·实验研究·

去氢骆驼蓬碱及其衍生物 DH-004 暴露对小鼠神经系统毒性作用研究

茹则妮萨·阿卜杜拉[1,2],高惠静[2],巩月红[2],文丽梅[2],高　旖[1,2],王建华[2],陈　蓓[2]
(1 新疆医科大学药学院,乌鲁木齐 830000;2 新疆医科大学第一附属医院药学部,乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的**:研究去氢骆驼蓬碱(harmine,HM)及其衍生物 1-(4-甲氧基)苯基-9-丁基-β-咔啉(DH-004)对脑神经毒性的作用。**方法**:免疫吸附测定法(ELISA)测定小鼠脑组织中 IL-1β,TNF-α,IL-12 和 IL-6 含量;尼氏染色法检测小鼠大脑皮质神经细胞形态改变;实时荧光定量逆转录聚合酶链反应法(qRT-PCR)检测脑组织中离子钙接头蛋白(ionized calcium binding adaptor molecule-1,Iba-1)基因的表达水平;蛋白免疫印迹法(Western-Blot)检测脑组织中 Iba-1 蛋白的表达水平。**结果**:ELISA 实验结果显示,除了 IL-6 因子在各剂量组的含量变化不明显,其余 3 个因子 HM 处理组小鼠脑组织中的表达量最高,给予相同剂量的 DH-004 后,与 HM 处理组相比,小脑组织中炎症因子表达出现显著下降($P<0.01$)。尼氏染色、qRT-PCR、Western-Blot 实验结果显示,与空白组相比,HM 给药组对小鼠皮质神经细胞损伤严重,且有剂量依赖性;HM 组 Iba-1mRNA 和 Iba-1 蛋白表达水平较相应的空白组明显上调($P<0.01$),给予相同剂量的 DH-004 后,与 HM 处理组相比,小脑组织中 Iba-1mRNA 和 Iba-1 蛋白表达水平显著下调($P<0.01$)。**结论**:HM 可能诱导小鼠小胶质细胞的活化,激活的小胶质细胞促使炎症因子释放增加,导致神经组织损伤;而 DH-004 可能抑制小胶质细胞活化,从而减少炎症因子释放,减轻神经毒性。

[关键词] DH-004;神经毒性;小胶质细胞;炎症因子;尼氏染色
[中图分类号] R965.3　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2021)08-0740-07

Study on the neurotoxic effects of harmine and its derivatives DH-004 in mice

Ruzenisa·abudula[1,2],GAO Hui-jing[2],GONG Yue-hong[2],WEN Li-mei[2],GAO Yi[1,2],WANG Jian-hua[2],CHEN Bei[2]
(1 *College of Pharmaceutical Sciences*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830000, *China*; 2 *Department of Pharmacy*, *First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To study the neurotoxicity of DH-004, a derivative of harmine (HM). **Methods**: IL-1β, TNF-α, IL-12 and IL-6 in the brain of mice were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Morphological changes of neurons in cerebral cortex of mice were detected by Nissl staining. Real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect ionized calcium binding adaptor molecule-1 (Iba-1) mRNA expression in brain tissue. Iba-1 protein expression in brain tissue was detected by Western-Blot. **Results**: ELISA results showed that except for the insignificant changes of

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860666);省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室开放课题资助项目(SKL-HIDCA-2019-24);新疆维吾尔自治区自然科学基金(2018D01C191);新疆重大疾病防治与转化协同创新中心资助项目(80910721);兵团重点领域科技攻关计划项目(2020AB028)

[作者简介] 茹则妮萨·阿卜杜拉,女,在读硕士研究生,研究方向:抗包虫药物新制剂。E-mail:2441527648@qq.com。
[通讯作者] 陈蓓,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向:抗包虫药物新制剂。E-mail:chenbei_lisa@163.com。王建华,女,主任药师,研究方向:抗包虫病新药研发。E-mail:jhw716@163.com。

IL-6 in each dose group, the expression levels of the other three inflammatory factors with HM-treated mice in the brain tissues were the highest. After the same dose of DH-004 was given, the expression levels of inflammatory factors in the cerebellum tissues were significantly decreased compared with HM-treated mice ($P<0.01$). The results of Nisier staining, qRT-PCR and Western-Blot showed that compared with the blank control group, HM group had serious and dose-dependent damage to the cortical nerve cells of mice. The expression levels of Iba-1 mRNA and Iba-1 protein in HM group were up-regulated compared with the corresponding blank control group ($P<0.01$), after the same dose of DH-004 was given, the expression levels of Iba-1 mRNA and Iba-1 protein in cerebellum tissues were significantly down-regulated compared with HM group ($P<0.01$). **Conclusion**: HM can induce the activation of microglia cells in mice, then the activated microglia cells promote the release of inflammatory factors, leading to nerve tissue damage. While DH-004 can inhibit the activation of microglia cells, thus reducing the release of inflammatory factors and reducing neurotoxicity.

