

基于 Nrf2/D1R-ERK 信号通路探讨甘松对左旋多巴诱导的异动症大鼠的作用机制

李佳园, 魏晓嘉, 万国慧, 杨雪, 于佳禾, 刘金凤, 金重先, 王雨青, 吕研, 石晋丽*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 基于 Nrf2/D1R-ERK 信号通路探讨甘松 *Nardostachys jatamansi* 对左旋多巴 (levodopa, L-DOPA) 诱导的异动症 (levodopa-induced dyskinesia, LID) 模型大鼠的作用机制。方法 将 SD 大鼠随机分为假手术组、帕金森 (Parkinson's disease, PD) 组、L-DOPA 组和甘松+L-DOPA 组。PD 组、L-DOPA 组和甘松+L-DOPA 组颈背部 sc 鱼藤酮葵花籽油 (1.5 mg/kg) 14 d 制备 PD 模型, 假手术组 sc 等体积葵花籽油, 之后进行 14 d 的药物干预: L-DOPA 组 ig L-DOPA (100 mg/kg) 和苯丝肼 (25 mg/kg), 甘松+L-DOPA 组 ig 甘松 (1240 mg/kg)、L-DOPA (100 mg/kg) 和苯丝肼 (25 mg/kg), 假手术组和 PD 组 ig 等体积 0.9%氯化钠溶液。通过前肢功能检测实验评估 L-DOPA 对 PD 大鼠运动能力的影响; 通过异常不自主运动 (abnormal involuntary movement, AIM) 评分评估 L-DOPA 导致 LID 大鼠的 AIM 程度; 采用免疫组化法考察大鼠黑质中酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 的表达; Western blotting 法检测大鼠纹状体内转录因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)、多巴胺 D1 受体 (dopamine D1 receptor, D1R)、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)、磷酸化 ERK ((phosphorylated ERK, p-ERK) 和 Δ FosB 蛋白的表达; ELISA 法检测大鼠脑纹状体中活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、多巴胺和 cAMP 调节的磷蛋白-32 (dopamine and adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phospho-protein, DARPP-32) 和 p-DARPP-32 的含量。结果 前肢功能检测结果显示, L-DOPA 单用和甘松与 L-DOPA 联用均能显著增加 PD 大鼠的前肢跨步次数 ($P < 0.001$)。AIM 评分结果显示, 与 L-DOPA 单用相比, 甘松与 L-DOPA 联用可显著降低 LID 大鼠的 AIM 症状 ($P < 0.01$)。免疫组化结果显示, PD 组和 L-DOPA 组的 TH 表达没有显著性差异, 而甘松与 L-DOPA 联用可明显增强 PD 大鼠的 TH 表达 ($P < 0.05$), 同时显著增强 L-DOPA 单用导致的 LID 大鼠的 TH 表达 ($P < 0.01$)。Nrf2 信号通路结果显示, PD 组和 L-DOPA 组没有显著性差异, 而甘松与 L-DOPA 联用可明显降低 PD 大鼠的 ROS 含量 ($P < 0.05$), 显著促进 Nrf2 表达 ($P < 0.01$), 并显著提高 HO-1、SOD、GSH-Px 的含量 ($P < 0.001$); 同时还能显著降低 LID 大鼠的 ROS 含量 ($P < 0.001$), 明显提高 Nrf2、HO-1、SOD 的含量 ($P < 0.05$), 并显著提高 GSH-Px 含量 ($P < 0.01$)。D1R-ERK 信号通路结果显示, 甘松与 L-DOPA 联用能显著降低 LID 大鼠的 D1R 表达 ($P < 0.001$), 同时明显减低 Δ FosB、p-DARPP-32/DARPP-32、p-ERK/ERK 的表达 ($P < 0.05$)。结论 L-DOPA 可以改善 PD 大鼠的运动障碍, 但不能降低 TH 的损伤, 而且还会引起氧化应激反应和 D1R-ERK 通路的过表达。甘松联合 L-DOPA 给药可明显改善 PD 大鼠的运动损伤, 抑制 L-DOPA 引起的 AIM 现象, 同时提高 TH 的表达。其机制可能是甘松通过激活 Nrf2 通路相关蛋白的表达, 并抑制 D1R-ERK 通路相关蛋白的过表达发挥抗 LID 作用。

关键词: 甘松; 帕金森; 左旋多巴诱导的异动症; Nrf2 信号通路; D1R-ERK 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)01-0134-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.01.017

Mechanism of *Nardostachys jatamansi* on levodopa-induced dyskinesia in rats based on Nrf2/D1R-ERK signaling pathway

LI Jia-yuan, WEI Xiao-jia, WAN Guo-hui, YANG Xue, YU Jia-he, LIU Jin-feng, JIN Zhong-xian, WANG Yu-qing, LYU Yan, SHI Jin-li

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

收稿日期: 2021-09-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82073971)

作者简介: 李佳园 (1997—), 女, 硕士研究生。E-mail: 20190935157@bucm.edu.cn

*通信作者: 石晋丽, 博士生导师, 教授, 主要从事中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: shijl@vip.sina.com

