

温肾养肝汤对 MPTP 所致帕金森病多巴胺能神经元损伤保护的分子机制研究

徐成成, 陆艳, 唐莉莉, 梁艳, 赵杨

(南京市中医院脑病科, 南京中医药大学附属南京中医院, 江苏 南京 210001)

摘要:目的 探讨温肾养肝汤保护多巴胺(Dopamine, DA)能神经元, 延缓帕金森病(Parkinson's disease, PD)进程的作用机制。**方法** 将 50 只小鼠随机分为正常组, 模型组, 温肾养肝汤高、低剂量组, 金刚烷胺组, 每组 10 只, 除正常组外, 其余组小鼠腹腔注射 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP), 每周 2 次, 连续 4 周, 建立 MPTP 致小鼠 PD 模型, 灌胃温肾养肝汤, 每日 1 次, 连续 3 周。观察 PD 小鼠的行为学变化; 免疫组化和尼氏染色法检测 DA 能神经元细胞数; HPLC 法检测病理组织中 DA、3,4-二羟基苯乙酸(3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)和高香草酸(Homovanillic acid, HVA)含量; 比色法测定小鼠黑质线粒体中 ATP 酶(ATPase)、线粒体呼吸链复合物 I (Complex I) 活性; Western blot 测定 PINK1、Parkin、VDAC1、LC3 II/I、P62 蛋白相对表达量。**结果** 行为学检测显示, 与模型组相比, 温肾养肝汤能明显改善小鼠的肌肉力量和运动平衡 ($P < 0.01$), 延长小鼠在滚筒上的时间 ($P < 0.01$); 免疫组化显示, 温肾养肝汤高剂量组可观察到大量酪氨酸氨化酶(Tyrosine hydrogenase, TH)免疫反应呈阳性的细胞, 明显的细胞突起, 与尼氏染色结果一致, 同时小鼠纹状体中 DA 和 HVA 含量明显提高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 黑质线粒体酶活性和自噬通路相关蛋白研究显示, 高剂量温肾养肝汤能明显提高 ATPase 和 Complex I 活性 ($P < 0.01$), 同时还能上调模型小鼠的 PINK1 ($P < 0.05$)、Parkin ($P < 0.01$)、LC3 II/I ($P < 0.01$) 蛋白表达, 抑制 P62 蛋白表达 ($P < 0.01$)。**结论** 温肾养肝汤通过提高线粒体功能, 激活 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬过程来保护 DA 能神经元, 改善 PD 模型小鼠行为学功能障碍, 延缓 PD 进程。

关键词: 温肾养肝汤; 帕金森病; 多巴胺能神经元; 线粒体自噬; PINK1/Parkin

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-0482(2022)02-0122-07

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2022.0122

引文格式: 徐成成, 陆艳, 唐莉莉, 等. 温肾养肝汤对 MPTP 所致帕金森病多巴胺能神经元损伤保护的分子机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(2): 122-128.

Molecular Mechanism Research of Wenshen Yanggan Decoction on Dopaminergic Neuron Injury in MPTP-Induced Parkinson's Disease

XU Cheng-cheng, LU Yan, TANG Li-li, LIANG Yan, ZHAO Yang

(Department of Brain Disease, Nanjing Hospital of Chinese Medicine, Nanjing TCM Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the potential mechanism of Wenshen Yanggan Decoction on protecting dopaminergic neurons and delaying the process of Parkinson's disease (PD). **METHODS** Fifty mice were randomly divided into 5 groups ($n = 10$): control group, model group, Wenshen Yanggan Decoction high dose group, Wenshen Yanggan Decoction low dose group and amantadine group. Except for the control group, mice were injected intraperitoneally with $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) twice a week for 4 consecutive weeks to establish a Parkinson's disease (PD) mouse model. The mice were administered with Wenshen Yanggan Decoction by gavage once a day for 3 weeks. The behavioral effects of mice were observed. Immunohistochemistry and Nissl staining were used to detect the number of DA neurons. The contents of DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) in pathological tissues were measured by HPLC. Colorimetric method was used to determine the activities of ATPase and mitochondrial respiratory chain Complex I in the substantia nigra. The protein expression levels of PINK1, Parkin, VDAC1, LC3 II/I, and P62 were detected by Western blot. **RESULTS** The behavioral tests showed that compared with the model group, Wenshen Yanggan Decoction significantly improved the muscle strength and exercise balance of mice ($P < 0.01$), and prolonged the duration of mice on the roller ($P < 0.01$). The results of the immunohistochemistry demonstrated that a large number of TH immunoreactive cells and obvious cell protrusions were observed in Wenshen Yanggan Decoction high dose group, which was consistent with the results of the Nissl staining assay. In addition, Wenshen Yanggan Decoction significantly increased the levels of DA and HVA ($P < 0.05, P < 0.01$) in the striatum. Furthermore, treatment with the high dose Wenshen Yanggan Decoction profoundly

