

刘雪城, 金皓洁, 陈彬辉, 等. 蚕豆苗提取物对帕金森病的保护作用 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 379–386. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010053

LIU Xuecheng, JIN Haojie, CHEN Binhui, et al. Protective Effect of Broad Bean Seedling Extract on Parkinson's Disease[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(22): 379–386. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010053

· 营养与保健 ·

蚕豆苗提取物对帕金森病的保护作用

刘雪城^{1,2}, 金皓洁², 陈彬辉², 何凌云^{2,*}, 刘陶世^{1,*}

(1.南京中医药大学药学院, 江苏南京 210023;

2.南京艾德凯腾生物医药有限责任公司, 江苏南京 211100)

摘要:目的: 研究蚕豆苗提取物 (Broad bean seedling extract, BSE) 抗帕金森病的作用及初步机制。方法: 采用 50 $\mu\text{mol/L}$ 六羟基多巴胺 (6-Hydroxydopamine, 6-OHDA) 诱导 PC-12、SH-SY5Y 细胞损伤, 应用 MTT 法检测不同浓度 BSE 对神经细胞增殖的影响, 并测定神经细胞中活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 水平、线粒体膜电位以及细胞凋亡情况。采用腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 建立帕金森病小鼠模型, 设置空白对照组、模型对照组、500 mg/kg BSE 组、300 mg/kg BSE 组、25 mg/kg 左旋多巴组, 每组 6 只。通过爬杆试验、转轴实验和抓力实验观察 BSE 对小鼠行为学功能的影响, 并测定 BSE 对小鼠脑组织中丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px) 含量的影响。结果: PC-12 和 SH-SY5Y 细胞经 6-OHDA 诱导后, 细胞增殖受到抑制、细胞活性氧水平上升、线粒体膜电位下降, 细胞凋亡增多。BSE 预处理可极显著降低神经细胞的细胞增殖抑制率、活性氧水平, 增加线粒体膜电位, 并抑制细胞凋亡 ($P<0.01$)。BSE 可极显著缩短 MPTP 帕金森病模型小鼠的爬杆时间, 增加抓力和延长转轴时间, 提高小鼠脑组织 SOD 和 GSH-Px 水平, 降低 MDA 含量, 并抑制脑组织脂质过氧化 ($P<0.01$)。结论: BSE 对神经细胞具有保护作用, 能明显改善帕金森病模型小鼠的症状, 提示 BSE 可能对帕金森病具有潜在的治疗意义。

关键词: 蚕豆提取物, 凋亡, 抗氧化作用, 帕金森病

中图分类号: R153.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)22-0379-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010053

本文网刊:



Protective Effect of Broad Bean Seedling Extract on Parkinson's Disease

LIU Xuecheng^{1,2}, JIN Haojie², CHEN Binhui², HE Lingyun^{2,*}, LIU Taoshi^{1,*}

(1.School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2.Nanjing CoreTech Biomedical Co., Ltd., Nanjing 211100, China)

Abstract: Objective: To study the protective effect of broad bean seedling extract (BSE) on Parkinson's disease. Methods: PC-12 and SH-SY5Y cell injury were induced by 50 $\mu\text{mol/L}$ 6-OHDA. The effects of BSE on the proliferation of neuro cells were determined by MTT method. The effects of BSE on reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential and apoptosis in neuro cells were measured. The mouse model of Parkinson's disease was established by intraperitoneal injection of MPTP, and the mice were divided into blank control group, model control group, 500 mg/kg BSE group, 300 mg/kg BSE group and 25 mg/kg L-dopa group with 6 rats in each group. The effects of BSE on the behavioral function of mice were studied via pole climbing test, rotation test and grip test, and the effects of BSE on the contents of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the brain of mice were determined by the test kit. Results: After PC-12 and SH-SY5Y neuro cells were treated by 6-OHDA, the cell proliferation was inhibited, the level of reactive oxygen species increased, the mitochondrial membrane potential decreased

收稿日期: 2022-01-10

作者简介: 刘雪城 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药制药技术与开发研究, E-mail: liuxuecheng0924@126.com。

* 通信作者: 何凌云 (1978-), 女, 博士, 研究方向: 中药制药技术与开发研究, E-mail: helina@core-tech.com.cn。

刘陶世 (1971-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药剂学研究, E-mail: tsiur4111@sina.com。

and the apoptosis increased. After pretreatment with BSE, the inhibition rate of cell proliferation and the level of reactive oxygen species were significantly decreased, the mitochondrial membrane potential was increased and the apoptosis was inhibited ($P<0.01$). BSE could significantly shorten the rod climbing time, increase the grip and prolong the rotation time, increase the levels of SOD and GSH-Px in brain tissue, decrease the content of MDA and inhibit lipid peroxidation in brain tissue of MPTP Parkinson's disease model mice ($P<0.01$). Conclusion: BSE had a protective effect on nerve cells and can significantly improve the symptoms of Parkinson's disease in mice. These results suggested that BSE might have potential therapeutic significance for Parkinson's disease.

