

镇肝熄风汤对帕金森病模型小鼠神经行为学 及黑质 14-3-3、酪氨酸羟化酶表达的影响

兴桂华, 王晓丽, 丛欢, 邹宇, 李丽波, 董妙先*

(齐齐哈尔医学院医药科学研究所, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] **目的:**观察镇肝熄风汤对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine MPTP)诱导的 C57BL/6 小鼠帕金森病模型自主活动的影响及其可能机制。**方法:**连续灌胃 14 d 给予不同剂量的镇肝熄风汤(12.5, 25, 50 g·kg⁻¹)和司来吉兰(10 mg·kg⁻¹)预处理,于给药第 11 天开始连续 4 d C57BL/6 小鼠皮下注射 MPTP(30 mg·kg⁻¹)制备帕金森病小鼠模型。通过自主活动实验观察动物行为学表现,采用实时定量 RT-PCR 法检测多功能蛋白 14-3-3 和酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH) mRNA 表达,Western blot 方法检测多功能蛋白 14-3-3, TH 蛋白表达。**结果:**与模型组比较,镇肝熄风汤可显著增强帕金森病小鼠自主活动能力(均 $P < 0.05$),上调多功能蛋白 14-3-3 和 TH mRNA 和蛋白表达(均 $P < 0.05$)。**结论:**镇肝熄风汤具有抗实验性帕金森病的作用,其机制可能与上调多功能蛋白 14-3-3 和 TH 的 mRNA 和蛋白表达有关。

[关键词] 帕金森病;镇肝熄风汤;14-3-3;酪氨酸羟化酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0190-04

[doi] 10.11653/syfy2013210190

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130823.1015.005.html>

[网络出版时间] 2013-08-23 10:15

Effect of Zhengan Xifeng Decoction on Expression of 14-3-3 and Tyrosine Hydroxylase Gene in Substantia Nigra of MPTP-treated C57BL/6 Mice

XING Gui-hua, WANG Xiao-li, CONG Huan, ZOU Yu, LI Li-bo, DONG Miao-xian*

(The Institute of Medicine, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to investigate the effects of Zhengan Xifeng decoction on the spontaneous movement in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated C57BL/6 mice, and some mechanisms involved. **Method:** C57BL/6 mice were given MPTP (30 mg·kg⁻¹) to prepare Parkinson disease mice model. Different doses of Zhengan Xifeng decoction (12.5, 25, 50 g·kg⁻¹), or selegiline (10 mg·kg⁻¹) were given for 14 d in the pretreatment groups. The behavioral analysis of C57BL/6 mice was performed by using spontaneous movement test. Real-time PCR and Western blot were used to analyze the expression of 14-3-3 and tyrosine hydroxylase (TH) mRNA and protein. **Result:** Zhengan Xifeng decoction could reduce the number of spontaneous movement of MPTP-treated C57BL/6 mice. Zhengan Xifeng decoction could also up-regulate the expression of 14-3-3 and TH mRNA and protein. **Conclusion:** Anti-Parkinson disease effect of Zhengan Xifeng decoction may be attributable to up-regulation mRNA and protein expression of 14-3-3 and TH in

[收稿日期] 20130305(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81241107)

[第一作者] 兴桂华, 硕士, 教授, 从事中药神经精神药理学工作, Tel:0452-2663621, E-mail:1057503785@qq.com

[通讯作者] *董妙先, 副主任医师, 从事中医药防治神经退行性疾病的基础研究工作, Tel:0452-2663120, E-mail:dmx1969@126.com

MPTP-treated C57BL/6 mice.

