

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.20.013

# 补肾复方对帕金森病模型大鼠不同脑区神经营养因子的影响

林瑶<sup>1</sup>, 杨莎莎<sup>2</sup>, 刘婷<sup>2</sup>, 钟佳男<sup>2</sup>, 许茜<sup>1</sup>, 黄露芬<sup>1</sup>, 袁明洲<sup>1</sup>, 林友宁<sup>3</sup>, 肖绍坚<sup>3</sup>, 蔡晶<sup>1\*</sup>

(1. 福建中医药大学中西医结合学院, 福建省福州市闽侯上街邱阳路 1 号, 350122; 2. 福建中医药大学中西医结合研究院; 3. 福建中医药大学附属第三人民医院)

**摘要** 目的 探讨补肾复方治疗帕金森病 (PD) 的可能作用机制。方法 40 只雄性 SD 大鼠采用颈背部皮下注射鱼藤酮葵花油乳化液建立 PD 大鼠模型, 随机分为补肾复方低、中、高剂量组 (40、80、160 mg/kg 补肾复方水煎剂灌胃) 及模型组 (等体积生理盐水灌胃), 每组 10 只。另设正常组和溶剂组 (等体积生理盐水灌胃) 各 10 只。于灌胃第 14 天进行悬挂实验; 免疫组化检测黑质酪氨酸羟化酶 (TH) 阳性细胞数, Western Blot 法检测纹状体、额叶多巴胺能神经营养因子 (CDNF)、中脑胶质细胞源性神经营养因子 (MANF) 蛋白表达, RT-PCR 检测纹状体、额叶 CDNF、MANF mRNA 表达。结果 与模型组比较, 补肾复方中、高剂量组悬挂实验评分增加, 黑质 TH 阳性细胞数增加, 纹状体和额叶 CDNF 蛋白表达及补肾复方高剂量组纹状体 MANF 蛋白及 mRNA 水平、纹状体 CDNF mRNA 水平、额叶 MANF mRNA 亦明显增加, 补肾复方各剂量组额叶 CDNF mRNA 表达均增多 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 补肾复方能改善帕金森病的行为障碍, 保护纹状体、额叶的多巴胺能神经细胞, 其保护作用可能是通过纠正不同脑区的 CDNF、MANF 表达实现的, 且以高剂量效果更好。

**关键词** 帕金森病; 补肾复方; 纹状体; 额叶; 神经营养因子

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 典型的运动症状出现在 Braak 病理分期第三期黑质受累时, 据此病理分期, PD 早期病变出现在延髓、脑桥, 之后进展至海马、黑质、丘脑, 晚期蔓延到额叶<sup>[1]</sup>。目前对 PD 的研究多集中在黑质, 其他脑区的研究甚少。神经营养因子 (neurotrophins, NTs) 是神经系统正常发育和功能维持的重要调节因子, 包括神经生长因子基因家族、胶质细胞源性神经营养因子家族、保守性多巴胺神经营养因子家族及促神经生成细胞因子家族。大脑多巴胺能神经营养因子 (CDNF)、中脑胶质细胞源性神经营养因子 (MANF) 属于保守性多巴胺神经营养因子家族, 具有特定的保守氨基酸序列, 对多巴胺能神经元有良好的保护及神经修复作用<sup>[2-4]</sup>。

中医理论认为, 肝肾亏虚、髓海不足是帕金森病的重要病机, 补肾益髓是治疗该病的重要思路。本实验采用的补肾复方是课题组多年经验的总结, 已申请为国家专利 (专利号: 2011103028541)。课题组前期临床试验发现, 其能减轻 PD 患者运动障碍及减少西药用量<sup>[5-6]</sup>; 改善 PD 动物模型的行为学障碍, 增加黑质胶质细胞源性神经营养因子及其受体的表达<sup>[7-8]</sup>; 上调 ME23.5 神经细胞神经营养因子表达, 减轻多巴胺能神经细胞的凋亡<sup>[9-10]</sup>。本实验拟在前期研究基础上观察补肾复方对 PD 模型大鼠不同脑区神经营养因子的影响, 为补肾复方进一步应用于临床提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 70 只, 体重 (180 ± 20) g, 由福建中医药大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号码: SCXK (沪) 2012-0002。实验条件: 室温 20 ~ 22℃, 相对湿度 60% ~ 65%, 自动光暗控制 (7: 00 - 19: 00 光照, 19: 00 - 7: 00

