

王孟迪, 魏山山, 姜宁, 等. 金钗石斛对 MPTP 诱导 PD 小鼠的神经保护作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (1): 48-56.

Wang MD, Wei SS, Jiang N, et al. Neuroprotective effects of *Dendrobium nobile* Lindl on MPTP-induced PD mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 48-56.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 01. 006

金钗石斛对 MPTP 诱导 PD 小鼠的神经保护作用及机制研究

王孟迪^{1,2}, 魏山山¹, 姜宁³, Alberto Carlos Pires Dias^{1,4}, 刘新民^{1,3*}, 王琼^{1,2*}

(1.西南医科大学附属中医医院中葡中医药国际合作中心 药学院, 四川 泸州 646000; 2.中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193; 3.中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所药理毒理研究中心, 北京 100193; 4.葡萄牙米尼奥大学分子和环境生物学中心生物系中葡食药资源研究中心, 葡萄牙 布拉加, 4710-057)

【摘要】 目的 探究金钗石斛提取物(*Dendrobium nobile* Lindl, DNL)在 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的小鼠帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型中的神经保护作用。**方法** 将小鼠随机分为对照组、模型组、美多芭组(阳性药组)、DNL(100、200、300 mg/kg)组, 通过腹腔注射(i.p)MPTP(30 mg/(kg·d), 7 d)建立亚急性小鼠 PD 模型, 进行步态分析实验、爬杆实验、悬挂实验等评估 DNL 对 PD 小鼠运动异常的影响; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组小鼠纹状体区和皮层区肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)表达的变化; 蛋白质印迹法(Western blot)检测各组小鼠纹状体 caspase-3 和 caspase-9 的表达情况。**结果** 模型组与对照组相比, 推进指数、支撑时相的步态指标有显著变化($P<0.05$); 与模型组相比, 美多芭组、DNL(100、200、300 mg/kg)组在左后、右前、右后推进指数, 左后、右前、右后支撑时相均有明显改善($P<0.05$); 与对照组相比, 模型组在爬杆上半段和总时间增加($P<0.01$ 、 $P<0.001$), 调头时间和下半段时间无明显变化($P>0.05$); 与模型组相比, DNL(300 mg/kg)组可以改善上半段时间($P<0.05$), 美多芭和 DNL(100、200 mg/kg)组无明显改善($P>0.05$); 与对照组相比, 模型组的悬挂评分降低($P<0.05$), 与模型组相比, DNL(300 mg/kg)可以增加悬挂评分($P<0.05$), 美多芭和 DNL(100、200 mg/kg)无明显改善($P>0.05$); 与对照组相比, 模型组小鼠纹状体中 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量增加($P<0.05$), caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平显著增高($P<0.001$); 与模型组相比, 美多芭、DNL(300 mg/kg)组炎症因子指标均降低($P<0.05$), 皮层中各组含量无差异($P>0.05$); caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。**结论** DNL 能够改善 MPTP 诱导的 PD 小鼠行为变化, 减轻脑组织中的炎症反应, 抑制神经细胞凋亡, 在治疗 PD 药物及功能食品研发方面具有较好的潜力。

【关键词】 金钗石斛; 帕金森病; 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶; 美多芭; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0048-09

Neuroprotective effects of *Dendrobium nobile* Lindl on MPTP-induced PD mice

WANG Mengdi^{1,2}, WEI Shanshan¹, JIANG Ning³, Alberto Carlos Pires Dias^{1,4}, LIU Xinmin^{1,3*}, WANG Qiong^{1,2*}

(1. Sino-Portugal TCM International Cooperation Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, School of

【基金项目】 (泸州-医科大)应用基础研究项目(2018LZXNYD-ZK32); 中国农业科学院农产品加工研究所创新工程院所重点任务(CAAS-ASTIP-2020-IFST); 泸州市高端人才引进项目(刘新民团队); 国家重点研发计划(2016YFE0131800)。

【作者简介】 王孟迪(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药神经药理与航天医学。E-mail: 18383067491@163.com

【通信作者】 王琼(1975—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药神经药理与航天医学。E-mail: luyiwangqiong@163.com

刘新民(1962—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药神经精神药理及实验方法学。E-mail: liuxinmin@hotmail.com

* 共同通信作者

Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China. 2. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193. 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193. 4. Centre of Molecular and Environmental Biology (CBMA), Department of Biology, SINO-PT Research Center For Food and Medicinal Plant Resources, University of Minho, Braga 4710-057, Portugal)

