

甘草黄酮对 MPTP 帕金森病模型小鼠的神经保护效应
及对小胶质细胞活化的影响

陈浩^{1,2}, 师亮², 王燕宏¹, 景玮¹, 张宇新³, 李新毅^{*}

(1. 山西医学科学院 & 山西大医院 神经内科, 太原 030032;
2. 山西医科大学 基础医学院, 太原 030001; 3. 河北联合大学 基础医学院, 河北 唐山 063000)

[摘要] **目的:**观察甘草黄酮对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)帕金森病(PD)小鼠多巴胺(DA)能神经元数量和黑质小胶质细胞活化的影响。**方法:**制作 MPTP 小鼠 PD 模型,随机分为 6 组:空白组、模型组、左旋多巴组(1 次/d ig 给予 40 mg·kg⁻¹左旋多巴,1 次/d,连续 7 次)和 10,20,30 mg·kg⁻¹甘草黄酮处理组(ig 给予不同浓度的甘草黄酮,1 次/d 连续 7 次)。采用行为学观察、免疫组织化学和免疫蛋白印迹法,观察 PD 模型小鼠的行为学表现、DA 能神经元数量、黑质致密部 OX-6 阳性细胞(活化的小胶质细胞)数量和腹侧中脑酪氨酸羟化酶(TH)蛋白表达水平。**结果:**模型组小鼠出现 PD 典型行为学表现,黑质致密部 DA 能神经元和腹侧中脑 TH 含量较对照组分别下降约 62% 和 76%;同时黑质致密部 OX-6 阳性细胞数量大幅升高($P<0.01$)。经过甘草黄酮处理后,小鼠行为表现、黑质致密部 DA 能神经元丢失和 OX-6 阳性细胞数量增加均较模型组改善,尤以 30 mg·kg⁻¹甘草黄酮组最为明显。与对照组相比,30 mg·kg⁻¹甘草黄酮组小鼠黑质致密部 DA 能神经元和腹侧中脑 TH 含量仅下降约 36% 和 42%;而与模型组相比,黑质致密部 OX-6 阳性细胞数量下降明显($P<0.01$)。与左旋多巴组相比,30 mg·kg⁻¹甘草黄酮组 TH 阳性神经元数量也明显增多($P<0.01$),同时 OX-6 阳性细胞数量也显著减少($P<0.01$)。**结论:**甘草黄酮对 MPTP 帕金森病小鼠 DA 能神经元具有神经保护效应;可能与其抑制黑质内小胶质细胞活化有关。

[关键词] 帕金森病;甘草黄酮;多巴胺;酪氨酸羟化酶;OX-6
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0225-05
[doi] 10.11653/syfy2013200225

Neuroprotective Effect of Licorice Flavonoids on MPTP-induced
Mouse Models with Parkinson's Disease and
Influence on Microglia Activation

CHEN Hao^{1,2}, SHI Liang², WANG Yan-hong¹, JING Wei¹, ZHANG Yu-xin³, LI Xin-yi^{1*}

(1. Department of Neurology, Shanxi Academy of Medical Sciences &
Shanxi Dayi Hospital, Taiyuan 030032, China;
2. Department of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;
3. Department of Basic Medicine, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the neuroprotection of licorice flavonoids on dopamine (DA) neurons and the influence of microglia activation of the substantia nigra compact (SNc) in the mice with Parkinson's disease (PD). **Method:** The PD mouse models were established by 1, 2, 3, 6-Tetrahydro-1-methyl-4-phenylpyridine; 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) and the mice were randomly divided into 6 group: control group, model group, levodopa group (40 mg · kg⁻¹), 10, 20, 30 mg · kg⁻¹ licorice flavonoids group. The drugs were intragastrically perfused to the mice daily for 7 consecutive times. The number of

[收稿日期] 20130805(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173455);山西省自然科学基金项目(2008011079-2);山西医科大学大学生创新基金(201419)

