

# 葛根素对6-羟多巴胺所致帕金森病大鼠 黑质组织 Nrf2/ARE 通路的影响

黎荣<sup>1</sup>, 徐灵源<sup>2</sup>, 梁韬<sup>3</sup>, 段小群<sup>1</sup>, 李勇文<sup>1</sup>, 廖维勇<sup>1\*</sup>

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000;  
3. 广西医科大学, 南宁 530021)

**[摘要]** 目的:研究葛根素对6-羟多巴胺(6-OHDA)致帕金森病(PD)大鼠黑质组织核转录因子(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)通路的影响。方法:建立帕金森SD大鼠模型,随机分成5组:模型组、美多巴阳性组(40 mg·kg<sup>-1</sup>)及葛根素低、中、高剂量组(20, 40, 80 mg·kg<sup>-1</sup>)。持续灌胃给药30 d。Elisa法检测黑质组织中γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ-GCS)、谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT)活性。RT-PCR法检测黑质组织细胞色素c氧化酶(COX)mRNA表达。Western blot法检测转录因子NF-E2相关因子2(Nrf2)、Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Keap1)蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组黑质中γ-GCS, GSH, CAT活性显著降低, COX mRNA Nrf2, Keap1蛋白表达显著降低(P<0.01);与模型组比较,葛根素有效地增加帕金森病大鼠黑质γ-GCS, GSH, CAT活性(P<0.01)。葛根素低,中,高剂量组能明显上调黑质COX mRNA水平(38.5±4.3)%, (43.2±5.1)%, (57.4±6.2)% (P<0.01), 显著增加Nrf2, Keap1蛋白表达(38.5±3.6)%, (52.4±4.8)%, (78.5±7.3)%; (31.7±2.3)%, (40.8±3.5)%, (65.9±6.1)% (P<0.01)。结论:葛根素有效地对抗6-OHDA诱导PD大鼠黑质神经细胞氧化应激性损伤,其机制可能与其调节Nrf2/ARE通路有关。

**[关键词]** 葛根素; 6-羟多巴胺; 帕金森病; Nrf2/ARE通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0230-04

**[收稿日期]** 20120823(007)

**[第一作者]** 黎荣, 硕士, 从事抗帕金森研究, Tel:13635187328, E-mail: lirong1278@163.com

**[通讯作者]** \*廖维勇, 硕士, 讲师, 从事抗帕金森研究, Tel:0773-5895291, E-mail: liaoweiyong99@163.com

步研究。

**[致谢]** 湖北省荆州市中心医院医学检验部王昌富教授、李承彬主任技师、梅冰博士在数据检测分析中给予了大力支持,特此致谢!

## [参考文献]

[1] 蓝忠, 龙惠东, 曾昭华, 等. 代谢综合征模型的建立及其靶器官改变[J]. 现代预防医学, 2012, 39(3): 725.  
[2] 陈维彬, 刘戈力, 李亚璞, 等. 代谢综合征幼鼠模型中血管内皮功能损伤的检测[J]. 天津医科大学学报, 2011, 17(4): 473.  
[3] 吴桂贤, 吴兆苏, 刘静, 等. 11省市代谢综合征患者中心脑血管疾病发病率队列研究[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(7): 551.  
[4] 顾惠琳, 陈支援, 丁随新. 代谢综合征社区干预效果观察[J]. 上海预防医学杂志, 2010, 22(1): 5.  
[5] Steppan C M, Lazar M A. The current biology of resistance[J]. J Intern Med, 2004, 255(4): 439.  
[6] Steppan C M, Bailey S T, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes [J]. Nature, 2001, 409: 307.

[7] Fujita H, Fujishima H, Morii T, et al. Effect of metformin on adipose tissue resistin expression in db/db mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289: 1328.  
[8] Kubota N. Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and-independent pathways[J]. Biol Chem, 2006, 281(13): 8748.  
[9] Juan C C, Au L C, Fang V S, et al. Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin resistant rat model probably by elevated free fatty acids[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289: 1328.  
[10] Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86: 1930.  
[11] Yang W S, Lee W J, Funahashi T, et al. Weight reduction increased plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86: 3815.

