

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.02.012

补肾止颤方对帕金森病模型大鼠多巴胺能神经元铁死亡及 Nrf2 调控 SLC7A11/GSH/GPX4 信号通路的影响

胡玉英¹✉, 陈伟营², 宋曦¹, 黎晓东¹, 刘姗姗¹, 罗智慧²

1. 广西中医药大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市东葛路 89-9 号, 530023; 2. 广西中医药大学

[摘要] **目的** 从铁死亡角度探讨补肾止颤方治疗帕金森病(PD)的可能作用机制。**方法** 70 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)抑制剂组、多巴丝肼组及补肾止颤方低、中、高剂量组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组大鼠采用蛋白酶抑制剂皮下注射建立 PD 大鼠模型。造模 2 周后, Nrf2 抑制剂组大鼠予 ML385 小分子化合物 50 mg/kg 腹腔注射, 隔日 1 次, 共 3 次, 其余各组大鼠于同时点予 2 ml/kg 生理盐水腹腔注射。造模 4 周后, 补肾止颤方低、中、高剂量组分别给予补肾止颤方颗粒剂溶液 1.0、1.5、2.0 ml/(100 g·d) 灌胃, 多巴丝肼组则予多巴丝肼片 200 mg/(100 g·d) 灌胃, 对照组、模型组、Nrf2 抑制剂组大鼠均以生理盐水按 2.0 ml/(100 g·d) 灌胃。各组大鼠灌胃 3 周后, 采用网格实验、爬杆实验进行行为学检测, 对 PD 大鼠的运动功能进行评估; 采用 qRT-PCR 法检测大鼠中脑黑质 Nrf2 mRNA 表达, Western Blot 法检测 Nrf2、溶质载体家族 7 成员(SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)蛋白水平, ELISA 法检测谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)含量、亚铁离子(Fe^{2+})、GPX4 含量, 荧光酶标仪检测活性氧(ROS)水平。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠网格实验移动潜伏期、爬杆时间均增加, 中脑黑质区 GSH、GPX4 含量降低, Fe^{2+} 、MDA 含量升高, Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白水平均降低, ROS 水平升高, Nrf2 mRNA 表达下降($P<0.05$); Nrf2 抑制剂组上述各指标与模型组变化趋势相同, 且程度较模型组更显著, 与模型组、对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较, 多巴丝肼组和补肾止颤方低、中、高各剂量组各指标均改善($P<0.05$), 且补肾止颤方高剂量组和多巴丝肼组各指标均较补肾止颤方低、中剂量组改善更为显著($P<0.05$); 补肾止颤方高剂量组和多巴丝肼组改善情况差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 补肾止颤方可能通过激活中脑黑质 Nrf2 表达, 调控 SLC7A11/GSH/GPX4 信号通路, 从而抑制脂质过氧化和铁死亡, 达到治疗 PD 的目的。

[关键词] 帕金森病; 铁死亡; 补肾止颤方; 脂质过氧化; 核转录因子 E2 相关因子 2; 溶质载体家族 7 成员; 谷胱甘肽; 谷胱甘肽过氧化物酶 4

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是继阿尔茨海默病之后全球第二大神经退行性疾病^[1]。目前临床最常用的多巴胺(dopamine, DA)替代疗法虽能改善疾病早期的运动症状, 却不能阻止 PD 的进展。铁的蓄积、氧化应激水平升高和脂质过氧化损伤亦是 PD 病理生理学的显著特征^[2], 这种由铁

依赖性脂质过氧化产物不断积聚而引发的细胞死亡, 被定义为铁死亡。使用铁离子螯合剂驱铁治疗可降低 PD 患者体内的铁含量从而缓解早期 PD 运动症状^[3]。铁死亡受多种基因表达信号调控, 溶质载体家族 7 成员(SLC7A11)/谷胱甘肽(GSH)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)信号通路是主要的铁死亡监测系统, 对于维持氧化还原稳态和预防铁死亡至关重要^[4]。核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)是抗氧化反应的主要调节因子, 在预防和纠正细胞内氧化还原失衡中发挥重要作用^[5]。研究^[6-7]表明,

基金项目:国家自然科学基金(82360909); 广西自然科学基金(2023GXNSFAA026152); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(ZYYZDXK-2023166); 广西中医药重点学科建设项目(GZXK-Z-20-13)

✉ 通讯作者:13878847908@163.com

Nrf2 可通过激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路调控铁死亡保护神经元损伤。SLC7A11/GSH/GPX4 通路作为细胞抗氧化的重要通路,可以有效促进 GSH 的合成,减少活性氧 (ROS) 积累抑制铁死亡^[4, 8]。由此可见, Nrf2 调控 SLC7A11/GSH/GPX4 信号通路在铁死亡过程中发挥了重要作用。

本团队基于 PD 肝肾亏虚的中医基本病机,创制了补肾止颤方。该方具有补益肝肾、益精填髓、补气养血、疏筋通络、熄风止颤的功效。前期研究^[9]证明,该方可降低 PD 患者症状严重程度,提高患者的运动能力,对患者的运动症状和非运动症状均有明显改善。实验研究^[10]也发现,补肾止颤方呈剂量依赖地改善 PD 大鼠行为学表现及神经元受损情况,具有神经保护作用。因此,本研究拟从 Nrf2 调控 SLC7A11/GSH/GPX4 通路和铁死亡角度探讨补肾止颤方治疗 PD 的可能作用机制,为其临床应用提供依据。本研究已通过广西中医药大学实验动物福利伦理委员会伦理审查 (批件号: DW20230909-01)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只, 3~4 月龄, 体质量 (250±50) g, 所有大鼠均购自湖南省长沙市天勤生物技术有限公司 [实验动物生产许可证号: SCXK (湘) 2019-0014]。大鼠饲养于广西中医药大学第一附属医院实验动物中心的标准化动物房, 相对湿度 50%~70%, 温度 23~25 ℃, 采用昼夜各 12 h 的光照循环模式, 大鼠给予常规普通饲料, 自由饮水。

