

神经酸对帕金森病模型小鼠运动障碍的缓解作用及机制研究

郑辉^{1,2*}, 孙作乾¹, 王志亮¹, 魏正风², 冯炎², 张兴柱², 王付苍², 史永强², 高肇林^{2#}(1. 枣庄科技职业学院医学技术系, 山东滕州 277500; 2. 山东益康药业股份有限公司山东省晶型药物重点实验室, 山东滕州 277513)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2648-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.16

摘要 目的: 研究神经酸对帕金森病(PD)模型小鼠运动障碍的缓解作用及机制。方法: 将小鼠随机分为空白对照组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、多巴丝肼片组(阳性对照, 按左旋多巴计 120 mg/kg)和神经酸低、中、高剂量组(20.0、40.0、80.0 mg/kg), 每组 10 只。除空白对照组外, 其余各组小鼠均建立 PD 模型。成模后, 每天 ig 相应药物 1 次, 连续 14 d。末次给药后, 观察各组小鼠行为学变化, 采用高效液相色谱法测定小鼠脑纹状体内多巴胺(DA)及其代谢物二羟苯乙酸(DOPAC)、高香草酸(HVA)的含量。结果: 与空白对照组比较, 模型组小鼠爬杆时间延长、滚筒时间缩短、自发运动次数减少($P < 0.05$), 脑纹状体内 DA、DOPAC、HVA 含量均降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 多巴丝肼片组和神经酸各剂量组小鼠爬杆时间缩短、滚筒时间延长($P < 0.05$), 脑纹状体内 DA、DOPAC、HVA 含量均升高($P < 0.05$); 多巴丝肼片组和神经酸高剂量组小鼠自发运动次数增加($P < 0.05$)。结论: 神经酸可有效改善 PD 模型小鼠的运动障碍症状, 其机制可能与增加脑纹状体内 DA 含量有关。

关键词 神经酸; 帕金森病; 小鼠; 运动障碍; 多巴胺

Study on the Alleviation Effect and Its Mechanism of Nervonic Acid on Movement Disorder of Model Mice with Parkinson's Disease

ZHENG Hui^{1,2}, SUN Zuoqian¹, WANG Zhiliang¹, WEI Zhengfeng², FENG Yan², ZHANG Xingzhu², WANG Fucang², SHI Yongqiang², GAO Zhaolin²(1. Dept. of Medical Technology, Zaozhuang Vocational College of Science & Technology, Shandong Tengzhou 277500, China; 2. Shandong Province Key Laboratory of Polymorph Drugs, Shandong Yikang Pharmaceutical Co., Ltd., Shandong Tengzhou 277513, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the alleviation effect of nervonic acid on movement disorder of model mice with Parkinson's disease (PD). **METHODS:** Mice were randomly divided into blank control group (normal saline), model group (normal saline), Levodopa and benserazide hydrochloride tablet group (positive control, calculated by L-dopamine 120 mg/kg), nervonic acid low-dose, medium-dose, high-dose groups (20.0, 40.0, 80.0 mg/kg), 10 in each group. Except for blank control group, mice in other groups were induced for PD models. After modeling, mice were intragastrically given relevant medicines, once a day, for 14 d. After the last administration, behavioral changes of mice in each group were observed. HPLC was conducted to detect dopamine (DA) and its metabolites dihydroxybenzoic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA) concentrations in the striatum of mice. **RESULTS:** Compared with blank control group, climbing time was extended in model group, drum time was shortened, spontaneous movement times was decreased, and DA, DOPAC, HVA contents in the striatum were reduced ($P < 0.05$). Compared with model group, climbing time was shortened in Levodopa and benserazide hydrochloride tablet group, nervonic acid dose groups, drum time was extended, and DA, DOPAC, HVA contents in the striatum were increased ($P < 0.05$); and spontaneous movement times was increased in Levodopa and benserazide hydrochloride tablet group, and nervonic acid high-dose group ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** Nervonic acid can effectively improve symptoms of movement dysfunction of model mice with PD. The mechanism may associate with increasing DA content in the striatum.

