

毛蕊花糖苷对MPTP制备的帕金森病模型小鼠的神经保护作用及机制研究

张明洋 杨新玲

830063 乌鲁木齐, 新疆医科大学第二附属医院神经内科

通信作者: 杨新玲, Email: yangxinling2014@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2024.05.009

【摘要】目的 探讨毛蕊花糖苷对帕金森病(PD)模型小鼠脑的神经保护作用及其可能的机制。**方法** 选取75只C57/BL小鼠(SPF级、健康雄性、24~26 g)为实验对象,随机分为空白对照组、模型组(1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶/MPTP组)、实验组(低剂量组: MPTP+30 mg/kg毛蕊花糖苷;中剂量组: MPTP+60 mg/kg毛蕊花糖苷;高剂量组: MPTP+120 mg/kg毛蕊花糖苷),每组15只。造模完成后采用爬杆、悬挂实验检测各组小鼠的行动能力,采用超微电镜检测多巴胺能神经元细胞亚细胞结构变化,采用免疫组织化学染色法检测酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞数量,采用Western blotting检测TH、 α -突触核蛋白(α -syn)、核因子红细胞-2相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)蛋白的表达情况,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组小鼠黑质的谷胱甘肽、总铁离子、超氧化物歧化酶(SOD)、脑组织丙二醛等。**结果** 模型组小鼠完成爬杆实验的时间较空白对照组长,实验组小鼠完成爬杆实验的时间较模型组短,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);模型组小鼠的悬挂实验评分低于空白对照组,实验组小鼠的悬挂实验评分高于模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。电镜下模型组较实验组小鼠中脑黑质区多巴胺能神经元细胞的变性、坏死更明显;免疫组织化学染色结果显示,模型组小鼠黑质TH阳性神经元数目较空白对照组减少,实验组小鼠黑质TH阳性细胞数目较模型组增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Western blotting结果显示,模型组小鼠黑质TH、Nrf2、HO-1、GPX4的蛋白表达量低于空白对照组,实验组小鼠黑质TH、Nrf2、HO-1、GPX4的蛋白表达量高于模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);模型组小鼠黑质 α -syn表达量高于空白对照组,实验组小鼠黑质 α -syn表达量低于模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。ELISA结果显示,模型组小鼠黑质的谷胱甘肽、SOD表达量低于空白对照组,实验组小鼠黑质的谷胱甘肽、SOD表达量高于模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);模型组小鼠黑质的丙二醛、总铁离子表达量高于空白对照组,实验组的丙二醛、总铁离子表达量低于模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 毛蕊花糖苷可能是通过抑制PD模型小鼠中脑黑质区的多巴胺能神经元细胞的铁死亡起到神经保护作用。

【关键词】 帕金森病; 小鼠; 毛蕊花糖苷; 铁死亡

基金项目: 中央引导地方科技发展专项资助项目(ZYYD2022C17);自治区研究生科研创新项目(XJ2023G178);新疆神经系统疾病研究重点实验室(XJDX1711)

Research on the protective effect and mechanisms of verbascoside on Parkinson disease model mice prepared by MPTP

Zhang Mingyang, Yang Xinling
Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumuqi 830063, China
Corresponding author: Yang Xinling, Email: yangxinling2014@163.com

【Abstract】Objective To investigate the neuroprotective effect of verbascoside (VB) on the brain of Parkinson's disease (PD) model mice and its possible mechanism. **Methods** A total of 75 C57/BL mice (SPF grade, healthy male, 24–26 g) were randomly divided into blank control group, model group (MPTP group), and experimental group (low dose group: MPTP+30 mg/kg VB; medium dose group: MPTP+60 mg/kg VB; high dose group: MPTP+120 mg/kg VB), with 15 mice in each group. After the establishment of the model, the movement ability of mice in different groups was detected by rod climbing and hanging experiments; dopaminergic neurons were detected by ultramicroelectron microscopy; the number of tyrosine hydroxylase (TH) positive cells was detected by immunohistochemical staining; the expression of tyrosine hydroxylase (TH), α -synuclein (α -syn),

nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway related proteins was detected by Western blotting; glutathione, total iron ion, superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde in brain tissue was detected by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results The time of rod climbing experiment of mice in model group was significantly longer than that of blank control group, the time of rod climbing experiment of mice in experimental group was significantly shorter than that of model group, with statistical significance ($P < 0.05$); the score of hanging experiment of mice in model group was lower than that of blank control group, the score of hanging experiment of mice in experimental group was higher than that of model group, with statistical significance ($P < 0.05$). The degeneration and necrosis of dopaminergic neurons in substantia nigra of the midbrain of mice in the model group (MPTP group) were more obvious than those in the experimental group under electron microscope; immunohistochemical staining experiment showed that the number of TH positive cells in the model group was much lower than that in the blank control group, the number of TH positive cells in the experimental group was much higher than that in the model group, with statistical significance ($P < 0.05$). Western blotting experiment showed that the expression of TH, Nrf2, HO-1, and GPX4 in the model group was lower than that in the blank control group, the expression of TH, Nrf2, HO-1, and GPX4 in the experimental group was higher than that in the model group, with statistical significance ($P < 0.05$); the expression of α -syn in the model group was higher than that in the blank control group, the expression of α -syn in the experimental group was lower than that in the model group, with statistical significance ($P < 0.05$). The results of ELISA showed that the expression of glutathione and SOD in the model group was significantly lower than that in the blank control group, the expression of glutathione and SOD in the experimental group was significantly higher than that in the model group, with statistical significance ($P < 0.05$); the expression of malondialdehyde and total iron ions in the model group was significantly lower than that in the blank control group, the expression of malondialdehyde and total iron ions in the experimental group was significantly lower than that in the model group, with statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusions** Verminoside may play a protective role by inhibiting iron death of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Parkinson's disease model mice.

【Key words】 Parkinson's disease; Mice; Verbascoside; Ferroptosis

Fund programs: The Central Government Guiding Local Science and Technology Development Special Funding Project (ZYD2022C17); Research Innovation Project of Autonomous Region Graduate (XJ2023G178); Xinjiang Key Laboratory of Nervous System Diseases Research (XJDX1711)

目前, PD的发病机制尚不明确,为更好地研究PD的发病机制和临床治疗方法,制备PD实验模型成为研究PD的必备手段。在基础研究中,1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP)是制备PD模型小鼠的常用诱导剂之一^[1]。研究表明PD发生、发展与细胞铁死亡密切相关,铁死亡在PD发病机制中的线粒体功能障碍、氧化应激、 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)异常聚集过程中都扮演着重要角色^[2-3]。铁死亡是目前发现的一种铁依赖的氧化应激而导致的细胞死亡方式^[4]。铁死亡的生化标志性特征包括铁沉积、活性氧聚集、脂质过氧化^[5]。这种新型的细胞死亡方式在PD患者脑黑质的尸检病理报告和影像学检测中均已发现^[6-7],在PD模型大鼠与小鼠的黑质中也同样被发现^[8-9],表明PD发病与中脑黑质多巴胺能神经元细胞铁死亡相关。

毛蕊花糖苷是一种水溶性的苯乙醇苷类化合物,在地黄、肉苁蓉、车前子、桂花、裸花等植物中广泛存在^[10]。既往研究表明,毛蕊花糖苷具有抗炎、抗氧化、保护神经、抗肿瘤等多方面功效^[11-12]。在生理功能方面,毛蕊花糖苷对细胞铁死亡具有一定程度的拮抗作用,因此推测其能通过抑制中脑黑质

的多巴胺能神经元细胞的铁死亡,从而起到保护神经的作用。基于此,本研究制备PD模型小鼠,探讨毛蕊花糖苷对其的神经保护作用及可能机制。

一、材料与方法

1. 实验动物: 选择6~8周体重在24~26 g的75只C57/BL雄性小鼠(北京斯贝福生物技术有限公司提供)。实验期间饲养于新疆医科大学鲤鱼山校区SPF级实验动物房[SCXK(京)2019-0010],自由供给标准饲料和纯净水,保持12 h光照(9:00—21:00)和12 h黑暗(21:00—次日9:00)交替循环,室温20~23℃,湿度(55±10)%。动物适应环境5 d后开始实验。实验过程严格遵守3R原则。本研究已经新疆医科实验动物伦理委员会审核批准(伦理审批号: IACUC-20230217-46)。

2. 实验分组及处理: 将小鼠随机分为空白对照组、模型组(MPTP组)、实验组(参考Peng等^[13]给药剂量,低剂量组给予MPTP+30 mg/kg毛蕊花糖苷,中剂量组给予MPTP+60 mg/kg毛蕊花糖苷,高剂量组给予MPTP+120 mg/kg毛蕊花糖苷),每组各15只(实验组中不同剂量组各15只)。按体重30 mg/kg给予模型组及实验组小鼠腹腔注射0.25 ml的3 mg/ml MPTP(连续5 d)建立PD模型;空白对照组给予等

量的生理盐水腹腔注射。PD造模前7 d开始分别按体重给予30 mg/kg低剂量组、60 mg/kg中剂量组、120 mg/kg高剂量组各0.2 ml的3.75、7.50、15.00 mg/ml毛蕊花糖苷连续灌胃处理15 d;空白对照组和模型组给予等量的生理盐水灌胃处理。

