

引用:李明,李琦,罗佳晶,张佳诺.基于AMPK/mTOR通路探究养血清脑颗粒对帕金森综合征大鼠的作用及机制[J].中医导报,2025,31(1):27-31,60.

基于AMPK/mTOR通路探究养血清脑颗粒对帕金森综合征大鼠的作用及机制*

李明,李琦,罗佳晶,张佳诺

(北京中医药大学东直门医院,北京 100700)

[摘要] 目的:探究养血清脑颗粒(YXQNG)对帕金森综合征(PD)大鼠的作用及YXQNG在该过程中对AMPK/mTOR通路的调节机制。方法:将SPF级SD雄性大鼠随机分为对照组、模型组、YXQNG低剂量组、YXQNG高剂量组、YXQNG高+AMPK抑制剂(YXQNG高+Compound C)组,每组15只。评估各组大鼠的行为能力;苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠黑质组织的病理学变化;免疫组化法检测大鼠黑质中酪氨酸羟化酶(TH)和 α -突触核蛋白(α -Syn)的阳性表达;蛋白免疫印迹(Western blotting)检测大鼠纹状体中AMPK/mTOR通路及自噬相关蛋白的表达。结果:与对照组比较,模型组大鼠旋转圈数、脑黑质中MDA水平、 α -Syn表达、多巴胺能神经元凋亡率、mTOR的磷酸化水平及p62的表达均升高,脑黑质中SOD水平、TH阳性表达、AMPK的磷酸化水平及LC3 II/I的比例均降低($P<0.05$);与模型组比较,YXQNG低、高剂量组大鼠的旋转圈数、脑黑质中MDA水平、 α -Syn表达、多巴胺能神经元凋亡率、mTOR的磷酸化水平及p62的表达均降低,脑黑质中SOD水平、TH阳性表达、AMPK的磷酸化水平及LC3 II/I的比例均升高($P<0.05$);进一步加入AMPK抑制剂,结果发现高剂量YXQNG对PD大鼠的保护作用及对AMPK/mTOR通路的促进作用均被逆转($P<0.05$)。结论:YXQNG可能通过促进AMPK/mTOR信号通路来保护PD大鼠。

[关键词] 帕金森综合征;养血清脑颗粒;腺苷一磷酸激活蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路;自噬;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)01-0027-05

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.01.005

The Effect and Mechanism of Yangxue Qingnao Granules (养血清脑颗粒) on Parkinson's Syndrome Rats Based on AMPK/mTOR Pathway

LI Ming, LI Qi, LUO Jiajing, ZHANG Jianuo

(Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To investigate the impact of Yangxue Qingnao granule (YXQNG) on Parkinson's syndrome (PD) rats and its regulatory mechanism on the AMPK/mTOR pathway during this process. Methods: SPF grade SD male rats were randomly grouped into control group, model group, YXQNG low-dose group, YXQNG high-dose group, and YXQNG high+AMPK inhibitor (YXQNG high+Compound C) group, with 15 rats in each group. The behavioral ability of rats in each group was evaluated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was applied to observe pathological changes in the substantia nigra of rats. Immunohistochemical method was applied to detect the positive expression of tyrosine hydroxylase (TH) and α -synaptic nuclear protein (α -Syn) in the substantia nigra of rats. Western blotting was applied to detect the expression of AMPK/mTOR pathway and autophagy related proteins in the rat striatum. Results: Compared with the control group, the number of rotations, the level of MDA, expression of α -Syn, apoptosis rate of dopaminergic neurons, phosphorylation level of mTOR, and expression of p62 in the substantia nigra increased in the model group, while the levels of SOD, positive expression of TH, phosphorylation level of AMPK, and the proportion of LC3 III/I in the substantia nigra of the brain decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the number of rotations, the level of MDA, expression of α -Syn, apoptosis rate of dopaminergic neurons, phosphorylation level of mTOR, and expression of p62 in the substantia nigra decreased in the YXQNG low and high dose groups while the levels of SOD, positive expression

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(82174340)

of TH, phosphorylation level of AMPK, and the proportion of LC3 II/I in the substantia nigra of the brain increased ($P < 0.05$). With addition of AMPK inhibitors, the protective effect of high-dose YXQNG on PD rats and its promoting effect on the AMPK/mTOR pathway were reversed ($P < 0.05$). Conclusion: YXQNG may protect PD rats by promoting the AMPK/mTOR signaling pathway.