[第一作者] 陈浩,博士,主治医师,从事神经退行性疾病的防治,Tel:0351-4064312,E-mail:1403352675@qq.com

[通讯作者] *李新毅,博士,主任医师,从事神经退行性疾病的防治 Tel:0351-8379126 E-mail:1403352675@qq.com

OX-6 immunoreactive cells and DA neurons in the SNc, and the expression level of tyrosine hydroxylase (TH) in ventral midbrain were studied by immunohistochemical analysis and Western blot, and behavior changes were noticed after levodopa or licorice flavonoids treatment. **Result:** Compared with control mice, the PD mice had the typical behaviors of PD, and the number of DA neurons in SNc and the level of TH in ventral midbrain decreased by about 62% and 76%. Meanwhile the number of the OX-6-positive cells in SNc increased markedly ($P < 0.01$). After administered by licorice flavonoids, behavioral symptoms, reduction of DA neurons and increase of OX-6 positive cells in SNc were improved by licorice flavonoids. Especially in $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ licorice flavonoids group, those mice with PD had slight behavioral symptoms, and the number of DA neurons in SNc and the expression level of TH in ventral midbrain declined by only about 36% and 42% in compared with the control. Compared with those PD mice without licorice flavonoids, the number of the OX-6 positive cells in the SNc of $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ licorice flavonoids group was obviously down-regulated ($P < 0.01$). Compared with those in the levodopa group, the increasing of the number of DA neurons and the decreasing of the number of OX-6 positive cells in $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ licorice flavonoids group were significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** These results indicated the neuroprotection effect of licorice flavonoids on DA neurons of SNc in PD mice, and the inhibition of the microglia activation by licorice flavonoids might be responsible for it.

[**Key words**] Parkinson's disease; licorice flavonoids; dopamine; tyrosine hydroxylase; OX-6

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是最常见的神经系统变性疾病之一,在我国 65 岁以上人群中发病率高达 2%,占全球 PD 患者总数 40% 以上。PD 发病机制未明,以中脑黑质多巴胺(Dopamine, DA)能神经元选择性、进行性变性丢失为主要病理特点。近年来炎症反应在 PD 发病过程中的作用逐渐被人们认识和关注^[1-3]。虽然传统左旋多巴替代治疗和某些非甾体抗炎药也能减轻患者临床症状,但并不能阻止疾病进展,长期用药还会出现严重不良反应^[4-6]。甘草是历史悠久广泛使用的传统中药之一^[7],常被用于治疗 PD 的中药复方。甘草黄酮是甘草所含两大主分中最具生物活性的一种^[8],甘草黄酮能否减少 DA 能神经元丢失?目前尚未见文献报道。笔者制作 MPTP 帕金森病小鼠模型^[9],采用酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)标记 DA 能神经元,观察甘草黄酮对 DA 能神经元的影响以及对黑质炎症反应的影响,以期为今后探讨 PD 的防治策略提供新思路。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 C57BL/6N 小鼠 90 只,8~12 周龄,体重 18~23 g,购于山西医科大学实验动物中心许可证号 SCXK(晋)2002-0003,自由进食饮水,室温(25 ± 2)℃,单笼喂养,自然光照。

1.2 药物与试剂 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)和小鼠抗 TH 单克隆抗体购于 Sigma 公司,小鼠抗 OX-6 单克隆抗体购于 BD 公司,SP 超敏试剂盒购于福州迈新生物公司。甘草黄酮购于中国

食品药品检验研究院,经 HPLC 测定含黄酮 50% 以上。左旋多巴注射液购于上海福达制药公司(药准字 H31022793)。

1.3 仪器 切片及展片机(Leica 公司),光学显微镜(Olympus 公司),稳压恒流电泳仪 DYC-40C、半干式转移电泳槽 DYY-8B(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 动物分组和模型制备 实验动物随机分为 6 组,每组 15 只。模型组:ip 给予 MPTP($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 盐水溶),1 次/d,连续 5 d^[9];甘草黄酮处理组及左旋多巴组:造模同时每日分别 ig 给予不同浓度的甘草黄酮($10, 20, 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[10]或左旋多巴($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),与 MPTP 间隔 6 h,造模后再分别再给予 2 次,间隔 8 h;空白对照组:注射等体积盐水。于每次注射后 2 h,观察小鼠行为变化。

2.2 黑质致密部 TH 和 OX-6 阳性神经元免疫组化法检测 小鼠麻醉,用多聚甲醛($40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)灌注固定,取脑标本后置于多聚甲醛($40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)中固定 3 d,然后放入含蔗糖($200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)的磷酸盐缓冲液,待组织下沉,用冰冻切片机切取脑片($10 \mu\text{m}$ 厚)。3% H_2O_2 封闭,PBS 漂洗,牛 BSA 液($30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)孵育 1 h,滴加小鼠抗 TH 单克隆抗体(1:1 000)或小鼠抗 OX-6 单克隆抗体(1:250),4℃ 过夜,PBS 冲洗,按试剂盒使用说明滴加 SP 超敏试剂盒,DAB 显色,封片,光镜下照相观察。每组每只动物取 3 张黑质部脑片,随机取 10 个高倍视野,进行黑质致密部细胞计数。

