

健脾益肺方对肌萎缩侧索硬化 hSOD1-G93A 转基因小鼠脊髓 p38 MAPK 蛋白及炎症因子表达的影响

潘显梅¹, 杨碧莹², 杜宝新^{2*}, 郑瑜², 李惠珍¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广东省中医院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**探讨健脾益肺方对 hSOD1-G93A 转基因小鼠 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 蛋白及炎症因子表达的影响。**方法:**将 24 只 8 周龄的 SPF 级 hSOD1-G93A 转基因小鼠随机分为模型组、健脾益肺方 (2.86, 5.72, 11.44 g·kg⁻¹) 组, 每组 6 只。8 周龄 SPF 级同窝出生正常野生型小鼠 6 只作为正常组。模型组和正常组予生理盐水灌胃, 药物组予不同剂量的中药灌胃, 每日 1 次, 共 120 d。用免疫荧光法 (immunofluorescence) 检测小鼠脊髓小胶质细胞的活化情况, p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白的荧光强度核浆比, 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测小鼠脊髓 p38 MAPK, p-p38 MAPK, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及环氧合酶-2 (COX-2) 蛋白的表达。**结果:**与正常组比较, 模型组、健脾益肺方 (2.86 g·kg⁻¹) 组小胶质细胞激活数明显增多 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), p38 MAPK, p-p38 MAPK 荧光强度核浆比显著升高 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 健脾益肺方 (5.72, 11.44 g·kg⁻¹) 组小胶质细胞激活数及所占总数比例显著减少 ($P < 0.01$), p38 MAPK, p-p38 MAPK 荧光强度核浆比显著下降 ($P < 0.01$); 与正常组比较, 模型组、健脾益肺方 (2.86 g·kg⁻¹) 组 p38 MAPK, p-p38 MAPK, COX-2, TNF- α 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 与模型组相比, 健脾益肺方 (5.72, 11.44 g·kg⁻¹) 组 p38 MAPK, p-p38 MAPK, COX-2, TNF- α 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。**结论:**健脾益肺方可能通过介导 p38 MAPK 通路抑制 p38 MAPK 蛋白磷酸化, 以浓度依赖性抑制小胶质细胞的活化, 下调 p38 MAPK 蛋白及炎症因子的表达, 从而发挥神经保护作用。

[关键词] 健脾益肺方; hSOD1-G93A 转基因小鼠; 炎症因子; p38 丝裂原活化蛋白激酶

[中图分类号] R22; R242; R273; R285.5; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)15-0155-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181317

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.0905.006.html>

[网络出版时间] 2018-04-12 9:58

Effect of Jianpi Yifei Prescription on p38 MAPK Protein and Inflammatory Factors Expression in Spinal Cord of ALS hSOD1-G93A Transgenic Mice

PAN Xian-mei¹, YANG Bi-ying², DU Bao-xin^{2*}, ZHENG Yu², LI Hui-zhen¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Province Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Jianpi Yifei prescription on p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) protein and inflammatory factors expression in hSOD1-G93A transgenic mice. **Method:** Twenty-four SPF class 8 weeks old hSOD1-G93A transgenic mice were randomly divided into model group, low concentration Jianpi Yifei prescription group (2.86 g·kg⁻¹), medium concentration Jianpi Yifei prescription group (5.72 g·kg⁻¹), and high concentration Jianpi Yifei prescription group (11.44 g·kg⁻¹), $n = 6$ in each group. 6 normal SPF class wild mice of 8 weeks old were selected as normal group. The mice in model

[收稿日期] 20171030(029)

[基金项目] 广东省中医药局科研项目(20161080);广东省中医院中医药科学技术研究专项(YN2014PJ06)