Key words: broad bean extract; apoptosis; antioxidation; Parkinson's disease

帕金森病是一种以黑质致密部多巴胺神经元的进行性变性为主要特征的神经系统疾病,是仅次于阿尔兹海默病的第二大神经退行性疾病^[1-2]。目前帕金森病的病因尚不完全清楚,一般认为氧化应激、神经炎症、线粒体功能障碍和神经营养因子不足等参与该疾病的发生、发展^[3-5]。研究表明,食用富含黄酮与酚酸类等生理活性成分的物质能够保护神经细胞、改善帕金森病相关症状。石榴汁中含有黄酮和酚酸,能够显著降低帕金森小鼠模型活性氧(Reactive oxygen species, ROS)、丙二醛水平、提高抗氧化酶活性、改善氧化应激^[6]。银杏叶提取物对鱼藤酮诱导的帕金森大鼠模型具有明显的神经保护作用,能够提高抗氧化酶活性、降低促炎细胞因子的水平,改善氧化应激与炎症反应^[7]。蒲葵子总黄酮可通过调控 BLACAT1/miR-29c-3p 分子轴,抑制 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的人神经母细胞瘤细胞氧化应激、凋亡,进而保护神经细胞^[8-9]。

蚕豆,为豆科野豌豆属植物 *Vicia faba* L. 的种子^[10-11],属药食两用,性味平甘,具有益气健脾和清热止血功效。蚕豆苗是蚕豆发芽后的嫩茎叶。研究显示,蚕豆苗中不仅含有大量的左旋多巴,还含有对帕金森病具有保护作用的原花青素和黄酮类等成分^[12-17]。左旋多巴是目前治疗帕金森病的金标准,患者服用左旋多巴后经体内多巴胺脱羧酶转化成多巴胺,从而发挥其药理作用。本研究以蚕豆苗提取物(Broad bean seedling extract, BSE)为研究对象,拟实验观察 BSE 对帕金森病的影响,并初步探讨其可能的作用机制。PC-12 细胞和 SH-SY5Y 细胞是常用的两种神经细胞^[18-19],适用于药物神经保护作用研究。本论文重点探讨 BSE 对这两种神经细胞的保护作用以及对帕金森病小鼠模型的影响^[20-22],为阐明 BSE 治疗帕金森综合征的作用机理及其产品研发打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

蚕豆苗提取物 自制取 45~50cm 高的蚕豆苗适量,洗净,切成小段,榨汁,合并蚕豆苗汁,煮沸 3~5 min,过滤,得滤液。将滤液减压浓缩,真空干燥,得 BSE 16 g。采用 HPLC 法测得蚕豆苗提取物中左旋多巴为含量 4.99%,采用紫外-可见分光光度测

定 BSE 中总黄酮、异黄酮和原花青素的含量分别为 18.07%、1.20%和 0.45%; PC-12 细胞、SH-SY5Y 细胞 均采购于凯基生物科技发展有限公司; C57BL/6 小鼠 由上海斯莱克实验动物有限公司提供,许可证号: SCXK(沪)2017-0005, 周龄: 4~5 周健康小鼠, 体重: 16~18 g, 性别: 雄性, 动物数: 每组 6 只, 共 30 只, 自由供给标准饲料和纯净水, 保持 12 h 光照(9:00~21:00)和 12 h 黑暗(21:00~次日 9:00)交替循环, 室温 20~23 ℃, 湿度 55%±10%。动物适应环境 5 d 后开始实验, 实验过程严格遵守 3R 原则; D0600 左旋多巴 日本东京化成工业株式会社; 6-羟基多巴胺、SIGMAD2650 二甲亚砜 DMSO(溶解受试药品) 美国 Sigma-Aldrich; 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MoIT4081/23007-85-4100 mg) 美国 Target; 四甲基偶氮唑盐 MTT 美国 Amresco0793; 二甲亚砜 DMSO(溶解 Formazan 结晶) 中国上海久亿化学试剂有限公司; KGT010-1 活性氧检测试剂盒、KGY002 青霉素/链霉素溶液、KGY001 0.25% 胰蛋白酶-EDTA、KGB500 PBS、KGA602 线粒体膜电位检测试剂盒、KGA105 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 中国江苏凯基生物技术股份有限公司。

SW-CJ-1FD 超净工作台 中国苏州净化设备有限公司; OLYMPUS IX51 生物倒置显微镜 日本奥林巴斯; ELx800 酶标仪 美国 BioTek; WH-2 振荡器 中国上海沪西分析仪器厂; 通风橱 中国苏州亿达; Becton-Dickinson FACSCalibur 流式细胞仪 美国 BD 公司; XD-101CO₂ 培养箱 日本 SANYO; 80-2 台式低速离心机 中国上海医疗器械股份有限公司医疗设备厂; YXQ-LS-50 立式压力锅 中国上海博讯。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT 法研究 BSE 对帕金森模型细胞增殖的影响

1.2.1.1 造模与给药浓度 经过前期预实验, 6-羟基多巴胺(6-Hydroxydopamine, 6-OHDA)的造模浓度选择为 50 μmol/L, 该浓度对 PC-12 细胞和 SH-SY5Y 细胞的抑制率分别为 37.65% 和 42.79%。BSE 的安全给药浓度梯度选择为 5、10、20、40、80、160 μg/mL。

1.2.1.2 实验分组及处理 将冻存的 PC-12 细胞和 SH-SY5Y 细胞, 分别迅速放入 37 ℃ 恒温水中解冻, 并缓缓摇动试管, 使其快速融化。吸出融化的细胞悬

液注入到 3 mL 含 10% 胎牛血清的培养基中,在 4 ℃ 条件下 1000 r/min 离心 5 min,弃去上清溶液;将余下的细胞沉淀置于 1 mL 培养基中,轻轻吹打使其成为单细胞悬液。吸取单细胞悬液并加入到培养瓶中,加培养液至 6 mL,摇匀静置 3 min,置于 37 ℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中进行培养 24 h 以上。

