

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.15.012

实验研究

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

李晨, 王鹏, 王亮, 王学林, 李绍旦, 杨明会✉

中国人民解放军总医院第六医学中心中医医学部, 北京市海淀区复兴路 28 号, 100853



[摘要] **目的** 探讨补肾活血颗粒治疗帕金森病的作用及可能机制。**方法** 将 48 只 C57/BL6 小鼠随机分为空白组 (12 只) 和造模组 (36 只), 造模组小鼠连续 1 周腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6 四氢吡啶 (MPTP) 30 mg/(kg·d) 制备亚急性 PD 小鼠模型, 将造模成功 36 只小鼠再随机分为模型组、补肾活血颗粒组、铁死亡抑制剂组, 各 12 只。补肾活血颗粒组给予补肾活血颗粒药液 3 g/(kg·d) 灌胃, 铁死亡抑制剂组予铁死亡抑制剂 Liproxstatin-1 溶液 10 mg/(kg·d) 腹腔注射, 空白组和模型组给予蒸馏水 10 ml/(kg·d) 灌胃, 均每日 1 次, 连续 2 周。给药结束后的第 2 天运用旷场实验和步态行为分析进行小鼠行为学测试, 免疫组化法观察脑黑质酪氨酸羟化酶 (TH) 阳性表达, 检测脑黑质谷胱甘肽 (GSH)、4-羟基异壬烯醛 (4-HNE)、铁离子 (Fe^{2+}) 含量变化, Western-blot 和 RT-qPCR 法检测脑黑质铁死亡相关因子溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4) 蛋白及 mRNA 的表达。**结果** 与空白组比较, 模型组小鼠在旷场实验中运动总路程缩短、平均速度明显降低, 静止时间明显延长, 步态分析实验中步宽增大、步长减小、步态变异率增大, 脑黑质 TH 表达、GSH 含量及 SLC7A11、GPX4 mRNA 及蛋白表达降低, 4-HNE、 Fe^{2+} 含量、ACSL4 mRNA 及蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 补肾活血颗粒组小鼠运动总路程和平均速度增加, 静止时间缩短, 步宽缩小、步长增加、步态变异率减小, 脑黑质 TH 阳性表达、GSH 含量及 SLC7A11、GPX4 mRNA 及蛋白表达升高, 4-HNE、 Fe^{2+} 含量、ACSL4 mRNA 及蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 铁死亡抑制剂组运动总路程延长、平均速度增加, 步长增加, 脑黑质 TH 阳性表达、GSH 含量及 SLC7A11、GPX4 mRNA 及蛋白表达升高, 4-HNE、 Fe^{2+} 含量、ACSL4 mRNA 及蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。铁死亡抑制剂组与补肾活血颗粒组比较, GPX4 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$), 其余各指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 补肾活血颗粒治疗帕金森病可能机制是通过抑制多巴胺神经元铁死亡, 改善氧化应激, 从而改善运动能力。

[关键词] 帕金森病; 补肾活血颗粒; 脑黑质; 铁死亡; 行为学; 谷胱甘肽

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种年龄依赖性、迟发性神经退行性疾病, 多巴胺 (DA) 能神经元变性坏死所致的黑质-纹状体通路障碍和错误折叠的 α -突触核蛋白 (α -syn) 在神经元中形成的团块, 是其主要的病理特征^[1]。铁死亡是一种由于谷胱甘肽 (GSH) 的合成受阻引起, 并因铁代谢失衡而加剧, 最终导致脂质过氧化物累积到毒性

水平而触发的程序性细胞死亡^[2]。PD 中铁超载、脂质过氧化程度升高、谷胱甘肽表达异常等病理标志是铁死亡途径的主要触发因素^[3-4]。本课题组既往研究证明, 补肾活血颗粒是治疗 PD 的有效复方颗粒, 与单纯西药治疗相比, 可明显延缓疾病进展^[5], 也可改善氧化应激、调节铁代谢异常^[6]。本实验观察补肾活血颗粒对 PD 小鼠 DA 神经元铁死亡途径的作用, 从而探讨补肾活血颗粒对 PD 小鼠的神经保护可能作用机制。本研究通过解放军总医院动物伦理委员会批准 (批准号: 2020-X16-101)。

基金项目: 中组部“万人计划”科技创新领军人才基金; 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程 (岐黄工程) 项目

