

姜黄素通过抑制 α -突触核蛋白对脂多糖诱导的帕金森病模型的神经保护作用



甘小葵, 宋校伟, 张明, 方一鸣, 马龙彪, 黄保胜

南京医科大学附属逸夫医院神经外科(南京 211112)

【摘要】目的 探究姜黄素(Cur)对帕金森病模型的神经保护作用及其机制。**方法** SD大鼠随机分为对照(CON)组、模型(PD)组和姜黄素(Cur)低、中、高剂量组,每组10只。脂多糖注射至大鼠黑质建立帕金森病模型, Cur各组每天腹腔注射姜黄素20、40、60 mg/kg,共21 d。采用免疫组织化学(IHC)法检测大鼠脑组织 α -突触核蛋白(α -syn)、核转录因子 κ B蛋白(NF- κ B、IKB α 、p-NF- κ B、p-IKB α)和星形胶质细胞的活化水平。通过实时定量PCR(qRT-PCR)测定促炎因子(TNF- α 、IL- β 、IFN- γ 、IL-6)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧化酶(COX-2)、NADPH氧化酶复合物(gp47phox、gp91phox、gp67phox)及凋亡因子(Bax、Bcl-2、Caspase-3和Caspase-9)mRNA水平。采用滚轴实验和爬杆实验评估大鼠运动协调性。**结果** 与CON组相比, PD大鼠 α -syn、p-NF- κ B、p-IKB α 水平、星形胶质细胞活化、TNF- α 、IL- β 、IFN- γ 、IL-6、iNOS、COX-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、gp47phox、gp91phox、gp67phox的mRNA表达水平显著升高($P < 0.05$);而Bcl-2水平显著降低($P < 0.05$)。中、高剂量Cur组在抑制 α -syn蛋白的聚集、减少NF- κ B通路的激活、降低炎症和凋亡因子的表达方面均比PD组显著($P < 0.05$)。中、高剂量的Cur处理显著改善了大鼠的运动协调性,与PD组相比,滚轴实验和爬杆实验的表现有显著提高($P < 0.05$)。**结论** Cur可通过抑制神经炎症和氧化应激反应抑制 α -syn的聚集,改善帕金森病大鼠的运动协调能力,发挥神经保护作用。

【关键词】 帕金森; 姜黄素; α -突触核蛋白; 氧化应激; 神经炎症; 脂多糖

The neuroprotective effect of curcumin by inhibiting the aggregation of α -synuclein on lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease model

GAN Xiaokui, SONG Xiaowei, ZHANG Ming, FANG Yiming, MA Longbiao, HUANG Baosheng

Department of Neurosurgery, Sir Run Run Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 211112, China

Corresponding author: HUANG Baosheng, Email: bs.huang@njmu.edu.cn

【Abstract】Objective To explore the neuroprotective effect of curcumin (Cur) on Parkinson's disease model and its mechanism. **Methods** Sprague-Dawley rats were randomly divided into the control (CON) group, the model (PD) group, and the low-, medium-, and highdose curcumin (Cur) groups, with ten rats in each group. Lipopolysaccharide was injected

DOI: 10.12173/j.issn.1008-049X.202404171

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(201701396-SBK2017040357)

通信作者: 黄保胜, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, Email: bs.huang@njmu.edu.cn

<https://zgys.whuzhmedj.com>

into the substantia nigra to establish a Parkinson's disease model. Rats in the Cur groups were administered Cur intraperitoneally at doses of 20 mg/kg, 40 mg/kg, and 60 mg/kg daily for 21 days. α -synuclein (α -syn), nuclear transcription factor κ B proteins (NF- κ B, I κ B α , p-NF- κ B, p-I κ B α) and the activation levels of astrocytes were detected in rat brain tissues by immunohistochemistry (IHC). mRNA levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL- β , IFN- γ , IL-6), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), NADPH oxidase complex (gp47phox, gp91phox, gp67phox), and apoptosis-related factors (Bax, Bcl-2, Caspase-3, and Caspase-9) were measured by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). The rotarod and pole climbing tests were used to evaluate the motor coordination of the rats. **Results** Compared to the CON group, PD rats showed significantly increased levels of α -syn, p-NF- κ B, p-I κ B α proteins, activation of astrocytes, TNF- α , IL- β , IFN- γ , IL-6, iNOS, COX-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9, gp47phox, gp91phox and gp67phox mRNA levels ($P < 0.05$); while the Bcl-2 level was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the PD group, the medium- and high-dose Cur treatment groups inhibited the aggregation of α -syn protein, reduced the activation of the NF- κ B pathway, and the expression of inflammatory and apoptosis-related factors ($P < 0.05$). Moreover, medium and high doses of Cur significantly improved the motor coordination in rats, and compared with the PD group, the performance of rotarod and pole climbing tests was significantly improved ($P < 0.05$). **Conclusion** cur may inhibit the aggregation of α -syn by suppressing neuroinflammation and oxidative stress responses, thereby improving motor coordination in Parkinson's disease rats and exerting neuroprotective effects.