Abstract: Objective To explore the mechanism of *Nardostachys jatamansi* (Nar) on levodopa (*L*-DOPA)-induced dyskinesia (LID) model rat based on Nrf2/D1R-ERK signaling pathway. **Methods** SD rats were randomly divided into sham group, Parkinson's disease (PD) group, *L*-DOPA group and Nar + *L*-DOPA group. Rats in PD group, *L*-DOPA group, and Nar + *L*-DOPA group were sc rotenone sunflower oil (1.5 mg/kg) on the back of neck for 14 d to prepare PD model. Rats in sham group was sc same amount of sunflower oil. Then 14 d of drug intervention was carried out: rats in *L*-DOPA group were ig *L*-DOPA (100 mg/kg) and benserazide (25 mg/kg), rats in Nar + *L*-DOPA group were ig Nar (1240 mg/kg), *L*-DOPA (100mg/kg) and benserazide (25 mg/kg), rats in sham group and PD group were ig same amount of normal saline. Effect of *L*-DOPA on motor ability of PD rats was evaluated by forelimb function test. Abnormal involuntary movement (AIM) score was used to assess the AIM degree of LID induced by *L*-DOPA in rats. Expression of tyrosine hydroxylase (TH) in substantia nigra of rats was investigated by immunohistochemical staining. Expressions of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), dopamine D1 receptor (D1R), extracellular regulated protein kinases (ERK), p-ERK and Δ FosB protein in rats striatum was detected by Western blotting. ELISA method was used to detected the contents of reactive oxygen species (ROS), heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), dopamine and adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein (DARPP-32), p-DARPP-32 in the striatum of rats. **Results** The results of the forelimb function test showed that *L*-DOPA alone and Nar + *L*-DOPA combined significantly increased the number of forelimb strides in PD rats ($P < 0.001$). The AIM score results showed that compared with *L*-DOPA alone, the combination of Nar + *L*-DOPA significantly reduced the AIM symptoms of LID rats ($P < 0.01$). Immunohistochemical results showed that there was no significant difference in TH expression between PD group and *L*-DOPA group. The combination of Nar + *L*-DOPA significantly enhanced TH expression in PD rats ($P < 0.05$), and significantly enhanced TH expression in LID rats induced by *L*-DOPA alone ($P < 0.01$). Nrf2 signaling pathway showed no significant difference between PD group and *L*-DOPA group. The combination of Nar + *L*-DOPA significantly decreased ROS content ($P < 0.05$), significantly promoted Nrf2 expression ($P < 0.01$), significantly increased the contents of HO-1, SOD and GSH-Px of PD rats ($P < 0.001$). The combination of Nar + *L*-DOPA significantly decreased ROS content ($P < 0.001$), significantly increased Nrf2, HO-1, SOD content ($P < 0.05$), and increased GSH-Px content in LID rats ($P < 0.01$). D1R-ERK signaling pathway results showed that the combination of Nar + *L*-DOPA significantly decreased the expression of D1R in LID rats ($P < 0.001$), significantly reduced the expressions of Δ FosB, p-DARPP-32/DARPP-32 and p-ERK/ERK ($P < 0.05$). **Conclusion** *L*-DOPA can alleviate dyskinesia in PD rats, but it can not reduce the damage of TH, and can induce an oxidative stress response and overexpression of D1R-ERK pathway. Nar combined with *L*-DOPA significantly alleviated the motor injury of PD rats, inhibited AIM phenomenon caused by *L*-DOPA and increased TH expression. The mechanism may be that Nar plays an anti-LID role by activating the expression of related proteins in Nrf2 pathway and inhibiting the overexpression of related proteins in D1R-ERK pathway.

Key words: *Nardostachys jatamansi* DC.; Parkinson's disease; levodopa-induced dyskinesia; Nrf2 signaling pathway; D1R-ERK signaling pathway

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是继阿尔茨海默症之后的第二大中枢神经系统退行性疾病^[1]。临床表现为静止性震颤、姿势步态异常、肌肉僵直等^[2]，病理特征主要为中脑黑质致密部多巴胺能神经元的变性缺失^[3]。目前 PD 的治疗主要通过补充外源性多巴胺来缓解症状^[4]。左旋多巴 (levodopa, *L*-DOPA) 作为多巴胺的前体，是目前治疗 PD 的首选药物，能有效缓解 PD 的运动障碍，临床常与苄丝肼联用增加中枢神经系统对其利用程度^[5]。但 *L*-DOPA 长期应用会出现一些局限性，如加速 PD 进展过程中多巴胺能神经元的死亡^[6]、引起并发症等。

异动症 (levodopa-induced dyskinesia, LID) 是长期服用 *L*-DOPA 后最常见的一种不良反应^[7]，临床表现主要为肢体、躯干和面部的非自主、无目的、

不规则运动，是 PD 患者晚期致残的主要原因^[8]。研究表明，在接受 *L*-DOPA 治疗 15 年以上的 PD 患者中，LID 的累积发生率可高达 95%^[8]，严重影响了患者的生命质量。目前，LID 的发病机制尚未明确，但研究发现主要与 *L*-DOPA 在体内代谢过程中引起的氧化应激反应和 *L*-DOPA 长期反复摄取导致基底神经环路中多巴胺 D1 受体 (dopamine D1 receptor, D1R) 的过度激活有关^[9]。研究表明，*L*-DOPA 进入机体后，在代谢期间会产生大量的活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 形成氧化应激反应，破坏多巴胺能神经元。此时，转录因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2) 作为机体自身的抗氧化通路^[10-11]，可通过抑制氧化应激反应，减少多巴胺能神经元的损伤，缓解 PD^[12] 和 LID^[13]。此外，当 D1R 激活后，会促进细胞外调

节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号的磷酸化, 而 ERK 信号通路持续过度活化被认为是诱导和维持 LID 发生的主要原因^[14]。因此, 基于 Nrf2 和 D1R-ERK 通路探讨药物对 LID 的作用具有重要意义。

甘松为败酱科植物甘松 *Nardostachys jatamansi* DC. 的干燥根及根茎, 有理气止痛、开郁醒脾之功^[15], 具有神经保护^[16]、抗神经退行性疾病^[17]、镇静^[18]等药理作用。本课题组前期研究发现, 甘松提取物不同萃取部位均可增强 6-羟基多巴胺损伤细胞的存活率, 对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞损伤有明显的保护作用^[19]。甘松 80%乙醇提取物对 PD 模型大鼠具有良好的治疗效果, 优于甘松 95%乙醇提取物和甘松水提取物, 且甘松 (生药 1240 mg/kg) 联合少量的 *L*-DOPA 对 PD 的治疗具有增效作用。此外, 甘松还可提高多巴胺能神经元含量, 抑制炎症反应, 缓解 PD 伴发焦虑^[20]。以上研究表明, 甘松在治疗 PD 方面具有潜在的开发价值, 但甘松对 PD 后期出现的 LID 是否也具有保护作用却鲜有研究。本研究在 PD 模型的基础上给予 *L*-DOPA 的慢性刺激制备 LID 模型大鼠, 考察甘松对 LID 模型大鼠 Nrf2 和 D1R-ERK 信号通路的调控作用, 以期甘松治疗 LID 的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 200~220 g, 8 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号 SCXK (京) 2016-0006。大鼠饲养于北京中医药大学 SPF 级动物实验中心, 湿度 40%~60%, 温度 20~22 °C, 12 h 光暗周期 (7:00~19:00 光照), 自由进食饮水。动物实验方案符合国家实验动物福利伦理的相关要求, 均符合 3R 原则。