基金项目: 国家自然科学基金 (81804156); 福建省自然科学基金 (2018J01882); 福建中医药大学科研平台开放课题 (X2017007—平台); 福建省科技计划 (2017Y0053); 福建省中医药科研项目 (2017FJZYLC202, 2017FJZYLC501, 2017FJZYLC201)

\* 通讯作者: caiji1@163.com

暗置), 摄食饮水自由。

## 1.2 主要药物与试剂

补肾复方组成: 肉苁蓉 10 g, 淫羊藿 10 g, 制黄精 12 g, 福建中医药大学附属第三人民医院提供, 按原料配比称取肉苁蓉、淫羊藿、制黄精, 加蒸馏水煎煮 2 次, 合并煎液, 将过滤后的煎液分别浓缩成终浓度为 25、50、100 mg/ml 的补肾复方药液。鱼藤酮 (批号: R8875)、葵花油 (批号: S5007), 美国 Sigma 公司; 水合氯醛 (天津市大茂化学试剂厂, 批号: 1362); 免疫组化试剂盒 (福建迈新技术有限公司, 批号: KIT-9720); ECL 化学发光检测试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司, 批号: 1705060); BCA 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: P0010S); CDNF 抗体 (美国 Novus 公司, 批号: NBP1-76834);  $\beta$ -actin 抗体 (武汉三鹰公司, 批号: 66009-1); MANF 抗体 (批号: ab67271)、TH 抗体 (批号: ab112), 英国 Abcam 公司; Trizol 试剂盒 (批号: R401)、HiScript Q RT SuperMix for qPCR (批号: R123)、AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (批号: Q111), 南京诺唯赞生物技术有限公司。

## 1.3 实验仪器

倒置显微镜 (日本尼康公司, 型号: TS100); 光学显微镜 (型号: MDL)、石蜡切片机 (型号: RM2235), 德国 Leica 公司; 多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司, 型号: ELX800); 电泳仪 (型号: PowerPac Basic)、转膜仪 (型号: PowerPac Basic)、化学发光成像仪 (型号: Universal Hood II)、RNA 逆转录仪 (型号: S1000 Thermal), 美国 Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 分析仪 (美国 BD 公司, 型号: CFX96)。

## 1.4 动物模型建立

PD 模型制备采用 Sherer 等<sup>[1]</sup> 创立的经典方法: 将鱼藤酮溶于葵花油乳化液, 使其终浓度为 1.5 mg/ml, 按 1.5 mg/(kg·d) 剂量给予大鼠颈背部皮下注射, 连续 14 天。观察大鼠的行为学改变, 参照陈忻等<sup>[2]</sup> 的行为学评分标准进行评分, 2~8 分者为合格的 PD 模型大鼠。

## 1.5 实验分组及给药

将 70 只健康 SD 大鼠按 SPSS 24.0 软件产生的随机数字分为正常组 10 只, 溶剂组 10 只 (为排除溶剂对各检测指标的影响而设, 只颈背部皮下注射等量葵花油乳化液), 造模组 50 只。造模组大鼠按 1.4 中的造模方法建立 PD 模型, 造模成功大鼠

共 40 只。将造模成功大鼠再次按 SPSS 24.0 软件随机分为模型组及补肾复方低、中、高剂量组, 每组 10 只。

补肾复方按人每日常用量 47 g, 根据人-大鼠体表面积比换算<sup>[3]</sup>, 得出大鼠每天用药的低、中、高剂量分别为 40、80、160 mg/kg, 其中中剂量为人的临床等效剂量。补肾复方低、中、高剂量组分别用浓度为 25、50、100 mg/ml 的补肾复方药液按 10 ml/(kg·d) 灌胃, 正常组、溶剂组和模型组按 10 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃, 每天 1 次, 连续 14 天。

