

育真熄风汤对拟帕金森小鼠脑内 nNOS 和 iNOS 的影响*

卢思英¹, 党晓伟¹, 李 建¹, 张世琴¹, 秦博文¹, 商亚珍^{2△}

(1. 河北承德护理职业学院, 河北承德 067000; 2. 河北承德医学院中药研究所, 河北承德 067000)

[摘要] **目的** 探讨中药复方育真熄风汤(YZXFD)对拟帕金森病(PD)模型小鼠黑质内 nNOS 和 iNOS 的影响。**方法** 将健康雄性 C57/BL 小鼠随机分为空白对照组、模型对照组、中药治疗组(YZXFD 低、中、高质量组)和阳性对照组,采取腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)制备 PD 小鼠模型,应用免疫组织化学染色技术,观察各组小鼠黑质内 nNOS、iNOS 表达的变化情况。**结果** 实验结果显示,在药物治疗后的第 14、28 天,中药治疗组小鼠与模型对照组小鼠比较,nNOS 和 iNOS 基因表达都有不同程度的减少,尤其以 ZXFD 高剂量组效果明显,差异有统计学意义($P < 0.01$),分别减少 38.6% 和 38.0%。**结论** ZXFD 可通过抑制黑质多巴胺神经元内 nNOS 和 iNOS 的基因表达途径,减少神经元的氧化应激损伤,达到保护神经元的作用。

[关键词] 帕金森病;一氧化氮合酶;育真熄风汤**[中图分类号]** R285**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)34-4768-03**Effects of Yuzhenxifeng Decoction on nNOS and iNOS expression in Parkinson model mice***Lu Siying¹, Dang Xiaowei¹, Li Jian¹, Zhang Shiqin¹, Qin Bowen¹, Shang Yazhen^{2△}

(1. Chengde Nursing Vocational College, Chengde, Hebei 067000, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of the Yuzhenxifeng Decoction(YZXFD) on nNOS and iNOS expression in Parkinson disease(PD) mouse models. **Methods** Preparing PD model mice with MPTP. C57/BL mice were randomly divided into 4 groups: the blank control group, PD model group, Chinese medicine treatment group and positive control group. By using the immunohistochemical staining technique, we observed the change of expression of nNOS and iNOS in the SN of mice in all groups. **Results**

The results showed that compared with model group, the expression of nNOS and iNOS gene in treatment group was lower than that in model group on 14th and 28th($P < 0.01$), and were 38.6% and 38.0% lower respectively. **Conclusion** ZXFD might exert its prevention and treatment effects on the PD through inhibiting nNOS and iNOS gene expression in the DA neurons.

[Key words] parkinson disease; nitric oxide synthase; Yuzhenxifeng Decoction

帕金森病(PD)是世界卫生组织确定的疑难疾病之一。研究表明,一氧化氮(NO)作为中枢神经系统内的细胞递质和信使分子,参与了帕金森等神经退行性疾病的病理过程。而一氧化氮合酶(NOS)作为 NO 生成的关键限速酶,可间接反映 NO 对 DA 神经元的影响。自拟配方育真熄风汤(Yuzhenxifeng decoction, ZXFD)在临床中应用多年,但其作用机理一直未有研究。本实验目的希望通过动物实验,研究其对 PD 小鼠脑内神经型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的影响,探讨中药复方 ZXFD 对帕金森病的作用机理。

1 材料与方法**1.1 材料**

1.1.1 实验动物 采用 C57/BL 健康雄性小鼠 90 只,6~7 周龄,SPF 级,体质量 18~20 g。购于北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号为 SCXK 京 2009-2004。

1.1.2 仪器与试剂 BH-2 型 OLYMPUS 显微镜及摄像装置(日本),美多巴(每片含苄丝肼 50 mg+左旋多巴 200 mg,上海,罗氏公司),MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,美国, Sigma 公司),兔抗小鼠 nNOS 抗体、iNOS 抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.1.3 药物制备 中药配方 ZXFD 以生黄芪、熟地、龟板为

君药,包含多种中药成分^[1],生药总量 275 g 制成中药汤剂。根据药理学方法制成高、中、低 3 个药物治疗浓度,相当于生药量分别为 143.00 g/kg、71.50 g/kg、35.75 g/kg^[1];造模药 MPTP 采用生理盐水配制成浓度为 0.33% 的溶液;美多巴阳性对照药采用 CMC 溶解配制成浓度为 12.5 mg/mL 的溶液。

1.2 方法

1.2.1 PD 小鼠模型建立 造模采用 MPTP(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹)诱导模型,腹腔注射,每日 1 次,连续 5 d^[2]。造模前 1 d,筛选能连续游泳 1 min 的健康小鼠做为实验对象,以消除小鼠的运动能力差异。

