

· 基础研究 ·

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

栾振先 湛盈帆 秦 丽 李绍旦 杨明会

摘要 目的 探讨补肾活血方抑制 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 诱导的帕金森病 (PD) 模型小鼠脑黑质内 α -突触核蛋白 (α -syn) 集聚的作用机制。方法 将 36 只雄性 C57/BL 小鼠随机分为空白组、模型组及中药组, 每组 12 只。采取腹腔注射 MPTP 法制备亚急性 PD 小鼠模型。中药组在造模成功后予补肾活血方连续灌胃 14 天, 空白组和模型组每天仅灌胃等量的生理盐水。免疫组化法检测各组小鼠脑黑质内酪氨酸羟化酶 (TH)、 α -syn 阳性表达, 并用 Western Blot 法检测各组小鼠脑黑质内 Lamp2a、Hsc70、 α -syn 表达。结果 与空白组比较, 模型组小鼠表现出明显的 PD 症候群特征, 且行为学评分明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组小鼠 PD 症状减轻, 行为学评分明显降低 ($P < 0.01$)。模型组 TH 和 α -syn 阳性表达明显低于空白组 ($P < 0.01$); 中药组 TH 和 α -syn 阳性表达明显高于模型组 ($P < 0.01$)。与空白组比较, 模型组 Lamp2a、Hsc70、 α -syn 表达水平明显升高 ($P < 0.01$), TH 表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 中药组 Lamp2a、Hsc70、TH 表达水平明显升高 ($P < 0.01$), α -syn 表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。结论 补肾活血方可能通过上调 Lamp2a、Hsc70 水平, 进而增强分子伴侣介导的自噬来抑制 PD 小鼠脑黑质内 α -syn 的集聚, 从而抑制多巴胺能神经元的凋亡。

关键词 补肾活血方; 帕金森病; 自噬; 分子伴侣介导的自噬

Effect of Bushen Huoxue Recipe on Inhibiting α -synuclein Aggregation in Parkinson's Disease Model Mice Based on Autophagy LUAN Zhen-xian, CHEN Ying-fan, QIN Li, LI Shao-dan, and YANG Ming-hui *Chinese Medicine Hospital, First Medical Center, General Hospital of the PLA, Beijing (100089)*

ABSTRACT Objective To observe the effect of Bushen Huoxue Recipe (BSHXR) on inhibiting 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced α -synuclein (α -syn) aggregation in Parkinson's disease (PD) model mice. **Methods** Totally 36 male C57/BL mice were randomly divided into a blank group, a model group, and a traditional Chinese medicine (TCM) group, 12 in each group. A mouse model of subacute PD was prepared by intraperitoneal injection of MPTP. After successful modeling, mice in the TCM group were administered with BSHXR by gastrogavage for 14 consecutive days. Equal volume of normal saline (NS) was administered to mice in the blank group and the model group by gastrogavage for 14 consecutive days. The immunohistochemical method was used to detect the positive expression of tyrosine hydroxylase (TH) and α -syn in the brain substantia of each group of mice, and the expressions of Lamp2a, Hsc70, and α -syn in the brain substantia were detected by Western Blot. **Results** Compared with the blank group, obvious PD syndrome characteristics occurred in mice of the model group, and their behavioral scores significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the PD symptoms of the mice in the TCM group were attenuated, and their behavioral scores significantly decreased ($P < 0.01$). The positive expressions of TH and α -syn in the model group were significantly lower than those

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81273969); 中组部“万人计划”科技创新领军人才基金

作者单位: 解放军总医院第一医学中心中医院 (北京 100089)

通讯作者: 杨明会, Tel: 010-66939651, E-mail: ymh9651@sina.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20200211.305

in the blank group ($P < 0.01$). The positive expressions of TH and α -syn in the TCM group were significantly higher than those in the model group ($P < 0.01$). Compared with the blank group, the expression levels of Lamp2a, Hsc70, and α -syn in the model group significantly increased ($P < 0.01$), and the expression levels of TH in the model group significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression levels of Lamp2a, Hsc70, and TH significantly increased ($P < 0.01$), and the expression level of α -syn significantly decreased ($P < 0.01$) in the TCM group. **Conclusion** BSHXR inhibited the aggregation of α -syn in the substantia nigra of PD mice by up-regulating the levels of Lamp2a and Hsc70, and further enhancing molecular chaperone-mediated autophagy, thereby inhibiting the apoptosis of dopaminergic neurons.

