

牛膝-白芍配伍对帕金森病小鼠神经炎症及 RhoA/ROCK2信号通路的影响

刘京¹, 刘得水², 张英博², 张晓杰^{1,3*}

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150006; 2. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161003;
3. 黑龙江护理高等专科学校, 哈尔滨 150086)

[摘要] 目的:观察牛膝和白芍不同剂量对肝阳上亢证帕金森病小鼠神经炎症及多巴胺能神经元的保护作用,并探究其作用机制。方法:将C57BL/6小鼠随机分为正常组、模型组、牛膝-白芍低、中、高剂量组(3.25、6.5、13 g·kg⁻¹)、司来吉兰组(0.01 g·kg⁻¹)。采用附子汤灌胃联合1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)腹腔注射的方法制备肝阳上亢证帕金森病模型。通过小鼠转棒实验和爬杆实验评估其行为学改变;蛋白免疫印迹法(Western blot)测定小鼠脑黑质中Ras同源基因家族蛋白A(RhoA)、Rho相关螺旋卷曲蛋白激酶2(ROCK2)、肌球蛋白轻链1(MLC1)、 α -突触核蛋白(α -synuclein)的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测脑黑质中RhoA、ROCK2、MLC1 mRNA表达水平;采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)促炎细胞因子含量;透射电镜观察小鼠神经元超微结构变化。结果:与正常组比较,模型组跌落潜伏期显著缩短及爬杆时长显著增加($P<0.01$),脑黑质内RhoA、ROCK2、MLC1、 α -synuclein、TNF- α 、IL-1 β 水平均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,牛膝-白芍低、中、高剂量组、司来吉兰组跌落潜伏期明显增加及爬杆时长明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),且ROCK2、MLC1、 α -synuclein、TNF- α 、IL-1 β 水平均降低($P<0.05$)。电镜下与正常组比较,模型组神经元胞质内细胞器数量明显减少,线粒体肿胀且内质网形态异常,而牛膝-白芍高剂量组和司来吉兰组神经元胞核结构完整,细胞轮廓清晰,内质网形态正常。结论:牛膝-白芍配伍改善肝阳上亢证PD小鼠运动能力,下调RhoA/ROCK2信号通路相关蛋白表达,抑制炎症因子表达,减轻多巴胺能神经元损伤,其机制可能与抑制脑内RhoA/ROCK2信号通路介导的神经炎症反应有关。

[关键词] 帕金森病; 肝阳上亢证; 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP); 牛膝-白芍; Ras同源基因家族蛋白A(RhoA); Rho相关螺旋卷曲蛋白激酶2(ROCK2); 神经炎症

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R284;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)21-0050-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221207

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220518.0932.001.html>

[网络出版日期] 2022-05-18 16:21

Effect of Achyranthis Bidentatae Radix-Paeoniae Radix Alba on Neuroinflammation and RhoA/ROCK2 Signaling Pathway in Parkinson's Disease Mouse Model

LIU Jing¹, LIU Deshui², ZHANG Yingbo², ZHANG Xiaojie^{1,3*}

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150006, China; 2. Qiqihar Medical University, Qiqihar 161003, China; 3. Heilongjiang Nursing College, Harbin 150086, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect and mechanism of Achyranthis Bidentatae Radix-Paeoniae Radix Alba on dopaminergic neurons in Parkinson's disease mouse model with the syndrome of ascendant hyperactivity of liver Yang. **Method:** The C57BL/6 mice were randomly assigned into normal group, a model group, low-, medium, and high-dose (3.25, 6.5, 13 g·kg⁻¹) Achyranthis Bidentatae Radix-Paeoniae

[收稿日期] 2022-03-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973597)

[第一作者] 刘京,在读硕士,从事中医药治疗帕金森病和阿尔茨海默病机制研究,E-mail:547063823@qq.com

[通信作者] * 张晓杰,博士,教授,博士生导师,从事中医药治疗帕金森病和阿尔茨海默病机制研究,E-mail:zxj4456@sina.com

Radix Alba groups, and a selegiline group ($0.01 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The mouse model of Parkinson's disease with the syndrome of ascendant hyperactivity of liver yang was established by intragastric administration of Fuzitang combined with intraperitoneal injection of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). The behavioral changes were evaluated by rotarod test and pole test. The protein levels of Ras homolog gene family member A (RhoA), Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK2), myosin light chain 1 (MLC1), and α -synuclein in the substantia nigra were determined by Western blot. Real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR) was employed to determine the mRNA levels of RhoA, ROCK2, and MLC1 in the substantia nigra. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin- 1β (IL- 1β). The ultrastructural changes of mouse neurons were observed under a transmission electron microscope. **Result:** Compared with the normal group, the modeling shortened the latency to fall, increased the average total time in the pole test ($P<0.01$), and up-regulated the levels of RhoA, ROCK2, MLC1, TNF- α , α -synuclein, and IL- 1β in the substantia nigra ($P<0.05$). Compared with the model group, different doses of Achyranthis Bidentatae Radix-Paeoniae Radix Alba and selegiline prolonged the latency to fall, shortened the average total time in the pole test ($P<0.05$, $P<0.01$), and down-regulated the levels of ROCK2, MLC1, α -synuclein, TNF- α , and IL- 1β in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Further, the modeling decreased the number of cytoplasmic organelles and caused mitochondrial swelling and abnormal shape of endoplasmic reticulum compared with the normal group. The neurons in high-dose Achyranthis Bidentatae Radix-Paeoniae Radix Alba and selegiline groups showed intact nuclei, clear cell boundary, and normal endoplasmic reticulum shape. **Conclusion:** The combination of Achyranthis Bidentatae Radix and Paeoniae Radix Alba may improve the motor coordination ability of Parkinson's disease mouse model with the syndrome of ascendant hyperactivity of liver yang by inhibiting the neuroinflammation mediated by the RhoA/ROCK2 signaling pathway in the brain.

