

本文引用:孙冰,徐玉英.氧化苦参碱对帕金森小鼠中枢神经系统氧化应激的影响[J].新乡医学院学报,2020,37(6):509-516. DOI:10.7683/xyxyxb.2020.06.002.

【基础研究】

氧化苦参碱对帕金森小鼠中枢神经系统氧化应激的影响

孙 冰¹, 徐玉英²

(1. 洛阳市第三人民医院神经内科,河南 洛阳 471002;2. 河南中医药大学基础医学院,河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 探讨氧化苦参碱对帕金森小鼠中枢神经系统氧化应激的影响及其可能机制。**方法** 将 80 只 C57BL/6 小鼠随机分为正常组、模型组及氧化苦参碱低、高剂量组,每组 20 只。模型组及氧化苦参碱低、高剂量组小鼠分别给予 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)30 mg·kg⁻¹ 溶于 0.6 mL 生理盐水腹腔注射建立帕金森病小鼠模型,正常组小鼠腹腔注射生理盐水 0.6 mL,每日 1 次,连续 7 d。动物模型制备成功后,氧化苦参碱低、高剂量组小鼠分别给予氧化苦参碱 150、250 mg·kg⁻¹ 溶于 0.2 mL 生理盐水中腹腔注射,正常组、模型组小鼠分别给予 0.2 mL 生理盐水腹腔注射,均每日 1 次,连续 27 d。小鼠处死前每日测体质量。分别于末次注射 MPTP 后的第 1、7、27 天采用旷场实验测量各组小鼠水平运动距离。末次注射 MPTP 后的第 27 天处死小鼠取脑组织,苏木精-伊红染色观察 4 组小鼠脑组织黑质纹状体处神经元损伤情况;比色法检测 4 组小鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及丙二醛(MDA)含量,末端脱氧核苷酸介导的 dUTP 缺口末端标记测定法检测 4 组小鼠脑组织细胞凋亡情况,Western blot 法检测 4 组小鼠脑组织中 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Keap1)、核因子红细胞系-2 相关因子 2(Nrf2)、抗氧化反应元件(ARE)蛋白表达。**结果** 造模前,4 组小鼠体质量比较差异无统计学意义($F=0.214, P>0.05$);造模后 5、9、13、17、21、27 d,4 组小鼠体质量比较差异均有统计学意义($F=1.057、1.087、1.344、5.374、3.582、6.274, P>0.05$),其中模型组及氧化苦参碱低、高剂量组小鼠体质量均低于正常组($P<0.05$),氧化苦参碱低剂量组小鼠体质量高于模型组($P>0.05$);氧化苦参碱高剂量组小鼠造模后第 17、21、27 天的体质量与模型组比较显著增高($P<0.05$);氧化苦参碱高剂量组小鼠造模后第 27 天的体质量高于低剂量组($P<0.05$)。末次注射 MPTP 后第 1 天起,模型组小鼠水平运动距离即显著短于正常组($P<0.05$);第 1、7 天时,氧化苦参碱低、高剂量组小鼠水平运动距离与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$);第 27 天时,氧化苦参碱低、高剂量组小鼠的水平运动距离大于模型组($P<0.05$);末次注射 MPTP 后第 1、7、27 天,氧化苦参碱高剂量组小鼠水平运动距离与低剂量组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。末次注射 MPTP 后第 27 天,模型组及氧化苦参碱低、高剂量组小鼠脑组织细胞损伤率高于正常组($P<0.05$);氧化苦参碱低、高剂量组小鼠脑组织细胞损伤率低于模型组($P<0.05$);氧化苦参碱高剂量组小鼠脑组织细胞损伤率低于氧化苦参碱低剂量组($P<0.05$)。4 组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH、MDA 相对表达量比较差异均有统计学意义($F=11.374、10.925、6.688、9.346, P<0.05$)。与正常组比较,模型组及氧化苦参碱低、高剂量组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH 含量显著降低,MDA 含量显著增高($P<0.05$);氧化苦参碱低剂量组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH、MDA 相对表达量与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$);氧化苦参碱高剂量组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH 相对表达量显著高于模型组和低剂量组($P<0.05$),MDA 相对表达量显著低于模型组和低剂量组($P<0.05$)。与正常组比较,模型组、氧化苦参碱低、高剂量组小鼠脑组织细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与模型组比较,氧化苦参碱低、高剂量组小鼠脑组织细胞凋亡率显著减少($P<0.05$);与氧化苦参碱低剂量组比较,高剂量组小鼠脑组织细胞凋亡率显著减少($P<0.05$)。4 组小鼠脑组织 Keap1、Nrf2、ARE 蛋白表达比较差异均有统计学意义($F=10.954、8.241、10.699, P<0.05$)。与正常组比较,模型组及氧化苦参碱低、高剂量组小鼠脑组织中 Keap1 蛋白相对表达量显著降低,Nrf2、ARE 蛋白相对表达量显著升高($P<0.05$);氧化苦参碱低剂量组小鼠脑组织中 Keap1、ARE、Nrf2 蛋白相对表达量与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组和氧化苦参碱低剂量组比较,氧化苦参碱高剂量组小鼠脑组织中 Keap1 蛋白相对表达量显著降低,Nrf2、ARE 蛋白相对表达量显著升高($P<0.05$)。**结论** 氧化苦参碱能有效抑制帕金森小鼠中枢神经系统氧化应激反应,该作用可能是通过激活 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路活性发生的。