## 1.6 观察指标及方法

1.6.1 一般情况观察及行为学检测 每天观察各组大鼠进食、饮水、活动、精神情况, 并做好记录。于干预第 14 天灌胃后 6 h 在同一时间分别对各组大鼠进行悬挂实验<sup>[4]</sup>: 将大鼠前爪悬挂于距地面 30 cm 水平放置的金属丝上, 记录从开始悬挂至落地时的时间并评分, 评分标准为: 持续 0~5 s 为 0 分, 6~10 s 为 1 分, 11~15 s 为 2 分, 16~20 s 为 3 分, 21~25 s 为 4 分, 26~30 s 为 5 分, 超过 30 s 为 6 分, 共检测 3 次, 取平均值, 每次检测时间间隔约 2 min。

1.6.2 免疫组化法检测黑质酪氨酸羟化酶 (TH) 阳性细胞数 各组取 5 只大鼠, 以 10% 水合氯醛 3 ml/kg 行腹腔注射麻醉后打开胸腔, 灌注针插入左心室, 剪开右心耳, 灌注生理盐水 (4℃) 冲洗血液, 以肝脏变白为灌注成功, 至右心房流出的液体变清亮时, 再灌注 4% 多聚甲醛溶液, 灌注完成后仔细分离取出大脑组织, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h, 流水冲洗 2 h, 依次进行 70%、80%、90%、95%、100% 乙醇梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋切片。按照试剂盒说明书对石蜡切片进行免疫组化染色, 200 倍显微镜下观察, 以棕黄色或淡黄色颗粒染色为阳性表达。每张切片随机选取 5 个视野, 应用 Image-pro Plus 6.0 软件分析图像, 读取 TH 阳性反应细胞数, 取平均数。

1.6.3 Western Blot 法检测各组大鼠不同脑区 CDNF、MANF 蛋白表达 各组另 5 只大鼠待其完全麻醉后快速断头, 于冰面上迅速取出脑组织并分离出大脑纹状体及额叶皮层, 置 -80℃ 冰箱中保存备用。取大鼠纹状体、额叶皮层各 50 mg, BCA 法测定蛋白水平。SDS-PAGE 凝胶电泳, PVDF 转膜, 脱脂奶粉室温封闭, 加入一抗 ( $\beta$ -actin 1:2000; CDNF 1:1000; MANF 1:1000), 4℃ 孵育过夜。相应二抗 (均 1:3000) 室温孵育 1 h, ECL 试剂

盒显影并成像,用 Image Lab 4.0 软件分析蛋白条带灰度值,  $\beta$ -actin 为内参,以目的蛋白条带灰度值/ $\beta$ -actin 表示相对表达水平。

1.6.4 RT-PCR 法检测各组大鼠不同脑区 CDNF、MANF mRNA 表达 取  $-80^{\circ}\text{C}$  冷冻保存的大鼠纹状体和额叶组织块 100 mg,抽提总 RNA,反转录后扩增,引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,引物序列见表 1。反应条件为:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 1 min,  $94^{\circ}\text{C}$  8 s,  $60^{\circ}\text{C}$  34 s,共 40 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  值相对定量法计算目的基因表达的相对水平。

表 1 大鼠纹状体、额叶 PCR 引物序列

| 基因    | 引物序列                                                                   | 扩增片段长度 |
|-------|------------------------------------------------------------------------|--------|
| MANF  | 上游: 5'-ACCAGCCACTATTGAAGAAGAAC-3',<br>下游: 5'-GTCCTAGTCACACTCACCCTAT-3' | 226 bp |
| CDNF  | 上游: 5'-TGCCAACATCCAAGACAACAT-3',<br>下游: 5'-CATTGACATCAGCGTGAGAGTT-3'   | 209 bp |
| GAPDH | 上游: 5'-GCAGCGACTAAGCAGGAAC-3',<br>下游: 5'-CAGATGACGAAGAGCAGATG-3'       | 140 bp |