[Keywords] Parkinson's disease; syndrome of ascendant hyperactivity of liver Yang; 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP); Achyranthis Bidentatae Radix-Paeoniae Radix Alba; Ras homolog gene family member A (RhoA); Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK2); neuroinflammation

帕金森病(PD)是一种常见于中老年人群,以运动症状如静止性震颤、肌僵直、运动迟缓和姿势不稳为主要临床表现进行归类的神经系统变性疾病,与神经精神症状、睡眠障碍、自主神经症状、胃肠道症状等非运动症状共同构成PD症状的整体^[1]。研究表明PD发病与老龄化,长期接触杀虫剂或重金属等危险因素有关,是环境因素和易感基因共同作用的结果^[2-3]。传统治疗PD总体思路为通过外源性的补充多巴胺来平衡脑内纹状体内多巴胺的缺失从而缓解PD的临床症状,但由于脉冲式补充多巴胺,剂量的加大会破坏基底节内由多巴胺浓度调节的动态反馈式运行模式,产生不良反应^[4]。因此,中医药多靶点、多途径、多层次的神经保护性作用是近年来治疗PD的一种趋势^[5-6]。临床常见PD患者出现肌张力增高,强直震颤等肝阳上亢症状^[7],研究表明牛膝和白芍是其治疗方剂中高频出现的药对,如镇肝熄风汤、清眩平肝汤等传统方剂中均含有这

2味中药^[8]。课题团队前期体外实验发现^[9],联合应用牛膝的主要活性成分 β -蜕皮甾酮和白芍的主要活性成分芍药苷联合使用可抑制鱼藤酮诱导的神经细胞损伤,为治疗神经退行性疾病提供了可能。鉴于此,本研究基于传统七情药对配伍理论,探究牛膝-白芍抗PD疗效并探讨其作用机制,这可能对发现治疗PD的新药物具有重要意义。

1 材料

1.1 实验动物 SPF级雄性C57BL/6小鼠60只,8周龄,体质量(20 ± 2)g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,合格证号SCXK(辽)2020-0001。动物实验获得齐齐哈尔医学院实验动物伦理委员会批准(伦理审核号QUM-AECC-201949),饲养于齐齐哈尔医学院动物实验中心,饲养温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,湿度(50 ± 5)%,自由饮食饮水,自然光照,适应性饲养1周后用于实验。

1.2 药物与试剂 附子、牛膝、白芍饮片均购自北

京同仁堂有限公司(批号分别为01103900、01103311、001001168),经齐齐哈尔医学院医药科学研究院张英博副教授鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》项下规定;盐酸司来吉兰片(四川长威制药有限公司,批号20130902);1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP,美国Sigma公司,批号M0896);Ras同源基因家族蛋白A(RhoA)、Rho相关螺旋卷曲蛋白激酶2(ROCK2)、 α -突触核蛋白(α -synuclein)、 β -微管蛋白(β -tubulin)一抗(美国Abcam公司,批号分别为ab187027、ab22800、ab1903、ab215037);肌球蛋白轻链1(MLC1)一抗(美国Novus公司,批号NBPI-80073);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号分别为JL10484、JL18442);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(上海爱必信生物科技有限公司,批号分别为abs20040、abs20039);逆转录试剂盒、实时荧光定量试剂盒(日本Takara公司,批号分别为RR047A、RR820A);TRIzol裂解液、放射免疫沉淀(RIPA)裂解液、焦碳酸二乙酯(DEPC)水(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为R0016、R0013B、R0021)。

1.3 药物制备 附子汤依据《伤寒论》原文,并按《人和动物间按体表面积这算的等效剂量比值表》换算成小鼠给药浓度,加入附子总质量10倍体积的蒸馏水浸泡1h,用煎药砂锅武火煮沸后转文火慢煎45min,趁热过滤,滤渣加8倍量水,武火煮沸,文火慢煎40min,合并2次滤液,煎煮浓缩至含原生药 $0.4\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用;根据前期实验基础并参照文献[10]确定干预剂量,按牛膝-白芍1:2比例称取(煎煮步骤同附子),用时按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃体积,稀释至相当于含原生药 0.325 、 0.65 、 $1.3\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (即 3.25 、 6.5 、 $13\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),制备成牛膝-白芍配伍水煎液;盐酸司来吉兰片(规格 $0.005\text{ g}/\text{片}$)经碾碎后配成 $0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的溶液,现用现配。

