

研究论文

灵芝提取物通过抑制小胶质细胞激活保护多巴胺能神经元

丁晖, 周明, 张瑞萍, 徐胜利*

首都医科大学宣武医院, 北京市老年病研究所神经生物学研究室, 教育部神经退行性疾病重点实验室, 北京 100053

摘要: 近来的研究表明, 神经炎症在帕金森病(Parkinson's disease, PD)的发病过程中起着重要的作用, 因此通过抑制神经炎症而保护黑质多巴胺能神经元可能是一种具有潜力的治疗策略。本研究组前期的临床试验表明, 灵芝(*Ganoderma lucidum*, GL)具有潜在的神经保护作用, 可能通过抗炎及免疫调节机制发挥其保护作用。本研究在神经元-小胶质细胞共培养的模式中观察了GL的神经保护作用, 并探讨其可能的保护机制。小胶质细胞单独或与MES23.5多巴胺能神经细胞共培养, 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)孵育24 h作为阳性对照, 试验组分别加入GL提取物(50~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和/或MPP⁺处理的MES23.5细胞膜碎片(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 检测小胶质细胞激活情况及其产生的有害因子和MES23.5细胞[³H]DA摄取能力。结果显示, LPS或MPP⁺损伤的MES23.5膜碎片均可激活小胶质细胞。同时, GL提取物可以显著降低小胶质细胞源性炎症因子和细胞毒性因子(NO、TNF- α 、L-1 β)的产生, 并呈一定的浓度依赖性; 并同样可以下调TNF- α 和L-1 β mRNA水平的表达。此外, GL还可明显对抗由小胶质细胞激活和MPP⁺介导的多巴胺能神经细胞[³H]DA摄取抑制。以上结果提示, GL主要通过抑制小胶质细胞激活, 减少其神经毒性因子的释放而保护多巴胺能神经细胞。GL可能成为治疗PD的潜在药物。

关键词: 帕金森病; 小胶质细胞; 灵芝; 神经炎症; 神经保护

中图分类号: R329

Ganoderma lucidum extract protects dopaminergic neurons through inhibiting the production of inflammatory mediators by activated microglia

DING Hui, ZHOU Ming, ZHANG Rui-Ping, XU Sheng-Li*

Department of Neurobiology, Institute of Geriatrics of Beijing, Xuanwu Hospital of the Capital University of Medical Sciences, Key Laboratory for Neurodegenerative Disease of Ministry of Education, Beijing 100053, China

Abstract: Abundant evidence has suggested that neuroinflammation participates in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD). The emerging evidence has supported that microglia may play key roles in the progressive neurodegeneration in PD and might be a promising therapeutic target. *Ganoderma lucidum* (GL), a traditional Chinese medicinal herb, has been shown potential neuroprotective effect in our clinical trials that lead us to speculate that it might possess potent anti-inflammatory and immunomodulating properties. To test this hypothesis, the present study investigated the potential neuroprotective effect of GL and underlying mechanism through inhibiting microglial activation using co-cultures of dopaminergic neurons and microglia. The cultures of microglia or MES23.5 cells alone or together were treated for 24 h with lipopolysaccharide (LPS, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as a positive control, GL extracts (50-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or MES23.5 cell membrane fragments (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used in treatment groups. Microglia activation, microglia-derived harmful factors and [³H]dopamine ([³H]DA) uptake of MES23.5 cells were analyzed. The results showed that microglia were activated by LPS and MPP⁺-treated MES23.5 cell membrane fragments, respectively. Meanwhile, GL extracts significantly prevented the production of microglia-derived proinflammatory and cytotoxic factors, including nitric oxide, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 1 β (IL-1 β), in a dose-dependent manner and down-regulated the TNF- α and IL-1 β expressions on mRNA level. In addition, GL extracts antagonized the reduction of [³H]DA uptake induced by MPP⁺ and microglial activation. In conclusion, these results suggest that GL may be

Received 2010-08-31 Accepted 2010-11-17

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30671950 and 30070279).

*Corresponding author. Tel: +86-10-83198834; Fax: +86-10-83161294; E-mail: xushengli@yahoo.com

a promising agent for the treatment of PD through anti-inflammation.

