

引用:吴幸鸿,梁慧荟,戴健,韦秀英,李若琪,陈钊森,王凯华,王荔.五藤定神汤减轻多巴胺能神经元丢失并抑制MPTP模型M1型小胶质细胞极化的研究[J].中医药导报,2026,32(1):1-6,28.



五藤定神汤减轻多巴胺能神经元丢失并抑制MPTP模型M1型小胶质细胞极化的研究*

吴幸鸿¹,梁慧荟²,戴健¹,韦秀英¹,李若琪¹,陈钊森¹,王凯华²,王荔^{1,2}

(1.广西中医药大学,广西 南宁 530200;

2.广西中医药大学附属国际壮医医院,广西 南宁 530201)

[摘要] 目的:研究五藤定神汤是否具有改善多巴胺(DA)能神经元丢失和调控MPTP模型M1小胶质细胞活化的作用。方法:将36只C57BL/6J小鼠随机分为空白组、模型组和干预组,每组12只。采用腹腔注射MPTP方法构建帕金森病(PD)小鼠模型。干预组小鼠灌服相应剂量的五藤定神汤,空白组、模型组灌服超纯水,1次/d,连续14d。于实验第0天、第5天、第19天对各组小鼠进行行为学检测,实验第20天处死小鼠,采用免疫荧光染色对小鼠中脑黑质进行酪氨酸羟化酶(TH)、小胶质细胞离子钙结合衔接分子1(Iba-1)、一氧化氮合酶(iNOS)染色,采用高效液相色谱检测纹状体多巴胺含量,RT-qPCR检测纹状体Iba mRNA、iNOS mRNA表达水平,蛋白质印迹(Western blotting)法检测黑质Iba、iNOS蛋白表达水平,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测纹状体肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1(IL-1)的含量。结果:与模型组相比,干预组爬杆实验时长显著缩短,旷场实验路程增加、平均移动速度均显著提高($P<0.01$),黑质酪氨酸羟化酶表达明显增加,纹状体DA含量显著提高($P<0.05$)。此外,相对模型组,免疫荧光染色、WB、RT-qPCR检测均提示干预组iNOS较模型组减少($P<0.05$);ELISA检测提示TNF- α 、IL-1 β 含量减少。结论:五藤定神汤可改善MPTP模型小鼠运动障碍症状,抑制小胶质细胞M1型活化,降低纹状体TNF- α 、IL-1 β 水平,减轻中脑黑质致密部多巴胺能神经元丢失。

[关键词] 帕金森病;五藤定神汤;小胶质细胞;M1型极化;多巴胺能神经元;小鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2026)01-0001-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2026.01.001

Wuteng Dingshen Decoction (五藤定神汤) Attenuates Dopaminergic Neuron Loss and Inhibits Microglia M1 Polarization in an MPTP-Induced Mouse Model

WU Xinghong¹, LIANG Huihui², DAI Jian¹, WEI Xiuying¹, LI Ruoxi¹, CHEN Zhaosen¹, WANG Kaihua², WANG Li^{1,2}

(1.Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning Guangxi 530200, China; 2.Guangxi International Zhuang Medicine Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning Guangxi 530201, China)

[Abstract] Objective: To investigate whether Wuteng Dingshen decoction can ameliorate the loss of dopaminergic neurons and regulate the activation of M1 microglia in MPTP-induced Parkinson's disease (PD) mouse models. Methods: A total of 36 C57BL/6J mice were randomly divided into a blank group, a model group, and an intervention group, 12 mice in each. PD mouse models were established by intraperitoneal injection of MPTP. The intervention group was intragastrically administered with Wuteng Dingshen decoction, while the blank group and the model group received ultrapure water, once daily for 14 consecutive days. Behavioral tests were performed on day 0, 5, and 19. All mice were sacrificed on day 20. Immunofluorescence staining was used to detect tyrosine hydroxylase (TH), ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1), and inducible

*基金项目:国家自然科学基金项目(82460888);广西科技计划项目(2022JJB140452);中国民族医药学会课题(2022M1112-140201);广西中医药大学博士科研启动基金项目(2020BS031);广西国际壮医医院引进人才科研启动基金项目(GZ2023RC003)

通信作者:王荔,女,主任医师,研究方向为帕金森病相关的中西医结合防治及“微生物-肠-脑”轴

nitric oxide synthase (iNOS) in the substantia nigra. High-performance liquid chromatography was used to measure dopamine (DA) content in the striatum. RT-qPCR was used to detect the levels of Iba-1 mRNA and iNOS mRNA in the striatum. Western blotting was used to determine the protein expression levels of Iba-1 and iNOS in the substantia nigra. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in the striatum. Results: Compared with the model group, the intervention group showed a significantly shortened duration in the pole-climbing test, and increased total distance and average speed in the open-field test ($P<0.01$). TH expression in the substantia nigra and DA content in the striatum were significantly higher in the intervention group ($P<0.05$). Furthermore, immunofluorescence staining, Western blotting, and RT-qPCR analyses all indicated a reduction in iNOS in the intervention group compared to the model group ($P<0.05$). ELISA revealed decreased levels of TNF- α and IL-1 β . Conclusion: Wuteng Dingshen decoction can ameliorate motor dysfunction, inhibit M1 microglial polarization, reduce the levels of TNF- α and IL-1 β , and attenuate the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta of MPTP-induced PD mice.

