

葛根素对帕金森病大鼠黑质 NGF, c-fos, c-jun 表达的影响

黎荣¹, 魏斌², 徐灵源³, 李勇文¹, 段小群^{1*}

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 广西壮族自治区妇幼保健院, 南宁 530021;
3. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000)

[摘要] **目的:** 研究葛根素对 6-羟多巴胺(6-OHDA)致帕金森病大鼠黑质神经生长因子(NGF), 即刻早期基因(c-fos, c-jun)mRNA 表达的影响。**方法:** 建立帕金森病大鼠模型, 随机分成 6 组: 正常组、模型组、左旋多巴阳性组及葛根素低、中、高剂量组, 并设立正常组。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。Nissl 染色观察黑质神经细胞尼氏小体的变化, 免疫组织化学法检测黑质组织神经生长因子(NGF)表达。原位杂交法检测 c-fos, c-jun mRNA 表达。**结果:** 与正常组比较, 模型组帕金森病大鼠黑质神经细胞严重损伤以及 NGF, c-fos, c-jun 表达明显减少($P < 0.01$)。与模型组比较, 葛根素有效地增加黑质组织神经细胞尼氏小体数量。增加黑质组织中 NGF 阳性细胞数量(139.1 ± 26.5), (206.1 ± 33.8), (294.6 ± 40.7) cell·mm⁻² ($P < 0.01$)。同时明显上调 c-fos, c-jun mRNA 表达(98.5 ± 16.4), (137.6 ± 19.5), (205.4 ± 28.9); (90.6 ± 15.3), (125.9 ± 18.6), (191.7 ± 27.5) cell·mm⁻² ($P < 0.01$)。**结论:** 葛根素对 6-OHDA 所致 PD 大鼠黑质具有神经保护作用, 机制可能与其调节 c-fos/c-jun 表达而介导神经修复和增强信号传导有关。

[关键词] 葛根素; 6-羟多巴胺; 帕金森病; 神经修复; 信号传导

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0259-04

Effect of Puerarin on the Expressions of NGF, c-fos, c-jun in Substantia Nigra of Parkinson's Rats

LI Rong¹, WEI Bin², XUN Ling-yuan³, LI Yong-wen¹, DUAN Xiao-qun^{1*}

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

2. Guangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanning 530021, China;

3. The Affiliated Hospital of YouJiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of puerarin on the expressions of nerve growth factor (NGF), c-fos, c-jun in substantia nigra of Parkinson's rats induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). **Method:** Parkinson's rat model was established, model rats were randomly divided into 5 groups: model group, L-dopa group (40 mg·kg⁻¹), low-, medium-and high-dosage groups of puerarin (20, 40, 80 mg·kg⁻¹). The drugs were intragastrically perfused to rats daily for 30 days. The changes of nissl bodies in nerve cells of substantia nigra were observed by Nissl staining. The expression of NGF was tested by immunohistochemistry assay. And the c-fos, c-jun mRNA levels were tested by in situ hybridization analysis. **Result:** Compared to model group, the neuronal cells were badly injured and expression of NGF, c-fos, c-jun mRNA was obviously reduced in substantia nigra of PD rats in model group. Compared to model group, puerarin effectively increased nissl bodies in neuronal cells of substantia nigra of PD rats, and elevated the number of NGF-immunoreactive cells in substantia nigra ($P < 0.01$). The expressions of c-fos, c-jun mRNA were significantly up-regulated. **Conclusion:** The results demonstrate that puerarin has a neuroprotection on the neuronal cells in substantia nigra of PD rats induced by 6-OHDA, though the underlying mechanisms that may be associated with regulation of c-fos/c-jun expressions to mediate neuronal

[收稿日期] 20120722(008)

[第一作者] 黎荣, 硕士, 从事抗帕金森病研究, Tel:13635187328, 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:duanxiaqun668@163.com

repairment and enhance the signaling transduction.

