

## 灵芝孢子油干预治疗 6-羟多巴帕金森病大鼠模型的实验研究

朱蔚文, 刘焯霖, 徐浩文, 谢安木, 叶钦勇, 陈 玲  
(中山大学附属第一医院神经内科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】研究灵芝孢子油对 6-羟多巴(6-OHDA)帕金森病(PD)大鼠模型行为学及病理改变的影响, 探讨该药对黑质多巴胺能神经元的保护作用。【方法】100 只 SD 大鼠随机分为正常对照组 20 只、6-OHDA 组 40 只、灵芝孢子油+6-OHDA 组 40 只。通过脑部立体定向法将 6-OHDA 注射到 SD 大鼠一侧黑质致密部建立 6-OHDA 大鼠 PD 模型, 灵芝孢子油+6-OHDA 组在造模前 3 d 开始给灵芝孢子油每天 500 mg/kg, 连续 10 d。6-OHDA 组喂食生理盐水做对照。造模后每周给予阿朴吗啡观察大鼠旋转行为的变化, 4 周后用高效液相色谱法检测大鼠纹状体多巴胺及其代谢物含量, 免疫组织化学法检测黑质致密部酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞数量, western blot 法对 TH 蛋白进行半定量测定。【结果】① 灵芝孢子油+6-OHDA 组出现旋转行为的大鼠比例为 10%, 6-OHDA 组为 45%, 两组比较有显著性差异。② 纹状体多巴胺及其代谢物含量在两组间存在差异, 多巴胺手术侧含量/手术对侧含量在灵芝孢子油+6-OHDA 组为(60.12±7.5)%, 在 6-OHDA 组为(38.58±7.26)%。③ 在黑质致密带区灵芝孢子油+6-OHDA 组的 TH 免疫阳性细胞及 TH 蛋白表达量均较 6-OHDA 组显著增多。【结论】灵芝孢子油能明显改善 6-OHDA 大鼠模型行为学, 增加纹状体多巴胺及其代谢物含量并提高黑质多巴胺能神经元的残存率, 提示灵芝孢子油可能具有减缓 PD 病变进程的神经保护作用。

**关键词:** 灵芝孢子油; 帕金森病; SD 大鼠 6-OHDA 模型; 旋转行为; 多巴胺; 酪氨酸羟化酶

中图分类号: R 742.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)04-0417-04

## Effect of Ganoderma Lucidum Spores Oil on 6-Hydroxydopamine Rats Model of Parkinson's Disease

ZHU Wei-wen, LIU Zhuo-lin, XU Hao-wen, XIE An-mu, YE Qin-yong, CHEN Ling  
(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To develop neuroprotective treatment that will slow or discontinue the progression of Parkinson's disease (PD), we explored the ganoderma lucidum spores oil, a rare Chinese crude drug used to cure chronic brain function failure, to evaluate its effect on the pathological condition of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rats model in the substantia nigra pars compacta (SNpc). 【Method】 SD rats were pretreated with ganoderma lucidum spores oil feeding for 3 days before they were injected with 6-hydroxydopamine into one side substantia nigra, and were continually fed by ganoderma spores oil for 1 week. The control group rats had not been treated. The animals' cataplasia turning behavior induced by apomorphine were observed every week. Four weeks later, dopamine and its metabolic products in the striatum of both groups were determined by HPLC, and the tyrosine hydroxylase (TH) positive cells were detected by immunohistochemical method, semi-determination expression of TH were detected by Western blot analysis. 【Result】① In apomorphine test, rats of the ganoderma spores oil group (10%) presented significant lesser turning than the untreated control group (45%). ② The levels of dopamine in the lesion side striatum were increased in the ganoderma spores oil group. ③ The amount of survival TH positive neurons of the ganoderma spores oil group in SNpc were larger than that of the control group's, either in lesion side or another side. The result of semi-determination indicated that TH expression was significantly increased in the ganoderma spores oil group. 【Conclusions】 Ganoderma lucidum spores oil can efficiently improve the levels of dopamine in the lesion side striatum, and increase the amount of survival TH neurons as well as TH protein expression in 6-hydroxydopamine rats PD model. It is possible that Ganoderma spores oil may has neuroprotective role to PD.

