

· 基础研究 ·

补肾活血方对帕金森病模型小鼠
TLR4/NF- κ B 信号通路的影响

湛盈帆 栾振先 李绍旦 秦 丽 杨明会

摘要 **目的** 探讨补肾活血方对帕金森病 (PD) 模型小鼠神经炎症的抑制效应及其机制。**方法** 将 36 只雄性 C57/BL 小鼠随机分为 3 组 (正常组、模型组、中药组), 每组 12 只。模型组和中药组小鼠采用腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 法建立 PD 模型, 造模成功后中药组予补肾活血方灌胃治疗 14 天 (0.3 mL/d), 同时正常组和模型组予等量生理盐水灌胃。选择爬杆试验和 Morris 水迷宫试验评估小鼠行为学变化。采用 Western Blot 法检测各组小鼠黑质致密部 Toll 样受体 4 (TLR4)、NF- κ B p65、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 Caspase-3 蛋白表达, 并用免疫组化法测定各组小鼠脑黑质酪氨酸羟化酶 (TH) 的阳性表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠在爬杆实验中转向时间和爬下时间均增加 (均 $P < 0.01$), 在水迷宫实验中逃避潜伏期延长 ($P < 0.01$), 穿越平台次数减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组小鼠爬下时间减少 ($P < 0.01$), 逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$), 穿越平台次数增加 ($P < 0.01$)。与正常组比较, 模型组小鼠 TH 阳性神经元数目减少 ($P < 0.01$), 信号通路蛋白 TLR4、NF- κ B p65、炎症因子 IL-6、TNF- α 及凋亡蛋白 Caspase-3 的表达水平均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组小鼠 TH 阳性神经元数目增加 ($P < 0.05$), TLR4、NF- κ B p65、IL-6、TNF- α 及 Caspase-3 的表达均下调 ($P < 0.05$)。**结论** 补肾活血方能通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路, 进而降低炎症因子和 Caspase-3 蛋白表达, 减轻炎症反应, 抑制细胞凋亡, 减少 DA 能神经元损伤。补肾活血方对 PD 模型小鼠具有神经保护作用, 并能够改善 PD 小鼠运动协调及学习记忆能力。

关键词 补肾活血方; 帕金森病; TLR4/NF- κ B 信号通路; 炎症; 凋亡

Effect of Bushen Huoxue Recipe on TLR4/NF- κ B Signal Pathway in Parkinson's Disease Model Mice CHEN Ying-fan, LUAN Zhen-xian, LI Shao-dan, QIN Li, and YANG Ming-hui *Department of Traditional Chinese Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing (100853)*

ABSTRACT **Objective** To observe the inhibitory effect of Bushen Huoxue Recipe (BSHXR) on neuroinflammation in Parkinson's disease (PD) model mice and its mechanism. **Methods** Totally 36 male C57/BL mice were randomly divided into 3 groups (normal, model, and CM group), 12 mice in each group. Mice in the model and CM group were intraperitoneally injected with 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) to establish PD models. After the models were successfully established, mice in the CM group were administered with BSHXR (0.3 mL/d) by gastrogavage for 14 days, while mice in the normal group and the model group were administered with the same amount of normal saline by gastrogavage. The rod climbing test and Morris water maze test were used to evaluate the behavioral changes of mice. Western Blot was used to detect the expressions of TLR4, NF- κ B p65, IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and Caspase-3 protein in the substantia nigra pars compacta (SNc) of each group of mice, and the positive expression level of TH in the substantia nigra of mice in each group was determined by immunohistochemistry. **Results** Compared with the normal group,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81273969); 中组部“万人计划”百千万工程领军人才支持经费; 中医药传承与创新“百千万”人才工程

作者单位: 解放军总医院中医学部 (北京 100853)