[Abstract] Objective To investigate the neuroprotective effect of *Dendrobium nobile* Lindl (DNL) in mice with 1-methyl-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson's disease (PD). **Methods** After establishment of the MPTP-induced subacute PD mouse model (30 mg MPTP/(kg · day) i.p, 7 d), the effects of DNL on the motor dysfunction in PD mice were evaluated by gait analysis, the pole test, suspension test and open field test. The effects of DNL on the expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) in PD mice were determined by ELISA. The effects of DNL on the expression levels of caspase-3 and caspase-9 in PD mice were assessed by Western blot. **Results** Compared with the control group, gait indexes, such as the propulsion index and duty cycle, were significantly changed in the model group ($P < 0.05$) compared with model group, whereas Madopar and DNL (100, 200 and 300 mg/kg) groups showed significant improvements ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$). In the pole test, compared with the control group, climbing in the top half of the pole time and total time of the model group were significantly increased ($P < 0.01$ and $P < 0.001$), but the time of turn around and the time of the lower half of the pole were not changed significantly ($P > 0.05$). Compared with model group, the DNL (300 mg/kg) group showed improvement in the top half of the pole time ($P < 0.05$), but Madopar and DNL (100 and 200 mg/kg) groups had no significant improvement ($P > 0.05$). In the suspension test, compared with the control group, the suspension score of the model group was significantly decreased ($P < 0.05$) compared with that of the model group and the suspension score of the DNL (300 mg/kg) group was increased ($P < 0.05$), but there was no significant improvement in Madopar and DNL (100 and 200 mg/kg) groups ($P > 0.05$). Compared with the control group, the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, caspase-3 and caspase-9 were increased in the striatum of mice in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.001$) compared with model group and those in the DNL (300 mg/kg) group were significantly lower ($P < 0.05$), but there were no significant differences in the content of cortex among the groups ($P > 0.05$). **Conclusions** DNL significantly improved MPTP-induced behavioral changes in PD mice, reduced the inflammatory response and neuronal apoptosis in brain tissue, and has a good potential for the development of PD drugs and functional food.

[Keywords] *Dendrobium nobile* Lindl; Parkinson's disease; 1-methyl-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; Madopar; mice

帕金森病 (Parkinson's diseases, PD), 又称震颤麻痹 (paralysis agitans), 是一种常见的神经退行性疾病, 其典型的临床表现包括静止性震颤、运动迟缓、姿势失衡和步态障碍等^[1]。黑质多巴胺能神经元的变性坏死以及 α -突触核蛋白 (α -Synuclein, α -Syn) 为主要成分的路易小体 (Lewy's body, LB) 的形成是 PD 的特征性病理表现^[2]。目前关于 PD 发病的具体分子机制尚不清楚, 已有的研究认为 PD 与氧化应激、炎症反应以及细胞凋亡密切相关^[3-5]。至今, PD 的临床治疗仍然以药物为主, 主要包括左旋多巴、单胺氧化酶 B (monoamine oxidase-B, MAO-B) 抑制剂、NMDA 受体阻滞剂和抗胆碱能药物等^[6]。这类药物可有效缓解 PD 症状, 但长期治疗仍会引起诸多副作用, 如姿势不稳、自主神经功能紊乱等, 严重危害身体健康^[7]。因此迫切需要研发

安全、有效、副作用小的防治 PD 药物。

中医药在防治 PD 方面有着丰富的临床经验^[8], 且中药具有多环节、多靶点的药理特点, 可为 PD 治疗提供新思路。PD 在中医学理论中, 症见头摇、手足动摇为主者可属“颤证”范畴^[9]。金钗石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl, DNL) 又名金钗石、扁金钗、扁黄草等, 味甘、微咸、无毒, 主要以新鲜或干燥茎入药, 主产于贵州、云南等地^[10]。2010 年版《中国药典》中已明确将金钗石斛作为药用石斛的首要来源^[11]。现代药理研究分析, 金钗石斛的主要化学成分为生物碱、多糖、氨基酸、酚类、挥发油等, 尤其是生物碱和多糖在抗肿瘤、降血糖以及对神经系统疾病等方面都具有显著的改善作用^[12]。金钗石斛提取物能有效改善小鼠抑郁模型的行为学表现, 显著提高小鼠脑内的 DA 和 5-HT^[13], 金钗石斛生物总

碱可以改善脂多糖诱导大鼠海马 tau 蛋白的高度磷酸化和炎症反应,减轻海马周围神经细胞的凋亡^[14];此外,段灿灿等^[15]通网络药理分析途径,筛选到金钗石斛活性成分 47 个,作用靶点 88 个,富集帕金森、阿尔茨海默症及精神、记忆障碍等神经系统疾病,从系统层面揭示了金钗石斛治疗神经系统疾病的药效物质基础及分子机制。因此,金钗石斛在防治帕金森病中具有很大的潜力。

在本研究中,我们采用 1-甲基-4 苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)制备经典的亚急性 PD 小鼠模型,探究金钗石斛提取物对 PD 小鼠的作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

66 只 8~10 周龄,体重 18~20 g,SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006]。实验期间喂养于中国医学科学院药用植物研究所 SPF 级实验动物房[SYXK(京)2017-0020],自由供给标准饲料和纯净水,保持 12 h 光照(9:00~21:00)和 12 h 黑暗(21:00~次日 9:00)交替循环,室温 20℃~23℃,湿度(55±10)%。动物适应环境 5 d 后开始实验。实验过程严格遵守 3R 原则,并遵循本所实验动物伦理委员会相关规定(SLXD-2021052119)。

1.2 主要试剂与仪器

金钗石斛生药购自四川泸州合江凤鸣,由中国医学科学院药用植物研究所张本刚研究员鉴定为金钗石斛。

MPTP 购自美国 Sigma 公司(规格:100 mg);美多芭购自上海罗氏制药有限公司(规格:0.25 g,产品批号:SH5146);小鼠肿瘤坏死因子(TNF)-α、白细胞介素(IL)-6 和 IL-1β 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒均购自上海酶联生物公司;caspase-3、caspase-9 和 β-Actin 抗体均购自 CST 公司(caspase-3 产品编号:9664, caspase-9 产品编号:

9509,β-Actin 产品编号:4967);HRP 羊抗兔 IgG、HRP 羊抗鼠 IgG 等二抗购自 Jackson 公司。

步态计算机图像实时检测分析处理系统(中国医学科学院药用植物研究所、中国航天员科研训练中心、北京鑫海仪技术公司联合研制);小鼠自主活动实时检测分析系统(中国医学科学院药用植物研究所、中国航天员中心、北京康森益友科技有限公司共同研制作);AL104 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);高速匀浆机(上海净信);台式高速冷冻离心机(湘立离心机);全自动酶标仪(美国,BIOTEK 有限公司);自制小鼠爬杆等。

1.3 方法

1.3.1 金钗石斛提取物的制备

称取金钗石斛茎干粉与 80%酸性乙醇按 1:10 的料液比混合浸泡 1 夜,85℃ 条件下回流提取 3 次后合并提取液,浓缩得到浸膏,干燥、粉碎后的褐色粉末即为金钗石斛提取物。

1.3.2 帕金森小鼠模型的建立及分组

适应期结束后,将小鼠随机分为 6 组:对照组、模型组、美多芭组(112.5 mg/kg)、DNL 低剂量(100 mg/kg)组、DNL 中剂量(200 mg/kg)组和 DNL 高剂量(300 mg/kg)组,各组小鼠分笼群养,每笼 4 只,每组 10~12 只。除对照组以外,各组小鼠每天在固定时间进行腹腔注射(i.p)MPTP 30 mg/kg,每天 1 次,连续 7 d,建立亚急性 PD 模型。对照组小鼠 i.p 给予相同体积生理盐水。美多芭组与 DNL(100、200、300 mg/kg)组造模前 14 d 进行灌胃(i.g)预给药,造模期间持续每天灌胃给药直到取材结束,对照组和模型组灌胃予以相同体积纯水。造模完成后次日进行行为学检测,实验流程见图 1。

1.3.3 步态分析实验(gait analysis,GA)

步态分析实验主要用于动物运动能力及运动协调性的评价^[16]。开始实验前 5 d,每天对小鼠进行不少于 3 次训练,以确保动物可从检测通道的一端不间断地跑到另一端。正式检测前调试软件参数,保证小鼠足印在采集图像窗口中清晰可见。检

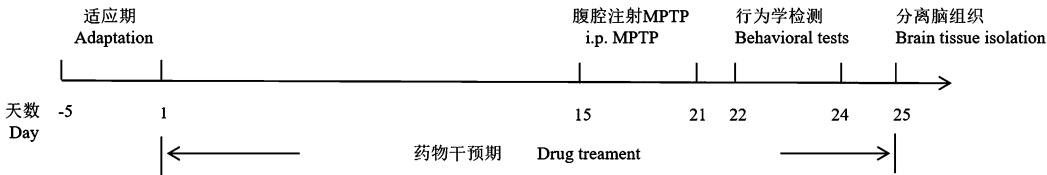


图 1 实验流程
Figure 1 Experimental procedure

测时,将小鼠的足部沾水,使小鼠连续通过跑台,此时高频摄像机记录下步态录像。录制完成的视频通过计算机分析软件进行分析,并统计步态指标。每只小鼠重复测量 3 次,取平均值进行分析。

1.3.4 爬杆实验

爬杆实验主要用于模型动物运动能力评价^[17]。自制一根长 69 cm,直径为 1 cm 的铁杆作为小鼠实验爬杆,将直径 25 cm 的软木质小球固定在爬杆顶部,爬杆上缠上医用胶带以防打滑。检测时,将每只小鼠头朝上放置在球顶使其自动爬下,以小鼠双前肢接触爬杆底部平台为爬完全长,记录以下时间:小鼠头向上至头向下的时间(调头时间),小鼠爬完杆子上半部分所需时间,小鼠爬完杆子下半部分所需时间,爬完全杆所需的总时间。每只小鼠重复测量 3 次,取平均值进行分析。

1.3.5 悬挂实验

悬挂实验参照 Kuribara 等^[18]的操作方法,准备一根离地面约 36 cm 的电线,将小鼠前肢悬挂于水平电线上,评分方法如下:小鼠四爪抓住电线则记 3 分,用一后爪抓住电线记 2 分,如果小鼠两后爪均抓不住电线则记 1 分,无法抓住而掉落记 0 分。

1.3.6 空场实验(the open-field test, OFT)

空场实验用于检测小鼠的自主活动情况^[19]。先将小鼠背对测试箱壁轻轻放入测试箱(30 cm×30 cm×35 cm),适应 3 min 后开始检测,计算机自动监测记录小鼠 10 min 内在测试箱中的自发活动情况,如总路程、运动时间、运动速度等指标。

1.3.7 小鼠脑组织分离

末次行为学实验结束后,小鼠处死后迅速断头,于冰上取脑,分离纹状体、皮层脑组织,-80℃条件下保存。

1.3.8 ELISA 法检测纹状体、皮层部位炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的含量

将脑组织进行冰上匀浆裂解,12000 r/min 离心 30 min,收集上清。ELISA 操作按试剂盒说明书进行。

1.3.9 Western blot 法检测纹状体中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白的表达

将各组脑组织加入蛋白裂解液匀浆,4℃条件下 12000 r/min 离心 15 min 后,取上清液,按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,分装,-80℃冻存待用。按每孔 30 μg 蛋白上样量配制样品,加入 SDS-PAGE 上样缓冲液配置最终样品。凝胶蛋白电泳条

