

柴胡加龙骨牡蛎汤对帕金森病伴发抑郁模型大鼠的神经保护作用及对 AMPK/mTOR 信号通路的影响

刘蔚¹, 曹俊岭¹, 荆志伟², 崔拓拓¹, 尹梦霞², 刘鑫¹, 欧阳竞锋^{2*}

(1. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078;

2. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 医学实验中心, 北京 100700)

【摘要】 目的:观察柴胡加龙骨牡蛎汤(CLMT)对帕金森病伴发抑郁(PDD)模型大鼠多巴胺能神经元的保护作用,并基于腺苷酸活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(AMPK/mTOR)信号通路探讨其作用机制。方法:80只雄性SD大鼠,随机选取10只作为正常组,其余采用长期低剂量颈背部皮下注射鱼藤酮联合慢性不可预见性温和应激(CUM)建立PDD大鼠模型,将造模成功的PDD大鼠随机分为模型组、西药组(多巴丝肼 $0.032\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ +盐酸氟西汀 $0.002\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、CLMT低、中、高剂量组(5、10、20 $\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组10只,正常组和模型组予以等体积生理盐水灌胃,连续4周。旷场实验、爬杆实验评估各组大鼠行为学变化;高效液相色谱法(HPLC)测定脑脊液中多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)含量;苏木素-伊红(HE)染色法观察各组大鼠黑质DA能神经元病理改变;免疫组化法(IHC)检测黑质酪氨酸羟化酶(TH)阳性表达;免疫荧光法(IF)检测黑质 α -突触核蛋白(α -synuclein)表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测纹状体微管相关蛋白1轻链3(LC3)、AMPK、磷酸化AMPK(p-AMPK)、mTOR、磷酸化mTOR(p-mTOR)蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠旷场实验水平运动总距离及中央区域活动时间均明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),爬杆时间明显缩短($P<0.01$),评分升高($P<0.01$),脑脊液中DA、5-HT含量减少($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,CLMT高剂量组和西药组水平运动总距离明显增加及中央区域活动时间均增加($P<0.05$, $P<0.01$),爬杆时间延长($P<0.05$),评分下降($P<0.05$, $P<0.01$),DA及5-HT含量增加($P<0.05$, $P<0.01$)。与正常组比较,模型组大鼠黑质DA能神经元数量明显减少,胞体缩小且排列疏松, α -synuclein荧光表达显著增强($P<0.01$),TH阳性表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,CLMT高剂量组和西药组黑质DA能神经元数量增加,胞体增大, α -synuclein荧光表达明显减弱($P<0.05$, $P<0.01$),TH表达显著增加($P<0.01$)。与正常组比较,模型组纹状体LC3 II/I、p-AMPK/AMPK表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)、p-mTOR/mTOR表达显著增加($P<0.01$);与模型组比较,CLMT高剂量组和西药组LC3 II/I、p-AMPK/AMPK表达均明显增加($P<0.05$, $P<0.01$)、p-mTOR/mTOR表达显著降低($P<0.01$)。结论:CLMT可抑制鱼藤酮神经毒性,发挥神经保护作用,提高DA水平,从而改善帕金森病大鼠抑郁状态,其机制可能与调控AMPK/mTOR信号通路,激活自噬,促进异常聚集的 α -synuclein降解有关。

【关键词】 柴胡加龙骨牡蛎汤; 帕金森病伴发抑郁; 腺苷酸活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(AMPK/mTOR)信号通路; 自噬; 神经保护作用

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R338 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)08-0021-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220838

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220223.0917.001.html>

[网络出版日期] 2022-02-23 18:12

Neuroprotective Effect of Chaihu Jia Longgu Mulitang on Parkinson's Disease with Depression Model Rats and Its Mechanism Based on AMPK/mTOR Signaling Pathway

LIU Wei¹, CAO Jun-ling¹, JING Zhi-wei², CUI Tuo-tuo¹, YIN Meng-xia², LIU Xin¹, OUYANG Jing-feng^{2*}

(1. Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

[收稿日期] 2021-12-24

[基金项目] 国家中医药管理局“全国中医药创新骨干人才”培训项目(国中医药人教函2019-128号);中国中医科学院医学实验中心自选课题项目(ZZ2019002)

