DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.11.023

基于糖代谢的帕金森病肾精虚证生物学机制及地黄饮子的干预作用研究

赵雅飞,韩诚,赵玉婷,李少创,青千裕,赵琼
(山西中医药大学,山西 太原 030619)

摘要:目的 从糖代谢层面探讨帕金森病(Parkinson's disease,PD)肾精虚证的生物学机制和地黄饮子干预帕金森病肾精虚证的作用机制。方法 采用SPF级雄性12周龄的SAM-P8小鼠55只,分为模型组、阳性药组、地黄饮子低剂量组、地黄饮子中剂量组、地黄饮子高剂量组每组11只和SAM-R1小鼠11只作为正常组,SAM-P8小鼠腹腔注射1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,MPTP)(30 mg/kg,1次/d)7 d建立PD模型,地黄饮子干预4周。观察小鼠一般状态指标,测定小鼠空腹血糖值、行为学指标。采用HE染色观察小鼠肾脏及睾丸组织结构变化,采用蛋白免疫印迹法(Western blot,WB)、免疫组化法、聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction,PCR)检测小鼠脑组织中黑质、纹状体葡萄糖转运蛋白1(Glucose transporter 1,GLUT 1)、葡萄糖转运蛋白3(Glucose transporter 3,GLUT 3)、葡萄糖转运蛋白4(Glucose transporter 4,GLUT 4)、糖原合成激酶3β(Glycogen synthase kinase-3β,GSK-3β)蛋白含量。结果 在旷场实验中,与正常组相比,模型组小鼠运动总路程减少($P<0.05$),潜伏期增加($P<0.05$);与模型组相比,地黄饮子低、高剂量组小鼠潜伏期降低($P<0.05$);地黄饮子中剂量组小鼠总路程增加($P<0.05$)。在爬杆实验中,与正常组比较,模型组爬杆时间增加($P<0.05$);与模型组相比,地黄饮子低、高剂量组时间降低($P<0.05$);与给药前相比,地黄饮子低、中、高剂量组时间降低($P<0.05$)。在步态实验中,与正常组相比,模型组小鼠右前接触面积、左前推进时间、右后推进指数、左后支撑时相、右前支撑时相差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,地黄饮子低剂量组小鼠右后推进指数差异有统计学意义($P<0.01$),地黄饮子中剂量组小鼠右前肢接触面积、右后推进指数、左后支撑时相、右前支撑时相差异有统计学意义($P<0.01$),地黄饮子高剂量组小鼠右前肢接触面积、左后支撑时相、右前支撑时相差异有统计学意义($P<0.01$)。HE肾脏染色检测结果:与正常组相比,模型组出现肾小球囊上皮细胞增生、脂滴增加、肾小管扩张、细胞碎片增加、红细胞增加、淋巴细胞增加、成纤维细胞增加、纤维细胞增加等病理改变。与模型组相比,地黄饮子高剂量组出现脂滴降低、红细胞降低、纤维细胞降低。HE睾丸染色结果显示:与正常组相比,模型组见生精上皮空泡化、精子数量减少等病变现象。与模型组相比,地黄饮子高剂量组出现生精上皮空泡化减轻。Westernblot检测结果:与正常组相比,模型组小鼠黑质GLUT1蛋白表达显著降低($P<0.01$),GLUT3和GLUT4蛋白表达降低($P<0.05$)。与模型组相比,地黄饮子高剂量组GLUT1蛋白表达显著增加($P<0.01$),GLUT4蛋白表达增加($P<0.05$),GSK-3β蛋白表达降低($P<0.05$)。与正常组相比,模型组小鼠纹状体GLUT1和GLUT3蛋白表达显著降低($P<0.01$),GLUT4蛋白表达降低($P<0.05$),GSK-3β蛋白表达升高($P<0.05$)。与模型组相比,地黄饮子高剂量组GLUT1蛋白表达增高($P<0.05$),GLUT3蛋白表达显著增高($P<0.01$),GLUT4蛋白表达升高($P<0.05$),GSK-3β蛋白表达降低($P<0.05$)。实时荧光定量PCR检测结果:与正常组相比,模型组小鼠黑质GLUT1、GLUT3、GLUT4 mRNA表达显著降低($P<0.01$),GSK-3β表达升高($P<0.05$)。与模型组相比,地黄饮子高剂量组GLUT1、GLUT3、GLUT4表达增高($P<0.05$),GSK-3β表达降低($P<0.05$)。与正常组相比,模型组小鼠纹状体GLUT1和GLUT3 mRNA表达显著降低($P<0.01$),GLUT4表达降低($P<0.05$),GSK-3β表达升高($P<0.05$)。与模型组相比,地黄饮子高剂量组GLUT1、GLUT3、GLUT4表达增高($P<0.05$),GSK-3β表达降低($P<0.05$)。免疫组化检测结果:与正常组相比,模型组小鼠黑质GLUT1、GLUT4的表达降低($P<0.05$),GSK-3β表达升高($P<0.05$)。与模型组相比,地黄饮子高剂量组GLUT1表达显著升高($P<0.01$)。与正常组相比,模型组小鼠纹状体GLUT1表达显著降低($P<0.01$),GLUT4表达降低($P<0.05$)。与模型组相比,地黄饮子高剂量组GLUT1、GLUT3表达显著增高($P<0.01$),GLUT4表达升高($P<0.05$),GSK-3β表达降低($P<0.05$)。结论 ①地黄饮子能够提高PD肾精虚证小鼠运动速度、改善抓握能力、增强四肢协调性、增强对新环境的探索能力。②地黄饮子能够降低PD肾精虚证小鼠空腹血糖,通过纠正糖代谢,改善机体能量代谢。③地黄饮子能够提高PD肾精虚证小鼠脑黑质GLUT1、GLUT4蛋白的表达,降低脑黑质GSK-3β蛋白的表达,提高脑纹状体GLUT1、GLUT3、GLUT4的表达,降低脑纹状体GSK-3β蛋白的表达,地黄饮子中、高剂量组效果高于地黄饮子低剂量组。④帕金森病肾精虚证存在GLUT1、GLUT3、GLUT4、GSK-3β蛋白的摄入异常,地黄饮子可以通过调节帕金森病小鼠黑质、纹状体中GLUT1、GLUT3、GLUT4、GSK-3β蛋白的表达,治疗帕金森病肾精虚证。