**Key words:** ganoderma lucidum spores oil; Parkinson's disease; 6-hydroxydopamine rats model; rotational behavior; dopamine; tyrosine hydroxylase

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(4):417-420]

收稿日期: 2005-02-25

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(21868)

作者简介: 朱蔚文(1971-), 女, 主治医师, 博士生; 刘焯霖, 教授, 导师. E-mail: zhuweiwen11@126.com

中脑黑质致密部多巴胺能神经元进行性减少是帕金森病(PD)的主要病理生理基础。尽管应用左旋多巴类替代治疗和多巴胺受体激动剂能有效地减轻患者临床症状,却无法延缓帕金森病病程的进展。近年来,针对帕金森病的神经保护药物国内外有不少研究,已开发出单胺氧化酶 B 抑制剂、儿茶酚-氧位-甲基转移酶抑制剂等药物,但临床效果尚不明显<sup>[1,2]</sup>。本实验通过研究灵芝孢子油对 6-羟多巴(6-OHDA)帕金森病大鼠模型黑质多巴胺能神经元的保护作用,为寻找有效的神经保护药物提供新途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物、试剂和仪器

健康雄性 SD 大鼠 100 只,体质量 200~230 g,由中山大学药学院动物中心提供。灵芝孢子油(香港盈康科技公司),6-OHDA、阿朴吗啡(SIGMA),TH 一抗(CHEMICON, SIGMA),抗兔 IgG 试剂盒(博士德),Western-blot 检测盒(Roche),脑部立体定位仪(NARISHIGE,SR-5N),HP1049A 电化学检测器,BDSC18 色谱柱,Mini-protean III 型电泳槽、电转移装置,纯硝酸纤维素膜(PALL)。

### 1.2 动物模型

随机将 SD 大鼠分为正常对照组 20 只、6-OHDA 组 40 只、灵芝孢子油+6-OHDA 组 40 只。所有大鼠均进行脑立体定向手术,前囟为坐标原点,前囟右旁开 1.6 mm,前囟后 4.9 mm,脑面下 7.9 mm 为右侧黑质致密部定位点,钻开颅骨后,6-OHDA 组和灵芝孢子油+6-OHDA 组用微量注射器注入 3  $\mu\text{L}$ (共 18  $\mu\text{g}$ )6-OHDA 溶液,正常对照组注入 2 g/L 抗坏血酸生理盐水 3  $\mu\text{L}$ 。灵芝孢子油+6-OHDA 组在造模前 3 d 开始每天喂食灵芝孢子油 500 mg/kg,连续 10 d。6-OHDA 组和正常对照组喂食生理盐水做对照。造模后 1 周腹腔注射 0.5 mg/kg 阿朴吗啡,观察动物行为变化,记录 40 min 内向手术对侧旋转次数。每周诱发 1 次,连续 4 周。造模 4 周后处死各组大鼠,断头在冰上取纹状体和中脑组织。

### 1.3 多巴胺及其代谢产物含量测定:

按 20  $\mu\text{L}/\text{mg}$  的比例在手术侧及对侧纹状体加入 0.1 mol/L 高氯酸(内含 1 g/L 半胱氨酸)制成匀浆,离心取上清液 20  $\mu\text{L}$  上样检测。流动相,以缓冲液:甲醇体积比为 9:1 混合,调 pH 值至 4.0,高压泵流速 1.0 mL/min,电化学检测器检测电压 0.6 V。定性分析:以样品峰的保留时间与标准物保留时间对照定性。定量分析:以样品峰面积与内标峰

面积的比值进行定量分析,检测多巴胺及其代谢产物 3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)的含量。

### 1.4 免疫组织化学染色检测 TH 阳性细胞

中脑作冰冻切片,切片厚度 5  $\mu\text{m}$ ,3 mL/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 20 min,50 mL/L 羊血清封闭 30 min,加入 TH 一抗(兔抗大鼠,CHEMICON, 1:100),4  $^\circ\text{C}$  过夜,次日予二抗 37  $^\circ\text{C}$  孵育 30 min,滴加链酶亲和素-过氧化物酶复合物作用 30 min,DAB 显色,封片后观察。阴性对照以 PBS 代替一抗。光镜下观察并对双侧黑质致密带 TH 阳性细胞计数,每个标本取黑质区切片 3 张计数,取平均值。

