

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.04.011

补肾活血颗粒对帕金森病模型小鼠大脑黑质 Nrf2/NLRP3 炎症小体轴的影响

陈琦^{1,2}, 王鹏², 湛盈帆¹, 李绍旦¹, 杨明会^{1✉}

1. 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. 解放军医学院

[摘要] **目的** 从核因子E2相关因子2(Nrf2)/核苷酸结构域样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体轴探讨补肾活血颗粒治疗帕金森病(PD)的可能作用机制。**方法** 将84只雄性C57/BL6小鼠随机分为空白组、模型组、美多芭组、富马酸二甲酯组及补肾活血颗粒低、中、高剂量组,每组12只。除空白组外其余各组小鼠采用腹腔注射浓度为30 mg/ml的1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导PD小鼠模型,空白组小鼠腹腔注射等量生理盐水,每天1次,连续7天。造模成功后,补肾活血颗粒低、中、高剂量组分别给予补肾活血颗粒1.5、3、6 g/(kg·d)灌胃,美多芭组给予美多芭片0.113 g/(kg·d)灌胃,富马酸二甲酯组给予富马酸二甲酯50 mg/(kg·d)灌胃,空白组和模型组给予10 ml/(kg·d)蒸馏水灌胃。各组均每天灌胃1次,连续14天。采用旷场试验(总路程、中央区总路程和平均速度)、转棒实验(在棒时间)、爬杆实验(爬杆时间)评估小鼠行为学改变;ELISA法检测各组小鼠血清白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素18(IL-18)、髓过氧化物酶(MPO)水平;免疫组化法检测小鼠大脑黑质酪氨酸羟化酶(TH)表达;免疫荧光法检测大脑黑质 α -突触核蛋白(α -syn)表达;蛋白印迹法检测各组小鼠大脑黑质Nrf2、NLRP3、天冬氨酸蛋白水解酶1(Caspase1)、 α -syn蛋白水平;RT-PCR法检测各组小鼠黑质Nrf2、NLRP3、Caspase1 mRNA表达。**结果** 与空白组比较,模型组小鼠总路程、中央区总路程和平均速度下降,在棒时间缩短,爬杆时间延长,大脑黑质TH表达降低、 α -syn表达升高,Nrf2蛋白及其mRNA表达降低,NLRP3、Caspase1蛋白及其mRNA表达升高,血清IL-1 β 、IL-18和MPO水平升高($P<0.05$)。与模型组比较,各药物干预组上述指标均显著改善($P<0.05$)。与美多芭组比较,补肾活血颗粒高剂量组各指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。与富马酸二甲酯组比较,补肾活血颗粒中、高剂量组黑质Nrf2 mRNA表达升高($P<0.05$)。与补肾活血颗粒高剂量组比较,补肾活血颗粒低剂量组小鼠总路程、中央区总路程和平均速度下降,血清IL-18水平及大脑黑质 α -syn、Nrf2、NLRP3、Caspase1蛋白水平降低,Nrf2 mRNA表达亦降低($P<0.05$)。**结论** 补肾活血颗粒治疗PD的机制可能通过激活大脑黑质Nrf2/NLRP3炎症小体轴,从而发挥减轻神经炎症和减少 α -syn异常聚集的作用,且以高剂量组效果最好。

[关键词] 帕金森病;补肾活血颗粒;黑质;核因子E2相关因子2;核苷酸结构域样受体蛋白3;炎症小体

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是常见于老年人的慢性、进展性中枢神经变性疾病,已成为社会的重大公共卫生问题^[1]。目前PD的发病机理仍不清楚,缺少特异性根治手段,无法完全逆转神经元变性和阻止进行性 α -突触核蛋白(α -syn)聚集。研究^[2-3]表明,神经炎症、氧化应激等病理机

制参与了PD的发病过程。炎症小体是细胞炎症调控的重要靶点^[4],激活核因子E2相关因子2(Nrf2)可以抑制核苷酸结构域样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体的表达,抑制NLRP3炎症小体可减少小胶质细胞激活、运动缺陷、黑质多巴胺能神经元变性和 α -syn聚集体的积累^[5-6]。因此,Nrf2/NLRP3炎症小体轴介导的神经炎症反应在PD发病机制中起重要作用。本课题组根据PD患者老年多肾虚、久

基金项目:国家自然科学基金(82205231)

✉ 通讯作者:ymh9651@sina.com

病致瘀的特点,以肾虚血瘀为基本病机,以补肾活血为治疗原则,临床运用补肾活血颗粒治疗 PD 临床疗效显著^[7-9]。本研究基于 Nrf2/NLRP3 炎症小体轴探讨补肾活血颗粒治疗 PD 的可能作用机制,为补肾活血颗粒的临床应用提供依据。本实验已通过解放军总医院动物伦理委员会审批(动物伦理批准号:2024-X20-25)。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性 C57/BL 6 小鼠 84 只,8 周龄,体质量(20.0±2.0) g,采购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2021-0006。饲养温度控制在 21~23℃,湿度 30%~60%,12 h 光照与黑暗交替,每周更换 3 次垫料。

1.2 药物

补肾活血颗粒组成:肉苁蓉 15 g,丹参 20 g,山萸肉 20 g,赤芍 15 g,石菖蒲 10 g 等,颗粒剂由北京九龙制药有限公司生产,规格:10 g/袋,批号:210301,每袋颗粒剂相当于 1 剂中药组方中药含量。美多芭(0.25 g/片,国药准字:H10930198),上海罗氏制药有限公司。

1.3 主要试剂和仪器

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:MB3783-100MG);Nrf2 激动剂富马酸二甲酯(DMF, MedChemExpress 公司,货号:68-12-2); α -syn 单克隆抗体(货号:67864-1-Ig)、酪氨酸羟化酶(TH)单克隆抗体(货号:25859-1-AP)、Nrf2 单克隆抗体(货号:16396-1-AP)、NLRP3 单克隆抗体(货号:68102-1-Ig)、天冬氨酸蛋白水解酶 1(Caspase1)单克隆抗体(货号:22915-1-AP),武汉三鹰生物技术有限公司;白细胞介素 1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒(货号:MM-0040M1)、白细胞介素 18(IL-18) ELISA 试剂盒(货号:MM-0169M1)、髓过氧化物酶(MPO) ELISA 试剂盒(货号:MM-0338M1),江苏酶免实业有限公司;无 RNA 酶水(货号:R1600,北京索莱宝科技有限公司);反转录试剂盒(货号:AG11728)、QPCR 试剂(货号:AG11739,湖南艾科瑞生物工程有限公司);ECL 发光液(货号:WBKLS0500,默克密理博公司);Trizol(货号:R0016,上海碧云天生物技术有限公司)。

