

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.09.012

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信号通路的影响崔拓拓¹, 曹俊岭², 欧阳竞锋³✉, 尹梦霞³, 刘鑫¹, 孙梦菲³

1. 北京中医药大学东方医院, 北京市丰台区方庄芳星园一区6号, 100078; 2. 北京中医药大学东直门医院洛阳医院; 3. 中国中医科学院医学实验中心



[摘要] **目的** 探讨大定风珠对帕金森病神经损伤的影响及可能作用机制。**方法** 84只C57BL雄性小鼠随机分为正常组、模型组、多巴丝肼组及大定风珠低、中、高剂量组, 每组14只。除正常组外, 其余各组小鼠每天腹腔注射鱼藤酮2.5 mg/kg连续28天复制帕金森病小鼠模型。造模同时大定风珠低、中、高剂量组分别给予大定风珠混悬液5、10、20g/(kg·d)灌胃, 多巴丝肼组给予多巴丝肼混悬液0.034 g/(kg·d)灌胃, 正常组和模型组小鼠给予生理盐水0.08 ml灌胃, 均每日1次, 共28天。灌胃结束后对各组小鼠进行旷场实验(包括水平运动总距离、中央区域运动总距离、静止时间)、爬杆实验(包括转身时间及爬杆总时间)评价小鼠行为学改变; 高效液相色谱法检测小鼠纹状体多巴胺(DA)、5羟色胺(5-HT)水平; HE染色法观察小鼠中脑黑质致密部多巴胺能神经细胞病理改变; 免疫组化法检测黑质致密部、纹状体酪氨酸羟化酶(TH)表达; 免疫荧光法检测黑质致密部 α -突触核蛋白(α -synuclein)、离子钙结合衔接分子1(Iba-1)表达; 蛋白免疫印迹法检测纹状体Toll样受体4(TLR4)、髓样分化因子88(MyD88)、核转录因子 κ B p65(NF- κ B p65)、磷酸化核转录因子 κ B p65(p-NF- κ B p65)蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠水平运动总距离和中央区域运动总距离明显减少、静止时间延长($P<0.01$), 爬杆实验转身时间及爬杆运动总时间显著延长($P<0.01$); 小鼠纹状体DA、5-HT含量减少, TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65蛋白表达明显上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 黑质DA能神经细胞数量明显减少, 排列紊乱且胞体皱缩; 纹状体和黑质致密部TH阳性表达显著减少, α -synuclein、Iba-1荧光强度显著增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 大定风珠中、高剂量组小鼠水平运动总距离增加、静止时间减少, 爬杆实验转身时间及爬杆运动总时间显著缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 纹状体DA、5-HT含量增加, TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65蛋白表达明显减少; 黑质DA能神经细胞数量增加, 排列有序, TH阳性表达显著增加, α -synuclein、Iba-1荧光强度减弱($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与多巴丝肼组比较, 大定风珠中、高剂量组 α -synuclein、Iba-1荧光强度及MyD88蛋白表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 大定风珠可缓解鱼藤酮对DA能神经元的神经毒性, 抑制小胶质细胞活化, 其机制可能与TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路有关。

[关键词] 帕金森病; 大定风珠; 小胶质细胞; 多巴胺能神经元; TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是中老年人常见的一种进行性神经退行性疾病, 据流行病学调查, 目前我国60岁以上人群中PD患病率达1.37%, 总人数约362万^[1]。PD以黑质-纹状体通路多巴胺能神经元坏死、缺失和出现错误折叠

的 α -突触核蛋白(α -synuclein)的路易小体为病理特征, 临床表现包括动作迟缓、静息性震颤、肌肉强直、步态障碍等运动症状, 以及认知和精神障碍、失眠、便秘等非运动症状^[2]。研究发现, 神经炎症是PD的病理机制和风险因素^[3], 激活的小胶质细胞在PD患者脑组织中广泛存在, 与路易小体的传播模式相对应^[4], 中枢神经炎症释放的炎症因子与多巴胺能神经元的凋亡相互促进, 加剧PD的

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(CI2021A00602)

✉ 通讯作者: springeltics@hotmail.com

进展^[5]。其中, Toll样受体4 (TLR4)/髓样分化因子88 (MyD88)/核转录因子 κ B (NF- κ B) 信号通路介导的炎症反应是PD神经炎症和神经变性过程中的关键因素^[6]。目前左旋多巴仍是针对PD运动症状的主要治疗药物, 但并不能改善PD的发展进程, 且具有较强副作用^[7]。

PD属于中医学“颤证”范畴, 病性总属本虚标实, 肝肾亏虚为发病之本, 风阳内动为发病之标^[8]。大定风珠出自《温病条辨》, 具有补肾填精益肝、滋阴熄风的功效, 是《实用中医内科学》^[9]中治疗PD的重要方药。临床研究发现, 大定风珠适用于PD各个阶段, 且针对PD主症及兼症均疗效显著^[10]。本研究从脑黑质TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路及中脑小胶质细胞活化方面探讨大定风珠的可能作用机制, 为其临床应用提供基础。本实验经中国中医科学院动物伦理委员会批准(伦理审查编号: ERCCACMS21-2112-12)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级雄性C57BL小鼠84只, 7周龄, 体质量(20 $\pm$ 2)g, 购于北京维通利华实验动物有限公司, 实验动物使用许可证号: SCXK(京)2021-0006。饲养温度(25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 湿度(50 $\pm$ 10)%, 12 h明暗交替, 自由饮食饮水, 适应性饲养1周后开始实验。