关键词:帕金森病;肾精虚证;糖代谢;地黄饮子;葡萄糖转运蛋白
中图分类号:R277.742.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2025)11-0107-20

基金项目:国家自然科学基金项目(8187152326)
作者简介:赵雅飞(1994-),女,河南平顶山人,硕士,研究方向:藏象理论。
通讯作者:赵琼(1979-),女,山西晋中人,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:藏象理论。E-mail:413568433@qq.com。

Research on Biological Mechanism of PD of Kidney Essence Deficiency Syndrome Based on Glucose Metabolism and Intervention Effect of Dihuang Yinzi(地黄饮子)

ZHAO Yafei, HAN Cheng, ZHAO Yuting, LI Shaochuang, QING Qianyu, ZHAO Qiong
(Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619, Shanxi, China)

Abstract: *Objective* To explore the biological mechanism of Parkinson's disease(PD) of kidney essence deficiency syndrome from the perspective of glucose metabolism and the mechanism of intervention of Dihuang Yinzi(地黄饮子) in PD of kidney essence deficiency syndrome. *Methods* Fifty-five SPF grade male 12-week-old SAM-P8 mice were divided into model group, positive drug group, Dihuang Yinzi low, middle and high dose groups, with 11 mice in each group, and 11 SAM-R1 mice were as the normal group. The PD model was established by intraperitoneal injection of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)(30 mg/kg, once a day) into SAM-P8 mice for 7 days, and the intervention lasted for 4 weeks. The general status indicators of mice was observed, and the fasting blood glucose levels and behavioral indicators in mice were measured. HE staining was used to observe the structural changes of mouse kidney and testis. Western blot(WB), immunohistochemistry and polymerase chain reaction(PCR) were used to detect the protein contents of glucose transporter 1(GLUT1), glucose transporter 3(GLUT3), glucose transporter 4(GLUT4), and glycogen synthase kinase 3β(GSK-3β) in the substantia nigra and striatum of mouse brain tissue. *Results* In the open field experiment, compared with the normal group, the model group showed a decrease in total exercise distance($P<0.05$) and an increase in latency($P<0.05$). Compared with that of the model group, the latency of mice in the Dihuang Yinzi low and high dose groups decreased($P<0.05$). The total distance of mice in the Dihuang Yinzi middle dose group increased($P<0.05$). In the pole climbing experiment, compared with the normal group, the model group showed an increase in pole climbing time($P<0.05$). Compared with the model group, the Dihuang Yinzi low and high groups showed a decrease in time($P<0.05$). Compared with those before administration, the Dihuang Yinzi low, middle and high dose groups showed a decrease in time($P<0.05$). In the gait experiment, compared with the normal group, the model group showed significant differences in right anterior contact area, left anterior propulsion time, right posterior propulsion index, left posterior support phase and right anterior support phase($P<0.01$). Compared with that in the model group, there was a significant difference in the right posterior propulsion index($P<0.01$) in the Dihuang Yinzi low dose group. There were significant differences in the contact area of the right forelimb, right posterior propulsion index, left posterior support phase, and right anterior support phase in the Dihuang Yinzi middle dose group($P<0.01$). There were significant differences in the contact area of the right forelimb, left posterior support phase and right anterior support phase in the Dihuang Yinzi high dose group($P<0.01$). HE renal staining test results showed compared with the blank group, the model group showed pathological changes such as glomerular epithelial cell proliferation, increased lipid droplets, renal tubular dilation, increased cell debris, increased red blood cells, increased lymphocytes, increased fibroblasts and increased fibroblasts. Compared with the model group, the Dihuang Yinzi high dose group showed a decrease in lipid droplets, red blood cells and fibroblasts. The HE