将稳定生长的 PC-12 细胞和 SH-SY5Y 细胞,分别从培养箱中取出,缓慢加入 PBS 清洗两遍,弃去 PBS;加入预热的胰蛋白酶 2 mL 后置于 CO₂ 培养箱中消化,当观察细胞完全脱离瓶壁后终止消化;加入 3 mL 培养基,吹打细胞使其成单细胞悬液。1000 r/min 离心 5 min,弃去上清,在细胞沉淀中加入 1 mL 培养基混匀成细胞悬液;经过计数板处理,在显微镜下观察细胞计数。计算并配制浓度为 5×10^4 个/mL 细胞悬液,分别于 96 孔细胞培养板中每孔加入 100 μ L 细胞悬液;并将培养板置于 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。

将上述 96 孔细胞培养板中的 PC-12 细胞和 SH-SY5Y 细胞,分别分为 8 组,其中空白对照组和模型对照组每孔细胞分别加入 100 μ L 不含药的空白培养基,6 个给药组每孔细胞分别加入 100 μ L 含 BSE 浓度为 5、10、20、40、80、160 μ g/mL 的培养基;将 96 孔细胞培养板置于 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,模型组与给药组各加入 50 μ mol/L 6-OHDA 造模 24 h,空白对照组加入等体积 PBS;将 96 孔板每孔细胞加入 20 μ L MTT(5 mg/mL)进行染色,在培养箱继续培养 4 h;弃去培养基,每孔加入 150 μ L DMSO 进行溶解,摇床 10 min 轻轻混匀;利用酶标仪检测每孔 OD 值, $\lambda=490$ nm。根据测得的吸光度值(OD 值), A_i 来判断活细胞数量,OD 值越大,细胞活性越强。分别计算各组别细胞增殖抑制率。

$$W(\%) = \left(1 - \frac{A_i}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中:W 表示细胞增殖抑制率,%; A_i 表示给药组或模型对照组测得的吸光度值(O 值); A_0 表示空白对照组测得的吸光度值(OD 值)。

1.2.2 蚕豆苗提取物对帕金森模型细胞活性氧含量(ROS)、线粒体膜电位以及凋亡率影响的实验 按 1.2.1 项下培养细胞。将 96 孔细胞培养板中的 PC-12 细胞和 SH-SY5Y 细胞分别分为 6 组,其中空白对照组与模型对照组加入 100 μ L 不含药的空白培养基,左旋多巴阳性对照组(4 μ g/mL),BSE 5、20、80 μ g/mL 组分别加入 100 μ L 含药培养基。各组细胞置于 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h;将模型对照组与各给药组加入 50 μ mol/L 6-OHDA 作用 24 h,空白对照组加入等体积 PBS。然后分别在各孔中加入 0.25% 胰酶(不含 EDTA)消化细胞,用 PBS 洗涤细胞一次,1000 r/min 离心 5 min,收集并调整细胞浓度为 1×10^6 /mL。采用活性氧检测试剂盒、线粒体膜

电位检测试剂盒(JC-1)、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒检测各组细胞的 ROS 值、线粒体膜电位和细胞凋亡情况^[23-24]。

1.2.3 蚕豆苗提取物(BSE)对 MPTP 诱导帕金森病小鼠模型的影响

1.2.3.1 分组与造模给药 健康 C57BL/6 小鼠 30 只,随机分为 5 组,每组 6 只,分别为空白对照组、模型对照组、左旋多巴阳性对照组 25 mg/kg、BSE 高剂量组 500 mg/kg、BSE 低剂量组 300 mg/kg。每次灌胃药液体积为 0.2 mL,空白对照组和模型对照组每次灌服等体积蒸馏水,1 次/d,连续给药 19 d,给药前后不禁食不禁水。其中在第 11~15 d 灌胃给药 1 h 后,除空白对照组注射等体积生理盐水外,其余各组小鼠每天腹腔注射 30 mg/kg 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)一次,连续注射 5 d^[21-22,25-27]。

1.2.3.2 行为学检测 抓力试验^[28]:将受试小鼠放置于拉力仪上,抓住小鼠尾部,向后直线拉拽,记录抓力数据。在给药第 8 d 测定所有小鼠抓力大小,并在第 15 d 给药后,再次测定其抓力。

爬杆实验^[29-30]:取直径 1 cm、高 50 cm、顶部有一直径 3 cm 木球的光滑木杆。测试时将被测小鼠置于软木小球上,记录小鼠爬到杆底所需要的时间,在给药第 8 d 测定所有小鼠爬杆时间,并在第 18 d 给药 1 h 后,再次测定其爬杆时间。并对爬杆时间进行评分测试,三秒钟内爬一半者记 3 分,6 s 内爬一半者记 2 分,超过 6 s 则记 1 分,重复三次,取平均值。

转轴实验^[31]:将小鼠置于转棒上,测试小鼠从转棒开始旋转到从转棒上掉落的时间。在给药第 8 d 测定所有小鼠转轴时间,并在第 19 d 给药 1 h 后,测定其转轴时间。

行为学检测项目,若于同一天测定抓力试验、爬杆实验、转轴实验三项行为学指标,实验结果会因小鼠疲劳而失真,因此分 3 d 测定。

1.2.3.3 氧化应激因子的检测 行为学实验后,将各组小鼠断头取脑组织,制备组织匀浆,低温离心,取上清液,采用 Bradford 定量蛋白法测定各样本光吸收度值,检测各组小鼠脑组织中丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)的含量变化^[32-33]。

1.3 数据处理

采用 SPSS 23 统计软件、Graphpad prism 8 软件进行统计学分析与图表绘制,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示,所有实验均重复 3 次以上,当数据满足正态分布与方差齐性时,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 检验,方差不齐采用 Dunnett-*t* 检验进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 BSE 对神经细胞增殖的影响

