

敛肝熄风养血濡筋方对帕金森病模型大鼠脑组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

文晓东¹, 任 丁¹, 王春玲², 王凯华¹, 蒙 冰¹, 孔德燕¹(1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530011; 2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001)

摘要: **目的** 探讨敛肝熄风养血濡筋方对帕金森病(Parkinson's disease, PD)大鼠黑质抗凋亡蛋白-2(Bcl-2)、促凋亡蛋白(Bax)表达的影响。**方法** 采用 6-羟基多巴胺(6-OHDA)纹状体左侧两点注射法复制 PD 大鼠模型, 术后将大鼠随机分为空白对照组、模型组、美多巴组(0.075 g·kg⁻¹)、敛肝熄风养血濡筋方(LXYR)(32, 16, 8 g·kg⁻¹)剂量组, 连续灌胃 4 周。实验结束后, 免疫组化法检测各组大鼠黑质组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达。**结果** 与空白对照组比较, 模型组 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达增加(均 $P < 0.01$)。与模型组比较, 敛肝熄风养血濡筋方高、中剂量组均能增加 Bcl-2 蛋白表达, 降低 Bax 蛋白表达, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 其中以高剂量组改变最为显著($P < 0.01$), 而低剂量组及美多巴组与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 敛肝熄风养血濡筋方可通过调节 Bcl-2/Bax 表达数量而起到保护黑质多巴胺能神经元的作用。

关键词: 敛肝熄风养血濡筋方; 帕金森病; 细胞凋亡; 抗凋亡蛋白-2; 促凋亡蛋白

中图分类号: 285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)04-0406-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.005

Influence of *Liangan Xifeng Yangxue Rujin* Formula on Bcl-2 and Bax Protein Expression in Brain Tissue of Parkinson's Disease Rats

WEN Xiaodong¹, REN Ding¹, WANG Chunling², WANG Kaihua¹, MENG Bin¹, KONG Deyan¹ (1. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, 530011 Guangxi, China; 2. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001 Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of *Liangan Xifeng Yangxue Rujin*(LXYR)Formula, a Chinese herbal formula with the actions of astringing liver to extinguish wind and nourishing blood to moisten the tendon, on Bcl-2 and Bax protein expression in substantia nigra of rats with Parkinson's disease(PD). **Methods** The hemilateral PD model was reproduced by stereotaxically two-site injection of 6-hydroxydopamine(6-OHDA)into the left side of rat striatum. Rats were randomized into five groups, namely normal control group, model group, madopar group, LXYR groups (32, 16, 8 g·kg⁻¹). The oral administration of the intervention medicine lasted for 4 weeks. At the end of the experiment, Bcl-2 and Bax protein expression levels were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the normal control group, cerebral Bcl-2 and Bax expression was increased in the model group($P < 0.01$). In contrast with the model group, high-and middle-dose LXYR decreased Bax expression and increased Bcl-2 expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$). However, the expression levels of Bax and Bcl-2 in low-dose LXYR group and madopar group did not differ from the model group ($P > 0.05$). **Conclusion** LXYR Formula could protect nigrostriatal dopaminergic neurons from apoptosis through regulating Bcl-2 and Bax expression.

Keywords: *Liangan Xifeng Yangxue Rujin* Formula; Parkinson's disease; Apoptosis; Anti-apoptosis protein 2(Bcl-2); Apoptosis-promoting protein(Bax)

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是严重影响中老年身心健康的主要神经变性疾病, 迄今对 PD 的

治疗仍然采用多巴胺(DA)替代疗法, 只能起到改善症状的作用, 不能延缓病程的进展和 DA 能神经元退

收稿日期: 2013-12-29

作者简介: 文晓东, 男, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 帕金森病的基础及临床研究。Email: wenxiaodong0912dr@163.com。通讯作者: 王春玲, 博士, 讲师, 研究方向: 中医药防治帕金森病。Email: 1021643438@qq.com。

