

• 药理与临床 •

羟基积雪草苷对转基因肌萎缩侧索硬化小鼠的治疗作用

刘颖菊^{1,2}, 小林裕太², 李颂华², 高丽佳¹

(1. 重庆医科大学 药理教研室, 重庆 400016; 2. 日本岛根大学 医学实验中心, 出云 693-8501)

摘要:目的 探讨羟基积雪草苷对铜锌超氧化物歧化酶 (Cu, Zn superoxide dismutase, SOD1)-G93A 突变肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 小鼠的治疗作用。方法 通过行为学和组织学测定, 观察羟基积雪草苷对 SOD1-G93A 突变 ALS 小鼠发病时间、生存时间、运动功能变化和神经元病理改变的影响。结果 羟基积雪草苷 (61.1 ± 11.0) 和 (185.6 ± 18.7) mg/(kg · d) 在小鼠日龄 70 d 时开始给药至死亡, 能分别延长 SOD1-G93A 突变 ALS 小鼠的生存时间 11.4 和 9.4 d, 但对发病时间无影响; 同时 (61.1 ± 11.0) mg/(kg · d) 组小鼠在肌力缓慢下降期运动功能降低减缓, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。120 d 时 L2~5 组织切片显示两治疗组脊髓前角运动神经元数明显高于 SOD1-G93A 对照组 ($P < 0.05$), 多数运动神经元胞浆中仍有尼氏体存在。结论 羟基积雪草苷对 SOD1-G93A 突变转基因小鼠运动神经元变性有保护作用, 能延长小鼠的生存时间。

关键词:羟基积雪草苷; 肌萎缩侧索硬化; 铜锌超氧化物歧化酶

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)05-0718-04

Therapeutic potential of madecassoside in transgenic mice of amyotrophic lateral sclerosis

LIU Ying-ju^{1,2}, KOBAYASHI Yuta², LI Song-hua², GAO Li-jia¹

(1. Department of Pharmacology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China;

2. Centre for Integrated Research in Science, Shimane University, Izumo 693-8501, Japan)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic potential of madecassoside in mice expressing a mutant human Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1)-G93A linked to human amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **Methods** Effects of madecassoside on onset of clinical disease, survival of mice, decline of motor function, and motor neuron (MN) degeneration were observed by behavioral analysis and histological evaluation. **Results** Madecassoside (61.1 ± 11.0) and (185.6 ± 18.7) mg/(kg · d) ig administration, beginning at 70 d of age until death, prolonged survival of SOD1-G93A ALS mice by 11.4 and 9.4 d, respectively ($P < 0.05$), but did not delay the onset of disease. Madecassoside (61.1 ± 11.0) mg/(kg · d) decreased significantly the decline of motor strength of SOD1-G93A ALS mice during the slower declining stage until end-stage of disease ($P < 0.05$). Histological evaluation of the lumbar spinal cord revealed that madecassoside treatment prevented the pathological changes typical of the transgenic disease model at 120 d of age. Average MN counts per section in the lumbar spinal cord in madecassoside-treated animals were significant more than these of untreated SOD1-G93A ALS mice ($P < 0.05$). Nissl bodies were found in cytoplasm of more motor neurons. **Conclusion** Madecassoside could protect motor neuron degeneration and increase the longevity of SOD1-G93A ALS mice.

Key words: madecassoside; amyotrophic lateral sclerosis (ALS); Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1)

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种以脊髓和脑中的运动神经元变性为特征的神经系统疾病。近年发现氧化损伤、炎症反应和细胞凋亡在神经元变性中起着重要作用^[1,2]。积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 为伞形科药用植

物。现代药理研究证明积雪草主要活性成分为三萜皂苷类^[3]。有报道积雪草总苷对小鼠棉球肉芽肿和二甲苯所致炎症有明显的抑制作用^[4]; 能抑制 A β 诱导的海马运动神经元凋亡^[5]; 可抑制髓过氧化物酶 (MPO) 及减少丙二醛 (MDA) 形成, 从而抑制

收稿日期: 2005-10-05

基金项目: 日本岛根县难病研究所、重庆市自然科学基金资助 (CSTC, 2005BB5036)

