

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.14.014

天麻钩藤饮对帕金森病模型大鼠纹状体 α -突触核蛋白含量及自噬相关蛋白 Beclin1、LC3B 表达的影响

彭伟^{*}, 张立娟¹, 张倩¹, 王康锋¹, 李思毅², 杨洁¹, 王海燕³

(1. 山东中医药大学附属医院, 山东省济南市历下区经十路 16369 号, 250014; 2. 陕西中医药大学针灸推拿学院; 3. 山东中医药大学)

摘要 目的 探讨天麻钩藤饮治疗帕金森病的可能作用机制。方法 采用 6-羟基多巴胺注射法建立帕金森病大鼠模型, 造模成功后将大鼠随机分为模型组、西药组和中药高、低剂量组, 另设假手术组, 每组 10 只。中药低、高剂量组分别给予天麻钩藤饮 11.88、47.52 g/(kg·d) 灌胃, 西药组予多巴丝肼片 75 mg/(kg·d) 灌胃, 模型组、假手术组予等量生理盐水灌胃, 共干预 8 周。治疗后采用 HE 染色法观察大鼠脑组织纹状体形态学变化, 免疫组织化学法测定纹状体中 α -突触核蛋白含量及自噬相关蛋白 Beclin1、LC3B 表达情况。结果 假手术组中纹状体神经元细胞密集, 形态正常; 模型组神经元的损伤较为严重, 神经细胞数量明显减少; 中药高、低剂量组和西药组纹状体细胞形态与模型组比较均有不同程度的改善。与假手术组比较, 模型组大鼠纹状体内 α -突触核蛋白灰度值下降, Beclin1、LC3B 灰度值升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 中药高剂量组和西药组 α -突触核蛋白灰度值升高, 中药高、低剂量组和西药组 Beclin1 和 LC3B 灰度值降低 ($P < 0.05$)。与西药组比较, 中药高剂量组 α -突触核蛋白灰度值升高, Beclin1 灰度值降低 ($P < 0.05$)。结论 天麻钩藤饮可能通过上调纹状体神经细胞自噬活性, 清除过量 α -突触核蛋白, 从而发挥神经保护作用。

关键词 帕金森病; 天麻钩藤饮; 纹状体; 细胞自噬; α -突触核蛋白

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 属于中医学“颤证”范畴, 发病多由于年老体虚、肝肾亏损、肝风内动、气血阴阳亏虚、筋脉失养所致, 治疗当以补肾平肝熄风为法。天麻钩藤饮出自《中医内科杂病证治新义》, 具有平肝熄风、补益肝肾之效^[1]。近年来, 越来越多的医家采用该方治疗 PD, 无论是与西药联合还是单独应用都能明显改善患者症状, 取得了满意疗效^[2-4]。本研究以天麻钩藤饮干预 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 致 PD 模型大鼠, 观察大鼠脑组织形态学变化, 测定纹状体中 α -突触核蛋白含量及自噬相关蛋白 LC3B、Beclin1 的表达情况, 探讨天麻钩藤饮治疗 PD 的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 65 只, 8 周龄, 体质量

200 ~ 250 g, 由山东省实验动物中心提供, 实验动物许可证号: CSXK (鲁) 20140007。自然光照, 室温 (25 ± 2) °C, 水食自由摄取。

1.2 药物

天麻钩藤饮组成: 天麻 9 g, 钩藤 12 g, 石决明 18 g, 栀子 9 g, 黄芩 9 g, 川牛膝 12 g, 杜仲 9 g, 桑寄生 9 g, 夜交藤 9 g, 茯神 9 g, 益母草 9 g。药材煎煮两次合并滤液进行浓缩, 低剂量浓度为 1.188 g/ml, 高剂量浓度为 4.752 g/ml。美多芭 (多巴丝肼片): 上海罗氏制药有限公司, 批号: H10930198。

1.3 主要试剂及仪器

3% 戊巴比妥钠 (批号: H61022217), 西安利菌有限责任公司; 6-OHDA (批号: H4386), 美国 Sigma 公司; 阿朴吗啡 (APO, 批号: 0458853-17), 美国 Cayman 公司; α -突触核蛋白抗体 (批号: AD101756M)、LC3B 抗体 (批号: AD12044AM)、Beclin1 抗体 (批号: AF11161687M), 美国博奥森公司; 0.02% 抗坏血