1.2 药物

补肾止颤方组成: 鹿角胶 10 g, 阿胶 10 g (烔化), 龟甲 20 g, 党参 15 g, 枸杞子 30 g, 白芍 30 g, 生地黄 25 g, 火麻仁 15 g, 麦冬 15 g, 炙甘草 6 g, 鳖甲 15 g, 肉苁蓉 30 g, 天麻 15 g, 黄精 10 g, 山萸肉 10 g, 钩藤 30 g。免煎颗粒由江阴天江药业有限公司生产, 配制成含生药 2.574 g/ml 的溶液, 批号: 1206003。多巴丝肼片 (国药准字 SH10930198, 批号: YT2725, 规格 250 mg/片), 上海罗氏制药公司。

1.3 主要试剂和仪器

蛋白酶抑制因子 (PSI, ApexBio 公司, 批号: A190011337769); ML385 (Selleck 公司, 批号: S8790); 水合氯醛 (天津市大茂化学试剂厂, 批号: ky-my); 4% 多聚甲醛 (批号: IP9020)、GAPDH 一抗 (批号: BL006B)、ECL 化学发光底物 (批号: BL520A), Biosharp 公司; Nrf2、SLC7A11、

GPX4 抗体 (Affinity 公司, 批号分别为: AF0639、DF12509、DF6701); GPX4 ELISA 试剂盒 (武汉贝茵莱生物科技有限公司, 批号: RA 21465); 丙二醛 (MDA) ELISA 试剂盒 (批号: BC0025)、GSH ELISA 试剂盒 (批号: BC1175)、亚铁离子含量检测试剂盒 (批号: BC5415)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: PC0020)、总 RNA 提取试剂 (批号: R1100), 北京索莱宝科技有限公司; 组织 ROS 检测试剂盒 (贝博生物科技有限公司, 批号: BB-470357); HRP 标记山羊抗兔 (Servicebio 公司, 批号: GB23303)。

酶标分析仪 (德铁生物科技有限公司, HBS-1096A 型); 荧光酶标仪 (Perkin Elmer 公司, VICTOR Nivo 型); 高速低温组织研磨仪 (Servicebio 公司, KZ-III-F 型); 低温离心机 (Eppendorf 公司, 5418R 型); 蛋白转印模块 (Bio-Rad 公司, Mini Trans-Blot Cell 型); 电泳仪 (Bio-Rad 公司, PowerPac Basic 型); 多功能酶标仪 (TECAN 公司, INFINITE 200PRO 型); 荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, 7500 型); 体视显微镜 (MOTIC 公司, Stellar 1 Pro-B 型); 显微脑刮匙 (上海医疗器械公司, M-N-0209 型)。

1.4 动物分组与模型制备

将 70 只大鼠按照随机数字表法分为对照组、模型组、Nrf2 抑制剂组、多巴丝肼组及补肾止颤方低、中、高剂量组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组大鼠采用 PSI 皮下注射建立 PD 大鼠模型^[11]: 大鼠背部皮下注射 PSI 溶液 75 μl/100 g, 每周一、三、五注射, 连续处理 2 周。造模后大鼠出现运动迟缓、肌肉僵直、肢体震颤等 PD 样症状, 同时网格实验、爬杆实验评分上升则认为 PD 大鼠模型制备成功^[11-12]。在此过程中, 若出现大鼠死亡或造模失败的情况, 及时将其剔除, 同时从同一批次大鼠进行补充并重新造模, 待造模成功后再将其纳入实验。对照组大鼠同时间点背部皮下注射 2 ml/kg 生理盐水, 持续 2 周。

1.5 给药方法

造模 2 周后, Nrf2 抑制剂组大鼠予 ML385 小分子化合物 50 mg/kg 腹腔注射, 于周一、周三、周五注射, 共 3 次; 其余各组大鼠于同时间点均予 2 ml/kg 生理盐水腹腔注射, 注射完成后观察 1 周。造模 4 周后, 依据大鼠与人药物剂量折算方法^[13], 补肾止颤方低、中、高剂量组分别给予补肾止颤方颗粒剂溶液 1.0、1.5、2.0 ml/(100 g·d), 其中高剂量为临床等效剂量; 多巴丝肼组则予多巴丝肼片 200 mg/(100 g·d)

