

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.05.013

复方地黄颗粒对帕金森病阴虚动风证模型大鼠脑组织右侧纹状体 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

梁建庆^{1✉}, 孙雪¹, 梁鹏², 何建成³

1. 甘肃中医药大学基础医学院, 甘肃省兰州市和平开发区中医大道1号, 730101; 2. 兰州大学第二临床医学院; 3. 上海中医药大学基础医学院

[摘要] **目的** 探讨复方地黄颗粒治疗帕金森病(PD)阴虚动风证的可能作用机制。**方法** 将175只SPF级雄性SD大鼠随机分为正常组,假手术组,模型组,美多芭组,复方地黄颗粒低、中、高剂量组,每组25只。除正常组、假手术组外,其余各组大鼠给予6-羟基多巴胺(6-OHDA)脑立体注射造模制备PD阴虚动风证大鼠模型。造模成功后复方地黄颗粒低、中、高剂量组分别给予复方地黄颗粒1.75、3.5、7 g/(kg·d)灌胃,美多芭组给予美多芭片150 mg/(kg·d)灌胃,正常组、假手术组及模型组给予生理盐水2 ml灌胃,均每日1次,共28天。观察各组大鼠一般情况及神经行为学测定,检测各组大鼠右侧纹状体组织中Wnt1、低密度脂蛋白受体相关蛋白6(LRP6)、 β 连环蛋白(β -catenin)、抗卷曲同源物1(Fzd1)、抗糖原合成酶激酶3 β (GSK-3 β) mRNA及蛋白表达水平。**结果** 与正常组、假手术组大鼠比较,模型组大鼠精神较差,反应迟钝,毛发污秽、枯暗,饮食、活动均减少,体重减轻。与模型组比较,美多芭组、复方地黄颗粒各剂量组大鼠精神、毛发、饮食、活动量等均有所改善,体重增加,且以美多芭组与复方地黄颗粒高剂量组改善较为明显。与正常组、假手术组比较,模型组大鼠旋转圈数增多,Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1蛋白、阳性细胞数及mRNA的表达明显降低,GSK-3 β 蛋白、阳性细胞数及mRNA表达明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,美多芭组及复方地黄颗粒各剂量组大鼠旋转圈数均显著减少($P<0.01$),右侧纹状体Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1蛋白、阳性细胞数及mRNA水平均明显升高,GSK-3 β 蛋白、阳性细胞数及mRNA水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);复方地黄颗粒各剂量组各指标呈剂量依赖性,以复方地黄颗粒高剂量组Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1蛋白、阳性细胞数及mRNA水平最高,GSK-3 β 蛋白、阳性细胞数及mRNA水平最低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 复方地黄颗粒可能通过调控脑组织右侧纹状体Wnt/ β -catenin信号通路起到保护多巴胺能神经元的作用,且以高剂量效果最佳。

[关键词] 帕金森病; 复方地黄颗粒; 阴虚动风证; Wnt/ β -catenin 信号通路

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种较常见的锥体外系疾病,多见于中老年人,以静止性震颤、肌强直、运动迟缓和姿势异常为主要临床表现^[1]。PD主要的病理生化改变为中脑黑质致密区多巴胺(DA)能神经元的变性、缺失,细胞质中

出现路易小体,纹状体中DA含量减少^[2]。研究表明,Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)信号具有调节黑质细胞分化及增殖等功能,能够促进多巴胺能神经元新生、细胞存活以及突触发生,是促进神经再生修复的重要信号通路之一^[3-4]。帕金森病属于中医学“颤证”范畴,阴虚动风证是其最常见的证型^[5]。复方地黄颗粒是课题组在继承和挖掘中医古籍和现代文献治疗“颤证”的经验基础上,经临床反复验证研制而成(专利号ZL200810043734.2),具有滋阴熄风、活血化痰、散结解毒的功效,临床治疗PD阴虚动风证患者疗效显著、安全性高^[6]。

基金项目:国家自然科学基金(81573899,81660767,82160929);甘肃省教育厅青年博士基金(2021QB-077);甘肃省中医药研究中心开放课题(zyzx-2020-zx20);甘肃中医药大学敦煌医学与转化教育部重点实验室开放课题(DHYX18-08);甘肃中医药大学中青年科研基金(ZQ2015-17);甘肃中医药大学引进人才科研启动基金(2016YJRC-07)

✉ 通讯作者:1766424015@qq.com

本实验采用 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 诱导建立大鼠 PD 阴虚动风证证结合模型, 观察复方地黄颗粒对大鼠右侧纹状体组织 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响, 探讨复方地黄颗粒治疗 PD 的可能作用机制。本实验经过甘肃中医药大学实验动物伦理委员会审查 (批件号 2016-017)。

