

龟板联合 β -细辛醚对帕金森病模型大鼠作用及机制的初步研究

张升, 桂雪虹, 黄丽平, 邓敏贞, 李翎, 方永奇(广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

摘要: **目的** 研究龟板联合石菖蒲有效成分 β -细辛醚对 6-OHDA 诱导的 SD 大鼠帕金森病(PD)模型的神经保护作用及机制。**方法** 以大鼠自主活动度和滚轴实验研究动物的行为学, 以中脑黑质酪氨酸羟化酶(TH)观察多巴胺能神经元的损伤程度, 并观察纹状体中 α -突触核蛋白(α -syn)含量来探讨药物作用机制。**结果** 模型组自主活动次数、滚轴运动能力均显著低于正常对照组($P < 0.05$); 多巴胺能神经元中 TH 阳性细胞数明显减少; 纹状体内的 α -syn 蛋白水平明显升高。龟板联合 β -细辛醚给药后能明显改善模型组大鼠的行为学表现, 增加 TH 阳性细胞数, 降低纹状体内 α -syn 蛋白水平。**结论** 龟板联合 β -细辛醚具有神经保护作用, 能对抗模型组大鼠 PD 模型中的神经损伤, 其机制可能与下调 α -syn 蛋白水平有关。

关键词: 龟板; β -细辛醚; 帕金森病; 酪氨酸羟化酶; α -突触核蛋白; 神经保护

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0264-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.006

Neuroprotective Effect and Mechanism of Carapax et Plastrum Testudinis Combined with β -Asarone Against Rat Model of Parkinson's Disease

ZHANG Sheng, GUI Xuehong, HUANG Liping, DENG Minzhen, LI Ling, FANG Yongqi (The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To study the neuroprotective effect of combination of Carapax et Plastrum Testudinis and β -asarone against rat mode of Parkinson's disease(PD) induced by 6-hydroxydopamine(6-OHDA), and to explore its possible mechanism. **Methods** The behavioral changes were assessed by open field and rotarod test. The activities of tyrosine hydroxylase (TH) in substantia nigra of midbrain were examined by immunohistochemical staining for the evaluation of the damage of dopaminergic neurons. Moreover, the neuroprotective mechanism of the combination of Carapax et Plastrum Testudinis and β -asarone was investigated by the changes of α -synuclein level in the corpus striatum analyzed by ELISA. **Results** Compared with the blank control group, model rats had low autonomic activities and activites on rotating the rod($P < 0.05$). The number of dopaminergic neurons with TH positive was reduced, and α -synuclein level in the corpus striatum was increased in the model group. After treatment with the combination of Carapax et Plastrum Testudinis and β -asarone, the behavior of PD rats was improved, TH-positive neurons count was increased, and α -synuclein level in the corpus striatum was decreased. **Conclusion** The combination of Carapax et Plastrum Testudinis and β -asarone damage has neuroprotective effect against neurogenic injury in 6-OHDA-induced PD rats, and the mechanism may be associated with the down-regulation of α -synuclein level.

Keywords: Carapax et Plastrum Testudinis; β -asarone; Parkinson's disease; Tyrosine hydroxylase; α -Synuclein; Neuroprotection

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经退行性疾病, 其主要病理改变为黑质致密部多

巴胺能神经元的变性和坏死, 导致神经递质多巴胺的不足, 最终造成 PD 特有的运动功能障碍。目前,

收稿日期: 2013-11-11

作者简介: 张升, 男, 博士研究生, 研究方向: 中医药治疗脑病。Email: loveguangzhou2009@163.com。通讯作者: 方永奇, 教授, 研究方向: 中医药治疗脑病。Email: fangyq2@163.com。

基金项目: 广东省自然科学基金(S2012010010625); 广州中医药大学第一临床医学院优秀博士学位论文培育项目(中医临-[2014]2号)。

复方左旋多巴类药物仍然是治疗 PD 的“金标准”，但所有的治疗措施仍停留在对症治疗阶段，并不能阻止疾病的进展，且长期应用会产生疗效减退及难以纠正的症状波动、异动症等，因而现代医学提出了对 PD 进行神经保护性治疗，这可能推迟发病或延缓病情的发展^[1]。

