基于PKA信号通路探讨胆南星对MPTP诱导帕金森病模型小鼠的保护作用Δ

陈桂恩[1*]，邓雅方[1]，邓婉柔[1]，伍斌玺[1]，彭东辉[2]，曾元宁[1,2]，王秋红[1,2#]（1.广东药科大学中药学院/广东省中药饮片规范化炮制工程技术研究中心，广州 510006；2.黑龙江中医药大学教育部北药基础与应用研究重点实验室/黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室，哈尔滨 150040）

中图分类号 R285；R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2023）15-1809-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.15.04

摘 要 目的 探讨胆南星对帕金森病（PD）模型小鼠的改善作用及可能机制。**方法** 将60只雄性C57BL/6J小鼠随机分为正常组、模型组、胆南星低剂量组[0.39 g/（kg·d）]、胆南星高剂量组[1.56 g/（kg·d）]和阳性对照药左旋多巴片组[80 mg/（kg·d）]，每组12只。除正常组小鼠注射等体积生理盐水外，其余各组连续5 d腹腔注射1-甲基-4-苯基-1，2，3，6-四氢吡啶[MPTP，35 mg/（kg·d）]建立亚急性PD模型；造模完成后连续给药治疗7 d，于造模前1 d、造模第5天和末次给药后进行爬杆实验和线悬挂测试。采用免疫荧光法检测小鼠脑黑质中酪氨酸羟化酶（TH）阳性神经元数量；采用酶联免疫吸附法检测小鼠血清中白细胞介素1β（IL-1β）和肿瘤坏死因子α（TNF-α）水平以及脑黑质中IL-1β、TNF-α、环氧合酶2（COX-2）和诱导型一氧化氮合酶（iNOS）水平；采用Western blot法检测小鼠脑黑质中cAMP依赖的蛋白激酶催化亚单位α（PKA C-α）、谷胱甘肽过氧化物酶4（GPX4）以及铁蛋白重链多肽1（FTH1）蛋白的表达。**结果** 末次给药后，与正常组比较，模型组小鼠爬杆时间显著延长（$P<0.01$），线悬挂评分显著降低（$P<0.01$），脑黑质中TH阳性神经元数量显著减少（$P<0.01$），血清中IL-1β、TNF-α水平和脑黑质中IL-1β、TNF-α、COX-2、iNOS水平显著升高（$P<0.01$），脑黑质中GPX4、PKA C-α和FTH1蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。与模型组比较，胆南星高剂量组小鼠上述指标水平均显著回调（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论** 胆南星能够改善MPTP诱导的PD模型小鼠运动能力障碍，减少脑黑质TH神经元死亡，对模型小鼠具有神经保护作用；这可能与其激活PKA信号通路来抑制神经炎症和神经元细胞铁死亡有关。

关键词 胆南星；帕金森病；1-甲基-4-苯基-1，2，3，6-四氢吡啶；cAMP依赖的蛋白激酶信号通路；神经炎症；铁死亡

Investigation on the protective effect of Arisaema Cum Bile on MPTP-induced Parkinson's disease model mice based on PKA signaling pathway

CHEN Guien[1], DENG Yafang[1], DENG Wanrou[1], WU Binxi[1], PENG Donghui[2], ZENG Yuanning[1,2], WANG Qiuhong[1,2] (1. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University/Guangdong Engineering Technology Research Center for Standardized Processing of Chinese Materia Medica, Guangzhou 510006, China; 2. Heilongjiang Key Laboratory for Pharmacodynamic Material Bases of TCM and Natural Medicines/Key Laboratory of Northern Medicine Foundation and Application, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the improvement effects of Arisaema Cum Bile on Parkinson's disease (PD) model mice and its potential mechanism. **METHODS** Sixty male C57BL/6J mice were randomly divided into normal group, model group, Arisaema Cum Bile low-dose group [0.39 g/(kg·d)], Arisaema Cum Bile high-dose group [1.56 g/(kg·d)] and positive control drug Levodopa tablet group [80 mg/(kg·d)], with 12 mice in each group. Except that normal group was given constant volume of normal saline, other groups were given 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine [MPTP, 35 mg/(kg·d)] intraperitoneally for 5 consecutive days to induce subacute PD model; after modeling, they were given relevant medicine continuously for 7 d; rod climbing test and line suspension test were performed 1 d before modeling, on the 5th day of modeling and after the last medication. The number of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons in the substantia nigra of mice were measured by immunofluorescence; the levels of interleukin 1β (IL-1β) and tumor necrosis factor α (TNF-α) in serum and the levels of IL-1β, TNF-α, cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric

Δ**基金项目** 国家重点研发计划项目（No.2018YFC1707100）；广东省重点领域研发计划项目（No.2022B1111120002）；广东省中医药局科研项目（No.20221214）

＊**第一作者** 硕士。研究方向：中药炮制学。E-mail：674039717@qq.com

\# **通信作者** 教授，博士。研究方向：中药炮制与药效物质基础。E-mail：qhwang668@sina.com

oxide synthase (iNOS) in the substantia nigra of mice were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression levels of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit α (PKA C-α), glutathione peroxidase 4 (GPX4) and ferritin heavy chain polypeptide 1 (FTH1) proteins in the substantia nigra of mice was measured by Western blot. **RESULTS** After last medicine, compared with the normal group, mice in the model group had significantly longer pole-climbing time ($P<0.01$), significantly lower line suspension scores ($P<0.01$), significantly fewer TH-positive neurons in the substantia nigra ($P<0.01$), significantly higher serum concentrations of IL-1β and TNF-α and nigrostriatal concentrations of IL-1β, TNF-α, COX-2 and iNOS ($P<0.01$), while lower protein expression levels of GPX4, PKA C-α and FTH1 in the substantia nigra ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the model group, the above indexes of mice were significantly returned in Arisaema Cum Bile high-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Arisaema Cum Bile can improve motor impairment and reduce apoptosis of nigrostriatal TH neurons in MPTP-induced PD mice, and has neuroprotective effects on model mice; this may be related to its inhibition of neuroinflammation and the inhibition of ferroptosis by up-regulating PKA signaling pathway.

KEYWORDS Arisaema Cum Bile; Parkinson's disease; 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine; cAMP-dependent protein kinase signaling pathway; neuroinflammation; ferroptosis

帕金森病(Parkinson's disease,PD)是以黑质致密部多巴胺能神经元丢失和路易小体的形成为主要病理特征的一种神经系统退行性疾病,世界范围内超过1%的60岁以上人群受到其影响。PD的临床表现主要包括运动症状和非运动症状,其中运动症状主要包括静止性震颤、肌强直、运动迟缓和姿势步态异常[1]。PD的发病机制尚未明确,主要涉及氧化应激、线粒体功能障碍、神经炎症以及铁死亡等假说[2-4]。目前,临床常用的左旋多巴替代治疗虽然能减轻PD临床症状,但并不能阻止疾病进程,且长期使用还可能导致严重不良反应[5]。因此,寻找更加安全有效的PD治疗药物是目前亟待解决的问题。

PD属于中医中"颤证"或"拘病"的范畴,病机上常以阴虚、气虚和血虚合并风邪、痰湿和瘀血为主,证候上可分为少阳气郁、痰火内扰证,阴血亏虚、肝失濡养证,阴血亏虚、肝风内动证等五大证候[6]。胆南星(Arisaema Cum Bile)为制天南星的细粉与牛、羊或猪的胆汁一起加工而成,或为生天南星细粉与牛、羊或猪的胆汁一起发酵加工而成,具有清热化痰、息风定惊的功效。现代药理研究发现,胆南星具有清热、镇痛、抗惊厥、抗炎、抗氧化以及肺损伤保护作用[7]。临床上常用含胆南星的复方治疗痰火内扰型的PD[8],但其具体作用机制尚不明确。

胆南星含有大量胆汁酸成分[7]。胆汁酸是武田G蛋白偶联受体5(Takeda G protein-coupled receptor 5, TGR5)的天然激动剂,能激活环磷酸腺苷依赖性蛋白激酶(cAMP-dependent protein kinase, PKA)信号通路[9]。PKA信号通路是神经元短期和长期突触可塑性的关键调控因子,而在小胶质细胞中,其作为炎症的负调节因子发挥着重要作用[10]。研究表明,在PD模型中过度激活的PKA信号通路能显著减弱1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine,MPTP)诱导的纹状体多巴胺消耗和黑质多巴胺能神经元丢失,也能通过抑制神经炎症与抗线粒体损伤发挥神经保护作用[11-12]。鉴于此,本研究基于PKA信号通路,以MPTP建立PD小鼠模型并给予胆南星进行干预,通过动物行为学检测、多巴胺能神经元数量观察,考察胆南星对PD的改善作用,通过检测小鼠白细胞介素1β(interleukin-1β,IL-1β)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、环氧合酶2(cyclooxygenase-2,COX-2)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)等炎症因子水平及黑质中铁死亡与PKA信号通路相关蛋白——铁蛋白重链多肽1(ferritin heavy polypeptide 1,FTH1)、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4)和cAMP依赖的蛋白激酶催化亚单位α(cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha,PKA C-α)蛋白的表达情况,初步阐明胆南星潜在的作用机制,为胆南星防治PD提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器与设备

