

## 止颤胶囊对帕金森大鼠血清中细胞因子 IL-1β 和 IL-6 水平的影响

王友联<sup>1</sup>, 苏国志<sup>1</sup>, 张叔杰<sup>2</sup>, 王艳玲<sup>3</sup>, 李海峰<sup>2</sup>, 刘永茂<sup>3</sup>, 王丹<sup>1</sup>

- 1. 白求恩医科大学制药厂, 吉林 长春 130012
- 2. 吉林大学第一医院, 吉林 长春 130021
- 3. 吉林大学白求恩医学院, 吉林 长春 130021

**摘要:** **目的** 探讨止颤胶囊对帕金森病(PD)大鼠细胞因子 IL-1β 和 IL-6 表达的影响。**方法** 采用立体定位法将 6-羟多巴胺(6-hydroxy dopamine, 6-OHDA)注入大鼠黑质部位,制备帕金森大鼠模型。实验分3组,包括正常对照组、模型对照组和止颤胶囊组。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法对实验大鼠血清中细胞因子 IL-1β 和 IL-6 进行分析。**结果** 与正常对照组相比,止颤胶囊组血清中 IL-1β、IL-6 基因的表达差异无显著性。与 PD 模型对照组相比,止颤胶囊治疗组 IL-1β 和 IL-6 的表达均有降低。**结论** 止颤胶囊对 PD 大鼠血液中 IL-1β 和 IL-6 的表达有下调作用,表明止颤胶囊对 PD 有一定的治疗作用。

**关键词:** 止颤胶囊; 帕金森病; 细胞因子; IL-1β; IL-6; 6-羟多巴胺

**中图分类号:** R971.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376 (2013) 04 - 0270 - 04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.04.008

## Effects of shive-stopping capsule on the serum levels of cytokines IL-1β and IL-6 in rats with Parkinson

WANG You-lian<sup>1</sup>, SU Guo-zhi<sup>1</sup>, ZHANG Shu-jie<sup>2</sup>, WANG Yan-ling<sup>3</sup>, LI Hai-feng<sup>2</sup>, LIU Yong-mao<sup>3</sup>, WANG Dan<sup>1</sup>

- 1. Pharmaceutical factory of Bethune Medical University, Changchun 130012, China
- 2. No.1 Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China
- 3. Jilin University Bethune School of Medicine, Changchun 130021, China

**Abstract: Objective** To study the effect of tremor-stopping capsule on cytokines IL-1β, IL-6 in the pathogenesis of rats with Parkinson disease(PD). **Methods** Using the method of injecting 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the substantia nigra pars of rat's brain located to get injured PD model in part. We select. The experiment divided into 3 groups, normal SD rats as the experimental control group, and PD rats are divided into PD model control group and tremor-stopping capsule group. ELISA were used to detect the groups all the above to analyse the expression levels of IL-1β and IL-6 in serum of experimental rats. The results of each group were statistically analyzed by SPSS11.5, the groups are compared with each other to determine the effects of tremor-stopping capsule on the expression of IL-1β and IL-6. **Results** At the beginning of experiment, IL-1β and IL-6 protein expression levels were observed higher in the peripheral blood of PD model control group and tremor-stopping capsule group compared with the normal control subjects ( $P < 0.05$ ); The expression contents of IL-1β and IL-6 in tremor-stopping capsule group become lower followed with the time ( $P < 0.05$ ), and closer to the normal control group; Those in PD model control group decreased slightly compared with those without drug treatment ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** The expression level of IL-1β and IL-6 in the substantia nigra pars blood of SD's PD rats is increased caused by PD, and it is decreased of both of IL-1β and IL-6 in serum of rats who treated by the tremor-stopping capsule. It is indicated that the traditional Chinese medicine tremor-stopping capsule has some treatment on PD's rats

**Key words:** shive-stopping capsule; parkinson's disease; cytokines; IL-1β; IL-6; 6-hydroxydopamine (6-OHDA)

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的中老年神经系统变性疾病,随着现代社会人口老龄化,PD发病率表现出逐年增高的趋势,但其确切的病因及发病机制尚未完全明确,可能与遗传、

环境因素、兴奋性毒素、氧化应激过度、免疫学异常等有关<sup>[1]</sup>,其中免疫学异常在PD发病机制中具有较为重要的作用。研究显示PD患者血清中炎性细胞因子 IL-1β、IL-6 和 IL-10 水平均高于正常值<sup>[2-3]</sup>。