[责任编辑] 聂淑琴

## Effect of Puerarin on the Nrf2/ARE pathway in Substantia Nigra Tissue of Parkinson's Rats Induced by 6-hydroxydopamine

LI Rong<sup>1</sup>, XU Ling-yuan<sup>2</sup>, LIANG Tao<sup>3</sup>, DUAN Xiao-qun<sup>1</sup>, LI Yong-wen<sup>1</sup>, LIAO Wei-yong<sup>1\*</sup>

(1. Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

2. The Affiliated Hospital of YouJiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China;

3. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of puerarin on the Nrf2/ARE pathway in substantia nigra tissue of Parkinson's disease (PD) rats model induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). **Method:** SD PD rats model was established, the rats were randomly divided into 5 groups: model group, madopar group (40 mg · kg<sup>-1</sup>), low-, medium-and high-dosage groups of puerarin (20, 40, 80 mg · kg<sup>-1</sup>). The drugs were intragastrically perfused to rats daily for 30 consecutive days. The activities of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS), glutathione (GSH) and catalase (CAT) in substantia nigra tissue were tested by ELISA method. The expression of cytochrome c oxidase (COX) mRNA was tested by RT-PCR assay. And the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keapl) protein expressions were tested by Western blot analysis. **Result:** Compared to model group, puerarin effectually elevated the activity of  $\gamma$ -GCS, GSH and CAT in substantia nigra tissue of PD rats ( $P < 0.01$ ). And the COX expression at mRNA level in substantia nigra was upregulated ( $P < 0.01$ ). The expression of Nrf2 and Keapl proteins was markedly increased. **Conclusion:** The results reveal that puerarin effectively fight against the oxidative stress damage in nerve cells in substantia nigra of PD rats induced by 6-OHDA, and its probable mechanism may be involved in regulation of Nrf2/ARE pathway.

**[Key words]** puerarin; 6-hydroxydopamine; Parkinson's disease; Nrf2/ARE pathway

帕金森病(PD)多发于老年人,是以震颤麻痹为主要临床症状和病理特征为多巴胺能神经元损伤或变性的神经退行性功能障碍疾病<sup>[1]</sup>。研究发现,氧化应激发生时,机体抗氧化能力下降,组织中活性氧簇(ROS)过度生成,造成机体严重损伤。ROS在PD致病分子机制中有着重要影响,ROS是各种因素诱导PD的共同途径<sup>[2]</sup>。而核转录因子(Nrf2)通过介导抗氧化反应元件(AER)活性调控氧化应激途径<sup>[3]</sup>。因此研究Nrf2/AER通路的调控作用对PD机制的阐明具有重要的意义。本实验研究葛根素对黑质组织Nrf2/AER通路的影响,探讨其对6-羟多巴胺(6-OHDA)致PD大鼠的干预机制。

### 1 材料

**1.1 动物** SD大鼠,SPF级,雌雄各半,体重(200 ± 20)g,动物许可证号SCXK(桂)2009-0002,由广西医科大学实验动物中心提供。

**1.2 药物与试剂** 葛根素由本实验室自行提取、分离,鉴定,纯度99.0%。6-羟多巴胺(美国Sigma公司,批号MCAA 1216),美多巴(上海罗氏制药有限公司,批号20120614), $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶

( $\gamma$ -GCS)、谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(武汉博士德公司生产,批号20120720),cDNA合成试剂盒(Fermentas公司,批号00075432),总RNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号K9406],RT-PCR试剂盒(Life Technologies公司,批号120714),SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术研究所,批号BY1203),Marker预染蛋白(Fermentas公司,批号SR1248),羊抗人RSK4多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology,批号CV20120715),HRP标记的兔抗羊IgG抗体(Santa Cruz Biotechnology,批号CV20120716),化学发光显色剂(Pierce Biotechnology公司,批号PS120732)。

**1.3 仪器** 722S紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),2235病理组织切片仪(德国Leitz公司),DMR+550病理图像分析仪(德国Leitz公司),ABI Stepone Plus型实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司),酶免分析仪(美国Thermo Forma公司),垂直电泳仪及显影设备(BIO-RAD公司)。