2.3 小鼠腹侧中脑 TH 蛋白相对表达量检测 用 Weetern blot 法在体视镜下切取小鼠脑组织腹侧中脑部分,分别将各组标本匀浆,提取总蛋白,蛋白定量,取 15 μ L 样品加入等体积 2 $\times$ 上样缓冲液,煮沸 5 min 备用。取 100 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后,转至硝酸纤维素膜,脱脂奶粉封闭液孵育 2 h,加入小鼠抗 TH 单克隆抗体(1:1 500)(β -actin 为内参),4 $^{\circ}$ C 过夜,漂洗后与辣根过氧化物酶标记的二抗结合,化学发光显色。使用光密度分析软件进行目的条带检测及分析。

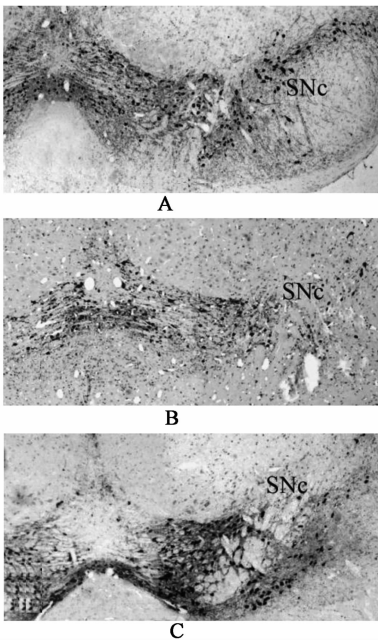
2.4 统计分析 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件,两均数比较经方差齐性检验后,方差齐者用 t 检验,方差不齐者用 t 检验;多组之间的两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 PD 模型行为学观察 模型小鼠于第 1 次注射 MPTP 后 0.5~1 h 均出现不同程度的震颤、竖毛、翘尾等表现;最后 1 次注射后,模型鼠出现动作减少、倦卧、尾僵直、细小震颤等症状。左旋多巴组和甘草黄酮处理组小鼠的行为学表现较模型组小鼠减轻,且症状的持续时间较短,尤以 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甘草黄酮组和左旋多巴组最为明显;空白对照组小鼠活动如前,未见有上述表现。

3.2 黑质致密部 TH 阳性神经元和 OX-6 阳性神经元 免疫组化检测空白对照组小鼠黑质致密部可见大量 TH 阳性神经元,排列整齐,呈条带状(图 1A),偶见有 OX-6 阳性细胞(图 2A)。与空白对照组相比,模型组小鼠黑质 TH 阳性神经元数量减少约 62%(图 1B,表 1);同时在黑质致密部可见大量散在分布的 OX-6 阳性细胞(49.3 ± 5.1 vs 2.2 ± 0.8)($P < 0.01$,图 2B)。甘草黄酮处理组小鼠黑质 TH 阳性神经元的缺失较模型组减轻,黑质致密部 OX-6 阳性细胞数量也较模型组减少,尤以 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甘草黄酮组最为明显,TH 阳性神经元仅较对照组减少约 36%(图 1C,表 1),OX-6 阳性细胞数量也较模型组明显减少($P < 0.01$)(图 2C,表 1)。与左旋多巴组相比,30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甘草黄酮组 TH 阳性神经元数量也明显增多($P < 0.01$),同时 OX-6 阳性细胞数量也显著减少($P < 0.01$)(表 1)。

3.3 腹侧中脑 TH 蛋白相对表达 在预染蛋白标准 M_r 61 000 处,可见 TH 特异性蛋白条带。灰度分析发现,与对照组相比,模型组小鼠腹侧中脑 TH 含量下降约 76%;经甘草黄酮处理后,腹侧中脑 TH 含



A. 对照组; B. 模型组; C. 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甘草黄酮组(图 2 同)

图 1 甘草黄酮对 MPTP 帕金森病小鼠黑质致密部 TH 阳性神经元的影响(免疫组织化学检测,SABC, $\times 40$)