Key words: Parkinson's disease; microglia; *Ganoderma*; neuroinflammation; neuroprotection

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经系统变性疾病,临床上以运动迟缓、强直、静止性震颤和姿势步态异常为主要表现^[1]。随着疾病的不断进展,很多患者出现包括焦虑、抑郁、便秘和痴呆在内的非运动症状。尽管药物可以缓解PD的症状,但是这些药物并不能减缓PD的进程,长期使用还会出现一系列的副作用,故亟待研发一种可以减缓或是阻止疾病进程的神经保护性药物^[2]。

目前,PD神经元变性的原因和发病机理仍然不明。许多证据表明,胶质细胞的激活和神经炎症在黑质神经元进行性变性的级联放大过程中起了重要作用^[3]。尸检显示,PD患者黑质周围有大量激活的小胶质细胞^[4]。中枢神经系统内的静息小胶质细胞受到如环境毒素、神经毒素等外界刺激时将被激活,释放一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)和超氧化物等炎症及细胞毒性因子,导致一系列的神经毒性作用^[5]。

在中国,灵芝(*Ganoderma lucidum*, GL)药用已有1 000多年的历史。研究表明GL提取物有免疫调节、抑制炎症、清除自由基等一系列广泛的药理学作用。有研究表明,GL提取物可以防止脑缺血后神经元的缺失^[6],但是还没有关于GL是否可以保护多巴胺能神经元和减轻小胶质细胞介导的炎症反应的报道,本研究就此问题进行了初步探讨。

1 材料与方 法

1.1 小胶质细胞和MES23.5细胞培养 小胶质细胞的分离和培养根据 Gao 等^[7]的方法进行。MES23.5多巴胺能神经细胞系由中国科学院上海生命科学研究院健康科学研究所乐卫东博士馈赠,培养方法参照 Crawford 等^[8]方法进行。为了观察小胶质细胞和MES23.5细胞的相互作用,小胶质细胞与MES23.5细胞在24孔板内共培养。将纯化的小胶质细胞以 1×10^4 /孔的密度接种于24孔板,24 h后加入MES23.5细胞共培养(MES23.5:小胶质细胞=2:1)。共培养基含 Sato's 及2%胎牛血清。小胶质细胞单独或是与神经元共培养组加入脂多糖(lipopolysaccharide, LPS,

0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)孵育24 h作为阳性对照,试验组分别加入GL提取物(50~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$,培力药业公司赠予,批号:070106。主要活性成分为灵芝多糖和三萜类物质,含少量麦角甾醇)和/或MPP⁺处理的MES23.5膜碎片(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)孵育。

1.2 免疫组织化学染色 4%多聚甲醛固定小胶质细胞,正常血清室温封闭30 min,加入一抗OX-42(小鼠抗人CD11b单克隆抗体,1:2 000,Abcam),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS漂洗后,分别加入生物素标记马抗小鼠IgG(1:200, Santa Cruz)与辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素(1:500, Santa Cruz),DAB显色。显微镜观察,照相。

1.3 MES23.5细胞膜碎片(CF)的制备 在MPP⁺作用MES23.5细胞24 h后,加入0.25%胰酶消化,待细胞形态刚刚变为圆形时,加入含0.25 mol/L蔗糖、100 mmol/L PBS、1 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L EDTA和2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PMSF的缓冲液吹打,吸出液体4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 g离心10 min;取离心上清液4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 g离心60 h,吸除上清液,沉淀物冻干称重后,取适量用培养基溶解,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 [³H]多巴胺(dopamine, DA)摄取能力的检测 细胞用1 mL Krebs-Ringer缓冲液(16 mmol/L NaH₂PO₄, 16 mmol/L Na₂HPO₄, 119 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl₂, 1.2 mmol/L MgSO₄, 1.3 mmol/L EDTA, 5.6 mmol/L glucose; pH 7.4)冲洗。各孔分别加入10 μL [³H]DA(终浓度为10 nmol/L),非特异性摄取组每孔加入10 μL nomifensine(终浓度为1 mmol/L),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。加入1 mL冰冷的Krebs-Ringer缓冲液冲洗3次,每孔加入500 μL ,1 mol/L NaOH裂解细胞,室温孵育1 h,将裂解液移入4 mL同位素试管中,每个试管中加入3 mL闪烁液,过夜,测定每分钟脉冲数(cpm)。特异性摄取cpm=总摄取cpm-非特异性摄取cpm。

1.5 NO测定 小胶质细胞培养体系处理24 h后,收取细胞上清液,用于测量NO。测量时,将相同体积的Griess试剂加入96孔板的细胞上清液中,混匀,室温下黑暗反应10 min,于540 nm下用LP-400 ELISA测定仪读取光密度值。样品的亚硝酸盐浓度根据亚硝酸钠配成的标准曲线来确定。

表 1. IL-1 β 与 TNF- α 实时定量 PCR 扩增引物表
Table 1. The primers of IL-1 β and TNF- α for real time-PCR

