

松果菊苷抑制 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠神经胶质细胞激活及其机制研究

张彦红¹, 刘美玲², 朱磊³, 刘梦², 姚丽伟², 陈淑云², 赵威², 王奇²(1. 广州市第一人民医院, 广东 广州 510180; 2. 广州中医药大学科创中心, 广东 广州 510405; 3. 广州中医药大学研究生院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 探讨松果菊苷对帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型小鼠脑部黑质致密部小胶质细胞活化与多巴胺(dopamine, DA)神经元损伤的作用, 及其对多巴胺神经元-小胶质细胞生存微环境的影响。**方法** ①松果菊苷药效实验: 采用 C57BL/6 雄性小鼠, 随机分为空白组、模型组、阳性药组(美满霉素, 30 mg·kg⁻¹)、松果菊苷组(20 mg·kg⁻¹), 除空白组、模型组注射等体积生理盐水外, 其余组分别腹腔注射相应药物, 每日 1 次, 连续给药至取材前停止。给药 3 d 后, 除空白组外, 各组腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(MPTP, 30 mg·kg⁻¹), 每日 1 次, 连续 7 d, 分别观察各组小鼠运动行为改变, 脑部小胶质细胞特异性标志物(OX-42)和酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞数目; ②松果菊苷药效机制研究: 采用 C57BL/6 雄性小鼠, 随机分为假手术组、模型组(IgG 溶液, 0.2 μg·μL⁻¹)、松果菊苷组(20 mg·kg⁻¹)、anti-Chemokine receptor 组(Anti-CX3CR1, 0.2 μg·μL⁻¹), 假手术组脑部注射等体积生理盐水, 模型组脑部注射等体积 IgG 溶液, 松果菊苷组腹腔注射松果菊苷溶液, Anti-CX3CR1 组则在每次 MPTP 注射前 1 h, 侧脑室注射 Anti-CX3CR1(5 μL), 造模方法同①, 各组分别观察 CX3CR1 的表达水平的改变。**结果** 松果菊苷腹腔注射给药后, 可明显改善 MPTP 腹腔注射模型动物运动行为状态($P < 0.05$, $P < 0.01$), 增加 TH 的表达、降低 OX-42 免疫荧光表达强度($P < 0.05$, $P < 0.01$), 明显减轻模型小鼠的小胶质细胞激活及多巴胺能神经元的损伤。West Blot 结果显示, Anti-CX3CR1 组脑内 CX3CR1 表达水平与松果菊苷组表达一致。**结论** 松果菊苷腹腔注射给药可较明显地降低 MPTP 造成的多巴胺能神经元损伤, 其机制可能与抑制小胶质细胞 CX3CR1 激活有关。

关键词: 帕金森病; 松果菊苷; 小胶质细胞; 多巴胺神经元; CX3CR1; 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)01-0036-08

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783.2021.01.005

Effect and Mechanism of Echinacoside on Inhibiting Glial Cell Activation in MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease

ZHANG Yanhong¹, LIU Meiling², ZHU Lei³, LIU Meng², YAO Liwei², CHEN Shuyun², ZHAO Wei², WANG Qi² (1. The First People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180 Guangdong, China; 2. Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 3. Graduate School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of echinacoside on the activation of microglia in substantia nigra compacta and the injury of DA neurons in Parkinson's disease (PD) mice, and on the dopaminergic neuron-microglia survival microenvironment. **Methods** ①Pharmacodynamic experiment: Male C57BL/6 mice were randomly divided into blank group, model group, positive drug group (minocycline, 30 mg·kg⁻¹) and echinacea glycoside group (20 mg·kg⁻¹). The blank group and the model group were injected with equal volume of normal saline, and the other groups were injected intraperitoneally with corresponding drugs, once a day for 3 d. The groups except blank

收稿日期: 2020-01-18

作者简介: 张彦红, 女, 博士研究生, 副主任医师, 研究方向: 中医内科学脑血管病。Email: syyyzykzyh@126.com。共同第一作者: 刘美玲, 女, 硕士研究生, Email: 936140904@qq.com。通信作者: 赵威, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药效与安全性评价机制研究。Email: athena_zw@126.com。

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2016A030313435)。

group were intraperitoneally injected with 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridin (MPTP, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) for successive 7 days (once a day). The changes of motor behavior, complement receptor-3 (OX-42) and the number of tyrosine hydroxylase (TH)-positive cells were observed. ② Pharmacodynamic mechanisms: Male C57BL/6 mice were randomly divided into sham-operation group (normal saline, $5 \mu\text{L}$), model group (IgG solution, $0.2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), echinacea glycoside group ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and anti-chemokine receptor group (Anti-CX3CR1, $0.2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). The injection volume of all groups was equal. IgG group and anti-chemokine receptor group were respectively injected IgG or anti-CX3CR1 into the lateral ventricle. Animals in the anti-chemokine receptor group were injected with anti-CX3CR1 one hour before MPTP injection. The expression of CX3CR1 was investigated. **Results** After intraperitoneal injection of echinacoside for 10 days, the behaviors of MPTP-treated mice were altered ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the immunofluorescence expression of OX-42 and TH were all restored ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the level of CX3CR1 was decreased. **Conclusion** Intra-peritoneal injection of echinacoside can significantly reduce the damage of dopaminergic neurons caused by MPTP, which may be related with the inhibition of echinacoside on microglia activation.