[第一作者] 刘蔚,在读硕士,从事中医药防治神经退行性疾病的研究,E-mail:liuwei15732296589@163.com

[通信作者] * 欧阳竞锋,博士,研究员,硕士生导师,从事中医药防治神经退行性疾病的研究,E-mail:springeltics@163.com

2. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, Experimental Research Center,
China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect of Chaihu Jia Longgu Mulitang (CLMT) on dopaminergic neurons in Parkinson's disease with depression (PDD) model rats, and to explore the mechanism based on adenosine monophosphate-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin (AMPK/mTOR) signaling pathway. **Method:** Among the 80 male SD rats, 10 were randomly selected as normal group and the rest were treated with long-term low-dose subcutaneous injection of rotenone in the neck and back combined with chronic unpredictable mild stress (CUMS) to establish PDD rat model. The successfully modeled PDD rats were randomly divided into model group, western medicine group (madopar $0.032 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ +fluoxetine hydrochloride $0.002 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), CLMT low-dose, medium-dose and high-dose groups (5, 10 and $20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 10 rats in each group. Normal group and model group were administrated with the same amount of normal saline by gavage for 4 consecutive weeks. Behavioral changes of rats in each group were evaluated by open field test and pole climbing test. The content of dopamine (DA) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in cerebrospinal fluid was determined by high performance liquid chromatography (HPCL). The pathological changes of dopaminergic neurons in substantia nigra of rats were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The positive expression of tyrosine hydroxylase (TH) and expression of α -synuclein in substantia nigra were detected by immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF), respectively. The protein expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated AMPK (p-AMPK), mammalian target of rapamycin (mTOR) and phosphorylated mTOR (p-mTOR) was detected by Western blot. **Result:** Compared with the conditions in normal group, the total horizontal distance and the activity time in the central region in open field test and the content of DA and 5-HT in cerebrospinal fluid were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the time of pole climbing was shortened ($P<0.01$), with increased score ($P<0.01$) in model group. Compared with model group, CLMT high-dose group and western medicine group increased the total horizontal distance and activity time in the central region and the content of DA and 5-HT ($P<0.05$, $P<0.01$), and extended the time of climbing pole ($P<0.05$), with decreased score ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with those in normal group, the number of dopaminergic neurons in the substantia nigra was reduced, with narrowed and loosely arranged cell body. The fluorescence expression of α -synuclein was enhanced ($P<0.01$), and the positive expression of TH was decreased ($P<0.01$) in model group. Compared with model group, CLMT high-dose group and western medicine group showed elevated number of dopaminergic neurons in the substantia nigra, with enlarged cell body, and decreased fluorescence expression of α -synuclein, and enhanced the positive expression of TH ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with normal group, model group had lowered expression of LC3 II/I, p-AMPK/AMPK in striatum ($P<0.05$, $P<0.01$) and increased expression of p-mTOR/mTOR ($P<0.01$). Compared with those in model group, LC3 II/I and p-AMPK/AMPK expression were increased ($P<0.05$, $P<0.01$) and p-mTOR/mTOR expression was decreased ($P<0.01$) in CLMT high-dose group and western medicine group. **Conclusion:** CLMT exerts a neuroprotective effect by inhibiting rotenone neurotoxicity. It enhances the level of DA, and thus improves the depression condition in rats with Parkinson's disease. The underlying mechanism may be related to the regulation of AMPK/mTOR signaling pathway, activation of autophagy, and promotion of degrading α -synuclein.

[Keywords] Chaihu Jia Longgu Mulitang (CLMT); Parkinson's disease with depression (PDD); adenosine monophosphate-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin (AMPK/mTOR) signaling pathway; autophagy; neuroprotective effect

帕金森病(PD)是一种常见的神经退行性疾病, 除表现为静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势平

衡障碍等运动症状外,往往还伴有一系列非运动症状,抑郁是PD最常见的精神症状之一^[1]。据统计,近40%~50%的PD患者会出现体质量减轻、疲劳、精神萎靡等抑郁样症状^[2]。临床治疗以控制运动症状同时予以抗抑郁药物为主,但多数抗抑郁药物存在锥体外系副作用,可能加重运动症状,长期应用抗PD药物左旋多巴后也会加重抑郁,治疗效果不甚理想^[3-4]。

帕金森病伴发抑郁(PDD)的发病机制目前尚未明确,但有观点认为多巴胺(DA)能神经元的丢失导致的DA异常与该病有关^[5]。有尸检报告显示,PDD患者伴有中脑DA能神经元的广泛丢失,且伴有DA含量异常^[6];此外,深部刺激PD患者黑质临近区域及应用DA受体激动剂不仅能够改善运动功能,亦可改善抑郁症状^[7],提示保护中脑黑质DA能神经元可能有助于改善PD患者的抑郁症状。

柴胡加龙骨牡蛎汤(CLMT)出自张仲景《伤寒论·辨少阳病脉证并治少阳病兼变证篇》第107条,主治“胸满烦惊,小便不利,谵语,一身尽重,不可转侧者”,是和解少阳的经典名方。“胸满烦惊”即胸肺部胀满不适,烦躁,胆小易惊恐,与抑郁症状十分契合;“一身尽重,不可转侧者”表明该方可治疗少阳枢机不利所致的屈伸不利即PD样运动症状。临床应用该方治疗PD伴发的抑郁症状取得了良好疗效^[8-10],基础研究也表明,CLMT可通过调节炎症状态,营养脑神经,促进神经元的修复,发挥神经保护作用而改善抑郁状态^[11-12]。但是目前针对CLMT治疗PDD的基础研究相对较少,且主要从抗炎、抗氧化、抑制凋亡的角度探讨CLMT的神经保护作用,缺少从自噬角度对其进行的相关研究。故本研究通过建立PDD大鼠模型,观察CLMT对PDD大鼠抑郁症状的治疗效果,并从自噬的角度探讨其可能作用机制,为临床CLMT治疗PD抑郁症状提供新的理论依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠80只,体质量(150±10)g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0008。饲养温度(25±1)℃,湿度(50±5)%,自由饮食饮水,自然光照,适应性喂养1周。本实验经由中国中医科学院动物伦理委员会批准,伦理审查编号为ERCCACMS21-2106-7。

1.2 药品与试剂 柴胡加龙骨牡蛎汤(柴胡12 g,生龙骨4.5 g,生牡蛎4.5 g,黄芩4.5 g,人参4.5 g,桂枝4.5 g,茯苓4.5 g,生姜4.5 g,法半夏6 g,大黄6 g,

