

茶多酚保护脑神经防止帕金森病 损伤作用及其分子机理*

赵保路**

(中国科学院生物物理研究所, 脑与认知国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 详细介绍了茶多酚保护脑神经防止 PD 损伤作用及其分子机理。家族遗传虽然是帕金森病(PD)的重要因素, 但主要与环境因素有关(大约 70%), 其中氧化应激在致病机理中发挥着重要作用。茶多酚的抗氧化作用和及饮后可以进入血液甚至穿越血脑屏障为其保护脑神经防止 PD 提供了重要条件。在细胞水平, 选择 6-OHDA 诱导的 PC12 和 SH-SY5Y 细胞作为细胞模型, 结果表明, 茶多酚预处理可明显减少细胞的凋亡率, 防止线粒体膜电位下降, 降低细胞内活性氧和钙离子累积。茶多酚还可以抑制 6-OHDA 诱导 NO 升高和 nNOS 与 iNOS 过量表达, 降低细胞内蛋白质结合硝基酪氨酸水平。在动物水平, 利用 6-OHDA 建立 PD 大鼠模型, 探讨茶多酚对其保护作用机制。结果发现, 茶多酚可以浓度和时间依赖性减轻 6-OHDA 诱导产生的旋转行为, 降低中脑和纹状体中 ROS 和 NO 含量、脂质过氧化程度、硝酸盐 / 亚硝酸盐含量、蛋白质结合硝基酪氨酸浓度, 同时降低 nNOS 和 iNOS 表达水平。茶多酚预处理可增加黑质致密部存活神经元, 减少凋亡细胞。上述实验结果证明, 口服茶多酚可以有效保护脑组织免于 6-OHDA 损伤引起的神经细胞死亡, 其保护作用可能是通过 ROS 和 NO 的途径减少过氧亚硝基的生成实现的。

关键词 帕金森病, 茶多酚, 自由基, 天然抗氧化剂

学科分类号 Q

随着社会老龄化趋势的进一步发展, 帕金森病(PD)的发病率和患病率也逐年增加。PD 在 55 岁以上的人群中的发病率为 1.4%, 而在 75 岁以上的人群中为 3.4%, 预计到 2010 年中国的 PD 患者将增加到 1 500 万。由于该病具有严重致残性、持续进展性以及目前为止治疗上的“无法根治性”, 直接导致大量的帕金森病患者丧失了日常生活、工作和学习能力, 给病人、家庭和社会都带来了沉重的负担。虽然世界各国对此进行了大量研究, 也对 PD 的发病机理有了一定认识, 但还没有确切可靠的药物阻断 PD 的发病进程, 现用的一些药物多具有毒副作用。因而在分子、细胞、动物水平上深入研究帕金森病的发病机理, 寻求有效的预防及治疗药物和方法, 不仅可以提高中老年人的生活质量, 减轻家庭和社会的负担, 更可以为人类在新世纪中破译脑的奥秘, 最终战胜脑疾病提供重要的线索和依据。

茶叶在中国和世界已有几千年栽种和饮用历

史。喝茶有助于健康已被广大人民所接受, 喝茶可以预防一些疾病也被流行病学研究证实。研究表明, 茶叶中对身体健康最有益的物质是具有很强抗氧化能力的茶多酚。茶多酚占茶叶干重的 30% 左右, 其结构如图 1 所示。茶多酚可以有效地清除氧自由基和脂类自由基, 预防脂质过氧化, 而且具有抑制肿瘤发生和防治神经退行性疾病等功能。喝茶和茶多酚也能保护神经细胞和预防乃至治疗 PD 吗? 多年来我们对此进行了系统的研究, 发表了一系列论文, 其中一篇发表在 *Biological Psychiatry* 杂志上, 题目是《Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway》, 该

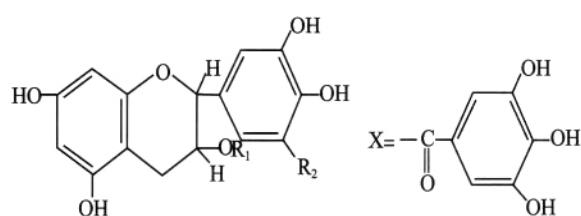
* 国家自然科学基金(110200101056)和国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB500706)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64888569, E-mail: zhaobl@ibp.ac.cn

收稿日期: 2008-02-01, 接受日期: 2008-03-06

杂志为此文发布了一个新闻, 该文还被《自然》(Nature) 的网上杂志《自然中国》选为来自中国大陆和香港的突出科学研究成果. 这里对茶多酚的抗氧化作用及其保护脑神经防止帕金森病损伤作用及其分子机理进行了总结, 就茶多酚保护脑神经、预防和防治 PD 作用及其分子机理作一阐述, 以推动茶多酚的深入研究和利用, 服务于人类健康和防病治病.



- (-) 表儿茶素 (EC): $R_1=H, R_2=H$;
 (-) 没食子儿茶素 (EGC): $R_1=H, R_2=OH$;
 (-) 儿茶素没食子酸酯 (ECG): $R_1=X, R_2=H$;
 (-) 没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG): $R_1=X, R_2=OH$.

Fig. 1 Chemical structure of green tea catechins

图 1 茶多酚的化学结构

1 帕金森病的致病机理

PD 是老年人群中发病率很高的一种神经系统退行性疾病, 其主要病理特征为选择性的黑质和纹状体多巴胺能神经元的减少、丧失和黑体-纹状体束的病理性改变, 从而引起运动障碍, 以僵直、震颤、运动迟缓为主要临床特征. 目前发病机制一般认为是由于中脑黑质的多巴胺能神经元的变性坏死, 使通过黑质纹状体通路作用于纹状体的神经递质多巴胺(DA)减少, 造成纹状体内多巴胺和乙酰胆碱(Ach)两种递质的平衡失调而发病. 黑质神经元消失具有特殊分布区, 主要在致密带. 所有受损区除神经元脱失外, 还伴有胶质细胞增生, 残存的色素细胞亦可出现色素减少或色素外溢, 部分细胞出现 Lewy body, 可观察到 α -synuclein 和 ubiquitin 形成的直径 7~12 nm 的纤维^[1]. PD 的致病因素有遗传和环境两种, 前者占大约 30%. 后者占大约 70%.