✉ 通讯作者: ymh9651@sina.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 SPF 级 C57/BL6 小鼠 48 只, 8 周龄, 体质量 (18.0±2.0) g, 购自中国人民解放军总医院实验动物中心, 实验动物许可证号: SYXK (军) 2017-0019。生存环境: 温度 21~23 °C, 湿度 30%~60%, 保持 12 h 明暗交替, 垫料每周更换 2 次。

1.2 药物

补肾活血颗粒(解放军总医院中医医学部制备, 批号: 总 L2016002, 规格: 每袋 10 g), 组成: 肉苁蓉 15 g, 山萸肉 15 g, 赤芍 10 g, 丹参 15 g, 石菖蒲 10 g。将补肾活血颗粒溶于适量蒸馏水进行煎煮, 获得药物终浓度为 0.3 g/ml, 搅拌并加热助于溶解, 4 °C 储存备用。铁死亡抑制剂 Liproxstatin-1 粉末 (APEX-BIO 公司, 批号: 950455-15-9, 规格: 50 mg), 50 mg 药物溶于 2.5 ml DMSO (母液浓度 20 mg/ml), 将 2.5 ml 母液依次加入 15 ml PEG300、5 ml Tween80、27.5 ml ddH₂O, 混匀澄清后浓度为 1 mg/ml。

1.3 主要试剂与仪器

1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP, APEX-BIO 公司, 批号: 23007-85-4); DMSO (批号: 0231)、戊巴比妥钠 (批号: B0500), Tween80 (批号: STS0204-1L), Sigma 公司; PEG300 (批号: S6740), Selleck 公司; 枸橼酸 (PH6.0) 抗原修复液 (批号: G1202), 谷歌生物科技有限公司; BCA 试剂盒 (批号: PC0020)、TBST (批号: T1081), Solarbio 公司; 4% 多聚甲醛 (批号: G1212)、DAB 显色试剂盒 (批号: G1212-200T)、苏木素染液 (批号: G1004-100ML), Servicebio 公司; GSH 试剂盒 (批号: SG2799)、4-羟基异壬烯醛 (4-HNE) 试剂盒 (批号: SG9191), SG Green qPCR Mix (批号: Q1001L), 北京信诺金达生物科技有限公司; Fe²⁺试剂盒 (上海源叶生物科技有限公司, 批号: R22186); 酪氨酸羟化酶 (TH) 一抗 (批号: 25859-1-AP)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 一抗 (批号: 26864-1-AP)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 一抗 (批号: 14432-1-AP), Proteintech 公司; 酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4) 一抗 (博士德生物工程有限公司, 批号: A04372-2); Trizol (批号: R1001)、RNA 提取试剂盒 (批号: R1002)、反转录试剂盒 (批号: Q1010)、RIPA 裂解液 (批号: W1001), 中国 Sino-

Gene 公司; ECL 发光液 (Engreen 公司, 批号: 29050); β -actin (Abclonal 公司, 批号: AC028); HRP 羊抗兔 IgG 二抗 (批号: SA00001-2)、HRP 羊抗鼠 IgG 二抗 (批号: SA00001-1), 美国 PTG 公司。

电泳仪 (型号: JY-300C)、转移槽 (型号: JY-ZY6)、凝胶成像系统 (型号: JY04S-3C), 北京君意东方电泳仪器有限公司; 正置白光拍照显微镜 (日本尼康公司, 型号: Eclipse Ci-L); 酶标仪 (美国伯乐公司, 型号: 680); 冷冻离心机 (SIGMA 公司, 型号: 3K15); 分光光度计 (Eppendorf 公司, 型号: Biophotometer D30)。

1.4 动物分组、造模及给药

将 48 只 C57/BL6 小鼠按照随机数字表法分为空白组 12 只和造模组 36 只, 造模组予 3 mg/ml MPTP 溶液 30 mg/(kg·d) 腹腔注射制备亚急性 PD 小鼠模型^[7], 空白组注射 0.9% 氯化钠溶液 10 ml/(kg·d), 每日 1 次, 连续 1 周。造模后小鼠出现毛发悚立、震颤、弓背、抽搐等症状即为造模成功^[7]。将造模成功的 36 只小鼠按照随机数字表法分为模型组、补肾活血颗粒组、铁死亡抑制剂组, 每组 12 只。按照人与小鼠的等效剂量系数进行换算^[8], 补肾活血颗粒组予补肾活血方药液 3 g/(kg·d) 灌胃, 铁死亡抑制剂组予 Liproxstatin-1 溶液 10 mg/(kg·d) 腹腔注射, 空白组和模型组予蒸馏水 10 ml/(kg·d) 灌胃, 各组均每日 1 次, 连续 2 周。