### 2 方法

**2.1 帕金森病大鼠模型的建立**<sup>[4-5]</sup> 造模前12 h

禁食不禁水,麻醉后用立体定位仪固定,根据大鼠脑立体定位图谱<sup>[6]</sup>,于右侧前脑内侧束,定位于黑质部位,微量注射 6-OHDA (0.25% 维生素 C 和 0.1% 去甲丙咪嗪的生理盐水制成质量浓度为 2.0 g·L<sup>-1</sup>) 10 μg·kg<sup>-1</sup>。术后进行抗感染处理,并于 1 周后经旋转行为测试选取帕金森病大鼠。

**2.2 分组及给药** 经测试确定成模后的 PD 大鼠,随机分成 5 组:模型组、左旋多巴阳性组及葛根素低、中、高剂量组,每组 10 只。并设置正常组。灌胃给予葛根素 20, 40, 80 mg·kg<sup>-1</sup>,阳性组给予美多巴 40 mg·kg<sup>-1</sup>,正常组及模型组则给予等量生理盐水。持续灌胃 30 d。动物饲养在符合医学实验动物环境设施要求的条件中。

**2.3 动物取材和匀浆制备** 末次给药后所有大鼠 ip 25% 乌拉坦麻醉,心脏插管快速灌注 4 ℃ 生理盐水 100 mL 排出血液,开颅,根据大鼠脑立体定位图谱分离出黑质组织,一部分保存待用,另一部分于低温下精确称重后迅速置入 1 mL 匀浆器中制成 5% 组织匀浆液,4 ℃ 离心后取上清液于 -80 ℃ 冰箱保存待测。

**2.4 指标检测** 按试剂盒说明检测黑质组织中 γ-GCS, GSH, CAT 活性。待测蛋白经裂解后离心取上清液并调整蛋白浓度,上样进行垂直电泳,用 10% SDS-PAGE 胶分离,转移到 PVDF 膜上。经脱脂奶粉 TBST 溶液封闭 60 min 后,用 TBST 溶液平衡 10 min 再与相应一抗 (Nrf2: Keap1 为 1:1 000) 在 4 ℃ 摇床孵育过夜。加相应二抗 (1:2 000) 在室温摇床孵育 60 min,在暗房内发光剂发光,显影,定影,分析。同时取 COX 基因的 PCR 扩增产物 1 μL DNA Loading buffer 充分混匀后,加入含核酸染色剂的 2% 琼脂糖凝胶中,以 80 V·cm<sup>-1</sup> 电压电泳 30 min。电泳结束后,应用凝胶成像分析仪进行分析,扫描扩增 DNA 片段吸光度 (A),计算积分吸光度 (IA),以目的基因扩增产物和内参扩增产物的比值计算黑质组织 COX mRNA 的表达水平。同时采用 Quantity One 软件分析蛋白条带的 A,以 Nrf2, Kelch 条带的 A/内参 GAPDH 的 A 计算蛋白的相对表达量。所有实验操作步骤均严格按照厂家说明书进行。

**2.5 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 PD 大鼠黑质 γ-GCS, GSH, CAT 活性的影响** 模型组 PD 大鼠黑质 γ-GCS, GSH, CAT 活性

明显降低,与正常组比较差别有统计意义 (*P* < 0.01)。药物干预后,美多巴和葛根素组 PD 大鼠黑质 γ-GCS, GSH, CAT 活性显著增强,与模型组比较差别有统计意义 (*P* < 0.01)。见表 1。

