

范欣悦,何汶璐,董丽,等. 金钗石斛提取物对秀丽隐杆线虫帕金森病模型的神经保护作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 31-42.

Fan XY, He WL, Dong L, et al. Neuroprotective effect of *Dendrobium nobile* Lindl extract on *Caenorhabditis elegans* model of Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 31-42.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.004

金钗石斛提取物对秀丽隐杆线虫帕金森病模型的神经保护作用研究

范欣悦¹,何汶璐¹,董丽¹,侯志颖²,郑涵文³,
Alberto Carlos Pires Dias⁴,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,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.山东大学齐鲁医学院基础医学院生理教研室,济南 250012;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(*Dendrobium nobile* Lindl, DNL)提取物在帕金森病(Parkinson's disease, PD)线虫模型中的神经保护作用。**方法** 分别用 7.5、15 和 30 mg/L 的 DNL 提取物对转基因模型秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) NL5901 和经 6-羟基多巴胺(6-Hydroxydopamine, 6-OHDA)诱导的 N2、BZ555、PD4521 及 CB7272 线虫进行处理,分别观测线虫生存率、基础减慢反应率、 α -突触核蛋白(alpha-synuclein, α -syn)聚集情况、多巴胺能神经元(dopaminergic neurons, DN)情况、体壁肌肉细胞线粒体分布密度及膜内蛋白水平。检测经 6-OHDA 诱导的 N2 线虫体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)活性,探究 DNL 对 PD 线虫模型的抗氧化应激能力的作用。**结果** 与模型组相比,线虫经 DNL 及左旋多巴(levodopa, L-DOPA)处理后 DN 荧光强度明显增强($P < 0.05$, $P < 0.001$), α -syn 聚集明显减少($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$),基础减慢率均增加($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.0001$),线粒体密度增大($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$),线粒体内膜蛋白含量增加($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$),并且 SOD 含量增加($P < 0.05$),GSH 含量也呈上升趋势;线虫体内 ROS 含量减少($P < 0.01$)。在寿命试验中,N2 野生型线虫和两种 PD 线虫经 DNL 处理后寿命均延长($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。**结论** DNL 能有效改善 *C. elegans* PD 模型的运动麻痹,改善 DN 退化,抑制 α -syn 的聚集和神经元的损伤,增加抗氧化应激能力,减缓线虫衰老过程。

【关键词】 金钗石斛;帕金森病;秀丽隐杆线虫;神经保护

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0031-12

Neuroprotective effect of *Dendrobium nobile* Lindl extract on *Caenorhabditis elegans* model of Parkinson's disease

【基金项目】 国家重点研发计划(2024YFD1600603)。

【作者简介】 范欣悦(1999—),女,在读硕士研究生,研究方向:中药神经药理与航天医学。E-mail:819242595@qq.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

FAN Xinyue¹, HE Wenlu¹, DONG Li¹, HOU Zhiying², ZHENG Hanwen³, Alberto Carlos Pires Dias⁴, WANG Qiong^{1,2*}
(1. Sino-Portugal TCM International Cooperation Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China. 2. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193. 3. Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250012. 4. Center 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) extract in a *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) model of Parkinson's disease (PD). **Methods** *C. elegans* NL5901 and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced N2, BZ555, PD4521, and CB7272 *C. elegans* strains were treated with DNL 7.5, 15, and 30 mg/L. The survival rate, basal slowing response rate, α -synuclein (α -syn) aggregation, dopaminergic neurons (DNs), mitochondrial distribution density of body wall muscle cells, and protein levels in the membrane were observed. In addition, reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in 6-OHDA induced N2 was detected to explore the effect of DNL on the antioxidative stress ability of PD *C. elegans* models. **Results** Compared with that in the model group, the DN fluorescence intensity was significantly increased in nematodes treated with DNL and levodopa (L-DOPA) ($P < 0.05$, $P < 0.0001$), α -syn aggregation was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$), the basal slowing rate ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), mitochondrial density ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), mitochondrial intima protein content ($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$), SOD content ($P < 0.05$), and GSH content were all increased. The ROS content was reduced in nematodes ($P < 0.01$). The lifespans of N2 wild-type and PD *C. elegans* models were prolonged after DNL treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusions** DNL can effectively improve motor paralysis in a *C. elegans* PD model, improve DN degradation, inhibit α -syn aggregation and neuronal damage, increase the antioxidative stress ability, and slow the aging process in *C. elegans*.

【Keywords】 *Dendrobium nobile* Lindl; Parkinson's disease; *Caenorhabditis elegans*; neuroprotection

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

神经退行性疾病严重危害全球老年人的健康,帕金森病(Parkinson's disease, PD)是这类疾病中常见的一种^[1]。PD与黑质多巴胺能神经元(dopaminergic neurons, DN)损伤有关,导致静止性震颤、运动迟缓和自主神经功能紊乱等。其病理特征是 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)和泛素化蛋白聚集成路易小体^[2-3]。目前PD的标准临床治疗方法旨在缓解症状,并不能有效阻止病情的发展,现美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于治疗PD的几类药物如长期使用可能造成运动障碍、恶心、低血压等并发症^[3]。所以寻找合适的治疗策略以改善或者延缓疾病进展具有重要意义。虽然PD具体病因不明,但是丰富的资料表明氧化应激和线粒体功能障碍在DNs变性中发挥重要作用^[4]。

在神经系统、信号转导和衰老相关基因通路等研究领域中,秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis*

elegans, *C. elegans*)已然成为重要的模式生物。*C. elegans*因生命周期短、通体透明、可大量同步、培养环境简易等特点,而具有很多其他模式动物都无法与之相较的优点,使其非常便于研究^[5]。此外,*C. elegans*神经递质合成和释放通路与哺乳动物有着较高的保守性,有包含DNs在内的完整的神经元系统,且与哺乳动物(包括人类)的部分基因在遗传学上高度保守,可从行为和遗传水平探究其神经保护的机制^[5-8]。*C. elegans*具有许多与PD相关的同源基因,是研究PD的良好模式生物^[9]。在以往的线虫研究中, α -syn聚集情况、DNs损伤程度、抗氧化应激能力、线粒体损伤情况等是常用于研究PD的考察指标^[10-11]。

金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl, DNL)是一种兰科属多年附生草本植物,又名金钗石、扁金钗等,主要在云南、贵州、四川等地生长^[12]。古医书《神农本草经》记载了DNL具有“主伤中,除痹,下气,补五脏虚劳、羸瘦、强阴”之功效,可用

于热病伤津、口渴舌燥、病后虚热等^[13-14]。DNL 含多糖、生物碱、酚类和黄酮等多种化学成分^[15-16],已有研究报道石斛多糖在生物体中可以调节免疫和抗氧化^[17],石斛碱可改善阿尔茨海默病^[18]。研究表明,金钗石斛在动物体内具有确切的氧化损伤保护和线粒体功能障碍的作用^[19-20]。本研究选用产自四川泸州地区的 DNL,用水溶醇提法提取并制成干燥粉末,二甲基亚砜作为溶剂配制成 60 g/L 的母液,作用于线虫 PD 模型,探究 DNL 对 PD 线虫是否具有神经保护作用,为 DNL 的临床应用提供科研依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

