

白头翁皂苷组合物对帕金森病和阿尔茨海默病模型小鼠的改善作用

黄天衍^{1,2}, 苑仁祎坤^{1,2}, 何佳^{1,2}, 韩珊^{1,2}, 李佶朗^{1,2}, 梁晓伟^{1,2}, 高翔^{1,2}, 高红伟^{1,2*}

1. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530020

2. 中药壮瑶药创新药物教育部工程研究中心, 广西南宁 530020

摘要: 目的 探讨白头翁皂苷B₄和常春藤皂苷C (HSC, 又名白头翁皂苷B₅) 质量比为4:1的组合物对帕金森病和阿尔茨海默病模型小鼠的保护作用及机制。方法 取60只健康雄性C57BL/6小鼠, 随机抽取10只作为对照组, 剩余50只小鼠ip 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 制备帕金森病 (PD) 模型, 模型构建成功后随机分为模型组、左旋多巴胺片(阳性对照, 30 mg·kg⁻¹)组和白头翁皂苷B₄+HSC高、中、低剂量(20、10、5 mg·kg⁻¹)组, 每组10只, ig给药14 d, 每天1次, 对照、模型组小鼠ig等量0.9%的氯化钠溶液。每2天观察动物震颤行为出现与消失的时间, 于给药第7、14天展开行为学实验并记录评分; HE染色法观察脑组织黑质病理学变化; 免疫组化检测脑组织α-突触核蛋白表达; 实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 检测小鼠脑组织多巴胺转运体 (DAT)、酪氨酸羟化酶 (TH) mRNA表达。将50只APP/PS1转基因小鼠随机分为模型组、盐酸多奈哌齐(阳性药, 1.5 mg·kg⁻¹)组和白头翁皂苷B₄+HSC高、中、低剂量(20、10、5 mg·kg⁻¹)组, 取10只同背景APP/PS1转基因阴性小鼠作为对照组, 每天1次, 连续ig给药28 d, 模型组和对照组ig等量0.9%的氯化钠溶液。给药结束后进行行为学实验并记录评分; ELISA法检测小鼠血清中炎症因子白细胞介素 (IL-6、IL-1β)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 水平、环氧化酶2 (COX-2) 和氧化应激因子活性氧 (ROS), 试剂盒检测超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 水平。结果 在PD模型小鼠中, 与模型组比较, 白头翁皂苷B₄+HSC显著降低震颤麻痹评分(P<0.01、0.001), 显著降低旷场实验评分(P<0.01、0.001), 显著降低爬杆实验评分(P<0.01、0.001), 显著降低悬挂实验评分(P<0.01、0.001), 显著降低游泳实验评分(P<0.01、0.001), 显著降低行为学实验综合评分(P<0.001), 明显改善黑质体结构损伤, 明显降低α-突触核蛋白表达, 显著升高小鼠脑组织DAT和TH mRNA水平(P<0.05、0.01、0.001)。在AD模型小鼠中, 与模型组比较, 白头翁皂苷B₄+HSC显著缩短水迷宫定位航行实验逃避潜伏期(P<0.001), 明显延长在目标象限的累计停留时间(P<0.05、0.01、0.001), 显著增加准确穿越平台所在位置的次数(P<0.05、0.01), 显著降低血清炎症因子水平(P<0.05、0.01、0.001), 显著降低ROS水平、升高SOD和GSH-Px的水平(P<0.05、0.01、0.001)。结论 白头翁皂苷+HSC对PD和AD小鼠具有保护作用, 可能通过发挥抗炎、抗氧化, 改善脑组织和神经元损伤等来实现。

关键词: 白头翁皂苷B₄; 白头翁皂苷B₅; 帕金森病; 阿尔茨海默病; α-突触核蛋白; 脑组织损伤; 神经元损伤; 炎症因子; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 07-1433-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.07.002

Improvement of *Pulsatilla* saponin composition on Parkinson's disease and Alzheimer's disease in mice

HUANG Tianyan^{1,2}, YUAN Renyikun^{1,2}, HE Jia^{1,2}, HAN Shan^{1,2}, LI Jilang^{1,2}, LIANG Xiaowei^{1,2}, GAO Xiang^{1,2}, GAO Hongwei^{1,2}

1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530020, China

2. Guangxi Engineering Technology Research Center for Choice Chinese Patent Drug and Ethnic Drug Development, Nanning 530020, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects of a combination of *Pulsatilla* saponin B₄ and hederagenin C (HSC, anemосide B₅) with a quality ratio of 4:1 on Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD) models in mice and the underlying mechanisms. **Methods** Sixty healthy male C57BL/6 mice were randomly selected, with 10 mice serving as the control

收稿日期: 2024-02-12

基金项目: 广西高校引进海外高层次人才“百人计划”项目(05018064)

第一作者: 黄天衍(1996—), 男, 广西中医药大学, 中药学硕士。E-mail: huangtianyan1110@163.com

*通信作者: 高红伟, 博士, 研究员, 研究方向为中药抗炎活性及抗肿瘤活性研究。E-mail: gaohongwei06@126.com

group. The remaining 50 mice were intraperitoneally injected with 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) to establish a PD model. After the model was successfully established, the mice were randomly divided into the model group, the positive control group (levodopa hydrochloride tablets, 30 mg·kg⁻¹), and the *Pulsatilla* saponin B₄+HSC high, medium, and low dose groups (20, 10, and 5 mg·kg⁻¹), with 10 mice in each group. The mice were ig given the drugs for 14 d, once a day. The control and model groups were ig given an equal volume of 0.9% sodium chloride solution. The onset and disappearance times of tremor behavior were observed every two days. Behavioral experiments were conducted and scores were recorded on days 7 and 14 of the treatment. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in the substantia nigra of the brain tissue. Immunohistochemistry was used to detect the expression of α -synuclein in the brain tissue. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of dopamine transporter (*DAT*) and tyrosine hydroxylase (*TH*) mRNA in the brain tissue. 50 APP/PS1 transgenic mice were randomly divided into the model group, the positive drug group (donepezil hydrochloride, 1.5 mg·kg⁻¹), and the high, medium, and low dose groups of *Pulsatilla* saponin B₄+HSC (20, 10, and 5 mg·kg⁻¹), respectively. Ten APP/PS1 transgenic wild-type mice were taken as the control group. The mice were administered ig once a day for 28 d. The model group and the control group were given the same amount of 0.9% sodium chloride solution. After the administration, behavioral tests were conducted and the scores were recorded. The levels of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), cyclooxygenase-2 (COX-2), and reactive oxygen species (ROS) in the serum of the mice were detected by ELISA. The levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected by kits. **Results** In the PD model mice, compared with the model group, *Pulsatilla* saponin B₄+HSC significantly reduced the tremor paralysis score (PD-RATS) score ($P < 0.01, 0.001$), significantly reduced the open field test score ($P < 0.01, 0.001$), significantly reduced the climbing rod test score ($P < 0.01, 0.001$), significantly reduced the hanging test score ($P < 0.01, 0.001$), significantly reduced the swimming test score ($P < 0.01, 0.001$), and significantly reduced the comprehensive score of behavioral test ($P < 0.001$), and significantly improved the structure damage of substantia nigra, significantly reduced the expression of α -synuclein, and significantly increased the levels of *DAT* and *TH* mRNA in the brain tissue of mice ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). In the AD mouse model, compared with the model group, *Pulsatilla* saponin B₄+HSC significantly shortened the escape latency in the water maze spatial navigation experiment ($P < 0.001$), significantly prolonged the cumulative stay time in the target quadrant ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), significantly increased the number of accurate crossings of the platform location ($P < 0.05, 0.01$), significantly reduced the serum inflammatory factor level ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), significantly reduced the level of ROS, and increased the level of SOD and GSH-Px ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** *Pulsatilla* saponin B₄+HSC effectively played protective roles on PD and AD in mice, which may be achieved through anti-inflammatory and antioxidant effects and improvement of brain tissue and neuron damage.