1 材料与方法

1.1 动物

180 只 SPF 级 SD 雄性大鼠, 体质量 (180±20)g, 购自甘肃中医药大学实验动物中心, 实验动物合格证号 SCXK (甘) 2015-0002, 实验动物使用许可证号 SYXK (甘) 2020-0009。分笼饲养, 每笼 6~8 只, 给予大鼠标准饲料及洁净饮用水 (均由甘肃中医药大学实验动物中心提供)。12 h/12 h 昼夜交替, 环境湿度 30%~40%, 温度 20~25℃。

1.2 药物

复方地黄颗粒组成: 熟地黄 20 g, 白芍 30 g, 钩藤 15 g, 珍珠母 15 g, 丹参 20 g, 石菖蒲 12 g, 全蝎 2 g。颗粒剂由上海中医药大学提供, 委托国家中药制药工程技术研究中心制备。美多芭片 (批号 SH4189), 上海罗氏制药有限公司; 6-OHDA 粉剂 (批号 MKBP1027V)、阿朴吗啡粉剂 (APO, 批号 SLBF8273V)、抗坏血酸粉剂 (批号 063K2059), 美国 Sigma 公司; 庆大霉素注射剂 (批号 20200687, 0.3 g/支), 上海第一制药厂。

1.3 主要试剂及仪器

戊巴比妥钠粉剂 (批号 WS20130198), 上海中西药业股份有限公司; 水合氯醛 (批号 20200726), 国药集团上海化学试剂有限公司; 抗 β -catenin 抗体 (批号 ab32572)、抗糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β) 抗体 (批号 ab93926), 英国 Abcam 公司; 抗卷曲同源物 1 (Fzd1) 抗体 (批号 PB0625), 博士德生物工程有限公司; 抗 Wnt1 抗体 (货号 AF5315)、磷酸化抗低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 (P-LRP6) 抗体 (货号 DF2994)、羊抗兔酶标 (IgG-HRP) 抗体 (货号 S0001), Affinity 公司; 抗 β -Actin 抗体 (货号 MON8092), Immunoway 公司; 羊抗鼠 IgG (货号 11031), 美国 Thermo 公司; Trizol (批号 R0016)、RIPA 裂解液 (批号 P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 P0012)、SDS-PAGE 电泳液 (Tris-Gly, 批号 P0014C)、超敏 ECL 化学发光试剂盒 (批号 P0018S)、DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒 (批号 P0203)、苏木素染色液 (批号 C0107), 上海碧云天生物技术有限公司;

QuantiNova Reverse Transcription Kit (批号 205413)、QuantiFast SYBR Green PCR Kit (批号 204056), 德国 Qiagen 公司; 4% 多聚甲醛 (批号 E672002), 生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

单臂数显脑立体定位仪 (BW-SAD902 型, 上海软隆科技发展有限公司), 实时荧光定量 PCR 仪 (LightCycler96 型, Roche 公司), 凝胶成像系统 (Gel View 6000plus 型, 广州博鹭腾生物科技有限公司)。

1.4 造模、分组及给药

175 只 SD 大鼠常规饲养 1 周后, 按随机数字表法分为正常组, 假手术组, 模型组, 美多芭组, 复方地黄颗粒低、中、高剂量组, 每组 25 只。除正常组和假手术组外, 其余各组大鼠参照文献 [7] 制备 PD 阴虚动风证模型。根据《大鼠脑立体定位图谱》^[8], 确定右侧黑质二坐标 (前囟后 5.2 mm, 正中右侧 1.0 mm, 硬膜下 9.0 mm; 前囟后 5.2 mm, 正中右侧 2.5 mm, 硬膜下 8.5 mm)。大鼠术前 12 h 禁食不禁水, 术前确认大鼠神经行为学测试^[9]无异常。3% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉大鼠, 将其固定在脑立体定位仪, 颅顶剃毛备皮, 碘伏消毒, 沿正中右侧切开, 剥离骨膜, 暴露颅顶, 颅骨钻孔, 用微量进样器将 6-OHDA (溶于含 0.02% 抗坏血酸的生理盐水中, 2 μ g/ μ l) 注入孔内 (进针速度 1.0 mm/min), 每孔 3 μ l, 注射速度为 1 μ l/min, 注射后留针 5 min, 然后以 1.0 mm/min 速度退针。颅骨孔填塞医用明胶海绵, 缝合切口, 肌肉注射庆大霉素 20 万单位/只共 7 天预防颅内感染, 待大鼠清醒后放入饲养笼。正常组除固定大鼠外, 不进行任何处理。假手术组除注射 0.02% 抗坏血酸的等量生理盐水外, 其余同造模大鼠。

术后 10 天用 APO (0.5 mg/kg) 经腹腔注射诱导大鼠向健侧旋转, 记录旋转始至 30 min 末的旋转圈数, 以 >7 圈/min 者为 PD 成功动物模型^[7]。本研究采用两点法将 6-OHDA 注射于 SD 大鼠右侧黑质来构建病证结合动物模型, 课题组前期研究证实, 该模型具有疾病 (帕金森病) 和证候 (阴虚动风证) 的双重特征^[5,7]。造模后大鼠向健侧旋转, 伴情绪易激惹, 肢体震颤, 毛发干枯, 大便干燥呈粒状, 小便量少色黄, 舌红, 平均每只大鼠饮水量 45 ml/24 h, 符合阴虚动风证的表现。