[**Key words**] puerarin; 6-hydroxydopamine; Parkinson's disease; neuron repairment; signaling transduction

帕金森病(Parkinsons disease, PD)是一种常见的神经系统变性的慢性疾病,由于中脑黑质致密部的多巴胺能神经元发生退行性变性而发病,并导致患者的运动障碍^[1]。研究发现,葛根素具有抗氧化、抑制神经细胞凋亡、心血管保护作用等药理活性^[2-3]。本实验拟一次性于右侧黑质部位注射 6-羟多巴胺(6-OHDA)复制帕金森病大鼠模型,从促进神经再生和改善信号传导角度,探讨葛根素治疗帕金森的作用机制,为其应用提供理论依据。

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%。6-羟多巴胺(美国 Sigma 公司,批号 MKAA 1216),左旋多巴(广西河丰药业有限责任公司,批号 20110810),NGF 蛋白抗体(武汉博士德公司,批号 3852064),c-fos 原位杂交检测试剂盒(泰普生物科学有限公司,批号 12060238),c-jun 原位杂交检测试剂盒(泰普生物科学有限公司,批号 12060235),DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 683579A),二乙基焦碳酸酯 DEPC(上海士锋生物科技有限公司,批号 SF1254)。

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),2235 病理组织切片机(德国 Leitz 公司),S500 原位杂交仪(创博环球(北京)生物科技有限公司),DMR + 550 病理图像分析仪(德国 Leitz 公司)。

2 方法

2.1 帕金森病大鼠模型的建立^[4-5] 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^[6],于右侧前脑内侧束,定位于黑质部位,微量注射溶解有维生素 C 和去甲丙咪嗪的 6-OHDA 10 μg·kg⁻¹。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

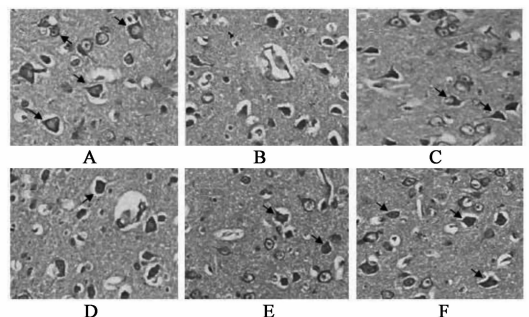
低、中、高剂量组,每组 10 只。并设置正常组(10 只正常大鼠)。ig 给予葛根素 20, 40, 80 mg·kg⁻¹,阳性组给予左旋多巴 40 mg·kg⁻¹,正常组及模型组则给予等量生理盐水,连续 ig 30 d。动物饲养在符合医学实验动物环境设施要求的条件中。

2.3 指标检测 Nissl 染色观察黑质神经细胞尼氏小体的变化,免疫组织化学法检测黑质组织神经生长因子(NGF)表达。原位杂交法检测即刻早期基因(c-fos, c-jun)mRNA 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 Nissl 染色 正常组神经元形态正常,结构完整,胞浆丰富,胞浆突起明显,神经元胞质中有数量较多的尼氏小体。模型组神经细胞减少,部分肿胀,核移位,染色质聚集,胞浆空泡化,尼氏小体消失,代以神经胶质细胞增生。左旋多巴阳性组神经细胞数量增加,神经元损伤有所减轻,尼氏小体回增,有突起形成。葛根素低剂量组神经元胞核变小,核浆比例降低,神经细胞形态部分恢复,尼氏小体较少。中剂量组神经细胞修复或再生,有突起形成,有尼氏小体生成,但仍有部分神经元损伤,神经胶质细胞增生。高剂量组神经细胞形态和结构恢复较好,有明显的胞浆突起,细胞核较清晰,尼氏小体增多。神经细胞修复或再生明显,表现为数量增加。见图 1。



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。箭头所指为神经细胞

图 1 葛根素对 PD 大鼠右侧黑质神经细胞的影响(Nissl 染色,×200)