[**Key words**] DH-004; neurotoxicity; microglia cells; inflammatory factors; nisier staining

棘球蚴病(包虫病)是棘球绦虫的幼虫于人体内所致的一种严重的人兽共患寄生虫病,有“寄生虫肿瘤”之称,新疆为高发区[1]。现阶段以外科手术治疗为首选,但术中易播散,复发率较高。药物治疗因能降低复发率、提高手术治愈率而不断得到肯定[2]。

骆驼蓬为蒺藜科骆驼蓬属多年生草本植物的全草,化学成分主要为生物碱,如去氢骆驼蓬碱(harmine, HM)、骆驼蓬碱、哈尔醇、鸭嘴花碱等[3]。在这些生物碱中,主要以去氢骆驼蓬碱和骆驼蓬碱 2 种成分为主[4]。文献报道去氢骆驼蓬碱具有良好的抗包虫作用[5-7],但也有较大毒性,主要表现为神经系统症状、体温升高及心血管系统紊乱等[8-10],其中以肝肾、神经系统毒性最为严重,因此未被应用于临床。高晓黎等[11]、张学农等[12]研究表明,小鼠给予去氢骆驼蓬碱后,在肺、肾、肌肉中持续表现出较高的分布,在脑中表现出高分布。鉴于此,课题合作者对其进行结构修饰,合成了低神经毒性和高抗肿瘤活性的去氢骆驼蓬碱衍生物 DH-004[13]。本课题组前期体内外药效学及安全性评价研究结果证实,衍生物 DH-004 为低毒高活性的抗包虫化合物,同时进行了体内药动学研究,药动学参数结果显示,DH-004 在血浆中吸收少,消除快,推测 DH-004 口服后较多进入组织,在体内分布广,不能排除在脑组织中也有分布[14]。去氢骆驼蓬碱、DH-004 的化学结构式(见图 1)存在 β-咔啉环,通过紫外分光光度法测得 DH-004 解离常数 pKa 为 7.08,属于碱性化合物[15]。在血浆 pH 7.4 时,弱酸性药物主要以解离型存在,而弱碱性药物主要以非解离型存在,弱碱性药物容易向脑脊液转运。因此本研究在前期研究的基础上,进一步考察 DH-004 的神经毒性作用,以期为其抗包虫病研究提供参考。

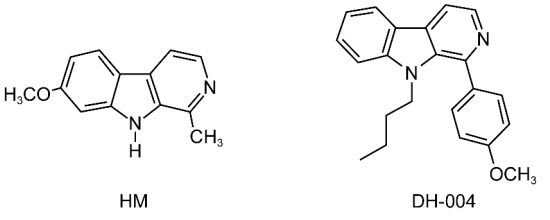


图 1 HM 和 DH-004 的化学结构式

材料与方法

1 药品与试剂

DH-004(批号:171213,纯度≥98%)、去氢骆驼蓬碱(HM,批号:171022,纯度≥98%)均购自新疆华世丹药业股份有限公司;伊红染液(北京索莱宝科技有限公司);4% 多聚甲醛购自北京索莱宝科技有限公司;环保透明脱蜡液购自中杉金桥公司;石蜡购自上海标本模型厂;Tween-80(湖南尔康制药有限公司);0.4% CMC-Na(天津市福晨化学试剂厂);Trizol(批号:15596-026)购自 Ambion 公司;HiScript Reverse Transcriptase (RNase H,批号:R101-01/02),5 × HiScript Buffer(批号:R101-01/02),50 × ROX Reference Dye 2(批号:Q111-02),SYBR Green Master Mix(批号:Q111-02)均购自 VAZYME 公司;dNTP(批号:CD117),Taq Plus DNA Polymerase(批号:ET105-01),DL2000 DNA Marker(批号:MD114-02)均购自 TIANGEN 公司;ddH_2O(DNase/RNase Free,批号:

C1D230A）购自 genecopoeia 公司；Ribonuclease Inhibitor（批号：AI101）购自 TransGen 公司；Random Primer（N6，批号：3801）购自 TAKARA 公司；磷酸酶抑制剂（批号：S1873）、RIPA 裂解液（批号：P0013B）、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号：P0010）均购自碧云天公司；PMSF（批号：P105539）购自阿拉丁公司；TEMED（批号：80125336）、SDS（批号：30166428）、溴酚蓝（批号：71008060）、甘油（批号：10010618）、甲醇（批号：10014118）、NaCl（批号：10019318）、KCl（批号：10016318）、$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$（批号：10020318）、KH_2PO_4（批号：10017618）冰醋酸（批号：10000218），吐温 20（批号：30189328）均购自国药集团化学试剂有限公司；Trise-Base（批号：1115GR500）、二硫叔糖醇（DTT，批号：1111gr005）、甘氨酸（批号：1275GR500）均购自 Biofroxx 公司；HCl（批号：GB622-89）购自信阳市化学试剂厂；30% 丙烯酰胺（批号：BL513b）购自 Biosharp 公司；蛋白 marker（10 ~ 250 kD，批号：P12103-2）购自海利克思公司；PVDF 膜（0.45 μm，批号：IPVH00010）、PVDF 膜（0.22 μm，批号：ISEQ15150）购自 Millipore 公司；小鼠单抗 β-actin（42 kD，批号：BM0627）、HRP 标记羊抗兔二抗（批号：BA1054）购自武汉博士德生物工程有限公司；兔单抗 IBA1（17 kD，批号：BM5765）购自 Boster 公司；ECL 底物液（批号：P1050）购自北京普利莱基因技术有限公司；X 光胶片（批号：6535876）购自锐珂（厦门）医疗器材有限公司；显影定影试剂盒购自天津市汉中摄影材料厂；水为蒸馏水。

2 仪器

全自动包埋机（德国 Leica 公司）；酶标仪（型号：Varioskan Flash 型，美国 Thermo Scientific 公司）；切片机（型号：RAM2135，德国 Leica 公司）；三目显微镜（型号：DM3000B，德国 Leica 公司）；高速冷冻离心机（型号：HC－3018R，安徽中科佳科学仪器有限公司）；电泳仪电源（型号：DYY－7C）、垂直电泳槽（型号：DYCZ－24DN）、电转仪（型号：DYCZ－40）均是北京六一仪器厂；水平摇床（型号：TS－1，江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司）；pH 计（型号：LP115，德国 Metter-Toledo GmbH 公司）；电子天平（型号：CPA，北京赛多利斯仪器系统有限公司）；磁力搅拌器（型号：T8 －1，江苏省金坛市中大仪器厂）；电热恒温鼓风干燥箱（型号：DHG 9203A，上海精宏实验设备有限公司）；实时荧光定量 PCR 仪（型号：QuantStudio 6，ABI）；荧光定量 PCR 管（型号：EXTRAGENE/illumina）；微量分光光度计（型号：Nano－100，杭州奥盛仪器有限公司）；电热恒温水浴锅（型号：HW-SY11-K P2，北京市长风仪器仪表有限公司）；Aquapro 超级纯水仪（型号：AJY－0501，艾科浦）；水平电泳仪（型号：JY300，北京君意东方电泳设备有限公司）；1 mL 无 RNase 袋装吸头、200 μL 无 RNase 袋装吸头、10 μL 无 RNase 袋装吸头均为 EXTRAGENE 公司。

3 实验动物

昆明白（KM）小鼠 70 只，雌性，（20 ± 2）g，购自新疆医科大学实验动物中心，许可证号：SYXK（新）2018-002。在标准环境下适应性喂养 7 d。

4 药物的配制

HM 可直接溶于生理盐水；衍生物 DH-004 不溶于水，故将药物放入干净、已灭菌研钵中，加入适量的 Tween-80 使药物完全润湿，并进行研磨，最后慢慢加入一定体积的 0.4% CMC-Na 溶液，配制成一定浓度的混悬液，备用[16]。

5 实验动物分组及给药

选取健康昆明小鼠，随机取 10 只作为空白对照组（除 DH-004 外的溶剂，即 Tween-80 和 4% CMC-Na 溶液），剩下的随机分为 HM 低、中、高（25，50，100 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$）剂量组以及 DH-004 低、中、高（25，50，100 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$）剂量组，各组 10 只，*qd*，连续灌胃给药 30 d，并观察脑毒性行为症状。

6 ELISA 法检测脑组织中的相关因子的含量

脑组织称质量，按 1∶9的比例用磷酸盐缓冲液（PBS）稀释，匀浆，在 4 ℃条件下以 3 000 $r \cdot min^{-1}$离心 20 min，取上清液，按照 ELISA 试剂盒说明操作测定上清液中的炎症因子 IL-1β，TNF-α，IL-12 和 IL-6 含量。