共 60 只大鼠造模成功, 其中模型组 13 只, 美多芭组 14 只, 复方地黄颗粒低、中、高剂量组各 11 只。造模结束后第 2 天开始给药, 给药量参照

《定量药理学》^[10] 中方法计算。复方地黄颗粒低、中、高剂量组分别给予复方地黄颗粒 1.75、3.5、7 g/(kg·d)灌胃,其中中剂量为人与大鼠的等效剂量,美多芭组给予美多芭 150 mg/(kg·d)灌胃,灌胃量 2 ml。正常组、假手术组及模型组给予生理盐水 2 ml 灌胃。各组每天灌胃 1 次,共 28 天。

1.5 标本采集

给药结束后,在 Excel 2019 表中使用随机函数每组选取 11 只大鼠,进行一般情况观察及神经行为学检测。灌胃结束空腹 12 h 后将各组大鼠先称重,然后腹腔注射 10% 水合氯醛 (30 mg/kg) 麻醉。各组按随机数字表法取大鼠 3 只,灌注预冷的 4% 多聚甲醛进行固定取脑,剥离完整的脑组织,并置于 4% 多聚甲醛中常温保存,用于后续免疫组化实验。各组剩余 8 只大鼠于冰上快速剥离完整脑组织,并分离出大鼠右侧纹状体部分,置于冻存管中,放入液氮罐速冻,后转移至 -80 °C 冰箱保存备用。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 大鼠一般情况 记录各组大鼠精神、毛发、饮食、活动量、体重等情况。

1.6.2 神经行为学检测 给药结束后用 APO (0.5 mg/kg) 经腹腔注射,诱导大鼠向健侧旋转,记录各组大鼠旋转始至 30 min 末的旋转圈数。

1.6.3 RT-PCR 法检测右侧纹状体组织中 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1、GSK-3 β mRNA 表达 在 Excel 2019 表中使用随机函数每组选取 5 只大鼠脑组织进行检测,提取大鼠右侧纹状体总 RNA,反转录后,选用 β -actin 作为内参。反应条件如下: 95 °C 120 s; 95 °C 5 s, 60 °C 3 s, 45 ~ 50 个循环; 95 °C 15 s; 60 °C 60 s; 95 °C 15 s。每组 3 个复孔。实验数据由 PCR 分析仪采集的目的基因和内参基因的 CT 值进行计算, $\Delta CT = CT_{目的} - CT_{内参}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{实验组} - \Delta CT_{对照组}$, 各组的相对表达量为由上述各组再与对照组间 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行计算所得。引物由大连 Takara 公司合成,引物序列见表 1。

1.6.4 Western Blot 法检测右侧纹状体组织中 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1、GSK-3 β 蛋白表达 在 Excel 2019 表中使用随机函数每组选取 3 只大鼠脑组织进行检测,采用 RIPA 裂解法提取大鼠右侧纹状体蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,根据测定结果上样,进行 SDS-PAGE 电泳,浓缩胶 100 V 30 min,分离胶 120 V 80 min,恒流转模 90 mA 1.5 h,5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,放入一抗 (Wnt1、P-LRP6、

表 1 大鼠右侧纹状体组织 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1、GSK-3 β mRNA 引物序列

引物	序列 (5'-3')	产物长度 /bp
β -actin	正向: CCTAAGGCCAACCCTGAAAA 反向: CAGAGGCATACAGGGACAACAC	103
Wnt1	正向: TCCTCATGAACCTTCACAATAACGA 反向: TTGCACTCTTGGCGCATCTC	70
P-LRP6	正向: TGGCATTGGATCCTGCTGAA 反向: TGCTCGACCCACATTGGA	122
β -catenin	正向: GTCTGAGGACAAGCCACAGGACTAC 反向: AATGTCCAGTCCGAGATCAGCA	115
Fzd1	正向: GGAATGCAGTCACCAGTACCA 反向: CCAGACCCATAGCAGGTTCCA	98
Gsk-3 β	正向: TTCTCGGTACTACAGGGCACCA 反向: GTCCTAGCAACAATTCAGCCAACA	107

注: P-LRP6, 磷酸化低密度脂蛋白受体相关蛋白 6; β -catenin, β 连环蛋白; Fzd1, 抗卷曲同源物 1; GSK-3 β , 抗糖原合成酶激酶 3 β 。

β -catenin 按照 1 : 1000 稀释; Fzd1、GSK-3 β 按照 1 : 500 稀释; β -actin 内参按照 1 : 800 稀释) 中, 4 °C 摇床过夜。次日, 回收一抗, -20 °C 保存。TBST 洗脱一抗 8 min×3 次; 后放入二抗, 摇床孵育 1 h, TBST 洗脱二抗 8 min×3 次。ECL 显色曝光后, 用 Image J 1.8.0 软件分析灰度值, 以 β -actin 为参照。