[Key words] Parkinson disease; Zhengan Xifeng decoction; 14-3-3; tyrosine hydroxylase

帕金森病(Parkinson disease, PD)是脑内多种神经递质异常的生化代谢疾病,主要是由于黑质纹状体多巴胺能神经元变性以及残存神经元多巴胺(dopamine, DA)生物合成能力下降,从而导致纹状体 DA 缺乏引起的^[1]。中医抗 PD 是我国的特色和优势,临床应用广泛^[2-3]。酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是 DA 合成的限速酶,由于 PD 病人和 PD 动物模型的黑质和纹状体 TH mRNA 和酶活性都显著降低^[4],通过中医药干预恢复 TH 的正常活性和表达是阻止甚至逆转 PD 进程的策略之一,而经典古方镇肝熄风汤治疗 PD 具有很好的临床基础^[5]。本研究观察镇肝熄风汤对 PD 模型小鼠的行为学以及对 TH 和多功能蛋白 14-3-3 mRNA 和蛋白表达的影响,旨在探讨镇肝熄风汤抗 PD 的作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 C57BL/6 小鼠购于吉林大学实验动物中心,动物许可证号为 SCXK(吉)2008-0005,体质量 20~25 g。

1.2 药品与试剂 镇肝熄风汤由怀牛膝 30 g,代赭石 30 g,生龙骨 15 g,生牡蛎 15 g,生龟板 15 g,玄参 15 g,天冬 15 g,生白芍 15 g,川楝子 6 g,生麦芽 6 g,茵陈 6 g,甘草 4.5 g 组成,按传统煎药法获取药液。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP,购自 Sigma 公司),腹腔注射用生理盐水配制的 0.3% MPTP。TRIzol Reagent(美国 Gibco 公司),SYBR Green I master mix(美国 ABI 公司),引物由上海生物工程公司合成,细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(碧云天生物技术有限公司),TH(H-196)和 pan 14-3-3(K-19)人抗小鼠多克隆抗体(Santa 公司)、辣根过氧化物酶标记 IgG 二抗(Santa 公司),其他试剂为国产分析纯。

1.3 仪器 ABI7300 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),JY-ZY2 型转移电泳槽和 JY-CZ1 型单垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司),AlphaImager™ 图像分析系统(美国 AlphaNotech 公司)。

2 方法

2.1 受试动物分组 动物适应性喂养 1 周后,采用随机数字法分为正常对照组、模型组、司来吉兰组、镇肝熄风汤低剂量组、镇肝熄风汤中剂量组、镇肝熄

风汤高剂量组,每组 15 只。

2.2 PD 模型的建立和药物干预 连续灌胃给予镇肝熄风汤和司来吉兰 14 d,正常对照组和模型组小鼠给予等体积生理盐水。于给药第 11 天,模型组、镇肝熄风汤和司来吉兰组小鼠连续 4 d 背部皮下注射 MPTP(30 mg·kg⁻¹)。灌胃给药结束后第 1 天进行自主活动试验,第 4 天处死小鼠,于冰上分离中脑黑质。

2.3 自主活动计数 参照 Kawai H^[6] 的测试方法,自制 30 cm × 30 cm × 15 cm 的有机玻璃盒,底部刻出 6 cm × 6 cm 的格子,在安静、光线较暗的环境中检测,适应环境 10 min 后,记录每只小鼠 5 min 内在玻璃盒底部移动的格子数,连续测 3 次取平均值。

2.4 检测小鼠黑质 TH 和多功能蛋白 14-3-3 的蛋白表达 中脑黑质剪碎,采用细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒提取总蛋白,BCA 法测定蛋白质含量。每条泳道 60 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 分离,采用电转移将凝胶上蛋白质转印至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,用 1:1 000 稀释的 14-3-3,TH,GAPDH 一抗 4 ℃ 孵育过夜,再用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育后,用 Western blot 荧光检测试剂激发荧光,显示于 X 光片,显影、定影后用凝胶图像分析各蛋白质条带的积分吸光度。

