毕殿勇,王利,何竹青,等. 复方地黄颗粒对帕金森病模型大鼠小胶质细胞激活及神经行为的干预研究［J］. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 749-757.
Bi DY, Wang L, He ZQ, et al. Effects of compound Rehmannia Granule on microglia activation and neurobehavior in Parkinson's disease model rats［J］. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 749-757.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.006

复方地黄颗粒对帕金森病模型大鼠小胶质细胞激活及神经行为的干预研究

毕殿勇,王利,何竹青,杨玉芳,何建成*

(上海中医药大学基础医学院,上海　201203)

【摘要】　目的　探讨复方地黄颗粒对不同模型大鼠黑质纹状体小胶质细胞激活、炎症因子表达及神经行为学的干预作用。**方法**　采用黑质两点立体定位注射术结合阿扑吗啡腹腔注射法分别构建 6-羟基多巴胺(6-OHDA)、脂多糖(LPS)模型大鼠。实验大鼠被分为假手术组、模型组、复方地黄颗粒干预组。药物干预组大鼠给予 7 g/(kg·d)的复方地黄颗粒混悬液灌胃,假手术组及模型组大鼠以等量体积生理盐水灌胃(每只 2 mL),每日 1 次,连续 6 周。分别在造模成功后(简称 0 周)及灌胃干预第 2、4、6 周观察、记录阿扑吗啡诱导的自发旋转行为。ELISA 法检测黑质纹状体 TNF-α 等炎症因子表达水平。Western Blot 法检测黑质纹状体 Iba1 等蛋白表达水平。**结果**　(1)神经行为学:与模型组(6-OHDA 组;LPS 组)比较,复方地黄颗粒干预组大鼠在第 4、6 周自发旋转行为显著减少($P< 0.05$ 或 $P< 0.001$)。(2)ELISA 结果:与模型组比较,复方地黄颗粒干预组大鼠黑质纹状体 TNF-α 等促炎因子含量表达显著降低($P< 0.01$ 或 $P< 0.001$)。(3)Western Blot 结果:与模型组比较,复方地黄颗粒干预组大鼠黑质纹状体 Iba1 等促炎相关蛋白含量表达显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。**结论**　复方地黄颗粒通过抑制模型大鼠黑质纹状体小胶质细胞激活,下调 TNF-α 等炎症因子表达等机制抑制模型大鼠自发旋转行为。

【关键词】　复方地黄颗粒;帕金森病;小胶质细胞;炎症因子
【中图分类号】Q95-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1005-4847(2021) 06-0749-09

Effects of compound Rehmannia Granule on microglia activation and neurobehavior in Parkinson's disease model rats

BI Dianyong, WANG Li, HE Zhuqing, YANG Yufang, HE Jiancheng*

(Basic Medical College of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)
Corresponding author: HE Jiancheng. E-mail: hejc8163@163.com

【Abstract】　Objective　To study the effect of compound Rehmannia granule on the activation of microglia in the substantia nigra and striatum, the expression of inflammatory factors, and neurobehavior in different rat models. **Methods**　We established a 6-hydroxydopamine (6-ODHA) and a lipopolysaccharide (LPS) animal model by administering a two-point stereotactic injection into the substantia nigra, combined with an intraperitoneal injection of apomorphine. Rats were divided into sham, model (6-ODHA and LPS model groups), and compound Rehmannia granule intervention groups (DH + 6-OHDA and DH + LPS groups). Rats in the drug intervention group were given 7 g/(kg·d) compound Rehmannia

[**基金项目**]国家自然科学基金面上项目(81573899),上海市生物医药科技支撑专项项目(20S21901700),上海市健康辨识与评估重点实验室(21DZ2271000)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China (81573899), Shanghai Biomedical Science Technology Support Project (20S21901700), Shanghai Key Laboratory of Health Identification and Assessment(21DZ2271000).
[**作者简介**]毕殿勇(1975—),男,讲师,研究方向:中医药治疗神经退行性疾病实验研究。Email: bdy965199@163.com
[**通信作者**]何建成(1966—),男,教授,博士研究生导师,研究方向:中医药治疗神经退行性疾病实验研究。Email: hjc8163@163.com

granule suspension by gavage, whereas rats in the sham and model groups were given 2 mL saline by gavage once a day for 6 weeks. Spontaneous rotation behavior induced by apomorphine was observed and recorded after the model was established (abbreviation for 0 weeks) as well as at 2, 4, and 6 weeks after intragastric administration. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) and other inflammatory factors in the substantia nigra and striatum were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western Blot was used to detect the expression of ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) and other proteins in the substantia nigra and striatum. **Results** (1) For neuroethology, compared with the model groups (i.e., 6-OHDA and LPS groups), the spontaneous rotation behavior of rats in the compound Rehmannia granule intervention group was significantly lower at 4 and 6 weeks ($P< 0.05$ and $P< 0.001$, respectively). (2) The ELISA result showed that compared with the model group, TNF-α and other pro-inflammatory factors in the substantia nigra and striatum of rats in the compound Rehmannia granule intervention group were significantly lower ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively). (3) Western Blot result showed that compared with the model group, the expression of Iba1 and other pro-inflammatory proteins in the substantia nigra and striatum in the compound Rehmannia granule group were significantly lower ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively). **Conclusions** Compound Rehmannia granule intervention inhibits the activation of microglia in the substantia nigra and striatum, downregulates the expression of TNF-α and proinflammatory factors, and attenuates the spontaneous rotation behavior of model rats.

