

DOI:10. 13288/j. 11-2166/r. 2025. 23. 015

补肾活血颗粒对帕金森病模型小鼠脑纹状体多巴胺稳态及 ERK/CREB/VMAT2 信号通路的影响

孙和昊^{1,2}, 谌盈帆¹, 王鹏¹, 耿小涵¹, 张煜桢¹, 张倩¹, 李敏¹, 李绍旦¹, 杨明会¹✉

1. 中国人民解放军总医院第六医学中心中医医学部, 北京市海淀区阜成路 6 号, 100048; 2. 中国人民解放军医学院

[摘要] **目的** 从多巴胺稳态探讨补肾活血颗粒治疗帕金森病的可能机制。**方法** 将 72 只小鼠随机分为空白组、模型组、美多芭组和补肾活血颗粒低、中、高剂量组, 每组 12 只。除空白组外其余各组小鼠采用腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 连续 7 天诱导构建帕金森病小鼠模型。腹腔注射结束后次日, 补肾活血颗粒低、中、高剂量组小鼠分别给予补肾活血颗粒 1.25、2.5、5.0 mg/(g·d) 灌胃, 美多芭组小鼠给予美多芭片 0.093 8 mg/(g·d) 灌胃, 空白组与模型组小鼠给予蒸馏水 0.2 ml/10 g 灌胃, 均每日 1 次, 持续 14 天。采用旷场实验、爬杆实验与抓力实验进行行为学评价; 免疫组织化学法检测脑纹状体酪氨酸羟化酶 (TH) 表达; 尼氏染色检测纹状体神经元数量; 超高效液相色谱串联质谱法检测纹状体多巴胺 (DA) 与 3,4-二羟基苯基乙酸 (DOPAC) 含量; 透射电镜观察纹状体神经元突触小泡; 免疫荧光检测纹状体囊泡单胺转运蛋白 2 (VMAT2) 表达; 蛋白质印迹法检测纹状体细胞外调节蛋白激酶 (ERK)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (p-ERK)、环磷腺苷效应元件结合蛋白 (CREB)、磷酸化环磷腺苷效应元件结合蛋白 (p-CREB) 及 VMAT2 蛋白水平。**结果** 与空白组比较, 模型组小鼠旷场实验总路程与平均速度下降、总静止时间增加, 爬杆实验中小鼠从开始运动到头完全朝下所需的时间 (T-turn) 与小鼠从开始运动到木杆底部的总时间 (T-total) 均增加, 小鼠前肢抓力下降, 脑纹状体 TH 平均光密度值、VMAT2 蛋白平均荧光强度、DA 含量降低, 纹状体神经元数量减少, DOPAC/DA 升高, 纹状体 p-ERK/ERK、p-CREB/CREB 与 VMAT2 水平降低 ($P<0.01$), 透射电镜结果显示纹状体神经元突触小泡数量与体积明显降低。与模型组比较, 美多芭组和补肾活血低、中、高剂量组小鼠上述各指标均显著改善 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与美多芭组比较, 补肾活血高剂量组纹状体 DA 含量、p-CREB/CREB 升高 ($P<0.05$)。与补肾活血低剂量组比较, 补肾活血高剂量组总路程、平均速度增加, 总静止时间、T-turn 与 T-total 均降低, 小鼠前肢抓力增加, 脑纹状体 VMAT2 蛋白平均荧光强度、DA 含量、p-ERK/ERK、p-CREB/CREB、VMAT2 水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 补肾活血颗粒可能通过调节 ERK/CREB/VMAT2 信号通路促进多巴胺稳态平衡, 缓解帕金森病多巴胺能神经元损伤。

[关键词] 帕金森病; 多巴胺稳态; 补肾活血颗粒; 纹状体; 囊泡单胺转运蛋白 2; 细胞外调节蛋白激酶; 环磷腺苷效应元件结合蛋白

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是临床常见的慢性神经退行性疾病, 其病理特征为中脑黑质致密部与纹状体尾壳核多巴胺 (DA) 能神经元进行性退变与 α 突触核蛋白 (α -Syn) 异常聚集形成路易小体^[1]。DA 正常传递与利用依赖于合成、储

存、释放、再摄取与代谢等过程的平衡, 即多巴胺稳态 (DAH)^[2]。研究发现, DAH 失衡在 PD 发病中发挥重要作用, 囊泡单胺转运蛋白 2 (VMAT2) 表达减少是 DAH 失衡的关键原因之一^[3], 而细胞外调节蛋白激酶 (ERK)/环磷腺苷效应元件结合蛋白 (CREB)/VMAT2 信号通路在 DAH 调节中发挥重要作用, ERK 磷酸化增强, 引起 CREB 自身磷酸化增强, 促进其与 VMAT2 结合, 可增加 VMAT2 在纹状体的表达量^[4]。

基金项目: 国家自然科学基金 (82130117); 中医药传承与创新“百千万”人才工程 (岐黄工程) 岐黄学者 (国中医药人教函〔2018〕284 号)

✉ 通讯作者: ymh9651@sina.com

补肾活血颗粒是本团队根据PD肾虚血瘀的根本病机所创制的治疗PD的代表方剂。既往研究发现,补肾活血颗粒可提高PD患者脑内DA及其转运体水平,发挥治疗作用^[5-6],其机制可能与减轻大脑神经炎症和减少 α -Syn异常聚集的作用有关^[7]。本实验从DAH角度探讨补肾活血颗粒发挥多巴胺能神经元保护作用的潜在分子机制,以期补肾活血颗粒治疗PD的临床应用提供更多依据。本研究经中国人民解放军总医院动物伦理委员会审查批准(批准号:2020-X16-101)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级雄性C57BL/6健康小鼠72只,8周龄,体质量(20±3)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2021-0006。小鼠饲养于军事医学研究院实验动物中心,温度23~25℃,湿度55%~65%,光照与黑暗环境12h/12h循环,自由饮水与摄食,适应性饲养1周。

1.2 药物

补肾活血颗粒组成:肉苁蓉15g,山萸肉20g,丹参20g,赤芍15g,石菖蒲10g等组成,北京九龙制药有限公司生产,规格:10g/袋,每袋药量相当于处方1剂,批号:250101。美多芭片:内含左旋多巴200mg、苄丝肼50mg,由上海罗氏制药有限公司生产,批号:YT2075。