关键词: 氧化苦参碱;帕金森病;氧化应激;Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1/核因子红细胞系-2 相关因子 2/抗氧化反应元件信号通路

中图分类号: R741 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2020)06-0509-08

Effects of oxymatrine on oxidative stress of central nervous system in Parkinson mice

SUN Bing¹, XU Yuying²

(1. Department of Neurology, the Third People's Hospital of Luoyang, Luoyang 471002, Henan Province, China; 2. School of Basic Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of oxymatrine on oxidative stress of central nervous system in Parkinson mice and its possible mechanism. **Methods** Eighty C57BL/6 mice were randomly divided into normal group, model group, low-dose oxymatrine group and high-dose oxymatrine group, with 20 mice in each group. The mice in the model group and the low-dose and high-dose oxymatrine groups were injected intraperitoneally with $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) which was dissolved in 0.6 mL of normal saline, and the mice in the normal group were intraperitoneally injected with 0.6 mL of normal saline; once a day for 7 consecutive days. The body weight of mice in the four groups was measured daily before execution. The horizontal movement distances of mice in the four groups were measured by open field experiment on the 1st, 7th, and 27th day after the last injection of MPTP. On the 27th day after the last injection of MPTP, the mice were sacrificed and the brain tissues were taken. The neuronal damage in the nigrostriatal tissues of mice in the four groups was observed by hematoxylin eosin (HE) staining. The oxidative stress indexes of superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) content in brain tissue of mice in the four groups were detected by colorimetry; the apoptosis of brain tissue of mice in the four groups was detected by terminal dextranucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling; the expressions of Kelch-like epichlorohydrin-related protein 1 (Keap1), nuclear factor erythrocyte line-2 related factor 2 (Nrf2) and anti-oxidation response element (ARE) protein in brain tissue of mice in the four groups were detected by Western blot. **Results** There was no significant difference in body weight among the four groups before modeling ($F=0.214, P>0.05$). There was significant difference in the body weight among the four groups at 5, 9, 13, 17, 21, 27 days after modeling ($F=1.057, 1.087, 1.344, 5.374, 3.582, 6.274; P>0.05$). The body weight of mice in the model group, the low-dose oxymatrine group and high-dose oxymatrine group was lower than that in the normal group ($P<0.05$); there was no statistic difference in the body weight of mice between the low-dose oxymatrine group and the model group ($P>0.05$); the body weight of mice in the high-dose oxymatrine group was significantly higher than that in the model group at the 17th, 21th, 27th day after the last injection of MPTP ($P<0.05$); the body weight of mice in the high-dose oxymatrine group was significantly higher than that in the low-dose oxymatrine group at the 27th day after modeling ($P<0.05$). The horizontal movement distance of mice in the model group was significantly shorter than that in the normal group at the first day after the last injection of MPTP ($P<0.05$). There was no statistically significant difference in the horizontal movement distance of mice between the low-dose oxymatrine group, the high-dose oxymatrine group and model group at the 1st, 7th day after the last injection of MPTP ($P>0.05$); the horizontal movement distance of mice in the low- and high-dose oxymatrine group was longer than that in the model group at the 27th day after the last injection of MPTP ($P<0.05$); there was no statistically significant difference in the horizontal movement distance of mice between the high-dose oxymatrine group and the low-dose oxymatrine group at 1st, 7th, 27th day after the last injection of MPTP ($P>0.05$). The damage rate of brain tissue cells of mice in the model group, the low-dose oxymatrine group and high-dose oxymatrine group was higher than that in the normal group at the 27th day after the last injection of MPTP ($P<0.05$); the damage rate of brain tissue cells of mice in the low-dose oxymatrine group and high-dose oxymatrine group was lower than that in the model group ($P<0.05$); the damage rate of brain tissue cells of mice in the high-dose oxymatrine group was lower than that in the low-dose oxymatrine group ($P<0.05$). There was statistic difference in the relative expression of SOD, GSH-Px, GSH and MDA in the brain tissues of mice among the four groups ($F=11.374, 10.925, 6.688, 9.346; P<0.05$). Compared with the normal group, the relative expression of SOD, GSH-Px and GSH in the brain tissue of mice in the model group, low-dose oxymatrine group and high-dose oxymatrine group were lower, and the relative expression of MDA was higher ($P<0.05$). There was no statistic difference in the relative expression of SOD, GSH-Px, GSH and MDA in the brain tissues of mice between the low-dose oxymatrine group and the model group ($P>0.05$); the relative expression of SOD, GSH-Px and GSH in the brain tissue of mice in the high-dose oxymatrine group was significantly higher than that in the model group and low-dose oxymatrine group, while the MDA relative expression was significantly lower than that in the model group and low-dose oxymatrine group ($P<0.05$). The apoptosis rate of brain tissue of mice in the model group, low-dose oxymatrine group and high-dose oxymatrine group was significantly higher than that in the normal group ($P<0.05$); the apoptosis rate of brain tissue of mice in the low-dose oxymatrine group and high-dose oxymatrine group was significantly lower than that in the model group ($P<0.05$); compared with the low-dose oxymatrine group, the apoptosis rate of brain tissue of mice in the high-dose oxymatrine group was significantly lower than that in the