7 脑组织的病理学观察

从小鼠体内取出脑组织，经过处理后，用生理盐水清洗干净，将水分用滤纸吸干，取适量组织置于 4% 多聚甲醛中充分固定后，用清洁刀片进行切割整理（组织块的厚度不超过 3 mm），后续进行脱水、石蜡包埋、切片及尼氏染色。

8 qRT-PCR 实验检测 Iba-1mRNA 表达

RNA 的提取及 cDNA 的合成：干预后的原头蚴用 Trizol 法提取总 RNA[17]，核酸定量仪测定总 RNA 浓度，1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 纯度。逆转录合成 cDNA 使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒。以上述逆转录合成 cDNA 为模板进行 qRT-PCR

反应,检测相关目的基因的表达。

9 Western-Blot 法检测 Iba-1 蛋白表达

蛋白质经定量、变心后,置于冰上迅速冷却,进行电泳[18]。① 配胶:分离胶和浓缩胶按照自己选的蛋白的大小来定,分离胶加完后用 75% 乙醇压平胶面,凝胶时间大约 20 min,弃掉 75% 乙醇,加入选好的浓缩胶,立即插入上样齿梳,10 min 后进行蛋白上样。② 加样:胶板放入电泳槽中,加入适量电泳液,小心拔出上样齿梳,样品 12 000 r·min^{-1},4 ℃离心后,进行加样,其中蛋白样品加 10 μL,Marker 加 5 μL。③ 电泳:先以恒压 80 V 使上样液迁移至浓缩胶和分离胶的交界处,然后调节电压至 120 V,电泳至嗅酚蓝至分离胶底部,即可终止电泳,进行转膜。

转膜:① 电泳完毕后,取出凝胶,准备 1 张 PVDF 膜,8 张滤纸,PVDF 膜需要用纯甲醇浸泡饱和 3 ~5 s,制备夹心"三明治"湿转夹板:黑色海绵-4 层滤纸-SDS 凝胶-PVDF 膜-4 层滤纸-白色海绵,每层放好后,用涂布管去除气泡。② 将转膜槽置于冰浴中,放入闭合湿转夹板(黑色面对黑色面),加转移缓冲液,放入冰袋,插上电极,恒压 100 V,1.40 h 进行转膜。

封闭和抗体孵育:① 转膜完毕后,取出 PVDF 膜,放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST(称 0.5 g 脱脂奶粉溶于 10 mL TBST 中)中摇动,室温 2 h 进行封闭。② 用 TBST 洗膜 10 min ×4 次,室温,摇动。③ 一抗孵育(ab74711):加入合适稀释度(1∶200)的一抗,4 ℃缓慢摇动孵育过夜。④ 用 TBST 洗膜 10 min ×4 次,室温,摇动。⑤ 二抗孵育(ab205718):加入合适稀释度的二抗(1∶50 000),室温孵育 1 h,缓慢摇动。

化学发光检测(ECL 显影液):① 二抗孵育完,用 TBST 洗膜 10 min ×4 次,室温,摇动。② 将 A 和 B 两种显影剂等体积混合(现配现用),将转膜移至检测器平台上,将显色液加在膜上,避光开始检测。③ 结果分析:使用 ImageJ 软件对图片进行分析。

10 统计学分析

采用 SPSS 19.0 和 PRISM 6.0 统计软件进行数据处理,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较用方差分析;$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般行为观察

在整个实验期间,我们密切关注动物的情况,所有组没有发现任何组动物死亡,小鼠在体重、摄入水和食物方面均表现正常。然而,在实验过程中 HM 组小鼠有震颤、躁动不安、抽搐、竖毛等现象出现,持续约 15 min 左右自行恢复,衍生物 DH-004 对感染小鼠有良好耐受性,并没有表现出行为异常现象。

2 ELISA 法检测脑组织中 IL-1β,TNF-α,IL-12 和 IL-6 含量

IL-1β,TNF-α,IL-12 和 IL-6 是炎症反应重要的因子,其表达量检测可以反映脑组织受损程度。从表 1 和图 2 可知,除了 IL-6 因子在各剂量组的含量变化不明显,其余 3 个因子 HM 处理组小鼠脑组织中的表达量最高,相同剂量的 DH-004 给药后,与 HM 处理组相比,小脑组织中炎症因子表达出现显著下降($P < 0.01$)。