1.2.2 动物分组与给药 为达到药物有效浓度,中药治疗各组小鼠从首次注射 MPTP 前 3 d 开始分别给予不同浓度的 ZXFD 灌胃给药(10 mL/kg);阳性对照组小鼠给予美多巴(10 mL/kg)灌胃;空白和模型对照组给予生理盐水灌胃(10 mL/kg),持续 28 d。

1.2.3 行为学检测 游泳实验:自制 20 cm×30 cm×20 cm 规格的水箱,控制水温 28~30℃。放入受试小鼠,观察并记录小鼠 1 min 内游泳状态。能够连续不断游泳的小鼠计 3.0 分;大部分时间游泳仅偶尔漂浮者计 2.5 分;漂浮时间超过 30 s 的计 2.0 分;偶尔游泳的计 1.5 分;漂浮在一边仅偶尔用后肢游动的计 1.0 分^[2]。

1.2.4 组织形态学观察 实验第 14、28 天随机选取各组小鼠处死制成切片,常规 4.0%多聚甲醛透心灌注固定,根据小鼠大脑图谱黑质位置做冠状石蜡切片,片厚 5 μm。采用尼氏体染色(0.2%的硫堇溶液浸洗 30 min)观察多巴胺神经元组织形态和数量的改变。

1.2.5 nNOS,iNOS 染色 采用 SABC 免疫组织化学法染色:常规 3% H₂O₂ 灭活内源性酶;枸橼酸盐微波煮沸修复;一抗分别用 1:150 兔抗小鼠 nNOS,iNOS。阴性对照以 PBS 代替一抗进行染色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 行为学检测 注射 MPTP 5~10 min 后,小鼠即出现肢体震颤、竖毛、竖尾及跳窜等典型动作,持续 20~30 min 后,小鼠活动明显减少,动作迟缓,甚至匍匐不动,符合 PD 小鼠模型行为学表现^[1]。游泳试验结果显示,模型对照组小鼠游泳时间较空白对照组游泳时间缩短,且随着用药时间的延长而逐渐降低,尤其从第 3 天开始差异有统计学意义(*P* < 0.05),显示 PD 造模成功。中药治疗组与模型对照组比较,小鼠游泳能力有所改善,评分增加,尤其以 YZXFD 高剂量治疗组改善明显,差异有统计学意义(*P* < 0.05)^[3]。

2.2 YZXFD 对各组小鼠中脑黑质 DA 神经元数目的影响 结果显示,空白对照组小鼠黑质致密部 DA 神经元内尼氏体分布均匀,神经元胞体饱满整齐,呈带状分布,数量密集;模型对照组神经元带状分布松散,残存神经元形态各异^[4],与空白对照组比较,神经元数量明显降低(*P* < 0.01),见表 1;中药治疗组神经元数量较模型对照组增多,神经元胞体较饱满,结构较清晰。

表 1 YZXFD 对 PD 模型小鼠 SN 中尼氏体染色 DA 神经元细胞数目的影响 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量(mg/kg)	14 d	28 d
空白对照组	—	14.50 ± 1.29	15.00 ± 1.41
模型对照组	—	4.75 ± 1.26▲	7.00 ± 1.83△
YZXFD 低剂量组	35.75	5.75 ± 1.50	7.75 ± 1.26
YZXFD 中剂量组	71.50	8.25 ± 1.71▽	9.75 ± 2.06*
YZXFD 高剂量组	143.00	11.25 ± 0.96▽	12.25 ± 0.96▽
阳性对照组	125.00	12.75 ± 0.50▽	13.50 ± 1.29▽

△: *P* < 0.05, ▲: *P* < 0.01, 与空白对照组比较; *: *P* < 0.05, ▽: *P* < 0.01, 与模型对照组比较。

表 2 YZXFD 对 PD 模型小鼠 SN 中 nNOS,iNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量(mg/kg)	nNOS		iNOS	
		14 d	28 d	14 d	28 d
空白对照组	—	0.020 4 ± 0.000 8	0.012 7 ± 0.001 8	0.020 9 ± 0.001 4	0.007 9 ± 0.002 1
模型对照组	—	0.046 2 ± 0.001 9▲	0.085 8 ± 0.001 4▲	0.038 1 ± 0.003 3▲	0.028 4 ± 0.002 2▲
YZXFD 低剂量组	35.75	0.030 5 ± 0.001 7*	0.071 4 ± 0.001 3▽	0.035 9 ± 0.002 3▽	0.027 7 ± 0.004 5
YZXFD 中剂量组	71.50	0.020 1 ± 0.002 4▽	0.069 2 ± 0.004 0▽	0.033 7 ± 0.002 1▽	0.027 1 ± 0.005 2
YZXFD 高剂量组	143.00	0.019 0 ± 0.002 7▽	0.052 7 ± 0.001 9▽	0.032 0 ± 0.004 1▽	0.017 6 ± 0.004 3▽
阳性对照组	125.00	0.027 9 ± 0.005 6▽	0.013 0 ± 0.002 1▽	0.030 0 ± 0.002 2▽	0.010 7 ± 0.002 9▽