1.1 帕金森病的致病的遗传因素

PD 相关基因即致病基因和易感基因目前发现的有 α -synuclein 基因和 Parkin 基因等.

α -synuclein 定位在 4q21~23, 其 209 位的鸟嘌呤突变为腺嘌呤, 导致 α -synuclein 蛋白 53 位丙氨酸突变为苏氨酸. 丙氨酸本来位于 α -synuclein 螺旋中, 在

螺旋的周围为 β -折叠, 这种替换干扰了 α -synuclein 螺旋的形成, 使 β -折叠延长, 聚集的 β -折叠参与了蛋白质的自我凝聚, 导致形成淀粉样的纤维结构, 参与 Lewy 小体的形成. 另外, 发现第二个 α -synuclein 的突变体(Ala30Pro), 较野生型的可形成更多的片层和成熟的纤维丝, 容易与泛醌结合、沉淀而被包裹^[2]. Parkin 基因位于 6q25.2~27 上, 有多处突变发生. Parkin 蛋白主要分布在细胞的高尔基体上, 其功能还不清楚, 可能参与清除残缺蛋白质和调节基因的表达. Parkin 基因的突变或缺失, 可能会干扰泛醌介导的蛋白质水解通路, 导致黑质神经元的死亡, 其确切机制仍有待于进一步阐明^[3].

另外, 在 PD 病人中, α -synuclein 的突变导致了多种细胞毒性物质的累积, 包括蛋白酶功能的抑制, 囊泡通透性的上升, 线粒体损伤. 这些可能是通过两条不同的途径: a. 细胞内 ATP 减少, 加剧了蛋白酶的功能丧失, 进一步加强了蛋白质沉积; b. parkin 基因突变降低了黑质神经元对抗氧化应激的能力, 可能是因为 Parkin 蛋白作为蛋白质-泛素连接酶的功能丧失, 进而影响到毒性蛋白的降解. 另外, UCHL1 的突变也可能影响到蛋白酶的功能或者是 α -synuclein 的浓度. 尽管在疾病的发生过程中, 有纤维化颗粒形成, 但 α -synuclein 的纤维化聚集并不是主要的致病因素. 在发病的早期 α -synuclein 起主要的调节作用, 但在后期导致了神经元功能的紊乱, 最终直至细胞死亡.

1.2 氧化应激与 PD

环境因素包括一些环境产生的神经毒剂, 如 6-OHDA, MTPT, 除草剂, 鱼藤酮等, 它们都会引起多巴胺神经元的损伤甚至凋亡. 这些神经毒剂引起多巴胺神经元损伤和凋亡的共同特征是通过氧化应激, 即产生活性氧(ROS)和活性氮(RNS). 神经递质多巴胺可以通过化学反应或酶反应产生 ROS. 人脑内黑质区金属离子铁的含量较高. 过量生成的活性氧自由基, 攻击生物大分子, 消耗抗氧化物质, 破坏了细胞的抗氧化防御系统, 增加了细胞的氧化应激. 更为严重的是氧化还原平衡的破坏, 进一步导致线粒体电子传递链受阻, 呼吸衰竭, 产生能量危机, 形成氧化应激和线粒体损伤的反馈循环, 最终导致多巴胺能神经元过度的损伤和缺失, 产生 PD 的临床症状.

氧化应激在 PD 发病过程中发挥着重要作用. 脑组织的氧化代谢率很高, 同时抗氧化剂的保护机制又相对缺乏. 这就导致脑组织的 ROS 代谢相对容

易失去平衡。线粒体是 ROS 敏感的细胞器之一, 过量的 ROS 不仅影响线粒体“能量工厂”的正常功能, 而且还能反馈性增加 ROS 和 RNS 的产生, 释放凋亡因子细胞色素 C, 激活 Caspases 蛋白家族, 导致细胞凋亡。许多环境因素和代谢毒素都可以诱导产生过量的 ROS 及 RNS, 而引起不同程度的细胞毒性作用。过量的 ROS 及 RNS 不仅可以影响细胞膜的通透性, 引起 Ca^{2+} 内流和细胞第二信使含量的升高, 进而激活多条氧化还原通路。大量证据表明在 PD 的发病过程中, 活性氧与不同的突变蛋白相互作用, 共同调节了蛋白质的纤维沉积, 促进神经元凋亡, 甚至死亡^[4,5]。

大量研究表明, 过量的一氧化氮(NO)可以诱导神经元凋亡。在病理条件下, ROS 和 NO 的产量都大大增加, 二者极易发生反应生成过氧亚硝基。过氧亚硝基是强氧化剂, 可以与蛋白质的巯基反应, 或者硝基化芳香族氨基酸, 影响它们在信号传导中的功能。此外, 过氧亚硝基可以氧化脂类, 蛋白质和 DNA, 从而破坏其功能。NO 还可与 Fe 配基反应, 使 Fe()通过与 NO 结合而还原, 产生的 $Fe^{2+}-NO^+$, 进一步与细胞内的巯基反应, 使其亚硝基化^[6]。NO 还参与了 PD 病多巴胺能神经元的降解^[7]。

PD 的治疗目前采用药物、手术和基因治疗等方法, 但是效果都不是很理想, 一些药物和方法副作用很严重。通过抗氧化剂等维持细胞内的氧化还原状态, 抑制细胞凋亡, 从而减缓或阻止神经元的降解是一个重要的途径。研究发现, 抗氧化剂对神经有明显保护作用, 例如天然抗氧化剂银杏提取物对许多环境因素引起的神经元凋亡, 有较强的保护作用^[8]。另外, 其他黄酮类和多酚类物质如茶多酚在体内外的许多氧化损伤体系中, 也都有抑制凋亡信号, 阻止凋亡发生, 减缓或保护神经退行性疾病发生的功能^[9-13]。