收稿日期: 2013-04-15

作者简介: 王友联(1966—),男,高级工程师,硕士,研究方向为药物研制开发。

Tel: 13804355480 Fax: (0431)85888076 E-mail: byz8516@163.com

\*通信作者 刘永茂 Tel: 13514499112 E-mail: lymmm8338@sina.com

目前国内用于治疗 PD 的中药制剂很多,如抗氧化应激中药有雷公藤内酯醇、银杏叶提取物和抗神经细胞凋亡类药物白藜芦醇、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>g2</sub>、葛根素、刺五加、肉苁蓉提取物等<sup>[4]</sup>。止颤胶囊是由黄芪、人参、白首乌、续断、厚朴、女贞子和川芎等组成,其对 PD 模型的相关作用本研究组先前已有报道<sup>[5-7]</sup>。本文拟通过观察止颤胶囊对 PD 大鼠血清中炎症细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 分泌水平的变化,探索对实验大鼠免疫功能的影响,以探讨细胞因子在 PD 发病机制中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

清洁级纯系 SD 大鼠,鼠龄 8 周,雌雄不限,体质量 150~160 g,由吉林大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(吉)2007-0003。动物分笼饲养,室温维持在 20~25 °C,湿度 40%~70%,光照强度 15~20 lx,大鼠自由饮水和摄食。实验中对动物的操作符合科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物指导性意见》。

### 1.2 药物

止颤胶囊由长春中医学院盖国忠教授研制,主要由黄芪、人参、白首乌、续断、厚朴、女贞子和川芎等中药组成,将这些药物分别粉碎,再按一定比例混合后用开水浸泡过夜,加水煎煮 3 次,合并煎液,过滤。将滤液于 60~80 °C 下干燥,粉碎即得棕褐色药粉。每克药粉含生药 5.36 g。

### 1.3 试剂和仪器

6-OHDA(批号 41k3724)和阿扑吗啡(Apomorphine,批号 065k1067)均为美国 Sigma 公司产品;大鼠 IL-1 $\beta$ 、IL-6 ELISA 试剂盒均为美国 Biosource 公司产品;SR-5R 大鼠脑立体定位仪为日本成茂公司产品;Thermo LabSystems MK3 酶标仪为芬兰雷勃产品;CL30 离心机为德国贺利氏公司产品。

### 1.4 6-OHDA 诱导大鼠 PD 部分损伤模型的制备

参照周厚广等<sup>[8]</sup>报道的方法,将麻醉好的大鼠在立体定向仪上固定好后,确定黑质的坐标<sup>[4]</sup>:中线旁开 1.1 mm,前囟后 4.4 mm,硬膜下 7.5 mm。在此位置注射 6-OHDA 溶液,体积流量为 10  $\mu$ L/min,注射完毕后留针 1~5 min 后缝合伤口,抗感染治疗 5 d<sup>[7-9]</sup>。2 周后给大鼠 sc 0.25 mg/kg 阿扑吗啡溶液,诱发大鼠旋转,记录 40 min 内总的旋转次数和旋转方向,1 次/周,连续 3 周,取连续 3 次

的平均值作为旋转次数,若其平均速度超过 7 r/min 则为制备成功 PD 模型。

### 1.5 分组和给药

将 90 只 SD 大鼠中随机取 20 只作为正常对照组。其余 70 大鼠只用于 6-OHDA 部分损伤大鼠 PD 模型制备。将 42 只成模大鼠随机分为 2 组,其中模型组 20 只、止颤胶囊组 22 只。将止颤胶囊去掉外壳,取止颤粉用生理盐水调成质量浓度为 200 g/L 药糊,每次每鼠 ig 10 mL/kg。正常对照组和模型对照组大鼠每天 ig 给予等体积生理盐水,连续给药 49 d。

### 1.6 取材

自给药开始,每隔 7 d 大鼠尾静脉取血,室温下放置 1 h 后,3 000 r/min 离心 30 min。分离血清,于 -80 °C 冰箱内保存备用。

### 1.7 酶联免疫吸附试验检测细胞因子

按试剂盒说明书完成样品分析。首先制备标准品和待测样品,分别设空白孔、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40  $\mu$ L,然后再加待测样品 10  $\mu$ L。轻轻晃动混匀后,置 37 °C 温育 30 min。然后分别与酶标试剂反应、最后加入显色剂避光显色,终止后以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(A)值,绘制标准曲线,计算待测样品中细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 浓度。