收稿日期: 2021-07-07

基金项目: 江苏省中医药领军人才项目(SLJ0214); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81804022)

第一作者: 徐成成, 男, 主治医师, E-mail: zyxcc@163.com

通信作者: 赵杨, 男, 主任医师, 主要从事神经系统疾病的诊治和临床研究, E-mail: yangzhaotcm@163.com

promoted the activities of ATPase and Complex I ($P < 0.01$), up-regulated the protein levels of PINK1 ($P < 0.05$), Parkin ($P < 0.01$) and LC3 II/I ($P < 0.01$), and inhibited P62 protein expression ($P < 0.01$) in MPTP-induced mice. **CONCLUSION** Wenshen Yanggan Decoction can improve mitochondrial function, and provide neuroprotective effect in PD by activating PINK1/Parkin mediated mitochondrial autophagy pathway.

KEYWORDS: Wenshen Yanggan Decoction; Parkinson's disease; dopaminergic neurons; mitochondrial autophagy; PINK1/Parkin

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经系统退行性疾病,以中脑黑质多巴胺(Dopamine, DA)能神经元丧失,纹状体中 DA 含量明显减少以及黑质和蓝斑中存在路易小体(Lewy body, LB)等为主要病理特征,以肌张力增强、运动障碍,同时可能伴有认知能力下降为主要临床症状^[1]。据估计,到 2030 年,我国 PD 患者将会达到 494 万,约占全世界患者 50%^[2]。目前,临床上只能通过外科手术以及左旋多巴类、左旋多巴增效剂、DA 受体激动剂和促 DA 释放类等药物干预来控制 PD 病情,尚无法根治,且药物短期疗效较好,但长期使用易出现疗效减退现象,寻找更为有效的治疗 PD 新药尤为迫切^[3]。

PD 致病因素较多,发病机制尚不明确,诸多证据表明黑质内 DA 能神经元退化与线粒体功能障碍和自噬通路功能异常等相关^[4],以 ROS 产生过多、ATP 产生减少、线粒体 DNA 损伤等为主要特征的线粒体功能缺陷在 PD 发病过程中起着关键作用^[5]。同时,线粒体自噬通路的异常,不能及时清除损伤或病变的线粒体,导致线粒体动态性失调,造成 PD 的发生和发展^[6]。

温肾养肝汤是江苏省名中医赵杨教授治疗 PD 的经验方,全方由肉苁蓉、乌药、益智仁、淮山药、炒白芍和钩藤 6 味药组成,临床上具有保护 DA 能神经元,延缓 PD 的疗效^[7]。前期研究结果也证实,方中君药肉苁蓉能明显升高黑质纹状体中 DA 及其代谢物含量,下调 α -突触核蛋白表达,保护 PD 模型大鼠的 DA 能神经元,改善大鼠神经行为学特征^[8],但全方治疗 PD 的作用机制尚不清楚。本研究建立 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)致 PD 小鼠模型,观察温肾养肝汤保护 DA 能神经元的作用,并从线粒体功能及自噬通路方面探究其分子机制,以期 PD 治疗药物开发提供更多科学依据。

1 材料

1.1 实验动物

成年雄性 C57/BL6 小鼠 50 只,10 周龄,体质量 25~30 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0006。在南京中医药大学动物实验中心适应性饲养(伦理

号:202102A002),自由饮水,温度 20~25 °C,湿度 40%~70%。适应性饲养 1 周。

1.2 药材

1.2.1 温肾养肝汤处方 肉苁蓉 30 g,乌药 20 g,益智仁 30 g,淮山药 20 g,炒白芍 20 g,钩藤 20 g,按处方量加 20 倍纯水,煎煮 2 次,每次 1.5 h,浓缩至生药量 $4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。给药前,分别稀释成高、低剂量 $1.6, 0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$

1.2.2 试剂 MPTP(货号:M0896,用无菌生理盐水配制成 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液)和酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH)多克隆抗体(货号:SAB4200697)购自 Sigma-Aldrich 公司;金刚烷胺(货号:A800770,配置成 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液)购自上海麦克林;ATP 酶(ATPase)活性检测试剂盒(货号:ab234055)和线粒体呼吸链复合物 I(Complex I)活性检测试剂盒(货号:ab109721)购自 Abcam 公司;PINK1 抗体(货号:ab23707)、Parkin 抗体(货号:ab264105)、VDAC1 抗体(货号:ab15895)、P62 抗体(货号:ab56416)、LC3 II/I 抗体(货号:ab128025)、COX IV 抗体(货号:ab202554)、山羊抗小鼠二抗(货号:ab205719)和山羊抗兔二抗(货号:ab205718)均购自 Abcam 公司;Tubulin 抗体(货号:AF7011)购自 Affinity 公司;ECL 试剂盒(货号:P1000-25)购自北京普利莱生物技术公司,二氨基联苯胺(DAB)(货号:ZLI-9017)购自中杉金桥;线粒体提取试剂盒(货号:SM0020)购自北京索莱宝;DA(货号:B25300)、高香草酸(Homovanillic acid, HVA)(货号:B20433)、3,4-二羟基苯乙酸(3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)(货号:B21788)购于上海源叶生物。

