

龟羚帕安丸对帕金森病大鼠模型中脑黑质细胞 Nestin 蛋白, Nestin mRNA 及 DAT 蛋白的影响

张良芝¹, 常学辉^{2*}, 宁亚红³

(1. 河南中医药大学基础医学院, 郑州 450008; 2. 河南中医药大学第二临床医学院, 郑州 450002; 3. 河南中医药大学, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**观察龟羚帕安丸对帕金森病(PD)大鼠黑质细胞巢蛋白(Nestin),多巴胺转运体(DAT)及 Nestin mRNA 表达的影响。**方法:**大鼠黑质致密部注射 6-羟基多巴胺(6-OHDA),后大鼠 *ip* 阿扑吗啡(APO)诱导旋转建立 PD 大鼠模型。PD 大鼠随机分为模型组,多巴丝肼组,龟羚帕安丸高、中、低剂量组,同时设立假手术组,模型组。假手术组每日 *ig* 同等容积的生理盐水;多巴丝肼组 *ig* 多巴丝肼混悬液($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);龟羚帕安丸高、中、低剂量组 *ig* 龟羚帕安丸混悬液($4, 2, 1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),连续 30 d。免疫组化法检测各组大鼠中脑黑质 Nestin, DAT 蛋白表达,原位杂交法检测各组大鼠中脑黑质 Nestin mRNA 的表达。**结果:**模型组黑质细胞 Nestin, DAT 蛋白, Nestin mRNA 表达均显著低于假手术组($P < 0.01$);各治疗组 Nestin 蛋白, Nestin mRNA, DAT 蛋白表达均显著高于模型组($P < 0.01$)。**结论:**龟羚帕安丸治疗帕金森病的作用机制可能与上调 Nestin, DAT 表达,促进神经的修复和再生,增加多巴胺(DA)含量有关。

[关键词] 龟羚帕安丸; 帕金森病; 巢蛋白; 多巴胺转运体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0115-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040115

Effect of Guiling Pa'an Pill on Expression of Nestin, Nestin mRNA and DAT in Substantia Nigra Cells of Rat Models with Parkinson's Disease

ZHANG Liang-zhi¹, CHANG Xue-hui^{2*}, NING Ya-hong³

(1. Basic Medical School, Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450008, China;
2. The Second Clinical Medical School, Henan University of TCM, Zhengzhou 450002, China;
3. Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Guiling Pa'an pill on the expression of Nestin, Nestin mRNA and dopamine transporter (DAT) in substantia nigra cells of rats with Parkinson's disease (PD). **Method:** SPF grade rats were stereotaxically injected with 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA) and apomorphinum (APO) to induce PD rat models. Rats were randomly divided into model group, madopar group, Guiling Pa'an pill high dose group, middle dose group and low dose group, and at the same time, the sham operation group was also established. Rats in model group and sham operation group daily received the same volume of normal saline. Rats in madopar group received $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ suspension by *ig*. Rats in Guiling Pa'an pill high dose group, middle dose group and low dose group received $4, 2, 1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ suspension respectively by *ig*, all with a course of 30 days. The Nestin and DAT protein levels of the substantia nigra tissue were detected by immunohistochemistry for various groups; Nestin mRNA level in substantia nigra tissues was detected by hybridization in situ method for

[收稿日期] 20150603(013)

[基金项目] 河南省中医管理局中医临床学科领军人才培养计划项目(201301006);河南中医学院科技创新人才支持计划项目(2010XCXRC06)

[第一作者] 张良芝, 硕士, 副教授, 从事中医杂病防治研究, Tel:13333865263, E-mail: zlz0721@163.com

[通讯作者] * 常学辉, 博士, 教授, 从事中医杂病防治研究, Tel:13383865938, E-mail: xhchang123@126.com

various groups. **Result:** Nestin and DAT protein expression and Nestin mRNA expression in substantia nigra tissues of the model group were significantly lower than those in sham operation group ($P < 0.01$). Compared with model group, the Nestin protein, Nestin mRNA and DAT protein expressions in substantia nigra tissues of various treatment groups were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Action mechanism of Guiling Pa'an pill for the treatment of Parkinson's disease might be associated with increasing Nestin, DAT expressions, which would promote the repair and regeneration of nerves and increase the content of dopamine.