离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, H1650R 型);微量分光光度计[屹谱仪器制造(上

海)有限公司, DS-500 型];QPCR 仪(美国 ABI 公司, QuantStudio 7 Flex 型);电泳仪(北京君意东方电泳仪器有限公司, JY-300C 型);酶标仪(珀金埃尔默仪器有限公司, Enspire 型);正置荧光拍照显微镜(Nikon 公司, Eclipse Ci-L 型);视频追踪仪(上海欣软信息科技有限公司, XR-XZ301 型);转棒疲劳仪(上海玉研科学仪器有限公司, YAN-ROTA 型)。

1.4 分组和模型制备

采用随机数字表法将 84 只 C57/BL 6 小鼠分为造模组 72 只和空白组 12 只,造模组小鼠予以 MPTP 30 mg/(kg·d)腹腔注射建立 PD 小鼠模型^[10],注射体积为 3 mg/ml,每天 1 次,连续注射 7 天。以小鼠出现震颤、弓背、毛发悚立等判断造模成功^[10]。空白组予以等量生理盐水腹腔注射。将造模成功的小鼠采用随机数字表法分为模型组、美多芭组、富马酸二甲酯组及补肾活血颗粒低、中、高剂量组,每组 12 只。

1.5 给药方法

根据人与小鼠体表面积换算公式^[11],将补肾活血颗粒临床等效剂量 3 g/(kg·d)作为中剂量。补肾活血颗粒低、中、高剂量组小鼠分别给予补肾活血颗粒 1.5、3、6 g/(kg·d)灌胃,富马酸二甲酯组予 DMF 溶液 50 mg/(kg·d)灌胃,美多芭组予美多芭片 0.113 g/(kg·d)灌胃,空白组和模型组予蒸馏水 10 ml/(kg·d)灌胃。各组均每日灌胃 1 次,连续 14 天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 行为学实验 最后一次灌胃后次日,对各组小鼠展开行为学实验评估:1)旷场实验:实验开始前将各组小鼠置于环境中适应 15 min,随后对每组小鼠编号,打开视频追踪仪,记录各组小鼠活动情况,记录时间为 5 min,最后通过视频追踪系统分析各组小鼠的活动模式,评估其自主活动水平。2)转棒实验:在正式实验前,以 5 r/min 固定低速对小鼠进行训练,让它们适应转棒,正式实验时,将小鼠放在静止的转棒上,开始后转棒逐渐加速,从 4 r/min 逐渐增加到 40 r/min,记录每只小鼠在转棒上的停留时间(即从开始旋转到小鼠掉落的时间),每只小鼠进行 3 次实验,间隔时间为 15 min,取平均值。3)爬杆实验:将长度为 50 cm 的垂直细杆置于实验平台上,首先把小鼠放置在爬杆的顶部,头部朝向上方,记录小鼠转身(即转向头部朝下)的时间和爬下杆子到达地面的总时间,重复 3 次,记录每次平均时间。

1.6.2 ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-18、MPO 水平 各组小鼠行为学实验结束后,开始取材,取小鼠血液离心后的上清液,根据 ELISA 试剂盒说明书步骤进行,使用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长下的吸光度值(OD 值)。

1.6.3 免疫组化法检测大脑黑质 TH 光密度值 小鼠采血后采用脱颈处死,使用生理盐水进行心脏灌注,以小鼠肺脏、肝脏颜色变白为灌注结束标志,灌注结束取各组小鼠全脑。将全脑置于冰面,使用解剖刀沿中线分为左右两半,各组小鼠左脑置于多聚甲醛固定,右脑置于冻存管、液氮速冻,随后保存于-80℃冰箱冻存。使用石蜡包埋小鼠大脑左脑组织,选择黑质部分经过组织切片、抗原修复、分别采用 TH 抗体(1:500)孵育等过程,使用显微镜拍照,用 ImageJ(版本:1.54f)测量光密度值(IOD),最后计算平均 IOD 值,平均 IOD 值=IOD/该区域面积(Area)。

1.6.4 免疫荧光法检测大脑黑质 α -syn 荧光强度 使用石蜡包埋小鼠大脑黑质制备组织切片,采用柠檬酸钠缓冲液热修复对抗原进行修复,5% BSA 封闭 1 h,加入 α -syn 一抗(1:1000),4℃孵育过夜,洗涤后荧光标记二抗,室温孵育 1 h,DAPI 染核,最后用抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察并记录荧光强度,用 ImageJ(版本:1.54f)检测荧光强度。

1.6.5 蛋白印迹法检测大脑黑质 Nrf2、NLRP3、Caspase1、 α -syn 蛋白水平 使用脑模具于冰面取各组小鼠大脑黑质,提取小鼠黑质蛋白,SDS-PAGE 分离,转膜,使用 Nrf2 抗体(1:1000)、NLRP3 抗体(1:1000)、Caspase1 抗体(1:1000)孵育,加入 HRP 标记的二抗(稀释比例 1:5000),

ECL 显影后,使用 ImageJ(版本:1.54f)测量条带灰度值,内参为 GAPDH,并计算各蛋白灰度值与内参灰度值比值为蛋白相对水平。

1.6.6 RT-PCR 法检测大脑黑质 Nrf2、NLRP3、Caspase1 mRNA 表达 使用 Trizol 提取小鼠黑质总 RNA,测定各组样本的 RNA 浓度以及纯度,根据说明书步骤使用逆转录酶将 RNA 转为 cDNA,加入引物和 SYBR Green 探针进行 qPCR,根据 15 μ l 的最终反应体系,扩增循环设为 40 个(95℃ 10 min, 95℃ 20 s),引物由北京生欧科技有限公司合成, GAPDH: 上游 TGACATCAAGAAGGTGGTGAAGC, 下游 GGAAGAATGGGAGTTGCTGTTG, 长度 112 bp; Nrf2: 上游 TGACCATGAGGTTTCTTCACCT, 下游 TCCTGCCAAACTTGCTCCAT, 长度 174 bp; Caspase1: 上游 GACCGAGTGGTTCCTCAAG, 下游 GACGTG-TACGAGTGGGTGTT, 长度 108 bp; NLRP3: 上游 GGCGAGACCTCTGGGAAAAA, 下游 CTGTCTTCC-TGGCACACCAT, 长度 91 bp。使用 GAPDH 内参基因校正,结果分析采用 $\Delta\Delta C_t$ 法比较各组基因表达量。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析。对于符合正态分布的计量资料,结果以均值 $\pm$ 标准差表示。当方差齐时,组间差异的分析采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD 检验;当方差不齐时,使用 Games-Howell 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