### 1.5 Western 免疫印迹法检测 TH 蛋白含量

取手术侧中脑组织,称量后加入细胞裂解液,匀浆、超声破碎后,将组织加热变性,高速离心后取上清液,测量蛋白质浓度。在垂直电泳仪中灌注 10%分离胶和 5%成层胶,加入不同组样本,稳压 160 V 电泳 80 min,然后在转膜仪上将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上,稳压 100 V 转移 60 min,取出膜封闭 60 min,加入 TH 一抗(小鼠抗大鼠,SIGMA, 1:4000)4 $^\circ\text{C}$  过夜,次日加入二抗孵育 30 min,予化学发光剂作用后在暗室中曝光、显影、定影、观察结果。Western blot 蛋白带测定吸光度(A)值, $\beta$ -actin 为内参照。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 11.0 软件包进行数据处理和分析。所有数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示进行描述,采用  $t$  检验和  $\chi^2$  检验,检验标准取  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 大鼠造模后 1~4 周的行为学表现

注射阿朴吗啡后,正常对照组大鼠均无固定旋转方向,6-OHDA 组有 45% (18/40)大鼠出现向手术对侧旋转运动,其 40 min 内旋转行为为平均(286 $\pm$ 62)次,灵芝孢子油+6-OHDA 组有 10% (4/40)出现向手术对侧旋转运动,其旋转行为每 40 min 平均(187 $\pm$ 53)次,出现旋转行为的大鼠比例在 6-OHDA 组和灵芝孢子油+6-OHDA 组之间有显著性差异( $\chi^2=12.3, P < 0.01$ )。此外,注射阿朴吗啡后在未出现旋转行为的大鼠中 6-OHDA 组另有 54% (12/22)大鼠出现持续 10 min 以上向手术对侧扭转身体咬抓对侧肢体行为,灵芝孢子油+6-OHDA 组有 33% (12/36)出现上述表现。

### 2.2 纹状体多巴胺及其代谢产物含量

在第 5 周取纹状体测定多巴胺、DOPAC 的含量。多巴胺、DOPAC 含量在手术侧/手术对侧比值

分别是:正常组为(1020±2.6)%和(103.4±4.1)%,灵芝孢子油+6-OHDA 组为 (60.1±7.5)%和 (67.5±5.3)%,6-OHDA 组为(38.6±7.3)%和(46.2±3.6)%。结果显示灵芝孢子油+6-OHDA 组术侧纹状体多巴胺和 DOPAC 含量减少的程度轻于 6-OHDA 组,两组间比较有显著性差异( $t=13.2, P < 0.01$ )。

2.3 中脑黑质致密部 TH 阳性细胞染色情况

TH 阳性细胞的细胞浆和突起均呈深棕黄色。灵芝孢子油+6-OHDA 组在手术侧仍有较多 TH 阳性细胞 (图 1A), 灵芝孢子油+6-OHDA 组存活的

TH 阳性细胞着色深,形态正常,胞体完整,轮廓清晰(图 1B)。6-OHDA 组 TH 阳性细胞数量明显减少(图 1C),6-OHDA 组的 TH 细胞着色较浅,轮廓模糊,部分细胞体积缩小,细胞内有空泡(图 1D)。手术对侧灵芝孢子油+6-OHDA 组 TH 阳性细胞数量接近正常对照组,6-OHDA 组减少较明显。经  $t$  检验行两两组间的差异性比较,结果显示 3 组在手术侧 TH 阳性细胞存活数量有显著性差异  $P < 0.01$  (见图 2)。