[**Key words**] Guiling Pa'an pill; Parkinson's disease; Nestin; dopamine transporter

帕金森病(PD)是中老年人临床常见的一种神经系统变性疾病,主要病理改变是中脑黑质多巴胺能神经元的变性死亡,引起纹状体多巴胺(DA)含量显著减少导致^[1]。西医学目前以左旋多巴为代表的多巴胺替代疗法可以不同程度改善临床症状,但是不能阻止或延缓疾病的发展进程,而且长期治疗后逐渐产生治疗开关现象,运动障碍,精神症状等副作用^[2]。神经干细胞移植日益成为治疗本病最有前景的方法之一,但是面临细胞存活率低的问题^[3]。中医药干预,促进干细胞存活,转化为多巴胺能神经元是研究热点^[4]。龟龄帕安丸是河南省中医院脑病科研制的用于治疗 PD 的中药复方,经多年临床验证对 PD 有较好疗效^[5-6],作用机制与抗自由基损伤,调节 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的表达,减少 PD 大鼠的神经元凋亡及提高 Nurr1 表达,上调下游靶基因 TH 的表达^[7],从而诱导神经干细胞分化为成熟多巴胺能神经元,并最终转化为神经递质多巴胺(DA)有关^[8-10]。本研究以 PD 模型大鼠为研究对象,探讨龟龄帕安丸对其中脑黑质巢蛋白(Nestin),多巴胺转运体(DAT)及 Nestin mRNA 表达的影响。

1 材料

1.1 药物 龟龄帕安丸(由龟板,羚羊角,全蝎,威灵仙,厚朴等组成,河南省中医院院内部制剂,批号郑卫制剂 Z04010162)研末筛取细粉状物质,以生理盐水稀释成 0.4,0.2,0.1 g·mL⁻¹ 混悬液备用。多巴丝肼片(上海罗氏制药有限公司,批号 SH1652)临时用生理盐水稀释成 2 g·L⁻¹ 混悬液。

1.2 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重(200 ± 20) g,购自河南省实验动物中心,合格证号 SCXK(豫)2010-0002。

1.3 试剂 鼠抗 Nestin 单克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号 4760),鼠抗多巴胺转运体(DAT)单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 sc-32258),6-羟基多巴胺(6-OHDA,批号 1001499259)和阿扑吗啡(APO,批号 1001504348)均购自美国

Sigma 公司;Nestin 原位杂交试剂盒(批号 MK1844-Rat),SABC 免疫组化染色试剂盒(批号 SA1025),DAB 显色试剂盒(批号 AR1022),PBS 缓冲液(A 批号 R0030),均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 仪器 51650 型大鼠脑立体定向仪(美国 Stoelting 公司),5 μL 微量进样器(上海安亭微量进样器厂),ZH-GSZ 型高速颅骨钻(淮北正华生物仪器设备有限公司),SZ51 型光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 模型制备 参照文献[10]方法,大鼠采用左侧黑质致密部立体定向注射 6-OHDA(8 μg)建立 PD 大鼠模型。术后 1 周 APO 按 0.5 mg·kg⁻¹ ip 诱导旋转,若大鼠出现以右侧肢体为支点,身体向右侧弯曲,首尾相接,原地转动,并伴有嗅探,颤抖等动作,且 30 min 内平均旋转圈数 > 7 r·min⁻¹,则视为成功 PD 大鼠模型。假手术组黑质内注射物质为同等量生理盐水。

2.2 分组与给药 将造模成功的 PD 大鼠随机分为模型组,多巴丝肼组,龟龄帕安丸高、中、低剂量组 5 组。假手术组,模型组每日 ig 同等容积的生理盐水;多巴丝肼组 ig 多巴丝肼混悬液(10 mg·kg⁻¹);龟龄帕安丸高、中、低剂量组分别 ig 龟龄帕安丸混悬液(4,2,1 g·kg⁻¹)。每日 1 次,共 30 d。