2 方法

2.1 动物饲养分组

50 只小鼠分笼后,随机分成正常组、模型组、温肾养肝汤低剂量组(低剂量组)、温肾养肝汤高剂量组(高剂量组)、金刚烷胺组,每组 10 只。

2.2 动物造模

适应性饲养 1 周后,除正常组外,其余组小鼠每日腹腔注射 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ MPTP,每周 2 次,连续 4 周。

2.3 药物处理

根据动物体表面积折算小鼠给药量^[9]。造模 1 周后,温肾养肝汤低剂量组和高剂量组小鼠分别灌胃 8、16 g · kg⁻¹ · d⁻¹; 金刚烷胺组小鼠灌胃 40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 正常组和模型组小鼠灌胃等体积纯水, 每日 1 次, 连续 3 周。最后 1 次 MPTP 腹腔注射后, 进行行为学检测。

2.4 行为学检测

从最后一次 MPTP 注射前 5 d 开始, 每天对小鼠进行训练以适应行为学检测, 采用爬杆试验、牵引试验和滚筒试验^[10]检测 5 组小鼠肢体运动协调性。

爬杆试验: 在垂直木制表面粗糙的杆 (高 50 cm, 直径 1 cm) 顶部固定一个直径为 2.5 cm 的塑料小球, 将小鼠放置于杆顶, 记录小鼠下降转弯潜伏期和整个爬杆时间, 测定 3 次, 每次间隔 30 min。

牵拉试验: 将小鼠前肢悬挂在水平钢丝上, 用两个后肢抓住钢丝记 3 分, 用单个后肢抓住钢丝记 2 分, 两个后肢均抓不住钢丝记 1 分, 落下得 0 分。

滚筒试验: 小鼠在滚轴上 (直径 6 cm, 转速 20 r · min⁻¹) 保持平衡并连续运动, 记录运动时间, 连续测 20 次, 取平均值。

2.5 脑组织取材

行为学检测后, 腹腔注射 45 mg · kg⁻¹ 戊巴比妥钠麻醉, 将小鼠大脑剥离, 切割成 2 个完全相同的半球, 1 个半球分离黑质, 部分黑质 4% 甲醛固定, 用于组织病理学研究; 另 1 个半球分离黑质和纹状体, -80 °C 储存。

2.6 免疫组化法分析 DA 能神经元数^[11]

分别取黑质组织, 石蜡包埋后, 切成 30 μm 厚, PBS 洗涤后, 牛血清白蛋白封闭, 加 TH 抗体 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜, 洗涤后, 再加生物素标记的二抗, 室温孵育, 经 DAB 显色后封片, 取 21 个连续切片选择视野于同一放大倍数、同一光强度下拍摄, 用无偏体视学方法计算黑质总 TH 阳性神经元数量。

2.7 尼氏染色

冷冻切片依次经过二甲苯、无水乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇和蒸馏水处理, 切片在尼氏染色液中 40 °C 孵育 10 min, 并用蒸馏水清洗。之后, 切片依次经 70% 乙醇、80% 乙醇、95% 乙醇, 各脱水 2 min; 然后经无水乙醇 2 次, 每次 5 min, 二甲苯 2 次, 每次 10 min。最后 DPX 封片, 显微镜下尼氏体呈紫色, 细胞核呈淡紫色。

2.8 纹状体中 DA 及其代谢物检测

组织匀浆后, 取 50 μL 上清液, 按照文献描述的方法^[12], 测定 DA、HVA 和 DOPAC 含量。HPLC 色谱条件: 电化学检测器 (美国 Waters 公司, 2696), 流动相为 A (1% 醋酸铵水溶液) : B (甲醇) = 94 : 6 等度洗脱, 流速为 0.5 mL · min⁻¹, 柱温 22 °C。用外标法计算 DA 及其代谢物 HVA、DOPAC 的含量。