Sequence name	Accession number	Forward primer	Reverse primer	Product size
IL-1 β	NM_008361	CCGTGGACCTTCCAGGATGA	GGGAACGTCACACACCAGCA	102 bp
TNF- α	NM_013693	CCACCACGCTCTTCTGTCTA	AGGGTCTGGGCCATAGAACT	116 bp
β -actin	NM_031144.2	CCTCTGAACCCTAAGGCCAA	AGCCTGGATGGCTACGTACA	90 bp

1.6 TNF- α 、IL-1 β 和超氧化物测定 样本处理同 NO 测定, 分别使用大鼠 TNF- α 试剂盒、大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒和超氧化物 -WST 试剂盒按照说明测定相应因子含量。

1.7 RNA 提取和 real-time PCR 以 RNAprep 试剂盒提取的细胞总 RNA 反转录为 cDNA。使用 SYBR2 Green I 试剂盒(TaKaRa, 日本)与对应的基因引物(表 1)进行实时定量 PCR 扩增。每个样本重复测定 2 次。用同一样品中 β -actin 的含量进行校正得到其相对值。

1.8 数据分析 结果数据表示为 mean \pm SD, 使用的统计分析软件为 SPSS11.0 软件, 单因素方差统计分析方法分析不同处理组间的差异, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 以 LPS 或 CF 为工具药激活小胶质细胞

为了建立神经元变性过程中小胶质细胞激活的模型, 使用 LPS 或 MPP⁺ 损伤的多巴胺能(MES23.5 细胞) CF 为工具药孵育单独培养的小胶质细胞或胶质细胞 - 神经元共培养体系。用 OX-42 对小胶质细胞表面特异性标志 CD11b 进行免疫组织化学染色, 结果显示, CD11b 阳性率在 95% 以上。静息的小胶质细胞成分枝状(图 1A、B), 而激活的小胶质细胞呈阿米巴样(图 1C、D)。

在众多的神经毒性因子中, NO、TNF- α 、IL-1 β 和超氧化物是小胶质细胞激活后介导多巴胺能神经元变性的主要因子。首先观察 LPS 诱导的小胶质细胞激活后小胶质细胞源性 TNF- α 、IL-1 β 及活性氧成分(NO、超氧化物)的水平。结果显示 LPS 作

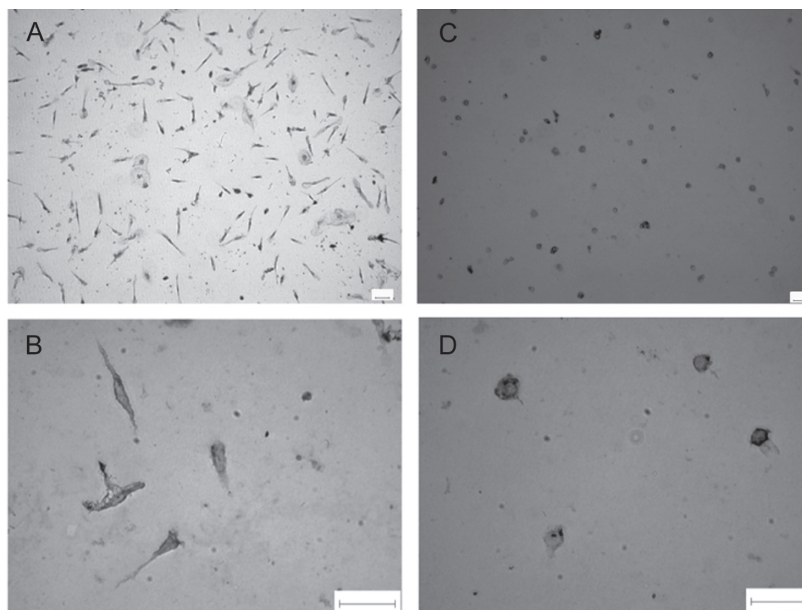


图 1. 小胶质细胞 OX-42 免疫组织化学染色

Fig. 1. The morphology of rat microglia cells labeled with OX-42. The rest ramified microglia (A, B) were transformed into an amoeboid morphology after being treated with LPS (C, D). A, C: 100 \times ; B, D: 400 \times . Scale bar, 100 μ m.