【**Keywords**】 compound Rehmannia granule; Parkinson's disease; microglia; inflammatory factors
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

帕金森病(Parkinson's disease,PD)属中老年常见慢性、神经退行性疾病,其主要病理特征为黑质致密部多巴胺能神经元进行性丢失、大脑皮层神经元内 α-突触核蛋白(α-synuclein,α-syn)聚集及路易小体(lewy bodies,LBs)形成,伴有黑质致密部酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)阳性神经元及神经纤维大量丢失[1-2]。

PD 病因及发病机理尚不十分明确。相关研究发现,氧化应激、线粒体功能障碍及小胶质细胞过度激活所致的黑质致密部多巴胺能神经元内游离型铁离子过度沉积与 PD 发病密切相关[3-4]。本课题组长期临床实践证实,复方地黄颗粒在改善 PD 患者的抑郁、焦虑、睡眠障碍及开-关现象等方面疗效确切[5-6]。前期研究表明,复方地黄颗粒可通过抑制糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)基因、蛋白表达,促进 p-GSK-3β(phospho S9)蛋白表达等作用抑制因 α-syn 错误聚集所致的黑质多巴胺能神经元凋亡[7]。有研究证实,模型小鼠黑质致密部小胶质细胞可被脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)大量激活,其激活标志物离子化钙结合适配分子 1(ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba1)及相关炎症因子 IL-1β、TNF-α 表达水平显著升高[8-9]。本研究分别制备 LPS 和 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine,6-OHDA)实验模型大鼠,探讨复方地黄颗粒对两种实验模型大鼠黑质纹状体小胶质细胞激活及神经行为学的干预作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

100 只 8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠,体重(180 ± 20)g,购自上海中医药大学实验动物中心【SCXK(沪)2018-0006】。以上动物均饲养于上海中医药大学实验动物中心实验室【SYXK(沪)2018-0008】。本实验研究已通过上海中医药大学实验动物伦理审查委员会批准(PZSHUTCM200911001)。饲养条件:湿度 60% ~ 65%,温度 23 ~ 25℃,自动光-暗控制(LD12:12,即 7:00 ~ 19:00),自由采食、饮水。实验操作地点:上海中医药大学实验动物中心。

1.1.2 药物

复方地黄颗粒由熟地黄、丹参、钩藤、石菖蒲、全蝎、杭白芍、珍珠母 7 味药物组方,委托国家中药工程技术研究中心制作,按照既定的工艺流程制备浸膏粉,置于阴冷通风处,药物避光包装。动物给药剂量折算标准参照孙瑞元《定量药理学》所述计算每只大鼠每日用药剂量,即每只标准体重大鼠每日灌胃剂量公式 DB = DA × KB/KA。DA 为标准体重常人用药剂量,KB 为大鼠剂量折算系数(7),KA 为标准体重成人剂量折算系数(388),即大鼠每日灌胃药量 DB = DA × 7/388。

1.1.3 主要试剂与仪器

大鼠脑立体定位仪(型号 SN-3N,成茂公司,日本);10 μL 微量上样器(上海高鸽);微型颅骨钻

(上海奥尔科特生物科技有限公司);多功能酶标仪(型号 DENLEY DRAGON Wellscan MK3,Thermo 公司,美国);Western Blot 电泳仪(型号 043BR41664,Bio-Rad 公司,美国)。

ELISA 试剂盒 IL-1β(Lot:JL20884,上海将来实业股份有限公司);ELISA 试剂盒 IL-10(Lot:ER0135,上海威奥生物科技有限公司);ELISA 试剂盒 TNF-α(Lot:JL13202,上海将来实业股份有限公司);NF-κ Bp65 antibody Rabit(Lot:D14E12,CST 公司,美国);phospho-NF-κ Bp65 antibody Rabit(Lot:GR3204852-19,Abcam 公司,英国);酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH) antibody Rabit (Lot:58844S, CST 公司, 美国); GAPDH Antibody (Lot:10011065,Proteintech 公司);β-actin antibody(Lot:#0078629,Proteintech 公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(Lot:D110058-0100,上海生工);辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(Lot:D110087-0100,上海生工);离子钙接头蛋白抗体 1(ionized calcium binding adapter molecule antibody 1 Rabit,Iba1 antibody Rabit)(Lot:PTE0556,WAKQ 公司,日本);BCA Reagent A(Lot:#A4801 A,碧云天公司);BCA Reagent B(Lot:#A1101B,碧云天公司);SDS-PAGE 凝胶配备试剂盒(Lot:#102919191106,碧云天公司);PVDF Transfer Membranes (0.22 μmol/L&0.45 μmol/L, Immobilon-p Millipore, Bedford, MA, 美国); ECL 化学发光液 (Lot: #1907702,Immobilon-p Millipore,Bedford,MA,美国);戊巴比妥钠(Lot:WS20130112,上海中西药业股份有限公司);6-羟基多巴胺(6-OHDA)(Lot:#MKCD0817, Sigma 公司, 美国); LPS (Lot: #068M4067 V,Sigma 公司,美国);阿扑吗啡(APO)(Lot: WKQ4315, WKQ 公司, 日本); 抗坏血酸(Vitamin C)(Lot:#311403,Selleck 公司,美国)。

1.2　方法

所有实验大鼠术前适应性喂养 1 周,取无自发旋转行为的健康大鼠纳入研究范围。

1.2.1　LPS 模型大鼠构建

采用黑质两点立体定位术将 LPS(体积为每只 2 μL,浓度为 2.5 μg/μL,生理盐水配制,现配现用)注射于右侧黑质致密部制备 LPS 大鼠模型。

1.2.2　6-OHDA 模型大鼠构建

采用黑质两点立体定位术将 3 μL 6-OHDA 溶液(浓度为 2 μg/μL,0.2%的 Vitamin C 现配)注射于右侧黑质致密部,制备 6-OHDA 大鼠模型。

1.2.3　手术步骤

大鼠麻醉(1%戊巴比妥钠,40 mg/kg,腹腔注射),头部去毛备皮。将其头部牢固固定于脑立体定位仪,使颅骨前后位于同一水平面,碘伏常规消毒术野皮肤。切开皮肤,暴露前囟至两耳之间位置,仔细止血,剥离骨膜。

参照包新民主编《脑立体定位图谱》寻找、标记前囟中线位置。标记右侧黑质注射位点:(1)第一点坐标在前囟后 5.2 mm,颅顶中线右侧 1 mm,硬膜下 9 mm;(2)第二点坐标在前囟后 5.2 mm,颅顶中线右侧 1.2 mm,硬膜下 8.5 mm。