表 1 药物处理后小鼠脑组织炎症因子水平的情况 $\bar{x} \pm s, n = 10$

组别	剂量 /mg·mL^{-1}	炎症因子/pg·mL^{-1}			
		IL-1β	TNF-α	IL-6	IL-12
正常组	—	356.76 ± 24.12	834.52 ± 71.85	272.29 ± 29.52	383.23 ± 52.74
HM 组	100	539.22 ± 26.39^{b}	1406.95 ± 98.66^{b}	275.43 ± 12.07	626.30 ± 19.06^{b}
	50	490.99 ± 16.83^{b}	1190.79 ± 42.11^{b}	296.28 ± 22.40	547.89 ± 25.64^{b}
	25	447.42 ± 25.36^{b}	1094.39 ± 68.25^{b}	276.04 ± 10.75	489.30 ± 18.26^{b}
DH-004 组	100	421.53 ± 24.16^{b,d}	870.04 ± 70.36^{d}	302.39 ± 24.32	402.06 ± 14.15^{d}
	50	384.01 ± 19.52^{a,d}	853.68 ± 45.65^{d}	305.59 ± 15.06	383.23 ± 25.52^{d}
	25	392.42 ± 26.53^{b,d}	818.32 ± 66.74^{d}	274.61 ± 19.83	320.20 ± 28.99^{b,d}

与空白组相比,a:$P < 0.05$;与空白组相比,b:$P < 0.01$;与 HM 组相比,c:$P < 0.05$;与 HM 组相比,d:$P < 0.01$

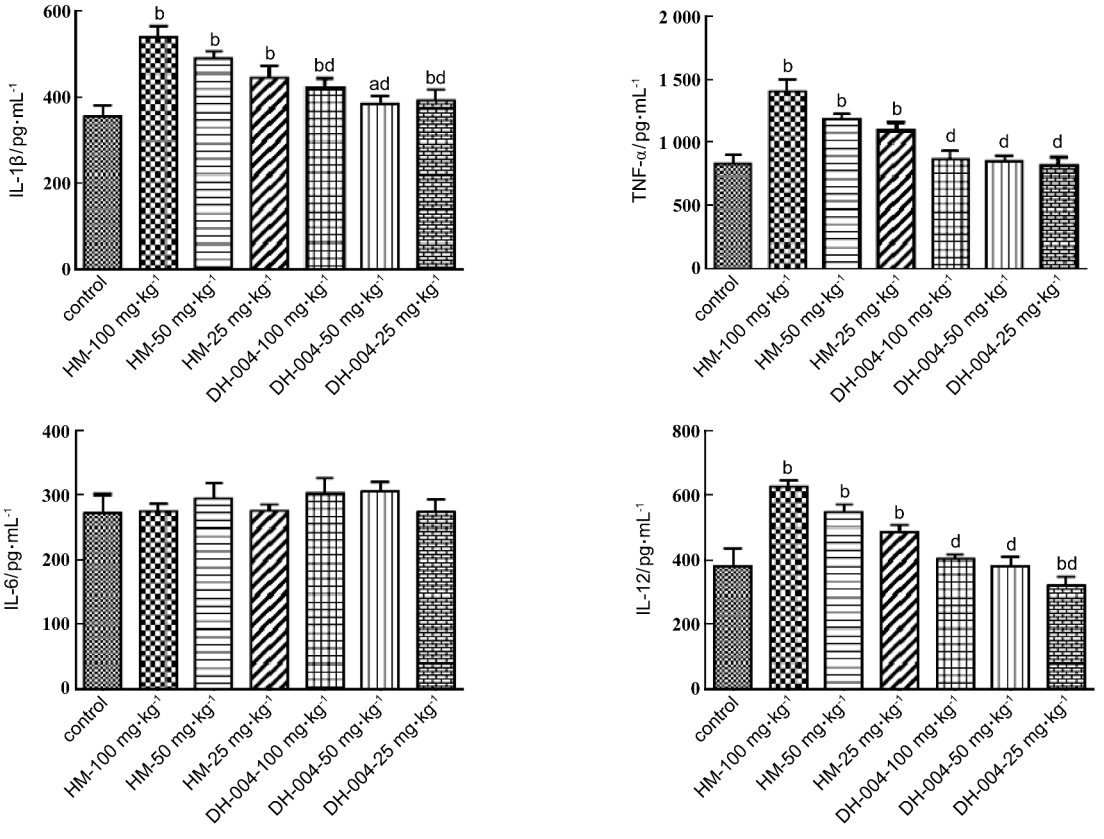
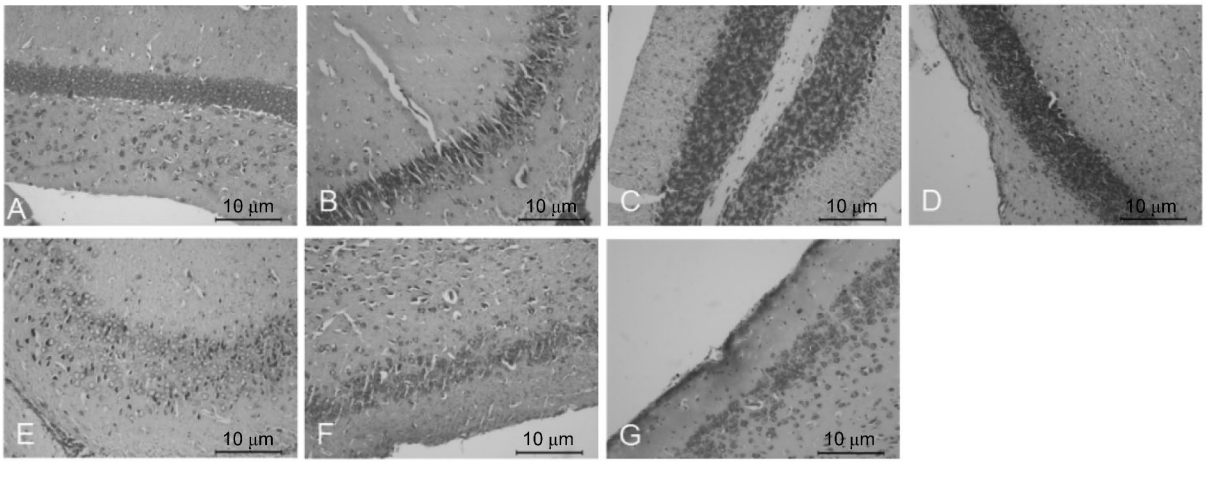