1.2 药物

大定风珠组成: 白芍18 g, 生地黄18 g, 麦冬18 g, 龟甲12 g, 牡蛎12 g, 鳖甲12 g, 阿胶9 g, 炙甘草12 g, 五味子6 g, 火麻仁6 g, 鸡子黄2个。中药颗粒剂购自北京康仁堂药业有限公司, 将大定风珠颗粒充分溶于适量蒸馏水并加入新鲜鸡子黄2个, 制备成含生药量为1 g/ml的中药混悬液, 4 $^{\circ}$ C储存备用。鱼藤酮粉末(Sigma公司, 批号R8875), 10 mg药物溶于50 μ l二甲基亚砜(DMSO), 然后加入葵花油定容至10 ml混匀澄清后浓度为1 mg/ml。多巴丝肼片(上海罗氏制药有限公司, 批号SH4750), 每日干预先研磨后蒸馏水充分混匀, 制备成10 mg/ml多巴丝肼混悬液。

1.3 主要试剂与仪器

多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司, 批号80096618); 葵花油(批号8001-21-6)、DMSO(批号D2650)、戊巴比妥钠(批号P3761), 美国Sigma公司; 苏木素、伊红染色液(北京九州柏林生物科技有限公司, 批号分别为20210628、20210308);

酪氨酸羟化酶 (TH) 抗体 (批号 25859-1-AP)、 α -synuclein 抗体 (批号 66412-1-Ig)、TLR4 抗体 (批号 66350-1-Ig)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (批号 SA00001-1)、HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L) (批号 SA00001-2)、HRP 标记兔抗山羊 IgG (H+L) (批号 SA00001-4)、超敏 ECL 化学发光检测试剂盒 (批号 PK10003), 武汉三鹰生物技术有限公司; 离子钙结合衔接分子1 (Iba-1) 抗体 (批号 ab178847)、NF- κ B p65 抗体 (批号: ab32536)、磷酸化核转录因子 κ B p65 (p-NF- κ B p65) 抗体 (批号 ab76302)、MyD88 抗体 (批号: ab28763)、含 DAPI 的封片剂 (批号 ab104139), 英国 Abcam 公司; 免疫组化兔二步法检测试剂盒 (批号: PV-9001)、免疫组化小鼠二步法检测试剂盒 (批号: PV-9002)、DAB 显色试剂盒 (批号: ZLI-9019), 北京中杉金桥生物有限公司; Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 抗体 (批号 A0423)、强效 RIPA 裂解液 (批号: P0013B)、蛋白酶磷酸酶抑制剂 (批号: P1046)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: P0010)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (批号: P0015L)、 β 肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (批号: AF5003)、Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (批号: A0423), 上海碧云天生物技术有限公司; BSA (批号 A8010)、TBST (批号 T1086), 北京索莱宝科技有限公司; 三色预染蛋白 Marker (10-250kDa, 上海雅酶生物医药科技有限公司, 批号: WJ103); PVDF 膜(德国 Millipore 公司, 批号 IPVH00010)。

CS-Q2 型旷场实验分析系统 (日本 Canon 公司); Rotanta460R 型高速冷冻离心机 (德国 Hettich 公司); TGL-16G 型高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); VS120-S6-W 型数字切片扫描系统 (日本 Olympus 公司); Synergy H1 型全自动酶标仪 (美国 BioTek 公司); PowerPac Basic 电泳仪、Chemi Doc Imaging System 多功能成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 动物造模、分组及给药

小鼠按体质量采用随机数字表法分为空白组、模型组、多巴丝肼组及大定风珠低、中、高剂量组, 每组14只。空白组小鼠腹腔注射2.5 ml/(kg $\cdot$ d) 葵花油 (含0.5%体积DMSO), 其余各组小鼠腹腔注射鱼藤酮溶液2.5 mg/(kg $\cdot$ d) 制备PD小鼠模型, 共28天。随着给药时间的增长, 小鼠逐渐出现运动迟缓、反应迟钝等异常行为证明造模成功^[11], 本研究全部小鼠均造模成功。在鱼藤酮造模的同时

开始药物干预,大定风珠低、中、高剂量组分别给予大定风珠混悬液 5、10、20 g/(kg·d)灌胃,其中大定风珠中剂量是根据 60 kg 成人临床等效剂量的 10 倍计算^[12];多巴丝肼组给予多巴丝肼混悬液 0.034 g/(kg·d)(成人等效剂量)灌胃,空白组和模型组小鼠给予生理盐水 0.08 ml 灌胃,均每日 1 次,共 28 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 旷场实验^[13] 最后一次药物干预次日将各组动物置于旷场装置评价自主探索行为及焦虑样行为,记录 5 min 内小鼠水平运动总距离、中央区域运动总距离、静止时间。

1.5.2 爬杆实验^[14] 旷场实验结束次日进行爬杆实验。爬杆实验用于评价帕金森动物运动迟缓情况。将一直径为 2.5 cm 的小球固定于一根长 60 cm、直径 0.8 cm 的木杆顶端,木杆缠上纱布以防打滑,将小鼠头向上放于木杆顶端,记录小鼠从开始运动到完全转为头向下的转身时间以及爬行到杆底的运动总时间,每只小鼠每次检测间隔 10 min,共检测 3 次取平均值。

1.5.3 高效液相色谱法(HPLC)检测小鼠纹状体多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)水平 爬杆实验结束后,禁食过夜,使用 0.4%戊巴比妥钠(每只剂量 10 ml/kg)麻醉后摘眼球取血,小鼠经 4%多聚甲醛心脏灌注后冰上取脑,分离纹状体和中脑。纹状体称重置后于高氯酸中匀浆,冰上裂解,4℃离心机 12 000 r/min(离心半径 9 cm)离心 20 min 取上清,乙腈-甲酸(100:0.1)和水-甲酸(100:0.1)程序梯度洗脱,4℃条件,进样量 5 μl。使用 HPLC 检测各组小鼠纹状体 DA、5-HT 水平。