[Keywords] Parkinson's disease; Wuteng Dingshen decoction; microglia; M1 polarization; dopaminergic neurons; mice

帕金森病(parkinson's disease,PD)是常见神经退行性疾病。我国患者超300万,成为全球新增帕金森病比例较高的国家之一^[1]。多巴替代治疗无法延缓其病程,亟需新的疗法。近年来,慢性炎性损伤作为PD重要发病机制备受关注,小胶质细胞(microglial cell, MG)在发病中作用关键^[2-7]。其活化标志物为小胶质细胞离子钙结合衔接分子1(Ionized calcium binding adapter molecule 1,Iba-1),可分化为M1和M2表型。一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)为M1表型活化标志物,可调控其炎性极化,加剧炎症损伤。壮医药历史悠久,在PD防治领域挖掘空间大。五藤定神汤是课题组自拟方,临床疗效良好。网络药理学提示其有调节炎性反应的作用,却缺乏实验证。本研究拟通过动物实验,探究该方能否减轻M1型MG炎性激活、减少多巴胺(dopamine,DA)能神经元丢失、改善PD小鼠运动障碍,丰富壮医药防治PD的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 36只SPF级C57BL/6J小鼠,11~12周龄,雌雄各半,体质量(24±5)g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司。生产许可证号:SCXK(京)2024-001;质量合格证号:11032423 0103844232;实验动物使用许可证号:SYXK(京)2019-0010。动物饲养在广西中医药大学实验动物中心[实验单位使用许可证号:SYXK(桂)2019-0001],在SPF级实验室适应性饲养,饲养条件:室温(24±2)℃,相对湿度50%~70%,自由饮食,自然昼夜节律,适应性饲养6周。本实验经广西中医药大学动物伦理委员会批准,审批号:DW2023 0411-048。

1.2 药物与试剂 钩藤(广西仙茱中药科技有限公司,批号:20220801);首乌藤(广西仙茱中药科技有限公司,批号:20220802);鸡血藤(广西仙茱中药科技有限公司,批号:20220702);宽筋藤(广西仙茱中药科技有限公司,批号:20220801);扶芳藤(广西仙茱中药科技有限公司,批号:20220901);白芍(江西彭氏国药堂饮片有限公司,批号:23031004);甘草(广西仙茱中药科技有限公司,批号:

20221001)。将上述中药置于砂锅中分别3次煎制,所得药液混匀后用武火浓缩成五藤定神汤灌胃溶液。丙磺舒(北京索莱宝科技有限公司,批号:20230714);灭菌注射用水(陕西圣奥动物药业有限公司,批号:202301061);MPTP(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号:09222230612);4%多聚甲醛(合肥兰杰柯科技有限公司,批号:23067175);RNA提取液(批号:CR2211013)、氯仿替代物(批号:CR2305116)、SweScript RT I First Strand cDNA Synthesis Kit(批号:MPC2111096)、组织自发荧光淬灭剂(批号:CR2101149)、牛血清白蛋白BSA(批号:GC2309012)、DAPI染色试剂(批号:CR2101104)和抗荧光淬灭封片剂(批号:CR2205130)均购于武汉赛维尔生物科技有限公司;Fast Tap Template SYBR Green qPCR Mix[信天翁生物科技(广州)有限公司,批号:1964833051];白介素-1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号:202410100016184420616)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)ELISA试剂盒(批号:202410100016204840616)均购于上海将来实业股份有限公司;BCA蛋白测定试剂盒(上海宏叶生物科技有限公司,批号:68);5X loading buffer蛋白上样缓冲液(亲和生命科技有限责任公司,批号:W2311E5L09);20X TBST浓缩液(北京索莱宝科技有限公司,批号:20220412);酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)一抗(上海蓝木化工有限公司,批号:F010802);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:AC230702002);一氧化氮合酶(iNOS)一抗(杭州荟丹生物有限公司,批号:F10535);小胶质细胞离子钙结合衔接分子1(Iba-1)一抗(成都正能生物技术有限责任公司,批号:M29NO07);山羊抗兔Ig G H&L(HRP)二抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号:BA12163708);ECL化学发光液(合肥兰杰柯科技有限公司,批号:22041739)。

1.3 主要仪器 轮转式切片机(型号:RM 2016)和荧光倒置显微镜(型号:DMI8)均购于徕卡显微系统(上海)贸易有限公

司;高效液相色谱仪(型号:UltiMate 3000 RS)和高速低温离心机(型号:ST16)均购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司;全波长酶标仪[安捷伦科技(中国)有限公司,型号:Epoch 2];荧光定量PCR仪[罗氏诊断产品(上海)有限公司,型号:Light-Cycler480];Bio-Rad基础电源(型号:1645050)、Bio-Rad小型垂直电泳系统(型号:1658001)和Bio-Rad转印模块(型号:1703935)均购于伯乐生命医学产品(上海)有限公司;全自动化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:ChemiScope 6000)。

