

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.14.007
文章编号: 1005-8982 (2022) 14-0035-07

实验研究·论著

乌参醒脑汤对帕金森病大鼠行为学及内质网应激PERK/ATF4通路的影响*

于楠楠¹, 毕海洋¹, 匡禹霏¹, 孙殿甲²

(1. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150040;
2. 黑龙江省老年病医院, 黑龙江 哈尔滨 150016)

摘要: **目的** 探究乌参醒脑汤对帕金森病大鼠行为学及内质网应激PERK/ATF4通路的影响。**方法** 将48只大鼠随机分为对照组、模型组、低剂量组、高剂量组, 每组12只。除对照组外, 另3组在大脑纹状体内注射0.2% 6-羟基多巴胺(6-OHDA)复制帕金森病模型。模型复制成功后, 低剂量组和高剂量组(5.4 g/kg和10.8 g/kg)乌参醒脑汤连续灌胃给药21 d, 给药结束后, 通过旋转实验和旷场实验观察各组大鼠行为学表现; 取大鼠纹状体, 通过苏木精-伊红(HE)染色, 观察其组织病理变化; 采用实时荧光定量聚合酶链反应和Western blotting检测大鼠纹状体蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)、转录活化因子4(ATF4)、C/EBP同源蛋白(CHOP)和B淋巴细胞瘤-2基因(Bax) mRNA和蛋白的表达。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠旋转频率、水平运动频率降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 低剂量组和高剂量组大鼠旋转频率降低($P < 0.05$), 水平运动频率升高($P < 0.05$); 与低剂量组比较, 高剂量组大鼠旋转频率降低($P < 0.05$), 水平运动频率升高($P < 0.05$)。HE染色结果显示, 对照组大鼠纹状体多巴胺能神经细胞元形态正常, 结构和轮廓清晰, 且数量多。模型组大鼠纹状体多巴胺能神经细胞数量很少, 形态破损严重, 多成角状。低剂量组和高剂量组大鼠纹状体多巴胺能神经细胞数量较多, 结构比较完整, 轮廓清晰。与对照组比较, 模型组PERK、ATF4、CHOP、Bax mRNA和蛋白相对表达量升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 低剂量组和高剂量组PERK、ATF4、CHOP、Bax mRNA和蛋白相对表达量降低($P < 0.05$); 与低剂量组比较, 高剂量组PERK、ATF4、CHOP、Bax mRNA和蛋白相对表达量降低($P < 0.05$)。**结论** 乌参醒脑汤可以改善帕金森病大鼠的运动失调, 修复损伤的多巴胺能神经元, 其作用机制可能与抑制内质网应激PERK/ATF4通路有关。

关键词: 帕金森病; 乌参醒脑汤; 行为学; 蛋白激酶R样内质网激酶; 转录活化因子4; 大鼠
中图分类号: R742.5 **文献标识码:** A

Effects of Wushen Xingnao Decoction on behavior and endoplasmic reticulum stress PERK/ATF4 pathway in rat models of Parkinson's disease*

Nan-nan Yu¹, Hai-yang Bi¹, Yu-fei Kuang¹, Dian-jia Sun²

(1. The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China; 2. Heilongjiang Geriatric Hospital, Harbin, Heilongjiang 150016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Wushen Xingnao Decoction on behavior and endoplasmic reticulum stress PERK/ATF4 pathway in rat models with Parkinson's disease. **Methods** Forty-eight rats were divided into control group, model group, low-dose group and the high-dose group, with twelve rats in each group.

收稿日期: 2022-01-10

* 基金项目: 黑龙江省博士后资助基金(No.: LBH-Z18247)