KEYWORDS Bushen Huoxue Recipe; Parkinson's disease; autophagy; molecular chaperone-mediated autophagy

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种以静止性震颤、肌张力增高、动作迟缓和姿势步态异常为主要临床表现的慢性、进行性神经退行性疾病。PD 的典型病理特征是黑质多巴胺 (dopamine, DA) 能神经元变性缺失和神经元包浆内嗜酸性包涵体路易小体 (Lewy body, LB) 的形成^[1]。

α -突触核蛋白 (α -synuclein, α -syn) 是 LB 的主要成分,是 PD 病变过程中的重要病理产物。研究证明, α -syn 的异常折叠和降解障碍是损伤 DA 能神经元的主要机制之一,抑制异常聚集蛋白质 α -syn 的集聚可能是防治 PD 的一个突破口^[2,3]。分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA) 在真核细胞中参与 α -syn 的降解,与 PD 发病有密切关系。抑制自噬能够加剧各型 α -syn 积聚而致使细胞死亡,而上调自噬,可以促进 α -syn 的降解以及细胞生长^[4]。热休克同源蛋白 70 (heat shock cognate 70, Hsc70) 及溶酶体相关膜蛋白 2A (lysosome-associated membrane protein type-2a, Lamp2a) 是 CMA 的关键分子^[5]。

补肾活血方是解放军总医院杨明会教授根据多年临床经验和临床实践总结的治疗帕金森病的验方^[6],本研究观察补肾活血方对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 诱导的 PD 模型小鼠黑质内 Lamp2a、Hsc70、 α -syn 表达的影响,探讨补肾活血方防治 PD 的作用机制,为临床运用补肾活血方治疗 PD 提供客观依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级健康雄性 C57/BL 小鼠 36 只,体重 18~20 g。购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心 [许可证号: SCXK (京) 2014-0004]。将 36 只小鼠适应性喂养 1 周,动物房室温 (22 ± 1) °C,相对湿度 30%~60%,SPF 级,昼夜循环

12 h,小鼠可自由进食进水。实验中对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

2 主要试剂及仪器 MPTP (MCE 公司,批号: HY-15608),兔抗 TH (批号: 25859-1-AP),兔抗 α -syn (批号: 10842-1-AP),Lamp2a 抗体 (批号: bs-2379R)、Hsc70 抗体 (批号: 10654-1-AP)、 β -actin 抗体 (批号: GB11001) (武汉赛维尔生物科技有限公司)。微量移液器 (北京大龙公司,型号: 711111080000),Trizol (Invitrogen,批号: 15596-018),显影定影试剂盒 (武汉谷歌生物,货号: G2019),电子天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司,型号: MS1003TS/02),垂直电泳槽 (北京六一仪器厂,型号: DYCZ-24EN),电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司,型号: DHG-9148A)。

3 中药制备 补肾活血方由肉苁蓉 15 g 山茱萸 10 g 石菖蒲 15 g 当归 10 g 赤芍 20 g 丹参 15 g 蜈蚣 2 g 川芎 10 g 等组成。中药材由解放军总医院中药房鉴定并提供。按传统煎药法获取汤剂,以恒温水浴锅浓缩成含生药 1 g/mL 药液,消毒后玻璃瓶密闭盛装,冰箱 4 °C 保存备用。

4 动物分组及模型制备 采用数字表法随机分为空白组、模型组、中药组,每组 12 只。造模方法:采用腹腔注射 MPTP 法制备亚急性 PD 小鼠模型^[6],模型组和中药组每天给予腹腔注射 MPTP (30 mg/kg),1 次/天,空白组注射等量生理盐水,连续 7 天。每次注射 MPTP 之后观察小鼠活动情况有无异常;注射药物 3 min 内小鼠即可出现步态蹒跚、易激惹、毛发及鼠尾竖起、抓鼻、全身抽搐等反应。造模完成后观察小鼠行为变化,以小鼠出现肢体震颤、步态不协调、运动迟缓、尾僵直等症状作为衡量造模成功的标准。