2 茶多酚的代谢

健康人饮用绿茶(按体重 20 mg/kg)后, 血浆中的茶多酚单体 EGCG、EGC、EC 在 1.3 ~ 1.6 h 达到峰值, 最大浓度分别为(77.9 ± 22.2), (223.4 ± 35.2), (124.03 ± 7.86) $\mu\text{g/L}$, 在血浆中的半衰期为(3.4 ± 0.3), (1.7 ± 0.4), (2.0 ± 0.4) h。在 1 h 收集的样品中, 77% EGCG、31% EGC、21% EC 以游离态存在, 到 5 h 64% 的 EGCG 以游离态存在, 而 EGC 和 EC 为 40% ~ 50%。大部分结合态的儿茶素以糖基化形式

存在, 人喝茶后 1 h, 在血浆中可检测到 EGCG 主要以三种存在形式, 其中糖基化占 8% ~ 19%、硫酸基化占 58% ~ 72% 和自由态 12% ~ 28%; EGC 的 57% ~ 71% 为糖基化形式, 23% ~ 36% 为硫酸基化形式, 而自由态为 3% ~ 13%。此外, 在体内检测到儿茶素的代谢产物, 在血浆及尿中有高水平的 4-O-甲基-EGC。口服绿茶 1.7 h 后, 4-O-Me-EGC 在血浆中达到峰值, 浓度为 1.2 ~ 2.2 mg/L, 远高于 EGC 的浓度。4-O-Me-EGC 的半衰期为(4.4 ± 1.1) h。在血浆和尿液中也检测到 EGC 和 EC 的两个裂环代谢物, 它们在 3 h 后出现, 并在 8 ~ 15 h 达到峰值^[14]。

将放射标记的 ^3H -EGCG 通过胃饲给小鼠, 1 h 后在小鼠的胃、小肠、结肠中分别保留放射活性的 30.7%, 40.6% 和 3.9%, 至 24 h 后, 消化道中的放射活性残留为 19.5%。给药 1 h 后, 少量放射性在小鼠多处器官被发现, 包括血液、肝、脑、心脏、皮肤等。至 6 h, 放射活性迅速增加, 此后直至 24 h, 放射活性仍以缓慢的速度在各组织中累积, 脑中的 EGCG 浓度最高可达 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 。另外, 经常饮用绿茶可以使机体中保持较高的茶多酚水平。首次给药后 6 h 再给以相同剂量的 ^3H -EGCG, 脑中的放射性比单次给药的增加 6 倍左右^[15]。在细胞实验中用 ^3H -EGCG 标记细胞, 放射活性在细胞膜、细胞质和细胞核都有分布, 表明 EGCG 可以穿过细胞膜。在肿瘤细胞上发现一种 67 ku 的层粘连蛋白受体(67LR), 其可以加强 EGCG 与肿瘤细胞的结合, 并且层粘连蛋白可以和 EGCG 发生竞争性抑制, 而 67LR 仅对 EGCG 有增强结合的作用, 其他的茶多酚单体不受其影响, 说明 67LR 可能是 EGCG 的受体。目前在脑内还没有相关的报道^[16]。

这些研究表明茶多酚不仅可以进入血浆, 而且可以穿透血脑屏障, 这就为我们利用茶多酚保护脑神经细胞防治 PD 提供了必要条件。

3 茶多酚保护脑神经细胞防止帕金森症病损伤作用及其分子机理

应用 6-OHDA 诱导 PD 病理细胞模型, 我们评价了茶多酚的神经保护作用。结果表明, 茶多酚预处理可明显改变凋亡细胞核变化, 减少 6-OHDA 诱导的早期凋亡率, 防止线粒体膜电位下降, 降低细胞内活性氧和钙离子累积。茶多酚还可以抑制 6-OHDA 诱导 NO 含量升高和 nNOS 与 iNOS 过量

表达,降低细胞内蛋白结合硝基酪氨酸水平.此外,茶多酚对6-OHDA自氧化有浓度-时间依赖性抑制作用^[9-11].利用6-OHDA建立半PD大鼠模型,探讨茶多酚对其保护作用机制,结果发现,6-OHDA诱导动物旋转行为是时间依赖性的,茶多酚可以浓度和时间依赖性减轻6-OHDA诱导产生的旋转行为,降低中脑和纹状体中ROS和NO含量、脂质过氧化程度、硝酸盐/亚硝酸盐含量、蛋白质结合硝基酪氨酸浓度,同时降低nNOS和iNOS表达水平.茶多酚预处理可增加黑质致密部存活神经元,抗氧化水平和减少凋亡细胞.口服茶多酚可以有效保护脑组织免于6-OHDA损伤引起的神经细胞死亡,其保护作用可能是通过ROS和NO的途径实现的^[17],为茶多酚的神经保护理论提供了实验证据,为预防和治疗PD提供了新的思路.

3.1 在细胞水平茶多酚对帕金森症损伤的防护作用

在细胞水平上,我们应用MTT、荧光显微镜、流式细胞分析和DNA电泳等技术和方法研究了茶多酚及其单体化合物对6-OHDA诱导的PC12细胞凋亡的神经保护作用.通过对6-OHDA单独处理的和茶多酚提前处理过而后再用6-OHDA处理的PC12细胞的形态,生理功能状态变化的研究,我们发现茶多酚和其成分EGCG和ECG,在100~200 μmol/L浓度范围内,表现出明确的保护氧化应激诱导的细胞凋亡作用,其他单体化合物没有表现这种保护作用^[9,10].