[通信作者] 孙殿甲, E-mail: nannanyugood@126.com

Except for the control group, the other three groups were injected with 0.2% 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the striatum to establish the models of Parkinson's disease. Three days after the model establishment, Wushen Xingnao Decoction was continuously administered by gavage for twenty-one days in the low-dose group (5.4 g/kg) and the high-dose group (10.8 g/kg). Following the administration, the behavioral performance of rats in each group was observed via rotation test and open field test. The histopathological changes of the rat striatum were observed by H&E staining. The relative mRNA and protein expressions of PERK, ATF4, CHOP and Bax were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting, respectively. **Results** The rotational speed and horizontal movement speed of rats were lower in the model group than those in the control group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the rotational speed of rats was decreased and the horizontal movement speed was increased in low-dose group and high-dose group ($P < 0.05$). The rotational speed of rats was decreased and the horizontal movement speed was increased in the high-dose group relative to those in the low-dose group ($P < 0.05$). The morphology of striatal dopaminergic neurons was normal and the number of striatal dopaminergic neurons was high in the control group as revealed via H&E staining. In the model group, the number of dopaminergic neurons in the striatum was low, and they were severely damaged and were mostly angular in shape. In contrast, the number of dopaminergic neurons in the striatum of rats was relatively high and the neurons were well-defined in low-dose group and high-dose group. Compared with the control group, the mRNA and protein expression levels of PERK, ATF4, CHOP and Bax in the striatum of rats were higher in the model group ($P < 0.05$). The mRNA and protein expression levels of PERK, ATF4, CHOP and Bax in the striatum of rats in the low-dose group and high-dose group were lower than those in the model group ($P < 0.05$), while they were even lower in the high-dose group than those in the low-dose group ($P < 0.05$). **Conclusions** Wushen Xingnao Decoction can improve the motor function of rat models of Parkinson's disease and repair the damaged dopaminergic neurons, which may be related to the inhibition of endoplasmic reticulum stress PERK/ATF4 pathway.

Keywords: Parkinson's disease; Wushen Xingnao Decoction; behavior; PERK; ATF4; rat

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种神经系统退行性疾病,多发于老年群体,临床上表现为静止性战栗、运动减少、步态异常等,发病原因较复杂。有研究显示,年龄增长、氧化应激过度等均可引起黑质纹状体系统中多巴胺能神经元变性死亡,促进PD的发展^[1]。目前西医主要通过抗胆碱能药物、多巴胺受体激动剂等对症治疗,用药后症状明显改善,但长期使用毒副作用较大^[2]。此外手术治疗也有明显效果,但术后并发症多,且极易复发^[3]。近年来,中医治疗PD有一定成效,并且中药毒副作用低,值得临床参考^[4]。中医认为,PD的病位在脑,病机为本虚标实证,虚症以气血两虚和肝肾亏虚为主,实证在于风、淤、痰^[5]。2010版《中华人民共和国药典》^[6]收录了“人参首乌胶囊”一方,具有益气补血、补肝养肾的功效,可治疗神经衰弱、失眠健忘等症。本研究在此方基础上根据临床经验加入黄芪、当归、川芎、银杏叶、三七粉、蒲黄,在补肾养肝的基础上起到通脑络、养气血、通淤堵的作用。本研究探究配伍而成的乌参醒脑汤对帕金森病大鼠的行为学和内质网应激PERK/ATF4通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

48只雄性SD大鼠,体重(220±20)g,SPF级,购自上海昇敞生物科技有限公司。实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2021-0002;实验动物使用许可证号:SYXK(沪)2021-0009。正常饲喂、饮水,适应性饲养1周。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 乌参醒脑汤方中人参、首乌、黄芪、当归、川芎、银杏叶、三七粉和蒲黄(北京同仁堂大药房),6-羟基多巴胺(6-OHDA)(批号:636-00-0)、盐酸阿扑吗啡(批号:314-19-2)(上海源叶生物科技有限公司),Total RNA Extraction Kit(批号:R1200)、Universal RT-PCR Kit(批号:RP1100)、动物组织总蛋白提取试剂盒(柱式法)(批号:BC3790-50T)、BCA试剂盒(批号:PC0020)(北京索莱宝科技有限公司),蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)、转录活化因子4(activating transcription factor 4, ATF4)、C/EBP同源蛋白(C/EBP homology protein, CHOP)、B淋巴细胞瘤-2

基因 (BCL2-associated X, Bax)、 β -actin 兔抗大鼠一抗、HPR 标记羊抗兔 IgG 二抗 (美国 Abcam 公司)。

1.2.2 主要仪器 数显式脑立体定位仪 DB006-1、SMART 3.0 动物行为学视频分析系统 Smart 3.0 (北京智鼠多宝生物科技有限公司), 光学显微镜 Axio Lab. A1 (北京普瑞赛司仪器有限公司), Qtower96G 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪 (德国椰拿分析仪器股份公司), 全自动样品快速研磨仪-24L (上海净信实业发展有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 乌参醒脑汤的制备 称取人参 12 g、首乌 12 g、银杏叶 10 g、黄芪 8 g、当归 6 g、川芎 6 g、三七粉 3 g、蒲黄 5 g, 冷水浸泡 30 min, 取出沥干水分, 置于砂锅中, 加适量自来水头煎煮沸后 25 min 关火, 倒出汤剂, 加适量自来水再煎, 煮沸后 20 min 关火, 捞出药渣, 将头煎和二煎的汤剂混合, 浓缩至 20 mL, 生药浓度为 3.1 g/mL 的混悬液, 置于 4℃ 冷藏备用。