1.4 造模与分组 用随机分组方法将所有小鼠按1~36号的顺序进行编号,使用Excel生成随机数,按随机数将小鼠编号从小到大排序,1~12号归为空白组,13~36号归为造模组。空白组于实验第1天至第19天按体质量予等体积(体积=体质量×给药剂量/药物浓度)灭菌注射用水进行腹腔注射(1次/d,共19 d);造模组于实验第1天至第5天予0.03 g/kg的0.5% MPTP进行腹腔注射(1次/d,共5 d),连续5 d构建亚急性帕金森病小鼠模型,随后用随机分组方法,将造模组的24只小鼠分为模型组和干预组。在实验第6天至第19天,模型组和干预组共24只小鼠经腹腔注射予0.025 g/kg的0.5% MPTP溶液和皮下注射予0.25 g/kg的1.25%丙磺舒溶液以维持模型效果(1次/7 d,共2次)。

1.5 实验给药 成人体质量取60 kg,人与小鼠的等效剂量比值取9.1,一剂五藤定神汤的总生药量为80 g,灌胃剂量为 $80 \text{ g} \div 60 \text{ kg} \times 9.1 \approx 12.130 \text{ g/kg}$ 。五藤定神汤低剂量、中剂量、高剂量的灌胃剂量比例为1:2:4,得出五藤定神汤低剂量的灌胃剂量为6.065 g/kg,中剂量的灌胃剂量为12.130 g/(kg·d),高剂量的灌胃剂量为24.260 g/kg。

在实验第6天至第19天,空白组和模型组分别以每10 g体质量予超纯水0.1 mL进行灌胃处理(1次/d,共14 d),干预组以每10 g体质量予五藤定神汤0.1 mL进行灌胃处理(1次/d,共14 d)。本研究在预实验中按照6.065 g/(kg·d)、12.130 g/(kg·d)、24.260 g/(kg·d)3个剂量进行实验,发现12.130 g/(kg·d)剂量可以显著改善帕金森病模型小鼠的运动功能、减少黑质酪氨酸羟化酶的丢失,故本研究中选择12.130 g/(kg·d)剂量进行后继实验。

1.6 观察指标

1.6.1 行为学观察 各组小鼠分别于实验第0天、第5天和第19天进行爬杆实验和旷场实验检测,收集实验数据。

爬杆实验装置由底座和杆体组成,杆体直径1 cm,长50 cm,在杆上缠上纱布,将杆垂直放置。将被测小鼠置于杆体顶部,小鼠双后下肢接触杆底平台认定为爬完全程,检测小鼠从杆体顶部爬至杆底平台的总时长(s)。每只小鼠每次爬杆实验重复3次,每次实验间隔最少为30 min,记录数据,取均值。

旷场实验在长、宽、高分别为50 cm、50 cm、40 cm且上方敞开的旷场箱中进行,旷场箱为黑色,上方安置摄像头记录小鼠在旷场箱内的运动情况。检测小鼠在旷场箱中5 min内的总路程(m)和平均移动速度(m/s)。

1.6.2 免疫荧光检测黑质TH、Iba-1和iNOS的表达 实验第

20天,将3组小鼠脱颈处死($n=3$),置于冰上将完整脑组织取出,并用4%多聚甲醛溶液将其浸泡固定。将固定好的脑组织进行石蜡包埋切片,脱蜡、水化,修复抗原,阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,先后加入TH、Iba-1、iNOS抗体(稀释比例为1:1 000)和二抗(稀释比例为1:300)进行孵育,DAB显色,DAPI复染细胞核,经荧光倒置显微镜观察黑质TH、Iba-1、iNOS的表达并对其进行拍照。

1.6.3 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测纹状体DA含量测定 实验第20天,将3组小鼠脱颈处死($n=3$),置于冰上剖取出纹状体,加入500 μL 甲醇涡旋混匀,加入研磨珠研磨5 min,离心半径10 cm,13 000 r/min,离心10 min后取上清。用0.22 μm 滤膜过滤,取滤液进样分析,检测小鼠纹状体中的DA含量(ng/g)。色谱柱:Welch Ultimate XB-C₁₈ 150 4.6 mm,5 μm ;水相:0.1%甲酸/水;有机相:0.1%甲酸/乙腈;流速:0.8 mL/min;柱温箱温度:40 °C。

1.6.4 RT-qPCR检测纹状体小胶质细胞标志物(Iba-1 mRNA、iNOS mRNA)相对表达量 实验第20天,将3组小鼠脱颈处死($n=3$),置于冰上剖取出纹状体,按照1 mg组织加10 μL RNA提取液匀浆至样本无颗粒状,离心半径10 cm,4 °C,12 000 r/min,离心10 min后取上清。加入三氯甲烷替代物静置10 min,4 °C,离心半径10 cm,12 000 r/min,离心10 min后取无色水相。加入500 μL 异丙醇,颠倒混匀数次后静置沉淀10 min,4 °C,离心半径10 cm,12 000 r/min,离心10 min,于管底可见白色沉淀即为总RNA。以总RNA为模板,用第一链cDNA合成试剂盒将提取的RNA逆转录合成cDNA,然后用qPCR预混液试剂盒进行相对定量的RT-qPCR反应,检测纹状体中Iba-1 mRNA、iNOS mRNA表达。RT-qPCR扩增条件:预变性95 °C 30 s;变性95 °C 15 s,60 °C 30 s,循环40次。在RT-qPCR扩增结束后,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示Iba-1 mRNA、iNOS mRNA相对表达量。引物序列由广西博裕生物科技有限公司设计合成,引物序列见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')	扩增产物长度/bp
Iba-1	上游引物:GGATCAACAAGCAATTCTCGA	187
	下游引物:CTCTTCAGCTCTAGGTGGTCTT	
iNOS	上游引物:CAACAGGAACCTACCAGCTACT	253
	下游引物:AGCCTGAAGTCATGTTGCCG	
β -actin	上游引物:CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	287
	下游引物:TGAGGTCAATGAAGGGTCGT	