Key words: *Pulsatilla* saponin B₄; hederagenin C; Parkinson's disease; Alzheimer's disease; α -synuclein; brain tissue damage; neuronal injury; inflammatory cytokines; oxidative stress

神经退行性疾病以大脑或脊髓特定区域神经元死亡为特征,包括急性神经退行性疾病脑缺血、脑损伤、癫痫和慢性神经退行性疾病阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化、不同类型脊髓小脑共济失调等,其中以AD和PD最为常见^[1-2]。AD临床特征包括进行性记忆和认知功能的障碍,是世界范围内最普遍的神经退行性疾病,目前用于AD的所有药物均可减缓疾病进展并可延缓症状发展,但无显著改善认知功能或治愈疾病的作用^[3]。PD主要影响运动神经系统,它的症状通常随时间缓慢出现,早期最明显的症状为颤抖、肢体僵硬和运动功能减退等,是继AD后第2常见的神经退行性疾病。利用综合治疗手段能够改善PD的症状、延缓疾病进展,但目前尚无完全治愈PD的方法^[4]。近年来,天然产物对神经退行性疾病

的治疗已取得一定的进展,例如类黄酮、姜醇、单宁、花青素、三萜和生物碱等,已被证明具有抗炎、抗氧化、抗淀粉样变性和抗胆碱酯酶特性,可作为治疗神经退行性疾病的潜在药物^[5-9]。白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel 系毛茛科白头翁属多年生草本植物干燥根,主治热毒血痢、温疟寒热、鼻衄、血痔^[10]。白头翁皂苷为其具有生物活性的五环三萜类成分,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、认知增强等多种药理作用,但其对神经退行性疾病的作用及机制尚不明确^[11-12]。白头翁皂苷 B₄ 和常春藤皂苷 C (hederasaponin C, HSC, 又名白头翁皂苷 B₂) 是白头翁中的主要有效皂苷成分,头翁皂苷 B₄ 和 HSC 质量比为 4:1 的组合物对炎症、动脉粥样硬化、银屑病、糖尿病肾病等多种疾病均具有良好改善作用,具有抗炎、抗氧化等调节作用^[13-19]。本实

验以1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导小鼠PD和APP/PS1双转基因小鼠AD模型,探讨白头翁皂苷组合物对PD和AD 2种常见神经退行性疾病的保护作用及机制。

1 材料

1.1 实验动物

60只SPF级雄性C57BL/6小鼠,7~8周龄,体质量25~30g;50只6月龄APP/PS1转基因模型小鼠,10只APP/PS1阴性小鼠,均由广东维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(粤)2022-0063。所有动物均自由饮食,实验流程均符合实验动物管理和保护的相关规定。经广西中医药大学伦理委员会批准,批准编号DW20220526-116。

1.2 药物与主要试剂

白头翁皂苷 B_4 和HSC组合物(质量分数 $\geq 98\%$,实验室提取,白头翁皂苷 B_4 :HSC质量比为

4:1);MPTP(批号C13034045)、左旋多巴胺片(批号C12589995),上海麦克林生化科技股份有限公司;小鼠多巴胺转运蛋白(DAT)、小鼠酪氨酸羟化酶(TH)ELISA试剂盒、活性氧(ROS)试剂盒,酶免实业有限公司;Trizol(Ambion公司);SweScript RT I First Strand cDNA Synthesis Kit、2 \times Fast SYBR Green qPCR Master Mix (Low ROX),赛维尔生物科技有限公司;盐酸多奈哌齐片(卫材药业有限公司);注射用0.9%的氯化钠溶液(河南双鹤华利药业有限公司);白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-1 β ELISA试剂盒(赛默飞世尔科技公司,批号分别为225266-022、310125-003、26133-012);环氧化酶(COX-2)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。引物由赛默飞世尔科技公司设计合成,具体见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	引物上游序列	引物下游序列
<i>Th</i>	5'-AGCCCTACCAAGACCAGACG-3'	5'-CACCTAGCCAATGGCACTCA-3'
<i>Dat</i>	5'-CGTCTAACTTCATGCTGTCTG-3'	5'-GTTTCCTCCATTTACCTTC-3'
<i>Gapdh</i>	5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3'	5'-GAAGGCTGGGGCTCATT-3'

1.3 主要仪器

ME204E 1/10000精密天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);5425R低温高速离心机(Eppendorf公司);KZ-III-F高速低温组织研磨机(武汉赛维尔生物科技有限公司);Synergy H1酶标仪(BioTek Instrumentes公司);BX-60病理图像分析仪(日本OLYMPUS)。

2 方法

2.1 动物造模及给药

2.1.1 PD小鼠动物造模及给药 随机取50只雄性C57BL/6小鼠,ip 30 mg·kg⁻¹ MPTP溶液,每天1次,持续7d,于第3、7天进行震颤麻痹实验、旷场实验、爬杆实验、悬挂实验、游泳实验、水迷宫空间探索实验等行为学测试,具体参照林臻等^[20]的方法并稍加修改,根据行为学实验评分,达到7.5分后,判断为PD造模成功。将PD模型小鼠随机分成5组:模型组、左旋多巴胺片(阳性对照,30 mg·kg⁻¹)组和白头翁皂苷 B_4 +HSC高、中、低剂量(20、10、5 mg·kg⁻¹)组,另取10只雄性C57BL/6小鼠作为对照组(ip等量0.9%的氯化钠水溶液)。分组后,各组小鼠每天称量并记录体质量,按体质量10 mL·kg⁻¹对小鼠进行ig给药14d(对照、模型组小鼠ig等量0.9%的氯化

钠溶液),每天1次,每2天观察动物震颤行为出现与消失的时间,给药第7、14天开展行为学实验检测并记录评分,给药期间隔天给予30 mg·kg⁻¹ MPTP溶液维持PD症状。

2.1.2 AD小鼠动物造模及给药 将50只APP/PS1转基因小鼠随机分成5组:模型组、盐酸多奈哌齐(阳性药,1.5 mg·kg⁻¹)和白头翁皂苷 B_4 +HSC高、中、低剂量(20、10、5 mg·kg⁻¹)组,另取10只同背景APP/PS1转基因阴性小鼠作为对照组。分组后,各组小鼠每天称量并记录体质量,按体质量10 mL·kg⁻¹对小鼠进行ig给药28d,模型组和对照组ig等量0.9%的氯化钠水溶液。