Keywords: Parkinson's disease; echinacoside; microglia; dopaminergic neurons; CX3CR1; mice

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是常见的神经变性运动障碍疾病, 临床主要症状表现为静止性震颤、运动迟缓及肌肉强直等。有研究^[1]表明, 帕金森病的发病机制主要是多巴胺 (Dopamine, DA) 能神经元退行性病变的病理过程, 该过程受环境因素和遗传因素双重因素影响。现有的治疗方法虽然可以减轻大部分患者临床症状, 但依然无法阻止或延缓多巴胺神经元的进行性死亡^[2], 这也是帕金森病患者在长期服用左旋多巴制剂后, 出现疗效递减以及“开关”“剂末”现象等运动异常的原因^[3]。因此, 探讨减轻多巴胺神经元的损伤程度, 延缓神经元变性的过程已成为当前该疾病治疗的课题^[4-6]。

研究^[3,5]发现, 中脑黑质 (SNpc) 多巴胺能神经元的丢失与胶质细胞的激活相关, 脑内小胶质细胞的激活会进一步增加 α 巨核蛋白对神经元的毒害作用, 与帕金森病的发病进程密不可分。通过免疫荧光共聚焦技术发现, 在 8、48 周龄帕金森病小鼠的黑质网状部、中脑黑质致密部及腹侧区均发现了小胶质细胞的存在^[5]。小胶质细胞在神经内环境失衡的条件下, 其状态由静止转变为活化, 同时释放出白细胞介素 1β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 等具有生物活性的分子物质^[6]。Castro-Sánchez S 等^[7]研究证实, 鱼藤酮、6-羟多巴胺 (6-OHDA) 诱导的帕金森病模型中, 小胶质细胞激活与帕金森病发病密切相关。因此, 寻求能够有效抑制小胶质细胞病理性激活的治疗方式, 维持神经元-小胶质细胞生存微环境的稳态, 可能成为帕金森病治疗的新靶向。

Harms AS 等^[8]在对小胶质细胞活化机制的研究中发现, 帕金森病模型中内源性趋化因子 Fractalkine (CX3CL1) 的表达被明显上调, 并通过其特异性受体 CX3CR1 激活小胶质细胞, 引起多巴胺能神经元大量丢失和神经行为学损害; 而采用特异性抗体中和 CX3CR1 后可阻断小胶质细胞的活化, 并可明显减少多巴胺能神经元丢失, 改善神经行为学症状, 提示 CX3CL1 是帕金森病模型小胶质细胞的激活途径之一。

中医认为肾虚是帕金森病的关键病机, 而肉苁蓉是滋肾益髓的代表中药。《本草经疏》^[9]: “肉苁蓉, 滋肾补精血之要药”。目前, 对肉苁蓉属植物的系统研究发现, 肉苁蓉中含有丰富的松果菊苷药效成分, 其在肉苁蓉总苷胶囊中的含量超过 25%^[10]。如今含松果菊苷的药物制剂已应用于治疗血管性痴呆, 临床效果明显^[11-12]。而痴呆与帕金森病同属于神经退行性疾病, 且发病都与神经胶质细胞活化有关^[13]。研究^[10-11]发现, 肉苁蓉的活性成分松果菊苷可减轻帕金森病模型小鼠的行为学障碍, 增加多巴胺表达数量和多巴胺代谢物的水平, 减少细胞死亡, 并明显增加帕金森病模型小鼠酪氨酸羟化酶 (TH) 的表达水平。因此, 本研究将从肉苁蓉的活性成分松果菊苷改善 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 诱导的帕金森病模型小鼠多巴胺能神经功能状态、维持神经元-小胶质细胞生存微环境稳态的角度, 阐释松果菊苷治疗帕金森病疾病的作用机制。

1 材料与amp;方法

1.1 动物 C57BL/6 小鼠，雄性，SPF 级，周龄为 9~12 周，体质量(25±5)g，购于中国广东省医学实验动物中心，动物许可证号：SCXK(粤)2013-0002。将 C57BL/6 小鼠饲养在恒温通风良好的环境中 1 周以上，以排除环境产生的应激干扰，供以充足的食物和水，每天观察小鼠的情况，并记录体质量。

1.2 药物及试剂 松果菊苷单体(纯度≥98%)，中国食品药品检定研究院，批号：111670；MPTP，美国 Sigma 公司，批号：M0896-100MG；美满霉素，美国 TargetMol 公司，批号：T1101；Integrin αM 抗体(OX-42)，美国 Santa Cruz 公司，批号：SC-53086；Anti-Tyrosine Hydroxylase 抗体(批号：AB75875)、GAPDH(批号：AB9485)，美国 Abcam 公司；荧光二抗 cy3 山羊抗兔(批号：GB21303)、荧光二抗 FITC 山羊抗小鼠(批号：GB22301)，武汉 Service 生物公司；Rabbit Anti-CX3CR1 antibody(批号：bs-1728R)、HRP 标记山羊抗兔抗体(批号：GB23303)、DAB 显色试剂盒(批号：AR1022)，武汉博士德公司；Rabbit Anti-mouseIgG，美国 Cohesion Biosciences 公司，批号：CSA2027。