作者简介: 刘颖菊 (1963—), 女, 四川德昌县人, 副教授, 博士, 主要从事神经药理学和新药临床前药理学研究, 在该领域已发表论文 10 余篇。Tel: (023) 68485038 E-mail: liuyingjbh@yahoo.com.cn

炎症反应及减轻氧自由基损伤^[6]。以上研究提示积雪草可能对 ALS 有一定治疗作用。羟基积雪草苷(madecassoside)是积雪草三萜皂苷的主要活性成分之一,本实验以人铜锌超氧化物歧化酶(Cu, Zn superoxide dismutase, SOD1)-G93A 突变转基因小鼠为实验对象,探讨其对 ALS 的治疗作用,为开发治疗 ALS 药物提供依据。

1 材料

1.1 药品和试剂:羟基积雪草苷购自广西昌洲天然植物开发有限公司,质量分数 95%。DNA 提取试剂盒和 PCR 试剂盒及引物购自美国 Biotronics 公司。

1.2 动物:B6SJL-TgN (SOD1-G93A) 1 Gur 雌性小鼠和非转基因 B6SJL F1 雌性小鼠购自 Jackson 实验室(Bar Harbor, ME)。小鼠饲养在 12 h 灯光昼夜交替的标准化实验室中。所有操作规程均按照日本岛根医科大学实验动物应用原则进行。

1.3 仪器:转棒仪(Rotarod)为 Colombus 仪器公司生产,PCR 仪和电泳仪由美国伯乐公司生产。

2 方法

2.1 B6SJL-TgN (SOD1-G93A) 1 Gur 小鼠的繁殖筛选:B6SJL-TgN (SOD1-G93A) 1 Gur 雄性小鼠 5 只,日龄 60 d 时开始与 B6SJL F1 雌性健康小鼠按 1 雄 3 雌交配。子代小鼠剪尾提取 DNA (按试剂盒要求),加 SOD1 引物 5'-CATCAGCCC-TAATCCATCTGA-3' 和 5'-CGCGACTAACAA-TCAAAGTGA-3' 经 PCR 30 个循环扩增,确定 200~300 bp 间的 SOD1 基因条带。淘汰无 SOD1 突变基因的小鼠。

2.2 行为学测定:按文献报道方法^[7],将小鼠放在转棒仪上(60 Hz/min, Φ90 mm),记录小鼠放上转棒至落下的时间。每时间点每只小鼠测定 3 次,取小鼠呆在转棒上时间最长的 1 次反映小鼠的运动功能,如时间大于 180 s 则中止测定,按 180 s 计算。第 3 代 SOD1 基因突变小鼠从日龄 60 d 开始用转棒仪测定运动功能。以后每 4 天观察测定 1 次直至死亡。

2.3 治疗过程

2.3.1 实验分组:第 3 代 SOD1 基因突变小鼠日龄 70 d 时按运动功能情况,随机将小鼠分为 3 组。分别是:ALS 对照组,饲普通饲料;羟基积雪草苷小剂量治疗组和大剂量治疗组,分别饲相应特殊饲料;另设无 SOD1 突变基因的 B6SJL 健康小鼠对照组,饲普通饲料。每组 26 只,雌雄各半。

2.3.2 实验给药:羟基积雪草苷混匀在 AIN-93G

饲料中,制成含药 0.4 (小剂量组)和 1.2 g/kg (大剂量组)特殊饲料。小鼠日龄 70 时开始分别给予含药特殊饲料直至死亡。在小鼠 60~80 d 时根据小鼠每周消耗的饲料量及小鼠体重估计两组小鼠的给药量,分别相当于每只小鼠给药 (61.1±11.0) 和 (185.6±18.7) mg/(kg·d)。

2.3.3 发病时间和生存时间:当小鼠在转棒上的时间较前次测定时间降低 30% 以上时确定为肌力降低。据此运动功能的变化和观察小鼠前肢有无震颤确定小鼠的发病时间。当小鼠仰卧在光滑的平面上 30 s 不能翻正反射过来或单、双眼出现严重的感染时确定为小鼠死亡将其处死。小鼠从出生至死亡的时间为小鼠的生存时间。