1.5.4 HE 染色观察黑质致密部病理变化 取石蜡包埋后的中脑组织,连续切取 6 μm 双侧黑质致密部冠状切片,二甲苯脱蜡后梯度乙醇至水,苏木素、伊红染色,中性树胶封片后光镜拍照。

1.5.5 免疫组化(IHC)法检测黑质致密部、纹状体 TH 表达 黑质致密部和纹状体石蜡切片脱蜡至水,柠檬酸钠高压抗原修复,TBS+Triton 透化 30 min,滴加内源性过氧化物酶阻断剂,5% BSA 封闭,TBS+Triton 洗涤,滴加 TH 兔单克隆抗体(1:800),湿盒内 4℃孵育过夜,洗涤,反应增强液,洗涤,滴加山羊抗兔生物素化二抗室温孵育 1 h,洗涤,DAB 显色,苏木素复染细胞核,脱水,中性树胶封片后高倍光镜拍照,使用 ImageJ 1.52 计算平均光密度值。

1.5.6 免疫荧光(IF)法检测黑质致密部 α-synuclein、Iba-1 蛋白表达 石蜡切片脱蜡至水,柠檬酸钠高压抗原修复,TBS+Triton 透化 30 min,滴加内源性过氧化物酶阻断剂,5% BSA 封闭,洗涤,滴加 α-synuclein 抗体(1:350)和 Iba-1 抗体(1:350),湿盒内 4℃孵育过夜,洗涤 3 次,Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG、Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)荧光二抗(1:250)室温避光孵育 1 h,使用含 DAPI 的封片剂复染细胞核并封片,荧光显微镜拍照,使用 ImageJ 1.52 计算平均光密度值。

1.5.7 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测小鼠双侧纹状体 TLR4、MYD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达 称取 20 mg 小鼠脑纹状体组织,加入预冷小铝珠和混有蛋白酶磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液充分研磨裂解,4℃离心机 12 000 r/min(离心半径 6 cm)离心 10 min 取上清,BCA 法测定蛋白含量,4:1 体积比加入蛋白上样缓冲液,沸水浴加热 5 min 蛋白变性,冷却至室温后备用。各组蛋白样品液和 Marker 分别上样,SurePAGE 预制胶电泳,将相应 Marker 湿转至 PVDF 膜,室温封闭 1 h,分别加入一抗 β-actin、p65、p-p65、TLR4、MyD88(1:2500、1:1000、1:1000、1:5000、1:1000),4℃摇床过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,HRP 标记山羊抗兔 IgG、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG、HRP 标记兔抗山羊 IgG(1:5000)孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,滴加 ECL 显影,ImageJ 1.52 软件分析目的蛋白灰度值。

1.6 统计学方法

应用 GraphPad Prism 9.3.1 统计软件进行分析,本研究计量资料数据均符合正态分布且方差齐,以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 one-way ANOVA 分析,组间多重比较采用最小显著性差异法(LSD)。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠旷场实验结果比较

表 1 示,与正常组比较,模型组小鼠水平运动总距离、中央区域运动总距离均显著减少,静止时间显著延长($P < 0.01$)。与模型组比较,大定风珠中剂量组小鼠水平运动总距离显著增加,静止时间缩短($P < 0.05$);大定风珠高剂量组和多巴丝肼组小鼠水平运动总距离、中央区域运动总距离均显著增加,静止时间显著缩短($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与大定风珠低剂量组比较,大定风珠高剂

表 1 各组小鼠旷场实验行为学结果比较

Table 1 Comparison of behavioral changes of mice in each group by open field test (x̄±s)				
组别	鼠数	水平运动总距离/mm	中央区域运动总距离/mm	静止时间/s
正常组	14	11068.02±4304.57	930.79±281.98	57.00±21.73
模型组	14	5770.94±2498.12 ^{a)}	357.87±260.06 ^{a)}	129.38±39.75 ^{a)}
大定风珠低剂量组	14	7509.70±2883.67	598.77±362.21	101.55±38.91
大定风珠中剂量组	14	9959.05±2841.50 ^{b)}	733.13±380.43	81.46±29.42 ^{b)}
大定风珠高剂量组	14	10888.42±3199.52 ^{c)} d)	819.54±275.28 ^{b)}	64.30±38.35 ^{c)} d)
多巴丝肼组	14	10454.94±3342.16 ^{b)} d)	875.10±275.34 ^{c)} d)	72.60±26.01 ^{c)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与大定风珠低剂量组比较， $P<0.05$ 。

量组小鼠水平运动总距离显著增加、静止时间缩短，多巴丝肼组水平运动总距离和中央区域运动总距离均增加 ($P<0.05$)。多巴丝肼组与大定风珠中、高剂量组小鼠各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组小鼠爬杆实验结果比较

表 2 示，与正常组比较，模型组小鼠转身时间、爬杆总时间显著延长 ($P<0.01$)；与模型组比较，大定风珠各剂量组和多巴丝肼组小鼠转身时间、爬杆总时间均显著缩短 ($P<0.01$)；与大定风珠低剂量组比较，大定风珠高剂量组转身时间、爬杆总时间显著缩短，多巴丝肼组爬杆总时间缩短 ($P<0.05$)。多巴丝肼组与大定风珠中、高剂量组各指标比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组小鼠爬杆实验行为学结果比较