1.3 仪器 TSY-B 脱色摇床，天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司；MX-F 涡旋混合器，大龙兴创实验仪器(北京)有限公司；DXP-2 大小鼠转棒仪，中国医学科学院药物研究所；Leica-CM1950 冷冻切片机，德国徕卡公司；AUM220D 电子分析天平，日本 Shimadzu 公司；ECLIPSE Ti 荧光倒置显微镜，日本 Nikon 公司。

1.4 动物分组、模型复制^[14]及给药方法

1.4.1 松果菊苷抗帕金森病的药效作用研究 将 C57BL/6 雄性小鼠，随机分为空白组、模型组、阳性药组(美满霉素，30 mg·kg⁻¹)、松果菊苷组(20 mg·kg⁻¹)，除空白组、模型组注射等体积生理盐水外，其余组分别腹腔注射相应药物，给药 3 d 后，除空白组外，各组腹腔注射 MPTP 30 mg·kg⁻¹ 造模，每日 1 次，连续 7 d。

用超纯水将 MPTP、美满霉素(阳性药)和松果菊苷粉末分别配成浓度为 3 mg·mL⁻¹、2 mg·mL⁻¹ 和 2 mg·mL⁻¹ 的溶液，给药体积均为 10 mL·kg⁻¹。阳性药及松果菊苷组分别从 MPTP 造模前 3 d 起给药，连续给药至取材前停止。

每个组又分为 D1、D3、D7、D14 小组，共 16 组，每组 8 只小鼠。各小组分别在给药后 2 h 进行转棒实验和爬杆实验，记录数据，并按照帕金森

评分表记录小鼠的评分情况。

1.4.2 松果菊苷调节小胶质细胞激活的机制研究 采用 C57BL/6 雄性小鼠，随机分为假手术组、模型组(IgG 溶液，0.2 μg·μL⁻¹)、松果菊苷组(20 mg·kg⁻¹)、anti-Chemokine receptor 组(Anti-CX3CR1，0.2 μg·μL⁻¹)。脑部给药利用鼠脑立体定位仪，采用侧脑室注射的方法注射 IgG 溶液或 Anti-CX3CR1 各 5 μL；假手术组行侧脑室手术并留置针管，每天注射等量无菌生理盐水 5 μL；脑部注射速度为 0.5 μL·min⁻¹。松果菊苷组腹腔注射松果菊苷溶液。MPTP 造模方法同“1.4.1”。

每个给药组又分为 D1、D3、D7、D14 小组，共 16 组，每组 8 只小鼠。各组从造模第 1 天起分别连续给药 1、3、7、14 d。

1.5 行为学指标检测 动物分组、模型复制及给药方法同“1.4.1”项下。造模前 3 d 开始，连续 3 d 对所有实验小鼠进行爬杆和转棒行为训练，去除四肢运动不协调的小鼠，留取合格小鼠进行下一步实验。

协调运动能力检测(转棒法)：转棒仪器有 5 个相互隔开的小室，可以同时测试 5 只小鼠。本实验选用直径 3 cm 的轴，通过预实验摸索后确定用 13 r·min⁻¹ 的旋转速度匀速转动较为合适。每只小鼠的测量时间为 240 s，记录每只小鼠的潜伏时间及规定时间内掉落的次数，计算每组小鼠转棒时掉落次数的平均值。

运动能力检测(爬杆法)：取长为 50 cm 直径为 2 cm 的杆，在杆顶部安装一小木球，外面覆盖纱布以防止小鼠打滑。小鼠经过适应训练后，记录小鼠自杆顶爬至杆底部后肢着地的总时间。每只小鼠测试 3 次，计算平均时间，如果小鼠出现中途停顿或反向攀爬，则重新测试。

自主活动行为评分(帕金森评分表)：给药后观察小鼠自主行为学的变化，按照表 1 标准进行评分，并作统计学分析。得分越高，震颤麻痹的症状越明显。

表 1 帕金森病自主行为学表现评分表

Table 1 Rating scale for autonomic behavior of Parkinson's disease

项目	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
①运动功能	正常	减少	入睡		
②检验运动	存在	减少	缺乏		
③注意力和眨眼	正常	异常			
④姿势	正常	躯干异常	躯干和尾部异常	躯干、尾部、固定肢体异常	固定姿势
⑤平衡和动作协调	正常	受损	不稳		跌倒
⑥反应能力	正常	下降	变慢	缺乏	
⑦发音	正常	下降	缺乏		

1.6 免疫荧光检测酪氨酸羟化酶(TH)和小胶质细胞特异性标志物(OX-42)的表达

动物分组、模型复制及给药方法同“1.4.1”项下。松果菊苷组在 MPTP 腹腔注射后第 7 天取脑组织, 脑冠状面冷冻切片, 片厚 10 μm, 于 -80 °C 保存。冰冻切片复温 10 min, 晾干水分, 于 4% 的多聚甲醛固定液中固定, 以 0.01 mol·L⁻¹ 的 PBS (pH7.4) 溶液清洗, 100 °C 的 EDTA 抗原修复缓冲液 (pH8.0) 抗原修复; 血清封闭滴加 5% BSA, 封闭 45 min。滴加一抗混合液 (1 : 200), 于 4 °C 孵育过夜加二抗 (1 : 300)。DAPI 复染细胞核。封片, 荧光显微镜下以 ImageJ 图像分析软件观察并采集图像。每个脑袋取 3 张切片, 计算平均光密度值, 以该值作为该动物的最终光密度分别观察酪氨酸羟化酶和小胶质细胞特异性标记物 OX-42 表达量及二者的共定位情况。