5 给药方法 根据人与小鼠药量换算公式^[7]得出灌胃药量,造模后中药组小鼠每天予补肾活血方药

液灌胃治疗,每只小鼠每次灌胃 0.3 mL,1 次/天,连续 14 天。空白组与模型组予等量生理盐水灌胃,1 次/天,连续 14 天。

6 行为学评价 灌胃给药结束后,对小鼠进行爬杆实验。将小鼠头向上放于自制爬杆顶端,记录时间:小鼠从开始运动到完全转为头向下的时间和下到杆底的时间之和。测定小鼠爬杆时间前先进行爬杆训练。然后再进行正式检测,共检测 5 次,每次检测间隔 1 min,取平均值。

7 组织处理与取材取材方法 对所有小鼠进行称重,再以水合氯醛(0.01 mL/g)麻醉小鼠。麻醉后将小鼠开胸,剪开右心耳,用生理盐水灌注左心室,再迅速在冰面上分离得到脑黑质。将每只小鼠的脑黑质组织的 1/2 用 4% 多聚甲醛固定 10 h 后,作石蜡包埋切片,切片厚度 5~6 μm ,用于形态学观察;另一半用锡纸包裹放入液氮中速冻,然后取出标本放置在冻存管中于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存以备检测。

8 免疫组化法检测黑质酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)、 $\alpha\text{-syn}$ 阳性表达 将上述切片进行常规脱蜡处理,切片依次放入二甲苯 I-二甲苯 II-无水乙醇 I-无水乙醇 II-95%酒精-90%酒精-80%酒精-70%酒精,然后入蒸馏水浸泡 2 min。采用微波进行抗原修复;用蒸馏水新鲜配置的 3% H_2O_2 滴加于切片组织上以阻断内源性过氧化物酶,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;加一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育 10 h;加二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,PBS 冲洗切片 3 次,每次 3 min;加 DAB 显色液,Harris 苏木素复染,然后脱水封片,在显微镜下观察,采集图像。

采用免疫组化光面密度(areal density)分析方法对免疫组化结果进行分析。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件选取相同的棕黄色作为判断所有照片阳性的统一标准,对每张照片进行分析得出每张照片阳性的累积光密度值(OD)以及组织的像素面积(pixel area)。并求出面密度(areal density),areal density = OD/pixel area,areal density 值越大表明阳性表达水平越高。每组内每张切片随机选取至少 3 个 200 倍视野进行拍照。拍照时让组织充满整个视野,保证每张照片的背景光一致。更换样品时,除了调整焦距和视野外,不调整显微镜的其他部件,保证前后拍摄条件一致。

9 Western Blot 检测 Lamp2a、Hsc70、 $\alpha\text{-syn}$ 的表达 取上述保存的冷冻黑质,(1)电泳:取适量 RIPA(radio immunoprecipitation assay)裂解液匀浆组织,测蛋白浓度后,各样品取 50 μg 总蛋白上样电泳,根据蛋白分子量配制聚丙烯酰胺凝胶电泳(poly-

acrylamide gel electrophoresis, PAGE)胶电泳。根据预染 marker 显示,判断目的蛋白得到充分分离后,停止电泳。(2)转膜(湿转法):取出凝胶根据 Marker 切下目的条带,用蒸馏水冲洗,剪与 PAGE 凝胶相同大小的聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜和滤纸,PVDF 膜用甲醇浸泡数秒后和滤纸一同浸泡于电转缓冲液中。按照黑色板-纤维垫-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-纤维垫-白色板依次放好,夹紧板后放入转膜仪内,黑色板的一面对照黑色负极。(3)一抗:用封闭液稀释相应的一抗,使 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 h。(4)二抗:TBST(tris buffered saline tween)缓冲液充分洗涤 PVDF 膜 5~6 次,5 min/次。用封闭液稀释相应的辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记二抗—1:50 000 稀释,使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中,室温摇床孵育 2 h。(5)显色曝光:TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5~6 次,5 min/次。每张膜滴加适量的化学发光底物试剂盒(Electro-Chemi-Luminescence, ECL)底物液,孵育数分钟。待荧光带明显后,用滤纸吸去多余的底物液,覆上保鲜膜,X 光胶片压片后依次放入显影液显影、定影液定影。采用 Alpha Innotech 灰度分析软件分析胶片灰度值得出 Lamp2a、Hsc70、 $\alpha\text{-syn}$ 与 $\beta\text{-actin}$ 的相对吸光度值。