Table 2 Comparison of behavioral changes of mice in each group by pole climbing test (s, x̄±s)			
组别	鼠数	转身时间	爬杆总时间
正常组	14	2.91±1.18	12.09±2.28
模型组	14	5.59±1.32 ^{a)}	20.15±2.88 ^{a)}
大定风珠低剂量组	14	4.05±0.83 ^{b)}	16.40±2.03 ^{b)}
大定风珠中剂量组	14	3.57±1.12 ^{b)}	15.03±3.43 ^{b)}
大定风珠高剂量组	14	3.36±1.00 ^{b)} c)	14.18±2.80 ^{b)} c)
多巴丝肼组	14	3.31±0.67 ^{b)}	14.15±1.34 ^{b)} c)

注：a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与大定风珠低剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠纹状体 DA、5-HT 水平比较

表 3 示，与正常组比较，模型组小鼠纹状体 DA、5-HT 水平降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，大定风珠中、高剂量组和多巴丝肼组 DA、5-HT 水平升高 ($P<0.05$)。

2.4 各组小鼠黑质致密部病理 HE 染色形态改变比较

图 1 示，正常组小鼠黑质致密部 DA 能神经元数量较多，排列整齐且形态正常；与正常组比较，模型组 DA 能神经元细胞数量明显减少，且排列紊

表 3 各组小鼠纹状体 DA、5-HT 水平比较

Table 3 Comparison of DA and 5-HT levels in striatum of mice in each group (μg·g ⁻¹ , x̄±s)			
组别	鼠数	5-HT	DA
正常组	14	3.77±0.06	5.07±2.35
模型组	14	2.24±0.41 ^{a)}	2.56±0.49 ^{a)}
大定风珠低剂量组	14	3.53±1.03	3.08±0.79
大定风珠中剂量组	14	4.29±1.84 ^{b)}	3.82±1.49 ^{b)}
大定风珠高剂量组	14	3.98±0.89 ^{b)}	3.70±1.13 ^{b)}
多巴丝肼组	14	3.93±0.67 ^{b)}	3.57±0.53 ^{b)}

注：DA，多巴胺；5-HT，5 羟色胺。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

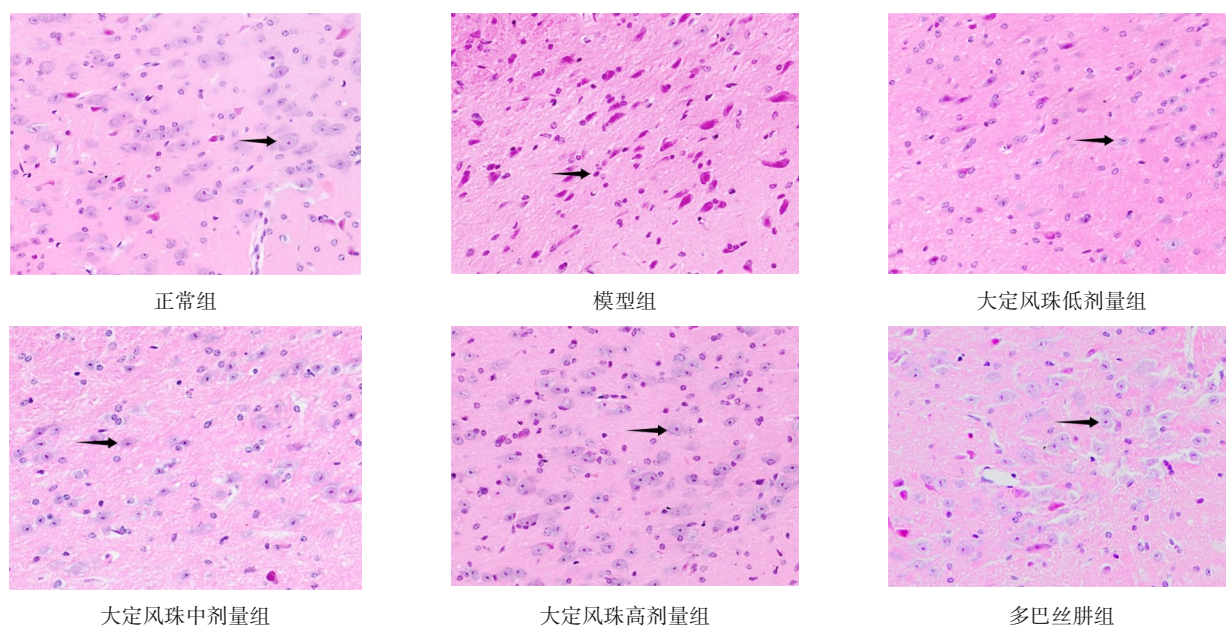
乱，胞体皱缩；与模型组比较，大定风珠各剂量组小鼠随着剂量增加，DA 能神经元细胞数量逐渐增多，排列逐渐有序且形态趋于正常，呈剂量依赖；多巴丝肼组与模型组、大定风珠低剂量组比较，DA 能神经元细胞数量有所增加，但 DA 能神经元细胞数量、细胞排列及形态的改善不如大定风珠中、高剂量组效果明显。

2.5 各组小鼠纹状体、黑质致密部 TH 免疫组化结果比较

表 4 示，与正常组比较，模型组小鼠纹状体、黑质致密部 TH 表达减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组比较，大定风珠中、高剂量组和多巴丝肼组小鼠纹状体、黑质致密部 TH 表达增加 ($P<0.01$)；与大定风珠低剂量组比较，大定风珠中、高剂量组和多巴丝肼组小鼠纹状体、黑质致密部 TH 表达均增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。大定风珠中、高剂量组和多巴丝肼组两两比较，纹状体、黑质致密部 TH 表达差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠纹状体、黑质致密部 TH 免疫组化染色图见附件 1 (扫描本文二维码获取)。