应用氧化应激诱导PD病理细胞SH-SY5Y模型,我们评价了茶多酚的神经保护作用,结果表明,茶多酚预处理可明显减少6-OHDA诱导的早期凋亡引起细胞核变化,防止线粒体膜电位下降,降低细胞内活性氧和钙离子累积.茶多酚还可以抑制6-OHDA诱导NO含量升高和nNOS与iNOS过量表达,降低细胞内蛋白质结合硝基酪氨酸水平.此外,茶多酚对6-OHDA自氧化有浓度-时间依赖性抑制作用^[18].以不同浓度6-OHDA(1 μmol/L~0.5 mmol/L)处理SH-SY5Y细胞,MTT法测定细胞活力.6-OHDA以浓度及时间依赖性的方式导致细胞活力的降低.75 μmol/L和100 μmol/L 6-OHDA处理24 h后,细胞活力分别降为对照的60%和35%左右.茶多酚单独处理24 h,结果显示在低浓度时,细胞活力升高,而在高浓度时,细胞活力下降到大约80%.用不同浓度茶多酚预处理1 h,结果显示茶多酚对6-OHDA所诱导的细胞活力下降

有浓度依赖性作用.细胞先同茶多酚(100 μmol/L)孵育1 h,再与100 μmol/L 6-OHDA孵育12, 18, 24, 48 h,细胞活力取决于共同孵育的时间,在12 h和24 h时细胞活力分别上升到大约85%和96%.

单独用儿茶素单体处理细胞24 h,在25~500 μmol/L ECG和100~500 μmol/L EGCG和EC时其细胞活力上升,然而,EGC在25~400 μmol/L时使细胞活力下降到70%~80%.先用儿茶素处理1 h,再用6-OHDA处理24 h,细胞活力有明显的升高.在25~400 μmol/L,EGCG, ECG和EC的保护作用有明显的增强,而EGC有明显的负面作用.茶多酚在25 μmol/L和50 μmol/L时与EGCG作用相似,在100~400 μmol/L时与ECG作用相似.因此,无论在何种浓度下,茶多酚都对细胞活力具有最大的增强作用.本实验中我们选择了50, 100和200 μmol/L三个浓度的茶多酚作为实验浓度.细胞先用儿茶素单体处理1 h,然后洗去培养基,再用6-OHDA单独处理24 h,儿茶素可以削弱6-OHDA所导致的细胞活力的降低,尽管这种作用比共孵育时较弱,揭示了茶多酚及其单体的抗氧化作用主要是发生在细胞内的.GSH清除ROS和L-NMMA抑制NO的产生都对6-OHDA诱导的细胞凋亡有剂量依赖性保护作用,说明茶多酚可能也是通过这些特性来抑制6-OHDA诱导的细胞损伤的.

利用荧光显微镜观察核形态变化,对照细胞的细胞核呈均匀荧光,当用100 μmol/L 6-OHDA处理细胞24 h之后,细胞核形态表现出明显的凋亡变化,即核发生固缩或出现碎裂.但是这种核凋亡的形态变化在用50~200 μmol/L茶多酚预处理后明显减轻或者消失了,细胞核形态与正常细胞接近.表明茶多酚对6-OHDA引起的细胞核凋亡的变化有明显的保护作用.单独茶多酚没有明显的影响.为了确定茶多酚对6-OHDA诱导的细胞凋亡的保护作用,利用Annexin V和PI双染方法标记细胞,做流式细胞分析.细胞被6-OHDA处理24 h后,早期凋亡的细胞比率急剧增加至53.06%,如果事先用不同浓度的茶多酚处理,凋亡细胞的百分比会明显下降.茶多酚的浓度从50到200 μmol/L增加时,细胞凋亡率随着浓度增加分别降至8.77%, 4.76%和2.14%.而茶多酚单独处理没有明显影响.

利用DCFH-DA荧光分析检测细胞内的活性氧.100 μmol/L 6-OHDA处理24 h后,诱导细胞

内活性氧信号显著增加 ($P < 0.01$), 而 50 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ 的茶多酚对活性氧的清除具有浓度依赖效应. 利用分光光度计分析细胞内亲脂性阳离子荧光染料的含量变化来衡量线粒体膜电位变化. 6-OHDA 处理 24 h, 可以检测到荧光强度的显著下降. SH-SY5Y 细胞用 6-OHDA 处理后导致荧光强度降低表明线粒体膜电位的降低. 茶多酚预处理可以显著抑制线粒体膜电位的降低并具有浓度效应. 单独茶多酚处理可以使线粒体膜电位升高, 提高细胞的抗氧化能力.

为了检测凋亡细胞内钙离子的浓度, 采用 SH-SY5Y 细胞与荧光探针 Fluo-3 AM 共同孵育的方法. 100 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA 导致细胞内钙离子上升了 2.4 倍 ($P < 0.01$). 单独茶多酚(100 $\mu\text{mol/L}$)也能使细胞内钙离子浓度略有升高. 6-OHDA 与不同浓度的茶多酚(50 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$)共同孵育 24 h, 可使细胞内钙离子浓度显著下降. 茶多酚对 6-OHDA 导致的细胞内钙离子浓度升高有明显的抑制作用.

利用分子生物学技术检测细胞内 NO 含量的变化及 nNOS、iNOS 表达的变化发现, 6-OHDA 处理可使 NO 含量上升到 140% ($P < 0.01$), 茶多酚对 NO 没有明显的作用. 6-OHDA 导致的 NO 含量的升高可被不同浓度茶多酚(50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$)所抑制, 并且具有浓度依赖效应, 分别降至 108.01%, 77.94%和 65.11%. 6-OHDA 可使细胞内的 nNOS 和 iNOS 含量显著升高, 而茶多酚的预处理可剂量依赖性的下调 6-OHDA 所致的细胞内的 nNOS 和 iNOS 含量. eNOS 的表达在各组间没有明显的差异. 过氧亚硝基使蛋白质结合酪氨酸发生硝基化, 产生 3-硝基酪氨酸, 可利用 3-硝基酪氨酸的特异性抗体, 通过竞争性 ELISA 来测定. 6-OHDA 可显著地增加蛋白质结合的硝基酪氨酸, 而 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ 茶多酚分别使蛋白质结合的硝基酪氨酸降到 11.21, 7.66, 4.05 $\mu\text{mol/L}$, 并且具有浓度依赖效应. 茶多酚单独处理组对蛋白质结合的硝基酪氨酸含量没有明显影响. Levites 等^[10, 11]在 SH-SY5Y 细胞内, 茶多酚可以抑制 6-OHDA 诱导的 NF- κ B 的转运和结合提示茶多酚可能通过抑制 iNOS 的活性而发挥保护作用.