用后, 培养基中 TNF- α 、IL-1 β 的水平升高了 6~11 倍, NO 和超氧化物的水平升高了 5~11 倍(图 2)。因为只有神经元受损伤后才可以激活小胶质细胞, 实验制备了 MPP⁺ 损伤的多巴胺能神经元 CF。结果显示, 经 CF(150 μ g/mL)作用后, TNF- α 、IL-1 β 的水平显著增加, 升高了 4~10 倍, 但是均不如 LPS 明显, NO 和超氧化物的水平分别升高了 2~10 倍(图 2)。

2.2 GL 能降低激活的小胶质细胞释放的各种因子的水平

为了观察GL对小胶质细胞源性炎症因子及活性氧成分的作用, GL 预孵育 30 min 后, 再暴露于 LPS 或 CF 环境中。如图 3 和图 4 所示, 低剂量 GL 提取物对这些细胞因子有微弱的抑制作用, 而高浓度 GL (100~400 μ g/mL)预孵育可以浓度依赖性地降低 LPS/CF (vehicle)刺激小胶质细胞产生的 NO 和超氧化物的水平, 400 μ g/mL GL 几乎可以完全抑制 NO 的产生。同样浓度下的 GL 对 TNF- α 和 IL-1 β 也有类似的作用(图 5)。

2.3 GL 提取物对 MPP⁺ 介导的多巴胺能神经元损伤有保护作用

为了评估炎症介导的神经毒性作用, 对有或无小胶质细胞存在下 100 μ mol/L MPP⁺ 或 0.25 μ g/mL LPS 对MES23.5细胞[³H]DA 摄取能力的影响均进行

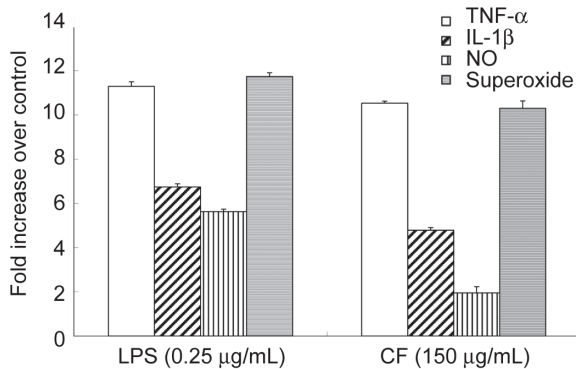


图 2. LPS 和 MPP⁺ 损伤的 MES23.5 细胞膜碎片对小胶质细胞的激活作用

Fig. 2. LPS and MPP⁺-treated MES23.5 cell membrane fragment (CF) increased neurotoxic factors through activating microglia. The levels of TNF- α , IL-1 β , NO and superoxide in control are 106.55 pg/mL, 119.09 pg/mL, 0.6 mmol/L and 5.22 U/mL, respectively. Levels were expressed as fold increase as compared to concentrations of the control. The levels of all factors were increased significantly compared with those in control ($P < 0.05$).

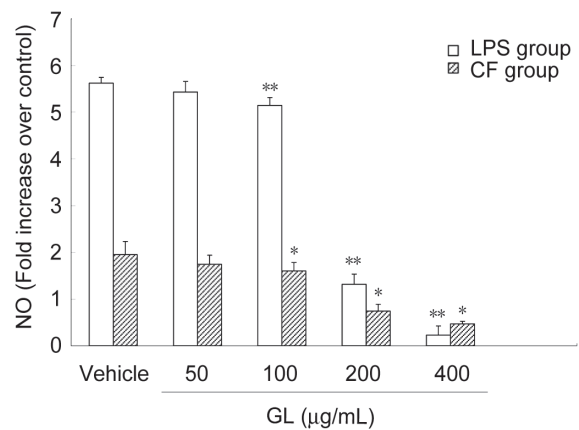


图 3. GL 可以剂量依赖性地降低 LPS/CF 诱导的 NO 产生
Fig. 3. GL protects against LPS- or CF-induced production of NO in a dose-dependent manner. Data are expressed as fold increase over control group (rest microglia without LPS or CF activation) and presented as means \pm SD of two experiments performed in triplicate. Vehicle groups were treated only with LPS or CF. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with corresponding vehicles.

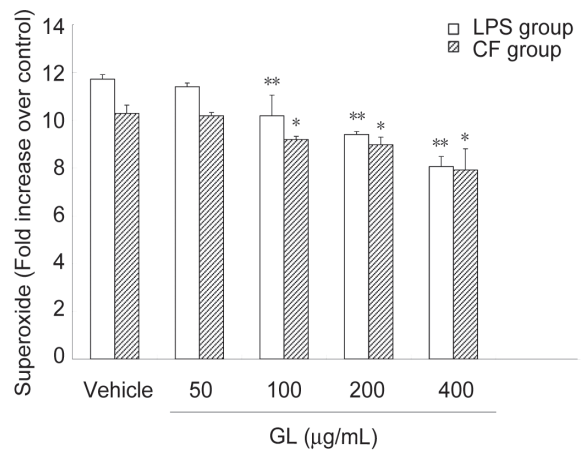


图 4. GL 可以剂量依赖性地降低 LPS/CF 诱导的超氧化物的水平

Fig. 4. GL protects against LPS- or CF-induced production of superoxide in a dose-dependent fashion. Data are expressed as fold increase of control group (rest microglia without LPS or CF activation) and presented as means \pm SD of two experiments performed in triplicate. Vehicle groups were treated only with LPS or CF. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with corresponding vehicles.