10 统计学方法 采用 SPSS 17.0 版统计学软件包进行数据处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-Way ANOVA 分析,继用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠行为学评价比较(表 1) 模型组爬杆时间较空白组明显延长($P < 0.01$);中药组爬杆时间较模型组显著缩短($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠行为学评价比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	爬杆时间(s)
空白	12	6.33 $\pm$ 0.61
模型	12	20.82 $\pm$ 1.05*
中药	12	12.07 $\pm$ 1.24* $^{\Delta}$

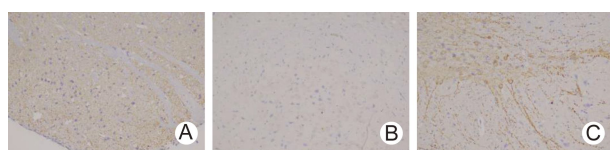
注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta}$ $P < 0.01$

2 各组小鼠黑质 TH 阳性表达比较(图 1,表 2) 空白组黑质部 TH 阳性神经元数目较多,形态轮廓正常;模型组小鼠黑质部 TH 阳性神经元数目较少,且细胞染色较淡,轮廓形态不清晰;中药组小鼠黑质部 TH 阳性神经元数目明显较模型组增多。与空白组比

较,模型组黑质部 TH 阳性神经元数目明显减少 ($P<0.01$);中药组黑质部 TH 阳性神经元数目明显高于模型组 ($P<0.01$)。

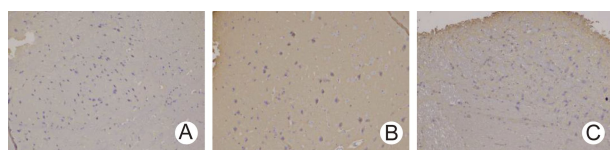
3 各组小鼠黑质 α -syn 阳性表达比较(图 2,表 2) 免疫组化染色中 α -syn 阳性着色为棕黄色核团。空白组小鼠黑质部无明显 α -syn 聚集;而模型组小鼠黑质内可见较多 α -syn 阳性聚集;中药组小鼠黑质部 α -syn 阳性聚集较少。

与空白组比较,模型组黑质部 α -syn 蛋白表达明显降低 ($P<0.01$);中药组黑质部 α -syn 蛋白表达明显高于模型组 ($P<0.01$)。



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为中药组;图 2 同;图中棕褐色为 TH 阳性表示

图 1 各组小鼠黑质 TH 表达比较 (免疫组化染色, $\times 200$)



注:图中棕黄色核团为 α -syn 阳性表示

图 2 各组小鼠黑质内 α -syn 表达比较 (免疫组化染色, $\times 200$)

表 2 各组小鼠黑质内 TH、 α -syn 面密度比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TH	α -Syn
空白	12	0.011 1 $\pm$ 0.001 9	0.005 4 $\pm$ 0.001 2
模型	12	0.002 9 $\pm$ 0.001 9*	0.010 5 $\pm$ 0.001 1*
中药	12	0.008 8 $\pm$ 0.001 2* Δ	0.007 8 $\pm$ 0.001 5* Δ

注:与空白组比较, * $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.01$

4 各组小鼠黑质内 Lamp2a、Hsc70、 α -syn 蛋白表达比较(表 3,图 3) 与空白组比较,模型组小鼠黑质内 Lamp2a、Hsc70 表达显著升高 ($P<0.01$), α -syn 表达增加 ($P<0.01$);与模型组比较,中药组 Lamp2a、

表 3 各组小鼠黑质 Lamp2a、Hsc70、 α -Syn、TH 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Lamp2a	HSC70	α -Syn	TH
空白	12	0.03 $\pm$ 0.02	0.65 $\pm$ 0.05	0.43 $\pm$ 0.10	0.79 $\pm$ 0.12
模型	12	0.27 $\pm$ 0.01*	0.96 $\pm$ 0.01*	0.88 $\pm$ 0.19*	0.42 $\pm$ 0.03*
中药	12	0.87 $\pm$ 0.10* Δ	1.09 $\pm$ 0.01* Δ	0.46 $\pm$ 0.06* Δ	0.73 $\pm$ 0.08* Δ