1.3 主要试剂及仪器

1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP,批号:MB3783-100MG,大连美仑生物技术有限公司);苏木素染液(批号:G1004)、柠檬酸抗原修复液(批号:G1202)、酪氨酸羟化酶(TH)抗体(批号:GB11181-100)、DAB显色剂(批号:G1212)、尼氏染液(批号:G1036)、电镜固定液(批号:G1102)、DAPI染色试剂(批号:G1012)、甲苯胺蓝染液(批号:G1032)、ERK抗体(批号:GB11560)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-ERK)抗体(批号:GB11004)、CREB抗体(批号:GB111052)、磷酸化环磷腺苷效应元件结合蛋白(p-CREB)抗体(批号:GB114322)、抗GAPDH(批号:GB15004)、HRP-山羊抗兔(批号:GB23303)、磷酸酶抑制剂混合液(批号:GRF102,上海雅酶生物医药科技有限公司);(批号:G2007)、超敏ECL化学发光试剂盒(批号:G2020),武汉赛维尔生

物科技有限公司;DA(批号:A303863)、3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC,批号:D106475),阿拉丁控股集团有限公司;VMAT2抗体(批号:ab259970),Abcam公司;冰醋酸(批号:10000218),国药集团化学试剂有限公司。

Visu Track啮齿动物行为分析软件(3.0版,上海欣软信息科技有限公司);ZS-ZL型小鼠抓力测定仪(北京众实迪创科技发展有限公司);HT7800型透射电子显微镜(HITACHI公司);Nikon Eclipse E100型正置光学显微镜(日本尼康公司);RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);UPLC I-Class型超高效液相色谱、XEVO TQ-XS型串联四极杆质谱系统,Waters Corporation公司。

1.4 分组与造模

适应性饲养1周后,将72只小鼠按随机数字表法分为空白组,模型组,美多芭组,补肾活血低、中、高剂量组,每组12只。除空白组外,其余各组小鼠均使用MPTP腹腔注射30mg/kg造模,每日注射1次,连续7天^[8]。注射MPTP后小鼠出现震颤、反应迟钝、弓背、抽搐、毛发直立、活动次数减少等症状,提示造模成功^[9]。相同时期内,空白组腹腔注射0.9%氯化钠溶液30ml/kg。

1.5 干预方法

利用人与小鼠的等效剂量系数^[10]进行换算,补肾活血颗粒中剂量组为临床等效剂量,每日给药量为2.5mg/g;补肾活血颗粒低、高剂量组每日给药量分别为补肾活血颗粒中剂量组的0.5、2倍,即1.25、5.0mg/g。美多芭组每日给药剂量为0.0938mg/g。空白组与模型组采取0.2ml/10g蒸馏水灌胃。各组小鼠腹腔注射结束后次日开始灌胃,每日1次,持续14天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 行为学实验 灌胃结束后次日依次进行旷场实验、爬杆实验、抓力实验。

1) 旷场实验^[11]:将白色旷场底板分为4个长50cm、宽50cm的方格,实验期间,保持环境安静,每次在4个方格依次放入4只小鼠,使用Visu Track动物行为分析系统检测5min内小鼠在旷场内的活动轨迹,每次实验结束后用75%乙醇棉球擦拭旷场底板,避免该批小鼠气味、分泌物等对待测小鼠活动轨迹的影响。记录每只小鼠运动总路程、平均速度、总静止时间等指标,评估小鼠运动缺陷。

2) 爬杆实验^[12]:选取一根长50cm,直径

0.8 cm 的木杆, 用纱布缠绕其表面。所有小鼠在灌胃最后 2 天进行爬杆训练。正式测试时, 将小鼠头部向上置于木杆顶部, 并记录小鼠从开始运动到头完全朝下所需的时间 (T-turn) 与小鼠从开始运动到木杆底部的总时间 (T-total)。每只小鼠测试 3 次, 取 3 次的平均值。

3) 抓力实验^[11]: 使用小鼠抓力测试仪, 一手抓住小鼠尾端, 另一手将小鼠前肢放置于抓网上, 水平向后拉动小鼠尾端, 直至小鼠前肢完全脱离抓网, 读取仪器所示前肢对抓网施加的最大抓力, 每只小鼠实验 5 次并取平均值。

1.6.2 免疫组织化学法检测小鼠脑纹状体 TH 表达 行为学测试次日, 使用 1% 戊巴比妥钠溶液 0.1 ml/20 g 腔注射麻醉小鼠后, 使用 0.9% 氯化钠溶液进行心脏灌注。剥离小鼠全脑置于冰上, 镊子剥开皮质, 暴露出完整纹状体, 使用手术刀片完整分离, 左侧纹状体装入冻存管, 保存于 -80 °C 环境, 用于后续超高效液相色谱串联质谱法 (UPLC-MS/MS)、蛋白质印迹实验; 右侧纹状体存放于电镜固定液或通用型组织固定液, 用于免疫组化、尼氏染色、透射电镜观察或免疫荧光分析。

取右侧纹状体, 酒精与二甲苯梯度脱水, 石蜡包埋, 用切片机切出 4 μm 石蜡切片, 依次将切片放入脱蜡液与无水乙醇, 蒸馏水洗涤, 经柠檬酸抗原修复液修复后, 加入 3% 双氧水室温避光孵育, 阻断内源性过氧化物酶, BSA 均匀覆盖纹状体, 封闭 30 min, 加入 TH 一抗 (稀释比例 1 : 1000), 4 °C 过夜, 洗涤 3 次, 加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (稀释比例 1 : 200), 室温孵育 50 min, 洗涤 3 次, 加入 DAB 显色, 镜下视野棕黄色为阳性, 苏木素复染细胞核 3 min 后, 封片, 显微镜下拍照, 用 ImageJ 1.8.0 软件计算平均光密度值。

1.6.3 尼氏染色检测小鼠纹状体神经元数量 采用随机数字表法每组选取 4 只小鼠纹状体石蜡切片, 切片放入尼氏染液 5 min, 0.1% 冰醋酸分化, 显微镜下控制分化程度, 自来水冲洗终止反应, 烤干, 放入二甲苯透明 10 min, 采集图像。使用 ImageJ 1.8.0 软件计算小鼠纹状体神经元数量。

1.6.4 免疫荧光法检测小鼠纹状体 VMAT2 蛋白表达 石蜡切片脱蜡至水后, 水浴 30 min 修复抗原, 切片洗涤 3 次后, 组化笔在纹状体周围画圈, BSA 封闭, 加入一抗 (稀释比 1 : 300), 4 °C 孵育, 洗涤, 加 CY3 标记山羊抗兔 IgG (稀释比例 1 : 300), 孵育 50 min, 加入 DAPI 染液后, 淬灭组织自发荧

