

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.10.011

补肾活血方对帕金森病模型小鼠回肠组织
TLR/NF- κ B 通路及肠道菌群的影响齐小荣¹, 郝斐然², 汤响林², 黎发根¹, 王雨佳¹, 王亮¹, 湛盈帆¹, 杨明会¹✉, 李敏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. 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院

[摘要] **目的** 从肠道菌群探讨补肾活血方治疗帕金森病(PD)的可能作用机制。**方法** 将72只雄性C57/BL6J小鼠随机分为空白组、模型组、美多芭组及补肾活血方低、中、高剂量组, 每组12只。空白组小鼠腹腔注射10 ml/kg生理盐水, 其余各组小鼠采用腹腔注射浓度为3 mg/ml的1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP) 30 mg/kg诱导PD小鼠模型, 均每天1次, 连续7天。造模成功后, 补肾活血方低、中、高剂量组分别给予补肾活血方7.5、15、30 g/(kg·d)灌胃, 美多芭组给予多美多芭片112.5 mg/(kg·d)灌胃, 空白组和模型组予15 ml/(kg·d)蒸馏水灌胃, 均每天灌胃1次, 连续14天。采用爬杆实验、转棒实验、抓力实验和负重游泳实验评估小鼠行为学指标; 16S rRNA高通量测序技术分析各组小鼠肠道菌群改变; Western Blot法测定小鼠回肠组织Toll样受体(TLR)/核因子 κ B(NF- κ B)通路炎症因子[包括Toll样受体2(TLR2)、Toll样受体4(TLR4)、NF- κ B、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素17(IL-17)]蛋白表达水平。**结果** 与空白组比较, 模型组小鼠爬杆触底时间延长, 抓力减小, 转棒持续时间和游泳持续时间缩短, 回肠组织中TLR2、TLR4、NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-17蛋白表达均升高($P<0.01$)。与模型组比较, 美多芭组和补肾活血方低、中、高剂量组爬杆触底时间缩短, 抓力增加, 美多芭组和补肾活血方高剂量组转棒持续时间延长, 回肠组织TLR2、TLR4、NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-17蛋白表达均降低, 而仅有补肾活血方高剂量组游泳持续时间延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与补肾活血方低剂量组比较, 补肾活血方中、高剂量组爬杆触底时间缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 补肾活血方高剂量组抓力增加, TLR2、TLR4、IL-17蛋白表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。肠道菌群结果显示, 与空白组比较, 模型组Dominance指数、Pielou_e指数、Shannon指数、Simpson指数差异均具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 美多芭组Shannon指数、Chao1指数、Observed_otus指数, 以及补肾活血方高剂量组Chao1指数、Observed_otus指数、Dominance指数、Pielou_e指数、Shannon指数、Simpson指数差异均具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。在门水平上, 各组差异具有统计学意义的菌门相对丰度类别包括变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 在属水平上, 各组差异具有统计学意义的菌属相对丰度类别包括Muribaculaceae、阿克曼菌属、幽门螺杆菌($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 补肾活血方治疗PD的可能作用机制是通过重构紊乱的肠道菌群结构, 减轻炎症反应进而达到改善PD运动功能的目的。

[关键词] 帕金森病; 补肾活血方; 肠道菌群; 炎症反应; Toll样受体; 核因子 κ B

胃肠道功能紊乱是帕金森病(Parkinson's disease, PD)主要非运动症状之一, 其胃肠道症状常早于PD出现运动症状数年甚至二十年^[1]。研究表

明, 胃肠道症状是导致PD发生发展的关键因素^[2-3], 主要作用机制在于肠道菌群的免疫炎症调节失衡。PD患者的肠道菌群组成结构较正常人发生了显著变化^[4-5], 其中Toll样受体(TLR)/核因子 κ B(NF- κ B)通路信号传导起关键作用^[6-7], 故调节肠道菌群紊乱或可成为治疗PD的关键途径之

基金项目: 国家自然科学基金(82274613)

✉ 通讯作者: 杨明会, ymh9651@sina.com; 李敏, kittenlee1115@126.com

一。本课题组认为, PD 中医病机主要为肾虚血瘀, 以肾虚为本、瘀血阻滞为标, 治疗应以补肾活血为基本治法, 并据此拟定补肾活血方^[8]。前期研究^[9]表明, 补肾活血方对便秘、睡眠、情绪等 PD 非运动症状疗效显著, 可显著延缓 PD 病情进展。本实验基于肠道菌群及 TLR/NF- κ B 通路探讨补肾活血方治疗 PD 的可能作用机制, 为其临床应用提供依据。本实验已通过解放军总医院动物伦理委员会审批 (批准号: 2020-X16-101)。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性 SPF 级 C57/BL6J 小鼠 72 只, 6~7 周龄, 体质量 (20.0 $\pm$ 2.0) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2021-0006。小鼠饲养温度 21~23 $^{\circ}$ C, 湿度 30%~60%, 保持 12 h 明暗交替, 实验期间自由进食饮水。