基金项目: 国家自然科学基金 (81303028); 山东省中医药科技发展计划 (2017-037)

* 通讯作者: pengwei0625@163.com, (0531) 68616648

酸 (批号: H61022217), 上海哈灵生物科技有限公司; 甲醛溶液 (批号: AR-0221), 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, 批号: abx098132), 北京奥维亚生物科技有限公司; 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (批号: HPBIO-BS1181)、正常山羊血清 (批号: XY-0005), 上海信裕生物科技有限公司; 3-二氨基联苯胺 (DAB, 批号: M11069), 上海迈瑞尔生物科技有限公司; 苏木精 (批号: BD5035), 南京巴傲得生物科技有限公司; 医用明胶海绵 (批号: CE1327015-2)、庆大霉素 (批号: CA1408013-6), 哈药集团制药总厂。

多功能脑立体定位仪, 美国 Stoelting 公司, 型号: 51400; 低温离心机, 美国 Thermo IEC 公司, 型号: MICROMAX R; 高速离心机, 德国 Sigma 公司, 型号: 1-43; 激光共聚焦显微镜, 日本 Olympus 公司, 型号: FV3000; 酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司, 型号: plus384; 电子天平, 德国赛多利斯集团, 型号: BSA。

2 方法

2.1 动物模型制备

术前按常规进行行为学测试^[1], 确认大鼠无异常旋转行为后, 用 3% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉。参照文献^[8]方法将大鼠固定于脑立体定位仪上, 剪去颅顶鼠毛, 碘伏常规消毒, 沿正中中线切开大鼠颅顶皮肤, 剥离骨膜, 暴露前后囟。纯双氧水擦拭颅骨表面, 以前囟为准, 根据《大鼠脑立体定位图谱》^[9], 确定右侧黑质二坐标: 1) 前囟后 5.2 mm, 正中右侧 1.0 mm, 硬膜下 9.0 mm; 2) 前囟后 5.2 mm, 正中右侧 2.5 mm, 硬膜下 8.5 mm。用牙科钻在手术要求部位小心钻开颅骨, 用 5 μ l 微量进样器将 6-OHDA (溶于含 0.02% 抗坏血酸的生理盐水中, 浓度为 2 μ g/ μ l) 溶液注入右侧黑质部, 每孔 3 μ l, 注射速度为 1 μ l/min, 注射完毕后留针 5 min, 然后以 1.0 mm/min 速度缓慢退针。手术完成后, 用医用明胶海绵填塞颅骨孔, 缝合切口皮肤, 肌肉注射庆大霉素每只 20 万单位, 共 7 天, 待动物清醒后放回笼中饲养。假手术组只注射含 0.02% 抗坏血酸的等量生理盐水, 其余条件与造模手术相同。造模手术 10 天后, 通过腹腔注射 APO 0.5 mg/kg 诱发大鼠向健侧旋转, 记录开始旋转至 30 min 内的旋转圈数, 以旋转圈数平均每分钟超过 7 次者为合格的 PD 模型。

2.2 分组及给药

造模成功后, 按随机数字表法将 PD 模型大鼠分为模型组、西药组和中药高、低剂量组, 另设假手术组, 每组 10 只。中药低、高剂量组分别给予天麻钩藤饮 11.88、47.52 g/(kg·d) 灌胃, 分别相当于临床人日用量的 6.25 倍和 25 倍; 西药组予多巴丝肼片 75 mg/(kg·d) 灌胃, 相当于临床人日用量的 6.25 倍; 模型组、假手术组予等量生理盐水灌胃, 共干预 8 周。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 动物一般状态 实验过程中每日观察并记录各组大鼠的皮毛、精神、活动、肢体震颤、僵直等情况。

2.3.2 纹状体形态学观察 实验结束后处死大鼠, 取脑, 剥离出纹状体, 经 4% 甲醛溶液浸泡固定, 48 h 后用自来水流水冲洗 30 min 后, 脱水、透明、石蜡包埋, 做连续冠状切片, 采用 HE 染色法, 在显微镜下观察各组大鼠纹状体神经细胞形态学改变。