2.3.4 脊髓运动神经元测定:在日龄 120 d 时,各组分别取小鼠 6 只,雌雄各半,4% 多聚甲醛磷酸缓冲液(0.1 mol/L)心脏穿刺灌注固定,取 L2~5 脊髓,石蜡包埋,连续切片 8 张(10 μm)作尼氏染色,光镜下观察脊髓前角运动神经元形态并计数,取 8 张切片的平均数进行比较。

2.4 统计处理:采用 PQMS 医学统计软件进行 *t* 检验(两组比较均数)和方差分析(多组比较)。

3 结果

3.1 羟基积雪草苷延长 SOD1-G93A 小鼠生存时间:SOD1-G93A 对照组小鼠在日龄 113 d 左右时开始发病,平均生存时间为 (137.8±2.5) d。羟基积雪草苷两个剂量组在小鼠 70 d 时开始给药,对小鼠发病时间没有影响,但能明显延长小鼠的生存时间,小剂量组平均生存时间为 (149.2±3.0) d (*P*<0.01),大剂量组为 (147.2±3.4) d (*P*<0.05),见表 1。B6SJL 健康小鼠无临床症状,生存时间在 1 年以上。实验中测定运动功能时对照组 1 只小鼠和羟基积雪草苷大、小剂量治疗组各有 2 只小鼠逃跑。

表 1 羟基积雪草苷对转基因 SOD1-G93A 小鼠发病时间和生存时间的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effects of madecassoside on onset of clinical disease and survival time of TgN (SOD1-G93A) mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	动物/只		发病时间/ d	生存时间/ d	生存时间 延长/d
		雄性	雌性			
SOD1-G93A 对照	—	9	10	112.7±3.5	137.8±2.5	—
羟基积雪草苷	61.1±11.0	8	10	113.3±2.6	149.2±3.0**	11.4
	185.6±18.7	8	10	112.0±4.0	147.2±3.4*	9.4

与 SOD1-G93A 对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01

P*<0.05 *P*<0.01 vs SOD1-G93A control group

3.2 羟基积雪草苷延缓 SOD1-G93A 小鼠运动功能降低: SOD1-G93A 小鼠运动功能降低分为两阶段: 发病时肌力快速降低和随后肌力缓慢下降至完全瘫痪。羟基积雪草苷治疗不能防止肌力的快速降低, 但小剂量组在肌力缓慢降低阶段能延缓小鼠运动功能的降低, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$), 见图 1。

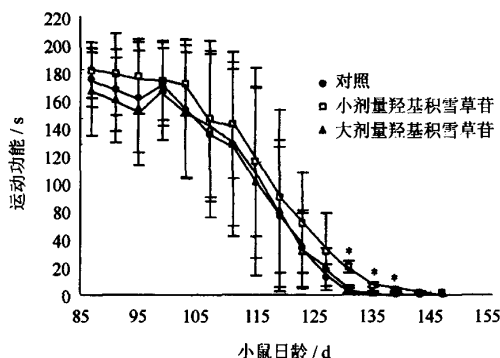
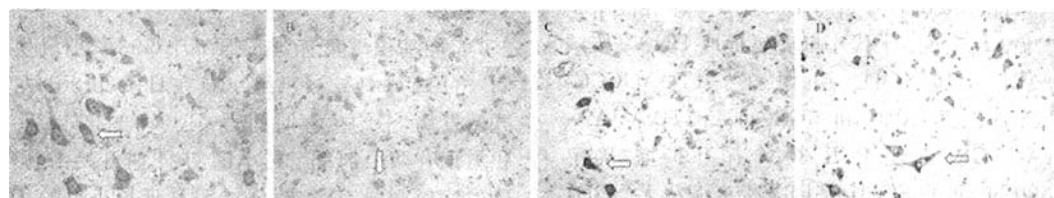


图 1 羟基积雪草苷对 SOD1-G93A 小鼠运动功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=18 \sim 19$)

Fig. 1 Effect of madecassoside on motor function of SOD1-G93A mice ($\bar{x} \pm s$, $n=18 \sim 19$)