1.2 药物

补肾活血方组成: 肉苁蓉 15 g, 丹参 20 g, 山萸肉 15 g, 赤芍 15 g, 石菖蒲 15 g, 蜈蚣 2 g, 由中国人民解放军总医院中药房提供。将上述中药按传统方法煎煮, 水煎后蒸馏提取并制成含生药 1 g/ml 的中药浓缩液, 4 $^{\circ}$ C 保存。美多芭片 (多巴丝肼片, 成分包括左旋多巴 200 mg、苄丝肼 50 mg), 批号: SH5722, 上海罗氏制药有限公司, 配置成浓度为 2.25 mg/ml 的混悬液, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 主要试剂及仪器

1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP, 大连美仑生物技术有限公司, 货号: MB3783-2); NF- κ B 单克隆抗体 (货号: 66535-1-Ig)、Toll 样受体 2 (TLR2) 单克隆抗体 (货号: 17236-1-AP)、Toll 样受体 4 (TLR4) 单克隆抗体 (货号: 66350-1-Ig)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 多克隆抗体 (货号: 17590-1-AP)、白细胞介素 17 (IL-17) 多克隆抗体 (货号: 13082-1-AP)、白细胞介素 6 (IL-6) 多克隆抗体 (货号: 21865-1-AP), Affinity 公司; β -actin (13E5) 兔单克隆抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 货号: 4970); 鼠抗 β -actin 多克隆抗体 (货号: C1313)、兔抗 β -actin 多克隆抗体 (货号: C1828), 中国普利莱基因技术有限公司; BCA 蛋白质浓度测定试剂盒 (Applygen Technologies 公司, 货号: P1513); 总蛋白提取试剂盒 (Sigma-Aldrich 公司, 货号: PROTOT-1KT)。

台式冷冻离心机 (Eppendorf 公司, 型号: Centrifuge 5430R); 大小鼠抓力测定仪 (北京众实迪创科技发展有限公司, 型号: ZS-ZL); 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂, 型号: RE-52AA)。

1.4 分组及造模

将 72 只小鼠按照体质量采用随机数字表法分为空白组、模型组、美多芭组及补肾活血方低、中、高剂量组, 每组 12 只。除空白组外其余各组小鼠腹腔注射 3 mg/ml 的 MPTP 30 mg/kg 诱导 PD 小鼠模型^[10], 空白组小鼠腹腔注射 10 ml/kg 生理盐水, 均每天 1 次, 连续 7 天。已有研究^[11]证实, 此造模方法可诱发肠道菌群变化和 PD 相关胃肠功能障碍, 造模成功标准为小鼠出现肢体震颤、竖毛、呆滞、行为学受损, 并伴见小鼠排便减少、粪便干燥等症状。

1.5 给药方法

所有小鼠均造模成功。根据课题组前期研究^[12-13]基础, 并按照人与小鼠的等效剂量系数进行换算^[14], 其中补肾活血方中剂量为临床等效剂量, 给药剂量为 15 g/(kg $\cdot$ d), 补肾活血方低、高剂量组给药剂量分别为 7.5、30 g/(kg $\cdot$ d)。美多芭组给予美多芭片 112.5 mg/(kg $\cdot$ d) 灌胃。空白组和模型组予 15 ml/(kg $\cdot$ d) 蒸馏水灌胃。各组均每天灌胃 1 次, 连续 14 天。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 行为学实验 于灌胃第 12 天开始连续 3 天对小鼠进行爬杆训练和转棒训练。最后一次灌胃结束后 2 h 依次进行以下行为学实验。1) 爬杆实验: 自制爬杆实验装置评估小鼠的运动功能。训练具体方法为将小鼠头部朝上放置于顶端圆球上使其转向后自然爬下, 双前爪接触底部平台视为爬杆完成。正式实验时每只小鼠爬杆 3 次, 若小鼠中途跳落或返回则重新进行爬杆测试, 记录爬杆触底时间并取 3 次平均值。2) 转棒实验: 评估小鼠运动协调性。训练具体方法为将转棒仪器设置转速为 10 r/min, 持续时间为 5 min, 每只小鼠训练 3 次。正式实验时将转棒仪器设置为实验时间 5 min, 初始速度为 5 r/min、加速时间 5 s、持续时间 30 s, 一级速度为 25 r/min、加速时间 25 s、持续时间 120 s, 二级速度为 40 r/min、加速时间 25 s、持续时间 150 s, 记录小鼠的转棒持续时间, 连续测 3 次取平均值。3) 抓力实验: 检测小鼠前肢抓力大小。将小鼠放在抓力测量仪上, 待其抓稳后抓住鼠尾向后缓慢牵拉直至小鼠完全脱离仪器, 读数并记录抓力大小, 连续

测量 5 次取平均值。4) 负重游泳实验: 评估小鼠抗疲劳能力和运动耐力。采用长 60 cm、宽 30 cm、高 50 cm 的透明水箱, 将小鼠系上占其体质量 5% 的铅块, 逐一缓慢放入水池中, 每次最多检测 5 只, 使其自由游泳直至小鼠沉入水底且无逃避反应和无法完成翻正反射, 以小鼠的捞出时间记为结束时间, 计算游泳持续时间。

1.6.2 肠道菌群 16S rRNA 扩增子测序 灌胃第 14 天取材前收集各组小鼠粪便, 将每只小鼠放入直径约 10 cm 独立容器中, 保证其干净、无菌, 采集方法为自由排便和按摩腹部刺激排便, 每只小鼠收集至少 2 粒粪便。逐步进行粪便 DNA 提取、质量检测、PCR 扩增等, 将得到的检测合格的 PCR 产物定量混样、纯化后将目的条带进行回收。定量后将合格的文库使用 NovaSeq6000 进行 PE 250 测序。测序过程由北京诺禾致源完成。