光, 封片, 采集图像, 采用 ImageJ 1.8.0 软件计算平均荧光强度。

1.6.5 UPLC-MS/MS 测定小鼠纹状体 DA 与 DOPAC 含量 各组小鼠取左侧纹状体 50 mg, 色谱柱: Waters UPLC HSS PFP (2.1 mm $\times$ 100 mm, 粒径 1.8 μm), 流动相: A 相 (水, 0.1% 甲酸)、B 相 (纯乙腈), 流速: 0.4 ml/min, 进样量: 5.0 μl , 柱温: 35 °C。质谱条件: 离子源电压 3.0 kV、温度 150 °C; 去溶剂化温度 400 °C、去溶剂化气体流速 800 L/h; 锥孔气体流速 150 L/h。采用 TargetLynx 定量软件计算峰面积, 获得定量结果。

1.6.6 透射电镜观察纹状体突触小泡 取各组小鼠右侧纹状体 10 mg, 投入装有 4 °C 电镜固定液的培养皿, 用手术刀片切成 1 mm³ 小块, 放入 0.1 M 磷酸缓冲液 PB 配制的 1% 锇酸固定 2 h。酒精与丙酮在室温下脱水。配制包埋剂 (丙酮 : 812 包埋剂 = 1 : 1), 37 °C 下包埋 4 h 后, 使用包埋剂 (丙酮 : 812 包埋剂 = 1 : 2), 37 °C 渗透过夜, 纯 812 包埋剂 37 °C 包埋 5 h 后, 37 °C 烤箱过夜, 60 °C 聚合 48 h, 将树脂块切成 1.5 μm 切片, 用甲苯胺蓝染色, 光镜下定位。最后用超薄切片机切成 70 nm 切片, 置于铜网上染色, 透射电镜下观察并采集图像。

1.6.7 蛋白质印迹法检测小鼠纹状体 ERK、CREB、VMAT2、p-ERK、p-CREB 蛋白水平 采用随机数字表法选取各组 3 只小鼠左侧纹状体 20 mg, 经 PBS 洗涤 3 次后, 剪成小块置于离心管中, 加入 4 颗 3 mm 的钢珠, 加入 10 倍组织体积的裂解液, 使用匀浆机匀浆 5 min, 放置冰上裂解 30 min, 使用离心机 4 °C、12 000 r/min (离心半径 86.75 mm) 离心 10 min, 收集上清。部分上清 1 : 10 稀释后, 进行 BCA 蛋白定量, 4 : 1 加入蛋白上样缓冲液, 沸水浴变性 15 min。配制电泳胶后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭, 洗脱。以 1 : 1000 稀释 ERK、p-ERK、CREB、p-CREB、VMAT2 抗体; 1 : 10 000 稀释 GAPDH 抗体, 4 °C 孵育过夜。TBST 洗脱后, 1 : 5000 稀释 HRP 山羊抗兔, 室温孵育 30 min, 曝光, 并收集条带图像, 用 AIWBwell™ 分析软件计算灰度值。

1.7 统计学方法

采用 Graphpad Prism 9.5 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐采用单因素方差分析进行多组间比较, 组间两两比较采用 Tukey 法检验; 方差不齐采用 Dunnett-*T*⁸ 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 1 各组小鼠旷场实验指标比较

Table 1 Comparison of open field test results among groups of mice (x̄±s)				
组别	鼠数	总路程/mm	平均速度/mm·s ⁻¹	总静止时间/s
空白组	12	23336.25±3577.79	77.43±11.88	68.45±20.04
模型组	12	8244.82±1949.16 ^{a)}	26.86±5.95 ^{a)}	182.52±20.46 ^{a)}
美多芭组	12	19395.26±5595.89 ^{b)}	64.11±18.68 ^{b)}	76.40±23.43 ^{b)}
补肾活血低剂量组	12	15232.89±3569.75 ^{b)}	50.12±12.11 ^{b)}	103.38±32.11 ^{b)}
补肾活血中剂量组	12	16871.94±2289.49 ^{b)}	55.80±7.59 ^{b)}	92.07±12.54 ^{b)}
补肾活血高剂量组	12	21266.25±6010.95 ^{b) c)}	70.52±19.85 ^{b) c)}	73.21±24.63 ^{b) d)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与补肾活血低剂量组比较, $P<0.01$; d) 与补肾活血低剂量组比较, $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠旷场实验结果比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组小鼠旷场实验总路程与平均速度降低, 总静止时间增加 ($P<0.01$)。与模型组比较, 美多芭组及补肾活血低、中、高剂量组总路程、平均速度增加, 总静止时间降低 ($P<0.01$)。与美多芭组比较, 补肾活血低、中、高剂量组各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与补肾活血低剂量组比较, 补肾活血高剂量组总路程、平均速度增加, 总静止时间降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.2 各组小鼠爬杆实验结果比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组小鼠 T-turn 与 T-total 均增加 ($P<0.01$)。与模型组比较, 美多芭组和补肾活血低、中、高剂量组小鼠 T-turn 与 T-total 均降低 ($P<0.01$)。与补肾活血低剂量组比较, 补肾活血高剂量组和美多芭组小鼠 T-turn 与 T-total 均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 2 各组小鼠爬杆实验结果比较

Table 2 Comparison of pole test results among groups of mice (s, x̄±s)			
组别	鼠数	T-turn	T-total
空白组	12	1.55±0.20	9.68±1.20
模型组	12	8.40±0.77 ^{a)}	25.26±1.53 ^{a)}
美多芭组	12	3.92±0.42 ^{b) c)}	11.66±1.72 ^{b) d)}
补肾活血低剂量组	12	5.18±0.81 ^{b)}	13.32±1.15 ^{b)}
补肾活血中剂量组	12	4.44±0.40 ^{b)}	11.92±1.37 ^{b)}
补肾活血高剂量组	12	3.70±0.98 ^{b) c)}	10.49±1.24 ^{b) c)}

注: T-turn, 小鼠从开始运动到头完全朝下所需的时间; T-total, 小鼠从开始运动到木杆底部的总时间。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与补肾活血低剂量组比较, $P<0.01$; d) 与补肾活血低剂量组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠抓力实验结果及脑纹状体 TH 表达比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组小鼠前肢抓力和脑纹状体 TH 平均光密度值降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 美多芭组与补肾活血低、中、高剂量组小鼠前肢抓力增加, 脑纹状体 TH 平均光密度值升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与补肾活血低剂量组比较, 补肾活血中、高剂量组和美多芭组小鼠前肢抓力增加 ($P<0.01$)。各给药组小鼠脑纹状体 TH 平均光密度值差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠脑纹状体 TH 表达免疫组化图见图 1。