用颅骨钻轻轻钻透颅骨直至硬脑膜,微量上样器吸取适量造模药物,将其垂直固定于脑立体定位仪,缓慢匀速进针。当针头到达预定位置后以 1 μL/min 的速度匀速推注药物,注射完毕留针 5 min,缓慢退针。假手术组大鼠按体重标准注射同体积生理盐水,术毕消毒并缝合皮肤切口,将大鼠放回笼具。

1.2.4　分组及药物干预

术后第 2 周,腹腔注射 APO(0.5 mg/kg,0.1 mL/100 g)诱导、记录大鼠自发旋转行为,将旋转圈数大于每分钟 7 圈者视为为模型成功标志。

(1)LPS 实验模型动物分组:随机数字表法将 LPS 实验模型大鼠分为 2 组:LPS 模型组(简称 LPS 组),复方地黄颗粒干预组(简称 DH+LPS 组)。另纳入假手术组(简称 sham 组),每组大鼠 8 只。

(2)6-OHDA 实验模型动物分组:随机数字表法将 6-OHDA 实验模型大鼠分为 2 组:6-OHDA 模型组(简称 6-OHDA 组)、复方地黄颗粒干预组(简称 DH+6-OHDA 组),另纳入假手术组(sham 组),每组大鼠 8 只。

(3)药物干预:假手术组、LPS、6-OHDA 组模型大鼠用等量体积生理盐水灌胃,其余各组大鼠以复方地黄颗粒灌胃(浓度 1 g/mL,剂量 7 g/kg),每日 1 次,共计 6 周。

1.2.5　神经行为学检测及取材

分别于造模成功时(简称 0 周)和灌胃干预的第 2、4、6 周观察、记录 APO 诱导的大鼠自发旋转行为。取材前 24 h 大鼠禁食,不禁水,1%戊巴比妥钠麻醉并脱臼处死大鼠,在冰上迅速断头取脑,分离其黑质-纹状体,液氮保存,迅速移至-80℃冰箱。

1.2.6 ELISA 法检测大鼠黑质纹状体组织匀浆液 TNF-α、IL-1β、IL-10 的含量表达

组织匀浆液制备：取 100 mg 黑质纹状体组织加入 1 mL 生理盐水内，低温超声震荡，4℃条件下以低温高速离心机（12 000 r/min）离心，取其上清液－80℃冰箱保存。ELISA 具体实验操作步骤参照生产商说明书。

1.2.7 Western Blot 技术检测各组大鼠黑质纹状体 TH、NF-κ Bp65、p-NF-κ Bp65、Iba1 的蛋白表达水平

RIPA 法提取黑质纹状体组织蛋白，BCA 法蛋白定量。根据分子量不同配置 8% 及 10% 的 SDS-PAGE 凝胶。电泳、蛋白转膜及抗体孵育：电泳，80 V 30 min，110 V 90 min；转膜，200 mA，1 h；5% BSA 封闭，室温，摇床 2 h；一抗孵育：GAPDH Antibody（1∶1000）；NF-κ Bp65 Antibody 溶液配制（1∶1000）；p-NF-κ Bp65 Antibody 溶液配制（1∶1000）；tyrosine hydroxylase Antibody（1∶1000）；ionized calcium bindingadaptor molecule−1 Antibody（1∶500）；β-actin Antibody（1∶2000）；抗体孵育：4℃摇床过夜，1×TBST 洗涤 3 次，每次 5 min；二抗孵育：HRP * Goat anti-Rabbit IgG（H+L）溶液配制（1∶5000）：HRP * Goat anti-Mouse IgG（H+L）（1∶5000）；室温，摇床 2 h，1×TBST 洗涤 3 次，每次 5 min。

使用 ECL 化学发光剂于暗室内曝光显影，Imagej 图像分析软件分析目的蛋白条带灰度值，取样本组织蛋白灰度值与 GAPDH、β-actin 灰度值比值作对比，求得样本组织蛋白相对含量。

1.3 统计学分析

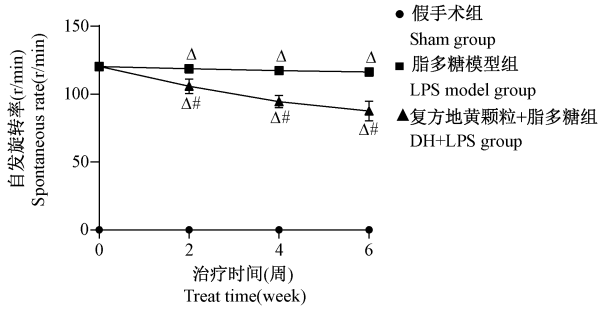
GraphPad Prism 8 软件处理所有实验数据，所有数据服均从正态分布，计量资料以平均值±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多组间实验数据比较采用单因素方差分析（One-Way ANOVA），组间两两比较采用 LSD/Dunett/SNK 法，统计结果以 P 值表示，$P < 0.05$ 表示组间存在统计学差异，$P < 0.01$ 表示组间存在显著性差异。

2 结果

2.1 神经行为学

2.1.1 复方地黄颗粒对 LPS 模型大鼠神经行为学的影响

由图 1 可见，与 sham 组比较，LPS 模型大鼠造模后成功后（图 1 所示 0 周）出现 APO 诱导的首尾衔接自发旋转行为，组间有显著性差异（$P < 0.001$）；与 LPS 组比较，DH+LPS 组大鼠在 2、4、6 周时的自发旋转圈数明显减少，组间有显著性差异（$P < 0.001$）。



注：与假手术组比较，$^{\Delta}P < 0.001$；与 LPS 模型组比较，$^{\#}P < 0.001$。

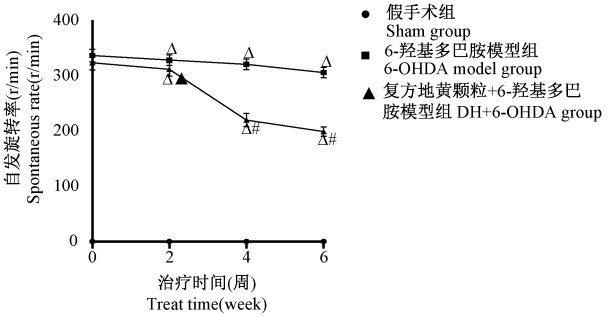
图 1 复方地黄颗粒对脂多糖模型大鼠神经行为学的影响

Note. Compared with sham group, $^{\Delta}P < 0.001$. Compared with LPS model group, $^{\#}P < 0.001$.