对所有初始数据进行质量控制, 得到更加准确可靠的数据后进行分析。将初始数据逐步过滤处理后得到最终有效数据。首先进行扩增子序列变异 (ASV) 聚类后对每个分类单元 (OTU) 进行物种注释, 以 Alpha 多样性可视化每组菌落的物种丰富度与均匀度。菌群丰度用 Chao1 指数、Observed_otus 指数、Dominance 指数计算, 菌群的多样性用 Simpson 指数、Shannon 指数计算, 菌群的均匀度用 Pielou_e 指数计算。根据 bray_curtis 距离算法采用主坐标分析 (PCoA 分析) 将群落结构差异进行二维展示, 以聚集和分离情况判断各组群落结构差异度。随后使用线性判别分析 (LDA effect size, LEfSe) 对每组具差异有统计学意义 ($P<0.05$) 的特征菌群进行采集分析, 设置 LDA score 筛选值为 3, 随后对每组不同分类水平前 10 物种相对丰度进行比较分析。

1.6.3 Western Blot 法测定小鼠回肠组织 TLR/NF- κ B 通路炎症因子蛋白表达 各组小鼠收集粪便完成后对各组小鼠回肠组织取材。脱颈处死小鼠后快速分取小鼠回肠组织, 放置于 2 ml 无菌冻存管中液氮速冻, -80°C 保存。将回肠组织逐步进行匀浆、提取总蛋白溶液、BCA 定量、计算上样量等, 随后进行配胶、上样、电泳、转膜、抗体孵育 (β -actin, 1:6000; TLR2, 1:1000; TLR4, 1:2000; NF- κ B, 1:5000; TNF- α , 1:1000; IL-6, 1:1000; IL-17, 1:1000; 兔抗, 1:50 000; 鼠抗, 1:50 000), 最后进行显影, 及时保存条带图像, 用 ImageJ 1.8.0 软件分析, 计算其与内参 β -actin 的平均吸光度比值。

1.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7.0 软件、SPSS 16.0 软件和诺禾云平台对实验数据进行统计分析, 所有计量资料进行正态检验及方差齐性检验, 结果显示均符合正态分布且方差齐, 以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用最小显著差值 (LSD) 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠行为学指标比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组小鼠爬杆触底时间延长, 抓力减小, 转棒持续时间和游泳持续时间缩短 ($P<0.01$)。与模型组比较, 美多芭组和补肾活血方低、中、高剂量组爬杆触底时间缩短, 抓力有所增加, 美多芭组和补肾活血方高剂量组转棒持续时间延长, 仅有补肾活血方高剂量组游泳持续时间延长 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与补肾活血方低剂量组比较, 补肾活血方中、高剂量组爬杆触底时间缩短, 补肾活血方高剂量组抓力增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。补肾活血方中剂量组和补肾活

表 1 各组小鼠行为学指标比较

Table 1 Comparison of behavioral indicators of mice in each group

($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	爬杆触底时间/s	转棒持续时间/s	抓力/N	游泳持续时间/s
空白组	12	8.14 $\pm$ 1.77	227.95 $\pm$ 41.09	1.81 $\pm$ 0.24	926.25 $\pm$ 511.95
模型组	12	28.21 $\pm$ 6.17 ^{a)}	146.24 $\pm$ 34.77 ^{a)}	1.50 $\pm$ 0.05 ^{a)}	429.83 $\pm$ 177.41 ^{a)}
美多芭组	12	9.31 $\pm$ 1.40 ^{b)}	207.59 $\pm$ 37.58 ^{c)}	1.87 $\pm$ 0.18 ^{b)}	536.00 $\pm$ 177.93
补肾活血方低剂量组	12	18.27 $\pm$ 7.06 ^{b)}	158.58 $\pm$ 42.55	1.79 $\pm$ 0.17 ^{c)}	464.75 $\pm$ 166.41
补肾活血方中剂量组	12	11.50 $\pm$ 5.21 ^{b) d)}	178.15 $\pm$ 60.57	1.94 $\pm$ 0.15 ^{b)}	490.42 $\pm$ 267.83
补肾活血方高剂量组	12	7.99 $\pm$ 2.86 ^{b) d)}	211.57 $\pm$ 54.10 ^{c)}	2.08 $\pm$ 0.33 ^{b) e)}	813.17 $\pm$ 345.22 ^{c)}

注: 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) 与补肾活血方低剂量组比较, $P<0.01$; e) 与补肾活血方低剂量组比较, $P<0.05$ 。

血方高剂量组各指标差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组小鼠肠道菌群多样性及菌群丰度比较

ASV 聚类结果显示, 各组共有的物种包括 537 个 OTU, 其中空白组特有 1015 个 OTU, 模型组特有 923 个 OTU, 美多芭组特有 2230 个 OTU, 补肾活血方低剂量组特有 1661 个 OTU, 补肾活血方中剂量组特有 610 个 OTU, 补肾活血方高剂量组特有 1333 个 OTU。表 2 示, 与空白组比较, 模型组 Dominance 指数、Pielou_e 指数、Shannon 指数、Simpson 指数差异均具有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 表明造模后小鼠菌群丰度、多样性和菌群分布均匀度均显著下降; 与模型组比较, 美多芭组 Chao1 指数、Observed_otus 指数、Shannon 指数差异具有统计学意义, 补肾活血方高剂量组 Chao1 指数、Observed_otus 指数、Dominance 指数、Pielou_e 指数、Shannon 指数、Simpson 指数差异均