表 3 各组小鼠前肢抓力及脑纹状体 TH 平均光密度值比较
Table 3 Comparison of forelimb grip strength and mean optical density of TH in the striatum among groups (x̄±s)

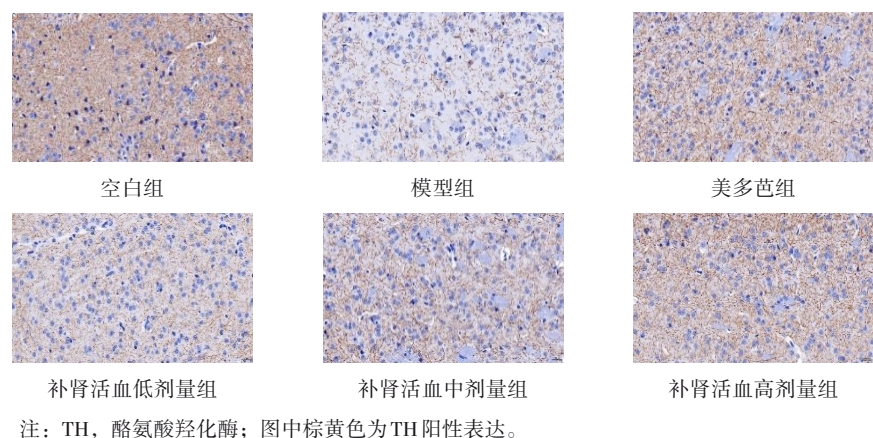
组别	鼠数	前肢抓力/N	TH 平均光密度值
空白组	12	1.56±0.11	0.40±0.05
模型组	12	0.36±0.05 ^{a)}	0.26±0.01 ^{a)}
美多芭组	12	1.11±0.15 ^{b) d)}	0.37±0.03 ^{b)}
补肾活血低剂量组	12	0.74±0.20 ^{b)}	0.34±0.03 ^{c)}
补肾活血中剂量组	12	1.02±0.21 ^{b) d)}	0.36±0.05 ^{b)}
补肾活血高剂量组	12	1.19±0.15 ^{b) d)}	0.38±0.01 ^{b)}

注: TH, 酪氨酸羟化酶。

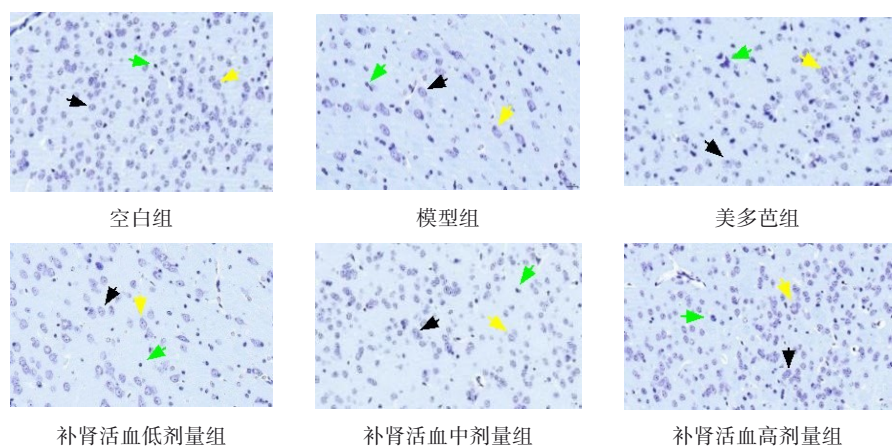
a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与补肾活血低剂量组比较, $P<0.01$ 。

2.4 各组小鼠纹状体神经元数量及 VMAT2 蛋白平均荧光强度比较

图 2 示, 空白组小鼠纹状体神经元细胞数量密集, 排列紧凑整齐, 尼氏小体结构完整。模型组小鼠纹状体神经元细胞数量减少, 排列紊乱无序, 尼氏小体结构缺损。与模型组比较, 美多芭组与补肾活血低、中、高剂量组小鼠纹状体神经元细胞数量增加, 排列较为密集有序, 尼氏小体结构较为完整。表 4 示, 与空白组比较, 模型组小鼠纹状体神经元数量减少, 纹状体 VMAT2 蛋白平均荧光强度降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 美多芭组与补



注：TH，酪氨酸羟化酶；图中棕黄色为TH阳性表达。
图1 各组小鼠脑纹状体TH表达（免疫组化，×400）
Figure 1 Comparison of striatal TH expression among groups (Immunohistochemistry, ×400)



注：黑色箭头代表正常神经元细胞，绿色代表坏死神经元细胞，黄色代表尼氏小体。
图2 各组小鼠纹状体神经元尼氏染色图（×400）
Figure 2 Nissl staining images of striatal neurons in mice in each group (×400)

表4 各组小鼠纹状体神经元数量及VMAT2蛋白平均荧光强度比较

Table 4 Comparison of striatal neuronal counts and VMAT2 protein mean fluorescence intensity in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	神经元数量/个	VMAT2蛋白平均荧光强度
空白组	4	216.50±15.16	29.91±2.55
模型组	4	112.25±12.82 ^{a)}	8.99±2.00 ^{a)}
美多芭组	4	181.25±22.23 ^{b)}	19.91±3.09 ^{b) d)}
补肾活血低剂量组	4	162.25±25.95 ^{c)}	16.24±2.13 ^{c) e)}
补肾活血中剂量组	4	177.50±29.23 ^{b)}	20.96±3.06 ^{b) d)}
补肾活血高剂量组	4	184.75±21.70 ^{b)}	27.48±3.56 ^{b)}

注：VMAT2，囊泡单胺转运蛋白2。

a) 与空白组比较， $P < 0.01$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.01$ ；c) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；d) 与补肾活血高剂量组比较， $P < 0.05$ ；e) 与补肾活血高剂量组比较， $P < 0.01$ 。

肾活血低、中、高剂量组小鼠纹状体神经元数量增加，纹状体VMAT2蛋白平均荧光强度升高（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ）。与补肾活血高剂量组比较，美

多芭组及补肾活血低、中剂量组纹状体VMAT2蛋白平均荧光强度降低（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ）。

2.5 各组小鼠脑纹状体DA含量及DOPAC/DA值比较

表5示，与空白组比较，模型组小鼠纹状体DA含量降低，DOPAC/DA值升高（ $P < 0.01$ ）。与模型组比较，美多芭组和补肾活血低、中、高剂量组小鼠纹状体DA含量升高，DOPAC/DA值降低（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ）。与补肾活血高剂量组比较，美多芭组及补肾活血低、中剂量组小鼠纹状体DA含量降低（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ），而DOPAC/DA值各给药组差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。