1.6.5 免疫组化法检测右侧纹状体组织中 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1、GSK-3 β 表达 取大鼠脑组织纹状体部位切片, 进行免疫组化: 烤片、脱蜡、抗原修复、过氧化氢封闭内源性过氧化物酶、血清封闭、一抗 (兔抗鼠) 孵化、二抗 (羊抗兔) 孵化、DAB 显色、苏木素复染、脱水封片; 各组各指标取 3 张切片拍照, 每张切片取纹状体部位 3 个随机视野。运用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析图像, 测定阳性细胞数平均光密度值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件统计分析。计量资料均符合正态分布且方差齐, 用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

正常组、假手术组大鼠精神良好, 饮食可, 活动佳, 毛发光泽柔软, 体重增加。模型组大鼠精神较差, 反应迟钝, 毛发污秽、枯暗, 饮食、活动均减少, 体重减轻。与模型组比较, 美多芭组、复方

地黄颗粒各剂量组大鼠精神、毛发、饮食、活动量等均有所改善，体重增加，其中以美多芭组与复方地黄颗粒高剂量组改善较为明显，两组改善程度基本一致。

2.2 各组大鼠神经行为学结果比较

表 2 示，与正常组、假手术组比较，模型组大鼠旋转圈数增多 ($P<0.01$)；与模型组比较，美多芭组及复方地黄颗粒各剂量组大鼠旋转圈数均减少 ($P<0.01$)；与美多芭组比较，复方地黄颗粒低、中剂量组大鼠旋转圈数明显增多 ($P<0.01$)，而复方地黄颗粒高剂量组旋转圈数差异无统计学意义 ($P>0.05$)；大鼠旋转圈数随复方地黄颗粒剂量增多而减少，呈剂量依赖性 ($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠神经行为学结果比较 (r/30 min, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	旋转圈数
正常组	11	0
假手术组	11	0
模型组	11	616.82±21.20 ^{a)}
美多芭组	11	234.45±11.53 ^{b)}
复方地黄颗粒低剂量组	11	338.18±20.40 ^{b) c)}
复方地黄颗粒中剂量组	11	293.73±25.89 ^{b) c) d)}
复方地黄颗粒高剂量组	11	237.82±20.41 ^{b) d) e)}

注：a)与正常组、假手术组比较， $P<0.01$ ；b)与模型组比较， $P<0.01$ ；c)与美多芭组比较， $P<0.01$ ；d)与复方地黄颗粒低剂量组比较， $P<0.01$ ；e)与复方地黄颗粒中剂量组比较， $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠右侧纹状体组织中 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 及 GSK-3 β mRNA 表达比较

表 3 示，正常组、假手术组各指标比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与正常组、假手术组比较，模型组大鼠 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 mRNA 的表达明显降低，GSK-3 β mRNA 表达明显升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，美多芭组及复方地黄颗粒各剂量组大鼠 Wnt1、P-LRP6、

β -catenin、Fzd1 mRNA 表达均明显升高，GSK-3 β mRNA 表达明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；复方地黄颗粒高剂量组与美多芭组比较各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$)；美多芭组及复方地黄颗粒高剂量组 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 mRNA 表达明显高于复方地黄颗粒低、中剂量组，GSK-3 β mRNA 表达则低于复方地黄颗粒低、中剂量组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；复方地黄颗粒各剂量组各指标呈剂量依赖性，以复方地黄颗粒高剂量组 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 mRNA 表达最高，GSK-3 β mRNA 表达最低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.4 各组大鼠右侧纹状体组织中 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 及 GSK-3 β 蛋白表达比较

表 4、图 1 示，正常组、假手术组各指标比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与正常组、假手术组比较，模型组大鼠 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 蛋白表达降低，GSK-3 β 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，美多芭组及复方地黄颗粒各剂量组大鼠 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 蛋白表达均升高，GSK-3 β 蛋白表达则明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；复方地黄颗粒高剂量组各指标蛋白表达与美多芭组比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与美多芭组及复方地黄颗粒高剂量组比较，复方地黄颗粒低、中剂量组 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 蛋白表达降低，GSK-3 β 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。复方地黄颗粒各剂量组各指标呈剂量依赖性，以复方地黄颗粒高剂量组 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 蛋白水平最高，GSK-3 β 蛋白水平最低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.5 各组大鼠右侧纹状体组织中 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 及 GSK-3 β 免疫组化结果比较