testicular staining results showed that compared with the blank group, the model group showed pathological changes such as vacuolization of the spermatogenic epithelium and decreased sperm count. Compared with the model group, the Dihuang Yinzi high dose group showed reduced vacuolization of the spermatogenic epithelium. WB detection results showed compared with the normal group, the model group showed a significant decrease in GLUT1 protein expression in the substantia nigra($P<0.01$), and a decrease in protein expressions of GLUT3 and GLUT4($P<0.05$). Compared with the model group, the Dihuang Yinzi high dose group showed a significant increase in protein expressions of GLUT1 and GLUT4 protein expression($P<0.01$, $P<0.05$) and GSK-3β protein expression decreased($P<0.05$). Compared with the normal group, the protein expressions of GLUT1 and GLUT3 in the striatum of the model group decreased significantly($P<0.01$), and the expression of GLUT4 protein decreased($P<0.05$). The protein expression of GSK-3β increased($P<0.05$). Compared with the model group, the Dihuang Yinzi high dose group showed an increase in protein expression of GLUT1, GLUT3 and GLUT4($P<0.05$, $P<0.01$), and GSK-3β protein expression decreased($P<0.05$). Real time fluorescence quantitative PCR detection results showed compared with the normal group, the mRNA expressions of GLUT1, GLUT3 and GLUT4 in the substantia nigra of the model group mice were significantly reduced($P<0.01$), and GSK-3β expression increased($P<0.05$). Compared with the model group, the Dihuang Yinzi high dose group showed increased expressions of GLUT1, GLUT3 and GLUT4

($P<0.05$), and GSK-3β expression decreased ($P<0.05$). Compared with the normal group, the mRNA expressions of GLUT1 and GLUT3 in the striatum of the model group were significantly lower ($P<0.01$), the expression of GLUT4 was lower ($P<0.05$) and the expression of GSK-3β increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the Dihuang Yinzi high dose group showed increased expressions of GLUT1, GLUT3 and GLUT4 ($P<0.05$), and GSK-3β expression decreased ($P<0.05$). Immunohistochemical test results showed compared with the normal group, the expressions of GLUT1 and GLUT4 in the substantia nigra of the model group decreased ($P<0.05$), and GSK-3β expression increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the Dihuang Yinzi high dose group significantly increased the expression of GLUT1 ($P<0.01$). Compared with the normal group, the expressions of GLUT1 and GLUT4 in the striatum of the model group decreased significantly ($P<0.01$, $P<0.05$), respectively. Compared with the model group, the Dihuang Yinzi high dose group significantly increased the expressions of GLUT1, GLUT3 and GLUT4 ($P<0.01$, $P<0.05$), and the expression of GSK-3β decreased ($P<0.05$). *Conclusion* 1. Dihuang Yinzi can improve the motor speed, grip ability, limb coordination and exploration ability of PD mice with kidney essence deficiency syndrome. 2. Dihuang Yinzi can reduce fasting blood glucose in mice with PD kidney essence deficiency syndrome, improve energy metabolism by correcting glucose metabolism. 3. Dihuang Yinzi can increase the protein expressions of GLUT1 and GLUT4 in the substantia nigra of PD mice with kidney essence deficiency syndrome, and reduce the protein expression of GSK-3β in the substantia nigra of the brain, increase the expressions of GLUT1, GLUT3 and GLUT4 in the brain striatum, and reduce the expression of GSK-3β in the brain striatum. The protein expression in the Dihuang Yinzi middle and high dose groups was higher than that in the Dihuang Yinzi low dose group. 4. Dihuang Yinzi has abnormal intake of GLUT1, GLUT3, GLUT4 and GSK-3β proteins. Dihuang Yinzi can treat PD of kidney essence deficiency syndrome by regulating the expressions of GLUT1, GLUT3, GLUT4 and GSK-3β proteins in the substantia nigra and striatum of PD mice.