low-dose oxymatrine group ($P < 0.05$). There was statistic difference in the relative expression of Keap1, Nrf2 and ARE protein among the four groups ($F = 10.954, 8.241, 10.699; P < 0.05$). Compared with the normal group, the relative expression of Keap1 protein in the brain tissue of mice in the model group, low-dose oxymatrine group and high-dose oxymatrine group was significantly lower, while the relative expression of Nrf2 and ARE protein was significantly higher ($P < 0.05$); there was no statistic difference in the relative expression of Keap1, Nrf2 and ARE protein in the brain tissue of mice between the low-dose oxymatrine group and the model group ($P > 0.05$); compared with the model group and low-dose oxymatrine group, the relative expression of Keap1 protein in the brain tissue of mice in the high-dose oxymatrine group was significantly lower, and the relative expression of Nrf2, ARE protein was significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** Oxymatrine can effectively inhibit the oxidative stress response in the central nervous system of Parkinson mice, which may occur by activating the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway activity.

Key words: oxymatrine; Parkinson disease; oxidative stress; Kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear factor erythroid-2 related factor 2/antioxidant responsive element signaling pathway

帕金森病 (Parkinson disease, PD) 又称震颤麻痹, 是常见的神经系统变性疾病, 多发病于中老年阶段, 临床表现为运动功能障碍、静止性震颤、肌肉强直以及姿势异常等^[1]。随着我国社会老年化, PD 的发病率呈逐年上升趋势, 该疾病症状严重, 病程长, 治愈率低, 给患者和家属造成很大的心理、身体和经济负担^[2]。PD 的发病机制尚未完全清楚, 但有研究发现其与线粒体功能障碍、老化、氧化应激 (oxidative stress, OS) 及炎症等造成的细胞凋亡有关^[3]。OS 是指机体受到刺激后产生大量活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS), 氧化物的清除速度远低于产生速度, 导致 ROS 在体内蓄积, 从而引起组织损伤的过程^[4]。研究表明, Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)/核因子红细胞系-2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件 (antioxidant responsive element, ARE) 信号通路是调控细胞内 OS 反应的重要通路之一^[5-6]。氧化苦参碱又称苦参素, 是植物苦参根茎中生物碱的主要有效成分, 有抗炎、镇静催眠、抗肿瘤、抗氧化等广泛的药理活性, 且其不良反应小^[7]。有研究发现, 氧化苦参碱能通过增强谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 的活性改变细胞内的 OS, 从而减轻组织损伤^[8], 但目前尚未不明确氧化苦参碱能否通过调控 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路发挥抗氧化作用。因此, 本研究通过建立帕金森小鼠模型, 探讨氧化苦参碱对帕金森小鼠中枢神经系统 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8 周龄无特定病原体级雄性 C57BL/6 小鼠 80 只, 体质量 18 ~ 23 g, 购自北京

维通利华实验动物技术有限公司, 小鼠批号: SCXK (京)20130001, 质量合格证号: 11400700139332。实验前于温度 20 ~ 25 ℃、湿度 60% ~ 70% 的环境中适应饲养 1 周, 每日更换垫料、饲料、饮水, 自由饮食, 然后将 80 只小鼠随机分为正常组、模型组及氧化苦参碱低、高剂量组, 每组 20 只。

1.2 主要试剂与仪器 氧化苦参碱购自江苏正大天晴药业集团有限公司, 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP) 购自美国 Sigma 公司, 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染液购自北京索莱宝科技有限公司, GSH-Px、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定法 [terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL] 试剂盒购自美国 Roche 公司, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量分析试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司, 兔单克隆抗体 Keap1、Nrf2、ARE、内参磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 购自美国 Abcam 公司, 放射性免疫沉淀法 (radio-immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司, PL-1002E 电子天平购自瑞士 Mettler Toledo 公司, 760CRT 双光束紫外可见分光光度计购自杭州汇尔仪器设备有限公司, 5415R 高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司, Mini-PROTEAN Tetra 小型垂直电泳槽和小型转印槽购自美国 Bio-rad 公司, 石蜡切片机、石蜡包埋机、脱水机购自德国 Leica 公司, CKX53 普通显微镜购自日本 Olympus 公司, CMax Plus CMax Plus 酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物模型制备 模型组及氧化苦参碱低、高剂量组小鼠分别给予 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 MPTP 溶于 0.6 mL 生理盐水中腹腔注射,每日 1 次,连续 7 d;正常组小鼠腹腔注射生理盐水 0.6 mL ,每日 1 次,连续 7 d。给予 MPTP 7 d 后,出现明显震颤、竖毛、易激怒、尾僵及过伸、肢体及躯干僵直、活动迟缓及动作减少等异常表现者为帕金森小鼠模型制备成功。动物模型建立后,氧化苦参碱低、高剂量组小鼠分别给予氧化苦参碱 150 、 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 溶于 0.2 mL 生理盐水中腹腔注射,正常组、模型组小鼠每只分别给予 0.2 mL 生理盐水腹腔注射,均每日 1 次,连续 27 d。

1.3.2 4 组小鼠体质量测定 从造模前开始直至小鼠处死前,每日清晨 9:00 进行腹腔注射以前采用电子天平称量 4 组小鼠的体质量。

1.3.3 旷场实验测定 4 组小鼠的水平运动距离 分别于末次注射 MPTP 后的第 1、7、27 天,采用旷场实验测定 4 组小鼠的水平运动距离:将不透明钢板制成的旷场($100 \text{ cm} \times 100 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$)置于暗室,将小鼠置于旷场中心自由活动 10 min ,使用 HDR-CX450 摄像机进行全程拍摄,用 Smart version 2.5 软件(上海欣软科技有限公司)跟踪记录小鼠 10 min 内的行径,计算小鼠运动总路程。