表 5 示，正常组、假手术组各指标比较差异均

表 3 各组大鼠右侧纹状体组织中 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 及 GSK-3 β mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Wnt1	P-LRP6	β -catenin	Fzd1	GSK-3 β
正常组	5	1.00±0.09	1.00±0.06	1.00±0.05	1.00±0.03	1.01±0.15
假手术组	5	0.97±0.01	1.01±0.05	1.00±0.03	1.00±0.03	0.99±0.07
模型组	5	0.17±0.01 ^{a)}	0.08±0.01 ^{a)}	0.20±0.03 ^{a)}	0.06±0.01 ^{a)}	3.36±0.05 ^{a)}
美多芭组	5	0.64±0.01 ^{b)}	0.48±0.02 ^{b)}	0.81±0.11 ^{b)}	0.75±0.04 ^{b)}	1.45±0.05 ^{b)}
复方地黄颗粒低剂量组	5	0.30±0.04 ^{b) d)}	0.19±0.02 ^{b) d)}	0.37±0.10 ^{b) e)}	0.21±0.01 ^{b) e)}	2.52±0.09 ^{c) e)}
复方地黄颗粒中剂量组	5	0.45±0.02 ^{b) d) f)}	0.38±0.04 ^{b) d) f)}	0.55±0.18 ^{b) e) f)}	0.56±0.04 ^{b) e) g)}	1.80±0.11 ^{b) e) g)}
复方地黄颗粒高剂量组	5	0.65±0.03 ^{b) f) h)}	0.45±0.04 ^{b) f) h)}	0.76±0.10 ^{c) f) i)}	0.77±0.07 ^{c) g) i)}	1.48±0.06 ^{b) g) h)}

注：P-LRP6，低密度脂蛋白受体相关蛋白 6； β -catenin， β 连环蛋白；Fzd1，抗卷曲同源物 1；GSK-3 β ，抗糖原合成酶激酶 3 β 。

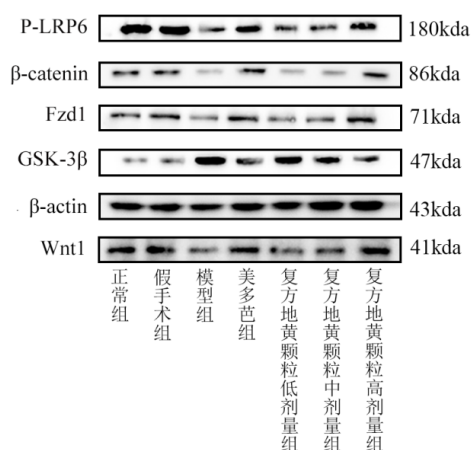
a) 与正常组、假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与美多芭组比较， $P<0.05$ ；e) 与美多芭组比较， $P<0.01$ ；f) 与复方地黄颗粒低剂量组比较， $P<0.05$ ；g) 与复方地黄颗粒低剂量组比较， $P<0.01$ ；h) 与复方地黄颗粒中剂量组比较， $P<0.05$ ；i) 与复方地黄颗粒中剂量组比较， $P<0.01$ 。

表 4 各组大鼠右侧纹状体组织中 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 及 GSK-3 β 蛋白表达比较 (β -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Wnt1	P-LRP6	β -catenin	Fzd1	GSK-3 β
正常组	3	1.146 $\pm$ 0.030	0.956 $\pm$ 0.015	1.236 $\pm$ 0.024	1.074 $\pm$ 0.051	0.323 $\pm$ 0.024
假手术组	3	1.153 $\pm$ 0.012	0.919 $\pm$ 0.010	1.236 $\pm$ 0.032	1.024 $\pm$ 0.070	0.335 $\pm$ 0.036
模型组	3	0.537 $\pm$ 0.026 ^{a)}	0.420 $\pm$ 0.012 ^{a)}	0.372 $\pm$ 0.006 ^{a)}	0.304 $\pm$ 0.017 ^{a)}	1.323 $\pm$ 0.007 ^{a)}
美多芭组	3	1.045 $\pm$ 0.001 ^{b)}	0.816 $\pm$ 0.060 ^{b)}	0.772 $\pm$ 0.022 ^{b)}	0.672 $\pm$ 0.007 ^{b)}	0.494 $\pm$ 0.008 ^{b)}
复方地黄颗粒低剂量组	3	0.774 $\pm$ 0.017 ^{b) d)}	0.527 $\pm$ 0.062 ^{b) d)}	0.516 $\pm$ 0.009 ^{b) e)}	0.442 $\pm$ 0.016 ^{b) e)}	0.964 $\pm$ 0.011 ^{c) e)}
复方地黄颗粒中剂量组	3	0.939 $\pm$ 0.028 ^{b) d) f)}	0.630 $\pm$ 0.026 ^{b) d) f)}	0.619 $\pm$ 0.020 ^{b) e) f)}	0.553 $\pm$ 0.058 ^{b) e) g)}	0.886 $\pm$ 0.018 ^{b) e) g)}
复方地黄颗粒高剂量组	3	1.019 $\pm$ 0.034 ^{b) f) h)}	0.800 $\pm$ 0.018 ^{b) f) h)}	0.754 $\pm$ 0.011 ^{c) f) i)}	0.671 $\pm$ 0.014 ^{c) f) i)}	0.469 $\pm$ 0.028 ^{b) g) h)}