ALLEGRA X-15R型医用离心机购于美国Beckman公司;ME104/02型电子分析天平购于梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;DYY-6C型电泳仪购于北京六一生物科技有限公司;Chem Studio PLUS型超敏多功能成像仪购于德国Analytikjena公司;Epoch 2型酶标仪购于美国BioTek公司;Ⅳ73型荧光倒置显微镜购于日本Olympus公司;SP2型激光共聚焦显微镜购于德国Leica公司。

1.2 主要药品与试剂

天南星饮片(批号2005001)购于亳州市悦林药业有限公司,由广东药科大学中药学院刘基柱教授鉴定为天南星科植物天南星*Arisaema erubescens*(Wall.)Schott的干燥块茎;牛胆购于佛山市三水金盛菜牛定点屠宰肉联厂有限公司;MPTP购于美国Sigma公司;左旋多巴片(批号H31020888,规格0.25 g/片)购于上海福达制药有

限公司；兔抗酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）多克隆抗体、Alexa Fluor® 488标记的山羊抗兔免疫球蛋白G（IgG）H&L二抗和含DAPI的水基封固剂均购于美国Abcam公司，货号分别为ab6211、ab150077和ab104139；小鼠的IL-1β、TNF-α、COX-2、iNOS酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒均购于泉州睿信生物科技有限公司，货号分别为RX203063M、RX202412M、RX200401M、RX201999M；兔PKA C-α一抗、兔GPX4一抗、兔FTH1一抗、兔β-微管蛋白（β-tubulin）一抗、辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔IgG二抗均购于艾比玛特医药科技（上海）有限公司，货号分别为MA8076、T56959、T55648、PA4302、M21002；BCA蛋白定量试剂盒、超敏ECL发光液均购于大连美仑生物技术有限公司，货号分别为MA0082、MA0186。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级C57BL-6J雄性小鼠，共60只，6～7周龄，体重18～20 g，均购自广东省医学实验动物中心，动物生产许可证号为SCXK（粤）2018-0002。所有实验动物均饲养于标准实验动物房中，饲养期间小鼠自由进食及饮水，保持明暗12 h交替。适应性喂养7 d后开展实验。本实验通过了广东省医学实验动物中心实验动物伦理委员会审查，编号为C202301-2。

2 方法

2.1 药物制备

（1）造模药：称取适量MPTP粉末，加入适量0.9%氯化钠溶液溶解，以每管5 mL分装于棕色离心管中，－20 ℃保存。（2）胆南星混悬液：将生天南星粉碎后过8号筛，从新鲜牛胆顶端破口倒出胆汁，将生天南星细粉和牛胆汁按质量比1∶4进行混匀，复装于牛胆内，封口后悬挂于低温通风处。3个月后取下，破开牛胆皮，将胆南星取出后粉碎，过8号筛，干燥后制得胆南星细粉[13]，加0.5%羧甲基纤维素钠溶液混匀后备用。（3）阳性对照药左旋多巴片混悬液：将左旋多巴片研磨成细粉，加0.5%羧甲基纤维素钠溶液混匀，备用。

2.2 动物分组、造模与给药

小鼠适应性喂养7 d后，进行为期3 d的行为学训练（包括爬杆测试、线悬挂测试），根据行为学表现将个体差异明显的小鼠剔除。结果未发现行为异常者。将60只小鼠按体重随机分成5组，每组12只，分别为正常组、模型组、左旋多巴片组[80 mg/（kg·d），为成人临床等效剂量]和胆南星低、高剂量组[0.39、1.56 g/（kg·d），分别为成人临床低剂量（3 g）的1、4倍剂量]。除正常组外，其余各组小鼠均腹腔注射MPTP溶液[35 mg/（kg·d）]，每天1次，连续5 d，以建立亚急性PD模型[14]；正常组小鼠同步腹腔注射生理盐水[10 g/（kg·d）]。从实验第6天开始，正常组和模型组小鼠每天灌胃0.5%羧甲基纤维素钠溶液[10 g/（kg·d）]，其余各组小鼠灌胃相应药液，每天1次，连续7 d。每天称定各组小鼠的体重。