注: MANF,中脑胶质细胞源性神经营养因子; CDNF,大脑多巴胺能神经营养因子

## 1.7 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件进行统计学处理,计量资料采用均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较进行单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法或 Game's Howell 法,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠一般情况比较

造模前各组大鼠毛色、活动、体型等情况无明显差异。模型组大鼠于造模第 7 天开始逐渐出现主动活动减少、拒捕行为减弱、弓背向上抬高、单侧斜卧、行走困难。补肾复方低、中、高剂量组大鼠主动活动均较模型组大鼠有所增加,毛色较为光亮,行动有所改善,补肾复方低、中、高剂量组大鼠之间一般情况无明显区别。正常组及溶剂组大鼠毛色亮,活动自如,饮食正常。

### 2.2 各组大鼠行为学结果比较

表 2 示,与正常组比较,溶剂组大鼠悬挂实验评分差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),模型组悬挂实验评分减少 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,补肾复方中、高剂量组悬挂实验行为学评分增加 ( $P < 0.05$ );补肾复方低、中、高剂量组之间两两比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 各组大鼠中脑黑质 TH 阳性细胞数比较

显微镜下观察,模型组 TH 阳性细胞数较正常组及溶剂组减少,补肾复方中、高剂量组 TH 阳性细胞数较模型组增多。表 2 示,与正常组比较,溶剂组大鼠中脑黑质 TH 阳性细胞数差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),模型组中脑黑质 TH 阳性细胞数显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,补肾复方中、高剂量组中脑黑质 TH 阳性细胞数显著增多 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );补肾复方高剂量组 TH 阳性细胞数明显多于中、低剂量组 ( $P < 0.01$ ),补肾复方中、低剂量组之间 TH 阳性细胞数比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 各组大鼠悬挂实验评分、中脑黑质 TH 阳性细胞数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | 鼠数 | 悬挂实验评分 (分)               | TH 阳性细胞数 (个)                              |
|----------|----|--------------------------|-------------------------------------------|
| 正常组      | 10 | 1.16 $\pm$ 0.42          | 314.33 $\pm$ 17.15                        |
| 溶剂组      | 10 | 1.16 $\pm$ 0.53          | 309.13 $\pm$ 16.25                        |
| 模型组      | 10 | 0.47 $\pm$ 0.21*         | 128.67 $\pm$ 19.56**                      |
| 补肾复方低剂量组 | 10 | 0.63 $\pm$ 0.25          | 150.33 $\pm$ 5.13                         |
| 补肾复方中剂量组 | 10 | 0.87 $\pm$ 0.16 $\Delta$ | 169.37 $\pm$ 17.18 $\Delta$               |
| 补肾复方高剂量组 | 10 | 0.88 $\pm$ 0.16 $\Delta$ | 272.33 $\pm$ 17.47 $\Delta\Delta\Delta\#$ |

注: TH,酪氨酸羟化酶;与正常组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与补肾复方低剂量组比较, $\Delta P < 0.01$ ;与补肾复方中剂量组比较, $\#P < 0.01$

### 2.4 各组大鼠纹状体、额叶 CDNF、MANF 蛋白表达比较

表 3 示,与正常组比较,溶剂组大鼠纹状体、额叶 CDNF、MANF 蛋白表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),模型组纹状体、额叶 CDNF、MANF 蛋白表达均明显减少 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,补肾复方低剂量组额叶 MANF 蛋白,补肾复方中、高剂量组纹状体、额叶 CDNF 蛋白,补肾复方高剂量组纹状体 MANF 蛋白表达均明显升高 ( $P < 0.05$ );补肾复方低、中、高剂量组之间两两比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。各组大鼠纹状体、额叶 CDNF、MANF 蛋白电泳图分别见图 1、图 2。

### 2.5 各组大鼠纹状体、额叶 CDNF、MANF mRNA 表达比较

表 4 示,与正常组比较,溶剂组大鼠纹状体、额叶 CDNF、MANF mRNA 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),模型组纹状体、额叶中 CDNF、MANF mRNA 表达均明显减少 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与模型组比较,补肾复方高剂量组纹状体 CDNF、MANF mRNA 和额叶 MANF mRNA 及补肾复方各剂