1.2 药材

甘松购自四川阿坝若尔盖县, 经北京中医药大学石晋丽教授鉴定为败酱科植物甘松 *N. jatamansi* DC. 的干燥根及根茎。将药材用高速万能粉碎机粉碎成粗粉, 称取 100 g 置于 1 L 烧杯中, 封口膜封口, 依次用 10、8、8 倍量 80%乙醇超声提取 3 次, 温度控制在 35 °C 以下, 时间分别为 60、45、45 min, 静置, 滤过, 合并滤液, 减压回收溶剂, 得棕色浸膏, 将浸膏真空冷冻干燥, 得到干燥的甘松 80%乙醇提取物。HPLC 测得含甘松新酮为 0.56%, 符合《中国药典》2020 年版规定。

1.3 药品与试剂

鱼藤酮 (批号 R105076) 购自上海阿拉丁生化科技有限公司; 葵花籽油 (批号 W24A11L122237) 购自上海源叶生物科技有限公司; 乌拉坦 (批号 C10821103) 购自上海麦克林生化科技有限公司; *L*-DOPA 购自北京曙光药业有限责任公司; 多巴胺和 cAMP 调节的磷蛋白-32 (dopamine and adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phospho-protein, DARPP-32) ELISA 试剂盒、磷酸化 DARPP-32 (phosphorylated DARPP-32, p-DARPP-32) ELISA 试剂盒、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) ELISA 试剂盒 (批号 20210706CM2)、ROS ELISA 试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) ELISA 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) ELISA 试剂盒 (批号 20210617K) 购自江苏酶兔生物科技有限公司; D1R 抗体 (批号 A2893) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; ERK 抗体 (批号 GB11560)、p-ERK 抗体 (批号 GB11004) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; Nrf2 抗体 (批号 12721S) 购自美国 CST 公司; ΔFosB 抗体 (批号 ab227387)、β-actin 抗体 (批号 AB227387) 购自英国 Abcam 公司; HRP 标记的山羊抗小鼠二抗 (批号 074-1506)、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 074-1806) 购自 KPL 公司。

1.4 仪器

FW200 型高速万能粉碎机 (北京科伟永兴仪器有限公司); RE3000A 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); 冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司); KW-1000DC 型数显恒温水浴锅 (金坛市杰瑞电器有限公司); KH5200DE 数控超声波清洗器型 (昆山合创超声仪器有限公司); RT-6100 型多功能酶标仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

2 方法

2.1 PD 和 LID 模型的制备、分组及给药

SD 大鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为假手术组、PD 组、*L*-DOPA 组和甘松+*L*-DOPA 组。PD 组、*L*-DOPA 组、甘松+*L*-DOPA 组大鼠颈背部 sc 鱼藤酮葵花籽油 (1.5 mg/kg) 14 d 制备 PD 模型, 假手术组 sc 等体积葵花籽油。当大鼠出现毛色发黄、精神萎靡不振、弓背和四肢力量减弱等症状时, 表明造模成功^[21], 共得到 36 只 PD 模型大鼠, 造模成功率为 90%。之后在 PD 模型大鼠的基础上给予 *L*-DOPA 和苯丝肼的慢性刺激制备 LID 模型^[22], 同

时进行 14 d 的药物干预: *L*-DOPA 组 ig *L*-DOPA (100 mg/kg) 和苕丝肼 (25 mg/kg); 甘松+*L*-DOPA 组 ig 甘松 (1240 mg/kg), 30 min 后 ig *L*-DOPA (100 mg/kg) 和苕丝肼 (25 mg/kg); 假手术组和 PD 组 ig 等体积 0.9%氯化钠溶液 (5 mL/kg)。

2.2 前肢功能检测实验

前肢功能检测实验能较好地模拟 PD 患者的运动障碍^[23], 可以用来确定 *L*-DOPA 对 PD 大鼠的运动障碍是否具有改善作用, 以及甘松与 *L*-DOPA 联用是否影响 *L*-DOPA 的疗效。实验时一只手固定大鼠后半部躯体和双后肢, 另一只手托起一条前肢, 使大鼠将其重心放置在着地的前肢上。在桌子上沿着大鼠负重肢体方向以 18 cm/s 的速度匀速移动, 记录移动时大鼠负重前肢的跨步数。重复 3 次, 每次间隔 30 min, 取平均值作为大鼠前肢跨步数。

2.3 各组大鼠异常不自主运动 (abnormal involuntary movement, AIM) 评分

为了评价 *L*-DOPA 导致的 LID 大鼠的运动障碍程度, 在文献报道^[24]的基础上进行了 AIM 评分。在给予 *L*-DOPA 后, 每 20 分钟评价 1 次, 观察周期为 1 min, 共观察 3 次, 取平均值。总 AIM 得分对应 3 种 AIM 亚型 (轴向、肢体和口舌) 的得分之和。每种亚型的严重程度为 0~4 级 (0 级: 没有出现异动; 1 级: 偶然出现异动; 2 级: 频繁出现异动; 3 级: 连续出现异动; 4 级: 连续出现异动, 且无法被抑制)。

2.4 免疫组化检测各组大鼠黑质中酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 的表达

大鼠 ip 20%乌拉坦麻醉, 充分暴露大鼠胸腔, 将灌注针插入心脏左心室, 同时剪开右心耳。每只大鼠先灌注 300 mL PBS 缓冲溶液, 待大鼠心脏中流出的液体为无色澄清时, 灌注 100 mL 多聚甲醛进行固定。固定完成后在冰上迅速剥离出完整的大脑, 浸泡于 10 倍量的多聚甲醛溶液中, 静置 24 h。然后进行石蜡包埋, 冠状面切片, 梯度酒精脱水, 染色, 拍照, 并将图片导入至 Image J 软件中, 对阳性细胞的吸光度 (*A*) 值及区域总面积的比值进行分析, 得到 TH 的平均 *A* 值, 以确定其表达情况。