注: P-LRP6, 低密度脂蛋白受体相关蛋白 6; β -catenin, β 连环蛋白; Fzd1, 抗卷曲同源物 1; GSK-3 β , 抗糖原合成酶激酶 3 β 。

a) 与正常组、假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与美多芭组比较, $P < 0.05$; e) 与美多芭组比较, $P < 0.01$; f) 与复方地黄颗粒低剂量组比较, $P < 0.05$; g) 与复方地黄颗粒低剂量组比较, $P < 0.01$; h) 与复方地黄颗粒中剂量组比较, $P < 0.05$; i) 与复方地黄颗粒中剂量组比较, $P < 0.01$ 。



注: P-LRP6, 磷酸化低密度脂蛋白受体相关蛋白 6; β -catenin, β 连环蛋白; Fzd1, 抗卷曲同源物 1; GSK-3 β , 抗糖原合成酶激酶 3 β 。

图 1 各组大鼠右侧纹状体中 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 及 GSK-3 β 蛋白电泳图

无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常组、假手术组比较, 模型组大鼠 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 阳性细胞数降低, GSK-3 β 阳性细胞数升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 美多芭组及复方地黄颗粒各剂量组大鼠 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、

Fzd1 阳性细胞数均明显升高, GSK-3 β 阳性细胞数则明显降低 ($P < 0.05$); 复方地黄颗粒高剂量组各指标与美多芭组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与复方地黄颗粒低、中剂量组比较, 美多芭组及复方地黄颗粒高剂量组 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 阳性细胞数明显升高, GSK-3 β 阳性细胞数明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。复方地黄颗粒各剂量组存在量效关系, 以高剂量组效果最显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

PD 病机特点为本虚标实, 本虚为肝肾亏损, 阴虚动风, 筋脉失养; 标实为风、痰、瘀、毒互结, 壅塞脑窍, 治则是滋阴熄风、活血化瘀、散结解毒。复方地黄颗粒中熟地黄补益肾精、滋阴养血、固本培元, 为君药; 钩藤熄风定惊、化痰舒筋, 珍珠母滋阴潜阳、定惊止颤、养血舒筋, 白芍养肝血、滋肝阴、柔肝气, 三者同用, 可助君药滋阴养血、平肝熄风, 共为臣药; 丹参养血、活血、化瘀, 石菖蒲化痰除湿、开窍醒神, 共为佐药; 全蝎集解毒熄风、化痰祛瘀、通络散结于一体, 为使

表 5 各组大鼠右侧纹状体组织中 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 及 GSK-3 β 免疫组化结果比较 (平均光密度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Wnt1	P-LRP6	β -catenin	Fzd1	GSK-3 β
正常组	3	0.343 $\pm$ 0.024	0.330 $\pm$ 0.013	0.142 $\pm$ 0.008	0.330 $\pm$ 0.015	0.222 $\pm$ 0.012
假手术组	3	0.335 $\pm$ 0.028	0.339 $\pm$ 0.003	0.139 $\pm$ 0.004	0.342 $\pm$ 0.026	0.222 $\pm$ 0.011
模型组	3	0.090 $\pm$ 0.003 ^{a)}	0.121 $\pm$ 0.020 ^{a)}	0.016 $\pm$ 0.003 ^{a)}	0.122 $\pm$ 0.010 ^{a)}	0.849 $\pm$ 0.025 ^{a)}
美多芭组	3	0.273 $\pm$ 0.017 ^{b)}	0.241 $\pm$ 0.014 ^{b)}	0.076 $\pm$ 0.008 ^{b)}	0.262 $\pm$ 0.019 ^{b)}	0.351 $\pm$ 0.012 ^{b)}
复方地黄颗粒低剂量组	3	0.129 $\pm$ 0.003 ^{b) d)}	0.167 $\pm$ 0.008 ^{b) d)}	0.043 $\pm$ 0.00 ^{b) e)}	0.162 $\pm$ 0.026 ^{b) e)}	0.604 $\pm$ 0.015 ^{c) e)}
复方地黄颗粒中剂量组	3	0.187 $\pm$ 0.014 ^{b) d) f)}	0.197 $\pm$ 0.007 ^{b) d) f)}	0.057 $\pm$ 0.003 ^{b) e) f)}	0.203 $\pm$ 0.020 ^{b) e) g)}	0.500 $\pm$ 0.010 ^{b) e) g)}
复方地黄颗粒高剂量组	3	0.255 $\pm$ 0.010 ^{b) f) h)}	0.248 $\pm$ 0.015 ^{b) f) h)}	0.074 $\pm$ 0.005 ^{c) f) i)}	0.252 $\pm$ 0.009 ^{c) f) i)}	0.353 $\pm$ 0.012 ^{b) g) h)}