Keywords: Parkinson's disease; kidney essence deficiency syndrome; sugar metabolism; Dihuang Yinzi (地黄饮子); glucose transporter protein

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的中枢神经系统疾病,常伴有运动迟缓、静止性震颤、认知功能障碍等症状[1]。其病理特点主要为黑质致密部多巴胺能神经元的缺失、多巴胺能神经元区路易小体、多脑区路易神经突增多[2]。至今,PD 治疗仍然以药物为主,主要包括左旋多巴、N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体阻滞剂、抗胆碱能药物[3]。这类药物可有效缓解 PD 的症状,但长期使用可能会带来一系列不良反应。葡萄糖和能量代谢的改变是 PD 的早期分子事件,是发病的潜在危险因素因此,越来越多的研究关注于代谢异常和神经退行性变的关系,帕金森病糖代谢情况渐渐成为了大家关注的重点。

中医将 PD 归属于"颤证"范畴,中医药在防治 PD 方面具有丰富的临床经验。PD 多发于中老年人,高发于 55 岁以上人群,从中医角度思考,此年龄段是人体各脏腑功能减退的阶段,以肾中精气发展至由盛至亏虚为主要生理特点。地黄饮子为滋肾阴、补肾阳、开窍化痰之要方,现代药理学的研究证实,地黄饮子能够提高胆碱能系统活性、改善脑组织能量代谢、提高学习记忆能力、保护神经元[4]。因此,地黄饮子在防治帕金森病方面有着巨大的潜力。

糖代谢异常是 PD 的一个重要病理机制,脑的正常功能活动依赖从血液中不断提供的葡萄糖来维持。在脑内能量代谢过程中,葡萄糖是首要的能量来源,脑组织的代谢特点使其必须依赖于葡萄糖的摄取来维持正常的活动。肾精虚证是 PD 的重要病机,肾藏精生髓,脑为髓海,主神志,髓由肾精及气血化生,充养其脑,肾精亏虚则精不上承,脑髓空虚而脑失所养。本研究旨在探讨糖代谢异常是否为 PD 肾精虚证的机制,地黄饮子补肾益精治疗 PD 的作用机制是否通过调整大脑糖代谢异常实现。在本研究中,建立 PD 模型小鼠通过行为学观察和检测血糖值等指标,评估地黄饮子对 PD 肾精虚证和糖代谢异常的干预效果。同时,检测地黄饮子对糖代谢相关蛋白表达的影响,探讨其可能的作用机制。希望本研究的相关结果能为明确 PD 的发病机制和中医药补肾治疗神经退行性脑病提供新的思路和方向。

1 实验材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 12 周龄 SAM-P8 小鼠 55 只,体质量(29±3) g,SPF 级雄性 12 周龄 SAM-R1 小鼠 11 只,体质量(28±2) g,购自北京大学医学部,合格证编号:11033222010002352,许可证号:SCXK(京)2021-0013,经山西中医药大学伦理委员会批准,按国际动物实验方针进行科学实验。

受试动物饲养于山西中医药大学科研中心 SPF 级动物房。饲养室环境温度控制在(22±2)℃,相对湿度 40%~60%,自然光照,通风良好。动物自由饮食、进水及活动。

1.2 试剂与仪器

全自动多色荧光及化学发光凝胶成像系统(北京赛智创业科技有限公司,ChampChemi Professional),电泳仪(北京六一生物科技有限公司,DYY-6D),声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司,JY92-IIN),光学显微镜(奥林巴斯有限公司,BX53),1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)(广州

市鲁诚生物科技有限公司，SLBM9246V），β - actin 抗体（ab8226，英国 Abcam 公司），anti - 糖原合成激酶 3β（Glycogen synthase kinase - 3β，GSK - 3β）antibody（华安生物，EET1607 - 71），anti - Glucose Tran sporter 葡萄糖转运蛋白 4（Glucose transporter 4，GLUT 4），Mouse Monoclonal Antibody（华安生物，M1505 - 6），葡萄糖转运蛋白 3（Glucose transporter 3，GLUT 3）Rabbit mAb（武汉博士德生物工程有限公司，A4137），anti - 葡萄糖转运蛋白 1（Glucose transporter 1，GLUT 1）Antibody（武汉博士德生物工程有限公司，PB9435）。