1.4 仪器 SA102转棒式动物疲劳测试仪(江苏赛昂科技有限公司);PROTEAN II xi/XL型十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳仪、ChemiDocTM+凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);Tecan-5082 Sunrise型酶标仪(奥地利Tecan公司);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time RCP)仪(美国Thermo公司);HT7700-SS型超微透射电镜(日本Hitachi公司)。

2 方法

2.1 PD肝阳上亢证模型建立及药物干预 60只雄性C57BL/6小鼠,随机选取10只设为正常组,其余50只采用附子汤连续灌胃28d,以小鼠双眼结膜颜色加深变红,易激惹,频繁打斗,提尾时尖叫、惊跳甚至咬人等宏观表征变化为肝阳上亢证建立成功的观察标准。将建模成功的49只肝阳上亢证小鼠随机分为模型组(10只)、牛膝-白芍低剂量组(10只)、牛膝-白芍中剂量组(10只)、牛膝-白芍高剂量组(10只)、司来吉兰组(9只)。其中牛膝-白芍低、中、高剂量(3.25 、 6.5 、 $13\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、司来吉兰($0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,连续灌胃给药14d,正常组和模型组给与等容量的生理盐水。给与治疗药物的第10天开始,灌胃给药前1h,模型组与各给药组腹腔注射MPTP($0.03\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),连续干预5d。采用震颤麻痹4分制评分法^[11]:小鼠未出现任何不良反应为0分;出现细小震颤、弓背或束毛等反应,但不影响活动为1分;出现四肢震颤、蜷缩、竖尾等反应,且活动受限为2分;出现持续性四肢持续震颤且僵直、流涎等症状为3分;全身麻痹致死为4分。选取1~4分小鼠纳入实验。

2.2 运动行为学测定 在MPTP注射后第0、3、7天进行行为学测试,采用盲法进行,且各组小鼠均于正式实验前3d进行适应性训练,3次/d,每次5min。

2.2.1 转棒实验 后肢动作性能是评估运动协调能力的指标之一^[12]。将小鼠放置于转棒仪上,设置转棒仪转速为 $15\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,总时间为120s,记录从转轴开始转动到小鼠掉落所持续的时间,即跌落潜伏期。

2.2.2 爬杆实验 评估小鼠的运动迟缓程度及基底节运动障碍^[13]。将直径 2.5 cm 的软木塞球垂直固定于一根长 50 cm 、直径 1 cm 的木杆顶部,用双层纱布包裹木杆为防止打滑。将小鼠放置于顶部的软木塞球上,记录各组小鼠爬完全长所需总时间(以小鼠双前肢接触爬杆底部平台为爬完全长)。每只小鼠重复测量3次,每次测量间隔30min,测量3次取平均值。

2.3 组织取材 行为学测试完成后,各组小鼠禁食不禁水12h,麻醉处死,参考脑定位图谱^[14]在小鼠脑黑质处取材,每组各取3只小鼠脑黑质用于透射电镜实验,其余分离的脑黑质放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 用于蛋白指标检测。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定 各组脑黑质RhoA、ROCK2、MLC1、 α -synuclein蛋白相对表达量 组织剪碎,加入含1% PMSF的RIPA裂解液提

取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度并将其调至统一,加入蛋白上样缓冲液,沸水浴100℃变性5 min。蛋白样品进行10% SDS-PAGE电泳(110 V)分离蛋白,湿转1 h至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,加入一抗(稀释比例均为1:1 000的RhoA、ROCK2、MLC1、 α -synuclein兔抗)4℃孵育过夜,二抗(稀释比例为1:1万)37℃避光反应1 h,加入ECL化学发光液显影,于凝胶成像系统采集图像,使用Image J计算蛋白相对表达量。

2.5 Real-time PCR检测脑黑质RhoA、ROCK2和MLC1 mRNA表达情况 TRIzol法提取脑黑质总RNA,选用合格RNA样品进行逆转录合成cDNA,以稀释的cDNA为模板,用SYBR Green Real-time PCR Master Mix试剂盒步骤进行扩增,扩增条件为95℃预热30 s,95℃变性15 s,60℃退火1 min,72℃延伸30 s,40个循环。以 β -tubulin为内参基因,读取目的基因及内参基因的循环阈值(C_t),计算目的基因与内参基因 C_t 值差值(ΔC_t),用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组目的基因mRNA表达水平,各引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表1。

2.6 ELISA检测脑黑质TNF- α 、IL-1 β 的含量 将黑质充分研磨匀浆化,3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径13.5 cm)取上清,具体按照ELISA试剂盒说明书步骤进行,用全自动酶标仪检测450 nm吸光度A,纵坐标为A,横坐标为标准品,绘制标准曲线计算各目标因子的含量,每次实验独立重复3次。