3. 小鼠运动功能评价:参考Zhou等^[14]的方法在给药完成后对小鼠进行行为学检测。(1)爬杆实验:选取长约50 cm、直径1~2 cm的木杆,木杆上端固定有一膨大,木杆下端固定在长宽约25 cm、厚约1 cm的正方形木板上;给每只小鼠做标记,将小鼠尾上头下倒立放置于木杆顶端,待小鼠抓稳木杆后开始计时,记录小鼠从木杆顶端爬到木杆底端的时间。每只小鼠测3次,间隔10 min,取平均值。(2)悬挂实验:将直径为5 mm的金属丝水平固定放置于距离地面约40 cm高度的位置,金属丝两端用支架固定;给每只老小鼠做标记,让小鼠以头上尾下的方式双前爪抓住铁丝,观察10 s进行评分。评分标准:小鼠四肢均能抓住铁丝计3分;双前肢可以悬挂,但后肢不可以抓住铁丝计2分;四肢均无法抓住铁丝计1分。每只小鼠测3次,间隔10 min,取平均值。

4. 组织标本获取:造模及行为学检测结束后(对实验动物的处理方法按照动物伦理审查标准执行),给予小鼠腹腔注射1%的戊巴比妥钠0.2 ml麻醉后获得组织标本。在冰上取小鼠中脑黑质组织样本,采用透射电镜、Western blotting、免疫组化、试剂盒检测标本。

5. 组织细胞透射电镜实验:小鼠行为学检测后每组小鼠取3只,麻醉后取小鼠中脑附近黑质,放置于提前准备好的电镜固定。pH值7.4的磷酸盐缓冲液漂洗3次,经室温脱水、包埋、聚合、超薄切片、染色等,在透射电镜下观察组织细胞的亚细胞结构变化^[15],采集图像分析。

6. 免疫组织化学法检测各组小鼠黑质酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)^[16]:小鼠行为学检测后每组小鼠取4只,麻醉后取小鼠中脑附近黑质组织,置于4%多聚甲醇固定,经组织脱水后进行石蜡包埋、切片(切片位置选取小鼠中脑黑质部位)、烤片、脱蜡、抗原修复、封闭;TH一抗稀释液4℃孵育过夜,次日孵育二抗(增强酶标山羊抗兔IgG聚合物)、DAB显色,苏木素复染,脱水封片。置于显微镜下观察TH阳性神经元(呈棕黄色),TH阳性神经元代表存活的多巴胺能神经元,采用Image J软件计数TH阳性细胞的数量。

7. Western blotting检测各组小鼠黑质TH、 α -syn、核因子红细胞-2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、血红素加氧酶-1(heme

oxygenase 1, HO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)蛋白相对表达量^[17]:小鼠行为学检测后每组小鼠取5只,麻醉后取小鼠中脑附近黑质组织,加入RIPA裂解配置液(1%蛋白酶抑制剂PMSF)提取组织蛋白,按BCA说明书进行蛋白浓度定量,100℃沸水中煮沸蛋白变性10 min,分装-80℃保存备用;经SDS-PAGE凝胶电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育后曝光显色;Image J软件采集聚偏二氟乙烯条带上的灰度值,检测脑组织相关蛋白表达量。

8. ELISA检测各组小鼠脑组织谷胱甘肽、总铁离子、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛:小鼠行为学检测后每组小鼠取3只检测谷胱甘肽、总铁离子、SOD、丙二醛的表达水平。(1)采用比色法检测谷胱甘肽^[18]:准确称取小鼠黑质脑组织重量,按组织:体积为1:9的比例加入生理盐水制备组织匀浆液,2 500 r/min离心取上清液;将96孔板划分空白孔、标准孔、测定孔,依次按要求上样,检测小鼠中脑黑质谷胱甘肽表达水平。实验重复进行3次。(2)采用菲罗嗉法检测细胞内活性总铁离子含量^[19]:取小鼠中脑黑质脑组织,加入适当比例的RIAP裂解液在冰上匀浆裂解,离心后提取上清液,按照一定比例稀释上清液;将上清液加入96孔板,并在每个孔里加等体积的盐酸,室温放置30 min,孔中添加铁探针后,室温避光放置1 h,在酶标仪上读取593 nm处吸光度,检测各组铁离子含量。实验重复进行3次。(3)采用WST-8法检测组织细胞总SOD活性^[20]:取小鼠中脑黑质脑组织,加入适当比例的RIAP裂解液在冰上匀浆裂解,4℃离心后提取上清液,使用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,采用试剂盒提供的SOD检测缓冲液适当稀释样品。在96孔板中设置样品孔和各种空白对照孔,依次上样后37℃孵育30 min,测定450 nm处吸光度,检测SOD活力。实验重复进行3次。(4)采用硫代巴比妥酸法检测丙二醛^[21]:取小鼠中脑黑质脑组织,加入适当比例的RIAP裂解液在冰上匀浆裂解,取适量裂解组织加入1.5 ml的EP管中在旋涡混匀器混匀,95℃以上水浴40 min,取出后流水冷却,4 000 r/min离心10 min,在酶标板板进行扫描,吸取0.25 ml各管反应液加入新的96孔板中,采用酶标仪测定各孔530 nm处的吸光度(计算时要减去空板读数),检测丙二醛表达量。实验重复进行3次。