2 实验方法

2.1 实验分组

SPF 级雄性 SAM - P8 小鼠 55 只，适应性喂养 1 周后，按照 rand 函数随机分为模型组、地黄饮子低剂量组、地黄饮子中剂量组、地黄饮子高剂量组、阳性药组，每组 11 只。SPF 级雄性 SAM - R1 小鼠 11 只作为正常组。小鼠在实验期间自由进食和饮水。

2.2 试剂配制及给药方式

2.2.1 地黄饮子水煎剂制备 熟地黄 12 g，巴戟天 9 g，山茱萸 9 g，石斛 9 g，肉苁蓉 9 g，炮附子 6 g，五味子 6 g，官桂 6 g，白茯苓 6 g，麦门冬 6 g，石菖蒲 6 g，远志 6 g，薄荷 3 g，购自北京同仁堂晋中药店有限责任公司安宁店。煎煮前每剂药加 500 mL 纯水浸泡 2 h（薄荷后下，附子先煎）[5]，煮沸后转为文火煮 30 min。滤出药液后再加等量清水依上法再次煎煮，将两次取出的药液混合（过程中加入薄荷），每副药物浓缩成 46.5 mL。4 ℃冰箱保存，并在使用前回温并充分摇匀。给药 1 次/d，持续给药 1 个月。

2.2.2 盐酸美金刚混悬液制备 将盐酸美金刚片放入研钵研磨成粉末，加入纯水，制成混悬液，浓度为 0.4 mg/（mL · d），持续给药 1 个月。

2.2.3 给药方式 各组详细给药剂量和方法见表 1。

2.3 模型制备

采用 SAM - P8 小鼠，MPTP 腹腔注射建立 PD 肾精虚证模型，连续 7 d，浓度为 30 mg/kg，1 次/d。MPTP 采用灭菌的纯水溶解配制，现配现用，根据小鼠体质量计算腹腔注射用量[6]。

2.4 检测指标及方法

2.4.1 空腹血糖值 于给药后的第 7、14、21、28、35、42、49、56 天，12 h 禁食不禁水，尾静脉取血，测定空腹血糖值[7]。

2.4.2 行为学观察 （1）步态分析实验：步态分析实验用于评价动物的运动能力和协调性。于实验开始前 3 d，各组小鼠每天进行 1 次训练。使用 DigiGait 动物步态检测分析系统，在检测过程中，将小鼠置于平台中，使用高频摄像机记录连续 10 s 的步态行为。录制完成的视频通过计算机分析软件分析，评价动物平衡协调能力。每只小鼠重复检测 3 次，每次间隔至少 10 min，取平均值进行分析。

（2）爬杆实验：爬杆实验[8]用于检测模型小鼠的运动功能。自制一根高 50 cm，直径 2.5 cm，顶端装有直径 25 cm 小球的不锈钢杆，用胶布将小球及杆包裹起来防止打滑。检测时，将小鼠头部朝上放于杆顶部位置，检测并记录小鼠爬下的时间，以小鼠双前肢接触底部平台为爬完全长。实验前让小鼠进行爬杆训练 1 次，实验时连续测定 3 次，取平均值。

表 1 各组给药剂量及处理方法

组别	蒸馏水	MPTP	盐酸美金刚	地黄饮子水煎剂
正常组	0.03 g/（kg · d），腹腔注射 1.55 g/（kg · d），灌胃			
模型组	1.55 g/（kg · d），灌胃	0.03g/（kg · d），腹腔注射		
阳性药组		0.03 g/（kg · d），腹腔注射	0.1 g/（kg · d），灌胃	
地黄饮子低剂量组		0.03 g/（kg · d），腹腔注射		0.76 g/（kg · d），灌胃
地黄饮子中剂量组		0.03 g/（kg · d），腹腔注射		1.55 g/（kg · d），灌胃
地黄饮子高剂量组		0.03 g/（kg · d），腹腔注射		3.10 g/（kg · d），灌胃

（3）旷场实验：旷场实验[9]使用 SuperMaze 动物行为学视频分析软件评价小鼠的自主活动能力。实验时，在相对安静的环境下，将小鼠放入测试箱（40 cm × 40 cm × 40 cm）中央，四周黑色，底部浅灰色。适应 3 min 后开始检测，计算机自动检测小鼠 5 min 内在测试箱中的自发活动情况，并获取小鼠的运动轨迹，每次更换老鼠时使用酒精棉球擦拭清除敞箱内异物，祛除气味干扰，测试 3 次取平均值。