2.3 小鼠行为学检测

2.3.1 爬杆测试

爬杆测试用于检测小鼠的运动能力。造模前1 d、造模第5天以及末次给药后进行爬杆测试。取一根长55 cm、宽0.8 cm的竖杆，外周缠绕1层纱布防止小鼠打滑，在杆的一端固定1个直径约2 cm的小球，另一端与地面垂直并固定在平台上。每次将1只小鼠从饲养笼转移至中转笼，待小鼠状态稳定后，将小鼠头朝下放置在球的顶端，记录小鼠开始向下爬行至双后肢触碰平台的时间，即爬杆时间。小鼠中途停顿或者逆向爬行则视为爬行无效，需重新测量；爬杆时间超过30 s的仍记为30 s[15]。重复实验3次，每次实验间隔5 min。

2.3.2 线悬挂测试

线悬挂测试用于检测小鼠后肢耐力以及肢体协调能力。造模前1 d、造模第5天以及末次给药后进行线悬挂测试。取一根长约40 cm、直径为2 mm的金属细棒，固定在平行于地面15 cm的位置，地面处铺一层垫料作为缓冲，保护小鼠不被摔伤。每次将1只小鼠从饲养笼转移至中转笼，待小鼠状态稳定后，将小鼠双前肢挂于细绳中央，观察1 min内小鼠双后肢抓细棒的能力；若小鼠双后肢均能抓住细棒记为3分，只有一后肢能抓住细棒记为2分，无后肢抓住细棒记为1分[16]。重复实验3次，每次实验间隔5 min。

2.4 动物取材

末次灌胃给药后，小鼠禁食不禁水，12 h后称体重，腹腔注射2%戊巴比妥钠（45 mg/kg）麻醉，每组取9只小鼠于眼眶取血，将血液在室温静置1 h后，在4 ℃下以3 000 r/min离心15 min，收集血清，－80 ℃保存，备用。将取血后的小鼠颈椎脱臼处死，在冰上分离脑组织的黑质，－80 ℃保存，备用。另外每组取3只小鼠，麻醉后经生理盐水或磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗后，使用4%多聚甲醛灌注固定；取出小鼠脑组织，置于4%多聚甲醛中固定3 d后，用15%、20%、30%蔗糖梯度脱水，待脑组织下沉后进行冰冻切片（厚度约10 μm）。

2.5 小鼠脑黑质致密部TH阳性神经元数量检测

每组选取3个样本，采用免疫荧光法检测小鼠脑黑质TH阳性神经元数量。用蒸馏水洗切片3次，然后以0.3%H_2O_2浸泡10 min，再以0.01 mol/L的PBS洗3次、每次5 min；3%BCA封闭30 min后，滴加兔源TH抗体（稀释比例1∶2 000），37 ℃孵育1 h；以0.01mol/L的PBS洗3次、每次5 min，滴加Alexa Fluor® 488标记的山羊抗兔IgG H&L二抗（稀释比例1∶200），37 ℃孵育30 min；以0.01 mol/L的PBS洗3次、每次5 min，滴加含DAPI的水基封固剂避光孵育5 min。使用激光共聚焦显微镜扫描

拍照。以神经元TH染色阳性且DAPI细胞核染色阳性为标准，判断为阳性神经元。使用Image J 1.8.0软件对阳性神经元进行标记计数。

2.6 小鼠血清与脑黑质中炎症因子水平检测

采用ELISA法进行检测。每组随机取6只小鼠的脑黑质制成组织匀浆，并取冻存的小鼠血清常规解冻后，按照相应ELISA试剂盒说明书操作，检测小鼠血清中IL-1β、TNF-α水平与脑黑质中IL-1β、TNF-α、COX-2、iNOS水平。