2.3 取材与指标检测 灌胃 30 d 后,所有大鼠断头取脑,放于冰盘上快速完整剥取脑组织,分离出大脑中脑黑质,在含 0.1% 焦碳酸二乙酯的 4% 多聚甲醛中 4 ℃ 固定 4~6 h。常规石蜡包埋,切片(片厚 5 μm)。Nestin 和 DAT 蛋白表达检测用免疫组化法,Nestin mRNA 表达检测用原位杂交法,专人按说明书方法操作,在郑州大学医学院进行检测。以细胞核呈深棕色为细胞阳性表达,在光镜高倍视野下,对每张切片同一区域中,随机取 5 个视野,面积大致相同,采集 5 组数据,平均值作为目标区域阳性反应物质的平均积分吸光度。图像采集与分析采用 Leica 显微照相系统与 Biosens Digital Imaging System v1.6

分析系统进行。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 处理, 各组数据符合正态分布和方差齐性的采用单因素方差分析, 若不符合正态分布和方差齐性则采用多个相关样本的非参数检验, 平均积分吸光度以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

龟龄帕安丸对 PD 大鼠中脑黑质 Nestin 蛋白, Nestin mRNA, DAT 蛋白表达的影响 模型组黑质细胞 Nestin 蛋白, DAT 蛋白, Nestin mRNA 表达均显著低于假手术组 ($P < 0.01$); 龟龄帕安丸高、中、低剂量组及多巴丝肼组大鼠黑质细胞 Nestin 蛋白, DAT 蛋白, Nestin mRNA 表达均显著高于模型组 ($P < 0.01$)。见表 1 和图 1~3。

表 1 龟龄帕安丸对 PD 大鼠中脑黑质 Nestin 蛋白, Nestin mRNA, DAT 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Guiling Pa'an pill on expressions of Nestin, Nestin mRNA and DAT in substantia nigra cells of rats with Parkinson's disease ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

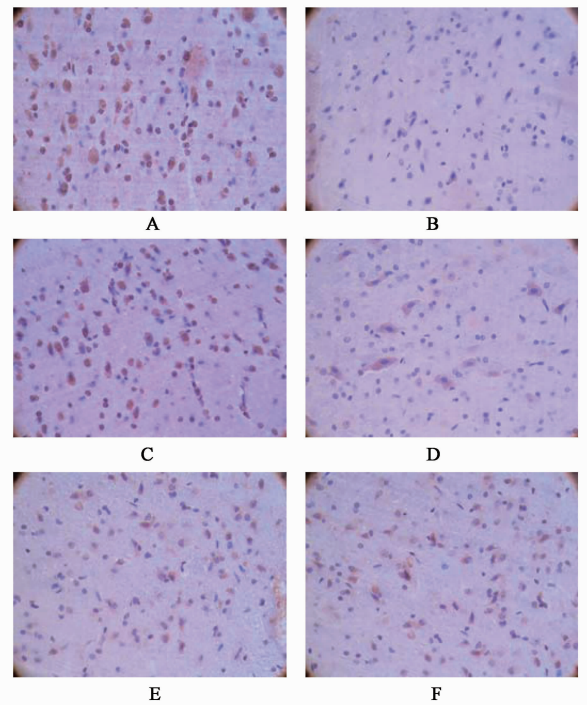
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Nestin 蛋白	Nestin mRNA	DAT 蛋白
假手术	-	153.6 ± 1.5	131.9 ± 4.9	156.6 ± 5.7
模型	-	107.3 ± 5.6 ¹⁾	58.8 ± 2.6 ¹⁾	69.9 ± 4.3 ¹⁾
多巴丝肼	0.010	136.9 ± 8.6 ²⁾	87.4 ± 5.3 ²⁾	127.1 ± 2.6 ²⁾
龟龄帕安丸	1	119.8 ± 9.6 ²⁾	69.8 ± 4.6 ²⁾	85.5 ± 5.5 ²⁾
	2	129.9 ± 8.3 ²⁾	76.4 ± 5.5 ²⁾	100.3 ± 4.6 ²⁾
	4	137.9 ± 6.9 ²⁾	88.2 ± 4.9 ²⁾	116.4 ± 8.1 ²⁾

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$, 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