2.6 各组小鼠脑纹状体神经元突触小泡透射电镜观察结果比较

图3示，透射电镜下肉眼观察发现，与空白组比较，模型组小鼠脑纹状体神经元突触小泡数量明显减少，体积减小。与模型组比较，美多芭组和补

表5 各组小鼠脑纹状体DA含量与DOPAC/DA值比较

Table 5 Comparison of DA content and DOPAC/DA in the striatum of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	DA/ng·mg ⁻¹	DOPAC/DA
空白组	12	6.52±0.70	0.93±0.06
模型组	12	1.95±0.30 ^{a)}	1.62±0.08 ^{a)}
美多芭组	12	4.61±0.44 ^{b) d)}	1.16±0.30 ^{c)}
补肾活血低剂量组	12	3.67±0.62 ^{c) e)}	1.20±0.16 ^{c)}
补肾活血中剂量组	12	4.30±0.61 ^{b) d)}	1.18±0.17 ^{c)}
补肾活血高剂量组	12	6.05±0.93 ^{b)}	1.06±0.20 ^{b)}

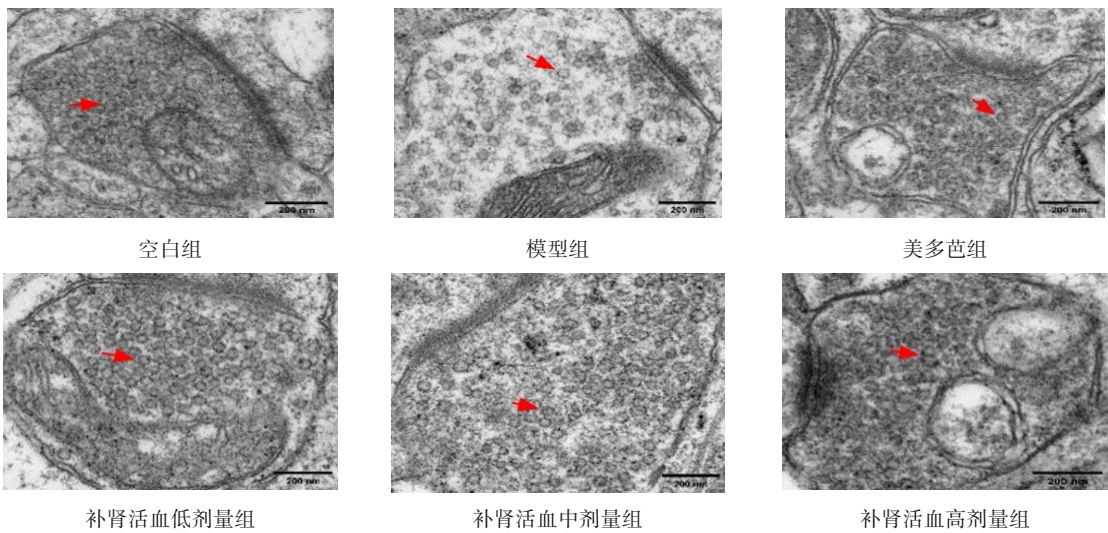
注：DA，多巴胺；DOPAC，3,4-二羟基苯基乙酸；DOPAC/DA值评价DA代谢状态，反映DAH平衡状况。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与补肾活血高剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与补肾活血高剂量组比较， $P<0.01$ 。

肾活血低、中、高剂量组突触小泡数量增加，体积增大，且以补肾活血高剂量组更显著。

2.7 各组小鼠脑纹状体p-ERK/ERK、p-CREB/CREB、VMAT2水平比较

表6示，与空白组比较，模型组小鼠纹状体p-ERK/ERK、p-CREB/CREB与VMAT2水平降低($P<0.01$)。与模型组比较，美多芭组及补肾活血低、中、高剂量组小鼠纹状体p-ERK/ERK、p-CREB/CREB与VMAT2水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与美多芭组比较，补肾活血低、中剂量组p-ERK/ERK降低，补肾活血高剂量组p-CREB/CREB、VMAT2水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与补肾活血低、中剂量组比较，补肾活血高剂量组p-ERK/ERK与VMAT2水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与补肾活血低剂量组比较，补肾活血中、高剂量组p-CREB/CREB升高($P<0.01$)。各组小鼠纹状体ERK、CREB、p-ERK、p-CREB、VMAT2蛋白电泳图见图4。



注：红色箭头指示为神经元突触小泡。

图3 各组小鼠脑纹状体神经元突触小泡透射电镜图（×40 000）

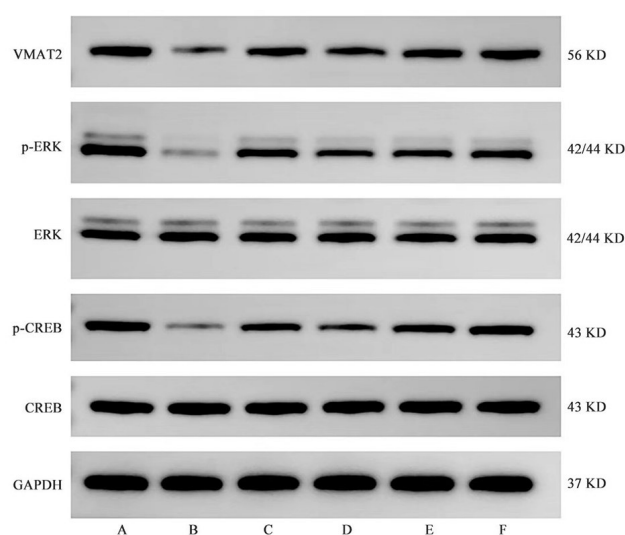
Figure 3 Transmission electron microscopy images of striatal neuronal synaptic vesicles in mice of each group (×40 000)

表6 各组小鼠脑纹状体p-ERK/ERK、p-CREB/CREB、VMAT2水平比较

Table 6 Comparison of p-ERK/ERK, p-CREB/CREB and VMAT2 levels in the striatum of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	p-ERK/ERK	p-CREB/CREB	VMAT2
空白组	3	1.42±0.01	0.79±0.08	0.77±0.03
模型组	3	0.15±0.02 ^{a)}	0.13±0.02 ^{a)}	0.22±0.01 ^{a)}
美多芭组	3	0.75±0.06 ^{b)}	0.39±0.06 ^{b)}	0.49±0.03 ^{b)}
补肾活血低剂量组	3	0.45±0.04 ^{b) d)}	0.28±0.04 ^{c)}	0.40±0.03 ^{b)}
补肾活血中剂量组	3	0.55±0.03 ^{b) e)}	0.53±0.07 ^{b) f)}	0.49±0.03 ^{b)}
补肾活血高剂量组	3	0.88±0.12 ^{b) f) g)}	0.64±0.05 ^{b) d) f)}	0.60±0.05 ^{b) e) f) h)}