1.7 West Blotting 检测 CX3CR1 蛋白表达

动物分组、模型复制及给药方法同“1.4.2”项下。各组动物分别在 MPTP 腹腔注射后第 1、3、7、14 d, 腹腔注射 5% 水合氯醛, 经左心室进针灌注 4 °C 的生理盐水; 缓慢灌注至肝变为土白色后, 更换 4 °C 的 4% 多聚甲醛固定液灌注固定, 灌注至小鼠尾巴翘起, 四肢及身体僵硬即可。立即剥取大脑, 置于 4% 多聚甲醛固定液中固定。脑组织裂解 30 min, 超声破碎, 4 °C 下 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清, 提取细胞核蛋白。取等量蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 转膜; 5% 脱脂奶粉封闭 3 h, 滴加一抗, 过夜; PBS 洗涤, 滴入二抗, 室温孵育; ECL 显影并扫描。以 ImageJ 灰度分析软件测定灰度值, 以 GAPDH 为内参, 以“目的蛋白/GAPDH”表示该目的蛋白的相对表达量。

1.8 统计学处理方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。符合正态分布与方差齐性的计量资料, 多组间数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA); 不符合正态分布与方差齐性的计量资料, 进行秩和检验, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验, 组间两两比较采用 Mann-Whitney 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

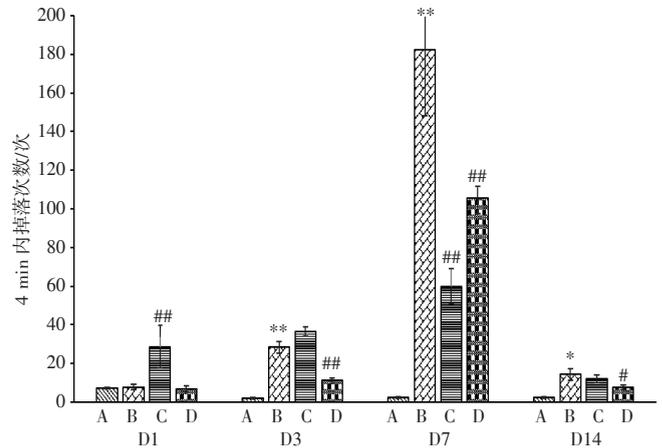
2 结果

2.1 松果菊苷行为学指标检测结果

2.1.1 松果菊苷对小鼠协调运动能力的影响(转棒法)

结果见图 1。与模型组比较, 阳性药组给药后, 小鼠

第 1 天从转棒上掉落的次数比模型组明显增加($P < 0.01$); 而第 7 天小鼠从转棒上掉落的次数与模型组相比明显减少($P < 0.01$); 阳性药物组在第 14 天的差异虽无统计学意义($P > 0.05$), 但该平均值均比第 3、7 天的数值有减少的趋势。与模型组比较, 松果菊苷组第 3 天、第 7 天检测结果均减少($P < 0.01$), 第 14 天的差异虽无统计学意义($P > 0.05$), 但转棒实验掉落的次数也有一定的减少趋势。



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 阳性药组; D, 松果菊苷组。与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$
图 1 松果菊苷对 MPTP 模型小鼠协调运动能力的影响(转棒法)($\bar{x} \pm s, n=8$)

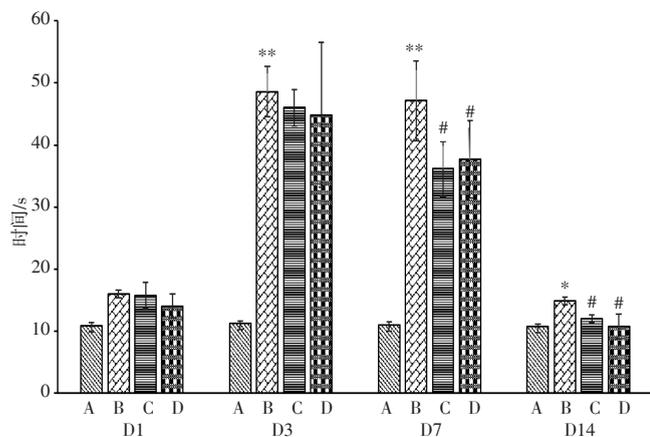
Figure 1 Effect of echinacoside on motor coordination behavior in MPTP model after echinacoside injection($\bar{x} \pm s, n=8$)

2.1.2 松果菊苷对 MPTP 小鼠运动能力的影响(爬杆法)

结果见图 2。与模型组比较, 阳性药组第 1、3 天检测结果均无统计学意义(均 $P > 0.05$), 第 7、14 天检测结果降低且差异有统计学意义(均 $P < 0.05$), 说明给予美满霉素进行干预可较好地改善模型小鼠的爬杆行为, 从第 7 天开始爬杆所需的时间明显减少。与模型组比较, 给予松果菊苷进行干预后, 各时间段的松果菊苷组爬杆时间均有不同程度的降低, 其中第 7、14 天的检测结果有统计学意义(均 $P < 0.05$), 提示松果菊苷有改善 MPTP 模型小鼠行为学的作用。