9. 统计学方法:采用SPSS 23.0统计学软件进行数据分析,采用Graphpad prism 7.0软件制作图表。采用Shapiro-Wilktest法对计量资料进行正态性检

验,所有计量资料符合正态分布,用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*法检验。双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 各组小鼠行为学检测结果比较: 小鼠行为学检测结果显示,模型组小鼠爬杆时间长于空白对照组,悬挂实验评分低于空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 实验组中 30 mg/kg、60 mg/kg、120 mg/kg 组小鼠的爬杆实验完成时间均短于模型组,悬挂实验评分高于模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠行为学实验结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	爬杆时间(s)	悬挂实验评分(分)
空白对照组	15	11.67 ± 1.53	2.83 ± 0.41
模型组	15	22.33 ± 1.51 ^a	1.50 ± 0.55 ^a
实验组			
30 mg/kg 组	15	20.33 ± 1.52 ^b	1.67 ± 0.52 ^b
60 mg/kg 组	15	16.67 ± 1.15 ^b	2.17 ± 0.42 ^b
120 mg/kg 组	15	13.67 ± 0.58 ^b	2.67 ± 0.52 ^b
<i>F</i> 值		34.272	8.931
<i>P</i> 值		< 0.001	< 0.001

注: ^a与空白对照组比较, $P < 0.001$; ^b与模型组比较, $P < 0.001$

2. 各组小鼠透射电镜组织超微结构变化: 在透射电镜下观察组织细胞的亚细胞结构变化,结果显示与空白对照组细胞相比,模型组细胞趋于凋亡,细胞膜边界更模糊;细胞核固缩、异染色质凝集,核膜模糊;线粒体肿胀更明显。与模型组细胞相比,实验组细胞形态更规则,细胞膜边界更清晰;细胞

核固缩相对不明显,染色质均匀,核膜相对清晰;线粒体随着毛蕊花糖苷药物剂量升高,结构完整性更高;粗面内质网局部扩张相对不明显。见图 1。

3. 各组小鼠黑质TH阳性细胞数量比较: 采用免疫组织化学染色检测各组小鼠黑质TH阳性细胞数量,结果显示模型组小鼠黑质TH阳性神经元数目较空白对照组减少,实验组中 30 mg/kg、60 mg/kg、120 mg/kg 组小鼠TH阳性神经元数目较模型组增加,并伴随毛蕊花糖苷类药物剂量增加,中脑黑质TH阳性细胞增多,其中毛蕊花糖苷药物 120 mg/kg 的用量效果更为显著,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 2、表 2。

4. 各组小鼠黑质TH、 α -syn 的蛋白表达: 采用Western blotting检测各组小鼠黑质中TH、 α -syn 蛋白的相对表达量,结果显示实验组中 30 mg/kg、60 mg/kg、120 mg/kg 组小鼠的TH表达量高于模型组;实验组中 30 mg/kg、60 mg/kg、120 mg/kg 组小鼠的 α -syn表达量低于模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 3、表 3。

5. 各组小鼠黑质Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白的表达: 采用Western blotting检测各组小鼠黑质中Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白的相对表达量,结果显示模型组Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达量较空白对照组减少,实验组中 30 mg/kg、60 mg/kg、120 mg/kg 组小鼠Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达量较模型组增加,其中 120 mg/kg 组效果更明显,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 4、表 4。