注:与空白组比较, * $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.01$

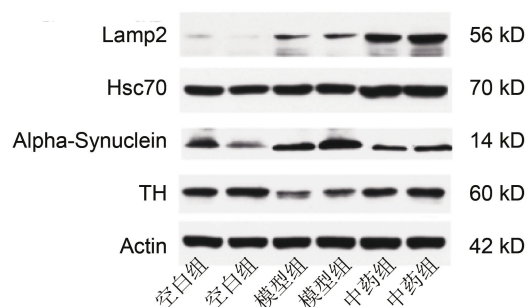


图 3 各组小鼠黑质内 Lamp2a、Hsc70、 α -syn 蛋白表达电泳图

Hsc70 表达显著升高 ($P<0.01$),且 α -syn 表达显著降低 ($P<0.01$)。

讨 论

PD 属于中医学“颤证”“颤震”的范畴,早在《内经》即有相关论述。如《素问·至真要大论》曰:“诸风掉眩,皆属于肝”。明代孙一奎《赤水玄珠》首次把此病命名为“颤振症”,曰:“颤振者,病人手足摇动如抖擻之状,筋脉约束不住,而莫能任持,风之象也”^[8]。王肯堂《证治准绳》中提出以定振丸治疗老年“虚颤”^[9]。随着现代医学对 PD 研究的日益深入,当代中医对本病的病因病机、治疗用药进行了大量的研究,取得了一定的成就,对此病的理解也愈发深刻^[10,11]。目前,中医已逐渐跳出通过“滋阴熄风”治疗 PD 的思维定式,认识到 PD 病位在脑,PD 患者黑质部 DA 能神经元缺失是导致其震颤的根本原因^[12],中医中药治疗应当力求保护 PD 患者的 DA 能神经元,促进 DA 的分泌,而不应单纯缓解其震颤症状^[13]。

在以往临床与基础研究中,本课题组根据中医学肾脑相关的理论认为 PD 虽然病位在脑,其中医病机当以肾虚为本,瘀血阻滞脑络为标,“肾虚血瘀”是其基本病机^[14,15]。肾精亏虚则不能滋养肝木,水不涵木则致肝阴血亏虚,筋脉失养;肾精亏损,阴虚津枯,血脉滞涩,瘀血内停,则精血难以充养脑髓,故治疗当以补肾活血为主。

根据 PD 肾虚血瘀的基本病机,杨明会教授创制了治疗 PD 的专方补肾活血方,并经多年临床实践形成了基本固定的配伍比例和剂量。本方由肉苁蓉、山茱萸、当归、川芎、赤芍、石菖蒲、蜈蚣等组成。该方以肉苁蓉和山茱萸为君,补肾填精,温肾壮阳,切中帕金森病肾虚的基本病机;又以当归、川芎、赤芍为臣,活血祛瘀。以石菖蒲为佐,豁痰开窍,配伍方中活血药起到痰瘀并除的作用。张锡纯在《医学衷中参西录》中指

出,“蜈蚣之为物,节节有脑,乃物类之至异者,是以性能入脑,善理脑髓神经,使不失其司,而痼疾之病自愈。”^[16]补肾活血方以虫类药蜈蚣为使,取其搜剔络效,治疗帕金森病久病瘀血入络。

补肾活血方配伍严谨,选药精当,方中中药或其有效成分多已有现代研究证实对 PD 具有治疗作用。比如已有研究表明肉苁蓉及其有效成分对 DA 能神经元具有保护作用^[17],且对 PD 患者的长期便秘有治疗作用^[18]。芍药甘草汤加减可能通过抑制氧化损伤和细胞凋亡对 MPTP 诱导的 PD 小鼠发挥神经保护作用^[19]。高浓度当归注射液对 6-OHDA 诱导 PC12 细胞 PD 体外模型具有保护作用^[20]。丹参的有效成分丹参酮 II A 可能通过减弱内质网应激反应来减轻 PD 模型大鼠 DA 能神经元的损伤^[21]。以川芎为君药的川芎茶调散可明显改善 MPTP 所致的小鼠 PD 模型的运动障碍,同时能对 MPTP 引起的 DA 神经元损伤起到保护作用^[22]。石菖蒲的有效成分 β -细辛醚能降低 PD 大鼠脑内自噬的水平^[23]。