大枣4.5 g),均为中药免煎颗粒,购自北京中医药大学东直门医院(批号分别为21035241、21032301、21028121、21044771、21044171、21033791、22002371、21039901、21032831、21042111、21033761),研磨后以生理盐水充分溶解,制备成含生药量分别为0.75、1.5、3 g·mL⁻¹的中药混悬液,4℃保存备用;鱼藤酮(陕西清雅生物科技有限公司,批号YTT20200513),以葵花油和二甲基亚砜(DMSO)充分溶解,制备成2 g·L⁻¹混悬液,4℃避光保存;多巴丝肼片(上海罗氏制药有限公司,批号SH4750),充分研磨成粉状后以生理盐水溶解,制备成8 g·L⁻¹混悬液,现用现配;盐酸氟西汀胶囊(苏州礼来苏州制药有限公司,批号9875A),以生理盐水充分溶解,制备成0.5 g·L⁻¹混悬液备用;苏木素、伊红染色液(北京九州柏林生物科技有限公司,批号分别为20210628、20210308);多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)(美国Aglient公司,批号分别为BCBC7614V、BCCB1831);酪氨酸羟化酶(TH)抗体、 α -突触核蛋白(α -synuclein)抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、Alexa Fluor 488标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)抗体、强效RIPA裂解液,蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物、BCA蛋白浓度测定试剂盒、5×十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为AF2185、AF8019、AF5003、A0423、P0013B、P1046、P0010、P0015L);微管相关蛋白1轻链3(LC3)A/B抗体、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)抗体、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抗体、磷酸化mTOR(p-mTOR)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab62721、ab110036、ab32028、ab137133);磷酸化AMPK(p-AMPK)抗体(美国CST公司,批号2537);免疫组化兔二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司,批号PV-9001);SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、牛血清白蛋白(BSA)、1×TBST(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为P1200、A8020、T1086);超敏ECL化学发光检测试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠IgG(H+L)、HRP标记山羊抗兔IgG(H+L)(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为PK10003、SA00001-1、SA00001-2);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(德国Millipore公司,批号IPVH00010)。

1.3 仪器 CS-Q2型旷场实验分析系统(日本Canon公司);ExionLC-20AC型高效液相色谱仪(美国AB Sciex公司);S2100型溶剂输送系统、S5200

型自动进样器和 Clarity 色谱工作站(德国 Sykam 公司);Rotanta 460R 型高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司);TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂);VS120-S6-W 型数字切片扫描系统(日本 Olympus 公司);SK-0180-E 型水平摇床(北京大龙兴创实验仪器有限公司);Synergy H1 型全自动酶标仪(美国 BioTek 公司);Chemi Doc Imaging System 多功能成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 PDD 模型制备 80 只雄性 SD 大鼠,随机选取 10 只作为正常组,其余大鼠均予以颈背部皮下注射鱼藤酮($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),连续 6 周,同时予以 21 d 慢性不可预知性温和应激刺激:冰水游泳($4 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min),夹尾(距尾根 1 cm, 3 min),禁食(24 h),禁水(24 h),昼夜颠倒(持续黑暗 12 h,持续光照 12 h),倾斜鼠笼(45° , 20 min),潮湿垫料(24 h)。每日随机安排上述 1 种刺激,且相邻 2 d 刺激不重复,使大鼠不可预见刺激的发生,连续 21 d。造模结束后参照文献[13]对各组大鼠进行评分:1 分,出现拒捕表现减弱、毛发变黄变脏发硬呈扇形、弓背抬高及主动活动轻度减少;2 分,在有 1 分症状基础上,大鼠自主活动明显减少、行为缓慢,伴有肌张力增高震颤,或平衡力减弱;4 分,在有 2 分的症状基础上,平衡力进一步减弱,甚或走直线困难,或前进时呈往一侧偏转状;6 分,在有 4 分症状基础上,大鼠行步时卧向单侧,单侧两肢基本无力站立,瘫软,主动前进表现减少,行进艰难,进食减少;8 分,在有 6 分症状基础上,单侧两肢完全无法站立,卧向一侧,四肢肌张力增高,无法行进,进食停止;10 分,综合以上症状,完全瘫痪,体质量大幅度降低,濒临死亡或死亡。2 分以上为造模成功,并选取 2~8 分的大鼠进行后续实验。

2.2 分组及给药 将造模成功的 50 只大鼠随机分为模型组、多巴丝肼+盐酸氟西汀组(西药组)、CLMT 低、中、高剂量组,每组 10 只。参照文献[14]研究方法,CLMT 以成人(60 kg)临床等效剂量的 10 倍计算中剂量,CLMT 低、中、高组给药剂量分别为 5、10、20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,西药组按照成人等效剂量系数折算法计算给药剂量:多巴丝肼 $0.032 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ +盐酸氟西汀 $0.002 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,分别予以相应药物灌胃,正常组和模型组予以等体积生理盐水灌胃,连续 4 周。

2.3 行为学检测

2.3.1 旷场实验 分组给药前、后分别将各组大鼠置于动物行为分析装置的正中格内,采用旷场实验分析系统记录 5 min 内大鼠的水平运动总距离及中

央区域活动时间。

2.3.2 爬杆实验 依据文献[15]中方法制备直径为 3 mm、高 760 mm 的木杆。分组给药前、后垂直竖立木杆,将大鼠头部向下放置在木杆顶部,使其沿杆自然爬下,记录大鼠爬至木杆底部的时间,并进行行为评分。评分标准:0 分,四肢并用,一次顺利从杆上爬下;0.5 分,一步一步螺旋向下爬行,但兼有后肢滑行行为;1 分,上杆后停顿数次后爬下,但可抱紧木杆;1.5 分,滑行后滑落,伴轻微震颤;2 分,频繁性震颤,四肢僵直,不能抓杆,直接掉落;2.5 分,大鼠出现连续震颤,四肢麻痹,不能活动或死亡。每只大鼠进行 3 次实验,取平均值。

2.4 高效液相色谱法(HPLC)检测大鼠脑脊液中 DA、5-HT 含量 大鼠麻醉后进行固定,从枕骨大孔处缓慢抽取脑脊液,并取适量脑脊液上清进行测定,配制混合对照品系列溶液及系列工作溶液并绘制标准曲线,根据标准曲线计算各样本中的递质浓度,并根据稀释倍数折算。检测条件如下,流动相为水-甲醇 90:10(含 $0.74 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 辛烷磺酸钠、 $80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二水合磷酸二氢钠、 $0.027 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸二钠和 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钾),磷酸调 pH 3.0, Waters X Select[®] HSS T3 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 2.5 μm), $0.20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 等度洗脱,柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$; Antec Decade II SDC 电化学检测器, VT-03 玻璃碳工作电极(直径 3 mm),原位银/氯化银参比电极, 25 μm 电极垫片,柱前连有 ADF 滤波器(0.05 Hz)和脉冲阻尼器,工作电压 +0.56 V,测量时间 15 min,样品 20 μL 进样分析。