【Keywords】 Parkinson's disease; Curcumin; α -synuclein; Oxidative stress; Neuroinflammation; Lipopolysaccharide

帕金森病是最常见神经退行性疾病之一，主要特征是多巴胺能神经元变性并产生路易体和路易亚硝酸盐的神经内包涵体，其主要由 α -突触核蛋白 (α -synuclein, α -syn) 组成^[1]。 α -syn 低聚物产生神经毒性的机制可能是其转化成膜的渗透性，导致线粒体功能障碍，促进溶酶体渗漏或阻碍细胞骨架聚合物的形成等，因此导致帕金森病^[2]。

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可诱导中枢神经系统的小胶质细胞和星形胶质细胞激活，从而影响 α -syn 聚集^[3-4]。此外，LPS 可诱导脑组织中活性氧的产生，激活具有神经毒性的星形胶质细胞^[5]。 α -syn 过度聚集又可以促进小胶质细胞和星形胶质细胞的过度活化，产生大量促炎因子，加重神经炎症反应^[6]。此外， α -syn 过度聚集还会导致活性氧的过量产生，引起氧化应激反应^[7]。氧化应激水平增强，导致更多的 α -syn 被氧化修饰和聚集，从而加重帕金森病的病理进程^[8]。因此，抑制 α -syn 聚集是预防治疗帕金森病的重要靶点，但目前关于作用于此靶点的药物报道较少。

姜黄素 (curcumin, Cur) 具有抗炎作用、抗

微生物和抗癌活性，可以减少多种器官和组织损伤^[9-10]；其可穿过血脑屏障，并在脑损伤中发挥神经保护作用^[11]。关于 Cur 的研究表明，其可抑制 α -syn 的体外聚集，并且减弱细胞中 α -syn 寡聚体的毒性^[12]。然而，关于 Cur 是否可抑制 α -syn 在体内的聚集，尤其是在帕金森病模型中的作用和抑制 α -syn 聚集作用的分子机制尚不明确。本研究旨在探讨 Cur 在 LPS 诱导的帕金森病模型中抑制 α -syn 聚集的潜在机制及其神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

Form Steri-Cycle 型 CO₂ 细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；TE2000 型荧光显微镜购自日本 Nikon 公司，Mini-Protein 型垂直电泳系统、ChemiDoc MP 全能型凝胶成像系统购自美国 Bio Rad 公司。

Cur 购自美国 Sigma 公司 (纯度 > 94%)；5 × Loading Buffer (批号: P0015L)、脱脂奶粉 (批号: P0216) 购自上海碧云天生物科技有限公司；二

甲基亚砷 (DMSO, 批号: 2206-27-1) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 蛋白提取试剂盒 (批号: 20170901) 购自北京索莱宝科技有限公司; Trizol 试剂 (批号: 1401902) 购自美国 Invitrogen 公司; RT Master Mix 反转录试剂盒 (批号: AK3101)、实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 试剂盒 (批号: AI21785A) 均购自诺唯赞公司; PCR 引物均购自铂尚 (上海) 股份有限公司; NO 比色法测试盒 (批号: BC-K035) 购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号: 23225)、ECL 发光液 (批号: 32209) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 一抗核因子 κ B (NF- κ B, 批号: 8242)、IKB α (批号: 4814)、p-NF- κ B (批号: 3033)、p-IKB α (批号: 2859)、 α -syn (批号: 2644) 购自美国 CST 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG) 二抗 (批号: ab205718) 均购自美国 Abcam 公司。

1.2 动物

本研究使用 7~9 周龄, 体质量为 350~400 g 的雄性 SD 大鼠。所有大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证编号: SCXK (京) 2018-0046。本中心实验动物使用许可证编号: SYXK (苏) 2020-0022。大鼠饲养于南京医科大学实验动物中心, 饲养环境温度控制在 20~25 °C, 相对湿度保持在 40%~70%。实行 12 h 昼/12 h 夜的光照循环。动物可以 unlimited 自由摄取全价颗粒饲料, 并通过持续供水的饮水瓶自由饮用纯化水。动物实验根据国际医学科学组织理事会提供的《国际动物研究指导原则》进行, 使用动物模型的参与者根据机构动物护理和使用委员会指南规则进行培训。本实验经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准 (批件号: IACUC-2203036)。

1.3 大鼠帕金森病模型构建

70 只雄性 SD 大鼠, 其中 10 只设为对照 (CON) 组, 另外 60 只进行建模。帕金森病模型的建立如下^[12]: 大鼠经异氟烷麻醉后, 使用脑立体定位注射仪将 LPS (5 μ g/5 μ L PBS) 注射至大鼠右侧黑质纹状体中建立大鼠帕金森病模型, 注射位点为针头穿过黑质短突后 4 mm、侧 1.5 mm 和深 8.3 mm 钻孔。CON 组仅单次向大鼠右侧黑质纹状体注射 5 μ L PBS。结合 CON 组观察造模大鼠行为学表现,

若出现运动缓慢、肢体僵硬、小步子、拖脚、强迫性转圈行为, 评估为模型制作成功。

挑选 40 只造模成功的 SD 大鼠随机分为 4 组 (每组 10 只): ①模型 (PD) 组; ② PD+Cur-20 组 (Cur 20 mg/kg); ③ PD+Cur-40 组 (Cur 40 mg/kg); ④ PD+Cur-60 组 (Cur 60 mg/kg)。PD+Cur 组向大鼠黑质纹状体注射 LPS 5 μ L 后, 接着向大鼠腹腔注射不同剂量的 Cur (20、40、60 mg/kg), 持续 21 d。

1.4 NO 含量检测

于脑组织中加入 PBS 匀浆后, 于 4 °C 条件下 10 000 \times g 离心 10 min, 取部分上清置冰上, 依据 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。具体步骤为: 配置蛋白标准品, 配置 BCA 工作液, 酶标仪测定各孔 562 nm 处吸光度, 根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白浓度。