3.2 葛根素对 PD 大鼠黑质 NGF 表达的影响 免疫组化结果显示,PD 大鼠模型黑质中 NGF 阳性细胞数量明显减少,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增加 PD 大鼠模型黑质中 NGF 阳性细胞数量,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 NGF 阳性细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	NGF 阳性细胞/ $\text{cell} \cdot \text{mm}^{-2}$
正常	-	327.5 \pm 43.8
模型	-	89.4 \pm 17.1 ¹⁾
左旋多巴	40	217.8 \pm 34.9 ²⁾
葛根素	20	139.1 \pm 26.5 ²⁾
	40	206.1 \pm 33.8 ²⁾
	80	294.6 \pm 40.7 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 葛根素对 PD 大鼠黑质 c-fos, c-jun mRNA 表达的影响 原位杂交结果显示,模型组 PD 大鼠右侧黑质 c-fos, c-jun mRNA 阳性细胞表达显著减少 ($P < 0.01$)。经药物治疗后,左旋多巴和葛根素各组 PD 大鼠右侧黑质组织中 c-fos, c-jun mRNA 阳性细胞表达明显地增多,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 c-fos, c-jun mRNA 阳性细胞表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	c-fos _m mRNA 阳性细胞/ $\text{cell} \cdot \text{mm}^{-2}$	c-jun mRNA 阳性细胞/ $\text{cell} \cdot \text{mm}^{-2}$
正常	-	238.9 \pm 30.6	225.3 \pm 29.8
模型	-	60.4 \pm 13.8 ¹⁾	57.6 \pm 12.4 ¹⁾
左旋多巴	40	142.1 \pm 20.3 ²⁾	134.8 \pm 19.7 ²⁾
葛根素	20	98.5 \pm 16.4 ²⁾	90.6 \pm 15.3 ²⁾
	40	137.6 \pm 19.5 ²⁾	125.9 \pm 18.6 ²⁾
	80	205.4 \pm 28.9 ²⁾	191.7 \pm 27.5 ²⁾

4 讨论

研究发现,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)可提高脑组织神经元间突触连接的效能,其合成与释放可促进神经细胞修复或再生,提高其存活率^[7]。临床应用,NGF 可抑制神经系统退行性进程,介导神经细胞的分化或再生^[8]。从 Nissl 染色显示,模型组 PD 大鼠右侧黑质 Nissl 小体明显减少且表现为神经细胞损伤和类凋亡现象。经葛根素治疗后,增加了 PD 大鼠右侧黑质内源性 NGF 表达,并

促使神经元形态和数量的恢复,且 Nissl 小体增多,结果提示葛根素能促进神经元的修复或再生。在分子水平上,葛根素增加黑质内源性 NGF 的水平,促进神经递质释放,触发 Ca^{2+} 内流并激活 TrkA 等的途径^[9],从而介导神经元活性,诱发突触去极化,重塑神经可塑性。

研究表明,即刻早期基因(immediate early gene, IEG, c-fos 和 c-jun)在神经细胞发育过程中,可对细胞外信号刺激作出兴奋性反应^[10]。c-fos 基因的功能是通过它所编码的蛋白 c-Fos 实现的,并与 c-jun 基因产物 c-Jun 结合成异源二聚体核蛋白复合物,以高亲和力结合到靶基因的 DNA 相关序列激活蛋白 1(AP-1),通过其相互作用参与信号传导,介导细胞的增殖,是生物效应的标志之一^[11-12]。最终优化黑质细胞间信号转导,恢复神经可塑性改善黑质功能。本实验还发现,6-OHDA 致 PD 大鼠黑质损伤伴有 c-fos/c-jun 水平的下调,与 NGF 含量的减少有相关性。推测葛根素通过增加 PD 大鼠黑质内源性 NGF 的表达调节 c-fos/c-jun 下游信号途径,而介导神经保护作用。

[参考文献]

- [1] Park N H. Parkinson disease [J]. JAAPA, 2012, 25 (5):73.
- [2] 高善荣,杜闻伟,曹丽,等.不同厂家葛根素注射剂防治实验性大鼠脑损伤的比较研究[J].中国实验方剂学杂志,2005,11(5):31.
- [3] 巩红岩,秦元旭,王更富,等.葛根素对大鼠体外循环后心肌缺血再灌注损伤的保护作用及抗氧化应激机制的探讨[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):165.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. New York: Academic Press, 1997:128.
- [7] Mariak Z, Rakowski G, Krejza J. Neuroprotective effect of oestrogen on the central nervous system [J]. Przegł Lek, 2007, 64(12):1028.
- [8] Chen L W, Yung K K, Chan Y S, et al. The proNGF-p75NTR-sortilin signalling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2008, 7(6):512.