2.2 行为学实验

2.2.1 MPTP诱导的PD小鼠行为学实验 (1)震颤麻痹:观察小鼠给药后1h内是否出现立尾、竖毛、流涎、震颤、麻痹、死亡等情况,按照小鼠表现进行评分:0分,与正常小鼠相似,无任何症状;1分,出现竖毛、弓背、间断性细小震颤,但活动自如;2分,出现吞咽频繁,频繁性震颤,后肢张开,颤尾,活动逐渐受限;3分,出现流涎、持续性震颤,四肢僵硬,活动受限;4分,因全身麻痹而死亡。

(2)旷场实验(判断其活动情况):采用亚克力

材质 50 cm×50 cm×50 cm 方盒作为场地,均匀划分为9格,将小鼠放入旷场的正中格内,记录小鼠3爪以上跨入邻格的次数,观察持续2 min。评分标准为:0分,跨入次数>40次;1分,跨入次数为31~40次;2分,跨入次数为21~30次;3分,跨入次数<21次。

(3)爬杆实验(判断其前肢状态):准备一直径为25 cm的软木小球固定于一根长50 cm直径1 cm的木杆顶端,木杆缠上纱布以防打滑,将待测小鼠放到小球上,记录小鼠从球部爬到底部的时间。评分标准为:0分,爬杆时间<4.01 s;1分,爬杆时间为4.01~8.00 s;2分,爬杆时间为8.01~12.00 s;3分,爬杆时间>12.00 s。

(4)悬挂实验(判断小鼠后爪抓握状态):被测小鼠倒置悬挂,将两前爪置于30 cm长、25 cm高水平线中点,而后放开小鼠,记录其抓握情况。评分标准为:0分,两后爪均可抓住线;0.5分,后爪反复抓取线,间断可抓住;1分,1只后爪可抓住线;2分,2只后爪均不能抓住线。

(5)游泳实验(判断小鼠协调能力):将被测小鼠放于40 cm×25 cm×16 cm的水箱中,水深15 cm,水温为(27±2)°C,记录3 min内小鼠的漂浮时间。评分标准为:0分,漂浮0~30 s;1分,漂浮31~90 s;2分,漂浮91~150 s;3分,漂浮151~180 s;4分,漂浮期间呛水。

2.2.2 AD小鼠行为学实验 (1)水迷宫定位航行实验:行为学测试采用Morris水迷宫来测试小鼠的空间学习和记忆能力。小鼠接受治疗28 d后,随机每组选取6只小鼠进行为期6 d的训练,记录其游泳路径。水迷宫主体是一个白色圆形水池(直径120 cm、高50 cm),在测试期间,圆形水池中装满水并加入脱脂奶粉,池子被分成4个等面积的象限(1、2、3和4)。将平台(高25 cm、直径10 cm)放置于目标象限的正中心,让其淹没在水面以下1 cm处。实验时将小鼠背向平台放置于平台所在目标象限的对角象限,共计时60 s,各组小鼠依次进行训练。若60 s的时间内小鼠找到平台,则记录该时间为小鼠的逃避潜伏期,让小鼠在平台上停留10 s后将其擦干放回笼中,若60 s内小鼠未找到目标平台,则引导该小鼠到达平台,此小鼠逃避潜伏期记为60 s。

(2)水迷宫空间探索实验:定位航行检测结束后24 h,将透明平台撤去,将小鼠背向平台放置于目标象限对角象限边缘,使其自由运动60 s,期间要记录各小鼠穿越平台次数和进入平台所在目标象限

累计时间。所有实验的过程中均要保持周围环境安静,且其他参照物的位置不能随意挪动。

2.3 组织病理学检测

行为学实验结束后1 d,PD各组小鼠取脑组织,部分固定于多聚甲醛,HE染色检测小鼠脑组织黑质结构改变,免疫组化检测脑组织 α -突触核蛋白表达。

2.4 实时荧光定量(qRT-PCR)法检测PD小鼠脑组织DAT、TH mRNA表达水平

称取各组小鼠剩余脑组织20 mg,加入1 mL的Trizol裂解并提取总RNA,使用酶标仪检测各RNA样本浓度,取1 μ g进行cDNA逆转录,以cDNA为模板进行接下来的qRT-PCR实验。PCR反应条件为:95 °C预变性30 s,95 °C变性10 s,60 °C退火30 s,共40个循环,溶解曲线遵循仪器默认设置,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,计算DAT、TH mRNA相对表达水平。

2.5 ELISA法检测AD小鼠血清IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、COX-2、ROS、SOD和GSH-Px水平

行为学实验结束后,各组小鼠摘眼取血,室温放置30 min后,于4 °C、3 000 r·min⁻¹离心15 min,取上层血清于-80 °C保存,用于后续ELISA试剂盒检测,检测方法均按照说明书执行。

2.6 统计学方法

使用Graph Pad 7.0进行统计分析,各项指标结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较采用 t 检验,多组间计量资料比较采用单因素方差分析(One-wayANOVA)和两两比较(LSD法)。

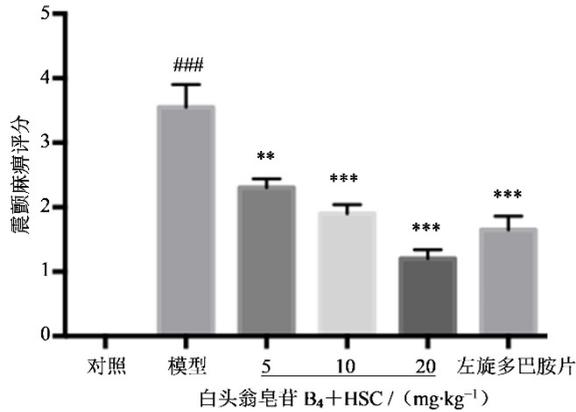
3 结果

3.1 白头翁皂苷对MPTP诱导PD小鼠模型的影响

3.1.1 白头翁皂苷对PD小鼠震颤麻痹水平的影响 制备PD模型后,小鼠出现竖毛、弓背、间歇性震颤、流涎、四肢僵硬,活动减低。与对照组比较,模型组小鼠震颤麻痹评分显著升高($P<0.001$);与模型组比较,白头翁皂苷B₄+HSC能够明显改善小鼠麻痹现象,显著降低评分($P<0.01$ 、 0.001),其中高剂量组效果最显著。结果见图1。

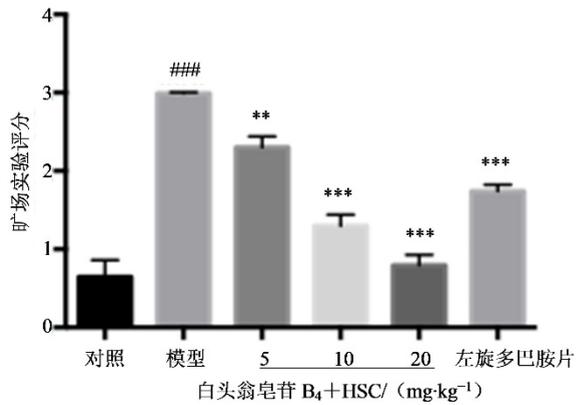
3.1.2 白头翁皂苷对PD小鼠旷场实验评分的影响 如图2所示,与对照组比较,模型组小鼠旷场实验评分显著升高($P<0.001$);与模型组比较,白头翁皂苷B₄+HSC能够显著降低旷场实验评分($P<0.01$ 、 0.001),高剂量组效果最显著。