1.3.4 小鼠脑组织取材 末次注射 MPTP 后的第 27 天,用 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊巴比妥钠($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉小鼠,将小鼠置于仰卧位,用预冷的生理盐水进行心脏灌注,直至肝脏变成土黄色,取出大脑,将左侧大脑在 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛溶液中固定 24 h ,采用梯度乙醇(体积分数 70%、80%、90%、95%、100%)脱水,二甲苯固定,石蜡包埋;右侧大脑保存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.3.5 HE 染色观察 4 组小鼠脑组织细胞损伤情况 将 4 组小鼠的大脑蜡块切成层厚 $5 \mu\text{m}$ 的石蜡切片,经二甲苯脱蜡,梯度乙醇(体积分数 100%、90%、85%、70%)水化,自来水冲洗 2 次,每次 20 s ,放入苏木精染液浸泡 5 min ,自来水洗 5 min ,置于体积分数 1% 盐酸乙醇 10 s ,自来水冲洗 5 min ,置于伊红染液浸泡 5 min ,自来水冲洗 20 min ,梯度乙醇(体积分数 70%、80%、90%、95%、100%)和二甲苯脱水,中性树脂封片。用 CKX53 普通显微镜观察脑组织黑质纹状体处神经元,出现核固缩者为神经元受损,计数每个视野中的神经元总数和受损神经元

数,细胞损伤率 = 受损神经元数/神经元总数 $\times 100\%$ 。检测 3 个视野,取均值。

1.3.6 比色法检测 4 组小鼠脑组织中 SOD、GSH、GSH-Px、MDA 含量 分别取 4 组小鼠右侧脑组织 0.2 g ,加入 1 mL RIPA 裂解液,在冰盒上用玻璃匀浆器研磨, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min ,取上清液提取总蛋白。用比色法按照试剂盒的步骤使用 CMax Plus CMax Plus 酶标仪分别在 450 、 420 、 412 、 532 nm 波长处测定脑组织匀浆吸光度值,计算 SOD、GSH、GSH-Px 及 MDA 含量。蛋白相对表达量 = [(测定组吸光度值-对照组吸光度值)/(标准组吸光度值-空白组吸光度值)] \times 标准品浓度/待测样本蛋白浓度。实验重复 3 次,取均值。

1.3.7 TUNEL 染色测定 4 组小鼠脑组织中细胞凋亡情况 将 4 组小鼠大脑蜡块制成层厚 $5 \mu\text{m}$ 的石蜡切片,按照说明书要求进行 TUNEL 染色法检测,显微镜下观察染色情况,每张切片随机选取 5 个视野,以出现黄褐色颗粒细胞为 TUNEL 阳性细胞,即凋亡细胞,蓝色细胞为正常细胞,细胞凋亡率 = 凋亡细胞/正常细胞 $\times 100\%$ 。观察 5 个视野,取均值。

1.3.8 Western blot 法检测 4 组小鼠脑组织中 Keap1、Nrf2、ARE 蛋白表达 取 60 mg 冻存脑组织,加入 $600 \mu\text{L}$ 裂解液,在冰浴条件下研磨 2 min ,静置 30 min , $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min ,取 $10 \mu\text{L}$ 上清,按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行操作,用 CMax Plus CMax Plus 酶标仪测定总蛋白浓度。将其余上清液加等量 $5 \times$ Loading buffer, $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴煮 10 min ,自然冷却后置于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。取 $20 \mu\text{g}$ 样品与上样缓冲液混合,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(100 V 、 80 min),电转至硝酸纤维素膜(300 mA 、 50 min),加入封闭液室温孵育 2 h ,洗膜后,加入一抗 Keap1 ($1:500$)、Nrf2 ($1:500$)、ARE ($1:500$) 和 GAPDH ($1:2\,000$), $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜,洗膜后加入相应的山羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗($1:2\,000$),室温孵育 1 h ,每张膜上加入 $200 \mu\text{L}$ 显色液,暗室中曝光显影,应用凝胶成像系统扫描拍照,采用 Image J 软件分析各条带的灰度值,以待测蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值表示蛋白相对表达量。实验重复 3 次,取均值。

1.4 统计学处理 应用 SPSS21.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组小鼠体质量比较 结果见表 1。造模前,4 组小鼠体质量比较差异无统计学意义($F = 0.214$, $P > 0.05$)。造模后 5、9、13、17、21、27 d,4 组小鼠体质量比较差异均有统计学意义($F = 1.057$ 、 1.087 、 1.344 、 5.374 、 3.582 、 6.274 , $P > 0.05$);其中模型组及表 1 4 组小鼠体质量比较