C. elegans 品系:野生型 N2,标记 α -syn 的转基因线虫 NL5901 (pkIs2386 [unc-54p:: α -synuclein::YFP+unc-119]),标记 DN 的转基因线虫 BZ555 (egl-1 [dat-1p::GFP]),标记体壁肌肉细胞中的线粒体的转基因线虫 PD4251 [(pSAK2) myo-3p::GFP::LacZ::NLS + (pSAK4 myo-3p::mitochondrial) GFP + dpy-20(+)],由绿、红两种荧光分别标记咽肌及体壁中的复合物 I、II、III 和咽肌及表皮中的复合物 IV、V 的转基因线虫 CB7272,均由西南医科大学衰老与再生医学实验室罗怀容团队惠赠。

1.2 主要试剂与仪器

金钗石斛来自泸州市合江县。取金钗石斛干茎,粉碎,与 80%乙醇按 w:v=1:10 料液比混合,室温浸泡 12 h,煮沸状态下回流 3 次,每次 2 h,过滤、弃渣;将滤液进行旋蒸浓缩、冷冻干燥,碾磨制成粉末备用^[21]。

二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 碧云天);胰蛋白胨 (北京索莱宝科技有限公司);酵母粉 (北京索莱宝科技有限公司);琼脂粉 (北京索莱宝科技有限公司);胆固醇 (北京索莱宝科技有限公司);氟尿脱氧核苷 (FUDR, 阿拉丁);左旋多巴胺 (levodopa, L-DOPA, 阿拉丁);6-羟多巴胺 (6-OHDA, 源叶生物);抗坏血酸 (阿拉丁);盐酸左旋咪唑 (阿拉丁);H2DCF-DA 探针 (碧云天);SOD 试剂盒 (碧云天);GSH 试剂盒 (南京建成);BCA 试剂盒 (南京建成)。NGM 培养基 (400 mL) 由 1.2 g 氯化钠、1.0 g 蛋白胨、7.0 g 琼脂粉和

5 mg/mL 胆固醇 400 μ L 配制,经高压蒸气灭菌,温度降至 60 $^{\circ}$ C 后依次加入 1 mol/L PB 缓冲液 10 mL、1 mol/L 硫酸镁溶液 400 μ L、1 mol/L 氯化钙溶液 400 μ L。分别将 DNL 与 L-DOPA 加入线虫生长培养基 (nematode growth media, NGM) 中,配制成 7.5、15、30 mg/L DNL 及 2 mmol/L L-DOPA 的药物培养基。

生化培养箱 (上海一恒仪器有限公司);体视显微镜 (桂光仪器有限公司);倒置荧光显微镜 (尼康株式会社);离心机 (湖南湘仪仪器有限公司);高压灭菌锅 (上海申安医疗器械公司);多功能酶标仪 (Tecan Spark)。

1.3 实验方法

1.3.1 线虫培养及同步化

把大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) OP50 涂布于接种线虫的 NGM 培养基表面,将线虫接种后置于 20 $^{\circ}$ C 恒温培养。将产卵期线虫用 M9 缓冲液冲洗收集至离心管,添加线虫裂解液轻微摇动 3 min,待虫体完全裂解,2000 r/min 离心 1 min,丢弃上层清液,以上操作重复两次,随后添加 M9 缓冲液于 20 $^{\circ}$ C 过夜培养,次日将其离心后去上清,将沉淀的虫体置于涂有 *E. coli* OP50 的 NGM 培养基平板上,获得同步后的 L1 期秀丽隐杆线虫。

1.3.2 使用 6-OHDA 诱导 DN 变性

6-OHDA 可选择性地损伤线虫 DN,构建 PD 模型。按照之前的报道用 6-OHDA 处理线虫,造成 DN 损伤的 PD 线虫模型^[22-23]。将同步化得到的 L1 时期线虫,转移至 NGM 平板,20 $^{\circ}$ C 恒温培养至 L3~L4 时期,用含有 50 mmol/L 6-OHDA 和 10 mmol/L 抗坏血酸的 M9 缓冲液处理线虫 1 h,每 10 min 轻柔上下颠倒混匀,以诱导 DN 损伤。待线虫自然沉淀后弃上清,加 M9 缓冲液洗涤,重复洗涤 3 遍。虫体分为 6 组,其中 5 组用 6-OHDA 处理,另外一组用相同体积的 ddH₂O 作为对照 (Control) 组;经 6-OHDA 处理的线虫分为 5 组,分别为模型 (Model) 组、阳性药物 (L-DOPA) 组及 7.5、15 和 30 mg/L DNL 组。

1.3.3 运动能力测定

将同步后的 L4 时期的 N2 线虫按照“1.3.2”中的方法进行处理。分组培养 3 d 后,将线虫挑取在加有 M9 缓冲液的 96 孔板中,线虫适应 1 min 后,记录在 20 s 中线虫身体弯曲的次数,作

为运动能力的指标。每组不少于 30 条线虫。

1.3.4 多巴胺能神经元退化分析

将同步后的 L4 时期的 BZ555 线虫按照“1.3.2”中的方法进行处理并分为 6 组。分组培养处理 3 d 后将线虫挑至含琼脂糖的载玻片上固定,在荧光显微镜下进行拍摄。用 Image J 1.54k 软件用于分析荧光强度^[24]。每组不少于 30 条线虫。

1.3.5 α -syn 聚集分析

将同步后的 L4 时期的 NL5901 线虫分为 5 组,其中一组为对照组,另外 4 组分别用 7.5、15 和 30 mg/L 3 种浓度 DNL 和 2 mmol/L L-DOPA 进行处理,设置为 7.5、15 和 30 mg/L DNL 组及阳性药物(L-DOPA)组。20 °C 培养 3 d 后再将线虫挑至含琼脂糖的载玻片上固定,在荧光显微镜下进行拍摄。Image J 1.54k 软件用于分析荧光强度^[25]。每组不少于 30 条线虫。

1.3.6 食物感知行为分析

将同步后的 L4 时期 N2 线虫用 6-OHDA 造模。分组培养 3 d 后,用 M9 收集线虫,并洗涤除去线虫身上的细菌,分别放于有或无细菌的平板上,静置 5 min 后开始。记录每条线虫在 20 s 内身体弯曲频率,每组设置 3 个平行,每个平行 10 条线虫。基础减慢率=(食物缺失的移动速率-食物存在的移动速率)/食物存在的移动速率^[9]。

1.3.7 寿命分析

分别将同步后的 L4 时期 N2 线虫分为对照组、7.5、15、30 mg/L DNL 共 4 组;L4 时期 N2 线虫按照“1.3.2”中的方法进行处理后分 6 组;L4 时期 NL5901 线虫按照“1.3.5”中的方法分为 5 组。所有的培养基中均加入 FUDR 以抑制线虫妊娠,以排除线虫子代的干扰。每组设置 3 个平行,每个平行 50 条线虫。线虫被转移至药板的时间记为第 0 天,每天用铂丝轻触虫体,若无任何反应,则记录为线虫死亡,剔除因爬至皿壁死亡的线虫,观察记录各组线虫的存活和死亡情况,直到线虫全部死亡。