使用 NO 含量测定试剂盒进行检测。于酶标仪 550 nm 处读取标准孔、空白孔及样品孔吸光度值。依据公式计算组织 NO 浓度, NO 含量 (nmol/mg prot) = (Δ A550-b) \times f/a/Cpr。其中, Δ A550: 绝对吸光度值 (样本测定吸光度值 - 空白吸光度值); a: 标曲的斜率; b: 标曲的截距; f: 样本加入检测体系之前的稀释倍数; Cpr: 样本的蛋白浓度 (g prot/L)。

1.5 炎症相关因子、凋亡标记物和 NAPDH 氧化酶亚单位 mRNA 水平

使用 TRIzol 法提取样本总 RNA, 在 42 °C 条件下反转录 15 min 和 85 °C 条件下反转录 5 min 产生 cDNA, 然后使用 qRT-PCR 分析, 反应体系由 10 μ L UltraSYBR Mixture、1 μ L PCR Forward Primer (10 μ mol/L)、1 μ L PCR Reverse Primer (10 μ mol/L)、2 μ L cDNA 模板和 6 μ L ddH₂O 构成。qRT-PCR 条件如下: 95 °C 变性 5 min, 然后是 40 个循环, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s。所使用引物序列见表 1。

1.6 大鼠脑组织中星形胶质细胞的活化水平

免疫组化实验流程如下: 切片经二甲苯脱蜡, 梯度浓度乙醇水化后, 随后进行抗原修复, 继续在每张脑片上均匀滴加内源性过氧化物酶阻断剂 15 min; 然后使用 Iba-1 (稀释比例 1:100) 一抗在 4 °C 条件下封闭过夜, 第 2 天使用滴加 100 mL 抗兔/鼠 HRP 标记聚合物 (稀释比例 1:50 000), 室温孵育 30 min 后进行 DAB 显色; 苏木素染细胞

核,最后进行封片。封片结束后,于光学显微镜下观察,每个脑组织切片选取6个视野。

表1 引物名称与序列

Table 1. Primer names and sequences

引物名称	引物序列
β-actin	forward 5'-CTATTGGCAACGAGCGGTTCC-3'
	reverse 5'-CAGCACTGTGTTGGCATAGAG-3'
COX-2	forward 5'-GAAGTGCTG GGC AAA GAATG-3'
	reverse 5'-GTGTCACCGTGTCTTCCTTGAG-3'
IL-1β	forward 5'-AAGATGAAGGGCTGCTTCCAAAACC-3'
	reverse 5'-ATACTGCCTGCCTGAAGCTCTTGT-3'
IL-6	forward 5'-TAGTCCTTCCCTACCCCAATTTCC-3'
	reverse 5'-TTGCTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
iNOS	forward 5'-CCTCTCCACCCTACCAAGT-3'
	reverse 5'-CACCCAAAGTGCTTCAGTCA-3'
TNF-α	forward 5'-CGTCAGCCGATTTGCTATCT-3'
	reverse 5'-CGGACT CCGCAAAGTCTAAG-3'
IFN-γ	forward 5'-GGTCTTGCCCTCTACAACC-3'
	reverse 5'-CCACCTAGTACGATGCGC-3'
α-syn	forward 5'-CACCATGGATGTATTCATGTTCC-3'
	reverse 5'-AGGATCCACAGGCATATCTTCCA-3'
gp47phox	forward 5'-GCTCACCGACTACTCAACA-3'
	reverse 5'-GCCTTCTGCAGATACATGGA-3'
gp91phox	forward 5'-ACGATCCATATCCGTATTGTGGGA-3'
	reverse 5'-TCTCAGACTGCTGGCATTGTCA-3'
gp67phox	forward 5'-CATAGGCACCGCTGAGCTTCA-3'
	reverse 5'-ACGAATTTGCGT GTCATCC-3'
BAX	forward 5'-TCTTCAAAGCTGCTGG GCCATT-3'
	reverse 5'-CTTGTCACTGCCTGACTGCT-3'
BCL-2	forward 5'-GGATCCAGGATAACGGAGGC-3'
	reverse 5'-ATGCACCCAGAGTGATGCAG-3'
Caspase-3	forward 5'-GGAGCTTGGAAACGCGAAGAA-3'
	reverse 5'-ACACAAGCCATTTCAGGGT-3'
Caspase-9	forward 5'-CAAGAAGAGCGGTTCTCTGGT-3'
	reverse 5'-CAGAAACAGCATTGG CGACC-3'

注: β-actin: β-肌动蛋白; COX-2: 环氧化酶-2; IL-1β: 白细胞介素-1β; IL-6: 白细胞介素-6; iNOS: 可诱导型一氧化氮合酶; TNF-α: 肿瘤坏死因子α; IFN-γ: 干扰素γ; α-syn: α-突触核蛋白; gp47phox: 47千道尔顿噬菌体氧化酶; gp91phox: 91千道尔顿噬菌体氧化酶; gp67phox: 67千道尔顿噬菌体氧化酶; Bcl-2: B细胞淋巴瘤-2蛋白; BAX: Bcl-2相关蛋白; Caspase-3: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3; Caspase-9: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9。

1.7 脑组织中α-syn蛋白表达的测定

脱蜡切片经梯度酒精脱水后,进行抗原修复,继续用10%血清孵育30 min;切片在1.5% BSA中与α-syn一抗(稀释比例1:1 000)共孵育60 min; PBS洗涤3次,每次5 min,然后与FITC偶

