

基于肠-脑轴理论探讨甘松对帕金森大鼠运动功能障碍的改善作用及机制

薛静文, 万国慧[#], 李佳园, 魏晓嘉, 于佳禾, 杨 雪, 刘朦朦, 芦艺凡, 范文昕, 张 鸽, 石晋丽*
北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘 要: 目的 考察甘松 80%乙醇提取物对鱼藤酮诱导的帕金森 (Parkinson's disease, PD) 大鼠运动障碍的改善作用, 探究甘松通过“肠-脑轴”改善 PD 大鼠运动障碍的作用机制。方法 采用鱼藤酮致大鼠 PD 模型, 将大鼠分为对照组、模型组、左旋多巴 (50 mg/kg) 组及甘松低、中、高剂量 (0.41、0.62、0.93 g/kg) 组, 通过旷场实验、斜板实验研究 PD 大鼠的运动障碍, ELISA 测定 PD 大鼠纹状体多巴胺 (dopamine, DA) 含量, 筛选出甘松 80%乙醇提取物抗 PD 运动障碍的最优剂量。选择最优剂量组进行机制探究, 通过免疫组化实验检测大鼠中脑黑质部位多巴胺 DA 能神经元特征标记物酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 的表达; 采用 ELISA 测定大鼠结肠及纹状体中 DA、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 及其代谢产物 3,4-二羟基苯乙酸 (3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)、高香草酸 (homovanillic acid, HVA) 和 5-羟吲哚乙酸 (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA) 含量; 采用 Western blotting 测定大鼠结肠和纹状体中神经胶质细胞生物标志物胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 和小胶质细胞的表面标记物离子钙结合蛋白-1 (ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1) 的表达。结果 与模型组比较, 甘松均能在不同程度上改善 PD 大鼠的运动功能障碍, 其中甘松中剂量组效果最优, 能显著提升大鼠旷场运动总路程和斜板停留角度 ($P < 0.001$), 显著提高 PD 大鼠纹状体 DA 和黑质 TH 阳性表达含量 ($P < 0.01$ 、 0.001)。给予甘松干预后, PD 大鼠结肠及纹状体中 DA、5-HT 及其代谢产物 DOPAC、HVA 和 5-HIAA 的含量下降趋势均得到不同程度的逆转 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且 DA 的代谢速率得到了抑制 ($P < 0.05$); 结肠和纹状体中 GFAP 和 Iba-1 的表达显著降低 ($P < 0.001$), 抑制肠神经胶质细胞、神经胶质细胞和小胶质细胞的激活。结论 甘松能明显改善 PD 大鼠的运动障碍, 其机制可能与甘松抑制肠道胶质细胞和神经胶质细胞的过度激活, 从而阻止神经炎症的发展, 并抑制结肠与纹状体中 DA 及 5-HT 等神经递质的代谢过程从而提高其含量有关。验证了甘松通过“肠-脑轴”发挥抗 PD 作用的理论, 可为入脾胃经中药的抗 PD 的研究提供新思路。

关键词: 甘松; 帕金森; 肠-脑轴; 脾胃学说; 运动功能; 多巴胺; 5-羟色胺; 胶质细胞; 甘松新酮

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)09-2822-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.015

Effect and mechanism of *Nardostachys jatamansi* on motor dysfunction in Parkinson's rats based on gut-brain axis theory

XUE Jing-wen, WAN Guo-hui, LI Jia-yuan, WEI Xiao-jia, YU Jia-he, YANG Xue, LIU Meng-meng, LU Yi-fan, FAN Wen-xin, ZHANG Ge, SHI Jin-li

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

Abstract: Objective To investigate the effect of 80% ethanol extract of *Nardostachys jatamansi* (NJ) on dyskinesia in Parkinson's (PD) rats, and explore the mechanism of NJ against Parkinson's disease through the “gut-brain axis”. **Methods** The rotenone was used to induce PD rats model, rats were set up as blank control group, model group, levodopa (50 mg/kg) group and NJ low-, medium- and high-dose (0.41, 0.62, 0.93 g/kg) groups. To screen optimal dose of 80% ethanol extract of NJ for anti-PD movement disorders, the movement disorders of PD rats were investigated by open field test and inclined plate test, the striatal DA content was measured by ELISA. Immunohistochemical staining was used to investigate the expression of tyrosine hydroxylase (TH), a characteristic marker of dopamine (DA) neurons in the substantia nigra of rat midbrain; ELISA was used to investigate the contents of DA, 5-

收稿日期: 2022-11-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82073971)

作者简介: 薛静文 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: 15711008276 E-mail: xuejingwen_10@163.com

*通信作者: 石晋丽, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药质量评价与创新药物研究。Tel: (010) 84738623 E-mail: shijl@vip.sina.com

[#]共同第一作者: 万国慧 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量评价。Tel: 17864191021 E-mail: 17864191021@163.com

hydroxytryptamine (5-HT) and its metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA) and 5-hydroxyphenylacetic acid (5-HIAA) in colon and striatum of rats; Expressions of enteric glial cell biomarker glial fibrillary acidic protein (GFAP) and microglia surface marker ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) from colon and striatum were detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, NJ could improve the motor dysfunction of PD rats to varying degrees, and NJ medium-dose group had the best effect, which significantly improved the total distance of open field test and angle of stay of inclined plate test ($P < 0.001$), significantly increased DA content in striatum and TH positive expression in substantia nigra of PD rats ($P < 0.01, 0.001$). After administration of NJ, the decreasing trend of DA, 5-HT and its metabolites DOPAC, HVA and 5-HIAA in colon and striatum of PD rats were reversed to varying degrees ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and DA metabolic rate was inhibited ($P < 0.05$); NJ significantly reduced the expressions of GFAP and Iba-1 in colon and striatum ($P < 0.001$), inhibited the activation of enteric glial cells, glial cells and microglia. **Conclusion** NJ can significantly improve the motor dysfunction of PD rats, and its mechanism may be related to that inhibiting the excessive activation of enteric glial cells and glial cells to prevent the development of neuroinflammation, and inhibiting the metabolic process of neurotransmitters such as DA and 5-HT in colon and striatum to increase their content. This study verifies the theory that NJ exerts its anti-PD effect through the “gut-brain axis”, and can provide new ideas for the research on anti-PD of traditional Chinese medicine that attributed to the spleen and stomach meridians.