6. 各组小鼠黑质谷胱甘肽、丙二醛、SOD、总铁离子表达水平比较: 采用ELISA检测各组小鼠黑质谷胱甘肽、丙二醛、SOD、总铁离子的表达,结果显

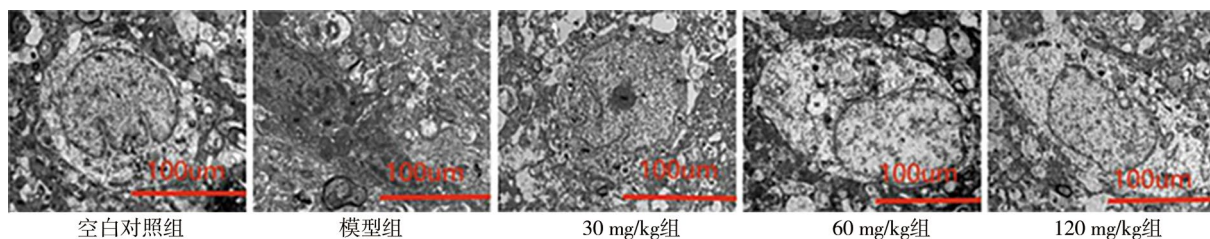


图 1 透射电镜检测各组小鼠黑质多巴胺能神经元细胞形态变化

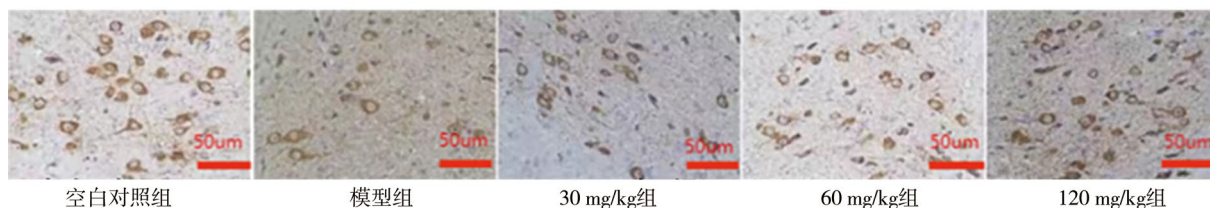
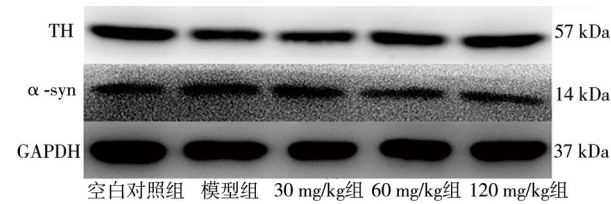


图 2 免疫组织化学法检测各组小鼠黑质酪氨酸羟化酶阳性神经元数量

表2 各组小鼠黑质TH阳性细胞表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TH阳性细胞数目
空白对照组	4	200 959 ± 746
模型组	4	80 854 ± 226 ^a
实验组		
30 mg/kg组	4	106 534 ± 3 859 ^b
60 mg/kg组	4	144 158 ± 3 019 ^b
120 mg/kg组	4	188 871 ± 2 247 ^b
F值		2 314.247
P值		<0.001

注: TH 酪氨酸羟化酶; ^a与空白对照组比较, $P < 0.001$; ^b与模型组比较, $P < 0.001$



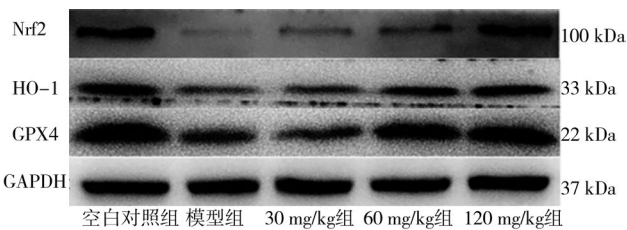
注: TH 酪氨酸羟化酶; α -syn α -突触核蛋白; GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图3 蛋白质印迹法检测各组小鼠黑质TH、 α -syn的蛋白表达

表3 各组小鼠黑质TH、 α -syn蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TH	α -syn
空白对照组	5	1.02 ± 0.05	0.41 ± 0.05
模型组	5	0.78 ± 0.06 ^a	0.91 ± 0.07 ^a
实验组			
30 mg/kg组	5	0.84 ± 0.04 ^b	0.83 ± 0.07 ^b
60 mg/kg组	5	0.94 ± 0.05 ^b	0.71 ± 0.06 ^b
120 mg/kg组	5	0.97 ± 0.04 ^b	0.61 ± 0.06 ^b
F值		29.237	30.374
P值		<0.001	<0.001

注: TH 酪氨酸羟化酶; α -syn α -突触核蛋白; ^a与空白对照组比较, $P < 0.001$; ^b与模型组比较, $P < 0.001$



注: Nrf2 核因子红细胞-2相关因子2; HO-1 血红素加氧酶-1; GPX4 谷胱甘肽过氧化物酶4; GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; Nrf2/HO-1/GPX4 通路为经典铁死亡通路

图4 蛋白质印迹法检测各组小鼠黑质Nrf2、HO-1、GPX4蛋白的表达

示与空白对照组相比,模型组小鼠黑质谷胱甘肽、SOD的表达量减少,丙二醛和总铁离子表达量增加;与模型组比较,实验组中的30 mg/kg、60 mg/kg、

表4 各组小鼠黑质Nrf2、HO-1、GPX4蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Nrf2	HO-1	GPX4
空白对照组	5	0.98 ± 0.09	0.93 ± 0.05	1.07 ± 0.06
模型组	5	0.17 ± 0.04 ^a	0.53 ± 0.05 ^a	0.53 ± 0.05 ^a
实验组				
30 mg/kg组	5	0.46 ± 0.06 ^b	0.65 ± 0.04 ^b	0.64 ± 0.05 ^b
60 mg/kg组	5	0.56 ± 0.06 ^b	0.73 ± 0.05 ^b	0.83 ± 0.07 ^b
120 mg/kg组	5	0.76 ± 0.050	0.86 ± 0.06 ^b	0.92 ± 0.06 ^b
F值		43.352	31.275	44.174
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注: Nrf2 核因子红细胞-2相关因子2; HO-1 血红素加氧酶-1; GPX4 谷胱甘肽过氧化物酶4; ^a与空白对照组比较, $P < 0.001$; ^b与模型组比较, $P < 0.001$