1.3.8 荧光标记线粒体密度分析

转基因线虫 PD4251 体壁肌肉细胞中的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)荧光标记物质可以用于分析 DNL 对线虫的线粒体表达变化情况^[26]。将同步后的 L4 时期的 PD4251 线

虫按照“1.3.2”中的方法进行处理。分组处理 3 d 后在荧光显微镜下进行拍摄,用 Image J 1.54k 软件分析荧光强度。

1.3.9 荧光标记线粒体呼吸链复合物分析

在转基因线虫 CB7272 的咽肌和体壁中, GFP 标记了复合物 I ~ III;在咽肌和表皮中,红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)标记了复合物 IV、V。分析 CB7272 荧光强度可以确定线粒体呼吸链中复合物的变化情况^[27]。将同步后的 L4 时期的 CB7272 线虫按照“1.3.2”中的方法进行处理 3 d 后在荧光显微镜下进行拍摄,用 Image J 1.54k 软件分析荧光强度。

1.3.10 体内 ROS 测定

将同步后的 L4 时期的 N2 线虫按照 1.3.2 中的方法处理 3 d 后,用 M9 缓冲液冲洗收集线虫,离心后加入 1 mL 浓度为 50 μ mol/L 的 H2DCFDA 探针,20 °C 避光放置 1 h,用 M9 缓冲液清洗 3 次,将线虫挑至含琼脂糖的载玻片上固定,荧光显微镜下测定 488 nm 的荧光强度^[28]。用 Image J 1.54k 软件分析荧光强度。每组至少 30 只线虫。

1.3.11 体内 GSH 和 SOD 测定

抗氧化防御系统是抗氧化能力的重要组成部分,其中 SOD 负责清除活性氧, GSH 可以与自由基结合加速自由基排泄。为了研究 DNL 对 PD 线虫模型抗氧化防御系统的影响,检测线虫体内 SOD 与 GSH 的含量。将同步后的 L4 时期 N2 线虫分为对照组、模型组和 15 mg/L DNL 组,分组培养 3 d 后,用 M9 缓冲液收集线虫,加入裂解液,用预冷的玻璃匀浆器进行碾磨,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,分别按照试剂盒的方法进行 SOD 活性、GSH 含量测定^[23]。蛋白浓度测定使用 BCA 方法测定。

1.4 统计学方法

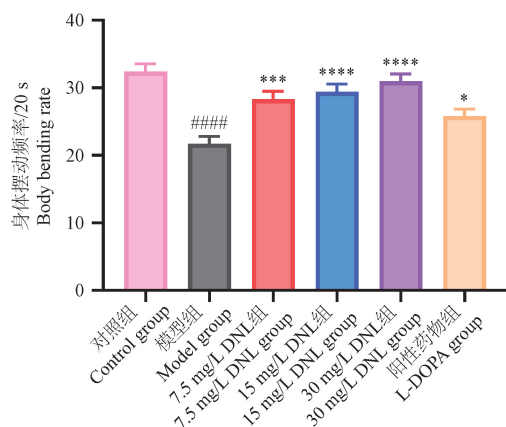
本研究的数据用 GraphPad Prism 8.4 软件进行处理,数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析方法,多重比较方差齐时,寿命实验采用 Kaplan-Meier 和 log-rank 检验法分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNL 改善 PD 线虫的运动能力

PD 线虫模型的主要特点是运动障碍。正常

情况下, N2 线虫在 M9 缓冲液中会左右弯曲摆动, 线虫在液体中的移动速率, 也称为摆动速率, 即单位时间内身体弯曲的次数。通过观察线虫身体摆动情况判断其运动能力。与对照组相比, 模型组运动能力明显降低 ($P < 0.0001$); 7.5、15 和 30 mg/L DNL 组和阳性药物组与模型组相比, 运动能力均显著增强 ($P < 0.05$)。因此可以明确 DNL 具有改善 PD 线虫运动能力的作用(图 1)。

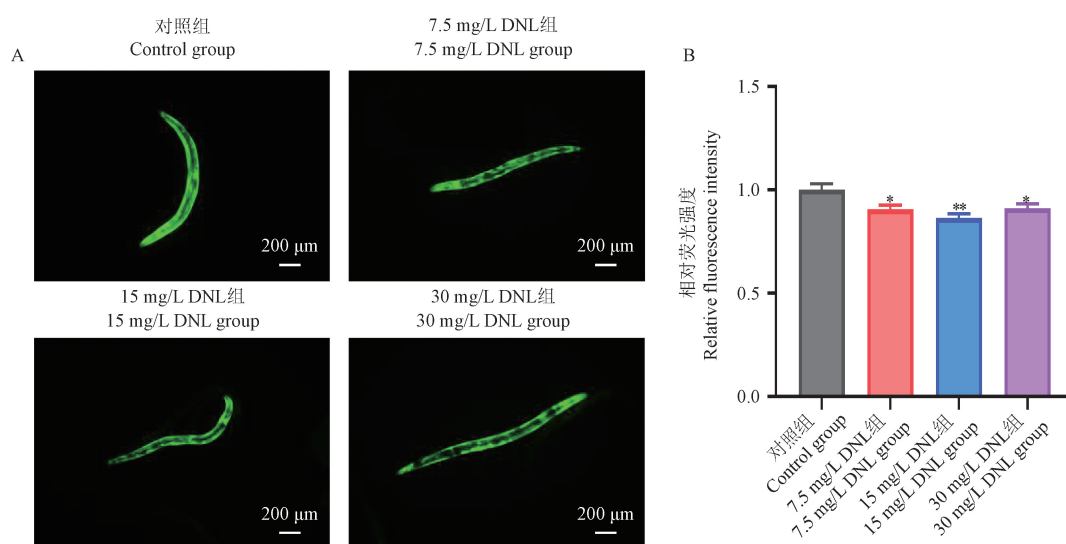


注:与对照组相比,#### $P < 0.0001$;与模型组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$ 。

图 1 DNL 改善 PD 线虫的运动能力

Note. Compared with Control group,#### $P < 0.0001$. Compared with Model group,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$.