前期研究表明中药龟板能改善 PD 模型大鼠的行为学和脑内多巴胺水平^[2]，而且能够抑制 PD 模型大鼠中黑质神经元凋亡^[3]和促进骨形成蛋白 4 表达^[4]。另外， β -细辛醚为石菖蒲中的主要成分之一，研究表明 β -细辛醚在体内吸收快、分布快^[5]、分子量小、高度亲脂性，能快速透过血脑屏障(BBB)，能抑制大鼠脑皮质和海马神经细胞凋亡^[6]，对谷氨酸所致的 PC12 细胞损伤具有保护作用^[7-8]，有效减少细胞内 Ca^{2+} 浓度，提高细胞存活率；抑制受损神经细胞内钙离子浓度^[9]。因此，本课题研究龟板提取物联合 β -细辛醚对帕金森病模型大鼠行为学、酪氨酸羟化酶 (TH) 和 α -突触核蛋白 (α -syn) 含量的作用，旨在为治疗 PD 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠，雌雄各半，体质量 250~300 g，广州中医药大学实验动物中心提供，动物许可证号：SCXK(粤)2013-0020。

1.2 药物及试剂 阿扑吗啡，美国 Sigma 公司，批号：A4393；6-羟基多巴胺(6-OHDA)，美国 Sigma 公司，批号：H4381；TH 抗体，美国 Sigma 公司，批号：T8700； α -syn ELISA 试剂盒，美国 Thermo Scientific Nunc 公司，批号：REP104718；美多巴，上海罗氏制药有限公司，批号：SH1599； β -细辛醚，自制，纯度高于 99.7%；龟板，广州杏林药业有限公司，产地：湖南，批号：20120908。

1.3 仪器 大鼠自主活动仪，自制；ZB-200 大鼠转棒仪，成都泰盟科技有限公司；U-SPT 型显微镜，日本奥林巴斯公司；AE-200 型电子分析天平，瑞士梅特勒公司；51600 型脑部立体定位仪，美国 Stoelting 公司；SK3300LH 超声波清洗器，上海科导超声仪器有限公司；超纯水器，Reo-Pure 75LPTM。

1.4 复制大鼠 PD 模型 即实验采用 SD 大鼠，经立体定位注射，在麻醉状态下向左侧的前脑内侧束内单点注射 6-OHDA 6 μ L(剂量为 4 μ g $\cdot\mu$ L⁻¹)，坐标是：tooth bar: -2.3 mm, antero-posterior: -4.4 mm, medio-lateral: 1.2 mm, dorso-ventral: -7.8 mm^[10]。注

射后第 7 d 腹腔注射 aPomorPhine (0.05 mg \cdot kg⁻¹)，检测其旋转行为 40 min，每周测试 5 次，持续 2 周，每分钟旋转圈数大于 7 者定为 PD 模型。

1.5 分组及给药 将合格的 PD 模型大鼠随机分为模型组、龟板组、 β -细辛醚组、龟板联合 β -细辛醚组、阳性药物组(美多巴组)，另设正常对照组，每组 10 只。给药时间均为 4 周，每天 2 次。龟板组：常法制备成含生药量 1 kg \cdot L⁻¹ 的水煎液，根据成人日服药量折算成大鼠灌胃剂量 16 g \cdot kg⁻¹。 β -细辛醚组：灌胃给药，剂量为每天 20 mg \cdot kg⁻¹。龟板联合 β -细辛醚组：剂量按龟板组联合 β -细辛醚；美多巴口服给药剂量为每天 75 mg \cdot kg⁻¹，正常组和模型组则给予等体积蒸馏水灌胃。

1.6 行为学观察 自主活动计数：观察大鼠的自主活动能力。参照 Kawai 的测试方法，自制 30 cm \times 30 cm \times 15 cm 的有机玻璃盒，底部刻出 6 cm \times 6 cm 的格子，在安静、光线较暗的环境中检测。大鼠适应环境 10 min 后，计数 5 min 内大鼠移动的格子数和站立次数，连续测 5 次取平均值。

滚轴实验：观察大鼠的平衡能力。将大鼠置于旋转的转棒仪上(滚轴直径 6 cm，转速为 20 r \cdot min⁻¹)，适应 5 次后，每次检测间隔 1 min，若从转杆跌落下来即自动记录在转杆的时间(最长检测时间为 180 s，超过者仍记为 180 s)。连续测 5 次取平均值。