[第一作者] 潘显梅,在读硕士,从事中西医结合诊治神经系统疾病研究, Tel:020-39318490, E-mail:499190864@qq.com

[通信作者] *杜宝新,硕士,主任医师,从事肌萎缩侧索硬化症基础与临床研究, Tel:020-39318491, E-mail:dbx.dr@163.com

group and normal group were given with normal saline, while different concentrations of Jianpi Yifei prescription was given in the treatment groups once a day, for continuously 120 days. The activation of spinal cord microglia, p38 MAPK and p-p38 MAPK protein fluorescence intensity karyoplasmic ratio were detected by immunofluorescence (IF), and Western blot (WB) was used to detect the protein expression levels of p38 MAPK, p-p38 MAPK, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and cyclooxygenase-2 (COX-2). **Result:** As compared with normal group, the activation number of microglia was increased significantly in model group and the low concentration Jianpi Yifei prescription group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the fluorescence intensity karyoplasmic ratio of p38 MAPK and p-p38 MAPK was increased significantly ($P < 0.01$). As compared with model group, the number of microglia activation and the proportion of the total number was significantly reduced in the medium and high concentration Jianpi Yifei prescription groups ($P < 0.01$); and the fluorescence intensity karyoplasmic ratio of p38 MAPK and p-p38 MAPK was significantly reduced ($P < 0.01$). As compared with normal group, the protein expression levels of p38 MAPK, p-p38 MAPK, COX-2, and TNF- α were significantly increased in model group and the low concentration Jianpi Yifei prescription group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with model group, the protein expression levels of p38 MAPK, p-p38 MAPK, COX-2, and TNF- α were significantly reduced in the high, medium concentration Jianpi Yifei prescription groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Jianpi Yifei prescription may inhibit p38 MAPK protein phosphorylation by mediating p38 MAPK pathway, and plays a neuroprotective role through inhibiting the activation of microglia in a concentration-dependent manner and down-regulating the expression of p38 MAPK protein and inflammatory factors.

[**Key words**] Jianpi Yifei prescription; hSOD1-G93A transgenic mouse; inflammatory factors; p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)

肌萎缩侧索硬化(ALS)是累及上下运动神经元的进展性、致死性神经系统变性疾病,患者平均存活期为3~5年,其发病机制至今未明,目前西医尚无有效治疗方法。健脾益肺方是广东省中医院脑病四科治疗ALS患者10余年总结的经验方,并从临床治疗中发现能改善患者生活质量,一定程度上延缓疾病发展^[1-2]。前期基础研究发现,健脾益肺方可以延缓hSOD1-G93A转基因小鼠的发病时间和生存期,改善小鼠运动功能^[3]。前期临床和基础研究中健脾益肺方对ALS患者和转基因小鼠有延缓病情作用,但未深入阐明其分子生物学机制。p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)是MAPK家族主要成员之一,参与神经炎症反应,p38 MAPK通路介导小胶质细胞活化,其抑制剂可以抑制小胶质细胞释放的细胞毒性因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α),环氧化酶-2(COX-2)及诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)的表达^[4],在突变型SOD1转基因小鼠模型中发现,活性小胶质细胞和星形胶质细胞所致的神经炎症使运动神经元死亡^[5]。为进一步探讨神经炎症反应在ALS发病机制中的作用,笔者通过用不同剂量的健脾益肺方干预hSOD1-G93A转基因小鼠,观察健脾益肺方对小胶质细胞活化,p38 MAPK蛋白及炎症因子表达的影响,探讨ALS的发病机制及健脾益

肺方的作用机制。

1 材料

1.1 动物 选用8周龄的SPF级hSOD1-G93A转基因小鼠24只,雌雄各半,体质量18~22 g。均从南京大学-南京生物医药研究院购买,采用PCR基因扩增方法鉴定后确定携带hSOD1突变基因,合格证号SCXK(苏)2015-0001,质量检测单位NBRI。SPF级同窝出生正常野生型小鼠6只,8周龄,体质量18~22 g,购自广东省中医药科学院,合格证号SCXK(粤)2013-0002。根据广东省中医药科学院动物使用和饲养规范及动物伦理委员会指导大纲的要求饲养(批号2014034)。小鼠在清洁动物房适应性饲养3 d后进行实验,无限量提供水和饲料,室温22~25℃,空气湿度50%,每日12 h光照维持,昼夜循环。