2.3.3 纹状体内 α -突触核蛋白、LC3B、Beclin1 蛋白表达 采用免疫组化法, 具体步骤按试剂盒说明进行, 苏木精复染, 封片, 显微镜下观察。每只大鼠取纹状体冠状切片 3 张, 每张切片随机取 4 个不重叠的视野, 通过自动图像分析系统得出每个视野平均灰度值, 将 4 个视野的平均灰度值取平均值。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据处理。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐采用 LSD 法, 方差不齐采用 Dunnett 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 各组大鼠一般状态观察

假手术组大鼠皮毛光泽, 精神可, 活动及进食饮水正常, 无肢体震颤、僵直情况; 模型组大鼠毛色枯燥晦暗, 脱毛明显, 肢体震颤、僵直情况频发, 进食和饮水量减少; 中药高、低剂量组和西药组大鼠毛色晦暗, 部分可见脱毛、竖毛, 前爪时常颤抖, 行动迟缓, 肢体伸展缓慢, 症状随着用药时间的延长而逐渐减轻。

3.2 各组大鼠纹状体形态学变化

HE 染色病理图 (图略) 示, 假手术组纹状体中神经元细胞密集, 形态正常, 排列整齐; 模型组神经元的损伤较为严重, 神经细胞数量明显减少, 细胞体积缩小, 细胞膜皱缩, 细胞核变形, 核染色

质皱缩且边缘化; 中药高、低剂量组和西药组纹状体细胞形态与模型组比较均有不同程度的改善。

3.3 各组大鼠纹状体内 α -突触核蛋白、Beclin1、LC3B 表达情况

α -突触核蛋白、Beclin1、LC3B 主要表达于神经元的胞浆及胶质神经细胞的胞突, 呈棕黄色粗颗粒状表达。 α -突触核蛋白: 假手术组大鼠黑质细胞内未见沉积; 模型组大鼠黑质内存在大量棕黄色斑块, 面积较大; 中药高、低剂量组和西药组大鼠黑质区均有少量棕黄色斑块, 但面积较模型组小。Beclin1、LC3B: 二者的免疫组化结果表达趋势相似, 假手术组大鼠大脑黑质区有大量棕黄色斑块; 模型组大鼠大脑黑质部 Beclin1、LC3B 表达强度很低; 中药高、低剂量组和西药组大鼠黑质区均有明显棕黄色斑块。表 1 示, 与假手术组比较, 模型组、西药组和中药高、低剂量组 α -突触核蛋白灰度值均明显下降, LC3B 灰度值均明显升高 ($P < 0.05$); 模型组、中药低剂量组和西药组较假手术组 Beclin1 灰度值升高 ($P < 0.05$), 而中药高剂量组 Beclin1 灰度值与假手术组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 中药高剂量组和西药组 α -突触核蛋白灰度值升高, 中药高、低剂量组和西药组 Beclin1 和 LC3B 灰度值降低 ($P < 0.05$)。与西药组比较, 中药高剂量组 α -突触核蛋白灰度值升高, Beclin1 灰度值降低 ($P < 0.05$)。中药低剂量组 α -突触核蛋白、Beclin1、LC3B 灰度值与西药组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠纹状体内 α -突触核蛋白、Beclin1、LC3B 表达灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	α -突触核蛋白	Beclin1	LC3B
假手术组	10	228.5 $\pm$ 16.3	138.4 $\pm$ 6.0	141.1 $\pm$ 6.3
模型组	10	135.2 $\pm$ 8.3*	216.1 $\pm$ 15.8*	199.9 $\pm$ 8.1*
中药高剂量组	10	166.2 $\pm$ 13.3* Δ $\blacktriangle$	147.1 $\pm$ 7.1 Δ $\blacktriangle$	159.4 $\pm$ 7.4* Δ
中药低剂量组	10	144.6 $\pm$ 7.7*	163.8 $\pm$ 12.5* Δ	168.3 $\pm$ 8.7* Δ
西药组	10	151.0 $\pm$ 7.9* Δ	159.5 $\pm$ 11.3* Δ	163.7 $\pm$ 8.3* Δ

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与西药组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