具有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 提示经补肾活血方高剂量干预后小鼠菌群丰度、多样性和均匀度显著改善。

2.3 各组小鼠肠道菌群 PCoA 主坐标分析结果

图 1 示, 空白组和模型组在图中明显分开, 表明空白组和模型组之间的物种丰度有变化趋势。在各组药物干预后, 美多芭组和补肾活血方高剂量组粪便样本菌落分布逐渐趋于空白组, 这表明美多芭和补肾活血方高剂量均不同程度影响了 PD 模型小鼠的肠道微生物群。

2.4 各组小鼠肠道菌群 LEfSe 分析结果

LEfSe 分析统计得到所有差异物种共 121 种, 其中空白组有 4 种, 模型组有 28 种, 美多芭组有 45 种, 补肾活血方低剂量组有 14 种, 补肾活血方中剂量组有 9 种, 补肾活血方高剂量组有 21 种。其中空白组具有特征菌群包括肠乳酸杆菌、理研菌

表 2 各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数比较
Table 2 Comparison of alpha diversity index of intestinal flora of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Chao1 指数	Observed_otus 指数	Dominance 指数	Pielou_e 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
空白组	12	655.15±109.31	652.92±109.01	0.03±0.02	0.72±0.04	6.73±0.41	0.97±0.02
模型组	12	528.33±112.34	525.42±110.84	0.10±0.05 ^{a)}	0.62±0.06 ^{b)}	5.61±0.61 ^{b)}	0.90±0.05 ^{a)}
美多芭组	12	882.61±175.18 ^{c)}	876.83±175.85 ^{c)}	0.04±0.03	0.70±0.06	6.83±0.74 ^{c)}	0.96±0.03
补肾活血方低剂量组	12	668.68±345.35	664.33±343.22	0.07±0.09	0.66±0.11	6.10±1.26	0.93±0.09
补肾活血方中剂量组	12	577.23±72.69	572.75±72.00	0.09±0.04	0.62±0.05	5.67±0.50	0.91±0.04
补肾活血方高剂量组	12	787.26±143.60 ^{d)}	781.50±141.80 ^{d)}	0.03±0.01 ^{d)}	0.72±0.04 ^{c)}	6.93±0.52 ^{c)}	0.97±0.01 ^{d)}

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

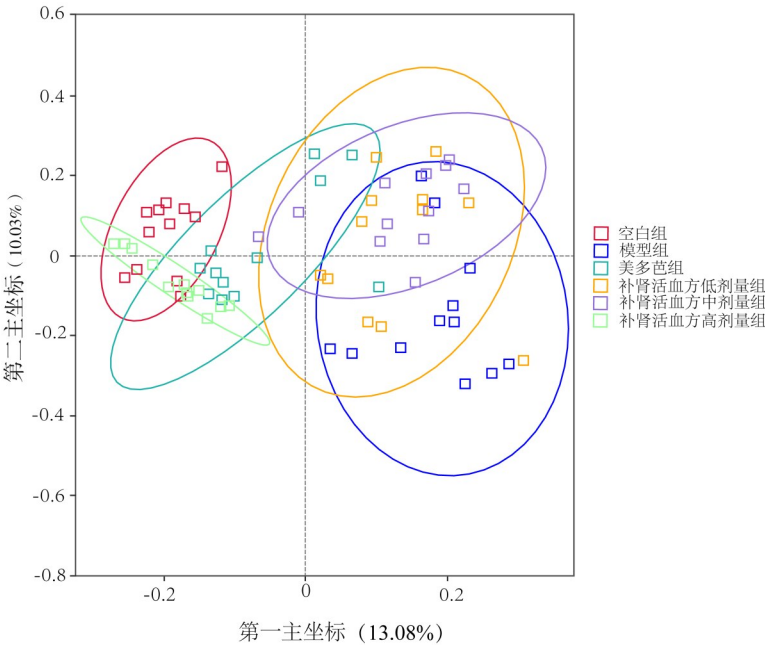


图 1 各组小鼠肠道菌群主坐标分析 (PCoA) 结果
Figure 1 PCoA principal coordinate analysis of intestinal flora of mice in each group

属、另枝菌属等；模型组具有特征菌群包括变形菌门、幽门螺杆菌、肠杆菌科等；美多芭组具有特征菌群包括 α -变形菌、黄色单胞菌科等；补肾活血方低剂量组具有特征菌群包括韦荣球菌科、立克次体目等；补肾活血方中剂量组具有特征菌群包括阿克曼菌属、普雷沃菌科；补肾活血方高剂量组具有特征菌群包括明串珠菌科、萨科瑞莫纳斯菌、脱硫弧菌属、发酵乳杆菌等。