图 1 结果显示,经 6-OHDA 作用后,PC-12 和 SH-SY5Y 两种神经细胞的增殖均受到明显抑制,其抑制率与空白对照组比较,呈极显著上升($P<0.01$),表明 6-OHDA 可诱导神经细胞损伤。BSE 不同浓度给药组神经细胞的增殖抑制率极显著小于模型对照组($P<0.01$),且呈 BSE 浓度相关性,表明 BSE 对神经细胞损伤具有较好的保护作用。

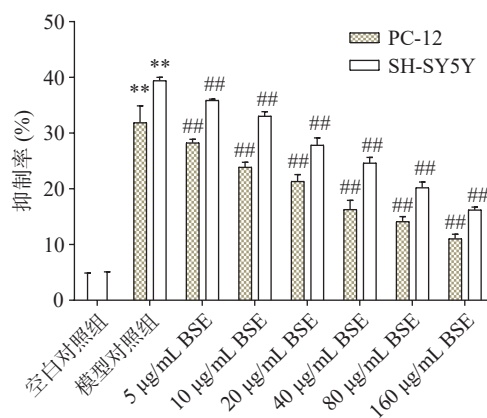


图 1 蚕豆苗提取物对 6-OHDA 损伤 PC-12 和 SH-SY5Y 细胞的保护作用

Fig.1 Protective effect of broad bean seedling extract on PC-12 and SH-SY5Y cells damaged by 6-OHDA

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$;图 2~图 5 同。

6-OHDA 能够导致细胞炎症、产生氧化应激,从而引起线粒体功能受损,进而激活凋亡级联通路,造成多巴胺能神经元的死亡。研究表明,植物中提取的

黄酮和酚类化合物能够缓解细胞炎症、降低氧化应激,保护神经细胞的线粒体功能,改善 6-OHDA 导致的神经细胞增殖抑制^[2,4]。BSE 对神经细胞的保护作用,可能和上述机制有关。

2.2 BSE 对神经细胞 ROS、线粒体膜电位的影响

活性氧检测试剂盒是一种利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒。在活性氧存在的条件下,DCFH 被氧化生成荧光物质 DCF,荧光强度与细胞内活性氧水平成正比。线粒体膜电位检测试剂盒是一种利用荧光探针 JC-1 进行线粒体膜电位的检测的试剂盒,线粒体膜电位下降时,表现为 JC-1 单体比例升高,绿色荧光强度增强。正常线粒体内,JC-1 形成聚合物,表现为红色荧光强度增强或绿色荧光强度减弱。

由图 2 可知,经 6-OHDA 作用后,促使 PC-12 和 SH-SY5Y 细胞产生氧化应激反应,导致细胞内的荧光强度增强,活性氧含量升高,且极显著高于空白对照组($P<0.01$)。高活性氧引起线粒体功能损伤,表现为 JC-1 单体比例升高,绿色荧光强度增强,线粒体膜电位下降($P<0.01$),促进细胞的进一步凋亡。与模型组比较,BSE 两浓度(20 和 80 µg/mL)下均能够抑制线粒体膜电位下降,且具有极显著差异($P<0.01$),5 µg/mL BSE 无统计学意义($P>0.05$)。与模型组相比,BSE 各浓度干预组与左旋多巴组均能够抑制 6-OHDA 造成的活性氧水平升高($P<0.01$),表明 BSE 和左旋多巴在保护线粒体功能和抑制氧化应激反应具有较好的效果。