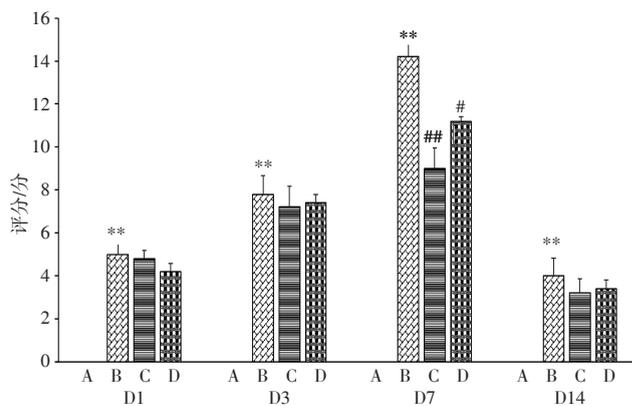
2.1.3 松果菊苷对 MPTP 模型小鼠自主活动的影响

见图 3。与空白组比, 模型组、阳性组、松果菊苷组的帕金森病自主活动行为评分均有明显差异($P < 0.01$), 提示帕金森病小鼠出现明显运动功能障碍, 模型复制成功。与模型组比, 阳性组及松果菊苷组第 7 天自主活动行为评分明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。



注: A. 空白组; B. 模型组; C. 阳性药组; D. 松果菊苷组。
与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图2 松果菊苷对MPTP模型小鼠爬杆行为的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)
Figure 2 Effect of echinacoside on pole climbing behavior in MPTP model mice($\bar{x} \pm s, n=8$)



注: A. 空白组; B. 模型组; C. 阳性药组; D. 松果菊苷组。

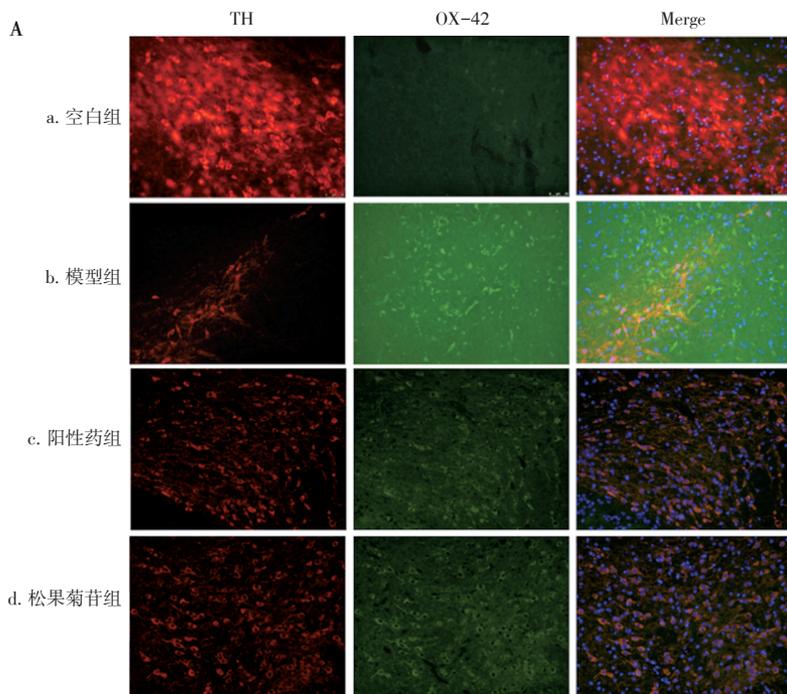
与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图3 松果菊苷对帕金森病模型小鼠自主活动行为的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Figure 3 Effect of echinacoside on autonomous movement in Parkinson's disease mice($\bar{x} \pm s, n=8$)

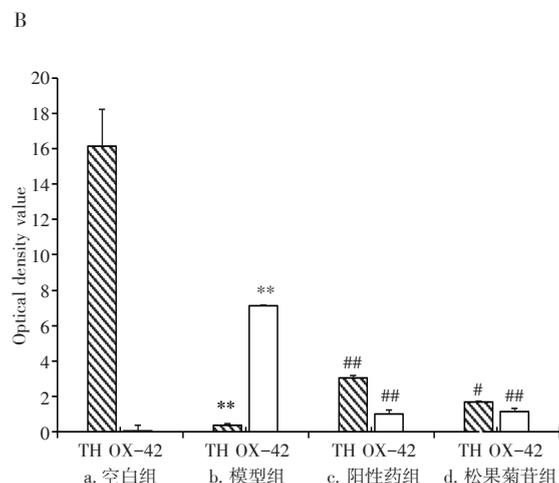
2.2 松果菊苷对MPTP模型小鼠酪氨酸羟化酶(TH)和小胶质细胞特异性标志物(OX-42)表达的影响结果见图4。从免疫组化染色图片中可以观察到在阳性药和松果菊苷给药组中, TH阳性神经元数量明显高于模型组, 提示美满霉素和松果菊苷起到了一定的神经保护作用。与空白组比, 模型组的TH表达明显降低($P < 0.01$), OX-42表达数量明显升高($P <$

0.01)。与模型组比, 阳性药组和松果菊苷组的TH表达均明显升高($P < 0.01, P < 0.05$), 而OX-42表达均明显降低($P < 0.01$), 说明美满霉素和松果菊苷均可在一定程度上起到保护神经元、降低多巴胺神经元损伤的作用。“2.1”项行为学结果已经表明, 美满霉素和松果菊苷可对MPTP小鼠的行为学异常起到改善作用, 与此结果相符。