Key words: *Nardostachys jatamansi* DC.; Parkinson's disease; gut-brain axis; theory of spleen and stomach; motor function; dopamine; 5-hydroxytryptamine; glial cells; nardosinone

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是当前世界范围内最常见的神经退行性疾病之一^[1], 其主要病理特征为中脑黑质-纹状体通路出现多巴胺 (dopamine, DA) 能神经元的进行性退化。PD 患者会出现静止性震颤、运动迟缓等运动症状^[2], 以及睡眠障碍、胃肠道功能障碍等非运动症状^[3]。有 30% 的 PD 患者在运动功能障碍和中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 疾病出现前就出现肠道神经系统 (enteric nervous system, ENS) 失调。在近些年的研究中, 不断有证据为“PD 可能是肠源性疾病”这一假说提供支持^[4]。

中医“脾胃学说”与脑有着密切的联系, 脾胃为气血生化之源, 能升清降浊以营养全身, 若其代谢失常, 则脑神失养, 导致众多脑病^[5]。甘松为败酱科植物甘松 *Nardostachys jatamansi* DC. 的干燥根及根茎, 是我国传统中药材, 收录于《中国药典》2020 年版一部^[6], 入脾、胃经, 有“醒脾”“行气”“健胃”等功效。马云枝教授认为脾虚湿阻、痰瘀互结是 PD 发生的主要病机, 甘松既有“醒脾”之功, 便有其统摄之效^[7]。临床上常使用甘松与石菖蒲配伍治疗脾虚痰盛型原发性癫痫^[8]。传统观点认为 PD 与“肝风”相关^[5], PD 患者久病则郁, 有因病致郁, 或因病使郁加重, 甘松既有“行气”之功, 便有其治疗之效。中医理论中, 胃与脑通过经气直接相连, 胃气的变动可以直接影响到脑的功能^[9], 甘松既有“健胃”之功, 便有其滋养之效。临床归纳甘松广泛应用于疏解久病之郁, 调理脾胃之气, 芳香避秽

醒脑^[10]。此外, 现代药理研究表明, 甘松对各种神经、精神疾病有较好的神经保护作用^[11], 包括抗 PD^[12]和阿尔兹海默^[13]等神经退行性疾病、抗抑郁^[14]和镇静^[15]等。

课题组前期研究发现甘松 80% 乙醇提取物可以调节 PD 大鼠肠道菌群, 从而干预 PD 相关病理症状^[16], 但尚缺乏基于中医基础理论探讨甘松抗 PD 机制的研究。因此, 本研究拟采用鱼藤酮致大鼠 PD 模型, 通过旷场实验、斜板实验以及大鼠纹状体 DA 含量考察不同剂量甘松 80% 乙醇提取物对 PD 大鼠运动障碍的改善能力, 筛选甘松抗 PD 最优剂量; 在“肠-脑轴”理论的指导下, 采用 Western blotting 和 ELISA 实验检测 PD 大鼠结肠和纹状体中神经递质的含量、肠道胶质细胞标志物和神经胶质细胞标志物的表达情况, 探究甘松抗 PD 的作用机制, 为将“脾胃学说”和“肠-脑轴”理论相结合治疗 PD 的研究奠定基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 体质量 200~220 g, 由维通利华 (北京) 实验技术有限公司提供, 动物许可证号 SCXK (京) 2016-0006, 饲养于北京中医药大学实验动物部标准屏障环境内, 自由饮食, 明暗节律 12 h/12 h。进行实验前, 大鼠给予不受限制的标准饲料和洁净饮用水。动物实验遵守国际实验动物伦理学要求, 已由动物伦理委员会批准, 批准编号为 BUCM-4-2020091407-3055。

1.2 药材

甘松药材购自四川阿坝若尔盖县,经北京中医药大学中药鉴定教研室石晋丽教授鉴定为败酱科繖草属植物甘松 *N. jatamansi* DC.的干燥根及根茎。

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;左旋多巴(批号 H11021055)购自北京曙光药业有限责任公司;乌拉坦(批号 C10821103)购自上海麦克林科技有限公司;4%多聚甲醛(批号 70120900)购自北京兰杰柯科技有限公司;双氧水(批号 10011218)购自国药集团化学试剂有限公司;PBS 缓冲液(批号 B0002)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 Ba1086)、柠檬酸(pH 6.0)抗原修复液(批号 B2010)、苏木素染液(批号 B1001)购自 BQD 公司;酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体(批号 GB11181)购自 Servicebio 公司;二甲苯(批号 10023418)购自国药集团化学试剂有限公司;离子钙结合蛋白 1(ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1)抗体(批号 17198s)购自美国 CST 公司;HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 074-1506)、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(批号 074-1806)购自美国 KPL 公司; β -actin 抗体(批号 ab227387)购自英国 Abcam 公司;蛋白 Marker(批号 26616)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;大鼠 DA ELISA 试剂盒(批号 20210618AS1)、大鼠 3,4-二羟基苯乙酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC) ELISA 试剂盒(批号 20210618AS1)、大鼠高香草酸(hemovanillic acid, HVA) ELISA 试剂盒(批号 20210618AS1)、大鼠 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT) ELISA 试剂盒(批号 20210618AS1)、大鼠 5-羟吲哚乙酸(5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA) ELISA 试剂盒(批号 20210618AS1)购自江苏酶免有限公司;胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(批号 16825-1-AP)购自美国 Proteintech 公司。

1.4 仪器

SB-5200DTD 型超声清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司);ME104E/02 型十万分之一电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];FW-200 型高速万能粉碎机(北京科伟永兴仪器有限公司);HW.SY21-KP4 型智能恒温水浴锅(北京市

长风仪器仪表公司);RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);JY96-IIN 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);旷场、斜板均为实验室自制。

2 方法

2.1 甘松样品的制备

将甘松药材粉碎成粗粉,称取 100 g 置于具塞锥形瓶中,分别用 10、8、8 倍量的 80%乙醇超声提取 3 次,时间分别为 60、45、45 min,温度控制在 35 ℃ 以下,滤过,合并滤液,减压回收溶剂,得棕色浸膏 10.5 g,出膏率为 10.5%,冷冻真空干燥。甘松醇提物中主要含有萜类、黄酮类和香豆素类化合物,其中倍半萜类成分甘松新酮的质量分数为 0.109%~2.013%,总黄酮质量分数为 1.01%~2.18%^[17]。