2.3 BSE 对神经细胞凋亡的影响

线粒体损伤与氧化应激能够造成细胞损伤和凋

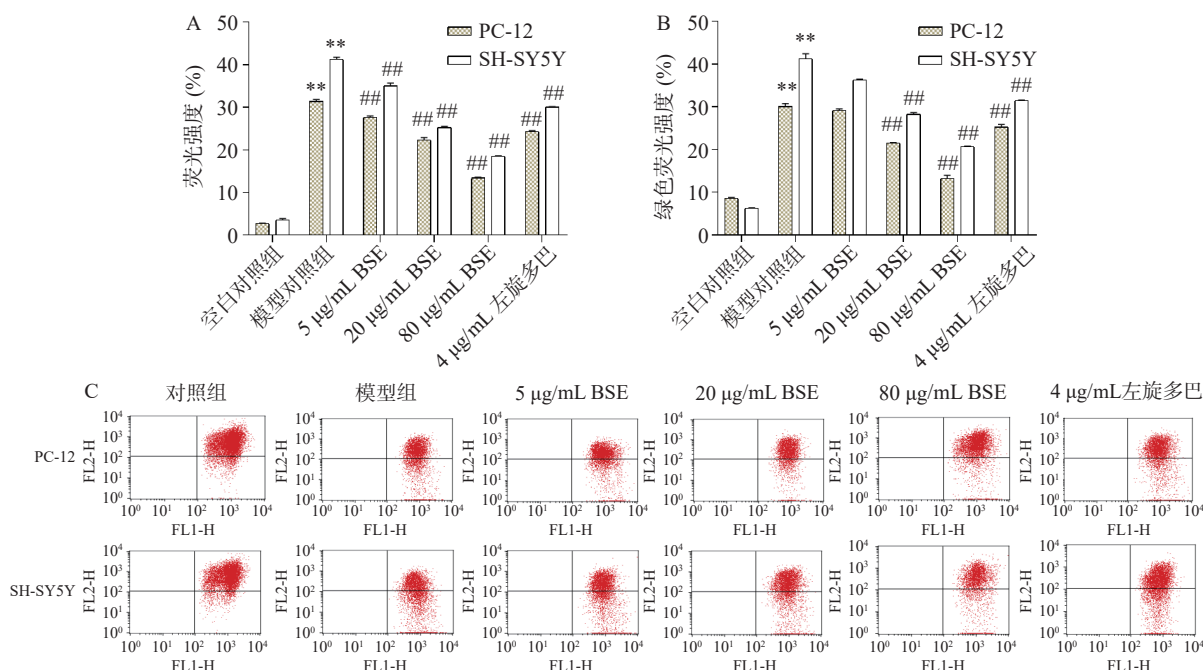


图 2 BSE 对神经细胞 ROS、线粒体膜电位的影响

Fig.2 Effects of BSE on neuronal ROS and mitochondrial membrane potential

注:(A)神经细胞内活性氧(ROS)水平测定;(B)神经细胞线粒体膜电位荧光测定结果;(C)神经细胞线粒体膜电位流式图。

亡。由图 3 可知,经过 6-OHDA 作用后,PC-12、SH-SY5Y 细胞凋亡率极显著增加($P<0.01$)。与模型对照组相比,BSE 两个浓度 20 和 80 $\mu\text{g/mL}$ 干预组和左旋多巴组均能够显著抑制 PC-12、SH-SY5Y 细胞凋亡($P<0.05$),5 $\mu\text{g/mL}$ BSE 抑制神经细胞凋亡作用不显著($P>0.05$),且 BSE 干预组呈浓度相关性。结果还显示,20 和 80 $\mu\text{g/mL}$ BSE 抗凋亡效应要显著

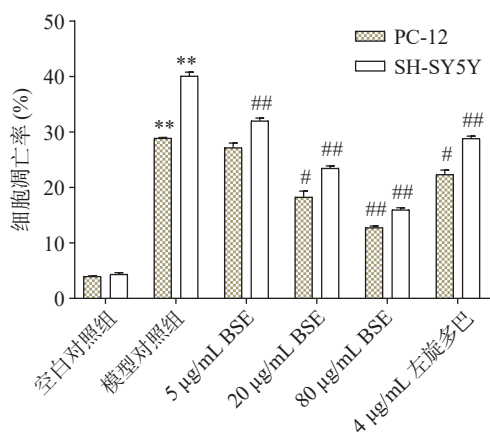


图 3 蚕豆苗提取物对神经细胞凋亡的影响

Fig.3 Effects of broad bean extract on apoptosis of neuro cells

优于左旋多巴阳性组($P<0.05$),这进一步表明 BSE 中除左旋多巴外,还有其他成分参与其抗神经细胞凋亡的作用。

2.4 BSE 对 MPTP 诱导帕金森病模型小鼠的影响

2.4.1 BSE 对帕金森模型小鼠行为学的影响 图 4 结果表明,小鼠注射 MPTP 后,明显出现爬杆、转轴、抓力等行为障碍,说明 MPTP 引起小鼠行为异常,帕金森病小鼠模型复制成功。与模型对照组比较,BSE 各给药组小鼠行为学障碍得到改善,且高剂量组(500 mg/kg)效果更加显著,数据具有极显著性差异($P<0.01$)。左旋多巴 25 mg/kg 对小鼠行为障碍的改善作用不如 BSE 给药组($P<0.01$),这再次提示 BSE 中除了左旋多巴成分外,还含有其他成分参与对神经细胞的保护。

2.4.2 BSE 对帕金森病模型小鼠纹状体中 SOD、GSH-Px 和 MDA 含量的影响 由图 5 可知,正常小鼠经过 MPTP 注射后,小鼠大脑纹状体中 SOD 和 GSH-Px 水平下降,MDA 含量升高,说明 MPTP 能够导致小鼠神经细胞的氧化应激反应,产生神经细胞毒性,损伤了神经元。与模型对照组比较,BSE 两剂