图 2　药物处理后小鼠脑组织炎症因子水平的情况

3　脑组织尼氏染色实验结果

小鼠脑病理组织尼氏染色，尼氏体染成蓝紫色，观察结果如图 3 所示。空白组与 DH-004 各剂量尼氏体细胞排列整齐，细胞形状清晰呈类椭圆形或三角形，数量多；HM 组随着给药剂量增加对尼氏体细胞损伤逐渐加重呈剂量依赖性。



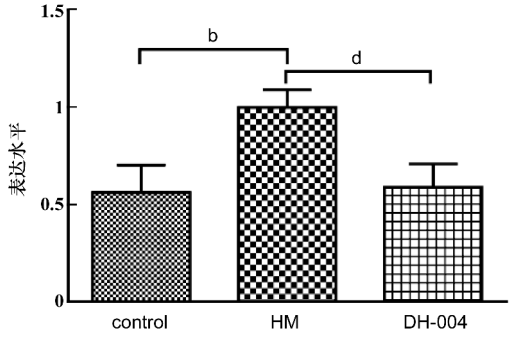
A：空白组；B：HM 低剂量组；C：HM 中剂量组；D：HM 高剂量组；E：DH-004 低剂量组；F：DH-004 中剂量组；G：DH-004 高剂量组

图 3　各实验组脑组织尼氏染色结果（200 ×）

4　qRT-PCR 检测 *Iba-1* 基因表达水平变化结果

qRT-PCR 检测各给药组脑组织中 *Iba-1* 基因表达水平变化，各实验组 Iba-1 mRNA 表达水平结果见图 4。HM 组 *Iba-1* 基因表达量与空白对照组相比显

著增加了约 77.62%，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与 HM 组相比，DH-004 组 *Iba-1* 基因表达量显著降低了约 41.00%，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

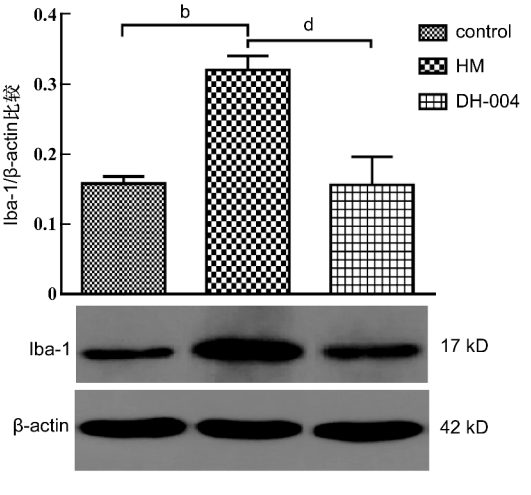


a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与空白组比较，$P<0.01$；c：与 HM 组比较，$P<0.05$；d：与 HM 组比较，$P<0.01$