了观察。与无任何处理的对照组 MES23.5 细胞相比, MPP⁺ 处理后 MES23.5 细胞单独培养组[³H]DA 摄取能力下降了 66%, 而 MES23.5 细胞与小胶质细

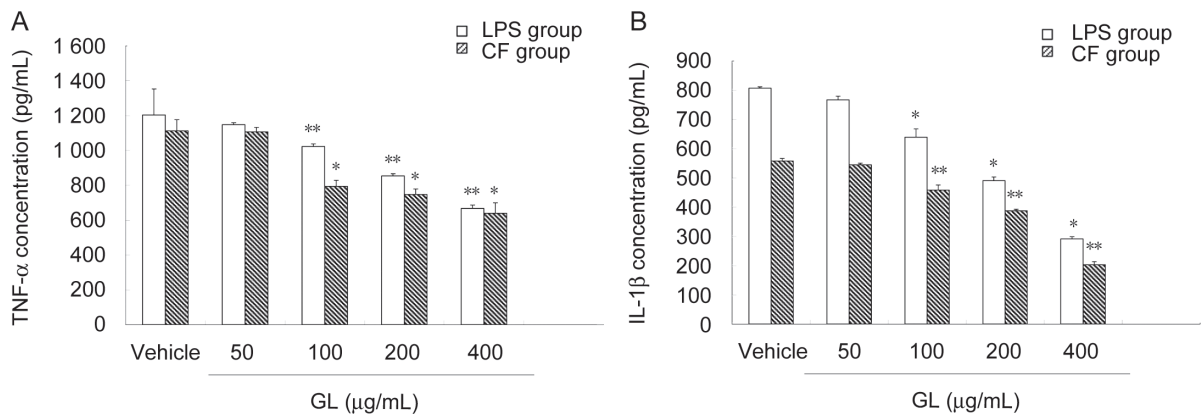


图 5. GL 可以剂量依赖性地降低 LPS/CF 诱导的 TNF-α 和 IL-1β 的水平

Fig. 5. GL protects against LPS- or CF-induced production of TNF-α and IL-1β in a dose-dependent fashion. Data are expressed as means±SD of two experiments performed in triplicate. Vehicle groups were treated only with LPS or CF. **P*<0.05, ***P*<0.01 compared with corresponding vehicles.

胞共培养组^[3H]DA 摄取能力下降了 74% (图 6); 经 400 μg/mL GL 预处理, MPP⁺ 处理后 MES23.5 细胞单独培养组和共培养组^[3H]DA 摄取能力仅分别下降了 35% 和 38%。

2.4 GL 提取物对 LPS 介导的多巴胺能神经元损伤有保护作用

当 0.25 μg/mL LPS 作用于神经元 - 胶质细胞共培养体系 24 h 后, ^[3H]DA 摄取能力下降了约 50% (图 7)。经 400 μg/mL GL 作用后, ^[3H]DA 摄取能力有显著改善 (GL 作用组下降了 22%, 无 GL 作用组下降了 50%) (图 7)。

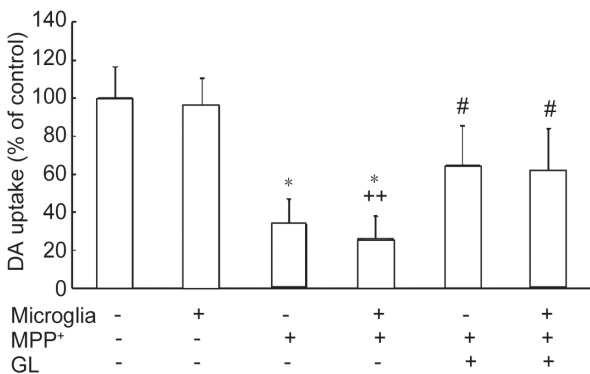


图 6. 小胶质细胞和 GL 对 MPP⁺ 诱导的 MES23.5 细胞^[3H]DA 摄取能力降低的作用

Fig. 6. GL protects against MPP⁺-induced reduction of ^[3H]DA uptake in MES23.5 cell cultures with or without microglia. The GL groups were pre-treated with 400 μg/mL GL for 30 min before 100 μmol/L MPP⁺ incubation for 24 h. Data are expressed as percentage increase of control group (MES23.5 cells without microglia, MPP⁺ and GL treatment) and presented as means±SD. *n*=4. **P*<0.05 compared with corresponding MES23.5 in the absence or presence of microglia cultures without exposure to MPP⁺; ***P*<0.01 compared with the MPP⁺-treated MES23.5 cultures without microglia; #*P*<0.01 compared with corresponding MPP⁺-treated MES23.5 in the absence or presence of microglia cultures without exposure to GL.