2.6 各组小鼠黑质致密部 α-synuclein、Iba-1 蛋白表达比较

表 5 示，与正常组比较，模型组小鼠黑质致密



注：黑色箭头指示为神经元细胞。

图1 各组小鼠黑质致密部病理HE染色结果(×200)

Figure 1 Pathological results of HE staining of the substantia nigra compacta of mice in each group (×200)

表4 各组小鼠纹状体、黑质TH表达比较

Table 4 Comparison of TH expression in striatum and substantia nigra of mice in each group (平均光密度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	纹状体TH	黑质致密部TH
正常组	14	0.32±0.04	0.94±0.10
模型组	14	0.17±0.03 ^{a)}	0.46±0.18 ^{b)}
大定风珠低剂量组	14	0.19±0.02	0.52±0.18
大定风珠中剂量组	14	0.35±0.06 ^{c) e)}	0.74±0.04 ^{c) e)}
大定风珠高剂量组	14	0.45±0.02 ^{c) e)}	0.77±0.08 ^{c) e)}
多巴丝肼组	14	0.35±0.03 ^{c) d)}	0.76±0.09 ^{c) e)}

注：TH，酪氨酸羟化酶。

a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与正常组比较, $P < 0.01$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与大定风珠低剂量组比较, $P < 0.05$; e) 与大定风珠低剂量组比较, $P < 0.01$ 。

部 α -synuclein、Iba-1 荧光强度显著增强 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 大定风珠各剂量组黑质致密部 α -synuclein、Iba-1 荧光强度显著减弱 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。多巴丝肼组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与大定风珠低剂量组比较, 大定风珠中剂量组 α -synuclein 荧光强度减弱, 大定风珠中、高剂量组 Iba-1 荧光强度减弱 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与多巴丝肼组比较, 大定风珠中、高剂量组 α -synuclein、Iba-1 荧光强度减弱 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。大定风珠中、高剂量组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组小鼠黑质致密部 α -synuclein、Iba-1 免疫荧光染色图见图2。

表5 各组小鼠黑质致密部 α -synuclein、Iba-1 荧光强度比较

Table 5 Comparison of fluorescence intensity of α -synuclein and Iba-1 in substantia nigra compacta of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

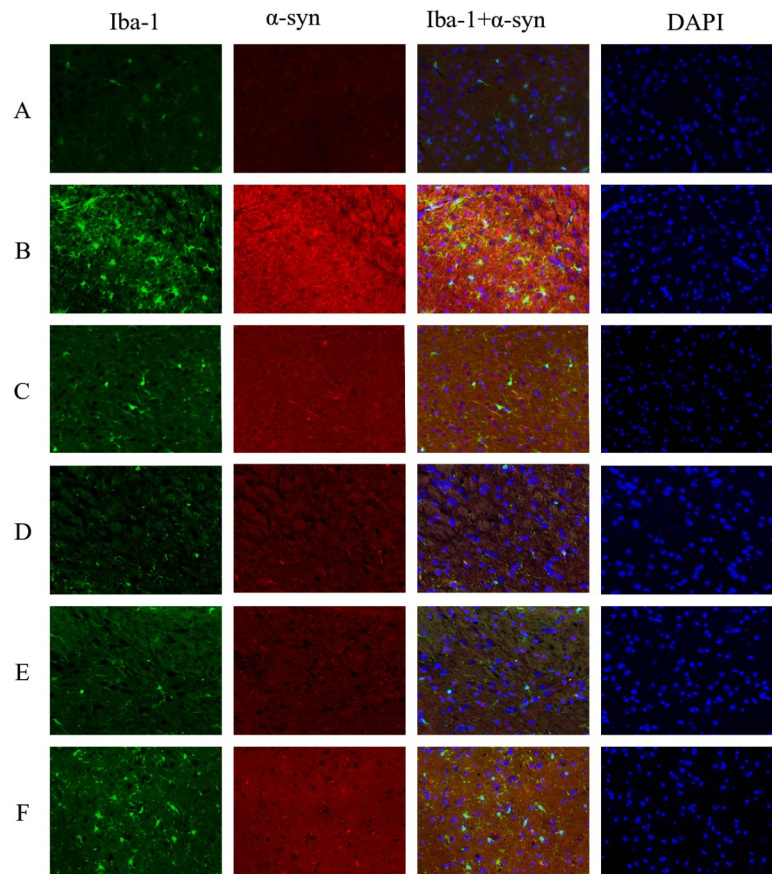
组别	鼠数	α -synuclein	Iba-1
正常组	14	4.55±2.49	5.16±0.13
模型组	14	19.17±6.79 ^{a)}	13.00±5.16 ^{a)}
大定风珠低剂量组	14	10.47±1.99 ^{b)}	9.40±1.86 ^{b)}
大定风珠中剂量组	14	4.67±1.32 ^{c) d) f)}	4.35±2.10 ^{c) e) g)}
大定风珠高剂量组	14	5.01±0.26 ^{c) f)}	3.85±0.98 ^{c) e) g)}
多巴丝肼组	14	11.62±4.01	11.87±1.94

注： α -synuclein, α -突触核蛋白；Iba-1, 离子钙结合衔接分子1。

a) 与正常组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与大定风珠低剂量组比较, $P < 0.05$; e) 与大定风珠低剂量组比较, $P < 0.01$; f) 与多巴丝肼组比较, $P < 0.05$; g) 与多巴丝肼组比较, $P < 0.01$ 。

2.7 各组小鼠纹状体 TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达比较

表6示, 与正常组比较, 模型组小鼠纹状体 TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较, 大定风珠低剂量组 NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达降低, 大定风珠中、高剂量组 TLR4、MyD88、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达均降低, 多巴丝肼组 TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与大定风珠低剂量组比较, 大定风珠中剂量组 TLR4 蛋白表达降低, 大定风珠高