3.1.3 白头翁皂苷对PD小鼠爬杆实验评分的影响 与对照组比较,MPTP造模后爬杆实验评分显



与对照组比较:### $P < 0.001$;与模型组比较:** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
$P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图1 白头翁皂苷对PD小鼠震颤麻痹评分的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Fig. 1 Effect of anemoside on tremor paralysis score of PD mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)



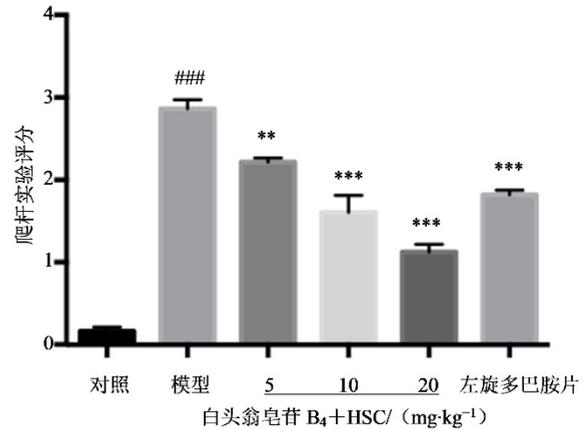
与对照组比较:### $P < 0.001$;与模型组比较:** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
$P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图2 白头翁皂苷对PD小鼠旷场实验评分的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Fig. 2 Effect of anemoside on open field test score of PD mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

著升高($P < 0.001$);与模型组比较,白头翁皂苷 $B_4 + HSC$ 能够显著降低爬杆实验评分($P < 0.01, 0.001$),高剂量组效果最显著。结果见图3。

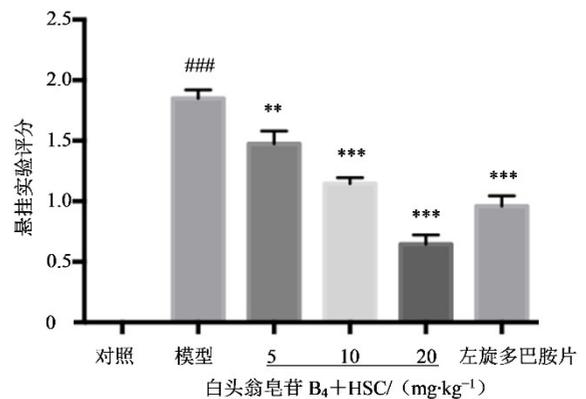
3.1.4 白头翁皂苷对PD小鼠悬挂实验评分的影响 与对照组比较,模型组小鼠悬挂实验评分显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,白头翁皂苷 $B_4 + HSC$ 能够显著降低悬挂实验评分($P < 0.01, 0.001$),且高剂量组效果最显著。结果见图4。

3.1.5 白头翁皂苷对PD小鼠游泳实验评分的影响 游泳实验检测结果提示(图5),与对照组比较,MPTP造模后游泳实验评分显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,白头翁皂苷 $B_4 + HSC$ 能够显著降低游泳实验评分($P < 0.01, 0.001$),且高剂量组效果最显著。



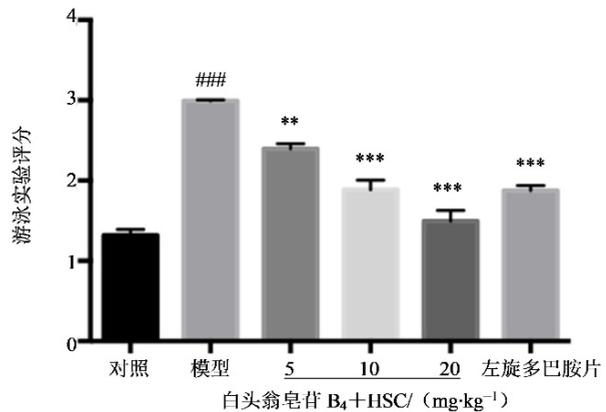
与对照组比较:### $P < 0.001$;与模型组比较:** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
$P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图3 白头翁皂苷对PD小鼠爬杆实验评分的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Fig. 3 Effect of anemoside on open field test score of PD mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)



与对照组比较:### $P < 0.001$;与模型组比较:** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
$P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图4 白头翁皂苷对PD小鼠悬挂实验评分的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Fig. 4 Effect of anemoside on suspension test score of PD mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)



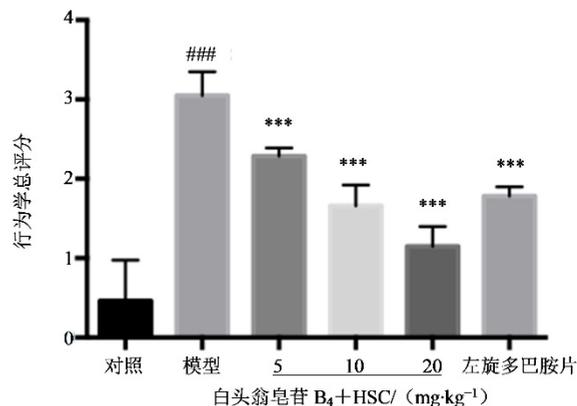
与对照组比较:### $P < 0.001$;与模型组比较:** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
$P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图5 白头翁皂苷对PD小鼠游泳实验评分的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Fig. 5 Effect of anemoside on swimming test score of PD mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.1.6 白头翁皂苷对PD小鼠行为学实验综合评分的影响 将小鼠的5项行为学评分加和后求平均分,统计后结果显示(图6),与对照组比较,模型组小鼠评分显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,白头翁皂苷 B_4 +HSC 能够显著降低综合评分($P < 0.001$),且高剂量效果最显著,其作用评分低于左旋多巴胺片组。结果表明,白头翁皂苷对小鼠PD行为学变化具有显著改善作用,且其治疗作用优于阳性药左旋多巴胺片。

3.1.7 白头翁皂苷对PD小鼠脑组织黑质结构的影响 如HE染色结果所示,对照组小鼠脑组织结构正常,神经元排列紧密、整齐,形态正常,黑质细胞体型较大,富含黑色素颗粒;模型组脑组织可见神经元排列紊乱,数量减少,胞质肿胀,部分空泡样变性,且黑质细胞黑色素颗粒脱失,残存细胞萎缩;而白头翁皂苷 B_4 +HSC 组和左旋多巴胺片组神经元排列紊乱程度和胞质肿胀程度较模型组有不同程度的减轻,空泡样变性减少,萎缩细胞明显减少,显著改善黑质体结构损伤,白头翁皂苷 B_4 +HSC 高剂量组效果最显著,改善作用优于左旋多巴胺片组。见图7。

3.1.8 白头翁皂苷对PD小鼠脑组织黑质体 α -突触核蛋白的影响 α -突触核蛋白是中枢神经系统突触前及核周表达的可溶性蛋白质,其病理性聚集导致多



与对照组比较:### $P < 0.001$;与模型组比较:*** $P < 0.001$ 。
$P < 0.001$ vs control group;*** $P < 0.001$ vs model group.