表 1 葛根素对 PD 大鼠右侧黑质 γ-GCS, GSH, CAT 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	γ-GCS	GSH	CAT
		/mg·g <sup>-1</sup>	/U·mg <sup>-1</sup>	/U·mg <sup>-1</sup>
正常	-	18.2 ± 3.4	121.7 ± 13.5	8.5 ± 0.9
模型	-	7.1 ± 1.2 <sup>1)</sup>	59.6 ± 8.4 <sup>1)</sup>	2.4 ± 0.2 <sup>1)</sup>
美多巴	40	14.8 ± 2.1 <sup>2)</sup>	96.2 ± 11.3 <sup>2)</sup>	5.7 ± 0.6 <sup>2)</sup>
葛根素	20	9.4 ± 1.5 <sup>2)</sup>	73.4 ± 9.2 <sup>2)</sup>	3.6 ± 0.3 <sup>2)</sup>
	40	11.2 ± 1.7 <sup>2)</sup>	89.6 ± 10.7 <sup>2)</sup>	4.9 ± 0.5 <sup>2)</sup>
	80	16.7 ± 2.8 <sup>2)</sup>	110.5 ± 12.4 <sup>2)</sup>	7.6 ± 0.8 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.01; 与模型组比较<sup>2)</sup> *P* < 0.01 (表 2 ~ 3 同)。

**3.2 对 PD 大鼠黑质 COX mRNA 表达的影响** RT-PCR 结果显示,PD 大鼠模型黑质 COX mRNA 表达明显减少,与正常组比较差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。治疗后,美多巴和葛根素组逐渐上调 PD 大鼠模型黑质中 COX mRNA 表达,与模型组比较差别有统计意义 (*P* < 0.01)。见表 2。

表 2 葛根素对 PD 大鼠右侧黑质组织 COX mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	COX mRNA	
		A	COX/β-actin/%
正常	-	0.98 ± 0.16	68.3 ± 7.2
模型	-	0.32 ± 0.04 <sup>1)</sup>	21.5 ± 3.6 <sup>1)</sup>
美多巴	40	0.72 ± 0.10 <sup>2)</sup>	49.6 ± 5.8 <sup>2)</sup>
葛根素	20	0.46 ± 0.06 <sup>2)</sup>	38.5 ± 4.3 <sup>2)</sup>
	40	0.61 ± 0.08 <sup>2)</sup>	43.2 ± 5.1 <sup>2)</sup>
	80	0.82 ± 0.13 <sup>2)</sup>	57.4 ± 6.2 <sup>2)</sup>

**3.3 葛根素对 PD 大鼠黑质 Nrf2, Keap1 蛋白表达的影响** Western blot 结果显示,模型组 PD 大鼠黑质 Nrf2, Keap1 蛋白表达明显下调 (*P* < 0.01)。经治疗后,美多巴和葛根素组 PD 大鼠黑质组织中 Nrf2, Keap1 蛋白水平有效地增加,与模型组比较差别有统计意义 (*P* < 0.01)。见表 3。

### 4 讨论

氧化应激 (oxidative stress, OS) 是体内产生大量自由基所介导的一种负向作用,导致机体氧化/抗氧化系统失衡从而造成组织损伤,并认为其是导致衰老和疾病的一个重要因素<sup>[7]</sup>。因而,提高抗氧化因子间协调作用可以有助于恢复抗氧化系统系统,从而有效地对抗氧化应激损伤。γ-GCS, GSH, CAT 等酶相互补充作用对中和毒性生成物、清除氧自由基、终止氧化链式反应等不同途径有积极的抗氧化防御

表3 葛根素对PD大鼠右侧黑质 Nrf2, Keap1 蛋白相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	Nrf2/GADPH /%	Keap1/GADPH /%
正常	-	95.3 ± 8.5	80.4 ± 7.9
模型	-	25.4 ± 1.8 <sup>1)</sup>	20.3 ± 1.6 <sup>1)</sup>
美多巴	40	61.8 ± 5.7 <sup>2)</sup>	52.4 ± 4.7 <sup>2)</sup>
葛根素	20	38.5 ± 3.6 <sup>2)</sup>	31.7 ± 2.3 <sup>2)</sup>
	40	52.4 ± 4.8 <sup>2)</sup>	40.8 ± 3.5 <sup>2)</sup>
	80	78.5 ± 7.3 <sup>2)</sup>	65.9 ± 6.1 <sup>2)</sup>

作用<sup>[8]</sup>。在本实验中,PD大鼠右侧黑质中 $\gamma$ -GCS, GSH, CAT的活性显著降低,提示PD大鼠模型早期抗氧化能力下降。葛根素治疗明显提高降低 $\gamma$ -GCS, GSH, CAT的活性,说明葛根素有效地逆转6-OHDA致PD大鼠氧化应激性损伤。

