

张忠文,陈国华,黄露麒,等. 黄连解毒汤活性成分保护帕金森症脑神经细胞损伤机制的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 17-23.

Zhang ZW, Chen GH, Huang LQ, et al. Mechanism of the active ingredients in Huanglian Jiedu decoction in protecting against brain nerve cell damage in Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 17-23.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.003

## 黄连解毒汤活性成分保护帕金森症脑神经细胞 损伤机制的研究

张忠文,陈国华,黄露麒,梅俊华,邵卫,梅瑰\*

(武汉市第一医院神经内科,武汉 430022)

**【摘要】 目的** 探讨黄连解毒汤活性成分对帕金森症脑神经细胞损伤的保护作用及其机制。**方法** 将 SH-SY5Y 细胞分为 5 组:空白对照组、模型组、巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷组。空白对照组的细胞培养基中不添加任何物质,其余各组加入 500  $\mu\text{mol/L}$  的 1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium ions, MPP<sup>+</sup>) 构建帕金森病(Parkinson's disease, PD)细胞模型。巴马汀组中添加 10  $\mu\text{mol/L}$  的巴马汀,汉黄芩素组中添加 50  $\mu\text{mol/L}$  的汉黄芩素,京尼平苷组中添加 50  $\mu\text{mol/L}$  的京尼平苷。CCK-8 检测细胞活力, Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡情况,免疫荧光检测  $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -Syn)、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)的表达情况,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$ -干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )的水平, Real-time PCR 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平。**结果** MPP<sup>+</sup> 刺激 SH-SY5Y 细胞后,模型组细胞活力明显下降,  $\alpha$ -Syn 荧光强度增强, TH 阳性细胞显著减少。巴马汀、汉黄芩素、京尼平苷分别干预后,细胞增殖活力显著升高,  $\alpha$ -Syn 荧光强度减弱, TH 阳性细胞增加。TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的水平明显降低, Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平降低,而 Bcl-2 mRNA 的表达增加。**结论** 黄连解毒汤活性成分能抑制炎症因子的释放从而抑制炎症反应,为帕金森症脑神经细胞损伤的治疗提供理论基础。

**【关键词】** 黄连解毒汤;帕金森症;炎症反应;凋亡

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0017-07

## Mechanism of the active ingredients in Huanglian Jiedu decoction in protecting against brain nerve cell damage in Parkinson's disease

ZHANG Zhongwen, CHEN Guohua, HUANG Luqi, MEI Junhua, SHAO Wei, MEI Gui\*

(Department of Neurology, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the protective effect and mechanism of the active ingredients in Huanglian Jiedu decoction in preventing brain nerve cell damage in a cell model of Parkinson's disease. **Methods** SH-SY5Y cells were divided into five groups: control group, model group, palmitate group, wogonin group and geniposide group. No substance was added to the cell culture medium of the control group, whereas 500  $\mu\text{mol/L}$  of 1-methyl-4-phenylpyridinium ions (MPP<sup>+</sup>) was added to the other groups to create a cell model of Parkinson's disease. The palmitate group was

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81673914)。

**【作者简介】** 张忠文(1974—),男,硕士,副主任医师,研究方向:帕金森及运动障碍疾病。E-mail:zzwtougao@163.com

**【通信作者】** 梅瑰(1982—),女,硕士,住院医师,研究方向:帕金森及运动障碍病。E-mail:45711427@qq.com

supplemented with 10  $\mu\text{mol/L}$  of palmatine, the wogonin group was supplemented with 50  $\mu\text{mol/L}$  of wogonin, and the geniposide group was supplemented with 50  $\mu\text{mol/L}$  of geniposide. The cell viability was detected by CCK-8, cell apoptosis was evaluated using Hoechst 33258 staining, and the expressions of  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -Syn) and tyrosine hydroxylase (TH) were detected by immunofluorescence. The concentrations of the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA levels of the apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax and Caspase-3 were detected by Real-time PCR. **Results** MPP<sup>+</sup> stimulation significantly decreased the viability of SH-SY5Y cells; the  $\alpha$ -synuclein fluorescence intensity was significantly increased, and the number of TH-positive cells was significantly decreased. Intervention with palmatine, wogonin and geniposide significantly increased the viability, decreased the  $\alpha$ -synuclein fluorescence intensity, and increased the number of TH-positive cells; furthermore, the concentrations of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  and the expression levels of Bax and Caspase-3 mRNA were significantly reduced, whereas the level of Bcl-2 mRNA was increased. **Conclusions** The active ingredients of Huanglian Jiedu decoction inhibit the release of inflammatory factors and thus inhibit the inflammatory response, providing a theoretical basis for the treatment of brain nerve cell injury in Parkinson's disease.