2.9 线粒体酶活性评价

按照试剂盒说明书检测 ATPase 和 Complex I 的活性。

2.10 Western blot 检测

取黑质组织匀浆, 加 RIPA 裂解缓冲液, 用试剂盒提取线粒体总蛋白, 再用 BCA 法测定蛋白浓度。上样量 50 μg, 根据目的蛋白分子量选择 10% ~ 12% SDS-PAGE 进行电泳分离, 转膜后, 按比例孵育一抗 [PINK1 抗体 (1:1 000)、Parkin 抗体 (1:1 000)、VDAC1 抗体 (1:1 000)、P62 抗体 (1:1 000)、LC3 II / I 抗体 (1:1 000)], 洗涤后, 加二抗孵育, ECL 显影, 以 Tubulin (1:3 000) 为总蛋白内参, COX IV (1:1 000) 为线粒体蛋白内参, 计算目的蛋白的相对表达水平, 所有试验重复 3 次。

2.11 统计学方法

所有试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 ANOVA 和 Dunnett's 事后检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠造模情况

模型组小鼠腹腔注射 MPTP 后出现全身震颤、运动迟缓、活动减少、后肢张开以及皮毛和尾巴竖立的特征, 而且随着 MPTP 给药次数的增加, 上述症状趋于明显, 提示造模成功。

3.2 温肾养肝汤对 PD 小鼠行为学的影响

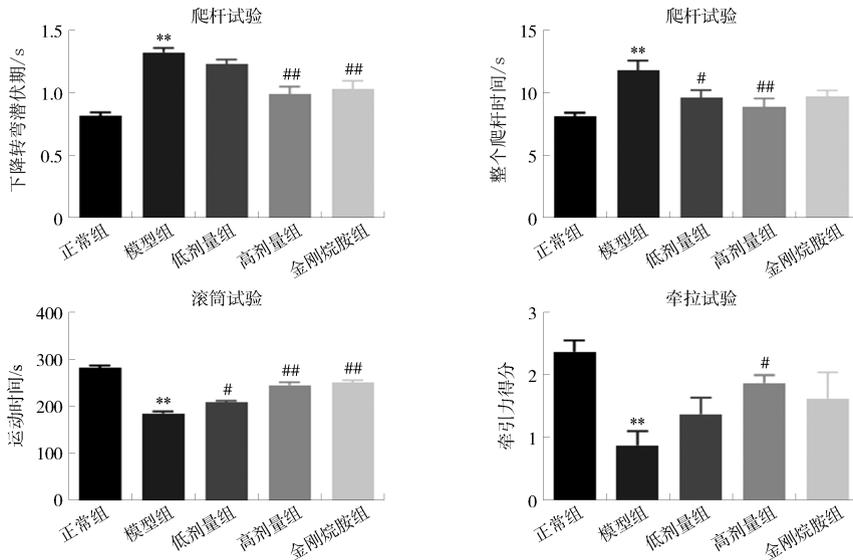
与正常组相比, 模型组小鼠爬杆完成时间明显延长 (P < 0.01), 滚筒试验时间明显缩短 (P < 0.01), 牵拉试验得分显著降低 (P < 0.01), 经温肾养肝汤干预后, 高剂量组小鼠爬杆完成时间和滚筒试验时间以及牵拉试验得分均得到明显改善, 与模型组比较具有统计学差异 (P < 0.01), 提示温肾养肝汤可以改善 PD 小鼠运动障碍, 增强肌肉抓力。见图 1。

3.3 温肾养肝汤对 PD 小鼠中脑黑质 DA 能神经元数的影响

免疫组化结果显示, 正常组小鼠 DA 能神经元胞浆和纤维染色较深, 细胞突起明显, TH 免疫反应阳性信号明显; MPTP 可引起小鼠明显的 DA 能神

神经元毒性,中脑腹侧被盖区(Ventral tegmental area, VTA)和黑质致密部(SNpc) DA 能神经元明显丢失,TH 免疫反应阳性细胞数减少,多数细胞无突起,而经温肾养肝汤干预后,高剂量组可见大量 TH 免