图6 白头翁皂苷对PD小鼠行为学实验综合评分的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 6 Effect of anemoside on comprehensive scores of behavioral experiments in PD mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

巴胺能神经元的丢失是PD的典型病例表现^[21]。免疫组化结果提示,与对照组比较,MPTP造模后小鼠脑组织黑体 α -突触核蛋白表达显著升高,呈明显聚集;与模型组比较,白头翁皂苷 B_4 +HSC 和左旋多巴胺片能够显著降低 α -突触核蛋白表达,高剂量组效果最显著,其作用优于左旋多巴胺片组(图8)。结果表明,白头翁皂苷能够通过降低脑组织 α -突触核蛋白表达和聚集来改善PD。

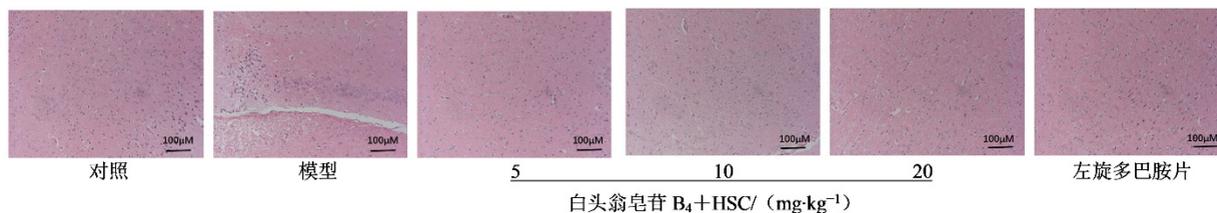


图7 白头翁皂苷对PD小鼠脑组织黑质结构病理改变的影响($\times 200$)

Fig. 7 Effects of anemoside on structural pathological changes of substantia nigra in PD mice ($\times 200$)

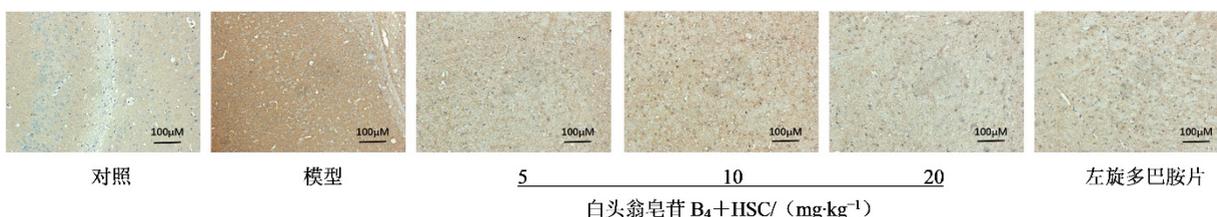
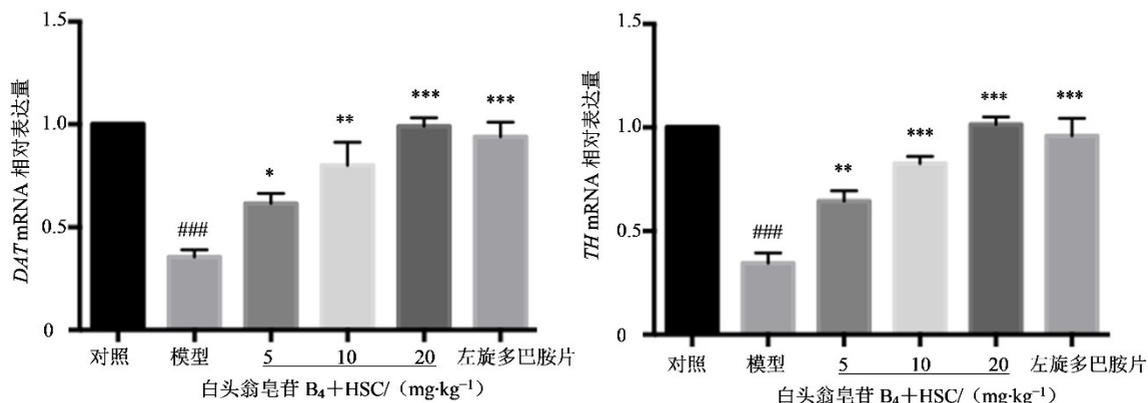


图8 白头翁皂苷对PD小鼠脑组织黑质体 α -突触核蛋白病理改变的影响($\times 200$)

Fig. 8 Effects of anemoside on α -synuclein in brain tissue of PD mice ($\times 200$)

3.1.9 白头翁皂苷对PD小鼠脑组织DAT、TH表达的影响 多巴胺转运体是一种位于多巴胺神经元突触前膜上的多巴胺转运蛋白,其功能是将释放至突触间隙的多巴胺通过主动转运再摄取回突触前,以保证突触的正常生理功能,酪氨酸羟化酶是脑内

多巴胺合成的最关键限速酶,二者保证生理条件下多巴胺的合成和转运正常进行^[22]。qRT-PCR实验结果提示(图9),与对照组比较,模型组小鼠脑组织DAT和TH mRNA水平显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,白头翁皂苷 B_4 +HSC 能够显著回升小鼠



与对照组比较:### $P < 0.001$;与模型组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图9 白头翁皂苷对PD小鼠脑组织DAT、TH mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 9 Effects of anemoside on mRNA level of DAT and TH in brain tissue of PD mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

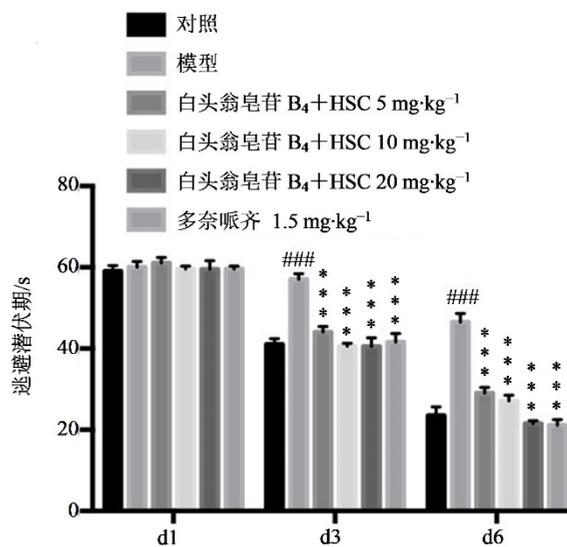
脑组织 DAT 和 TH mRNA 水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结果表明,白头翁皂苷可以升高脑组织中多巴胺转运体和酪氨酸羟化酶水平,对MPTP诱导的PD小鼠模型多巴胺神经元起到保护作用。

3.2 白头翁皂苷对AD小鼠的影响

3.2.1 白头翁皂苷对AD小鼠水迷宫定位航行实验的影响 随着训练天数的增加,各组小鼠的逃避潜伏期均有不同程度的缩短。与对照组比较,模型组d3、d6小鼠的逃避潜伏期均显著延长($P < 0.001$);与模型组比较,d3、d6白头翁皂苷B₄+HSC各剂量均显著缩短逃避潜伏期($P < 0.001$);白头翁皂苷能够改善AD小鼠空间记忆能力减退,并且表现出剂量相关性(图10)。