KEYWORDS Nervonic acid; Parkinson's disease; Mice; Movement disorder; Dopamine

帕金森病(Parkinson's disease, PD)为一种常见的神经系统退行性疾病, 临床表现为静止震颤、肌肉强直、自发运动障碍等症状, 患者生活自理能力较差。中国现有 PD 患者约 170 万人, 并保持每年约 6% 的增长速度^[1]。中枢拟胆碱药左旋多巴目前为治疗 PD 的公认药物, 但

这种药物长期服用后的不良反应较大, 制约了其在临床上的使用。所以, 寻找新的药物是目前 PD 研究领域的热点。

神经酸(Nervonic acid)为一种具有 24 个碳原子的单不饱和脂肪酸, 最先是从小鼠脑神经内分离出来的, 室温条件下为白色片状结晶性固体。神经酸作为脑神经细胞中的一种核心神经营养因子, 能够修复受损的神经元末梢、促进神经细胞生长发育和提高脑神经活跃程度, 是脑细胞生长所必需的营养物质^[2]。研究证明,

* 讲师, 硕士。研究方向: 新药开发。电话: 0632-5953070。E-mail: zhenghui198334@163.com

通信作者: 高级工程师, 博士。研究方向: 新药开发。电话: 0632-5953070。E-mail: sdykyy@126.com

神经酸具有增强免疫功能^[3]、防治艾滋病、防治恶性肿瘤、治疗阿尔茨海默病^[4]、治疗齐薇格综合征^[5]等作用,但未见其在治疗帕金森病方面的应用。本研究神经酸对模型小鼠PD的缓解作用及机制,为其开发及临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Alliance2695液相色谱仪、2475荧光检测器(美国Waters公司);TGL-20M台式高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司)。

1.2 药品与试剂

神经酸(上海恒棵生物科技有限公司,批号:151011,纯度:90.0%);多巴丝肼片(商品名:美多巴,上海罗氏公司,批号:SH2443,规格:每片含左旋多巴200 mg、苄丝肼50 mg);1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)、多巴胺(DA)、二羟苯乙酸(DOPAC)、高香草酸(HVA)等均购自美国Sigma公司。

1.3 动物

C57BL/6小鼠,SPF级,♀♂各半,8周龄,体质量(20±2)g,由山东大学实验动物中心提供,生产许可证号为SCXK(鲁)2009-0001。

2 方法

2.1 样品的制备

神经酸按每100 g加入30 mL聚山梨酯80的比例混合研磨,加纯化水制成白色均匀乳液,用时以纯化水配制所需浓度即可。

2.2 分组与给药

将小鼠随机分为空白对照组、模型组、多巴丝肼片组(阳性对照,按左旋多巴计120 mg/kg)^[6]和神经酸低、中、高剂量组(20.0、40.0、80.0 mg/kg,给药剂量在参考文献[7]及前期预实验结果的基础上确定)。除空白对照组外,其余各组小鼠ip生理盐水溶解的MPTP溶液25 mg/kg,每天1次,连续5 d。选取步长变短、活动减少、运动缓慢、全身震颤、竖毛竖尾等行为改变的小鼠作为合格PD模型小鼠,每组10只,♀♂各半。5 d后,各给药组小鼠ig相应药物0.2 mL/10 g,空白对照组和模型组小鼠ig等体积生理盐水,每天1次,连续14 d。末次给药24 h后,进行行为学实验。

2.3 行为学实验

2.3.1 爬杆实验 将一个圆形小球(直径3 cm)固定于一根竹杆(长50 cm,直径1 cm)的顶部,竹杆表面缠绕多层纱布以免打滑。夹住小鼠尾尖,鼠头朝下放在杆顶,并保证其双后肢落在小球表面,然后使其顺着竹杆顺势爬下。自小鼠适应环境4 d后开始计时,从附在杆顶头朝下开始,到双前肢接触小杆底端结束,记录小鼠爬杆时间。

2.3.2 滚筒实验 将小鼠放在滚筒仪的表面上,调整仪

器旋转速度为35 r/min。自小鼠适应环境4 d后开始计时,小鼠站在筒上滚筒旋转开始,到从滚筒上掉落结束,记录小鼠在滚筒上的持续时间。

2.3.3 自发运动实验 参考文献[8]进行实验。把小鼠放在自发运动仪中心,确保环境安宁不嘈杂。打开自发运动监测仪,使红外线自由穿过,当小鼠活动时可阻挡红外线,自小鼠适应环境2 min后开始计时,记录5 min内小鼠运动次数。