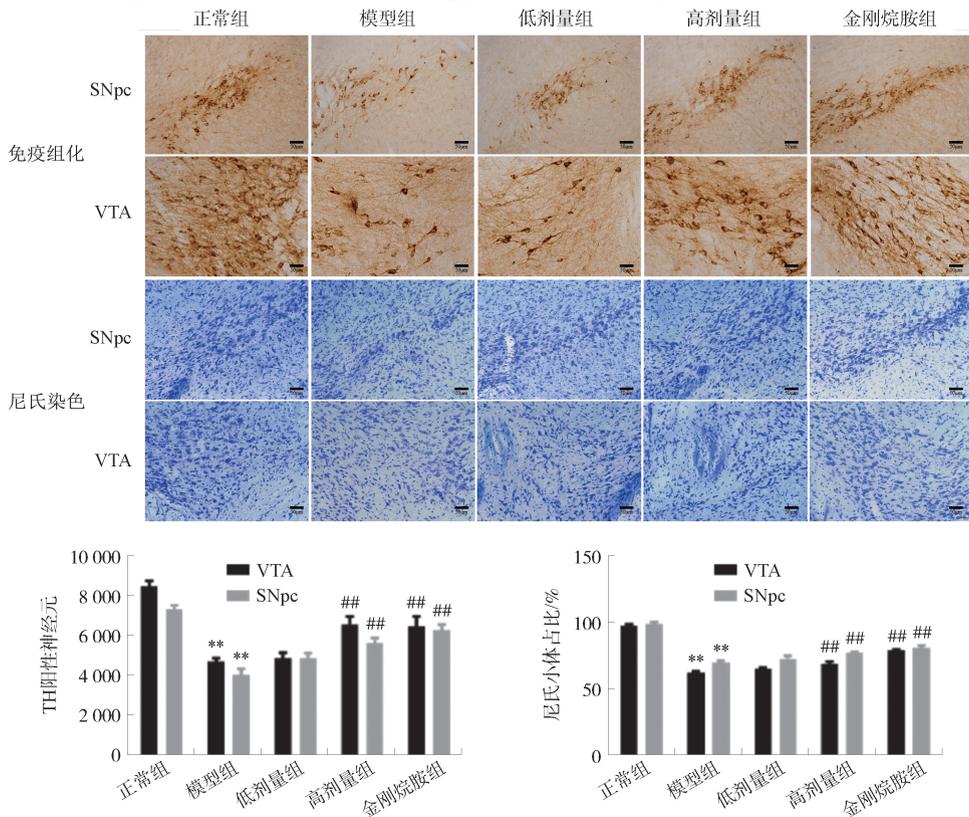
疫反应阳性细胞,细胞突起较易观察($P<0.01$)。尼氏染色结果显示,相比于正常组,模型组尼氏小体缺失严重($P<0.01$),经温肾养肝汤干预后,尼氏小体数明显增加($P<0.01$)。见图 2。



注:与正常组比较, ** $P<0.01$;与模型组相比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s, n=10$ 。

图 1 温肾养肝汤对 PD 小鼠运动障碍的影响

Fig. 1 Effects of Wenshen Yanggan Decoction on dyskinesia in PD mice



注:与正常组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ## $P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s, n=3$ 。

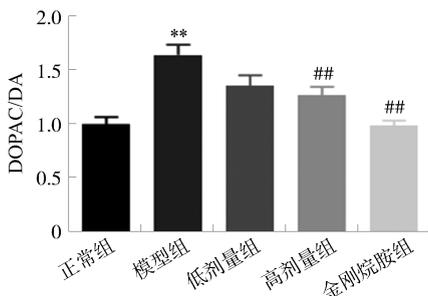
图 2 温肾养肝汤对 PD 小鼠 DA 能神经元的影响

Fig. 2 Effects of Wenshen Yanggan Decoction on dopaminergic neurons in PD mice

3.4 温肾养肝汤对 PD 小鼠大脑纹状体 DA 能神经 元功能的影响

结果见表 1 和图 3。与正常组相比,模型组小鼠纹状体中 DA、DOPAC 和 HVA 含量明显降低($P < 0.01$), DOPAC/DA 和 HVA/DA 明显升高($P < 0.01$), 而给予高剂量温肾养肝汤可明显提高 DA 及其代谢物 HVA 含量($P < 0.05, P < 0.01$), DOPAC/DA 和 HVA/DA 也有不同程度降低($P < 0.05, P < 0.01$), 阳性对照药金刚烷胺也能明显减轻 MPTP 致 PD 小鼠纹状体 DA 的损失($P < 0.01$), 提示温肾养肝汤或金刚烷胺能改善 DA 的利用率和周转代谢率。

表 1 温肾养肝汤对 PD 小鼠纹状体 DA 及其代谢物



注:与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 。

图 3 温肾养肝汤对 PD 小鼠纹状体 DOPAC/DA 和 HVA/DA 的影响

Fig. 3 Effects of Wenshen Yanggan Decoction on DOPAC/DA and HVA/DA in PD mice

3.5 温肾养肝汤对 PD 小鼠线粒体酶活性的影响

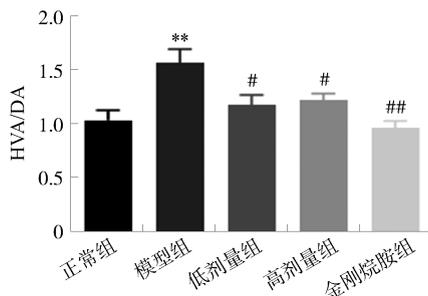
结果见图 4。与正常组相比,模型组小鼠线粒体酶活性明显低于正常小鼠($P < 0.01$), 温肾养肝汤高剂量能明显提高 ATPase 和 Complex I 酶活性($P <$

的影响($\bar{x} \pm s, ng \cdot mg^{-1}, n = 6$)