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重大项目(2006BAI04A11-1)。

变, 长期应用毒副作用大, 疗效随时间延长而逐渐减弱、终止, 还可能加速患者残存的多巴胺能神经元的变性、凋亡。因此, 人们更加关注 PD 的神经保护治疗。近年研究^[1-2]显示, 细胞凋亡是 PD 发病的重要机制之一。敛肝熄风养血濡筋方 (LXYR) 为治疗 PD 的经验方, 源出《伤寒论·厥阴病》主方乌梅丸, 由乌梅、白芍、熟地黄、何首乌、天麻等 14 味中药组成, 具有敛肝熄风、养血濡筋的功效。前期研究^[3]表明, LXYR 能抑制帕金森病大鼠黑质细胞的凋亡, 提示 LXYR 对多巴胺能神经元具有保护作用, 但其机制尚需进一步阐明。本研究通过单侧纹状体两点注射 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 复制 PD 大鼠模型, 探讨 LXYR 对促凋亡蛋白 (Bax)、抗凋亡蛋白 -2 (Bcl-2) 表达的影响, 以期治疗 PD 寻找新的途径。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠, 体质量 (220 ± 20)g, 购自广西中医药大学实验动物中心, 许可证号: (桂) 医动字 11004 号。自由进食, 饮水, 室温 (25 ± 2)℃。

1.2 药物 LXYR 方药 (乌梅 20 g、黄连 3 g、白芍 20 g、当归 10 g、熟附子 10 g、熟地黄 10 g、何首乌 20 g、川芎 10 g、葛根 20 g、人参 10 g、石菖蒲 5 g、天麻 10 g、龟板 10 g、炙甘草 3 g 等), 饮片购自广西中医药大学附属瑞康医院, 常规水煎, 过滤, 浓缩至 1.6 kg·L⁻¹ 的浸膏, 4℃ 保存备用。

1.3 试剂及仪器 6-OHDA 批号: 16000-085 美国 Sigma 公司; 美多巴, 批号: SH1081, 上海罗氏制药有限公司; 兔抗鼠多克隆 Bcl-2 抗体 (批号: BA0412)、兔抗鼠多克隆 Bax 抗体 (批号: BA0567), 武汉博士德生物科技有限公司。Allegra X-22 型低温高速离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; RM2255 型全自动石蜡切片机, 德国徕卡公司; 奥林巴斯 BX50 生物组织显微镜, 日本奥林巴斯公司; 北航多媒体真彩色病理图文分析系统。

1.4 PD 模型复制 参照文献^[4]复制 PD 大鼠模型。大鼠麻醉后固定于脑立体定位仪, 根据大鼠脑立体定位图谱^[5], 于左侧纹状体部位, 注射溶解有抗坏血酸的 6-OHDA (5 μg·μL⁻¹), 术后予青霉素肌肉注射预防感染, 术后第 2 周开始旋转行为测试选取 PD 大鼠。若大鼠恒定转向右侧, 最大转速大于 7 r·min⁻¹, 30

min 内旋转圈数大于 150 r·min⁻¹, 视为 PD 大鼠模型制作成功^[6]。

1.5 分组及给药 经测试确定成模后的 PD 大鼠, 随机分为 5 组: 模型组, 美多巴组 (0.075 g·kg⁻¹)、LXYR 高、中、低剂量组 (按生药量计, 32.0, 16.0, 8.0 g·kg⁻¹), 并设空白对照组, 每组 8 只。空白对照组和模型组分别给予等容积的蒸馏水, 各给药组每天灌胃给药 1 次, 连续 28 d。