**【Keywords】** Huanglian Jiedu decoction; Parkinson's disease; inflammatory response; apoptosis

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见于老年人的神经系统退行性疾病,在全球人口中 65 岁以上人群发病率高达 1.5%<sup>[1]</sup>。PD 涉及黑质致密部多巴胺能神经元的进行性死亡,出现运动迟缓、震颤和姿势异常等运动障碍<sup>[2]</sup>。到目前为止,PD 发病的确切机制仍不完全清楚。目前,帕金森病的治疗如康复、多巴胺前体、多巴胺激动剂和抗胆碱能药物可以缓解症状<sup>[3]</sup>。此外,许多药物会产生许多副作用,比如左旋多巴引起的运动障碍、断断续续的现象、疲惫、幻觉和妄想<sup>[4]</sup>。因此迫切需要有效的治疗方法来阻止或减缓多巴胺能细胞的死亡。

近年来,从天然产物中分离出的高效低毒化合物用于神经退行性疾病治疗的研究受到了人们的广泛关注<sup>[5]</sup>。黄连解毒汤由黄连、黄芩、黄柏、栀子 4 味中药组成,具有抗炎、抗氧化、抗脑缺血、保护神经元等作用,可用于脑血管疾病、痴呆、炎症等疾病的治疗<sup>[6]</sup>。有研究表明,黄连解毒汤对 MPTP 所致的帕金森病小鼠有防治效果<sup>[7]</sup>,但其主要成分对帕金森病的作用及其作用机理还有待研究。研究发现,黄连解毒汤的主要成分巴马汀、汉黄芩素和京尼平苷均能抑制炎症细胞因子的产生,进而抑制炎症反应来保护细胞免受损伤<sup>[8-10]</sup>。但它们是否通过抑制炎症反应保护神经元细胞鲜见报道。1-甲基-4-苯基吡啶(MPP<sup>+</sup>)是一个带正电荷的分子。MPP<sup>+</sup>通过干扰线粒体氧化磷酸化诱导大量氧化应激,导致多巴胺能神经元损伤<sup>[11]</sup>。SH-SY5Y 细胞系具有多种神经元特性和多巴胺能神经元的儿茶酚胺能表型,被广泛用作帕金森病研究的多巴胺能神经元的体外模型<sup>[12]</sup>。因此,本研究拟使用 MPP<sup>+</sup>处

理 SH-SY5Y 细胞构建 PD 模型,再用黄连解毒汤中 3 种活性成分巴马汀、汉黄芩素和京尼平苷处理模型细胞,模拟黄连解毒汤在 PD 发生和发展中的作用,然后检测细胞存活率、凋亡、炎症因子和  $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -Syn)、酪氨酸羟化酶(TH)的表达,探讨黄连解毒汤活性成分对帕金森症脑神经细胞损伤的保护作用及其机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 主要试剂与仪器

DMEM 购自 Gibco 公司(货号:C11330500BT);胎牛血清购自 TBD(货号:TBD11HT);MPP<sup>+</sup>碘化物购自 sigma 公司(货号:D048);CCK-8 购自 BestBio(货号:BB-4202);Hoechst 33258 购自碧云天公司(货号:C1017);Triton X-100 购自 absin 公司(货号:abs9149); $\alpha$ -Syn、TH 抗体购自 Bioswamp 公司(货号:PAB31491、MAB46040);TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  试剂盒购自 Bioswamp 公司(货号:HM10001、HM10115、HM10205 和 HM10206);TRIzol 购自 ambion 公司(货号:15596026),反转录所用试剂购自 TaKaRa 公司,SYBR Green 染料购自 KAPA Biosystems 公司(货号:KM4101);PCR 引物由武汉天一华煜基因科技有限公司合成。CO<sub>2</sub> 恒温培养箱购自 Thermo 公司(型号 311);倒置荧光显微镜购自 Leica 公司(型号 DMIL LED)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 SH-SY5Y 细胞的培养及 PD 细胞模型的构建及鉴定

将 SH-SY5Y 细胞以每毫升  $1 \times 10^5$  个的密度接种于培养瓶内,用 10% FBS 的 DMEM 培养基  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养。当细胞生长达到 80% 汇合时,以 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1:3 比例传代培养。取 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板分为对照组和  $\text{MPP}^+$  组,对照组加入 10% FBS 的 DMEM 培养基, $\text{MPP}^+$  组中加入含  $500 \mu\text{mol/L}$  的  $\text{MPP}^+$  的 10% FBS 的 DMEM 培养基<sup>[13]</sup>,于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h 后,CCK-8 检测细胞活力。