1.3.2 模型的复制与鉴定 参照张辉等^[7]的研究, 复制 PD 大鼠模型。模型复制前 12 h 禁食, 用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠, 将其固定在脑立体定位仪上, 剃去颅顶毛发, 沿头部中线切开头皮, 暴露颅骨。参考 PAXINOS 等^[8]的大鼠脑部立体定向图谱, 利用定位坐标法定位大鼠左侧纹状体 (striatum, CPU) 的坐标 (前囟后 1.00 mm, 中线左 3.00 mm, 硬膜下 5.00 mm), 于该点向大鼠左侧 CPU 内注射 0.2% 6-OHDA (生理盐水稀释), 留针 5 min, 缓慢退针, 缝合好伤口后表面涂抹青霉素防止感染。模型复制 3 d 后观察到大鼠步态失调, 肢体震颤, 行动迟缓, 即模型复制成功。

1.3.3 实验分组与给药 将 48 只大鼠随机分为对照组、模型组、低剂量组、高剂量组, 每组 12 只。模型复制成功后低剂量组和高剂量组分别灌胃 5.4 g/kg 和 10.8 g/kg 乌参醒脑汤 (灌胃前需摇匀并加热至 37℃, 按照人与大鼠用药剂量换算得出), 连续灌胃 21 d。对照组灌胃等体积生理盐水, 模型组按照 1.3.2 方法复制模型后灌胃生理盐水。

1.3.4 大鼠行为学观察 ①旷场实验^[9]: 最后一天给药结束后, 将大鼠依次入旷场行为箱 (160 cm × 160 cm × 50 cm 的纸箱), 箱底有 16 个大小一致的方格 (40 cm × 40 cm), 利用行为学视频分析系统记录

5 min 大鼠四肢爬过的方格数量, 即大鼠的水平运动频率。②旋转实验^[10]: 旷场实验结束后, 于各组大鼠后颈部皮下注射 0.5 mg/kg 盐酸阿扑吗啡, 注射结束后 5 min 开始计时, 记录 30 min 内大鼠的旋转圈数 (360° 为 1 圈), 即大鼠的旋转频率。

1.3.5 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色观察纹状体组织病理改变 旋转实验结束后, 待大鼠安静, 每组随机选取 4 只大鼠, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠, 迅速取下头部, 在冰上解剖分离出脑组织纹状体, 放入 10% 甲醛溶液中浸泡 1 周固定, 石蜡包埋, 切片。取石蜡切片烤干, 二甲苯脱蜡处理 (2 次, 10 min/次), 乙醇浸泡脱苯 (2 次, 5 min/次), 蒸馏水洗净乙醇, 加苏木精染色 15 min, 用 0.5% 盐酸乙醇浸泡 30 s, 再用蒸馏水冲洗干净, 加入 0.5% 伊红染色 10 min, 蒸馏水冲洗干净, 二甲苯浸泡透明处理 (2 次, 10 min/次), 中性树脂封片, 在光学显微镜下观察神经元细胞呈深蓝色。

1.3.6 qRT-PCR 检测纹状体 PERK、ATF4、CHOP、Bax mRNA 的表达 每组随机选取 4 只大鼠, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉, 迅速取下头部, 在冰上解剖分离出脑组织纹状体, 置于 2 mL 离心管, 加入 1 mL 裂解液, 放入组织匀浆机中匀浆, 匀浆后将离心管在室温放置 5 min, 使核酸蛋白复合物完全分离, 按照 Total RNA Extraction Kit 试剂盒说明书进行后续提取, 将得到的 RNA 用 Universal RT-PCR Kit 试剂盒进行逆转录, qRT-PCR 检测 mRNA 的表达, 反应条件: 95℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 30 个循环。以 β -actin 为内参, 每个样品做 3 个复孔计算 Ct 值的平均数, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量。各引物序列见表 1。