Figure 1 DNL improved the motor capacity of PD *C. elegans*



注:A:各组荧光显微镜下 α -syn 聚集图像;B: α -syn 相对荧光强度。与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 2 DNL 改善 NL5901 线虫 α -syn 聚集

Note. A, Image of α -syn aggregation in each group under fluorescence microscope. B, Relative fluorescence intensity of α -syn. Compared with Control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

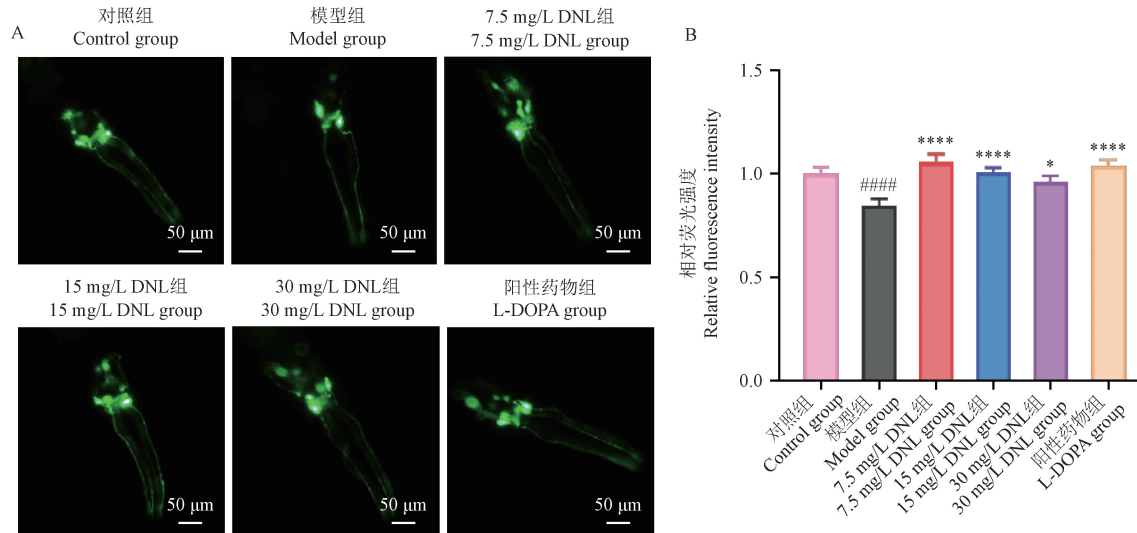
Figure 2 DNL decreased α -synuclein aggregation in NL5901 *C. elegans*

2.2 DNL 改善 NL5901 线虫 α -syn 聚集

当 α -syn 在 NL5901 线虫体内聚集时,可通过荧光显微镜观察 GFP。通过分析 α -syn 聚集情况,可确定 DNL 是否有抑制 α -syn 聚集的作用。与对照组相比,DNL 3 个浓度组 α -syn 聚集均减少 ($P < 0.05$)。提示 DNL 有效改善 NL5901 线虫体内的 α -syn 聚集(图 2)。

2.3 DNL 改善 6-OHDA 诱导的 BZ555 线虫多巴胺能神经元损伤

雌雄同体的 *C. elegans* 具有 8 个多巴胺能神经元,包括多巴胺能神经元前斜角神经元、头感觉神经元和后斜角神经元^[28]。*C. elegans* 的 DN 胞体丢失,以及神经元轴突消失、突起断裂、树突末梢退缩等都可以反映出线虫 DN 的损伤。BZ555 线虫的 DN 特异性表达 GFP,经 6-OHDA 暴露后可在线虫头部区域观察到 DN 形态异常。对 BZ555 DN 分析可确定 DNL 是否对线虫 DN 具有保护作用。如图 3 所示,与对照组相比,模型组 DN 荧光强度降低 14.86% ($P < 0.0001$),并且有神经元完整性的丧失,出现树突形状改变和缺失。与模型组相比,经 7.5、15 和 30 mg/L DNL 及阳性药物处理的线虫 DN 荧光强度分别增强 24.59%、18.70%、13.86%、22.47% ($P < 0.05$)。提示 DNL 能有效改善 6-OHDA 对线虫造成的



注: A: 各组荧光显微镜下多巴胺能神经元图像; B: 多巴胺能神经元相对荧光强度。与对照组相比, #### $P < 0.0001$; 与模型组相比, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ 。

图 3 DNL 改善 6-OHDA 诱导的 BZ555 线虫多巴胺能神经元损伤

Note. A, DNs images under fluorescence microscope in each group. B, Relative fluorescence intensity of dopaminergic neurons. Compared with Control group, #### $P < 0.0001$. Compared with Model group, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

Figure 3 Protection of DNL against 6-OHDA-induced DNs degeneration in BZ555 *C. elegans*

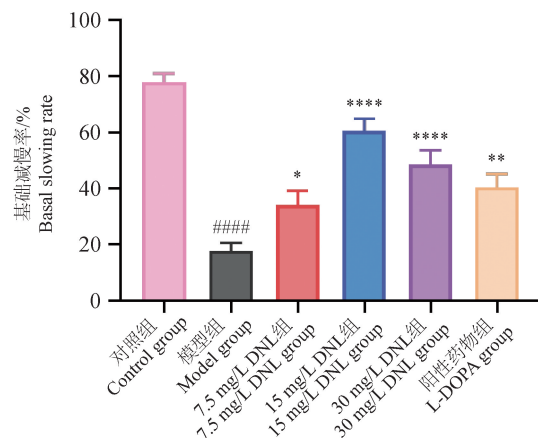
DNs 损伤, 对其具有保护作用。

2.4 DNL 提高 PD 线虫基础减慢率

DNs 的感知食物功能可以直接影响 *C. elegans* 的行为。正常摄食的线虫在有食物存在的平板中运动缓慢, 在没有细菌的培养板中运动较快。如果 DNs 破坏, 会降低在有食物存在的情况下线虫减慢运动速度的能力, 导致爬行速度加快^[22]。所以进行食物感知行为分析可以确定 DNL 是否对于 DNs 具有保护作用。经 6-OHDA 处理后, 与对照组相比, 模型组线虫基础减慢率下降了 77.20% ($P < 0.0001$), 7.5 mg/L DNL 组与模型组相比基础减慢率增加 ($P < 0.05$), 15 mg/L DNL 组和 30 mg/L DNL 组与模型组相比基础减慢率增加了 240.33% 和 173.19% ($P < 0.0001$), 阳性药物组与模型组相比基础减慢率增加了 127.87% ($P < 0.01$)。提示 DNL 有效改善 PD 线虫模型的食物感知行为, 具有保护其 DNs 的作用 (图 4)。

2.5 DNL 提高线虫寿命

在 N2 线虫中, 15 mg/L DNL ($P < 0.001$) 和 30 mg/L DNL ($P < 0.0001$) 均有效延长线虫寿命; 在经 6-OHDA 诱导的 PD 线虫中, DNL 各浓度组及



注: 与对照组相比, #### $P < 0.0001$; 与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图 4 DNL 提高线虫基础减慢率

Note. Compared with Control group, #### $P < 0.0001$. Compared with Model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