注：α-synuclein，α-突触核蛋白；Iba-1，离子钙结合衔接分子 1。

图2 各组小鼠黑质致密部α-synuclein、Iba-1免疫荧光染色结果（×200）

Figure 2 Immunofluorescent staining results of α-synuclein and Iba-1 in the substantia nigra compacta of mice in each group (×200)

表6 各组小鼠纹状体TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65蛋白表达比较

Table 6 Comparison of protein expressions of TLR4, MyD88, NF-κB p65, and p-NF-κB p65 in striatum of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	TLR4	MyD88	NF-κB p65	p-NF-κB p65
正常组	14	0.44±0.12	0.22±0.06	0.60±0.17	0.42±0.23
模型组	14	0.73±0.12 ^{a)}	0.64±0.13 ^{a)}	1.09±0.28 ^{a)}	0.92±0.10 ^{a)}
大定风珠低剂量组	14	0.62±0.10	0.47±0.14	0.87±0.25 ^{b)}	0.65±0.15 ^{b)}
大定风珠中剂量组	14	0.40±0.06 ^{c) d)}	0.40±0.08 ^{b) f)}	0.74±0.13 ^{c)}	0.48±0.12 ^{c)}
大定风珠高剂量组	14	0.41±0.18 ^{c) d)}	0.33±0.08 ^{c) d) g)}	0.60±0.20 ^{c)}	0.17±0.05 ^{c) e)}
多巴丝肼组	14	0.51±0.08 ^{b)}	0.73±0.11	0.80±0.20 ^{b)}	0.58±0.20 ^{c)}

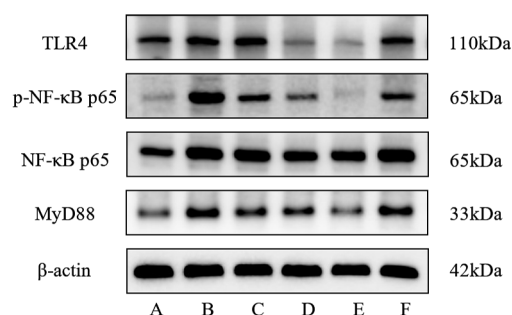
注：TLR4，Toll样受体4；MyD88，髓样分化因子88；NF-κB p65，核转录因子κB p65；p-NF-κB p65，磷酸化核转录因子κB p65。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与大定风珠低剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与大定风珠低剂量组比较， $P<0.01$ ；f) 与多巴丝肼组比较， $P<0.05$ ；g) 与多巴丝肼组比较， $P<0.01$ 。

剂量组TLR4、MyD88、p-NF-κB p65蛋白表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与多巴丝肼组比较，大定风珠中、高剂量组MyD88表达均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组小鼠纹状体TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65蛋白电泳图见图3。

3 讨论

PD患者多发于中老年，病因多为生理性虚衰，

肝肾阴虚为主要证型^[15]。《素问·阴阳应象大论篇》云：“形不足者，温之以气，精不足者，补之以味。”大定风珠是《温病条辨》“复脉辈”中治疗真阴耗竭、虚阳上浮的滋阴重剂^[16]，方中阿胶、鸡子黄为血肉有情之品，可滋阴润燥、养血熄风；白芍、炙甘草、五味子酸甘化阴，柔肝止痛；龟甲、鳖甲、牡蛎滋阴潜阳，平肝熄风；生地黄、麦



注: TLR4, Toll样受体4; MyD88, 髓样分化因子88; NF-κB p65, 核转录因子κB p65; p-NF-κB p65, 磷酸化核转录因子κB p65; A, 正常组; B, 模型组; C, 大定风珠低剂量组; D, 大定风珠中剂量组; E, 大定风珠高剂量组; F, 多巴丝肼组。

图3 各组小鼠纹状体TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65蛋白电泳图

Figure 3 Protein electrophoresis of TLR4, MyD88, NF-κB p65, and p-NF-κB p65 in striatum of mice in each group

冬增液益阴; 火麻仁润燥滑肠。诸药合用共奏益精填髓、滋阴潜阳、熄风止痉之效。鱼藤酮是一种线粒体复合物 I 型抑制剂, 作为农业中常用的杀虫剂, 构成PD环境风险因素。长期低剂量接触鱼藤酮可诱导C57BL小鼠出现运动障碍、黑质纹状体DA能神经元变性、腓肠肌神经丛神经变性、α-synuclein的异常聚集等PD病变的一系列症状^[11]。本实验发现, 鱼藤酮可诱导小鼠出现PD运动障碍和焦虑样行为, 而大定风珠高剂量和西药均可使PD小鼠旷场水平运动总距离和中央区域运动总距离增加、静止时间缩短, 爬杆实验转身时间及总运动时间缩短, 提示其可改善PD小鼠的运动症状和焦虑样行为, 其中大定风珠高剂量组的效果更为明显, 且与多巴丝肼组相比无显著性差异。

TH是DA合成的限速酶, 在黑质和纹状体中的表达随PD的发展逐渐减少, 是PD的进展标志^[17]。病理情况下α-synuclein可从神经元释放并在神经系统中传播^[18]。小胶质细胞是中枢免疫系统的先天免疫细胞, 通过免疫监视、吞噬清除来维持大脑微环境稳态^[19]。中脑组织中小胶质细胞的激活与PD的进展正相关^[20], 错误折叠的α-synuclein可在神经变性之前诱发神经炎症, 神经元死亡本身也会激活小胶质细胞。活化的小胶质细胞可通过释放诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、白细胞介素1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)等促炎细胞因子损伤神经元细胞或吞噬邻近细胞, 而造成神经元退化的恶性循环, 促进PD进展^[5]。本实验结果发现, 模型组小鼠出现黑质神经细胞明显减少、排列紊乱,