2.2 大鼠 PD 模型制备

将鱼藤酮粉末溶于葵花籽油中,配成 1.5 mg/mL 的乳化液,SPF 级 SD 大鼠适应性饲养 1 周后,连续 2 周颈背部 sc 鱼藤酮(1.5 mg/kg),选取 PD 评分 2~4 分大鼠纳入实验,评分标准见表 1。按照评分标准筛选造模成功的大鼠,少数大鼠对鱼藤酮较为敏感,中毒症状严重,出现瘫痪、不能进食等危害生命的症状,基于动物伦理的考虑,对 6~8 分大鼠进行及时处死。

表 1 PD 模型评分标准

Table 1 Scoring criteria of PD model

评分	表现
1 分	拒捕行为减弱、竖毛、毛色变黄变脏、弓背、主动活动减少
2 分	有 1 分的表现,且主动活动减少明显、动作迟缓,并有震颤或有步态不稳
4 分	有 2 分的表现,且步态不稳,或不能直线行走、或行步时向一侧旋转
6 分	向单侧斜卧,单侧前肢和/或后肢瘫痪,行走困难,进食困难
8 分	单侧,前肢和/或后肢完全瘫痪,四肢拘挛,体质量大幅减轻,不能进食
10 分	濒死状态或死亡

2.3 分组及给药

将造模成功的大鼠随机分为模型组、左旋多巴组和甘松低、中、高剂量组,每组 7~8 只,另设置对照组大鼠 8 只。以前期课题组对甘松不同溶剂提取物抗大鼠帕金森运动功能研究中所用剂量作为中剂量^[18],另设低、高剂量,分别为中剂量的 2/3、3/2 倍,即分别为 0.41、0.62、0.93 g/kg 生药。左旋多巴

类药物是临床治疗 PD 的首选药物^[19],能有效缓解 PD 患者的运动功能障碍,故左旋多巴组为阳性对照组,根据左旋多巴临床用量确定给药剂量 50 mg/kg。

2.4 行为学实验

2.4.1 旷场实验 选择规格为 100 cm×100 cm×45 cm 的正方形箱作为旷场,将其底部划分为 25 个方格(20 cm×20 cm),将大鼠置于旷场实验箱正中央,观察大鼠在 5 min 内旷场自由活动的总路程。大鼠运动总路程越长,证明运动功能障碍越小。

2.4.2 斜板实验 参照 Rivlin 等^[20]方法自制斜板,斜板由 2 个矩形木板靠铰链连接,作为底板的木板不动,通过铰链连接另一块可活动木板,上附 1 cm 厚的橡胶垫。将大鼠头朝上,垂直放于可活动木板的橡胶垫上,从夹角为 50° 开始,若大鼠可在斜板上停留 5 s,则升高斜板角度 5°,直至停留时间小于 5 s,记录此角度作为斜板停留角度。每只大鼠测量 3 次,取测量平均值。大鼠停留角度越高,证明运动功能障碍越小。

2.5 免疫组化检测大鼠黑质中 TH 的表达

行为学实验结束后,各组大鼠禁食、不禁水 12 h,ip 20%乌拉坦麻醉,剪开大鼠的胸腔,将灌注针插入心脏左心室,剪开右心耳进行心脏灌注操作。在冰上迅速剥离出完整的大脑,浸泡于 10 倍体积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。

2.6 ELISA 检测大鼠结肠和纹状体中 DA、DOPAC、HVA、5-HT 和 5-HIAA 的含量

按照 ELISA 试剂盒说明书检测各组大鼠结肠和纹状体中 DA、DOPAC、HVA、5-HT、5-HIAA 水平。

2.7 Western blotting 检测大鼠结肠和纹状体中 Iba-1、GFAP 的表达

将大鼠结肠、纹状体组织用 4℃ 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次,加入 10 倍体积的组织蛋白提取试剂,置于匀浆器中匀浆,待匀浆液完全裂解,收集上清液,使用 BCA 定量法对蛋白总浓度进行测定。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,TBST 洗涤,用 5%脱脂牛奶封闭 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 5 min;加入一抗(1:6000),4℃ 孵育过夜;TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,加入二抗(1:50 000),室温孵育 30 min, TBST 洗涤 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。

2.8 统计分析

数据应用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验结果服从正态分布时,组间比较采用单因素方差分析,差异有显著性时利用 Dunnett's 检验进行多重比较分析。

3 结果

3.1 甘松抗 PD 大鼠运动功能障碍最优剂量选择

3.1.1 甘松对 PD 大鼠旷场实验的影响 如表 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠旷场总运动距离显著缩短($P < 0.001$);与模型组比较,各给药组大鼠旷场总运动距离均显著增加($P < 0.05, 0.01, 0.001$),其中甘松中剂量组最佳,表明甘松中剂量组对 PD 大鼠自主活动能力的改善最为显著。

3.1.2 甘松对 PD 大鼠斜板实验的影响 如表 3 所示,与对照组比较,模型组大鼠上肢力量不足、停留角度显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,各给药组大鼠上肢协调能力显著改善,斜板停留角度显著升高($P < 0.01, 0.001$),其中甘松中剂量组最佳,

表 2 甘松对 PD 大鼠旷场实验的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of *N. jatamansi* on open field experiment of PD rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	旷场总运动距离/cm
对照	—	8	2 827±262
模型	—	7	1 299±152 ^{###}
左旋多巴	0.05	7	2 623±353 ^{**}
甘松	0.41	8	2 394±241 [*]
	0.62	8	2 868±221 ^{***}
	0.93	8	2 553±267 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$;与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 下表同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$

^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as below tables

表 3 甘松对 PD 大鼠斜板实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Effect of *N. jatamansi* on inclined plate experiment of PD rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	倾斜角度/(°)
对照	—	65.00±3.27
模型	—	50.71±1.70 ^{###}
左旋多巴	0.05	63.57±2.83 ^{**}
甘松	0.41	62.14±1.84 ^{**△△}
	0.62	72.86±1.84 ^{***}
	0.93	62.14±1.84 ^{**△△}