件:浓缩胶恒压 90 V,约 20 min;分离胶恒压 120 V。转膜条件:300 mA 恒流;0.45 μm 孔径 PVDF 膜,转膜时间 60 min。室温封闭 1 h 后用抗体稀释液稀释 caspase-3 和 caspase-9 一抗(1:1000),4℃水平摇床孵育过夜。用抗体稀释液稀释山羊抗兔 IgG(H+L)HRP(1:0:10),室温孵育 1 h。用 ECL 化学发光液进行检测观察,使用 IPP 6.0 图像分析软件进行分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 对实验数据进行统计分析,数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,图形以 GraphPad Prism 6.02 软件制作。组间差异的显著性采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 金钗石斛对 PD 小鼠步态功能的影响

结果如表 1 所示,在步宽指标中,各组之间的前肢步宽和后肢步宽没有显著性差异($P > 0.05$)。在推进指数和支撑时相指标中,模型组与对照组相比,左后推进指数、右前推进指数、右后推进指数、左后支撑时相、右前支撑时相、右后支撑时相等步态指标均有显著差异($P < 0.01$, $P < 0.001$),而左前推进指数和左前支撑时相均没有显著性差异($P > 0.05$)。与模型组比较,美多芭组、DNL(100、200、300 mg/kg)剂量组在左后推进指数均有明显恢复($P < 0.001$),DNL(100、200、300 mg/kg)剂量组在右前推进指数($P < 0.05$, $P < 0.01$)和右后推进指数均有明显恢复($P < 0.01$)。与模型组相比,美多芭组、DNL(200、300 mg/kg)剂量组在左后支撑时相和右前支撑时相中有明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组相比,美多芭组在右后支撑时相中有明显改善($P < 0.05$, $P < 0.01$),DNL(100、200、300 mg/kg)剂量组与模型组相比有一定程度的改善趋势但无显著性差异($P > 0.05$)。

在平均步行周期指标中,模型组与对照组相比有上升趋势,各给药组与模型组相比有下降趋势,但无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 金钗石斛对 PD 小鼠爬杆时间和悬挂评分的影响

如表 2 所示,在爬杆实验中,与对照组比较,模型组的上半段时间、总时间均增加($P < 0.01$, $P < 0.001$),掉头时间和下半段时间无明显变化($P >$

0.05)。与模型组相比,DNL(300 mg/kg)组的爬杆上半段时间指标下降($P<0.01$),下半段时间、掉头时间和总时间无显著性差异($P>0.05$)。在悬挂评分实验中,模型组与对照组比较,悬挂评分明显下降($P<0.05$)。与模型组相比,DNL(300 mg/kg)组的评分增加具有显著性差异($P<0.05$),美多芭组、DNL(100、200 mg/kg)组评分有一定的增加趋势但

无显著性差异($P>0.05$)。
2.3 金钆石斛对 PD 小鼠空场实验的影响
在空场实验中,如表 3 所示,与对照组相比,模型组在运动总路程、运动时间、平均速度、僵滞时间比率上均有显著性差异($P<0.05$)。与模型组相比,美多芭组,DNL(100、200、300 mg/mL)组各项指标均无显著性差异($P>0.05$)。

表 1 DNL 对 PD 小鼠步态功能的影响($\bar{x}\pm s,n=10\sim 11$)
Table 1 Effect of DNL on gait function in PD mice

步态指标 Gait indicators	对照组 Control	模型组 Model	美多芭组 Madopar	金钆石斛组 DNL		
				100 mg/kg	200 mg/kg	300 mg/kg
前肢步宽 (cm) Forepaw track width	1.36±0.38	1.39±0.59	1.10±0.26	1.17±0.41	1.24±0.43	1.21±0.43
后肢步宽 (cm) Hindpaw track width	1.65±0.68	2.47±0.66	1.50±0.42	1.76±0.31	1.92±0.52	1.62±0.45
左前推进指数 Lf propulsion index	0.39±0.12	0.62±0.18	0.48±0.08	0.47±0.05	0.46±0.07	0.46±0.08
左后推进指数 Lh propulsion index	0.50±0.06	0.73±0.06***	0.55±0.03###	0.51±0.01###	0.53±0.01###	0.54±0.04###
右前推进指数 Rf propulsion index	0.46±0.05	0.65±0.13**	0.50±0.04	0.46±0.04##	0.47±0.06#	0.46±0.05##
右后推进指数 Rh propulsion index	0.47±0.12	0.66±0.04***	0.56±0.03	0.52±0.07##	0.53±0.04##	0.57±0.07##
左前支撑时相 Lf duty cycle	0.39±0.15	0.53±0.08	0.47±0.15	0.44±0.10	0.44±0.09	0.40±0.08
左后支撑时相 Lh duty cycle	0.45±0.08	0.55±0.05*	0.44±0.03##	0.49±0.07	0.43±0.04##	0.45±0.06##
右前支撑时相 Rf duty cycle	0.45±0.16	0.63±0.16**	0.45±0.04##	0.46±0.07	0.40±0.07##	0.39±0.09##
右后支撑时相 Rh duty cycle	0.49±0.13	0.66±0.13**	0.45±0.04##	0.51±0.05	0.54±0.08	0.55±0.09
平均步行周期 (s) Average step cycle	0.24±0.08	0.30±0.07	0.23±0.06	0.26±0.08	0.25±0.05	0.23±0.05