#### 1.3.2 化合物浓度筛选

将构建成功的 PD 模型细胞按照不同成分分别进行下列实验。巴马汀:在培养基中分别加入 0、3.5、7、10、12.5  $\mu\text{mol/L}$  的巴马汀培养 24 h;汉黄芩素:在培养基中分别加入 0、10、30、50、60  $\mu\text{mol/L}$  的汉黄芩素培养 24 h;京尼平苷:在培养基中分别加入 0、10、30、50、60  $\mu\text{mol/L}$  的京尼平苷培养 24 h。细胞处理完成后,使用 ELISA 检测筛选出巴马汀、汉黄芩素、京尼平苷的最佳作用浓度。

#### 1.3.3 实验分组及处理

将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞分为 5 组:空白对照组、模型组、巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷组。空白对照组的细胞培养基中不添加任何物质培养 24 h;其余各组加入  $500 \mu\text{mol/L}$  的  $\text{MPP}^+$  构建 PD 细胞模型。巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷组 3 组添加相应浓度的药物,培养 24 h 后,CCK-8 检测细胞活力,计算抑制率。

#### 1.3.4 Hoechst 33258 染色

SH-SY5Y 细胞接种 12 孔板处理 24 h 后,加 1 mL 4% 多聚甲醛室温固定 20 min,PBS 清洗后加入 1 mL Hoechst 33258 染色液,室温染色 5 min。PBS 清洗后于荧光显微镜下拍照。

#### 1.3.5 免疫荧光

SH-SY5Y 细胞接种 12 孔板处理 24 h 后,PBS 清洗后加入 1 mL 4% 多聚甲醛室温固定 30 min。PBS 清洗,加入 1 mL 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min。1 mL 5% BSA, $37^\circ\text{C}$  封闭 1 h,弃去封闭液。加入 300  $\mu\text{L}$  PBS 稀释后的一抗, $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。次日,PBS 清洗后加入 300  $\mu\text{L}$  PBS 稀释后的二抗, $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h。加入 300  $\mu\text{L}$  抗荧光淬灭封片液(含 DAPI),于荧光显微镜观察拍照。

#### 1.3.6 ELISA 检测细胞中炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IFN-}\gamma$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$ 的水平

严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测细胞中  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IFN-}\gamma$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的水平。

#### 1.3.7 Real-time PCR 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白的表达水平

采用 TRIzol 试剂分别提取各组细胞的总 RNA,测定提取的 RNA 纯度和浓度。将提取的 RNA 按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明方法逆转录获得 cDNA。Real-time PCR 扩增体系如下:SYBR FAST qPCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ ,上游引物( $10 \mu\text{mol/L}$ )0.5  $\mu\text{L}$ ,下游引物( $10 \mu\text{mol/L}$ )0.5  $\mu\text{L}$ ,cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu\text{L}$ ,总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件如下: $95^\circ\text{C}$  预变性 3 min,扩增  $95^\circ\text{C}$  5 s, $56^\circ\text{C}$  10 s, $72^\circ\text{C}$  25 s 共计 40 个循环,最后  $65^\circ\text{C} \sim 95^\circ\text{C}$  制备溶解曲线,以 GAPDH 为内参基因。计算相对表达量。待测基因引物序列见表 1。

### 1.4 统计学方法

采用 Graph pad 8.0 软件对数据进行统计分析,实验数据均以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,每两组间比较应用  $t$  检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 $\text{MPP}^+$ 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

如图 1 所示,与空白对照组比较,模型组 SH-SY5Y 细胞增殖活力显著降低( $P < 0.01$ ),结果表明 PD 细胞模型构建成功。

### 2.2 巴马汀、汉黄芩素、京尼平苷浓度的筛选

如图 2 所示,巴马汀组细胞中  $\text{IFN-}\gamma$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的浓度在 0~12.5  $\mu\text{mol/L}$  的范围内呈下降趋势,而  $\text{TNF-}\alpha$  的浓度在 0~10  $\mu\text{mol/L}$  的范围内呈下降趋势,在 12.5  $\mu\text{mol/L}$  的时候浓度增加,显示巴马汀的最佳作用浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。汉黄芩素组细胞中