1.2 药物 健脾益肺方组成及制备:黄芪9 g,党参4.5 g,白术4.5 g,茯苓1 g,麦冬3 g,陈皮0.5 g,法半夏0.5 g,苦杏仁1 g,射干1 g,石菖蒲0.5 g,白附子0.5 g,僵蚕0.5 g,制马钱子0.1 g,炙甘草2 g。全部为无糖颗粒剂型,购自江阴天江药业有限公司(批号分别为1510012, 1510054, 1509064, 1509287, 1508108, 1509304, 1508145, 1510107, 1510049, 1509077, 1509083, 1506107, YPA2L0002,

1510109)。根据徐叔云主编《药理实验方法学》，按小鼠与人每 kg 体质量用药剂量折算关系，小鼠给药剂量(每 20 g 体质量) = 人用药剂量 × 0.002 6，小鼠低、中、高剂量(2.86, 5.72, 11.44 g·kg⁻¹) 健脾益肺方组。

1.3 试剂 小鼠 CD11b 抗体(Santa Cruz 公司, 批号 sc-20050); 小鼠 p-p38 MAPK, p38 MAPK, TNF-α, COX-2, β-肌动蛋白(β-actin), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) 单克隆抗体(CST 公司, 批号分别为 4092S, 8690S, 11948S, 4842S, 8457S, 51332S); 羊抗兔免疫球蛋白(Ig) G-HRP(博士德公司, 批号 BA1050); Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG, Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG, BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 A0521, A0423, P0010); 显影液(A + B)(Millipore 公司, 批号 WBKLS0100)。

1.4 仪器 CM1860 型冰冻切片仪(德国 Leica 公司); MDF-U32V 型 -80 °C 冰箱(日本 Sanyo 公司); SZ61 型奥林巴斯光学显微镜(日本 Olympus 光学工业株式会社); 5804R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Victor X5 型多功能酶标仪(美国 Perkin Elme 公司); Mini-PROTEAN Tetra 型电泳仪, Mini Trans-Blot 型转膜仪, ChemiDoc™ Touch Imaging System 型化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及处理 24 只 hSOD1-G93A 转基因小鼠按随机数字表分 4 组, 每组 6 只, 即模型组、健脾益肺方(2.86, 5.72, 11.44 g·kg⁻¹) 组, 同窝 8 周龄的普通野生型小鼠共 6 只设为正常组。模型组和正常组予生理盐水, 药物组予不同剂量健脾益肺方, 每日灌胃 1 次, 共 120 d。

2.2 标本取材与检测指标

2.2.1 免疫荧光法(IF)检测小鼠脊髓 CD11b, p38 MAPK, p-p38 MAPK 表达 终末期小鼠用 10% 水合氯醛麻醉后, 4% 的多聚甲醛心脏灌注 20 min, 待小鼠全身僵硬处死后取出脊髓, 浸泡于 15%, 30% 蔗糖溶液各 24 h 进行梯度脱水。取颈段、腰段脊髓用 OCT 包埋, 置于 -80 °C 冰箱备用。脊髓连续切片的厚度为 10 μm, 切片贴到多聚赖氨酸防脱载玻片上, 用磷酸盐缓冲液(PBS) 冲洗切片; 羊血清封闭液封闭 1 h; 加入一抗(1:200)4 °C 过夜; 次日吸去一抗, PBS 冲洗; 滴加二抗(1:500)37 °C 避光孵育 2 h; 吸去二抗, PBS 冲洗; 抗荧光淬灭剂封片, 荧光显微镜观察并拍照后进行数据分析。