Figure 4 DNL improved slowing rate of *C. elegans*

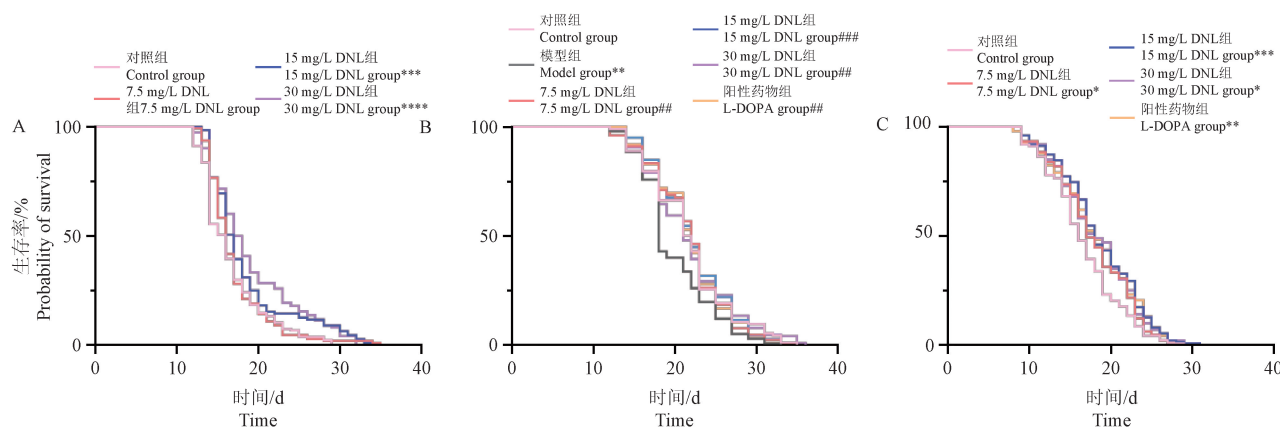
阳性药物组均有效提高线虫寿命 ($P < 0.01$), 其中 15 mg/L DNL 组效果最为明显 ($P < 0.001$); 在 NL5901 线虫中 DNL 各组及阳性药物组均有效提高线虫寿命 ($P < 0.05$), 其中 15 mg/L DNL 组效果最为明显 ($P < 0.001$)。说明 DNL 具有提高 N2 线

虫和 PD 线虫模型寿命的作用(图 5)。

2.6 DNL 提高经 6-OHDA 诱导的 PD4251 线虫线粒体密度

如图 6 所示,6-OHDA 导致 PD4251 线虫的线粒体密度降低。PD4251 线虫体壁和外阴肌肉中表达的荧光标记物的变化情况可以反映线粒体

表达变化情况。7.5 mg/L DNL 组与模型组相比,平均荧光强度提高 36.17% ($P<0.001$),15 mg/L、30 mg/L DNL 和 L-DOPA 处理后的线虫平均荧光强度分别提高 32.78%、28.36% 和 33.03% ($P<0.01$)。提示 DNL 可以改善 6-OHDA 引起的线粒体减少。

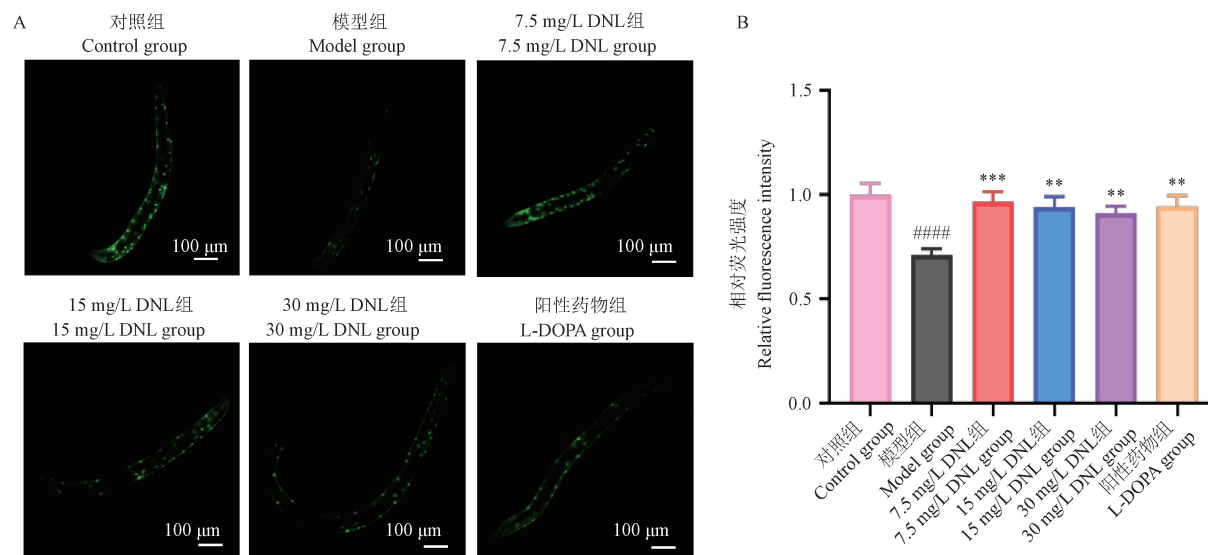


注:A:N2 野生型线虫生存率;B:6-OHDA 诱导的 PD 模型线虫生存率;C:NL5901 线虫生存率。与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$;与模型组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 5 DNL 提高线虫寿命

Note. A, Survival rate of N2 wild-type nematodes. B, Survival rate of 6-OHDA-induced PD model nematodes. C, Survival rate of the NL5901 model nematodes. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Compared with Model group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 5 DNL extended the lifespan of *C. elegans*



注:A:线粒体密度;B:相对荧光强度。与对照组相比,**** $P<0.0001$;与模型组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 6 DNL 提高经 6-OHDA 诱导的 PD4251 线虫线粒体密度

Note. A, Mitochondrial density. B, Relative fluorescence intensity. Compared with Control group, **** $P<0.0001$. Compared with Model group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 6 DNL increased mitochondrial density in PD4251 *C. elegans* induced by 6-OHDA