DA、5-HT含量减少、TH蛋白表达较少, 且黑质致密部聚集大量α-synuclein等PD经典病理改变, 与相关文献^[11]一致, 而大定风珠中、高剂量可以缓解鱼藤酮造成的DA能神经毒性, 具有明显的DA能神经元保护作用; 并且大定风珠中、高剂量组的治疗效果优于多巴丝肼组, 证明大定风珠的DA能神经元保护作用较强。Iba-1蛋白是小胶质细胞的标志物^[19]。本实验研究发现, 模型组小鼠黑质致密部Iba-1荧光强度增加, 提示小胶质细胞活化, 而大定风珠中、高剂量组可抑制Iba-1表达, 从而减轻小胶质细胞的活化, 优于多巴丝肼组和大定风珠低剂量组。

Toll样受体(TLR)是一种位于质膜或内体膜中的跨膜蛋白, 是主要的先天免疫受体, 可被外来或内源性危险因素激活^[21], TLR4是TLRs家族的重要成员, 参与包括PD的多种神经退行性疾病^[22]。TLR4在PD发病机制中具有损害和神经保护的双向作用, TLR4在急性期激活神经胶质细胞的吞噬反应, 诱导产生必要的炎症细胞因子, 清除异常的α-synuclein, 延缓疾病进展; 而在PD的慢性期, TLR4过度刺激介导的促炎细胞因子会导致神经炎症, 破坏神经元, 从而导致疾病进展^[23]。TLR4结合骨髓分化初级反应蛋白MyD88, 激活NF-κB, 刺激引起级联炎症反应是经典通路^[24]。本研究结果发现, 大定风珠可抑制TLR4/MyD88/NF-κB通路的激活, 其中大定风珠高剂量组效果最明显, 多巴丝肼组参与调控TLR4/MyD88/NF-κB通路蛋白的表达作用明显弱于大定风珠高剂量组。多巴丝肼片是临床治疗PD运动症状的标准药物^[25], 故本研究将其作为西药对照药物。本研究发现大定风珠中、高剂量组针对PD小鼠的运动症状疗效及缓解PD病理改变等方面与多巴丝肼组相当, 且对神经炎症的抑制作用强于多巴丝肼组。

综上所述, 大定风珠可通过调控脑黑质TLR4/MyD88/NF-κB通路抑制小胶质细胞活化, 减轻中枢神经炎症, 从而减轻鱼藤酮诱导的DA能神经元毒性, 保护DA能神经元。但PD的发病受多种机制和多条通路的影响, 大定风珠防治PD作用的关键成分及其作用途径尚不明确, 仍需进一步研究。

参考文献

- [1] QI S, YIN P, WANG L, et al. Prevalence of Parkinson's disease: a community-based study in China [J]. Mov Disord, 2021, 36(12): 2940-2944.

- [2] RODRIGUEZ-OROZ MC, JAHANSHAH M, KRACK P, et al. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms [J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8(12): 1128-1139.
- [3] BOYD RJ, AVRAMOPOULOS D, JANTZIE LL, et al. Neuroinflammation represents a common theme amongst genetic and environmental risk factors for Alzheimer and Parkinson diseases [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 223.
- [4] TERADA T, YOKOKURA M, YOSHIKAWA E, et al. Extrastriatal spreading of microglial activation in Parkinson's disease: a positron emission tomography study [J]. *Ann Nucl Med*, 2016, 30(8): 579-587.
- [5] GLASS CK, SAIJO K, WINNER B, et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 918-934.
- [6] HUGHES CD, CHOI ML, RYTEN M, et al. Picomolar concentrations of oligomeric alpha-synuclein sensitizes TLR4 to play an initiating role in Parkinson's disease pathogenesis [J]. *Acta Neuropathol*, 2019, 137(1): 103-120.
- [7] JANKOVIC J, TAN EK. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2020, 91(8): 795-808.
- [8] 上海市中医药学会神经科分会. 中西医结合治疗早期帕金森病专家共识(2021)[J]. *上海中医药杂志*, 2022, 56(1): 1-6.
- [9] 方药中, 邓铁涛. 实用中医内科学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 424-426.
- [10] 三瑛, 黄瑶, 魏澜波, 等. 大定风珠治疗帕金森病研究进展 [J]. *实用中医内科杂志*, 2020, 34(7): 97-100.
- [11] MIYAZAKI I, ISOOKA N, IMAFUKU F, et al. Chronic systemic exposure to low-dose rotenone induced central and peripheral neuropathology and motor deficits in mice: reproducible animal model of Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3254.
- [12] 刘蔚, 曹俊岭, 荆志伟, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对帕金森病伴发抑郁模型大鼠的神经保护作用及对 AMPK/mTOR 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(8): 21-29.
- [13] ZHANG Y, WU Q, ZHANG L, et al. Caffeic acid reduces A53T α -synuclein by activating JNK/Bcl-2-mediated autophagy in vitro and improves behaviour and protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 150: 104538. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104538.
- [14] YE M, CHUNG HS, LEE C, et al. Bee venom phospholipase A2 ameliorates motor dysfunction and modulates microglia activation in Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice [J]. *Exp Mol Med*, 2016, 48(7): e244.
- [15] 杨宁, 过伟峰, 刘卫国, 等. 300 例帕金森病患者病机证素分布规律探讨 [J]. *南京中医药大学学报*, 2016, 32(6): 540-542.
- [16] 吴嫣然, 陈刚. 从“复脉辈”初探中医理论之阴阳观 [J]. *中西医结合研究*, 2022, 14(4): 271-273.
- [17] ZHANG X, ZHANG Y, LI R, et al. Salidroside ameliorates Parkinson's disease by inhibiting NLRP3-dependent pyroptosis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(10): 9405-9426.
- [18] YAMADA K, IWATSUBO T. Extracellular α -synuclein levels are regulated by neuronal activity [J]. *Mol Neurodegener*, 2018, 13(1): 9.
- [19] NIMMERJAHN A, KIRCHHOFF F, HELMCHEN F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo [J]. *Science*, 2005, 308(5726): 1314-1318.
- [20] OUCHI Y, YAGI S, YOKOKURA M, et al. Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2009, 15(Suppl 3): S200-S204.
- [21] KOULI A, HORNE CB, WILLIAMS-GRAY CH. Toll-like receptors and their therapeutic potential in Parkinson's disease and α -synucleinopathies [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 81: 41-51. doi: 10.1016/j.bbi.2019.06.042.
- [22] LEITNER GR, WENZEL TJ, MARSHALL N, et al. Targeting toll-like receptor 4 to modulate neuroinflammation in central nervous system disorders [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(10): 865-882.
- [23] HEIDARI A, YAZDANPANAH N, REZAEI N. The role of Toll-like receptors and neuroinflammation in Parkinson's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 135.
- [24] PEREZ-PARDO P, DODIYA HB, ENGEN PA, et al. Role of TLR4 in the gut-brain axis in Parkinson's disease: a translational study from men to mice [J]. *Gut*, 2019, 68(5): 829-843.
- [25] REICH SG, SAVITT JM. Parkinson's disease [J]. *Med Clin North Am*, 2019, 103(2): 337-350.