2.4.3 指标检测 （1）样品采集：行为学实验结束后，每组随机取 3 只，异氟烷麻醉后经心尖部灌注常温生理盐水（50 mL）和 4% 多聚甲醛（30 mL），断头取脑，取肾脏、睾丸，放入含有 4% 多聚甲醛的离心管中备用。余下小鼠异氟烷麻醉后断头取脑，参照 ALLEN BRAIN ATLAS 在线图谱和 Karunakaran 等的方法分离黑质部位脑组织，将其冷冻在液氮中，保存在 - 80 ℃中，用于蛋白免疫印迹法（Western blot，WB）和实时荧光定量聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction，PCR）检测使用。

（2）WB 检测 PD 肾精虚证小鼠黑质、纹状体 GLUT1、GLUT3、GLUT4、GSK - 3β 蛋白含量：分别提取 PD 小鼠黑质、纹状体的蛋白，取少量蛋白用于 BCA 法蛋白定量，剩余蛋白各加入 1/4 体积的 5 × loadingbuffer，100 ℃沸水煮 10 min 使蛋白变性。根据蛋白浓度计算各样品上样量，经相应浓度 SDS - PAGE 凝胶电泳分离蛋白后，转膜，3% BSA 封闭蛋白条带，之后加入相应的一抗及二抗进行免疫反应，滴加超敏发光液经 ECL 显色后，用 GelPro31 进行蛋白条带灰度分析。

（3）实时荧光定量 PCR 检测 PD 肾精虚证小鼠黑质、纹状体 GLUT1、GLUT3、GLUT4、GSK - 3β 蛋白含量：①模板 DNA 的变性：将含有目标 DNA 的样品加入 PCR 反应管中，然后将管子置于热板上，并加热到 95 ℃以上，使 DNA 的双链结构解开成单链的 DNA 模板。②引物的结合：将 PCR 反应管降温到 50 ~ 60 ℃时，引物（由两段寡核苷酸组成的 DNA 序列）与模板

DNA序列相互作用,使它们结合成双链结构。③DNA聚合酶的作用:将PCR反应管的温度升高到72 ℃时,DNA聚合酶开始作用,它将在引物的基础上复制模板DNA序列,产生1个新的DNA分子。④重复循环:以上3个步骤构成1个PCR循环,每个循环可以扩增模板DNA的数量翻倍。PCR循环可以重复30~40次,从而产生数以百万计的DNA复制品。⑤最终延伸:最后,PCR反应管中的DNA链伸长过程结束,将反应体制加热到72 ℃以上,保持5~10 min,使其完成最终延伸。序列信息见表2。

表2 引物与探针序列

引物和探针	引物序列(5′-3′)
GLUT1F	ACAGCCGATGTGACCCGAGAC
GLUT1R	CAGCACCACAGCGATGAGGATG
GLUT3F	CGCTGCCTTCCTCATCTTCTTCC
GLUT3R	CGAAAGTCCTGCCTTTGGLCTCC
GLUT4F	GGCTGTGAGTGAGTGCTIT
GLUT4R	GGTITCTGCTCCCTATCGT
GSK-3βF	GGCTGTGTGTTGGCTGAATTGTTG
GSK-3βR	TTTGCTCCCTTGTTGGTGTTCCTAG
β-actinF	CTCCATCATGAAGTGCGACGT
β-actinR	GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC

(4)免疫组化染色检测PD肾精虚证小鼠黑质、纹状体GLUT1、GLUT3 、GLUT4、GSK-3β蛋白含量:各组取6只小鼠经心脏灌流后,取脑,沉蔗糖,冰冻切片,按照常规免疫组化步骤进行封闭、一抗、二抗孵育、封片。共聚焦显微镜下观察,用ImageProPlus6.0进行阳性染色面积及密度的统计。

(5)苏木精-伊红(HE)染色观察肾脏及睾丸组织结构变化:HE染色观察肾脏及睾丸组织结构变化:肾脏及睾丸钙后,脱水、石蜡包埋,之后进行HE染色,于光学显微镜下观察病理变化,并进行Mankin评分。

2.5 统计学方法

采用GraphPad Prism5.0统计软件进行数据分析,计量资料用表示,两两比较采用t检验,组间比较用单因素方差分析(ANOVA),以$P<0.05$为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠空腹血糖值检测结果