[Keywords] Parkinson's syndrome; Yangxue Qingnao granules; AMPK/mTOR pathway; autophagy; rat

帕金森综合征(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经退行性疾病,主要特征是由于多巴胺能黑质纹状体系统的损伤而导致的运动活动退化,其临床特征是运动迟缓、静止性震颤、强直,以及姿势和步态的改变。运动障碍导致进行性残疾,日常生活活动受损,生活质量下降^[1-2]。PD的病理学机制比较复杂,主要与线粒体功能障碍、氧化应激、神经毒素和神经炎症等相关。据了解,在大多数PD动物模型中,线粒体自噬可以通过清除黑质致密部(substantia nigra dense part, SNpc)积累的 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -Syn)对多巴胺能神经元产生保护作用,最终促进细胞存活^[3-4]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是细胞生长和增殖的中枢调节因子,能够形成mTORC1和mTORC2两种复合物,其中mTORC1受生长因子、氨基酸和细胞能量等多种信号调节,同时也可以调节翻译、转录和自噬等重要的细胞过程^[5]。腺苷一磷酸激活蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)是一种重要的生理能量传感器,可以协调多种代谢途径,平衡能量供需。AMPK也是mTOR重要的上游调节分子,在自噬中起负调控作用^[6]。目前已有大量研究^[6-7]显示,通过激活AMPK/mTOR信号途径介导的自噬可以保护PD多巴胺能神经元。养血清脑颗粒(Yangxue Qingnao Granule, YXQNG)是由中医经典名方四物汤加减改良而成的中药复方制剂,具有补血、清肝的功效,被广泛用于治疗血虚、肝阳上亢引起的头痛、眩晕、失眠、头晕及血管性痴呆等病症,为临床常用中药复方^[8]。有研究^[9]证明YXQNG能够通过抑制内质网应激相关通路的激活来缓解PD大鼠的症状,但其对线粒体功能障碍的作用机制还不清楚。因此,本研究旨在探讨YXQNG是否能够通过调控AMPK/mTOR信号通路对PD大鼠发挥保护作用。

1 材 料

1.1 实验动物 SPF级SD雄性大鼠80只,6周龄,体质量(180 ± 20)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,生产许可证号为SCXK(京)2019-0008。本实验所有大鼠均置于温度 26°C ,湿度60%的环境中饲养。实验动物合格证号:SYXK(京)2020-0013。本实验通过北京中医药大学东直门医院伦理委员会审批(批准号:2021-00926)。

1.2 主要试剂与仪器 养血清脑颗粒(规格:4 g/袋,天士力医药集团股份有限公司,批号:22052418);Compound C(AMPK抑制剂,美国MedChemExpress公司,批号:LotNo.258);6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA, 美国Sigma公司,批号:MKCN9040);阿扑吗啡注射液(规格:5 mg/mL,东北制药集团沈阳第一制药有限公司,批号:20220215);TUNEL原位细胞凋亡检测试剂盒(绿色,AF488)(武汉益普生物科技有限公

司,批号:52733700);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号:10619)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(批号:B10238)均购自北京伊塔生物科技有限公司;酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体(批号:3193)、 α -Syn抗体(批号:20535)、AMPK抗体(批号:19549)、p-AMPK抗体(批号:5683)、mTOR抗体(批号:Y319)、p-mTOR抗体(批号:4262)、LC3 II/I 抗体(批号:187095)、p62抗体(批号:18351)均购自英国abcam公司;Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG(H+L)(翌圣生物科技股份有限公司,批号:34850-60)。SpectraMax iD5多功能微孔板酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司);尼康光学显微镜E100(上海普赫生物科技有限公司);德国徕卡共聚焦显微镜(上海徕卡显微系统贸易有限公司);iBright CL1500成像系统(赛默飞世尔科技公司)。

2 方 法

2.1 大鼠模型建立 在所有大鼠中随机选取15只作为对照组。其余大鼠均参照文献[10]用6-OHDA注射制备PD大鼠模型:先用1%戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉大鼠,剪去头部毛发,将头部固定在立体定位仪上,用碘消毒后,切开大鼠头皮、皮下组织和骨膜,使用牙钻准确地钻取定位的颅骨,没有损伤硬脑膜,然后使用10 mL的微量注射器以 0.5 mL/min 的速度将溶解在0.02%抗坏血酸盐水中的6-OHDA溶液注射到左内侧前脑束(前囟后4.3 mm,中线外侧4.3 mm,硬膜表面下8.2 mm)中,在脑中停留5 min后缓慢取出注射器,以避免回流,后缝合伤口,并连续7 d腹腔注射青霉素预防感染。对照组仅注射等量的含抗坏血酸的生理盐水。造模成功标准:术后14 d,腹腔注射阿扑吗啡(0.5 mg/kg)诱发大鼠旋转试验,并诱导大鼠向对侧旋转,观察30 min内旋转圈数,平均旋转次数 ≥ 7 次/min,则视为造模成功,共60只。