灌胃;对照组、模型组、Nrf2 抑制剂组大鼠均以生理盐水按 2 ml/(100 g·d)灌胃。各组大鼠均连续灌胃 3 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 大鼠一般状态及行为学观察 实验期间每日对各组大鼠的行为表现进行观察与记录,具体包括体毛状态、肢体震颤情况、站立频次及僵直反应等。灌胃 3 周后各组大鼠进行网格实验及爬杆实验评估运动协调能力^[14]。网格实验:取自制的长 60 cm、宽 40 cm、每个小格子约 1 cm²的金属网格一块,垂直地面放置。依次将各组大鼠以倒立姿势放置于金属网格中央,待其四肢抓牢网格后开始记录大鼠从前后肢平稳到其中一肢开始活动所需的时间,即为该大鼠的移动潜伏期。大鼠休息 10 min 后进行下一轮实验,每只重复测 3 次。大鼠移动潜伏期越长表示大鼠肢体僵硬情况越重。爬杆实验:长 50 cm、直径 2 cm 的木杆与桌面呈 45°固定,将大鼠放置杆顶,头朝木杆底部,记录大鼠从杆顶到达桌面的时间,重复 3 次,取平均值,每次重复前休息 1 min。大鼠震颤频率高、步态异常、进食少及爬杆时间增加表示大鼠 PD 症状加重。

1.6.2 ELISA 法检测中脑黑质区亚铁离子 (Fe²⁺)、GSH、GPX4、MDA 含量 各组大鼠进行最后一次爬杆实验后 2 h,400 mg/kg 水合氯醛腹腔注射,待大鼠角膜反射完全消失、呼吸心跳停止,确认大鼠死亡后,取大脑标本,用解剖剪沿间脑与中脑交界处、中脑与脑桥交界处剪断,分离出完整中脑块。在体视显微镜下,用显微脑刮匙轻剥黑质组织,收集大鼠中脑黑质区组织样本,每只大鼠约获得 100 mg 中脑黑质组织。每组采用随机数字表法取 6 只大鼠中脑黑质组织,用 ELISA 试剂盒定量测定 Fe²⁺、GSH、GPX4 及 MDA 含量,操作均严格参照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.6.3 Western Blot 法检测中脑黑质区 Nrf2、SLC7A11、GPX4、GSH 蛋白水平 每组采用随机数字表法取 6 只大鼠中脑黑质组织约 20 mg,转至 EP 管,匀浆,离心半径 10 cm、12 000 r/min,4 °C 离心 5 min,取上清蛋白测定浓度后调齐浓度,加入 5×蛋白上样 buffer,100 °C 变性 10 min。90 V 恒压电泳约 20 min,分离胶层后,换用 120 V 恒压电泳 1.0~1.5 h,300 mA 恒流转膜、封闭,按说明书将一抗 GAPDH、Nrf2、SLC7A11、GPX4 按 1:3000 比例稀释,将膜放入 4 °C 孵育 12 h。孵育操作结束后,将膜置于按 1:4000 比例稀释的二抗中,在

37 °C 条件下孵育 1 h;完成膜清洗操作后,采用 ECL 化学发光显色剂对印迹膜进行处理,触发目的蛋白与抗体复合物的发光反应。待显色反应稳定后,将膜转移至凝胶成像系统内,通过设定适宜的曝光参数完成图像采集,获取包含目的蛋白与内参蛋白条带的发光影像,用 Image J (1.52 版本)软件分析得到的蛋白条带的灰度值。

1.6.4 qRT-PCR 法检测中脑黑质区 Nrf2 mRNA 表达 每组采用随机数字表法取 6 只大鼠中脑黑质组织约 20 mg,将组织剪成小块,采用 3 mm 小钢珠研磨充分,加入 0.1 ml 氯仿替代物,振荡 15 s,室温静置 2 min,取 0.5 ml 上清放入新的 1.5 ml EP 管中离心,加入 0.5 ml 异丙醇再次离心,沉淀。取 1 μl RNA 样本,用多功能酶标仪进行 RNA 浓度测定并直接测定 A260/280, A260/280 代表 RNA 的纯度(比值在 1.8~2.0 之间则说明 RNA 样本纯度较高)。采用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增,扩增条件:预变性 95 °C 30 s;PCR 循环 (40 循环):变性 95 °C 10 s;退火和延伸:60 °C 30 s;记录每个样本所对应基因的 Ct 值,各样本目的基因的相对表达量为 2^{-ΔΔCt}。引物设计由南宁捷尼斯生物科技有限公司合成,NRF2:上游 GGTGCCCCACATTCCTCAAAC,下游 TCAGGGGTGCTGAAGACTGA,长度 168 bp;GAPDH:上游 TCTCTGCTCCTCCCTGTTCT,下游 ATCCGTT-CACACCGACCTTC,长度 95 bp。

1.6.5 荧光酶标仪法检测中脑黑质区细胞内 ROS 水平 随机选取 6 只大鼠中脑黑质组织约 40 mg,加入缓冲液充分摇匀,离心半径 10 cm、4 °C、1500 r/min 离心 3 min,弃沉淀,取上清。在 96 孔板中加入 190 μl 匀浆上清液、10 μl DCFHDA 探针,用移液器吹打,使之充分混匀。37 °C 避光孵育 30 min。置于酶标仪中,于激发波长 488 nm、发射波长 530 nm 检测荧光强度。蛋白定量:取约 50 μl 上清匀浆液,用 PBS 约稀释 30 倍,取 100 μl,按 BCA 蛋白浓度测试剂盒说明书,配制蛋白梯度浓度,每个浓度设置 3 个复孔,进行蛋白定量,以每毫克蛋白荧光强度表示组织活性氧强度。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计分析软件进行数据处理。计量资料均符合正态分布用均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较,方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Dunnett's *T*⁰ 检验。取双侧 $\alpha=0.05$ 为检验水准。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般表现及行为学结果比较