### 1.8 统计学分析

所有实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,运用 SPSS11.5 统计软件进行方差齐性检验,组间比较采用 *t* 检验。实验过程中各组均有实验大鼠死亡,其中正常对照组 2 只、止颤胶囊组 2 只和模型对照组 5 只。死亡大鼠经解剖分析,7 只死于食管黏膜损伤,2 只死于消瘦,进食困难。最终有正常对照组 18 只、止颤胶囊组 20 只和模型组 15 只大鼠进入结果分析。

## 2 结果

### 2.1 血清中 IL-1 $\beta$ 含量的变化

实验开始时,与正常对照组相比,模型对照组与止颤胶囊组血清中的 IL-1 $\beta$  含量均明显升高。随着作用时间的延长,止颤胶囊组血清中的 IL-1 $\beta$  含量明显降低( $P < 0.05$ ),到第 7 周时,含量接近正常对照组。而模型对照组血清中的 IL-1 $\beta$  含量也有所降低( $P > 0.05$ ),但速度放缓。见表 1。

### 2.2 血液中 IL-6 的测定结果

与正常对照组相比,模型对照组与止颤胶囊组血清中的 IL-6 含量均明显升高。随着作用时间的延

长, 止颤胶囊组血清中的 IL-6 含量明显降低 ( $P < 0.05$ ), 到第 7 周时, 含量接近正常对照组。尽管模

型对照组血清中的 IL-1 $\beta$  含量也有所降低, 但降低不明显。见表 2。

表 1 血清中 IL-1 $\beta$  含量 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Levels of IL-1 $\beta$  in serum ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量(mg·g <sup>-1</sup> )	n	IL-1 $\beta$ / (pg·mL <sup>-1</sup> )							
			第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天	第 49 天
正常对照	—	18	9.25 $\pm$ 3.59	9.26 $\pm$ 3.35	9.23 $\pm$ 4.68	9.24 $\pm$ 4.93	9.23 $\pm$ 3.69	9.22 $\pm$ 6.31	9.22 $\pm$ 3.17	9.23 $\pm$ 3.17
模型	—	15	45.5 $\pm$ 5.58*	40.8 $\pm$ 3.16*	38.3 $\pm$ 4.54*	37.6 $\pm$ 3.39*	35.1 $\pm$ 5.55*	33.2 $\pm$ 3.69*	32.6 $\pm$ 5.52*	30.9 $\pm$ 5.38*
止颤胶囊	2	20	45.5 $\pm$ 5.58*	35.3 $\pm$ 3.29*#	28.6 $\pm$ 3.99*#	21.3 $\pm$ 4.32*#	18.1 $\pm$ 5.88*#	15.7 $\pm$ 5.42*#	11.2 $\pm$ 4.67*#	10.3 $\pm$ 5.68*#

与正常对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group

表 2 血液中 IL-6 变化 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Levels of IL-6 in serum ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量(mg·g <sup>-1</sup> )	n	IL-6 / (pg·mL <sup>-1</sup> )							
			第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天	第 49 天
正常对照	—	18	6.33 $\pm$ 5.36	6.28 $\pm$ 3.98	6.37 $\pm$ 4.45	6.34 $\pm$ 4.83	6.43 $\pm$ 3.86	6.31 $\pm$ 6.52	6.53 $\pm$ 3.88	6.35 $\pm$ 4.15
模型	—	15	63.4 $\pm$ 5.28*	58.4 $\pm$ 4.16*	52.5 $\pm$ 4.35*	46.8 $\pm$ 4.38*	42.1 $\pm$ 5.65*	36.3 $\pm$ 6.61*	33.6 $\pm$ 5.39*	31.4 $\pm$ 5.87*
止颤胶囊	2	20	64.5 $\pm$ 5.56*	55.5 $\pm$ 5.21*	46.6 $\pm$ 4.36*#	39.3 $\pm$ 5.38*#	33.1 $\pm$ 4.89*#	27.7 $\pm$ 5.76*#	21.3 $\pm$ 4.85*#	15.8 $\pm$ 5.25*#