本课题组既往研究表明,临床运用补肾活血方治疗 PD 能有效增强 PD 患者肌力,改善其运动功能,缓解其临床症状,提高生活质量^[24]。既往动物实验表明,补肾活血方治疗可以使中脑黑质 TH 活性增强,黑质区炎性细胞因子的表达下降,黑质凋亡细胞减少,氧化应激反应减弱,神经营养因子增加^[25]。本研究选用腹腔注射 MPTP 的方法制作亚急性 PD 小鼠模型^[26]。根据课题组临床观察,成年 PD 患者服用补肾活血方治疗,1 剂/天,连续服用 14 天为 1 个疗程,大多可见运动症状和消化道症状有一定改善。因此在造模成功后,中药组小鼠予补肾活血方治疗,其剂量按“人与小鼠剂量换算公式”求得,相当于成年 PD 患者每日服用补肾活血方的剂量。连续灌胃 14 天,也于 PD 患者临床连续服药 14 天为 1 个疗程所契合,符合临床实际。模型组和中药组小鼠在造模成功后出现步态蹒跚、抽搐等典型的 PD 症候群,爬杆实验所用时间较空白组小鼠显著增加,表现出行动迟缓,与 PD 的临床特征一致。经免疫组化检测发现,模型组和中药组小鼠脑黑质内 TH 阳性细胞数较空白组小鼠显著减少($P<0.01$),表明该模型能较好地模拟 PD 的行为和病理特征。

α -syn 的集聚是 PD 病理过程中的重要一环。已有文献研究表明,生理情况下 α -syn 在参与 DA 的生物合成、保护细胞方面具有重要作用。在细胞损伤的情况下, α -syn 能聚集起来抵抗损伤。但随着蛋白质的异常聚集、沉积,线粒体遭到损伤,超越了细胞所能承受的范围,特别是异常蛋白不能被及时清除,反而出

现促进细胞死亡的作用。随着蛋白质的异常集聚和沉积,线粒体遭到损伤,逐渐超越细胞能承受的范围,导致异常沉积的蛋白不能被及时的清除,进而出现促进细胞变性坏死的作用,这被认为是 PD 的关键致病因素之一^[27]。

在 PD 的发病进程中,随着 LB 的主要成分 α -syn 的异常聚集,产生具有神经毒性的寡聚体, α -syn 的寡聚体能增加细胞的通透性,促进细胞内钙离子的浓度上升,从而扰乱细胞内的离子平衡状态,并激活 Caspase 系统,最终导致 DA 能神经元的变性坏死^[28-30]。本实验结果显示:经 MPTP 造模成功后,小鼠脑黑质内 α -syn 阳性神经元数量与 α -syn 蛋白表达较空白组显著增高($P<0.01$)。经补肾活血方灌胃治疗后,中药组小鼠脑黑质内 α -syn 阳性神经元数量与 α -syn 蛋白表达较模型组显著降低($P<0.01$)。提示补肾活血方能通过抑制 α -syn 集聚来对 PD 发挥治疗作用。

CMA 在真核细胞中参与 α -syn 的降解^[4],Hsc70 及 Lamp2a 是其的关键分子^[5]。本研究中小鼠经 MPTP 造模后,其脑黑质内 α -syn 阳性神经元数量与 Lamp2a、Hsc70、 α -syn 蛋白表达较空白组显著增高($P<0.01$),TH 阳性神经元数量显著降低。这表明由于 MPTP 损伤而导致模型组小鼠黑质出现 α -syn 异常集聚,其自噬功能也因此被激活。而中药组小鼠黑质内 TH 阳性神经元数量与 Lamp2a、Hsc70 较模型组显著增高, α -syn 阳性神经元数量和 α -syn 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。这表明补肾活血方能增强通过增强细胞自噬而抑制 α -syn 的异常集聚,保护 DA 能神经元。综上所述,本实验结果表明补肾活血方治疗能增强 CMA,可通过促进 Hsc70 及 Lamp2a 的表达来抑制 α -syn 集聚,从而保护多巴胺能神经元,发挥对 PD 的治疗作用。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组. 中国帕金森病治疗指南(第三版)[J]. 中华神经科杂志, 2014, 47(6): 428-432.
- [2] 吴东金, 莫文斌. 自噬与神经退行性病变的研究进展[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(6): 174-175.
- [3] 胡晓梅, 郭斌, 马莎, 等. 自噬在帕金森病发生发展中的作用[J]. 生命科学, 2015, 25(1): 73-77.
- [4] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword[J]. Science,