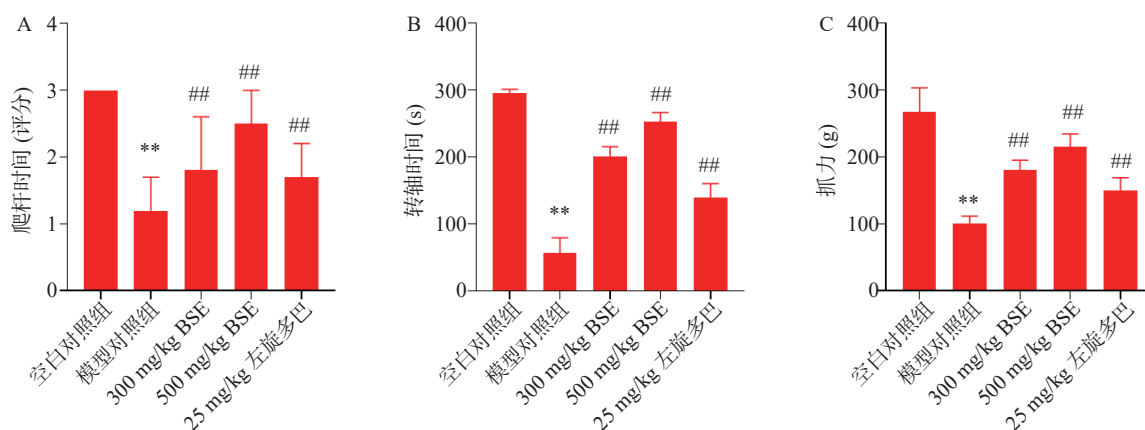


图 4 蚕豆苗提取物对帕金森病模型小鼠的影响

Fig.4 Effects of broad bean extract on Parkinson's disease in mice

注: A.爬杆试验; B.转轴实验; C.抓力实验。

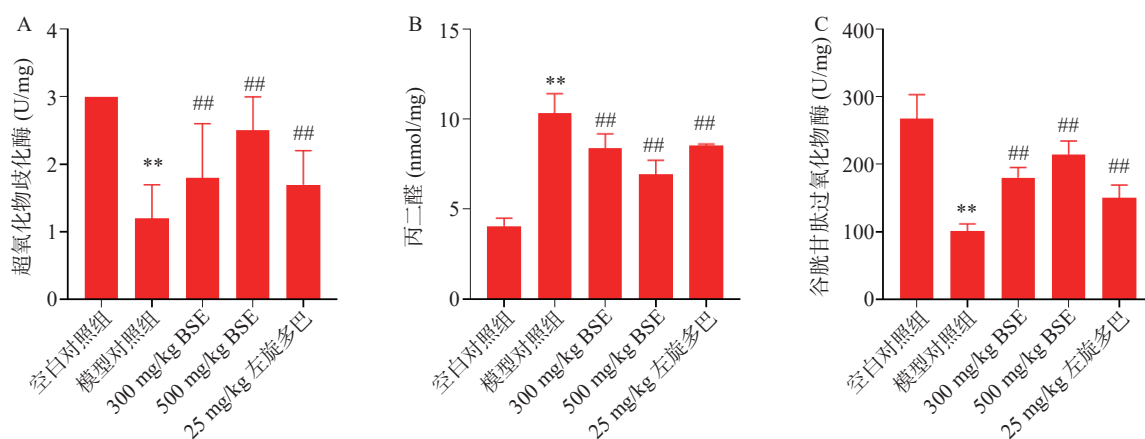


图 5 蚕豆苗提取物对帕金森病模型小鼠纹状体中 SOD、MDA 和 GSH-Px 含量的影响

Fig.5 Effects of broad bean extract on the contents of SOD, MDA and GSH-Px in striatum of Parkinson's model mice

注: A.超氧化物歧化酶(SOD); B.丙二醛(MDA); C.谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)。

量组均能使帕金森症小鼠纹状体的 SOD 和 GSH-Px 水平上升,且降低 MDA 含量,经统计均具有极显著差异($P<0.01$);左旋多巴对帕金森症小鼠表现出同样的作用。

3 讨论与结论

帕金森病最主要的病理改变是中脑黑质多巴胺能神经元的变性死亡,进而导致纹状体多巴胺含量显著性减少而致病。

本文采用 6-OHDA 诱导 PC-12 和 SH-SY5Y 两种神经细胞损伤,造成线粒体膜电位降低、ROS 水平升高,神经细胞凋亡增加,从而抑制其增殖作用^[18,34]。BSE 能够提高 PC-12 和 SH-SY5Y 神经细胞的线粒体膜电位,降低 ROS 水平,抑制模型细胞凋亡,从而有利于神经细胞的增殖,对神经细胞有明显的保护作用。

本文采用 MPTP 腹腔注射建立帕金森小鼠模型,小鼠出现明显的行为障碍、脑组织 SOD 和 GSH-Px 水平下降、MDA 含量升高^[25,35,36]。BSE 能改善 MPTP 致帕金森病模型小鼠的行为障碍,提高小鼠脑组织 SOD 和 GSH-Px 水平,降低 MDA 含量,明显地抑制小鼠脑组织脂质过氧化。

上述研究证实了 BSE 对神经细胞的保护作用,同时 BSE 能显著改善帕金森小鼠的行为障碍,且这一作用可能与降低脑纹状体 MDA 水平、升高 SOD 和 GSH-Px 相关,体现了 BSE 的抗氧化作用。研究表明,许多植物中的总黄酮、总酚提取物能够明显减轻神经细胞损伤,抑制线粒体功能障碍,对帕金森动物模型具有显著改善^[6-8]。蚕豆苗中亦含有丰富的酚类与黄酮类物质^[12,17,37],这应该是其发挥抗帕金森病效应的物质基础。

此外,蚕豆苗中还含有左旋多巴,这是疗效明确的帕金森治疗药物。本研究以左旋多巴组为阳性对照,且剂量与 BSE 高剂量组中所含左旋多巴相同,旨在探讨蚕豆苗提取物中除左旋多巴外,其它成分(黄酮类和酚类)是否对损伤的神经细胞和帕金森小鼠模型具有保护作用,这些成分是否能与左旋多巴发挥协同增效作用。研究结果表明,BSE 对神经细胞的保护作用以及对帕金森小鼠行为的改善作用均要优于左旋多巴单用,这一结果显示 BSE 中的黄酮类和酚类成分参与了 BSE 的抗帕金森病作用。当然,BSE 中的黄酮类和酚类成分中具体发挥神经细胞保护和抗帕金森症的单体成分及其详细作用机理还有待进一步研究。

参考文献

- [1] BRISTON T, HICKS A R. Mitochondrial dysfunction and neurodegenerative proteinopathies: Mechanisms and prospects for therapeutic intervention[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2018, 46(4): 829–842.
- [2] RAVI S K, NARASINGAPPA R B, JOSHI C G, et al. Neuroprotective effects of Cassia tora against paraquat-induced neurode-

generation: Relevance for Parkinson's disease[J]. *Natural Product Research*, 2018, 32(12): 1476–1480.

[3] CHIARA V, ELEONORA S, ANDREA C, et al. Resveratrol protects neuronal-like cells expressing mutant Huntingtin from dopamine toxicity by rescuing ATG4-mediated autophagosome formation[J]. *Neurochemistry International*, 2018, 117: 174–187.

[4] CARMELA S, STEFANIA M, GIAN L R. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 153: 105–115.