通讯作者: 杨明会, Tel: 010-66939651, E-mail: ymh9651@sina.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20210108. 153

the climbing total time (T-total) and the turning time (T-turn) spent in the rod climbing experiment significantly increased ($P<0.01$), the escape latency was prolonged ($P<0.01$), and the time of swim in the platform quadrant shortened ($P<0.01$) in the Morris water maze test in the model group. Compared with the model group, T-total and the escape latency significantly decreased in the CM group ($P<0.01$), and the times of crossing the platform quadrant was reduced ($P<0.01$). Compared with the model group, T-total was reduced ($P<0.01$), the escape latency was shortened ($P<0.01$), and the times of crossing the platform quadrant increased ($P<0.01$) in the CM group. Compared with the normal group, the number of TH-positive neurons was significantly reduced ($P<0.01$) in the model group, and the expression levels of TLR4, NF- κ B p65, IL-6, TNF- α , Caspase-3 were increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the number of TH-positive neurons increased in the CM group ($P<0.05$), and the expressions of TLR4, NF- κ B p65, IL-6, TNF- α , and Caspase-3 were down-regulated ($P<0.05$). **Conclusions** BSHXR reduced the expressions of inflammatory factors and Caspase-3 protein by inhibiting TLR4/NF- κ B signal pathway, attenuating inflammatory response, inhibiting cell apoptosis, and reducing DA neuron damage. So BSHXR had neuroprotective effects on PD model mice, and improved the movement coordination and learning and memory of PD mice.

KEYWORDS Bushen Huoxue Recipe; Parkinson's disease; TLR4/NF- κ B signaling pathway; inflammation; apoptosis

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种以脑黑质—纹状体内多巴胺能神经元功能退行性改变、路易小体形成为典型病理表现的中枢神经系统变性疾病^[1], 发病机制尚不明确。目前普遍认为神经炎症反应是 PD 关键病理机制以及治疗靶点之一^[2,3]。核转录因子 kappaB (nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号通路作为调节炎症反应的经典通路之一, 通过调控机体免疫应答、诱导细胞凋亡, 在 PD 等神经退行性疾病中发挥关键作用^[4]。

既往应用补肾活血方能显著改善 PD 患者症状, 提高西药疗效并减少不良反应, 具有增效减毒的效果^[5,6]。本研究采用 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP) 诱导的亚急性 PD 小鼠模型, 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路, 研究小鼠黑质致密部 (substantia nigra pars compacta, SNc) 炎症因子 IL-6、TNF- α 及凋亡蛋白 Caspase-3 表达的变化, 探讨补肾活血方对 PD 模型小鼠的保护效应及其作用机制。

材料与方 法

1 动物 8 周龄 SPF 级健康雄性 C57/BL 小鼠 36 只, 体重 (20.0 ± 2.0) g。购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心 [许可证号: SCXK (京) 2014-0004]。室温 (22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 30%~60%, 适应性喂养 1 周。实验中对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》, 本实验经解放军总医院

实验动物福利伦理审查 (No. 2020-X16-101)。

2 试剂及仪器 MPTP (MCE 公司, 批号: HY-15608)、 β -actin (Servicebio 公司, 批号: GB12001)、BCA 蛋白定量检测试剂盒 (Servicebio 公司, 批号: G2026)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (Servicebio 公司, 批号: G2003)、NF- κ B 兔单克隆抗体 (Bioss 公司, 批号: bs-0465R)、Caspase-3 兔单克隆抗体 (Bioss 公司, 批号: bs-0081R)、TLR4 鼠单克隆抗体 (Servicebio 公司, 批号: GB12186)、IL-6 兔单克隆抗体 (武汉三鹰公司, 批号: 21865-1-AP)、TNF- α 兔单克隆抗体 (武汉三鹰公司, 批号: 17590-1-AP)、TH 兔单克隆抗体 (武汉三鹰公司, 批号: 25859-1-AP)、GAPDH (Servicebio 公司, 批号: GB12002)、HRP 标记羊抗兔二抗 (Servicebio 公司, 批号: GB23303)、HRP 标记羊抗鼠二抗 (Servicebio 公司, 批号: GB23301)、ECL 超敏发光液 (Servicebio 公司, 批号: G2014)、显影定影试剂盒 (武汉谷歌生物, 批号: G2019)、微量移液器 (北京大龙公司, 型号: 711111080000)、垂直电泳槽 (北京六一仪器厂, 型号: DYCZ-24E)、电子天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司, 型号: MS1003TS/02)。