Figure 1 Effect of compound Rehmannia granules on neurobehavior of lipopolysaccharide model rats

2.1.2 复方地黄颗粒对 6-OHDA 模型大鼠神经行为学的影响

由图 2 可见，与 sham 组比较，6-OHDA 模型大鼠造模成功后（图 2 所示 0 周）出现 APO 诱导的首尾衔接自发旋转行为，组间有显著性差异（$P < 0.001$）；与 6-OHDA 组比较，DH+6-OHDA 组在 2、4、6 周时的自发旋转圈数明显减少，组间有显著性差异（$P < 0.05$ 或 $P < 0.001$）。



注：与假手术组相比，$^{\Delta}P < 0.001$；与 6-OHDA 模型组相比，$^{\blacktriangle}P < 0.05$，$^{\#}P < 0.001$。

图 2 复方地黄颗粒对 6−羟基多巴胺模型大鼠神经行为学的影响

Note. Compared with sham group, $^{\Delta}P < 0.001$. Compared with 6-OHDA model group, $^{\blacktriangle}P < 0.05$, $^{\#}P < 0.001$.

Figure 2 Effect of compound Rehmannia granules on neurobehavior of 6-hydroxydopamine model rats

2.2 复方地黄颗粒对各组大鼠黑质纹状体炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-10 含量表达的影响

2.2.1 复方地黄颗粒对 LPS 模型大鼠黑质纹状体炎症因子含量表达的影响

由表 1 可见，与 sham 组比较，LPS 组 IL-1β、TNF-α 表达水平显著升高，IL-10 表达水平显著降低，组间有显著性差异（$P < 0.001$）；与 LPS 组比较，DH+LPS 组 IL-1β、TNF-α 表达水平显著降低，IL-10 的表达水平显著升高，组间有显著性差异（$P < 0.01$ 或 $P < 0.001$）。

2.2.2　复方地黄颗粒对 6-OHDA 模型大鼠黑质纹状体炎症因子含量表达的影响

由表 2 可见，与 sham 组比较，6-OHDA 组 IL-1β、TNF-α 表达量显著升高，IL-10 表达水平显著降低，组间有显著性差异（$P < 0.001$）；与 6-OHDA 组比，DH+6-OHDA 组 IL-1β、TNF-α 显著降低，IL-10 表达水平显著升高，组间有显著性差异（$P < 0.001$）。

2.3　复方地黄颗粒对模型大鼠黑质纹状 NF-κ Bp65、p-NF-κ Bp65 蛋白表达的影响

由表 3、图 3 见，与 sham 组比较，6-OHDA 组及 LPS 组大鼠 NF-κ Bp65、p-NF-κ Bp65 表达水平显著升高，组间有显著性差异（$P < 0.05$，$P < 0.001$）；与 6-OHDA 组及 LPS 组相比较，DH+6-OHDA 及 DH+LPS 组 NF-κ Bp65、p-NF-κ Bp65 表达水平显著降低，组间有显著性差异（$P < 0.05$，$P < 0.001$）。

2.4　复方地黄颗粒对模型大鼠黑质纹状体 TH、Iba1 蛋白表达的影响

由表 4、图 4 可见，与 sham 组比较，LPS 组及 6-OHDA 组 Iba1 表达水平显著升高，TH 表达水平显著降低，组间有显著性差异（$P < 0.05$，$P < 0.001$）；与 6-OHDA 组及 LPS 组相比较，DH+6-OHDA 组及 DH+LPS 组 Iba1 表达水平显著降低，TH 表达水平显著升高，组间有显著性差异（$P < 0.05$，$P < 0.001$）。

表 1　复方地黄颗粒对 LPS 模型大鼠黑质纹状体炎症因子含量表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n=8$）

Table 1　Effect of compound Rehmannia granule on expression of inflammatory factors in substantia nigra and striatum of LPS model rats（$\bar{x} \pm s$，$n=8$）

组别 Groups	IL-1β（pg/mL）	TNF-α（pg/mL）	IL-10（pg/mL）
假手术组 Sham group	177.48 ± 7.38	845.58 ± 7.12	467.33 ± 6.57
脂多糖模型组 LPS model group	212.06 ± 4.58$^{\Delta}$	893.34 ± 5.02$^{\Delta}$	374.31 ± 9.17$^{\Delta}$
复方地黄颗粒+脂多糖组 DH+LPS group	197.79 ± 10.11$^{\blacktriangle}$	858.02 ± 8.80$^{\blacktriangle\blacktriangle}$	453.87 ± 13.45$^{\blacktriangle\blacktriangle}$

注：与假手术组相比，$^{\Delta}P < 0.001$；与 LPS 模型组相比，$^{\blacktriangle}P < 0.01$，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.001$。（下表同）
Note. Compared with sham group, $^{\Delta}P < 0.001$. Compared with LPS model group, $^{\blacktriangle}P < 0.01$, $^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.001$. (The same in the following tables)

表 2　复方地黄颗粒对 6-OHDA 模型大鼠黑质纹状体炎症因子含量表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n=8$）

Table 2　Effect of compound Rehmannia granule on the expression of inflammatory factors in substantia nigra and striatum of 6-OHDA model rats（$\bar{x} \pm s$，$n=8$）

组别 Groups	IL-1β（pg/mL）	TNF-α（pg/mL）	IL-10（pg/mL）
假手术组 Sham group	187.80 ± 7.74	793.40 ± 11.62	438.32 ± 13.56
6-羟基多巴胺模型组 6-OHDA model group	223.21 ± 8.62$^{\Delta}$	981.80 ± 6.33$^{\Delta}$	375.94 ± 10.76$^{\Delta}$
复方地黄颗粒+6-羟基多巴胺组 DH+6-OHDA group	203.02 ± 1.55$^{\blacktriangle\blacktriangle}$	862.35 ± 12.74$^{\blacktriangle\blacktriangle}$	403.13 ± 7.78$^{\blacktriangle\blacktriangle}$