表 3 各组大鼠纹状体、额叶 CDNF、MANF 蛋白表达比较 ( $\beta$ -actin,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | 鼠数 | 纹状体                      |                          | 额叶                       |                          |
|----------|----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|          |    | CDNF                     | MANF                     | CDNF                     | MANF                     |
| 正常组      | 5  | 0.52 ± 0.04              | 0.43 ± 0.05              | 0.59 ± 0.04              | 0.66 ± 0.05              |
| 溶剂组      | 5  | 0.51 ± 0.05              | 0.43 ± 0.04              | 0.59 ± 0.03              | 0.65 ± 0.05              |
| 模型组      | 5  | 0.24 ± 0.08*             | 0.22 ± 0.07*             | 0.40 ± 0.04*             | 0.48 ± 0.03*             |
| 补肾复方低剂量组 | 5  | 0.27 ± 0.03              | 0.29 ± 0.11              | 0.46 ± 0.03              | 0.56 ± 0.05 <sup>△</sup> |
| 补肾复方中剂量组 | 5  | 0.34 ± 0.07 <sup>△</sup> | 0.28 ± 0.02              | 0.47 ± 0.03 <sup>△</sup> | 0.52 ± 0.04              |
| 补肾复方高剂量组 | 5  | 0.35 ± 0.05 <sup>△</sup> | 0.35 ± 0.02 <sup>△</sup> | 0.48 ± 0.03 <sup>△</sup> | 0.55 ± 0.06              |

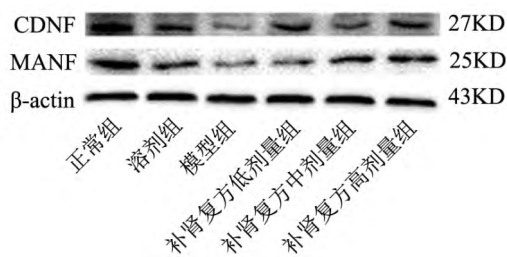
注: CDNF, 大脑多巴胺能神经营养因子; MANF, 中脑胶质细胞源性神经营养因子; 与正常组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$

表 4 各组大鼠纹状体、额叶 CDNF、MANF mRNA 表达比较 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | 鼠数 | 纹状体                      |                         | 额叶                       |                          |
|----------|----|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|          |    | CDNF                     | MANF                    | CDNF                     | MANF                     |
| 正常组      | 5  | 1.80 ± 0.90              | 1.26 ± 0.31             | 1.11 ± 0.16              | 1.02 ± 0.12              |
| 溶剂组      | 5  | 1.66 ± 0.26              | 1.41 ± 0.26             | 1.10 ± 0.09              | 0.97 ± 0.06              |
| 模型组      | 5  | 0.78 ± 0.24*             | 0.76 ± 0.21*            | 0.47 ± 0.12**            | 0.64 ± 0.02**            |
| 补肾复方低剂量组 | 5  | 1.40 ± 0.34              | 1.03 ± 0.04             | 0.92 ± 0.14 <sup>△</sup> | 0.75 ± 0.18              |
| 补肾复方中剂量组 | 5  | 1.26 ± 0.36              | 1.10 ± 0.14             | 0.86 ± 0.08 <sup>△</sup> | 0.79 ± 0.16              |
| 补肾复方高剂量组 | 5  | 1.93 ± 0.62 <sup>△</sup> | 1.32 ± 0.3 <sup>△</sup> | 0.93 ± 0.04 <sup>△</sup> | 0.90 ± 0.18 <sup>△</sup> |

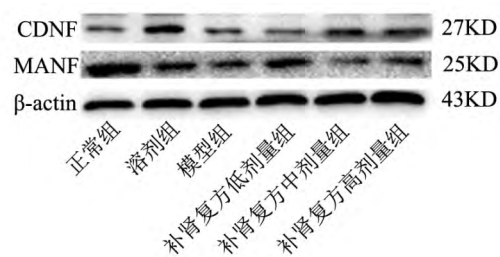
注: CDNF, 大脑多巴胺能神经营养因子; MANF, 中脑胶质细胞源性神经营养因子; 与正常组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$

