

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

黎荣¹, 徐灵源², 梁韬³, 张士军³, 李勇文¹, 段小群^{1*}

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 右江民族医学院附属医院药剂科, 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)模型大鼠黑质组织神经细胞的保护作用。方法: 建立帕金森病大鼠模型, 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。ig 给予葛根素 20, 40, 80 mg·kg⁻¹, 阳性组给予左旋多巴 40 mg·kg⁻¹, 连续灌胃 30 d。检测黑质组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性以及丙二醛(MDA)含量, 进行黑质神经细胞常规染色观察, Western blot 法检测黑质组织内诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环-磷酸腺苷(cAMP)反应元件结合蛋白(CREB)蛋白表达。**结果:** 葛根素能缓解帕金森模型大鼠病情。与模型组比较, 葛根素有效增加帕金森病大鼠黑质组织中 GSH-Px、SOD 活性, 同时降低 MDA 含量 ($P < 0.01$)。下调黑质组织中 iNOS 蛋白水平, 并上调 CREB 蛋白表达 ($P < 0.01$)。**结论:** 葛根素对 6-羟多巴胺所致 PD 大鼠黑质组织神经细胞具有保护作用, 机制可能与其抑制过氧化应激作用以及调节内源性 iNOS、CREB 蛋白的表达有关。

[关键词] 葛根素; 6-羟多巴胺; 帕金森病; 过氧化应激; 保护作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0247-04

Protective Effect of Puerarin on Nerve Cells in Substantia Nigra of Parkinson's Disease Rats Induced by 6-hydroxydopamine

LI Rong¹, XU Ling-yuan², LIANG Tao³, ZHANG Shi-jun³, LI Yong-wen¹, DUAN Xiao-qun^{1*}

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

[收稿日期] 20120711(015)

[第一作者] 黎荣, 硕士, 从事抗帕金森研究, Tel: 13407720550, E-mail: lirong1278@163.com

[通讯作者] * 段小群, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事抗帕金森研究, Tel: 0773-5895291, E-mail: duanxiaoqun668@163.com

- [3] 周坤福, 王明艳, 赵凤鸣, 等. 六味地黄丸延缓衰老作用机理的实验研究[J]. 江苏中医, 1999, 20(1): 44.
- [4] 卿照前. 六味地黄丸延缓老年痴呆症 50 例疗效观察[J]. 中国中医药科技, 2007, 16(5): 373.
- [5] 郝艳鹏, 张悦, 刘煜敏, 等. 六味地黄丸含药血清对 HK-2 细胞对 TGF- β Smad 信号通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(1): 149.
- [6] Lukasz Bojarski, Jochen Herms, Jacek Kuznicki. Calcium dysregulation in Alzheimer's disease [J]. Neurochemistry International, 2008, 52: 621.
- [7] Frankland P W, O' Brien C, Ohno M, et al. Alpha-CaMK II-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory [J]. Nature, 2001, 411(6835): 309.
- [8] 李燕华, 李吕力, 王铁建, 等. 大鼠脑缺血后 P-CaMK II 的表达与 Ca²⁺ 浓度的关系[J]. 中国急救医学, 2006, 26(6): 436.
- [9] 何雨, 金玉芬. 血管性痴呆大鼠海马钙调蛋白激酶 II 变化机制的研究[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(1): 116.
- [10] 杨斌. 复方地黄对老年痴呆动物模型学习记忆能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 195.
- [11] 孙蓉, 钱晓路, 张丽美. 基于当归有效成分的抗早老性痴呆药理作用及分子机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 255.
- [12] 周慧生. 六味地黄丸延缓衰老作用的理论探讨[J]. 光明中医, 2006, 21(10): 45.
- [13] 周建政, 张永祥, 周金黄. 六味地黄汤对快速老化模型小鼠学习记忆能力的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(4): 29.