2.5 检测黑质中 TH 和多功能蛋白 14-3-3 mRNA 表达 用 TRIzol 试剂提取黑质总 RNA,RT 反应得 cDNA 模板。使用 SYBR Green I master mix 试剂盒进行 PCR 扩增。TH 引物:上游 5'-AGGGCTGCTGTCTTCCTATG-3',下游 5'-GCTGCTGTGCTGGGTCAA-3';多功能蛋白 14-3-3 引物:上游 5'-CCAAAAGGCAGAGCCAGAG-3',下游 5'-GCGAGGATGGACAGACAGAC-3';GAPDH 引物:上游 5'-GGTGAAGTCCGGTGTGAACG-3',下游 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGT-3'。数据分析用 2^{-ΔΔCt} 法。其中 $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{目的基因}} - C_{t_{内参基因}})_{实验} - (C_{t_{目的基因}} - C_{t_{内参基因}})_{对照}$ 。

2.6 统计方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。多组间差异的显著性分析采用方差分析,组间两两比较用 SNK 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 PD 自主活动能力的影响 模型组小鼠移

动格子数较正常组显著减少 ($P < 0.05$)。与模型组比较,各剂量镇肝熄风汤组移动格子数均有显著增加 (均 $P < 0.05$),且高剂量组移动格子数的增加较低剂量组更为显著。与司来吉兰组比较,各剂量镇肝熄风汤组移动格子数差异无统计学意义,见表 1。

表 1 镇肝熄风汤对小鼠自主活动计数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	自主活动/格
正常对照	-	116.73 \pm 17.34
模型	-	68.33 \pm 13.27 ¹⁾
司来吉兰	0.01	92.40 \pm 15.17 ²⁾
镇肝熄风汤	12.5	80.46 \pm 11.68 ²⁾
	25	83.06 \pm 14.50 ²⁾
	50	90.00 \pm 14.97 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 对 PD 小鼠黑质多功能蛋白 14-3-3 的 mRNA 和蛋白表达的影响 模型组小鼠黑质多功能蛋白 14-3-3 的 mRNA 和蛋白表达较正常组显著下调 ($P < 0.05$)。与模型组比较,各剂量镇肝熄风汤组

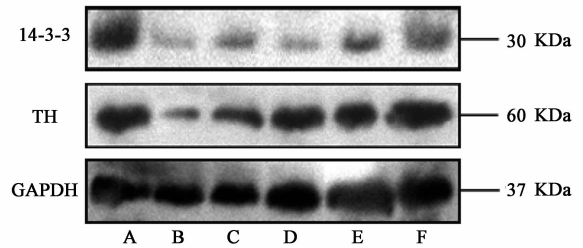
表 2 镇肝熄风汤小鼠多功能蛋白 14-3-3 和 TH mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	蛋白表达/%		mRNA 表达/ $2^{-\Delta\Delta Ct}$	
		14-3-3	TH	14-3-3	TH
正常对照	-	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.11
模型	-	14.00 \pm 2.11 ¹⁾	19.64 \pm 5.35 ¹⁾	0.53 \pm 0.08 ¹⁾	0.33 \pm 0.04 ¹⁾
司来吉兰	0.01	22.80 \pm 2.28 ²⁾	58.90 \pm 14.49 ²⁾	0.68 \pm 0.04 ²⁾	0.45 \pm 0.01 ²⁾
镇肝熄风汤	12.5	15.24 \pm 1.63 ²⁾	75.54 \pm 10.10 ²⁾	0.71 \pm 0.08 ²⁾	0.57 \pm 0.05 ²⁾
	25	33.88 \pm 3.39 ²⁾	70.08 \pm 8.39 ²⁾	0.74 \pm 0.08 ²⁾	0.65 \pm 0.06 ²⁾
	50	47.32 \pm 3.93 ²⁾	81.30 \pm 13.74 ²⁾	0.76 \pm 0.09 ²⁾	0.71 \pm 0.08 ²⁾