1.3.7 Western blotting 检测大鼠纹状体 PERK、ATF4、CHOP、Bax 蛋白的表达 随机选取每组 4 只大鼠, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉, 迅速取下头部, 在冰上解剖分离出脑组织中纹状体部分, 置于 2 mL 离心管中, 按照动物组织总蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白, 利用 BCA 法测定蛋白浓度。提取结束后, 利用 SDS-PAGE 系统进行电泳, β -actin 为内参, 转膜, 洗膜, 5% BSA 蛋白封闭, 一抗孵育过夜, 洗膜, 二抗孵育 1 h, 显色液显色, 曝光分析, 利用 Image J 系统计算灰度值。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.00 统计软件。计量资料

表 1 qRT-PCR引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
PERK	正向: 5'-ACCTAGGCGCTAAATGATCCG-3'	116
	反向: 5'-CCTAGTCGGTACCCTAGGCCT-3'	
ATF4	正向: 5'-CCAATGGGTAACGGTAACTG-3'	250
	反向: 5'-GGTATTCTAAACCTGGGTAC-3'	
CHOP	正向: 5'-CCGGTACATGTACAATACG-3'	22
	反向: 5'-ATTGAATGACCATGACAGA-3'	
Bax	正向: 5'-TTGATACATGACGATCAGTAG-3'	18
	反向: 5'-CCTAGCATGACCATTGACCATG-3'	
β -actin	正向: 5'-ATTCTGGTACCATGCGGTAC-3'	827
	反向: 5'-TAGTAGCCATGACATGAAC-3'	

以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠行为学实验结果比较

模型组与对照组大鼠的旋转频率比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 9.841, P = 0.000$), 模型组大鼠旋转频率较高。模型组、低剂量组、高剂量组大鼠的旋转频率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 与模型组相比, 低剂量组和高剂量组大鼠旋转频率降低 ($P < 0.05$); 与低剂量组比较, 高剂量组大鼠旋转频率降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

对照组、模型组、低剂量组、高剂量组大鼠的水平运动频率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 与对照组比较, 模型组大鼠水平运动频率降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 低剂量组和高剂量组大鼠水平运动频率升高 ($P < 0.05$); 与低剂量组比较, 高剂量组大鼠水平运动频率升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

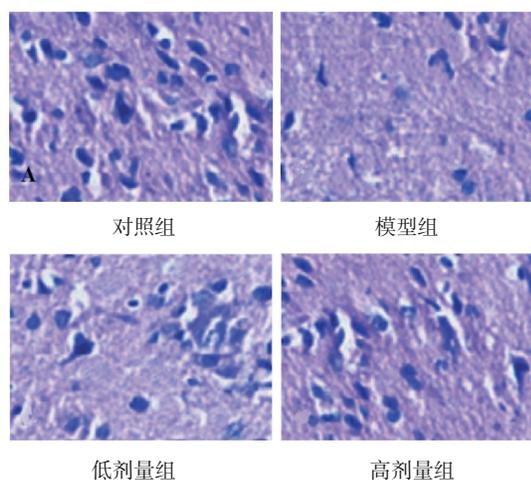
2.2 各组大鼠纹状体染色结果比较

各组大鼠纹状体病理切片见图 1。对照组大鼠纹状体多巴胺能神经细胞元形态正常, 结构和轮廓清晰, 且数量多。模型组大鼠纹状体多巴胺能神经细胞元数量很少, 形态破损严重, 多成角状。低剂量组和高剂量组大鼠纹状体多巴胺能神经细胞元数量较多, 结构比较完整, 轮廓清晰。

表 2 各组大鼠旋转频率比较 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	旋转频率/(圈/min)	水平运动频率/(格/min)
对照组	0.00 \pm 0.00	22.40 \pm 4.21
模型组	10.00 \pm 3.52 ^①	12.58 \pm 2.18 ^①
低剂量组	6.61 \pm 2.81 ^{①②}	15.38 \pm 2.71 ^{①②}
高剂量组	3.69 \pm 1.01 ^{①②③}	19.10 \pm 3.52 ^{①②③}
F 值	16.850	20.923
P 值	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$; ③与低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠纹状体病理切片 (HE \times 100)

2.3 各组大鼠纹状体 PERK、ATF4、CHOP、Bax mRNA 相对表达量比较

对照组、模型组、低剂量组和高剂量组大鼠纹状体 PERK、ATF4、CHOP、Bax mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 与对照组比较, 模型组 PERK、ATF4、CHOP、Bax mRNA 相对表达量升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 低剂量组和高剂量组 PERK、ATF4、CHOP、Bax mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$); 与低剂量组比较, 高剂量组 PERK、ATF4、CHOP、Bax mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 各组大鼠纹状体 PERK、ATF4、CHOP、Bax 蛋白相对表达量比较