与甘松中剂量组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$, 下表同

[△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs *N. jatamansi* medium-dose group, same as below tables

表明甘松中剂量组对 PD 大鼠运动协调能力的改善最为显著。

3.1.3 甘松对 PD 大鼠纹状体 DA 含量的影响 如表 4 所示,与对照组比较,模型组大鼠纹状体中 DA 含量显著降低 ($P<0.001$);与模型组比较,各给药组大鼠纹状体 DA 含量显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),其中甘松中剂量组作用最佳。

3.2 甘松抗 PD 大鼠运动功能障碍的机制探究

3.2.1 甘松对 PD 大鼠黑质 TH 表达的影响 如图 1、表 5 所示,模型组大鼠中脑黑质区域 TH 阳性神经元表达明显下降 ($P<0.05$),胞体轮廓不清晰且胞体显著缩小;经左旋多巴给药后,PD 大鼠 TH 阳性表达明显升高 ($P<0.05$),胞体缩小较少;经甘松给药后,PD 大鼠 TH 阳性表达显著升高 ($P<$

表 4 甘松对 PD 大鼠纹状体中 DA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=7$)
Table 4 Effect of *N. jatamansi* on DA content in striatum of PD rats ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	DA/(pg·mg ⁻¹)
对照	—	674.2±23.8
模型	—	259.6±47.5 ^{###}
左旋多巴	0.05	448.4±27.9 ^{***}
甘松	0.41	377.6±31.5 ^{**}
	0.62	529.9±54.0 ^{***}
	0.93	353.7±24.0 ^{*△}

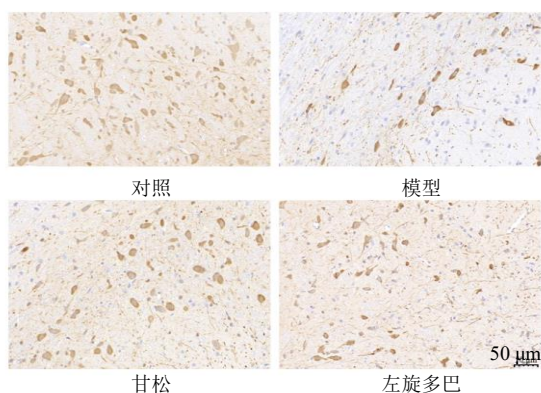


图 1 各组大鼠脑内黑质中 TH 的表达 (×200)

Fig. 1 Expression of TH in substantia nigra of rats in each group (×200)

表 5 甘松对 PD 大鼠中脑黑质 TH 神经元表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of *N. jatamansi* on expression of TH neurons in midbrain substantia nigra of PD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	A 值
对照	—	0.449 8±0.055 8
模型	—	0.172 1±0.006 5 [#]
左旋多巴	0.05	0.410 3±0.029 4 [*]
甘松	0.62	0.486 7±0.088 2 ^{**}

0.01),表明甘松可有效抑制 PD 大鼠黑质 TH 阳性神经元的减少。

3.2.2 甘松对 PD 大鼠结肠中神经递质含量的影响 如表 6 所示,与对照组比较,模型组大鼠结肠中神经递质 DA、DOPAC、HVA、5-HT 和 5-HIAA 含量显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001),DA 代谢速率 (DOPAC+HVA)/DA 显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,左旋多巴组 DA、DOPAC 和 HVA 含量均显著升高 ($P<0.05$),甘松组 DA、DOPAC、HVA、5-HT 和 5-HIAA 含量显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001),DA 代谢速率显著降低 ($P<0.05$)。

3.2.3 甘松对 PD 大鼠纹状体中神经递质含量的影响 如表 7 所示,与对照组比较,模型组大鼠纹状体中 DA、DOPAC、HVA、5-HT 和 5-HIAA 含量显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001),DA 代谢速率 (DOPAC+HVA)/DA 显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,左旋多巴组 DA、HVA 含量显著升高 ($P<0.01$),DA 代谢速率降低;甘松组 DA、DOPAC、HVA、5-HT 和 5-HIAA 含量显著升高 ($P<0.05$),DA 代谢速率降低,表明甘松能起到抑制 PD 大鼠 DA、5-HT 神经递质含量下降的作用,并降低 DA 代谢速率。

3.2.4 甘松对 PD 大鼠肠神经胶质细胞的影响 如图 2、表 8 所示,与对照组比较,模型组大鼠结肠组织 Iba-1、GFAP 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.001$);与模型组比较,各给药组结肠组织 Iba-1、GFAP 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.001$),表明肠神经胶质细胞的过度激活得到了有效抑制。

表 6 甘松对 PD 大鼠结肠中神经递质含量和 DA 代谢速率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of *N. jatamansi* on neurotransmitter content and DA metabolic rate in colon of PD rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	DA/(pg·mg ⁻¹)	DOPAC/(ng·mg ⁻¹)	HVA/(ng·mg ⁻¹)	5-HT/(ng·mg ⁻¹)	5-HIAA/(ng·mg ⁻¹)	(DOPAC+HVA)/DA
对照	—	623.37±31.17	62.52±2.44	116.83±6.54	12.79±0.45	24.86±1.38	289.85±10.84
模型	—	259.59±47.50 ^{###}	39.20±3.56 ^{###}	76.46±6.31 ^{###}	8.74±0.57 ^{###}	18.61±1.61 ^{##}	509.06±69.03 ^{##}
左旋多巴	0.05	452.76±42.16 [*]	52.69±1.78 [*]	94.91±0.97 [*]	10.50±0.88	20.55±0.65	340.80±32.48
甘松	0.62	529.87±54.02 ^{***}	58.27±4.99 ^{**}	107.93±4.05 ^{***}	12.02±0.52 ^{**}	25.76±1.27 ^{**}	334.70±46.04 [*]