联的二抗(稀释比例1:10 000)共孵育60 min;用1 mg/mL碘化丙啶在37℃下对载玻片进行反染色20 min, PBS洗涤3次,封片,镜检。

1.8 α-syn和NF-κB信号通路相关蛋白

将脑组织样本(100 mg)置于含有1 mL预冷裂解缓冲液的培养皿中并进行匀浆,离心10 min,取上清液,进行蛋白变性;然后通过SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白质,将胶上的蛋白转移到PVDF膜上;用TBST洗涤后,使用5%脱脂奶粉中封闭PVDF膜2 h;随后再用TBST洗膜后,将膜在4℃采用下使用一抗孵育(振荡)过夜,主要抗体按如下比例稀释:α-syn(1:1 000)、β-actin(1:1 000)、NF-κB(1:1 000)、IKBα(1:1 000)、p-NF-κB(1:500)、p-IKBα(1:500)。次日,将PVDF膜取出并回收一抗,用TBST洗膜;然后使用AP标记的二抗(1:10 000)室温孵育1 h,再用TBST洗膜,最后使用ECL化学发光试剂检测蛋白质条带。Image J软件测定条带灰度值,以目标蛋白与内参GAPDH的比值作为其相对含量。

1.9 行为学检测

使用LPS建立模型随后分别注射不同浓度Cur 21 d后,对各组大鼠进行以下行为学检测^[13]:滚轴实验和爬杆实验。

1.9.1 滚轴实验

分别将各组大鼠放置转棒仪上,转棒仪的参数设置如下:初始速度为5 r/min,终止速度为30 r/min,匀加速运行时间为5 min。大鼠的放置方向与转棒仪相反,使大鼠可以按照与转棒仪相反的方向运动,每次运动30 min,通过大鼠在转棒上的潜伏时间来评价大鼠的运动协调能力。

1.9.2 爬杆实验

本实验对大鼠的肢体协调能力进行检测,通过测试不同分组大鼠在爬杆上爬下来的时间来进行统计。爬杆长为直径1 cm,长度为50 cm,记录各组大鼠3次的爬下时间并取平均值,每次测量间隔30 min以上。

1.10 统计学分析

使用SPSS 24.0统计软件进行数据分析。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验或Kruskal-Wallis H 检验。多组数据比较使用单因素方差进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小胶质细胞活化情况

如图 1 所示，与 CON 组相比，PD 组显示活化小胶质细胞数量显著增加 ($P < 0.05$)，表明 PD 模型造模成功；与 PD 组相比，Cur 中、高剂量组治疗作用显著，小胶质细胞的数量均显著减少 ($P < 0.05$)。

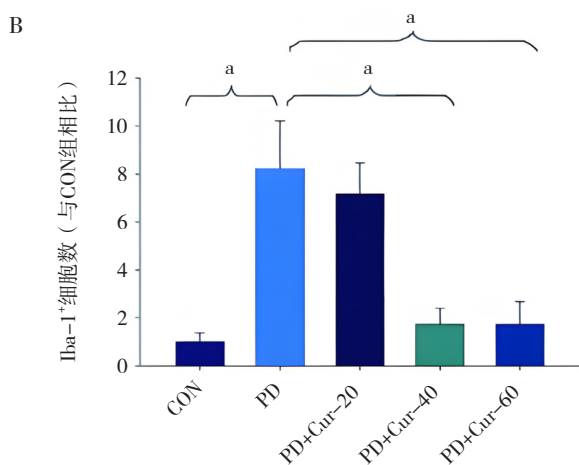
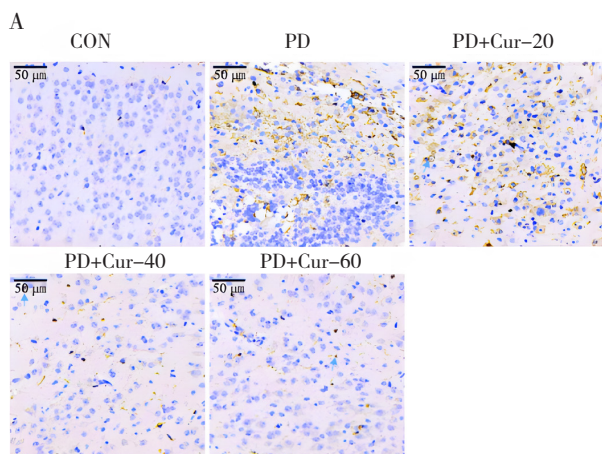


图1 Cur对LPS诱导大鼠脑组织小胶质细胞活的影响

Figure 1. The effect of Cur on the activation of microglia in rat brain tissues induced by LPS

注：A. 大鼠脑组织中Iba-1⁺细胞；B. 大鼠脑组织小胶质细胞活化即Iba-1⁺细胞数 ($n=6$)； $^{\circ}P < 0.05$ 。

2.2 神经炎症反应

如图 2 所示，PD 组大鼠脑组织中促炎细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、COX2、iNOS 和 IL-6 的 mRNA 水平上调 ($P < 0.05$)，表明 PD 模型造模成功；而中、高剂量 Cur 可明显抑制 LPS 处理大鼠的脑组织黑质中以上促炎因子 mRNA 表达水平的上调 ($P < 0.05$)。