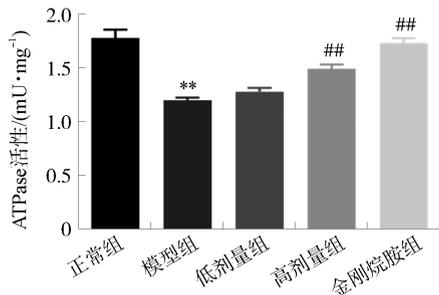
Table 1 Effects of Wenshen Yanggan Decoction on DA and its metabolites in PD mice ($\bar{x} \pm s, ng \cdot mg^{-1}, n = 6$)

组别	DA	DOPAC	HVA
正常组	6.10 ± 0.59	6.02 ± 0.63	6.18 ± 0.71
模型组	2.83 ± 0.56 ^{**}	4.51 ± 0.37 ^{**}	4.26 ± 0.23 ^{**}
低剂量组	3.95 ± 0.51 [#]	5.26 ± 0.41	4.54 ± 0.47
高剂量组	4.24 ± 0.37 ^{##}	5.30 ± 0.49	5.11 ± 0.19 [#]
金刚烷胺组	5.55 ± 0.63 ^{##}	5.46 ± 0.74 [#]	5.31 ± 0.62 ^{##}

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组相比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。



0.01) (见图 4), 提示温肾养肝汤能明显改善 PD 小鼠黑质线粒体酶活性, 恢复线粒体功能, 为神经元的存活供能。



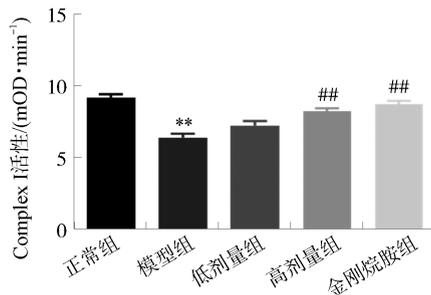
注:与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 。

图 4 温肾养肝汤对 PD 小鼠线粒体酶活性的影响

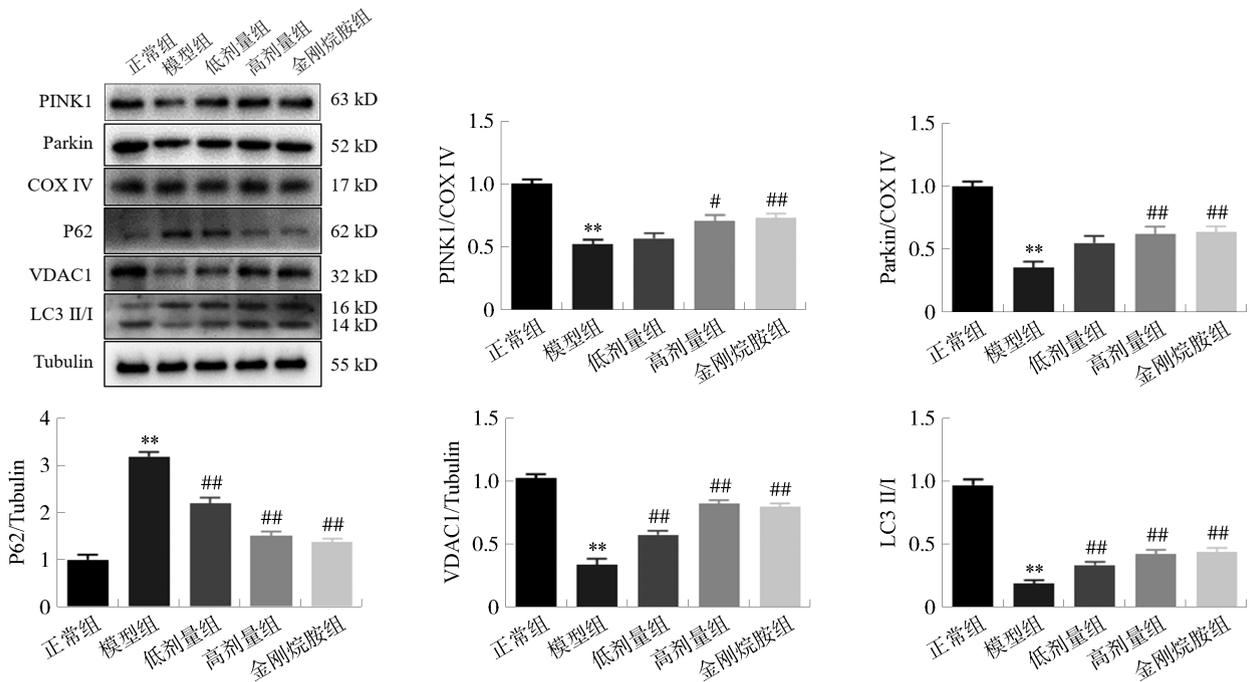
Fig. 4 Effects of Wenshen Yanggan Decoction on ATPase and Complex I activities in PD mice