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,模型组小鼠旷场试验总路程、中央区总路程和平均速度均下降,转棒实

表 1 各组小鼠行为学指标比较

Table 1 Comparison of behavioral indicators in mice of each group

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

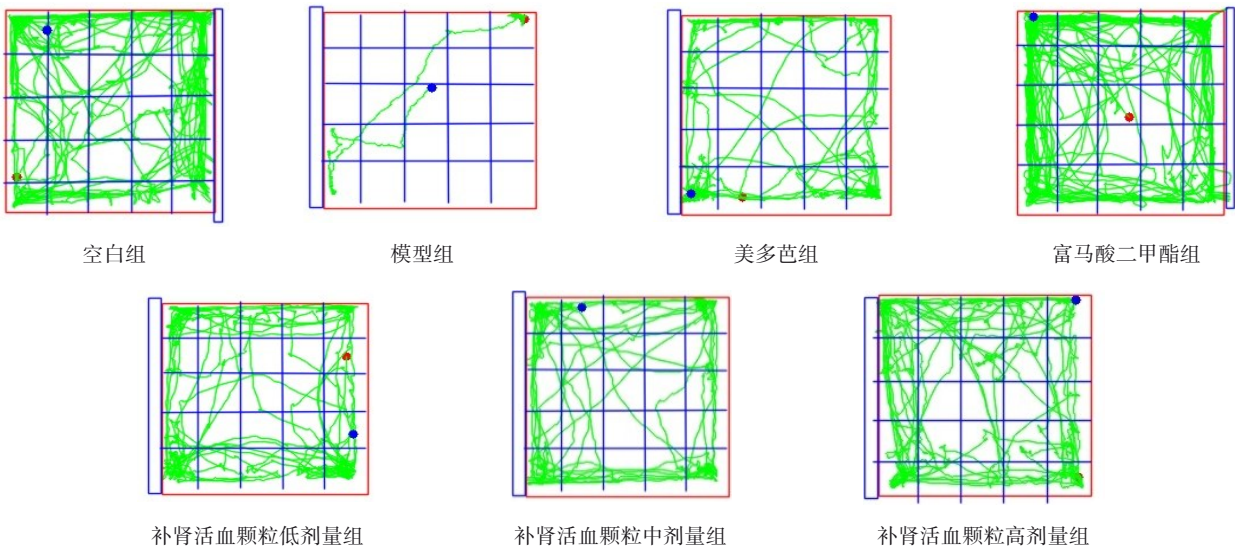
组别	鼠数	旷场实验			转棒实验	爬杆实验
		总路程/mm	平均速度/mm $\cdot$ s $^{-1}$	中央区总路程/mm	在棒时间/s	爬杆时间/s
空白组	12	28585.14 $\pm$ 6977.98	85.69 $\pm$ 20.22	5874.98 $\pm$ 2918.41	256.40 $\pm$ 52.27	8.01 $\pm$ 0.46
模型组	12	1595.73 $\pm$ 1065.20 ^{a)}	9.92 $\pm$ 13.21 ^{a)}	616.35 $\pm$ 256.98 ^{a)}	120.55 $\pm$ 32.75 ^{a)}	28.96 $\pm$ 2.05 ^{a)}
美多芭组	12	20822.69 $\pm$ 8321.67 ^{b)}	47.52 $\pm$ 14.47 ^{b)}	2931.44 $\pm$ 1141.83 ^{b)}	204.92 $\pm$ 69.4 ^{b)}	9.65 $\pm$ 0.79 ^{b)}
富马酸二甲酯组	12	26997.90 $\pm$ 6065.73 ^{b)}	72.35 $\pm$ 17.44 ^{b)} c)	4519.53 $\pm$ 2294.33 ^{b)}	268.77 $\pm$ 42.64 ^{b)} c)	8.47 $\pm$ 0.59 ^{b)}
补肾活血颗粒低剂量组	12	14128.36 $\pm$ 4919.97 ^{b)} d)	47.49 $\pm$ 12.86 ^{b)} d)	2839.52 $\pm$ 310.92 ^{b)}	175.88 $\pm$ 30.28 ^{b)} d)	20.04 $\pm$ 1.17 ^{b)} c) d)
补肾活血颗粒中剂量组	12	20633.54 $\pm$ 3003.43 ^{b)}	57.33 $\pm$ 8.34 ^{b)}	3210.41 $\pm$ 982.29 ^{b)}	254.78 $\pm$ 57.10 ^{b)}	13.29 $\pm$ 1.20 ^{b)} c) d) e)
补肾活血颗粒高剂量组	12	22801.26 $\pm$ 6328.33 ^{b)} e)	60.02 $\pm$ 17.05 ^{b)} e)	3443.09 $\pm$ 1844.15 ^{b)} e)	224.83 $\pm$ 66.49 ^{b)}	8.58 $\pm$ 0.69 ^{b)} e)

注: a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与美多芭组比较, $P<0.05$; d) 与富马酸二甲酯组比较, $P<0.05$; e) 与补肾活血颗粒低剂量组比较, $P<0.05$ 。

验中在棒时间缩短，爬杆实验中爬杆时间延长 ($P<0.05$)。与模型组比较，美多芭组、富马酸二甲酯组和补肾活血颗粒低、中、高剂量组的总路程、平均速度和中央区总路程均升高，在棒时间延长，爬杆时间缩短 ($P<0.05$)。与美多芭组比较，富马酸二甲酯组平均速度升高、在棒时间延长，补肾活血颗粒低、中剂量组爬杆时间延长 ($P<0.05$)。与富马酸二甲酯组比较，补肾活血颗粒低剂量组总路程和平均速度降低，在棒时间减少，爬杆时间延长；补肾活血颗粒中剂量组爬杆时间延长 ($P<0.05$)。与补肾活血颗粒低剂量组比较，补肾活血颗粒高剂量组旷场试验总路程、平均速度和中央区总路程均升高；补肾活血颗粒中、高剂量组爬杆时间缩短 ($P<0.05$)。各组小鼠旷场总路程轨迹见图 1。