3.2 在动物水平茶多酚对帕金森症损伤的防护作用

在细胞实验的基础上, 我们又建立了 6-OHDA 诱导的小鼠 PD 亚急性动物模型^[17]. 在试验过程中, 动物的饮水和体重被严格监控. 四组动物每日

的饮水量相似, 没有明显差异. 动物服用茶多酚的剂量为在低剂量组和高剂量组分别是 150 mg/kg·d 和 450 mg/kg·d. 试验中各组动物体重之间没有明显的差异, 另外, 茶多酚预处理 7 天及手术后连续处理 21 天没有发现对动物有任何副作用.

采用阿朴吗啡(apomorphine)诱导动物旋转的方法, 以评估 PD 动物模型的建立^[19]. 大鼠腹腔注射阿朴吗啡(0.25 mg/kg)诱发旋转行为, 约 3 ~ 5 min 动物出现旋转, 记录 30 min 内的旋转圈数及方向, 平均每分钟 7 圈以上者为合格的帕金森病大鼠模型. 6-OHDA 注射后, 大鼠的旋转行为随时间的增加而递增, 到三周时达到稳定, 说明 6-OHDA 单侧注射前脑内侧束所导致的黑质致密部多巴胺能神经元的凋亡是时间依赖性的. 茶多酚预处理表明, 茶多酚可以明显降低大鼠的旋转数, 并且随时间延长其作用越发明显, 提示茶多酚可以有效地对大鼠黑质致密部神经元进行保护.

动物手术后, 分别于一周, 两周, 三周时, 测量了脑组织中产生的活性氧和一氧化氮, 脑匀浆的脂质过氧化水平, 脑匀浆的抗氧化能力, 以评价 6-OHDA 所产生的活性氧和活性氮对脑组织的损伤效果. 6-OHDA 注射后, ESR 实验表明, 与阴性对照组相比, 6-OHDA 注射使得中脑和纹状体内的 ROS 和 NO 的含量都有所上升. 茶多酚预处理可以明显降低损伤侧的 ROS 和 NO 的产生, 甚至使对照侧明显低于阴性对照组的对照侧, 并且有时间和剂量依赖效应.

6-OHDA 注射后脂质过氧化水平用 TBARS 的含量表示. 6-OHDA 的损伤使得 TBARS 水平在第一周时均高于阴性对照组, 并且在 中脑和海马内随时间递增而上升. 在中脑和纹状体内, 茶多酚预处理都使 TBARS 水平有明显的降低, 并且具有时间依赖效应. 为了更准确地评价茶多酚在 6-OHDA 诱导的半 PD 大鼠中的保护效果, 我们进一步检测了脑匀浆的抗氧化水平, 测定了对超氧阴离子自由基和羟基自由基的清除效果. 6-OHDA 损伤侧中脑和纹状体内脑匀浆清除超氧阴离子自由基的能力比阴性对照组显著下降了 66%和 40%, 并且有时间和剂量依赖效应. 茶多酚预处理使得损伤侧中脑和纹状体内脑匀浆清除超氧阴离子自由基的能力显著升高, 并且是时间和剂量依赖性的. 对羟基自由基的清除能力与清除超氧阴离子能力类似.

为了进一步确定一氧化氮在 6-OHDA 诱导大鼠 PD 模型中的作用, 我们用 Griess 法进一步检测

了一氧化氮的终产物硝酸盐 / 亚硝酸盐的产量. 与阴性对照组相比, 6-OHDA 注射侧中脑和纹状体内硝酸盐 / 亚硝酸盐显著升高, 并且具有时间依赖性. 茶多酚预处理剂量和时间依赖性降低了中脑和纹状体内脑匀浆的硝酸盐 / 亚硝酸盐水平. 同时, 茶多酚预处理都使得对照侧中脑和纹状体内硝酸盐 / 亚硝酸盐水平显著下降, 并且具有剂量和时间效应.

利用分子生物学技术检测发现, 6-OHDA 显著增加了中脑和纹状体内 nNOS 和 iNOS 的蛋白质表达, 并且是具有时间依赖效应的. 茶多酚预处理可以显著降低中脑和纹状体内的 nNOS 和 iNOS 的蛋白表达. iNOS 在阴性对照组也有表达, 但表达量比较低, 可能是由于手术和灌胃刺激导致的.

与阴性对照相比, 6-OHDA 可显著提高中脑和纹状体内蛋白结合硝基酪氨酸含量, 并且在中脑内有时间依赖效应, 可能是与中脑黑质致密部神经元的缺失有关. 茶多酚可以剂量依赖性地降低蛋白结合硝基酪氨酸含量. 用免疫组化的方法标记 TH 阳性神经元是观察中脑黑质多巴胺能神经元变化的有效手段. 对中脑黑质 TH 免疫活性的神经元用 DAB 显色, 在 6-OHDA 注射三周后, 正常组的动物 TH 阳性神经元的数目比 6-OHDA 损伤一侧的多, 表明 6-OHDA 对中脑的多巴胺能神经元有显著的损伤作用. 而低剂量和高剂量茶多酚可以明显地保护多巴胺能神经元免受 6-OHDA 的毒害.

在细胞凋亡过程中, 细胞内 DNA 内切酶被激活, 降解基因组 DNA, 断裂的 DNA 碎片可以被 TUNEL 试验特异性的检测, 因此 TUNEL 可以特异性检测凋亡细胞. 结果显示, 阴性对照组黑质致密部神经元没有特异性染色, 6-OHDA 注射后三周, 几乎所有的 SNc 区神经元都被特异性的着色, 显示 6-OHDA 经前脑内侧束扩散到 SNc 区, 引起 SNc 区多巴胺能神经元的大量凋亡, 同时, 在 6-OHDA 诱导凋亡的神经元中, 部分神经纤维显示 TUNEL 阳性, 这种现象表明, 断裂的 DNA 碎片在神经元中由胞体向神经纤维末端运输, 是一种凋亡神经元特有的现象, 进一步说明 6-OHDA 注射后神经元 DNA 的断裂至少部分是由凋亡引起的. 茶多酚预处理剂量依赖性减少切片中凋亡神经元的数目^[17].