1.6.5 Western blotting法检测黑质Iba-1、iNOS的蛋白表达水平 于实验第20天,将3组小鼠脱颈处死($n=3$),置于冰上剖取出含黑质的脑组织,取20 mg左右含黑质的脑组织,按1:10质量的比例加入RIPA裂解液后充分匀浆至无明显颗粒物,4 °C,离心半径10 cm,12 000 r/min,离心20 min后吸取上清液再次离心得到黑质的总蛋白上清液,BCA法测定上清液的蛋白浓度。按1:4的体积加入5X loading buffer进行蛋白变性后加入裂解液将蛋白浓度调整至6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,取等体积的蛋白样本进行SDS-PAGE电泳,湿转至PVDF膜,TBST洗膜4次×7 min,快速封闭液封闭20 min,TBST洗膜4次×7 min,分别加入Iba-1一抗

(1:1 000)、iNOS一抗(1:1 600)后4℃孵育过夜,TBST洗脱4次×7 min,HRP抗兔IgG进行室温孵育1 h,TBST洗膜4次×7 min,在PVDF膜上滴加ECL化学发光底物曝光,全自动化学发光成像分析系统显影成像,拍照并保存图像,检测黑质中Iba-1、iNOS蛋白表达水平。利用ImageJ图像分析软件对Iba-1和iNOS的目的条带进行灰度值分析,再以“相对蛋白定量=目的蛋白的灰度值/内参的灰度值”公式计算Iba-1和iNOS蛋白表达相对定量。

1.6.6 ELISA检测纹状体细胞因子(TNF- α 、IL-1 β)含量水平于实验第20天,将3组小鼠脱颈处死($n=3$),置于冰上取出纹状体,按照1:9的比例加入PBS制备组织匀浆液,4℃,离心半径10 cm,12 000 r/min,离心15 min后取上清液,采用双抗夹心法严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作,检测细胞因子TNF- α 、IL-1 β 的含量水平。

1.7 统计学方法采用SPSS 23.0软件进行统计分析,计量资料以“均数±标准差”($\bar{x}\pm s$)表示。对实验第19天的爬杆实验资料和第5天的旷场实验资料采用非参数检验的统计学方法,多组间比较采用Kruskal-Wallis H 检验。对实验第0天和实验第5天的爬杆实验资料、实验第0天和实验第19天的旷场实验资料、DA含量检测结果、Iba-1 mRNA和iNOS mRNA相对表达量检测结果、Iba-1和iNOS的蛋白表达水平检测结果采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多组间数据采用Least Significant Difference法进行比较。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 五藤定神汤对小鼠运动功能的影响实验第0天,3组小鼠的爬杆时间、旷场实验路程和旷场实验平均移动速度比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。实验第5天,与空白组小鼠比较,模型组和干预组小鼠爬杆时间明显延长($P<0.01$)、旷场路程缩短($P<0.01$)、旷场平均移动速度下降($P<0.01$)。实验第19天,与空白组比较,模型组小鼠爬杆时长、旷场总路程、旷场平均移动速度均有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,干预组小鼠爬杆时间明显缩短($P<0.01$),旷场总路程明显增加($P<0.01$),旷场平均移动速度明显提高($P<0.01$)。(见表2~4)

表2 爬杆时间 ($\bar{x}\pm s$, s)

组别	<i>n</i>	实验第0天	实验第5天	实验第19天
空白组	12	5.616±0.761	4.938±1.062	5.248±0.670
模型组	12	5.604±0.777	11.508±2.504 ^a	11.586±2.132 ^a
干预组	12	5.969±0.621	12.484±2.488 ^a	6.110±0.915 ^b
检验统计量		$F=0.988$	$F=44.642$	$H=25.200$
<i>P</i>		0.383	0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$ 。

表3 旷场实验总路程结果 ($\bar{x}\pm s$, m)

组别	<i>n</i>	实验第0天	实验第5天	实验第19天
空白组	12	15.929±3.950	13.328±3.813	11.139±2.590
模型组	12	15.171±4.834	2.162±1.786 ^a	2.510±1.544 ^a
干预组	12	15.732±4.185	2.007±1.762 ^a	7.405±2.623 ^{ab}
检验统计量		$F=0.099$	$H=23.353$	$F=42.208$
<i>P</i>		0.906	0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$ 。

表4 旷场实验平均移动速度结果 ($\bar{x}\pm s$, m/s)

组别	<i>n</i>	实验第0天	实验第5天	实验第19天
空白组	12	0.053±0.013	0.044±0.013	0.037±0.008
模型组	12	0.051±0.016	0.007±0.006 ^a	0.008±0.005 ^a
干预组	12	0.053±0.014	0.007±0.006 ^a	0.025±0.009 ^{ab}
检验统计量		$F=0.107$	$H=23.436$	$F=42.875$
<i>P</i>		0.899	0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$ 。