注: P-LRP6, 低密度脂蛋白受体相关蛋白 6; β -catenin, β 连环蛋白; Fzd1, 抗卷曲同源物 1; GSK-3 β , 抗糖原合成酶激酶 3 β 。

a) 与正常组、假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与美多芭组比较, $P < 0.05$; e) 与美多芭组比较, $P < 0.01$; f) 与复方地黄颗粒低剂量组比较, $P < 0.05$; g) 与复方地黄颗粒低剂量组比较, $P < 0.01$; h) 与复方地黄颗粒中剂量组比较, $P < 0.05$; i) 与复方地黄颗粒中剂量组比较, $P < 0.01$ 。

药。上述诸药配伍，共奏滋阴熄风、活血化痰、散结解毒之功。

PD 是一种神经系统退行性疾病，其发病机制与异常蛋白质稳态、线粒体功能障碍、氧化应激、神经递质水平降低等有关^[11]。Wnt/ β -catenin 信号通路处于激活状态时，Wnt 蛋白（如 Wnt1）与 Frizzled 家族及 LRP5/6 结合，致使 β -catenin 稳定地积累，最终进入细胞核与转录因子 TCF/LEF 结合，而后激活下游靶基因的表达。Wnt1 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的启动蛋白^[12]，同时，作为调节中脑 DA 前体细胞增殖分化的重要分子，Wnt1 缺失会使中脑发育紊乱^[13]。P-LRP6 介导的 Wnt/ β -catenin 信号通路对神经元突触完整性和神经元活性具有至关重要的作用^[14]。成熟的中脑表达 DAT 的神经元包含大多数卷曲受体蛋白（frizzleds, Fzds），以 Fzd1 最丰富^[15]。Fzd1 受体是中脑 DA 神经元的下游促存活效应子，与 Wnt1 共同参与星形胶质细胞神经保护作用。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的主要成分，细胞实验证实 β -catenin 是调控 DA 能神经发生的关键分子，它通过维持神经微环境的完整性和神经前体细胞向 DA 能神经元的发育进程来调控 DA 能神经元^[16]。GSK-3 β 与路易小体中 α -突触核蛋白（ α -synuclein）的表达密切相关，使用 GSK-3 β 抑制剂可降低 α -synuclein 的表达^[17]。综上所述，Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 及 GSK-3 β 共同参与了 Wnt/ β -catenin 信号通路的活动进程，在 PD 的发病过程中起重要作用。本研究结果显示，正常组、假手术组 Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 表达均高于模型组，GSK-3 β 表达低于模型组，说明 6-OHDA 能激活相关信号分子使其表达发生恶性变化，同时抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路活性，该研究结果与相关报道^[18]一致。治疗后美多芭组、复方地黄颗粒各剂量组大鼠的旋转圈数减少，精神、毛发、饮食、活动量较灌胃前明显好转，Wnt1、P-LRP6、 β -catenin、Fzd1 表达明显升高、GSK-3 β 表达明显降低，提示复方地黄颗粒与美多芭均能调控 Wnt/ β -catenin 信号通路，且认为其可能通过调控该通路分子，缓解 PD 症状，复方地黄颗粒以高剂量效果最佳，与美多芭效果相当。

课题组前期研究已经证实，复方地黄颗粒对 6-OHDA 诱导的 PD 阴虚动风证模型大鼠有较明显的 DA 能神经元保护作用^[19]。结合上述研究结果，6-OHDA 诱导的 PD 阴虚动风证大鼠模型中复方地黄颗粒可能通过调控右侧纹状体组织 Wnt/ β -catenin 信

号通路起到保护 DA 能神经元的作用，其中以复方地黄颗粒高剂量组发挥治疗作用最显著。

参考文献

- [1] 贾建平, 陈生弟. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 321.
- [2] 侯熙德. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 164-165.
- [3] MARCHETTI B, TIROLO C, L'EPISCOPO F, et al. Parkinson's disease, aging and adult neurogenesis: Wnt/ β -catenin signaling as the key to unlock the mystery of endogenous brain repair [J]. Aging Cell, 2020, 19 (3): e13101.
- [4] MISHRA A, SINGH S, TIWARI V, et al. Dopamine receptor activation mitigates mitochondrial dysfunction and oxidative stress to enhance dopaminergic neurogenesis in 6-OHDA lesioned rats: a role of Wnt signaling [J]. Neurochem Int, 2019, 129(10): 104463.
- [5] 田德禄. 中医内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 299.
- [6] 徐鹏恒, 何建成, 王利, 等. 复方地黄汤联合美多巴治疗帕金森病的临床疗效观察 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(2): 838-840.
- [7] 梁建庆, 何建成. 病证结合大鼠帕金森病模型构建初探 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1854-1857.
- [8] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 49-58.
- [9] UNGERSTEDT U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons [J]. Eur J Pharmacol, 1968, 5(1): 107-110.
- [10] 孙瑞元. 定量药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 247.
- [11] RAZA C, ANJUM R, SHAKEEL NUA. Parkinson's disease: mechanisms, translational models and management strategies [J]. Life Sci, 2019, 226: 77-90. doi: 10.1016/j.lfs.2019.03.057.
- [12] CASTELO-BRANCO G, WAGNER J, RODRIGUEZ FJ, et al. Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(22): 12747-12752.
- [13] WURST W, PRAKASH N. Wnt1-regulated genetic networks in midbrain dopaminergic neuron development [J]. J Mol Cell Biol, 2014, 6(1): 34-41.
- [14] CASTELO-BRANCO G, ANDERSSON ER, MININA E, et al. Delayed dopaminergic neuron differentiation in Lrp6 mutant mice [J]. Dev Dyn, 2010, 239(1): 211-221.
- [15] L'EPISCOPO F, SERAPIDE MF, TIROLO C, et al. A Wnt1 regulated Frizzled-1/ β -catenin signaling pathway as