2.5 苏木素-伊红(HE)染色法检测黑质致密部 DA 能神经元病理学改变 脑组织经 4% 多聚甲醛灌注固定后脱水,石蜡包埋,连续切取冠状位中脑黑质致密部脑片(厚 6 μm),进行 HE 染色,中性树脂封片,光镜下观察并拍照。

2.6 免疫荧光法(IF)检测黑质致密部 α -synuclein 的表达情况 切取中脑黑质致密部脑片(厚 6 μm),柠檬酸钠高压抗原修复, TBS+Triton 洗涤,阻断内源性过氧化物酶, 1% BSA 封闭,洗涤,稀释后的兔抗 α -synuclein 多克隆抗体(1:100) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,洗涤,稀释后的 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 荧光二抗(1:250)室温避光孵育,洗涤, DAPI 复染,封片,荧光显微镜下观察并拍照。

2.7 免疫组化法(IHC)检测黑质致密部 TH 的表达情况 取黑质致密部脑组织石蜡切片(厚 6 μm),抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,封闭,稀释后的兔

抗TH单克隆抗体(1:200)4℃孵育过夜,洗涤,滴加反应增强剂(HRP标记链亲合素),洗涤,山羊抗兔生物素化二抗室温孵育,TBS洗涤,DAB显色,苏木素复染,脱水,中性树脂封片。高倍光镜下观察并拍照,各切片随机选取3个视野($\times 200$),应用Image J软件计算平均积分吸光度AA。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠纹状体LC3、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR蛋白表达 取适量大鼠新鲜纹状体组织进行匀浆,4℃、12 000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径9.49 cm),提取总蛋白,BCA法蛋白定量,按体积比4:1加入蛋白上样缓冲液,金属浴加热3 min变性备用;各组取蛋白30 μg进行SDS-PAGE凝胶电泳,湿转至PVDF膜,室温封闭60 min;一抗孵育,LC3、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR(1:1 000)、β-actin(1:4 000),4℃摇床过夜;TBST洗膜3次,HRP标记羊抗兔抗体IgG(1:2 500)、HRP标记羊抗小鼠抗体IgG(1:5 000)室

温孵育1 h,TBST洗膜3次,进行增强化学发光显影(ECL),应用Image J软件分析目的蛋白条带灰度值。

2.9 统计学分析 应用SPSS 20.0软件对本实验数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间数据符合正态分布且满足方差齐性检验则采用单因素方差分析,组间多重比较采用最小显著性差异法(LSD);若不符合则采用多个独立样本的非参数检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对PDD大鼠行为学的影响 与正常组比较,模型组大鼠水平运动总距离及中央区域活动均显著减少($P < 0.01$),爬杆时间均显著缩短($P < 0.01$),爬杆评分显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,CLDM中、高剂量组及西药组大鼠水平运动总距离、中央区域活动时间、爬杆时间均明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),评分明显下降($P < 0.05$)。见表1。

表1 CLMT对PDD大鼠行为学的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of CLMT on behavior of PDD rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 旷场实验 | | 爬杆实验 | |
|----------|-----------------------|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | 水平运动总距离/mm | 中央区域活动时间/s | 爬杆时间/s | 爬杆评分/分 |
| 正常组 | | 29 073.41±1 204.35 | 37.02±32.49 | 13.60±2.52 | 0 |
| 模型组 | | 3 738.50±483.15 ²⁾ | 5.26±2.07 ²⁾ | 4.50±0.96 ²⁾ | 1.83±0.11 ²⁾ |
| CLMT低剂量组 | 5 | 8 966.24±2 882.13 | 6.65±2.23 ¹⁾ | 4.75±0.62 | 1.50±0.13 |
| CLMT中剂量组 | 10 | 11 834.83±2 204.50 ³⁾ | 10.39±1.90 | 5.57±0.69 | 1.43±0.13 ³⁾ |
| CLMT高剂量组 | 20 | 16 449.11±2 062.07 ⁴⁾ | 22.86±13.64 ³⁾ | 8.43±0.81 ³⁾ | 1.36±0.14 ³⁾ |
| 西药组 | 0.032±0.002 | 19 649.01±3 649.52 ⁴⁾ | 30.17±30.52 ³⁾ | 11.00±3.21 ³⁾ | 1.00±0.29 ⁴⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2-表5同)

3.2 对PDD大鼠脑脊液DA、5-HT含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠脑脊液中DA、5-HT含量均明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,CLMT高剂量组及西药组DA、5-HT含量均明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表2。

表2 CLMT对PDD大鼠脑脊液DA、5-HT含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of CLMT on content of DA and 5-HT in cerebrospinal fluid of PDD rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

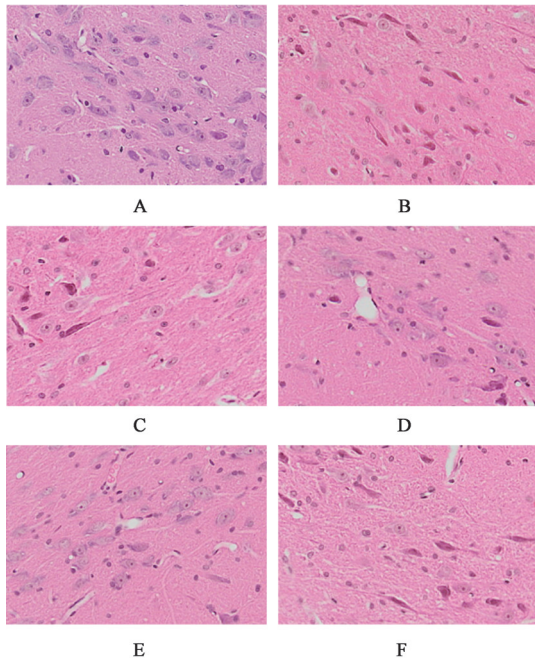
| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | DA | 5-HT |
|----------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| 正常组 | | 109.90±61.85 | 175.97±61.68 |
| 模型组 | | 20.82±2.05 ²⁾ | 32.22±13.06 ¹⁾ |
| CLMT低剂量组 | 5 | 28.01±8.48 ¹⁾ | 60.42±19.34 |
| CLMT中剂量组 | 10 | 45.98±22.66 | 173.78±27.98 ³⁾ |
| CLMT高剂量组 | 20 | 81.15±59.06 ³⁾ | 195.95±31.23 ⁴⁾ |
| 西药组 | 0.032±0.002 | 143.04±95.36 ⁴⁾ | 208.95±29.83 ⁴⁾ |