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 引物 Primer   | 序列 Sequences(5'-3') |
|-------------|---------------------|
| Bax-F       | TTCAGGGGATGATTGCC   |
| Bax-R       | GCCTTGAGCACCAGTTTG  |
| Bcl-2-F     | CTGCTGGACAACATCGC   |
| Bcl-2-R     | GGAGAAATCAAACAGAGGC |
| Caspase-3-F | GGTTCATCCAGTCGCTTT  |
| Caspase-3-R | ATTCTGTTGCCACCTTTT  |
| GAPDH-F     | GGGAAACTGTGGCCTGAT  |
| GAPDH-R     | GACTGGCTGTCGCTGTTGA |

TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的浓度在 0~60  $\mu\text{mol/L}$  的范围内呈下降趋势,但在浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  和 60  $\mu\text{mol/L}$  时无明显差异,表明汉黄芩素的最佳作用浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ 。京尼平苷组细胞 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 IL-1 $\beta$  的浓度在 0~50  $\mu\text{mol/L}$  的范围内呈下降趋势,而 IL-6 的浓度在 0~50  $\mu\text{mol/L}$  的范围内呈下降趋势,在 60  $\mu\text{mol/L}$  的时候浓度增加,显示京尼平苷的最佳作用浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 2.3 药物对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

与空白对照组比较,模型组 SH-SY5Y 细胞增殖活力显著降低 ( $P<0.01$ )。与模型组比较,巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷组中 SH-SY5Y 细胞增殖活力显著升高 ( $P<0.01$ )。见图 3。

### 2.4 Hoechst 33258 染色结果

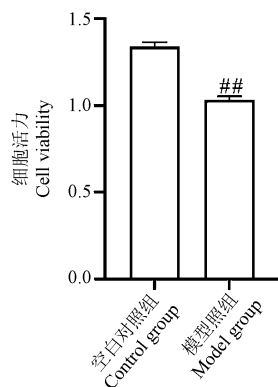
如图 4 所示, Hoescht 33258 染色后空白对照组的细胞出现较弱的均匀的蓝色荧光。而 MPP<sup>+</sup> 处理 SH-SY5Y 细胞后,细胞核大量呈浓染致密的固缩形态伴着较强的荧光。巴马汀组、汉黄芩素组、京尼

### 2.5 免疫荧光检测 $\alpha$ -Syn、TH 的表达情况

如图 5 所示,免疫荧光检测观察到模型组  $\alpha$ -Syn 荧光强度强于空白对照组。而巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷组分别干预细胞后,荧光强度减弱。镜下可见空白对照组中绿色荧光的 TH 阳性细胞较多,模型组 TH 阳性细胞显著减少。巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷组 TH 阳性细胞均有不同程度的增加。结果表明,巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷组能抑制  $\alpha$ -Syn 的表达水平,对 SH-SY5Y 细胞具有保护作用。

### 2.6 ELISA 检测细胞中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$ 的水平

如图 6 所示,与空白对照组比较,模型组细胞中 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平显著升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷组分别干预细胞后,荧光均有不同程度减弱。

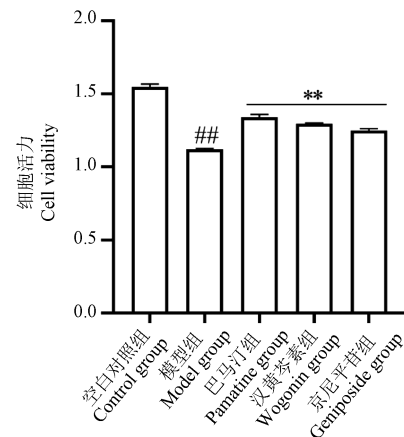


注:与空白对照组相比, ##  $P<0.01$ 。

图 1 CCK-8 法检测细胞活力

Note. Compared with control group, ##  $P<0.01$ .

Figure 1 Cell viability was detected by CCK-8 method



注:与空白对照组相比, ##  $P<0.01$ ;与模型组相比, \*\*  $P<0.01$ 。

图 3 药物对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

Note. Compared with control group, ##  $P<0.01$ . Compared with model group, \*\*  $P<0.01$ .

Figure 3 Effect of drugs on SH-SY5Y cell viability

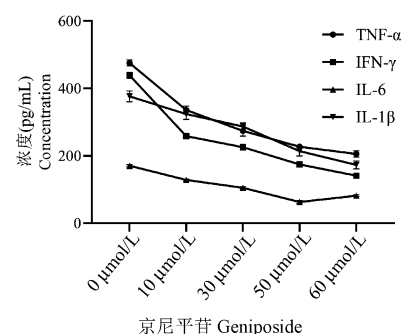
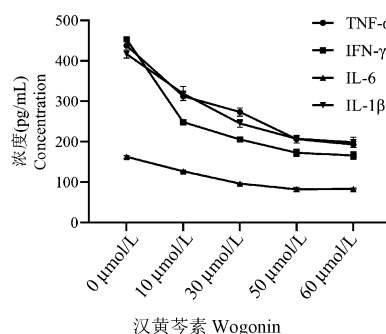
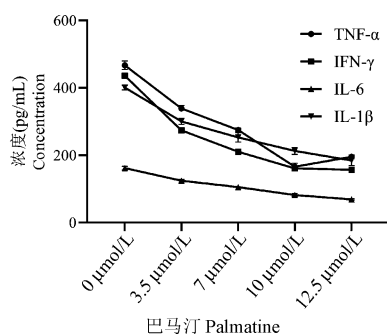