2.2.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠脊髓 p38 MAPK, p-p38 MAPK, COX-2, TNF-α 蛋白表达 终末期小鼠用 10% 水合氯醛深度麻醉, 处死后取颈段、腰段脊髓, 液氮下用研磨钵研成粉末状, 加入裂解液, 组织样品每 100 mg 加入裂解液 500 μL, 充分裂解, 离心取上清液, BCA 测定蛋白浓度, 按每孔蛋白样品 40 μg, 加入 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE) 中电泳, 完成后将凝胶置于半干转电泳仪中转膜。将转好的 PVDF 膜取出于 5% 封闭液中封闭 60 min, 洗净封闭液, 加入对应蛋白一抗(1:1 000)4 °C 过夜。次日加入二抗(1:2 000)孵育 90 min。在 PVDF 膜上加入适量 ECL 显影液, 用 Image Lab 显影成像并进行数据分析。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计学软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 hSOD1-G93A 转基因小鼠脊髓小胶质细胞活化的影响 与正常组比较, 模型组、健脾益肺方 2.86 g·kg⁻¹ 组小胶质细胞胞体呈不同程度地增大, 细胞突起增粗、变短, 细胞激活数增多(*P* < 0.05, *P* < 0.01), 与模型组比较, 健脾益肺方 5.72, 11.44 g·kg⁻¹ 组小胶质细胞激活数及所占总数显著降低(*P* < 0.01), 见表 1, 图 1。

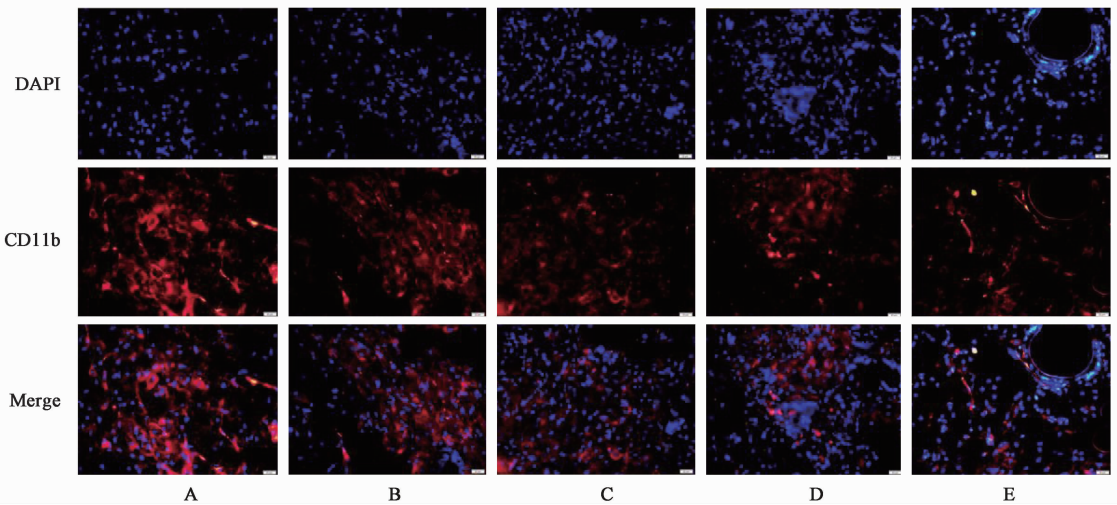
表 1 健脾益肺方对小鼠激活型小胶质细胞计数的影响($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

Table 1 Effect of Jianpi Yifei prescription on activated microglia count($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	激活型小胶质细胞计数/个	激活型小胶质细胞占总比例/%
正常	-	0.50 ± 0.548	0.53 ± 0.615
模型	-	17.67 ± 1.033 ²⁾	19.35 ± 2.058 ²⁾
健脾益肺方	2.86	15.50 ± 0.837 ¹⁾	17.26 ± 0.116 ¹⁾
	5.72	11.67 ± 1.751 ³⁾	12.83 ± 1.528 ³⁾
	11.44	9.00 ± 1.265 ³⁾	9.86 ± 1.621 ³⁾

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

3.2 对 hSOD1-G93A 转基因小鼠 p38 MAPK, p-p38 MAPK 表达的影响 与正常组比较, 模型组、健脾益肺方 2.86 g·kg⁻¹ 组 p38 MAPK, p-p38 MAPK 荧光强度核浆比显著升高(*P* < 0.01), 提示模型组、



A. 模型组; B~D. 健脾益肺方(2.86, 5.72, 11.44 g·kg⁻¹)组; E. 正常组(图 2, 3 同)

图 1 健脾益肺方对小鼠激活型小胶质细胞表达的影响(IF, ×400)