2.5 各组小鼠肠道菌群门水平和属水平相对丰度比较

表3示，在门水平上，各组差异具有统计学意义的菌门相对丰度类别包括变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与空白组比较，模型组变形菌门升高，拟杆菌门、厚壁菌门均降低 ($P<0.05$)。与模型组比较，补肾活血方高剂量组拟杆菌门升高，补肾活血方中、高剂量组厚壁菌门均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

在属水平上，各组差异具有统计学意义的菌属相对丰度类别包括 Muribaculaceae、阿克曼菌属、幽门螺杆菌 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与空白组比

较，模型组 Muribaculaceae 降低、幽门螺杆菌升高。与模型组比较，补肾活血方高剂量组 Muribaculaceae 升高、补肾活血方中剂量组阿克曼菌属升高 ($P<0.01$)，美多芭组及补肾活血方中、高剂量组幽门螺杆菌均降低 ($P<0.01$)。

2.6 各组小鼠回肠组织 TLR/NF- κ B 通路相关炎症因子蛋白表达比较

表4示，与空白组比较，模型组小鼠回肠组织中 TLR2、TLR4、NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-17 蛋白表达均升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，美多芭组和补肾活血方高剂量组 TLR2、TLR4、NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-17 蛋白表达均降低，补肾活血方低剂量组仅 TLR4 蛋白表达降低，补肾活血方中剂量组 TLR4、TNF- α 蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与补肾活血方低剂量组比较，补肾活血方高剂量组 TLR2、TLR4、IL-17 蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组小鼠回肠组织中 TLR2、TLR4、NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-17 蛋白电泳图见图2。

表3 各组小鼠肠道菌群门水平和属水平物种相对丰度比较

Table 3 Comparison of the relative abundance of species at the phylum level and genus level in the intestinal flora of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	门水平			属水平		
		变形菌门	拟杆菌门	厚壁菌门	Muribaculaceae	阿克曼菌属	幽门螺杆菌
空白组	12	0.02 $\pm$ 0.02	0.54 $\pm$ 0.09	0.32 $\pm$ 0.11	0.45 $\pm$ 0.08	0.06 $\pm$ 0.05	0
模型组	12	0.14 $\pm$ 0.11 ^{a)}	0.31 $\pm$ 0.10 ^{a)}	0.17 $\pm$ 0.07 ^{b)}	0.21 $\pm$ 0.07 ^{a)}	0.04 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.11 ^{a)}
美多芭组	12	0.14 $\pm$ 0.10	0.37 $\pm$ 0.08	0.25 $\pm$ 0.10	0.28 $\pm$ 0.08	0.06 $\pm$ 0.09	0 ^{c)}
补肾活血方低剂量组	12	0.08 $\pm$ 0.07	0.31 $\pm$ 0.11	0.31 $\pm$ 0.16 ^{d)}	0.24 $\pm$ 0.09	0.08 $\pm$ 0.08	0.03 $\pm$ 0.04
补肾活血方中剂量组	12	0.07 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.07	0.22 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.12 ^{c)}	0.01 $\pm$ 0.01 ^{c)}
补肾活血方高剂量组	12	0.07 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.12 ^{c)}	0.32 $\pm$ 0.12 ^{d)}	0.37 $\pm$ 0.11 ^{c)}	0	0 ^{c)}

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

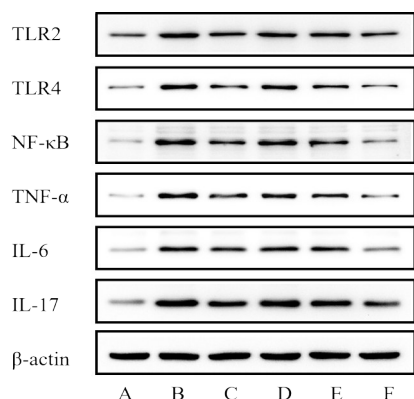
表4 各组小鼠回肠组织中 TLR/NF- κ B 通路相关炎症因子蛋白表达比较

Table 4 Comparison of protein expression of TLR/NF- κ B pathway-related inflammatory factors in the ileum tissue of mice in each group ($/\beta$ -actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TLR2	TLR4	NF- κ B	TNF- α	IL-6	IL-17
空白组	12	0.07 $\pm$ 0.06	0.06 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.04
模型组	12	0.59 $\pm$ 0.07 ^{a)}	0.55 $\pm$ 0.03 ^{a)}	0.50 $\pm$ 0.15 ^{a)}	0.41 $\pm$ 0.13 ^{a)}	0.53 $\pm$ 0.16 ^{a)}	0.80 $\pm$ 0.13 ^{a)}
美多芭组	12	0.25 $\pm$ 0.10 ^{b)}	0.24 $\pm$ 0.04 ^{b)}	0.17 $\pm$ 0.09 ^{c)}	0.12 $\pm$ 0.07 ^{c)}	0.22 $\pm$ 0.07 ^{c)}	0.38 $\pm$ 0.19 ^{c)}
补肾活血方低剂量组	12	0.46 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.05 ^{b)}	0.37 $\pm$ 0.17	0.24 $\pm$ 0.10	0.37 $\pm$ 0.11	0.67 $\pm$ 0.14
补肾活血方中剂量组	12	0.37 $\pm$ 0.09	0.30 $\pm$ 0.05 ^{b)}	0.24 $\pm$ 0.09	0.16 $\pm$ 0.09 ^{c)}	0.31 $\pm$ 0.07	0.52 $\pm$ 0.17
补肾活血方高剂量组	12	0.15 $\pm$ 0.09 ^{b) d)}	0.13 $\pm$ 0.02 ^{b) d)}	0.08 $\pm$ 0.03 ^{b)}	0.07 $\pm$ 0.06 ^{b)}	0.11 $\pm$ 0.05 ^{b)}	0.20 $\pm$ 0.09 ^{b) e)}