1.5 观察指标及方法

小鼠给药结束后的第 2 天进行行为学评估, 行为学测试结束后, 采用 1% 戊巴比妥钠 (0.5 ml/100 g) 腹腔注射麻醉小鼠, 开胸并沿心脏灌注 0.9% 氯化钠溶液, 小心剥离颅骨和脑组织后, 将脑组织放入脑定位槽中, 在定位槽的正中及后 1 mm 处分别插入两个刀片, 两刀片之间所夹的脑组织即黑质所在的切面, 并根据脑立体定位图谱确定黑质的具体位置, 用镊子夹取后, 一部分 -80 °C 保存, 用于 Elisa、Western-blot、RT-PCR 的检测; 另一部分用 4% 多聚甲醛固定, 用于免疫组化的病理检测。

1.5.1 行为学评价 旷场实验: 实验前将小鼠放入装有摄像头的旷场装置中适应 10 min, 适应结束后打开旷场实验分析系统, 输入小鼠的编号, 保持周围环境安静, 并开始连续录像 5 min, 通过追踪分析小鼠的自动运行轨迹, 得到小鼠运动总路程、平均速度、总静止时间等指标, 衡量小鼠的运动能力。

步态行为分析: 根据既往研究报道^[9-10], 自制

90 cm×4.5 cm×10 cm 的跑道，并在跑道上铺上相应宽度的白纸，测试时将小鼠前后爪分别涂抹红蓝墨水，使其从一端跑向另一端暗箱的过程中留下脚印，选择 3 个清晰连续的脚印，计算以下数据：步宽 (a)=相邻左右侧两脚印连线的垂直距离，步长 (b)=步行的距离/总步数，c=同侧相邻两脚印的平均距离，d=相邻左右侧两脚印的平均距离，平均步态变异率 $\beta=0.5-d/c$ 。

1.5.2 免疫组化检测脑黑质组织 TH 平均光密度值改变 取固定于 4% 多聚甲醛中的脑黑质组织，进行包埋切片，各级乙醇依次脱水 5 min。枸橼酸 (PH6.0) 抗原修复液及微波加热处理切片，DAB 显色剂滴于切片反应 15 min，苏木素复染 2 min，自来水冲洗后乙醇和二甲苯处理，树胶封固，显微镜下采集图像，计算 TH 光密度值 (IOD)/该区域面积 (Area)，即 TH 平均光密度值。

1.5.3 Elisa 法检测脑黑质组织 GSH、4-HNE、Fe²⁺ 的含量 称取 10 mg 脑黑质组织，充分裂解取上清，BCA 法检测蛋白浓度，根据试剂盒步骤说明测定 GSH、4-HNE、Fe²⁺ 的吸光度，并按照浓度与吸光度之间的线性关系得到 GSH、4-HNE、Fe²⁺ 的含量变化。

1.5.4 RT-PCR 法检测脑黑质组织 SLC7A11、GPX4、ACSL4 mRNA 表达 运用 Trizol 试剂从脑黑质组织中提取 RNA，测定 RNA 浓度及纯度，并严格按照试剂盒说明将其逆转录为 cDNA，加入引物和 2×SG Green qPCR Mix，按照 15 μl 的最终反应体系，进行 40 个扩增循环 (95 ℃ 10 min，95 ℃ 20 s，90 ℃ 30 s)，引物由北京信诺达生物有限公司合成，β-actin：上游 GCCAACAAAGTGCTGTCTGG，下游 GAGTACTTGCCTCAGGAGGAG，长度 131 bp；SLC7A11：上游 TGGCACTCTCCTGGCTTACT，下游 CTAGCTCCTCGGTGGTTCTG，长度 110 bp；GPX4：上游 ACTGCAACAGCTCCGAGTTC，下游 CGATGTCCTTGGCTGAGAAT，长度 93 bp；ACSL4：上游 ACCGTCCCCTCAGACACACC，下游 TGTTCAGCACCACATGATT，长度 94 bp。将结果中的 Ct 值采