[责任编辑 聂淑琴]

2. *Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China;*
3. *Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)*

[Abstract] Objective: To investigate the effect of puerarin on parkinson's rats model induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). **Method:** Parkinson's rats model was established, the rats were randomly divided into 5 groups: model group, L-dopa group ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), low-, medium-and high-dosage groups of puerarin (20, 40, $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The drugs were intragastrically perfused to rats daily for 30 consecutive days. The activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) as well as the contents of MDA in substantia nigra tissue were tested by biochemical method; the pathological change of nerve cells in substantia nigra was observed by HE staining; then the expressions of induced nitric oxide synthase (iNOS), cyclic adenosine monophosphate (cAMP) -response-element-binding-protein (CREB) in substantia nigra were using Western blot analysis. **Result:** The condition of Parkinson's rats model was alleviated via puerarin treatment. Compared to model control group, puerarin significantly elevated the activities of GSH-Px and SOD in substantia nigra tissue of parkinson's rats, while the MDA contents was reduced ($P < 0.01$); and down-regulated the iNOS protein level in substantia nigra tissue, while the expression of CREB was increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The findings indicate that puerarin has protective effect on the 6-OHDA-induced PD rats the mechanism may be associated with restraining the oxidative stress and regulations of endogenous iNOS, CREB expressions.

[Key words] puerarin; 6-hydroxydopamine; Parkinson's disease; oxidative stress; protection

帕金森病(PD)是一种神经退行性运动障碍的疾病,其特点是黑质致密部多巴胺能神经元变性和逐步丧失^[1]。有研究表明,氧化应激在帕金森病的病因和发展中均起着重要作用^[2]。目前左旋多巴作为临床治疗 PD 药物之一,获得了一定的疗效^[3]。葛根素是我国特色中药葛根的有效成分之一,其具有降血脂、降血压、抗氧化、改善微循环、抑制神经细胞凋亡等药理活性^[4-5]。本实验拟通过黑质单侧注射 6-羟多巴胺(6-OHDA)诱导帕金森病大鼠模型,探讨葛根素对 PD 大鼠的干预作用,为其抗帕金森的应用奠定一定的理论依据。

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%。左旋多巴(广西河丰药业有限责任公司,批号 20110810)。6-OHDA(美国 Sigma 公司,批号 MKAA 1216),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒(均为武汉博士德公司生产,批号 20120518),SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术研究所,批号 BY1205),Marker 预染蛋白(Fermentas 公司,批号 SR1246),羊抗人 RSK4 多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology,批号

CV20120412),HRP 标记的兔抗羊 IgG 抗体(Santa Cruz Biotechnology,批号 CV20120418),化学发光显色剂(Pierce Biotechnology 公司,批号 PS120576)。

1.3 仪器 DDL-5 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),722S 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),4590 包埋机(日本 Sakura finetechnical Co. Ltd),Gel doc 2000 低温高速离心机(德国西门子公司),DMR + 550 病理图像分析仪(德国莱卡公司),垂直电泳仪、转膜及显影设备(BIO-RAD 公司),酶免分析仪(美国 Thermo Forma 公司)。

2 方法

2.1 帕金森病大鼠模型的建立^[6] 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^[7],于右侧前脑内侧束微量注射 6-OHDA $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。术后进行抗感染处理,并于 1 周后经行旋转行为测试选取帕金森大鼠。

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。ig 给予葛根素 20, 40, $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,阳性组给予左旋多巴 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,正常组及模型组则给予等量生理盐水,连续灌胃 30 d。

2.3 指标检测 生物化学法检测 GSH-Px, SOD 活性以及 MDA 含量,HE 染色观察黑质神经元形态学改变,Western blot 法检测黑质组织内诱导型一氧化

氮合酶(iNOS),环-磷酸腺苷(cAMP)反应元件结合蛋白(CREB)表达。所有实验操作步骤均严格按照厂家说明书进行。

2.4 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 葛根素对PD大鼠模型氧化应激的影响 模

表1 葛根素对PD大鼠右侧黑质组织氧化应激的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹	SOD/NU·mg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹
正常	-	624.38 ± 57.92	249.61 ± 15.07	4.89 ± 0.76
模型	-	203.62 ± 31.08 ¹⁾	87.51 ± 9.36 ¹⁾	12.36 ± 1.84 ¹⁾
左旋多巴	40	521.09 ± 48.36 ²⁾	194.25 ± 13.18 ²⁾	7.27 ± 0.91 ²⁾
葛根素	20	375.84 ± 39.64 ²⁾	125.84 ± 10.12 ²⁾	10.09 ± 1.13 ²⁾
	40	492.36 ± 42.17 ²⁾	187.61 ± 12.93 ²⁾	7.85 ± 0.97 ²⁾
	80	587.25 ± 51.03 ^{2,3)}	213.79 ± 14.53 ^{2,3)}	5.29 ± 0.84 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与左旋多巴组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