复方萨都那保对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用

何苗^{1,2}, 蒋宝平^{1,2}, 余黎^{1,2}, 方泰惠^{1,2}, 许立^{1,2*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210029; 2. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210029)

[摘要] **目的:**观察复方萨都那保对大鼠心肌缺血/再灌注的保护作用。**方法:**60 只 SD 大鼠随机分为假手术组(只穿线不结扎)、模型组、阳性组(复方丹参片, 1.08 g·kg⁻¹)、复方萨都那保低、中、高剂量组(2.9, 5.8, 11.6 g·kg⁻¹)。连续 ig 给药 7 d, 结扎/松绑 SD 大鼠冠状动脉左前降支, 制成急性缺血/再灌注模型, 记录各组大鼠 II 导联心电图, 监测心律失常的情况, 及对心肌梗死面积的影响。**结果:**与假手术组比较, 模型组心律失常发生率、心肌梗死面积、心电图 ST-T 波和 J 点的升高程度均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性组和复方萨都那保低、中、高剂量组再灌注时心律失常发生率, 心肌梗死范围, 心电图 ST-T 波和 J 点的升高程度均降低 ($P < 0.01, P < 0.05$), 且复方萨都那保组呈现剂量依赖性。**结论:**复方萨都那保对心肌缺血再灌注损伤具有一定的保护作用, 可能与其降低心律失常发生率、减小梗死面积, 降低心电图 ST-T 波和 J 点的升高程度有关。

[关键词] 复方萨都那保; 心肌缺血/再灌注损伤; 心律失常; 心电图

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0262-04

Protective Effect of *Nepeta angustifolia* on Myocardial Ischemic/Reperfused Injury in Rats

HE Miao^{1,2}, JIANG Bao-ping^{1,2}, YU Li^{1,2}, FANG Tai-hui^{1,2}, XU Li^{1,2*}

(1. Nanjing University of China Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects of compound *Nepeta angustifolia* on myocardial ischemia/reperfusion-induced injury (I/R) in rats. **Method:** Sixty SD rats were divided into 6 groups randomly: sham group (only needle not ligation), model group, positive group (compound danshen tablets, 1.08 g·kg⁻¹), *N. angustifolia* groups low-does, medium-does and high-does group (2.9, 5.8, 11.6 g·kg⁻¹). Rats were continuous gavaged for 7 days, the ligation/relaxation of left anterior descending artery was used to establish acute ischemia/reperfusion model. meanwhile monitoring II ECG, arrhythmia and infarcted zone. **Result:** Compared with control, I/R group increased the incidence of reperfusion arrhythmia, infarcted zone and growth of J point and ST-T wave ($P < 0.01$). Compared with I/R group, *N. angustifolia* groups reduced the incidence of reperfusion

[收稿日期] 20120810(001)

[第一作者] 何苗, 硕士研究生, E-mail: hemiao_622@163.com

[通讯作者] * 许立, 教授, 硕士生导师, 从事心血管药理学研究, E-mail: xuli64@163.com

[9] Yu T, Calvo L, Anta B, et al. Regulation of trafficking of activated TrkA is critical for NGF-mediated functions [J]. Traffic, 2011, 12(4):521.

[10] Yuan Z, Gong S, Luo J, et al. Opposing roles for ATF2 and c-Fos in c-Jun-mediated neuronal apoptosis [J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(9):2431.

[11] Verma I M, Ransone L J, Visvader J, et al. fos-jun

conspiracy: implications for the cell [J]. Ciba Found Symp, 1990, 150(6):128.

[12] Ramirez-Carrozzi V, Kerppola T. Asymmetric recognition of nonconsensus AP-1 sites by Fos-Jun and Jun-Jun influences transcriptional cooperativity with NFAT1 [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(5):1737.

[责任编辑 聂淑琴]