2.4 脑纹状体内DA及其代谢产物DOPAC、HVA含量的测定

参考文献[9]测定各组小鼠脑纹状体内DA及其代谢产物DOPAC、HVA含量。

2.4.1 色谱条件 色谱柱:ZORBAX SB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:(0.02 mol/L枸橼酸钠-0.05 mol/L磷酸氢二钠)-甲醇(95:5);流速:1.0 mL/min;柱温:35 ℃;发射波长:285 nm,激发波长:333 nm;进样量:20 μL。

2.4.2 线性关系 分别精密称取DA、DOPAC、HVA适量,用流动相稀释制成300、50、50 μg/mL的贮备液。精密量取各贮备液适量,按需要用流动相稀释成系列质量浓度,按“2.4.1”项下方法进样测定,记录峰面积。以药物质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行回归分析。

2.4.3 准确度、基质效应、精密度 按相关方法操作考察本方法的准确度、基质效应和精密度。

2.4.4 测定方法 行为学实验完成后,小鼠剪头取脑放在冰盘表面并迅速剥离出纹状体,称质量后置于2 mL EP管内,准确加入0.1 mol/L冰冷高氯酸溶液1.0 mL,在冰浴条件下超声(5 kHz, 30 s)使细胞壁破损,4 ℃下10 000 r/min(离心半径为10 cm)离心30 min,取上清液进样测定。

2.5 统计学方法

采用SPSS 18.0软件进行统计分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 行为学考察结果

与空白对照组比较,模型组小鼠的爬杆时间明显延长,滚筒持续时间明显缩短,自发运动次数明显减少($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组小鼠的爬杆时间均明显缩短,滚筒持续时间均明显延长($P < 0.05$);多巴丝肼片组和神经酸高剂量组小鼠的自发运动次数明显增加($P < 0.05$)。各组小鼠行为学考察相关指标测定结果见表1。

3.2 含量测定结果

本文色谱条件下,其他辅料均不干扰DA、DOPAC和HVA的测定,其日内精密度试验的含量RSD分别为

表1 各组小鼠行为学考察相关指标测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 1 Determination results of related indexes in behavioral study of mice in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	爬杆时间,s	滚筒持续时间,s	自发运动次数
空白对照组	6.21±1.52	601±21.55	96.5±17.9
模型组	36.66±5.08*	256±14.89*	70.8±16.8*
多巴丝肼片组	8.62±1.14 [#]	421±18.66 [#]	92.8±17.2 [#]
神经酸低剂量组	11.59±1.23 [#]	314±16.08 [#]	79.7±16.7
神经酸中剂量组	10.01±1.11 [#]	367±15.99 [#]	84.6±17.6
神经酸高剂量组	9.83±1.03 [#]	388±17.05 [#]	89.8±17.4 [#]

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$; vs. model group, [#] $P<0.05$

5.4%~11.4%、4.9%~12.6%、5.1%~11.9($n=5$),日间精密度试验的含量RSD分别为7.1%~10.1%、10.8%~12.4%、11.8%~13.1($n=3$);准确度分别为99.6%~106.6%、99.8%~111.0%、99.4%~108.0%($n=3$);基质效应分别为86.9%~105.3%、91.7%~102.8%、94.5%~102.1%。DA、DOPAC和HVA的线性关系见表2。

表2 DA、DOPAC和HVA的线性关系

Tab 2 Linear relationships of DA, DOPAC and HVA

样品	回归方程($n=5$)	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
DA	$y=43.568x-0.657$	0.999 1	0.05~3.0
DOPAC	$y=19.891x-0.145$	0.999 5	0.01~0.5
HVA	$y=17.965x-0.128$	0.999 3	0.01~0.5

3.3 脑纹状体内DA、DOPAC和HVA含量测定结果

与空白对照组比较,模型组小鼠脑纹状体内DA、DOPAC、HVA含量明显减少($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组小鼠脑纹状体内DA、DOPAC、HVA含量明显增加($P<0.05$)。各组小鼠脑纹状体内DA、DOPAC、HVA含量的测定结果见表3。

表3 各组小鼠脑纹状体内DA、DOPAC、HVA含量的测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$, ng/mg)

Tab 3 Determination results of DA, DOPAC, HVA concentrations in the striatum of mice in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$, ng/mg)