3 药物 补肾活血方 (肉苁蓉 15 g 山茱萸 10 g 川芎 10 g 当归 10 g 丹参 15 g 赤芍 20 g 石菖蒲 15 g 蜈蚣 2 g) 中药饮片由解放军总医院中药房提供及质检。以恒温水浴锅浓缩中药汤剂 (饮片依传统煎药法煎煮) , 取浓缩药液 (含生药 1 g/mL) 消毒、密闭, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

4 模型制备与分组给药 雄性 C57/BL 小鼠 36 只按照数字表法分为正常组、中药组、模型组, 每组 12 只。中药组和模型组给予腹腔注射 MPTP (30 mg/kg), 每天 1 次, 连续 7 天^[7], 对比造模前后小鼠行为状态, 小鼠活动能力下降, 出现震颤、抽搐等 PD 样症状即视为 PD 小鼠模型建立成功^[7]。造模全部成功。

参考课题组前期相关实验选定最优中药剂量^[14, 15], 药量根据小鼠与人的药物剂量换算公式折算^[8], 每只小鼠每天应灌胃补肾活血方药液 0.015 mL/g (含生药 1 g/mL)。中药组从第 8 天开始予中药连续灌胃 14 天 (1 次/天)。模型组和正常组予等体积生理盐水灌胃。

5 行为学测试 爬杆实验: 中药灌胃给药结束后, 采用爬杆实验评估小鼠的运动平衡能力。将小鼠头向上放于自制爬杆 (直径 10 mm、高 500 mm 直木杆, 杆顶部固定一直径 50 mm 小球, 外覆医用胶布) 顶端小球上, 小鼠放置到球上从开始运动到完全转为头向下的时间为转向时间 (T-turn); 小鼠从开始运动到直至四肢着地的总时间为爬下时间 (T-total)。正式检测前先进行爬杆训练。正式检测重复 3 次, 每次限定时间 30 s, 间隔 1 min, 取平均值。

Morris 水迷宫测试: 爬杆实验完成后, 采用 Morris 水迷宫评估各组小鼠的学习记忆能力。水迷宫水池均分为 4 个部分, 分别标记成第一、第二、第三及第四象限, 池中设置一圆形平台。在同一时间于不同象限 (除平台象限外) 选取入水点进行 3 次训练, 连续 5 天, 记录其寻找到隐藏在水面下平台的时间 (逃避潜伏期), 如小鼠在 120 s 内无法找到平台, 则引导小鼠至平台上并停留 15 s。然后去除池内的平台, 用水迷宫视频分析仪记录小鼠在 120 s 内的游泳轨迹及其游过原平台象限区域的次数, 以此反映小鼠对原平台位置的学习与记忆程度。

6 免疫印迹 (Western Blot) 检测 行为学测试结束后各组小鼠以腹腔注射 4% 水合氯醛 (0.01 mL/g) 进行麻醉, 于冰上快速剥离脑组织, 并分离出中脑黑质部分。将取得的每一个小鼠脑黑质均等切为两部分, 一部分用 4% 多聚甲醛固定 10 h 后, 作石蜡包埋切片 (厚度 5~6 μm), 用于后续免疫组化检测; 另一部分置于 Eppendorf 管中, 放入液氮速冻, 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。取上述制备好的样品, 准确称量。加入 RIPA 蛋白裂解液充分裂解后, 超声破碎 20 s 后, 冰上静置 30 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清, BCA 法测定蛋白浓度。将蛋

白溶液按照 4:1 的比例加入 5 \times 蛋白上样缓冲液, 沸水浴变性 15 min。使用 SDS-PAGE 分离, 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 (0.5% TBST 配) 封闭 1 h。加入用 5% 脱脂奶粉配制的 NF- κ B p65 兔单克隆抗体 (1:1 000)、TLR4 鼠单克隆抗体 (1:1 000)、Caspase-3 兔单克隆抗体 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 漂洗, 5 min \times 3 次, 加入相应二抗 (1:3 000), 室温下孵育 30 min 后, 用 TBST 漂洗, 5 min \times 3 次。ECL 发光试剂反应, 曝光后的胶片用显影、定影试剂进行显影和定影。采用 Alpha Innotech 灰度分析软件分析胶片灰度值得出 TLR4、NF- κ B p65、IL-6、TNF- α 、Caspase-3 与 β -action 的相对光密度值。所有实验操作步骤均严格按照说明书进行。