2.5 Western blotting 法检测各组大鼠纹状体中 Nrf2、D1R、p-ERK/ERK、ΔFosB 的蛋白表达

大鼠 ip 20%乌拉坦麻醉, 迅速在冰上取出纹状体, 组织块用预冷的 PBS 缓冲液漂洗 2~3 次, 加入 10 倍量的组织蛋白提取试剂, 剪成小块置于匀浆器中匀浆。将匀浆液转移至离心管中, 振荡。冰

浴 30 min, 期间用移液器反复吹打, 确保匀浆液完全裂解, 4 °C、13 000×g 离心 5 min, 收集上清液。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质质量浓度, 加入 5×蛋白上样缓冲液, 95~100 °C沸水浴 5 min。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入封闭液室温封闭 1 h; 分别加入 Nrf2、D1R、p-ERK/ERK、ΔFosB、β-actin 抗体 (1:1000), 4 °C孵育过夜; 用 TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记的兔抗山羊 IgG 抗体 (1:5000), 室温孵育 2 h, TBST 洗 4 次, 每次 5 min。采用 ECL 化学发光法显影, 使用 Image J 分析蛋白条带灰度值。

2.6 ELISA 法检测各组大鼠纹状体中 HO-1、SOD、GSH-Px 活性及 ROS、p-DARPP-32/DARPP-32 含量

取低温保存的纹状体匀浆上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书检测 HO-1、SOD、GSH-Px 活性及 ROS、p-DARPP-32/DARPP-32 含量。

2.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.0 软件对实验数据进行分析, 利用单因素方差进行多组间比较, Tukey 检验进行两组间比较。符合正态分布的各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 前肢功能检测实验

采用前肢功能检测实验评价 *L*-DOPA 对 PD 大鼠运动障碍的影响及甘松与 *L*-DOPA 联用是否影响 *L*-DOPA 的疗效, 如表 1 所示, 与假手术组相比, PD 组大鼠前肢运动次数显著减少 ($P < 0.001$); 与 PD 组相比, *L*-DOPA 组和甘松+*L*-DOPA 组大鼠的前肢运动次数显著增多 ($P < 0.001$), 且 *L*-DOPA 组与甘松+*L*-DOPA 组之间没有显著性差异。表明 *L*-

表 1 各组大鼠前肢跨步次数 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Forelimb stride times of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	前肢跨步次数
假手术	11.83 ± 0.49
PD	6.25 ± 0.33***
<i>L</i> -DOPA	10.25 ± 0.33 ^{△△△}
甘松+ <i>L</i> -DOPA	11.33 ± 0.51 ^{△△△}

与假手术组比较: *** $P < 0.001$; 与 PD 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与 *L*-DOPA 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下表同

*** $P < 0.001$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs PD group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs *L*-DOPA group, same as below tables

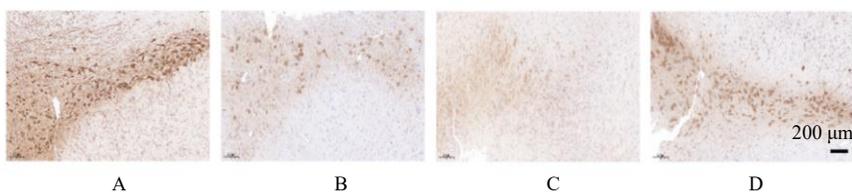
DOPA 能明显改善 PD 大鼠的运动障碍,且甘松与 L-DOPA 联用对 L-DOPA 治疗 PD 的药效未产生影响。

3.2 各组大鼠 AIM 评分

采用 AIM 评分评价 L-DOPA 导致的 LID 大鼠的运动障碍程度。如表 2 所示,假手术组和 PD 组大鼠均未表现出明显的 AIM 现象。L-DOPA 组和甘松+L-DOPA 组具有不同程度的 AIM 现象。与 L-DOPA 组相比,甘松+L-DOPA 组的 AIM 评分显著降低

表 2 各组大鼠 AIM 评分 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	AIM 评分
L-DOPA	28.75 ± 2.25
甘松+L-DOPA	19.50 ± 2.31 ^{###}

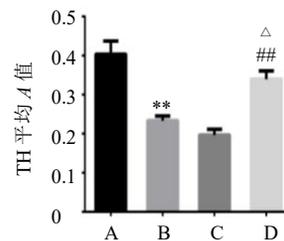


A-假手术组 B-PD 组 C-L-DOPA 组 D-甘松+L-DOPA 组 与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与 PD 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与 L-DOPA 组比较: $\#P < 0.05$ $\#\#P < 0.01$ $\#\#\#P < 0.001$, 下图同

A-sham group B-PD group C-L-DOPA group D-N. jatamansi + L-DOPA group ** $P < 0.01$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs PD group; $\#P < 0.05$ $\#\#P < 0.01$ $\#\#\#P < 0.001$ vs L-DOPA group, same as figures

图 1 各组大鼠脑内黑质中 TH 表达情况 ($\times 100$)

Fig. 1 Expression of TH in substantia nigra of rats in each group ($\times 100$)



3.4 甘松对大鼠纹状体 Nrf2 通路的影响

3.4.1 甘松对大鼠纹状体 ROS 含量的影响 如表 3 所示,与假手术组相比,PD 组大鼠纹状体中 ROS 水平显著升高 ($P < 0.001$);与 PD 组相比,L-DOPA 组有升高的趋势,但甘松+L-DOPA 组大鼠纹状体 ROS 含量明显降低 ($P < 0.05$);与 L-DOPA 组相比,甘松+L-DOPA 组大鼠纹状体 ROS 含量显著降低 ($P < 0.001$)。表明在 PD 模型大鼠中,ROS 因无法及时清除发生了氧化应激反应,而服用 L-DOPA 后,没有减轻 ROS 含量,又因 L-DOPA 在体内代谢产生 ROS,加重了氧化应激反应。甘松与 L-DOPA 联用可有效抑制 ROS 的产生,减轻氧化应激反应。