4 讨论

明代孙一奎《赤水玄珠·颤振门》曰“颤振者非寒禁鼓栗, 乃木火上盛, 肾阴不充, 下虚上实, ……法则清上补下”, 说明 PD 的病机为本虚标实, 治疗上在平肝熄风的同时, 应当重视补益肝肾, 治病求本, 标本兼顾。天麻钩藤饮方中天麻、钩藤平肝熄风, 为君药。石决明咸寒体重, 功能平

肝潜阳, 与君药合用, 加强平肝熄风之力; 川牛膝引血下行, 并能活血利水, 共为臣药。杜仲、桑寄生补益肝肾以治本; 栀子、黄芩清肝泻火, 以折其亢阳; 益母草合川牛膝活血利水, 有利于平肝潜阳; 夜交藤、茯神宁心安神, 为佐药。全方共奏平肝熄风、补益肝肾、清热活血之效, 用于治疗 PD 切中病机。

现代研究结果显示, PD 的主要病理特征为中枢黑质致密部多巴胺能神经细胞渐进性减少和神经元内出现路易小体^[1]。 α -突触核蛋白是构成路易小体的主要蛋白, α -突触核蛋白的错误折叠和聚集是 PD 发生发展的中心事件^[2]。机体修复或消除异常蛋白质的两种最主要的途径是泛素蛋白酶体系统和自噬溶酶体途径^[3], 这两种途径均可将体内错误折叠和聚集的蛋白质(包括 α -突触核蛋白)通过降解的方式消除, 而已经确定的是 α -突触核蛋白的寡聚物和聚集体降解的重要通路是自噬溶酶体途径^[3-14]。近年来, 自噬溶酶体途径在 PD 中的作用正日益受到重视, 研究显示, 神经细胞内自噬溶酶体途径的功能失调和路易小体的形成有重要联系^[3]。自噬是真核细胞所共有的一种通过降解细胞内过多或异常的蛋白、细胞器等以维持正常细胞功能的蛋白降解方式, 自噬的调控机制十分复杂, 许多蛋白都参与其中, 目前已知的有 Beclin1、LC3 等。Beclin1 与酵母自噬基因 Atg6 同源, 是调控哺乳动物自噬体形成的关键因子^[5]。LC3 是参与自噬发生的关键基因, 可共价结合在自噬泡膜上, LC3 含量与自噬活性密切相关, 被称为自噬的标志分子^[6]。自噬功能缺陷参与了 PD 等神经退行性疾病的发病过程, 故自噬激活可以作为 PD 的治疗靶点^[7]。

本研究结果发现, 假手术组大鼠纹状体神经元细胞形态正常, 几乎未见 α -突触核蛋白沉积, 而 Beclin1、LC3B 表达量较高。模型组大鼠纹状体神经元损伤, 数量减少, 有大量 α -突触核蛋白表达, 而 Beclin1、LC3B 表达量较低。经过天麻钩藤饮和美多芭干预后, 大鼠纹状体形态较模型组改善, α -突触核蛋白表达量下降, Beclin1、LC3B 表达量升高, 说明 PD 大鼠纹状体神经细胞自噬活性降低与 α -突触核蛋白沉积有关, 天麻钩藤饮可能通过上调自噬活性, 清除过量 α -突触核蛋白, 从而发挥神经保护作用。

参考文献

- [1] 张浩良. 中国方剂精华辞典 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1996: 161-162.

- [4] 陈为龙,徐容富,孔令周,等. 天麻钩藤饮联合西药治疗帕金森病随机平行对照研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2015,29(6):87-88.
- [5] 刘占兵. 天麻钩藤饮加味联合美多芭治疗 67 例帕金森病疗效观察 [J]. 中国民间疗法, 2015,23(7):69-70.
- [6] 陈琰,何富乐,杨卉. 天麻钩藤饮治疗帕金森病临床疗效观察 [J]. 心脑血管病防治, 2014,14(3):252-253.
- [7] 胡琼力,钟水生,曾昭龙,等. 加味天麻钩藤饮治疗早期帕金森病神经保护作用的临床研究 [J]. 中国现代药物应用, 2017,11(16):136-137.
- [8] 杨凯,邹久利,吉永相. 天麻钩藤饮治疗帕金森病临床疗效观察 [J]. 临床医学研究与实践, 2017(3):97-98.
- [9] 谭磊琦,刘亚松,沈富春,等. 帕金森病大鼠模型的建立及其行为学评价的实验研究 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2017,38(18):2109-2112.
- [10] 冉秋,何建成. 一体化证候结合帕金森病大鼠模型中医证候属性研究 [J]. 中国实验动物学报, 2011,19(6):466-471.
- [11] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1991:49-58.
- [12] ALI SF, BINIENDA ZK, IMAM SZ, et al. Molecular aspects of dopaminergic neurodegeneration: gene-environment interaction in parkin dysfunction [J]. Int J Environ Res Public Health, 2011,8(12):4702-4713.