2.7 透射电镜观察神经元的超微结构 将小鼠脑黑质修成1 mm³的组织块,迅速放入2.5%戊二醛中,经1%锇酸充分固定,依次梯度洗脱、包埋、薄切(片厚50 nm)、铀铅双染色后于电镜下观察神经元

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
RhoA	上游 ACGGTGTTTGAAAACATATGTGG	291
	下游 GACAGAAATGCTTGACTTCTGG	
ROCK2	上游 GACAGTAAAGACAGCGACATTG	275
	下游 GACAGTAAAGACAGCGACATTG	
MLC1	上游 GTTCCACATCATCAAGTGATCG	139
	下游 TGAGTCATCCTTTTCTAGCCTG	
β -tubulin	上游 GGTAACAACCTGGGCGAAGGG	313
	下游 CATGACGCTAAAGGAGTTCA	

的超微结构改变。

2.8 统计学分析 采用SPSS 22.0软件对数据进行分析,各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,符合正态分布者,多组样本均数比较采用单因素方差分析,并进行方差齐性检验,方差齐用最小显著性差异法(LSD),方差不齐用Tamhane's T2法;不符合正态分布者,用多个独立样本的秩和检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对PD小鼠行为学的影响 MPTP干预0 d,各组小鼠转棒和爬杆时长差异无统计学意义。干预3 d后,与正常组比较,模型组小鼠跌落潜伏期显著缩短,爬杆时长显著增加($P<0.01$);与模型组比较,牛膝-白芍低、中、高剂量组、司来吉兰组跌落潜伏期显著延长,爬杆时长明显减少($P<0.05$, $P<0.01$);其余组间两两比较差异无统计学意义。干预7 d后,与正常组比较,模型组小鼠跌落潜伏期显著缩短,爬杆时长显著增加($P<0.01$);与模型组比较,牛膝-白芍低、中、高剂量组、司来吉兰组转棒用时显著增加,爬杆时长显著减少($P<0.01$)。见表2。

表2 牛膝-白芍配伍对PD小鼠行为学的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 2 Effect of Achyranthis Bidentatae Radix-Paeoniae Radix Alba (AP) on neurological behavior of PD mice ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	爬杆时长			跌落潜伏期		
		0 d	3 d	7 d	0 d	3 d	7 d
正常组		5.51±0.10	5.75±0.19	5.42±0.19	114.70±2.78	113.30±4.42	117.30±1.43
模型组		5.56±0.31	34.90±0.74 ²⁾	37.04±5.49 ²⁾	117.30±1.43	9.44±1.75 ²⁾	7.85±0.09 ²⁾
牛膝-白芍低剂量组	3.25	5.65±0.29	30.31±1.56 ³⁾	25.60±0.17 ⁴⁾	115.80±2.01	45.18±2.71 ⁴⁾	62.61±2.29 ⁴⁾
牛膝-白芍中剂量组	6.5	5.78±0.09	17.40±0.15 ⁴⁾	13.57±0.26 ⁴⁾	118.10±1.20	62.10±1.61 ⁴⁾	90.86±1.33 ⁴⁾
牛膝-白芍高剂量组	13	5.42±0.01	10.47±0.10 ⁴⁾	8.39±0.19 ⁴⁾	119.10±0.34	80.12±7.37 ⁴⁾	100.20±3.98 ⁴⁾
司来吉兰组	0.01	5.36±0.01	6.55±0.19 ⁴⁾	6.29±0.11 ⁴⁾	117.30±1.43	100.80±1.42 ⁴⁾	109.00±2.29 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⁾ $P<0.01$

3.2 对 PD 小鼠脑黑质 RhoA、ROCK2、MLC1、 α -synuclein 蛋白相对表达量的影响 与正常组比较,模型组 RhoA、ROCK2、MLC1、 α -synuclein 表达量均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,牛膝-白芍低、中、高剂量组、司来吉兰组 RhoA、ROCK2、MLC1、 α -synuclein 蛋白相对表达量均明显降低($P<0.05$);与牛膝-白芍低剂量组比较,牛膝-白芍中、高

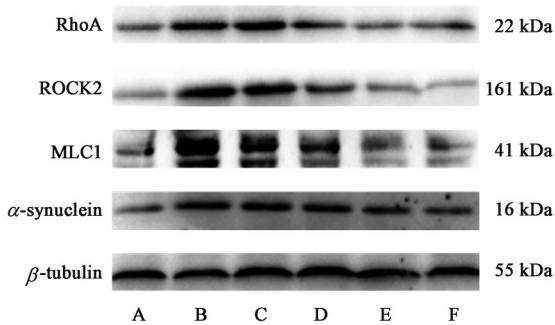
剂量组、司来吉兰组 RhoA、ROCK2、MLC1 蛋白相对表达量均明显降低($P<0.05$);与牛膝-白芍中剂量组比较,高剂量组、司来吉兰 RhoA、ROCK2、MLC1、 α -synuclein 蛋白相对表达量均明显降低($P<0.05$);与牛膝-白芍高剂量组比较,司来吉兰组 RhoA、ROCK2、MLC1、 α -synuclein 蛋白相对表达量均明显降低($P<0.05$)。见表3和图1。