量组额叶 CDNF mRNA 表达均增多 ( $P < 0.05$ ); 补肾复方低、中、高剂量组之间两两比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



注: CDNF, 大脑多巴胺能神经营养因子; MANF, 中脑胶质细胞源性神经营养因子

图 1 各组大鼠纹状体 CDNF、MANF 蛋白表达



注: CDNF, 大脑多巴胺能神经营养因子; MANF, 中脑胶质细胞源性神经营养因子

图 2 各组大鼠额叶 CDNF、MANF 蛋白表达

### 3 讨论

Braak 等<sup>[3]</sup> 研究将 PD 病理改变分为六期, 提

出 PD 的病变是由延髓向大脑皮层发展。当三、四期黑质明显受累时, 患者才出现典型的运动症状。但实际在病变早期, 患者即可出现嗅觉减退、睡眠障碍等非运动症状, 此时已有延髓、脑桥的受累; 而在疾病晚期, 患者还会并发痴呆、幻觉、认知障碍等神经精神症状, 但此时病变往往已波及额叶、新皮层等部位<sup>[4]</sup>。重视对其他脑区的研究有助于我们对 PD 的早期诊断以及对晚期神经精神症状的认知。中医理论认为, PD 虽然病位在脑, 但是病机为肾虚髓空, 可通过补益肾脏来濡养脑髓。本实验中应用的补肾复方中肉苁蓉为君药, 温补肾阳; 淫羊藿为臣药, 补肾阳、强筋骨; 制黄精为佐药, 滋阴补肾、填髓补虚; 三药联合, 共奏补肾益髓之功。

正常小鼠具有攀爬能力, 这需要适当的握力与运动协调性, 悬挂实验是常用的观察 PD 模型大鼠肢体运动协调情况的行为学检测方法<sup>[4]</sup>。本实验结果显示, 鱼藤酮造模后, 造模组大鼠出现了主动活动减少、行动困难等类似 PD 运动障碍的临床症状, 模型组大鼠悬挂实验的评分减少; 而补肾复方干预后, 补肾复方中、高剂量组大鼠悬挂实验的评分增多, 提示补肾复方中、高剂量可以改善鱼藤酮制备的 PD 模型大鼠的行为障碍。

TH 是脑内多巴胺合成的限速酶, 主要分布于脑内多巴胺能神经元, 是脑内多巴胺能神经元的蛋

白标志, TH 阳性神经元数目可反映脑内多巴胺含量及多巴胺能神经元的数量<sup>[8]</sup>。本实验中免疫组化发现, 造模后 PD 模型大鼠中脑黑质 TH 阳性细胞数明显减少, 而补肾复方干预后补肾复方中、高剂量组 TH 阳性细胞数量显著增多, 且以补肾复方高剂量组效果更明显, 反映了补肾复方对多巴胺能神经元具有保护作用。

CDNF、MANF 属于保守性多巴胺神经营养因子家族, 两者间接同源, 均定位于内质网, 能对抗内质网应激诱导的细胞凋亡, 而内质网应激导致的多巴胺能神经元的凋亡是帕金森病的重要发病机制之一, 增加 CDNF、MANF 的表达可能是治疗帕金森病的有效途径<sup>[17]</sup>。研究表明, CDNF、MANF 对帕金森病模型大鼠的多巴胺能神经元有神经保护和神经修复作用<sup>[18-19]</sup>。本实验中, 为了进一步探讨补肾中药对不同脑区神经营养因子的影响, 我们对各组大鼠额叶、纹状体的 CDNF、MANF 蛋白及 mRNA 表达水平进行测定, 结果发现补肾复方干预后 PD 模型大鼠额叶、纹状体的 CDNF、MANF 蛋白及 mRNA 表达水平增多, 提示补肾复方可能通过增加不同脑区 CDNF、MANF 的表达发挥神经保护作用, 但补肾复方低、中、高剂量组之间未见明显的剂量依赖关系。