表 7 甘松对 PD 大鼠纹状体中神经递质含量和 DA 代谢速率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Effect of *N. jatamansi* on neurotransmitter content and DA metabolic rate in striatum of PD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	DA/ (pg·mg ⁻¹)	DOPAC/ (ng·mg ⁻¹)	HVA/(ng·mg ⁻¹)	5-HT/(ng·mg ⁻¹)	5-HIAA/ (ng·mg ⁻¹)	(DOPAC+HVA)/DA
对照	—	559.04±37.47	58.64±4.30	109.60±6.66	11.91±0.43	27.48±1.18	304.78±20.82
模型	—	264.46±27.66 ^{###}	39.67±2.13 ^{##}	76.10±6.95 ^{##}	9.75±0.29 [#]	18.91±0.71 ^{###}	462.29±51.66 [#]
左旋多巴	0.05	459.72±52.52 ^{**}	52.19±5.02	103.33±5.35 [*]	11.20±0.63	21.85±1.60	356.49±38.93
甘松	0.62	430.49±26.89 [*]	56.38±3.23 [*]	101.44±7.25 [*]	12.09±0.62 [*]	23.96±1.46 [*]	373.75±29.99

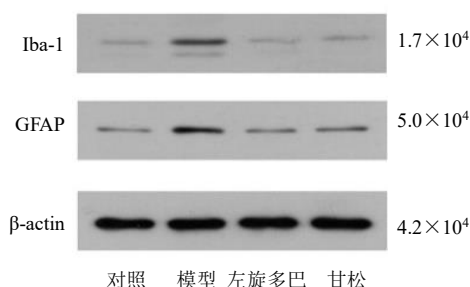


图 2 甘松对 PD 大鼠结肠中 Iba-1 和 GFAP 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of *N. jatamansi* on protein expressions of Iba-1 and GFAP in colon of PD rats

表 8 甘松对 PD 大鼠结肠中 Iba-1 和 GFAP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of *N. jatamansi* on protein expressions of Iba-1 and GFAP in colon of PD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	Iba-1/β-actin	GFAP/β-actin
对照	—	0.360 1±0.080 3	0.334 1±0.036 8
模型	—	0.939 6±0.061 3 ^{###}	0.971 4±0.072 2 ^{###}
左旋多巴	0.05	0.382 0±0.053 0 ^{***}	0.326 0±0.009 1 ^{***}
甘松	0.62	0.354 0±0.052 5 ^{***}	0.333 5±0.031 3 ^{***}

3.2.5 甘松对 PD 大鼠神经胶质细胞的影响 如图 3、表 9 所示,与对照组比较,模型组大鼠纹状体中神经胶质细胞的标志物 Iba-1、GFAP 的表达水平显

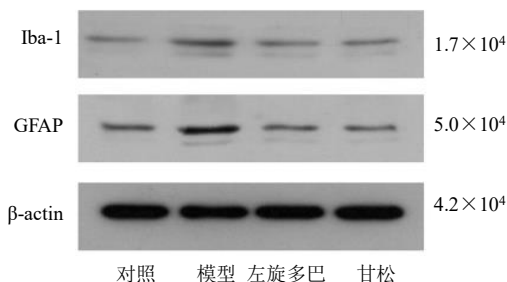


图 3 甘松对 PD 大鼠纹状体中 Iba-1 和 GFAP 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of *N. jatamansi* on protein expression of Iba-1 and GFAP in striatum of PD rats

表 9 甘松对 PD 大鼠纹状体中 Iba-1 和 GFAP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effect of *N. jatamansi* on protein expression of Iba-1 and GFAP in striatum of PD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	Iba-1/β-actin	GFAP/β-actin
对照	—	0.368 1±0.057 9	0.455 7±0.046 2
模型	—	0.902 7±0.023 3 ^{###}	1.023 0±0.032 1 ^{###}
左旋多巴	0.05	0.414 6±0.072 8 ^{***}	0.514 0±0.034 3 ^{***}
甘松	0.62	0.415 1±0.060 1 ^{***}	0.462 5±0.070 7 ^{***}

著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较,左旋多巴和甘松醇提取物可显著降低 Iba-1、GFAP 的表达 ($P < 0.001$),表明甘松能够有效抑制神经胶质细胞的过度激活。

4 讨论

本研究考察了甘松 80%乙醇提取物低、中、高剂量对鱼藤酮致 PD 大鼠运动功能障碍的改善作用和对 PD 大鼠纹状体 DA 含量的影响,结果表明甘松中剂量组对 PD 大鼠运动功能障碍的改善作用最佳,选择甘松中剂量进一步探究其抗 PD 机制。考察甘松对 PD 大鼠肠道胶质细胞、神经胶质细胞以及结肠和纹状体中神经递质的表达及含量的影响,结果表明甘松能够抑制 PD 大鼠肠道胶质细胞及神经胶质细胞的激活;抑制 PD 大鼠结肠和纹状体中 DA、5-HT 神经递质及其代谢产物含量下降的趋势,降低 DA 代谢速率。

综上所述,甘松抗 PD 的机制与抑制肠道胶质细胞和神经胶质细胞的激活,抑制肠道 DA 的分解,升高纹状体中 DA 及 5-HT 的含量有关,机制分析见图 4,验证了甘松基于“脾胃学说”和“肠-脑轴”理论治疗 PD 的可行性。

4.1 甘松通过“肠-脑轴”改善 PD 大鼠运动功能障碍的分析

PD 是以大脑中枢神经系统内 DA 能神经元的凋亡及 α-突触核蛋白 (α-synuclein, α-syn) 的异常聚集为病理特征的神经系统退行性疾病,该病的患者会日渐产生严重的运动障碍^[21],另外有流行病学