7 免疫组化检测 取上述石蜡切片, 放入二甲苯 I、二甲苯 II 中各 12 min 进行脱蜡, 以无水乙醇 I、II 洗去二甲苯, 再放入 95%、85% 乙醇中各 3 min, 完成常规脱蜡水化处理蒸馏水漂洗 3 min, 采用高温高压法进行抗原修复。然后将内源性过氧化物酶阻断剂 (新鲜配置的 3% H_2O_2) 滴加于切片组织上, 室温放置 4 min, 蒸馏水冲洗 2 min。PBS 冲洗 3 min \times 3 次, 加入 10% BSA 封闭液, 室温孵育 10 min, 滴加一抗放入孵育盒中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, PBS 冲洗 3 min \times 3 次, 加入二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min, PBS 冲洗 3 min \times 3 次。加适量现配 DAB 显色剂显色, Harris 苏木素复染后脱水、封片, 于显微镜下观察并采集图像, 每张切片随机采集 3 个 200 倍视野。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件对图像进行分析, 选取统一的棕黄色作为判断阳性的标准, 得到阳性的累积光密度值 (integrated optical density, IOD)、组织的像素面积 (AREA), 求得面密度 (areal density), areal density=IOD/AREA, areal density 值与阳性表达水平成正比。

8 统计学方法 运用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析。多组计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 one-way ANOVA 分析, 方差齐用 SNK 法检验, 方差不齐用 Tamhane's 法检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 小鼠行为学表现的变化情况

1.1 各组小鼠爬杆行为学结果比较 (表 1) 与正常组比较, 模型组小鼠的转向时间和爬下时间均增加 (均 $P<0.01$); 与模型组比较, 中药组小鼠爬下时间减少 ($P<0.01$), 转向时间差异无统计学意义 ($P=0.052$)。中国中西医结合杂志

表 1 各组小鼠爬杆行为学结果比较 (s, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	转向时间	爬下时间
正常	12	0.94 ± 0.12	4.82 ± 0.33
模型	12	2.45 ± 0.31*	6.24 ± 0.66*
中药	12	2.12 ± 0.46	5.73 ± 0.47 [△]

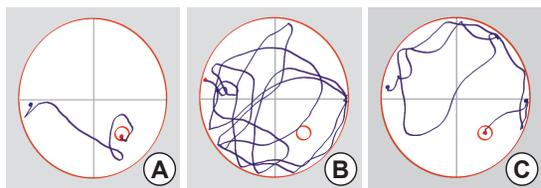
注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$

1.2 各组小鼠学习记忆行为学结果比较(表 2, 图 1) 与正常组比较,模型组小鼠逃避潜伏期延长 ($P < 0.01$),穿越平台次数减少 ($P < 0.01$);与模型组比较,中药组逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$),穿越平台次数增加 ($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠学习记忆行为学结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	逃避潜伏期 (s)	穿越平台次数 (次)
正常	12	10.88 ± 6.99	4.25 ± 1.06
模型	12	39.29 ± 12.20*	1.33 ± 0.65*
中药	12	14.24 ± 11.92 [△]	2.42 ± 0.52 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$



注:A为正常组;B为模型组;C为中药组

图 1 各组小鼠水迷宫路线

2 各组小鼠黑质 TH 阳性表达比较(表 3, 图 2) 正常组小鼠黑质 TH 阳性神经元数目较多,染色较均匀且轮廓较清晰,模型组黑质 TH 阳性神经元数目较正常组减少 ($P < 0.01$),染色较浅而轮廓较不清晰,而中药组较模型组 TH 阳性神经元数目增加 ($P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠脑黑质 TH 面密度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TH
正常	12	0.0154 ± 0.0039
模型	12	0.0003 ± 0.0002*
中药	12	0.0046 ± 0.0017 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$



注:A为正常组;B为模型组;C为中药组;棕黄染色表示 TH 阳性

图 2 各组小鼠黑质 TH 阳性表达比较 (免疫组化染色, × 200)