Fig. 1 Effect of Jianpi Yifei prescription on expression of activated microglia (IF, ×400)

健脾益肺方 2.86 g·kg⁻¹ 组核转移程度高。与模型组比较, 健脾益肺方 5.72, 11.44 g·kg⁻¹ 组 p38 MAPK, p-p38 MAPK 荧光强度核浆比显著降低 ($P < 0.01$), 提示健脾益肺方 5.72, 11.44 g·kg⁻¹ 组核转移程度低, 见表 2, 图 2, 3。

3.3 对 hSOD1-G93A 转基因小鼠脊髓 p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达影响 与正常组比较, 模型组、健脾益肺方 2.86 g·kg⁻¹ 组 p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较, 健脾益肺方 5.72, 11.44 g·kg⁻¹ 组 p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 可见健脾益肺方作用于 hSOD1-G93A 转基因小鼠, p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达随用药剂量的递减而呈递增趋势。见表 3, 图 4。

表 2 健脾益肺方对小鼠 p38 MAPK, p-p38 MAPK 荧光强度的核浆比的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Jianpi Yifei prescription on p38 MAPK and p-p38 MAPK fluorescence intensity karyoplasmic ratio ($\bar{x} \pm s, n = 6$) %

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	p38 荧光强度的核浆比	p-p38 荧光强度的核浆比
正常	-	20.42 ± 5.10	32.06 ± 13.22
模型	-	138.92 ± 3.49 ²⁾	223.61 ± 62.28 ²⁾
健脾益肺方	2.86	138.42 ± 2.09 ²⁾	208.43 ± 40.61 ²⁾
	5.72	121.18 ± 5.95 ³⁾	158.82 ± 65.85 ³⁾
	11.44	120.58 ± 5.59 ³⁾	120.37 ± 36.27 ³⁾

3.4 对 hSOD1-G93A 转基因小鼠脊髓 COX-2, TNF-α 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组、健脾益肺

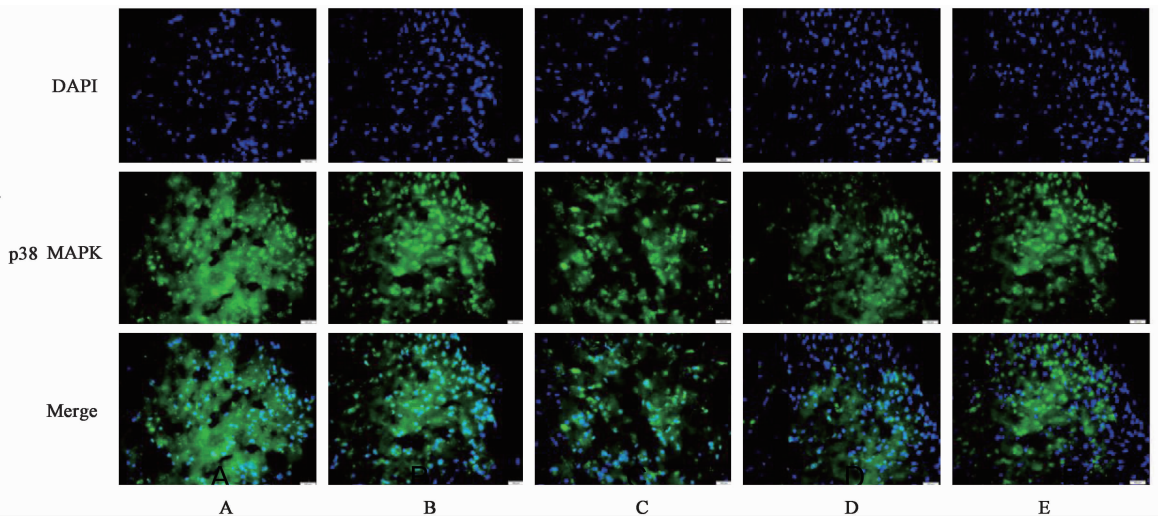


图 2 健脾益肺方对小鼠 p38 MAPK 蛋白在细胞中表达的影响(IF, ×400)

Fig. 2 Effect of Jianpi Yifei prescription on expression of p38 MAPK protein in cells (IF, ×400)