2.2 各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18、MPO 水平比较
表 2 示，与空白组比较，模型组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 和 MPO 水平均升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，美多芭组、富马酸二甲酯组和补肾活血颗粒低、中、高剂量组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 和 MPO 水平均降低 ($P<0.05$)。与美多芭组比较，补肾活血颗粒低剂量组 IL-18 水平升高 ($P<0.05$)。与富马酸二甲酯组比较，补肾活血颗粒低剂量组 IL-18 和 MPO 水平升高 ($P<0.05$)。与补肾活血颗粒低剂量组比较，补肾活血颗粒高剂量组 IL-18 水平降低 ($P<0.05$)。补肾活血颗粒中、高剂量组各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组小鼠大脑黑质 TH 平均 IOD 值、 α -syn 平均荧光强度比较
表 3 示，与空白组比较，模型组小鼠大脑黑质



注：红色点代表运动起点；蓝色点代表运动终点；绿色线条代表小鼠运动轨迹。

图 1 各组小鼠旷场总路程轨迹图

Figure 1 Track diagram of total distance in the open field test for mice in each group

表 2 各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 和 MPO 水平比较

Table 2 Comparison of serum IL-1 β , IL-18, and MPO levels in mice of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IL-1 β /pg·ml ⁻¹	IL-18/pg·ml ⁻¹	MPO/ng·ml ⁻¹
空白组	12	28.23 $\pm$ 3.37	38.57 $\pm$ 3.22	9.40 $\pm$ 0.56
模型组	12	36.05 $\pm$ 3.43 ^{a)}	62.87 $\pm$ 1.43 ^{a)}	18.12 $\pm$ 3.62 ^{a)}
美多芭组	12	28.63 $\pm$ 3.09 ^{b)}	40.96 $\pm$ 3.04 ^{b)}	11.79 $\pm$ 1.21 ^{b)}
富马酸二甲酯组	12	27.64 $\pm$ 2.45 ^{b)}	38.03 $\pm$ 2.77 ^{b)}	9.42 $\pm$ 0.66 ^{b)}
补肾活血颗粒低剂量组	12	29.45 $\pm$ 2.40 ^{b)}	46.44 $\pm$ 1.10 ^{b) c) d)}	13.26 $\pm$ 0.38 ^{b) d)}
补肾活血颗粒中剂量组	12	28.81 $\pm$ 2.28 ^{b)}	42.66 $\pm$ 1.80 ^{b)}	12.36 $\pm$ 0.92 ^{b)}
补肾活血颗粒高剂量组	12	29.67 $\pm$ 2.73 ^{b)}	39.11 $\pm$ 2.77 ^{b) e)}	10.70 $\pm$ 0.86 ^{b)}

注：IL-1 β ，白细胞介素 1 β ；IL-18，白细胞介素 18；MPO，髓过氧化物酶。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与美多芭组比较， $P<0.05$ ；d) 与富马酸二甲酯组比较， $P<0.05$ ；e) 与补肾活血颗粒低剂量组比较， $P<0.05$ 。

表3 各组小鼠大脑黑质TH、 α -syn表达比较Table 3 Comparison of TH and α -syn expression in the brain substantia nigra of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TH 平均 IOD 值	α -syn 平均荧光强度
空白组	12	10.20 $\pm$ 0.34	5.20 $\pm$ 0.16
模型组	12	2.54 $\pm$ 0.58 ^{a)}	26.93 $\pm$ 0.18 ^{a)}
美多芭组	12	8.83 $\pm$ 1.13 ^{b)}	11.58 $\pm$ 0.26 ^{b)}
富马酸二甲酯组	12	8.67 $\pm$ 1.05 ^{b)}	11.95 $\pm$ 0.06 ^{b)}
补肾活血颗粒低剂量组	12	8.17 $\pm$ 1.82 ^{b)}	13.08 $\pm$ 0.07 ^{b) c) d)}
补肾活血颗粒中剂量组	12	9.79 $\pm$ 2.37 ^{b)}	12.42 $\pm$ 0.34 ^{b) c)}
补肾活血颗粒高剂量组	12	9.99 $\pm$ 2.49 ^{b)}	11.72 $\pm$ 0.20 ^{b) e)}

注：TH，酪氨酸羟化酶； α -syn， α -突触核蛋白；IOD，光密度值。

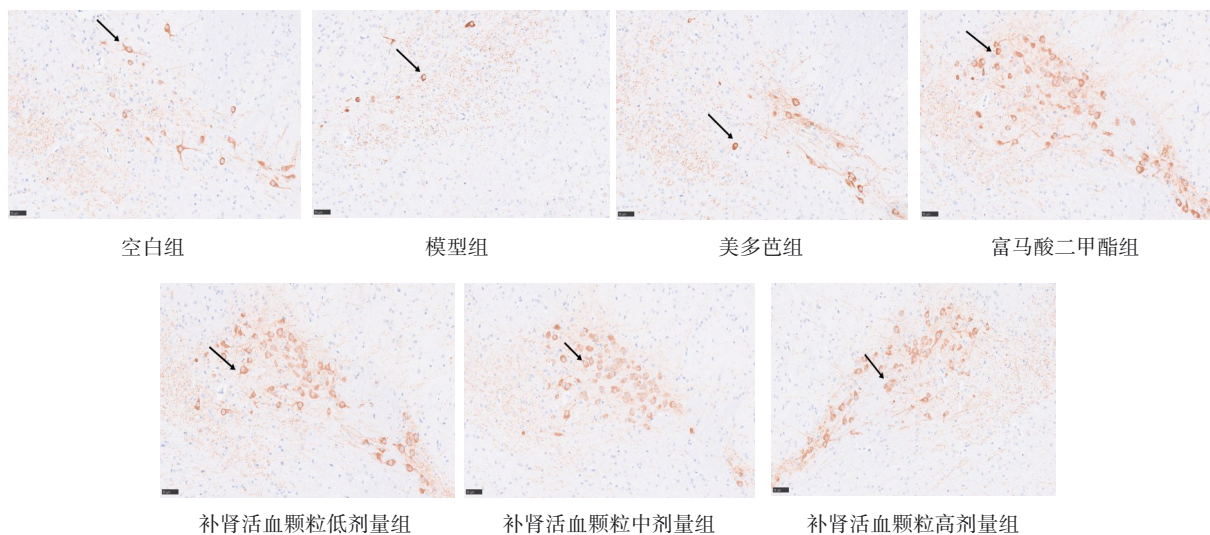
a) 与空白组比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；c) 与美多芭组比较， $P < 0.05$ ；d) 与富马酸二甲酯组比较， $P < 0.05$ ；e) 与补肾活血颗粒低剂量组比较， $P < 0.05$ 。