图 2 巴马汀、汉黄芩素和京尼平苷浓度的筛选

Figure 2 Screening of palmitine, wogonin and geniposide

平昔组细胞 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的表达水平显著降低 ( $P<0.01$ ), 表明巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平昔组能抑制炎症因子的释放, 对 SH-SY5Y 细胞具有一定的保护作用。

**2.7 Real-time PCR 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平**

如图 7 所示, 与空白对照组比较, 模型组细胞中

Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平增加, 而 Bcl-2 mRNA 的表达减少 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平昔组细胞 Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平降低, 而 Bcl-2 mRNA 的表达增加 ( $P<0.01$ )。结果表明, 黄连解毒汤活性成分对帕金森症脑神经细胞损伤具有保护作用, 其作用机制可能与抑制 Bax、Caspase-3 的表达, 提高 Bcl-2 的表达有关。

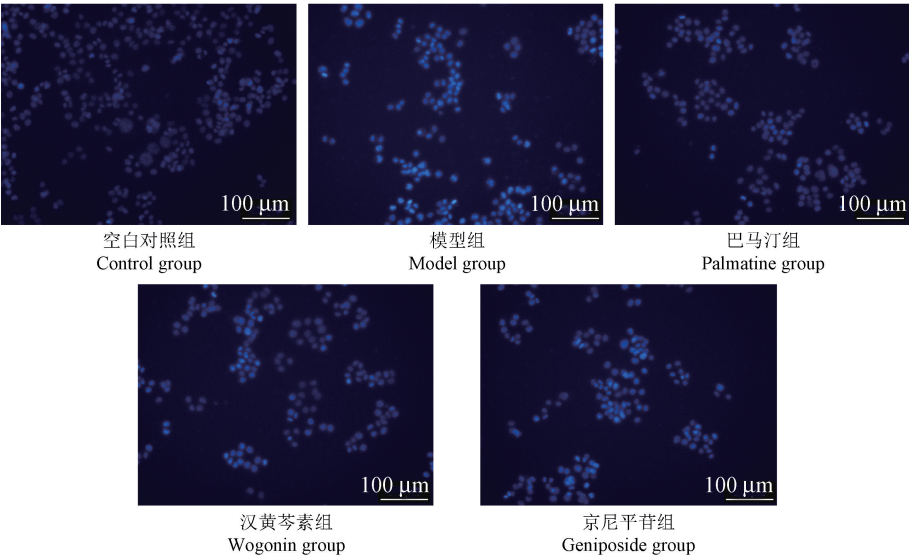