2.7 小鼠脑黑质中GPX4、FTH1、PKA C-α蛋白表达检测

每组（除左旋多巴片组外）取3只小鼠的脑黑质组织样本，采用Western blot法进行检测。采用RIPA裂解液提取组织中总蛋白，按照BCA蛋白定量试剂盒方法检测总蛋白浓度。将总蛋白变性后使用12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳（电压80～110 V，时间1.5 h），然后在恒流（320 mA）下电转3 h至聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上，5%脱脂牛奶封闭1 h；以TBST洗膜3次，加入GPX4、FTH1、PKA C-α一抗（稀释比例均为1∶1 000）和β-tubulin一抗（稀释比例为1∶2 000），4 ℃孵育过夜；以TBST洗涤3次，加入HRP标记的山羊抗兔IgG H&L二抗（稀释比例1∶2 000），室温孵育1 h；以TBST洗涤，加入ECL显影液，使用超敏多功能成像仪拍照记录，使用Image J 1.8.0软件进行灰度值的分析对比。以目的蛋白与内参蛋白（β-tubulin）条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用Graphpad Prism 7.0软件进行统计分析。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较使用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 胆南星对PD模型小鼠行为学的影响结果

腹腔注射MPTP后，小鼠表现出现竖毛、弓背、尾巴僵直、短暂的震颤等帕金森类行为改变。造模第5天时，与正常组比较，其余各组小鼠的爬杆时间均显著延长、线悬挂评分均显著降低（$P<0.01$），说明造模后小鼠运动能力降低。给药第7天时，与正常组比较，模型组小鼠爬杆时间显著延长、线悬挂评分显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组小鼠的爬杆时间均显著缩短（$P<0.05$或$P<0.01$），左旋多巴片组和胆南星高剂量组小鼠的线悬挂评分均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表1。

表1 各组小鼠的爬杆时间和线悬挂评分测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	爬杆时间/s			线悬挂评分/分		
	造模前1 d	造模第5天	给药第7天	造模前1 d	造模第5天	给药第7天
正常组	6.96±1.49	6.60±1.13	6.77±1.15	2.95±0.13	2.83±0.39	2.72±0.34
模型组	7.34±1.14	23.35±6.61[a]	18.95±5.79[a]	2.97±0.10	1.67±0.64[a]	1.50±0.73[a]
左旋多巴片组	7.79±1.11	23.84±5.57[a]	13.39±3.71[b]	2.89±0.30	1.61±0.69[a]	2.36±0.80[b]
胆南星低剂量组	7.86±1.43	24.38±5.22[a]	13.14±3.90[c]	2.95±0.13	1.69±0.67[a]	1.97±0.83
胆南星高剂量组	7.94±1.71	22.57±5.68[a]	10.88±6.32[c]	2.92±0.29	1.56±0.73[a]	2.53±0.54[c]

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$。

3.2 小鼠脑黑质致密部TH阳性神经元数量检测结果

与正常组[（128±10）个]比较，模型组小鼠脑黑质致密部TH阳性神经元数量[（75±12）个]显著减少（$P<0.01$）。与模型组比较，左旋多巴片组和胆南星低剂量组小鼠脑黑质致密部TH阳性神经元数量[分别为（80±5）、（76±8）个]差异无统计学意义（$P>0.05$），而胆南星高剂量组小鼠脑黑质致密部TH阳性神经元数量[（124±7）个]显著增加（$P<0.01$）。各组小鼠脑黑质致密部TH阳性神经元的免疫荧光染色图见图1。

3.3 小鼠血清及脑黑质中炎症因子水平测定结果

与正常组比较，模型组小鼠血清中IL-1β、TNF-α水平和脑黑质中IL-1β、TNF-α、iNOS、COX-2水平均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，各给药组小鼠血清中IL-1β水平和脑黑质中TNF-α、iNOS和COX-2水平均显著降低（$P<0.01$）；胆南星低、高剂量组小鼠血清中TNF-α水平及脑黑质中IL-1β水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表2。

3.4 小鼠脑黑质中GPX4、FTH1、PKA C-α蛋白表达测定结果

与正常组比较，模型组小鼠脑黑质中GPX4、FTH1和PKA C-α蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。与模型组比较，胆南星低剂量组小鼠脑黑质中上述蛋白表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$），而胆南星高剂量组小鼠脑黑质中上述蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$）。结果见图2、表3。