120 mg/kg组的谷胱甘肽、SOD的表达量增加,丙二醛和总铁离子表达量减少,特别是120 mg/kg高剂量组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表5。

讨论 PD是以中老年人为主的中枢神经系统退行性疾病^[22]。随着我国逐渐迈入老龄化社会,PD的患病率不断升高。PD患者主要表现为行动不便、运动迟缓、肢体僵硬、震颤、便秘、记忆减退等症状,给患者家庭和社会带来沉重负担,因此PD的防治工作越来越多地引起社会及医学界的关注。PD的发病机制尚未完全阐明,目前治疗方法主要是延缓和改善PD患者临床症状进展,尚缺乏有效的治愈方法,因此制备PD实验模型对于研究PD发病机制和治疗方法不可或缺。PD动物模型使用广泛,尤其是以神经毒素诱导的C57/BL的PD小鼠模型,其具有操作简单、周期短、可重复性强、成本相对较低廉、实验结果相对稳定等优点。

细胞铁死亡是Dixon等^[23]在2012年提出的一种新型的细胞死亡方式。铁死亡依赖细胞内铁元素累积,被铁还原酶氧化导致细胞内活性氧聚集,最终因细胞脂质氧化导致细胞死亡^[24]。铁死亡的标志性特征包括活性氧聚集、脂质过氧化和铁沉积^[25]。这种新型的细胞死亡方式在PD患者中脑黑质的尸检病理报告和影像学检测中均已发现^[6-7],在PD模型大鼠与小鼠的黑质中也同样被发现^[8-9]。目前发现铁死亡在PD发病机制中的线粒体功能障碍、氧化应激、 α -syn异常聚集过程中都扮演着重要角色^[1-2]。铁死亡细胞表现形式主要为铁离子沉积、氧化剂升高、抗氧化剂减少引起脂质过氧化最终导致细胞死亡。本研究结果显示,模型组较空白对照组的谷胱甘肽、SOD表达量减少,丙二醛和总铁离子表达量增加;与模型组比较,实验组(毛蕊花糖苷30、60、120 mg/kg组)较模型组谷胱甘肽、SOD表达量增加,

表5 各组小鼠黑质谷胱甘肽、SOD、丙二醛、总铁离子表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	谷胱甘肽	总铁离子	SOD	丙二醛
空白对照组	3	1054.67 ± 25.57	113.33 ± 6.03	135.63 ± 9.61	2.43 ± 0.29
模型组	3	665.33 ± 29.56 ^a	157.03 ± 4.11 ^a	73.13 ± 4.58 ^a	6.33 ± 0.37 ^a
实验组					
30 mg/kg组	3	757.01 ± 23.89 ^b	146.67 ± 4.51 ^b	83.33 ± 6.23 ^b	5.42 ± 0.41 ^b
60 mg/kg组	3	859.67 ± 28.59 ^b	135.65 ± 4.23 ^b	103.43 ± 9.07 ^b	4.41 ± 0.30 ^b
120 mg/kg组	3	957.00 ± 25.53 ^b	127.01 ± 3.82 ^b	116.34 ± 7.02 ^b	3.26 ± 0.25 ^b
F值		100.663	37.562	32.041	58.687
P值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注：^a与空白对照组比较， $P < 0.001$ ；^b与模型组比较， $P < 0.001$ ；SOD 超氧化物歧化酶

丙二醛和总铁离子表达量减少，特别是120 mg/kg组，提示毛蕊花糖苷可提高多巴胺能神经元细胞的谷胱甘肽、SOD等还原剂含量，同时降低细胞内的铁离子沉积和丙二醛等氧化剂含量。毛蕊花糖苷通过灌胃的方式进入C57/BL小鼠体内可以拮抗小鼠的黑质区多巴胺能神经元细胞铁死亡的作用。

毛蕊花糖苷于1963年由意大利科学家从毛蕊花属植物中分离提纯后首次获得，并以Verbascoside命名。目前已发现毛蕊花糖苷具有消炎、抗氧化、抗肿瘤及保护神经等功效^[10-11]。但毛蕊花糖苷在改善PD症状方面的相关报道较少，机制仍未阐明。本研究结果显示，PD模型组小鼠较空白对照组小鼠运动能力下降，中脑黑质区TH阳性细胞减少；应用毛蕊花糖苷药物可提高模型小鼠的运动能力，使其中脑黑质区TH阳性细胞增多，并伴随毛蕊花苷类药物剂量增加，中脑黑质TH阳性细胞增多，其中毛蕊花糖苷药物120 mg/kg的用量效果更为显著，提示毛蕊花糖苷可以缓解PD模型小鼠多巴胺神经元的损伤，与Yan等^[26]的研究结果基本一致。在中脑黑质透射电镜实验中发现，空白对照组小鼠中脑黑质多巴胺能神经元细胞形态优于模型组小鼠的细胞形态，表明造模成功；实验组小鼠中脑黑质多巴胺能神经元细胞形态优于模型组，提示在超微结构下毛蕊花糖苷对多巴胺能神经元细胞具有保护作用。