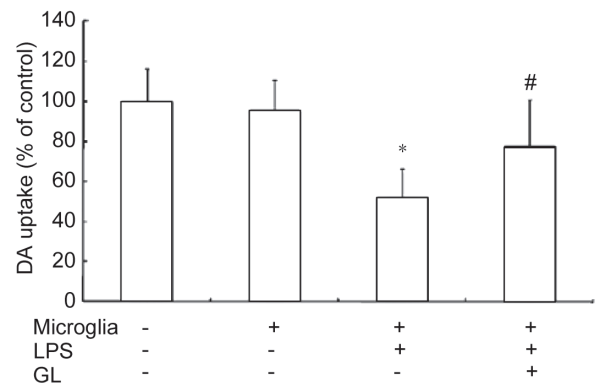


图 7. GL 对 LPS 诱导的 MES23.5 细胞^[3H]DA 摄取能力降低的作用

Fig. 7. GL protects against LPS-induced reduction of ^[3H]DA uptake in MES23.5 cell cultures with or without microglia. Data are expressed as percentage increase of control group (MES23.5 cells without microglia, LPS and GL treatment) and presented as means±SD. *n*=4. **P*<0.05 compared with corresponding MES23.5 in the absence or presence of microglia cultures without exposure to LPS; #*P*<0.01 compared with corresponding MES23.5 and microglia co-cultures without exposure to GL.

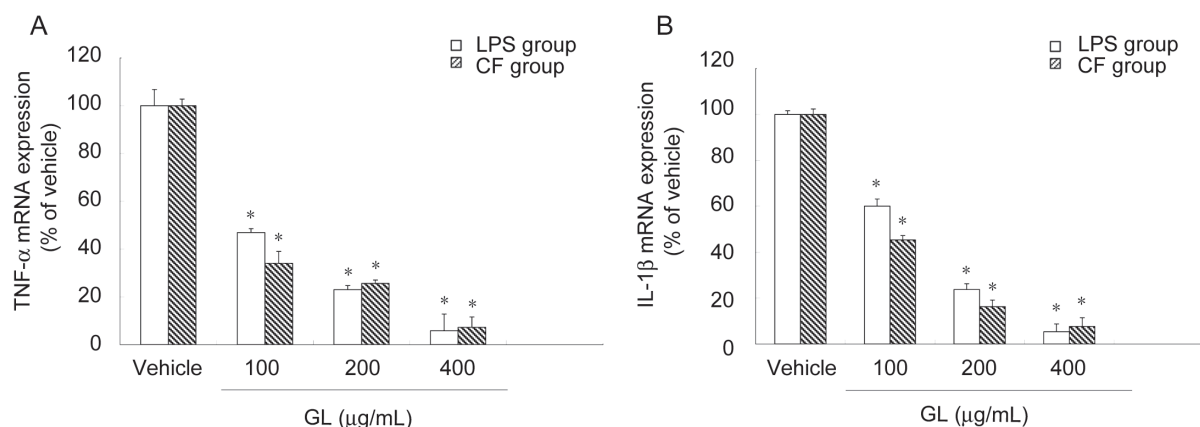


图 8. GL 可以剂量依赖性地降低 LPS/CF 导致的 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达

Fig. 8. GL protects against LPS- or CF-induced overexpression of mRNA levels of TNF- α (A) and IL-1 β (B) in a dose-dependent fashion. Data are expressed as percentage of the vehicle group (LPS or CF only treated group, respectively) calculated from the average threshold cycle values and presented as the means \pm SD. Independent RNA preparations from different sets of cultures were prepared, and determinations were performed in triplicate from the RNA samples of a set of experiment. * P <0.05 compared with corresponding vehicles.