注: 图中红色荧光为TH阳性; 绿色荧光为OX-42阳性

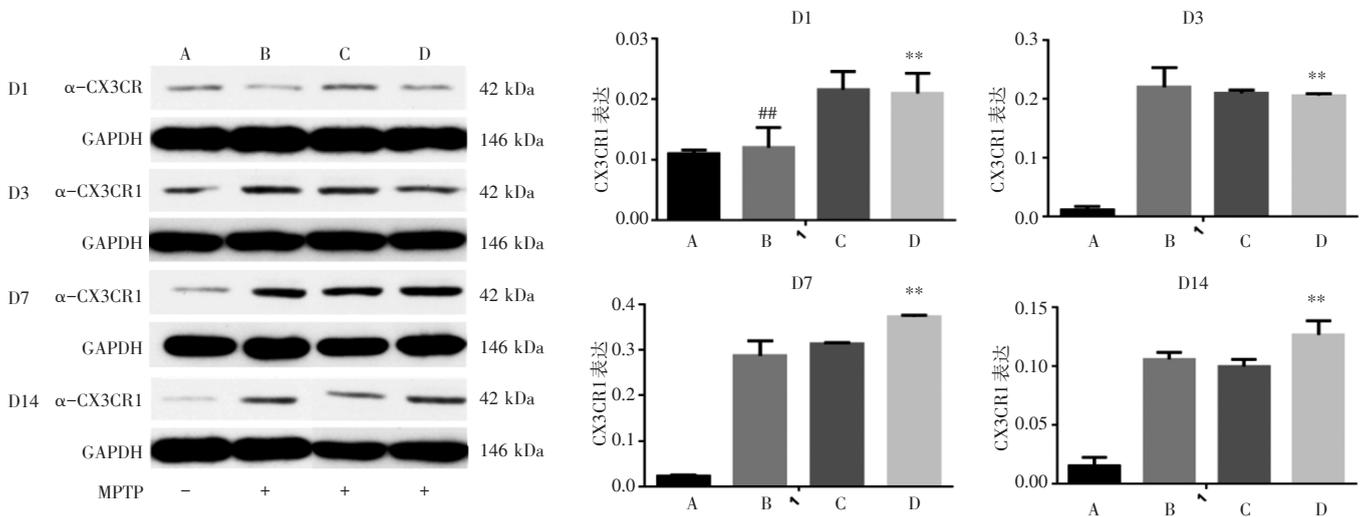
图4 松果菊苷对MPTP模型小鼠小胶质细胞特异性标志物(OX-42)及酪氨酸羟化酶(TH)表达的影响($\times 400, \bar{x} \pm s, n=8$)
Figure 4 Effects of echinacoside on the expression of OX-42 and TH in MPTP model mice($\times 400, \bar{x} \pm s, n=8$)



注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 松果菊苷对 CX3CR1 表达的影响 结果见图 5。与假手术组比, 帕金森病模型组的 CX3CR1 表达水平升高($P < 0.01$), 并且表现为随时间变化而升高的趋势, 第 7 天达到顶峰之后有所降低, 但第 14 天与第 1 天相比仍然是高表达状态, 证实了腹腔注射 MPTP 造模的确能上调脑内 CX3CR1 表达水平。此外, 检测结果显示, 侧脑室注射 Anti-CX3CR1 后,

与模型组比, Anti-CX3CR1 组第 1 天的 CX3CR1 表达水平下降($P < 0.01$), 第 3 天稍有升高, 第 7、14 天虽有下降趋势, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。松果菊苷给药后出现与 Anti-CX3CR1 组相类似的结果, 与模型组相比, 其第 7、14 天脑内的 CX3CR1 表达水平虽无统计学差异($P > 0.05$), 但也呈现出下降的趋势。



注: A, 假手术组; B, Anti-CX3CR1 组; C, 松果菊苷组; D, 模型组。与假手术组比较, $**P < 0.01$; 与模型组比较, $##P < 0.05$

图 5 给药第 1(D1)、3(D2)、7(D7)及 14(D14)天松果菊苷及 Anti-CX3CR1 对 MPTP 模型小鼠脑内 CX3CR1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Figure 5 The change of CX3CR1 expression in MPTP model after echinacoside and Anti-CX3CR1 injection for 1, 3, 7 and 14 day ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3 讨论

2018 年, 麻省医学院 Hickman S 等^[11]研究证实, PET 显示帕金森病时活化的小胶质细胞在大脑黑质中大量存在, 并且有证据提示, 与阿尔茨海默病(AD)中可见相同的“双刃剑”情况: 最初的保护性小胶质细胞逃避监管, 导致持续的破坏性神经炎症, 也出现在帕金森病中, 靶向调控小胶质细胞功能状态, 可以减轻或延缓神经退行性疾病的发生。

小胶质细胞根据其功能状态的不同, 形态学上有 3 种典型形态, 分支状、阿米巴样、反应性。分枝状静息状态多存在于正常脑组织, 形态学上表现为胞体小, 分枝状突起较长, 可以与神经元及其他胶质细胞紧密联系, 起到监视脑组织微环境的作用。脑内稳态一旦被打破, 小胶质细胞活化呈阿米巴样激活状态, 该状态多存在于中枢神经系统发育的早期, 也存在于机体严重损伤的情况下, 其表现为胞体变大, 突起增厚, 具有“阿米巴虫样”的短分枝状突起, 具备吞噬功能。还有一种介于两者之间的