注：TLR2，Toll样受体2；TLR4，Toll样受体4；NF- κ B，核因子 κ B；TNF- α ，肿瘤坏死因子 α ；IL-6，白细胞介素6；IL-17，白细胞介素17。

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) 与补肾活血方低剂量组比较， $P<0.01$ ；e) 与补肾活血方低剂量组比较， $P<0.05$ 。



注：A，空白组；B，模型组；C，美多芭组；D，补肾活血方低剂量组；E，补肾活血方中剂量组；F，补肾活血方高剂量组；TLR2，Toll样受体2；TLR4，Toll样受体4；NF-κB，核因子κB；TNF-α，肿瘤坏死因子α；IL-6，白细胞介素6；IL-17，白细胞介素17。

图2 各组小鼠回肠组织中TLR2、TLR4、NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-17蛋白表达电泳图

Figure 2 Electropherograms of TLR2, TLR4, NF-κB, TNF-α, IL-6, and IL-17 protein expression in the ileum tissues of mice in each group

3 讨论

PD作为神经系统退行性病变，以运动症状为主要表现，但近年来研究发现一些胃肠道症状在疾病早期就已出现，甚至是首发症状，这些胃肠道症状可能会导致抗PD药物的吸收减少、作用蓄积，从而加重患者的运动症状^[15]。现代研究发现，肠道菌群通过不同机制调节肠道屏障与肠-脑轴的相互作用^[16]，中国的PD患者存在明显的肠道菌群失调^[17]。PD可归属于中医学“颤证”范畴，本课题组认为，PD患者多为肾虚血瘀，肾与脑以督脉相连，致脑髓不充，筋脉失养，继而发为颤证，治则当以补肾活血法贯穿始终。补肾活血方中肉苁蓉味甘、性微温，入肾、大肠经，具有补肾阳、益精血、润肠通便的作用；丹参味苦、性微寒，入肝经，能活血祛瘀，通利血脉；赤芍味酸、苦，性微寒，入心经以行血破血，味酸又可滋阴养血，与丹参相伍则化瘀行滞之效更甚；山萸肉性味酸、性微温，可补益肝肾，平息内风，滋阴通便；石菖蒲味辛、性温，具有疏通脑窍、醒神益智之效；蜈蚣味辛、性温，能平肝熄风，化瘀散结。全方调补肾精以充髓海，通利血脉以行瘀滞，开窍醒神以益元神，润肠通便以开肾关，通补兼施、涩利并行，共奏补肾活血之功。

本研究行为学实验结果显示，模型组小鼠爬杆触底时间延长，抓力减小，转棒持续时间和游泳持

续时间缩短，而美多芭组和补肾活血方各剂量组小鼠爬杆触底时间缩短，抓力有所增加，美多芭组和补肾活血方高剂量组转棒持续时间延长，仅有补肾活血方高剂量组游泳持续时间延长，说明补肾活血方和美多芭均可以不同程度改善PD模型小鼠运动功能，提高前肢抓力、运动协调性、抗疲劳能力及运动耐力，且以高剂量的补肾活血方干预效果最好。另外，与空白组比较，模型组小鼠回肠组织TLR/NF-κB通路中TLR2、TLR4、NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-17炎症因子蛋白表达均显著升高，提示PD模型小鼠TLR/NF-κB通路被激活从而产生肠道炎症。与模型组比较，美多芭组和补肾活血方高剂量组均可不同程度降低TLR2、TLR4、NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-17炎症因子蛋白表达，提示补肾活血方可抑制PD模型小鼠肠道炎症。

另有研究表明，肠道菌群失调导致的肠道炎症及肠道屏障功能受损，其原因是代谢产物脂多糖和短链脂肪酸易位增加，进而引起全身性炎症反应，随后炎症因子穿过血脑屏障后活化小神经胶质细胞等导致或加重神经炎症，进而促进PD发生发展^[18]。本研究肠道菌群ASV聚类、Alpha多样性分析和PCoA显示，与空白组比较，模型组菌群丰度、多样性、均匀度和群落结构均有显著差异，经美多芭和补肾活血方干预后菌群结构逐渐趋于空白组小鼠，其中以补肾活血方高剂量改善较为明显。模型组小鼠粪便中发现肠杆菌科和幽门螺杆菌等致病菌。肠杆菌科可使血液中脂多糖升高并通过TLR/NF-κB通路产生炎症细胞因子，包括TLR4、NF-κB、TNF-α、IL-6等，随血脑屏障破坏触发PD标志性病理产物α-突触核蛋白累积进而导致PD发生或加重^[19]。一项基于PD患者的研究显示，幽门螺杆菌感染是加重PD的原因之一，其机制可能是感染引起炎症反应而加重PD免疫损伤^[20]。补肾活血方中剂量组小鼠粪便中特征存在普雷沃菌科和阿克曼菌属。研究显示，普雷沃菌减少会导致维持上皮屏障完整性的黏蛋白合成减少，进而导致肠黏膜屏障破坏、肠道通透性增加等^[21-22]。阿克曼菌可以增加肠道黏蛋白的数量维持肠道屏障，并可减少结肠炎症^[23]。补肾活血方高剂量组小鼠粪便中特征存在明串珠菌科、萨科瑞莫纳斯菌、脱硫弧菌、发酵乳杆菌等有益菌。相关研究证实，明串珠菌科的增加可以通过改善小肠黏膜炎的血清代谢物进而产生抗炎效果^[24]，萨科瑞莫纳斯菌、脱硫弧菌与短链脂肪酸的增加呈正相关^[25]。发酵乳杆菌属于益生菌，

