 1999, 103(7): 1047-1054.
- [10] Amersi F, Buelow R, Kato H, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury[J]. Clin Invest, 1999, 104(11): 1631-1639.
- [11] Juan SH, Lee TS, Tseng KW, et al. Adenovirus-mediated

- heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Circulation*, 2001, 104(13): 1 519-1 525.
- [12] Teng ZP, Chen J, Chau LY, et al. Adenoviral transfer of the heme oxygenase-1 gene protects striatal astrocytes from heme-mediated oxidative injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 17(2): 179-187.
- [13] Hung SY, Liou HC, Kang KH, et al. Over-expression of Heme oxygenase-1 protects dopaminergic neurons against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity[J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 76(6): 1 564-1 575.
- [14] Hwang YP, Jeong HG. The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 via the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine-derived oxidative stress[J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(17): 2 655-2 662.
- [15] Salinas M, Diaz R, Abraham NG, et al. Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner[J]. *Biol Chem*, 2003, 278(16): 13 898-13 904.
- [16] Hoffer BJ, Hoffman A, Bowenkamp K, et al. Glial-cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo[J]. *Neurosci Lett* 1994, 182(1): 107-111.
- [17] Smith MP, Cass WA. GDNF reduces oxidative stress in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's Disease[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 412(3): 259-263.
- [18] Kearns CM, Cass WA, Smoot K, et al. GDNF protection against 6-OHDA, time dependence and requirement for protein synthesis[J]. *Neurosci*, 1997, 17(18): 7 111-7 118.
- [19] Gelinas S, Bureau G, Valastm B, et al. Alpha and beta estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress[J]. *Neurotox Res*, 2004, 6(2): 141-148.
- [20] Sawada H, Ibi M, Kihara T, et al. Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death[J]. *Neurosci Res*, 1998, 54(5): 707-719.
- [21] Quesada A, Micevych PE. Estrogen interacts with the IGF-1 system to protect nigrostriatal dopamine and maintain motoric behavior after 6-hydroxydopamine lesions[J]. *Neurosci Res*, 2004, 75(1): 107-116.
- [22] Sawada H, Ibi M, Kihara T, et al. Estradiol protects dopaminergic neurons in a MPP+ Parkinson's disease model[J]. *Neuropharmacology*, 2002, 42(8): 1 056-1 064.
- [23] Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, et al. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore; a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin[J]. *FASEBJ*, 2004, 18(7): 869-871.
- [24] Miller JW, Selhub J, Joseph JA. Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation; protective effects of O-methylation and melatonin[J]. *Free Radic Biol Med*, 1996, 21(2): 241-249.
- [25] Jin BK, Shin DY, Jeong MY, et al. Melatonin protects nigral dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) neurotoxicity in rats[J]. *Neurosci Lett*, 1998, 245(2): 61-64.
- [26] Dabbeni-Sala F, Di Santo S, Franceschini D, et al. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rats; a role for mitochondrial complex I activity[J]. *FASEB J*, 2001, 15(1): 164-170.
- [27] Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer; a hypothesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(11): 6 858-6 862.
- [28] Hooper DC, Scott GS, Zborek A, et al. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis[J]. *FASEB J*, 2000, 14(5): 691-698.
- [29] Weisskopf MG, O'Reilly E, Chen H, et al. Plasma urate and risk of Parkinson's disease[J]. *Am J Epidemiol*, 2007, 166(5): 561-567.
- [30] Church WH, Ward VL. Uric acid is reduced in the substantia nigra in Parkinson's disease; effect on dopamine oxidation[J]. *Brain Res Bull*, 1994, 33(4): 419-425.
- [31] Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, et al. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease[J]. *Neurochem*, 2002, 80(1): 101-110.
- [32] 王丽君, 罗蔚锋. 尿酸对帕金森病神经保护作用的研究[D]. 苏州大学, 2008.
- [33] Loeffler DA, Camp DM, Juneau PL, et al. Purine-induced alteration of dopamine metabolism in rat pheochromocytoma PC12 cells[J]. *Brain Res Bull*, 2000, 52(6): 553-558.
- [34] 姚庆华, 高国栋. 肌苷对帕金森小鼠模型的神经保护作用[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(2): 141-145.
- [35] Salah N, Miller NJ, Paganga G, et al. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 322(2): 339-346.
- [36] Levites Y, Weinreb O, Maor G, et al. Green tea polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydroquinoline-induced dopaminergic neurodegeneration[J]. *Neurochem*, 2001, 78(5): 1 078-1 082.
- [37] Pan T, Fei J, Zhou X, et al. Effects of green tea polyphenols on dopamine uptake and MPP+-induced dopamine neuron injury[J]. *Life Sci*, 2003, 79(9): 1 073-1 083.
- [38] Hou RR, Chen JZ, Chen H, et al. Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on paraquat-induced apoptosis in PC12 cells[J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(1): 22-30.
- [39] Li R, Peng N, Du F, et al. Epigallocatechin gallate protects dopaminergic neurons against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity by inhibiting microglial cell activation[J]. *South Med Univ*, 2006, 26(4): 376-380.

(收稿日期: 2009-01-02)