对照组、模型组、低剂量组和高剂量组大鼠纹状体 PERK、ATF4、CHOP、Bax 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 与对照组比较, 模型组 PERK、ATF4、CHOP、Bax 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$); 与模型

表 3 各组大鼠纹状体 PERK、ATF4、CHOP、Bax mRNA 相对表达量比较 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	PERK mRNA	ATF4 mRNA	CHOP mRNA	Bax mRNA
对照组	0.55 ± 0.04	0.50 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.51 ± 0.05
模型组	1.07 ± 0.18 ^①	0.97 ± 0.15 ^①	1.21 ± 0.16 ^①	1.95 ± 0.28 ^①
低剂量组	0.71 ± 0.11 ^{①②}	0.87 ± 0.12 ^{①②}	0.89 ± 0.06 ^{①②}	0.95 ± 0.08 ^{①②}
高剂量组	0.65 ± 0.14 ^{①②③}	0.76 ± 0.15 ^{①②③}	0.75 ± 0.12 ^{①②③}	0.87 ± 0.10 ^{①②③}
F 值	12.493	10.870	41.516	62.619
P 值	0.001	0.001	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$; ③与低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

组相比, 低剂量组和高剂量组 PERK、ATF4、CHOP、Bax 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$); 与低剂量组比较, 高剂量组 PERK、ATF4、CHOP、Bax 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠纹状体 PERK、ATF4、CHOP、Bax 蛋白相对表达量比较 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	PERK 蛋白	ATF4 蛋白	CHOP 蛋白	Bax 蛋白
对照组	0.53 ± 0.03	0.59 ± 0.06	0.41 ± 0.05	0.56 ± 0.06
模型组	1.12 ± 0.32 ^①	1.51 ± 0.29 ^①	1.39 ± 0.20 ^①	2.01 ± 0.35 ^①
低剂量组	0.76 ± 0.14 ^{①②}	0.91 ± 0.09 ^{①②}	0.95 ± 0.08 ^{①②}	0.98 ± 0.09 ^{①②}
高剂量组	0.55 ± 0.12 ^{①②③}	0.78 ± 0.11 ^{①②③}	0.80 ± 0.10 ^{①②③}	0.81 ± 0.09 ^{①②③}
F 值	8.740	23.413	44.557	45.643
P 值	0.002	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$; ③与低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

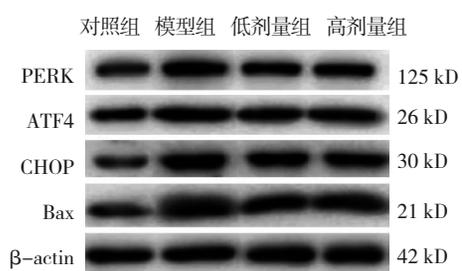


图 2 各组大鼠纹状体 PERK、ATF4、CHOP、Bax 蛋白的表达

3 讨论

PD 是以黑质纹状体系统多巴胺能神经元变性丢失为主要特征的神经系统疾病, 患者神经元胞质中出现易小体, 且纹状体内多巴胺含量减少^[11]。PD 一般多发于老年人, 表现为肌肉僵直、肢体静止性战栗、运动迟缓并伴有步态变形等临床症状, 极大地影响患者生活质量^[12-13]。目前, 西医常用金刚烷胺、左旋多巴胺等药物治疗 PD, 但长时间服用该类物会导致患者产生幻觉、出现意识障碍、刺激肠胃、呕吐等不良反应, 部分患者还表现出

直立性低血压和下肢水肿的症状。此外, 该类物仅缓解 PD 的症状, 并不能达到根治的目的。药物治疗效果不佳的患者还可以选择手术治疗, 即通过毁损神经核或者进行脑部电刺激, 但该方法会产生不可逆损伤, 且术后并发症多, 极易反复。我国中医研究资料显示, PD 属实虚结合症, 实为风、淤、痰, 虚为气血两虚和肝肾亏虚。中药的毒副作用少、对肠胃刺激小, 因此选择中药方剂或许可以有效治疗 PD。