Weinreb 等在 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型中, MPTP 可以导致脑黑质部多巴胺神经原丢失, 用茶提取物(0.51 mg/kg)和茶多酚 EGCG(2,10 mg/kg)预

处理可以显著防止这一损伤, EGCG 还能阻止 MPTP 引起的抗氧化酶的应激变化. 体外运用酶动力学方法, 发现茶多酚在一定的浓度范围内对小鼠脑 MAO 有明确的抑制作用, 其作用机制为可逆的非竞争性抑制. 结果表明, 茶多酚能够降低 MPTP 处理的小鼠各个脑区的 MAO 的活性^[20,21].

归纳以上研究, 我们可以用图 2 表示茶多酚保护神经细胞防止 6-OHDA 诱导 PD 损伤的分子机理.

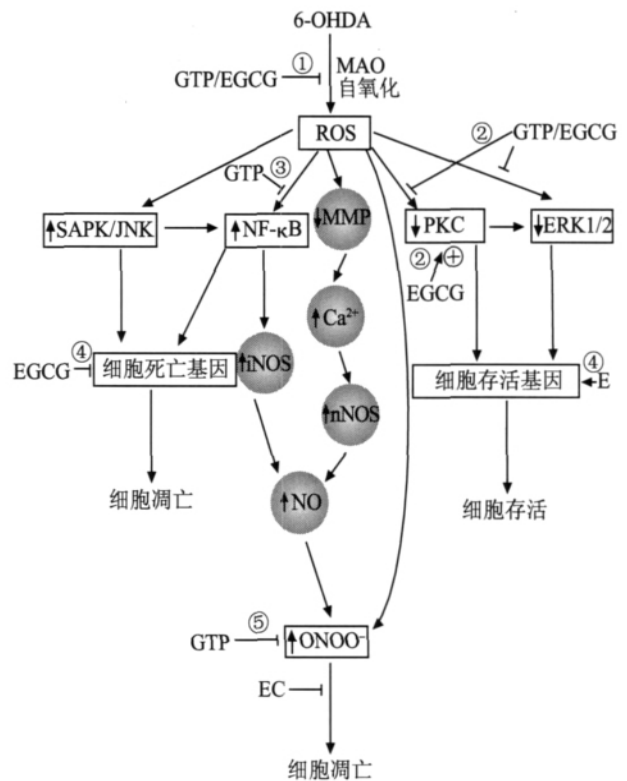


Fig. 2 A hypothetical model diagramming for the potential targets of green tea polyphenols (GTP) or EGCG are suggested in cell signaling pathways affected by 6-OHDA-induced oxidative stress

图 2 茶多酚 (GTP) 或者 EGCG 防止 6-OHDA 导致 PD 氧化损伤的靶位置和信号通路模型

①直接抑制 6-OHDA 导致 PD 氧化应激和清除 ROS; ②抑制 6-OHDA 对 PKC 和 ERK1/2 的激活作用及 PKC 磷酸化; ③抑制 NF-κB 向细胞核转移和抑制其活性; ④调节细胞死亡和周期; ⑤调节细胞内 NO 水平和抑制过氧亚硝基生成.

3.3 茶多酚的抗氧化作用

茶多酚的这些保护神经防止帕金森病损伤作用与其抗氧化作用有着密切关系. 一种抗氧化剂能否抗氧化和抗氧化效率如何, 一个很重要的性质就是它对氧自由基的清除作用. 我们系统研究了茶多酚对不同体系氧自由基的清除作用.

在体外, 利用鲁米诺来检测 6-OHDA 自氧化过程中产生的活性氧. 茶多酚对 ROS 的清除率有浓度依赖效应. 有意思的是, 即便浓度很低的茶多酚就可显著清除 6-OHDA 自氧化过程中产生的活性氧, 而这是与茶多酚的抗氧化剂活性相关的. 利用 ESR 方法检测了纯化学体系中茶多酚对 6-OHDA 自氧化产生的醌类自由基的清除作用. 6-OHDA 与不同浓度的茶多酚共同孵育, 茶多酚对 6-OHDA 自氧化产生的醌类自由基的清除作用具有浓度依赖效应. 相同浓度的茶多酚和 6-OHDA 共孵育, 在 10 min 时清除率达到了 50%, 20 min 时清除率几乎达到了 100%, 表明茶多酚对 6-OHDA 自氧化产生的醌类自由基的清除同时具有时间依赖效应.

我们用自旋捕集技术捕捉的用黄嘌呤氧化酶体系和人嗜中性粒细胞呼吸爆发产生的氧自由基. 在这两个体系中茶多酚对超氧阴离子自由基的清除作用远远大于的维生素 C 和维生素 E^[22]. 4 种单体对氧自由基的清除作用也是不同的, 它们混合在一起对氧自由基的清除有协同作用和最佳清除比例^[23]. 在从茶叶中提取以儿茶素作为主体成分的抗氧化剂时, 以保持原有儿茶素比例时其抗氧化效果最佳. 我们用自旋捕集技术研究了茶多酚和一些天然抗氧化剂对 ONOO⁻ 氧化活性的抑制作用, 结果发现茶多酚对 ONOO⁻ 清除作用远远大于维生素 C^[24].

我们研究和比较 4 种茶多酚单体对铁诱导的脑突触体脂质过氧化损伤的保护作用, 并用自旋捕集法研究比较它们清除脂类自由基的效果, 探讨它们对脑突触体脂质过氧化损伤的保护机理. 结果发现茶多酚 4 种单体对脑突触体脂质过氧化过程形成的 TBA 反应物都有抑制作用. 随 EGCG, ECG, EGC 和 EC 浓度的增加, TBA 反应物形成量逐渐减小, 抑制率逐渐增大, 并具有很好的量效关系, 它们的 IC₅₀ 分别是 0.35 mmol/L, 0.24 mmol/L, 0.19 mmol/L 和 0.11 mmol/L. 我们用自旋捕集技术研究了茶多酚 4 种单体对脂类自由基的清除作用, 结果发现 ECG, EGCG, EC 和 EGC 的 IC₅₀ 分别为 7.31 g/L, 14.9 g/L, 22.14 g/L 和 59.28 g/L^[25].