PD 归于中医“颤证, 震颤”范畴, 笔者认为肝肾阴虚, 血瘀阻滞是本病的病机根本, 虚风内动是标。本病多见中老年患者, 人年逾四旬而阴气自半, 肝肾阴虚, 日久阴不敛阳而见阳化风动; 加之年老各脏腑气衰推动无力, 导致水运不畅痰浊内生, 痰阻血脉运行致血行迟滞, 瘀血内停; 肝风夹痰、瘀阻塞清窍, 经髓、筋脉失统而发为本病。龟龄帕安丸是经验方, 由龟板胶、羚羊角、厚朴、全蝎、威灵仙等药组成。方中龟板胶滋阴潜阳, 补肾填精; 羚羊角粉熄风止痉; 全蝎活血祛风, 止痉通络; 佐羚羊角活血以熄风; 威灵仙搜风通络, 可以改善经脉拘挛; 厚朴温中, 燥湿, 消痰。诸药合用共奏滋补肝肾, 养血活血, 通络熄风之功。

神经干细胞移植治疗 PD 的报道屡见报道, 为 PD 患者带来了新的曙光^[11]。Nestin 是一种第 VI 型



A. 假手术组; B. 模型组; C. 多巴丝肼 10 mg·kg⁻¹ 组; D~F. 龟龄帕安丸 (4, 2, 1 g·kg⁻¹) 组 (图 2~3 同)

图 1 龟龄帕安丸对各组大鼠黑质 Nestin 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 1 Comparison of Nestin protein expression in substantia nigra cells of rats (immunohistochemical, ×400)

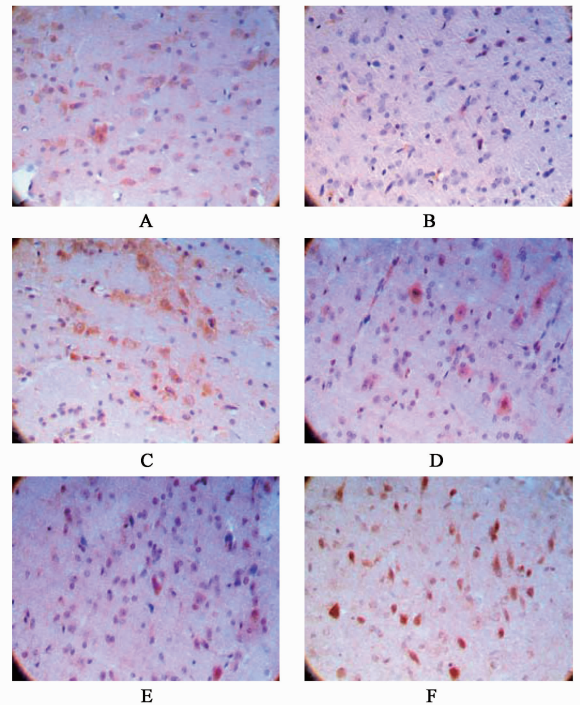


图 2 龟龄帕安丸对各组大鼠黑质 Nestin mRNA 表达的影响 (原位杂交, ×400)

Fig. 2 Comparison of Nestin mRNA expression in substantia nigra cells of rats (hybridization in situ, ×400)

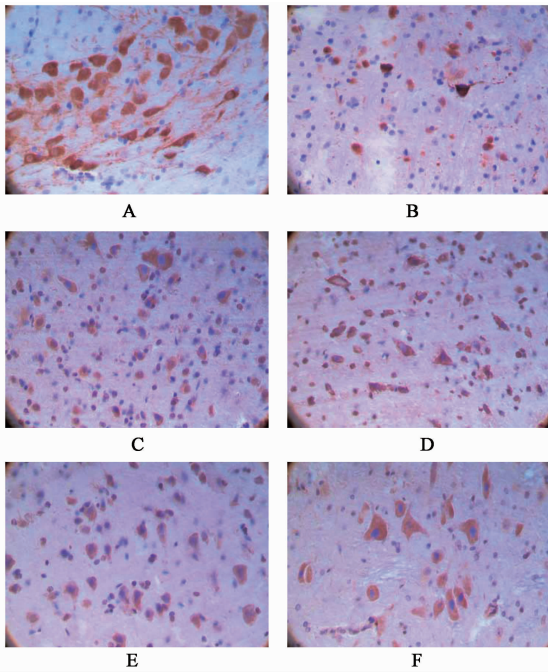


图 3 龟龄帕安丸对各组大鼠黑质 DAT 蛋白表达的影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 3 Comparison of DAT protein expression in substantia nigra cells of rats (immunohistochemical, $\times 400$)