用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析，并比较基因的相对表达量。

1.5.5 Western-blot 法检测脑黑质组织 SLC7A11、GPX4、ACSL4 蛋白表达 称取 10 mg 脑黑质组织，RIPA 裂解液和预冷的小钢珠充分研磨裂解，离心取上清，BCA 法测定蛋白含量。样品液和预染蛋白 marker 分别上样后，进行 SDS-PAGE 分离蛋白，待溴酚蓝跑出，停止电泳。准确组装滤纸凝胶纤维素夹层，将相对应的 marker 转移到 PVDF 膜上，并置于封闭液中孵育 1 h 后，分别加入一抗 ACSL4 (1:1000)、GPX4 (1:1000)、SLC7A11 (1:1000) 4 ℃ 过夜，TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，二抗 (1:3000) 孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次，每次 10 min。滴加 ECL 发光液，经 X 胶片曝光显影，Image J 6.0 软件进行灰度分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析，计量资料符合正态分布以均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，组间差异采用单因素方差分析，组间多重比较方差齐时采用 LSD 检验，方差不齐时采用 Games-Howell 检验， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠旷场实验结果比较

表 1 示，模型组小鼠较空白组小鼠运动总路程缩短、平均速度降低，静止时间延长 ($P<0.01$)。与模型组比较，补肾活血颗粒组运动总路程延长、平均速度增加，静止时间缩短 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；铁死亡抑制剂组小鼠运动总路程延长、平均速度增加 ($P<0.05$)，静止时间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。铁死亡抑制剂组与补肾活血颗粒组比较，各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组小鼠步态分析结果比较

表 2 示，与空白组比较，模型组小鼠步宽增大，步长减小，步态变异率增大 ($P<0.01$)。与模型组比较，补肾活血颗粒组小鼠步宽明显缩短，步长明显增长，步态变异率减小 ($P<0.05$ 或 $P<$

表 1 各组小鼠旷场实验结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	运动总路程/cm	平均速度/cm·s ⁻¹	静止时间/s
空白组	12	3579.28±823.45	11.93±2.75	54.70±11.51
模型组	12	2234.44±557.81 ^{a)}	7.45±1.86 ^{a)}	77.19±11.60 ^{a)}
补肾活血颗粒组	12	2909.99±361.11 ^{c)}	9.71±1.21 ^{c)}	67.73±7.55 ^{b)}
铁死亡抑制剂组	12	2718.23±377.42 ^{b)}	9.06±1.26 ^{b)}	70.03±9.18

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

0.01); 铁死亡抑制剂组步长明显增长 ($P<0.05$), 步宽、步态变异率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。铁死亡抑制剂组与补肾活血颗粒组比较, 各指标均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表2 各组小鼠步态分析结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	步宽/cm	步长/cm	步态变异率
空白组	12	2.74±0.21	7.63±0.28	0.12±0.01
模型组	12	3.39±0.24 ^{a)}	5.50±0.24 ^{a)}	0.16±0.03 ^{a)}
补肾活血颗粒组	12	3.19±0.23 ^{b)}	6.31±0.45 ^{c)}	0.14±0.02 ^{b)}
铁死亡抑制剂组	12	3.28±0.21	5.84±0.33 ^{b)}	0.15±0.02

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.3 各组小鼠脑黑质组织TH平均光密度值比较

图1示(彩图请扫描本文二维码获取), 空白组黑质致密部TH阳性细胞胞体完整清晰, 排列均匀致密。模型组TH阳性神经元胞体缩小, 排列稀疏。补肾活血颗粒组TH阳性细胞的损伤减少, 排列整齐, TH阳性神经元形态趋于正常。铁死亡抑制剂组TH阳性细胞形态完整, 排列有序。表3示, 与正常组比较, 模型组小鼠TH平均光密度值减少 ($P<0.01$); 与模型组比较, 补肾活血颗粒组、铁死亡抑制剂组小鼠的TH平均光密度值明显增多 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 铁死亡抑制剂组与补肾活血颗粒组比较, 各指标均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表3 各组小鼠脑黑质TH平均光密度值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TH平均光密度值
空白组	12	0.383±0.03
模型组	12	0.314±0.03 ^{a)}
补肾活血颗粒组	12	0.362±0.04 ^{c)}
铁死亡抑制剂组	12	0.346±0.03 ^{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, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.4 各组小鼠脑黑质组织GSH、4-HNE、Fe²⁺含量比较

表4示, 与空白组比较, 模型组小鼠GSH含量

明显降低, 4-HNE、Fe²⁺含量明显升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 补肾活血颗粒组和铁死亡抑制剂组小鼠脑黑质组织的GSH含量升高, 4-HNE、Fe²⁺含量降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。铁死亡抑制剂组与补肾活血颗粒组比较, 各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表4 各组小鼠脑黑质组织GSH、4-HNE、Fe²⁺含量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	GSH/ng·ml ⁻¹	4-HNE/ng·ml ⁻¹	Fe ²⁺ /μmol·g ⁻¹
空白组	12	12.00±2.12	265.13±21.93	8.97±2.66
模型组	12	6.48±0.59 ^{a)}	355.51±36.51 ^{a)}	18.96±5.17 ^{a)}
补肾活血颗粒组	12	8.36±1.29 ^{c)}	316.45±18.19 ^{c)}	12.05±4.44 ^{c)}
铁死亡抑制剂组	12	9.20±0.33 ^{c)}	319.14±22.61 ^{c)}	15.12±4.51 ^{b)}