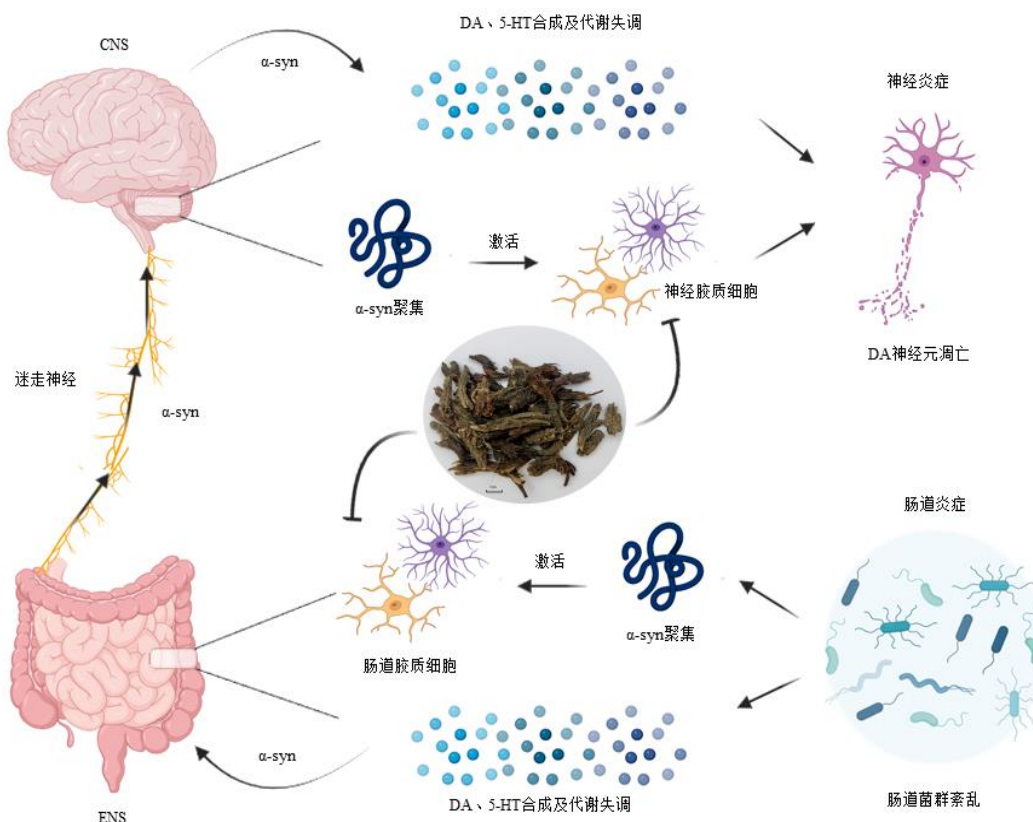


图 4 甘松对 PD 大鼠的治疗作用机制

Fig. 4 Mechanism of *N. jatamansi* on PD rats

结果显示其患者在早期通常有明显胃肠道障碍^[22]。2003 年, Braak 提出 α -syn 可能首先出现于肠道, 随后以朊病毒的方式由肠自脑传播^[23-24], 自此 PD 领域开展了对于“肠道起源”理论和微生物-肠-脑轴机制的研究。从改善胃肠道功能角度入手探索治疗 PD 也逐渐成为研究热点, 肠和脑之间的双向信息交流也越来越受到关注。

甘松是我国传统中药材, 中医理论认为其入脾、胃经, 有“理气”“醒脾胃”之功。本课题组前期研究结果证明^[16], 甘松不仅能抑制神经元退化, 治疗 PD, 还能够恢复紊乱的肠道微生物群, 减轻肠道炎症和神经炎症。因此本研究立足于中医“脾胃学说”, 探讨甘松治疗 PD, 不仅符合传统中医药理论, 也具有现代药理研究基础。

4.2 甘松通过抑制神经胶质细胞改善大鼠 PD 的机制分析

CNS 中的神经胶质细胞包括星形胶质细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞^[25]。神经胶质细胞被过度激活会导致的 CNS 神经炎症, 其发展进程主要受小胶质细胞影响, 在某些情况下也会受星形胶质细胞和少突胶质细胞等大胶质细胞影响^[26]。神经炎症在

PD 的病理发展过程中起到了极为关键的作用^[27], 研究表明, CNS 的神经炎症会促进 DA 能神经元细胞的凋亡和细胞自噬^[28]。

小胶质细胞是 CNS 的常驻免疫细胞^[29], Iba-1 是小胶质细胞的标志物。小胶质细胞能够介导及调节潜在有害的神经炎症反应^[30], 发挥神经保护的作用^[31]。研究发现, PD 病人黑质中存在活化的小胶质细胞^[32]。Sabogal-Guáqueta 等^[33]及 Sironi 等^[34]发现, 错误折叠的 α -syn 会激活中脑黑质致密部的小胶质细胞, 使其分泌促炎因子, 产生炎症和氧化应激。星形胶质细胞能够参与 PD 的神经病理过程^[35-36], 星形胶质细胞标志物 GFAP 的表达增加是其被过度激活的标志^[37]。星形胶质细胞过度激活后会产生极强的神经毒性, 对突触的功能和 CNS 的可塑性造成损伤, 破坏脑环境稳态^[38], 进一步加重神经炎症和血脑屏障功能障碍, 造成恶性循环状态。

综上所述, 错误折叠的 α -syn 会引发 CNS 神经胶质细胞的过度激活, 小胶质细胞分泌促炎因子的表达上升, 导致神经炎症加重; 过度激活的星形胶质细胞破坏脑环境稳态, 进一步加重 CNS 神经炎症, 进而引起 DA 能神经元的退化, 在一定程度上

加速 PD 的发生与发展过程。本研究结果表明, PD 大鼠的纹状体中, 出现了 GFAP 和 Iba-1 表达上升的现象, 这种现象可能是由于星形胶质细胞和小胶质细胞被过度激活引起的^[39]。而甘松给药后, 抑制了神经胶质细胞的过度激活, 制止了神经炎症的加重, 从而发挥了抗 PD 作用。

4.3 甘松通过抑制肠道胶质细胞改善大鼠 PD 的机制分析

ENS 通过交感神经中的迷走神经与 CNS 相连^[40], 当 ENS 发生长期慢性炎症会导致血脑屏障受损, 最终引起 CNS 中神经炎症的发生^[41]。肠神经胶质细胞可能在 PD 患者产生的肠道炎症和神经炎症的发生和发展中起到重要作用^[42]。GFAP 是神经胶质细胞中星形胶质细胞的标志物, 同时也是肠神经胶质细胞的一种广为人知的标志物^[39], Devos 等^[43]首先证明在 PD 病人的结肠活检中 GFAP 的表达水平有所提高, 随后 Clairembault 等^[44]的研究也发现 GFAP 在 PD 病人的胃肠道表达上升, 这可能是由于肠神经胶质细胞被过度激活引起的^[45]。此外有研究表明, 肠道微生物群的存在对以 Iba-1 为标志物的小胶质细胞的发育成熟和功能发挥至关重要^[46]。

