

应用 ERKO 小鼠研究雌激素受体在 MPTP 致帕金森病模型中的作用

王 强¹, 王 宇², 钱文溢², 王 军², 肖 杭², 董海蓉³, 丁海霞^{4*}

(¹ 江苏大学基础医学与医学技术学院预防医学系, 江苏 镇江 212013; ² 南京医科大学公共卫生学院神经毒理研究室, 江苏 南京 210029; ³ 南京医科大学第一附属医院神经内科, ⁴ 老年神经内科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨雌激素受体(estrogen receptors, ERs)在帕金森病(Parkinson's disease, PD)中的作用特点。方法:应用经典化学毒素 MPTP 腹腔注射制备小鼠 PD 模型, WT、 α ERKO 和 β ERKO 雄性小鼠随机分为 Saline 组和 MPTP 组, 爬竿试验观察行为学改变, 荧光定量 PCR 法检测纹状体和中脑 ER α 、ER β 、TH、DAT 和 VMAT2 mRNA 表达的变化。结果:与 WT 相比, α ERKO 小鼠中多巴胺缺失程度更大, 爬竿试验显示 α ERKO 小鼠更早出现行为学异常。 α ERKO 和 β ERKO 小鼠中脑 TH、DAT 和 VMAT2 mRNA 表达均降低。WT 小鼠 MPTP 染毒致 PD 模型后, 纹状体和中脑 ER α mRNA 表达增加, ER β mRNA 表达降低。MPTP 致 PD 模型后, α ERKO 和 β ERKO 小鼠 TH 和 DAT mRNA 表达变化情况与 WT 小鼠不同, β ERKO 小鼠 VMAT2 mRNA 表达变化情况与 WT 小鼠相同, 但 α ERKO 小鼠 VMAT2 mRNA 表达变化情况与 WT 小鼠不同。结论:ERs 在黑质纹状体 DA 系统中有神经保护作用, ER α 亚型在此过程中发挥着更重要的作用。

[关键词] 雌激素受体; 基因敲除小鼠; 帕金森病

[中图分类号] R742.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)12-1641-05

Role of estrogen receptors in ERKO mice with Parkinson's disease

WANG Qiang¹, WANG Yu², QIAN Wen-yi², WANG Jun², XIAO Hang², DONG Hai-rong³, DING Hai-xia^{4*}

(¹Department of Preventive Medicine, School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013; ²Laboratory of Neurotoxicology, School of Public Health, NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Neurology, ⁴Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** Estrogen-mediated neuroprotection in the nigrostriatal dopamine system, depend on the estrogen receptors (ERs), is now widely accepted. In the present study, the role of the two ERs in MPTP toxicity was investigated. **Methods:** Adult male wild type (WT), ERs knock out (α ERKO and β ERKO) mice were treated with MPTP. To determine the degree of bradykinesia, pole test was performed. Quantitative real time PCR was used to examine selective genes of the dopaminergic system. **Results:** Our data demonstrated that administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrapyridine (MPTP, 11 mg/kg) to WT mice led to depletion of DA, DOPAC and HVA. The degree of DA depletion in the α ERKO mice was greater than WT mice. Behavioral testing showed that MPTP-injected mice exhibited motor deficits in the pole test. After 2 days of MPTP treatment, a significant prolongation of T-LA was observed in α ERKO mice. We also observed that mRNA expression of ER α was significantly increased in the striatum and midbrain in MPTP-treated animals, while the expression of ER β decreased. The expression of tyrosine hydroxylase (TH), dopamine transporter (DAT) and vesicular monoamine transporter subtype 2 (VMAT2) mRNA were decreased in α ERKO and β ERKO mice. The down-regulation of TH and DAT mRNAs by MPTP in the midbrain acted on both ER α and ER β , whereas MPTP treatment lead to decreased mRNA expression of VMAT2 via ER α . **Conclusion:** Our results suggested that estrogen acting via ERs is an important regulative factor for the nigrostriatal dopamine system, ER α may play a more significant role.