△: *P* < 0.05, ▲: *P* < 0.01, 与空白对照组比较; *: *P* < 0.05, ▽: *P* < 0.01, 与模型组比较。

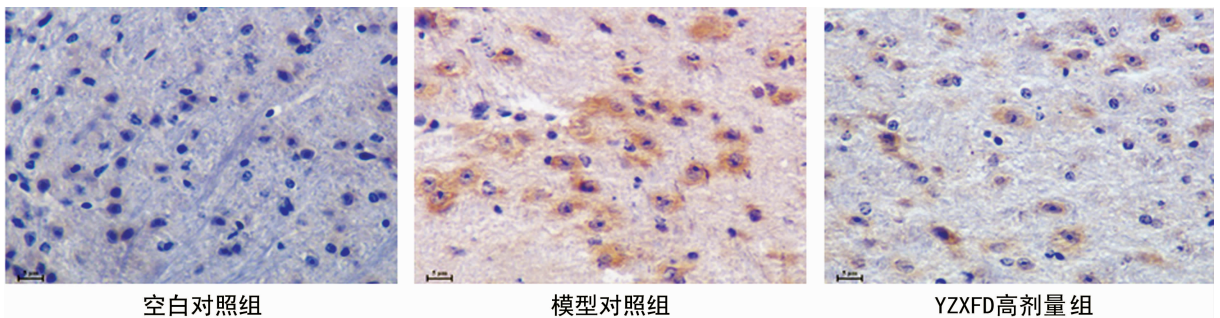


图 1 实验第 14 天黑质内 nNOS 免疫组织化学法蛋白表达 (SABC 法, ×400, scale bar=5 μm)

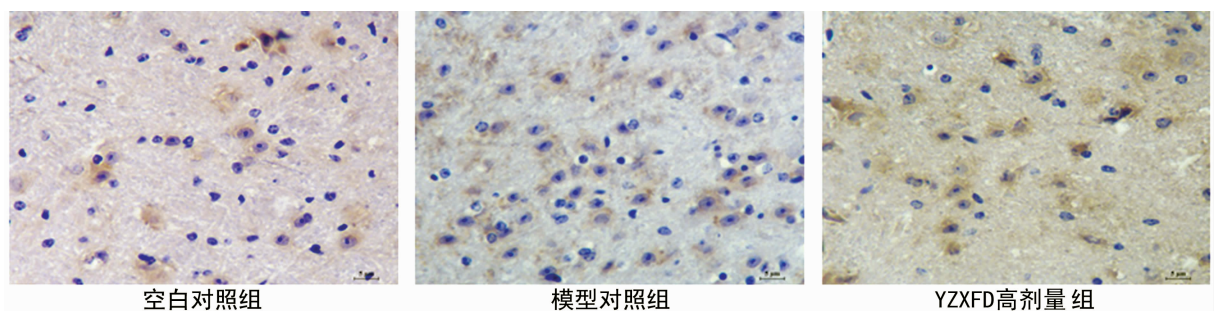


图 2 实验第 14 天黑质内 iNOS 免疫组织化学法蛋白表达 (SABC 法, ×400, scale bar=5 μm)

2.3 YZXFD 对各组小鼠中脑黑质 nNOS、iNOS 的影响
nNOS、iNOS 免疫反应阳性细胞,均表现为较为粗大的棕黄色颗粒,主要为胞质表达。与空白对照组比较,模型对照组 nNOS 和 iNOS 蛋白含量都显著增多($P < 0.05$),见图 1、2。中药治疗组及阳性对照组较模型对照组 nNOS 和 iNOS 蛋白含量减少,尤其以 YZXFD 高剂量组减少明显,差异有统计学意义($P < 0.01$),分别减少 38.6% (第 14 天)和 38.0% (第 28 天),见表 2。

3 讨 论

现代中医学对熟地、龟板、鹿角胶的药理作用做了相关研究,发现其均有增强大脑学习记忆,抗衰老、抗氧化、抗突变作用^[5-7]。苗明三等^[8]研究发现熟地黄中的多糖有较好的抗衰老作用,能提高小鼠衰老模型脑中酶类自由基清除剂的活力,降低脑匀浆过氧化脂质(LPO)水平。提示熟地可通过提高血中抗氧化相关酶的活性,起到一定的抗氧化作用。育真熄风汤以熟地、龟板、鹿角胶为君药,包含 18 种滋补肝肾肾气、益气补脾的有效中药成分,从多靶点、多途径整体调节机体功能,化疾通络,熄风止痉,符合中医治疗颤症的理论。