3.6 温肾养肝汤对线粒体自噬通路蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,造模后小鼠黑质线粒体的 PINK1、Parkin、VDAC1、LC3 II/I 表达明显下调



($P < 0.01$), P62 明显上调($P < 0.01$), 高剂量温肾养肝汤干预可显著改善各蛋白表达($P < 0.01$), 提示温肾养肝汤对 DA 能神经元保护作用可能与调控线粒体自噬有关。见图 5。



注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图 5 温肾养肝汤对 PD 小鼠线粒体自噬通路蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of Wenshen Yanggan Decoction on mitochondrial autophagy pathway-related protein expressions in PD mice

4 讨论

古代中医典籍中无 PD 病名的记载,根据 PD 临床表现其归属于“颤证”范畴,而众多医家认为“颤证”多属内风,病在肝肾^[13]。同样,赵杨教授也认为肝肾亏虚,肝风内动,筋脉失养是 PD 的主要病机,病位在筋脉,与肝、肾、脾密切相关^[7],并根据多年临床经验自拟了温肾养肝汤,方中肉苁蓉温补肾阳、润肠通便,乌药温肾散寒,益智仁温脾暖肾、涩精缩尿,山药补肺脾肾,钩藤平肝熄风,白芍养血敛阴,以避免肉苁蓉、乌药温燥引动肝阳。

目前 PD 动物模型制备主要是利用化学、物理等方法破坏黑质-纹状体 DA 递质神经系统,产生神经元变性丢失的特异性病理改变^[14]。MPTP 是一种亲脂性化学试剂,对黑质和纹状体有较强敏感性,其代谢物可被 DA 能神经元摄取,抑制线粒体复合物活性,导致 DA 能神经元变性,进而准确模拟出 PD 患者的运动障碍症状^[14]。基于此,选择 MPTP 作为造模剂复制小鼠 PD 模型研究温肾养肝汤对 PD 小鼠的 DA 能神经元保护作用及其对线粒体功能和自噬途径的影响。

中脑黑质 DA 能神经元变性丢失,纹状体内 DA 含量明显降低是 PD 的主要病理特征。生理情况下,DA 是在 DA 能神经元胞质内由酪氨酸经 TH 和

芳香族 L-氨基酸脱羧酶(AADC)作用异构脱羧而成,以囊泡形式经轴突末端释放到突触间隙,与突触后受体结合传递信号^[15];突触间隙内游离 DA 被轴突末梢上转运蛋白摄取后,经线粒体单胺氧化酶(MAO)代谢成具有内源性神经毒素的 3,4-二羟基苯乙醛(DOPAL),再经乙醛脱氢酶(ALDH)转化为低反应活性的 DOPAC,进一步代谢为 HVA,维持着 DA 动态平衡^[16]。本实验中,与模型组相比,温肾养肝汤高剂量能显著提高中脑黑质中 TH 抗体阳性细胞数($P < 0.01$),且可明显观察到阳性细胞突起,提示温肾养肝汤能保护 PD 小鼠的 DA 能神经元;同时对纹状体中 DA 及其代谢物进行分析,发现高剂量温肾养肝汤能明显提高 PD 小鼠脑内 DA ($P < 0.01$)、HVA 含量($P < 0.05$),降低 DOPAC/DA ($P < 0.01$)、HVA/DA ($P < 0.05$),改善 DA 周转代谢率,进一步证实温肾养肝汤能对抗 MPTP 诱导的 DA 能神经元丢失。

线粒体分裂融合的动态性失调与神经元细胞存活以及 PD 等神经退行性疾病发生密切相关^[17]。正常情况下,DA 能神经元细胞内线粒体分裂与融合过程的平衡保持着线粒体形态、数量和功能的正常,而在 PD 疾病状态下,Complex I 被抑制,使线粒体功能缺陷,ROS 大量聚集,诱发 DA 能神经元丢失。

失,同时介导受损线粒体降解的线粒体自噬也被抑制,造成受损细胞器聚集,进一步加剧 DA 能神经元丢失^[18]。PINK1 是线粒体质量控制主要调节因子,可被线粒体损伤因素激活,磷酸化 Parkin,泛素化线粒体底物,通过 VDAC1 通道将接头蛋白 P62 募集到线粒体上,被自噬受体识别后,在连接蛋白 LC3 II/I 作用下,被自噬泡招募,启动线粒体自噬,以清除损伤或病变的线粒体;在清除线粒体的过程中,与底物结合的 P62 也会被蛋白酶水解^[18-20]。本实验结果证实,温肾养肝汤能明显提高 PD 小鼠黑质中 Complex I 和 ATPase 活性,提示温肾养肝汤能改善线粒体功能;同时还能上调黑质线粒体中 PINK1、Parkin、VDAC1 和 LC3 II/I 蛋白的表达,下调 P62 蛋白表达,提示温肾养肝汤能恢复 PD 小鼠黑质线粒体自噬,及时清除受损的线粒体。