对照组大鼠行为活动及摄食正常。模型组大鼠逐渐出现反应迟钝、运动迟缓、毛发变脏、四肢及头部震颤等表现，随造模时间越长，上述表现越明显。与模型组比较，补肾止颤方各剂量组和多巴丝肼片组大鼠的摄食行为均有不同程度改善，典型的震颤症状得到缓解，肢体不自主震颤的频率与幅度降低，自主活动能力提升，同时大鼠毛发状态变为干燥、洁净，其中以补肾止颤方高剂量组及多巴丝肼组改善最为明显。表 1 示，与对照组比较，其余各组大鼠网格实验移动潜伏期、爬杆实验时间均增加 ($P<0.05$)；与模型组比较，Nrf2 抑制剂组网格实验移动潜伏期、爬杆实验时间增加，多巴丝肼组、补肾止颤方各剂量组网格实验移动潜伏期、爬杆时间均减少 ($P<0.05$)；补肾止颤方高剂量组、多巴丝肼组网格实验移动潜伏期、爬杆时间减少较

表 1 各组大鼠网格实验移动潜伏期、爬杆实验时间比较
Table 1 Comparison of movement latency in grid test and pole-climbing time among rats in each group (s, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	网格实验移动潜伏期	爬杆实验时间
对照组	10	2.80±0.86	10.05±2.17
模型组	10	10.53±1.35 ^{a)}	30.60±3.04 ^{a)}
Nrf2 抑制剂组	10	14.53±2.66 ^{a)b)}	34.26±1.22 ^{a)b)}
补肾止颤方低剂量组	10	7.73±1.09 ^{a)b)}	19.53±3.39 ^{a)b)}
补肾止颤方中剂量组	10	7.40±1.12 ^{a)b)}	16.80±1.65 ^{a)b)}
补肾止颤方高剂量组	10	6.26±1.57 ^{a)b)c)d)}	14.50±2.64 ^{a)b)c)d)}
多巴丝肼组	10	5.26±1.22 ^{a)b)c)d)}	14.80±2.07 ^{a)b)c)d)}

注：Nrf2，核因子 E2 相关因子 2。
a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；
c) 与补肾止颤方低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与补肾止颤方中剂量组比较， $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠中脑黑质区 Fe²⁺、GPX4、GSH、MDA 含量比较
Table 2 Comparison of Fe²⁺, GPX4, GSH and MDA contents in substantia nigra among rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Fe ²⁺ /μmol·g ⁻¹	GPX4/ng·ml ⁻¹	GSH/μg·ml ⁻¹	MDA/nmol·mg prot ⁻¹
对照组	6	0.112±0.014	33.49±4.26	161.10±22.14	1.34±0.15
模型组	6	0.275±0.031 ^{a)}	17.84±2.07 ^{a)}	93.48±11.93 ^{a)}	2.46±0.31 ^{a)}
Nrf2 抑制剂组	6	0.320±0.034 ^{a)b)}	14.20±1.80 ^{a)b)}	71.33±8.21 ^{a)b)}	2.88±0.28 ^{a)b)}
补肾止颤方低剂量组	6	0.237±0.023 ^{a)b)}	21.50±2.71 ^{a)b)}	113.48±13.35 ^{a)b)}	1.96±0.19 ^{a)b)}
补肾止颤方中剂量组	6	0.214±0.023 ^{a)b)}	22.05±3.14 ^{a)b)}	117.52±13.21 ^{a)b)}	1.96±0.18 ^{a)b)}
补肾止颤方高剂量组	6	0.166±0.018 ^{a)b)c)d)}	26.39±2.86 ^{a)b)c)d)}	138.48±15.90 ^{a)b)c)d)}	1.65±0.19 ^{a)b)c)d)}
多巴丝肼组	6	0.157±0.016 ^{a)b)c)d)}	28.51±3.27 ^{a)b)c)d)}	141.81±17.09 ^{a)b)c)d)}	1.61±0.19 ^{a)b)c)d)}

注：Fe²⁺，亚铁离子；GPX4，谷胱甘肽过氧化物酶 4；GSH，谷胱甘肽；MDA，丙二醛；Nrf2，核因子 E2 相关因子 2。
a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与补肾止颤方低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与补肾止颤方中剂量组比较， $P<0.05$ 。

补肾止颤方低、中剂量组更为显著 ($P<0.05$)；补肾止颤方高剂量组与多巴丝肼组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠中脑黑质区 Fe²⁺、GSH、GPX4、MDA 含量比较

表 2 示，与对照组比较，其余各组大鼠中脑黑质区 GSH、GPX4 含量均降低，Fe²⁺、MDA 含量均升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，Nrf2 抑制剂组 Fe²⁺、MDA 含量均升高，GPX4、GSH 含量均降低 ($P<0.05$)，多巴丝肼组和补肾止颤方低、中、高剂量组 Fe²⁺、MDA 含量均降低，GSH、GPX4 含量均升高 ($P<0.05$)；与补肾止颤方低、中剂量组比较，多巴丝肼组及补肾止颤方高剂量组 Fe²⁺、MDA 含量均下降，GSH、GPX4 含量均升高 ($P<0.05$)；多巴丝肼组与补肾止颤方高剂量组各指标比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组大鼠中脑黑质区 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白水平比较

表 3 示，与对照组比较，其余各组大鼠中脑黑质区 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白水平均降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，Nrf2 抑制剂组 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白水平均降低，而多巴丝肼组和补肾止颤方低、中、高各剂量组 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白水平均升高 ($P<0.05$)；多巴丝肼组、补肾止颤方高剂量组 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白水平显著高于补肾止颤方低、中剂量组 ($P<0.05$)；多巴丝肼组与补肾止颤方高剂量组 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠中脑黑质区 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白电泳图见图 1。