1.7 免疫组化测定 TH 将取出脑组织固定于 4% PFA 和 2% 蔗糖中 4~6 h，然后浸于 30% 蔗糖中，待组织块沉底后，经过石蜡包埋后切片行中脑连续冠状切片，层厚约 5 μ m，采用 ABC 法染色，取出黑质部位组织切片，加入 TH 抗体进行染色(1:200)，二联苯胺显色，显微镜观察拍照。光镜下观察，细胞质或胞核上有棕色颗粒者为阳性细胞，每张切片随机取 3 个视野，镜下计数 TH 阳性细胞数。

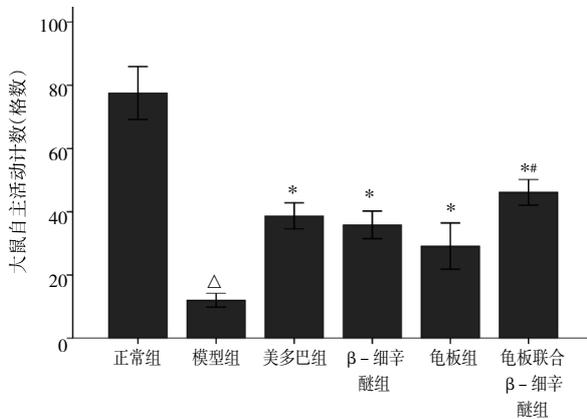
1.8 ELISA 测定 α -syn 含量 用单克隆抗体 D10(6 μ g \cdot mL⁻¹)包被 96 孔板，每孔 100 μ L，4 $^{\circ}$ C 过夜。0.5% 牛血清白蛋白封闭液封闭 2 h 后，加入重组蛋白标准品 α -syn(4, 8, 16, 32, 64, 128 \times 10⁻⁶ g \cdot L⁻¹) 和样品 2 μ g(每孔 100 μ L)，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。加入多克隆抗体 PRLA- α -syn(1:5000)，每孔 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。加入生物素化的山羊抗兔 IgG(1:4000)，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。加入碱性磷酸酶标记的亲合素(1:7000)，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h；加入 PNPP 显色，每孔 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后，用 3 mol \cdot L⁻¹ NaOH 终止反应，405 nm 处测定吸光度值。制作标

准曲线, 计算 α -syn 的含量。

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS13.0 统计软件, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 龟板联合 β -细辛醚对 PD 大鼠行为学的作用 与正常组比较, 模型组大鼠自主活动计数明显减少 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组大鼠自主活动计数均明显增加 ($P < 0.05$)。龟板组和 β -细辛醚组比较, 龟板联合 β -细辛醚组大鼠自主活动计数明显增加 ($P < 0.05$), 而且与美多巴组大鼠自主活动计数相近 ($P > 0.05$), 提示龟板联合 β -细辛醚更有利改善 PD 大鼠的自主活动能力, 见图 1。



注: 与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, 与模型组比较, $*P < 0.05$; 与龟板组和 β -细辛醚组比较, $^{*}P < 0.05$ 。

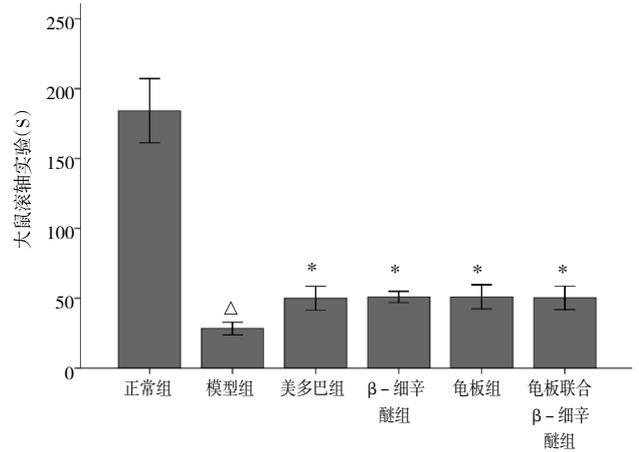
图 1 各组大鼠自主活动计数

Figure 1 Autonomic activities in different groups

与正常组比较, 模型组大鼠的平衡能力明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组大鼠的平衡能力均明显增高 ($P < 0.05$), 但各给药组平衡能力差异无意义 ($P > 0.05$), 见图 2。

2.2 龟板联合 β -细辛醚对 PD 模型大鼠 α -syn 含量的影响 与正常组比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$; 与正常组比较, 模型组大鼠的 α -syn 含量显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组 α -syn 含量均明显下降 ($P < 0.05$)。但各给药组间的 α -syn 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。