3.4.2 甘松对大鼠纹状体 Nrf2 蛋白表达的影响 如图 2 所示,与对照组相比,PD 组大鼠纹状体中 Nrf2 蛋白表达有升高的趋势;与 PD 组相比,L-DOPA 组没有显著差异,但甘松+L-DOPA 组大鼠纹状体的 Nrf2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$);与 L-DOPA 组相比,甘松+L-DOPA 组大鼠纹状体

($P < 0.01$)。表明与 L-DOPA 单用相比,甘松与 L-DOPA 联用能显著降低 LID 大鼠的 AIM 现象。

3.3 甘松对各组大鼠黑质 TH 表达的影响

如图 1 所示,与假手术组相比,PD 组 TH 表达显著降低 ($P < 0.01$);与 PD 组相比,L-DOPA 组没有显著性差异,但甘松+L-DOPA 组 TH 表达明显升高 ($P < 0.05$);与 L-DOPA 组相比,甘松+L-DOPA 组 TH 表达显著升高 ($P < 0.01$)。表明在 PD 模型大鼠形成过程中,TH 表达下降且胞体显著缩小,多巴胺能神经元被损坏;给予 L-DOPA 后,TH 表达没有明显提高,多巴胺能神经元的损伤程度没有被逆转;而甘松+L-DOPA 联用可有效扭转这一趋势,提高 TH 表达,达到保护多巴胺能神经元的作用。

表 3 各组大鼠纹状体 ROS 含量 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 ROS content in striatum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	ROS/(ng·mg ⁻¹)
假手术	45.42 ± 7.88
PD	125.60 ± 14.34 ^{***}
L-DOPA	146.00 ± 9.73
甘松+L-DOPA	79.60 ± 4.11 ^{△###}

的 Nrf2 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。表明在正常机体中,抗氧化因子 Nrf2 处于静息状态,表达不明显;在 PD 模型大鼠中,机体会自发启动保护机制使抗氧化因子 Nrf2 由静息状态变为活跃,并促进 Nrf2 的表达来抑制过量的 ROS;药物干预后,与 L-DOPA 单用比较,甘松与 L-DOPA 联用后,Nrf2 表达显著提高,表明甘松可通过提高 Nrf2 表达,降低体内 ROS 的含量,从而抑制氧化应激反应。

3.4.3 甘松对大鼠纹状体 HO-1、SOD、GSH-Px 活性的影响 如表 4 所示,与假手术组相比,PD 组大鼠纹状体 HO-1、SOD 和 GSH-Px 活性均有升高的

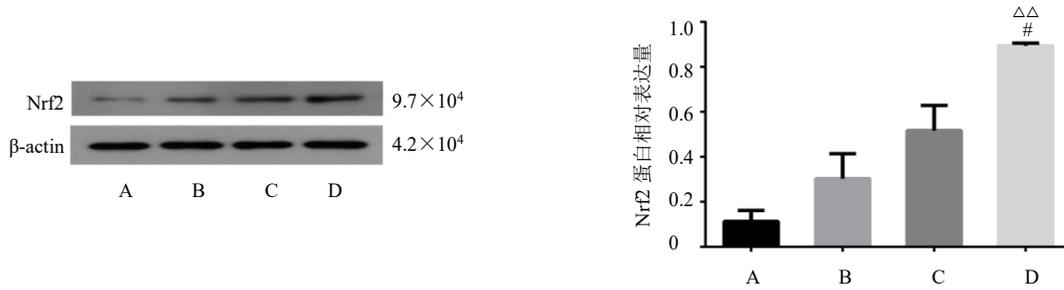


图2 各组大鼠纹状体 Nrf2 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Nrf2 protein expression in striatum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表4 各组大鼠纹状体 HO-1、SOD 和 GSH-Px 活性 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 HO-1, SOD and GSH-Px activities in striatum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	HO-1/(ng·mg ⁻¹) (n = 6)	SOD/(ng·mg ⁻¹) (n = 8)	GSH-Px/(ng·mg ⁻¹) (n = 8)
假手术	1.54 ± 0.07	1.52 ± 0.18	2.81 ± 0.24
PD	1.97 ± 0.14	1.84 ± 0.10	3.78 ± 0.35
L-DOPA	2.36 ± 0.08	2.27 ± 0.21	4.26 ± 0.32
甘松+L-DOPA	2.98 ± 0.21 ^{△△△#}	3.12 ± 0.20 ^{△△△#}	5.94 ± 0.34 ^{△△△##}

趋势；与 PD 组相比，L-DOPA 组没有显著性差异，但甘松+L-DOPA 组大鼠纹状体中 HO-1、SOD、GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.001$)；与 L-DOPA 组相比，甘松+L-DOPA 组大鼠纹状体 HO-1、SOD 活性明显升高 ($P < 0.05$)，GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.01$)。表明在正常机体中，氧化还原稳态平衡，HO-1、SOD、GSH-Px 均处于静息状态，表达不明显；在 PD 大鼠中，机体 ROS 异常增多导致 HO-1、SOD、GSH-Px 抗氧化因子被自发激活；药物干预后，与 L-DOPA 单用比较，甘松与 L-DOPA 联用可显著提高 HO-1、SOD、GSH-Px 的表达，对抑制过

量 ROS 的产生具有积极作用。

3.5 甘松对大鼠 D1R-ERK 通路的影响

3.5.1 甘松对大鼠纹状体 D1R、p-ERK/ERK、 Δ FosB 蛋白表达的影响 如图 3 所示，与 PD 组相比，L-DOPA 组大鼠纹状体 D1R、p-ERK/ERK、 Δ FosB 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001, 0.01$)；与 L-DOPA 组相比，甘松+L-DOPA 组大鼠纹状体 D1R、p-ERK/ERK、 Δ FosB 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05, 0.001$)。表明 PD 模型大鼠大量服用 L-DOPA 会激活 D1R-ERK 通路上的相关蛋白，而甘松与 L-DOPA 联用对 D1R-ERK 通路的过度激活具有抑制作用。