Effect and *Dadingfengzhu Pill* (大定风珠) on the Activation of Microglial Cells in the Substantia Nigra and TLR4/MyD88/NF- κ B Signaling Pathway in Parkinson's Disease Model Mice

CUI Tuotuo¹, CAO Junling², OUYANG Jingfeng³, YIN Mengxia³, LIU Xin¹, SUN Mengfei³

1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100078; 2. Luoyang Hospital Branch of Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine; 3. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of *Dadingfengzhu Pill* (大定风珠, DDFP) on nerve damage in Parkinson's disease (PD) and the possible mechanism. **Methods** Eighty-four C57BL male mice were randomly divided into normal group, model group, dopaserazide group, DDFP low-, medium- and high-dose groups, with 14 mice in each group. Except for the normal group, the mice were injected with rotenone ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) intraperitoneally every day for 28 days to replicate the PD model. Simultaneously, the DDFP low-, medium- and high-dose groups were given 5, 10, and 20 g/(kg·d) of DDFP suspension by gavage, while the dopaserazide group was given 0.034 g/(kg·d) of dopaserazide suspension, and the normal group and model group were given 0.08 ml of normal saline by gavage, once daily for a total of 28 days. The behavioral changes of the mice were evaluated by the open field test measuring the total horizontal locomotor distance, total central region locomotor distance and resting time, and pole climbing test measuring time to turn and total time. The levels of DA and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the striatum of mice were measured by high performance liquid chromatography (HPLC). The pathological changes of dopaminergic neurons in the midbrain substantia nigra compacta were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Immunohistochemical method was used to detect the expression of tyrosine hydroxylase (TH) in the substantia nigra compacta and striatum. The expression of α -synuclein and ionized calcium street protein (Iba-1) in the substantia nigra compacta were detected by immunofluorescence (IF). The protein expression of striatal Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), nuclear transcription factor- κ B p65 (NF- κ B p65) and phosphorylated nuclear transcription factor- κ B p65 (p-NF- κ B p65) were detected by Western blotting. **Results** Compared to those in the normal group, the total horizontal locomotor distance and central region locomotor distance of mice in the model group were significantly reduced, while the resting time was prolonged ($P < 0.01$), and the time to turn and total time of pole climbing were significantly prolonged ($P < 0.01$); striatal DA and 5-HT contents were significantly reduced, while protein expression of TLR4, MyD88, NF- κ B p65, and p-NF- κ B p65 increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); number of dopaminergic neurons in the substantia nigra significantly decreased with disorganized and wrinkled cytosol, and positive expression of TH in the striatum and substantia nigra compacta decreased as well, while fluorescence intensity of α -synuclein and Iba-1 were significantly enhanced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the total horizontal locomotor distance in the DDZP medium- and high-dose groups significantly increased, resting time shortened, while the time to turn and total time of pole climbing reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); striatal DA and 5-HT contents significantly increased, while protein expression of TLR4, MyD88, NF- κ B p65, and p-NF- κ B p65 decreased; number of dopaminergic neurons in the substantia nigra significantly increased with ordered arrangement, and positive expression of TH increased as well, while fluorescence intensity of α -synuclein and Iba-1 were significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the dopaserazide group, the fluorescence intensity of α -synuclein and Iba-1 and the MyD88 protein expression in the DDZP medium- and high-dose group significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** DDFP can alleviate the neurotoxicity of rotenone on dopaminergic neurons and inhibit microglia activation in PD mice, and the mechanism may be related to TLR4/MyD88/ NF- κ B signaling pathway.

Keywords Parkinson's disease; *Dadingfengzhu Pill* (大定风珠); microglia; dopaminergic neurons; TLR4/MyD88/ NF- κ B signaling pathway

(收稿日期: 2022-10-09; 修回日期: 2023-01-31)

[编辑: 邓 媛]