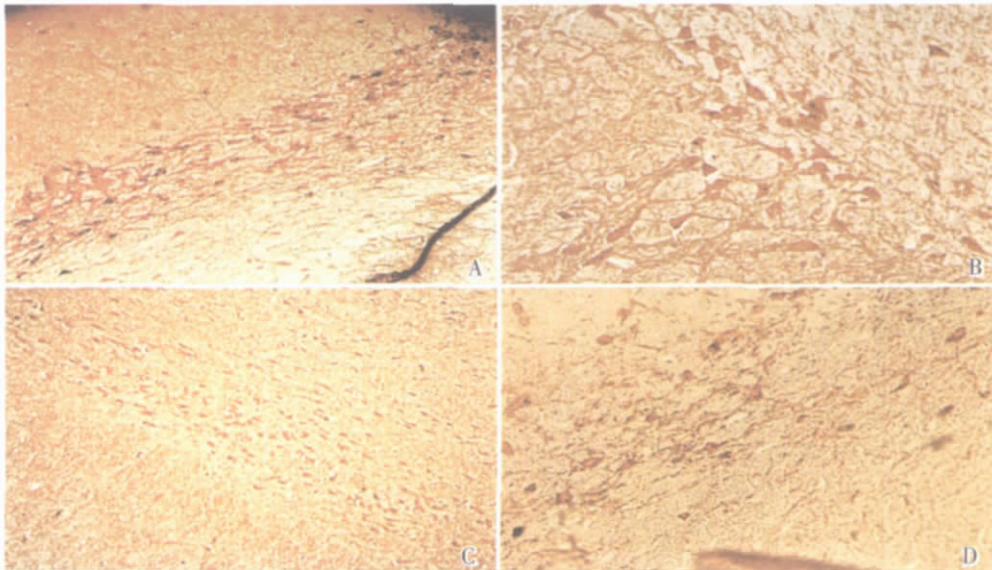


图 1 术侧 SNpc 区不同处理组 TH 阳性细胞图

Fig.1 TH positive cells in SNpc of lesion side in different treat groups

A: spores oil +6-OHDA group (×200); B: spores oil +6-OHDA group (×400); C: 6-OHDA group (×200); D: 6-OHDA group (×400)

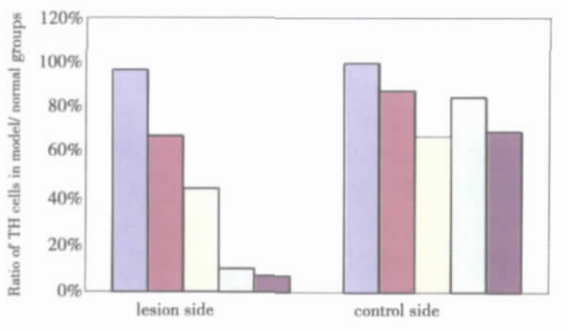


图 2 各组黑质致密部 TH 阳性细胞残存率

Fig.2 Survived rate of TH positive cell in SNpc in different groups

From left to right: normal, spore oil (no rotation), 6-OHDA (no rotation), spore oil (rotation) and 6-OHDA (rotation) group accordingly

2.4 Western blot 半定量检测中脑 TH 蛋白含量  
免疫印迹法对各组动物手术侧中脑 TH 蛋白

含量进行半定量检测结果显示,正常对照组 TH 含量最高。灵芝孢子油+6-OHDA 组无旋转行为大鼠 TH 含量比正常对照组略减少,6-OHDA 组无旋转行为大鼠的 TH 含量比正常对照组明显减少。在有旋转行为的大鼠中,灵芝孢子油+6-OHDA 组和 6-OHDA 组 TH 含量无明显差异,均显著减少。(图 3)

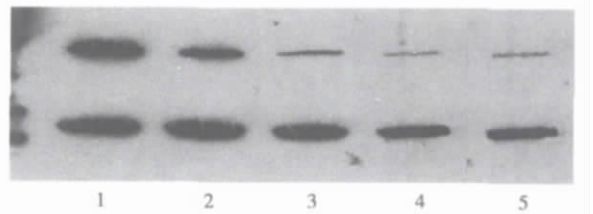


图 3 术侧中脑 TH 含量 Western blot 检测结果图

Fig.3 The result of Western blot of lesion side

1:normal group;2:spores oil +6-OHDA group (no rotation);3:6-OHDA group (no rotation);4:6-OHDA group (rotation);5:spores oil +6-OHDA group (rotation)

### 3 讨 论

#### 3.1 本实验模型模拟了人类 PD 的病理变化

由于特异地含有活性 Fe 离子, 以及多巴胺自身代谢中可产生超氧自由基、醌类及半醌, 黑质多巴胺能神经元呈现对内源性、外源性毒物损伤的易感性<sup>[3]</sup>。随年龄增加的原发性氧化应激压力、各种损伤引起线粒体功能障碍而出现的继发性氧化应激、泛素-蛋白酶途径介导的有害蛋白质降解过程发生异常、以及小胶质细胞激活释放炎性细胞因子促发毒性反应等多因素均可单独或协同导致黑质多巴胺能神经元发生死亡<sup>[4]</sup>。