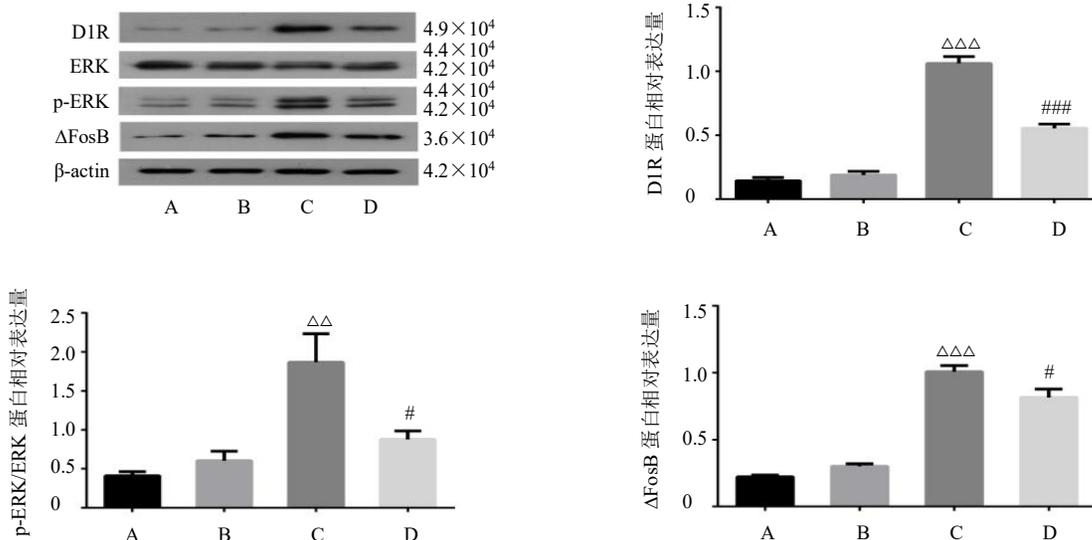


图3 各组大鼠纹状体 D1R、p-ERK/ERK 和 Δ FosB 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 D1R, p-ERK/ERK and Δ FosB protein expressions in striatum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5.2 甘松对大鼠纹状体 p-DARPP-32/DARPP-32 蛋白表达的影响 如表 5 所示,与 PD 组相比, L-DOPA 组大鼠纹状体 p-DARPP-32/DARPP-32 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与 L-DOPA 组相比,甘松+L-DOPA 组大鼠纹状体 D1R 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。表明 PD 模型大鼠大量服用 L-DOPA 会导致 p-DARPP-32/DARPP-32 蛋白激活,甘松与 L-DOPA 联用可以抑制该蛋白的过度激活。

表 5 各组大鼠纹状体 p-DARPP-32/DARPP-32 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 p-DARPP-32/DARPP-32 protein expression in striatum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	p-DARPP-32/DARPP-32/(ng·mg ⁻¹)
假手术	0.27 ± 0.02
PD	0.34 ± 0.03
L-DOPA	0.61 ± 0.09 ^{△△}
甘松+L-DOPA	0.39 ± 0.05 [#]

4 讨论

目前 PD 模型制备常用的神经毒素有鱼藤酮^[25]、6-OHDA^[26]和 MPTP^[27],其中鱼藤酮所致的 PD 模型在行为学改变和病理学特征上与临床 PD 患者更为接近,且容易穿透血脑屏障、造模成功率高、价廉易得^[28],此外,鱼藤酮可以直接作用于多巴胺能神经元,诱导线粒体功能障碍和增加 ROS 产生,导致多巴胺能神经元的变性^[29]。因此本研究采用 sc 鱼藤酮制备 PD 模型,并在此基础上给予大量的 L-

DOPA 制备 LID 模型大鼠^[30-31]。

本研究发现,PD 模型大鼠的前肢跨步次数显著降低,ROS 含量增多,TH 表达下降,多巴胺能神经元被严重破坏。给予 L-DOPA 治疗后,前肢跨步次数有所增加,但没有缓解 ROS 增多的现象,且因 L-DOPA 在体内代谢时也会产生 ROS,使得氧化应激反应进一步加重;此外,L-DOPA 还激活了 D1R-ERK 通路,此时机体表现为运动增加,出现 AIM^[32-33]。与 L-DOPA 单用相比,甘松与 L-DOPA 联用可以激活 Nrf2 通路抑制氧化应激反应,同时甘松与 L-DOPA 联用还能抑制 D1R-ERK 通路相关蛋白,最终起到治疗 LID 的作用。具体机制分析见图 4。

首先,外源性 L-DOPA 进入机体后,在氨基酸脱羧酶 (aromatic amino acid decarboxylase, AADC) 的代谢下成为多巴胺,多巴胺进一步代谢为 3,4-二羟基苯乙酸 (3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC) 和高香草酸 (homovanillic acid, HVA),反应的副产物包括 ROS、H₂O₂ 等,此时机体由于氧化还原稳态失衡,ROS 不能被及时清除,机体会发生氧化应激反应加剧疾病进程^[34]。Nrf2 是机体抗氧化防御机制中关键的内源性调节因子,可调节多种抗氧化酶的活性,对于降低 PD 患者体内 ROS 的含量、减轻多巴胺能神经元变性至关重要^[13]。当机体受到 ROS 的刺激时,Nrf2 和 Keap1 解离,迁移进入细胞核内,结合细胞内抗氧化反应元件