GPX4又称PHGPX，是GPX家族中含硒元素的第4位成员。由于其特殊的氨基酸顺序和独特的空间结构，可以清除膜脂质过氧化氢产物。其可以将具有细胞毒性的脂质过氧化物还原为无毒性的脂质醇，最大限度地减少细胞氧化应激的发生。当GPX4不活跃时，会造成有害脂质在细胞内的过度堆积，从而造成细胞死亡。因此，GPX4是铁死亡的主要抑制剂，也是细胞铁死亡的标志蛋白^[27-28]。本研究结果显示，实验组小鼠中脑黑质区GPX4蛋白的表达较模型组增高，尤其是120 mg/kg组效果更

明显。Nrf2/HO-1/GPX4通路与细胞铁死亡、抗氧化作用密切相关，GPX4和HO-1受Nrf2调控，因此转录因子Nrf2是细胞铁死亡、抗氧化系统的主要调控因子。Nrf2/HO-1/GPX4通路在介导谷胱甘肽合成、脂质代谢、铁等金属离子代谢方面均发挥重要作用^[29-30]。本研究结果显示，模型组小鼠黑质中Nrf2、HO-1、GPX4的蛋白表达量较空白对照组减少；实验组中30、60、120 mg/kg组小鼠黑质中Nrf2、HO-1、GPX4的蛋白表达量较模型组升高。

本研究存在一定的局限性：将毛蕊花糖苷剂量提高到120 mg/kg灌胃处理小鼠后未见明显中毒迹象，因此毛蕊花糖苷在MPTP制备的C57/BL雄性小鼠的PD模型中的最佳给药浓度仍需进一步探索，尚不足以作为药物的临床实验提供药物剂量的参考依据。

综上所述，本研究结果表明，毛蕊花糖苷可以提高MPTP诱导的C57/BL雄性小鼠PD模型的运动能力，保护小鼠中脑黑质多巴胺能神经元，提高小鼠中脑黑质区的TH表达，同时降低 α -syn的表达，进而提高Nrf2/HO-1/GPX4通路蛋白的表达。本研究研究结果证实了毛蕊花糖苷对PD模型小鼠中脑黑质多巴胺能神经元的铁死亡具有抑制作用，其可能通过作用于Nrf2/HO-1/GPX4通路实现。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 构思与设计、研究准备、数据分析、数据解释、论文撰写、论文修订、数据搜集、数据整理、图表绘制为张明洋，杨新玲 审校

参 考 文 献

[1] Sun MF, Zhu YL, Zhou ZL, et al. Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson's disease mice: gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF- α signaling pathway[J]. Brain Behav Immun, 2018, 70: 48-60. DOI: 10.1016/j.bbi.2018.02.005.

[2] Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders[J]. Neurol Res, 2017, 39(1): 73-82. DOI: 10.1080/01616412.2016.1251711.