3.3 对PDD大鼠黑质致密部病理形态改变的影响

与正常组比较,模型组神经元数量明显减少,且胞体明显缩小,边界模糊,排列疏松,但并未观察到典型的路易小体;与模型组比较,CLMT各组DA能神经元数量逐渐增多,胞体有所增大,高剂量组神经元数量明显增加,且排列趋于整齐,西药组DA能神经元数量及形态改善不明显。见图1。

3.4 对PDD大鼠黑质致密部α-synuclein表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠黑质致密部α-synuclein荧光表达显著增强($P < 0.01$);与模型组比较,CLMT低、中剂量组差异均无统计学意义,CLMT高剂量组和西药组荧光强度均明显减弱($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表3、图2。

3.5 对PDD大鼠黑质致密部TH表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠TH阳性表达显著减少($P <$



注: A. 正常组; B. 模型组; C. CLMT低剂量组; D. CLMT中剂量组; E. CLMT高剂量组; F. 西药组(图2-图4同)

图1 CLMT对PDD大鼠黑质致密部病理形态改变的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of CLMT on pathological morphologic changes of substantia nigra compact in PDD rats (HE, ×200)

0.01);与模型组比较,CLMT各剂量组TH阳性表达均有所增加,CLMT高剂量组和西药组均增加显著($P < 0.01$)。见图3、表4。

3.6 对PDD大鼠纹状体LC3、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组LC3 II/I、p-AMPK/AMPK表达均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), p-mTOR/mTOR显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,CLMT高剂量组和西药组LC3 II/I表达明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$), CLMT

表3 CLMT对PDD大鼠黑质致密部 α -synuclein表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of CLMT on expression of α -synuclein in substantia nigra compact of PDD rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | α -synuclein |
|----------|-------------------------------------|---------------------------|
| 正常组 | | 18.12±2.88 |
| 模型组 | | 151.69±6.03 ²⁾ |
| CLMT低剂量组 | 5 | 134.62±14.08 |
| CLMT中剂量组 | 10 | 95.45±8.65 |
| CLMT高剂量组 | 20 | 48.93±2.08 ³⁾ |
| 西药组 | 0.032±0.002 | 41.81±4.86 ⁴⁾ |

低、中剂量组表达虽有增加,但差异无统计学意义,除CLMT低剂量组外,各组p-AMPK/AMPK表达均显著增加($P < 0.01$), CLMT高剂量组和西药组p-mTOR/mTOR表达均显著降低($P < 0.01$), CLMT低、中剂量组p-mTOR/mTOR表达降低,但差异无统计学意义。见图4、表5。

4 讨论

PD是继阿尔茨海默症的第二大神经退行性疾病,流行病学调查显示,目前全世界PD患者人数已高达600万,其中60岁以上人群患该病比例约为1%^[16]。据估计,至2030年我国PD患病人数可能达到500万人^[17]。抑郁作为PD常见的非运动症状之一,常与PD的主要症状或药物副作用相互重叠,临床漏诊、误诊率较高。中医学认为PDD为“颤证”与“郁证”之合病,是少阳枢机不利,肝胆失和所致^[18]。肝气郁滞,胆气不舒,易致气郁、痰凝、血瘀。痰瘀互结,气血津液输布失常,筋脉失养,屈伸不利则发为颤证;肝失疏泄,气机不畅,情志失常则发为郁证,治疗宜和解少阳,肝胆同治。CLMT作为和解少阳的经典柴胡剂,以柴芩为君,柴胡善达少阳之木

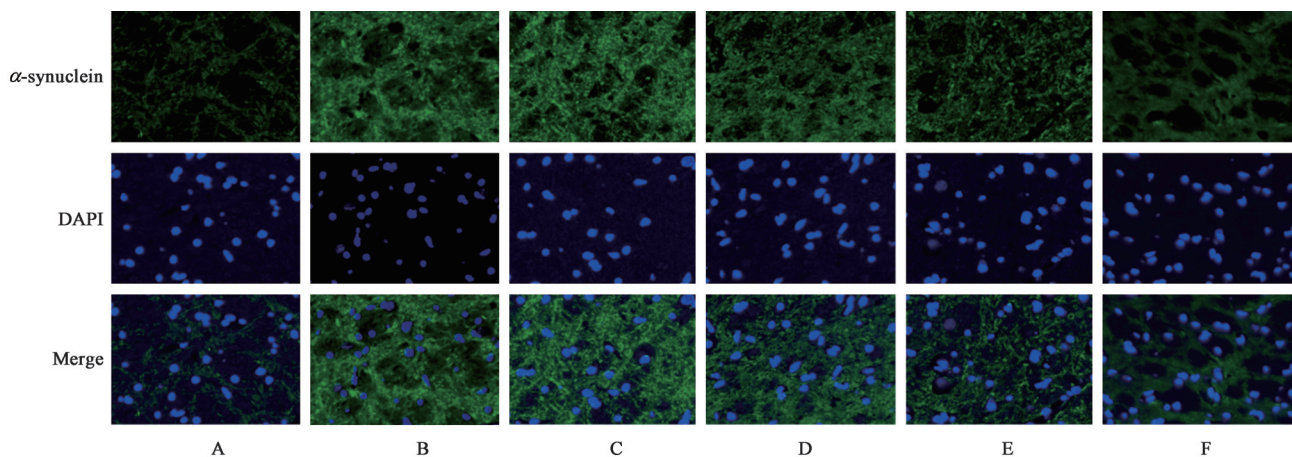


图2 CLMT对PDD大鼠黑质致密部 α -synuclein表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 2 Effect of CLMT on expression of α -synuclein in substantia nigra compact of PDD rats (IF, ×200)