[5] VENKATESH G V, RAJASANKAR S, RAMKUMAR M, et al. Agaricus blazei extract abrogates rotenone-induced dopamine depletion and motor deficits by its anti-oxidative and anti-inflammatory properties in Parkinsonic mice[J]. *Nutritional Neuroscience*, 2017, 21(9): 657–666.

[6] FATHY S M, EL D H A, SAID N I. Neuroprotective effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice and seed extract in paraquat-induced mouse model of Parkinson's disease[J]. *Bmc Complementary Medicine and Therapies*, 2021, 21(1): 130.

[7] MOHAMMED N, ABDOL H, ESSAWY A, et al. Oral supplements of *Ginkgo biloba* extract alleviate neuroinflammation, oxidative impairments and neurotoxicity in rotenone-induced parkinsonian rats[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2020, 21: 1259–1268.

[8] 顾宏韬,师会,王磊,等. 蒲葵子总黄酮对帕金森病细胞模型中人神经母细胞瘤细胞的保护作用[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2021, 23(9): 913–917. [WU H T, SHI H, WANG L, et al. Protective effect of total flavonoids from Pu Kui Zi on human neuroblastoma cells in a cell model of Parkinson's disease[J]. *Chinese Journal of Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases in the Elderly*, 2021, 23(9): 913–917.]

[9] 王春玲,罗宁,文晓东,等. 乌梅总黄酮对 MPP⁺诱导的 SH-SY5Y 细胞线粒体损伤的保护作用[J]. *重庆医学*, 2022(12): 1981–1986. [WANG C L, LUO N, WEN X D, et al. Protective effect of total flavonoids of ebony on MPP⁺-induced mitochondrial damage in SH-SY5Y cells[J]. *Chongqing Medical Journal*, 2022(12): 1981–1986.]

[10] 薛凯元. 蚕豆营养价值评价及瘤胃降解特性研究[D]. 天津: 天津农学院, 2018. [XUE K Y. Evaluation of the nutritional value of broad bean and research on rumen degradation characteristics [D]. Tianjin: Tianjin Agricultural College, 2018.]

[11] De ANGELIS D, PASQUALONE A, COSTANTINI M, et al. Data on the proximate composition, bioactive compounds, physicochemical and functional properties of a collection of faba beans (*Vicia faba* L.) and lentils (*Lens culinaris* Medik.)[J]. *Data in Brief*, 2021, 34: 106660.

[12] 张天阳,陈友霞,刘珍珍,等. 不同可食阶段蚕豆结合酚抗氧化活性的研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(4): 39–43. [ZHANG T Y, CHEN Y X, LIU Z Z, et al. Antioxidative activity of broad bean conjugated phenols in different edible stages[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(4): 39–43.]

[13] 陈友霞,刘珍珍,杨文艺,等. 未成熟蚕豆中矿物质含量、氨基酸组成和微观结构的研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(01):