4 讨论

PD患者的经典临床症状为静息性震颤、肌僵直、行动迟缓等，而PD的病理特征为黑质多巴胺能神经元的丢失及路易小体的形成[1]。本研究结果显示，经过MPTP造模的小鼠基本出现了短暂震颤、竖毛、行动能力下降、后肢无力以及尾巴僵直的现象，这些现象可在注射MPTP 3～6 h后恢复正常；而与正常组相比，模型组小鼠脑黑质致密部TH阳性神经元数量显著减少，这说明MPTP诱导了多巴胺能神经元的死亡。行为学测试结果表明，造模后小鼠的运动能力也明显下降，说明PD亚急性小鼠模型成功建立。与模型组相比，高剂量胆南星能够发挥神经保护作用，该组小鼠TH阳性神经元数量显著增加，且该组小鼠的行为能力也显著提高，说明高剂量胆南星对MPTP诱导的PD亚急性模型小鼠具有改善作用。

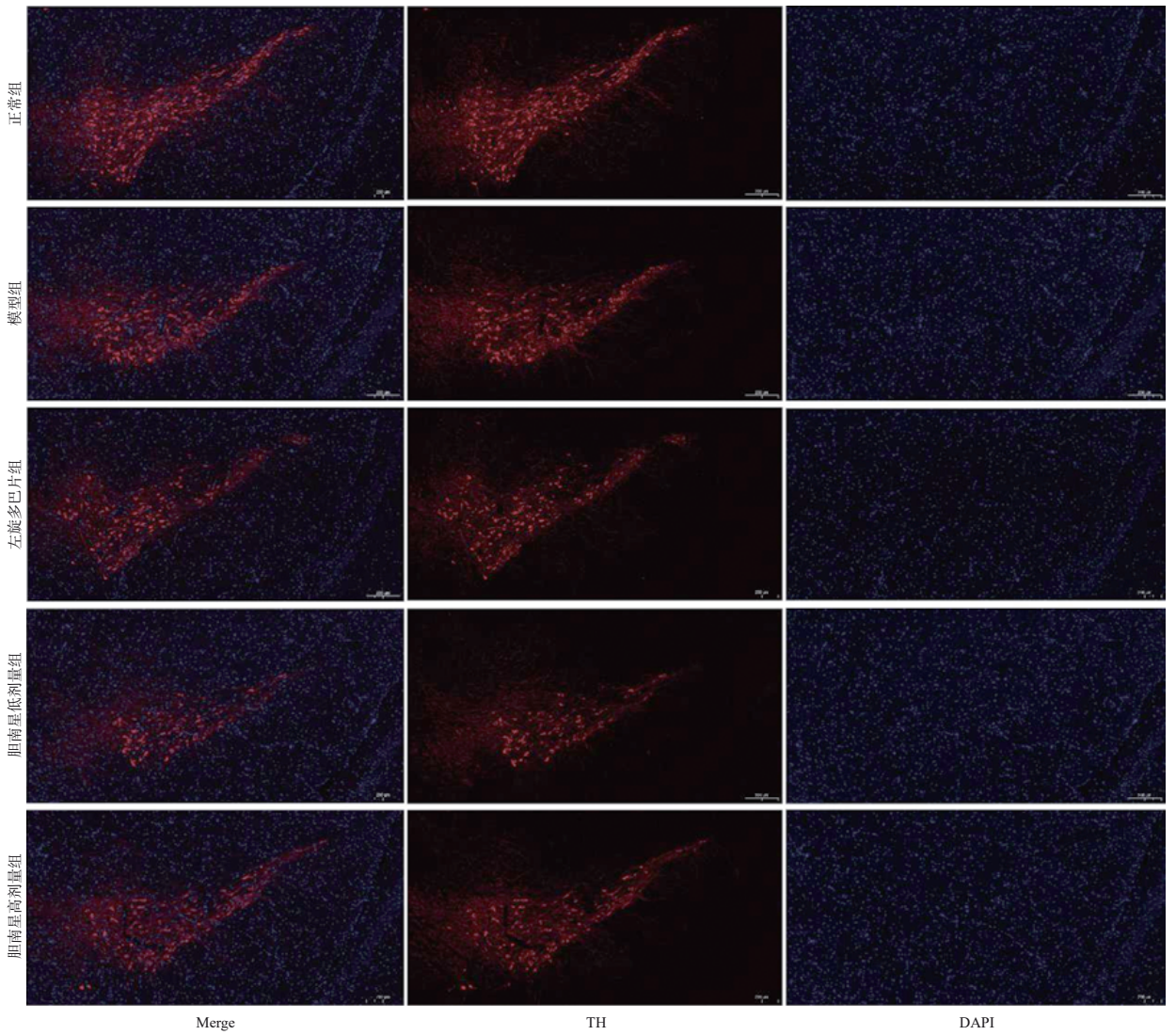


图1　各组小鼠脑黑质致密部TH阳性神经元的免疫荧光染色图（×6.0）

表2　各组小鼠血清及脑黑质中炎症因子水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	血清/(pg/mL)		脑黑质/(pg/mg)			
	IL-1β	TNF-α	IL-1β	TNF-α	iNOS	COX-2
正常组	14.21±2.75	88.04±8.56	4.71±1.40	24.69±2.44	1.17±0.15	2.75±0.46
模型组	26.50±0.71[a]	119.69±7.97[a]	9.23±1.27[a]	48.17±2.27[a]	2.55±0.28[a]	7.83±0.62[a]
左旋多巴片组	19.59±3.40[b]	108.06±14.58	7.69±1.63	39.14±4.93[b]	1.69±0.23[b]	4.47±0.51[b]
胆南星低剂量组	17.38±2.45[b]	101.21±7.71[c]	5.65±0.79[b]	31.55±4.99[b]	1.29±0.15[b]	3.65±0.75[b]
胆南星高剂量组	17.85±2.45[b]	90.94±13.24[b]	5.73±0.81[b]	28.27±2.35[b]	1.19±0.26[b]	3.28±0.62[b]

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$。

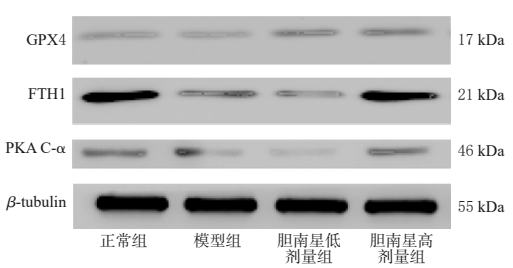