2.4 各组大鼠中脑黑质区 ROS 水平及 Nrf2 mRNA 表达比较

表 4 示，与对照组比较，其余各组大鼠中脑黑

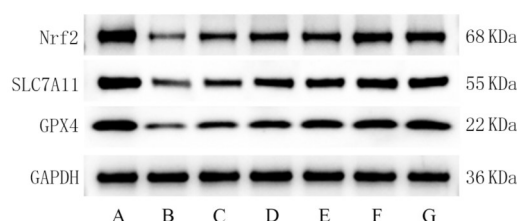
表3 各组大鼠中脑黑质区 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白水平灰度值比较

Table 3 Comparison of gray values of Nrf2, SLC7A11 and GPX4 protein levels in substantia nigra among rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Nrf2	SLC7A11	GPX4
对照组	6	1.12±0.14	0.97±0.11	0.94±0.10
模型组	6	0.67±0.08 ^{a)}	0.54±0.08 ^{a)}	0.47±0.05 ^{a)}
Nrf2 抑制剂组	6	0.54±0.07 ^{a) b)}	0.43±0.05 ^{a) b)}	0.34±0.04 ^{a) b)}
补肾止颤方低剂量组	6	0.82±0.10 ^{a) b)}	0.65±0.07 ^{a) b)}	0.63±0.08 ^{a) b)}
补肾止颤方中剂量组	6	0.83±0.09 ^{a) b)}	0.67±0.08 ^{a) b)}	0.68±0.07 ^{a) b)}
补肾止颤方高剂量组	6	0.96±0.10 ^{a) b) c) d)}	0.79±0.08 ^{a) b) c) d)}	0.78±0.08 ^{a) b) c) d)}
多巴丝肼组	6	0.98±0.11 ^{a) b) c) d)}	0.82±0.09 ^{a) b) c) d)}	0.86±0.09 ^{a) b) c) d)}

注：Nrf2，核因子 E2 相关因子 2；SLC7A11，溶质载体家族 7 成员 11；GPX4，谷胱甘肽过氧化物酶 4。

a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与补肾止颤方低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与补肾止颤方中剂量组比较， $P<0.05$ 。



注：Nrf2，核因子 E2 相关因子 2；SLC7A11，溶质载体家族 7 成员 11；GPX4，谷胱甘肽过氧化物酶 4；A，对照组；B，Nrf2 抑制剂组；C，模型组；D，补肾止颤方低剂量组；E，补肾止颤方中剂量组；F，补肾止颤方高剂量组；G，多巴丝肼组。

图1 各组大鼠中脑黑质区 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白电泳图

Figure 1 Protein electrophoresis of Nrf2, SLC7A11 and GPX4 in substantia nigra among rats in each group

表4 各组大鼠中脑黑质区 ROS 水平及 Nrf2 mRNA 表达比较

Table 4 Comparison of ROS level and Nrf2 mRNA expression in substantia nigra among rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ROS	Nrf2 mRNA
对照组	6	1.00±0.12	1.01±0.13
模型组	6	1.45±0.16 ^{a)}	0.53±0.07 ^{a)}
Nrf2 抑制剂组	6	1.67±0.22 ^{a) b)}	0.43±0.06 ^{a) b)}
补肾止颤方低剂量组	6	1.26±0.18 ^{a) b)}	0.65±0.08 ^{a) b)}
补肾止颤方中剂量组	6	1.24±0.15 ^{a) b)}	0.67±0.07 ^{a) b)}
补肾止颤方高剂量组	6	1.04±0.12 ^{a) b) c) d)}	0.84±0.09 ^{a) b) c) d)}
多巴丝肼组	6	1.03±0.14 ^{a) b) c) d)}	0.89±0.10 ^{a) b) c) d)}

注：ROS，活性氧；Nrf2，核因子 E2 相关因子 2。

a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与补肾止颤方低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与补肾止颤方中剂量组比较， $P<0.05$ 。

质 ROS 水平均升高，Nrf2 mRNA 表达均下降 ($P<0.05$)；与模型组比较，Nrf2 抑制剂组 ROS 水平升高、Nrf2 mRNA 表达降低，多巴丝肼组和补肾止颤方低、中、高剂量组 ROS 水平均下降、Nrf2 mRNA

表达均升高 ($P<0.05$)；与补肾止颤方低、中剂量组比较，多巴丝肼组、补肾止颤方高剂量组 ROS 水平下降、Nrf2 mRNA 表达升高 ($P<0.05$)；多巴丝肼组与补肾止颤方高剂量组比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