反应性状态, 广泛存在于多种病理状态下^[15]。小胶质细胞是脑内唯一能进行有丝分裂的成熟细胞, 在病理条件下小胶质细胞在局部不同程度增殖与聚集, 形态与功能发生改变, 被称为“反应性胶质增生”^[16-17]。小胶质细胞被激活后, 一方面可以通过旁分泌释放 TNF- α 、过氧化亚硝酸盐、氧自由基等对多巴胺神经元产生二次损伤^[18-20]; 另一方面会通过炎症级联反应募集更多的小胶质细胞共同参与多巴胺神经元的损伤过程, 形成恶性循环, 使神经元-小胶质细胞网络被破坏, 无法维持正常的多巴胺神经元生存微环境, 导致帕金森病程进展^[21]。小胶质细胞长时间持续产生的趋化因子、黏附分子在帕金森病等慢性变性疾病中扮演着重要的角色, 并在一定程度上对神经元产生了不可逆的损害作用^[21-22]。因此, 寻求能够有效抑制小胶质细胞激活的治疗方式, 维持神经元-小胶质细胞生存微环境的稳态, 可能成为帕金森病治疗的新靶标。

在静息状态下, 小胶质可以自然吞噬凋亡细胞及

分泌营养因子促进神经元生长；在炎症激活状态下则是免疫细胞，作为免疫细胞时具有巨噬细胞的特点，对周围微环境的变化特别敏感，主要参与神经系统的炎症和免疫反应等，炎症反应、中风、创伤、中枢神经退行性疾病等都可迅速激活小胶质细胞。而小胶质细胞病理性激活后可破坏生存微环境，导致神经元损伤^[11]。Shan 等^[23]在对小胶质细胞活化机制的研究中发现，帕金森病模型中内源性趋化因子 CX3CL1 的表达被明显上调，并通过其特异性受体 CX3CR1 激活小胶质细胞。

CX3CL1 可通过作用于其特异性受体 CX3CR1 参与多种神经系统病变，故而 CX3CL1/CX3CR1 趋化因子受到研究者的广泛关注。已有研究^[24]表明，CX3CR1 通常表达于大脑内的小胶质细胞及神经元，在某些疾病中扮演重要角色，如阿尔兹海默病、帕金森综合征等。已有报导^[25-26]支持 CX3CL1/CX3CR1 是管理神经元和小胶质细胞相互关联的关键信号通路。Hickman S 等^[11]也证实，CX3CR1 是小胶质细胞中 3 个潜在的重要免疫检查点之一。

肉苁蓉属列当科肉苁蓉属植物，始载于《神农本草经》，被列为上品，作为中医补益中药常用品种，可治疗阳痿、不孕等证。研究^[19, 27-28]表明肉苁蓉所含的松果菊苷等成分具有神经保护作用，对帕金森病等神经系统疾病具有明显的疗效，这使肉苁蓉及其有效成分松果菊苷研究成为了中医药研究领域的热点之一。为进一步研究松果菊苷的神经保护作用，本实验以 MPTP 损伤小鼠多巴胺能神经元建立帕金森病模型，利用免疫组化和 Western Blot 检测技术，探讨松果菊苷在多巴胺能神经元损伤过程中的保护作用。

IgG+MPTP 组，是在造模成功的基础上，针对脑部用药设立的一组类似注射生理盐水作用的空白对照组，主要用来证明脑部注射 Anti-CX3CR1 后，能真正起到上调酪氨酸羟化酶表达水平并对神经元起到保护作用。由于 Anti-CX3CR1 是一种蛋白质，为了排除蛋白质本身会产生类似作用的疑惑，故设立 IgG 组，侧面证实 Anti-CX3CR1 组确实是由于 Anti-CX3CR1 的特性从而起到上调作用。

行为学结果表明，侧脑室给与 CX3CR1 抗体进行干预，能在一定程度上改善帕金森病小鼠的行为障碍。免疫组化结果表明，CX3CR1 抗体能抑制小胶质细胞的激活，及上调酪氨酸羟化酶表达水平。Western Blot 检测结果表明，侧脑室注射 CX3CR1 抗

体能在一定程度上下调 CX3CR1 的表达水平，但与 IgG+MPTP 组相比，差异无统计学意义，这可能与本实验长时间反复多次脑部给药可能引起脑内炎症等因素相关。

腹腔注射松果菊苷进行干预，能对帕金森病模型的行为学障碍具有一定的改善作用。所有行为学结果差异一般在第 7 天最为明显，这可能与松果菊苷的药效起效时间及需达到一定的剂量有关。免疫组化结果表明，松果菊苷能在一定程度上抑制小胶质细胞的激活，及上调酪氨酸羟化酶表达水平。Western blot 检测结果表明，腹腔注射松果菊苷在第 7、14 天表现为有下调 CX3CR1 表达量的趋势，这与侧脑室注射 CX3CR1 抗体所得出的结果非常相似，因此我们认为松果菊苷能改善帕金森病小鼠行为学障碍，上调酪氨酸羟化酶表达水平，抑制小胶质细胞激活，可能与抑制 CX3CR1 表达有关。