2.2 五藤定神汤对MPTP模型小鼠黑质TH和黑质小胶质细胞M1型标志物(Iba-1、iNOS)表达水平的影响免疫荧光检测显示,模型组小鼠TH表达明显低于空白组;干预组小鼠TH阳性神经元数量较模型组增加,但仍少于空白组(比例尺500 μ m)(见图1)。模型组小鼠iNOS表达明显高于空白组,干预组小鼠iNOS表达略低于模型组,稍高于空白组(比例尺250 μ m)。(见图2)

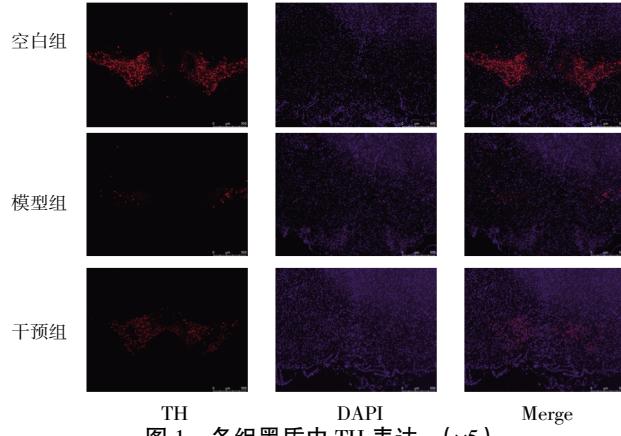


图1 各组黑质中 TH 表达 (×5)

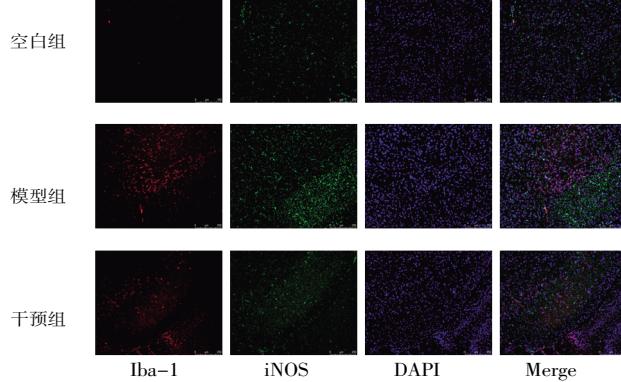


图2 各组黑质中 Iba-1、iNOS 表达 (×10)

2.3 五藤定神汤对MPTP模型小鼠纹状体DA含量的影响与空白组比较,模型组小鼠纹状体DA含量显著降低($P<0.01$),说明造模成功;与模型组比较,干预组小鼠纹状体DA含量显著升高($P<0.05$)。(见表5)

表5 纹状体 DA 含量 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	DA含量/(ng/g)
空白组	3	218.828±10.410
模型组	3	16.517±7.197 ^a
干预组	3	43.348±14.691 ^{ab}
<i>F</i>		289.030
<i>P</i>		0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.4 五藤定神汤对MPTP模型小鼠纹状体Iba-1 mRNA、iNOS mRNA相对表达量的影响 与空白组比较,模型组小鼠纹状体Iba-1 mRNA、iNOS mRNA相对表达量均显著上升($P<0.01$),干预组小鼠纹状体Iba-1 mRNA、iNOS mRNA相对表达量均显著上升($P<0.05$);与模型组比较,干预组小鼠纹状体Iba-1 mRNA、iNOS mRNA相对表达明显下降($P<0.01$)。(见表6)

表6 纹状体 Iba-1 mRNA、iNOS mRNA 相对表达量 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Iba-1 mRNA	iNOS mRNA
空白组	3	1.004±0.092	1.130±0.426
模型组	3	1.742±0.132 ^a	3.259±0.305 ^a
干预组	3	1.205±0.028 ^{b,c}	2.094±0.320 ^{b,d,c}
F		49.082	27.179
P		0.000	0.001

注:与空白组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与模型组比较,^c $P<0.01$ 。

2.5 五藤定神汤对MPTP模型小鼠黑质Iba-1、iNOS蛋白表达水平的影响 与空白组比较,模型组小鼠黑质Iba-1、iNOS蛋白表达显著上调($P<0.01$),干预组小鼠黑质Iba-1、iNOS蛋白表达均显著上调($P<0.05$);与模型组比较,干预组小鼠黑质Iba-1、iNOS蛋白表达下调($P<0.05$)。(见图3、表7)

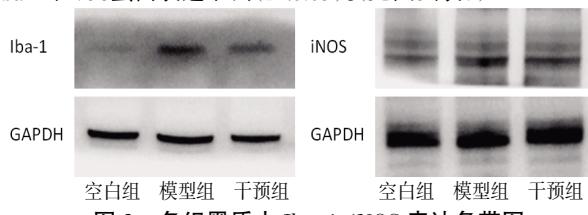


图3 各组黑质中 Iba-1、iNOS 表达条带图

表7 各组黑质中 Iba-1、iNOS 蛋白表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Iba-1	iNOS
空白组	3	1.000±1.695	1.000±0.251
模型组	3	2.449±0.544 ^a	1.803±0.078 ^a
干预组	3	1.765±0.093 ^{b,c}	1.442±0.119 ^{b,c}
F		14.174	17.431
P		0.005	0.003