表3 牛膝-白芍配伍对 PD 小鼠脑黑质 RhoA、ROCK2、MLC1、 α -synuclein 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of AP on relative expression of RhoA, ROCK2, MLC1, α -synuclein in substantia nigra of PD mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	RhoA/ β -tubulin	ROCK2/ β -tubulin	MLC1/ β -tubulin	α -synuclein/ β -tubulin
正常组		0.99±0.03	1.00±0.12	1.01±0.10	0.17±0.02
模型组		2.85±0.04 ¹⁾	3.52±0.39 ¹⁾	2.95±0.04 ¹⁾	1.29±0.08 ¹⁾
牛膝-白芍低剂量组	3.25	2.50±0.03 ²⁾	2.42±0.10 ²⁾	2.52±0.05 ²⁾	1.10±0.03 ²⁾
牛膝-白芍中剂量组	6.5	2.17±0.03 ^{2,3)}	2.07±0.03 ^{2,3)}	2.20±0.06 ^{2,3)}	1.02±0.03 ^{2,3)}
牛膝-白芍高剂量组	13	1.79±0.02 ^{2,3,4)}	1.74±0.04 ^{2,3,4)}	1.90±0.05 ^{2,3,4)}	0.86±0.01 ^{2,3,4)}
司来吉兰组	0.01	1.51±0.04 ^{2,3,4,5)}	1.40±0.01 ^{2,3,4,5)}	1.49±0.06 ^{2,3,4,5)}	0.67±0.02 ^{2,3,4,5)}

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与牛膝-白芍低剂量组比较³⁾ $P<0.05$;与牛膝-白芍中剂量组比较⁴⁾ $P<0.05$;与牛膝-白芍高剂量组比较⁵⁾ $P<0.05$ (表4和表5同)



注:A.正常组;B.模型组;C.牛膝-白芍低剂量组;D.牛膝-白芍中剂量组;E.牛膝-白芍高剂量组;F.司来吉兰组(图3同)

图1 各组小鼠脑黑质 RhoA、ROCK2、MLC1、 α -synuclein 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of RhoA, ROCK2, MLC1, α -synuclein protein expression in substantia nigra of each group mice

表4 牛膝-白芍配伍对 PD 小鼠脑黑质 RhoA、ROCK2、MLC1 mRNA 表达影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of AP on RhoA, ROCK2 and MLC1 mRNA expression in substantia nigra of PD mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	RhoA	ROCK2	MLC1
正常组		1.00±0.03	1.00±0.12	1.00±0.01
模型组		2.85±0.04 ¹⁾	3.52±0.39 ¹⁾	2.94±0.04 ¹⁾
牛膝-白芍低剂量组	3.25	2.50±0.03 ²⁾	2.42±0.01 ²⁾	2.52±0.05 ²⁾
牛膝-白芍中剂量组	6.5	2.17±0.03 ^{2,3)}	2.07±0.03 ^{2,3)}	2.20±0.06 ^{2,3)}
牛膝-白芍高剂量组	13	1.80±0.02 ^{2,3,4)}	1.75±0.04 ^{2,3,4)}	1.90±0.05 ^{2,3,4)}
司来吉兰组	0.01	1.52±0.04 ^{2,3,4,5)}	1.49±0.01 ^{2,3,4,5)}	1.50±0.06 ^{2,3,4,5)}

3.4 对 PD 小鼠脑黑质 TNF- α 、IL-1 β 含量的影响 与正常组比较,模型组 TNF- α 、IL-1 β 含量均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,牛膝-白芍低、中、高

3.3 对 PD 小鼠脑黑质 RhoA、ROCK2、MLC1 mRNA 表达水平的影响 与正常组比较,模型组 RhoA、ROCK2、MLC1 的 mRNA 表达均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,牛膝-白芍低、中、高剂量组、司来吉兰组 RhoA、ROCK2、MLC1 的 mRNA 表达均明显降低($P<0.05$);与牛膝-白芍低剂量组比较,中、高剂量组、司来吉兰组 RhoA、ROCK2、MLC1 的 mRNA 表达均明显降低($P<0.05$);与牛膝-白芍中剂量组比较,高剂量组、司来吉兰 RhoA、ROCK2、MLC1 的 mRNA 表达均明显降低($P<0.05$);与牛膝-白芍高剂量组比较,司来吉兰组 RhoA、ROCK2、MLC1 的 mRNA 表达均明显降低($P<0.05$)。见表4。

剂量组、司来吉兰组 TNF- α 、IL-1 β 含量均明显降低($P<0.05$);与牛膝-白芍低剂量组比较,牛膝-白芍中、高剂量组、司来吉兰组 TNF- α 、IL-1 β 含量均明显