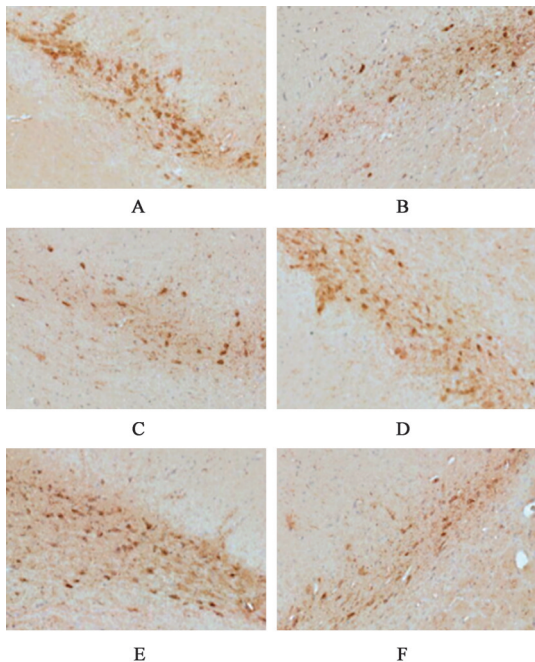


图3 CLMT对PDD大鼠黑质致密部TH表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 3 Effect of CLMT on TH expression in substantia nigra compactus of PDD rats (IHC, ×200)

表4 CLMT对PDD大鼠黑质致密部TH表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of CLMT on TH expression in substantia nigra compactus of PDD rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | TH |
|----------|-----------------------|--------------------------|
| 正常组 | | 15.89±2.06 |
| 模型组 | | 1.77±0.22 ²⁾ |
| CLMT低剂量组 | 5 | 2.06±0.19 |
| CLMT中剂量组 | 10 | 7.15±0.21 |
| CLMT高剂量组 | 20 | 9.56±0.19 ⁴⁾ |
| 西药组 | 0.032±0.002 | 11.23±0.52 ⁴⁾ |

气,解少阳之气郁,配以黄芩苦寒,清解少阳郁热,调畅气机,气血津液输布如常;以龙骨、牡蛎为臣,化痰镇静,宁心安神;佐以半夏、生姜化痰和胃,人参、茯苓健脾渗湿兼宁心,桂枝通阳化气以消痰饮,兼解少阳郁结,配以小剂量大黄疏导少阳郁火下行。全方可共奏疏肝顺气、燮理阴阳之功,使筋脉得舒,情志调畅,是治疗PDD的良方。

DA是协调运动、调控情绪的重要神经递质,中脑黑质致密部DA能神经元变性凋亡导致的DA耗竭是PD的发病基础,也是伴发抑郁症状的重要因素。PD患者和抑郁症患者均伴有DA水平的异常,应用DA受体激动剂如普拉克索则可改善抑郁症状^[19-20]。DA、5-HT等单胺类神经递质与抑郁的发病密切相关,常作为评价抑郁的指标^[21-22]。本研究

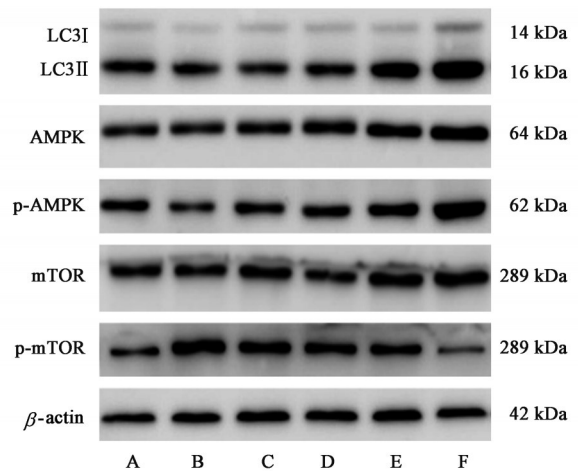


图4 各组PDD大鼠纹状体中LC3、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of LC3, AMPK, p-AMPK, mTOR and p-mTOR proteins in striatum of PDD rats in each group

表5 CLMT对PDD大鼠纹状体中LC3、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of CLMT on expression of LC3, AMPK, p-AMPK, mTOR and p-mTOR proteins in striatum of PDD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | LC3 II / I | p-AMPK / AMPK | p-mTOR / mTOR |
|----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常组 | | 1.46±0.04 | 1.12±0.09 | 0.50±0.06 |
| 模型组 | | 0.87±0.02 ¹⁾ | 0.55±0.13 ²⁾ | 1.60±0.30 ²⁾ |
| CLMT低剂量组 | 5 | 0.90±0.13 | 0.63±0.11 | 1.12±0.08 |
| CLMT中剂量组 | 10 | 1.14±0.24 | 0.84±0.11 ⁴⁾ | 1.08±0.10 |
| CLMT高剂量组 | 20 | 1.53±0.17 ³⁾ | 1.07±0.11 ⁴⁾ | 0.58±0.02 ⁴⁾ |
| 西药组 | 0.032±0.002 | 1.63±0.25 ⁴⁾ | 1.30±0.18 ⁴⁾ | 0.40±0.06 ⁴⁾ |