注: GSH, 谷胱甘肽; 4-HNE, 4-羟基壬烯醛; Fe²⁺, 铁离子。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.5 各组小鼠脑黑质组织SLC7A11、GPX4、ACSL4 mRNA相对表达量比较

表5示, 与空白组比较, 模型组小鼠SLC7A11、GPX4 mRNA表达明显降低, ACSL4 mRNA表达明显升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 补肾活血颗粒组和铁死亡抑制剂组小鼠脑黑质组织SLC7A11、GPX4 mRNA表达明显升高, ACSL4 mRNA表达明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与铁死亡抑制剂组比较, 补肾活血颗粒组GPX4 mRNA表达降低 ($P<0.01$), 其余各指标均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表5 各组小鼠脑黑质组织SLC7A11、GPX4、ACSL4 mRNA相对表达量比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	SLC7A11	GPX4	ACSL4
空白组	12	1.01±0.21	1.01±0.17	1.00±0.26
模型组	12	0.67±0.13 ^{a)}	0.15±0.05 ^{a)}	5.90±4.33 ^{a)}
补肾活血颗粒组	12	0.94±0.28 ^{b)}	0.64±0.07 ^{c) d)}	1.69±0.48 ^{b)}
铁死亡抑制剂组	12	1.11±0.13 ^{c)}	0.87±0.08 ^{c)}	2.06±0.43 ^{b)}

注: SLC7A11, 溶质载体家族7成员11; GPX4, 谷胱甘肽过氧化物酶4; ACSL4, 酰基辅酶A合成酶长链家族成员4。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与铁死亡抑制剂组比较, $P<0.01$ 。

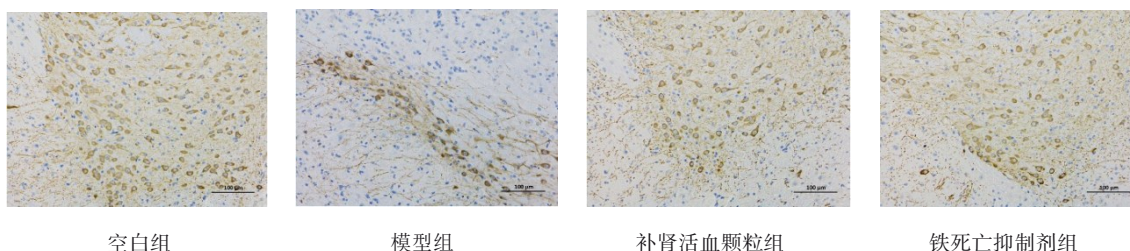


图1 各组小鼠脑黑质酪氨酸羟化酶 (TH) 阳性神经元免疫组化染色结果 (×200)

2.6 各组小鼠脑黑质组织 SLC7A11、GPX4、ACSL4 蛋白相对表达量比较

表 6 示，与空白组比较，模型组小鼠 SLC7A11、GPX4 蛋白相对表达量降低，ACSL4 蛋白相对表达量明显升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，补肾活血颗粒组和铁死亡抑制剂组小鼠 SLC7A11、GPX4 蛋白相对表达量升高，ACSL4 蛋白相对表达量明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。铁死亡抑制剂组与补肾活血颗粒组比较，各指标均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠黑质组织 SLC7A11、GPX4、ACSL4 蛋白电泳图见图 2。

表 6 各组小鼠脑黑质组织 SLC7A11、GPX4、ACSL4 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	SLC7A11	GPX4	ACSL4
空白组	12	1.00±0.05	1.00±0.13	1.00±0.10
模型组	12	0.59±0.14 ^{a)}	0.33±0.23 ^{a)}	1.86±0.25 ^{a)}
补肾活血颗粒组	12	0.99±0.29 ^{c)}	1.17±0.32 ^{c)}	1.57±0.22 ^{b)}
铁死亡抑制剂组	12	1.17±0.16 ^{c)}	1.46±0.24 ^{c)}	1.44±0.15 ^{c)}