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

表 2 金钆石斛对 PD 小鼠爬杆时间和悬挂评分的影响($\bar{x}\pm s,n=10\sim 11$)
Table 2 Effects of DNL on climbing time and the score of the suspension test of PD mice

组别 Groups		调头时间 (s) Turn round time	上半段时间 (s) First half of time	下半段时间 (s) Second half of time	总时间 (s) Total time	悬挂评分 Score
对照组 Control		0.97±0.04	4.03±0.83	5.93±0.81	9.96±1.10	2.70±0.48
模型组 Model		0.98±0.03	6.13±0.99***	6.73±0.91	12.86±1.16**	1.70±0.48*
美多芭组 Madopar		0.98±0.02	5.74±0.79	6.66±1.07	12.40±1.18	2.11±0.78
金钆石斛组 DNL	100 mg/kg	0.96±0.04	5.39±1.24	6.12±1.68	11.51±2.66	2.45±0.68
	200 mg/kg	0.98±0.03	5.15±0.88	5.66±1.17	10.81±1.66	2.55±0.52
	300 mg/kg	0.99±0.01	5.02±1.00#	6.63±0.70	11.66±1.42	2.63±0.67##

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

2.4 金钆石斛对 PD 小鼠脑组织炎症因子水平的影响

通过前期的行为学实验,我们认为 DNL 各剂量中 300 mg/kg 剂量效果最佳,因此仅选择 DNL (300 mg/kg) 进行后续的研究。ELISA 检测结果如图 2 所示,与对照组相比,模型组小鼠纹状体区炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平升高 ($P<0.001$)。与模型组相比,美多芭、DNL (300 mg/kg) 各指标显著下降 ($P<0.05, P<0.01$)。在皮层区,各组间炎症因子水平的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 金钆石斛对小鼠纹状体中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白的表达的影响

免疫印迹结果如图 3 所示,对照组中 caspase-3

和 caspase-9 蛋白的表达量较少,与对照组相比,模型组中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白的表达量明显增多 ($P<0.001$);与模型组相比,美多芭组和 DNL (300 mg/kg) 组中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白的表达均有显著下降 ($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)。

3 讨论

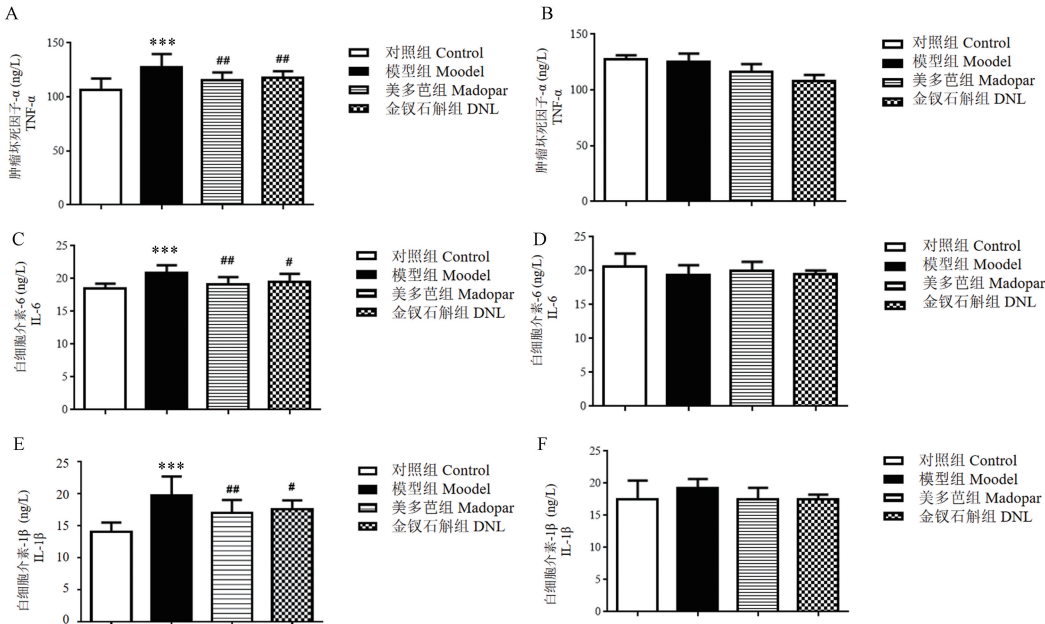
帕金森病是一种由多种环境因素、生物因素介导的慢性神经退行性疾病,在 60 岁以上人群中患病率达 1%^[20]。为了深入研究 PD 的病因及治疗方法,研究者们根据疾病的病理特点制作了不同的动物模型,其中 MPTP 模型是目前最常用的神经毒素模型之一,具有较长的研究历史。MPTP 能够引起

表 3 金钆石斛对 PD 小鼠空场实验的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10\sim 11$)