A-健康对照组 B-SOD1-G93A 组 C、D-大小剂量羟基积雪草组
A-normal control group B-SOD1-G93A group C, D-large and small dose of madecassoside group

图 2 小鼠 120 d 时脊髓腰段的组织切片 ($n=6$)

Fig. 2 Histological evaluation of 120-day-old lumbar spinal cord in mice ($n=6$)

($P < 0.05$), 多数运动神经元胞浆中仍有尼氏体存在。以上结果表明羟基积雪草苷对 SOD1-G93A 小鼠运动神经元有保护作用, 从而能改善小鼠运动功能, 延长生存时间。但两剂量组发病时间与对照组比较无差异, 说明该药不能阻止或延缓发病, 对神经元变性的初始诱发因素无干预作用, 只延缓小鼠发病后的病理进程。小剂量组作用更显著并能延缓运动功能降低, 实验中也发现大剂量组小鼠没有小剂量组生长状况好, 这可能是由于大剂量组药物剂量过大, 产生不良反应影响了治疗效果。为确定最佳治疗剂量和效果, 尚需进一步选用更小的剂量进行实验。

ALS 发生有散发性和家族性两种形式, 他们在病理和临床表现上没有差异^[8]。家族性 ALS 是基因

3.3 羟基积雪草苷延迟 SOD1-G93A 小鼠脊髓运动神经元变性: B6SJL 健康对照小鼠 120 d 时 L2~5 脊髓前角平均每张切片有 (22.0 ± 1.8) 个运动神经元, 细胞浆中有大量尼氏体, 胞体较大。未治疗的 SOD1-G93A 小鼠 120 d 时 L2~5 脊髓前角运动神经元明显减少, 平均每张切片 (8.3 ± 1.4) 个, 细胞体积极明显缩小, 细胞浆中尼氏体消失。羟基积雪草苷大、小剂量组平均每张切片运动神经元数分别为 (12.2 ± 2.5) 和 (14.3 ± 2.3) 个, 与未治疗组比较差异显著 ($P < 0.05$), 但细胞体积极缩小, 细胞浆中尼氏体减少, 见图 2。

4 讨论

本实验结果首次证明羟基积雪草苷对 SOD1-G93A 小鼠的治疗作用。实验结果显示羟基积雪草苷 (61.1 ± 11.0) 和 (185.6 ± 18.7) mg/(kg · d) 在症状前期 (70 d) 开始给药至小鼠死亡, 能分别延长 ALS 小鼠的生存时间 11.4 和 9.4 d, 同时 (61.1 ± 11.0) mg/(kg · d) 组小鼠在肌力缓慢下降期运动功能降低缓慢, 与对照组比差异显著 ($P < 0.05$)。120 d 时 L2~5 病理切片显示两治疗组脊髓前角运动神经元数目明显高于 SOD1-G93A 小鼠

遗传性的, 20% 的病人是由于 SOD1 突变。目前已发现的突变类型有 90 多种, 当突变的 SOD1 在转基因小鼠过度表达时, 引起小鼠进行性运动神经元变性, 出现与人类相同的症状和病理特征^[9]。SOD1-G93A 突变转基因小鼠是目前国际上最常用和可靠的 ALS 动物模型, 小鼠在出生后 3~4 个月左右时发病, 发病 1 个月左右后死亡。由于 ALS 疾病的发生发展由多因素介导、参与, 单一药物很难产生非常显著的效果。以前的研究显示用药物治疗 SOD1 介导的 ALS 在转基因小鼠只能产生轻、中度效果, 维生素 E 和 gabapentin 等均不能延长 SOD-G93A 小鼠的生存时间。FDA 批准并推荐使用的唯一药物 Riluzole (谷氨酸拮抗剂) 也只能延长 SOD1-G93A

小鼠的生存时间 10~15 d,而对发病时间无影响^[10]。本实验结果显示羟基积雪草苷虽不能延迟小鼠发病但能延长小鼠生存期 10 d 左右,这已是一个很好的苗头,且积雪草在我国长江以南地区广泛生长,药源丰富,因此有必要进一步研究并将其开发为治疗 ALS 和其他神经元变性疾病的药物。