- [13] COOKSON MR. Alpha-synuclein and neuronal cell death [J]. Mol Neurodegener, 2009,4:9. doi: 10.1186/1750-1326-4-9.
- [14] RUBINSZTEIN DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neuro-degeneration [J]. Nature, 2006,443(7113):780-786.
- [15] KURIBARA H, HIGUCHI Y, TADOKORO S. Effects of central depressants on rota-rod and traction performances in mice [J]. Jpn J Pharmacol, 1977,27(1):117-126.
- [16] 李晓明,张丽华,慕艳秋,等. 镇肝熄风汤对帕金森病肝阳上亢证大鼠旋转行为的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016,18(12):2138-2142.
- [17] SUN Q, FAN W, ZHONG Q. Regulation of Beclin1 in autophagy [J]. Autophagy, 2009,5(5):713-716.
- [18] MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, LEVINE B. Methods in mammalian autophagy research [J]. Cell, 2010,140(3):313-326.
- [19] 崔宁珊,宋淑亮,梁浩,等. 自噬在帕金森症中的研究进展 [J]. 生命的化学, 2016,36(1):33-38.

Effect of *Tianma Gouteng Yin* (天麻钩藤饮) on Content of α -synuclein in Striatum and Expression of Autophagy Protein Beclin1 and LC3B in Parkinson's Disease Model Rats

PENG Wei¹, ZHANG Lijuan¹, ZHANG Qian¹, WANG Kangfeng¹, LI Siyi², YANG Jie¹, WANG Haiyan³
(1. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014; 2. College of Acupuncture and Massage, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine; 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Tianma Gouteng Yin* (天麻钩藤饮) in treating Parkinson's disease. **Methods** A rat model of Parkinson's disease was established by 6-hydroxydopamine injection. After successful model establishment, the rats were randomly divided into model group, western medicine group, and high or low dose groups of traditional Chinese medicine, and a sham operation group, 10 rats in each group. The low and high dose groups of traditional Chinese medicine were given *Tianma Gouteng Yin* 11.88 and 47.52 g/(kg·d) gavage, respectively, and the western medicine group were given tobasasic tablets 75 mg/(kg·d) gavage. The same amount of saline was given to the model group and the sham operation group for a total of 8 weeks. HE staining was used to observe the morphological changes of brain tissue in rats. Immunohistochemistry was used to determine the content of α -synuclein in the striatum and the expression of autophagy-related proteins Beclin1 and LC3B. **Results**

In the sham operation group, the striatum neurons were densely packed and the morphology was normal. In the model group, the damage of the neurons was severe and the number of nerve cells was significantly reduced. The striatum cell morphology of the high, low dose of the Chinese medicine group and western medicine group was improved compared with that of the model group. Compared with the sham group, the gray value of α -synuclein in the striatum of the model group decreased, and the gray value of Beclin1 and LC3B increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the gray value of α -synuclein in the high and low dose group as well as the western medicine group increased, and the gray levels of Beclin1 and LC3B in the high-dose, low-dose group and western medicine group decreased ($P < 0.05$). Compared with western medicine group, the gray value of α -synuclein in high-dose group was increased, and the gray value of Beclin1 was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Tianma Gouteng Yin* may play a neuroprotective role by scavenging excess α -synuclein and upregulating autophagy activity in striatum.

Keywords Parkinson's disease; *Tianma Gouteng Yin*; striatum; autophagy; α -synuclein

(收稿日期: 2017-10-30; 修回日期: 2018-04-26)

编辑: 邓媛