降低($P<0.05$);与牛膝-白芍中剂量组比较,牛膝-白芍高剂量组、司来吉兰 TNF- α 、IL-1 β 含量均明显降低($P<0.05$);与牛膝-白芍高剂量组比较,司来吉兰组 TNF- α 、IL-1 β 含量均明显降低($P<0.05$)。见表5。

表5 牛膝-白芍配伍对PD小鼠脑黑质TNF- α 、IL-1 β 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β
正常组		2.49±0.15	1.54±0.37
模型组		13.22±0.61 ¹⁾	6.49±0.25 ¹⁾
牛膝-白芍低剂量组	3.25	8.95±0.48 ²⁾	4.69±0.15 ²⁾
牛膝-白芍中剂量组	6.5	5.49±0.03 ^{2,3)}	3.99±0.06 ^{2,3)}
牛膝-白芍高剂量组	13	4.78±0.12 ^{2,3,4)}	3.63±0.10 ^{2,3,4)}
司来吉兰组	0.01	3.06±0.61 ^{2,3,4,5)}	2.00±0.03 ^{2,3,4,5)}

3.5 对PD小鼠脑黑质区神经元细胞超微结构变化的影响 正常组脑黑质区神经元细胞核丰满,核膜结构清晰,线粒体形态正常,内质网分布均匀;模型组神经元损伤明显,细胞核皱缩、结构模糊、线粒体肿胀,部分细胞器缺损,内质网扩张等细胞器变形坏死现象;经各药物治疗后,神经元结构基本完整,细胞器坏死减少,各细胞器结构较正常,神经元较为规整,线粒体肿胀有所改善、染色质分布相对均匀,其中以牛膝-白芍高剂量组、司来吉兰组改善最为明显。见图2。

4 讨论

PD是一种高病残率的中枢神经系统退行性疾病,其基本病理特征为黑质(SN)中DA能神经元进行性丧失,伴随 α -synuclein蛋白聚集,最终DA能神经元变性坏死而导致病理和临床表现的异常^[15]。虽然PD的病因尚未明确,但大量证据表明,神经炎症在PD发生发展中起着重要作用,以小胶质细胞的激活和神经元损伤部位T细胞浸润为特征的神经炎症是PD发病的重要机制^[16]。在动物模型和PD患者中已发现小胶质细胞的激活和促炎因子如TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌^[17]。在本研究中,以辛燥大热之性的附子汤灌胃28d制备PD肝阳上亢证^[18-19],并连续7d腹腔注射MPTP的方法制备经典小鼠PD亚急性模型^[20],模型组小鼠中脑黑质 α -synuclein、TNF- α 、IL-1 β 的表达水平显著高于生理盐水处理小鼠,而牛膝-白芍高剂量组和司来吉兰组明显抑制了 α -synuclein和炎症细胞因子的表达,提

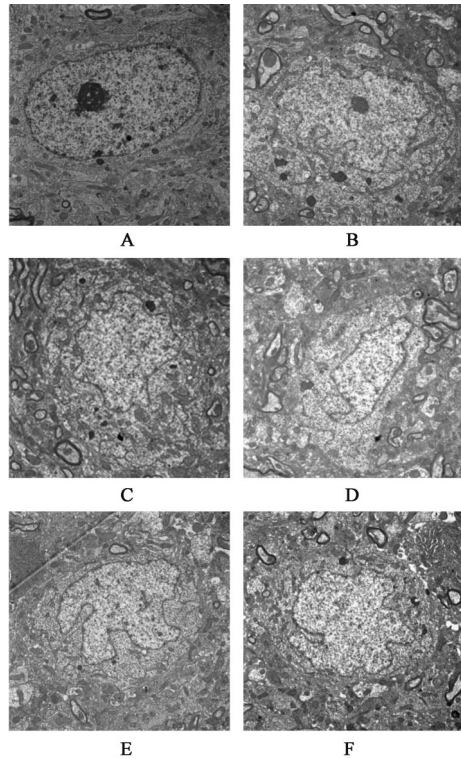


图2 牛膝-白芍配伍对PD小鼠脑黑质区结构的影响(电镜扫描,×18 000)

Fig. 2 Effect of AP on ultrastructure in substantia nigra of PD mice (SEM, ×18 000)