发现,PDD模型大鼠脑脊液中DA、5-HT含量均明显降低,而CLMT高剂量组可有效提高DA、5-HT水平。CLMT还可使PDD大鼠的自发活动(水平运动总距离)和探索行为(中央区域活动时间)增加,使爬杆时间延长,评分增加,有效改善其抑郁行为和运动障碍,其中CLMT高剂量组改善效果较低、中剂量组更为显著。另有研究表明,CLMT中的单体成分可发挥神经保护作用,如柴胡皂苷可对MPP+诱导的PD细胞模型发挥抗凋亡作用^[23];黄芩苷可缓解氧化应激反应,减少PD小鼠TH细胞的丢失,提高纹状体DA含量,减轻脑损伤^[24];人参皂苷可有效预防MPTP诱导的PD小鼠黑质DA神经元的凋亡与丢失等^[25]。由此推测CLMT可能通过神经保护作用,减少DA能神经元的丢失,提高DA水平而改善PD的抑郁症状。

中脑黑质 α -synuclein的异常聚集是导致黑质致密部DA能神经元变性凋亡,诱发PD的重要发病

机制。 α -synuclein异常聚集或过表达时可错误折叠成纤维状寡聚体,产生神经毒性^[26]。鱼藤酮是建立PD模型的常用药物,采用长期低剂量颈背部皮下注射鱼藤酮的方法可诱导 α -synuclein的异常聚集,高度选择性地损伤中脑黑质,造成DA能神经元的变性、丢失^[27-28]。本课题组前期应用鱼藤酮作用于SH-SY5Y细胞,观察到 α -synuclein蛋白的异常聚集,成功建立了PD体外模型^[29]。TH是DA合成的限速酶,其功能的缺失或表达不足直接影响DA的合成与分泌,常作为脑内DA能神经元的标志蛋白^[30]。本研究发现,PDD大鼠中脑黑质致密部TH阳性表达明显减少,且 α -synuclein荧光表达明显增强,这与李亚楠等^[31]采用该方法建立PD模型得到的实验结果相一致。中脑黑质DA能神经元数量减少,胞体皱缩,边界模糊等病理形态的改变也进一步证实,该方法可成功诱导PD病理特征改变。相较于模型组,CLMT各组黑质致密部TH阳性表达均有所增加, α -synuclein荧光表达减弱,DA能神经元数量增加,排列趋于紧密,其中CLMT高剂量组作用效果更为明显。

通过调控AMPK/mTOR信号通路激活自噬途径,促进 α -synuclein聚集体的降解,可能是CLMT抑制鱼藤酮神经毒性,保护DA能神经元的机制。自噬是由溶酶体介导的分解代谢过程,可将细胞中受损的细胞器及大分子进行降解并循环利用, α -synuclein蛋白的异常聚集往往与机体自噬水平下调有关。LC3是自噬过程中的关键蛋白,以LC3 I、LC3 II两种形式存在于细胞中,LC3 I被Atg7激活后可转变成LC3 II,并结合到自噬体膜上,成为自噬体膜上的标记蛋白,常用Western blot测定LC3 II/I来评价细胞自噬活性的高低^[32]。本研究发现,PDD大鼠纹状体中LC3 II/I表达明显降低,表明黑质中 α -synuclein的异常聚集可能与自噬水平下调有关。而CLMT高剂量组LC3 II/I表达较模型组显著增加,且黑质致密部 α -synuclein的荧光表达明显降低,提示CLMT可能激活自噬,促进 α -synuclein聚集体的降解。自噬过程受到一系列复杂信号分子和通路的调控,其中AMPK/mTOR信号通路是机体重要的自噬通路之一,研究表明,该信号通路对自噬水平的调控在PDD的发病进程中有重要作用^[33]。AMPK是一个敏感的能量信号分子,其磷酸化后可正向调控自噬过程。mTOR是AMPK下游重要信号分子之一,参与细胞的增殖、凋亡等过程。AMPK被激活后可抑制mTOR相关位点

(S2481)的磷酸化,mTOR活性降低,抑制其下游信号通路,从而激活或增强自噬活性^[34-35]。本研究发现,PDD大鼠p-AMPK/AMPK表达显著降低,p-mTOR/mTOR表达增加,且LC3 II/I降低,说明自噬活动被抑制。CLMT高剂量组LC3 II/I及p-AMPK/AMPK表达较模型组均有所增加,p-mTOR/mTOR表达明显降低,表明CLMT可激活AMPK(Ser485),抑制其下游mTOR磷酸位点(S2481)的活化,从而激活自噬,促进异常 α -synuclein的降解,降低对DA能神经元的损伤,而CLMT高剂量组激活自噬、保护神经元的作用明显强于低、中剂量组。

综上所述,CLMT可能通过调控AMPK/mTOR信号通路激活自噬,促进 α -synuclein聚集体降解,从而降低鱼藤酮的神经毒性,保护中脑黑质DA能神经元,提高DA水平,缓解PD抑郁症状。但PD的运动症状和抑郁症状往往同时出现,二者之间的相互影响及作用机制仍有待研究。此外PDD的发病涉及脑区多条信号传导通路和多种神经递质,中脑黑质病变导致的其他脑区生理功能的改变对PD抑郁症状的影响仍有待进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] HUI P, YANG J, WANG J, et al. Association between 5-hydroxytryptamine gene polymorphism rs140700 and primary insomnia in Chinese population[J]. Intern Med J, 2021, 51(5): 732-738.
- [2] GALTS C, BETTIO L, JEWETT D C, et al. Depression in neurodegenerative diseases: Common mechanisms and current treatment options [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2019, 102: 56-84.
- [3] 陈生弟. 帕金森病伴发抑郁症状的诊断及治疗[J]. 中华老年医学杂志, 2018, 37(4): 372-376.
- [4] MARSH L. Depression and Parkinson's disease: Current knowledge [J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2013, 13(12): 409.
- [5] 但小娟, 陈彪. 帕金森病抑郁研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2012, 14(8): 889-891.
- [6] 肖卫民, 徐立, 陈仰昆. 帕金森病伴发抑郁的机制[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2011, 37(3): 189-191.
- [7] 钱卓磊, 李文涛. 止颤汤合柴胡加龙骨牡蛎汤化裁治疗帕金森病合并抑郁的临床疗效[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(22): 5683-5685.
- [8] 秦劭晨, 王爱梅, 李若瑜, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对帕金森抑郁患者血清代谢组学的影响[J]. 中国中医药