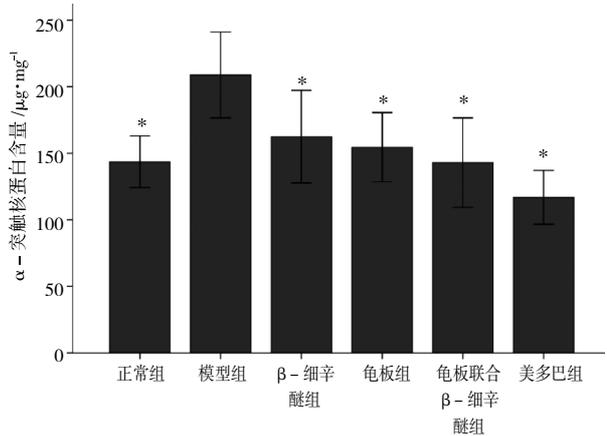
2.3 龟板联合 β -细辛醚对 PD 模型大鼠 TH 的影响 见图 4、图 5。与正常组比较, 模型组大鼠 TH 阳性细胞数明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组的 TH 阳性细胞数明显增高 ($P < 0.05$), 其中龟板联合 β -细辛醚组 TH 阳性细胞数高于龟板组、 β -



注: 与正常组比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$ 。

图 2 大鼠滚轴实验结果比较

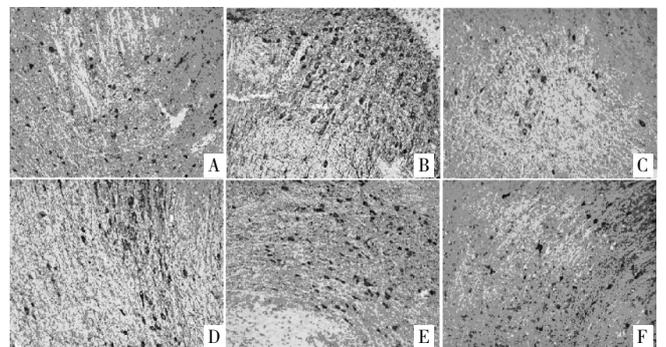
Figure 2 The rotarod test results in different groups ($P < 0.05$, * compared with model group)



注: 与正常组比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$ 。

图 3 大鼠脑内 α -syn 含量变化

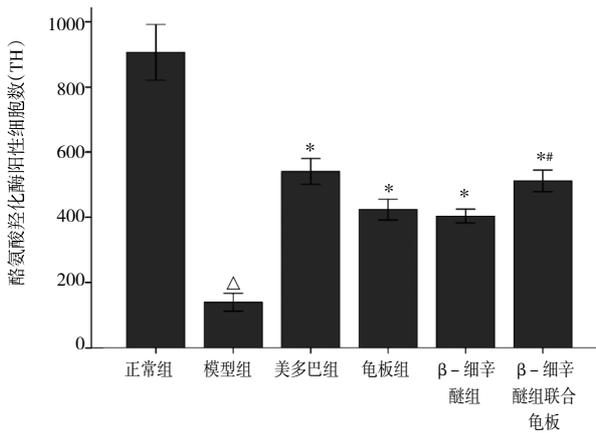
Figure 3 The α -syn expression level analyzed by ELISA in different groups



A. 美多巴组; B. 正常组; C. 模型组; D. 龟板组; E. 龟板联合 β -细辛醚组; F. β -细辛醚组

图 4 大鼠中脑黑质 TH 的免疫组化图 ($\times 200$, ABC 染色)

Figure 4 The TH expression of substantia nigra in different groups ($\times 200$, ABC)



注：与正常组比较，[^]*P* < 0.05；与模型组比较，**P* < 0.05；与龟板组和 β-细辛醚组比较，***P* < 0.05。

图 5 免疫组化检测大鼠中脑 TH

Figure 5 The TH expressions of substantia nigra analyzed by immunohistochemistry in different groups