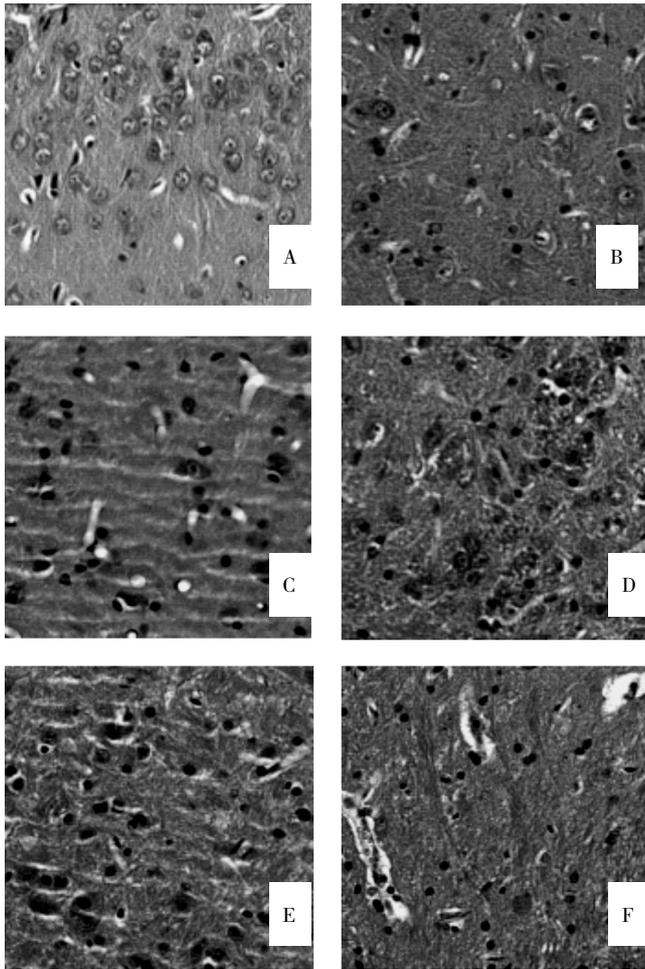
1.6 指标检测 末次给药后, 用 4% 多聚甲醛进行心脏灌流固定, 断头取脑。石蜡包埋, 依据图谱, 将蜡块先快速厚切, 确认切到黑质部位后, 调整片厚为 4 μm。每只大鼠黑质部位各取 10 张切片, 用于免疫组织化学染色。用 SP 法进行 Bcl-2 和 Bax 蛋白的免疫组化染色。一抗由武汉博士德生物科技有限公司提供, 阴性对照用 PBS 液代替一抗。在细胞质内出现棕黄染色颗粒代表 Bcl-2 和 Bax 蛋白阳性表达细胞。于每个鼠脑取 1 张切片, 每张切片分别随机选取左侧中脑黑质区 5 个不重复高倍镜视野 (×200), 计数每个视野阳性细胞数, 计算平均数即为每张切片阳性细胞数。

1.7 统计学处理方法 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件, 各组间数据比较采用 *t* 检验; 多组间数据比较采用单因素方差分析 (ANOVA), *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LXYR 对 6-OHDA 大鼠患侧黑质神经细胞形态学的影响 见图 1。空白对照组黑质神经元数量较多, 结构清晰, 神经细胞部分可见树突或者轴突, 胞核圆, 染色质均匀呈网状分布。模型组神经元细胞数量减少, 结构排列紊乱, 部分神经细胞发生固缩, 体积缩小, 呈不规则形态, 胶质细胞部分浸润。美多巴组可见发生固缩的细胞, 散在分布, 神经纤维排列紊乱, 胶质细胞部分浸润。LXYR 高、中剂量组尽管黑质内也出现神经元减少, 与模型组比较, 神经细胞数量明显增多, 发生固缩的细胞, 数量较少, 胶质细胞少量浸润。低剂量组可见部分神经细胞发生固缩, 体积变小, 结构排列较为紊乱, 少量胶质细胞浸润。

2.2 LXYR 对 PD 大鼠黑质 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 见表 2。空白对照组 Bcl-2 阳性细胞数为 (8.37 ± 1.71), 呈少量表达; 模型组 Bcl-2 阳性细胞



A. 空白对照组; B. 模型组; C. 美多巴组; D. LXYSR 高剂量组; E. LXYSR 中剂量组; F. LXYSR 低剂量组

图 1 各组对大鼠患侧黑质神经细胞形态学的影响 (HE, × 200)

Figure 1 Effects of LXYSR on nigrostriatal neurons morphology in PD rats (by HE staining, × 200)

表 2 各组对大鼠黑质细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tabel 2 Effects of LXYSR on the exprssion levels of Bcl-2/ Bax in rat nigrostriatal cells

组别	n	剂量 / g·kg ⁻¹	Bcl-2	Bax
空白对照组	8	-	8.37 ± 1.71	10.47 ± 1.21
模型组	8	-	24.17 ± 1.45**	46.93 ± 2.84**
美多巴组	8	0.075	25.94 ± 1.63	42.29 ± 2.52
LXYSR 高剂量组	8	32.0	33.62 ± 2.81 ^{△△}	31.62 ± 2.07 ^{△△}
LXYSR 中剂量组	8	16.0	29.76 ± 2.03 [△]	38.51 ± 1.81 [△]
LXYSR 低剂量组	8	8.0	26.58 ± 1.34	41.85 ± 2.35