表 3　复方地黄颗粒大鼠黑质纹状体 NF-κ Bp65、p-NF-κ Bp65 蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n=8$）

Table 3　Effect of compound Rehmannia granule on NF-κ Bp65 and p-NF-κ Bp65 protein expression in substantia nigra and striatum of model rats（$\bar{x} \pm s$，$n=8$）

组别 Groups	NF-κ Bp65	p-NF-κ Bp65
假手术组 Sham group	0.53 ± 0.16	0.29 ± 0.11
6-羟基多巴胺模型组 6-OHDA model group	1.44 ± 0.15$^{\blacktriangle\blacktriangle}$	0.54 ± 0.04$^{\blacktriangle}$
复方地黄颗粒+6-羟基多巴胺组 DH+6-OHDA group	0.64 ± 0.13$^{\blacksquare\blacksquare}$	0.30 ± 0.10$^{\blacksquare}$
脂多糖模型组 LPS model group	1.21 ± 0.14$^{\blacktriangle\blacktriangle}$	0.74 ± 0.25$^{\blacktriangle\blacktriangle}$
复方地黄颗粒+脂多糖组 DH+LPS group	0.69 ± 0.13$^{\Delta\Delta}$	0.28 ± 0.02$^{\Delta\Delta}$

注：与假手术组比较，$^{\blacktriangle}P< 0.05$，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P< 0.001$；与 LPS 模型组比较，$^{\Delta\Delta}P< 0.001$；与 6-OHDA 模型组比较，$^{\blacksquare}P< 0.05$，$^{\blacksquare\blacksquare}P< 0.001$。（下表同）
Note. Compared with sham group, $^{\blacktriangle}P< 0.05$, $^{\blacktriangle\blacktriangle}P< 0.001$. Compared with LPS model group, $^{\Delta\Delta}P< 0.001$. Compared with 6-OHDA model group, $^{\blacksquare}P< 0.05$, $^{\blacksquare\blacksquare}P< 0.001$. (The same in the following tables)

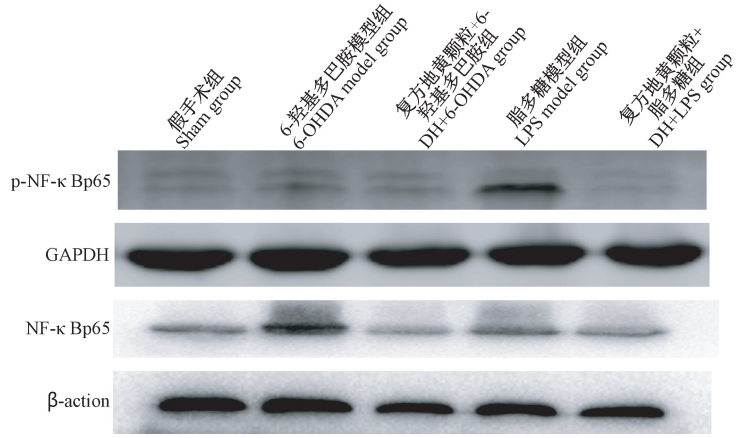


图 3 复方地黄颗粒对模型大鼠黑质纹状体 NF-κ Bp65 和 p-NF-κ Bp65 蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of compound Rehmannia granule on NF-κ Bp65 and p-NF-κ Bp65 protein expression in substantia nigra and striatum of model rats

表 4 复方地黄颗粒对模型大鼠黑质纹状体 TH、Iba1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of compound Rehmannia granule on TH and Iba1 protein expression in substantia nigra and striatum of model rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	Iba1	TH
假手术组 Sham group	0.64 ± 0.09	0.85 ± 0.06
6-羟基多巴胺模型组 6-OHDA model group	0.96 ± 0.10▲	0.50 ± 0.06▲▲
复方地黄颗粒+6-羟基多巴胺组 DH+6-OHDA group	0.42 ± 0.28■■	0.64 ± 0.05■
脂多糖模型组 LPS model group	0.86 ± 0.06▲▲	0.61 ± 0.08▲▲
复方地黄颗粒+脂多糖组 DH+LPS group	0.49 ± 0.07△△	0.89 ± 0.13△△

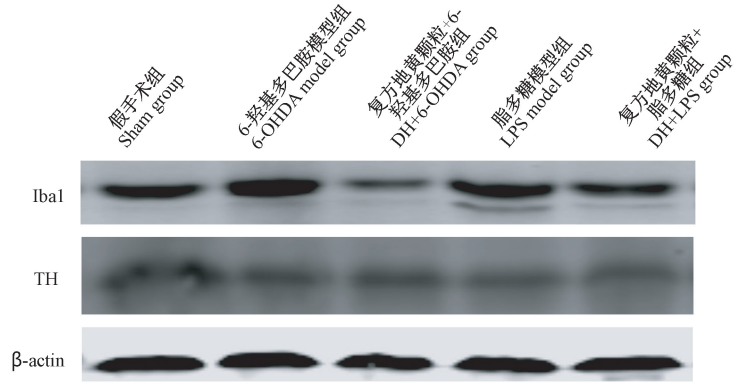


图 4 复方地黄颗粒对模型大鼠黑质纹状体 Iba1 和 TH 蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of compound Rehmanniagranule on Iba1 and TH protein expression in substantia nigra and striatum of model rats

3 讨论

PD 属中医学“颤振”“振掉”范畴。现代医学研究表明[10-12],PD 发病是衰老、基因突变、环境神经毒素(重金属及杀虫剂)及脑外伤等多重因素共同作用的结果。实验研究表明,复方地黄颗粒可通过抑制氧化应激、调控黑质多巴胺能神经元凋亡等机制发挥神经保护作用[13-14],但复方地黄颗粒的神经保护作用是否与抗炎作用相关尚待进一步研究证实。