综上, 在鱼藤酮制备的 PD 模型大鼠中, 除了中脑黑质区, 额叶和纹状体区的多巴胺能神经细胞亦存在损伤, 而补肾复方对此损伤具有保护作用, 其作用靶点可能是 CDNF 和 MANF。本研究还缺乏多时间点的选择验证, 未将神经营养因子的变化随造模和治疗时间长短的变化展现出来。今后将进一步探讨补肾复方调控 CDNF、MANF 表达的具体机制, 以期对补肾复方的临床应用提供更多的实验参考。

## 参考文献

- [1] KALIA LV, LANG AE. Parkinson's disease [J]. Lancet, 2015, 386(9996): 896-912.
- [2] LINDSTRÖM R, LINDHOLM P, PALGI M, et al. In vivo screening reveals interactions between Drosophila Manf, and genes involved in the mitochondria and the ubiquitinone synthesis pathway [J]. Bmc Genetics, 2017, 18(1): 52. doi: 10.1186/s12863-017-0509-3.
- [3] LINDHOLM P, VOUTILAINEN MH, LAURÉN J, et al. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues mid-brain dopamine neurons in vivo [J]. Nature, 2007, 448(7149): 73-77.
- [4] LIU H, YU C, YU H, et al. Cerebral dopamine neurotrophic factor protects H9c2 cardiomyocytes from apoptosis [J]. Herz, 2018, 43(4): 346-351.
- [5] 许清水, 肖绍坚, 陈少强, 等. 苁蓉精联合卡左双多巴控释片治疗早期帕金森病的疗效观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(23): 2832-2835.
- [6] WEI W, CHEN HY, FAN W, et al. Chinese medicine for idiopathic parkinson's disease: A meta analysis of randomized controlled trials [J]. Chin J Integr Med, 2017, 23(1): 55-61.
- [7] 范雯. 苁蓉精对帕金森病模型小鼠胶质细胞源性神经营养因子的影响 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2015.
- [8] XU Q, FAN W, YE SF, et al. Cistanche tubulosa protects dopaminergic neurons through regulation of apoptosis and glial cell-derived neurotrophic factor: in vivo and in vitro [J]. Front Aging Neurosci, 2016, 8: 295. doi: 10.3389/fnagi.2016.00295.
- [9] YE S, KOON HK, FAN W, et al. Effect of a traditional Chinese herbal medicine formulation on cell survival and apoptosis of MPP<sup>+</sup>-Treated MES 23.5 dopaminergic cells [J]. Parkinsons Dis, 2017, 2017: 4764212. doi: 10.1155/2017/4764212.
- [10] XU Y, LIN W, YE S, et al. Protective effects of an ancient Chinese kidney-tonifying formula against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage to MES23.5 Cells [J]. Parkinsons Dis, 2017, 2017: 2879495. doi: 10.1155/2017/2879495.
- [11] SHERER TB, KIM JH, BETARBET R, et al. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and  $\alpha$ -synuclein aggregation [J]. Exp Neurol, 2003, 179(1): 9-16.
- [12] 陈忻, 张楠, 赵晖, 等. 鱼藤酮致帕金森病大鼠行为学与黑质病理损伤的关系 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2008, 34(4): 232-234.
- [13] 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, 2002: 1861.
- [14] KHADRAWY YA, SALEM AM, EL-SHAMY KA, et al. Neuroprotective and therapeutic effect of caffeine on the rat model of parkinson's disease induced by rotenone [J]. J Diet Suppl, 2017, 14(5): 553-572.
- [15] BRAAK H, TREDICI KD, RÜB U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease [J]. Neurobiol Aging, 2003, 24(2): 197-211.
- [16] KHADRAW YA, SALEM AM, EL-SHAMY KA, et al. Neuroprotective and therapeutic effect of caffeine on the rat model of parkinson's disease induced by rotenone [J]. J Diet Suppl, 2017, 14(5): 553-572.
- [17] LINDAHL M, SAARMA M, LINDHOLM P. Unconventional neurotrophic factors CDNF and MANF: structure,

physiological functions and therapeutic potential [J].

Neurobiol Dis, 2016, 97 ( Pt B ): 90-102.