图 4 各实验组 *Iba-1 mRNA* 表达水平

5 Western-Blot 检测 Iba-1 蛋白表达水平变化结果

Western-Blot 检测各实验组脑组织中 Iba-1 蛋白表达水平变化，各实验组蛋白相对表达水平结果见图 5。HM 组 Iba-1 蛋白的表达水平比空白组显著上调了约 83.54%，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与 HM 组相比，DH-004 组 Iba-1 蛋白的表达水平显著下调了约 49.68%，差异有统计学意义（$P<0.01$）。



a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与空白组比较，$P<0.01$；c：与 HM 组比较，$P<0.05$，d：与 HM 组比较，$P<0.01$

图 5 各实验组 Iba-1 蛋白表达水平

讨　论

本研究采用尼氏染色法观察神经细胞尼氏体形态结构变化，ELISA 法测定了脑组织中 IL-1β，TNF-α，IL-12 和 IL-6 的含量；qRT-PCR 法、Western-Blot 法分别测定了脑组织中 *Iba-1 mRNA* 和 Iba-1 蛋白的表达水平，为 DH-004 的脑毒性研究提供基础数据支持。

神经元即神经细胞，是神经系统最基本的结构和功能单位，神经毒性最直接的表现就是神经元损伤[19]。尼氏体是神经元结构中的一个生物结构，尼氏体数量减少、形态结构改变也是神经毒性的表现之一。本研究利用尼氏染色观察各给药组脑组织尼氏体细胞的数量、排列及形态变化。由于 HM 有一定的神经毒性，因此 HM 给药组对尼氏体细胞的损伤呈剂量依赖性，随着剂量的增加尼氏体细胞数量变少、排列松散、变性；DH-004 对尼氏体细胞的作用也呈剂量依赖性，但是随着剂量的增加尼氏体细胞边缘清晰，数量增多，排列紧密。这说明 DH-004 给药组均较 HM 组对脑组织神经细胞胞质中的尼氏体细胞的形状、排列、数量等有显著的改善（见图 2）。

小胶质细胞是神经胶质细胞的一种，是中枢神经系统（CNS）中第一道也是最主要的免疫防线[20]，其显著特点是对所处微环境的变化异常敏感。在生理状态下，小胶质细胞处于“静息”状态，在保持胞体位置不变的同时，通过大量分枝状突起的不断伸缩，实现对脑部微环境的免疫监视；当所处的微环境因子发生变化时，小胶质细胞可以迅速“活化”，表现为具有变形和吞噬作用的阿米巴样形态，细胞膜表达特异性分子，并释放细胞因子引起炎症反应以清除异物。Iba-1 是小胶质细胞和吞噬细胞的特异性蛋白，小胶质细胞活化过程中 Iba-1 表达会升高，因此小胶质细胞的增殖活化可以通过 Iba-1 的特异性表达来反映[21]。本研究中 Western-Blot 和 qRT-PCR 检测结果显示，与正常组相比，HM 组的 Iba-1 蛋白和 Iba-1mRNA 表达水平显著升高（$P<0.01$）；与 HM 组相比，DH-004 组的 Iba-1 蛋白、Iba-1mRNA 表达量明显下降（$P<0.01$，图 3，图 4），说明 DH-004 可能抑制小胶质细胞的激活。

炎症反应是人体应对外来刺激的一种防御反应，可以消除有害刺激，但是强烈的炎症反应会造成损伤[22]。IL-1β，TNF-α，IL-12 和 IL-6 是炎症反应重要的因子，其表达量检测可以反映脑组织受损程度。本研究中我们发现，除了 IL-6 因子在各剂量组的含量变化不明显，其余 3 个因子 HM 处理组小鼠脑组织中的表达量最高，相同剂量的 DH-004 给药后，与 HM 处理组相比，小脑组织中炎症因子表达出

现显著下降($P<0.01$,图 1),结果说明 HM 组活化的小胶质细胞会释放大量炎症因子。

本研究显示,HM 给药组皮质神经细胞受到明显损伤,小胶质细胞被激活,且激活的小胶质细胞大量表达炎症因子,进而损伤神经元,导致神经元变性、坏死,出现神经组织损伤的典型特征,此结果与本课题组前期体外实验研究结果一致[23]。而 DH-004 则减少神经细胞损伤、炎症反应,抑制小胶质细胞活化,进而减少炎症反应可能是 DH-004 脑神经毒性小的重要作用机制之一。希望本实验能够为进一步研究 DH-004 脑神经毒性机制提供参考。

[参 考 文 献]

[1] 徐硕,党志胜,张皓冰,等. 棘球蚴病药物治疗的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2018,36(3):297 - 302.