β-细辛醚组，并与美多巴中 TH 阳性细胞数相当，提示龟板联合 β-细辛醚更有利于保护脑内的 TH。

3 讨论

祖国医学认为 PD 多为本虚标实，肝肾亏损是其本；风、火、痰、瘀为其标。肝肾阴虚、痰阻清窍为其主要病机，所以治疗当用补肾开窍法。本实验观察到益肾中药龟板对 PD 模型大鼠的行为学有一定程度的改善作用，而且联合石菖蒲中主要成分 β-细辛醚后具有更加明显的效果。龟板咸、甘、平，入肾经，滋阴之力强，而肾主发育，肾阴是人体阴液的根本，对各脏腑组织起着濡润、滋养的作用。石菖蒲芳香走窜，有开窍豁痰、醒神益智的功效，为开窍醒神之要药，研究^[9]证实 β-细辛醚是其中入脑的主要成分。因此，两者联合应用可以有协同增效的作用。

李伊为等^[2]报道龟板能提高 PD 动物模型纹状体内的多巴胺(DA)及其代谢产物 DOPAC 及 HVA 的水平，而且发现龟板能改善 PD 大鼠旋转行为。本研究表明，龟板联合 β-细辛醚能够改善 PD 模型大鼠的自主活动度及运动平衡功能，我们推测两者联用能够改善 PD 模型大鼠行为学可能在于其提高脑内多巴胺及其代谢物的水平。

龟板联合 β-细辛醚能够提高脑内 TH 的含量。TH 是影响 DA 合成的重要限速酶之一，在 DA 生物合成的调节中发挥重要作用，所以该酶在生物体内，尤其是在黑质纹状体系统中的变化会直接影响到 L-多巴胺的生物合成，TH 的变化与 PD 的发生发展密

切相关。本实验观察到对比龟板组和 β-细辛醚组，两者联用更有利于提高 TH 的含量，这可能提示 β-细辛醚有协同龟板保护多巴胺神经元损伤的作用，也解释了其对 PD 模型大鼠行为学和神经递质上的作用。有研究证实 α-突触核蛋白能抑制 TH 的表达^[11]，而且免疫共沉降研究显示 TH 与 α-syn 结合^[12]。在 TH 的酶促反应体系中添加了 α-syn 后，TH 的活性表现出不同程度的下降^[13]。

本实验还观察到龟板联合 β-细辛醚能降低大鼠脑内的 α-syn 含量。α-syn 与 PD 的发病有密切的联系，α-syn 蛋白总量增多或具有毒性构象的 α-syn 蛋白选择性增多，都可以导致 DA 细胞易死亡。α-syn 编码基因的突变点(A53T, A30P 和 E46K)能导致常染色体显性遗传的 PD，此外，作为路易小体(Lewy)的重要纤维组成部分，它既见于散发的 PD 患者，又见于 α-syn 基因突变的 PD 病患者^[14]。家族性 PD 患者中 α-syn 基因会发生二倍体化或三倍体化^[15]，而散发性 PD 与 α-syn 的等位基因多态性有关。过度表达的野生型或突变型 α-syn 能够模拟出 PD 的关键表型和病理特征^[16]。因此我们推测龟板联合 β-细辛醚可能通过降低 α-syn 含量而对多巴胺神经元发挥一定保护作用。

本研究初步证实了龟板联合 β-细辛醚给药后能明显改善 6-OHDA 诱导 SD 大鼠的自主活动计数以及运动平衡功能，增加大鼠脑内的 TH 阳性细胞数，同时降低纹状体中 α-syn 水平。但是龟板联合 β-细辛醚对 PD 模型大鼠的神经递质和线粒体功能影响等其他机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Mandel S, Grunblatt E, Riederer P, et al. Neuroprotective strategies in parkinson's disease: an update on progress [J]. CNS Drugs, 2003, 17(10): 729.
- [2] 李伊为, 周健洪, 陈东风, 等. 龟板对帕金森病大鼠行为和脑内多巴胺水平的影响[J]. 解剖学研究, 2004, 26(1): 17-21.
- [3] 邓汝东, 李伊为, 陈东风, 等. 龟板抗 Parkinson 病大鼠多巴胺能神经元凋亡的作用[J]. 神经解剖学杂志, 2008, 24(3): 301-306.
- [4] 赵丹, 陈东风, 李伊为, 等. 中药龟板对 Parkinson 病大鼠模型 BMP4 表达的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2009, 25(6): 655-658.
- [5] Liu L, Fang YQ. Analysis of the distribution of β-asarone in rat hippocampus, brainstem, cortex and cerebellum with gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)[J]. J Med Plants Res, 2011, (59): 1728-1734.
- [6] 方永奇, 匡忠生, 谢宇辉, 等. 石菖蒲对缺血再灌注脑损伤大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2002, 11(17):