Tab.1 Comparison of body weight of mice among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量/g						
		造模前	第 5 天	第 9 天	第 13 天	第 17 天	第 21 天	第 27 天
正常组	20	20.16 ± 0.92	20.59 ± 0.36	21.13 ± 0.51	21.91 ± 0.54	22.51 ± 0.38	23.18 ± 0.76	23.61 ± 0.52
模型组	20	20.03 ± 0.21	18.13 ± 0.42 ^a	17.72 ± 0.32 ^a	18.16 ± 0.89 ^a	18.67 ± 0.62 ^a	19.17 ± 0.77 ^a	19.31 ± 0.59 ^a
氧化苦参碱低剂量组	20	20.28 ± 0.74	17.94 ± 0.42 ^a	18.09 ± 0.78 ^a	18.36 ± 0.37 ^a	19.83 ± 0.35 ^a	20.12 ± 0.24 ^a	20.12 ± 0.49 ^a
氧化苦参碱高剂量组	20	20.03 ± 0.67	18.23 ± 0.87 ^a	18.65 ± 0.44 ^a	19.13 ± 0.98 ^a	20.77 ± 0.21 ^{ab}	21.21 ± 0.26 ^{ab}	21.76 ± 0.37 ^{abc}
F		0.214	1.057	1.087	1.344	5.374	3.582	6.274
P		>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与正常组比较^a $P < 0.05$;与模型组比较^b $P < 0.05$;与低剂量组比较^c $P < 0.05$ 。

2.2 4 组小鼠旷场实验水平运动距离比较 结果见表 2。末次注射 MPTP 后第 1 天起,模型组小鼠水平运动距离即显著短于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。末次注射 MPTP 后第 1、7 天,氧化苦参碱低、高剂量组小鼠的水平运动距离与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);末次注射 MPTP 后第 27 天,氧化苦参碱低、高剂量组小鼠的水平运动距离大于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。末次注射 MPTP 后第 1、7、27 天,氧化苦参碱高剂量组小鼠的水平运动距离与低剂量组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 4 组小鼠水平运动距离比较

Tab.2 Comparison of horizontal movement distance of mice among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

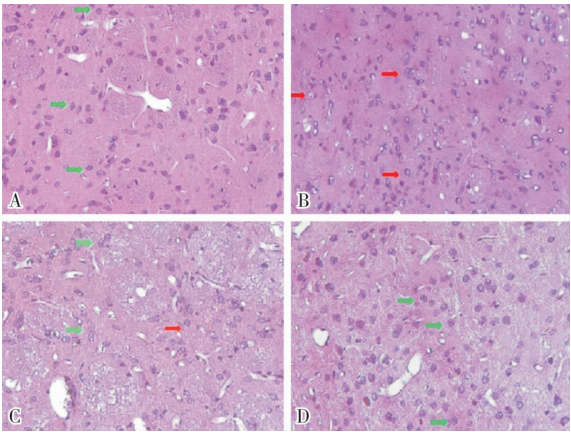
组别	n	水平运动距离/m		
		第 1 天	第 7 天	第 27 天
正常组	20	41.13 ± 6.49	40.26 ± 3.01	42.31 ± 12.21
模型组	20	32.29 ± 5.21 ^a	34.31 ± 0.89 ^a	26.51 ± 2.63 ^a
氧化苦参碱低剂量组	20	37.25 ± 7.96	36.64 ± 5.98	35.31 ± 7.39 ^{ab}
氧化苦参碱高剂量组	20	39.62 ± 13.07	37.83 ± 5.86	38.75 ± 6.48 ^b
F		6.245	3.041	4.849
P		<0.05	<0.05	<0.05

注:与正常组比较^a $P < 0.05$;与模型组比较^b $P < 0.05$ 。

2.3 4 组小鼠脑组织细胞损伤率比较 结果见图 1。正常组、模型组及氧化苦参碱低、高剂量组小鼠脑组织中细胞损伤率分别为(25.75 ± 1.11)%、(66.75 ± 1.03)%、(48.75 ± 0.95)%、(32.00 ± 0.91)%。模型组及氧化苦参碱低、高剂量组小鼠脑组织细胞损伤率高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$);氧化苦

氧化苦参碱低、高剂量组小鼠体质量均低于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$);氧化苦参碱低剂量组小鼠体质量与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);氧化苦参碱高剂量组小鼠造模后第 17、21、27 天的体质量显著高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);氧化苦参碱高剂量组小鼠造模后第 27 天的体质量显著高于低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

参碱低、高剂量组小鼠脑组织细胞损伤率低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);氧化苦参碱高剂量组小鼠脑组织细胞损伤率低于氧化苦参碱低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A:正常组;B:模型组;C:氧化苦参碱低剂量组;D:氧化苦参碱高剂量组;红色箭头所示为损伤细胞,绿色箭头所示为正常细胞。

图 1 4 组小鼠脑组织细胞损伤情况 (HE 染色, × 400)

Fig.1 Injury of brain tissue cells of mice in the four groups (HE staining, × 400)

2.4 4 组小鼠脑组织 SOD、GSH-Px、GSH、MDA 含量比较 结果见表 3。4 组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH、MDA 含量比较差异均有统计学意义($F = 11.374$ 、 10.925 、 6.688 、 9.346 , $P < 0.05$)。与正常组比较,模型组及氧化苦参碱低、高剂量组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH 含量显著降低,MDA 含量显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。氧

化苦参碱低剂量组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH、MDA 含量与模型组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);氧化苦参碱高剂量组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH 含量显著高于模型组,MDA 含量

显著低于模型组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。氧化苦参碱高剂量组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH 含量显著高于低剂量组,MDA 含量显著低于低剂量组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