- 科技, 2021, 28(2): 180-183.
- [9] 梁敏琴, 杨楠. 柴胡加龙骨牡蛎汤治疗帕金森病非运动症状的方证对应探讨[J]. 中医杂志, 2018, 59(24): 2148-2150, 2154.
- [10] 涂燕芬, 蔡晶, 郭进财. 柴胡加龙骨牡蛎汤治疗帕金森病伴发抑郁34例[J]. 光明中医, 2017, 32(4): 520-523.
- [11] 王钦, 蔡萧君, 李宇, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对慢性应激抑郁大鼠海马BDNF/TrkB/CREB通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21): 37-46.
- [12] 李凡, 肖波飞, 宋敏, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤加减通过p38 MAPK通路改善CKD小鼠PFC突触可塑性及抑郁行为研究[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(6): 878-885.
- [13] 陈忻, 张楠, 赵晖, 等. 鱼藤酮致帕金森病大鼠行为学与黑质病理损伤的关系[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2008(4): 232-234.
- [14] 王海明, 杨明会, 李绍旦, 等. 补肾活血饮对帕金森病伴发抑郁模型大鼠行为学及脑内5-HT、NE及NPY的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(11): 1345-1350.
- [15] 田新红, 徐玉英, 郝莉. 丹参酮II_A对帕金森病大鼠多巴胺能神经元的作用[J]. 解剖学杂志, 2018, 41(3): 303-306.
- [16] NICHOLS E, GIUSSANI G. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(5): 459-480.
- [17] LI G, MA J, CUI S, et al. Parkinson's disease in China: A forty-year growing track of bedside work [J]. *Transl Neurodegener*, 2019, 8: 22.
- [18] 赵志勇, 谢道俊. 帕金森病伴发抑郁的中西医结合研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2012, 24(11): 1117-1119.
- [19] MARINUS J, ZHU K, MARRAS C, et al. Risk factors for non-motor symptoms in Parkinson's disease [J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17(6): 559-568.
- [20] VRIEND C, RAIJMAKERS P, VELTMAN D J, et al. Depressive symptoms in Parkinson's disease are related to reduced [¹²³I] FP-CIT binding in the caudate nucleus [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2014, 85(2): 159-164.
- [21] 张欢润, 岳广欣, 梁媛, 等. 逍遥散对慢性轻度不可预见应激抑郁大鼠中枢多巴胺及其受体的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(11): 1725-1730.
- [22] 孟霜, 冯振宇, 马小娟, 等. 温阳解郁颗粒对抑郁模型大鼠行为学和血清中单胺类神经递质水平的影响[J]. 中国药房, 2019, 30(23): 3226-3231.
- [23] 杨军, 张贵斌, 陈冬娟. 柴胡皂甙-D通过调节SIRT3对MPP⁺诱导的SH-SY5Y细胞模型的神经保护作用[J]. 湖北医药学院学报, 2018, 37(1): 29-34.
- [24] 李爱英, 王辉明, 章政, 等. 黄芩苷对MPTP致帕金森病模型小鼠行为能力影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2016, 52(1): 46-48.
- [25] 王淑秀, 常海敏, 朱丰霞, 等. 人参皂苷Rg1对帕金森病小鼠黑质多巴胺能神经元凋亡及EphB1、TH、P-c-Jun蛋白表达的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2015, 50(2): 176-180.
- [26] PENG C, TROJANOWSKI J Q, LEE V M. Protein transmission in neurodegenerative disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2020, 16(4): 199-212.
- [27] BETARBET R, SHERER T B, MACKENZIE G, et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease [J]. *Nat Neurosci*, 2000, 3(12): 1301-1306.
- [28] 常宇涛, 罗晓光, 任艳. 鱼藤酮损伤大鼠黑质至行为学及黑质多巴胺能神经元损伤[J]. 解剖科学进展, 2011, 17(1): 60-62.
- [29] 张旭帆. 鹿茸多肽对鱼藤酮致SH-SY5Y细胞损伤的保护作用及其机理研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [30] 董小林, 战丽萍, 邹刚, 等. 重组慢病毒携带酪氨酸羟化酶对大鼠帕金森病模型的干预研究[J]. 中国全科医学, 2018, 21(8): 933-939.
- [31] 李亚楠, 马骏, 余沛豪, 等. 鱼藤酮帕金森病模型的建立与评价[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(3): 175-179.
- [32] ISSA A R, SUN J, PETITGAS C, et al. The lysosomal membrane protein LAMP2A promotes autophagic flux and prevents SNCA-induced Parkinson disease-like symptoms in the Drosophila brain [J]. *Autophagy*, 2018, 14(11): 1898-1910.
- [33] REN Z L, WANG C D, WANG T, et al. Ganoderma lucidum extract ameliorates MPTP-induced parkinsonism and protects dopaminergic neurons from oxidative stress via regulating mitochondrial function, autophagy, and apoptosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(4): 441-450.
- [34] WU A G, ZENG W, WONG V K, et al. Hederagenin and α -hederin promote degradation of proteins in neurodegenerative diseases and improve motor deficits in MPTP-mice [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 115: 25-44.
- [35] CHEN P, WANG Y, CHEN L, et al. Apelin-13 protects dopaminergic neurons against rotenone-induced neurotoxicity through the AMPK/mTOR/ULK-1 mediated autophagy activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8376.

[责任编辑 孙丛丛]