3 各组小鼠黑质 IL-6、TNF- α 表达比较(表 4, 图 3) 模型组小鼠黑质 IL-6、TNF- α 水平含量均高于正常组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),中药组均低于模型组 ($P < 0.05$)。

表 4 各组小鼠黑质 TNF- α 、IL-6 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6	TNF- α
正常	12	0.0900 ± 0.0566	0.1000 ± 0.0849
模型	12	1.2550 ± 0.1768**	0.6050 ± 0.2899*
中药	12	0.5300 ± 0.0707 [△]	0.3450 ± 0.0495 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

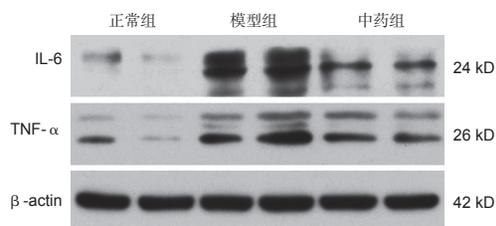


图 3 各组小鼠黑质 TNF- α 、IL-6 蛋白表达电泳图

4 各组小鼠黑质 TLR4、NF- κ B p65、Caspase-3 蛋白表达比较(表 5, 图 4) 模型组小鼠黑质 TLR4、NF- κ B p65、Caspase-3 蛋白表达水平较正常组均升高 (均 $P < 0.01$);中药组较模型组表达水平均降低 (均 $P < 0.05$)。

表 5 各组小鼠黑质 TLR4、NF- κ B p65、Caspase-3 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR4	NF- κ B p65	Caspase-3
正常	12	0.5289 ± 0.0515	0.0438 ± 0.0109	0.3179 ± 0.5836
模型	12	0.8134 ± 0.0486*	0.2653 ± 0.2565*	1.5753 ± 0.6943*
中药	12	0.7313 ± 0.0185 [△]	0.1653 ± 0.0104 [△]	1.3467 ± 0.7485 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

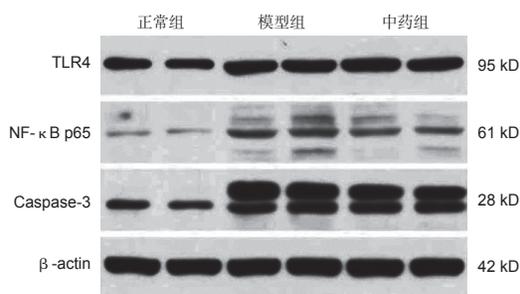


图 4 各组小鼠黑质 TLR4、NF- κ B p65、Caspase-3 蛋白表达电泳图

讨论

PD 属于中医学“颤证”范畴,肾虚血瘀是其关

键病因病机, 治疗当以补肾活血为主^[9,10]。补肾活血方中肉苁蓉、山茱萸为君补肾填精, 温阳益脑, 臣以当归、川芎等药活血化瘀, 佐以石菖蒲豁痰开窍, 又以蜈蚣搜剔之性引药入脑、通络, 全方用药精当, 切中病机。本课题组于临床观察中发现, 加用补肾活血中药可以显著改善 PD 患者运动及非运动症状, 减少西药用量, 缓解不良反应^[11-13]。前期相关基础研究也证实补肾活血中药基于不同机制发挥神经保护作用, 进而抑制 PD 的发生发展^[14-16]。

MPTP 诱导 PD 小鼠模型是目前国际上应用较为广泛的方法之一^[17], 适用于小鼠和非人灵长类动物的造模, 其中 C57/BL6 品系小鼠尤为敏感^[18]。本研究通过连续 1 周腹腔注射 MPTP (30 mg/kg, 1 次/天) 后, 小鼠运动能力显著下降, 出现震颤、运动迟缓、肌肉强直、步态不稳等症状, 并伴有反应迟钝、食欲减低等表现, 且免疫组化检测结果显示模型组和中药组小鼠 TH 阳性神经元数目较正常组显著减少 ($P<0.01$), TH 作为 DA 生物合成途径中的关键酶, 其表达与 DA 能神经元功能状况及 DA 水平成正比, 由此可见 PD 的症状和病理特征在此小鼠模型中均得到了较好的模拟。