水迷宫空间探索实验结果显示,与对照组比较,AD模型组小鼠在目的象限的累计停留时间明显缩短($P < 0.001$),准确穿越平台所在位置的次数也显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,白头翁皂苷B₄+HSC组小鼠在目标象限的累计停留时间明显延长($P < 0.05$ 、0.01、0.001),准确穿越平台所在位置的次数也显著增加($P < 0.05$ 、0.01)。结果说明白头翁皂苷对改善AD小鼠的空间学习记忆能力有显著的疗效(图11)。

3.2.2 白头翁皂苷对AD小鼠血清炎症因子的影响 研究表明,大脑的免疫系统和相关的炎症过程在很大程度上促进了AD的发展,当神经损伤标志物升高时,大多数炎症标志物也同时升高,因此,炎症标志物对于研究疾病早期阶段的神经损伤具有重要作用^[23]。如图12所示,与对照组比较,AD模型小鼠血清中IL-6、TNF- α 、IL-1 β 和COX-2水平显著升高($P < 0.01$ 、0.001);与模型组比较,白头翁皂苷



与对照组比较:### $P < 0.001$;与模型组比较:*** $P < 0.001$ 。
$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs model group.

图10 白头翁皂苷对AD小鼠水迷宫逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 10 Effect of anemoside on escape latency of AD mice in water maze ($\bar{x} \pm s, n=10$)

B₄+HSC能够显著降低炎症因子的水平($P < 0.05$ 、0.01、0.001),且其高剂量组抑制水平与阳性药左旋多巴胺片相近,表明白头翁皂苷可能通过抑制炎症因子水平对AD小鼠模型起到保护作用。

3.2.3 白头翁皂苷对AD小鼠血清氧化应激的影响 氧化应激被定义为ROS/RNS的产生与细胞抗氧化防御功能的失衡。人体约20%的氧气和25%的葡萄糖被大脑功能性消耗,其代谢水平高,耗氧量且抗氧化酶相对不足的生理特点导致大脑对氧化应激的损伤尤其敏感,越来越多的证据表明,氧化应激是AD的重要致病因素,参与了疾病的发

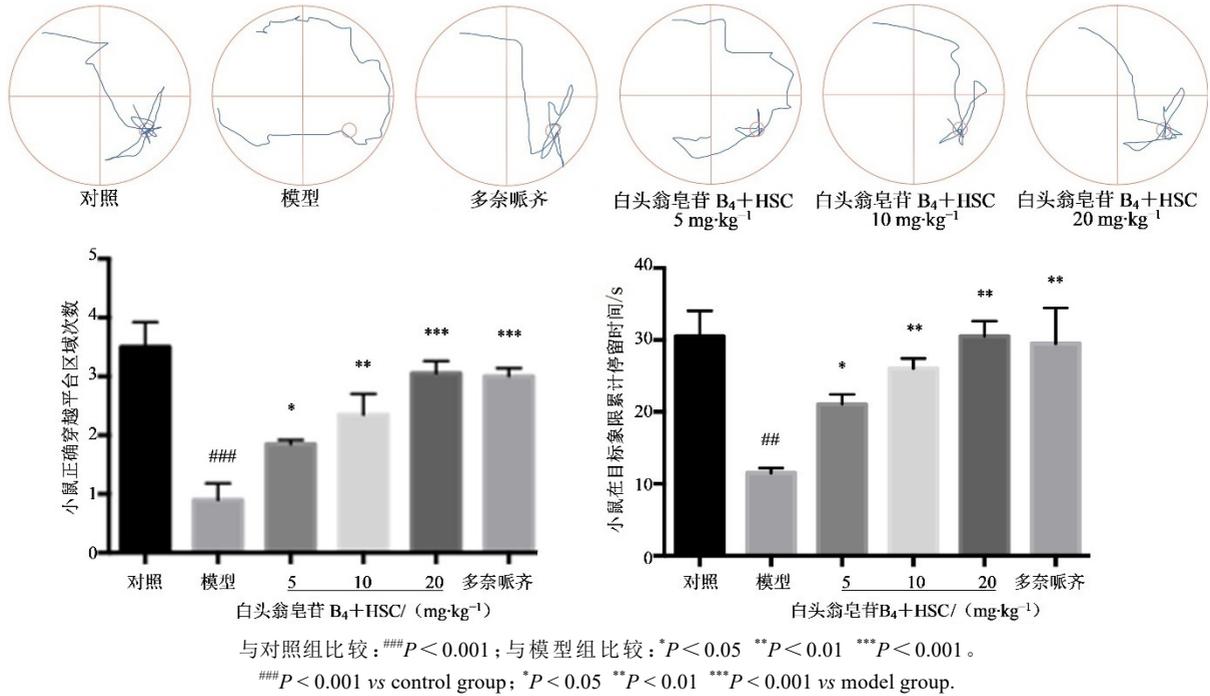


图 11 白头翁皂苷对 AD 小鼠水迷宫游泳轨迹的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Fig. 11 Effect of anemoside on swimming track in water maze in AD mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