Table 3 Effects of DNL on the open-feild test of PD mice

组别 Groups	总路程 (cm) Total distance	运动时间 (s) Time of movement	平均速度 (cm/s) Speed of movement	僵滞时间比率 (%) Ratio of stagnation time
对照组 Control	3750.05 $\pm$ 490.98	192.66 $\pm$ 38.09	6.25 $\pm$ 0.81	67.90 $\pm$ 6.35
模型组 Model	3188.43 $\pm$ 647.56 [*]	154.05 $\pm$ 45.85 [*]	5.31 $\pm$ 1.08 [*]	74.33 $\pm$ 7.64 [*]
美多芭组 Madopar	3342.14 $\pm$ 479.48	158.42 $\pm$ 34.41	5.57 $\pm$ 0.80	73.61 $\pm$ 5.73
金钆石斛组 100 mg/kg	3172.60 $\pm$ 494.68	150.43 $\pm$ 37.41	5.29 $\pm$ 0.82	74.94 $\pm$ 6.24
DNL 200 mg/kg	3126.48 $\pm$ 356.65	141.40 $\pm$ 25.64	5.21 $\pm$ 0.60	76.45 $\pm$ 4.27
300 mg/kg	3215.28 $\pm$ 699.36	151.42 $\pm$ 59.79	5.36 $\pm$ 1.17	74.78 $\pm$ 9.97

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^{*} $P<0.05$.

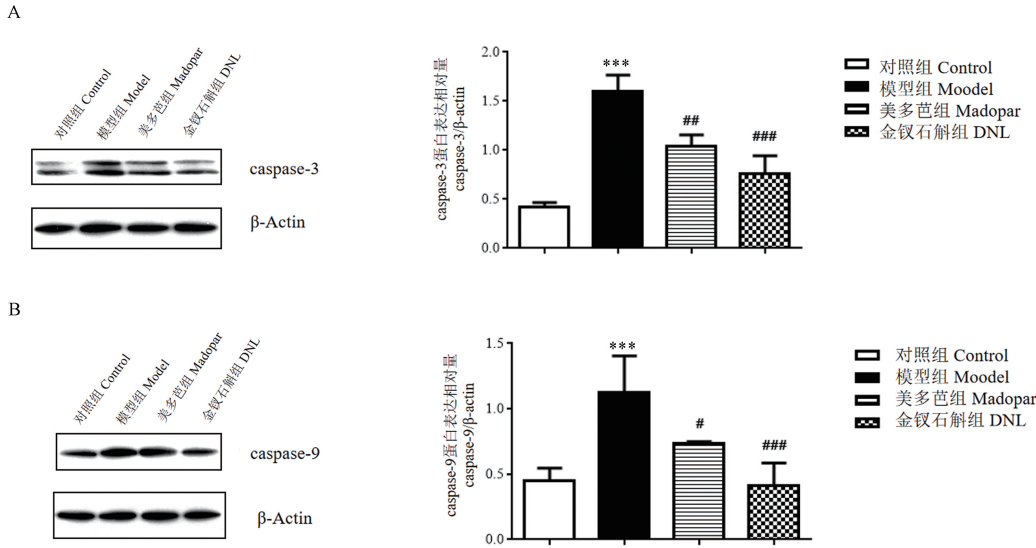


注:A:纹状体区 TNF- α 水平;B:皮层区 TNF- α 水平;C:纹状体区 IL-6 水平;D:皮层区 IL-6 水平;E:纹状体区 IL- β 水平;F:皮层区 IL- β 水平。与对照组相比, ^{***} $P<0.001$;与模型组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。

图 2 金钆石斛对 PD 小鼠脑组织 TNF- α 、IL-6、IL- β 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=7$)

Note. A, TNF- α levels in striatum. B, TNF- α levels in cortex. C, IL-6 levels in striatum. D, IL-6 levels in cortex. E, IL- β levels in striatum. F, IL- β levels in cortex. Compared with control group, ^{***} $P<0.001$. Compared with model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

Figure 2 Effects of DNL on TNF- α , IL-6, IL- β levels in PD mice brain



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图 3 金钆石斛对 PD 小鼠纹状体中 caspase-3 和 caspase-9 蛋白的表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Compared with control group, *** $P < 0.001$. Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 3 Effects of DNL on the expression of caspase-3 and caspase-9 proteins in the striatum of PD mice

黑质致密部多巴胺能神经元的变性,氧化应激反应和线粒体功能障碍,能够较好地模拟 PD 的临床表现和病理学特征^[21]。因此,在本研究我们采用腹腔注射给与 MPTP 30 mg/kg 连续 7 d 诱导的小鼠亚急性 PD 模型来评价 DNL 的药效。造模小鼠均在膜腔注射给予 MPTP 后 5~30 min 出现静止性震颤、立毛、弓背、行动减缓、聚集成团等现象,与参考文献^[22]报道一致,提示腹腔注射给与 MPTP 可成功建构 PD 模型。

现代药理学研究表明,金钆石斛生物碱具有显著的神经保护作用,Li 等^[23]发现金钆石斛生物碱可以显著改善 6-OHDA 诱导的 PD 大鼠中脑黑质 DA 神经元丢失以及降低 6-OHDA 诱导的原代大鼠中脑神经元-胶质细胞中促炎因子的释放。石斛碱是金钆石斛中含量最高的倍半萜类生物碱,具有显著的生物活性^[24],可显著改善 PD 症状保护 DA 能神经元。此外,研究表明金钆石斛中的有效活性成分槲皮素可保护机体免受神经毒性化学物质的侵害,并可防止神经元损伤和神经变性的进化和发展^[25]。Singh 等^[26]发现给予槲皮素可减轻链脲佐菌素(STZ)诱导的动物认知障碍。槲皮素还可以通过激活 PINK1-Parkin 线粒体吞噬通路改善 6-OHDA 诱导的 PD 模型的线粒体质量控制并保护 DA 神经元,改善 6-OHDA 处理下 PC12 细胞线粒体功能障碍,降低氧化应激水平^[27]。结合种种研究证据,我们认