2.5 GL 提取物抑制 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达

小胶质细胞源性毒性因子的生成可以在多个水平进行调控, 转录后调控、翻译、翻译后调控均有重要作用, 而基因转录则是主要的调控位点。对照组几乎观察不到 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达, 而 LPS 或 CF 作用组(vehicle) mRNA 表达显著增加, 100~400 μ g/mL GL 预处理后呈浓度依赖性地抑制, 400 μ g/mL GL 几乎抑制了 90% 的 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达(图 8)。

3 讨论

本研究表明 GL 可以通过抑制小胶质细胞激活有效地保护多巴胺能神经元, GL 这种保护作用与其抑制小胶质细胞源性炎症因子和细胞毒性因子(NO、TNF- α 、IL-1 β 和超氧化物)的生成有关。这个观点通过 GL 可以显著下调 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达得到了进一步证实。

PD 的病理特征为黑质神经元的进行性变性伴小胶质细胞激活。尽管有证据表明环境或是内源性毒素可以导致神经元死亡, 但是并不清楚它们通过何种途径激活小胶质细胞的。已表明 LPS 和神经毒素可以激活小胶质细胞并导致神经元进行性变性, 并且这种变性可以通过抑制炎症因子的表达来预防^[9]。越来越多的证据表明慢性炎症与包括 PD 在内的神经变性疾病有密切的关系。

小胶质细胞是脑内的常驻免疫细胞, 在神经炎症过程中起主要作用。可以通过两种途径激活小胶质细胞产生神经毒性作用。首先, 小胶质细胞可以被 LPS 等刺激因子激活, 产生有神经毒性的炎症因子和细胞因子, 从而导致神经元损伤, 这些产生的毒性因子也会消耗多巴胺能神经元内的抗氧化物质, 损伤线粒体功能, 抑制谷氨酸再摄取, 导致神经组织损伤^[10]。另外, 其产生的 TNF- α 等细胞因子可以激活其它静息状态小胶质细胞, 加重炎症反应。在黑质致密带, 细胞外氧化损伤主要是由小胶质细胞来源的 NADPH 氧化酶产生的超氧化物, 部分细胞外超氧化物直接损伤多巴胺能神经元; 部分进入细胞内, 成为细胞内活性氧类物质的来源之一, 所以细胞外超氧化物的增加会导致细胞内活性氧类物质水平的升高; 部分与 NO 反应, 生成毒性更强的过氧化亚硝酸盐, 继续损伤多巴胺能神经元。故细胞外超氧化物是启动多巴胺能神经元变性损伤的关键性因素。GL 显著抑制了细胞外超氧化物的产生, NADPH 氧化酶可能是 GL 发挥保护作用的一个重要靶标, 参与了 GL 的神经保护机制。IL-1 β 可以通过破坏血脑屏障易于白细胞进入中枢神经系统从而参与中枢神经系统的炎症反应。本研究结果显示: 细胞因子 IL-1 β 对 GL 的抑制作用十分敏感, 在 GL 的浓度低至 100 μ g/mL 时, 即可明显抑制 IL-1 β 的合成和释放。随着浓度的升高, GL 的抑制作

用更加明显, 在 GL 的浓度升高至 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 几乎可以拮抗 90% LPS/CF 诱导的 IL-1 β 释放, 而另外一种细胞因子 TNF- α 也有类似的变化, 具体机制有待进一步实验研究。NO 可以透过细胞膜, 过量的 NO 会和超氧化物反应生成毒性更强的过氧化亚硝酸盐, 可以攻击和改变蛋白质、脂质和 DNA 的结构, 同时消耗抗氧化物质。大多数小胶质细胞源性活性氧成分如超氧化物不能透过细胞膜, 就使这些细胞外活性氧不能进入多巴胺能神经元, 启动神经元内毒性级联反应, 但是, 超氧化物可以和 NO 在细胞外间隙反应, 形成更加稳定的氧化物, 透过细胞膜从而损伤邻近神经元。本实验结果显示: 100~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GL 可明显抑制活化的小胶质细胞合成和分泌 NO, 这一作用可能参与了 GL 的神经保护机制。上述所有因子均可激活转录因子 NF- κB , 从而上调凋亡基因导致神经元死亡^[11]。其次, 神经元的损伤也会使更多的小胶质细胞激活, 从而进一步损伤邻近的神经元, 形成神经元不断变性坏死的恶性循环^[12]。

在神经元单独或是神经元-胶质细胞共培养体系中, 鱼藤酮介导的多巴胺能神经元变性必须有小胶质细胞的存在。这种损伤是由激活小胶质细胞释放的超氧化物介导的。在大鼠黑质前区注射 LPS 导致的小胶质细胞和星形胶质细胞激活的模型中, 胶质细胞的激活是神经元损伤的重要介导者。而且, 在小鼠脑内可以通过抑制胶质细胞的激活, 阻断 iNOS 和 IL-1 的生成来减轻 MPTP 诱导的神经损伤^[13]。