- a candidate regulatory circuit controlling mesencephalic dopaminergic neuron-astrocyte crosstalk: therapeutical relevance for neuron survival and neuroprotection [J]. *Mol Neurodegener*, 2011, 6: 49. doi: 10.1186/1750-1326-6-49.
- [16] ZHAO JW, DYSON SC, KRIEGL C, et al. Modelling of a targeted nanotherapeutic 'stroma' to deliver the cytokine LIF, or XAV939, a potent inhibitor of Wnt- β -catenin signalling, for use in human fetal dopaminergic grafts in Parkinson's disease [J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(10): 1193-1203.
- [17] NAGAO M, HAYASHI H. Glycogen synthase kinase-3 β is associated with Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 449(2): 103-107.
- [18] WANG YL, JU B, ZHANG YZ, et al. Protective effect of curcumin against oxidative stress-induced injury in rats with parkinson's disease through the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(6): 2226-2241.
- [19] 梁建庆, 何建成. 复方地黄颗粒对阴虚动风证帕金森病模型大鼠神经营养因子及其受体的影响 [J]. *解放军医学杂志*, 2018, 43(8): 647-651.

Effect of *Fufang Dihuang Granules* (复方地黄颗粒) on Wnt/ β -catenin Signaling Pathway in Right Striatum of Parkinson's Disease Model Rats with Yin Deficiency Generating Wind Pattern

LIANG Jianqing¹, SUN Xue¹, LIANG Peng², HE Jiancheng³

1. School of Basic Medical Sciences, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, 730101; 2. Lanzhou University Second Hospital; 3. School of Basic Medical Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of *Fufang Dihuang Granules* (复方地黄颗粒, FDG) in treating Parkinson's disease (PD) model rats with yin deficiency generating wind pattern. **Methods** 175 SPF male SD rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model group, madopar group and FDG low-, medium- and high-dose groups, with 25 rats in each group. Except for the normal group and sham operation group, the rats were injected with 6-OHDA to establish model of PD with yin deficiency generating wind pattern. After successful modeling, the rats in FDG low-, medium- and high-dose groups were given 1.75 g/(kg·d), 3.5 g/(kg·d) and 7 g/(kg·d) of FDG, respectively, while those in madopar group were administered with 150 mg/(kg·d) of madopar; the normal group, sham operation group and model group were given 2 ml of normal saline; the interventions in all the groups were administered by gavage, once daily for 28 days. The general condition and neurobehavior of the rats in each group were observed. The mRNA and protein expression levels of Wnt1, low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6), β -catenin, anti-frizzled homolog 1 (Fzd1), and anti-glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) in the right striatum of rats were detected. **Results** Compared to the rats in the normal group and the sham operation group, those in the model group were in poorer spirits, unresponsive, with dirty and dull hair, having decreased diet, activity, and weight. Compared to those in the model group, the spirit, hair, diet, activity of the rats were improved in the madopar group and the FDG low-, medium- and high-dose groups, and the body weight increased; additionally, more improvements were seen in the madopar group and the FDG high-dose group. Compared to those in the normal group and the sham operation group, the number of rotations in the model group increased; the positive cells numbers and mRNA expressions of Wnt1, P-LRP6, β -catenin, and Fzd1 proteins significantly decreased, while those of GSK-3 β significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Compared to the model group, the madopar group and the three FDG groups had decreased the number of rotations of the rats ($P < 0.01$), increased number of positive cells and mRNA expression levels of Wnt1, P-LRP6, β -catenin, and Fzd1 protein in the right striatum, as well as decreased positive cells number and mRNA expression of GSK-3 β ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). FDG dose-dependency was found in the measured outcomes, and FDG high-dose group had highest number of positive cells and mRNA expressions of Wnt1, LRP6, β -catenin and Fzd1, as well as lowest positive cells number and mRNA expression of GSK-3 β ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** FDG may protect dopaminergic neurons by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway in the right striatum of brain tissue, and the highest dose has best effect.

Keywords Parkinson's disease; *Fufang Dihuang Granules* (复方地黄颗粒); yin deficiency generating wind pattern; Wnt/ β -catenin signaling pathways

(收稿日期: 2021-08-31; 修回日期: 2021-11-29)

[编辑: 王利芬]