不仅不同结构的茶多酚具有不同抗氧化性和对不同自由基具有不同清除作用, 即使相同结构但构象不同的茶多酚异构体可能对自由基也有不同清除作用. 我们选择了三对结构相同的茶多酚异构体进行了研究, 发现它们确实具有不同抗氧化性, 特别是在较低浓度时对不同自由基具有不同清除作用表

现得更清楚^[26, 27]. 不仅不同结构的茶多酚对不同自由基有不同的清除作用, 而且, 相同结构的不同异构体对不同自由基也有不同的清除作用. 这让我们了解为什么在天然茶叶中存在不同茶多酚异构体和我们考虑使用茶多酚作为抗氧化剂具有重要的意义.

我们采用 Cu²⁺ 螯合剂 (OP)₂Cu²⁺ 作为化学核酸酶诱导 DNA 损伤的模型, 利用 ESR 和化学发光技术研究了 4 种茶多酚单体对氧化损伤 DNA 保护作用机理^[28]. 结果发现它们对 DNA 氧化损伤保护作用的顺序为 ECG > EC > EGCG > EGC. 为了确定是什么自由基引起的 DNA 损伤, 我们用 ESR 自旋捕集技术测定了产生的自由基, 结果发现捕集到的是羟基自由基的波谱. 而且发现, 将 4 种茶多酚单体加入该体系对 ESR 信号的清除作用的顺序也是 ECG > EC > EGCG > EGC. 这就证明了在 (OP)₂Cu²⁺ 与过氧化氢及抗坏血酸反应体系引起 DNA 损伤的主要是羟基自由基.

我们研究了茶多酚对铅毒性的防护作用, 发现茶多酚可以防止铅毒性引起肝细胞膜脂质过氧化, 抑制铅毒性引起的神经细胞产生的活性氧自由基, 防止铅毒性引起的神经细胞内抗氧化剂的减少^[29-32].

我们从茶多酚的分子结构和分子轨道量子化学计算的结果探讨了茶多酚为什么可以清除氧自由基及清除氧自由基的反应活性中心^[33-35]. 结果发现苯环上两个酚羟基的 O—H 键比苯并二氢吡喃上两个酚羟基的 O—H 的键强, 说明当儿茶素与氧自由基反应时, 苯并二氢吡喃环上两个酚羟基的氢原子比苯酚环上的两个羟基的氢原子更容易被抽走. 儿茶素自由基反应时在苯并二氢吡喃环上也形成类似的醌自由基. 这一结论与前面用 ESR 检测到儿茶素与氧自由基反应生成的半醌自由基是一致的. 这就使茶多酚清除氧自由基和抗氧化的分子机理的研究深入了一步.

从以上结果和讨论可以看出, 作为茶叶主要成分的茶多酚对氧自由基的清除作用是很强的. 由此可以得出结论, 茶多酚的抗氧化作用在饮茶的健康益处和保护神经防止帕金森病损伤作用中起着重要作用. 目前这个项目正在宣武医院进行临床实验, 如果取得成功, 将为广大患者和老年人带来福音. 当然, 茶多酚可以有效防治神经退行性疾病等功能尚需大量流行病学资料进一步证实. 茶多酚是从绿茶中提取的多酚类化合物, 尽管毒性实验表明很高