- [8] HAO F, YANG C, CHEN SS, et al. Long-term protective effects of AAV9-Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor gene transfer in parkinsonian rats [J]. Exp Neurol, 2017, 291: 120-133. doi: 10. 1016/j.

expneurol. 2017. 01. 008.

- [9] HUOTARINEN A, PENTTINEN AM, BÄCK S, et al. Combination of CDNF and deep brain stimulation decreases neurological deficits in late-stage model parkinson's disease [J]. Neuroscience, 2018, 374: 250-263. doi: 10. 1016/j. neuroscience. 2018. 01. 052.

## Effects of Nourishing-Kidney Formula on Neurotrophic Factors in Different Brain Regions of Parkinson's Disease Model Rats

LIN Yao<sup>1</sup>, YANG Shasha<sup>2</sup>, LIU Ting<sup>2</sup>, ZHONG Jianan<sup>2</sup>, XU Qian<sup>1</sup>, HUANG Lufen<sup>1</sup>, YUAN Mingzhou<sup>1</sup>, LIN Youning<sup>3</sup>, XIAO Shaojian<sup>3</sup>, CAI Jing<sup>1</sup>

(1. College of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122; 2. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine; 3. Third People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine)

**ABSTRACT Objective** To investigate the possible action mechanism of Nourishing-Kidney Formula in the treatment of Parkinson's disease (PD). **Methods** A total of 40 male Sprague-Dawley rats were injected with subcutaneous injection of rotenone sunflower oil emulsion to establish a PD rat model. They were randomly divided into low, medium and high doses of Nourishing-Kidney Formula (40, 80, 160 mg/kg Nourishing-Kidney Formula decoction) and a model group (equal volume saline by gavage), with 10 rats in each group. There were also 10 rats in the normal group and the solvent group (equal volume saline by gavage). The suspension experiment was performed on the 14th day of intragastric administration; the number of black tyrosine hydroxylase (TH) positive cells was detected by immunohistochemistry, and the striatum, frontal lobe dopaminergic neurotrophic factor (CDNF) and midbrain glial cell-derived neurotrophic factor (MANF) protein were detected by Western Blot. RT-PCR was used to detect the expression of CDFN and MANF mRNA in striatum and frontal lobe. **Results** Compared with the model group, the suspension test scores in the middle and high dose groups of Nourishing-Kidney Formula increased, and the number of TH cells in the substantia nigra increased. The CDFN protein expression in the striatum and frontal striatum, and the MANF protein and mRNA levels in the striatum of the high-dose Nourishing-Kidney Formula group, the levels of CDFN mRNA in the striatum and the expression of MANF mRNA in the frontal lobe were also significantly increased. The expression of CDFN mRNA in the frontal lobe of each group was increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Nourishing-Kidney Formula can improve the behavioral disorder of Parkinson's disease and protect the dopaminergic neurons of striatum and frontal lobe. The protective effect may be achieved by correcting the expression of CDFN and MANF in different brain regions, and it is better to use high dose.

**Keywords** Parkinson's disease; Nourishing-Kidney Formula; striatum; frontal lobes; neurotrophic factors

(收稿日期: 2018-12-04; 修回日期: 2019-06-21)

编辑: 王利菊

## 欢迎关注《中医杂志》微信公众号

欢迎关注《中医杂志》微信公众号。我们会根据每期杂志中报道的内容,结合中医药领域的热点问题与人物,针对大家感兴趣的研究动态、医药资讯、专家团队、名医经验、临床心得、学术活动等进行推送。大家可以在文后留言,发表您的看法和观点。编辑部会将优秀回复推送进行展示,方便各位读者以公众号为桥梁,进行深入地学术交流与讨论。公众号中会提前发布每期杂志的目录,欢迎大家回复把您感兴趣的内容告诉我们。我们会根据大家的意见,选择相应内容进行重点介绍。此外,我们还会将编辑们处理稿件过程中的体会、经验介绍给大家,方便各位作者处理论文撰写、投稿、修改中存在的问题,拉近我们与广大读者、作者之间的距离。

扫一扫 关注