4 讨论

PD 属中医学“颤病”、“振掉”等范畴。关于本病的病因病机,中医认为肝主筋,阴血不足、筋脉失濡易导致拘急痉挛,肝肾阴虚动风,同气相求则震颤抖动^[7-8]。镇肝熄风汤具有镇肝熄风、滋阴潜阳之功,临床用于治疗 PD 有一定疗效^[5],鉴于龙骨属于稀有的古化石中药种,那么镇肝熄风汤减去龙骨是否影响其抗帕金森病的作用需进一步研究。本研究采用 MPTP ip C57BL/6 小鼠诱发的模型被公认是最理想的 PD 动物模型之一,已被广泛用于 PD 发病机制及药物作用机制的研究^[9]。作者研究发现,30 $mg \cdot kg^{-1}$ MPTP 连用 4 d 能显著减少 C57BL/6 自主活动实验小鼠的移动格子数,这与张慧楠等的研究发现相一致^[10]。镇肝熄风汤连续灌胃给药 2 周,小鼠移动格子数呈剂量依赖性显著增加,提示镇肝熄风汤具有改善 PD 模型小鼠行为学的作用。

黑质多功能蛋白 14-3-3 的 mRNA 和蛋白表达较均显著上调 ($P < 0.05$),见图 1 和表 2。



A. 正常对照组; B. 模型组; C. 司来吉兰 0.01 $g \cdot kg^{-1}$ 组;
D. 镇肝熄风汤 12.5 $g \cdot kg^{-1}$ 组; E. 镇肝熄风汤 25.0 $g \cdot kg^{-1}$ 组;
F. 镇肝熄风汤 50 $g \cdot kg^{-1}$ 组

图 1 镇肝熄风汤各组小鼠黑质多功能蛋白 14-3-3 和 TH 蛋白表达的影响 (免疫印迹)

3.3 镇肝熄风汤对 PD 小鼠黑质 TH mRNA 和蛋白表达的影响 模型组小鼠黑质 TH mRNA 和蛋白表达较正常组显著下调 (均 $P < 0.05$)。与模型组比较,各剂量镇肝熄风汤组小鼠黑质 TH mRNA 和蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$),见图 1 和表 2。

TH 在 DA 合成过程当中起着非常重要的作用。TH 催化儿茶酚胺的合成,并且是它的合成反应当中的第一个酶,也是一个限速酶。TH 在生物体内,尤其是在黑质纹状体系统中的表达变化会直接影响到 L-DA 的生物合成^[11],TH 含量与功能不足是导致 PD 一系列临床症状的重要环节^[12]。研究发现 PD 患者 TH mRNA 和 TH 蛋白含量明显低于健康人,但 PD 患者 TH 的 mRNA 和蛋白的比值与健康人无差别,说明 PD 患者 TH 蛋白的降低是由于细胞内 TH mRNA 降低所致^[13]。设法提高 TH 蛋白含量及酶活性也已成为 PD 治疗研究的重要策略^[14]。本实验结果表明,镇肝熄风汤对 PD 模型小鼠黑质 HT mRNA 和蛋白表达下调具有抑制作用。推测镇肝熄风汤通过增加中脑黑质内 TH 蛋白,将酪氨酸转化为左旋多巴,左旋多巴脱竣成为神经递质 DA,代偿了由于黑质的 DA 能神经元损毁所造成的黑质纹状

体通路中 DA 缺乏,从而产生抗 PD 的疗效。

多功能蛋白 14-3-3 是高度保守的酸性蛋白家族,它们在各种组织细胞中均表达,在神经系统中含量最丰富^[15]。多功能蛋白 14-3-3 与 TH 的结合是 TH 最佳的磷酸化活化方式。多功能蛋白 14-3-3 能够抑制 TH 去磷酸化,延长并提高 TH 的活性,增加 DA 的产生^[16]。同时多功能蛋白 14-3-3 参与细胞凋亡的调节,抑制细胞凋亡^[17],与许多神经疾病有关。研究发现多功能蛋白 14-3-3 与 α -synuclein 在氨基酸序列上有 40% 以上的同源性,二者能相互作用,并且共存于 Lewy body 中,提示多功能蛋白 14-3-3 可能与 PD 的发病有关^[18]。本研究结果表明,MPTP 腹腔注射能诱导多功能蛋白 14-3-3 的 mRNA 和蛋白表达显著下调。镇肝熄风汤干预使多功能蛋白 14-3-3 的 mRNA 和蛋白表达显著上调,提示从核酸和蛋白水平上调多功能蛋白 14-3-3 表达可能是镇肝熄风汤拮抗 MPTP 所致 PD 的机制之一。