作为一种复杂的神经退行性疾病，PD 的发病与铁死亡调控紧密相关^[15]。临床研究发现，PD 患者大脑显示出明显的铁离子积累，主要集中在中脑黑质致密部^[16]。在猴 PD 模型中，采用对 Fe²⁺具有氧化还原沉默作用的氯喹诺尔 (Clioquinol, CQ) 干预后，中脑黑质部铁积累和脂质过氧化明显减少^[17]。抑制铁死亡的发生可以有效减轻 PD 神经元细胞损伤。铁死亡的模式涉及脂质过氧化和 Fe²⁺的积累，而 Fe²⁺超载可以通过芬顿反应生成 ROS，ROS 则介导脂质过氧化产生 MDA，最终导致神经细胞铁死亡^[18-19]。MDA 是脂质过氧化反应的主要产物，标志着细胞内氧化应激，同时也可作为铁死亡标志物^[20]。GPX4 是一种关键的抗氧化酶，在 GSH 参与下，可将有毒的脂质过氧化物还原为无毒的脂质醇，消除细胞内脂质 ROS，因此能够防止由 ROS 引起的脂质过氧化物的产生，从而抑制铁死亡的发生^[21-22]。另有研究^[23]表明，在 PD 细胞模型中，通过增加 Nrf2 及 GPX4 的表达，能促进 GSH 的合成，减少 ROS 生成、Fe²⁺的积累从而抑制 PD 神经元铁死亡。SLC7A11 是一种重要致癌蛋白，在防御氧化应激和铁死亡中具有重要作用^[24]。SLC7A11 是胱氨酸/谷氨酸逆向转运系统的关键亚基，负责将谷氨酰胺导入细胞，在细胞内转化成半胱氨酸，最终用于合成 GSH^[25]。当胱氨酸/谷氨酸逆向转运系统被化合物抑制时，GSH 合成受阻，导致 GPX4 不能利

用GSH将脂质过氧化物还原,引发铁死亡^[26]。GPX4和GSH均是铁死亡的内源性抑制剂,SLC7A11/GSH/GPX4信号通路作为铁死亡的主要调控通路之一,发挥了重要的抗氧化作用^[27-28]。

Nrf2作为细胞抗氧化反应的主要调节因子,参与细胞抗氧化和抗炎反应。通过抑制Nrf2的表达,可提高脂质过氧化水平及ROS形成,促进细胞铁死亡^[29],促进Nrf2的激活能显著抑制GPX4依赖性脂质过氧化,减少MDA和脂质ROS的生成^[30]。研究^[31]表明,激活Nrf2的表达可以减轻1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导的PD大鼠多巴胺神经元丢失和运动缺陷,抑制神经铁死亡。因此,本研究设置Nrf2抑制剂组,以对比靶向调控Nrf2表达后PD大鼠行为学及铁死亡相关指标的改变。

中医学认为,PD属中医学“颤证”范畴,多因久病及摄养失调,暗耗肾精,或年迈肾亏精少,又因肝肾同源,终致肝肾俱亏,水不涵木则风阳上扰、内风暗动,致使经肢肢体失主而发病。课题组通过总结前期经验并结合现代研究认为,本病发病之根责之于肝肾,肝肾俱亏为其病机关键。龟鹿二仙汤是治疗肾元虚损、精血阴阳不足的经典良方,具有很强的抗氧化能力及抗衰老作用^[32];大定风珠亦能保护神经元,恢复神经细胞功能^[33]。补肾止颤方以龟鹿二仙汤合大定风珠加减化裁而成。该方剂一方面具有龟鹿二仙汤的补肾养阳、益精填髓之功效,另一方面基于大定风珠大力滋补真阴、收敛浮阳以平熄内风的组方理念,通过恢复阴液、濡养筋脉,实现虚风自止的效果。同时,方中配伍山萸肉、黄精、肉苁蓉以补益肝肾精血,搭配天麻、钩藤以平熄内风、镇痉止颤。诸药合用,具有滋养肝肾、补充精髓、熄风、止颤、通络的功效。前期研究^[2, 34-35]证实,补肾止颤方能有效减轻PD大鼠大脑炎症反应,保护DA能神经元。多巴丝肼片是治疗PD的常用药物,缓解PD的临床效果确切,是治疗帕金森病的标准疗法^[36],因此本实验将该药物设为阳性对照药物。

本研究结果显示,与模型组相比,补肾止颤方各剂量组与多巴丝肼组大鼠的摄食行为、震颤频率及毛发状态等一般状态均有改善,行为学表现同样得到改善,其中以补肾止颤方高剂量组及多巴丝肼组改善优于补肾止颤低、中剂量组,而补肾止颤方高剂量组与多巴丝肼组表现未见明显差异。与正常大鼠比较,PD模型大鼠中脑黑质GPX4、GSH含量下降,Fe²⁺、MDA、ROS含量升高,提示PD模型

大鼠存在铁死亡和脂质氧化损伤情况。同时,用抑制剂ML385靶向抑制Nrf2的表达后,大鼠中脑黑质GPX4、GSH含量及SLC7A11、GPX4蛋白水平均较模型组下降,Fe²⁺、MDA、ROS含量均增加,表明Nrf2能够调节SLC7A11/GSH/GPX4轴的表达,抑制Nrf2的表达则加重铁死亡和脂质氧化损伤。而经补肾止颤方低、中、高剂量及多巴丝肼干预后,PD大鼠中脑黑质Nrf2 mRNA及SLC7A11、GPX4、蛋白表达均升高,GSH含量升高,Fe²⁺、ROS、MDA含量下降,其中补肾止颤方高剂量组与多巴丝肼组改善情况相当,且优于补肾止颤方低、中剂量组。以上结果提示补肾止颤方能在一定程度上减轻机体氧化应激反应,抑制神经元铁死亡,其可能通过增加SLC7A11稳定性促进GPX4合成,提高GSH表达,降低Fe²⁺、ROS及MDA水平,从而抑制PD神经元细胞铁死亡进程,且以高剂量效果最好,其可能通过增强Nrf2的表达来激活其下游信号通路SLC7A11/GSH/GPX4的表达从而抑制PD神经元铁死亡进程。