TH 平均 IOD 值降低， α -syn 平均荧光强度升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较，美多芭组、富马酸二甲酯组和补肾活血颗粒低、中、高剂量组小鼠大脑黑质 TH 平均 IOD 值均升高， α -syn 平均荧光强度均降低 ($P < 0.05$)。与美多芭组比较，补肾活血颗粒低、中剂量组 α -syn 平均荧光强度升高 ($P < 0.05$)。与富马酸二甲酯比较，补肾活血颗粒低剂量组 α -syn 平均荧光强度升高 ($P < 0.05$)。与补肾活血颗粒低剂量组相比，补肾活血颗粒高剂量组 α -syn 平均荧光强度降低 ($P < 0.05$)。美多芭组和补肾活血颗粒各剂量组之间各指标差异均无统计学

意义 ($P > 0.05$)。各组小鼠大脑黑质 TH 免疫组化染色图见图 2，各组小鼠大脑黑质 α -syn 免疫荧光图见图 3。

2.4 各组小鼠大脑黑质 Nrf2、NLRP3、Caspase1、 α -syn 蛋白水平比较

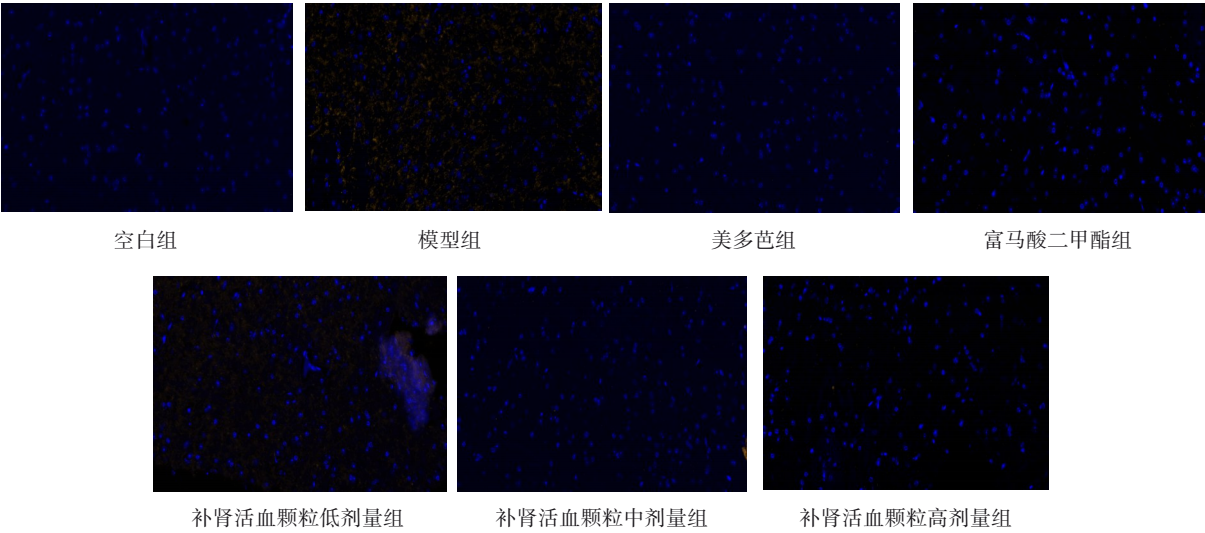
表 4 示，与空白组比较，模型组小鼠 Nrf2 蛋白水平降低，NLRP3、Caspase1、 α -syn 蛋白水平升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较，美多芭组、富马酸二甲酯组和补肾活血颗粒低、中、高剂量组小鼠 Nrf2 蛋白水平均升高，NLRP3、Caspase1、 α -syn 蛋白水平均降低 ($P < 0.05$)。与美多芭组比较，补肾活血颗粒低剂量组 Nrf2、NLRP3、 α -syn 蛋白水平升高，Caspase1 蛋白水平降低，补肾活血颗粒高剂量组 Nrf2 蛋白水平升高、Caspase1 蛋白水平降低 ($P < 0.05$)。与富马酸二甲酯组比较，补肾活血颗粒高剂量组 Nrf2 蛋白水平升高，补肾活血颗粒低剂量组 NLRP3、Caspase1、 α -syn 蛋白水平升高，补肾活血方中剂量组 α -syn 蛋白水平升高 ($P < 0.05$)。与补肾活血颗粒低剂量组比较，补肾活血颗粒高剂量组 Nrf2 蛋白水平升高，NLRP3、Caspase1、 α -syn 蛋白水平均降低，补肾活血方中剂量组 Caspase1 蛋白水平均降低 ($P < 0.05$)。与补肾活血颗粒中剂量组相比，补肾活血颗粒高剂量组 Caspase1 蛋白水平降低 ($P < 0.05$)。各组小鼠大脑黑质 Nrf2、NLRP3、Caspase1、 α -syn 蛋白电泳图见图 4。



注：TH，酪氨酸羟化酶；图中黑色箭头所指棕色即为 TH 表达。

图2 各组小鼠大脑黑质TH免疫组化染色图 (×100)

Figure 2 Immunohistochemical staining of TH in the brain substantia nigra of mice in each group (×100)



注：α-syn，α-突触核蛋白；图中橙色即为α-syn表达分布。
图3 各组小鼠大脑黑质α-syn免疫荧光图（×100）

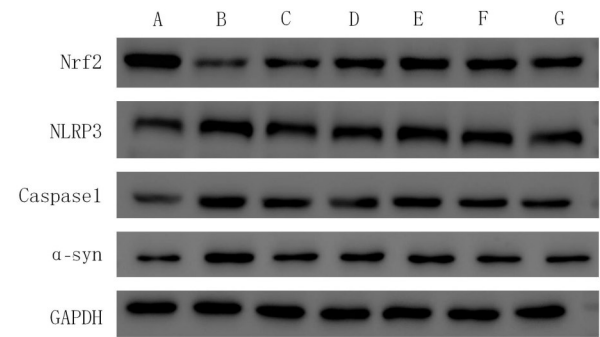
Figure 3 Immunofluorescence of α-syn in the brain substantia nigra of mice in each group (×100)