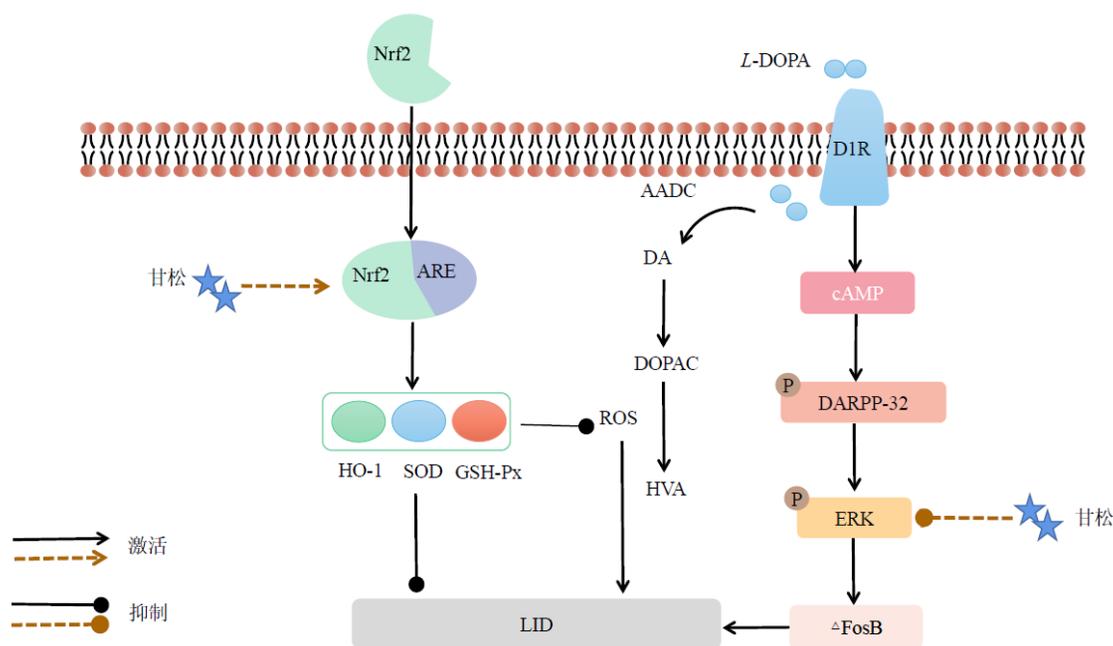


图 4 甘松治疗 LID 的具体机制

Fig. 4 Mechanism of *N. jatamansi* on treating LID

(antioxidant response element, ARE), 启动下游多种抗氧化酶(如 HO-1、SOD、GSH-Px 等)的表达^[35-36], 它们能保护机体免受氧化物质造成的损害, 减少外源性刺激引起的多种疾病。

其次, 长期服用外源性 L-DOPA, 会导致 D1R 激活, 当 D1R 被激活后, 会引起其下游 cAMP 信号级联的持续和间歇性高表达, 进而导致 cAMP 依赖的蛋白激酶 A (protein kinases A, PKA) 和 DARPP-32 的活性增加, 使 DARPP-32 磷酸化^[37]。DARPP-32 作为 D1R 下游信号通路上重要的整合分子, 当其磷酸化后会通过抑制蛋白磷酸酶-1 (protein phosphatase-1, PP-1) 从而促进 ERK 的磷酸化^[15]。研究表明, D1R 下游 ERK 信号通路持续过度活化是诱导和维持 LID 发生的主要机制, 在许多动物模型中干扰介导 ERK 激活的细胞内因子可以改善 LID 症状^[38-39]。此外, ERK 过度激活, 会促使其下游 Δ FosB 蛋白的生成, 在棘状神经元中 Δ FosB 的蓄积被认为是 LID 发生的标志分子, 且蓄积的程度与 LID 行为学评分呈正相关, 选择性阻止 Δ FosB 的蓄积则会显著减轻 LID^[40]。如 Ukgansan 可通过降低纹状体中 D1R 相关信号蛋白(如 p-ERK、 Δ FosB、c-fos 等)的过表达改善大鼠运动功能障碍, 恢复多巴胺能神经元, 减缓 LID 的进程^[41]。

本课题组前期研究发现, 甘松乙醇提取物对体内、体外 PD 模型均有良好的抑制作用。本研究通过 Nrf2 和 D1R-ERK 2 条信号通路证明了甘松对 LID 具有良好的治疗作用。此外, 有学者分别利用体内、体外模型研究甘松对阿尔茨海默症的作用, 结果表明甘松能够减轻 A β 诱导的脑内细胞死亡, 同时能够降低小胶质细胞数量、ROS 水平及 ERK 的磷酸化, 证明甘松的神经保护作用可能与抗氧化、抗炎及抑制 ERK 信号通路的激活作用有关^[42], 与本研究结果可以互为佐证。

综上所述, 甘松通过增强 PD 大鼠的 TH 表达和激活 Nrf2 信号通路, 对 L-DOPA 缓解 PD 大鼠的运动障碍起到了促进作用。同时, 甘松通过抑制 D1R-ERK 信号通路, 改善了慢性 L-DOPA 引起的 AIM 症状。本研究为甘松联合 L-DOPA 治疗 LID 的临床应用提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Xu W, Zheng D Y, Liu Y Y, et al. Glucocalyxin B alleviates lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease

by inhibiting TLR/NF- κ B and activating Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(6): 2091-2104.

- [2] 许薇. 蓝萼乙素对脂多糖诱导的帕金森病模型的神经保护作用及机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [3] Kline E M, Houser M C, Herrick M K, et al. Genetic and environmental factors in Parkinson's disease converge on immune function and inflammation [J]. *Mov Disord*, 2021, 36(1): 25-36.
- [4] Schapira A H, Olanow C W, Greenamyre J T, et al. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: Future therapeutic perspectives [J]. *Lancet*, 2014, 384(9942): 545-555.
- [5] Zibetti M, Merola A, Artusi C A, et al. Levodopa/carbidopa intestinal gel infusion in advanced Parkinson's disease: A 7-year experience [J]. *Eur J Neurol*, 2014, 21(2): 312-318.
- [6] Fahn S, Oakes D, Shoulson I, et al. Levodopa and the progression of Parkinson's disease [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(24): 2498-2508.
- [7] Ahlskog J E, Muenter M D. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature [J]. *Mov Disord*, 2001, 16(3): 448-458.
- [8] 吕思源. 依托拉嗪改善左旋多巴诱导帕金森病小鼠模型异动症的突触可塑性机制 [D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [9] 吴娜. D1R/Shp-2 复合物在异动症大鼠 D1R/Shp-2/ERK1/2 通路中的作用 [D]. 上海: 上海交通大学, 2019.
- [10] Tonelli C, Chio I I C, Tuveson D A. Transcriptional regulation by Nrf2 [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(17): 1727-1745.
- [11] Hu R, Saw C L, Yu R, et al. Regulation of NF-E2-related factor 2 signaling for cancer chemoprevention: Antioxidant coupled with antiinflammatory [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(11): 1679-1698.
- [12] 宋威彻. 黄芪甲苷治疗帕金森病的药效学评价及作用机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [13] Wei P C, Lee-Chen G J, Chen C M, et al. Neuroprotection of indole-derivative compound NC001-8 by the regulation of the NRF2 pathway in Parkinson's disease cell models [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 5074367.
- [14] Pahwa R, Lyons K E, Hauser R A, et al. Randomized trial of IPX066, carbidopa/levodopa extended release, in early Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2014, 20(2): 142-148.
- [15] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 87-88.
- [16] Yoon C S, Kim K W, Lee S C, et al. Anti-