本研究根据药典中收录的“人参首乌胶囊”, 另加入六味药材配伍成乌参醒脑汤(人参、首乌、银杏叶、黄芪、当归、川芎、三七、蒲黄)。其中, 人参属滋补药, 具有祛痰, 缓解神经衰弱的作用^[14]; 首乌具有益精血, 补肝肾, 祛湿痰的作用^[15]; 银杏叶可活血养心, 疏通脑络^[16]; 黄芪具有益气敛汗, 补脾益肺的作用; 当归为补血圣药, 可以补血活血治疗血虚诸症; 川芎可活血祛瘀, 行气开郁; 三七可以治气血虚弱; 蒲黄可化痰。八味药材相配伍, 起到补气、养血、化痰、通脑络的作用。

本研究结果显示,模型组大鼠运动迟缓,水平运动频率较低,说明运动受阻,灌服乌参醒脑汤后,水平运动频率升高,说明大鼠运动能力恢复;旋转实验中,低剂量和高剂量给药组大鼠旋转频率下降,高剂量组大鼠旋转频率更低,提示乌参醒脑汤可以降低帕金森病大鼠多巴胺受体敏感性,恢复大鼠运动障碍,且适当增加乌参醒脑汤的剂量效果更佳。二苯乙烯苷是从首乌中提取的主要成分,大量研究显示其对PD动物模型的行为具有改善作用^[17]。本研究结果显示,模型组大鼠纹状体内多巴胺能神经元受损严重且数量少,低剂量组和高剂量组大鼠纹状体内多巴胺能神经元形态良好且数量较多,提示各剂量乌参醒脑汤在不同程度上对神经元具有保护和修复的作用。现代药理学研究发现,人参的主要活性成分是人参皂碱,可以有效抑制神经细胞凋亡^[18];有研究显示,二苯乙烯苷可以提高黑质纹状体系统多巴胺含量,并且对多巴胺能神经元具有保护作用^[19]。三七总皂苷是三七的主要活性成分,可以诱导神经干细胞分化成多巴胺能神经元。以上研究与本研究结果均说明乌参醒脑汤具有保护神经元的作用。

内质网应激是一种细胞的保护性应激反应,适当的内质网应激有利于细胞内稳态的平衡,但内质网应激过度则会引起相关细胞凋亡。PERK是内质网上的一种跨膜蛋白激酶,介导内质网应激,当受到刺激时,PERK被活化,进而活化ATF4,导致细胞凋亡活化^[20]。CHOP、Bax是参与细胞凋亡的重要因子,活化的ATF4激活CHOP,CHOP可以上调Bax的表达,促进细胞凋亡^[21]。本研究结果显示,模型组大鼠PERK、ATF4、CHOP和Bax mRNA和蛋白相对表达量升高,说明大鼠纹状体内的细胞凋亡途径已被活化,不同剂量的乌参醒脑汤给药对PERK、ATF4、CHOP和Bax mRNA和蛋白有不同程度的下调作用。银杏叶提取物具有消除自由基,减少氧化应激的作用,抑制大鼠脑内多巴胺能神经元的减少,对其有保护作用^[7];黄芪的主要活性成分是皂苷类和黄酮类化合物,可以清除体内多余的氧自由基,具有抗氧化应激的作用。黄捷等^[22]的研究显示,人参皂苷R3参与调控内质网应激PERK通路;另有研究显示,二苯乙烯苷和川芎嗪可以调节Bax的表达,调控细胞凋亡^[23-25]。以

上研究结合本研究结果,说明乌参醒脑汤可以抑制PERK/ATF4通路,从而抑制细胞凋亡

综上所述,乌参醒脑汤具有保护多巴胺能神经元和修复已受损神经元的作用,可以恢复帕金森病大鼠的运动失调,抑制细胞凋亡,这可能与抑制PERK/ATF4通路有关。

参 考 文 献 :