[Key words] estrogen receptors; knock out; Parkinson's disease

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1641-1645]

[基金项目] 国家自然科学基金(81072329); 中国博士后基金(20110491450); 江苏省博士后基金(1101027c); 江苏省六大人才高峰(2009026); 江苏大学高级人才科研启动基金(12JDG083)

*通讯作者, E-mail: dhxnjmu@126.com

帕金森病^[1](Parkinson's disease, PD)是一种进行性神经系统退行性疾病,其主要的病理特征是黑质多巴胺(dopamine, DA)神经元进行性死亡、存活神经元的胞浆内出现路易小体、局部胶质细胞增生和纹状体 DA 缺失。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrapyridine, MPTP)是经典的 PD 造模生物毒素, MPTP 损伤的 PD 动物模型由于其在神经生化、病理和行为学方面与人类 PD 的极大相似性^[2-3],因此是目前最常用的 PD 模型之一。酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是 DA 生物合成途径的关键酶。神经元末梢释放的 DA 被利用后,约有 3/4 的 DA 由位于突触前膜的多巴胺转运体(dopamine transporter, DAT)转运至细胞内,进入胞质的 DA 再由囊泡膜上的 II 型囊泡单胺转运体(vesicular monoamine transporter subtype 2, VMAT2)转运至囊泡内,以待再循环。

大量研究显示,雌激素及雌激素受体(estrogen receptors, ERs)在 PD 发生发展过程中发挥重要作用^[3]。雌激素具有神经保护作用;可以避免 MPTP 诱导的 DA 细胞死亡^[3];能够阻断 MPTP 诱导的纹状体 DA 及其代谢产物丧失及黑质区 TH、DAT 和 VMAT2 mRNA 表达水平的降低^[4]。雌激素通过 ERs 发挥作用,研究发现 ERs(ER α 和 ER β)均表达于小鼠纹状体和黑质中^[5]。

本研究首先用 MPTP 建立小鼠 PD 模型,然后通过比较雌激素受体基因敲除(α ERKO 和 β ERKO)小鼠 PD 模型行为学以及相关基因的表达,探索 ER α 和 ER β 在 PD 中的作用特点,以期对雌激素及雌激素受体在 PD 神经保护作用中的机制研究提供进一步的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

WT、 α ERKO 和 β ERKO^[6]各亚型雄性 C57BL/6 小鼠各 8 只,3 个月龄左右,体重 20~25 g,饲养在南京医科大学实验动物中心 SPF 级屏障环境内,温度 20~25℃,湿度 40%~70%,自由采食和饮水,垫料 1 周更换 2 次,饲料、垫料和饮水均经过高温高压灭菌处理后使用。动物试验在上午 9:00~12:00 进行。

MPTP-HCl(Sigma 公司,美国),TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies 公司,美国),Prime-ScriptTM RT reagent Kit (TaKaRa 公司,日本),Eva-GreenTM(Biotium, CA 公司,美国),TaKaRa TaqTM Hot Start Version(TaKaRa 公司,日本)。ABI7300 荧光定

量 PCR 仪(ABI 公司,美国),DU-800 紫外可见分光光度计(Beckman 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

WT、 α ERKO 和 β ERKO^[6]各亚型雄性小鼠随机分成两组:Saline 组(生理盐水对照组)和 MPTP 组;以无菌生理盐水溶解 MPTP 后,按 11 mg/kg 的剂量给小鼠腹腔注射 0.1 ml,每天 2 h 间隔注射 4 次,连续 5 d。最后 1 次给药后 7 d 时处死小鼠进行试验。

1.2.2 观察指标及检测方法

爬竿试验:自制直径 1 cm、高 50 cm 的直木杆,杆顶部有一小木球(直径 1.2 cm),外面覆盖纱布以防止小鼠打滑。小鼠被头向上放于杆顶端,记录两个时间:小鼠从开始运动到完全转为头向下的时间(T-turn)和下到杆底的总时间(T-LA)。试验前训练,试验时检测 3 次,每次检测间隔 1 min,取最短时间记录。时间限制在 60 s,否则给予引导。

纹状体和中脑 ERs 基因表达以及中脑 TH、DAT、VMAT2 mRNA 的表达:小鼠断头取脑,冰冷生理盐水清洗,于冰上分离中脑,迅速放入液氮,-80℃保存。TRIzol 法提取组织中总 mRNA,按照 Prime-ScriptTM RT reagent Kit 反转录反应试剂说明书对提取的 mRNA 进行反转录成 cDNA。ABI7300 荧光定量 PCR 仪上进行荧光定量 PCR 实验^[7]。引物序列参考文献报道^[8](表 1)。

1.3 统计学方法

数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS13.0 统计学软件进行统计学分析,两组间比较用 *t* 检验,多组间的比较用方差分析(ANOVA)进行检验,多组间两两比较采用 *q* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