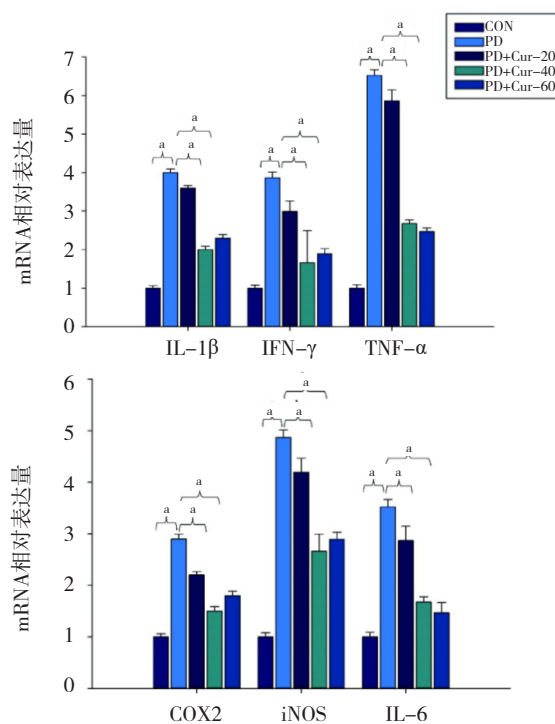


图2 Cur抑制LPS诱导的脑组织促炎因子mRNA水平的升高 ($n=6$)

Figure 2. The inhibition of the increase of pro-inflammatory cytokine mRNA levels by Cur in brain tissue induced by LPS ($n=6$)

注： $^{\circ}P < 0.05$ 。

2.3 NF- κ B通路

如图 3 所示，PD 组大鼠脑组织中 NF- κ B 和 IKB α 蛋白磷酸化水平显著增加 ($P < 0.05$)；而中、高剂量 Cur 可显著抑制 PD 大鼠脑组织 p-NF- κ B 和 p-IBK α 表达水平 ($P < 0.05$)，表明 Cur 可以抑制 NF- κ B 通路的激活。

2.4 氧化应激

如图 4 所示，与 CON 组相比，PD 组大鼠脑组织中 NO 水平显著升高 ($P < 0.05$)；而中、高剂量 Cur 可显著抑制 PD 组大鼠脑组织中 NO 的形成 ($P < 0.05$)。

2.5 α -syn聚集

如图 5A 和 5B 所示，与 CON 组相比，PD 组大鼠脑组织中 α -syn 的蛋白水平表达增加 ($P < 0.05$)，而中、高剂量 Cur 可显著抑制 α -syn 蛋白水平的增加 ($P < 0.05$)。图 5C 和 5D 的免疫荧光结果显示，与 CON 组相比，在 PD 组大鼠脑组织切片中可观察到大量神经元中 α -syn 细胞数量提高 ($P < 0.05$)；然而，中、高剂量 Cur 可显著抑制 α -syn 细胞数量的增加 ($P < 0.05$)。

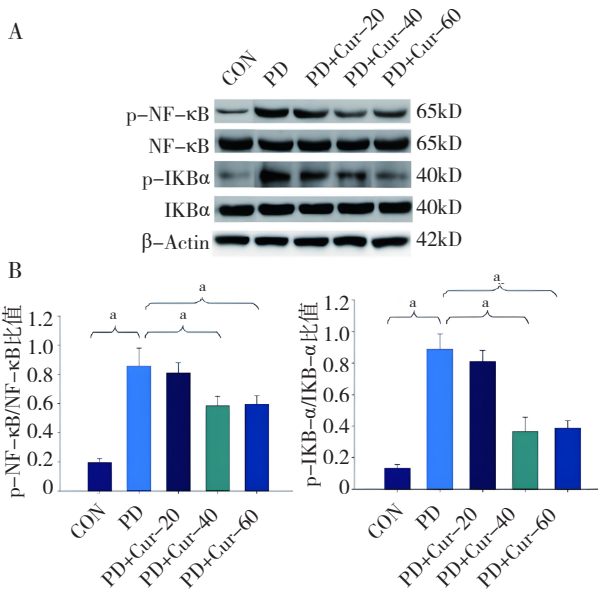


图3 Cur抑制NF-κB通路的激活

Figure 3. The inhibition of the NF-κB pathway activation by Cur

注：A. 大鼠脑组织中p-NF-κB、NF-κB、IKBα、p-IKBα蛋白表达的电泳图；B. 大鼠脑组织中p-NF-κB、NF-κB、IKBα、p-IKBα蛋白表达柱状图 (n=5)；*P<0.05。

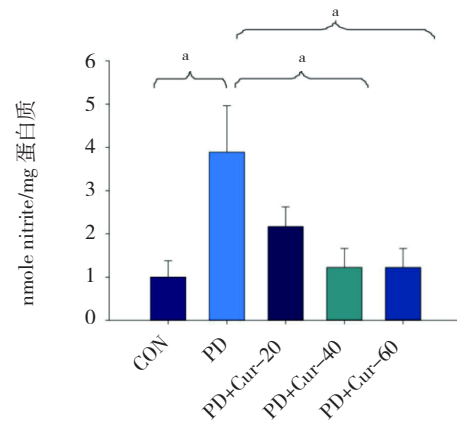


图4 姜黄素对脑组织中NO表达水平的影响 (n=5)

Figure 4. The impact of curcumin on NO expression levels in brain tissues (n=5)