- [3] Angelova PR, Choi ML, Berezhnov AV, et al. Alpha synuclein aggregation drives ferroptosis: an interplay of iron, calcium and lipid peroxidation[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(10): 2781-2796. DOI: 10.1038/s41418-020-0542-z.
- [4] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- [5] Sun Y, Pham AN, Waite TD. Elucidation of the interplay between Fe(II), Fe(III), and dopamine with relevance to iron solubilization and reactive oxygen species generation by catecholamines[J]. *J Neurochem*, 2016, 137(6): 955-968. DOI: 10.1111/jnc.13615.
- [6] Bartzokis G, Cummings JL, Markham CH, et al. MRI evaluation of brain iron in earlier- and later-onset Parkinson's disease and normal subjects[J]. *Magn Reson Imaging*, 1999, 17(2): 213-222. DOI: 10.1016/s0730-725x(98)00155-6.
- [7] Pagonabarraga J, Martinez-Hora S, Fernandez de Bobadilla R, et al. Minor hallucinations occur in drug-naïve Parkinson's disease patients even from the premotor phase[J]. *Mov Disord*, 2016, 31(1): 45-52. DOI: 10.1002/mds.26432.
- [8] He Y, Thong PS, Lee T, et al. Increased iron in the substantia nigra of 6-OHDA induced parkinsonian rats: a nuclear microscopy study[J]. *Brain Res*, 1996, 735(1): 149-153. DOI: 10.1016/0006-8993(96)00313-7.
- [9] Mandel S, Maor G, Youdim MB. Iron and alpha-synuclein in the substantia nigra of MPTP-treated mice: effect of neuroprotective drugs R-apomorphine and green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate[J]. *J Mol Neurosci*, 2004, 24(3): 401-416. DOI: 10.1385/JMN: 24: 3: 401.
- [10] 王丰青, 杨超飞, 李铭铭, 等. 密度对地黄生长及基因转录特性的影响分析[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(17): 4367-4379. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20210623.101.
Wang FQ, Yang CF, Li MM, et al. Effects of density on growth and gene transcription characteristics of rehmannia glutinosa[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2021, 46(17): 4367-4379.
- [11] Fu Z, Fan X, Wang X, et al. Cistanches herba: an overview of its chemistry, pharmacology, and pharmacokinetics property[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 219: 233-247. DOI: 10.1016/j.jep.2017.10.015.
- [12] Nigro O, Tuzi A, Tartaro T, et al. Biological effects of verbascoside and its anti-inflammatory activity on oral mucositis: a review of the literature[J]. *Anticancer Drugs*, 2020, 31(1): 1-5. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000818.
- [13] Peng XM, Gao L, Huo SX, et al. The mechanism of memory enhancement of acteoside (verbascoside) in the senescent mouse model induced by a combination of D-gal and AlCl₃ [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(8): 1137-1144. DOI: 10.1002/ptr.5358.
- [14] Zhou ZL, Jia XB, Sun MF, 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. DOI: 10.1007/s13311-019-00719-2.
- [15] Cantarero I, Luesma MJ, Alvarez-Dotu JM, et al. Transmission electron microscopy as key technique for the characterization of telocytes[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2016, 11(5): 410-414. DOI: 10.2174/1574888x10666150306155435.
- [16] Farrand AQ, Verner RS, McGuire RM, et al. Differential effects of vagus nerve stimulation paradigms guide clinical development for Parkinson's disease[J]. *Brain Stimul*, 2020, 13(5): 1323-1332. DOI: 10.1016/j.brs.2020.06.078.
- [17] Shen Y, Cui X, Hu Y, et al. LncRNA-MIAT regulates the growth of SHSY5Y cells by regulating the miR-34-5p-SYT1 axis and exerts a neuroprotective effect in a mouse model of Parkinson's disease[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(9): 9993-10013.
- [18] Shi Y, Shi X, Zhao M, et al. Ferroptosis is involved in focal segmental glomerulosclerosis in rats[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 22250. DOI: 10.1038/s41598-023-49697-8.
- [19] Lutz AM, Weishaupt D, Persohn E, et al. Imaging of macrophages in soft-tissue infection in rats: relationship between ultrasmall superparamagnetic iron oxide dose and MR signal characteristics[J]. *Radiology*, 2005, 234(3): 765-775. DOI: 10.1148/radiol.2343031172.
- [20] Fang J, Zhao X, Li S, et al. Protective mechanism of artemisinin on rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells against apoptosis induced by hydrogen peroxide via activation of c-Raf-Erk1/2-p90(rsk)-CREB pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 312. DOI: 10.1186/s13287-019-1419-2.
- [21] Reitznerová A, Šuleková M, Nagy J, et al. Lipid peroxidation process in meat and meat products: a comparison study of malondialdehyde determination between modified 2-thiobarbituric acid spectrophotometric method and reverse-phase high-performance liquid chromatography[J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 1988. DOI: 10.3390/molecules22111988.
- [22] Frisardi V, Santamato A, Cheeran B. Parkinson's disease: new insights into pathophysiology and rehabilitative approaches[J]. *Parkinsons Dis*, 2016, 2016: 3121727. DOI: 10.1155/2016/3121727.
- [23] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- [24] He Y, Thong PS, Lee T, et al. Increased iron in the substantia nigra of 6-OHDA induced parkinsonian rats: a nuclear microscopy study[J]. *Brain Res*, 1996, 735(1): 149-153. DOI: 10.1016/0006-8993(96)00313-7.
- [25] Sun Y, Pham AN, Waite TD. Elucidation of the interplay between Fe(II), Fe(III), and dopamine with relevance to iron solubilization and reactive oxygen species generation by catecholamines[J]. *J Neurochem*, 2016, 137(6): 955-968. DOI: 10.1111/jnc.13615.
- [26] Yan A, Liu Z, Song L, et al. Idebenone alleviates neuroinflammation and modulates microglial polarization in LPS-stimulated BV2 cells and MPTP-induced Parkinson's disease mice[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 529. DOI: 10.3389/fncel.2018.00529.
- [27] Hartmann A, Hunot S, Michel PP, et al. Caspase-3: a vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(6): 2875-2880. DOI: 10.1073/pnas.040556597.
- [28] Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 460-473. DOI: 10.1089/ars.2013.5371.
- [29] Dodson M, de la Vega MR, Cholanians AB, et al. Modulating NRF2 in disease: timing is everything[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2019, 59: 555-575. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021856.
- [30] Anandhan A, Dodson M, Schmidlin CJ, et al. Breakdown of an ironclad defense system: the critical role of NRF2 in mediating ferroptosis[J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27(4): 436-447. DOI: 10.1016/j.chembiol.2020.03.011.

(收稿日期: 2024-01-16)

(本文编辑: 郑圣洁)