其分离出的新菌株可显著降低免疫细胞因子表达,并可提高其他有益菌丰度^[26]。各组小鼠菌群物种相对丰度结果显示,与空白组比较,模型组幽门螺杆菌丰度显著上升,而Muribaculaceae丰度显著下降,经补肾活血方中、高剂量干预后,异常升高的幽门螺杆菌丰度显著下调,且补肾活血方高剂量组Muribaculaceae丰度显著上升。Muribaculaceae是近年来新命名的菌种,其在PD中的作用尚未明确^[27],需进一步研究。

综上所述,补肾活血方可调节PD模型小鼠肠道菌群紊乱,并可改善肠道炎症反应,是其治疗PD的可能机制之一。由于肠道菌群影响PD的机制复杂,本次研究仅针对菌群变化和肠道炎症进行了探究分析,之后仍需进一步对补肾活血方通过肠道菌群治疗PD的具体影响机制进行深入研究。

参考文献

- [1] LU QB, ZHU ZF, ZHANG HP, et al. Lewy pathological study on α -synuclein in gastrointestinal tissues of prodromal Parkinson's disease[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(7): 1514-1521.
- [2] HOLMQVIST S, CHUTNA O, BOUSSET L, et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats[J]. Acta Neuropathol, 2014, 128(6): 805-820.
- [3] KIM S, KWON SH, KAM TI, et al. Transneuronal propagation of pathologic α -Synuclein from the gut to the brain models Parkinson's disease[J]. Neuron, 2019, 103(4): 627-641.
- [4] ERNY D, HRABĚ DE ANGELIS AL, JAITIN D, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS[J]. Nat Neurosci, 2015, 18(7): 965-977.
- [5] SCHEPERJANS F, AHO V, PEREIRA PA, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype[J]. Mov Disord, 2015, 30(3): 350-358.
- [6] XU W, ZHENG D, LIU Y, et al. Glucocalyxin B alleviates lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease by inhibiting TLR/NF- κ B and activating Nrf2/HO-1 pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(6): 2091-2104.
- [7] YANG J, JIA M, ZHANG X, et al. Calycosin attenuates MPTP-induced Parkinson's disease by suppressing the activation of TLR/NF- κ B and MAPK pathways[J]. Phytother Res, 2019, 33(2): 309-318.
- [8] 杨明会, 李军艳, 刘毅. 系统论引领帕金森病治疗思路[J]. 医学与哲学(临床决策论坛版), 2009, 30(2): 3-5.
- [9] 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.
- [10] KOLACHEVA A, BANNIKOVA A, PAVLOVA E, et al. Modeling of the Progressive degradation of the nigrostriatal dopaminergic system in mice to study the mechanisms of neurodegeneration and neuroplasticity in Parkinson's disease[J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1): 683.
- [11] TRAVAGLI RA, BROWNING KN, CAMILLERI M. Parkinson disease and the gut: new insights into pathogenesis and clinical relevance[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(11): 673-685.
- [12] 栾振先, 湛盈帆, 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.
- [13] 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.
- [14] 陈齐. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 7.
- [15] HARSANYIOVA J, BUDAY T, KRALOVA TRANCIKOVA A. Parkinson's disease and the gut: future perspectives for early diagnosis[J]. Front Neurosci, 2020, 14: 626. doi: 10.3389/fnins.2020.00626.
- [16] ELFIL M, KAMEL S, KANDIL M, et al. Implications of the gut microbiome in Parkinson's disease[J]. Mov Disord, 2020, 35(6): 921-933.
- [17] QIAN YW, YANG XD, XU SQ, et al. Alteration of the fecal microbiota in Chinese patients with Parkinson's disease[J]. Brain Behav Immun, 2018, 70: 194-202. doi: 10.1016/j.bbi.2018.02.016.
- [18] SUN MF, SHEN YQ. Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's disease[J]. Ageing Res Rev, 2018, 45: 53-61. doi: 10.1016/j.arr.2018.04.004.
- [19] SAMPSON TR, CHALLIS C, JAIN N, et al. A gut bacterial amyloid promotes α -synuclein aggregation and motor impairment in mice[J]. Elife, 2020, 9: e53111. doi: 10.7554/eLife.53111.
- [20] NIELSEN HH, QIU J, FRIIS S, et al. Treatment for Helicobacter pylori infection and risk of Parkinson's disease in Denmark[J]. Eur J Neurol, 2012, 19(6): 864-869.
- [21] SAMPSON TR, DEBELIUS JW, THRON T, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease[J]. Cell, 2016, 167(6): 1469-1480.
- [22] MANSUY-AUBERT V, RAVUSSIN Y. Short chain fatty acids: the messengers from down below[J]. Front Neurosci, 2023, 17: 1197759. doi: 10.3389/fnins.2023.1197759.
- [23] CHENG H, ZHANG D, WU J, et al. Atractylodes macrocephala Koidz. volatile oil relieves acute ulcerative colitis via regulating gut microbiota and gut microbiota