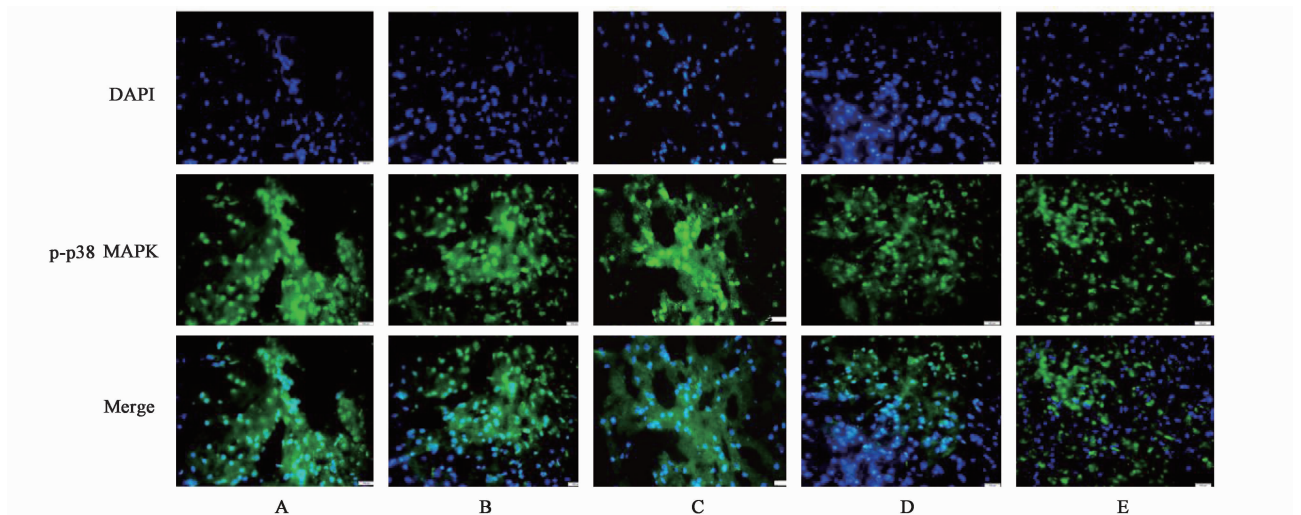


图 3 健脾益肺方对小鼠 p-p38 MAPK 蛋白在细胞中表达的影响 (IF, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of Jianpi Yifei prescription on expression of p-p38 MAPK protein in cells (IF, $\times 400$)

表 3 健脾益肺方对小鼠脊髓 p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

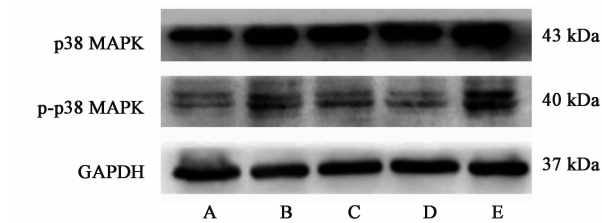
Table 3 Effect of Jianpi Yifei prescription on expression of p38 MAPK and p-p38 MAPK protein in spinal cord of mouse ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	p38 MAPK / GAPDH	p-p38 MAPK / GAPDH
正常	-	0.87 ± 0.57	0.32 ± 0.19
模型	-	$3.85 \pm 0.27^{2)}$	$1.58 \pm 0.29^{2)}$
健脾益肺方	11.44	$1.39 \pm 0.52^{3)}$	$0.56 \pm 0.40^{3)}$
	5.72	$1.92 \pm 0.68^{3)}$	$0.77 \pm 0.43^{3)}$
	2.86	$2.57 \pm 0.31^{2)}$	$1.13 \pm 0.32^{1)}$