组别	DA	DOPAC	HVA
空白对照组	5.66±0.83	0.99±0.17	0.83±0.10
模型组	0.48±0.03*	0.17±0.06*	0.16±0.03*
多巴丝肼片组	4.18±0.94 [#]	0.89±0.15 [#]	0.71±0.09 [#]
神经酸低剂量组	1.09±0.27 [#]	0.50±0.14 [#]	0.37±0.06 [#]
神经酸中剂量组	1.75±0.43 [#]	0.62±0.24 [#]	0.46±0.08 [#]
神经酸高剂量组	2.41±0.38 [#]	0.76±0.06 [#]	0.60±0.07 [#]

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$; vs. model group, [#] $P<0.05$

4 讨论

PD的发病机制相对复杂,目前认为其病理变化部位为中脑部黑质-纹状体DA能神经元。由于DA是抑制运动行为的关键性神经递质,而乙酰胆碱(Ach)则是兴

奋运动行为的关键性神经递质,故黑质-纹状体DA能神经元发生退行性改变,导致DA浓度显著下降,致使胆碱能神经功能相对亢进,从而出现PD症状。当DA含量降低至50%以下时,会导致纹状体内DA和Ach平衡严重失调,产生静止震颤、肌肉强直、自发运动障碍等PD症状。目前,临床上常用药物进行治疗,作用机制为使纹状体内DA和Ach重新达到平衡,从而缓解PD症状^[10]。

MPTP作为一种常用的造模用特殊神经毒物,其脂溶性高,易经血液循环穿过血脑屏障进入脑内,能损伤DA能神经元。本实验采用MPTP诱发小鼠PD模型,结果显示,PD模型小鼠自发活动较少,啃食东西及整理皮毛动作明显减少,攀爬行为减少,有的小鼠甚至出现啃食艰难、体质量降低、姿势协调功能较差等。此外,模型小鼠脑纹状体中DA、DOPAC和HVA含量较正常小鼠明显降低,这些现象与现有PD模型报道^[11-13]一致。因此,本实验建立的小鼠PD模型科学可靠。

本研究结果显示,PD模型小鼠ig神经酸后,其爬杆时间缩短,滚筒持续时间延长,自发活动次数增加,说明神经酸能提高PD模型小鼠的活动平衡及运动协调能力,可有效改善PD模型小鼠运动迟缓和肌肉强直等运动功能障碍症状。DOPAC和HVA为DA代谢产物,脑内DOPAC和HVA的含量能间接反映DA含量的高低。本研究结果显示,模型组小鼠脑纹状体中DA、DOPAC和HVA含量较空白对照组明显降低,而神经酸各剂量组和多巴丝肼片组小鼠脑纹状体中DA、DOPAC和HVA含量较模型组明显增加,说明神经酸缓解PD模型小鼠运动功能障碍症状的机制可能与增加脑纹状体内DA含量有关。

参考文献

- [1] 王丽云,刘丽星,吕海军,等.抗帕金森病药物的研究进展[J].中国药房,2017,28(8):1143-1149.
- [2] 王性炎,樊金栓,王姝清.中国含神经酸植物开发利用研究[J].中国油脂,2006,31(3):69-71.
- [3] 王熙才,左曙光,邱宗海,等.艾舍尔软胶囊增强小鼠免疫力的实验研究[J].昆明医科大学学报,2008,29(6):71-75.
- [4] 王建民,胡晓凯,王建林,等.生物活性物质神经酸钙的分离提取纯化生产工艺及其在治疗老年痴呆症中的应用:中国,200910101699[P]. 2011-03-30.
- [5] Tanaka K, Shimizu T, Ohtsuka Y, et al. Early dietary treatments with Lorenzo's oil and docosahexaenoic acid for neurological development in a case with Zellweger syndrome[J]. Brain Dev, 2007, 29(9): 586-589.
- [6] 沈熊,马海滨,厉璐帆,等.复方海蛇胶囊对帕金森病小鼠的作用[J].中国临床药理学与治疗学,2010,15(9): 1023-1026.
- [7] 韩锋,王建民,邓邵清,等.食品添加剂新品种-神经酸对

右美托咪定对脓毒症小鼠炎症反应的影响及机制研究

郭茂*, 王文明(泸州市人民医院麻醉科, 四川 泸州 646000)

中图分类号 R971⁺.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2651-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.17