中间丝纤维蛋白,具有调节神经细胞增殖,分化成熟作用,其主要在胚胎神经前体细胞和成年神经干细胞呈一过性表达,随着 NSCs 完成迁移和分化, Nestin 表达逐渐减少甚至消失^[12]。Nestin 在全部中枢神经系统干细胞中均呈现表达,因而已成为中枢神经系统干细胞的鉴定依据,目前被广泛作为神经干细胞的标记物。DAT 是一种膜蛋白,主要由黑质纹状体 DA 能神经元胞体、树突、轴突合成和表达,其将新合成及回摄取的 DA 转运至神经末梢,经包装完备后等待释放再利用,是突触间 DA 灭活的主要形式。DAT 已成为调节 DA 神经系统功能的重要环节,是多巴胺能神经末梢数量的间接反映。研究显示^[13],神经元数量减少至 50% 时, DAT 水平就开始降低,与此同时典型的 PD 临床症状也开始出现。

本实验通过大鼠颅内立体定向注射 6-OHDA, 毁损注射区多巴胺能神经元,引起多巴胺能细胞变性死亡,建立 PD 大鼠模型。结果显示模型组 Nestin 蛋白, mRNA, DAT 蛋白表达均显著低于假手术组,与多巴胺能神经元的变性,丢失相一致。经药物干预后,龟龄帕安丸高、中、低剂量组均可上调 Nestin 蛋白, Nestin mRNA 及 DAT 蛋白的表达,与多巴胺基本一致。由此可以推测神经毒性物质 6-OHDA 黑

质致密部注射后会引发多巴胺能神经元变性坏死,导致 DA 水平下降,应用龟龄帕安丸治疗后可上调 Nestin, DAT 表达,拮抗神经毒性作用,有利于 DA 的转运与释放,促进神经的修复和再生,这可能是龟龄帕安丸治疗 PD 的作用机制之一。

[参考文献]

- [1] 黎荣,徐灵源,梁韬,等. 葛根素对 6-羟多巴胺致帕金森病模型大鼠黑质组织神经细胞的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 247-250.
- [2] 赵贝贝,郑春叶,雒晓东,等. 帕病 2 号方对帕金森病模型大鼠中脑黑质 Nrf2, HO-1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 158-162.
- [3] 王海军,罗焯,刘自英,等. 神经干细胞移植对帕金森大鼠的疗效观察[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2014, 35(21): 3126-3127.
- [4] 董晓先,刘金保,董燕湘,等. 天麻诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(1): 51-54.
- [5] 常学辉,张良芝,李彦杰. 龟龄帕安丸配合美多巴片治疗帕金森病 30 例疗效观察[J]. 新中医, 2008, 40(6): 62-63.
- [6] 蒋诗媛. 龟龄帕安丸治疗帕金森病 38 例[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(4): 118-119.
- [7] 孟毅,乔明亮,常学辉. 龟龄帕安丸对帕金森病大鼠模型氧化应激反应的影响[J]. 中医学报, 2014, 29(2): 230-232.
- [8] 孟毅,乔明亮,宁亚红,等. 龟龄帕安丸对帕金森病大鼠模型多巴胺能神经元凋亡影响的研究[J]. 中医研究, 2014, 27(3): 65-67.
- [9] 张良芝,常学辉,宁亚红. 龟龄帕安丸对帕金森病大鼠行为学及中脑黑质 Nurr1, TH, Nurr1 mRNA, TH mRNA 的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(5): 116-118.
- [10] 文晓东,雒晓东,王春玲. 帕病 2 号方对帕金森病大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 224-228.
- [11] Muraoka K, Shingo T, Yasuhara T, et al. Comparison of the therapeutic potential of adult and embryonic neural precursor cells in a rat model of Parkinson disease[J]. J Neurosurg, 2008, 108(1): 149-159.
- [12] Suzuki S, Namiki J, Shibata S, et al. The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature[J]. J Histochem Cytochem, 2010, 58(8): 721-730.
- [13] Leviel V. Dopamine release mediated by the dopamine transporter, facts and consequences[J]. J Neurochem, 2011, 118(4): 475-489.

[责任编辑 聂淑琴]