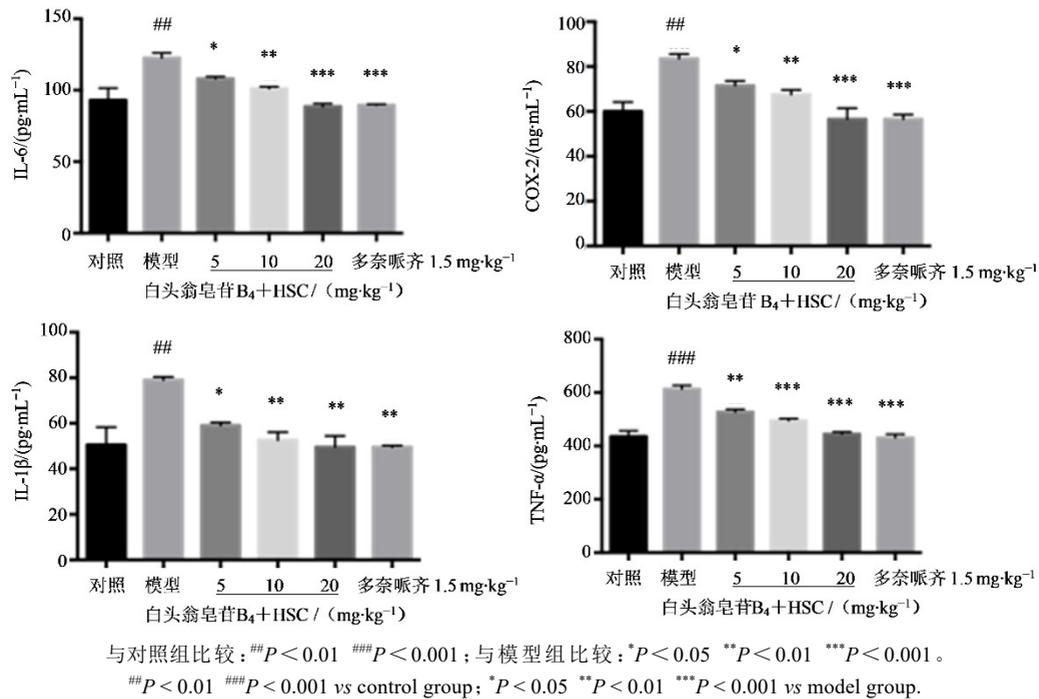


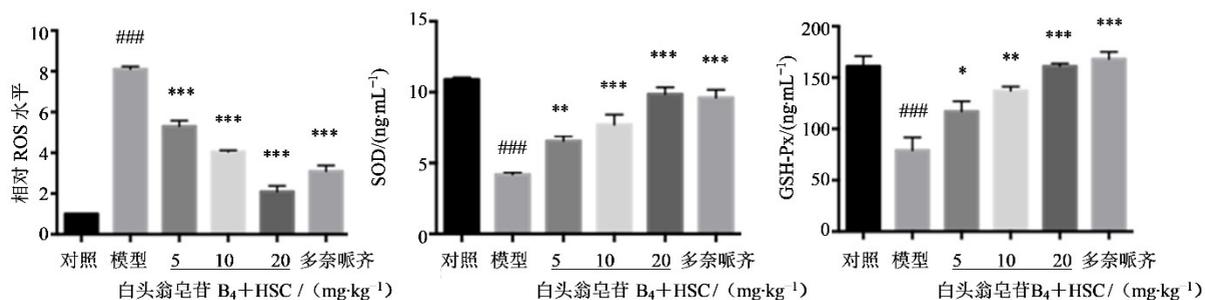
图 12 白头翁皂苷对 AD 小鼠炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Fig. 12 Effect of anemoside on levels of inflammatory factors in AD mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

生和发展^[24-25]。如图 13 所示,与对照组比较,AD 模型组小鼠血清中 ROS 显著升高、SOD 和 GSH-Px 水平显著降低 ($P < 0.001$);与模型组比较,而白头翁皂苷 B_4+HSC 能够显著降低 ROS 水平、升高 SOD 和 GSH-Px 的水平 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 发挥显著的抗氧化应激作用。因此,白头翁皂苷可

能通过发挥抗氧化应激作用对 AD 小鼠进行保护。

4 讨论

PD 以黑质纹状体多巴胺能神经元变性缺失为主要特征,导致纹状体区多巴胺递质水平下降和 α -突触核蛋白错误折叠和聚集形成路易小体,多巴胺



与对照组比较:### $P < 0.001$;与模型组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图13 白头翁皂苷对AD小鼠氧化应激的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Fig. 13 Effect of anemoside on oxidative stress in AD mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

能神经元减少触发补偿机制使多巴胺更新率升高,从而引起细胞损伤。同时, α -突触核蛋白水平的升高可能会促进异常物质的产生,进一步损害泛素-蛋白酶体系统(UPS)或自噬-溶酶体途径(ALP)的功能,抑制其自身的降解和其他底物的降解,形成神经毒性的恶性循环^[26-28]。PD临床症状表现为静止性震颤、运动迟缓、肌强直、姿势失衡和行为情绪异常等^[29]。本实验中MPTP造模后小鼠发生运动障碍、协调能力降低,白头翁皂苷给药后能够显著改善小鼠运动障碍,改善运动协调能力。同时HE染色观察小鼠脑黑质结构,模型组脑黑质结构损伤,白头翁皂苷给药后能够显著改善脑组织黑质结构损伤。MPTP造模后 α -突触核蛋白显著升高,白头翁皂苷能够显著降低 α -突触核蛋白表达,升高小鼠脑组织DAT和TH mRNA水平。说明白头翁皂苷对MPTP诱导小鼠PD具有保护作用,可以改善其行为学变化及脑组织黑质损伤。其作用机制可能与通过降低 α -突触核蛋白表达,升高DAT和TH相关。

AD是一种进行性神经退行性疾病,其主要发病机制尚未完全清楚,目前研究表明,氧化应激是AD进展的重要机制,ROS异常积累触发氧化应激的过程,从而损害神经元细胞功能和完整性,导致认知功能障碍和记忆力减退^[30]。同时,ROS积累或清除不及时,炎症细胞可在炎症部位释放大促炎因子,使氧化应激加剧而导致神经元凋亡^[31]。前期对白头翁皂苷药理研究表明,其具有抗氧化和抗炎等作用,可降低ROS水平及改善SOD活性,降低组织中炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平^[32-34]。本实验中,AD小鼠的空间记忆能力减退及血清中IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、COX-2和ROS水平显著升高,SOD和GSH-Px水平显著降低。水迷宫实验结果提示白头翁皂苷能够有效改善AD小鼠空间记忆能力的减退以及空间学习记忆能力。同时ELISA结果提示白

头翁皂苷能够显著降低小鼠血清中IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、COX-2、ROS水平,升高小鼠血清中SOD和GSH-Px水平。白头翁皂苷在治疗AD小鼠学习记忆能力、减少相关炎症因子表达、抗氧化应激实验中具有较好的疗效,说明其具有缓解AD的巨大潜力。

通过PD和AD小鼠实验初步验证白头翁皂苷对神经退行性疾病具有较好的治疗效果,其机制主要与抗炎、抗氧化、改善神经元损伤等相关。推测白头翁皂苷同样对脑缺血、脑损伤、癫痫亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化、不同类型脊髓小脑共济失调等具有相似发病机制的神经退行性疾病具有一定的治疗效果,其具体效果将进行实验探究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Martínez-Cué C, Rueda N. Cellular senescence in neurodegenerative diseases [J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 16.
[2] Chi H, Chang H Y, Sang T K. Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3082.
[3] Khanam H, Ali A, Asif M, et al. Neurodegenerative diseases linked to misfolded proteins and their therapeutic approaches: A review [J]. Eur J Med Chem, 2016, 124: 1121-1141.
[4] Armstrong M J, Okun M S. Diagnosis and treatment of parkinson disease: A review [J]. JAMA, 2020, 323(6): 548-560.
[5] 付琳, 王楠, 常亮, 等. 杜仲木脂素对慢性青光眼大鼠视神经保护作用及SOD、MDA、Caspase-3表达的影响 [J]. 中国药师, 2021, 24(2): 227-231.
Fu L, Wang N, Chang L, et al. Protective effect of *Eucommia ulmoides* lignans on optic nerve and influence on the expressions of SOD, MDA and caspase-3 in