示牛膝-白芍配伍可能抑制小胶质细胞的过度激活,降低炎症因子IL-1 β 和TNF- α 水平。

中草药一直被广泛应用于治疗神经退行性疾病,许多传统方剂,草药提取物和单体都具有抗PD活性^[21-22]。从中医理论角度而言,中医学将PD归为“颤病”范畴,“颤摇之病,风之象也”^[23]。以五脏辨证而言,其病位在肝肾,肝为病之本,肾为病之根,因精血同源,肝血亏虚,肾精不足,阴不敛阳,肝阳上亢,故选牛膝滋补肝肾,息风止颤;以五体辨证而言,其病位在筋,筋急则拘挛,风动则颤,肝血不足则筋失濡润,因肝为刚脏,非柔润不能调和,息风必用柔缓,以防辛燥走窜,阴血复伤,故配以白芍养血敛阴,柔肝平肝。此外,牛膝多肽(从中药牛膝中提取的活性成分)可有效抑制PD患者脑组织中的神经炎症,增强神经元活力^[24]。白芍总苷(从中药白芍中提取出的活性成分)对神经元具有保护作用,与炎症级联反应^[25]、氧化应激^[26]、细胞凋亡^[27]等机制有关,在体外研究中,他能保护中脑DA神经元免受MPP⁺诱导的神经毒性。因而研究牛膝-白芍配伍使用在MPTP诱导的PD模型小鼠中的作用机制和神经保护靶点是本实验探索的问题。

RhoA是一种小GTP结合蛋白,ROCK2为其下

游效应剂。在生理状态下 ROCK2 在中枢神经系统中呈现低表达;在病理状态下,中枢神经系统中 RhoA/ROCK2 通路被激活,启动一系列病理生理反应^[28]。MLC1 是调节细胞收缩的关键蛋白,激活 RhoA/ROCK2 通路可增强其下游分子 MLC 的磷酸酶活性,加强 MLC 磷酸基团的水解,引起神经元生长锥回缩、塌陷^[29]。研究证实,ROCK 信号通路 PD 中的神经炎症有关^[30],一方面,RhoA/ROCK2 信号通路对于小胶质细胞迁移到炎症性大脑区域,如黑质(SN)和纹状体至关重要,使用 Y-27632(一种 ROCK 抑制剂)可抑制小胶质细胞的激活,减轻神经炎症^[31-32];另一方面,最近研究表明 RhoA/ROCK2 通路通过诱导核转录因子- κ B(NF- κ B)的活化,使其从细胞质进入细胞核并促进 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等的释放,这些炎症细胞因子反过来可激活 RhoA/ROCK2 信号通路,由此形成恶性循环,导致大量炎症因子的积聚^[33]。因此,抑制 RhoA/ROCK2 信号通路对于改善 PD 神经炎症有重要意义。在本研究中,MPTP 诱导 RhoA、ROCK2 及 MLC1 显著上调,而牛膝-白芍配伍可抑制 RhoA/ROCK2 信号通路,其可能通过抑制 RhoA/ROCK2 信号通路来有效改善 PD(图 4),提示牛膝-白芍配伍可能是一种有前途的缓解 PD 神经炎症的药物,且 RhoA/ROCK2 可能是 PD 治疗的一个重要靶点。

综上所述,本实验研究证实牛膝-白芍配伍使用可显著下调脑黑质中 RhoA、ROCK2、MLC 的表达,降低炎症细胞因子,改善神经炎症从而起到神经保护作用,但其具体机制是否涉及调控小胶质细胞表型转化值得进一步探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] BLOEM B R, OKUN M S, KLEIN C. Parkinson's disease[J]. Lancet, 2021, 397(10291):2284-2303.
[2] SIMON D K, TANNER C M, BRUNDIN P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology[J]. Clin Geriatr Med, 2020, 36(1): 1-12.
[3] FORLONI G, LA VITOLA P, CEROVIC M, et al. Inflammation and Parkinson's disease pathogenesis: Mechanisms and therapeutic insight[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2021, 177:175-202.
[4] CHURCH F C. Treatment options for motor and non-motor symptoms of Parkinson's disease [J]. Biomolecules, 2021, 11(4):612-627.

[5] 谷丽丽,李钦,武柠子,等. MicroRNA 对阿尔茨海默病的双向作用及中药干预研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(7):1743-1751.
[6] 世界中医药学会联合会, 中华中医药学会. 国际中医临床实践指南—阿尔茨海默病(2019-10-11)[J]. 世界中医药, 2021, 16(8):1181-1187.
[7] 陈曦,李宜放. 基于医案解构探讨名老中医经验数据挖掘现状[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2608-2611.
[8] SHENG X, YANG S, WEN X, et al. Neuroprotective effects of Shende'an tablet in the Parkinson's disease model[J]. Chin Med, 2021, 16(1): 18.
[9] LIU H, YU C, XU T, et al. Synergistic protective effect of paeoniflorin and β -ecdysterone against rotenone-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. Apoptosis, 2016, 21(12):1354-1365.
[10] 张静艳,郭科东,金明,等. 基于基线等比增减设计法优选牛膝白芍对帕金森病肝阳上亢证小鼠神经保护作用的最佳配比研究[J]. 医学研究杂志, 2021, 50(10):59-64.
[11] SAVAS A, BAYATLI E, EROGLU U, et al. Combined unilateral radiofrequency lesioning of the motor thalamus, field of forel, and zona incerta: A series of cases with dystonia [J]. Neurosurgery, 2022, 90(3): 313-321.
[12] LIU W W, WEI S Z, HUANG G D, et al. BMAL1 regulation of microglia-mediated neuroinflammation in MPTP-induced Parkinson's disease mouse model [J]. FASEB J, 2020, 34(5):6570-6581.
[13] MA X, QIAO H F, WANG Q, et al. Effect of electroacupuncture on expression of α -syn in colon and substantia nigra of Parkinson's disease mice [J]. Acupunct Res, 2021, 46(5):362-367.
[14] 帕克森诺斯. 大鼠脑定位图谱[M]. 人民卫生出版社, 2005:79.
[15] ZAMAN V, SHIELDS D C, SHAMS R, et al. Cellular and molecular pathophysiology in the progression of Parkinson's disease[J]. Metab Brain Dis, 2021, 36(5): 815-827.
[16] MANI S, SEVANAN M, KRISHNAMOORTHY A, et al. A systematic review of molecular approaches that link mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease [J]. Neurol Sci, 2021, 42(11): 4459-4469.
[17] LIU Z, YAO X, SUN B, et al. Pretreatment with kaempferol attenuates microglia-mediate neuroinflammation by inhibiting MAPKs-NF- κ B signaling pathway and pyroptosis after secondary spinal cord injury [J]. Free