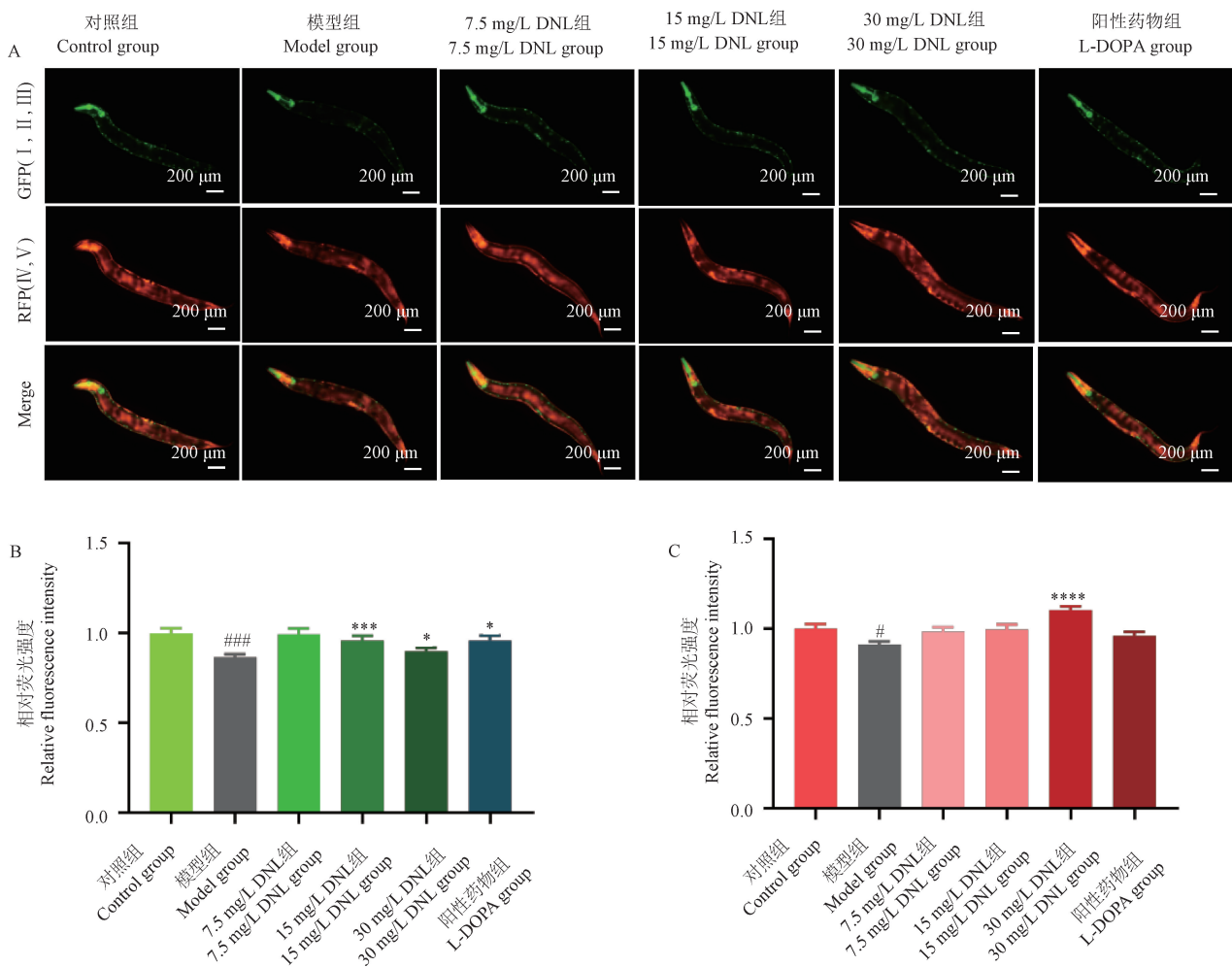
2.7 DNL 影响经 6-OHDA 诱导的 CB7272 线虫内膜蛋白水平

呼吸链复合物 I ~ V 是线粒体氧化还原反应与电子传递过程中重要的内膜蛋白,在线粒体的生理活动中发挥关键作用^[29]。在荧光显微镜下, CB7272 线虫的咽部和体壁可观察到由 GFP 标记的复合物 I、II、III,咽部和表皮可观察到由 RFP 标记的复合物 IV 和 V^[27]。与对照组相比,模型组 GFP ($P<0.001$) 和 RFP ($P<0.05$) 表达均减少。经 15、30 mg/L DNL 和 L-DOPA 处理后, GFP 平均荧光强度分别增加 14.86% ($P<0.001$)、10.70%

($P<0.05$)、10.83% ($P<0.05$); 经 30 mg/L DNL 处理后, RFP 平均荧光强度增加 20.74% ($P<0.0001$), 表明经 DNL 处理, 增加了经 6-OHDA 诱导 CB7272 线虫线粒体复合物 I~V 的表达(图 7)。

2.8 DNL 影响 6-OHDA 诱导的 N2 线虫 ROS、SOD 和 GSH 水平

结果如图 8 所示, 在 15 mg/L DNL 处理后, SOD 活性增加 47.02% ($P<0.05$), GSH 含量呈上升趋势。表明 DNL 可能通过提高线虫体内抗氧化酶水平和参与氧化还原反应, 间接改善 PD 模型线虫的神经运动症状。

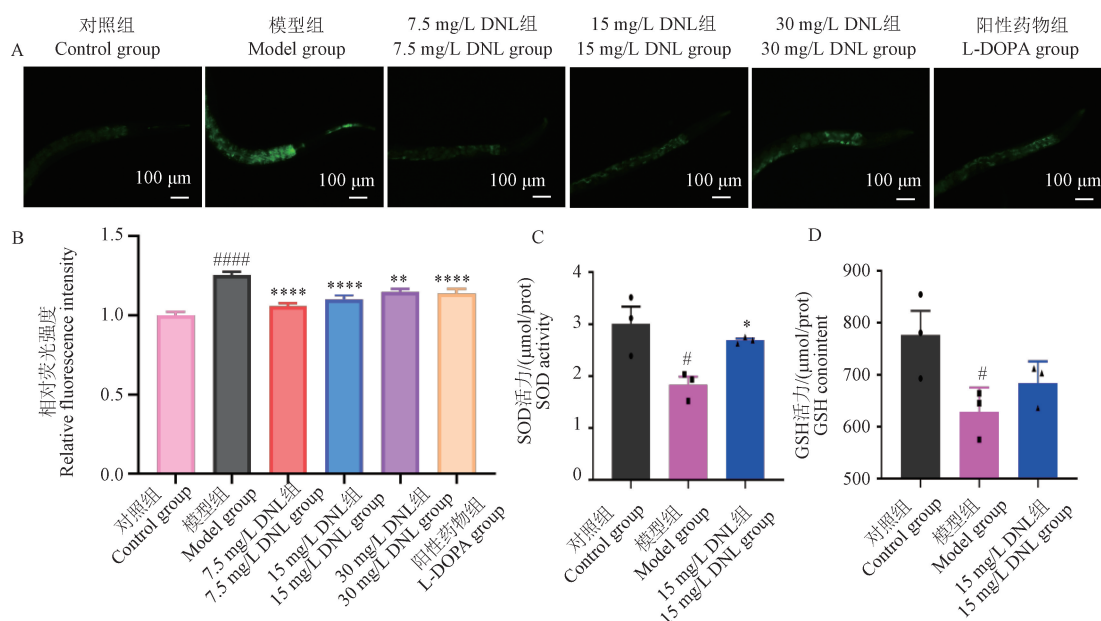


注: A: CB7272 线虫 GFP、RFP 通道下线粒体呼吸链复合物 I ~ V 表达情况; B: GFP 相对荧光强度; C: RFP 相对荧光强度。与对照组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$; 与模型组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图 7 DNL 影响经 6-OHDA 诱导的 CB7272 线虫内膜蛋白水平

Note. A, Expression of mitochondrial respiratory chain complex I to V in GFP and RFP channels of CB7272. B, Relative fluorescence intensity of GFP. C, Relative fluorescence intensity of RFP. Compared with Control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$. Compared with Model group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

Figure 7 DNL affected the protein levels of CB7272 *C. elegans* induced by 6-OHDA



注:A:ROS 荧光图像;B:ROS 相对荧光强度;C:SOD 活力;D:GSH 含量。与对照组相比, # $P<0.05$, #### $P<0.0001$;与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

图 8 DNL 影响 6-OHDA 诱导的 N2 线虫 ROS、SOD 和 GSH 水平

Note. A, ROS fluorescence image. B, Relative fluorescence intensity of ROS. C, SOD activity. D, GSH content. Compared with Control group, # $P<0.05$, #### $P<0.0001$. Compared with Model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

Figure 8 DNL affected levels of ROS, SOD and GSH in 6-OHDA-induced N2 *C. elegans*

3 讨论

将 DNL 作用于 PD 模型动物 *C. elegans*, 得到的结果展现了 DNL 对其的保护作用, 包括抑制 α -syn 的聚集、减少线虫神经元的破坏程度和延长线虫的寿命等。