- [1] SIMON D K, TANNER C M, BRUNDIN P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology[J]. Clin Geriatr Med, 2020, 36(1): 1-12.
- [2] SAEEDI Y, GHADIMI M, ROHANI M, et al. Impact of anticholinergic drugs withdrawal on motor function in patients with Parkinson's disease[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2021, 202: 106480.
- [3] MALEK N. Deep brain stimulation in Parkinson's disease[J]. Neurol India, 2019, 67(4): 968-978.
- [4] 徐鹏恒,何建成,王利,等.复方地黄汤联合美多巴治疗帕金森病的临床疗效观察[J].中华中医药杂志,2019,34(2): 838-840.
- [5] 周梦玲,李婷,倪敬年,等.帕金森病肠道菌群与中医证候的相关性研究[J].中华中医药杂志,2019,34(5): 2274-2278.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典-三部-2010年版[M].北京:中国医药科技出版社,2010: 38-39.
- [7] 张辉,马惠清,王森茂,等.银杏叶提取物对帕金森病模型大鼠脑内神经炎症反应的影响[J].首都医科大学学报,2019,40(3): 439-442.
- [8] PAXINOS G, WATSON C. 大鼠脑立体定位图谱[M].第3版.诸葛启钊,译.北京:人民卫生出版社,2005: 21-22.
- [9] KOSKI S K, LEINO S, PANULA P, et al. Genetic lack of histamine upregulates dopamine neurotransmission and alters rotational behavior but not levodopa-induced dyskinesia in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Neurosci Lett, 2020, 729: 134932.
- [10] SHI Z Q, BAMFORD I J, MCKINLEY J W, et al. Propranolol relieves L-dopa-induced dyskinesia in parkinsonian mice[J]. Brain Sci, 2020, 10(12): 903.
- [11] JANKOVIC J, TAN E K. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2020, 91(8): 795-808.
- [12] XU X J, FU Z F, LE W D. Exercise and Parkinson's disease[J]. Int Rev Neurobiol, 2019, 147: 45-74.
- [13] RAZA C, ANJUM R, SHAKEEL N U A. Parkinson's disease: mechanisms, translational models and management strategies[J]. Life Sci, 2019, 226: 77-90.
- [14] 刘飞翔,林子璇,张怀亮,等.人参抗疲劳的作用机制和潜在靶点研究[J].中国中药杂志,2019,44(24): 5479-5487.
- [15] 贾敏,秦巧红,张寒,等.何首乌水溶性提取物在体外对缩血管物质诱导的血管平滑肌收缩的拮抗作用[J].中药药理与临床,2020,36(3): 106-111.

- [16] 方钊妍, 贝伟剑, 罗荣生, 等. 银杏叶提取物抗氧化机制的网络药理学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(8): 942-949.
- [17] 何建影, 于浩飞, 李菊, 等. 二苯乙烯苷对帕金森病模型小鼠的保护作用[J]. 中华老年医学杂志, 2019, 38(8): 929-933.
- [18] 赵文学, 赵雨, 王伟楠, 等. 人参皂苷 Rg1 对 LRRK2 突变致帕金森病果蝇的治疗作用探讨[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(13): 33-39.
- [19] 邵华青. 何首乌有效成分二苯乙烯甙对神经细胞保护作用的机制[J]. 黑龙江中医药, 2019, 48(1): 48-49.
- [20] MOU Z, YUAN Y H, ZHANG Z, et al. Endoplasmic reticulum stress, an important factor in the development of Parkinson's disease[J]. Toxicol Lett, 2020, 324: 20-29.
- [21] AGHAEI M, KHANAHMAD H, AGHAEI S, et al. The role of Bax in the apoptosis of *Leishmania*-infected macrophages[J]. Microb Pathog, 2020, 139: 103892.
- [22] 黄捷, 吴可人, 徐涛, 等. 人参皂苷 Rg3 通过内质网应激 PERK 通路抑制人胆囊癌裸鼠移植瘤生长的研究[J]. 浙江医学, 2018, 40(22): 2415-2418.
- [23] 龙石银, 黄良珠, 乔新惠, 等. 二苯乙烯苷对血管内皮细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(7): 557-560.
- [24] 王齐, 刘梅梅, 雷娜, 等. 二苯乙烯苷对脑缺血再灌注沙鼠脑内 p53、Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2018, 27(1): 18-22.
- [26] ZHOU H F, SHAO M, YANG X J, et al. Tetramethylpyrazine analogue T-006 exerts neuroprotective effects against 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease *in vitro* and *in vivo*[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 8169125.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 于楠楠, 毕海洋, 匡禹霏, 等. 乌参醒脑汤对帕金森病大鼠行为学及内质网应激 PERK/ATF4 通路的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(14): 35-41.

Cite this article as: YU N N, BI H Y, KUANG Y F, et al. Effects of Wushen Xingnao Decoction on behavior and endoplasmic reticulum stress PERK/ATF4 pathway in rat models of Parkinson's disease[J]. China Journal of Modern Medicine, 2022, 32(14): 35-41.