- Radic Biol Med, 2021, 168: 142-154.
- [18] 王晓丽, 朱兰芹, 綦艳秋, 等. 镇肝熄风汤对帕金森病肝阳上亢证模型大鼠脑组织谷胱甘肽抗氧化系统的影响[J]. 中医学报, 2018, 33(7): 1289-1293.
- [19] 邹宇, 董妙先. 镇肝熄风汤含药血清对6-OHDA诱导PC12细胞损伤保护作用的抗氧化机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(9): 112-116.
- [20] PATHANIA A, GARG P, SANDHIR R. Impaired mitochondrial functions and energy metabolism in MPTP-induced Parkinson's disease: Comparison of mice strains and dose regimens[J]. Metab Brain Dis, 2021, 36(8): 2343-2357.
- [21] WANG Z Y, LIU J, ZHU Z, et al. Traditional Chinese medicine compounds regulate autophagy for treating neurodegenerative disease: A mechanism review [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110968.
- [22] ZENG B Y. Effect and mechanism of Chinese herbal medicine on Parkinson's disease [J]. Int Rev Neurobiol, 2017, 135: 57-76.
- [23] 芦锰, 周雨慧, 李晓宁, 等. 基于数据挖掘中医药治疗阿尔茨海默病用药规律研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(6): 1558-1563.
- [24] WANG Y, GE X, YU S, et al. Achyranthes bidentata polypeptide alleviates neurotoxicity of lipopolysaccharide-activated microglia via PI3K/Akt dependent NOX2/ROS pathway[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(20): 1522.
- [25] ZHANG L, WEI W. Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of paeoniflorin and total glucosides of paeony[J]. Pharmacol Ther, 2020, 207: 107452.
- [26] ZHENG M, LIU C, FAN Y, et al. Neuroprotection by Paeoniflorin in the MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. Neuropharmacology, 2017, 116: 412-420.
- [27] ZHENG M, LIU C, FAN Y, et al. Total glucosides of paeony (TGP) extracted from Radix Paeoniae Alba exerts neuroprotective effects in MPTP-induced experimental parkinsonism by regulating the cAMP/PKA/CREB signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2019, 245: 112182.
- [28] CHEN B, ZHENG W. Epigenetic control of rho-associated protein kinase 2 in neurodegeneration[J]. J Alzheimers Dis, 2019, 72(3): 815-822.
- [29] BRIGNONE M S, LANCIOTTI A, SERAFINI B, et al. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein-1 (MLC1) counteracts astrocyte activation in response to inflammatory signals [J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(12): 8237-8254.
- [30] ZHU M M, LIN J H, QING P, et al. Manual acupuncture relieves microglia-mediated neuroinflammation in a rat model of traumatic brain injury by inhibiting the RhoA/ROCK2 pathway [J]. Acupunct Med, 2020, 38(6): 426-434.
- [31] TSENG Y T, LIN W J, CHANG W H, et al. The novel protective effects of loganin against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity: Enhancement of neurotrophic signaling, activation of IGF-1R/GLP-1R, and inhibition of RhoA/ROCK pathway [J]. Phytother Res, 2019, 33(3): 690-701.
- [32] 赵怡然, 付洪涛, 赵楠楠. 丹参素对IUGR胎鼠脑神经细胞及脑组织Rho/ROCK信号通路的影响[J]. 世界中医药, 2020, 15(22): 3401-3405.
- [33] BAI Y, DU Q, ZHANG L, et al. Fasudil alleviated insulin resistance through promotion of proliferation, attenuation of cell apoptosis and inflammation and regulation of RhoA/Rho kinase/insulin/nuclear factor- κ B signalling pathway in HTR-8/SVneo cells [J]. J Pharm Pharmacol, 2021, 73(8): 1118-1127.

[责任编辑 周冰冰]