2.2 动物分组及处理 将造模成功的大鼠随机分为模型组、YXQNG低剂量组、YXQNG高剂量组、YXQNG高+AMPK抑制剂(YXQNG高+Compound C)组,每组15只。YXQNG低、高剂量组大鼠分别灌胃 3.2 g/kg 、 6.4 g/kg 的YXQNG^[9],YXQNG高+Compound C组大鼠先灌胃 6.4 g/kg 的YXQNG,再腹腔内注射 $250\text{ }\mu\text{g/kg}$ 的AMPK抑制剂Compound C^[11],对照组和模型组均以相同方式给予等量的生理盐水,1次/d,持续28 d。

2.3 各组大鼠的行为学评估 旋转试验:在大鼠末次给药结束24 h后,腹腔注射阿扑吗啡(0.5 mg/kg),诱导大鼠发生旋转行为,并记录30 min内大鼠旋转的圈数。

2.4 检测大鼠黑质组织中SOD和MDA的水平 行为学检测完成后,所有大鼠用1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,用盐水和预冷的4%多聚甲醛经心脏灌注,迅速取出大脑,并在每组中随机选择5个置于4%多聚甲醛中固定过夜。剩余脑组织

迅速置于冰上分离脑黑质,PBS清洗后取部分($n=5$)加入PBS进行匀浆,其余脑黑质均冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。然后将研磨后的匀浆, $8\,000\times g$ 离心 10 min ,取上清,并分别利用SOD检测试剂盒(ELISA)和MDA检测试剂盒(TBA微板法)测定黑质组织中SOD和MDA的水平。

2.5 免疫组化法检测黑质中TH和 α -Syn阳性表达 取“2.4”中固定过夜的脑组织,进行常规脱水、透明和石蜡包埋,然后使用切片机将脑组织切成包含中脑SNpc和纹状体的冠状切片($5\text{ }\mu\text{m}$),将切片脱蜡水化后进行抗原修复,并使内源性过氧化氢酶灭活,然后用5%BSA封闭 30 min ,洗涤后分别与TH和 α -Syn抗体(1:500)在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,洗涤后再与Alexa Fluor 488标记的山羊抗兔IgG二抗(1:500)在室温下孵育 1 h ,DAB显色,脱水透明后树脂封片。光学显微镜下观察黑质中TH和 α -Syn阳性表达(棕黄色)。每张切片选择5个区域,利用Image-Pro Plus 6.0软件分析并测定光密度,取均值。

2.6 TUNEL染色检测大鼠脑黑质多巴胺能神经元的凋亡 取“2.5”中的石蜡切片进行脱蜡水化,然后严格按照细胞凋亡检测试剂盒的操作加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ TUNEL工作液,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h ,PBS冲洗后将样本浸入装有PBS配制的DAPI溶液中,避光孵育 5 min ,最后清洗样本并用含抗荧光淬灭剂的封片剂封片,在荧光显微镜下观察细胞染色情况并计算凋亡率,凋亡率(%)=阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。每张切片任选5个视野计数,取均值。

2.7 Western Blotting检测黑质组织中AMPK/mTOR通路及自噬相关蛋白的表达 取“2.4”中冻存的黑质组织置于玻璃匀浆器中,加入蛋白裂解液匀浆, $12\,000\times g$ 离心 15 min ,收集上清,用BCA测定蛋白浓度。然后将变性后的蛋白样品用10%SDS-PAGE凝胶进行电泳,并转移至PVDF膜上。PVDF膜用5%脱脂牛奶封闭 1 h ,随后加入一抗稀释液(AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、p62比例1:1 000,LC3 II / I 比例1:500),在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,TBST清洗后加入羊抗兔IgG二抗稀释液(1:500),室温孵育 2 h ,最后用ECL显影。以GAPDH为内参蛋白,用凝胶成像仪和Image J软件分析蛋白表达水平。

2.8 统计学方法 采用Graphpad prism 8.0软件统计分析数据,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK- q 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 YXQNG对PD大鼠行为学的影响 与对照组比较,模型组