注：*P<0.05。

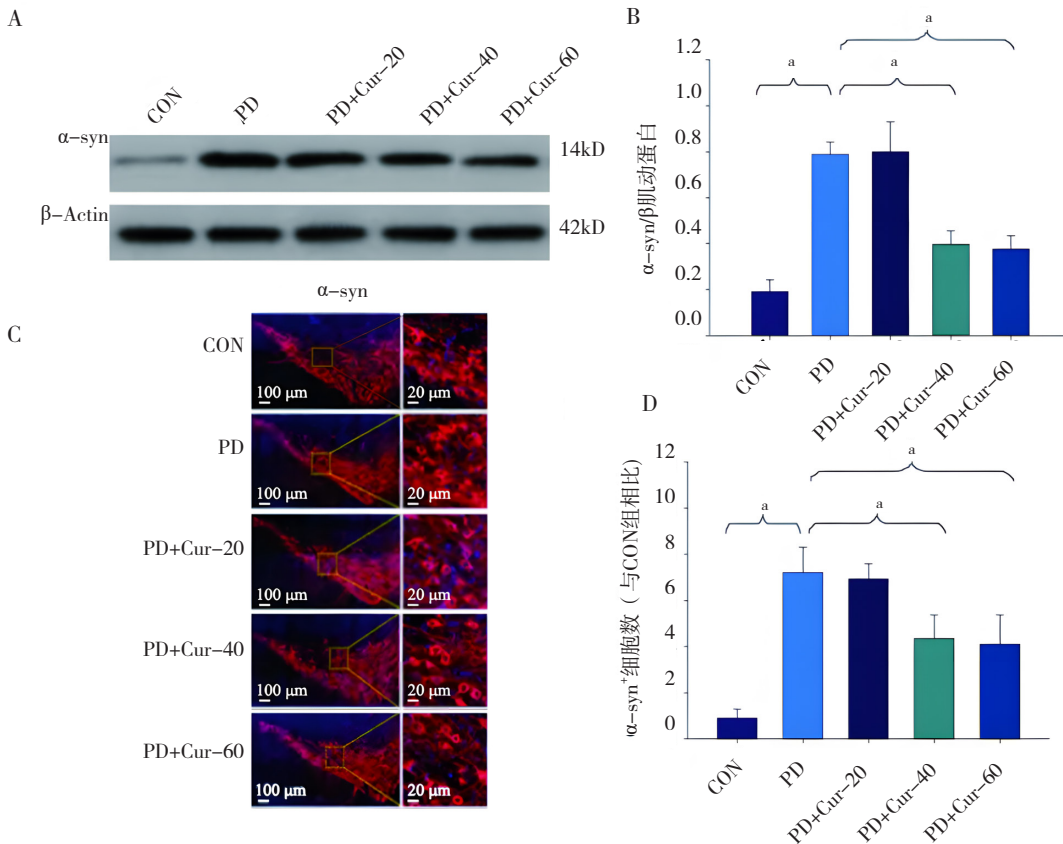


图5 Cur对脑组织中α-syn表达变化的影响

Figure 5. The effect of Cur on the expression changes of α-syn in brain tissues

注：A. 大鼠脑组织中α-syn的蛋白表达的电泳图；B. 大鼠脑组织中α-syn蛋白表达的柱状图 (n=4)；C. 免疫荧光结果显示大鼠脑组织中α-syn+细胞数量；D. 大鼠脑组织中α-syn+细胞数量的柱状图 (n=4)；*P<0.05。

2.6 凋亡级联反应

如图 6 所示, 与 CON 组相比, PD 组大鼠脑组织中 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 PD 组大鼠相比, 中、高剂量 Cur 可显著抑制 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 的表达 ($P < 0.05$), 显著提高 Bcl-2 的表达 ($P < 0.05$)。

2.7 NADPH 氧化酶亚单位基因表达

如图 7 所示, PD 组大鼠脑组织中 gp47phox、

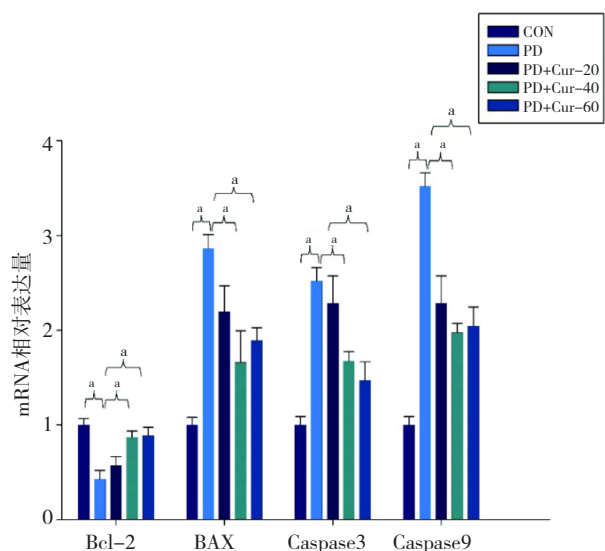


图6 各组大鼠脑组织中凋亡因子Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9的 mRNA表达水平 ($n=6$)

Figure 6. mRNA expression levels of apoptotic factors Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9 in the brain tissues of each group ($n=6$)

注: $^*P < 0.05$ 。

A

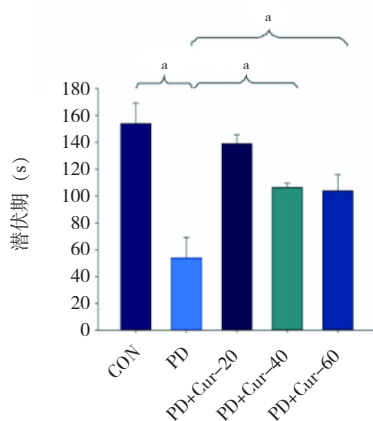


图8 Cur对各组大鼠PD样行为的影响

Figure 8. The effect of Cur on PD-like behaviors in each group of rats

注: A. 大鼠在转棒上的潜伏时间检测 ($n=8$); B. 大鼠在爬杆设备上的爬下时间 ($n=8$); $^*P < 0.05$ 。

gp67phox 和 gp91phox mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.05$); 中、高剂量 Cur 可显著抑制 gp47phox、gp67phox 和 gp91phox mRNA 表达水平的上调 ($P < 0.05$)。