表4 各组小鼠大脑黑质Nrf2、NLRP3、Caspase1、α-syn蛋白相对水平比较

Table4 Comparison of relative protein levels of Nrf2, NLRP3, Caspase1, and α-syn in the brain substantia nigra of mice in each group (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Nrf2	NLRP3	Caspase1	α-syn
空白组	12	0.98±0.04	0.34±0.01	0.17±0.01	0.41±0.03
模型组	12	0.21±0.02 ^{a)}	1.06±0.05 ^{a)}	0.89±0.04 ^{a)}	1.04±0.02 ^{a)}
美多芭组	12	0.51±0.06 ^{b)}	0.66±0.05 ^{b)}	0.72±0.02 ^{b)}	0.62±0.01 ^{b)}
富马酸二甲酯组	12	0.62±0.01 ^{b)}	0.65±0.04 ^{b)}	0.51±0.04 ^{b) c)}	0.53±0.06 ^{b)}
补肾活血颗粒低剂量组	12	0.69±0.04 ^{b) c)}	0.86±0.03 ^{b) c) d)}	0.73±0.02 ^{b) d)}	0.79±0.07 ^{b) c) d)}
补肾活血颗粒中剂量组	12	0.73±0.01 ^{b) c)}	0.76±0.04 ^{b)}	0.58±0.03 ^{b) c) e)}	0.75±0.03 ^{b) c) d)}
补肾活血颗粒高剂量组	12	0.81±0.02 ^{b) c) d) e)}	0.69±0.02 ^{b) c)}	0.48±0.02 ^{b) c) e) f)}	0.64±0.08 ^{b) c)}

注：Nrf2，核因子E2相关因子2；NLRP3，核苷酸结构域样受体蛋白3；Caspase1，天冬氨酸蛋白水解酶1；α-syn，α-突触核蛋白。
a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与美多芭组比较， $P<0.05$ ；d) 与富马酸二甲酯组比较， $P<0.05$ ；e) 与补肾活血颗粒低剂量组比较， $P<0.05$ ；f) 与补肾活血颗粒中剂量组比较， $P<0.05$ 。



注：A，空白组；B，模型组；C，美多芭组；D，富马酸二甲酯组；E，补肾活血颗粒低剂量组；F，与补肾活血颗粒中剂量组；G，补肾活血颗粒高剂量组；Nrf2，核因子E2相关因子2；NLRP3，核苷酸结构域样受体蛋白3；Caspase1，天冬氨酸蛋白水解酶1；α-syn，α-突触核蛋白；GAPDH，内参。

图4 各组小鼠脑黑质Nrf2、NLRP3、Caspase1、α-syn免疫印迹条带图

Figure 4 Western Blot Bands of Nrf2, NLRP3, Caspase1, and α-syn in the brain substantia nigra of mice in each group

2.5 各组小鼠大脑黑质Nrf2、NLRP3、Caspase1 mRNA表达比较

表5示，与空白组比较，模型组小鼠脑黑质Nrf2 mRNA表达降低，NLRP3、Caspase1 mRNA表达升高（ $P<0.05$ ）。与模型组比较，美多芭组、富马酸二甲酯组和补肾活血颗粒低、中、高剂量组小鼠Nrf2 mRNA表达均升高，NLRP3、Caspase1 mRNA表达均降低（ $P<0.05$ ）。与美多芭组比较，富马酸二甲酯和补肾活血颗粒低剂量组Nrf2 mRNA表达降低（ $P<0.05$ ）。与富马酸二甲酯组比较，补肾活血颗粒中、高剂量组Nrf2 mRNA表达升高（ $P<0.05$ ）。与补肾活血颗粒低剂量组比较，补肾活血颗粒中、高剂量组Nrf2 mRNA表达升高（ $P<0.05$ ）。与补肾活血颗粒中剂量组比较，补肾活血颗粒高剂量组Nrf2 mRNA表达升高（ $P<0.05$ ）。

表5 各组小鼠大脑黑质 *Nrf2*、*NLRP3*、*Caspase1* mRNA 表达比较

Table5 Comparison of *Nrf2*, *NLRP3*, and *Caspase1* mRNA expression in the brain substantia nigra of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	<i>Nrf2</i>	<i>NLRP3</i>	<i>Caspase1</i>
空白组	12	1.00±0.02	1.00±0.08	1.01±0.11
模型组	12	0.01±0.00 ^{a)}	30.66±5.46 ^{a)}	46.45±7.49 ^{a)}
美多芭组	12	0.24±0.01 ^{b)}	5.73±0.51 ^{b)}	9.60±0.67 ^{b)}
富马酸二甲酯组	12	0.13±0.01 ^{b) c)}	2.70±0.05 ^{b)}	2.82±0.17 ^{b)}
补肾活血颗粒低剂量组	12	0.15±0.01 ^{b) c)}	7.04±0.14 ^{b)}	9.73±0.19 ^{b)}
补肾活血颗粒中剂量组	12	0.20±0.02 ^{b) d) e)}	5.60±0.41 ^{b)}	8.65±0.71 ^{b)}
补肾活血颗粒高剂量组	12	0.25±0.01 ^{b) d) e) f)}	3.81±0.10 ^{b)}	3.63±0.26 ^{b)}

注：*Nrf2*，核因子E2相关因子2；*NLRP3*，核苷酸结构域样受体蛋白3；*Caspase1*，天冬氨酸蛋白水解酶1。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与美多芭组比较， $P<0.05$ ；d) 与富马酸二甲酯组比较， $P<0.05$ ；e) 与补肾活血颗粒低剂量组比较， $P<0.05$ ；f) 与补肾活血颗粒中剂量组比较， $P<0.05$

3 讨论

根据PD多发于中老年人的疾病特点，本课题组认为本病病机为年高病久，气血失调，治宜缓图，求速易变。以肾虚为本、血瘀为标立论，主张以补肾活血法为基本治则贯穿始终，根据个体差异加减用药^[12]。补肾活血颗粒方中肉苁蓉补肾健脑、丹参活血祛瘀共为君药；山萸肉补肾填精、赤芍散瘀凉血为臣药；石菖蒲为佐药，豁痰开窍、醒神益智。全方组方严谨，攻补兼顾。经过多年的临床观察发现，补肾活血颗粒能明显改善PD患者运动和非运动症状，提高患者生活质量，临床应用安全可靠有效^[7-9]。目前，《中国帕金森病治疗指南（第四版）》^[13]中推荐的西药治疗以美多芭为首选，因此本研究选择美多芭为对照药物。富马酸二甲酯作为*Nrf2*的一种激动剂，能上调抗炎反应基因表达，改善线粒体功能，对中枢神经系统具有保护作用^[14]，故设置富马酸二甲酯组观察补肾活血颗粒治疗PD的作用机制是否与*Nrf2*的激活有关。