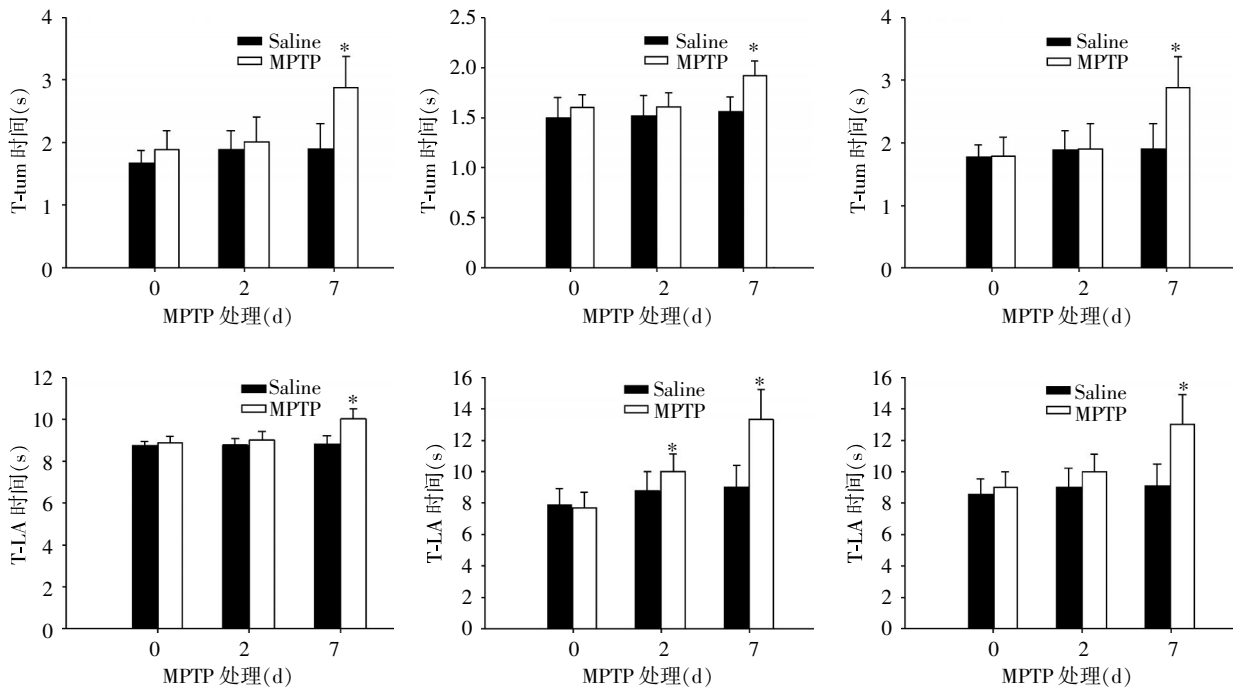
2.1 MPTP 致小鼠 PD 模型行为学改变

小鼠注射 MPTP 几分钟后,即开始颤抖、竖毛、牙齿震颤,尖叫并伴有流涎、流泪等,运动减慢且不稳。半小时后逐渐恢复正常,持续注射 MPTP 后,这些症状都逐渐消退。

本实验以爬竿时间为指标考察小鼠行为学变化。与 Saline 组比较, MPTP 处理 2 d 后, WT 和 β ERKO 小鼠爬竿试验无显著异常, α ERKO 小鼠 T-turn 指标无统计学差异,但 T-LA 指标显著延长 (*P* < 0.05)。MPTP 注射 7 d 后 WT、 α ERKO 和 β ERKO 小鼠爬竿试验时间均显著延长(T-turn 和 T-LA, *P* < 0.05, 图 1)。

表 1 小鼠 ER α 、ER β 、TH、DAT、VMAT2、18s rRNA 引物序列

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
ER α	GCCTCTGGCTACCAATTAT	CTTCAACATTCTCCCTCC
ER β	GTCAGGGTGGTTGGGTTGTGG	ATCGCGTCACTTTCCTTTTCC
TH	GGTATACGCCACGCTGAAGG	TAGCCACAGTACCGTTCAGAG
DAT	CTTCTCCTCTGGCTTCGTTGT	CAGGGTAGATGATGAAGATCAACC
VMAT2	GCGAGCATCTCTTATCTCATTGG	AAATGCTGATCCCAACAACATATCA
18s rRNA	CTTAGTTGGTGGAGCGATTTC	GCTGAACGCCACTTGTCC