爬杆实验结果显示, 模型组、中药组小鼠转向时间和爬下时间均较正常组显著延长 ($P<0.01$), 表现出运动速度减缓、协调能力下降, 而中药组小鼠较模型组爬下时间显著缩短 ($P<0.01$), 运动症状得到改善。Morris 水迷宫实验结果显示, 模型组、中药组小鼠相较正常组逃避潜伏期延长且穿越平台次数减少 ($P<0.01$), 提示学习记忆能力显著受损, 而中药组小鼠较模型组逃避潜伏期缩短 ($P<0.01$), 穿越平台次数增加 ($P<0.01$), 学习记忆能力明显提高, 体现了非运动症状的缓解。补肾活血方干预后 PD 小鼠症状显著、全面的改善, 表明补肾活血方对于 PD 具有较好的治疗作用。

近年来研究证实, 神经炎症作为中心环节在 PD 的发生及进展中普遍存在且持续参与, 其重要性已得到广泛认可^[19,20]。异常聚集的 α -突触核蛋白 (α -Syn) 是 PD 最重要的病理产物, 同时, α -Syn 聚集能激活胶质细胞, 使促炎因子、趋化因子等表达增加, 血脑屏障被破坏, 从而导致 DA 能神经元的炎性损伤^[21]。神经炎症又可进一步促进 α -Syn 错误折叠^[22], 两者形成的恶性循环使慢性神经炎症及 DA 能神经元损伤死亡被不断放大, 也为肾虚与血瘀互为因果, 贯穿于 PD 整个病程这一基本病机提供了结构还原基础。慢性神经炎症与 PD 的发病和恶化密切相

关, 而控制慢性神经炎症的细胞信号传导机制十分复杂。TLR4/NF- κ B 通路是最主要的炎性反应调节通路之一, TLR4 激活 NF- κ B p65 的核转位后, 可直接调节下游炎性因子 TNF- α 、IL-6 等相关基因的表达^[23], 进而放大 PD 的神经炎症。Western Blot 结果显示, 模型组小鼠黑质较正常组 TLR4、NF- κ B p65、TNF- α 、IL-6 表达水平均升高 (均 $P<0.01$), 中药组较模型组显著改善 (均 $P<0.05$)、表明补肾活血方确能抑制 PD 小鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路表达, 减少炎性因子 TNF- α 、IL-6 产生, 降低小鼠脑内的炎症反应。

炎性因子 TNF- α 与其受体 (TNF receptor1, TNFR1) 相结合可触发并启动 Caspase 家族介导的细胞凋亡^[24], 从而加剧 PD 病理进展中的神经损伤。同时 TNF- α 诱导的细胞凋亡又可通过促进细胞因子表达、调控 NF- κ B 的转录程序进一步促进炎症反应^[25], 继而形成 DA 能神经炎性损伤的正反馈。Caspase-3 是处于凋亡有序级联反应下游的执行型蛋白酶, 其表达的升高出现于大多数凋亡过程中^[26]。本研究中 Western Blot 结果显示, 模型组和中药组小鼠黑质内 Caspase-3 蛋白表达较正常组增加 (均 $P<0.01$), 但中药组低于模型组 ($P<0.05$), 提示补肾活血方可减少 Caspase-3 蛋白的产生, 抑制细胞凋亡。免疫组化检测结果显示中药组小鼠黑质内 TH 阳性神经元数目较模型组增加 ($P<0.05$), 可见补肾活血方有效减轻了 PD 小鼠 DA 能神经损伤。综上所述, 本研究显示补肾活血方可改善 PD 症状, 抑制病情发展, 其机制可能是通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路的表达, 下调脑内炎性因子和 Caspase-3 蛋白水平, 从而减轻炎症反应, 降低细胞凋亡, 保护 DA 能神经。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Bennet G 主编. 西氏内科学 (第 8 分册) [M]. 第 21 版. 西安: 世界图书出版公司, 2003: 138.
- [2] Yekstiv J, Podborski E, Winschov R. Parkinson's disease: mechanisms and models[J]. *Neuron*, 2018, 39 (6): 889-909.
- [3] Russo I, Bubacco L, Greggio E. LRRK2 and neuroinflammation: partners in crime in Parkinson's disease?[J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11 (1): 1-9.
- [4] Haoran J, Shaoxia W, Min W, et al.