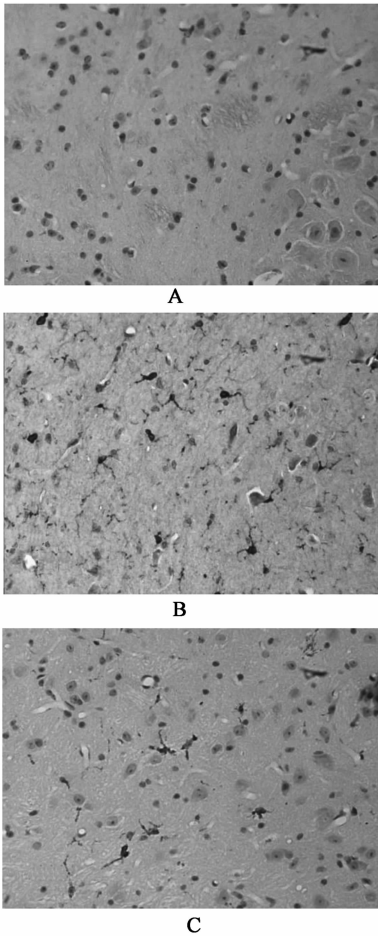


图 2 甘草黄酮对 MPTP 帕金森病小鼠黑质致密部 OX-6 阳性神经药的影响(免疫组织化学检测,SABC, $\times 100$)

表 1 甘草黄酮对 MPTP 帕金森病小鼠黑质致密部 OX-6 和 TH 阳性细胞的数量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	阳性细胞数/个	
		OX-6	TH
对照	—	2.2 ± 0.8	152.4 ± 8.6
模型	—	49.3 ± 5.1 ¹⁾	56.2 ± 3.5 ¹⁾
左旋多巴	40	39.4 ± 6.2	76.6 ± 4.8 ^{1,2)}
甘草黄酮	10	34.8 ± 5.8 ^{1,2)}	71.5 ± 5.2 ^{1,2)}
	20	26.5 ± 4.6 ^{1,2,3)}	82.4 ± 5.6 ^{1,2,3)}
	30	11.2 ± 4.1 ^{1,2,3)}	95.2 ± 5.9 ^{1,2,3)}

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$; 与左旋多巴组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

量减少被改善,尤以 30 mg·kg⁻¹甘草黄酮组最为显著,仅较对照组下降约 42% (图 3)。

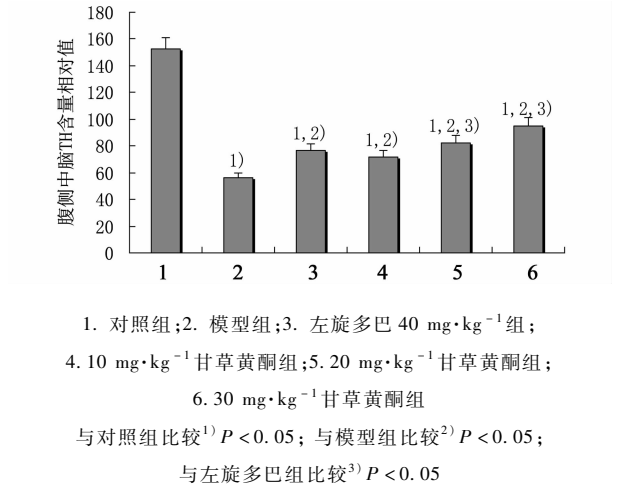


图 3 甘草黄酮对 MPTP 帕金森病小鼠腹侧中脑 TH 蛋白相对含量的影响 (免疫印迹法, $\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

PD 又名震颤麻痹,是由于中脑黑质 DA 能神经元进行性变性丢失,进而出现运动迟缓、静止震颤、强直等运动症状的神经变性疾病。本实验中,模型组小鼠黑质致密部 DA 能神经元数量减少,腹侧中脑 TH 蛋白含量降低,同时伴有 PD 典型的行为学表现,而给予左旋多巴后症状明显好转,说明本实验建立的动物模型符合要求。近年来对 PD 尸检标本和患者脑脊液、黑质纹状体等样本的检测及大量对 6-羟基多巴胺、脂多糖、MPTP 等多种 PD 动物实验和体外细胞模型研究表明:炎症反应与 DA 能神经元变性死亡密切相关^[1-3];流行病学调查也显示某些非甾体抗炎药能降低罹患 PD 的风险,但长期用药会产生严重不良后果^[4-5]。小胶质细胞是脑内起主要作用的免疫细胞。在成熟的中枢神经系统,小胶

质细胞分布并不均匀,中脑黑质中小胶质细胞最为密集^[11]。小胶质细胞过度激活及其产生的炎症因子、自由基等被认为是诱发脑内炎症反应,导致 DA 能神经元选择性丢失的主要原因^[2,6,11-12]。我们用只标记激活的小胶质细胞的 OX-6^[13]来显示模型动物脑内的炎症状态,结果发现模型组小鼠黑质致密部活化的小胶质细胞数量较对照组显著增多,同时存在黑质 DA 能神经元大量丢失和腹侧中脑 TH 蛋白含量降低。提示炎症反应也参与 MPTP 帕金森病小鼠 DA 能神经元的丢失过程,同时也进一步表明本实验造模的成功性。