图2　各组小鼠脑黑质中GPX4、FTH1、PKA C-α蛋白表达电泳图

表3　各组小鼠脑黑质中GPX4、FTH1、PKA C-α蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	GPX4/β-tubulin	FTH1/β-tubulin	PKA C-α/β-tubulin
正常组	0.37±0.04	0.43±0.08	0.36±0.04
模型组	0.23±0.03[a]	0.08±0.02[a]	0.14±0.08[b]
胆南星低剂量组	0.29±0.06	0.29±0.14	0.15±0.11
胆南星高剂量组	0.38±0.01[c]	0.46±0.16[c]	0.44±0.12[c]

a：与正常组比较，$P<0.01$；b：与正常组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$。

神经炎症在PD的进程中起着重要作用，慢性的炎症会导致多巴胺能神经元死亡。大量的PD患者尸检结果显示，PD患者大脑中IL-1β、TNF-α、COX-2和iNOS等促炎因子水平显著上升，小胶质细胞被激活，且这种炎症反应是由激活的小胶质细胞的NLRP3炎症小体所介导的[17]。胆南星含有大量的结合型与游离型胆汁酸成分[7]。胆汁酸可以激活TGR5受体，通过cAMP-PKA信号通路抑制NLRP3炎症小体的形成[9]。本研究发现，与正常组比较，模型组小鼠血清中IL-1β、TNF-α水平与脑黑质中IL-1β、TNF-α、COX-2、iNOS水平均明显上升，

说明MPTP诱导了神经炎症；与模型组相比，胆南星高剂量组小鼠血清和脑黑质中上述炎症因子水平均不同程度回调，说明胆南星可通过抑制神经炎症的发生，进而减轻对多巴胺能神经元的损伤。

铁死亡是大量脂质过氧化介导的铁依赖性细胞程序性死亡，在PD模型中，神经炎症会伴随神经元发生铁死亡[18]。抑制铁死亡是PD治疗的靶点之一[19]。GPX4与FTH1是铁死亡的标志物。GPX4是细胞对抗脂质过氧化的重要硒蛋白，当发生铁死亡时GPX4的水平会降低；FTH1是铁蛋白的重链，铁蛋白能够储存铁离子，在细胞铁稳态中发挥重要作用，同时也是铁死亡的抑制因子[18－20]。本研究结果显示，MPTP造模后，模型组小鼠脑黑质中GPX4和FTH1表达显著下调，说明MPTP诱导了黑质神经细胞发生铁死亡；给药后，胆南星高剂量组小鼠脑黑质中GPX4和FTH1的表达较模型组显著上调。这提示胆南星可能通过抑制神经元铁死亡从而抑制多巴胺能神经元丢失。