- Isobavachalcone attenuates MPTP-induced Parkinson's disease in mice by inhibition of microglial activation through NF- κ B pathway[J]. *PLoS One*, 2017, 12 (1): e0169560.
- [5] 郭云霞. 杨明会教授治疗帕金森病学术经验研究 [D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2014.
- [6] 杨明会, 李敏, 窦永起, 等. 补肾活血颗粒对帕金森病患者运动功能的影响: 多中心、随机、双盲、安慰剂对照研究 [J]. *中西医结合学报*, 2010, 8 (3): 231-237.
- [7] 樊开阳, 朱丽娜, 张文利, 等. MPTP 诱导小鼠帕金森病亚急性模型和慢性模型比较 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37 (1): 4-6.
- [8] 施新猷主编. *医学动物实验方法* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1980: 11.
- [9] 李军艳, 杨明会, 赵冠英. 试论肾虚血瘀是帕金森病的基本病机 [J]. *中华中医药杂志*, 2008, 23 (9): 768-771.
- [10] 杨明会, 李敏, 窦永起, 等. 补肾活血法治疗帕金森病的理论探讨 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2009, 15 (11): 812-814.
- [11] 李敏, 杨明会, 刘毅, 等. 补肾活血颗粒治疗帕金森病运动并发症临床研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26 (6): 1296-1299.
- [12] 张鑫. 补肾活血方治疗帕金森病的临床对照研究 [D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2013.
- [13] 李军艳, 杨明会, 窦永起, 等. 补肾活血饮治疗原发性帕金森病的疗效观察 [J]. *解放军医学杂志*, 2011, 36 (3): 273-276.
- [14] 栾振先, 湛盈帆, 秦丽, 等. 基于细胞自噬研究补肾活血方抑制帕金森病模型小鼠 α -突触核蛋白集聚的作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40 (5): 602-607.
- [15] 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.
- [16] 聂金涛. 基于 BDNF 介导的 PI3K/AKT 信号通路补肾活血方药对血管性痴呆大鼠海马神经元保护机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
- [17] Gerlach M, Riederer P, Przuntek H, et al. MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease [J]. *Eur J Pharmacol Molec Pharmacol*, 1991, 208 (4): 273-286.
- [18] William LJ. The MPTP story [J]. *J Parkinson's Dis*, 2017, 7 (s1): S11-S19.
- [19] Ho MS. Microglia in Parkinson's disease [J]. *Adv Exp Med Bio*, 2019, 11 (75): 335-353.
- [20] Niranjana R. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: Focus on astrocytes [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 49 (1): 28-38.
- [21] Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration [J]. *Science*, 2016, 353 (6301): 777-783.
- [22] Gao HM, Kotzbauer PT, Uryu K, et al. Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration [J]. *J Neurosci*, 2008, 28 (30): 7687-7698.
- [23] Wang CX, Xie GB, Zhou CH, et al. Bainscain alleviates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats: Possible involvement of TLR4/NF- κ B-mediated inflammatory pathway [J]. *Brain Res*, 2015, 1594: 245-255.
- [24] Liao J, Zhang L, Zheng JX, et al. Electroacupuncture inhibits annulus fibrosis cell apoptosis *in vivo* via TNF- α -TNFR1-caspase-8 and integrin β 1/Akt signaling pathways [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34 (6): 684-690.
- [25] Zhu K, Liang W, Ma Z, et al. Necroptosis promotes cell-autonomous activation of proinflammatory cytokine gene expression [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (5): 500.
- [26] 毛静, 王丽丽, 李亚, 等. 补肺健脾方对 COPD 大鼠骨骼肌 TNF- α 、Caspase-8 及 Caspase-3 的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33 (6): 2373-2377.

(收稿: 2020-09-08 在线: 2021-03-02)

责任编辑: 李焕荣
英文责编: 张晶晶