图 4 Hoechst 33258 染色

Figure 4 Hoechst 33258 staining

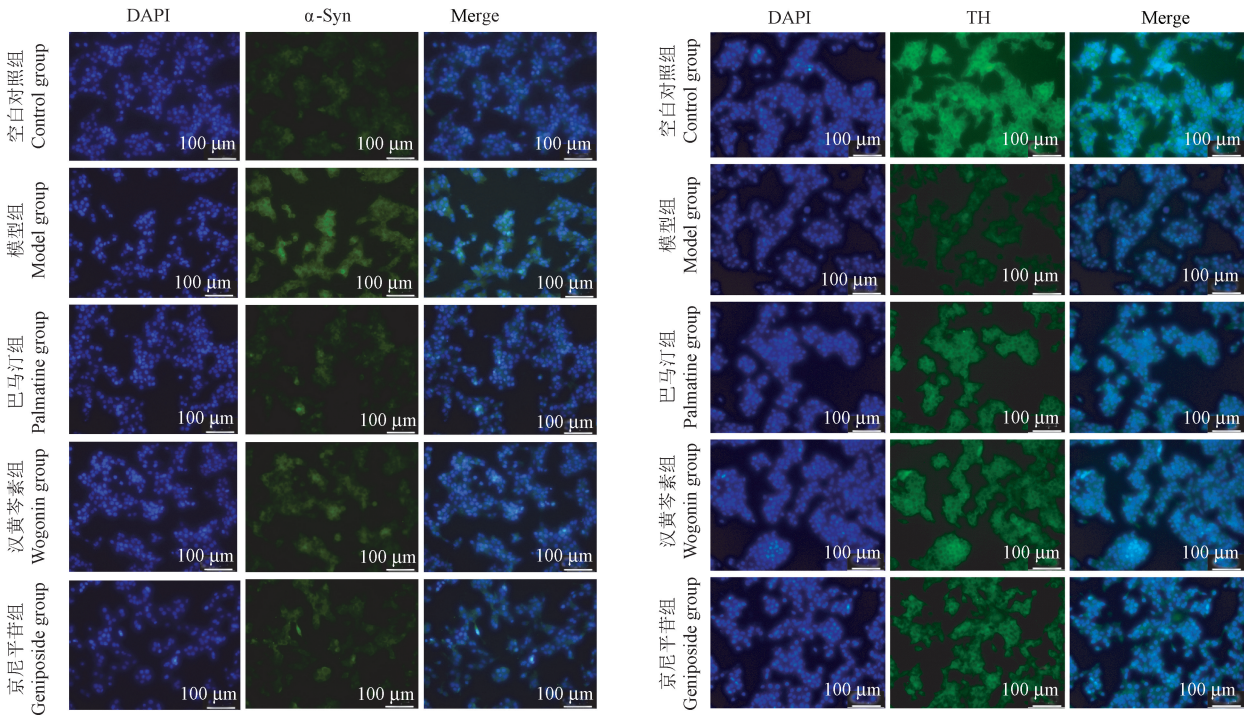
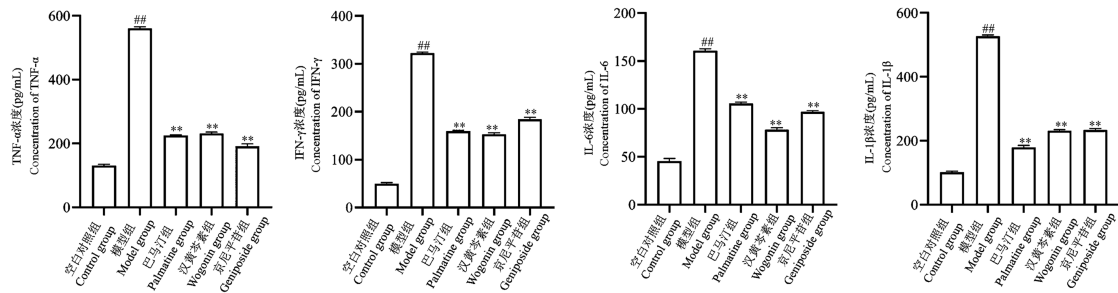


图 5 免疫荧光检测  $\alpha$ -Syn、TH 的表达情况

Figure 5 Expression of  $\alpha$ -Syn and TH was detected by immunofluorescence

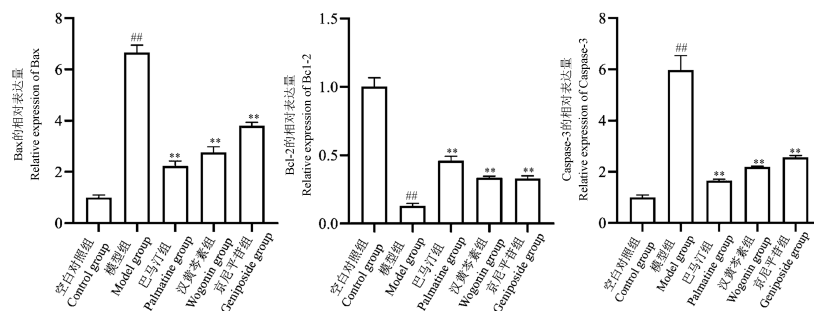


注:与空白对照组相比,## $P<0.01$ ;与模型组相比,\*\* $P<0.01$ 。

图6 炎症因子的水平

Note. Compared with control group, ## $P<0.01$ . Compared with model group, \*\* $P<0.01$ .

Figure 6 Levels of inflammatory factors



注:与空白对照组相比,## $P<0.01$ ;与模型组相比,\*\* $P<0.01$ 。

图7 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平

Note. Compared with control group, ## $P<0.01$ . Compared with model group, \*\* $P<0.01$ .