综上，胆南星对MPTP诱导的亚急性PD模型小鼠具有一定的神经保护作用，表现为减少运动功能障碍和减少多巴胺能神经元的死亡。其作用机制可能与激活PKA信号通路来抑制神经炎症和神经元细胞铁死亡有关，但更加详细的分子作用机制有待进一步研究。

参考文献

[1] TYSNES O B, STORSTEIN A. Epidemiology of Parkinson's disease[J]. J Neural Transm, 2017, 124(8): 901-905.

[2] HIRSCH E C, STANDAERT D G. Ten unsolved questions about neuroinflammation in Parkinson's disease[J]. Mov Disord, 2021, 36(1): 16-24.

[3] MAHONEY-SÁNCHEZ L, BOUCHAOUI H, AYTON S, et al. Ferroptosis and its potential role in the physiopathology of Parkinson's Disease[J]. Prog Neurobiol, 2021, 196: 101890.

[4] DIAS V, JUNN E, MOURADIAN M M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease[J]. J Parkinsons Dis, 2013, 3(4): 461-491.

[5] STEFANO A D, SOZIO P, CERASA L S, et al. L-dopa prodrugs: an overview of trends for improving Parkinson's disease treatment[J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(32): 3482-3493.

[6] 雒晓东，李哲，朱美玲，等. 帕金森病（颤拘病）中医临床诊疗专家共识[J]. 中医杂志，2021，62(23)：2109-2116.

[7] 唐照琦，李彪，王秋红，等. 胆南星的化学成分、药理作用及相关复方临床应用的研究进展[J]. 中国药房，2020，31(12)：1523-1527.

[8] 张晶晶，马云枝. 马云枝分型论治帕金森病[J]. 湖北中医杂志，2016，38(10)：26-27.

[9] GUO C S, XIE S J, CHI Z X, et al. Bile acids control inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome[J]. Immunity, 2016, 45(4): 944.

[10] GREGGIO E, BUBACCO L, RUSSO I. Cross-talk between LRRK2 and PKA: implication for Parkinson's disease?[J]. Biochem Soc Trans, 2017, 45(1): 261-267.

[11] DAGDA R K, GUSDON A M, PIEN I, et al. Mitochondrially localized PKA reverses mitochondrial pathology and dysfunction in a cellular model of Parkinson's disease [J]. Cell Death Differ, 2011, 18(12): 1914-1923.

[12] LEE Y Y, PARK J S, LEEM Y H, et al. The phosphodiesterase 10 inhibitor papaverine exerts anti-inflammatory and neuroprotective effects via the PKA signaling pathway in neuroinflammation and Parkinson's disease mouse models[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 246.

[13] 吴真，刘怡，林丽. 胆南星炮制历史沿革与现代研究[J]. 中国现代中药，2020，22(11)：1938-1943.

[14] JACKSON-LEWIS V, PRZEDBORSKI S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. Nat Protoc, 2007, 2(1): 141-151.

[15] LUCHTMAN D W, SHAO D, SONG C. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. Physiol Behav, 2009, 98(1/2): 130-138.

[16] HU X L, SONG Q, LI X, et al. Neuroprotective effects of Kukoamine A on neurotoxin-induced Parkinson's model through apoptosis inhibition and autophagy enhancement [J]. Neuropharmacology, 2017, 117: 352-363.

[17] MEHTA S H, TANNER C M. Role of neuroinflammation in parkinson disease: the enigma continues[J]. Mayo Clin Proc, 2016, 91(10): 1328-1330.

[18] KO C J, GAO S L, LIN T K, et al. Ferroptosis as a major factor and therapeutic target for neuroinflammation in Parkinson's disease[J]. Biomedicines, 2021, 9(11): 1679.

[19] TIAN Y, LU J, HAO X Q, et al. FTH1 inhibits ferroptosis through ferritinophagy in the 6-OHDA model of Parkinson's disease[J]. Neurotherapeutics, 2020, 17(4): 1796-1812.

[20] SMEYNE M, SMEYNE R J. Glutathione metabolism and Parkinson's disease[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 62: 13-25.

（收稿日期：2023-01-30　修回日期：2023-06-18）

（编辑：林　静）