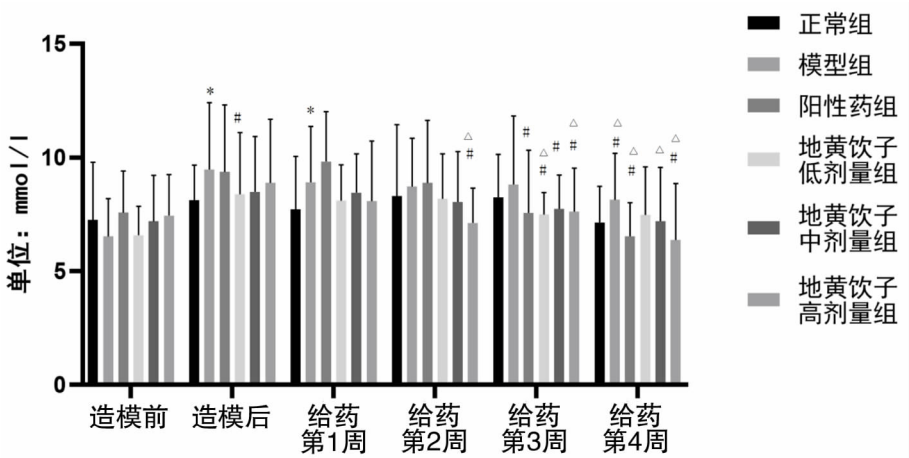
如图1所示,与正常组相比,模型组小鼠造模后、给药第1、4周空腹血糖升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,阳性药组小鼠给药第3、4周空腹血糖降低,地黄饮子低剂量组小鼠造模后、给药第3周空腹血糖降低,地黄饮子中剂量组小鼠给药第3周空腹血糖降低,地黄饮子高剂量组小鼠给药第2、3、4周空腹血糖降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与给药前相比,给药第2周地黄饮子高剂量组,给药第3周地黄饮子低、高剂量组空腹血糖降低,给药第4周阳性药组、地黄饮子低、中、高剂量组空腹血糖降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3.2 小鼠行为学结果检测结果

3.2.1 旷场实验检测结果 地黄饮子对小鼠旷场中移动总路程、潜伏期、平均速度、静止时间、跨格次数的影响如表3所示。与正常组相比,模型组小鼠运动总路程减少,潜伏期增加,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组相比,地黄饮子低、高剂量组小鼠潜伏期降低,地黄饮子中剂量组小鼠总路程增加,差异均有统计学意义($P<0.05$)。各组小鼠的平均速度、静止时间、跨格次数各项指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3.2.2 爬杆实验 如表4所示,在爬杆实验中,与正常组比较,模型组爬杆时间增加;与模型组相比,地黄饮子低、高剂量组给药后爬杆时间降低;与给药前相比,地黄饮子低、中、高剂量组爬杆时间降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3.2.3 步态实验检测结果 如表5所示,与正常组相比,模型组小鼠的右前接触面积、左前推进时间、右后推进指数、左后支撑时相、右前支撑时相差异有显著统计学意义($P<0.01$),右后肢接触面积差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,阳性药组小鼠的左后支撑时相、右前支撑时相差异有统计学意义($P<0.05$);地黄饮子低剂量组小鼠的右后推进指数差异有显著统计学意义($P<0.01$),右前推进指数差异有统计学意义($P<0.05$);地黄饮子中剂量组小鼠的右前肢接触面积、右后推进指数、左后支撑时相、右前支撑时相差异有显著统计学意



注:*与正常组相比,$P<0.05$;#与模型组相比,$P<0.05$;△与给药前相比,$P<0.05$。

图1 地黄饮子对PD肾精虚证小鼠空腹血糖的影响($n=11$,$\bar{x}\pm s$)

表3 地黄饮子对PD肾精虚证小鼠旷场实验的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	总路程/(cm)	总时间/(s)	平均速度/(cm/s)	静止时间/(s)	跨格次数/(次)	潜伏期/(s)
正常组	11	5 599.91 ± 635.93	299.83 ± 0.76	18.63 ± 1.62	28.18 ± 7.93	9.55 ± 2.23	27.78 ± 16.47
模型组	11	3 948.75 ± 664.28 *	299.03 ± 1.56	13.39 ± 2.32	36.18 ± 4.67	6.54 ± 1.94	44.52 ± 20.81 *
阳性药组	11	3 910.52 ± 635.93	298.90 ± 2.39	13.92 ± 2.91	36.09 ± 12.13	7.90 ± 1.44	34.90 ± 14.72
地黄饮子低剂量组	11	3 917.09 ± 457.18	298.02 ± 3.10	13.18 ± 1.41	36.65 ± 10.36	7.81 ± 2.04	34.40 ± 14.13
地黄饮子中剂量组	11	4 570.95 ± 643.01#	299.95 ± 0.33	13.68 ± 2.13	31.77 ± 10.01	7.34 ± 1.63	31.12 ± 22.26#
地黄饮子高剂量组	11	3 902.14 ± 782.67	299.85 ± 0.67	14.03 ± 2.61	37.02 ± 10.38	7.86 ± 2.01	29.29 ± 32.48#