参考文献：

- [1] LI Y, PENG Y, MA P, et al. In vitro and in vivo metabolism of Cistanche tubulosa extract in normal and chronic unpredictable stress-induced depressive rats[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1125: 121728.
- [2] ROUSSEAU M W, MARCOGLIESE P C, QU D, et al. Progressive dopaminergic cell loss with unilateral-to-bilateral progression in a genetic model of Parkinson disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(39): 15918-15923.
- [3] CHENG H C, ULANE C M, BURKE R E. Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons[J]. Ann Neurol, 2010, 67(6): 715-725.
- [4] TAMTAJI O R, REITER R J, ALIPOOR R, et al. Melatonin and Parkinson disease: Current status and future perspectives for molecular mechanisms[J]. Cell Mol Neurobiol, 2020, 40(1): 15-23.
- [5] HO M S. Microglia in Parkinson's disease[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, (1175): 335-353.
- [6] SKODDA S, VISSER W, SCHLEGEL U. Short- and long-term dopaminergic effects on dysarthria in early Parkinson's disease[J]. J Neural Transm, 2010, 117(2): 197-205.
- [7] CASTRO-SÁNCHEZ S, GARCÍA-YAGÜE Á J, LÓPEZ-ROYO T, et al. Cx3cr1-deficiency exacerbates alpha-synuclein-A53T induced neuroinflammation and neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Glia, 2018, 66(8): 1752-1762.
- [8] HARMS A S, THOME A D, YAN Z, et al. Peripheral monocyte entry is required for alpha-Synuclein induced inflammation and neurodegeneration in a model of Parkinson disease[J]. Exp Neurol, 2018, 300: 179-187.
- [9] 屠鹏飞, 何燕萍, 楼之岑. 肉苁蓉的本草考证[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(1): 3-5.

- [10] 张杰, 赵天翼, 李鸿钰, 等. 管花肉苁蓉提取物中化学成分研究[J]. 海峡药学, 2016, 28(10): 39-41.
- [11] HICKMAN S, IZZY S, SEN P, et al. Microglia in neurodegeneration[J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(10): 1359-1369.
- [12] IZZO A A, ERNST E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review[J]. *Drugs*, 2001, 61(15): 2163-2175.
- [13] FENG X Y, ZHU M, ZHANG Q Q, et al. Selective protective effect of echinacoside on rotenone-induced rat model of Parkinson's disease in dopaminergic neurons[J]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2012, 10(7): 777-783.
- [14] 孙习文, 宋俊杰, 陈程哲, 等. 氯胺酮对MPTP诱导的帕金森病小鼠 α -synuclein及星形胶质细胞的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(6): 1042-1048.
- [15] 党园园, 张虹钊, 徐如祥. 小胶质细胞在中枢神经系统创伤后的双重作用及调控机制[J]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2016, 2(5): 305-312.
- [16] TESSA C, LUCETTI C, GIANNELLI M, et al. Progression of brain atrophy in the early stages of Parkinson's disease: A longitudinal tensor-based morphometry study in de novo patients without cognitive impairment[J]. *Hum Brain Mapp*, 2014, 35(8): 3932-3944.
- [17] HALLIDAY G, HELY M, REID W, et al. The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2008, 115(4): 409-415.
- [18] DONG H R, YE M, DING X S. Mechanisms for dopaminergic cell apoptosis in Parkinson's disease[J]. *Chinese journal of clinical Rehabilitation*, 2004, 8(4): 758-759.
- [19] TANAKA S, ISHII A, OHTAKI H, et al. Activation of microglia induces symptoms of Parkinson's disease in wild-type, but not in IL-1 knockout mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2013, 10: 143.
- [20] TAM W Y, MA C H. Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 7279.
- [21] FERRINI F, DE KONINCK Y. Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling[J]. *Neural Plast*, 2013, 2013: 429815.
- [22] LIU Y, YING Y, LI Y, et al. Neuronal network activity controls microglial process surveillance in awake mice via norepinephrine signaling[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(11): 1771-1781.
- [23] SUN S, TANG H M, FENG Y, et al. New evidences for fractalkine/CX3CL1 involved in substantianigral microglial activation and behavioral changes in a rat model of Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2011, 32(3): 443-458.
- [24] MECCA C, GIAMBANCO I, DONATO R, Arcuri C. Microglia and Aging: the Role of the TREM2-DAP12 and CX3CL1-CX3CR1 Axes[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): 318.
- [25] HELMKE A, NORDLOHNE J, BALZER M S, et al. CX3CL1-CX3CR1 interaction mediates macrophage-mesothelial cross talk and promotes peritoneal fibrosis[J]. *Kidney Int*, 2019, 95(6): 1405-1417.
- [26] LEE S, VARVEL N H, KONERTH M E, et al. CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models[J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(5): 2549-2562.
- [27] TRISTÃO F S, AMAR M, LATROUS I, et al. Evaluation of nigrostriatalneuro-degeneration and neuroinflammation following repeated intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in mice, an experimental model of Parkinson's disease[J]. *Neurotox Res*, 2014, 25(1): 24-32.
- [28] WANG X Y, XU R, CHEN J, et al. Detection of Cistanches Herba (Rou Cong Rong) medicinal products using species-specific nucleotide signatures[J]. *Front Plant Sci*, 2018, 13(9): 1643.

(编辑: 修春)