- neuroinflammatory effects of sesquiterpenoids isolated from *Nardostachys jatamansi* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(2): 140-144.
- [17] Ahmad M, Yousuf S, Khan M B, *et al.* Attenuation by *Nardostachys jatamansi* of 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: Behavioral, neurochemical, and immunohistochemical studies [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006, 83(1): 150-160.
- [18] 张盼, 程光宇, 程为平. 浅谈甘松的临床应用 [J]. *中医药学报*, 2015, 43(2): 99-100.
- [19] 王胜男. 甘松对6-OHDA诱导的SH-SY5Y细胞损伤的保护作用及机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [20] 李佳园, 徐文, 万国慧, 等. 基于网络药理学及实验验证探究甘松治疗帕金森病伴发焦虑的作用机制 [J]. *中草药*, 2021, 52(23): 7192-7203.
- [21] 李亚楠, 马骏, 余沛豪, 等. 鱼藤酮帕金森病模型的建立与评价 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(3): 175-179.
- [22] 梁建庆, 何建成. 复方地黄颗粒对阴虚动风证帕金森病异动症模型大鼠神经行为学的影响 [J]. *解放军医学杂志*, 2018, 43(8): 652-656.
- [23] Olsen I, Singhrao S K. Inflammasome involvement in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 54(1): 45-53.
- [24] Dos-Santos-Pereira M, da-Silva C A, Guimarães F S, *et al.* Co-administration of cannabidiol and capsazepine reduces L-DOPA-induced dyskinesia in mice: Possible mechanism of action [J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 94: 179-195.
- [25] 黄玉菊. 柯诺辛在鱼藤酮诱导的帕金森病小鼠模型保护多巴胺能神经元的作用研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2020.
- [26] 崔晓萍, 陈建梅, 穆军山, 等. PI3K-AKT通路对脑缺血损伤神经干细胞的增殖作用 [J]. *中国康复医学杂志*, 2016, 31(2): 154-159.
- [27] Euteneuer S, Yang K H, Chavez E, *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) induces neuritegenesis in the cochlear spiral ganglion via neural cell adhesion molecule (NCAM) [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2013, 54: 30-43.
- [28] Klein A, Gidyk D C, Shriner A M, *et al.* Dose-dependent loss of motor function after unilateral medial forebrain bundle rotenone lesion in rats: A cautionary note [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 222(1): 33-42.
- [29] Maturana M G, Pinheiro A S, de Souza T L, *et al.* Unveiling the role of the pesticides paraquat and rotenone on α -synuclein fibrillation *in vitro* [J]. *Neurotoxicology*, 2015, 46: 35-43.
- [30] 王雪婷. 淫羊藿苷通过激活 SIRT3 上调线粒体复合体 II 活性减轻鱼藤酮诱导的多巴胺能神经元损伤 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020.
- [31] 滕龙, 洪芳, 何建成. 中药复方地黄方对帕金森病异动症模型大鼠 Δ FosB mRNA及蛋白表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(10): 4403-4406.
- [32] Brugnoli A, Napolitano F, Usiello A, *et al.* Genetic deletion of Rhes or pharmacological blockade of mTORC1 prevent striato-nigral neurons activation in levodopa-induced dyskinesia [J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 85: 155-163.
- [33] Singh A, Liang L, Kaneoke Y, *et al.* Dopamine regulates distinctively the activity patterns of striatal output neurons in advanced parkinsonian primates [J]. *J Neurophysiol*, 2015, 113(5): 1533-1544.
- [34] Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. Dopamine-or L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease [J]. *Neurotox Res*, 2003, 5(3): 165-176.
- [35] Lu M C, Ji J N, Jiang Z Y, *et al.* The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: An update [J]. *Med Res Rev*, 2016, 36(5): 924-963.
- [36] Magesh S, Chen Y, Hu L Q. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents [J]. *Med Res Rev*, 2012, 32(4): 687-726.
- [37] Feyder M, Bonito-Oliva A, Fisone G. L-DOPA-induced dyskinesia and abnormal signaling in striatal medium spiny neurons: Focus on dopamine D1 receptor-mediated transmission [J]. *Front Behav Neurosci*, 2011, 5: 71.
- [38] Lebel M, Chagniel L, Bureau G, *et al.* Striatal inhibition of PKA prevents levodopa-induced behavioural and molecular changes in the hemiparkinsonian rat [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 38(1): 59-67.
- [39] Schuster S, Nadjar A, Guo J T, *et al.* The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor lovastatin reduces severity of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements in experimental Parkinson's disease [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(17): 4311-4316.
- [40] Grandas F. Subcutaneous infusions of apomorphine: A reappraisal of its therapeutic efficacy in advanced Parkinson's disease [J]. *Expert Rev Neurother*, 2013, 13(12): 1343-1353.
- [41] Huh E, Choi J G, Sim Y, *et al.* An integrative approach to treat Parkinson's disease: Ukgansan complements L-dopa by ameliorating dopaminergic neuronal damage and L-dopa-induced dyskinesia in mice [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 431.
- [42] Liu Q F, Jeon Y, Sung Y W, *et al.* *Nardostachys jatamansi* ethanol extract ameliorates A β ₄₂ cytotoxicity [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(4): 470-477.