A, D: WT 小鼠; B, E: α ERKO 小鼠; C, F: β ERKO 小鼠。与 Saline 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠爬竿试验结果

Figure 1 Effects of MPTP on the motor activity in WT, α ERKO and β ERKO mice

2.2 MPTP 致 WT 小鼠 PD 模型纹状体和中脑 ERs 基因表达的变化

与 Saline 组比较, WT 小鼠 MPTP 染毒致 PD 模型后, 纹状体和中脑 ER α mRNA 表达增加, ER β mRNA 表达降低($P < 0.05$, 图 2)。

2.3 WT、 α ERKO 和 β ERKO 小鼠中脑 TH、DAT 和 VMAT2 基因表达变化的比较

与 WT 小鼠比较, α ERKO 和 β ERKO 小鼠 TH、DAT 和 VMAT2 mRNA 表达均降低($P < 0.05$, 图 3)。

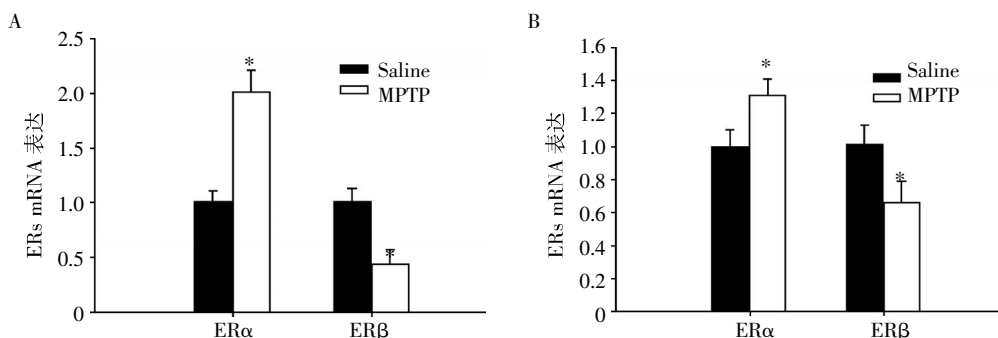
2.4 MPTP 致 WT、 α ERKO 和 β ERKO 小鼠 PD 模型中脑 TH、DAT 和 VMAT2 基因表达变化的比较

采用荧光定量 PCR 实验, 观察 WT、 α ERKO 和 β ERKO 小鼠 MPTP 染毒制作 PD 模型后中脑 TH、DAT 和 VMAT2 mRNA 表达变化。结果显示, 与 Saline 组比较, MPTP 染毒后, WT 小鼠中脑 TH、

DAT 和 VMAT2 基因表达水平均降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图 4)。 α ERKO 和 β ERKO 小鼠中脑组织中 TH 和 DAT mRNA 表达不变($P > 0.05$, 图 4), 这与 WT 组结果(降低)不同。 α ERKO 小鼠 VMAT2 mRNA 表达没有影响($P > 0.05$), 而 β ERKO 小鼠 VMAT2 mRNA 表达降低($P < 0.05$), 与 WT 组结果相同。

3 讨论

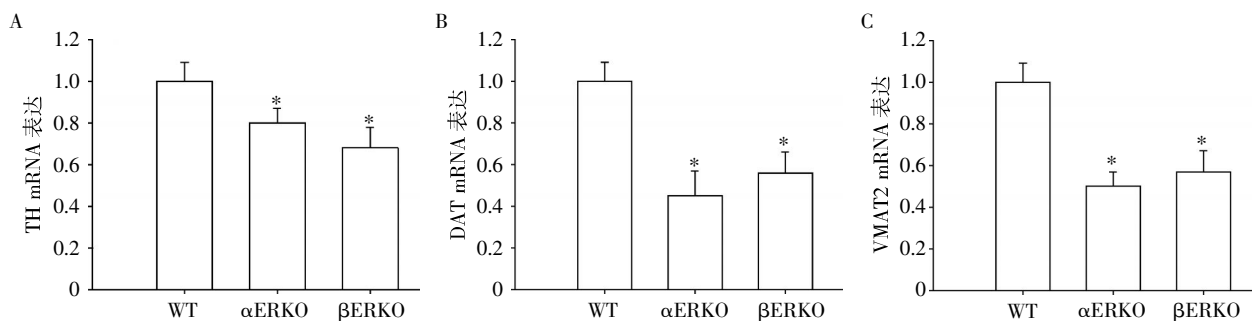
PD 一种常见的中枢神经系统退行性疾病, 主要见于中老年人, 本病的主要病理变化是黑质致密部的 DA 能神经元变性、丢失, 从而导致黑质纹状体 DA 通路变性, 纹状体 DA 含量显著降低^[1]。DA 利用 MPTP 诱导 C57BL 小鼠制作的 PD 模型, 是目前最常用的 PD 模型之一。研究报道发现 MPTP 致 PD 小