综上所述,温肾养肝汤能保护 PD 小鼠的 DA 能神经元,提高脑内 DA 含量,改善小鼠行为学特征,延缓疾病进程,可能与改善线粒体功能,激活 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬相关。

参考文献:

[1] OBESO JA, STAMELOU M, GOETZ CG, et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy[J]. *Mov Disord*, 2017, 32(9): 1264-1310.

[2] DORSEY ER, SHERER T, OKUN MS, et al. The emerging evidence of the parkinson pandemic[J]. *J Parkinsons Dis*, 2018, 8(S1): S3-S8.

[3] LI G, MA JF, CUI SS, et al. Parkinson's disease in China: A forty-year growing track of bedside work[J]. *Transl Neurodegener*, 2019, 8: 22.

[4] MENZIES FM, FLEMING A, RUBINSZTEIN DC. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2015, 16(6): 345-357.

[5] BOSE A, BEAL MF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease[J]. *J Neurochem*, 2016, 139(14): 216-231.

[6] 甘雪, 刘书一, 王正波. 线粒体自噬及功能障碍与帕金森病[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(10): 121-127.

GAN X, LIU SY, WANG ZB. Mitochondrial autophagy and dysfunction in Parkinson's disease[J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(10): 121-127.

[7] 王苏雷, 杨卉, 陆艳, 等. 赵杨教授治疗帕金森病失眠经验及验案举隅[J]. *四川中医*, 2018, 36(7): 17-19.

WANG SL, YANG H, LU Y, et al. Professor Zhao Yang's experience in treating insomnia of Parkinson's disease[J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*, 2018, 36(7): 17-19.

[8] 陆艳, 张亚杰, 阮杰, 等. 肉苁蓉颗粒剂对帕金森病大鼠模型黑质纹状体多巴胺能神经元的保护作用研究[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(12): 2927-2931.

LU Y, ZHANG YJ, RUAN J, et al. Nigrostriatal dopaminergic protection of Cistanche granule on rat model of Parkinson's disease[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2016, 34(12): 2927-2931.

[9] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. *畜牧兽医学报*, 2010(5): 52-53.

ZHAO W, SUN GZ. Conversion of drug dosage between different experimental animals[J]. *Chin J Animal Husb Vet Med*, 2010(5): 52-53.

[10] HU M, LI FM, WANG WD. Vitexin protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease through PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 565-573.

[11] HASEGAWA K, YASUDA T, SHIRAIISHI C, et al. Promotion of mitochondrial biogenesis by necdin protects neurons against mitochondrial insults[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10943.

[12] GENG XC, TIAN XF, TU PF, et al. Neuroprotective effects of echinacoside in the mouse MPTP model of Parkinson's disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 564(1/2/3): 66-74.

[13] 马浩浩. 基于 PINK1 基因探讨大补阴丸合牵正散对帕金森细胞模型线粒体的保护机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.

MA HJ. The protective mechanism investigation of Dabuyin Pill combined with Qianzheng San on mitochondria in Parkinson's disease model cells based on PINK1 gene[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2018.

[14] 蒙健林, 梁健芬, 张兴博, 等. 帕金森病实验动物模型的研究进展及评价[J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(3): 399-404.

MENG JL, LIANG JF, ZHANG XB, et al. Research progress and evaluation on animal models of Parkinson's disease[J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2021, 29(3): 399-404.

[15] CARTIER EA, PARRA LA, BAUST TB, et al. A biochemical and functional protein complex involving dopamine synthesis and transport into synaptic vesicles[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(3): 1957-1966.

[16] 李义. 帕金森氏病发病过程中多巴胺反应性氧化产物的蛋白修饰作用研究[D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020.

LI Y. The protein modification by reactive oxidation product of dopamine in the pathogenesis of Parkinson's disease[D]. Zunyi: Zunyi Medical College, 2020.

[17] YOULE RJ, VAN DER BLIEK AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress[J]. *Science*, 2012, 337(6098): 1062-1065.

[18] MALPARTIDA AB, WILLIAMSON M, NARENDRA DP, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's disease: From mechanism to therapy[J]. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46(4): 329-343.

[19] GEISLER S, HOLMSTRÖM KM, SKUJAT D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(2): 119-131.

[20] MA SF, ATTARWALA IY, XIE XQ. SQSTM1/p62: A potential target for neurodegenerative disease[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(5): 2094-2114.

(编辑:杨巍敏)