注：p-ERK，磷酸化细胞外调节蛋白激酶；ERK，细胞外调节蛋白激酶；p-CREB，磷酸化环磷腺苷效应元件结合蛋白；CREB，环磷腺苷效应元件结合蛋白；VMAT2，囊泡单胺转运蛋白2；p-ERK/ERK、p-CREB/CREB是评估ERK与CREB磷酸化水平与该通路活性的有效指标。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与美多芭组比较， $P<0.01$ ；e) 与美多芭组比较， $P<0.05$ ；f) 与补肾活血低剂量组比较， $P<0.01$ ；g) 与补肾活血中剂量组比较， $P<0.01$ ；h) 与补肾活血中剂量组比较， $P<0.05$ 。



注：VMAT2，囊泡单胺转运蛋白 2；p-ERK，磷酸化细胞外调节蛋白激酶；ERK，细胞外调节蛋白激酶；p-CREB，磷酸化环磷腺苷效应元件结合蛋白；CREB，环磷腺苷效应元件结合蛋白；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶；A，空白组；B，模型组；C，美多芭组；D，补肾活血低剂量组；E，补肾活血中剂量组；F，补肾活血高剂量组。

图 4 各组小鼠纹状体 ERK、CREB、p-ERK、p-CREB、VMAT2 蛋白印迹图

Figure 4 Western Blotting results of ERK, CREB, p-ERK, p-CREB, and VMAT2 proteins in the striatum of mice in each group

3 讨论

中医学将 PD 归属为“颤证”的范畴，病机总属本虚标实。本课题组认为 PD 病位在脑，根本在肾，肾虚血瘀为 PD 根本病机^[13]。肾之精气渐亏，精不生髓，髓无以上充于脑，脑窍失充，清窍不清；精不生血化气，气机不利，瘀血内阻，脑脉涩滞，清窍不通；血不荣筋，则筋脉颤动，故发为 PD。因此，治以补肾活血为根本大法。补肾活血颗粒以山萸肉、肉苁蓉为君，补肾填精养血；丹参、赤芍为臣，活血化瘀通络；石菖蒲为佐，开窍豁痰通络。全方共奏补肾活血之功。课题组前期研究^[14]发现，补肾活血颗粒可显著缓解 PD 患者临床症状，提高脑内 DA 含量。实验研究^[15-16]发现，补肾活血颗粒可通过抑制铁死亡、缓解神经炎症等途径缓解 PD 模型小鼠病理学特征。

研究^[17]表明，中枢神经系统 DAH 失衡可影响神经回路与情绪、认知、运动系统，DAH 失衡是 PD 发生的主要病理机制之一。在纹状体多巴胺能神经元中，TH 催化酪氨酸合成 L-3,4-二羟基苯丙氨酸（L-DOPA），继而 L-DOPA 在芳香族氨基酸脱羧酶的催化作用下，转化为 DA^[18]。随后，突触前膜 VMAT2 通过主动运输，将 DA 迅速包装入突触小

泡，囊泡内酸性 PH 值维持其理化性质稳定，防止其因异常代谢产生神经毒性^[19]。在神经元去极化后，突触小泡以钙依赖形式将 DA 释放于突触间隙，与突触后膜多种 DA 受体相结合，发挥其对运动与认知功能的调节能力^[20]。此外，突触小泡内 DA 通过主动运输与被动外排使 DA 浓度保持动态平衡，发挥神经保护作用^[21]。因此，DAH 平衡在缓解 PD 运动及非运动症状方面起到重要作用。在 PD 病理状态下，多巴胺能神经元胞质内生成的 DA 无法由突触小泡包装，而大量游离于胞质中，通过单胺氧化酶催化作用，DA 被氧化为具有强烈神经毒性的 3,4-二羟基苯乙醛和过氧化氢，随后，在醛脱氢酶的催化下，3,4-二羟基苯乙醛氧化为 DOPAC，最终通过儿茶酚-O-甲基转移酶甲基化形成高香草酸，此过程导致 DA 囊泡内含量与利用率显著降低，从而加重 PD 病理损伤^[22]。

VMAT2 是维持 DAH 平衡的关键蛋白之一^[23]。研究^[24]发现，VMAT2 转录与翻译水平下调可加重 PD 大鼠多巴胺能神经元损伤等典型病理学特征，同时，其下调水平与病情严重程度呈正相关。另有研究^[25]表明，ERK/CREB 通路的激活引起下游信号级联反应，对 PD 模型小鼠发挥神经保护作用。同时 CREB 被证实可维持 VMAT2 的基础水平，其磷酸化可上调下游 VMAT2 的表达，继而诱导 DA 包裹于突触小泡中，减轻 DA 神经毒性，恢复 DAH 平衡，改善 PD 病理特征^[26]。

本研究采用 MPTP 腹腔注射诱导 PD 小鼠模型，并设立美多芭为阳性对照，观察补肾活血颗粒对 PD 小鼠神经保护作用。本研究结果显示，模型组小鼠在旷场、爬杆与抓力实验中出现明显抑郁焦虑状态及运动障碍，同时纹状体 TH 阳性神经元显著减少，提示 MPTP 诱导的 PD 模型构建成功。TH 是鉴别 DA 能神经元功能的金标准标志物，其在黑质与纹状体表达降低是 PD 的关键病理特征^[27]。美多芭与补肾活血颗粒可显著改善 PD 模型小鼠行为学表现并增加 TH 阳性神经元表达。在旷场实验中美多芭组与补肾活血颗粒低、中、高剂量组效果相当，补肾活血高剂量效果优于低剂量。爬杆与抓力实验中美多芭组与补肾活血颗粒中、高剂量组效果相当，补肾活血高剂量疗效优于低剂量。此外，美多芭与补肾活血低、中、高剂量在提高 TH 表达方面效果相当。尼氏小体染色结果可见，模型组小鼠纹状体神经元数量减少，排列紊乱，尼氏小体结构缺损；美多芭组与补肾活血颗粒低、中、高剂量组