References:

- [1] Yoshihara T, Ishigaki S. Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Neurochem*, 2002, 80(1): 158-167.
- [2] Mhatre M, Floyd R A, Hensley K. Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis: common links and potential therapeutic targets [J]. *J Alzheimers Dis*, 2004, 6(2): 147-157.
- [3] Qin L P, Zhuang W G, Zheng H C. Progress in the study on centella asiatica [J]. *World Phytomed* (国外医药:植物药分册), 1997, 12(4): 154-157.
- [4] Ming Z J, Sun M. Study on anti-inflammation effect of asiaticoside [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol* (中国中医药科技), 2002, 9(1): 62.
- [5] Inhee M J, Ji-Eun S, Sung H Y. Protective effects of asiaticoside derivatives against beta-amyloid neurotoxicity [J]. *J Neurosci Res*, 1999, 58(3): 417-425.
- [6] Chen B W, Ji B A, Zhang X Z, et al. Protection of tinctured extract of centella asiatica on gastric mucosa and its possible mechanism [J]. *Chin J Dig* (中华消化杂志), 1999, 19(4): 246-248.
- [7] Azzouz M, Ralph G S, Storkebaum E, et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS mode [J]. *Nature*, 2004, 429: 413-417.
- [8] Rowland L P. *Merritt's Textbook of Neurology* [M]. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995.
- [9] Brown R H Jr. Amyotrophic lateral sclerosis; recent insights from genetics and transgenic mice [J]. *Cell*, 1995, 80: 687-692.
- [10] Gurney M E, Cutting F B, Zhai P, et al. Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Ann Neurol*, 1996, 39: 147-157.

芫花根总黄酮含药血清对小鼠细胞免疫功能的影响

高晓雯, 郑维发*, 彭烨城

(徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要:目的 建立小鼠血清中芫花根总黄酮(TFRD)各成分的 HPLC 测定方法,探讨 TFRD 含药血清对正常小鼠细胞免疫功能的影响。方法 HPLC 法测定小鼠单次 ig 给药后不同时间点血药浓度;MTT 法检测多次 ig 给药后含药血清对正常小鼠脾淋巴细胞增殖、NK 与 LAK 细胞杀伤活性和腹腔巨噬细胞的吞噬功能等细胞免疫功能的影响。结果 单次 ig TFRD 后血药浓度在 20~30 min 达到高峰;TFRD 含药血清能促进脾淋巴细胞增殖,增加 NK 和 LAK 细胞杀伤活性,增强腹腔巨噬细胞的吞噬能力。结论 TFRD 含药血清能增强正常小鼠细胞免疫功能。

关键词:芫花根总黄酮;血清药理学;细胞免疫

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)05-0721-05

Effect of serum containing total flavonoids from roots of *Daphne genkwa* on cell immunity in mice

GAO Xiao-wen, ZHENG Wei-fa, PENG Ye-cheng

(Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province,
Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China)

Abstract: Objective To establish HPLC method for assaying total flavonoids from the roots of *Daphne genkwa* (TFRD) in serum of mice and to elucidate the effect of mice serum containing TFRD on cell immunity in mice. **Methods** TFRD Concentration in serum was determined from the mice received single ig TFRD at certain time intervals using HPLC method. The effects of TFRD serum on lymphocyte proliferation, killing activities of NK and LAK cell, and phagocytic activity of macrophage were detected by MTT method. **Results** TFRD in serum reached its highest concentration in 20—30 min after ig administration. TFRD-containing serum significantly improved the proliferation of lymphocyte, enhanced the killing activities of NK and LAK cells, and enforced the phagocytic activity of macrophage. **Conclusion** TFRD-containing serum is an effective agents for enhancing cell immunity in mice.

收稿日期:2005-10-24

基金项目:教育部科学技术研究重点项目(03049);江苏省高校自然科学研究计划重点项目(02KJA360002)

作者简介:高晓雯(1977—),女,江苏徐州人,徐州师范大学天然产物化学及药理学硕士研究生。E-mail: gxw2003@126.com

*通讯作者 郑维发 Tel: (0516) 83403179 E-mail: yyzw@xznz.edu.cn