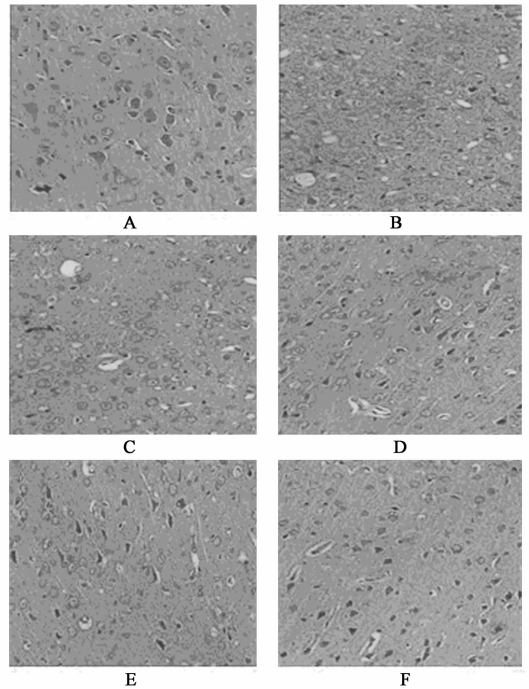
3.2 大鼠黑质致密区组织形态学观察 染色结果显示,正常组黑质区结构清晰,神经细胞排列整齐,数量较多。可观察到树突或轴突形态。模型组细胞数量显著减少,部分神经细胞皱缩,核碎裂,胞浆空化,并伴有增生的神经胶质细胞。左旋多巴组神经细胞有所增加,核浆比例恢复,结构得到修复,有突起生成。葛根素低剂量组,神经细胞形态有一定程度的恢复。但仍有神经元受损,胞核分散,有部分胶质细胞增生。中剂量组受损神经元减少,核浆比例有所恢复,神经胶质细胞增生减少,神经元有突起生成。高剂量组神经细胞数量明显增多,结构恢复较好,胞浆内容丰富,神经元突起明显。见图1。

3.3 葛根素对PD大鼠黑质组织中iNOS,CREB表达的影响 Western blot表明,PD大鼠模型黑质组织中iNOS蛋白表达明显上调,而CREB表达显著减少,与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。药物干预后,左旋多巴和葛根素治疗组逐渐下调PD大鼠模型黑质组织中iNOS蛋白,并增加CREB的表达,与模型组比较差别有统计学意义($P < 0.01$)。见图2。

4 讨论

应激是机体受内外环境的刺激(作用)时所触发的综合应答状态(反应)。适当的应激反应是有益的,但是持续或过度的应激作用会造成机体的损伤^[8]。有研究表明,应激反应在帕金森疾病的发生发展以及转归过程中担负的作用越来越重要,使调

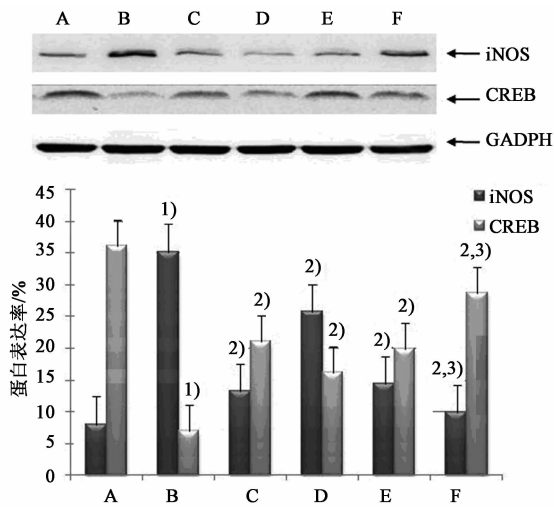
控应激作用成为抗帕金森的有效策略之一^[9]。本结果表明,模型组PD大鼠右侧黑质GSH-Px,SOD的水平明显降低,而MDA的含量则显著升高,提示PD大鼠抗氧化能力低下,处于氧化应激状态。同时HE染色结果显示,PD大鼠右侧黑质神经细胞萎