大量药理研究表明, GL 对人体免疫系统、神经系统、心血管系统等均有很好的调节作用, 同时具有抗肿瘤、抗衰老等作用。使用 GL 可以提高癌症患者对植物血凝素的有丝分裂活性, 增加 CD3、CD4、CD8 和 CD56 淋巴细胞的数量, 提高血浆 IL-2、IL-6 和 IFN γ 的水平及 NK 细胞活性, 同时降低其 IL-1 和 TNF- α 的水平^[14]。研究表明每天服用 GL 连续 15 天, 可以显著改善衰老大鼠三羧酸循环和线粒体电子传递链复合体 IV 的活性^[15]。这可能与 GL 的抗氧化活性密切相关。

GL 的主要活性成分为灵芝多糖和三萜类物质。灵芝多糖特别是 β -D-葡聚糖可以通过对多种因子的诱生或是促诱生作用, 增强免疫应答, 同时具有抗肿瘤、保护细胞不受自由基损伤或是减少外界环境诱变造成细胞损伤的作用。三萜类物质有抗氧化、保肝、抗高血压、降脂及抗组胺等作用^[16]。本研

究中发挥作用的 GL 活性成分仍需进一步研究。

目前 PD 最有效的对症治疗是 DA 替代治疗, 但是随着疾病进展疗效逐渐降低。治疗热点集中在可以阻止神经元死亡的神经保护性治疗。越来越多的证据表明中药或是中药提取物如绿茶多酚、人参皂甙、银杏叶提取物等有防止多巴胺能神经元变性、减轻症状的作用^[17]。另外, 有研究还表明中药或是中药提取物可以通过发挥其抗氧化、DA 载体抑制剂、单胺氧化酶抑制剂、自由基清除剂、重金属螯合剂、调控细胞生存基因和信号转导、抗凋亡甚至是改善大脑循环等作用促进神经元生存、神经突触生长及益于脑损伤后功能的恢复^[18]。中药有可能成为抗 PD 药物研发的新方向。但与目前 DA 替代治疗和手术治疗缓解 PD 大部分运动症状不同的是, GL 可以抑制小胶质细胞激活从而阻止神经元变性的进程, 但仍需进一步的研究来证实其是否可以有效地治疗 PD。

参考文献

- 1 Maetzler W, Liepelt I, Berg D. Progression of Parkinson's disease in the clinical phase: potential markers. *Lancet Neurol* 2009; 8 (12): 1158-1171.
- 2 Poewe W, Mahlknecht P. The clinical progression of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15 Suppl 4: S28-S32.
- 3 Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 2010; 129(2): 154-169.
- 4 McGeer PL. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988; 38 (8): 1285-1291
- 5 Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 2010; 19; 140(6): 918-934.
- 6 Wu XS (吴秀书), Kong DM. Protective effect of lingzhizongdai against nerve cell damnification. *Modern Med Hyg (现代医药卫生)* 2004; 20(16): 1576-1577 (Chinese, English abstract).
- 7 Gao HM, Hong JS, Zhang W, Liu B. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 2002; 22(3): 782-790.
- 8 Crawford GD Jr, Le WD, Smith RG, Xie WJ, Stefani E, Appel SH. A novel N18TG2 x mesencephalon cell hybrid expresses properties that suggest a dopaminergic cell line of substantia nigra origin. *J Neurosci* 1992; 12(9): 3392-3398.
- 9 Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B. Microglial activation-mediated delayed and progressive de-

- generation of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 2002; 81(6): 1285-1297.
- 10 Taupin V, Renno T, Bourbonniere L, Peterson AC, Rodriguez M, Owens T. Increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, chronic macrophage/microglial reactivity, and demyelination in transgenic mice producing tumor necrosis factor- α in the central nervous system. *Eur J Immunol* 1997; 27(4): 905-913.
- 11 Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12(1): 141-179.
- 12 Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 2005; 76(2): 77-98.
- 13 Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 2002; 22(5): 1763-1771.
- 14 Gao Y, Tang W, Dai X, Gao H, Chen G, Ye J, Chan E, Koh HL, Li X, Zhou S. Effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the immune functions of patients with advanced lung cancer. *J Med Food* 2005; 8(2): 159-168.
- 15 Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnol Annu Rev* 2007; 13: 265-301.
- 16 Ajith TA, Sudheesh NP, Roshny D, Abishek G, Janardhanan KK. Effect of *Ganoderma lucidum* on the activities of mitochondrial dehydrogenases and complex I and II of electron transport chain in the brain of aged rats. *Exp Gerontol* 2009; 44: 219-223.
- 17 Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 1996; 48(1): 1-19.
- 18 Radad K, Gille G, Moldzio R, Saito H, Ishige K, Rausch WD. Ginsenosides Rb1 and Rg1 effects on survival and neurite growth of MPP⁺-affected mesencephalic dopaminergic cells. *J Neural Transm* 2004; 111(1): 37-45.