2.8 大鼠PD样行为影响。

如图 8 所示, 在滚轴实验中, 与 PD 组大鼠相比, 中、高剂量 Cur 均可显著延长大鼠在滚轴上的潜伏时间 ($P < 0.05$); 在爬杆实验中, 与 PD 组大鼠相比, 中、高剂量 Cur 可显著减少大鼠从爬杆顶端到底端的用时显著 ($P < 0.05$)。

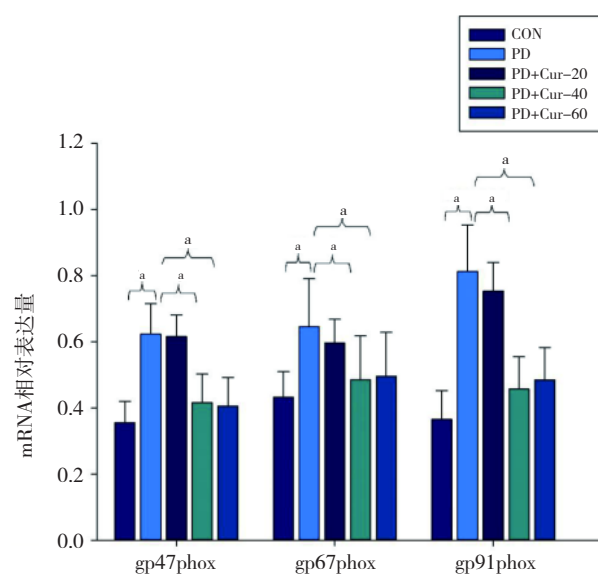
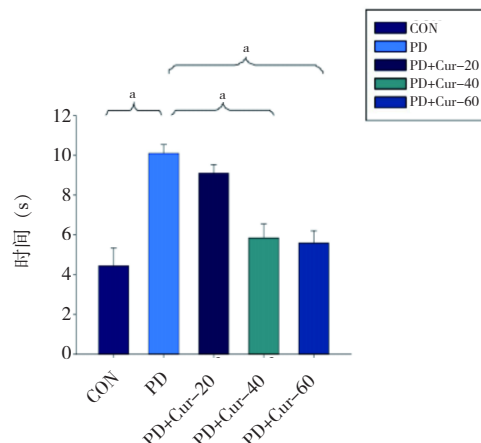


图7 各组大鼠脑组织中NADPH氧化酶亚单位 mRNA表达水平 ($n=6$)

Figure 7. mRNA expression levels of NADPH oxidase subunits in the brain tissues of each group ($n=6$)

注: $^*P < 0.05$ 。

B



3 讨论

流行病学研究表明, 每天摄入约 200 mg 的 Cur 可降低帕金森患病率, 其可能的机制是 Cur 可以破坏 α -syn 的形成, 增加 α -syn 在细胞中的溶解度^[4, 13]。LPS 可引发炎症反应, 而且小胶质细胞的激活导致核因子 NF- κ B 的激活, 随后释放各种促炎细胞因子, 刺激 NO 的产生, 从而使得细胞产生氧化应激反应^[4]。本研究显示, NF- κ B 的激活可致 NADPH 氧化酶亚单位的转录水平增加, 这些亚单位可转位至胶质细胞膜, 与细胞膜上的 gp91PHOX 结合, 引起其活化, 从而激活 NADPH 氧化酶复合物 (NADPH oxidase complex, PHOX), 启动或加速神经变性的过程^[14]。

α -syn 蛋白聚集体的形成是导致多巴胺能神经元凋亡介导的细胞死亡级联反应的主要原因, LPS 处理的大鼠 Caspase-3 和 Caspase-9 表达水平明显增强。 α -syn 可刺激神经胶质细胞活化并释放活性氧、活性氮和促炎细胞因子, 从而启动小胶质细胞活化和路易体形成之间的恶性循环, 导致疾病的进展^[15]。

本研究发现, Cur 通过多种途径发挥了对帕金森病大鼠的神经保护作用。首先, Cur 通过抑制小胶质细胞的活化, 有效减少了脑组织中促炎因子的大量分泌, 包括 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-6、COX2 和 iNOS。这些促炎因子的过度释放与帕金森病的发病密切相关。Cur 作为核转录因子 NF- κ B 活性的抑制剂, 可有效抑制 NF- κ B 信号通路的激活, 从而减少促炎因子和促炎介质的释放。此外, Cur 可通过抑制 NADPH 氧化酶减少氧化负荷, 减少 α -syn 蛋白的聚集^[16]。 α -syn 聚集是帕金森病患者氧化应激和神经炎症增加的结果。当 NADPH 氧化酶被抑制时, α -syn 聚集减少, 表明 NADPH 氧化酶可调节多巴胺能神经元中 α -syn 聚集^[17]。同时, Cur 可通过抑制氧化应激的产生、抑制小胶质细胞介导的炎症反应来发挥其对 α -syn 聚集的抑制作用。因本研究前期进行了大量的预实验, 并对预期结果进行验证, 保证样本量足够大, 从而实现结果的稳定性和可靠性。因此, 本实验未设置阳性对照组来验证本药物的作用。综上所述, Cur 通过抑制神经炎症和氧化应激反应抑制 α -syn 的聚集, 改善帕金森病