- metabolism [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1127785. doi: 10.3389/fimmu.2023.1127785.
- [24]ZHANG P, LIU J, XIONG B, et al. Microbiota from alginate oligosaccharide-dosed mice successfully mitigated small intestinal mucositis [J]. *Microbiome*, 2020, 8 (1): 112.
- [25]CAO C, WANG L, AI C, et al. Impact of Lycium barbarum arabinogalactan on the fecal metabolome in a DSS-induced chronic colitis mouse model [J]. *Food Funct*, 2022, 13(16): 8703–8716.
- [26]JANG YJ, KIM WK, HAN DH, et al. *Lactobacillus fermentum* species ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis by regulating the immune response and altering gut microbiota [J]. *Gut Microbes*, 2019, 10 (6): 696–711.
- [27]LAGKOUVARDOS I, LESKER TR, HITCH T, et al. Sequence and cultivation study of Muribaculaceae reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family [J]. *Microbiome*, 2019, 7 (1): 28.

Effects of *Bushen Huoxue Formula* (补肾活血方) on TLR/NF- κ B Pathway and Intestinal Flora in Ileum Tissue of Parkinson's Disease Model Mice

QI Xiaorong¹, HAO Feiran², TANG Xianglin², LI Fagen¹, WANG Yujia¹, WANG Liang¹, SHEN Yingfan¹, YANG Minghui¹, LI Min¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Sixth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100048;

2. Academy of Military Medical Sciences

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Bushen Huoxue Formula* (补肾活血方, BHF) in the treatment of Parkinson's disease (PD) from the perspective of intestinal flora. **Methods** Seventy-two male C57/BL6J mice were randomly divided into blank group, model group, Madopar group and low-, medium- and high-dose BHF groups, with 12 mice in each group. The mice in the blank group were intraperitoneally injected with 10 ml/kg of normal saline, and those in the other groups were intraperitoneally injected with 30 mg/kg of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) at a concentration of 3 mg/ml to induce PD mice model, both once a day for 7 consecutive days. After successful modeling, the low-, medium-, and high-dose BHF groups were given 7.5, 15, and 30 g/(kg·d) of BHF by gavage, respectively, while the Madopar group was given 112.5 mg/(kg·d) of Domopar tablets by gavage, and the blank group and the model group were given 15 ml/(kg·d) of distilled water, all once a day for 14 consecutive days. The rod climbing test, rotating rod test, grip strength test and weight-bearing swimming test were used to evaluate the behavioral indicators of mice. Western blotting was used to measure the protein expression levels of Toll-like receptor (TLR)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway inflammatory factors in the mouse ileum, including Toll-like receptor 2 (TLR2), Toll-like receptor 4 (TLR4), NF- κ B, tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), and interleukin 17 (IL-17). 16S rRNA high-throughput sequencing was used to analyze changes in mouse intestinal flora. **Results** Compared to those in the blank group, the mice in the model group had longer bottoming time when climbing the pole, reduced grip strength, shortened rotary pole duration and swimming duration, and increased protein expression levels of TLR2, TLR4, NF- κ B, TNF- α , and IL-6 in the ileal tissue ($P < 0.01$). Compared to the model group, the Madopar group and the low-, medium- and high-dose BHF groups had shortened bottoming time of the climbing pole and increased grip strength; the Madopar group and the high-dose BHF group had prolonged rotary pole duration, and reduced protein expressions of TLR2, TLR4, NF- κ B, TNF- α , IL-6, and IL-17 levels; and only the high-dose BHF group had prolonged swimming duration ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the low-dose BHF group, the bottoming time of the climbing pole were shorter in the moderate- and high-dose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the grip strength increased while the protein expression levels of TLR2, TLR4 and IL-17 decreased in the high-dose group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The intestinal flora results showed significant differences between the blank group and the model group in the Dominance index, Pielou_e index, Shannon index, and Simpson index ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those of the model group, the Shannon index, Chao1 index, and Observed_otus index of the Madopar group, as well as the Chao1 index, Observed_otus index, Dominance index, Pielou_e index, Shannon index, and Simpson index of the high-dose BHF group all showed significantly statistical differences ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). At the phylum level, the relative abundance categories of bacterial phyla with statistically significant differences in each group included Proteobacteria, Bacteroidetes, and Firmicutes ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). At the genus level, the relative abundance categories of bacterial genera with statistically significant differences among each group included Muribaculaceae, Akkermansia, and Helicobacter pylori ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The possible mechanism of BHF in treating PD may be to reconstruct the disordered intestinal flora structure and improve the inflammatory response.

Keywords Parkinson's disease; *Bushen Huoxue Formula* (补肾活血方); intestinal flora; inflammatory response; Toll-like receptors; nuclear factor kappa B

(收稿日期: 2023-12-21; 修回日期: 2024-02-29)

[编辑: 邓媛]