表 4 健脾益肺方对小鼠脊髓 COX-2, TNF- α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Jianpi Yifei prescription on expression of COX-2, TNF- α in spinal cord of mouse ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	COX-2 / β -actin	TNF- α / β -actin
正常	-	0.14 ± 0.12	0.31 ± 0.28
模型	-	$2.05 \pm 0.09^{2)}$	$1.35 \pm 0.49^{2)}$
健脾益肺方	11.44	$0.63 \pm 0.17^{3)}$	$0.39 \pm 0.32^{3)}$
	5.72	$1.25 \pm 0.28^{3)}$	$0.53 \pm 0.37^{3)}$
	2.86	$1.86 \pm 0.11^{1)}$	0.78 ± 0.32



A. 正常组; B ~ D. 健脾益肺方 ($11.44, 5.72, 2.86 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组; E. 模型组 (图 5 同)

图 4 健脾益肺方作用小鼠后脊髓 p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of expression of p38 MAPK and p-p38 MAPK protein in mouse spinal cord of different groups

方 $2.86 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 COX-2 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 模型组 TNF- α 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 健脾益肺方 $5.72, 11.44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 COX-2, TNF- α 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。可见健脾益肺方作用于 hSOD1-G93A 转基因小鼠, COX-2, TNF- α 蛋白表达随药物剂量递减而递增, 见表 4, 图 5。

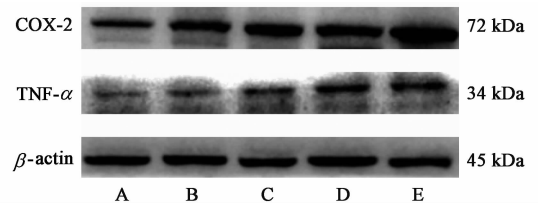


图 5 健脾益肺方作用小鼠后脊髓 COX-2, TNF- α 蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of expression of COX-2 and TNF- α protein in mouse spinal cord of different groups

4 讨论

ALS 是进展性、致死性神经系统变性疾病, 起病后多数患者仅存活 3 ~ 5 年, 最终多死于呼吸衰竭, 其发病机制至今未明, 西医治疗尚无有效方法, 目前治疗上多以改善生活质量, 延长生存期为主^[6], 中医药的干预在改善 ALS 患者临床症状、提高生存质量、减轻患者经济及心理负担等方面有一定的优势^[7]。临床上 ALS 患者出现形体消瘦、肌无力、肌萎缩及吞咽困难、呼吸功能不全等症状, 与脾胃虚、肺气不足的症状相符, 由此可见, 肺脾在 ALS 病因中起重要作用。课题组根据回顾文献及临床经验,

首创脾肺两虚的病机理论^[8],健脾益肺方源自《脾胃论》补中益气汤和《备急千金要方》补肺汤,补脾气而生肺气,以达培土生金之效。

小胶质细胞活化增生是中枢神经系统炎症反应的标志,也是ALS发病机制之一。小胶质细胞分为静息态和激活态,过度激活的小胶质细胞胞体呈不同程度地增大,细胞突起增粗、变短,其通过大量释放炎性细胞因子,如TNF- α ,COX-2等发挥神经炎症作用,导致神经元变性和死亡^[9]。McGeer等^[10]在ALS患者脊髓中发现显著的小胶质细胞增生。Boilleé等^[11]发现敲除小胶质细胞的SOD1能减慢疾病的进展。CD11b为小胶质细胞活化的标志,本研究结果提示,转基因小鼠各组的小胶质细胞出现不同程度地增大,细胞突起增粗、变短,与正常组比较,模型组、健脾益肺方2.86 g·kg⁻¹组小胶质细胞激活数明显增多,与模型组比较,健脾益肺方5.72,11.44 g·kg⁻¹组小胶质细胞激活数及所占总数比例明显减少。结果表明,转基因小鼠脊髓中存在小胶质细胞过度增生、活化的情况,健脾益肺方呈浓度依赖性抑制小胶质细胞活化增生。