显著增加神经元数量,恢复紧凑排列,改善尼氏小体结构缺损,表明美多芭与补肾活血颗粒可改善纹状体神经元形态,缓解多巴胺能神经元损伤。模型组小鼠纹状体 DA 含量减少、DOPAC/DA 增加,提示 DA 代谢增强,利用率下降。DOPAC/DA 是评价 DA 代谢状态与利用率的重要生化指标,反映 DAH 的平衡状况^[28]。美多芭组与补肾活血颗粒低、中、高剂量组显著提高纹状体 DA 含量,并降低 DOPAC/DA,抑制 DA 代谢,提高利用率,提示美多芭与补肾活血颗粒通过提高 DA 含量,抑制 DA 代谢,促进 DAH 平衡,其中补肾活血高剂量组提高纹状体 DA 含量的效果优于美多芭组与补肾活血低、中剂量组。此外,模型组小鼠纹状体神经元突触小泡数量与体积明显减少,纹状体 p-ERK/ERK、p-CREB/CREB、VMAT2 显著降低,而补肾活血颗粒可增加纹状体神经元突触小泡数量与体积,提高 p-ERK/ERK、p-CREB/CREB、VMAT2 表达,调节 DAH,其中补肾活血颗粒高剂量组效果最优,表明补肾活血颗粒通过激活 ERK/CREB/VMAT2 信号通路改善 MPTP 诱导 PD 模型小鼠 DAH 失衡。

综上,补肾活血颗粒可能通过激活 ERK/CREB/VMAT2 信号通路,增强 VMAT2 表达,改善 DAH 平衡,从而抑制 MPTP 诱导 PD 小鼠多巴胺能神经元损伤,缓解运动缺陷及焦虑状态。但本研究未采用体外实验、抑制剂或基因敲除小鼠验证此信号通路的必要性,且通路关键节点仅测定蛋白表达量变化,缺乏脑微透析技术等先进技术验证,后续实验应结合体外实验等方式进一步探讨补肾活血颗粒调控 DAH 的机制。

参考文献

- [1] 雒晓东,李哲,朱美玲,等. 帕金森病(颤拘病)中医临床诊疗专家共识[J]. 中医杂志, 2021, 62(23): 2109-2116.
- [2] BUCHER ML, DICENT J, DUARTE HOSPITAL C, et al. Neurotoxicology of dopamine: victim or assailant? [J]. Neurotoxicology, 2024, 103: 175-188. doi: 10.1016/j.neuro. 2024. 06. 001.
- [3] BUCHER ML, BARRETT CW, MOON CJ, et al. Acquired dysregulation of dopamine homeostasis reproduces features of Parkinson's disease [J]. NPJ Parkinsons Dis, 2020, 6(1):34.
- [4] ZHAO M, ZHOU Y, SHENG R, et al. Gastrodin relieves Parkinson's disease-related motor deficits by facilitating the MEK-dependent VMAT2 to maintain dopamine homeostasis [J]. Phytomedicine, 2024, 132: 155819. doi: 10.1016/j.phymed. 2024. 155819.
- [5] 李绍旦,杨明会,刘毅. 补肾活血颗粒辅助治疗对帕金森病患者脑内多巴胺神经递质及多巴胺转运蛋白的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(5): 622-625.
- [6] 李明伟,杨文学,齐小荣,等. 补肾活血颗粒治疗帕金森病非运动症状的临床研究[J]. 中华保健医学杂志, 2023, 25(1): 24-27.
- [7] 陈琦,王鹏,谌盈帆,等. 补肾活血颗粒对帕金森病模型小鼠大脑黑质 Nrf2/NLRP3 炎症小体轴的影响[J]. 中医杂志, 2025, 66(4): 390-398.
- [8] 齐月,黄金泳,张子炜,等. MPTP 诱导的帕金森病小鼠模型表型特点 [J]. 神经解剖学杂志, 2022, 38(1): 107-110.
- [9] SANTORO M, FADDA P, KLEPHAN KJ, et al. Neurochemical, histological, and behavioral profiling of the acute, sub-acute, and chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. J Neurochem, 2023, 164(2): 121-142.
- [10] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2010: 70-73.
- [11] 刘燕,李宇轩,李杰,等. 基于动物运动轨迹分析系统探讨旷场实验的规范化研究 [J]. 实验动物科学, 2024, 41(5): 55-58.
- [12] ZHANG QS, HENG Y, MOU Z, et al. Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease [J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38(10): 1317-1328.
- [13] 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.
- [14] 杨明会,李敏,窦永起,等. 补肾活血颗粒对帕金森病患者脑内多巴胺水平的影响 [J]. 中医杂志, 2011, 52(4): 299-302.
- [15] 谌盈帆,栾振先,李绍旦,等. 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 [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(3): 350-355.
- [16] 李晨,王鹏,王亮,等. 补肾活血颗粒对亚急性帕金森病模型小鼠脑黑质多巴胺神经元铁死亡的影响 [J]. 中医杂志, 2022, 63(15): 1463-1469.
- [17] KIM S, KANG S, CHOE J, et al. A microfluidic system for investigating anticipatory medication effects on dopamine homeostasis in dopaminergic cells [J]. Anal Chem, 2023, 95(6): 3153-3159.
- [18] TAI M, GAMIZ-ARCO G, MARTINEZ A. Dopamine synthesis and transport: current and novel therapeutics for parkinsonisms [J]. Biochem Soc Trans, 2024, 52(3): 1275-1291.