甘草是具有上千年历史、广泛使用的传统中草药之一,具有清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛等功效^[7]。在近年来公开发表的 62 首治疗 PD 中药复方中,甘草是第 2 位常用中药,使用频率高达 40%^[8,14]。提示甘草可能具有潜在的抗 PD 功效。但是目前有关甘草活性成分对 PD 发病过程中 DA 能神经元的影响,及对脑内炎症反应的影响鲜见有报道。甘草黄酮是甘草所含两大主分中最具生物活性的一种,比甘草具有更强的药理学活性^[8]。本研究用甘草黄酮处理 MPTP 帕金森病小鼠,发现甘草黄酮处理组小鼠黑质致密部 DA 能神经元丢失,腹侧中脑 TH 蛋白含量下降及行为学表现等均较模型组小鼠有显著改善。说明甘草黄酮能够对抗 MPTP 所致的 DA 能神经元减少;甘草抗 PD 的神经保护效应可能与其活性成分——甘草黄酮有关。而左旋多巴虽然能改善 PD 小鼠行为表现,但对 DA 能神经元的保护效果差于甘草黄酮。在急性或慢性关节炎、肠炎等疾病的研究中,甘草及甘草黄酮在体内或者体外都表现出很好的抗炎效果^[11,15]。鉴于炎症反应与 DA 能神经元变性丢失之间的密切关系,本研究观察了甘草黄酮处理 MPTP 帕金森病小鼠后黑质致密部小胶质细胞的活化情况,结果显示小鼠黑质致密部活化的小胶质细胞数量较模型组有显著减少。而左旋多巴虽然能改善 PD 小鼠行为表现,但在抑制小胶质细胞激活方面作用弱于甘草黄酮。上述实验结果提示甘草黄酮可以抑制小胶质细胞活化,从而抑制炎症反应;甘草黄酮对 DA 能神经元的保护效应可能与此有关。但是否有甘草黄酮其他生物学机制参与^[8],以及长期用药的安全性尚有待于进一步研究。

尽管甘草黄酮对 PD 神经保护效应的具体机制以及是否存在不良反应尚未完全阐明,但本实验结果似可提示,甘草黄酮可减轻 PD 发病过程中脑内

炎症反应,减少 DA 能神经元进行性变性。甘草及其提取物甘草黄酮可能成为预防和治疗 PD 的新辅助药物选择之一。

[参考文献]

[1] Teismann P, Vila M, Choi D K, et al. COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003,991:272.

[2] McGeer P L, McGeer E G. Glial reactions in Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2008, 23 (4):474.

[3] 孙圣刚,黎钢,曹学兵,等. 帕金森病与炎症反应关系研究进展 [J]. *中华神经科杂志*, 2003, 36 (6):401.

[4] Talene A, Yacoubian M D, David G, et al. Targets for neuroprotection in parkinson's Disease [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2009,1792(7):676.

[5] Samii A, Etminan M, Wiens M O, et al. NSAID use and the risk of Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. *Drugs Aging*, 2009,26(9):769.

[6] 张美蓉,孙芳玲,艾厚喜,等. 帕金森病的炎症及抗炎药物的研究进展[J]. *中国康复理论与实践*, 2012,18(11):1040.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005: 59.

[8] Zhang Q, Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice) [J]. *J Chromatogr*

A, 2009, 1216(11):1954.

[9] Petroske E, Meredith G E, Callen S, et al. Mouse model of parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/PROBENECID treatment[J]. *Neuroscience*, 2001,106(3):589.

[10] 管燕,谢强敏. 甘草黄酮对肺部炎症小鼠细胞因子表达和氧化反应的调节作用[J]. *中草药*, 2009,40 (8):1254.

[11] Kim W G, Mohnney R P, Wilson B, et al. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(16):6309.

[12] Qian L, Flood P M. Microglial cells and Parkinson's disease[J]. *Immunol Res*, 2008, 41(3):155.

[13] Yasuda Y, Shinagawa R, Yamada M, et al. Long-lasting reactive changes observed in microglia in the striatal and substantia nigral of mice after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine [J]. *Brain Res*, 2007,1138:196.

[14] 赵长振. 中药复方治疗帕金森病的用药规律研究 [J]. *中国医药科学*, 2013,3(3):107.

[15] Kim K R, Jeong C K, Park K K, et al. Anti-inflammatory effects of licorice and roasted licorice extracts on TPA-induced acute inflammation and collagen-induced arthritis in mice [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, doi: 10.1155/2010/709378.

[责任编辑 聂淑琴]