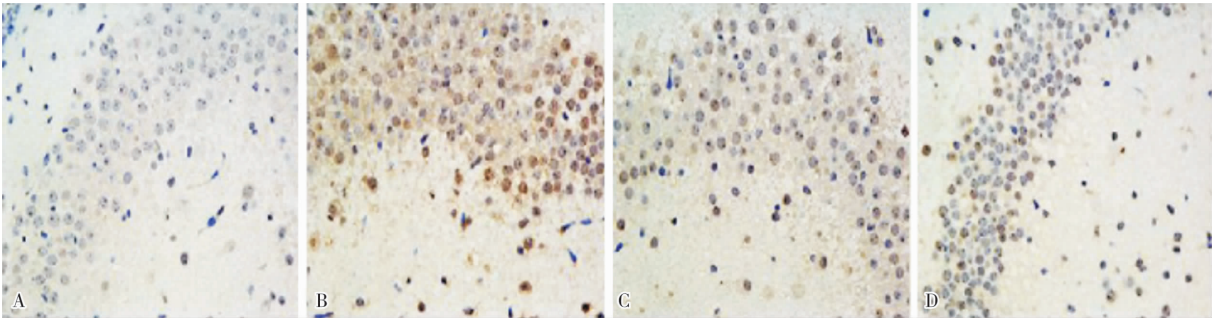
表 3 4 组小鼠脑组织中 SOD、GSH、GSH-Px、MDA 含量比较

Tab.3 Comparison of SOD, GSH, GSH-Px and MDA contents in brain tissue of mice among the four groups ($\bar{x} \pm s$)					
组别	<i>n</i>	SOD	GSH-PX	GSH	MDA
正常组	20	27.59 ± 3.09	161.28 ± 12.09	18.11 ± 2.66	36.89 ± 4.11
模型组	20	16.42 ± 2.87 ^a	121.36 ± 10.27 ^a	9.23 ± 1.36 ^a	48.31 ± 5.54 ^a
氧化苦参碱低剂量组	20	18.23 ± 2.11 ^a	140.21 ± 9.19 ^a	11.28 ± 2.01 ^a	42.25 ± 5.89 ^a
氧化苦参碱高剂量组	20	23.38 ± 3.01 ^{abc}	153.31 ± 2.08 ^{abc}	15.67 ± 3.09 ^{abc}	38.09 ± 4.69 ^{abc}
<i>F</i>		11.374	10.925	6.688	9.346
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与正常组比较^a $P<0.05$;与模型组比较^b $P<0.05$;与低剂量组比较^c $P<0.05$ 。

2.5 4 组小鼠脑组织中细胞凋亡情况比较 结果见图 2。正常组、模型组、氧化苦参碱低、高剂量组小鼠脑组织中细胞凋亡率分别为 (18.75 ± 1.49)%、(82.00 ± 1.87)%、(54.00 ± 1.68)%、(39.00 ± 0.91)%。与正常组比较,模型组、氧化苦参碱低、高剂量组细胞

凋亡率显著升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比较,氧化苦参碱低、高剂量组细胞凋亡率显著减少,差异有统计学意义 ($P<0.05$);与氧化苦参碱低剂量组比较,氧化苦参碱高剂量组细胞凋亡率显著减少,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

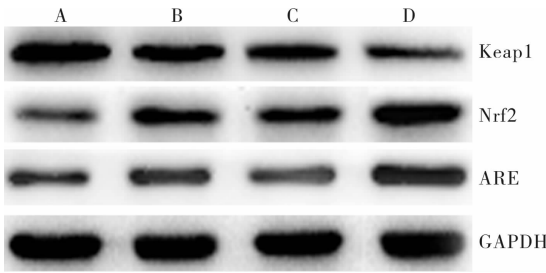


A: 正常组;B: 模型组;C: 氧化苦参碱低剂量组;D: 氧化苦参碱高剂量组。

图 2 4 组小鼠脑组织细胞凋亡情况 (TUNEL 染色, ×400)

Fig.2 Apoptosis of brain tissue of mice in the four groups (TUNEL staining, ×400)

2.6 4 组小鼠脑组织中 Keap1、Nrf2、ARE 蛋白相对表达量比较 结果见图 3、表 4。4 组小鼠脑组织中 Keap1、Nrf2、ARE 蛋白相对表达量比较差异均有统计学意义 ($F=10.954, 8.241, 10.699, P<0.05$)。与正常组比较,模型组及氧化苦参碱低、高剂量组小鼠脑组织中 Keap1 蛋白相对表达量显著降低,Nrf2、ARE 蛋白相对表达量显著升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。氧化苦参碱低剂量组小鼠脑组织中 Keap1、ARE、Nrf2 蛋白相对表达量与模型组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与模型组和氧化苦参碱低剂量组比较,氧化苦参碱高剂量组小鼠脑组织中 Keap1 蛋白相对表达量显著降低,Nrf2、ARE 蛋白相对表达量显著升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。



A: 正常组;B: 模型组;C: 氧化苦参碱低剂量组;D: 氧化苦参碱高剂量组。

图 3 4 组小鼠脑组织中 Keap1、Nrf2、ARE 蛋白表达 (Western blot)

Fig.3 Expression of Keap1, Nrf2 and ARE protein in brain tissue of mice in four groups (Western blot)

表 4 4 组小鼠脑组织中 Keap1、Nrf2、ARE 蛋白相对表达量比较

Tab. 4 Comparison of relative expression of Keap1, Nrf2 and ARE proteins in brain tissues of mice among the four groups