大鼠的旋转圈数增多($P<0.05$);与模型组比较,YXQNG低、高剂量组大鼠的旋转圈数减少($P<0.05$);与YXQNG高剂量组比较,YXQNG高+Compound C组大鼠的旋转圈数增多($P<0.05$)。(见表1)

表 1 各组大鼠旋转圈数比较 ($\bar{x}\pm s$)		
组别	n	旋转圈数/圈
对照组	15	6.28 ± 1.24
模型组	15	237.41 ± 15.87^a
YXQNG低剂量组	15	198.64 ± 16.12^{ab}
YXQNG高剂量组	15	165.93 ± 13.75^{ab}
YXQNG高+Compound C组	15	221.46 ± 16.83^{abc}
F		652.653
P		0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与YXQNG高剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

3.2 YXQNG对PD大鼠黑质中SOD和MDA水平的影响 与对照组比较,模型组大鼠脑黑质中SOD水平降低,MDA水平升高($P<0.05$);与模型组比较,YXQNG低、高剂量组大鼠SOD水平升高,MDA水平降低($P<0.05$);与YXQNG高剂量组比较,YXQNG高+Compound C组大鼠SOD水平降低,MDA水平升高($P<0.05$)。(见表2)

表 2 各组大鼠黑质中 SOD 和 MDA 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)			
组别	n	SOD/(U/mg)	MDA/(nmol/mg)
对照组	15	118.96 ± 9.23	2.46 ± 0.18
模型组	15	54.81 ± 4.26^a	5.37 ± 0.42^a
YXQNG低剂量组	15	75.73 ± 6.43^{ab}	3.82 ± 0.24^{ab}
YXQNG高剂量组	15	106.78 ± 9.16^{ab}	2.95 ± 0.17^{ab}
YXQNG高+Compound C组	15	62.42 ± 5.37^{abc}	4.76 ± 0.31^{abc}
F		227.753	281.637
P		0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与YXQNG高剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

3.3 YXQNG对PD大鼠黑质中TH和 α -Syn阳性表达的影响 与对照组比较,模型组大鼠脑黑质中TH阳性表达降低, α -Syn阳性表达升高($P<0.05$);与模型组比较,YXQNG低、高剂量组大鼠黑质中TH阳性表达升高, α -Syn阳性表达降低($P<0.05$);与YXQNG高剂量组比较,YXQNG高+Compound C组大鼠黑质中TH阳性表达降低, α -Syn阳性表达升高($P<0.05$)。(见图1、表3)

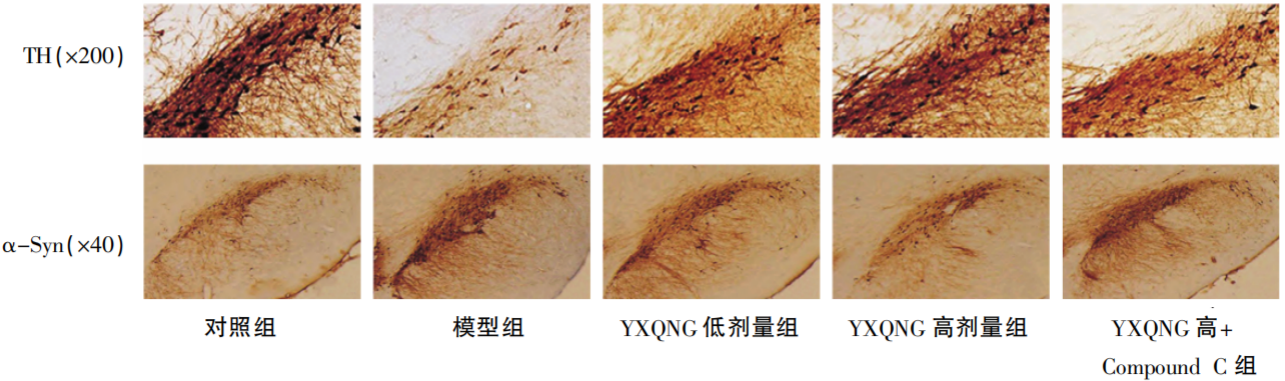


图 1 各组大鼠黑质中 TH 和 α -Syn 免疫组化染色结果

表 3 各组大鼠黑质中 TH 和 α -Syn 阳性表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TH	α -Syn
对照组	15	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
模型组	15	0.28 $\pm$ 0.02 ^a	2.14 $\pm$ 0.18 ^a
YXQNG低剂量组	15	0.51 $\pm$ 0.03 ^{ab}	1.63 $\pm$ 0.12 ^{ab}
YXQNG高剂量组	15	0.87 $\pm$ 0.06 ^{ab}	1.27 $\pm$ 0.07 ^{ab}
YXQNG高+Compound C组	15	0.36 $\pm$ 0.02 ^{abc}	1.86 $\pm$ 0.14 ^{abc}
F		472.783	72.493
P		0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与YXQNG高剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