[2] LUO YP,ZHANG GC,LIU X,*et al*. Therapeutic and immunoregulatory efects of water-soluble alkaloids E2-a from Sophora moorcroftiana seeds as a novel potential agent against echinococcosis in experimentally protoscolex-infected mice[J]. *Vet Res*,2018,49(9):100 - 113.

[3] 张义英,王俊儒,李越鲲,等. 骆驼蓬生物碱生物活性的研究进展[J]. 动物医学进展,2006,27(10):37 - 40.

[4] 史小媛,刘伟,张磊,等. 骆驼蓬总生物碱中骆驼蓬碱、去氢骆驼蓬碱及其代谢产物大鼠体内药代动力学研究[J]. 中成药,2014,36(6):1169 - 1175.

[5] 赵晋明,杨文光,马新明. 骆驼蓬总碱治疗小鼠腹腔细粒棘球蚴的实验研究[J]. 新疆医科大学学报,2001,24(2):125 - 127.

[6] 李红玲,赵军,马运芳,等. 去氢骆驼蓬碱抗细粒棘球蚴原头节作用研究[J]. 中国病原生物学杂志,2014,9(11):995 - 999.

[7] 李丽华,赵军,马运芳,等. 去氢骆驼蓬碱和阿苯达唑联合治疗小鼠腹腔细粒棘球蚴病的实验研究[J]. 中国病原生物学杂志,2016,9(11): 815 - 820.

[8] 张建强. 骆驼蓬有效成分两种给药途径的毒性比较研究[J]. 上海中医药大学学报,2016,30(6): 75 - 77.

[9] 李娜. 去氢骆驼蓬碱单体衍生物及 3 种倍半萜内酯的细胞毒活性研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2015.

[10] FRISON G,FAVRETTO D,ZANCANARO F,*et al*. A case of β-carboline alkaloid intoxication following ingestion of Peganum harmala seed extract[J]. *Forensic Sci Int*, 2008,179(2):37 - 43.

[11] 高晓黎,程利勇,孙殿甲,等. 定量分析去氢骆驼蓬碱注射用乳剂的组织靶向性[J]. 药学学报,2000,35(2):142 - 146.

[12] 张学农,孙殿甲,李观海. 去氢骆驼蓬碱在兔及小鼠体内的药物动力学研究[J]. 中成药,1993,15(9):4 - 6.

[13] 郭亮,孙洁,范文玺,等. 去氢骆驼蓬碱衍生物的合成和抗肿瘤活性研究[J]. 中国现代应用药学,2012,29(5): 385 - 388.

[14] 高惠静,巩月红,卢帅,等. 去氢骆驼蓬碱衍生物 DH-004 不同途径给药的大鼠体内药动学研究[J]. 中国新药杂志,2019,28(19):2405 - 2410.

[15] 茹则妮萨·阿卜杜拉,高惠静,衣来努尔·吐依哄, 等. 去氢骆驼蓬碱衍生物 DH-004 在不同介质中平衡溶解度,油水分配系数及解离常数的测定[J]. 中国新药杂志,2020,29(14):1660 - 1665.

[16] 郑海亚. 去氢骆驼蓬碱及其衍生物抗囊性包虫药效作用及其氧化损伤机制的初步研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2018.

[17] XU H,TAN G,ZHANG S,*et al*. Minocycline reduces reactive gliosis in the rat model of hydrocephalus[J]. *BMC Neuroscience*,2012,13(1):148.

[18] 王慧. 棘球蚴囊液蛋白质组学及主要分泌蛋白对宿主免疫调节的影响[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2015.

[19] XU L,SHAO A,ZHAO Y,*et al*. Neurotoxicity of silver nanoparticles in rat brain after intragastric exposure[J]. *J Nanosci Nanotechnol*,2015,15(6):4215 - 4223.

[20] SAVITZ SI,COX CS. Concise review:cell therapies for stroke and traumatic brain injury:targeting microglia[J]. *Stem Cells*,2016,34(3):537 - 542.

[21] 王茜,程雪娇,李娜,等. 白藜芦醇对阿尔茨海默病大鼠海马组织中小胶质细胞及白细胞介素-1β 表达抑制作用的实验研究[J]. 中国预防医学杂志,2015(8):581 - 585.

[22] HUANG CL,HSIAO IL,LIN HC,*et al*. Silver nanoparticles affect on gene expression of inflammatory and neurodegenerative responses in mouse brain neural cells[J]. *Environ Res*, 2015,136:253 - 263.

[23] 陈蓓,马丽娟,李丽华,等. 去氢骆驼蓬对 PC12 和 NCTC1469 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国病原生物学杂志,2018,13(1):59 - 63,67.

编辑:杨青/接受日期:2021 - 02 - 01