注:与空白组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与模型组比较,^c $P<0.05$ 。

2.6 五藤定神汤对MPTP模型小鼠黑质TNF-α、IL-1β含量水平的影响 与空白组比较,模型组小鼠黑质TNF-α、IL-1β含量均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,干预组小鼠黑质TNF-α、IL-1β含量均显著降低($P<0.01$)。(见表8)

表8 各组黑质中 TNF-α、IL-1β 的含量水平 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TNF-α	IL-1β
空白组	3	23.715±1.086	82.248±18.731
模型组	3	409.964±74.002 ^a	286.585±43.118 ^a
干预组	3	41.834±13.046 ^b	103.548±14.389 ^b
F		75.705	46.984
P		0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$ 。

3 讨论

PD是以黑质-纹状体DA能神经元丢失为主要病理改变的神经退行性病变。近年来的研究表明,MG的炎性活化是导致PD黑质-纹状体DA能神经元丢失的重要环节^[1]。MG是中枢神经系统常驻的巨噬细胞,根据其激活状态,可分化为促炎(M1)或抗炎(M2)表型^[2]。活化后的M1表型释放多种促炎因子(如IL-1、TNF-α、IL-6、iNOS、CD86等)参与DA神经炎症和变性,M2表型释放抑炎因子等作用则被抑制^[10]。已有不少研究发现,通过不同途径降低MG炎性活化,均可减轻PD模型DA神经元的损伤^[7,10-14];相比之下,诱发MG炎性活化,可加重PD模型的临床症状和DA能神经元损害^[15]。本研究中,经五藤定神汤治疗后干预组不仅运动障碍较模型组有所改善,黑质TH表达、纹状体多巴水平亦明显提高,显示该方在改善MPTP模型神经损害方面的有效性。同时,经治疗后,干预组黑质-纹状体iNOS水平相较模型组明显下降,炎性细胞因子TNF-α、IL-1β相应显著减少,提示MPTP模型经五藤定神汤干预后M1型MG活化受到抑制。

在PD脑中观察到的神经炎症反应表现为iNOS的升高,并且引起炎症因子的升高^[16]。抑制iNOS作用可以对酪氨酸羟化酶和运动能力有很好的保护作用^[17]。TNF-α可引起神经炎症^[18-19],抑制其作用可减少神经炎症发作^[20]。IL-1β成为中枢神经系统中引起神经炎症的主要调节因子^[21]。有研究证明,IL-1β和TNF-α可影响疾病的发展^[22],PD患者体内TNF-α升高^[14]。在本研究中,干预组iNOS表达低于模型组,说明五藤定神汤对小胶质细胞的M1极化有一定的抑制作用。IL-1β和TNF-α的变化表明五藤定神汤对其起到抑制作用,间接抑制MG的极化作用,但在本研究中,五藤定神汤减少iNOS激活的具体途径尚未可知,有待后续探究。

Iba-1全称为离子钙结合衔接分子1,为MG活化的特异性标志物。PD会引起大量的Iba-1活化^[23-24]。在本研究中,干预组中Iba-1表达稍低于模型组,说明五藤定神汤参与了抑制MG表型活化的过程,但其具体的信号通路作用有待日后再进一步研究。

五藤定神汤是本课题组根据“巧钩主神”“三道两路”等壮医基础理论以及多年临床观察拟定的、治疗帕金森病的特色壮药方,以“祛风毒、益嘘勒,调巧钩、通两路”为主要治法。方中钩藤性凉,味甜、苦;夜交藤性平,味甜。二者皆能祛风毒、调巧钩、通火路。鸡血藤能补血祛风,长于通调火路;宽筋藤长于通调龙路;扶芳藤主益气血、畅两路。五藤在方中重用,共为主药^[25-26]。白芍养血柔肝敛阴,共为帮药,具增强主药之功效。甘草调和诸药,为带药。现代药理学研究表明,五藤定神汤的多种药物有效成分可介导调节免疫应答,发挥抗炎作用。例如,钩藤可以抑制TLR4/NF-κB/NLRP3通路的激活,缓解PD小鼠模型运动功能障碍,保护由MPTP诱发的神经元毒性和DA能神经毒性^[27],抑制TLR4等炎症受体的表达,减轻神经炎症^[28]。首乌藤活性成分2,3,5,4-四羟基芪-2-O-β-D-葡萄糖苷(TSG)^[29]及宽筋藤均可减少血清促炎因子TNF-α、IL-1β、IL-6^[30]。但目前少有研究直接探索上述中壮药对黑质-纹状体MG炎性活化、DA能神经丢失的联合作用。本研究提供

了这一方面证据的补充。

综上所述,五藤定神汤能够改善MPTP模型运动障碍症状,抑制黑质-纹状体M1型小胶质细胞炎性活化,减少炎性细胞因子分泌,减轻黑质-纹状体多巴胺能神经元丢失。本实验为临床运用五藤定神汤治疗帕金森病提供了理论依据,但本研究仅观察五藤定神汤对MPTP模型黑质-纹状体M1型MG的影响,未进一步研究具体的信号通路机制。这可作为后续的研究方向进行探究。此外,五藤定神汤诱导MG炎症可塑性分化的机制,尚有待深入研究。基于此,本课题组日后将进一步探索该壮药方对MG的调控机制,以及对多巴胺能神经元的保护作用。