3.4 YXQNG对PD大鼠黑质多巴胺能神经元凋亡的影响 与对照组比较,模型组大鼠脑黑质多巴胺能神经元凋亡率升高($P<0.05$);与模型组比较,YXQNG低、高剂量组大鼠黑质多巴胺能神经元凋亡率降低($P<0.05$);与YXQNG高剂量组比较,YXQNG高+Compound C组大鼠黑质多巴胺能神经元凋亡率升高($P<0.05$)。(见图2、表4)

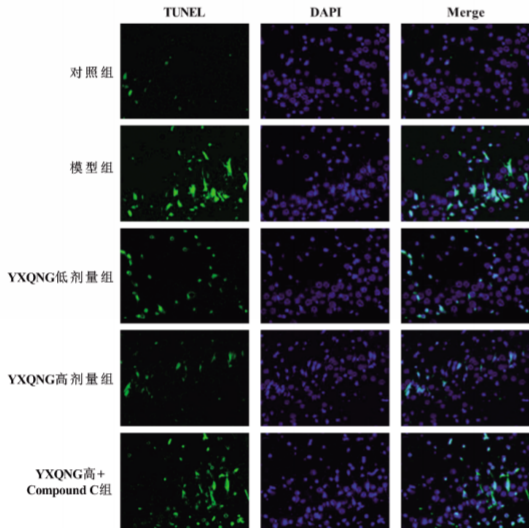


图 2 各组大鼠黑质多巴胺能神经元的 TUNEL 染色结果 ($\times 400$)

表 4 各组大鼠黑质中多巴胺能神经元凋亡率的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	神经元凋亡率/%
对照组	15	5.63 $\pm$ 0.72
模型组	15	52.76 $\pm$ 4.14 ^a
YXQNG低剂量组	15	36.81 $\pm$ 2.57 ^{ab}
YXQNG高剂量组	15	18.79 $\pm$ 1.35 ^{ab}
YXQNG高+Compound C组	15	45.96 $\pm$ 3.42 ^{abc}
F		251.258
P		0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与YXQNG高剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

3.5 YXQNG对PD大鼠纹状体中 AMPK/mTOR 通路及自噬相关蛋白表达的影响 与对照组比较,模型组大鼠脑黑质中 p-AMPK/AMPK 和 LC3 II / I 比例降低, p-mTOR/mTOR 比例和 p62 表达升高($P<0.05$);与模型组比较,YXQNG低、高剂量组大鼠黑质中 p-AMPK/AMPK 和 LC3 II / I 比例升高, p-mTOR/mTOR 比例和 p62 表达降低($P<0.05$);与YXQNG高剂量组比较,

YXQNG高+Compound C组大鼠黑质中 p-AMPK/AMPK 和 LC3 II / I 比例降低, p-mTOR/mTOR 比例和 p62 表达升高($P<0.05$)。(见图3、表5)