A:纹状体;B:中脑。与 Saline 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 荧光定量 PCR 检测 WT 小鼠 MPTP 染毒后纹状体和中脑 ER α 和 ER β 基因表达的变化

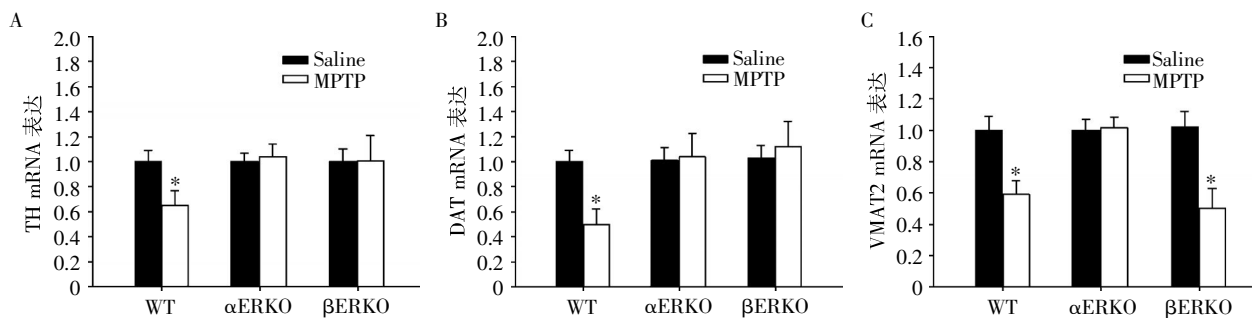
Figure 2 Quantitative real-time PCR analysis of the expression of ER α and ER β in the striatum (A) and the midbrain (B) of WT mice after MPTP treatment



与 WT 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 荧光定量 PCR 检测各组小鼠中脑 TH、DAT 和 VMAT2 基因表达的变化

Figure 3 Quantitative real-time PCR analysis of the expression of TH, DAT and VMAT2 mRNA in the midbrain of WT, α ERKO and β ERKO mice



与 Saline 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 荧光定量 PCR 检测 WT、 α ERKO 和 β ERKO 小鼠 MPTP 染毒后中脑 TH、DAT 和 VMAT2 基因表达的变化

Figure 4 Quantitative real-time PCR analysis of the expression of TH, DAT and VMAT2 in the midbrain of WT, α ERKO and β ERKO mice after MPTP treatment

鼠模型中, 中脑 TH、DAT 和 VMAT2 的基因表达显著降低^[8]。

雌激素在维持黑质纹状体 DA 系统的功能完整中发挥重要作用。雌激素可以通过拮抗细胞凋亡、氧化应激和神经营养等方式对中脑 DA 能神经元产生影响, 从而能预防或延缓 PD 的发生、缓解 PD 的症状。本研究应用 ERKO 小鼠比较分析雌激素受体(ER α 和 ER β)在雌激素对 PD 神经保护作

用中的特点。当敲除 ER α 或 ER β 后, 小鼠中脑 TH、DAT 和 VMAT2 mRNA 表达均降低。WT 小鼠 MPTP 染毒致 PD 模型后, 纹状体和中脑 ER α mRNA 表达增加, ER β mRNA 表达降低。表明 ER α 和 ER β 在 MPTP 致 PD 神经保护作用可能发挥不同的生理作用。

研究发现 ER α 特异性激动剂 PPT 和选择性雌激素受体调节剂雷洛昔芬(raloxifene)对 MPTP 诱导

的 PD 具有神经保护作用^[9]。 α ERKO 小鼠纹状体 DA 神经元对 MPTP 毒性更易感^[3]。研究爬竿试验显示 α ERKO 小鼠更早出现行为学异常,这提示 ER α 亚型在 MPTP 致 PD 模型中发挥着重要作用。ER α 激动剂(PPT 和 HPTE)能够阻断 MPTP 诱导的 DA 减少,而 ER β 激动剂(DPN)作用不明显^[10]。表明在 MPTP 诱导 PD 中 ER α 比 ER β 可能更重要^[11],但 ER β 在 DA 代谢中可能发挥重要作用^[3]。