注：SLC7A11，溶质载体家族 7 成员 11；GPX4，谷胱甘肽过氧化物酶 4；ACSL4，酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4。
 a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

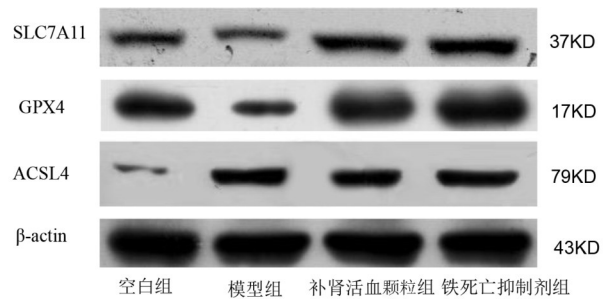


图 2 各组小鼠脑黑质组织 SLC7A11、GPX4、ACSL4 蛋白相对表达量比较

注：SLC7A11，铁死亡相关因子溶质载体家族 7 成员 11；GPX4，谷胱甘肽过氧化物酶 4；ACSL4，酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4。

3 讨论

帕金森病又名震颤麻痹，中医学称之为“颤证”，其根本病机为肾虚血瘀^[6]。肾与脑以督脉相连，与“髓”密切相关，并从神识意志、运动功能等方面联络互属^[11]，成为 PD 老年发病以肾虚精亏为本的理论基础。年老体衰，肾虚血瘀，亦致脑髓不充，筋脉不养，继而发为颤证，其治则当以补肾活血贯穿始终。补肾活血颗粒具有补肾填精益髓、活血化瘀通筋脉功效，其中肉苁蓉、山萸肉补肾益精填髓，为君药；丹参、赤芍活血化瘀，为臣

药；再加石菖蒲等诸药开窍化痰，为佐使药。诸药合用可痰瘀同治，共奏补肾活血之效。补肾活血颗粒已被证明在改善 PD 患者临床指征等方面有效^[12-13]，在基础实验中也证实可通过提高 PD 小鼠的抗氧化水平，促进 α-syn 自噬，下调炎症因子等方面对 DA 神经元起到保护作用^[14-16]。本研究通过旷场实验和步态分析实验等多角度的行为学评估，显示了 PD 模型小鼠主动运动行为显著减少、静止时间延长，以及出现步态异常、共济失调等症状。而补肾活血颗粒和 Liproxstatin-1 干预后，明显改善 PD 小鼠的运动迟缓症状和步态行为，并提高 PD 小鼠的协调能力和自主活动量，且补肾活血颗粒和 Liproxstatin-1 效果相当。

TH 活性降低是 DA 缺乏和 PD 早期发病的重要指征，TH 的表达水平可以直接影响 DA 的合成量，是反映 PD 严重程度重要标志物^[17]。病理检测结果显示，PD 模型小鼠 TH 表达降低，表明 DA 神经元受损严重。补肾活血颗粒和 Liproxstatin-1 干预后可提高 TH 表达，减轻 DA 神经元受损。以上结果表明，MPTP 造模通过降低小鼠脑黑质 TH 阳性表达，引发了 PD 的典型运动症状。而补肾活血颗粒和 Liproxstatin-1 均可以通过提升 TH 的表达，增强 DA 神经元的合成，并进一步改善 DA 能神经元支配下的运动障碍。

既往研究^[18-19]显示，PD 大鼠发病与铁死亡通路密切相关，铁死亡作为氧化损伤介导的一种关键细胞死亡方式，是神经元丢失的重要因素。MPTP 是诱导亚急性 PD 小鼠的常用药物^[20]，最早发现铁死亡的 PD 动物模型是经 MPTP 诱导的^[21]。铁死亡抑制剂 Liproxstatin-1 能够在低浓度范围内抑制铁死亡，能通过血脑屏障，且对其他经典类型的细胞死亡无干扰^[22]，因此本实验选用 Liproxstatin-1 抑制铁死亡进行研究。GSH 的合成受阻是诱发铁死亡的关键环节，Fe²⁺的聚集可以看作铁死亡发生的有效标志物，脂质过氧化物分解物 4-HNE 能破坏膜结构最终导致铁死亡^[23]。GPX4 通过提供还原后的脂质醇 (LOH)，避免了铁过载暴露在脂质过氧化物堆积的环境中，从而发挥抗铁死亡作用^[24]。SLC7A11 是胱氨酸/谷氨酸反向转运体中负责主要转运功能的轻链亚基，并通过提供还原后的半胱氨酸从而在 GSH 的合成中发挥核心作用^[25]。ACSL4 是脂质过氧化的底物，其与辅酶 A 结合，并催化花生四烯酸和肾上腺酸，引起磷脂酰乙醇胺膜磷脂的过度氧化，从而诱发铁死亡^[26]。