综上所述,补肾止颤方能够改善PD大鼠运动症状,抑制中脑黑质神经元铁死亡,其机制可能是通过激活Nrf2的表达,上调SLC7A11/GSH/GPX4通路,有效清除细胞内累积的Fe²⁺和脂质过氧化物,从而抑制神经元铁死亡,保护DA能神经元。本研究为探究补肾止颤方治疗PD提供了一定的科学依据与理论支撑,考虑到补肾止颤方抑制PD大鼠神经元铁死亡机制较为复杂,未来可能需结合单细胞测序及基因编辑等手段,进一步系统地揭示其调控机制。

参考文献

- [1]DORSEY ER, SHERER T, OKUN MS, et al. The emerging evidence of the Parkinson pandemic [J]. J Parkinsons Dis, 2018, 8(s1): S3-S8.
- [2]MAHONEY-SÁNCHEZ L, BOUCHAOUI H, AYTON S, et al. Ferroptosis and its potential role in the physiopathology of Parkinson's disease [J]. Prog Neurobiol, 2021, 196: 101890. doi: 10.1016/j.pneurobio.2020.101890.
- [3]DEVOS D, MOREAU C, DEVEDJIAN JC, et al. Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(2): 195-210.
- [4]NISHIDA XAVIER DA SILVA T, FRIEDMANN ANGELI JP, INGOLD I. GPX4: old lessons, new features [J]. Biochem Soc Trans, 2022, 50(3): 1205-1213.
- [5]DODSON M, DE LA VEGA MR, CHOLANIAN AB,

- et al. Modulating NRF2 in disease: timing is everything [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2019, 59: 555–575. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021856.
- [6]王正阳,王凯华,赖思嘉,等. 壮通饮通过Nrf2-SLC7A11-GPX4通路调控铁死亡保护神经元 OGD/R 损伤的作用机制研究[J]. *中药材*, 2024, 47(6): 1531–1535.
- [7]XIE L, ZHOU C, WU Y, et al. Wenqingyin suppresses ferroptosis in the pathogenesis of sepsis-induced liver injury by activating the Nrf2-mediated signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 114: 154748. doi: 10.1016/j.phymed.2023.154748.
- [8]CHEN LL, WANG WJ. p53 regulates lipid metabolism in cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 192: 45–54. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.188.
- [9]胡玉英,胡跃强,陈薇,等. 补肾止颤方联合埋针治疗帕金森病的疗效[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(12): 3249–3251.
- [10]胡玉英,罗荣卿,刘永辉,等. 补肾止颤方抑制帕金森病大鼠神经元细胞焦亡的作用机制[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(12): 7039–7044.
- [11]刘雨清,张伟栋,李媛媛. 一种新的帕金森病动物模型[J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(2): 159–160.
- [12]MCNAUGHT KS, PERL DP, BROWNELL AL, et al. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease [J]. *Ann Neurol*, 2004, 56(1): 149–162.
- [13]陈奇. *中药药理研究方法学*[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993: 1103.
- [14]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.
- [15]SU Y, JIAO Y, CAI S, et al. The molecular mechanism of ferroptosis and its relationship with Parkinson's disease [J]. *Brain Res Bull*, 2024, 213: 110991. doi: 10.1016/j.brainresbull.2024.110991.
- [16]GRIFFITHS PD, DOBSON BR, JONES GR, et al. Iron in the basal ganglia in Parkinson's disease. An in vitro study using extended X-ray absorption fine structure and cryo-electron microscopy [J]. *Brain*, 1999, 122 (Pt 4): 667–673.
- [17]SHI L, HUANG C, LUO Q, et al. Clioquinol improves motor and non-motor deficits in MPTP-induced monkey model of Parkinson's disease through AKT/mTOR pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(10): 9515–9533.
- [18]KO CJ, GAO SL, LIN TK, et al. Ferroptosis as a major factor and therapeutic target for neuroinflammation in Parkinson's disease [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(11): 1679.
- [19]WANG Y, SHEN Z, ZHAO S, et al. Sipeimine ameliorates PM 2.5-induced lung injury by inhibiting ferroptosis via the PI3K/Akt/Nrf2 pathway: a network pharmacology approach [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 239: 113615. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113615.
- [20]CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5): 280–296.
- [21]QIU Y, CAO Y, CAO W, et al. The application of ferroptosis in diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104919. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104919.
- [22]LIU MR, ZHU WT, PEI DS. System Xc(-): a key regulatory target of ferroptosis in cancer [J]. *Invest New Drugs*, 2021, 39(4): 1123–1131.
- [23]GU SC, XIE ZG, GU MJ, et al. Myricetin mitigates motor disturbance and decreases neuronal ferroptosis in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 15107.
- [24]IMAI H, MATSUOKA M, KUMAGAI T, et al. Lipid peroxidation-dependent cell death regulated by GPx4 and ferroptosis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 403: 143–170. doi: 10.1007/82_2016_508.
- [25]XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3): 369–379.
- [26]KINOWAKI Y, KURATA M, ISHIBASHI S, et al. Glutathione peroxidase 4 overexpression inhibits ROS-induced cell death in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Lab Invest*, 2018, 98(5): 609–619.
- [27]STOCKWELL BR. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications [J]. *Cell*, 2022, 185(14): 2401–2421.
- [28]余旭,唐文静,唐标. 铁死亡与脑卒中的神经损伤[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(7): 756–765.
- [29]DENG Y, WU Y, ZHAO P, et al. The Nrf2/HO-1 axis can be a prognostic factor in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 1221–1230. doi: 10.2147/CMAR.S188046.
- [30]HE R, LIU B, XIONG R, et al. Itaconate inhibits ferroptosis of macrophage via Nrf2 pathways against sepsis-induced acute lung injury [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 43.
- [31]WANG M, ZHENG HS, YE WL, et al. The mechanism of electroacupuncture-mediated improvement in Parkinson's disease by inhibiting ferroptosis through activating the