PD 患者的临床症状表现为动作迟缓、强直、震颤和姿势稳定性降低, 患者脑神经元内形成路易小体和缺失黑质 DN 是主要病理特征。研究发现当至少 50% 的黑质 DN 和 70% 壳核多巴胺能组织内容物缺失时, 就会出现典型的运动迟缓特征^[30]。 α -syn 基因是最早发现与帕金森病相关的基因^[31], 也是研究最广泛的 PD 相关常染色体显性遗传基因^[2,31]。 α -syn 作为 PD 的病理学标志物, 是路易小体的主要成分, 也是导致发病的重要因素。PD 的发病机制与线粒体功能的缺失与否有关。6-OHDA 会诱导细胞的线粒体自噬^[32], 引起线粒体断裂^[33]。经 6-OHDA 诱导, *C. elegans* 体内引起氧化应激, α -syn 聚集, ROS 急剧增加, ROS 作用于脂肪酸产生过氧化脂质, 并通过干扰线粒体呼吸链降低 ATP 水平导致细

胞死亡^[34]。ROS 受到多种内源性氧化酶的严密调控, 如 SOD 和 GSH 等, 若机体的抗氧化能力降低与 ROS 的产生不平衡, 也会导致细胞损伤引起细胞凋亡^[35]。

目前 PD 的药物治疗方法是用 L-DOPA 来替代多巴胺, 但是随着疾病的发展, 多巴胺能神经元损耗逐渐增加, 需要的药物剂量也越大, 并且较多的 DN 缺失和高剂量的 L-DOPA 组合会导致 PD 患者出现各种运动障碍的并发症^[36-37]。研究发现, DNL 具有生物碱、倍半萜、菲和联苄类等高活性药物成分^[38], 已有报道其在抗肿瘤^[39]、抗衰老^[38,40]等疾病方面的作用。网络药理学研究表明 DNL 具有 PD 相关靶点^[41], 对 PD 小鼠有一定的神经保护作用, 具有缓解运动障碍和降低炎症因子的作用^[21]。

本实验探究了 DNL 对秀丽隐杆线虫 PD 模型 NL5901 体内 α -syn 沉积的影响, 结果显示给药组线虫体内荧光蛋白和 unc-119 融合蛋白的荧光减弱, 证明 DNL 可以有效抑制 α -syn 的聚集。DN 减少也是帕金森病重要的病理特征之一, 它的缺损能导致发病体产生渐进性运动缺陷^[42]。

本研究选择了能很好观测多巴胺能神经元变化的 BZ555 线虫。DNs 的感知食物功能可以直接影响秀丽隐杆线虫的行为。如果线虫 DNs 破坏,有食物存在的情况下线虫减慢运动速度的能力会降低。对线虫进行食物感知行为分析,结果显示 DNL 可以抑制由 6-OHDA 诱导的线虫体内 DNs 的破坏,体现了其对线虫的神经保护作用。秀丽隐杆线虫的运动方式是一种类似于正弦波动的身体摆动,利用与运动方向相反的背腹身体弯曲来产生反向推力,通过检测线虫的身体弯曲频率可以直观判断药物是否对线虫运动能力产生影响^[34]。运动测试结果表明 DNL 对身体弯曲频率有一定的提高作用,表明其可以改善 PD 进程中线虫的运动能力。

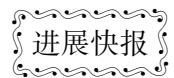
线粒体密度和线粒体呼吸链复合物检测结果显示 DNL 增加 PD 线虫线粒体密度和线粒体复合物的表达。ROS、SOD 和 GSH 检测结果提示 DNL 可能通过提高 PD 线虫的氧化酶水平,增加抗氧化应激能力,从而减少 ROS 生成,减少细胞损伤,改善 PD 相关的神经行为。综上,本研究以秀丽隐杆线虫为模式生物,通过考察线虫的 α -syn 聚集 DNs 损伤、运动能力、寿命及线粒体、活性氧、氧化酶等指标,证明 DNL 对帕金森病模型线虫具有抗氧化应激,保护神经、延长寿命的作用。本实验为后续的研究工作储备了重要铺垫。

参考文献:

- [1] RAY DORSEY E, SHERER T, OKUN M S, et al. The emerging evidence of the parkinson pandemic [J]. J Parkinsons Dis, 2018, 8(s1): S3-S8.
- [2] TOLOSA E, GARRIDO A, SCHOLZ S W, et al. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease [J]. Lancet Neurol, 2021, 20(5): 385-397.
- [3] TANNER C M, OSTREM J L. Parkinson's disease [J]. N Engl J Med, 2024, 391(5): 442-452.
- [4] MONZIO COMPAGNONI G, DI FONZO A, CORTI S, et al. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: the lesson from Alzheimer's disease and Parkinson's disease [J]. Mol Neurobiol, 2020, 57(7): 2959-2980.
- [5] CORSI A K, WIGHTMAN B, CHALFIE M. A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 2015, 200(2): 387-407.
- [6] SCHAFER W R. Neurophysiological methods in *C. elegans*: an introduction [EB/OL]. (2006-06-02) [2024-11-28]. http://www.wormbook.org/chapters/www_intromethodsneurophys/intromethodsneurophys.html.
- [7] YE H Y, YE B P, WANG D Y. Molecular control of memory in nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Neurosci Bull, 2008, 24(1): 49-55.
- [8] MICHALSKI A I, JOHNSON T E, CYPSEK J R, et al. Heating stress patterns in *Caenorhabditis elegans* longevity and survivorship [J]. Biogerontology, 2001, 2(1): 35-44.
- [9] COOPER J F, VAN RAAMSDONK J M. Modeling Parkinson's disease in *C. elegans* [J]. J Parkinsons Dis, 2018, 8(1): 17-32.
- [10] BRUCKER NOURSE J Jr, RUSSELL S N, MONIZ N A, et al. Integrated regulation of dopaminergic and epigenetic effectors of neuroprotection in Parkinson's disease models [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(7): e2210712120.
- [11] WANG C, YANG M, LIU D. Metabolic rescue of α -synuclein-induced neurodegeneration through propionate supplementation and intestine-neuron signaling in *C. elegans* [J]. Cell Rep, 2024, 43(3): 113865.
- [12] 张晓敏, 孙志蓉, 陈龙, 等. 金钗石斛的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(7): 895-899.
- [13] 汪家文, 吴君, 王承飞, 等. 金钗石斛水提物通过调节 APP/PS1 小鼠突触可塑性及胶质细胞激活缓解学习记忆损伤 [J]. 重庆医科大学学报, 2023, 48(10): 1208-1214.
- [14] 李菲, 刘波, 石京山, 等. 金钗石斛总生物碱抑制海马 tau 蛋白的过度磷酸化 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 752.
- [15] LI F, LIU B, SHI J S, et al. Total alkaloids of *Dendrobium nobile* inhibit hyperphosphorylation of tau protein in hippocampus [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2019, 33(9): 752.
- [16] FAN C, SUN X, WANG X, et al. Therapeutic potential of the chemical composition of *Dendrobium nobile* Lindl [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1163830.
- [17] 曾艺芸, 聂雪婷, 李振坚, 等. 中药石斛黄酮活性成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 197