本实验结果显示,模型组小鼠与正常组相比,脑黑质 GSH 水平降低,且 4-HNE、 Fe^{2+} 水平升高,脑黑质 GPX4、SLC7A11 蛋白和 mRNA 表达水平明显降低,ACSL4 蛋白和 mRNA 表达上调,而 Liproxstatin-1 干预后可明显逆转上述改变,说明 PD 小鼠脂质过氧化和铁过载共同作用激活了铁死亡途径,DA 神经元的丢失由铁死亡引起。补肾活血颗粒干预后,与铁死亡抑制剂组相比差异没有统计学意义,说明在抑制 DA 神经元铁死亡方面,可达到与 Liproxstatin-1 的同等干预效果。补肾活血颗粒组小鼠 GSH 水平明显升高,4-HNE、 Fe^{2+} 的升高受到抑制,GPX4、SLC7A11 蛋白和 mRNA 表达明显高于模型组,ACSL4 蛋白和 mRNA 表达明显下调。说明补肾活血颗粒的神经保护机制,可能与改善氧化应激水平及抑制 Fe^{2+} 的蓄积,改善脂质的暴露环境,从而直接减少膜磷脂的过度氧化,最终阻断铁死亡途径有关。

综上,补肾活血颗粒可抑制亚急性 PD 模型小鼠脑黑质铁死亡,改善氧化应激水平,从而发挥神经保护的作用,为补肾活血颗粒治疗 PD 提供了实验依据。但本实验分组未设计不同剂量对药物功效的影响,未来可进一步观察不同剂量的干预效果,并从细胞水平进一步挖掘其全面的作用机制。

参考文献

- [1] BALESTRINO R, SCHAPIRA AHV. Parkinson disease [J]. *Eur J Neurol*, 2020, 27(1): 27-42.
- [2] WU L, LIU M, LIANG J, et al. Ferroptosis as a new mechanism in Parkinson's disease therapy using traditional Chinese medicine [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 659584. doi: 10.3389/fphar.2021.659584.
- [3] GUINEY SJ, ADLARD PA, BUSH AI, et al. Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease [J]. *Neurochem Int*, 2017, 104: 34-48. doi: 10.1016/j.neuint.2017.01.004.
- [4] 赵喆, 鲍秀琦, 张丹. 铁死亡调控机制及其在帕金森病中的研究进展[J]. *药学报*, 2019, 54(3): 399-406.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] SEDELIS M, SCHWARTING RK, HUSTON JP. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2001, 125(1/2): 109-125.
- [8] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [9] 曹丽, 夏艳秋, 刘鑫, 等. MPTP 致帕金森模型小鼠海马区 NGF 基因的表达研究[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(7): 957-961.
- [10] 王永玲, 郑晶, 张晓峰. 百草枯诱导帕金森病小鼠行为学和病理学变化的动态观察[J]. *现代预防医学*, 2020, 47(22): 4160-4163, 4167.
- [11] 武峻艳, 王杰, 张俊龙. 肾脑相关理论探讨[J]. *中医杂志*, 2016, 57(20): 1711-1714.
- [12] LI M, YANG MH, LIU Y, et al. Analysis of clinical evaluation of response to treatment of Parkinson's disease with integrated Chinese and western medicine therapy [J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 21(1): 17-21.
- [13] 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.
- [14] 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脑内 SOD、MDA 的影响[J]. *中医学报*, 2017, 32(7): 1219-1222.
- [15] 栾振先, 谌盈帆, 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.
- [16] 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.
- [17] SIMON DK, TANNER CM, BRUNDIN P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology [J]. *Clin Geriatr Med*, 2020, 36(1): 1-12.
- [18] LU J, LIU X, TIAN Y, et al. Moxibustion exerts a neuroprotective effect through anti-ferroptosis in Parkinson's disease [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019: 2735492. doi: 10.1155/2019/2735492.
- [19] TIAN Y, LU J, HAO X, et al. FTH1 inhibits ferroptosis through ferritinophagy in the 6-OHDA model of Parkinson's disease [J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(4): 1796-1812.
- [20] KALARIA RN, MITCHELL MJ, HARIK SI. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84(10): 3521-3525.
- [21] DO VAN B, GOUEL F, JONNEAUX A, et al. Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC[J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 94: 169-178. doi: 10.1016/j.nbd.