大鼠的运动协调能力, 从而发挥神经保护作用, 最终为 Cur 治疗帕金森病提供更多的参考依据。

参考文献

- 1 Li HY, Liu DS, Zhang YB, et al. The interaction between alpha-synuclein and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Biophys Chem*, 2023, 303: 107122. DOI: [10.1016/j.bpc.2023.107122](https://doi.org/10.1016/j.bpc.2023.107122).
- 2 Neto JRM, Lima VA, Follmer C. Fibrillation of α -synuclein triggered by bacterial endotoxin and lipid vesicles is modulated by N-terminal acetylation and familial Parkinson's disease mutations[J]. *FEBS J*, 2024, 291(6): 1151-1167. DOI: [10.1111/febs.17027](https://doi.org/10.1111/febs.17027).
- 3 Bhattacharyya D, Bhunia A. Gut-brain axis in Parkinson's disease etiology: the role of lipopolysaccharide[J]. *Chem Phys Lipids*, 2021, 235: 105029. DOI: [10.1016/j.chemphyslip.2020.105029](https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.105029).
- 4 Sharma N, Nehru B. Curcumin affords neuroprotection and inhibits α -synuclein aggregation in lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease model[J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(2): 349-360. DOI: [10.1007/s10787-017-0402-8](https://doi.org/10.1007/s10787-017-0402-8).
- 5 Simuni T, Chahine LM, Poston K, et al. A biological definition of neuronal α -synuclein disease: towards an integrated staging system for research[J]. *Lancet Neurol*, 2024, 23(2): 178-190. DOI: [10.1016/s1474-4422\(23\)00405-2](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(23)00405-2).
- 6 He Q, Zhang S, Wang J, et al. The synergistic effect study of lipopolysaccharide (LPS) and A53T- α -synuclein: intranasal LPS exposure on the A53T- α -synuclein transgenic mouse model of Parkinson's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2024. Online ahead of print. DOI: [10.1007/s12035-024-04020-y](https://doi.org/10.1007/s12035-024-04020-y).
- 7 Cui Z, Guo FY, Li L, et al. Brazilin-7-acetate, a novel potential drug of Parkinson's disease, hinders the formation of α -synuclein fibril, mitigates cytotoxicity, and decreases oxidative stress[J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 264: 115965. DOI: [10.1016/j.ejmech.2023.115965](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115965).
- 8 Song MK, Adams L, Lee JH, et al. NXP031 prevents dopaminergic neuronal loss and oxidative damage in the AAV-WT- α -synuclein mouse model of Parkinson's disease[J]. *PLoS One*, 2022, 17(7): e0272085. DOI: [10.1371/journal.pone.0272085](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272085).

- 9 王友丽, 陈菊屏, 万运强. 姜黄素对脂多糖诱导肺泡巨噬细胞炎症、凋亡影响及机制 [J]. 华西医学, 2020, 35(2): 192–197. [Wang YL, Chen JP, Wan YQ. Effect and mechanism of curcumin on lipopolysaccharide-induced pulmonary macrophage inflammation and apoptosis[J]. West China Medical Journal, 2020, 35(2): 192–197.] DOI: [10.7507/1002-0179.201910090](https://doi.org/10.7507/1002-0179.201910090).
- 10 Ahmad I, Ahmad S, Ahmad A, et al. Curcumin, its derivatives, and their nanoformulations: revolutionizing cancer treatment[J]. Cell Biochem Funct, 2024, 42(1): e3911. DOI: [10.1002/cbf.3911](https://doi.org/10.1002/cbf.3911).
- 11 严德康, 张新悦, 王宇佳, 等. 甘露糖修饰姜黄素/人参皂苷 Rb1 脂质体的处方优选及体外脑靶向性评价 [J]. 中国药师, 2022, 25(1): 11–17. [Yan DK, Zhang XY, Wang YJ, et al. Formulation optimization and in vitro brain targeting evaluation of mannose-modified curcumin/ginsenoside Rb1 liposomes[J]. China Pharmacist, 2022, 25(1): 11–17.] DOI: [10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.01.003](https://doi.org/10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.01.003).
- 12 Deng I, Garg S, Zhou XF, et al. The effects of novel formulations of edaravone and curcumin in the mouse intrastriatal lipopolysaccharide model of Parkinson's disease[J]. Front Biosci (Schol Ed), 2022, 14(2): 13. DOI: [10.31083/j.fbs1402013](https://doi.org/10.31083/j.fbs1402013).
- 13 He HJ, Xiong X, Zhou S, et al. Neuroprotective effects of curcumin via autophagy induction in 6-hydroxydopamine Parkinson's models[J]. Neurochem Int, 2022, 155: 105297. DOI: [10.1016/j.neuint.2022.105297](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105297).
- 14 Liu R, Wang J, Chen Y, et al. NOX activation in reactive astrocytes regulates astrocytic LCN2 expression and neurodegeneration[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(4): 371. DOI: [10.1038/s41419-022-04831-8](https://doi.org/10.1038/s41419-022-04831-8).
- 15 Forloni G. Alpha synuclein: neurodegeneration and inflammation[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(6): 5914. DOI: [10.3390/ijms24065914](https://doi.org/10.3390/ijms24065914).
- 16 Rathore AS, Singh SS, Birla H, et al. Curcumin modulates p62-Keap1-Nrf2-mediated autophagy in rotenone-induced Parkinson's disease mouse models[J]. ACS Chem Neurosci, 2023. Online ahead of print. DOI: [10.1021/acscchemneuro.2c00706](https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.2c00706).
- 17 Keeney MT, Hoffman EK, Farmer K, et al. NADPH oxidase 2 activity in Parkinson's disease[J]. Neurobiol Dis, 2022, 170: 105754. DOI: [10.1016/j.nbd.2022.105754](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105754).

收稿日期: 2024 年 03 月 26 日 修回日期: 2024 年 04 月 29 日
本文编辑: 李 阳 钟巧妮