关于雌激素通过 ERs 发挥 DA 能神经保护作用的机制,雌激素既可以通过 ERs 的基因组途径^[3],也可以通过“膜反应”——与膜受体结合,快速的非基因组作用途径。ERs 可以激活 MAPK/ERK 信号通路^[12],也可以通过 Akt/GSK3 β /Bcl2 和 BAD 包含在内的 PI3K 激活信号通路发挥作用^[9]。除了 ER α 和 ER β ,G 蛋白偶联受体 30(G protein-coupled receptor 30,GPR30)被证实为新型雌激素受体^[13],也表达于纹状体、黑质、海马等神经系统中,但 GPR30 在 DA 能神经元中的作用目前尚不清楚。

MPTP 致 PD 模型后, α ERKO 和 β ERKO 小鼠 TH 和 DAT mRNA 表达变化情况与 WT 小鼠不同, β ERKO 小鼠 VMAT2 mRNA 表达变化情况与 WT 小鼠相同,但 α ERKO 小鼠与 WT 小鼠不同。提示 MPTP 影响小鼠中脑 TH 和 DAT mRNA 的表达可能主要是通过 ER α 和 ER β ,而 VMAT2 通过 ER α 介导。ER α 和 ER β 与雌激素特异性结合,通过 ER 反应原件来调节基因的转录,研究报道发现与 ER α 和 ER β 作用的 ER 反应原件中的配体结合区序列不同,从而使 ER 通过 PI3K/Akt 信号通路途径在发挥神经保护作用过程中表现出不同的功能特点^[10],这可能会引起 TH、DAT 和 VMAT2 等 DA 能神经元相关基因表达的变化。

本文采用 MPTP 致小鼠 PD 模型后,小鼠行为学表现异常,进一步应用 α ERKO 和 β ERKO 小鼠模型观察了 ER α 和 ER β 在雌激素对 PD 神经保护作用中的特点,发现 ER α 亚型在 MPTP 致 PD 过程中的神经保护功能发挥着更重要的作用,但作用机制需要进一步探索。

[参考文献]

- [1] Xia R, Mao ZH. Progression of motor symptoms in Parkinson's disease[J]. *Neurosci Bull.* 2012,28(1):39-48
- [2] 王 刚, 郑 静. 6-OHDA 损毁帕金森大鼠模型和 MPTP 诱导帕金森小鼠模型比较[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2010,30(3):383-385
- [3] Bourque M, Dluzen DE, Di Paolo T. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease[J]. *Front Neuroendocrinol*,2009,30(2):142-157
- [4] Jourdain S, Morissette M, Morin N, et al. Oestrogens prevent loss of dopamine transporter (DAT) and vesicular monoamine transporter (VMAT2) in substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice[J]. *J Neuroendocrinol*,2005,17(8):509-517
- [5] Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, et al. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha[J]. *Endocrinology*, 2003,144(5):2055-2067
- [6] 丁海霞,王 强,王 宇,等. 应用 ERKO 小鼠观察雌激素对痛觉的影响及 ERs 的作用特点[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2012,31(12):1731-1736
- [7] Ding H, Wang Q, Liu J, et al. Alterations of gene expression of sodium channels in dorsal root ganglion neurons of estrogen receptor knockout (ERKO) mice induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)[J]. *Endocrine*,2012,42(1):118-124
- [8] Xu Z, Cawthon D, Mccastlain KA, et al. Selective alterations of gene expression in mice induced by MPTP[J]. *Synapse*,2005,55(1):45-51
- [9] Morissette M, Al Sweidi S, Callier S, et al. Estrogen and SERM neuroprotection in animal models of Parkinson's disease[J]. *Mol Cell Endocrinol*,2008,290(1-2):60-69
- [10] D'astous M, Morissette M, Di Paolo T. Effect of estrogen receptor agonists treatment in MPTP mice:evidence of neuroprotection by an ER alpha agonist [J]. *Neuropharmacology*,2004,47(8):1180-1188
- [11] Johnson ML, Ho CC, Day AE, et al. Oestrogen receptors enhance dopamine neurone survival in rat midbrain[J]. *J Neuroendocrinol*,2010,22(4):226-237
- [12] Raz L, Khan MM, Mahesh VB, et al. Rapid estrogen signaling in the brain[J]. *Neurosignals*,2008,16(2-3):140-153
- [13] Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling[J]. *Science*,2005,307(5715):1625-1630

[收稿日期] 2012-05-23