p38 MAPK在静息状态下位于细胞质内,当有促炎因子TNF- α ,COX-2等应激刺激下,逐级发生磷酸化,最终使p38 MAPK“T环结构”Thr-Gly-Tyr上的Thr和Tyr双位点磷酸化,p38 MAPK被激活,被激活后迅速由细胞质移位到细胞核,在核内调控相关基因的转录和表达,调节炎症蛋白的释放,发挥神经炎症反应。本研究中,正常组小鼠脊髓的p38 MAPK,p-p38 MAPK蛋白主要表达在细胞质中,其荧光强度核浆比小,提示正常组p38 MAPK,p-p38 MAPK蛋白核转移程度低。而治疗组小鼠脊髓均有不同程度的核转移,与正常组比较,模型组、健脾益肺方2.86 g·kg⁻¹组荧光强度核浆比明显升高,与模型组比较,健脾益肺方5.72,11.44 g·kg⁻¹组荧光强度核浆比明显下降。免疫荧光结果表明,健脾益肺方以浓度依赖性抑制p38 MAPK,p-p38 MAPK蛋白核转移。蛋白质免疫印迹结果提示,健脾益肺方呈浓度依赖性下调p38 MAPK,p-p38 MAPK,TNF- α ,COX-2蛋白的表达,表明p38 MAPK通路调控TNF- α ,COX-2炎症因子表达。

前人研究发现小胶质细胞活化增殖与p38 MAPK通路相关,黄体素能通过激活MAPK信号通路抑制激活的小胶质细胞中TNF- α ,COX-2的表达,从而减轻神经炎症反应^[12-14]。本研究中健脾益肺方以浓度依赖性抑制小胶质细胞的过度活化增生,

下调p38 MAPK,p-p38 MAPK,TNF- α 及COX-2蛋白的表达,与前人研究相符,因此笔者认为,健脾益肺方可能通过介导p38 MAPK通路抑制p38 MAPK蛋白磷酸化,减少小胶质细胞的过度活化及炎症因子的释放,从而减轻神经炎症发挥神经保护作用。

[参考文献]

- [1] 郑瑜,任展能,王安琦,等.脾肺论治对肌萎缩侧索硬化运动和生活质量的疗效观察[J].时珍国医国药,2016,27(2):391-392.
- [2] 郑瑜,周炜,杨碧莹,等.脾肺论治对肌萎缩侧索硬化肌力及呼吸功能的影响[J].辽宁中医杂志,2016,43(8):1676-1677.
- [3] 周志坚,杜宝新.健脾益肺方治疗ALS动物模型hSOD1-G93A转基因小鼠的疗效和机制研究[D].广州:广州中医药大学,2016.
- [4] Jeohn G H, Cooper C L, Wilson B, et al. p38 MAP kinase is involved in lipopolysaccharide-induced dopaminergic neuronal cell death in rat mesencephalic neuron-glia cultures [J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 962:332-346.
- [5] Philips T, Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease [J]. Lancet Neurol, 2011, 10(3): 253-263.
- [6] Rooney J, Byrne S, Heverin M, et al. A multidisciplinary clinic approach improves survival in ALS: a comparative study of ALS in Ireland and Northern Ireland [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2015, 86(5):496-501.
- [7] 许文杰,秦勇,王琦伟,等.中医药治疗肌萎缩侧索硬化症的研究进展[J].中国药房,2015,26(23):3301-3303.
- [8] 赵晶,杜宝新.从脾肺辨治运动神经元病[J].新中医,2012,44(6):6-7.
- [9] Henkel J S, Beers D R, ZHAO W, et al. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2009, 4(4):389-398.
- [10] McGeer P L, McGeer E G. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Muscle Nerve, 2002, 26(4):459-470.
- [11] Boilleé S, Vande V C, Cleveland D W. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors [J]. Neuron, 2006, 52(1):39-59.
- [12] Merighi S, Bencivenni S, Vincenzi F, et al. A2B adenosine receptors stimulate IL-6 production in primary murine microglia through p38 MAPK kinase pathway [J]. Pharmacol Res, 2017, 117:9-19.
- [13] 韩笑,徐立,刘建勋,等.银杏蜜环口服溶液作用p38 MAPK调节eNOS/NO信号途径保护人脐静脉内皮细胞缺氧氧损伤[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(23):79-84.
- [14] LEI B, Mace B, Dawson H N, et al. Anti-inflammatory effects of progesterone in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e103969.

[责任编辑 张丰丰]