参考文献

- [1] SU D N, CUI Y S, HE C Z, et al. Projections for prevalence of Parkinson's disease and its driving factors in 195 countries and territories to 2050: Modelling study of Global Burden of Disease Study 2021[J]. BMJ, 2025, 388:e080952.
- [2] WANG L H, TIAN S, RUAN S S, et al. Neuroprotective effects of cordycepin on MPTP-induced Parkinson's disease mice via suppressing PI3K/AKT/mTOR and MAPK-mediated neuroinflammation[J]. Free Radic Biol Med, 2024, 216:60–77.
- [3] LIU L, JIANG L, ZHANG J L, et al. Imperatorin inhibits oxidative stress injury and neuroinflammation via the PI3K/AKT signaling pathway in the MPTP-induced Parkinson's disease mouse[J]. Neuroreport, 2024, 35(3):175–184.
- [4] KIMD Y, LEEMY H, PARKJ S, et al. RIPK1 regulates microglial activation in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and MPTP-induced Parkinson's disease mouse models[J]. Cells, 2023, 12(3):417.
- [5] PARKJ E, LEEMY H, PARKJ S, et al. Anti-inflammatory and neuroprotective mechanisms of GTS-21, an α₇ nicotinic acetylcholine receptor agonist, in neuroinflammation and Parkinson's disease mouse models[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8):4420.
- [6] PENG S J, CHEN Y, WANG R, et al. Z-ligustilide provides a neuroprotective effect by regulating the phenotypic polarization of microglia via activating Nrf2-TrxR axis in the Parkinson's disease mouse model[J]. Redox Biol, 2024, 76:103324.
- [7] YU H Y, CHANG Q, SUN T, et al. Metabolic reprogramming and polarization of microglia in Parkinson's disease: Role of inflammasome and iron[J]. Ageing Res Rev, 2023, 90:102032.
- [8] ISIKS, YEMANKIYAKB, AKBAYIRR, et al. Microglia mediated neuroinflammation in Parkinson's disease [J]. Cells, 2023, 12(7):1012.
- [9] ZOU Y H, HUANG T, PANG A L, et al. Electroacupuncture regulates glucose metabolism by inhibiting SGLT1 levels, inhibiting microglial polarization, and alleviating Parkinson's disease[J]. Exp Gerontol, 2024, 196: 112558.
- [10] LV J, ZHU J, WANG P H, et al. Artemisinin exerts a protective effect in the MPTP mouse model of Parkinson's disease by inhibiting microglial activation via the TLR4/Myd88/NF-κB pathway[J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(4):1012–1023.
- [11] WU Q, WANG M D, CHEN W, et al. Daidzein exerts neuroprotective activity against MPTP-induced Parkinson's disease in experimental mice and lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2022, 36(2):e22949.
- [12] LIUX L, FAN L, YUEB H, et al. Saikosaponin A mitigates the progression of Parkinson's disease via attenuating microglial neuroinflammation through TLR4/MyD88/NF-κB pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2023, 27(15):6956–6971.
- [13] RUAN S S, XIE J Q, WANG L H, et al. Nicotine alleviates MPTP-induced nigrostriatal damage through modulation of JNK and ERK signaling pathways in the mice model of Parkinson's disease[J]. Front Pharmacol, 2023, 14:1088957.
- [14] 陈梓誵,蔡娟,高垣,等.针灸改善帕金森病非运动症状的机制临床研究进展[J].中医药导报,2023,29(11):113–117.
- [15] CHENGY Y, CHENB Y, BIANG L, et al. Programmed death -1 deficiency aggravates motor dysfunction in MPTP model of Parkinson's disease by inducing microglial activation and neuroinflammation in mice[J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(4):2642–2655.
- [16] DE JAGER L, VIDIGALC B, DE CAMPOS B, et al. Role of the iNOS isoform in the cardiovascular dysfunctions of male rats with 6-OHDA-induced Parkinsonism[J]. Nitric Oxide, 2023, 134–135:49–60.
- [17] 李雅鑫,徐帆,秦丽娟,等.尼莫地平对帕金森病模型小鼠黑质iNOS和COX-2表达的抑制作用[J].中风与神经疾病杂志,2016,33(9):799–801.
- [18] ULLAH S, PARKT J, PARKJS, et al. Ambroxol attenuates detrimental effect of LPS-induced Glia-mediated neuroinflammation, oxidative stress, and cognitive dysfunction in mice brain[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1494114.
- [19] LIUT W, CHENC M, CHANGK H. Biomarker of neuroinflammation in Parkinson's disease[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8):4148.
- [20] DELVADIA P, DHOTE V, MANDLOIAS, et al. Dual GLP-1 and GIP agonist tirzepatide exerted neuroprotective action in a Parkinson's disease rat model[J]. ACS Chem Neurosci, 2025, 16(5):818–825.