本研究行为学实验结果表明，与正常小鼠相比，PD模型小鼠旷场试验总路程、中央区总路程和平均速度均下降，转棒实验中的在棒时间延长，爬杆实验中爬杆时间缩短，提示模型小鼠运动功能下降。给予美多芭、富马酸二甲酯和补肾活血颗粒低、中、高剂量干预后，旷场试验总路程、平均速度和中央区总路程均上升，在棒时间延长，爬杆时间缩短，说明给予美多芭、富马酸二甲酯和补肾活血颗粒后，PD模型小鼠的运动功能均得到了不同程度改善。与美多芭组比较，补肾活血颗粒低、中剂量组爬杆时间延长，而补肾活血颗粒高剂量组各指标差异无统计学意义。且与补肾活血颗粒低剂量组相比，补肾活血颗粒高剂量组旷场试验总路程、

平均速度和中央区总路程均上升，提示补肾活血颗粒高剂量效果优于低剂量，美多芭和补肾活血高剂量效果无明显差异。

TH是合成多巴胺的重要限速酶，可以作为多巴胺能神经元的一种标记物， α -syn的异常聚集是PD重要的病理因素^[15]。免疫组化结果表明，PD模型小鼠黑质TH表达明显降低， α -syn表达升高，提示黑质多巴胺能神经元损伤， α -syn异常地聚集；给予美多芭、富马酸二甲酯和补肾活血颗粒各剂量干预后，TH表达升高， α -syn表达降低，说明美多芭、富马酸二甲酯和补肾活血颗粒均可减轻MPTP诱导的PD小鼠黑质多巴胺能神经元损伤，减少 α -syn的异常聚集。与美多芭组比较，补肾活血颗粒低、中剂量组 α -syn表达升高，而补肾活血颗粒高剂量组无显著差异。与补肾活血颗粒低剂量组相比，补肾活血颗粒高剂量组 α -syn表达降低，说明补肾活血颗粒高剂量在减少 α -syn聚集的效果较低剂量更显著，且与美多芭效果相当。

神经炎症是PD退行性变的关键因素，炎症小体是细胞内炎症调节的重要靶点，炎症小体介导的神经炎症反应在PD发病机制中发挥重要作用^[16]。在PD患者的尸检中发现脑黑质致密部有炎症存在，其中包括了IL-1 β 等炎性细胞因子和NLRP3炎性小体的参与^[17]。NLRP3炎性小体的激活需要两个步骤：炎性小体相关蛋白的上调是炎性小体通路激活的第一个信号，Caspase1和IL-1 β 的成熟和分泌是炎性小体激活的第二个信号^[18-19]。研究发现，MPTP刺激星形胶质细胞可以促进NLRP3的活化，激活Caspase1，引发细胞程序性死亡，促使IL-1 β 表达并分泌和释放炎性因子，最终导致神经元细胞的凋亡^[20]。激活*Nrf2*可以抑制NLRP3炎性小体的表达，富马酸二甲酯作为*Nrf2*的激动剂，可导致

Nrf2 的积累和转录 Nrf2 信号通路上调, 发挥抗氧化损伤作用^[21]。MPO 是血红素过氧化物酶超家族的成员, MPO 衍生的活性物质主要通过参与吞噬过程发挥作用, MPO 水平升高与炎症和氧化应激增加有关^[22]。本研究结果表明, 给予美多芭、富马酸二甲酯和补肾活血颗粒各剂量干预后, 模型小鼠黑质 Nrf2 蛋白及其 mRNA 表达均升高, NLRP3、Caspase1 蛋白及其 mRNA 表达均降低, 提示补肾活血颗粒对 PD 的神经保护作用涉及 Nrf2 的激活和对 NLRP3 炎症小体、Caspase1 的抑制。与美多芭组比较, 补肾活血颗粒高剂量组 Nrf2 蛋白水平升高、Caspase1 蛋白水平降低; 与补肾活血颗粒低剂量组相比, 补肾活血颗粒高剂量组 Nrf2 蛋白及其 mRNA 表达升高; 与补肾活血颗粒中剂量组比较, 补肾活血颗粒高剂量组 Nrf2 mRNA 表达升高, Caspase1 蛋白水平均降低; 与富马酸二甲酯组比较, 补肾活血颗粒中、高剂量组 Nrf2 mRNA 表达升高。以上结果提示补肾活血颗粒高剂量在升高 Nrf2 蛋白及其 mRNA 效果更显著。另外, 与模型组比较, 美多芭组、富马酸二甲酯组和补肾活血颗粒各剂量组小鼠 IL-1 β 、IL-18 和 MPO 水平均降低, 提示各药物组可降低促炎细胞因子的表达, 抑制炎症反应。其中补肾活血颗粒高剂量组相比补肾活血颗粒低剂量组 IL-18 水平降低明显, 提示补肾活血颗粒高剂量抗炎疗效优于低剂量。

综上所述, 补肾活血颗粒可改善 PD 模型小鼠的行为学能力, 显著减轻大脑黑质多巴胺能神经元缺失, 抑制了炎症因子的分泌, 提高了抗氧化应激能力, 减少了 α -syn 的异常聚集, 其机制可能与激活大脑黑质 Nrf2/NLRP3 炎症小体轴有关, 且以高剂量效果最好。本研究仅从体内实验层面初步探讨了补肾活血颗粒治疗 PD 的作用机制, 但对 Nrf2/NLRP3 炎症小体轴的作用机制研究还不够深入, 未来将开展体外实验进行深入研究证实。