作者采用游泳法和尼氏体病理染色的方法,从行为学和组织形态学两方面观察小鼠的协调运动能力和 DA 神经元的改变。结果显示,模型对照组与空白对照组小鼠运动能力存在统计学差异,提示 PD 模型建立的成功和可靠。随着用药时间的延长,YZXFD 治疗组小鼠的运动协调能力及 DA 神经元的数量都有不同程度的改善和提高,尤其以 YZXFD 高剂量组效果明显。说明 YZXFD 对 PD 小鼠的行为学障碍有显著改善作用和对多巴胺神经元的保护作用。

NO 作为自由基家族的成员,近年研究表明,过多地在中枢神经系统内生成能引发神经细胞损伤,导致帕金森病及其他神经退行性疾病^[9-11]。NOS 是 NO 合成最关键的限速酶,有 3 种亚型,其中,nNOS 属结构型 NOS,正常情况下在神经元中仅有低水平表达。Vincent 等^[12]研究发现,大鼠局部脑缺血时同侧的 nNOS、mRNA 明显增加,而 nNOS 基因敲除的小鼠能明显抵抗脑缺血性损伤^[13],提示来源于 nNOS 的 NO 参与对神经的毒性作用。iNOS 在正常健康人的脑中不表达或表达很少,但病理情况下,如炎症细胞因子免疫应答、神经损伤等情况下表达增多,且产生比 nNOS 更多且持续更长时间^[14]。因此,来源于 iNOS 和 nNOS 的 NO 都具有神经毒性作用,可作为重要的介导因素被激活,从而引起神经元的毒性作用,导致神经元的凋亡或细胞坏死^[15]。作者在实验中也得出 MPTP 模型小鼠 SN 内在第 14、28 天的 nNOS 和 iNOS 有明显升高。而经过 YZXFD 中药预防和治疗后的小鼠与模型组比较,其行为学障碍有明显改善,DA 神经元数量增加,nNOS 和 iNOS 有明显降低。因此,作者有理由认为 YZXFD 可以通过抑制 nNOS 和 iNOS 的活性,进而降低其对 DA 神经元的毒性作用,发挥保护 DA 神经元、抗帕金森病的作用。

参考文献

[1] 秦博文,党晓伟,卢思英,等.育真熄风汤对帕金森病模型

小鼠脑内铁蛋白 Fn 的影响[J].重庆医学,2014,43(15):1889-1891,1895.

- [2] Lee KS, Lee JK, Kim HG, et al. Differential effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine on motor behavior and dopamine levels at brain regions in three different mouse strains [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2013, 17(1): 89-97.
- [3] 秦博文,董丽萍,卢思英,等.育真熄风汤对 MPTP 诱导 PD 模型小鼠行为学的影响[J].河北医学,2014,38(9):1482-1485.
- [4] 秦博文,党晓伟,卢思英,等.育真熄风汤对 PD 模型小鼠多巴胺能神经元的作用[J].江苏医药,2014,40(11):1249-1251.
- [5] 朱妍,徐畅.熟地黄活性成分药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2011,7(11):173-175.
- [6] 余新建,陈素红,吕圭源.龟甲“滋阴补肾”药效相关研究概况[J].当代医学,2009,15(10):15-17.
- [7] 牛晓晖,孙佳明,张艳萍,等.中国鹿科动物源药材药理作用十年研究进展(一)[J].吉林中医药,2012,32(6):611-612.
- [8] 苗明三,孙艳红,方晓艳.(怀)熟地黄多糖抗氧化作用[J].中国中医药信息杂志,2002,10(10):32-34.
- [9] 胡章颜.一氧化氮与细胞凋亡的研究进展[J].江西医学院学报,2005,45(3):176-178.
- [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):195-197.
- [11] Lorenc-Koci E, Czarnecka A. Role of nitric oxide in the regulation of motor function. An overview of behavioral, biochemical and histological studies in animal models[J]. Pharmacological Reports, 2013, 65(5): 1043-1055.
- [12] Vincent AM, Maiese K. Nitric oxide induction of neutral endonuclease activity in programmed cell death[J]. Exp Cell Res, 1999, 246: 240-243.
- [13] Tsutsui M, Shimokawa H, Morishita T, et al. Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthase isoforms[J]. J Pharmacol Sci, 2006, 102(2): 147-154.
- [14] Huerta C, Sánchez-Ferrero E, Coto E, et al. No association between Parkinson's disease and three polymorphisms in the eNOS, nNOS, and iNOS genes[J]. Neurosci Lett, 2007, 413(3): 202-205.
- [15] Gupta SP, Yadav S, Singhal NK, et al. Does restraining nitric oxide biosynthesis rescue from toxins-induced parkinsonism and sporadic Parkinson's disease? [J]. Mol Neurobiol, 2014, 49(1): 262-275.

(收稿日期:2015-05-03 修回日期:2015-07-15)