肠神经胶质细胞和神经胶质细胞分别在启动肠道和大脑的先天免疫方面起着重要作用, 与神经胶质细胞被过度激活后促进神经炎症的历程相同, 肠神经胶质细胞被过度激活也可能导致肠道炎症^[47]。在 PD 患者的结肠中发现了出现功能障碍的肠神经胶质细胞和路易小体^[48], 证明了当 ENS 中出现 α -syn 的异常集聚后, 肠神经胶质细胞的表达随之上调^[49], 进而可能会导致肠道神经元活性的改变以及肠道炎症的发生。

本研究结果表明, PD 大鼠的结肠中, 也出现了 GFAP 和 Iba-1 表达上升的现象, 这可能是由于肠神经胶质细胞被过度激活引起的^[39]。结合本课题组前期研究结果发现^[16], PD 大鼠出现肠道微生物紊乱和肠道 α -syn 的错误折叠, 使肠神经胶质细胞被过度激活, 分泌促炎因子, 导致肠道炎症的发生, α -syn 随迷走神经扩散至脑, 进一步激活神经胶质细胞导致 CNS 神经炎症, 在 PD 中形成恶性循环^[50]。甘松可以同时抑制肠道胶质细胞和神经胶质细胞的过度激活, 制止这种恶性循环, 起到抗 PD 的作用。

4.4 甘松通过神经递质改善大鼠 PD 的机制分析

脑和肠道关系密切, 二者均起源于早期胚胎的神经嵴^[51], 肠-脑轴作为双向交流系统, 使得神经

质对 PD 病人的非运动症状有着重要影响^[52]。其中 DA 和 5-HT 及其代谢产物 HVA、DOPAC、5-HIAA 含量的变化是 PD 临床诊断的主要指标之一^[53]。

DA 是负责调节平衡和运动的重要神经递质^[54], PD 发生后纹状体中 DA 的进行性下降是引起运动症状的主要原因, DA 信号通路被认为与 PD 机制相关或可用于相关治疗。研究表明, PD 患者结肠平滑肌层的 DA 含量低于正常人^[55], 这表明肠多巴胺能系统的损害是导致 PD 病人出现胃肠道功能失调的一个重要因素。而 HVA 和 DOPAC 是 DA 的中间产物和最终产物, 游离的 HVA 和 DOPAC 具有神经毒性, 其可加重神经元细胞损伤^[56]。

5-HT 是中枢神经系统调节情绪水平的关键神经递质和信号分子, 与胃肠道功能相关, 研究表明, 肠道微生物可以通过控制色氨酸通路对机体的新陈代谢过程进行调节, 促进 5-HT 代谢物 5-HIAA 的产生, 从而抑制 5-HT 的合成^[57]。因此, 神经递质及其代谢产物的变化可能与 PD 患者出现的早期胃肠道功能障碍、胃动力不足等症状密切相关。

本研究考察了 PD 大鼠结肠及纹状体中神经递质及其代谢产物含量的变化, 结果表明 PD 大鼠结肠及纹状体中 DA 及 5-HT 的代谢过程速率远高于合成速率, 而甘松醇提物能有效抑制神经递质含量的减少和代谢分解过程, 起到治疗 PD 的作用。这也提示 PD 患者早期的胃肠道障碍除了与 Braak 提出的“dual hit”假说有关以外^[24], 也可能与神经递质含量的改变有一定相关性。

综上, 本研究证明了甘松能够抑制 ENS 中过度激活的肠道胶质细胞及 CNS 中因 α -syn 错误折叠而过度激活的神经胶质细胞, 并抑制 DA 及 5-HT 等神经递质的代谢过程从而提高其含量, 通过肠-脑轴发挥抗 PD 作用。PD 作为世界范围内的疾病难题, 其发病机制极为复杂。本研究在传统中医理论“脾胃学说”和现代医学“肠-脑轴”理论的共同指导下, 探讨甘松对 PD 模型大鼠行为的改善作用, 可为入脾胃经中药的抗 PD 的研究提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] De Virgilio A, Greco A, Fabbri G, *et al.* Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation [J]. *Autoimmun Rev*, 2016, 15(10): 1005-1011.
- [2] Obeso J A, Rodríguez-Oroz M C, Benítez-Temino B, *et al.* Functional organization of the basal Ganglia: Therapeutic