参考文献

- [1] KLANN EM, DISSANAYAKE U, GURRALA A, et al. The gut-brain axis and its relation to Parkinson's disease: a review[J]. Front Aging Neurosci, 2021, 13: 782082. doi: 10.3389/fnagi.2021.782082.
- [2] SAIKI S, SATO S, HATTORI N. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2012, 83(4): 430-436.
- [3] SHARMA N, NEHRU B. Characterization of the lipopoly-saccharide induced model of Parkinson's disease: role of oxidative stress and neuroinflammation[J]. Neurochem Int, 2015, 87: 92-105. doi: 10.1016/j.neuint.2015.06.004.
- [4] WALSH JG, MURUVE DA, POWER C. Inflammasomes in the CNS[J]. Nat Rev Neurosci, 2014, 15(2): 84-97.
- [5] XU LL, WU YF, YAN F, et al. 5-(3,4-Difluorophenyl)-3-(6-methylpyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazole (DDO-7263), a novel Nrf2 activator targeting brain tissue, protects against MPTP-induced subacute Parkinson's disease in mice by inhibiting the NLRP3 inflammasome and protects PC12 cells against oxidative stress[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 134: 288-303. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.
- [6] OU Z, ZHOU Y, WANG L, et al. NLRP3 inflammasome inhibition prevents α -synuclein pathology by relieving autophagy dysfunction in chronic MPTP-treated NLRP3 knockout mice[J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(4): 1303-1311.
- [7] 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.
- [8] 杨文学, 李绍旦, 李敏, 等. 帕金森病运动症状不同侧起病对患者中医证候要素及运动功能的影响[J]. 中医杂志, 2023, 64(11): 1130-1134.
- [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] JACKSON-LEWIS V, PRZEDBORSKI S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. Nat Protoc, 2007, 2(1): 141-151.
- [11] REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited[J]. FASEB J, 2008, 22(3): 659-661.
- [12] 李军艳, 杨明会, 赵冠英. 试论肾虚血瘀是帕金森病的基本病机[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(9): 768-771.
- [13] 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.
- [14] HUANG H, TARABOLETTI A, SHRIVER LP. Dimethyl fumarate modulates antioxidant and lipid metabolism in oligodendrocytes[J]. Redox Biol, 2015, 5: 169-175. doi: 10.1016/j.redox.2015.04.011.
- [15] NAGATSU T, NAKASHIMA A, ICHINOSE H, et al. Human tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease and in related disorders[J]. J Neural Transm, 2019, 126(4): 397-409.
- [16] PIANCONE F, LA ROSA F, MARVENTANO I, et al. The role of the inflammasome in neurodegenerative

- diseases[J]. *Molecules*, 2021, 26(4):953.
- [17] NAGATSU T, NAKASHIMA A, ICHINOSE H, et al. Human tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease and in related disorders [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2019, 126(4): 397–409.
- [18] ZHENG D, LIWINSKI T, ELINAV E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms [J]. *Cell Discov*, 2020, 6: 36. doi: 10.1038/s41421-020-0167-x.
- [19] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13):3328.
- [20] LU M, SUN XL, QIAO C, et al. Uncoupling protein 2 deficiency aggravates astrocytic endoplasmic reticulum stress and nod-like receptor protein 3 inflammasome activation[J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(2): 421–430.
- [21] CAMPOLO M, CASILI G, BIUNDO F, et al. The neuro-protective effect of dimethyl fumarate in an MPTP-mouse model of Parkinson's disease: involvement of reactive oxygen species/nuclear factor- κ B/nuclear transcription factor related to NF- E_2 [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(8):453–471.
- [22] NDREPEPA G. Myeloperoxidase: a bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 493: 36–51. doi: 10.1016/j.cca.2019.02.022.

Effect of *Bushen Huoxue Granules* (补肾活血颗粒) on the Nrf2/NLRP3 Inflammasome Axis in the Brain Substantia Nigra of Parkinson's Disease Model Mice

CHEN Qi^{1,2}, WANG Peng², CHEN Yingfan¹, LI Shaodan¹, YANG Minghui¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Sixth Medical Center of Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing, 100048; 2. Chinese People's Liberation Army Medical School

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of action of *Bushen Huoxue Granules* (补肾活血颗粒, BHG) in the treatment of Parkinson's disease (PD) through the Nrf2/NLRP3 inflammasome axis. **Methods** A total of 84 male C57/BL 6 mice were randomly divided into blank group, model group, Madopar group, dimethyl fumarate group, and low-, medium, and high-dose BHG group, with 12 mice in each group. Except for the blank group, all groups were induced into PD models by intraperitoneal injection of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) at a concentration of 30 mg/ml for 7 consecutive days. The blank group received an equal volume of saline. After model establishment, the low-, medium, and high-dose BHG groups were treated with 1.5, 3, and 6 g/(kg·d) of the BHG by gavage, respectively. The Madopar group was given 0.113 g/(kg·d) of Madopar tablets by gavage, and the dimethyl fumarate group was given 50 mg/(kg·d) of dimethyl fumarate solution. The blank group and the model group were given 10 ml/(kg·d) of distilled water by gavage. Gavage was administered once daily for 14 days. Behavioral changes were evaluated using the open field test (total distance, central area distance, and average speed), rotarod test (time on the rod), and climbing pole test (climbing time). Serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-18 (IL-18), and myeloperoxidase (MPO) were measured by ELISA. Immunohistochemistry was used to detect tyrosine hydroxylase (TH) expression in the brain substantia nigra. Immunofluorescence was used to detect α -synuclein (α -syn) expression. Western Blot was used to detect Nrf2, NLRP3, Caspase-1, and α -syn protein levels in the brain substantia nigra. RT-PCR was used to detect mRNA expression levels of *Nrf2*, *NLRP3*, and *Caspase-1* in the brain substantia nigra. **Results** Compared with the blank group, the model group showed decreased total distance, central area distance, and average speed, reduced time on the rotarod, prolonged climbing time, reduced TH expression, increased α -syn expression, decreased Nrf2 protein and mRNA expression, increased NLRP3 and Caspase-1 protein and mRNA expression, and elevated serum IL-1 β , IL-18, and MPO levels ($P < 0.05$). Compared with the model group, all drug interventions significantly improved the above indicators ($P < 0.05$). There was no significant differences in all indicators between the high-dose BHG group and the Madopar group ($P > 0.05$). Compared with the dimethyl fumarate group, the medium and high-dose BHG groups showed increased *Nrf2* mRNA expression in the brain substantia nigra ($P < 0.05$). Compared with the high-dose BHG group, the low-dose group showed decreased total distance, central area distance, and average speed, reduced serum IL-18 levels, decreased α -syn, Nrf2, NLRP3, and Caspase-1 protein levels, and lower *Nrf2* mRNA expression ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism by which BHG treat PD may involve activating the Nrf2/NLRP3 inflammasome axis in the brain substantia nigra, thereby reducing neuroinflammation and α -syn aggregation. The high-dose group showed the best effects.

Keywords Parkinson's disease; *Bushen Huoxue Granules* (补肾活血颗粒); brain substantia nigra; Nrf2; NLRP3; inflammasome

(收稿日期: 2024-09-09; 修回日期: 2024-11-22)

[编辑: 邓媛]