A. 正常组;B. 模型组;C. 左旋多巴 40 mg·kg⁻¹组;
D. 葛根素 20 mg·kg⁻¹组;E. 葛根素 40 mg·kg⁻¹组;
F. 葛根素 80 mg·kg⁻¹组(图2同)

图1 葛根素对6-OHDA致PD大鼠右侧黑质神经细胞的影响(HE染色,×100)

缩、凋亡,提示PD大鼠右侧黑质神经细胞处于氧化应激状态。同时HE染色结果显示,PD大鼠右侧黑质神经细胞萎



与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较
²⁾ $P < 0.01$; 与阳性组比较³⁾ $P < 0.01$

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

缩、变形甚至坏死,推测应激作用造成了 PD 大鼠黑质神经细胞损伤。而左旋多巴和葛根素的治疗有效地提高 PD 大鼠抗氧化能力和清除自由基的能力,并缓解机体应激损伤。

实验发现,脑组织中 NO 的合成释放与其神经细胞的凋亡有联系。iNOS 表达增多后,会触发 NO 合成并释放,直接或间接导致细胞氧化损伤,并进一步破坏 DNA 结构,诱导细胞凋亡途径^[10]。本实验表明,PD 大鼠右侧黑质组织中 iNOS 蛋白水平上调,表明 NO 的活性增强,造成了神经元的损伤。葛根素的干预作用能下调 PD 大鼠右侧黑质组织中 iNOS 蛋白水平,提示其能逆转 NO 氧化活性诱导的应激性损伤,从而保护该组织的神经细胞。

神经药理学研究表明 CREB 是刺激诱导转录因子的核蛋白之一,其可调节基因转录、参与蛋白合成,从而介导神经元生长和兴奋性、突触可塑性等活动^[11]。CREB 通过谷氨酸能神经元以磷酸化的方式被激活,介导基因转录,合成神经活动所需的蛋白质^[12]。在本实验中发现,应激作用造成的 PD 大鼠右侧黑质神经细胞损伤,推测该组织中 CREB 活性的降低是应激引起的可塑性破坏的分子基础之一。葛根素的治疗能明显地增强 PD 大鼠右侧黑质组织中 CREB 表达活性,提示其增加 PD 大鼠 CREB 蛋白的水平,减轻应激反应损伤,保护神经细胞,进而缓解帕金森病情,可能是其抗帕金森作用机制之一。

[参考文献]

[1] Guilarte T R. Manganese and Parkinson's disease: a critical review and new findings [J]. Environ Health Perspect, 2010, 118(8): 1071.

[2] Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease [J]. Ann Neurol, 2003, 53(3): 26.

[3] Di Stefano A, Sozio P, Cerasa L S, et al. L-dopa prodrugs: an overview of trends for improving Parkinson's disease treatment [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(32): 3482.

[4] 李恒华,陈国庆,张毅,等. 四乙酰葛根素抗炎作用及机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 177.

[5] Li J, Wang G, Liu J. Puerarin attenuates amyloid-beta-induced cognitive impairment through suppression of apoptosis in rat hippocampus *in vivo* [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 649(1/3): 195.

[6] 田允,宋文婷,徐立,等. 补肾中药对帕金森病模型小鼠黑质-纹状体多巴胺的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 134.

[7] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. New York: Academic Press, 1997: 128.

[8] 何蓉蓉,姚新生,栗原博. 拘束应激动物模型的研究现状与应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 6(11): 98.

[9] Reale M, Pesce M, Priyadarshini M, et al. Mitochondria as an easy target to oxidative stress events in Parkinson's disease [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2012, 11(4): 430.

[10] Angeloni C, Hrelia S. Quercetin reduces inflammatory responses in LPS-stimulated cardiomyoblasts [J]. Oxid Med Cell Longev, 2012, 2(4): 146.

[11] Morris K A, Gold P E. Age-related impairments in memory and in CREB and pCREB expression in hippocampus and amygdala following inhibitory avoidance training [J]. Mech Ageing Dev, 2012, 133(5): 291.

[12] Zhang Q G, Han D, Hu S Q, et al. Positive modulation of AMPA receptors prevents downregulation of GluR2 expression and activates the Lyn-ERK1/2-CREB signaling in rat brain ischemia [J]. Hippocampus, 2010, 20(1): 65.

[责任编辑 聂淑琴]