- 2004, 306 (5698): 990-995.
- [5] Morsell E, Marino G, Bennetzen MV, et al. Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome[J]. J Cell Biol, 2011, 192(4): 615-629.
- [6] 樊开阳, 朱丽娜, 张文利, 等. MPTP 诱导小鼠帕金森病亚急性模型和慢性模型的比较[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(1): 4-6.
- [7] 施新猷主编. 医学动物实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 11.
- [8] 明·孙一奎. 赤水玄珠[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 1125.
- [9] 明·王肯堂. 证治准绳[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 435-437, 578-580.
- [10] 李军艳, 杨明会, 窦永起, 等. 帕金森病的中医药治疗[J]. 北京中医药, 2008, 27(4): 300-302.
- [11] 蔡定芳. 中西医结合治疗帕金森病研究思考[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(9): 775-776.
- [12] 彭根兴, 李绍敏. 帕金森病中医辨证诊治探讨[J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(2): 378-381.
- [13] 杨媛, 苗素华, 周荣淞, 等. 帕金森病中医治疗现状分析及政策建议[J]. 中国医药导报, 2019, 16(35): 44-47.
- [14] 杨明会, 李敏, 窦永起, 等. 补肾活血法治疗帕金森病的理论探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(11): 812-814.
- [15] 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, 27(9): 768-771.
- [16] 清·张锡纯. 医学衷中参西录·中册[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1990: 135-137.
- [17] 林瑶, 杨莎莎, 刘婷, 等. 肉苁蓉对帕金森病模型大鼠 PI3K、Akt、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. 江西中医药大学学报, 2019, 31(1): 83-86.
- [18] 田盼盼. 肉苁蓉颗粒剂治疗帕金森病便秘的临床研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [19] 秦劭晨, 王爱梅, 李若瑜. 芍药甘草汤加减对 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 15-21.
- [20] 盛阳, 张捷, 熊玉波, 等. 当归注射液对 6-羟基多巴胺诱导 PC12 细胞帕金森病模型 SIRT1 表达及细胞凋亡的影响[J]. 武汉大学学报(医学版), 2011, 32(4): 436-439.
- [21] 田新红, 徐玉英, 郝莉. 丹参酮 IIA 对帕金森病大鼠多巴胺能神经元的作用[J]. 解剖学杂志, 2018, 41(3): 303-306.
- [22] 舒丹, 何金彩, 陈江帆. 川芎茶调散对帕金森病小鼠多巴胺神经元损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(19): 2494-2497.
- [23] 张升. 石菖蒲成分 β -细辛醚对帕金森病模型大鼠作用的自噬机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [24] 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.
- [25] 徐睿鑫, 李绍旦, 刘毅, 等. 补肾活血颗粒对帕金森病模型大鼠黑质和纹状体中 Fas、FADD 表达的影响[J]. 北京中医药, 2015, 34(5): 405-408+425.
- [26] 王蔚, 李春燕, 丁婷, 等. 帕金森病实验动物造模方法研究进展[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(18): 2849-2852.
- [27] 何一昕, 王雪晶, 丁雪冰, 等. 突触核蛋白病中 α -syn 聚集及播散的机制研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2016, 19(4): 77-79.
- [28] 卢芳, 周世慧, 董杨, 等. α -突触核蛋白与帕金森病[J]. 哈尔滨医药, 2011, 31(4): 293-295.
- [29] Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases[J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(7): 492-501.
- [30] 刘康永, 石际俊, 倪夏裙, 等. α -核突触蛋白和自噬在帕金森病中的作用[J]. 中国临床神经科学, 2010, 18(1): 103-106.

(收稿: 2019-12-11 在线: 2020-03-20)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