总之,镇肝熄风汤具有改善 PD 小鼠行为学作用,这与其上调多功能蛋白 13-3-3 和 TH 的 mRNA 和蛋白表达有关。本研究结果为镇肝熄风汤的临床应用提供了部分药理学实验依据。

[参考文献]

[1] Haque M E, Mount M P, Safarpour F, et al. Inactivation of Pink1 gene *in vivo* sensitizes dopamine-producing neurons to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) and can be rescued by autosomal recessive Parkinson disease genes, Parkin or DJ-1[J]. J Biol Chem, 2012, 287(27):23162.

[2] 仲诚,黄萍,孙照国,等. 补肾活血通络胶囊治疗原发性帕金森病 120 例[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(24):343.

[3] 熊珮,陈忻,张楠. 帕金森病病理机制及中药防治帕金森病实验研究进展[J]. 中国中药杂志,2012, 37(5):686.

[4] Ahn T B, Langston J W, Achi V R, et al. Relationship of neighboring tissue and gliosis to α -synuclein pathology in a fetal transplant for Parkinson's disease[J]. Am J Neurodegener Dis, 2012, 1(1):49.

[5] 谭文澜,张永全,陆晖. 镇肝熄风汤治疗肝肾阴虚型帕金森病的临床研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2012, 14(3):52.

[6] Kawai H, Makino Y, Hirobe M, et al. Novel endogenous 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives: uptake by dopamine transporter and activity to induce parkinsonism[J]. J Neurochem, 1998, 70(2):745.

[7] 闫川慧,张俊龙,郭蕾,等. 帕金森病中医病机学说探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,2011, 17(9):940.

[8] 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.

[9] Ookubo M, Yokoyama H, Kato H, et al. Gender differences on MPTP (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine) neurotoxicity in C57BL/6 mice[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 311(1/2):62.

[10] 张慧楠,蒲小平. 神经生长因子鼻腔给药对 MPTP 致帕金森病模型小鼠的神经保护作用[J]. 中国新药杂志,2010, 19(2):152.

[11] Tokuoka H, Muramatsu S, Sumi-Ichinose C, et al. Compensatory regulation of dopamine after ablation of the tyrosine hydroxylase gene in the nigrostriatal projection[J]. J Biol Chem, 2011, 286(50):43549.

[12] Ubeda-Bañon I, Saiz-Sanchez D, de la Rosa-Prieto C, et al. α -Synucleinopathy in the human olfactory system in Parkinson's disease: involvement of calcium-binding protein-and substance P-positive cells[J]. Acta Neuropathol, 2010, 119(6):723.

[13] Nagatsu T, Sawada M. Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects [J]. J Neural Transm Suppl, 2007 (72):113.

[14] 杨洋,周德生, Wolf-Dieter RAUSCH, 等. 土的宁对多巴胺能神经元的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(24):223.

[15] Kawamoto Y, Akiguchi I, Nakamura S, et al. 14-3-3 proteins in Lewy bodies in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease brains [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2002, 61(3):245.

[16] Halskau J r, Ying M, Baumann A, et a. Three-way interaction between 14-3-3 proteins, the N-terminal region of tyrosine hydroxylase, and negatively charged membranes[J]. J Biol Chem, 2009, 284(47):32758.

[17] Kanno T, Nishizaki T. Sphingosine induces apoptosis in hippocampal neurons and astrocytes by activating caspase-3/-9 via a mitochondrial pathway linked to SDK/14-3-3 protein/Bax/cytochrome c [J]. J Cell Physiol, 2011, 226(9):2329.

[18] Kurz A, May C, Schmidt O, et al. A53T-alpha-synuclein-overexpression in the mouse nigrostriatal pathway leads to early increase of 14-3-3 epsilon and late increase of GFAP[J]. J Neural Transm, 2012, 119(3):297.

[责任编辑 聂淑琴]