小胶质细胞属中枢神经系统固有免疫监视细胞,参与神经元的发育及神经突触的重塑等多种病理、生理过程[15]。有研究表明,过度激活的小胶质细胞可释放多种致炎因子或细胞毒性因子导致神经元损伤,诱发或加速 PD、阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)等神经退行性疾病的病变进程[16]。

LPS 为革兰氏阴性菌胞壁的主要成分,广泛应用于炎症相关 PD 动物模型的制备[17]。LPS 用于制备 PD 模型动物多采用腹腔注射方式,其不足之处为不能通过血脑屏障,且外周给药其刺激作用持续时间较短,故不宜于长期实验动物模型的研究。本研究采用

黑质立体定位注射术将 LPS 直接注射于中脑黑质部，药物直接透过血脑屏障被注入黑质致密部。实验结果显示，该造模方法具有造模成功率高、症状持续较为持久的特征。

6-OHDA 为儿茶酚胺类神经递质多巴胺的羟基化衍生物，采用脑立体定位注射术可透过血脑屏障直接将其注射于中脑黑质区，在多巴胺转运体（dopamine transporter，DAT）作用下进入多巴胺能神经元，在神经元内被氧化产生过氧化氢、羟自由基等神经毒性物质，诱导氧化应激及线粒体功能障碍，加速黑质致密部多巴胺能神经元变性、丢失[18]，该造模方法多用于长期慢性 PD 实验动物模型的研究。本研究采用 LPS、6-OHDA 动物模型为研究对象，深入探讨复方地黄颗粒对模型大鼠小胶质细胞激活、炎症因子表达及神经行为学的干预作用。

NF-κ B 信号通路由 NF-κ B1（p50）、NF-κ B（p52）、RelA（p65）、Rel B 和 Rel（c-Re1）5 种家族成员构成[19]。生理状态下，该蛋白家族成员以异二聚体的形式（以 p65/p50 异二聚体为主）与其抑制因子 Iκ B（inhibitors of NF-κB）结合呈稳态形式存在于胞浆中。病理状态下，激活的 NF-κ B 信号通路通过正负反馈机制参与机体免疫炎症反应、细胞增殖及凋亡等病理生理过程[20]。Muhammad 等[21]研究表明，LPS 预处理的 C57BL/6 小鼠海马区细胞及 BV2 模型细胞其激活标志物 Iba1 及 p-NF-κ B 及 IL-1β 等炎性因子表达水平显著升高，故抑制小胶质细胞 NF-κ B 信号通路激活及促炎因子过度表达将有助于 PD 的临床治疗。

复方地黄颗粒由熟地黄、丹参、钩藤、石菖蒲、全蝎、杭白芍、珍珠母 7 味药物组成。熟地黄味甘微温，入肝、肾经，长于滋阴养血、补肾填精。《长沙药解》曰其可“凉肝滋血，清风润木，……滋风木……，血脱甚良”。丹参味苦，微寒，归心、肝经，长于活血祛瘀，通络止痛。全蝎，味辛性平，入肝经，长于息风通络，解毒散结，镇惊止痛。《医宗必读卷十·痹》曰：“治风先治血，血行风自灭”，临床实践证实，丹参、全蝎合用共奏活血通络、养血息风之效，二药合用则息风之力倍增[22]。石菖蒲味辛苦，性温，归心、胃经，长于化湿开胃、豁痰开窍、醒神益智。《本草备要》曰其可主“补肝益心，去湿逐风，……，风痹惊痫。”诸疾。钩藤甘苦，微寒，归肝、心包经，长于清热平肝，息风定惊。白芍味苦，性平，归肝、脾经，长于补血调经药，《神农本草经》曰：“主邪气腹痛，除血痹，……，利小便，益气”。钩藤、合用白芍共奏养血柔肝、息风止颤之功。珍珠母，咸、寒，归心，肝经，长于平肝潜阳，息风定惊。临床实践表明，复方地黄颗粒功效以补益肝肾，祛瘀通络、息风见长，该方对 PD 患者失眠、抑郁及便秘等非运动症状有显著改善。

现代药理研究证实，熟地黄含有毛蕊花糖苷、玉叶金花苷酸、海胆苷等 13 种抗氧化活性成分[23]。周艳等[24]等研究表明，熟地黄多糖可提高亚急性衰老模型大鼠血肝、脑、肾脏器指数，降低肝、脑、肾组织丙二醛（MDA）含量表达。刘培建等[25]研究表明，中、高剂量熟地黄多糖能够促进气血亏虚模型小鼠血清粒-巨噬细胞集落集落刺激因子含量，提升小鼠红细胞及血红蛋白表达水平。全蝎含有蝎毒、多糖、氨基酸及三甲胺、甜菜碱等活性成分，相关研究表明，全蝎对肿瘤、心脑血管疾病等临床各科疾病疗效显著[26]。现代医学研究表明，丹参所含丹参酮、丹参酚酸等主要成分可通过多靶点、多途径显著改善微循环功能障碍，调节由抗动脉粥样硬化所致的心脑血管功能障碍，保护器官免受炎症损[27-28]。现代药理研究表明，石菖蒲含 α-细辛醚（α-Asarone）、β-细辛醚（β-Asarone）、丁香烯（caryophyllene）等药理活性挥发油，通过抗炎、调节免疫等药理作用对中枢神经系统功能发挥正、负双向调节作用，调节血脑屏障通透功能，抑制大脑神经元凋亡[29-30]。现代药理研究证实，钩藤含黄酮、萜类、皂苷异、去氢钩藤碱（isocorynoxeine）等药理成分，具有抗炎、降压、神经保护及平喘等功效[31]。白芍含没食子酸、儿茶素、芍药苷、芍药内酯苷等药理活性成分，现代药理研究证实，白芍具有抗炎、抗氧化、养血保肝及神经保护等功效[32]。王成龙[33]研究证实，芍药苷、芍药内酯苷通过调控脑组织 cAMP/PKA 信号通路环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate，cAMP）、蛋白激酶 A（protein kinase A，PKA）含量发挥养血柔肝作用。珍珠母含大量碳酸钙、碳酸镁及丝氨酸等有机或无机成分，现代研究表明，其功效以镇静、抗炎、抗氧化应激等为主[34]。临床研究表明，珍珠母对心脑血管、胃肠消化系统及精神类疾病均显示出较佳的疗效[35-37]。