- implications for Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2008, 23(Suppl 3): S548-S559.
- [3] Cersosimo M G, Raina G B, Pecci C, *et al*. Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: Prevalence and occurrence before motor symptoms [J]. *J Neurol*, 2013, 260(5): 1332-1338.
- [4] Derkinderen P, Rouaud T, Lebouvier T, *et al*. Parkinson disease: The enteric nervous system spills its guts [J]. *Neurology*, 2011, 77(19): 1761-1767.
- [5] 缪晓路, 朱颖文. 从中医脾胃学说探讨脑退行性疾病的防治 [J]. *光明中医*, 2020, 35(13): 1976-1978.
- [6] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 12.
- [7] 肖利, 马云枝. 马云枝教授从脾论治帕金森病 [J]. *中医临床研究*, 2015, 7(19): 104-105.
- [8] 李巧彤, 程光宇, 张奇, 等. 醒脾化痰法为主中药对脾虚痰盛型原发性癫痫影响的临床试验 [J]. *上海中医药杂志*, 2018, 52(11): 42-45.
- [9] 韩政云, 商庆新. 基于脑肠轴理论从胃风论治神经内科疾病 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19(11): 1930-1934.
- [10] 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.
- [11] Khan M B, Hoda M N, Ishrat T, *et al*. Neuroprotective efficacy of *Nardostachys jatamansi* and crocetin in conjunction with selenium in cognitive impairment [J]. *Neurol Sci*, 2012, 33(5): 1011-1020.
- [12] 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.
- [13] Rahman H, Muralidharan P, Baid C. *Nardostachys jatamansi* DC protects from the loss of memory and cognition deficits in sleep deprived Alzheimer's disease (AD) mice model [J]. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2010, 5(3): 160-167.
- [14] Dhingra D, Goyal P K. Inhibition of MAO and GABA: Probable mechanisms for antidepressant-like activity of *Nardostachys jatamansi* DC. in mice [J]. *Indian J Exp Biol*, 2008, 46(4): 212-218.
- [15] Salim S, Ahmad M, Zafar K S, *et al*. Protective effect of *Nardostachys jatamansi* in rat cerebral ischemia [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003, 74(2): 481-486.
- [16] 万国慧, 魏晓嘉, 李佳园, 等. 甘松抗帕金森病作用及对大鼠肠道菌群的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(2): 499-510.
- [17] 李佳园, 魏晓嘉, 万国慧, 等. 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 [J]. *中草药*, 2022, 53(1): 134-142.
- [18] 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.
- [19] Lane E L. L-DOPA for Parkinson's disease-a bittersweet pill [J]. *Eur J Neurosci*, 2019, 49(3): 384-398.
- [20] Rivlin A S, Tator C H. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat [J]. *J Neurosurg*, 1977, 47(4): 577-581.
- [21] Del Tredici K, Rüb U, De Vos R A, *et al*. Where does Parkinson disease pathology begin in the brain? [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002, 61(5): 413-426.
- [22] Hsieh T H, Kuo C W, Hsieh K H, *et al*. Probiotics alleviate the progressive deterioration of motor functions in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Brain Sci*, 2020, 10(4): 206.
- [23] Braak H, Del Tredici K, Rüb U, *et al*. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2003, 24(2): 197-211.
- [24] Braak H, Rüb U, Gai W P, *et al*. Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2003, 110(5): 517-536.
- [25] 刘洪翠, 郑敏化, 韩骅, 等. 小胶质细胞在帕金森病病理进展中的作用 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(11): 3.
- [26] Voet S, Prinz M, van Loo G. Microglia in central nervous system inflammation and multiple sclerosis pathology [J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(2): 112-123.
- [27] 付星卉. 星形胶质细胞对帕金森病黑质一纹状体通路影响的探究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [28] Tansey M G, Goldberg M S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(3): 510-518.
- [29] 贾子瑞, 马泽宇, 秦齐, 等. 肠道菌群在帕金森病发病中的作用及机制研究进展 [J]. *河南大学学报: 医学版*, 2020, 39(4): 287-294.
- [30] Li Q Y, Barres B A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(4): 225-242.
- [31] 张博桦, 申延琴. 肠道菌群与帕金森病的研究进展 [J]. *延安大学学报: 医学科学版*, 2021, 19(1): 80-86.
- [32] 尚平平, 刘晓宁, 陈勇, 等. 褪黑素对帕金森病大鼠 Nrf2/HO-1 通路及小胶质细胞活化的影响 [J]. *现代药物与临床*, 2021, 36(12): 2464-2472.
- [33] Sabogal-Guáqueta A M, Marmolejo-Garza A, de Pádua V

- P, *et al.* Microglia alterations in neurodegenerative diseases and their modeling with human induced pluripotent stem cell and other platforms [J]. *Prog Neurobiol*, 2020, 190: 101805.
- [34] Sironi L, Restelli L M, Tolnay M, *et al.* Dysregulated interorganellar crosstalk of mitochondria in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Cells*, 2020, 9(1): 233.
- [35] Venkateshappa C, Harish G, Mythri R B, *et al.* Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: Implications for Parkinson's disease [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(2): 358-369.
- [36] Damier P, Hirsch E C, Zhang P, *et al.* Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease [J]. *Neuroscience*, 1993, 52(1): 1-6.
- [37] Burda J E, Sofroniew M V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease [J]. *Neuron*, 2014, 81(2): 229-248.
- [38] Liddel S A, Guttenplan K A, Clarke L E, *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia [J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481-487.
- [39] Jessen K R, Mirsky R. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein [J]. *Nature*, 1980, 286(5774): 736-737.
- [40] Niesler B, Kuerten S, Demir I E, *et al.* Disorders of the enteric nervous system-a holistic view [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(6): 393-410.
- [41] Zhou Z L, Jia X B, Sun M F, *et al.* Neuroprotection of fasting mimicking diet on MPTP-induced parkinson's disease mice via gut microbiota and metabolites [J]. *Neurotherapeutics*, 2019, 16(3): 741-760.
- [42] Benvenuti L, D'Antongiovanni V, Pellegrini C, *et al.* Enteric glia at the crossroads between intestinal immune system and epithelial barrier: Implications for Parkinson disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9199.
- [43] Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, *et al.* Colonic inflammation in Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 50: 42-48.
- [44] Clairembault T, Kamphuis W, Leclair-Visonneau L, *et al.* Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 2014, 130(6): 805-815.
- [45] 温路, 王硕, 张程璐, 等. MPTP 诱导帕金森病小鼠胃肠道中单胺类递质及胶质细胞变化 [J]. 中国药物警戒, 2021, 18(4): 320-323.
- [46] 张智静, 罗涛. 小胶质细胞极性调节与神经损伤修复研究进展 [J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(1): 26-28.
- [47] Morale M C, Serra P A, L'Episcopo F, *et al.* Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: Glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration [J]. *Neuroscience*, 2006, 138(3): 869-878.
- [48] Shannon K M, Keshavarzian A, Mutlu E, *et al.* Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2012, 27(6): 709-715.
- [49] Persons A L, Desai Bradaric B, Kelly L P, *et al.* Gut and brain profiles that resemble pre-motor and early-stage Parkinson's disease in methamphetamine self-administering rats [J]. *Drug Alcohol Depend*, 2021, 225: 108746.
- [50] McGeer P L, Itagaki S, Boyes B E, *et al.* Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains [J]. *Neurology*, 1988, 38(8): 1285-1291.
- [51] Lake J I, Heuckeroth R O. Enteric nervous system development: Migration, differentiation, and disease [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 305(1): G1-G24.
- [52] Dinan T G, Cryan J F. The microbiome-gut-brain axis in health and disease [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2017, 46(1): 77-89.
- [53] 黄鑫, 杨增艳, 黎丽, 等. 牡荆苷对 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠行为学、神经递质及脑黑质多巴胺能神经元凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 23-29.
- [54] 孙孟菲. 粪菌移植对于 MPTP 诱导的帕金森模型小鼠的神经保护作用及机制 [D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [55] Singaram C, Ashraf W, Gaumnitz E A, *et al.* Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation [J]. *Lancet*, 1995, 346(8979): 861-864.
- [56] 陈艳, 董良, 朱昭琼. 急性肺损伤治疗措施的研究进展 [J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(1): 157-161.
- [57] Gershon M. D. Review article: Serotonin receptors and transporters-roles in normal and abnormal gastrointestinal motility [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004, 20(7): 3-14.

[责任编辑 李亚楠]