为金钆石斛在防治 PD 药物研发方面具有较大的潜力,因此选择金钆石斛醇提物作为干预药物,探究其神经保护作用。

本研究选择爬杆实验、悬挂实验、步态分析实验和空场实验来评价动物的行为学指标。爬杆实验和悬挂实验是 PD 动物模型公认、经典、常用的行为学检测方法,对动物的协调性具有较好的检测效果^[18,28]。在爬杆实验中,小鼠在爬杆顶部调头至爬杆上半段时,需要调整姿势和方向,该动作能反映肢体的抓握调遣和协调能力,总时间可评估动物总体的运动速度和四肢协调性,因此常用于评价 PD 小鼠的运动功能。本实验中发现,MPTP 模型组小鼠在爬杆上半段时间、总时间与对照组相比均有显著延长,表明腹腔注射给与 MPTP 使小鼠肢体运动协调能力受到一定程度的损害,而 300 mg/kg 的 DNL 对这种损伤起到了一定的恢复作用。同样,模型组悬挂评分显著降低,提示小鼠肢体运动协调能力受损,DNL(300 mg/kg)同样可以显著恢复这种受损现象。

步态分析实验是一种评价神经系统运动行为高度敏感的检测方法^[16],本研究采用自主研发的大小鼠步态分析系统,已在前期的课题中得到验证^[29],目前国内已有文献报道将该系统应用于小鼠帕金森步态行为的研究^[30]。推进指数是指推进时长/支撑时长,用来描述动物肢体离地,在行走过程

中足迹面积逐渐变小的过程。该指标在一定程度上能反映动物行走时肢体肌力的情况。在本实验中,模型组的推进指数出现异常,提示模型动物的肢体推动能力下降,需要靠更大的肌力代偿。步行周期分为支撑相和摆动相,支撑时相指一个步行周期里,动物肢体支撑时长与步行周期的比例,步行周期的异常提示动物行走整体功能出现障碍,导致步行时间减少,肢体与地面接触时间增加。在本实验中,与对照组相比,虽然模型组的步行周期没有显著性差异,但有增高趋势,提示该模型已经出现步行异常,步行速度下降从而使动物各肢体支撑时长上升,美多芭和 DNL (300 mg/kg) 均可不同程度地改善 PD 小鼠步态指标的异常。

近年来研究表明,炎症反应参与了 PD 的发生发展^[31]。MPTP 腹腔注射可使小鼠纹状体内 TNF- α ^[32]、IL-6^[33]、IL-1 β ^[34]等促炎因子表达量增加,并伴有胶质细胞的增生^[35]。反应性小胶质细胞增生是 PD 炎症假说中的关键环节,有研究发现 PD 模型小鼠黑质致密部小胶质细胞出现明显增生,并产生了大量 TNF- α 和 IL-1 β ,后者加速了 DA 神经元的变性和死亡,继而引起了神经递质 DA 的生成的减少^[36-37],因此,恢复因过度炎性反应引起的 DA 神经元损伤是改善 PD 的一个重要途径。本研究结果显示,在 MPTP 模型组纹状体中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平及表达与对照组相比组显著升高,DNL (300 mg/kg) 给药组小鼠纹状体中的炎症因子指标相对于模型组均有所下降,说明 DNL 对 MPTP 引起的纹状体神经炎症同样发挥抑制作用。而在皮层区却并未观察到这一现象,这提示不同脑区对 MPTP 可能存在不同的免疫反应。

PD 的发生发展还与神经细胞凋亡密切相关,过度的细胞凋亡会严重影响神经功能。caspase 家族基因是控制凋亡的重要原件之一,当细胞凋亡途径激活,caspase-3 蛋白磷酸化,细胞凋亡进入不可逆阶段^[38]。在本实验中,与对照相比,模型组小鼠 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达量增高,表明 MPTP 使小鼠脑组织的神经细胞发生凋亡;相比模型组,美多芭、DNL (300 mg/kg) 给药组小鼠 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平均显著降低,提示 DNL 可能是通过降低 caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平的途径来抑制细胞凋亡对 PD 动物模型的影响,更具体的作用机理有待我们下一步的研究。

综上所述,金钗石斛提取物对 MPTP 诱导的 PD

模型小鼠具有一定的神经保护作用,可缓解运动障碍,降低 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平,其作用机制可能是通过抑制炎症反应,减少神经细胞凋亡的途径来实现的。

参考文献:

- [1] Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease [J]. Lancet, 2015, 386(9996): 896-912.
- [2] Burch D, Sheerin F. Parkinson's disease [J]. Lancet, 2005, 365(9459): 622-627.
- [3] Mashima K, Takahashi S, Minami K, et al. Neuroprotective role of Astroglia in Parkinson disease by reducing oxidative stress through dopamine-induced activation of pentose-phosphate pathway [J]. ASN Neuro, 2018, 10: 166335284.
- [4] Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? [J]. Lancet Neurol, 2009, 8(4): 382-397.
- [5] Mosley RL, Benner EJ, Kadiu I, et al. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. Clin Neurosci Res, 2006, 6(5): 261-281.
- [6] Goetz CG, Pal G. Initial management of Parkinson's disease [J]. BMJ, 2014, 349: 6258.
- [7] 陈彪. 左旋多巴在帕金森病治疗中的地位及进展 [J]. 中国临床神经科学, 2017, 5: 546-550.
- [8] 刘振国, 李文涛. 帕金森病运动并发症中西医结合诊治专家共识(2020) [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2020, 27(4): 247-252.
- [9] 吴勉华, 王新月. 中医内科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012.
- [10] 施宝盛, 陶永生, 黎唯. 金钗石斛化学成分和药理作用研究进展 [J]. 昆明医科大学学报, 2017, 38 (10): 124-129.
- [11] 周威, 夏杰, 孙文博, 等. 金钗石斛的化学成分和药理作用研究现状 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(22): 2693-2700.
- [12] 李志平, 郑若男, 柯伙钊, 等. 金钗石斛生物碱的研究现状 [J]. 科技经济导刊, 2019, 27(28): 96-98.
- [13] 姜宁, 范琳犀, 杨玉洁, 等. 金钗石斛提取物对慢性不可预见应激模型小鼠的抗抑郁作用 [J]. 生理学报, 2017, 69 (2): 159-166.
- [14] 石京山, 王茜, 李利生, 等. 金钗石斛生物碱抗老年痴呆基础研究 [J]. 神经药理学报, 2017, 7(2): 6.
- [15] 段灿灿, 王清纯, 赵泽粉, 等. 基于网络药理学分析金钗石斛治疗神经系统疾病的药效物质基础及作用机制 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(13): 1-10.
- [16] Li SD, Shi Z, Zhang H, et al. Assessing gait impairment after permanent middle cerebral artery occlusion in rats using an automated computer-aided control system [J]. Behav Brain Res, 2013, 250: 174-191.
- [17] Ogawa N, Hirose Y, Ohara S, et al. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice [J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1985, 50(3): 435-441.
- [18] 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.
- [19] 杨久山, 张楠, 宋铭晶, 等. 柴胡总皂苷对小鼠抑郁样行为及学习记忆障碍的改善作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 134-139.
- [20] Jankovic J, Stacy M. Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease [J]. CNS Drugs, 2007, 21(8): 677-692.
- [21] 许冰, 卢昌均. MPTP 诱导影响亚急性与慢性帕金森病模型小鼠黑质多巴胺能神经元 [J]. 华夏医学, 2015, 28(1): 24-27.
- [22] 陈世坚, 李舸, 张钰. MPTP 诱导帕金森病小鼠亚急性与慢性模型的比较及评价 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(8): 1303-1308.
- [23] Li DD, Wang GQ, Wu Q, et al. *Dendrobium nobile* lindl alkaloid attenuates 6-OHDA-induced dopamine neurotoxicity [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2020, 68(6): 1501-1507.
- [24] 王晓雅, 蒙春旺, 周勤梅. 金钗石斛倍半萜类成分研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(10): 1837-1845.
- [25] Islam MS, Quispe C, Hossain R, et al. Neuropharmacological effects of Quercetin: A literature-based review [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 665031.
- [26] Singh NK, Garabadu D. Quercetin exhibits $\alpha 7$ nAChR/Nrf2/HO-1-mediated neuroprotection against STZ-induced mitochondrial toxicity and cognitive impairments in experimental rodents [J]. Neurotox Res, 2021, 39(6): 1859-1879.
- [27] Wang WW, Han RY, He HJ, et al. Administration of quercetin improves mitochondria quality control and protects the neurons in 6-OHDA-lesioned Parkinson's disease models [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13: 11738-11751.
- [28] Luchtman DW, Shao D, Song C. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. Physiol Behav, 2009, 98(1-2): 130-138.
- [29] 李思迪, 金剑, 张恒, 等. 开心散对局灶性脑缺血模型大鼠认知和步行功能障碍的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(3): 425-426.
- [30] 李中正, 盛益华, 李思迪, 等. 电针对 MPTP 亚急性帕金森病模型小鼠步态运动行为的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(7): 874-878.
- [31] Wang Q, Liu Y, Zhou J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target [J]. Transl Neurodegener, 2015, 4(1): 19.
- [32] 朱蔚文, 刘焯霖, 徐浩文, 等. MPTP 所致帕金森病模型黑质区 TNF- α 、IL-1 β 的表达及灵芝孢子油的调控作用 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2007, 34(3): 201-204.
- [33] Lu YL, Su Y, Shen YQ, et al. The Levels of plasma IL-1 β , IL-6 of C57BL/6J mice treated with MPTP and brain lateralization [J]. Cell Mol Immunol, 2004, 1(3): 219-223.
- [34] Mogi M, Togari A, Ogawa M, et al. Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1 β and nerve growth factor in the striatum [J]. Neurosci Lett, 1998, 250(1): 25-28.
- [35] Dobbs RJ, Charlett A, Purkiss AG, et al. Association of circulating TNF- α and IL-6 with ageing and parkinsonism [J]. Acta Neurol Scand, 1999, 100(1): 34-41.
- [36] 王蓉, 欧阳敏, 张萍, 等. 帕金森病小鼠黑质纹状体小胶质细胞活化表达的炎性因子与多巴胺含量的关系 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(10): 2768-2770.
- [37] Block ML, Zecca LG, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms [J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8: 57-69.
- [38] 张晓愉, 张昆鹏, 王建民, 等. 圣草次苷调控 MPTP 诱导的慢性小鼠帕金森疾病和机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(3): 369-374.

[收稿日期] 2021-12-11