实验研究结果表明，6-OHDA、LPS 模型大鼠在造模后第 2 周经腹腔注射阿扑吗啡诱导出自患侧向健侧发起的首尾衔接的持续的自发性旋转行为，其证候表现与相关文献报道相符。与 6-OHDA 及 LPS 组比较，复方地黄颗粒灌胃后 DH+6-OHDA 组及 DH+LPS 组大鼠黑质纹状体 IL-1β、TNF-α 含量表达显著降低，IL-10 含量表达显著升高，复方地黄颗粒对模型大鼠神经行为学的干预作用与其抑制模型大鼠黑质纹状体促炎因子含量表达相关。

实验结果显示,与 sham 组比较,6-OHDA、LPS 模型组大鼠黑质纹状体 Iba1、NF-κ Bp65、p-NF-κ Bp65 表达水平显著升高,TH 表达水平显著降低。复方地黄颗粒灌胃后大鼠黑质纹状体 Iba1、NF-κ Bp65、p-NF-κ Bp65 表达水平显著降低,TH 表达水平显著升高。复方地黄颗粒通过抑制黑质纹状体小胶质细胞 NF-κ B 信号通路激活,下调 IL-1β、TNF-α 等炎症因子表达,显著改善模型大鼠神经行为学障碍。

综上所述,小胶质细胞激活及促炎因子高水平表达与 PD 的发病密切相关。复方地黄颗粒通过抑制模型大鼠黑质纹状体小胶质细胞激活,下调炎症因子 TNF-α、IL-1β 含量表达调节模型大鼠神经行为学障碍。复方地黄颗粒对 PD 模型大鼠神经行为学异常的干预作用与其抗炎机制相关,本研究进一步丰富了复方地黄颗粒治疗 PD 的理论基础。

参 考 文 献(References)

[1] Selikhova M, Williams DR, Kempster PA, et al. A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease [J]. Brain, 2009, 132(11): 2947-2957.

[2] 陈丹丹, 付文玉, 庄宝祥, 等. 骨髓间充质干细胞黑质内移植对帕金森病大鼠的治疗作用 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(1): 22-26.
Chen DD, Fu WY, Zhuang BX, et al. Therapeutic effects of transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells into substantia nigra on the rat model of Parkinson's disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2013, 21(1): 22-26.

[3] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models [J]. Neuron, 2003, 39(6): 889-909.

[4] Hirsch EC. Altered regulation of iron transport and storage in Parkinson's disease [J]. J Neural Transm Suppl, 2006, 71: 201-204.

[5] 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.
Xu PH, He JC, Wang L, et al. Clinical efficacy observation on compound Dihuang Decoction combined with Levodopa in the treatment of Parkinson's disease [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(2): 838-840.

[6] 张蕾, 何建成. 何建成教授从肝肾论治帕金森病 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(2): 23-25.
Zhang L, He JC. Experience of professor HE Jiancheng Treating Parkinson's disease with Dihuangcompound prescription [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2021, 39(2): 23-25.

[7] 滕龙, 洪芳, 何建成, 等. 复方地黄方调控 GSK3β 信号转导通路缓解帕金森病异动症型大鼠的机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(4): 815-818.
Teng L, Hong F, He JC, et al. Study on mechanism of compound formula rehmannia on remission of rats model of levodopa-induced dyskinesia by regulation of Gsk3β signal transduction pathway [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2018, 36(4): 815-818.

[8] 刘家岐, 赵明, 楚世峰, 等. 黑质注射 LPS 构建亚急性帕金森病模型的评价 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(3): 431-437.
Liu JQ, Zhao M, Chu SF, et al. Evaluation of subacute Parkinson's disease model by substantia nigra injection LPS [J]. Chin Pharmacol Bulletin, 2020, 36(3): 431-437.

[9] 洪乐鹏, 汪光亮, 王迪, 等. SHH 信号通路的激活对帕金森病模型小鼠的保护及其机制 [J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(5): 586-592.
Hong LP, Wang GL, Wang D, et al. The protective effects and its mechnisms of purmorphamine on mice models of Parkinson's disease [J]. Chin J Neuroanat, 2017, 33(5): 586-592.

[10] Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease [J]. J Neural Transm (Vienna), 2017, 124(8): 901-905.

[11] Ball N, Teo WP, Chandra S, et al. Parkinson's disease and the environment [J]. Front Neurol, 2019, 19(10): 218-226.

[12] Lill CM, Klein C. Epidemiologie und Ursachender Parkinson-Erkrankung [Epidemiology and causes of Parkinson´s disease] [J]. Nervenarzt, 2017, 88(4): 345-355.

[13] 王利, 何建成. 复方地黄颗粒对帕金森病大鼠氧化应激干预作用 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(12): 2840-2842.
Wang L, He JC. Effect of compound Rehmannia granules on oxidative stress in rats with Parkinson's disease[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(12): 2840-2842.

[14] 王利, 何建成. 复方地黄颗粒对帕金森病大鼠细胞凋亡的干预作用 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(8): 4122-4125.
Wang L, He JC. Effects of Compound Dihuang Granules on apoptosis in rats with Parkinson's disease [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(8): 4122-4125.

[15] Frost JL, Schafer DP. Microglia: architects of the developing nervous system [J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(8): 587-597.

[16] Xu L, He D, Bai Y. Microglia-mediated inflammation and neurodegenerative disease [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(10): 6709-6715.

[17] Chia SJ, Tan EK, Chao YX. Historical perspective: models of Parkinson's disease [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2464.

[18] Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease [J]. Br J Pharmacol, 2011, 164(4): 1357-1391.

[19] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF-κB system [J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2016, 8(3): 227-241.