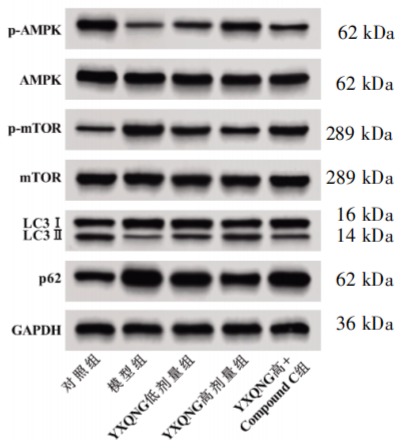


图 3 各组大鼠纹状体中 AMPK/mTOR 通路及自噬相关蛋白表达条带

表 5 各组大鼠纹状体中 AMPK/mTOR 通路及自噬相关蛋白相对表达量 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR	LC3 II / I	p62
对照组	15	0.87 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.04	0.83 $\pm$ 0.06
模型组	15	0.24 $\pm$ 0.02 ^a	0.97 $\pm$ 0.07 ^a	0.21 $\pm$ 0.02 ^a	1.95 $\pm$ 0.13 ^a
YXQNG低剂量组	15	0.48 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.73 $\pm$ 0.05 ^{ab}	0.47 $\pm$ 0.03 ^{ab}	1.52 $\pm$ 0.09 ^{ab}
YXQNG高剂量组	15	0.74 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.48 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.65 $\pm$ 0.04 ^{ab}	1.16 $\pm$ 0.07 ^{ab}
YXQNG高+Compound C组	15	0.36 $\pm$ 0.02 ^{abc}	0.85 $\pm$ 0.06 ^{abc}	0.28 $\pm$ 0.02 ^{abc}	1.73 $\pm$ 0.12 ^{abc}
F		226.897	131.037	280.765	104.525
P		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与YXQNG高剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

4 讨 论

PD是主要的神经退行性疾病之一,具有进行性神经变性,其特征在SNpc中多巴胺能神经元的缺失和主要由 α -Syn聚集组成的路易体的形成,进而导致患者出现震颤、僵硬、运动迟缓和姿势不稳等症状^[12]。已知PD的发病机制非常复杂,其中氧化应激、线粒体功能障碍和蛋白质聚集等一些潜在的病理生理学机制,与受损的自噬和凋亡密切相关,被认为是阻止PD发展的重要途径^[13]。据了解,6-OHDA是制备PD动物模型常用的神经毒素,可损伤脑黑质-纹状体的多巴胺能神经元,诱导动物产生氧化应激和线粒体功能障碍,是构建PD模型的经典方法之一^[14]。因此,本研究通过注射6-OHDA建立PD大鼠模型。结果发现,造模大鼠出现明显的行动迟缓、不平衡、肢体僵硬等症状,每分钟旋转圈数大于7次且明显高于对照组,表明了6-OHDA成功诱导PD大鼠模型。

氧化应激和线粒体功能障碍是PD发病的主要机制,是损害PD多巴胺能神经元的重要因素。氧化应激可以导致脂质过氧化,以及 α -Syn错误折叠、修饰和聚集成神经毒性低聚物,导致多巴胺能神经元死亡^[15]。越来越多的证据表明, α -Syn与PD的线粒体功能障碍有关,且被作为诊断PD和检测疾病进展的有用生物标志物^[16]。TH是一种单加氧酶,也是左旋多巴

胺合成第一步的限速酶。因此,TH在多巴胺的合成中非常重要,其表达较低或不足会直接影响多巴胺的合成和分泌^[15]。YXQNG由熟地黄、钩藤、当归、白芍、川芎、鸡血藤、延胡索、夏枯草、珍珠母、决明子、细辛等组方而成,具有养血平肝、活血通络等功效。有研究^[9,17]表明YXQNG能够改善脑内微循环障碍,辅助治疗阿尔茨海默病及PD。本研究结果显示,YXQNG低、高剂量组大鼠的旋转圈数及脑黑质中MDA水平、 α -Syn表达和多巴胺能神经元凋亡率均低于模型组,脑黑质中SOD水平和TH表达均高于模型组。表明YXQNG能够减轻PD大鼠的运动障碍,抑制大鼠的氧化应激和线粒体功能障碍,促进多巴胺的合成和分泌,从而抑制多巴胺神经元死亡,抑制PD的发展。

自噬是一个自我降解的过程,是一种至关重要的生存机制,在治疗包括神经退行性疾病在内的各种疾病中起着关键作用^[6]。自噬功能障碍会导致神经元死亡,抑制过度的自噬体形成或恢复溶酶体功能可以提供一定的神经保护,这表明自噬的调节是PD的一个可行治疗靶点^[18]。AMPK是一种重要的ATP/AMP能量传感器,主要维持能量稳态。AMPK激活通过增加分解代谢途径来调节代谢,例如自噬和脂肪酸氧化。mTOR是AMPK的一个下游靶标,对自噬活性进行负调节^[19]。研究^[20-21]发现,AMPK/mTOR通路在6-OHDA诱导的PD自噬调节中起关键作用。例如,AMPK/mTOR信号通路被激活能够促进PD中 α -Syn的清除和自噬功能的激活,进而阻止PD的发展^[22]。LC3以LC3 I和LC3 II的形式存在,是自噬中最重要的蛋白质分子,主要参与自噬体的形成,因此检测LC3可以反映自噬的完整性^[5]。p62是泛素化系统中的衔接蛋白,也是选择性自噬中的货物蛋白受体,目前已成为衡量自噬通量的可靠指标^[23]。本研究结果显示,模型组大鼠脑黑质中AMPK的磷酸化水平及LC3 II/I的比例低于对照组,mTOR的磷酸化水平及p62的表达高于对照组。YXQNG低、高剂量组中AMPK的磷酸化水平及LC3 II/I的比例高于模型组,mTOR的磷酸化水平及p62的表达低于模型组。本研究在YXQNG高剂量的基础上进一步加入AMPK抑制剂,结果发现高剂量YXQNG对PD大鼠的保护作用及对AMPK/mTOR通路的促进作用均被逆转。这揭示了YXQNG能够保护PD大鼠的运动和认知障碍,减轻神经元的损伤,其作用机制可能是通过促进AMPK/mTOR通路介导的自噬。