- 206.
- ZENG Y Y, NIE X T, LI Z J, et al. Research progress on active ingredients of flavonoids in traditional Chinese medicine *Dendrobium* [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(6): 197-206.
- [17] LUO A, HE X, ZHOU S, et al. Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl [J]. Carbohydr Polym, 2010, 79(4): 1014-1019.
- [18] LI D D, ZHENG C Q, ZHANG F, et al. Potential neuroprotection by *Dendrobium Nobile* Lindl alkaloid in Alzheimer's disease models [J]. Neural Regen Res, 2022, 17(5): 972-977.
- [19] ZHOU J, ZHANG Y, LI S, et al. *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids-mediated protection against CCl₄-induced liver mitochondrial oxidative damage is dependent on the activation of Nrf2 signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110351.
- [20] XIAN S, YANG Y, NAN N, et al. Inhibition of mitochondrial ROS-mediated necroptosis by *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids in carbon tetrachloride induced acute liver injury [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 330: 118253.
- [21] 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 M D, WEI S S, 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.
- [22] CHALORAK P, SANGUANPHUN T, LIMBOONREUNG T, et al. Neurorescue effects of frondoside A and ginsenoside Rg3 in *C. elegans* model of Parkinson's disease [J]. Molecules, 2021, 26(16): 4843.
- [23] MA C, FENG Y, LI X, et al. Potential therapeutic effects of policosanols from insect wax on *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2023, 18(1/2): 127-144.
- [24] CHANG C H, WEI C C, HO C T, et al. N-γ-(L-glutamyl)-L-selenomethionine shows neuroprotective effects against Parkinson's disease associated with SKN-1/Nrf2 and TRXR-1 in *Caenorhabditis elegans* [J]. Phytomedicine, 2021, 92: 153733.
- [25] HE C L, TANG Y, WU J M, et al. Chlorogenic acid delays the progression of Parkinson's disease via autophagy induction in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nutr Neurosci, 2023, 26(1): 11-24.
- [26] CAO Z, WU Y, CURRY K, et al. *Ginkgo Biloba* extract EGb 761 and Wisconsin Ginseng delay sarcopenia in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2007, 62(12): 1337-1345.
- [27] 叶永丽, 张晓娟, 唐莉莉, 等. 基于氧化应激和线粒体功能障碍的伏马毒素 B1 诱导线虫神经毒性机制 [J]. 食品与生物技术学报, 2024, 43(3): 26-35.
- YE Y L, ZHANG X J, TANG L L, et al. Mechanism investigation of neurotoxicity of *Caenorhabditis elegans* induced by fumonaxin B1-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunction [J]. J Food Sci Biotechnol, 2024, 43(3): 26-35.
- [28] LIMKE A, SCHARPF I, BLESING F, et al. Tire components, age and temperature accelerate neurodegeneration in *C. elegans* models of Alzheimer's and Parkinson's disease [J]. Environ Pollut, 2023, 328: 121660.
- [29] YANG R, LI Y, WANG Y, et al. NHR-80 senses the mitochondrial UPR to rewire citrate metabolism for lipid accumulation in *Caenorhabditis elegans* [J]. Cell Rep, 2022, 38(2): 110206.
- [30] WINSLOW A R, CHEN C W, CORROCHANO S, et al. α-synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease [J]. J Cell Biol, 2010, 190(6): 1023-1037.
- [31] SIDRANSKY E, LOPEZ G. The link between the GBA gene and Parkinsonism [J]. Lancet Neurol, 2012, 11(11): 986-998.
- [32] DAGDA R K, ZHU J, KULICH S M, et al. Mitochondrially localized ERK2 regulates mitophagy and autophagic cell stress: implications for Parkinson's disease [J]. Autophagy, 2008, 4(6): 770-782.
- [33] GOMEZ-LAZARO M, BONEKAMP N A, GALINDO M F, et al. 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells [J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44(11): 1960-1969.
- [34] TSALIK E L, HOBERT O. Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Neurobiol, 2003, 56(2): 178-197.
- [35] SINGLETON A B, FARRER M, JOHNSON J, et al. Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease [J]. Science, 2003, 302(5646): 841.
- [36] THANVI B, LO N, ROBINSON T. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: clinical features, pathogenesis, prevention and treatment [J]. Postgrad Med J, 2007, 83(980): 384-388.
- [37] SEPPI K, RAY CHAUDHURI K, COELHO M, et al. Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease-an evidence-based medicine review [J]. Mov Disord, 2019, 34(2): 180-198.
- [38] NIE X, CHEN Y, LI W, et al. Anti-aging properties of *Dendrobium nobile* lindl. from molecular mechanisms to potential treatments [J]. J Ethnopharmacol, 2020,

- 257: 112839.
- [39] 刘杰, 刘绍欢, 陈岩勤, 等. 基于糖酵解的金钗石斛乙醇提取物抗肺癌的药理机制研究 [J]. 中国新药与临床杂志, 2022, 41(9): 566-572.
- LIU J, LIU S H, CHEN Y Q, et al. Pharmacological mechanism of anti-lung cancer of *Dendrobium nobile* ethanol extract through glycolysis [J]. Chin J New Drugs Clin Remedies, 2022, 41(9): 566-572.
- [40] LI L S, LU Y L, NIE J, et al. *Dendrobium nobile* Lindl alkaloid, a novel autophagy inducer, protects against axonal degeneration induced by A β 25-35 in hippocampus neurons *in vitro* [J]. CNS Neurosci Ther, 2017, 23(4): 329-340.
- [41] 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.
- DUAN C C, WANG Q C, ZHAO Z F, et al. Analysis of the pharmacodynamic material basis and mechanism of *Dendrobium nobile* in the treatment of nervous system diseases using integrative network pharmacology [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(13): 1-10.
- [42] LAKSO M, VARTIAINEN S, MOILANEN A M, et al. Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein [J]. J Neurochem, 2003, 86(1): 165-172.
- [收稿日期] 2024-11-28



用丝状穿孔法成功评估小鼠弥漫性蛛网膜下腔出血的简单程序

蛛网膜下腔出血(SAH)小鼠模型是研究分子和细胞机制的重要实验工具,血管内丝穿孔技术可用于模拟人类SAH后观察到的突出病理生理特征;然而,目前评估合适SAH模型的验证方法有限。在此,我们介绍一种选择弥漫性SAH小鼠模型的简单程序。采用标准的丝状穿孔法诱导24只小鼠发生SAH。在确认小鼠存活24 h后,根据全脑磁共振成像(MRI)的T2*加权图像和透过硬脑膜对尾状脑室(CM)的肉眼观察,将SAH评为0-1。基于CM的SAH分级与提取脑定义的参考参数有很好的相关性($r^2=0.53$, $P<0.0001$)。接收器操作特征曲线显示,检测弥漫性SAH的灵敏度为85%,特异性为91%,曲线下面积(0.89 ± 0.06 (平均标准误差))与基于MRI的分级(0.72 ± 0.10 , $P=0.12$)相似。我们的数据表明,在CM中确认SAH血栓是选择与临床相关的弥漫性SAH模型的重要方法,可用于未来的实验研究。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2024, 7(1): 77-81. doi: 10.1002/ame2.12372)。