与正常对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group

### 3 讨论

脑损伤后在缺血受损区有细胞因子的过量表达和炎性细胞浸润, 过量炎症因子的产生会加重神经细胞损伤。IL-1 和 IL-6 均是免疫和炎症反应中的重要炎症细胞因子。近年来, 随着对帕金森病研究的不断深入, 相关的研究报道越来越多。PD 患者血清中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素类细胞炎性因子增高, PD 大鼠的外周循环中所测的炎性细胞因子水平确实增高, 其中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10 和 IL-6 的变化较为明显<sup>[3]</sup>。

本次实验设正常对照组、模型对照组和止颤胶囊实验组 3 个组, 分析止颤胶囊干预 PD 大鼠后, 血清中 IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量的变化。从本研究结果看, PD 大鼠的外周循环中所测的炎性细胞因子水平确实增高, 尤以 IL-1 $\beta$  和 IL-6 变化最为明显, 这与 Besster 等<sup>[9]</sup>报道的一致。实验开始时, 止颤胶囊组和模型对照组大鼠外周血中 IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量均远远高于正常对照组, 随着给药时间的延长, 止颤胶囊组大鼠外周血 IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量明显下降, 到第 7 周结束, 几乎接近正常对照组水平。而模型对照组大鼠外周血中 IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量随着实验时间的延长, 也有一定的下降, 但不显著, 此种下降可能是由于机体本身对 PD 模型所致部分脑损伤的自然恢复所致。从以上结果可以推测, 止颤胶囊治疗 PD

的可能作用机制之一是通过抑制体内 IL-1 $\beta$  和 IL-6 的产生, 减轻过量炎性细胞因子对脑神经造成的损伤。

关于 IL-6 与 PD 的关系目前尚未取得一致的结论。许继平等<sup>[2]</sup>认为 PD 黑质 DA 神经元周围 IL-6 浓度增高, 认为 IL-6 在 PD 患者中具有促进神经元修复和再生的功能; 而管小亭等<sup>[10]</sup>报道 PD 外周血 IL-6 显著低于正常对照组。本研究结果显示 PD 模型大鼠外周血 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平明显增高, 止颤胶囊能有效减低 IL-1 $\beta$  和 IL-6 增高水平, 但止颤胶囊是否是通过此过程对神经元起到保护作用还有待进一步的研究证实。

### 参考文献

- [1] 姚新. 止颤胶囊治疗帕金森病的临床研究 [J]. 吉林医学, 2008, 29(8): 653-654.
- [2] 许继平, 李玉莲, 范金萍, 等. 帕金森病患者血清细胞炎性因子水平的变化与其相关因素研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(3): 266-270.
- [3] 余能伟, 刘洁, 李晓佳, 等. 帕金森病患者 IL-2, IL-6, IL-10 的检测及临床意义 [J]. 中国临床神经科学, 2010, 18(4): 349-353.
- [4] 马云技, 史距新, 李枚. 中药治疗帕金森病研究进展 [J]. 中医学报, 2011, 26(152): 104-106.
- [5] 刘亚珍, 施雨露, 刘永茂, 等. 止颤胶囊对帕金森模型大鼠脑内单胺氧化酶 B 的影响 [J]. 中草药, 2010,

- 41(6): 963-965.
- [6] 韩玲, 刘永茂. 止颤胶囊对帕金森模型小鼠血中超氧化物歧化酶及丙二醛水平的影响 [J]. 吉林大学学报医学版, 2003, 29: 36-37.
- [7] 刘永茂, 庞勇, 刘亚珍, 等. 止颤胶囊对小鼠 T 淋巴细胞转化的影响 [J]. 中国民康医学杂志, 2006, 18(1): 58-60.
- [8] 周厚广, 陆建明. 6-羟基多巴胺帕金森病大鼠模型的建立与评价 [J]. 中国行为医学科学, 2002, 11(1): 4-7.
- [9] Bessler H, DjaldeLLi P, Salrnan H, *et al.* IL-1 beta, IL-2, IL-6 and TNF-alpha production by peripheral blood mononuclear cell from patients with Parkinson'diseas [J]. *Biomed Pharmacother*, 1999, 53(3): 141-145.
- [10] 管小亭, 王春雪, 龙洁. 帕金森病患者外周血 TNF-a 浓度和 IL-6 质量浓度的检测及分析 [J]. 首都医科大学学报, 2004, 25: 233-235.