综上所述,YXQNG可能通过促进AMPK/mTOR信号通路来缓解PD大鼠的神经元损伤。本研究为YXQNG成为治疗PD的潜在药物提供了充分的理论依据。但由于PD的发病机制非常复杂,本研究仅通过线粒体自噬和氧化应激探讨了PD可能的治疗靶点,更多关于PD的治疗方向还有待更深入的研究和探讨。

参考文献

- [1] PAJARES M, ROJO A I, MANDA G, et al. Inflammation in Parkinson's disease: Mechanisms and therapeutic implications[J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1687.
- [2] TOLOSA E, GARRIDO A, SCHOLZ S W, et al. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(5): 385-397.
- [3] ABHANGI K V, PATEL J I. Neuroprotective effects of linagliptin in a rotenone-induced rat model of Parkinson's disease[J]. *Indian J Pharmacol*, 2022, 54(1): 46-50.
- [4] CHEN P, WANG Y L, CHEN L L, et al. Apelin-13 protects dopaminergic neurons against rotenone-induced neurotoxicity through the AMPK/mTOR/ULK-1 mediated Autophagy Activation[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8376.
- [5] SU S, WANG X, XI X N, et al. Phellodendrine promotes autophagy by regulating the AMPK/mTOR pathway and treats ulcerative colitis[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(12): 5707-5720.
- [6] ZHANG L J, PARK J Y, ZHAO D, et al. Neuroprotective effect of astersaponin I against Parkinson's disease through autophagy induction[J]. *Biomol Ther*, 2021, 29(6): 615-629.
- [7] CHEN M, PENG L, GONG P, et al. Baicalein induces mitochondrial autophagy to prevent Parkinson's disease in rats via miR-30b and the SIRT1/AMPK/mTOR pathway[J]. *Front Neurol*, 2022, 12: 646817.
- [8] JIA Y J, WANG J, HOU Y L. A meta-analysis of the effectiveness of Yangxue Qingnao Granules for the treatment of chronic cerebral circulation insufficiency [J]. *Brain Behav*, 2020, 10(5): e01606.
- [9] 朱福连,梁培日,张创良.养血清脑颗粒对帕金森综合征大鼠认知功能障碍及PERK/ATF4/CHOP通路的影响[J]. *现代医学*, 2022, 50(4): 423-429.
- [10] 李琳,周云鹏,刘喜灿,等.基于Wnt/ β -catenin信号通路黄芩素对帕金森大鼠旋转行为及对脑黑质多巴胺能神经元凋亡的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(4): 395-401.
- [11] LIN S R, LIN Q M, LIN Y J, et al. Bradykinin postconditioning protects rat hippocampal neurons after restoration of spontaneous circulation following cardiac arrest via activation of the AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(10): 2232-2237.
- [12] VALLÉE A, VALLÉE J N, LECARPENTIER Y. Parkinson's disease: potential actions of lithium by targeting the WNT/ β -Catenin pathway, oxidative stress, inflammation and glutamatergic pathway[J]. *Cells*, 2021, 10(2): 230.
- [13] WITUCKI L, KURPIK M, JAKUBOWSKI H, et al. Neuroprotective effects of cranberry juice treatment in a rat model of Parkinson's disease[J]. *Nutrients*, 2022, 14(10): 2014.
- [14] 王文文,邵彦江,张新乐,等.丁苯酞软胶囊通过下调miR-137促进线粒体自噬对帕金森病大鼠发挥保护作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(12): 2172-2179.
- [15] ZHOU X Y, HUANG N Q, HOU X Y, (下转第60页)