Figure 7 Expression levels of Bcl-2, Bax and Caspase-3 mRNA

### 3 讨论

PD 是第二常见的与年龄相关的神经退行性疾病,其特征是多巴胺能(DA)神经元的进行性丢失和中脑黑质致密区胞质中路易小体的出现。慢性神经炎症也是帕金森病的病理生理学标志之一。研究表明,神经胶质细胞激活和促炎细胞因子水平升高是 PD 脑的共同特征<sup>[14]</sup>。由于促进炎症细胞因子的释放而引起的星形胶质细胞和小胶质细胞的激活,加重了 DA 神经元的变性<sup>[15]</sup>,因此炎症过程被认为是 PD 和其他神经退行性疾病的一个有希望的干预靶点。

MPTP 在星形胶质细胞中被单胺氧化酶代谢,转化为电离的 MPP<sup>+</sup>,通过多巴胺转运体转移到 DA 神经元<sup>[16]</sup>。研究发现,MPP<sup>+</sup>对 SH-SY5Y 细胞神经元产生明显的损伤,因此在疗效评价方面比其他 PD 模型有很大优势。本实验采用 MPP<sup>+</sup>干预 SH-SY5Y 细胞 24 h 制备体外 PD 模型,通过 CCK-8 检测,观察 MPP<sup>+</sup>组活力下降,对 SH-SY5Y 细胞有明显的抑制作用。在 PD 发病过程中,黑质致密部中  $\alpha$ -Syn 的逐渐聚集导致多巴胺能神经元的丢失,进一步通

过大脑中的神经元回路传播,从而促进疾病的进展<sup>[17]</sup>。TH 存在于所有多巴胺能细胞中,是 DA 生物合成中的关键限速酶。TH 阳性神经元的减少会抑制 TH 的活性,导致 DA 合成的减少,可作为 PD 的直接指示因子<sup>[18]</sup>。Ser129 磷酸化  $\alpha$ -Syn 比例的增加会对 TH 调节产生干扰,进一步对神经元存活产生负面影响<sup>[19]</sup>。本实验用 MPP<sup>+</sup>干预 SH-SY5Y 细胞后, $\alpha$ -Syn 荧光强度增强,TH 阳性细胞显著减少,表明成功建立 PD 体外模型。巴马汀、汉黄芩素、京尼平苷分别干预后,细胞增殖活力显著升高, $\alpha$ -Syn 荧光强度减弱,TH 阳性细胞增加,表明黄连解毒汤的活性成分对帕金森症脑神经细胞损伤具有一定的保护作用。

巴马汀是黄连和黄柏中的主要成分,能够阻断 ADAM17/EGFR 信号传导减弱胃上皮细胞的炎症反应。汉黄芩素是黄芩中的主要活性成分,能够直接作用免疫细胞抑制炎症细胞因子的产生,抑制炎症相关通路,如 MAPK、Akt、NF- $\kappa$ B 和 JAK-STAT 等。京尼平苷是栀子中的主要活性成分,通过上调 miR-145-5p 抑制 NF- $\kappa$ B 和 JNK 通路保护大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12)细胞免于炎症损伤<sup>[8-10]</sup>。本研究