- Nrf2/GPX4 signal pathway [J]. *Front Aging Neurosci*, 2025, 17: 1551404. doi: 10.3389/fnagi.2025.1551404.
- [32]刘相玲,徐长江,杨玲玲. 龟鹿二仙汤加减联合针刺治疗阿尔茨海默病疗效观察 [J]. *中医临床研究*, 2020, 12(21): 92-93.
- [33]崔拓拓,曹俊岭,欧阳竞锋,等. 大定风珠对帕金森病模型小鼠脑黑质小胶质细胞活化及 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *中医杂志*, 2023, 64(9): 930-938.
- [34]胡玉英,李伦甘,刘永辉,等. 补肾止颤方调控 miR-296-5p/GSDMD 通路抑制帕金森病大鼠神经元焦亡机制研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(4): 114-119, 280.
- [35]胡玉英,罗宇雄,钱凯,等. 补肾止颤方联合埋针对帕金森病大鼠行为学及黑质区自由基清除的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(2): 200-203.
- [36]中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组,中国医师协会神经内科医师分会帕金森病及运动障碍学组. *中国帕金森病治疗指南(第四版)* [J]. *中华神经科杂志*, 2020, 53(12): 973-986.

Effects of *Bushen Zhichan Formula* (补肾止颤方) on Ferroptosis of Dopaminergic Neurons and Nrf2-Regulated SLC7A11/GSH/GPX4 Signaling Pathway in Parkinson's Disease Model Rats

HU Yuying¹, CHEN Weiyang², SONG Xi¹, LI Xiaodong¹, LIU Shanshan¹, LUO Zhihui²

1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, 530023; 2. Guangxi University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of *Bushen Zhichan Formula* (补肾止颤方) in treating Parkinson's disease (PD) from the perspective of ferroptosis. **Methods** A total of 70 SD rats were randomly divided into 7 groups with 10 rats in each group, control group, model group, Nrf2 inhibitor group, levodopa-benserazide group, and low-, medium-, and high-dose *Bushen Zhichan Decoction* groups. PD models were established by subcutaneous injection of proteasome inhibitor in rats except for the control group. Two weeks after modeling, rats in the Nrf2 inhibitor group were intraperitoneally injected with ML385 small molecule compound at 50 mg/kg once every other day for 3 times, while rats in other groups were intraperitoneally injected with normal saline at 2 ml/kg at the same time points. Four weeks after modeling, rats in the low-, medium-, and high-dose *Bushen Zhichan Formula* groups were intragastrically administered with *Bushen Zhichan Formula* granule solution at 1.0, 1.5 and 2.0 ml/(100 g·d), respectively; rats in the levodopa-benserazide group were intragastrically administered with levodopa-benserazide tablets at 200 mg/(100 g·d); rats in the control group, model group and Nrf2 inhibitor group were intragastrically administered with normal saline at 2 ml/(100 g·d). After 3 weeks of intragastric administration, behavioral tests including grid test and pole-climbing test were performed to evaluate the motor function of PD rats. qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) in the substantia nigra of rats; Western Blot was employed to determine the protein levels of Nrf2, solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and glutathione peroxidase 4 (GPX4); ELISA was adopted to measure the contents of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), ferrous ion (Fe²⁺) and GPX4; and a fluorescence microplate reader was used to detect the level of reactive oxygen species (ROS). **Results** Compared with the control group, the movement latency in grid test and pole-climbing time prolonged, the contents of GSH and GPX4 in the substantia nigra decreased, the contents of Fe²⁺ and MDA increased, the protein levels of Nrf2, SLC7A11 and GPX4 reduced, the ROS level elevated, and the Nrf2 mRNA expression down-regulated in the model group ($P<0.05$). The above indicators in the Nrf2 inhibitor group showed the same changing trend as the model group with more significant degrees, and the differences were statistically significant compared with both the model group and control group ($P<0.05$). Compared with the model group, all indicators were improved in the levodopa-benserazide group and low-, medium-, high-dose *Bushen Zhichan Formula* groups ($P<0.05$); moreover, the improvements of all indicators in the high-dose *Bushen Zhichan Formula* group and levodopa-benserazide group were more significant than those in the low- and medium-dose groups ($P<0.05$). There was no statistically significant difference in improvement between the high-dose *Bushen Zhichan Formula* group and levodopa-benserazide group ($P>0.05$). **Conclusions** *Bushen Zhichan Formula* may exert a therapeutic effect on PD by activating the expression of Nrf2 in the substantia nigra, and regulating the SLC7A11/GSH/GPX4 signaling pathway, thereby inhibiting lipid peroxidation and ferroptosis.

Keywords Parkinson's disease; ferroptosis; *Bushen Zhichan Formula* (补肾止颤方); lipid peroxidation; nuclear factor E2-related factor 2; solute carrier family 7 member 11; glutathione; glutathione peroxidase 4

(收稿日期: 2025-09-04; 修回日期: 2025-11-15)

[编辑: 邓媛]