- [19] MULVIHILL KG. Presynaptic regulation of dopamine release: role of the DAT and VMAT2 transporters [J]. *Neurochem Int*, 2019, 122: 94–105. doi: 10.1016/j.neuint.2018.11.004.
- [20] BIOSA A, ARDUINI I, SORIANO ME, et al. Dopamine oxidation products as mitochondrial endotoxins, a potential molecular mechanism for preferential neurodegeneration in Parkinson's disease [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2018, 9(11): 2849–2858.
- [21] WANG Y, ZHANG P, CHAO Y, et al. Transport and inhibition mechanism for VMAT2-mediated synaptic vesicle loading of monoamines [J]. *Cell Res*, 2024, 34(1): 47–57.
- [22] NAOI M, MARUYAMA W, SHAMOTO-NAGAI M, et al. Toxic interactions between dopamine, α -synuclein, monoamine oxidase, and genes in mitochondria of Parkinson's disease [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2024, 131(6): 639–661.
- [23] LOHR KM, MASOUD ST, SALAHPOUR A, et al. Membrane transporters as mediators of synaptic dopamine dynamics: implications for disease [J]. *Eur J Neurosci*, 2017, 45(1): 20–33.
- [24] TANG J, XU Y, LIU C, et al. PET imaging with [^{18}F] FP- (+) -DTBZ in 6-OHDA-induced partial and full unilaterally-lesioned model rats of Parkinson's disease and the correlations to the biological data [J]. *Nucl Med Biol*, 2020, 90–91: 1–9. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2020.08.002.
- [25] DING Y, ZHOU M, ZHENG R, et al. Feruloylated oligosaccharides ameliorate MPTP-induced neurotoxicity in mice by activating ERK/CREB/BDNF/TrkB signalling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 108: 154512. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154512.
- [26] GU X, LIU L, SHEN Q, et al. Photoactivation of ERK/CREB/VMAT2 pathway attenuates MPP⁺-induced neuronal injury in a cellular model of Parkinson's disease [J]. *Cell Signal*, 2017, 37: 103–114. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.06.007.
- [27] JIN M, MATSUMOTO S, AYAKI T, et al. DOPAnization of tyrosine in α -synuclein by tyrosine hydroxylase leads to the formation of oligomers [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6880.
- [28] LI C, SUN Y, YANG W, et al. Pilose antler extracts (PAEs) protect against neurodegeneration in 6-OHDA-induced Parkinson's disease rat models [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 7276407. doi: 10.1155/2019/7276407.

Effect of *Bushen Huoxue Granule* (补肾活血颗粒) on Dopamine Homeostasis and ERK/CREB/VMAT2 Signaling Pathways in the Striatum in Parkinson's Disease Model Mice

SUN Hehao^{1,2}, CHEN Yingfan¹, WANG Peng¹, GENG Xiaohan¹, ZHANG Yuzhi¹, ZHANG Qian¹, LI Min¹, LI Shaodan¹, YANG Minghui¹

1. Department of Traditional Chinese medicine, The sixth medical center, The People's Liberation Army General Hospital, Beijing, 100048; 2. Chinese People's Liberation Army Medical School

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Bushen Huoxue Granule* (补肾活血颗粒, BHG) in treating Parkinson's disease (PD) from the perspective of dopamine (DA) homeostasis. **Methods** Seventy-two mice were randomly divided into blank group, model group, madopar group and BHG low-, medium- and high-dose groups, with 12 mice in each group. Except for the blank group, all mice were administered intraperitoneal injections of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) for 7 consecutive days to induce a PD model. On the day following the injection, BHG low-, medium- and high-dose groups were administered BHG at doses of 1.25, 2.5, and 5.0 mg/(g·d) by oral gavage, respectively, while the madopar group received madopar tablets at dose of 0.0938 mg/(g·d) by oral gavage. The blank group and the model group were given 0.2 ml/10 g of distilled water by gavage. All treatments were given once daily for 14 days. Open field test, pole climbing test and grip test were used to evaluate the behavior of mice in each group. Immunohistochemistry was used to detect the expression of tyrosine hydroxylase (TH) in striatum. Nissl staining was used to detect the activity of striatal neurons. The contents of DA and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in striatum were detected by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. The number and volume of synaptic vesicles were observed by transmission electron microscope. The expression of vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in striatum was detected by immunofluorescence. Western Blot was used to detect the expression of extracellular signal-regulated kinase (ERK), phosphorylated ERK

(p-ERK), cAMP response element-binding protein (CREB), phosphorylated CREB (p-CREB) and VMAT2 in striatum. **Results** Compared to the blank group, mice in the model group showed a significant decline in total distance and average speed in the open field test, along with an increase in total resting time; in the pole test, both the time required for the mice to turn completely downward (T-turn) and the total time taken to reach the bottom of the pole (T-total) were prolonged; forelimb grip strength was reduced; in the striatum, the mean optical density of TH, the average fluorescence intensity of VMAT2 protein, and DA content all decreased, while the number of striatal neurons was reduced, and the DOPAC/DA ratio was elevated; the levels of p-ERK/ERK, p-CREB/CREB, and VMAT2 in the striatum significantly decreased ($P < 0.01$); transmission electron microscopy revealed that both the number and volume of synaptic vesicles in striatal neurons were markedly reduced. Compared to the model group, mice in the madopar group and BHG low-, medium- and high-dose groups showed significant improvements in all the above indicators ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to madopar group, the BHG high-dose group exhibited increased DA content and elevated p-CREB/CREB ratio in the striatum ($P < 0.05$). Compared to the BHG low-dose group, the BHG high-dose group showed increased total distance and mean velocity, decreased total resting time, T-turn, and T-total, as well as enhanced forelimb grip strength; moreover, the average fluorescence intensity of VMAT2 protein, DA content, p-ERK/ERK, p-CREB/CREB, and VMAT2 levels in the striatum were all significantly elevated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** BHG may restore DA homeostasis and alleviate the damage of dopaminergic neurons by regulating ERK/CREB/VMAT2 signaling pathway.

Keywords Parkinson's disease; dopamine homeostasis; *Bushen Huoxue Granules* (补肾活血颗粒); striatum; vesicular monoamine transporter 2; extracellular regulated protein kinase; cAMP response element-binding protein

(收稿日期: 2025-08-20; 修回日期: 2025-09-27)

[编辑: 邓 媛]

读者·作者·编者

如何正确引用网络文献

正确引用的参考文献是学术论文的重要组成部分,除传统的印刷版文献外,参考文献还包括了大量的网络文献。常见的网络文献资源包括电子公告(EB/OL)、电子图书(M/OL)、电子期刊(J/OL)、报纸(N/OL)、数据库(DB/OL)、专利文献(P/OL)等。根据《GB/T 7714—2015 信息与文献 参考文献著录规则》,不同文献类型有相应的著录格式。以下为电子资源著录格式。

著录格式

主要责任者. 题名:其他题名信息[文献类型标识/文献载体标识]. 出版地:出版者,出版年:引文页码(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问路径. 数字对象唯一标识符.

著录格式示例

- [1] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室. 关于印发新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知[EB/OL]. (2020-03-03)[2020-03-17]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-03-04/content_5486705.htm.
- [2] 仝小林,李修洋,赵林华,等. 从“寒湿疫”角度探讨新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的中医药防治策略[J/OL]. 中医杂志. (2020-02-19)[2020-02-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2166.R.20200217.2034.006.html>.
- [3] 罗兰. “国医大师”王琦院士开的预防药方来了[N/OL]. 长江日报. (2020-01-29)[2020-05-12]. <http://www.cjrbapp.cjn.cn/wuhan/p/154889.html>.

(本刊编辑部)