(下转第28页)

- and therapeutic avenues[J]. Apoptosis, 2023, 28(7-8):943-957.
- [16] STROPEK A, WILKINSH M. Amyloid precursor protein and mitochondria[J]. Curr Opin Neurobiol, 2023, 78:102651.
- [17] TCHEKALAROVA J, TZONEVA R. Oxidative stress and aging as risk factors for Alzheimer's disease and Parkinson's disease: The role of the antioxidant melatonin[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3):3022.
- [18] BAI R R, GUO J N, YEX Y, et al. Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease[J]. Ageing Res Rev, 2022, 77:101619.
- [19] ANZOVINO A, CANEPA E, ALVES M, et al. Amyloid beta oligomers activate death receptors and mitochondria-mediated apoptotic pathways in cerebral vascular smooth muscle cells; protective effects of carbonic anhydrase inhibitors[J]. Cells, 2023, 12(24):2840.
- [20] LALIER L, MIGNARD V, JOALLANDM P, et al. TOM20-mediated transfer of Bcl2 from ER to MAM and mitochondria upon induction of apoptosis[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(2):182.
- [21] ALHARBIK M, ALSHEHRIS A, ALMARWANIW A, et al. Effects of cycloastragenol on Alzheimer's disease in rats by reducing oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. Curr Alzheimer Res, 2024, 21(2):141-154.
- [22] YU Z Y, JIANG N, SU W R, et al. Necroptosis: A novel pathway in neuroinflammation[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:701564.
- [23] FONTANA F, GIANNITTI G, MARCHESI S, et al. The PI3K/Akt pathway and glucose metabolism: A dangerous liaison in cancer[J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(8):3113-3125.
- [24] VERMA K, JAISWAL R, PALIWAL S, et al. An insight into PI3k/Akt pathway and associated protein-protein interactions in metabolic syndrome: A recent update[J]. J Cell Biochem, 2023, 124(7):923-942.
- [25] XU J W, LI Y, KANG M L, et al. Multiple forms of cell death: A focus on the PI3K/AKT pathway[J]. J Cell Physiol, 2023, 238(9):2026-2038.
- [26] KHEZRIM R, GHASEMNEJAD-BERENJI M, MOLO ODSOURI D. The PI3K/AKT signaling pathway and caspase-3 in Alzheimer's disease: Which one is the beginner?[J]. J Alzheimers Dis, 2023, 92(2):391-393.
- [27] CUI D Q, LIU H X, CAO L L, et al. MST1, a novel therapeutic target for Alzheimer's disease, regulates mitochondrial homeostasis by mediating mitochondrial DNA transcription and the PI3K-Akt-ROS pathway[J]. J Transl Med, 2024, 22(1):1056.
- [28] 彭俊,张杰.中医药通过PI3K/Akt信号通路防治阿尔茨海默病的研究进展[J].中医药导报,2022,28(9):105-109.
- [29] WANG J W, ZHANG J Y, YUZ L, et al. The roles of dietary polyphenols at crosstalk between type 2 diabetes and Alzheimer's disease in ameliorating oxidative stress and mitochondrial dysfunction via PI3K/Akt signaling pathways[J]. Ageing Res Rev, 2024, 99:102416.

(收稿日期:2025-05-19 编辑:时格格)

(上接第6页)

- [21] PAN T, XIAO Q, FANHJ, et al. Wuji Yanzong Pill relieves MPTP-induced motor dysfunction and neuron loss by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation[J]. Metab Brain Dis, 2023, 38(7):2211-2222.
- [22] TANSEY M G, WALLINGS R L, HOUSER M C, et al. Inflammation and immune dysfunction in parkinson disease[J]. Nat Rev Immunol, 2022, 22(11):657-673.
- [23] 胡梦妮,张小蕾,荣臻,等.电针对MPTP诱导帕金森病小鼠FoXO1/NLRP3通路介导神经炎症的影响[J].实用医学杂志,2024,40(11):1494-1499.
- [24] 崔拓拓,曹俊岭,欧阳竞峰,等.大定风珠对帕金森病模型小鼠脑黑质小胶质细胞活化及TLR4/MyD88/NF-κB信号通路的影响[J].中医杂志,2023,64(9):930-938.
- [25] 黄瑞松.壮药选编-上册[M].南宁:广西科学技术出版社,2015.
- [26] 黄瑞松.壮药选编-下册[M].南宁:广西科学技术出版社,2019.
- [27] ZHANG C X, ZHOU J Y, ZHUO L X, et al. The TLR4/NF-κB/NLRP3 and Nrf2/HO-1 pathways mediate the neuroprotective effects of alkaloids extracted from Uncaria rhynchophylla in Parkinson's disease[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 333:118391.
- [28] ZHANG C X, XUE Z, ZHU L M, et al. Rhynchophylline alleviates neuroinflammation and regulates metabolic disorders in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Food Funct, 2023, 14(7):3208-3219.
- [29] HE X L, LIU J Y, LONG G H, et al. 2, 3, 5, 4'-Tetrahydroxystilbene -2-O-β-D-glucoside, a major bioactive component from Polygoni multiflori Radix (Heshouwu) suppresses DSS induced acute colitis in BALB/c mice by modulating gut microbiota[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 137:111420.
- [30] 吴凤荣,曾聪彦,戴卫波,等.宽筋藤醇提物对佐剂性关节炎模型大鼠的影响[J].中医药导报,2018,24(7):37-39,47.

(收稿日期:2025-04-21 编辑:时格格)