剂量才有毒性。但是，凡事总有个“度”，任何好东西，过分就会有负面效应。希望每个人根据自己实际情况饮茶，如果直接食用茶多酚，应当根据医生嘱咐和说明书的用量。

参 考 文 献

- Meredith G E, Halliday G, Totterdell S. A critical review of the development and importance of proteinaceous aggregates in animal models of Parkinson's disease: new insights into Lewy body formation. *Parkinson's Dis*, 2004, 10 (1): 191 ~ 202
- Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S. Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet*. 2001, 10 (5): 919 ~ 926
- Petrucelli L, O'Farrell C, Lockhart P J, et al. Parkin protects against the toxicity associated with overexpression of mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron*, 2002, 36 (6): 1007 ~ 1019
- Dawson T M, Dawson V L. Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. *Nat Neurosci Suppl*, 2002, 5 (7): 1058 ~ 1061
- Zhang Y, Dawson V L, Dawson T M. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 2000, 7 (2): 240 ~ 250
- Groves J T. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr Opin Chem Biol*, 1999, 3 (2): 226 ~ 235
- Liu X, Miller M J, Joshi M S, et al. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5): 2175 ~ 2179
- Ni Y C, Zhao B L, Hou J W, et al. Protection of cerebellar neuron by Ginkgo-biloba extract against apoptosis induced by hydroxyl radicals. *Neuron Sci Letter*, 1996, 214 (1): 115 ~ 118
- Nie G J, Jin C F, Cao Y L, et al. Distinct effects of tea catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 397 (1): 84 ~ 90
- Nie G J, Cao Y L, Zhao B L. Protective effects of green tea polyphenols and their major component, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Redox Report*, 2002, 7 (2): 170 ~ 177
- Levites Y, Weinreb O, Maor G, et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J Neurochem*, 2002, 78 (6): 1073 ~ 1082
- Levites Y, Amit T, Youdim M B, et al. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate neuroprotective action. *J Biol Chem*, 2002, 277(34): 30574 ~ 30580
- Levites Y, Youdim M B H, Maor G, et al. Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nuclear factor-kappaB (NF-κB) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures. *Biochem Pharmacol*, 2000, 63 (1): 21 ~ 29
- Lee S R, Suh S I, Kim S P. Protective effects of the green tea polyphenol (2)-epigallocatechin gallate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. *Neuroscience Letters*, 2000, 287 (2): 191 ~ 194
- Suganuma. Wide distribution of 3H-(-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis*, 1998, 19 (8): 1771 ~ 1776
- Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, et al. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature Struct Mole Biol*, 2004, 11 (3): 380 ~ 381
- Guo S H, Bezar E, Zhao B L. Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS-NO pathway. *Free Rad Biol Med*, 2005, 39 (4): 682 ~ 695
- Castaneda E, Fleming S, Paquette M A, et al. Assessment of recovery in the hemiparkinson rat: Drug-induced rotation is inadequate. *Physiol Behav*, 2005, 84 (3): 525 ~ 535
- Guo S H, Yan J Q, Bezar E, et al. Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. *Biological Psychiatry*, 2007, 62 (12): 1353 ~ 1362
- Levites Y, Weinreb O, Maor G, et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J Neurochem*, 2001, 78 (7): 1073 ~ 1082
- Weinreb O, Mandel S, Amit T, et al. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Nutr Biochem*, 2004, 15 (2): 506 ~ 516
- Zhao B L, Li X J, He R G, et al. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophys*, 1989, 14 (2): 175 ~ 184
- 沈生荣, 杨贤强, 杨发军, 等. 儿茶素抗氧化作用的协同增强效应. *茶叶科学*, 1993, 13 (2): 141 ~ 146
- Shen S R, Yang X Q, Yang F J, et al. *Science of Tea*, 1993, 13 (2): 141 ~ 146
- 赵保路, 王建潮, 侯京武, 等. 茶多酚对过氧亚硝基氧化二甲基亚砷产生的甲基自由基的清除作用. *科学通报*, 1996, 41: 925 ~ 927
- Zhao B L, Wang J C, Hou J W, et al. *Chin Sci Bull*, 1996, 41: 925 ~ 927
- Guo Q, Zhao B L, Li M F, et al. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols (GTP) against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochem Biophys Acta*, 1996, 1304 (1): 210 ~ 222
- Guo Q, Zhao B L, Hou J W, et al. ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1427 (1): 13 ~ 23
- Zhao B L, Guo Q, Xin W J. Free radical scavenging by green tea polyphenols. *Method Enzym*, 2001, 335 (1): 217 ~ 231
- Nie G J, Wei T T, Shen S R, et al. Polyphenol protection of DNA against damage. *Meth Enzym*, 2001, 335 (2): 232 ~ 244
- Gao J T, Tang H R, Zhao B L. The toxicological damage of gas phase cigarette smoke on cells and protective effect of green tea polyphenols. *Res Chem Intermed*, 2001, 27 (2): 269 ~ 280

- 30 Chen L J, Yang X Q, Jiao H L, et al. Tea catechins protect against Lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 Cells. *Toxicol Sci*, 2002, 69 (1): 149 ~ 156
- 31 Chen L J, Yang X Q, Jiao H L, et al. Tea Catechins protect against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction and calcium dysregulation in PC 12 cells. *Chem Res Toxicol*, 2003, 16 (7): 1155 ~ 1161
- 32 Chen L J, Yang X Q, Jiao H L, et al. Effect of Tea Catechins on the Change of Glutathione Levels Caused by Pb²⁺ in PC12 Cells. *Chem Res Toxicol*, 2004, 17 (6): 922 ~ 928
- 33 Zhao B L, Liu S L, Chen R S, et al. Scavenging effect of catechin on free radicals studied by molecular orbital calculation. *Acta Pharmacol Sinica*, 1992, 13 (1): 9 ~ 14
- 34 Zhao B L, Antioxidant effects of green tea polyphenols. *Chinese Sci Bul*, 2003, 48 (4): 315 ~ 319
- 35 Zhao B L. The health effects of tea polyphenols and their antioxidant mechanism. *J Clinical Biochem Nutrition*, 2006, 38 (1): 59 ~ 68

Protective Effects of Green Tea Polyphenols Against Parkinson's Disease*

ZHAO Bao-Lu**

(State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract About 70% of Parkinson's pathogenesis comes from environment factor and one important of which is oxidative stress although the genetic factor plays an important role. The antioxidant of green tea polyphenols(GTP) and they can enter into plasma even penetrate blood brain barie provides an important condition for the protective effects of GTP against Parkinson's Disease(PD). In cellular model the protective mechanisms of GTP on PC12 and SH-SY5Y cells against apoptosis induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) were investigated. GTP attenuated 6-OHDA-induced early apoptosis, prevented the decrease in mitochondrial membrane potential, suppressed accumulation of reactive oxygen species (ROS) and of intracellular free Ca²⁺. GTP also counteracted 6-OHDA-induced nitric oxide increase and over-expression of nNOS and iNOS, and decreased the level of protein bound 3-Nitro-tyrosine (3-NT). Using PD rat model injected by 6-OHDA, the effect of GTP were investigated on animal model. Results showed that GTP attenuated the injury in a dose and time dependent manner. Pretreatment of the animals with GTP decreased ROS and NO production, thiobarbituric acid reactive substances content, nitrite/nitrate concentration, and protein bound 3-Nitro-tyrosine (3-NT) in brain homogenate of midbrain and striatum in a concentration and time dependent manner. NOS participated in the neuron death induced by 6-OHDA and it was found that the pretreatment with GTP could decrease the protein level of nNOS and iNOS. More neurons survived and less cells suffered apoptosis in the substantia nigra pars compacta (SNc) of GTP treated animal brain. These results suggest that oral administration of GTP increases the antioxidant level in the brain and protects the brain against cell death caused by 6-OHDA. The experimental results of present study support the neuroprotection of GTP and provided new strategy of preventing and curing Parkinson's diseases by ROS-NO pathway.

Key words Parkinson's disease, green tea polyphenols, free radicals, natural antioxidant

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (110200101056) and National Basic Research Program of China(2006CB500706).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-64888569, E-mail: zhaobl@ibp.ac.cn

Received: February 1, 2008 Accepted: March 6, 2008