通过 ELISA 检测发现,在一定浓度范围内,巴马汀、汉黄芩素、京尼平苷能抑制细胞中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的水平。小胶质细胞是大脑中的一种免疫细胞,活化后产生和释放促炎细胞因子,对 DA 神经元造成损伤。大量研究报道炎症反应作用会激活细胞凋亡信号,进一步损害并导致器官衰竭。炎症介质会引起线粒体产生活性氧并释放细胞色素,形成凋亡小体以激活 Caspase-3。活化的 Caspase-3 切割 DNA 修复酶和细胞稳定蛋白,最终导致细胞凋亡<sup>[20-21]</sup>。研究发现 PD 患者的纹状体和脑脊液中均有炎症因子如 IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的存在,同时 TNF- $\alpha$  受体 R1、Bcl-2、Fas 和 Caspase-3 的表达水平增加<sup>[22]</sup>。本实验研究结果显示, MPP<sup>+</sup> 干预 SH-SY5Y 细胞后, Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平增加,而 Bcl-2 mRNA 的表达减少,而巴马汀、汉黄芩素、京尼平苷干预后,细胞 Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平降低,而 Bcl-2 mRNA 的表达增加。结果表明,黄连解毒汤的活性成分能抑制炎症因子的释放,减少细胞凋亡情况。综上所述,黄连解毒汤的活性成分巴马汀、汉黄芩素、京尼平苷能有效抑制炎症因子的释放和细胞凋亡,对帕金森症脑神经细胞损伤具有保护作用,为临床应用提供新的依据。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Meissner WG, Frasier M, Gasser T, et al. Priorities in Parkinson's disease research [J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(5): 377-393.
- [ 2 ] Campos-Acuña J, Elgueta D, Pacheco R, et al. T-cell-driven inflammation as a mediator of the gut-brain axis involved in Parkinson's disease [J]. Front Immunol, 2019, 10: 239.
- [ 3 ] Zhong J, Yu H, Huang C, et al. Inhibition of phosphodiesterase 4 by FCPR16 protects SH-SY5Y cells against MPP<sup>+</sup>-induced decline of mitochondrial membrane potential and oxidative stress [J]. Redox Biol, 2018, 16: 47-58.
- [ 4 ] Agúndez JA, García-Martín E, Alonso-Navarro H, et al. Anti-Parkinson's disease drugs and pharmacogenetic considerations [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2013, 9(7): 859-874.
- [ 5 ] Fan D, Liu L, Wu Z, et al. Combating neurodegenerative diseases with the plant alkaloid berberine: molecular mechanisms and therapeutic potential [J]. Curr Neuropharmacol, 2019, 17(6): 563-579.
- [ 6 ] 刘雨浓, 张晓敏, 崔晓英, 等. 黄连解毒汤有效组分通过抑制 Caspase-11 靶点抗脓毒症的研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(1): 7-11.
- [ 7 ] 王帆, 陈晓光. 老年性痴呆防治中黄连解毒汤研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(5): 86-89.
- [ 8 ] Chen X, Wang R, Bao C, et al. Palmatine ameliorates Helicobacter pylori-induced chronic atrophic gastritis by inhibiting MMP-10 through ADAM17/EGFR [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 882: 173267.
- [ 9 ] Liao H, Ye J, Gao L, et al. The main bioactive compounds of *Scutellaria baicalensis* Georgi. for alleviation of inflammatory cytokines: a comprehensive review [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 133: 110917.
- [ 10 ] Ma S, Zhang C, Zhang Z, et al. Geniposide protects PC12 cells from lipopolysaccharide-evoked inflammatory injury via up-regulation of miR-145-5p [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 2875-2881.
- [ 11 ] Przedborski S, Tieu K, Perier C, et al. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease [J]. J Bioenerg Biomembr, 2004, 36(4): 375-379.
- [ 12 ] Moreira S, Fonseca I, Nunes MJ, et al. Nrf2 activation by tauroursodeoxycholic acid in experimental models of Parkinson's disease [J]. Exp Neurol, 2017, 295: 77-87.
- [ 13 ] Zhong J, Xie J, Xiao J, et al. Inhibition of PDE4 by FCPR16 induces AMPK-dependent autophagy and confers neuroprotection in SH-SY5Y cells and neurons exposed to MPP<sup>+</sup>-induced oxidative insult [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 135: 87-101.
- [ 14 ] Booth H, Hirst WD, Wade-Martins R. The role of astrocyte dysfunction in Parkinson's disease pathogenesis [J]. Trends Neurosci, 2017, 40(6): 358-370.
- [ 15 ] Wang Q, Liu Y, Zhou J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target [J]. Transl Neurodegener, 2015, 4: 19.
- [ 16 ] Liang Y, Chen C, Xia B, et al. Neuroprotective effect of echinacoside in subacute mouse model of Parkinson's disease [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 4379639.
- [ 17 ] Bieri G, Brahic M, Bousset L, et al. LRRK2 modifies  $\alpha$ -syn pathology and spread in mouse models and human neurons [J]. Acta Neuropathologica, 2019, 137(6): 961-980.
- [ 18 ] Tabrez S, Jabir NR, Shakil S, et al. A synopsis on the role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2012, 11(4): 395-409.
- [ 19 ] Sato H, Arawaka S, Hara S, et al. Authentically phosphorylated  $\alpha$ -synuclein at Ser129 accelerates neurodegeneration in a rat model of familial Parkinson's disease [J]. J Neurosci, 2011, 31(46): 16884-16894.
- [ 20 ] Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015, 16(6): 329-344.
- [ 21 ] Tsai R, Tsai C, Liu S, et al. Maackiain ameliorates 6-hydroxydopamine and SNCA pathologies by modulating the PINK1/parkin pathway in models of Parkinson's disease in *Caenorhabditis elegans* and the SH-SY5Y cell line [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(12): 4455.
- [ 22 ] Gordon R, Anantharam V, Kanthasamy AG, et al. Proteolytic activation of proapoptotic kinase protein kinase C $\delta$  by tumor necrosis factor  $\alpha$  death receptor signaling in dopaminergic neurons during neuroinflammation [J]. J Neuroinflammation, 2012, 9(1): 82-99.

[ 收稿日期 ] 2021-06-22