6-OHDA 是多巴胺异常羟化的衍生物, 内源性 6-OHDA 可能由过量 Fe<sup>3+</sup>诱发产生。外源性给予 6-OHDA 被多巴胺能神经元摄入后, 可产生大量自由基, 抑制线粒体呼吸链的功能, 最终导致多巴胺能神经元死亡<sup>[6]</sup>。黑质致密部注射 6-OHDA 数小时后即可检测出黑质多巴胺能神经元发生细胞损伤, 4~5 d 后有 40%~80%多巴胺能神经元陆续出现凋亡、坏死, TH 免疫阳性细胞逐渐减少、消失, 靶区纹状体多巴胺的含量显著减少, 实验动物出现较特异的行为学改变。本实验 PD 组中有 45%大鼠能成功被诱发出旋转行为, 其余 55%无旋转行为的大鼠术侧 TH 阳性细胞残存率也仅为 (42±6.7)%。可见尽管这部分动物无行为学变化, 但多巴胺能神经元已明显减少。

#### 3.2 灵芝孢子油的多种药理作用

灵芝是担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌, 被历代医家推崇为滋补强壮、扶正固本的珍品。灵芝孢子是灵芝的生殖细胞。本课题组谢安木等<sup>[7]</sup>使用灵芝孢子粉预处理 6-OHDA 大鼠模型, 能减少模型动物的旋转行为出现率, 减轻手术侧黑质神经元超微结构线粒体的病理改变, 提示灵芝孢子可能具有保护黑质多巴胺能神经元的作用。而通过超临界二氧化碳萃取的灵芝孢子油含三萜类、多糖、核苷类、脂肪酸、有机锗及微量元素等其它成分, 它们具有强烈的生理活性。其中三萜类在灵芝孢子油中含量高达 30%, 该类物质有较高的脂溶性, 相对分子量一般为 400~600, 目前有 7 种不同的母核结构, 分离得到 120 多种三萜类新化合物。目前国内多个实验室的研究已证实三萜类具有降低化学性和免疫性肝损害、抗氧化和清除自由基、调节免疫功能等较

广泛的药理作用<sup>[8-11]</sup>。

#### 3.3 灵芝孢子油对帕金森病大鼠模型的保护作用

本研究证实使用灵芝孢子油干预能显著减少 6-OHDA 大鼠旋转行为的发生, 干预组手术侧纹状体内多巴胺含量减少的程度明显轻于对照组, 黑质区免疫组化和 Western blot 检测结果显示 TH 的细胞数目及 TH 蛋白表达量在灵芝孢子油+6-OHDA 组均比 6-OHDA 对照组显著增多。以上结果高度提示灵芝孢子油对 6-OHDA 帕金森病大鼠模型的行为学、神经递质、病理等方面均能显著改善, 具有神经保护作用。我们推测其机理可能与三萜类抗自由基、减轻免疫反应的生物活性有关。灵芝孢子油对其它 PD 动物模型是否同样具有保护作用, 具体机制如何, 我们拟在今后作进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Rascol O, Payoux P, Ory F, *et al.* Limitations of current Parkinson's disease therapy[J]. *Ann Neurol*, 2003, 53 (Suppl 3): S3-15.
- [2] Kieburtz K. Designing neuroprotection trials in Parkinson's disease[J]. *Ann Neurol*, 2003, 53 (Suppl 3): S100-9.
- [3] Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's Disease [J]. *Ann Neurol*, 2003, 53 (Suppl 3): S26-38.
- [4] Dawson TM, Dawson VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease [J]. *Science*, 2003, 302 (5646): 819-22.
- [5] Naoi M, Marayama W. Cell death of dopamine neurons in aging and Parkinson's disease[J]. *Mech Ageing Dev*, 1999, 111(2-3): 175-88.
- [6] Thomas J, Wang J, Takubo H, *et al.* A 6-hydroxydopamine-induced selective Parkinson rat model: Further biochemical and behavior characterization[J]. *Exp Neurol*, 1994, 121: 159-67.
- [7] 谢安木, 刘焯霖, 陈玲, 等. 实验性帕金森病黑质的超微结构变化及灵芝孢子粉的影响研究[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2004, 30(1): 11-3.
- [8] 罗俊, 林志彬. 灵芝三萜类化合物药理作用研究进展[J]. *药学学报*, 2002, 37(7): 574-8.
- [9] 张伟, 曾园山. 灵芝孢子的研究进展[J]. *中西医结合学报*, 2004, 2(6): 463-5.
- [10] 冯翠萍, 陈小君, 杨容甫. 萌动激活灵芝孢子粉对肿瘤组织中 MDA 水平的影响[J]. *癌症*, 2000, 19(8): 835.
- [11] 秦葵, 钱彦丛. 灵芝免疫药理研究进展[J]. *解放军药学报*, 2003, 19(5): 360-2.

(编辑 刘清海)