- 1647-1649.
- [7] 陈奕芝, 方永奇, 梁毅, 等. β -细辛醚对谷氨酸所致 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(6): 22-23.
- [8] 陈奕芝, 方永奇, 梁毅, 等. β -细辛醚对谷氨酸诱导损伤的脑皮层神经元凋亡线粒体膜电位和超微结构的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2007, 14(5): 263-266.
- [9] 陈奕芝, 王绮雯, 梁毅, 等. β -细辛醚对谷氨酸所致脑皮层神经元损伤的保护作用[J]. 中药材, 2006, 30(4): 436-438.
- [10] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates[M]. San Diego: Academic Press, 1997: 60-61.
- [11] Yu S, Zuo X, Li Y, et al. Inhibition of tyrosine hydroxylase expression in alpha-synuclein-transfected dopaminergic neuronal cells [J]. Neurosci Lett, 2004, 367(1): 34-39.
- [12] Perez RG, Waymire JC, Lin E, et al. Zigmund MJA role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis [J]. J Neurosci, 2002, 22(8): 3090-3099.
- [13] 张晓录, 于顺, 陈彪, 等. 帕金森病病因蛋白质: 突触核蛋白对酪氨酸羟化酶活性的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 13(9): 34-36.
- [14] Klionsky DJ, Ohsumi Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999, 15: 1-32.
- [15] Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, et al. Dissection of autophagosome formation using APg5-deficient mouse embryonic stem cells[J]. J Cell Biol, 2001, 152: 657-668.
- [16] Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice[J]. Nature, 2006, 441(7095): 885-889.

(编辑: 修春)

小檗碱对 LPS、IL-4 诱导的小鼠 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 、IL-10 的影响

吴阳阳, 董 燕, 易 浪, 王 青(广州中医药大学临床药理研究所免疫研究室, 广东 广州 510405)

摘要: 目的 观察小檗碱(Berberine, Ber)对脂多糖(LPS)以及白介素-4(IL-4)诱导的 RAW264.7 细胞株分泌炎症因子中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、抑炎因子白介素(IL-10)的影响, 初步探讨 Ber 对巨噬细胞极化的影响。方法 噻唑蓝(MTT)法测定小檗碱对 RAW264.7 细胞增殖的影响, 选取半数抑制浓度(IC₅₀)以下的小檗碱浓度作为干预剂量; 酶联免疫法(ELISA)检测小檗碱对 LPS 以及 IL-4 不同诱导状态下 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 、IL-10 的影响。结果 小檗碱对 RAW264.7 细胞的 IC₅₀ 在 400 ~ 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间。LPS 作用下 RAW264.7 细胞促炎因子 TNF- α 分泌量明显升高, Ber(剂量分别为 5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)有显著的抑制作用, 并有剂量依赖关系(均 $P < 0.01$); 而 LPS 刺激下细胞 IL-10 分泌量也明显升高($P < 0.05$), 而 Ber 仅在 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量下表现抑制作用。在 IL-4 作用下, RAW264.7 细胞抗炎因子 IL-10 分泌量明显升高, Ber (剂量分别为 5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)有显著的抑制作用, 并呈现剂量依赖关系(均 $P < 0.01$); IL-4 作用下 TNF- α 分泌量明显降低($P < 0.05$), Ber 对 TNF- α 分泌量的影响无剂量依赖性。结论 Ber 对 LPS 刺激下促炎因子 TNF- α 的分泌具有抑制作用, 对 IL-4 诱导下 IL-10 分泌量的升高也有抑制作用, 提示 Ber 在巨噬细胞极化过程中有调节作用。

关键词: 小檗碱; 脂多糖; 白介素-4; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-10

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0268-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.007

Effects of Berberine on TNF- α and IL-10 Secretion Induced by LPS and IL-4 in RAW264.7 Cells

WU Yangyang, DONG Yan, YI Lang, WANG Qing (Dept. of Immunology, Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the effects of berberine on inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) secreted by macrophage RAW264.7 cells after

收稿日期: 2014-02-21

作者简介: 吴阳阳, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药免疫药理。Email: 626635898@qq.com。通讯作者: 董燕, 研究员, 研究方向: 中药免疫药理与分子生物学技术。Email: dondy001@gzucm.edu.cn。