- chronic glaucoma rats [J]. *China Pharm*, 2021, 24(2): 227-231.
- [6] 顾宏韬, 师会, 王磊, 等. 蒲公英总黄酮对帕金森病细胞模型中人神经母细胞瘤细胞的保护作用 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2021, 23(9): 913-917.
- Gu H T, Shi H, Wang L, et al. Total flavonoids of *Fructus Livistonae* protect human neuroblastoma cells in a cell model of PD [J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*, 2021, 23(9): 913-917.
- [7] 张明发, 沈雅琴. 还原型苦参碱类生物碱的中枢抑制和神经保护作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(8): 1541-1547.
- Zhang M F, Shen Y Q. Research advance on central suppression and neuroprotection of reduced matrine-type alkaloids [J]. *Drug Eval Res*, 2018, 41(8): 1541-1547.
- [8] 张诗莹, 杨亚玲, 黎慧琳, 等. 尿石素干预神经退行性疾病的研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(2): 273-280.
- Zhang S Y, Yang Y L, Li H L, et al. Advances of the intervention effect of urolithins at the neurodegenerative diseases [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2022, 33(2): 273-280.
- [9] 赵爽, 蒋利和, 王居平, 等. 外源性神经节苷脂联合灵芝三萜化合物对癫痫脑损伤神经保护作用 [J]. *现代预防医学*, 2017, 44(4): 701-705.
- Zhao S, Jiang L H, Wang J P, et al. Neuroprotective effect of exogenous GM1 combined with ganoderma triterpenein on the brain damage caused by epilepsy [J]. *Mod Prev Med*, 2017, 44(4): 701-705.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [11] 袁进, 张丽峰, 高红伟, 等. 白头翁皂苷 B₄ 药理作用研究进展 [J]. *中成药*, 2022, 44(7): 2229-2233.
- Yuan J, Zhang L F, Gao H W, et al. Research progress on pharmacological action of *Pulsatilla* saponin B₄ [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2022, 44(7): 2229-2233.
- [12] 官紫祎, 陈兰英, 罗颖颖, 等. 基于糖酵解机制的白头翁皂苷多成分协同抑制人肺癌 NCI-H460 细胞增殖作用研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(21): 5289-5297.
- Guan Z W, Chen L Y, Luo Y Y, et al. Summary of chemical constituents and pharmacological effects of *Pulsatilla chinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2019, 50(21): 5289-5297.
- [13] 钟长斌, 李祥. 白头翁的化学成分及药理作用研究述要 [J]. *中医药学刊*, 2003, 21(8): 1338-1339, 1365.
- Zhong C B, Li X. Summary of chemical constituents and pharmacological effects of *Pulsatilla chinensis* [J]. *Study J Tradit Chin Med*, 2003, 21(8): 1338-1339, 1365.
- [14] Gepdiremen A, Mshvildadze V, Süleyman H, et al. Acute anti-inflammatory activity of four saponins isolated from ivy: Alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F in carrageenan-induced rat paw edema [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(6/7): 440-444.
- [15] 郭文霞. Hederasaponin C 的体内抗炎作用研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2019.
- Guo W X. Study on anti-inflammatory effect of Hederasaponin C *in vivo* [D]. Suzhou: Soochow University, 2019.
- [16] 高红伟, 苑仁祎坤, 杨世林. 白头翁皂苷组合物在制备治疗糖尿病肾病的药物中的应用: 中国, CN115192592 A [P]. 2022-10-18.
- Gao H W, Yuan R Y K, Yang S L. Application of *Pulsatilla Pulsatilla* saponin composition in the preparation of drugs for diabetic nephropathy: China, CN115192592A [P]. 2022-10-18.
- [17] 高红伟, 苑仁祎坤, 杨世林. 白头翁皂苷组合物在制备治疗 CAR-T 疗法引起 CRS 的药物中的应用: 中国, CN114984094B [P]. 2023-09-15.
- Gao H W, Yuan R Y K, Yang S L. Application of *Pulsatilla Pulsatilla* saponin composition in the preparation of drugs for the treatment of CRS induced by CAR-T therapy: China, CN114984094B [P]. 2023-09-15.
- [18] 高红伟, 苑仁祎坤, 杨世林. 白头翁皂苷组合物在制备治疗动脉粥样硬化的药物中的应用: 中国, CN114931582A [P]. 2022-08-23.
- Gao H W, Yuan R Y K, Yang S L. Application of *Pulsatilla Pulsatilla* saponin composition in preparation of drugs for the treatment of atherosclerosis: China, CN114931582A [P]. 2022-08-23.
- [19] 高红伟, 苑仁祎坤, 杨世林. 白头翁皂苷组合物及其在制备治疗皮肤病的药物中的应用: 中国, CN114796248 A [P]. 2022-07-29.
- Gao H W, Yuan R Y K, Yang S L. *Pulsatilla Pulsatilla* saponin composition and its application in preparation of drugs for the treatment of dermatosis: China, CN114796248A [P]. 2022-07-29.
- [20] 林臻, 陈洪志, 赵航, 等. MPTP 诱导 C57BL/6 小鼠帕金森模型的制备和评估 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(8): 57-62, 85.
- Lin Z, Chen H Z, Zhao H, et al. Preparation and assessment of a C57BL/6 mouse Parkinson's model induced by MPTP [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(8): 57-62, 85.
- [21] Li Y Y, Zhou T T, Zhang Y, et al. Distribution of α -synuclein aggregation in the peripheral tissues [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(12): 3627-3634.

- [22] Cartier E, Garcia-Olivares J, Janezic E, et al. The SUMO-conjugase Ubc9 prevents the degradation of the dopamine transporter, enhancing its cell surface level and dopamine uptake [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 35.
- [23] Rusek M, Smith J, El-Khatib K, et al. The role of the JAK/STAT signaling pathway in the pathogenesis of Alzheimer's disease: New potential treatment target [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(1): 864.
- [24] Nippert A R, Biesecker K R, Newman E A. Mechanisms mediating functional hyperemia in the brain [J]. *Neuroscientist*, 2018, 24(1): 73-83.
- [25] Briyal S, Ranjan A K, Gulati A. Oxidative stress: A target to treat Alzheimer's disease and stroke [J]. *Neurochem Int*, 2023, 165: 105509.
- [26] Poewe W, Seppi K, Tanner C M, et al. Parkinson disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17013
- [27] Sampaio-Marques B, Pereira H, Santos A R, et al. Caloric restriction rescues yeast cells from alpha-synuclein toxicity through autophagic control of proteostasis [J]. *Aging*, 2018, 10(12): 3821-3833.
- [28] Jastrzębowska M A, Marquis R, Melie-García L, et al. Dopaminergic modulation of motor network compensatory mechanisms in Parkinson's disease [J]. *Hum Brain Mapp*, 2019, 40(15): 4397-4416.
- [29] 黄婷. 一中国早发性帕金森病家系临床特征及致病基因研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2020.
- Huang T. Clinical characteristics and gene mutations detection in a Chinese family with early-onset Parkinson's disease [D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2020.
- [30] Ionescu-Tucker A, Cotman C W. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2021, 107: 86-95.
- [31] Pardillo-Díaz R, Pérez-García P, Castro C, et al. Oxidative stress as a potential mechanism underlying membrane hyperexcitability in neurodegenerative diseases [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(8): 1511.
- [32] 查正霞. 白头翁皂苷B₃通过抑制S100A9/MAPK/NF-κB信号通路缓解炎症性肠病 [D]. 苏州: 苏州大学, 2021.
- Zha Z X. Hederacoside C alleviates inflammatory bowel disease through inhibiting S100A9/MAPK/NF-κB signaling pathway [D]. Suzhou: Soochow University, 2021.
- [33] 何鸾. 白头翁皂苷B₄通过抑制ROS/MAPKs信号通路缓解肾脏损伤 [D]. 苏州: 苏州大学, 2020.
- He L. Anemoside B₄ attenuates kidney injury by inhibiting ROS/MAPKs signaling pathway [D]. Suzhou: Soochow University, 2020.
- [34] 周滕静. 白头翁皂苷B₄对LPS所致急性肺损伤的保护作用及机制研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2019.
- Zhou M J. Protective effect and mechanism of *Pulsatilla* saponin B₄ on acute lung injury induced by LPS [D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2019.

[责任编辑 兰新新]