($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	Keap1	Nrf2	ARE
正常组	20	0.868 ± 0.102	0.298 ± 0.021	0.238 ± 0.013
模型组	20	0.608 ± 0.089 ^a	0.631 ± 0.109 ^a	0.409 ± 0.089 ^a
氧化苦参碱低剂量组	20	0.586 ± 0.084 ^a	0.661 ± 0.101 ^a	0.397 ± 0.029 ^a
氧化苦参碱高剂量组	20	0.280 ± 0.031 ^{abc}	0.909 ± 0.158 ^{abc}	0.896 ± 0.035 ^{abc}
F		10.954	8.241	10.699
P		<0.05	<0.05	<0.05

注:与正常组比较^a*P* < 0.05;与模型组比较^b*P* < 0.05;与低剂量组比较^c*P* < 0.05。

3 讨论

PD 为多发于中老年人的神经系统退行性疾病,其主要病理特征是脑多巴胺能神经元凋亡、变性以及在细胞质中生成路易小体^[9]。OS、线粒体功能障碍被认为是导致神经系统变性疾病和衰老的重要因素之一,与 PD 多方面的病理机制均有联系^[10]。目前尚无治疗 PD 的特效药物,其治疗措施主要从延缓病情、减轻痛苦、提高生活质量等方面入手^[11]。氧化苦参碱因其抗炎、镇静催眠、抗肿瘤、抗氧化、不良反应小等特点,成为研究较热的中药单体之一^[12]。研究发现,氧化苦参碱具有抑制慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区神经元凋亡的作用,其机制可能与其调节凋亡相关蛋白表达以及提高氧自由基清除能力、抑制炎症反应有关^[13]。另有研究发现,氧化苦参碱通过抑制脑组织细胞凋亡而对新生大鼠缺血缺氧脑损伤具有保护作用^[14]。以上结果提示,氧化苦参碱有缓解脑组织细胞凋亡的潜力。基于以上理论基础,本研究检测了氧化苦参碱对帕金森大鼠脑组织损伤及脑组织内细胞凋亡的影响,结果表明,与正常组比较,模型组小鼠大脑纹状体出现广泛的核固缩、神经细胞损伤和大量细胞凋亡,表明 PD 对中枢神经细胞造成损伤;与模型组比较,氧化苦参碱低、高剂量组细胞凋亡率显著降低,说明氧化苦参碱能够保护脑组织中的神经细胞免于凋亡和损伤;与氧化苦参碱低剂量组比较,高剂量组细胞凋亡率显著降低,说明氧化苦参碱的神经细胞保护作用具有剂量依赖性。

目前,越来越多的研究证实,神经元细胞凋亡和 OS 引起的细胞损伤是 PD 的重要机制。帕金森小

鼠脑组织中 OS 反应产生的过量活性氧导致中枢神经细胞凋亡,继而引发中枢神经退行性病变^[15]。研究发现,氧化苦参碱可以上调氧化还原平衡中的关键调节因子 Nrf2 以及血红素氧合酶-1 (heme oxygenase 1, HO-1) 表达,从而减轻 ROS 对肺动脉造成的氧化损伤^[16],提示氧化苦参碱具有显著的抗氧化作用。本研究探讨了氧化苦参碱对帕金森小鼠脑组织细胞凋亡的影响及其可能存在的作用机制,为 PD 的临床治疗寻找新的治疗药物。ROS 作为一种诱导机体产生 OS 的主要物质,其含量变化反映了机体的 OS 水平。MDA 是一种脂质过氧化产物,是通过 ROS 破坏细胞膜上的不饱和脂肪酸形成的,其含量显著升高表示机体氧化-抗氧化动态平衡被破坏^[17]。细胞中的抗氧化剂如 SOD、GSH-Px 和 GSH 能够与 ROS 发生氧化还原反应,将 ROS 有效清除^[18]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组中 SOD、GSH-Px 和 GSH 含量均显著降低,而 MDA 含量则显著升高,说明模型组小鼠脑组织中遭 OS,氧化物大量积累,抗氧化物被大量消耗;与模型组比较,氧化苦参碱低剂量组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH 含量稍有升高而 MDA 含量略有降低,说明低剂量的氧化苦参碱有调节氧化-抗氧化平衡的趋势;与模型组比较,氧化苦参碱高剂量组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH 含量显著升高而 MDA 含量显著下降,与氧化苦参碱低剂量组比较,氧化苦参碱高剂量组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px、GSH 含量显著升高而 MDA 含量显著下降,以上实验结果表明,氧化苦参碱能通过提高帕金森小鼠脑组织抗 OS 能力而抑制脑组织细胞凋亡。

为了进一步探讨氧化苦参碱对 PD 小鼠 OS 能力调节作用的机制,本研究检测了氧化苦参碱对小鼠脑组织 Keap1/Nrf2/ARE 通路相关分子表达的影响。Keap1/Nrf2/ARE 通路是目前研究最多的抗 OS 通路,该通路活化后能够激活抗氧化、抗炎基因的表达,特别是对调节神经细胞氧化损伤具有重要意义^[16]。Nrf2 是一种调控 OS 损伤的关键转录因子,在正常情况下,位于细胞质内的 Nrf2 与 Keap1 结合成复合体,固定在肌动蛋白组成的细胞骨架上,经过泛素-蛋白酶途径降解,使其不能进入细胞核发挥转录功能^[19]。当脑细胞受到活性氧刺激后,Keap1 的构象被改变,Keap1 与 Nrf2 发生解离,Nrf2 被激活,