- 310–314. [CHEN Y X, LIU Z Z, YANG W Y, et al. Study on mineral content, amino acid composition and microstructure of immature broad beans[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(01): 310–314.]
- [14] 申士富, 钱静, 刘廷, 等. 青海蚕豆中原花青素和左旋多巴的含量测定和品种间差异的比较[J]. *中国食物与营养*, 2017, 23(9): 36–40. [SHEN S F, QIAN J, LIU T, et al. Determination of proanthocyanidins and levodopa in Qinghai broad bean and comparison of differences among varieties[J]. *China Food and Nutrition*, 2017, 23(9): 36–40.]
- [15] KATARZYNA P, RAFAL M A, MACIEJ K, et al. Development of a sustainable, simple, and robust method for efficient L-DOPA extraction[J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2325.
- [16] J. M R, I. S B, O. R, et al. Broad bean (*Vicia faba*) consumption and Parkinson's disease: a natural source of L-dopa to consider[J]. *Neurologia (English Edition)*, 2015, 30(6): 375–6.
- [17] MEJRI F, SELMI S, MARTINS A, et al. Broad bean (*Vicia faba* L.) pods: A rich source of bioactive ingredients with antimicrobial, antioxidant, enzyme inhibitory, anti-diabetic and health-promoting properties[J]. *Food & Function*, 2018, 9(4): 2051–2069.
- [18] TAYARANI-NAJARAN Z, HADIPOUR E, SEYED M S M, et al. Protective effects of *Lavandula stoechas* L. methanol extract against 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 273: 114023.
- [19] CIRMI S, MAUGERI A, LOMBARDO G E, et al. A flavonoid-rich extract of mandarin juice counteracts 6-OHDA-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells and modulates parkinson-related genes[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(4): 539.
- [20] NOURMOHAMMADI S, YOUSEFI S, MANOUCHEHR-ABADI M, et al. Thymol protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in *in vivo* and *in vitro* model of Parkinson's disease via inhibiting oxidative stress[J]. *Bmc Complementary Medicine and Therapies*, 2022, 22(1): 40.
- [21] 陈世坚, 李舸, 张钰, 等. MPTP 诱导帕金森病小鼠亚急性与慢性模型的比较及评价[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(8): 1247–1252. [CHEN S J, LI G, ZHANG Y, et al. Comparison and evaluation of subacute and chronic models of MPTP-induced Parkinson's disease in mice[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2022, 26(8): 1247–1252.]
- [22] 林臻, 陈洪志, 赵航, 等. MPTP 诱导 C57BL/6 小鼠帕金森模型的制备和评估[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(8): 57–62. [LIN Z, CHEN H Z, ZHAO H, et al. Preparation and evaluation of MPTP-induced C57BL/6 mouse Parkinson's model[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2020, 30(8): 57–62.]
- [23] ANIS E, ZAFEER M F, FIRDAUS F, et al. Evaluation of phytochemical potential of perillyl alcohol in an *in vitro* Parkinson's disease model[J]. *Drug Development Research*, 2018, 79(5): 218–224.
- [24] 董晓光, 许孝飞, 马江波, 等. IGF-1 对 6-OHDA 诱导神经元氧化损伤的保护作用[J]. *天津医药*, 2018, 46(9): 905–910. [DONG X G, XU X F, MA J B, et al. Protective effect of IGF-1 on 6-OHDA-induced neuronal oxidative damage[J]. *Tianjin Medicine*, 2018, 46(9): 905–910.]
- [25] 齐月, 黄金泳, 张子炜, 等. MPTP 诱导的帕金森病小鼠模型表型特点[J]. *神经解剖学杂志*, 2022, 38(1): 107–110. [QI Y, HUANG J Y, ZHANG Z W, et al. Phenotypic characteristics of MPTP-induced Parkinson's disease mouse model[J]. *Journal of Neuroanatomy*, 2022, 38(1): 107–110.]
- [26] 曹方引, 王强, 宋文豪, 等. 佛手散对 MPTP 诱导帕金森模型小鼠的神经保护作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(1): 19–24. [CAO F Y, WANG Q, SONG W H, et al. Neuroprotective effect of bergamot powder on MPTP-induced Parkinson's model mice[J]. *Chinese Materia Medica and Clinical*, 2022, 38(1): 19–24.]
- [27] 陈海云, 魏来娇, 曹杰, 等. 异钩藤碱对 MPTP 所致帕金森病小鼠的疗效研究[J]. *上海中医药大学学报*, 2021, 35(4): 61–66. [CHEN H Y, WEI L J, CAO J, et al. Efficacy of isortychnine on MPTP-induced Parkinson's disease in mice[J]. *Journal of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 35(4): 61–66.]
- [28] 俞益桂. 自噬-NLRP3 炎症小体信号在脂多糖诱导的 PD 模型小鼠中的作用及鸡豆黄素 A 的保护作用[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2021. [YU Y G. The role of autophagy-NLRP3 inflammasome signaling in lipopolysaccharide-induced PD model mice and the protective effect of daidzein A[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2021.]
- [29] 杨文宇, 黄捷, 常馨宁, 等. 乙酸盐预处理对 MPTP 诱导亚急性帕金森病小鼠的神经保护作用[J]. *海军军医大学学报*, 2022, 43(2): 160–166. [YANG W Y, HUANG J, CHANG X N, et al. Neuroprotective effect of acetate pretreatment on MPTP-induced subacute Parkinson's disease mice[J]. *Journal of Naval Military Medical University*, 2022, 43(2): 160–166.]
- [30] 刘展, 蔡美云, 庄文欣, 等. 山柰酚通过 mTOR 通路诱导细胞自噬保护帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元[J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(4): 446–453. [LIU Z, CAI M Y, ZHUANG W X, et al. Kaempferol protects dopaminergic neurons in Parkinson's disease model mice by inducing autophagy through mTOR pathway[J]. *New Chinese Medicine and Clinical Pharmacology*, 2022, 33(4): 446–453.]
- [31] 董璐萌, 王雅溶, 陈阳, 等. 菊花提取物对帕金森病小鼠的保护作用及机制研究[J]. *营养学报*, 2017, 39(3): 294–298. [DONG L M, WANG Y R, Chen Yang, et al. Protective effect and mechanism of chrysanthemum extract on Parkinson's disease mice[J]. *Journal of Nutrition*, 2017, 39(3): 294–298.]
- [32] 曹桂云, 王小洪, 李珂珂, 等. 迷迭香酸乙酯对 MPTP 诱导的帕金森小鼠的保护作用[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(10): 2346–2348. [CAO G Y, WANG X H, LI K K, et al. Protective effect of ethyl rosmarinate on MPTP-induced Parkinson's mice[J]. *Shi Zhen Chinese Medicine and Chinese Medicine*, 2017, 28(10): 2346–2348.]
- [33] 彭金亮, 熊丽娇, 刘向红. 银杏二萜内酯葡胺对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *天津医药*, 2021, 49(2): 153–158. [PENG J L, XIONG L J, LIU X H. Protective effect of ginkgo diterpene lactone meglumine on cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Tianjin Medicine*, 2021, 49(2): 153–158.]

- [34] 王胜男. 甘松对 6-OHDA 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018. [WANG S N. The protective effect and mechanism of Gansong on 6-OHDA-induced SH-SY5Y cell injury[D]. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2018.]
- [35] 黄鑫, 杨增艳, 黎丽, 等. 牡荆苷对 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠行为学、神经递质及脑黑质多巴胺能神经元凋亡的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(6): 23-29. [HUANG X, YANG Z Y, LI L, et al. Effects of vitexin on behaviors, neurotransmitters and apoptosis of substantia nigra dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease model mice[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2021, 31(6): 23-29.]
- [36] ESSAM A, ENGY A M, MAREENA M T, et al. Methanolic extracts of a selected Egyptian *Vicia faba* cultivar mitigate the oxidative/inflammatory burden and afford neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease[J]. *Inflammopharmacology*, 2021, 29(1): 221-235.
- [37] 冯学花, 张国升, 陶阿丽, 等. 微波辅助提取蚕豆种皮中总黄酮的条件优化[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(24): 244-247. [FENG X H, ZHANG G S, TAO A L, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of total flavonoids from broad bean seed coat[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2013, 34(24): 244-247.]