注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 。

表达数为 (24.17 ± 1.45), 表达增多, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, LXYSR 高、中剂量组 Bcl-2 阳性细胞数分别为

(33.62 ± 2.81、29.76 ± 2.03), 阳性细胞明显增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而低剂量组及美多巴组 Bcl-2 阳性细胞数分别为 (26.58 ± 1.34、25.94 ± 1.63), 阳性细胞差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。空白对照组 Bax 阳性细胞数为 (10.47 ± 1.21), 呈少量表达; 模型组 Bax 阳性细胞数为 (46.93 ± 2.84), 表达显著增多, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, LXYSR 高、中剂量组 Bax 阳性细胞数分别为 (31.62 ± 2.07, 38.51 ± 1.81), 阳性细胞明显减少 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而低剂量组及美多巴组 Bax 阳性细胞数分别为 (41.85 ± 2.35, 42.29 ± 2.52), 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

PD 的病因及发病机制尚不清楚, 近年研究^[7-10]表明, 线粒体功能障碍可能在神经退行性疾病发病中起重要作用。不同因素引起的 PD 最终都表现为黑质致密部 DA 能神经元的凋亡, 即 PD 的发病有一条共同的通路——细胞凋亡。线粒体依赖性细胞凋亡途径是细胞凋亡信号通路之一。Bcl-2 是一种定位于线粒体外膜的凋亡抑制蛋白, 能显著地抑制线粒体外膜通透性, 控制线粒体中细胞色素 C 等凋亡因子的释放, 从而促进细胞存活^[2]。Bax 通过诱导线粒体膜去极化而促进凋亡^[11], Bax 和 Bcl-2 可形成同源二聚体, 作为线粒体膜上离子通道的组成成分, 使细胞色素 C 可以穿过线粒体膜, 在细胞质内参与形成凋亡启动复合物, 引发 DNA 断裂及多种细胞质破坏, 导致细胞的凋亡。Bax 与其抗凋亡同系物 Bcl-2 的比率是激发神经细胞发生凋亡的决定因素, 而且 Bax 是各种神经细胞损伤(包括 6-OHDA 所致的 DA 能神经细胞损伤)的启动子, 它作为前凋亡蛋白在启动和诱导黑质细胞凋亡方面起着关键性的作用^[12-13]。

本研究采用 6-OHDA 制备 PD 大鼠模型, 于药物干预 4 周后观察大鼠黑质区凋亡抑制因子 Bcl-2 的表达及促凋亡因子 Bax 的表达情况。免疫组化结果显示, 模型组大鼠黑质区可见 Bcl-2、Bax 大量表达, 而空白对照组未出现上述变化。这些现象表明, DA 能神经元丢失可能与细胞凋亡存在密切联系。

目前对 PD 的治疗仍然是控制症状, 左旋多巴是治疗 PD 的首选药物, 但它并不能阻止病程进展, 长期应用可出现严重的运动并发症。本研究显示, LXYSR 方药能够显著增加 PD 大鼠黑质多巴胺(DA)能神经元数量和中脑 Bcl-2 表达, 明显下调 Bax 表达。

推测 LXJR 方药可能通过上调 Bcl-2 的表达、抑制 Bax 表达, 进而防止线粒体功能障碍, 使 DA 能神经元变性丢失现象有所减轻, 从而发挥一定的神经保护作用。

参考文献:

- [1] Kountouras J, Zavos C, Polyzos SA, et al. Helicobacter pylori infection and Parkinson's disease: apoptosis as an underlying common contributor[J]. Eur J Neurol, 2012, 19(6): e56.
- [2] Mori T, Hayashi T, Su TP. Compromising σ -1 receptors at the endoplasmic reticulum render cytotoxicity to physiologically relevant concentrations of dopamine in a nuclear factor- κ B/Bcl-2-dependent mechanism: potential relevance to Parkinson's disease[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2012, 341(3): 663-671.
- [3] 文晓东, 王春玲, 雒晓东. 帕病 2 号方对帕金森病大鼠多巴胺能神经元的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(3): 568-571.
- [4] 陈玲, 黎锦如, 刘长征, 等. 美多巴对帕金森病大鼠模型多巴胺转运体影响的自显影[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2003, 24(6): 564-567.
- [5] Paxinos G, Watson C. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 第 3 版.北京: 人民卫生出版社, 2005: 18.
- [6] Sanchez Lglesias S, Rey P, Mendez Alvarez E, et al. Time course of brain oxidative damage caused by intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine in a rat model of Parkinson's disease[J]. Neurochem Res, 2007, 32(1): 99-105.
- [7] Shin DI, Oh YJ. Tumor Necrosis Factor-Associated Protein 1 (TRAP1) is Released from the Mitochondria Following 6-hydroxydopamine Treatment[J]. Exp Neurobiol, 2014, 23(1): 65-76.
- [8] Mullin S, Schapira A. α -Synuclein and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease[J]. Mol Neurobiol, 2013, 47(2): 587-597.
- [9] Wilding C, Bell K, Beck S, et al. α -Synuclein antibodies have neuroprotective potential on neuroretinal cells via proteins of the mitochondrial apoptosis pathway[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90737.
- [10] Venderova K, Park DS. Programmed cell death in Parkinson's disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(8): a009365.
- [11] Kim TW, Moon Y, Kim K, et al. Dissociation of progressive dopaminergic neuronal death and behavioral impairments by Bax deletion in a mouse model of Parkinson's diseases [J]. PLoS One, 2011; 6(10): e25346.
- [12] Kavitha M, Nataraj J, Essa MM, et al. Mangiferin attenuates MPTP induced dopaminergic neurodegeneration and improves motor impairment, redox balance and Bcl-2/Bax expression in experimental Parkinson's disease mice[J]. Chem Biol Interact, 2013, 206 (2): 239-247.
- [13] Xu CL, Wang QZ, Sun LM, et al. Asiaticoside: attenuation of neurotoxicity induced by MPTP in a rat model of Parkinsonism via maintaining redox balance and up-regulating the ratio of Bcl-2/Bax[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2012, 100(3): 413-418.

(编辑: 邓响潮)

嘌呤类生物碱 Theacrine 对 SIRT3 调节的脂肪酸代谢相关基因影响

徐 军¹, 翟羽佳², 王国恩², 杨 影³, 李怡芳², 栗原博², 秦书俭¹, 何蓉蓉²(1. 辽宁中医药大学, 辽宁沈阳 110032; 2. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东广州 510632; 3. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁医学院附属第一医院转化医学研究中心, 辽宁锦州 121001)

摘要: 目的 探讨嘌呤类生物碱 1, 3, 7, 9-四甲基尿酸(Theacrine)对 Sirtuin3(SIRT3)调节的脂肪酸代谢相关基因的影响。方法 对 3T3-L1 前脂肪细胞进行诱导分化, 并在诱导的第 5 天对细胞培养液中加入不同浓度的 Theacrine 孵育, 采用实时荧光 PCR(RT-PCR)方法测定细胞内 SIRT3 及脂肪酸代谢相关基因的表达。并对正常小鼠灌胃给予低、中、高剂量的 Theacrine(10, 20, 40 mg·kg⁻¹)及 Caffeine(20 mg·kg⁻¹)1h 后, 采用 RT-PCR 测定小鼠肝脏组织、棕色脂肪组织中 SIRT3 及脂肪酸代谢相关基因 LCAD、ATP5c、UCP1、HTGL、FABP4 等基因的表达, 同时采用 Western Blotting 检测肝脏中 SIRT3 的蛋白表达。结果 与正常对照组比较, Theacrine 可以上调 3T3-L1 前脂肪细胞在分化过程中 SIRT3、LCAD、FABP4、LPL 的表达。低剂量的 Theacrine 可显著上调小鼠肝脏中 SIRT3 基因, 高剂量则表现为抑制作用, 与其蛋白表达结果一致。同时, 低、高剂量的

收稿日期: 2014-03-07

作者简介: 徐军, 男, 教授, 研究方向: 中西医结合基础。Email: xujun681101@163.com。通讯作者: 秦书俭, 男, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中西医结合基础。Email: 15941628672@139.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81102485); 广东省自然科学基金项目(20120011316); 辽宁省科技厅项目(201202129)。