2016. 05. 011.
- [22] ZILKA O, SHAH R, LI B, et al. On the mechanism of cytoprotection by ferrostatin-1 and liproxstatin-1 and the role of lipid peroxidation in ferroptotic cell death [J]. ACS Cent Sci, 2017, 3(3): 232-243.
- [23] MAHONEY-SÁNCHEZ L, BOUCHAOUI H, AYTON S, et al. Ferroptosis and its potential role in the pathophysiology of Parkinson's Disease [J]. Prog Neurobiol, 2021, 196: 101890. doi: 10.1016/j.pneurobio. 2020. 101890.
- [24] FRIEDMANN ANGELI JP, SCHNEIDER M, PRONETH B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(12): 1180-1191.
- [25] KOPPULA P, ZHANG Y, ZHUANG L, et al. Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer [J]. Cancer Commun (Lond), 2018, 38(1): 12. doi: 10.1186/s40880-018-0288-x.
- [26] DOLL S, PRONETH B, TYURINA YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition [J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(1): 91-98.

Effect of *Bushen Huoxue Granule* (补肾活血颗粒) on Ferroptosis of Dopamine Neurons in Substantia Nigra of Subacute Parkinson's Disease Model Mice

LI Chen, WANG Peng, WANG Liang, WANG Xuelin, LI Shaodan, YANG Minghui

Department of Traditional Chinese Medicine, The Sixth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853

ABSTRACT **Objective** To investigate the effects of *Bushen Huoxue Granule* (补肾活血颗粒, BSHXG) on Parkinson's disease (PD) and the possible mechanism. **Methods** Thirty-six successful modeling subacute PD mice prepared by 7-day continuous intraperitoneal injection of 30 mg/(kg·d) 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) were randomly divided into model group, BSHXG group, Liproxstatin-1 (Lip-1) group with 12 mice in each group, and another 12 C57/BL6 mice were taken as blank group. The BSHXR group was given 3 g/(kg·d) BSHXG solution by gavage, while the Lip-1 group was administered with intraperitoneal injection of 10 mg/(kg·d) Lip-1 solution, and the blank and model group were given 10 ml/(kg·d) distilled water by gavage, once daily for two weeks. The behavioral performance of mice was detected by open field experiment and gait analysis, and the positive expression of tyrosine hydroxylase (TH) in substantia nigra was observed by immunohistochemistry. The contents of glutathione (GSH), 4-hydroxyisononenal (4-HNE) and ferric ion (Fe^{2+}) in substantia nigra were assessed, and the protein and mRNA expressions of ferroptosis related factors solute including carrier family 7 member 11 (SLC7A11), glutathione peroxidase 4 (GPX4) and acyl-CoA synthase long-chain family member 4 (ACSL4) were detected by Western-blot and RT-qPCR. **Results** Compared to those in the blank group, the total distance and average speed of mice in the model group decreased, and the resting time increased in the open field experiment; the gait analysis showed the step width in the model group increased, while the step length decreased, and the gait variation rate increased; the TH expression, the GSH content and the expression of SLC7A11 and GPX4 mRNA and protein decreased, while the contents of 4-HNE and Fe^{2+} and expression of ACSL4 mRNA and protein increased ($P < 0.01$). Compared to those in the model group, the total distance and average speed of mice in BSHXG group increased, while the resting time decreased significantly; the step width was shortened, while the step length increased, and the gait variation rate decreased; the TH positive expression, the GSH content and the mRNA and protein expression of SLC7A11 and GPX4 increased, while 4-HNE and Fe^{2+} contents and ACSL4 mRNA and protein expression decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the model group, the Lip-1 group increased the total distance, average speed and step length, increased the TH positive expression, GSH content and the SLC7A11 and GPX4 mRNA and protein expression, and decreased 4-HNE and Fe^{2+} contents and ACSL4 mRNA and protein expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to that in the BSHXG group, the expression of GPX4 mRNA in Lip-1 group increased ($P < 0.01$), while there were no statistical significant differences in other outcomes between groups ($P > 0.05$). **Conclusion** BSHXG in the treatment of PD may improve athletic ability by inhibiting ferroptosis of dopamine neurons and improving oxidative stress.

Keywords parkinson's disease; *Bushen Huoxue Granule* (补肾活血颗粒); substantia nigra; ferroptosis; behaviour performance; glutathione

(收稿日期: 2022-01-13; 修回日期: 2022-04-12)

[编辑: 邓媛]