研究表明,细胞色素c氧化酶(COX)是线粒体呼吸链氧化磷酸化过程的限速酶,直接参与内源性氧的利用和ATP生成<sup>[9]</sup>。COX的表达异常将直接导致线粒体功能障碍,造成供能不足,引发呼吸途径产生大量的自由基,最终诱发机体氧化应激损伤<sup>[10]</sup>。线粒体能量代谢障碍在神经毒性化学物质(6-OHDA)诱导的神经退行性疾病的帕金森病理生理过程中扮演着关键作用<sup>[11]</sup>。故改善线粒体呼吸链功能可以提高PD神经元抵抗活性自由基损伤。葛根素有效地上调6-OHDA致PD大鼠黑质COX mRNA表达,推测其通过调节内源性COX的表达发挥抗氧化损伤是抗PD的分子机制之一。

核转录因子(Nrf2)在调控氧化应激中介导机体某些氧化应激敏感信号转导途径。在激活或编码抗氧化酶系和药物代谢酶表达的过程中起主导作用,并通过抗氧化物元件(AREs)介导下游酶系如 $\gamma$ -GCS, GSH, CAT, NQO1等活性来维持机体氧化还原系统的平衡和降低氧化应激性损伤<sup>[12]</sup>。Keap1是细胞抗氧化通路的核心调节蛋白,能调控Nrf2的活性。无应激状态下,细胞中的Nrf2和Keap1正常结合并保持稳态。应激发生时,触发Keap1构型改变,Nrf2和Keap1构件分离,Nrf2转移进入细胞核并与靶部位ARE元件结合,激活下游靶基因的表达<sup>[13-14]</sup>。给予葛根素干预后,PD大鼠黑质组织中Nrf2和Keap1表达增加,提示葛根素激活核转位,启动抗氧化功能酶的合成和表达,降低细胞ROS损伤,进而保护黑质神经细胞,可能与其调节6-OHDA致PD大鼠黑质组织中Nrf2/ARE信号转导通路而发挥抗帕金森效应有关。

## [参考文献]

- [1] 罗海龙,尹昌浩,姜爱英. 止颤平郁汤配合美多巴治疗帕金森病33例[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):294.
- [2] 王冬梅,海静如,魏风,等. 帕宁方对帕金森病大鼠行为及氧化应激反应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):199.
- [3] Tufekci K U, Civi Bayin E, Genc S, et al. The Nrf2/ARE pathway: a promising target to counteract mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease [J]. Parkinsons Dis, 2011,2(4):1.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京,人民卫生出版社,1992:445.
- [5] 范凯,马坚妹,马晓凯. 6-羟多巴胺脑内注射制备帕金森病大鼠模型的研究[J]. 中国实验动物学报,2005,13(1):20.
- [6] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. New York: Academic Press, 1997:128.
- [7] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants [J]. Exp Physiol, 1997,82(2):291.
- [8] Nadeem A, Masood A, Siddiqui N. Oxidant--antioxidant imbalance in asthma: scientific evidence, epidemiological data and possible therapeutic options [J]. Ther Adv Respir Dis, 2008,2(4):215.
- [9] Fontanesi F, Soto I C, Horn D, et al. Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006,291(6):1129.
- [10] Fontanesi F, Soto I C, Barrientos A. Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation [J]. IUBMB Life, 2008,60(9):557.
- [11] Storch A, Kaftan A, Burkhardt K, et al. 6-Hydroxydopamine toxicity towards human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells: independent of mitochondrial energy metabolism [J]. J Neural Transm, 2000,107(3):281.
- [12] Giudice A, Arra C, Turco M C. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents [J]. Methods Mol Biol, 2010,647:37.
- [13] Sun Z, Zhang S, Chan J Y, et al. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2 [J]. Mol Cell Biol, 2007,27(18):6334.
- [14] Katoh Y, Iida K, Kang M I, et al. Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome [J]. Arch Biochem Biophys, 2005, 433(2):342.

[责任编辑 聂淑琴]