[20] Kawai T, Akira S. Signaling to NF-κB by Toll-like receptors [J]. Trends Mol Med, 2007, 13(11): 460-469.

[21] Muhammad T, Ikram M, Ullah R, et al. Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates LPS-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF-κB signaling [J]. Nutrients, 2019, 11(3): 648-668.

[22] 徐鹏恒, 夏菁, 王利. 何建成分阶段治疗帕金森病的思路与方法 [J]. 中医文献杂志, 2018, 36(5): 39-42.
Xu PH, Xia J, Wang L. He Jian's ideas and methods for the treatment of Parkinson's disease [J]. J Tradit Chin Med Lit,

2018, 36(5): 39-42.

[23] 沈华旦, 方江济, 郭鹏程, 等. 基于 HPLC-UV-DPPH 法的地黄和熟地黄药材抗氧化活性成分比较研究 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 582-588.
Shen HD, Fang JJ, Guo PC, et al. Comparative study on antioxidant active components of Rehmanniaglutinosa and Rehmanniaglutinosa by HPLC-UV-DPPH [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2018, 49(3): 582-588.

[24] 周艳, 杜莉杰, 郑旭亚, 等. 基于古法特色炮制前后的地黄饮片及其多糖对衰老模型大鼠的抗氧化作用比较 [J]. 中国药房, 2020, 31(17): 2087-2093.
Zhou Y, Du LJ, Zheng XY, et al. Comparison of antioxidant effects of Rehmanniaglutinosa decoction pieces and their polysaccharides on aging model rats before and after processing based on the characteristics of ancient methods [J]. Chin Pharm, 2020, 31(17): 2087-2093.

[25] 刘培建, 苗明三, 高渐联. 熟地黄多糖对气血双虚小鼠全血细胞及血清粒-巨噬细胞集落刺激因子水平的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(38): 7543-7546.
Liu PJ, Miao MS, Gao JJ. Effects of Rehmanniaglutinosa polysaccharide on the levels of whole blood cells and serum granulocyte macrophage colony stimulating factor in mice with Qi and blood deficiency [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2008, 12(38): 7543-7546.

[26] 吴福林, 董庆海, 王涵, 等. 中药全蝎研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(12): 108-111.
Wu FL, Dong QH, Wang H, et al. Research progress of scorpion [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2018, 20(12): 108-111.

[27] 董帅, 王辉, 谢治深. 丹参功用本草考证及现代药理认识 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(11): 152-155.
Dong S, Wang H, Xie ZS. Textual research and modern pharmacological understanding of Salvia miltiorrhiza [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2019, 21(11): 152-155.

[28] 王乐琪, 张云帆, 李莎莎, 等.丹参治疗微循环障碍作用机制的“成分-靶点-通路”多层次互作网络模型研究 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 439-450.
Wang LQ, Zhang YF, Li SS, et al. Study on the “component target pathway” multi-level interaction network model of the mechanism of Salvia miltiorrhiza in the treatment of microcirculation disorders [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2020, 51(2): 439-450.

[29] 陈俐. 石菖蒲药理作用的实验研究 [J]. 广州医学院学报, 2002, 30(4): 75-78.
Chen L. Experimental study on pharmacological action of Acorus tatarinowii [J]. Acad J Guangzhou Med Coll, 2002, 30(4): 75-78.

[30] 林晨, 安红梅. 石菖蒲的中枢神经系统药理作用研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2014, 30(2): 230-233.
Lin C, An HM. Study on the central nervous system pharmacological action of Acorus tatarinowii [J]. J Changchun Univ Tradit Chin Med, 2014, 30(2): 230-233.

[31] 崔莹. 钩藤化学成分和药理活性研究进展 [J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 2015, 18(4): 16-18.
Cui Y. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Uncariarhynchophylla [J]. J Xi'an Univ Arts Sci (Natural Sci Edit), 2015, 18(4): 16-18.

[32] 叶先文, 夏澜婷, 任洪民, 等. 白芍炮制的历史沿革及化学成分、药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1951-1969.
Ye XW, Xia LT, Ren HM, et al. Research progress on the processing history, chemical components and pharmacological effects of Radix Paeoniae Alba [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2020, 51(7): 1951-1969.

[33] 王成龙. 基于白芍养血柔肝功效的芍药苷、芍药内酯苷药理作用研究 [D]. 北京:北京中医药大学; 2017.
Wang CL. Study on pharmacological effects of paeoniflorin and paeoniflorin based on the efficacy of Radix Paeoniae Alba in nourishing blood and softening liver [D]. Beijing: University of Traditional Chinese Medicine; 2017.

[34] 金艳. 珍珠母重镇安神药理作用及临床应用研究进展 [J]. 浙江中医杂志, 2017, 52(5): 388-389.
Jin Y. Research progress on sedative pharmacological effect and clinical application of Pearl mother town [J]. Zhejiang J Tradit Chin Med, 2017, 52(5): 388-389.

[35] 竹青, 曹阳, 王明如. 珍珠母复方治疗高血压病临床疗效观察 [J]. 浙江中医学院学报, 2001, 25(1): 38.
Zhu Q, Cao Y, Wang MR. Observation on the clinical efficacy of mother of Pearl compound in the treatment of hypertension [J]. J Zhejiang Univ Tradit Chin Med, 2001, 25(1): 38.

[36] 高远, 张伟英, 于莉, 等. 林平诊治慢性胃炎临床经验 [J]. 新中医, 2019, 51(4): 302-304.
Gao Y, Zhang WY, Yu L, et al. Lin Ping's clinical experience in the diagnosis and treatment of chronic gastritis [J]. J New Chin Med, 2019, 51(4): 302-304.

[37] 邹天骏, 林江, 张荻娅, 等. 镇静安神类海洋中药的应用病证及配伍规律分析 [J]. 中医药导报, 2019, 25(19): 116-120.
Zou TJ, Lin J, Zhang DY, et al. Analysis of disease syndrome and compatibility law of sedative and tranquilizing marine traditional Chinese medicine [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 25(19): 116-120.

[收稿日期] 2021-07-15