- [16] LUO S, WEN R Y, WANG Q, et al. Rhubarb Peony Decoction ameliorates ulcerative colitis in mice by regulating gut microbiota to restoring Th17/Treg balance[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 231: 39–49.
- [17] DING A G, WEN X H. Dandelion root extract protects NCM460 colonic cells and relieves experimental mouse colitis[J]. *J Nat Med*, 2018, 72(4): 857–866.
- [18] LIU Y L, ZHOU M Y, YANG M, et al. Pulsatilla chinensis saponins ameliorate inflammation and DSS-induced ulcerative colitis in rats by regulating the composition and diversity of intestinal flora[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 728929.
- [19] 周正华, 冀建斌, 康洪昌, 等. 青赤散对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群及Treg/Th17免疫平衡的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(8): 4438–4442.
- [20] 潘丹峰, 苍玉珍, 沈峰, 等. 健脾法联合肠内营养对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的影响[J]. *新医学*, 2020, 51(9): 691–696.
- [21] 赵珈华, 李亚彤, 李玉婷, 等. 肠道菌群的功能及其在自身免疫病和过敏性疾病中的作用[J]. *国际免疫学杂志*, 2021, 44(6): 676–682.
- [22] 魏秀楠, 王晗璐, 孙大娟, 等. 基于肠道菌群探讨安肠愈疡汤联合美沙拉秦治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(1): 136–140.
- [23] GALIPEAU H J, CAMINERO A, TURPIN W, et al. Novel fecal biomarkers that precede clinical diagnosis of ulcerative colitis[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(5): 1532–1545.
- [24] NISHIHARA Y, OGINO H, TANAKA M, et al. Mucosa-associated gut microbiota reflects clinical course of ulcerative colitis[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 13743.
- [25] 毛慧芳, 梁永林. 黏质阿克曼菌及其代谢物短链脂肪酸与溃疡性结肠炎肠黏膜屏障的相关性研究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(4): 1411–1431.
- [26] BU F, DING Y, CHEN T, et al. Total flavone of *Abelmoschus Manihot* improves colitis by promoting the growth of *Akkermansia* in mice[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 20787.
- [27] 李翠茹, 彭买姣, 谭周进. 肠道菌群相关短链脂肪酸的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2022, 30(13): 562–570.
- [28] HAQ S, GRONDIN J A, KHAN W I. Tryptophan-derived serotonin-kynurenine balance in immune activation and intestinal inflammation[J]. *FASEB J*, 2021, 35(10): e21888.

(收稿日期: 2024-03-06 编辑: 罗英姣)

- (上接第31页) et al. Icaritin attenuates 6-OHDA-induced MN9D cell damage by inhibiting oxidative stress [J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13256.
- [16] QUE R F, ZHENG J L, CHANG Z H, et al. DL-3-n-butylphthalide rescues dopaminergic neurons in Parkinson's disease models by inhibiting the NLRP3 inflammasome and ameliorating mitochondrial impairment [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 794770.
- [17] 黄丽, 莫林宏, 刘爱贤. 养血清脑颗粒治疗阿尔茨海默病的疗效及对血管内皮生长因子的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(14): 121–126.
- [18] HE X, YUAN W, LI Z J, et al. 6-Hydroxydopamine induces autophagic flux dysfunction by impairing transcription factor EB activation and lysosomal function in dopaminergic neurons and SH-SY5Y cells[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 283: 58–68.
- [19] LI L R, LI Q H, HUANG W B, et al. Dapagliflozin alleviates hepatic steatosis by restoring autophagy via the AMPK-mTOR pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 589273.
- [20] ZHOU L N, CHENG Y. Alpha-lipoic acid alleviated 6-OHDA-induced cell damage by inhibiting AMPK/mTOR mediated autophagy[J]. *Neuropharmacology*, 2019, 155: 98–103.
- [21] WANG W S, LV R X, ZHANG J J, et al. circSAMD4A participates in the apoptosis and autophagy of dopaminergic neurons via the miR-29c-3p mediated AMPK/mTOR pathway in Parkinson's disease[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(1): 540.
- [22] XU J, AO Y L, HUANG C H, et al. Harmol promotes α -synuclein degradation and improves motor impairment in Parkinson's models via regulating autophagy-lysosome pathway[J]. *NPJ Parkinsons Dis*, 2022, 8(1): 100.
- [23] YU F Q, MA R C, LIU C G, et al. SQSTM1/p62 promotes cell growth and triggers autophagy in papillary thyroid cancer by regulating the AKT/AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 638701.

(收稿日期: 2023-05-10 编辑: 李海洋)