随后进入细胞内,激活 ARE,启动下游目标基因如 HO-1、 γ -谷氨酰半胱氨酸连接酶等转录,增强细胞抗 OS 的能力,促进细胞存活^[20]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组小鼠脑组织中 Keap1 蛋白的表达下调,Nrf2、ARE 蛋白表达上调,这一现象的原因是模型组小鼠脑组织细胞因过量活性氧刺激,发生 OS 反应,Keap1/Nrf2 结合物被降解,keap1 的构象被改变,释放并激活 Nrf2,继而激活 ARE,因此,keap1 蛋白表达下调,Nrf2 和 ARE 的表达量显著增加;与模型组比较,氧化苦参碱高剂量组小鼠脑组织中 Keap1 蛋白表达显著降低,Nrf2、ARE 蛋白表达显著升高,说明氧化苦参碱可以进一步活化 Keap1/Nrf2/ARE 通路,刺激机体发挥抗氧化作用;与氧化苦参碱低剂量组比较,氧化苦参碱高剂量组小鼠脑组织中 Keap1 蛋白表达显著降低,Nrf2、ARE 蛋白表达显著升高,说明氧化苦参碱的抗氧化作用具有剂量依赖性。

综上所述,氧化苦参碱能有效抑制 PD 小鼠中枢神经系统氧化应激反应,该作用可能是通过激活 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路活性而发生的。

参考文献:

[1] 晏思,王子裕,黄卫. 帕金森病震颤研究进展[J]. 中华神经科杂志,2019,52(10):861-865.

[2] 王玉凤,彭乔君,贺绍月,等. 帕金森病感觉障碍及其电生理研究[J]. 中华神经科杂志,2019,52(5):423-426.

[3] CAMPBELL B C. Thrombolysis and thrombectomy for acute ischemic stroke: strengths and synergies [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2017,43(2):185-190.

[4] 朱羽婷,朱向阳,周永,等. 氧化应激与帕金森病[J]. 中国实用神经疾病杂志,2019,22(11):1271-1276.

[5] 田崇梅,夏道宗,邢梦雨,等. 亚硒酸钠通过 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡[J]. 中国药理学通报,2019,35(2):181-186.

[6] BUENDIA I, MICHALSKA P, NAVARRO E, *et al.* Nrf2-ARE pathway: an emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2016,157:84-104.

[7] 毕亭亭,吕荣,朱敖,等. 氧化苦参碱增强肝癌细胞对氟尿嘧啶的敏感性[J]. 中华实验外科杂志,2015,32(10):2607.

[8] 包桂兰,陈勇,于玲,等. 氧化苦参碱对局灶性脑缺血大鼠氧化

应激反应的干预作用[J]. 吉林大学学报(医学版),2012,38(2):245-248.

[9] JING H, WANG S, WANG M, *et al.* Isobavachalcone attenuates MPTP-induced Parkinson's disease in mice by inhibition of microglial activation through NF-kappaB pathway [J]. *PLoS One*, 2017,12(1):e169560.

[10] 钟瑞霞,秦雅静,陈忠彦,等. 帕金森病发病机制及其早期诊断的研究进展[J]. 中国综合临床,2019,35(3):276-280.

[11] 沈王明,王毅力,潘建辉. 帕金森病病程早期的中药治疗与络病理论[J]. 中国中西医结合急救杂志,2017,24(6):561-564.

[12] MA L, ZHU Z, JIANG L, *et al.* Matrine suppresses cell growth of human chronic myeloid leukemia cells via its inhibition of the interleukin-6/Janus activated kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling cohort [J]. *Leuk Lymphoma*, 2015,56(10):2923-2930.

[13] 余婷,韩亚非. 苦参素对慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区神经元凋亡保护作用的研究 [J]. 天津中医药,2018,35(11):863-867.

[14] 魏炜. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路研究氧化苦参碱对新生大鼠缺血缺氧脑损伤的保护作用[D]. 银川:宁夏医科大学,2019.

[15] XIA D, SUI R, ZHANG Z. Administration of resveratrol improved Parkinson's disease-like phenotype by suppressing apoptosis of neurons via modulating the MALAT1/miR-129/SNCA signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019,120(4):4942-4951.

[16] YOU L, YANG C, DU Y, *et al.* Matrine exerts hepatotoxic effects via the ROS-dependent mitochondrial apoptosis pathway and inhibition of Nrf2-mediated antioxidant response [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019,2019:1045345.

[17] 王雪,姜忠玲,王新,等. 黄芩苷抗热应激小鼠输卵管氧化损伤的研究[J]. 华北农学报,2017,32(6):147-153.

[18] 陈梦,刘欣,吴丹,等. 植物雌激素抗氧化应激损伤的实验研究进展[J]. 中国医药,2019,14(3):463-466.

[16] DE FREITAS SILVA M, PRUCCOLI L, MORRONI F, *et al.* The keap1/Nrf2-ARE pathway as a pharmacological target for chalcones [J]. *Molecules*, 2018,23(7):1803.

[19] 窦彩霞,王倩,安建勇,等. Keap1-Nrf2/ARE 信号通路及其在畜禽抗氧化中的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2019,46(9):2567-2574.

[20] 张辉,马惠清,王晓娟. 银杏叶提取物通过激活 Nrf2-ARE 信号通路对帕金森病大鼠发挥脑保护作用[J]. 沈阳药科大学学报,2018,35(8):675-679,695.

(本文编辑:李胜利)