摘要 目的:研究右美托咪定(Dex)对脓毒症小鼠炎症反应的影响及机制。方法:将小鼠随机分为正常对照组、模型组、微小RNA-146a(miR-146a)抑制剂(50 mg/kg)+Dex(50 μg/kg)组和Dex低、中、高剂量组(10、30、50 μg/kg),每组10只。除正常对照组外,其余各组小鼠ip脂多糖建立脓毒症模型,0.5 h后ip相应药物。药物干预6 h后,实时荧光定量聚合酶链式反应法检测各组小鼠外周血单核细胞中miR-146a表达及其靶基因白细胞介素1(IL-1)受体相关激酶(IRAK1)、肿瘤坏死因子(TNF)受体相关因子6(TRAF6)mRNA表达,Western blot法检测外周血单核细胞中IRAK1、TRAF6蛋白的表达,酶联免疫吸附法检测血清中TNF-α、IL-6的水平。结果:与正常对照组比较,模型组小鼠的miR-146a表达增强,TNF-α、IL-6水平升高,IRAK1、TRAF6 mRNA和蛋白表达增强($P<0.01$)。与模型组比较,Dex中、高剂量组小鼠外周血单核细胞中miR-146a表达增强,TNF-α、IL-6水平下降,IRAK1、TRAF6蛋白表达减弱($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但IRAK1、TRAF6 mRNA表达变化不明显($P>0.05$)。与Dex高剂量组比较,miR-146a抑制剂+Dex组小鼠外周血单核细胞中miR-146a表达减弱,TNF-α、IL-6水平升高,IRAK1、TRAF6蛋白表达增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但IRAK1、TRAF6 mRNA表达变化不明显($P>0.05$)。结论:Dex可抑制脓毒症小鼠炎症反应,其机制可能与诱导miR-146a表达、抑制Toll样受体4/核因子κB通路中的两个重要接头蛋白IRAK1和TRAF6的表达有关。

关键词 脓毒症;右美托咪定;miR-146a;炎症反应;小鼠;Toll样受体4/核因子κB

Study on the Effect and Its Mechanism of Dexmedetomidine on the Inflammatory Response in Septic Mice

GUO Mao, WANG Wenming (Dept. of Anesthesiology, Luzhou People's Hospital, Sichuan Luzhou 646000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect and its mechanism of dexmedetomidine (Dex) on inflammatory response in septic mice. METHODS: Mice were randomly divided into normal control group, model group, miR-146a inhibitor (50 mg/kg)+Dex (50 μg/kg) group, Dex low-dose, medium-dose, high-dose groups (10, 30, 50 μg/kg), 10 in each group. Except for normal control group, other groups were intraperitoneally injected lipopolysaccharide to induce septic models, intraperitoneally injected relevant medicines after 0.5 h. After drug intervention for 6 h, miR-146a expression, IRAK1 and TRAF6 mRNA expressions in peripheral blood mononuclear cells in each group were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction method. IRAK1, TRAF6 protein expressions in peripheral blood mononuclear cells in each group were detected by Western blot method. TNF-α, IL-6 levels in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent method. RESULTS: Compared with normal control group, miR-146a expression, TNF-α and IL-6 levels, IRAK1, TRAF6 mRNA and protein expressions in peripheral blood mononuclear cells in model group were increased ($P<0.01$). Compared with model group, miR-146a expression in peripheral blood mono-

- 改善记忆的影响及在益智食品方面的应用研究进展[J]. 中国供销商情:乳业导刊,2003(1):18-20.
- [8] 王涛.普利醇抗帕金森病的药效学及其机制研究[D].北京:北京协和医学院,2009.
- [9] 杨梅.抗帕I号方剂治疗帕金森病机制的实验研究[D].武汉:华中科技大学,2006.
- [10] 奚月芬.我院2011—2013年抗帕金森病药使用分析[J].中国药房,2014,25(46):4333-4335.
- [11] 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, doi: 10.1016/j.brainres.2006.12.054.
- [12] Ohashi S, Mori A, Kurihara N, *et al.* Age-related severity of dopaminergic neurodegeneration to MPTP neurotoxicity causes motor dysfunction in C57BL/6 mice[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 401(1/2): 183-187.
- [13] Chang HC, Yang YR, Wang PS, *et al.* The neuroprotective effects of intramuscular insulin-like growth factor-1 treatment in brain ischemic rats[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e64015.

* 主治医师。研究方向:临床麻醉。电话:0830-2361931。E-mail:guomaolzyx@163.com

(收稿日期:2016-10-24 修回日期:2016-12-09)

(编辑:邹丽娟)