注：* 与正常组相比，$P<0.05$；# 与模型组相比，$P<0.05$。

表4 地黄饮子对PD肾精虚证小鼠爬杆时间的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药前爬杆时间/(s)	给药后爬杆时间/(s)
正常组	11	8.14 ± 2.89	6.57 ± 1.80
模型组	11	12.74 ± 4.13 *	11.58 ± 2.94 *
阳性药组	11	11.18 ± 2.69	9.86 ± 1.92
地黄饮子低剂量组	11	12.63 ± 2.77	7.95 ± 1.71#△
地黄饮子中剂量组	11	12.01 ± 3.90	8.99 ± 1.75△
地黄饮子高剂量组	11	12.24 ± 2.70	8.33 ± 1.42#△

注：* 与正常组相比，$P<0.05$；# 与模型组相比，$P<0.05$；△ 与给药前相比，$P<0.05$。

义($P<0.01$)，地黄饮子高剂量组小鼠的右前肢接触面积、左后支撑时相、右前支撑时相有差异有显著统计学意义($P<0.01$)，右前推进指数差异有统计学意义($P<0.05$)。

3.3 小鼠肾脏、睾丸HE染色结果

3.3.1 小鼠肾脏HE染色结果 肾脏HE染色结果如插页XXⅢ图2所示：与正常组相比，模型组出现肾小球囊上皮细胞增生、脂滴增加、肾小管扩张、细胞碎片增加、红细胞增加、淋巴细胞增加、成纤维细胞增加、纤维细胞增加等病理改变。与模型组相比，阳性药组出现脂滴降低、红细胞降低；地黄饮子低剂量组出现脂滴降低、红细胞降低；地黄饮子中剂量组出现红细胞降低、成纤维细胞降低；地黄饮子高剂量组出现脂滴降低、红细胞降低、纤维细胞降低。这一结果表明，肾精虚证小鼠模型建立成功，地黄饮子可以改善炎性细胞浸润和纤维组织增生，扭转肾损伤。

3.3.2 小鼠睾丸HE染色结果 睾丸HE染色结果如插页XXⅣ图3所示：与正常组相比，模型组见生精上皮空泡化、精子数量减少等病变现象。与模型组相比，地黄饮子低剂量组出现生精上皮空泡化减轻，地黄饮子中剂量组出现精子数量增加，地黄饮子高剂量组出现生精上皮空泡化减轻。这一结果表明，地黄饮子可以相对减轻睾丸组织病变程度。

3.4 Western Blot检测结果

3.4.1 Western Blot法检测黑质中GLUT1、GLUT3、GLUT4和GSK-3β蛋白的表达 结果如图4所示，与正常组相比，模型组小鼠黑质GLUT1蛋白表达显著降低，差异有显著统计学意义($P<0.01$)，GLUT3和GLUT4蛋白表达降低，差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组相比，阳性药组GLUT1蛋白表达显著增加，差异有显著统计学意义($P<0.01$)；地黄饮子低剂量组GLUT1蛋白表达显著增加，差异有显著统计学意义($P<0.01$)，GLUT4和GSK-3β表达升高，差异有统计学意义($P<0.05$)；地黄饮子中剂量组GLUT1蛋白表达显著升高，差异有显著统计学意义($P<0.01$)，GLUT4蛋白表达升高，差异有统计学意义($P<0.05$)；地黄饮子高剂量组GLUT1蛋白表达显著增加，差异有显著统计学意义($P<0.01$)，GLUT4蛋白表达增加，GSK-3β蛋白表达降低，差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3.4.2 Western Blot法检测对小鼠纹状体中GLUT1、GLUT3、GLUT4和GSK-3β蛋白表达的影响 结果如图5所示，与正常组相比，模型组小鼠纹状体GLUT1和GLUT3蛋白表达显著降低，差异有显著统计学意义($P<0.01$)，GLUT4蛋白表达降低，GSK-3β蛋白表达升高，差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表5 地黄饮子对PD肾精虚证小鼠步态功能的影响($\bar{x} \pm s$)

步态指标	n	左前肢接触面积/(m^2)	右前肢接触面积/(m^2)	左后肢接触面积/(m^2)	右后肢接触面积/(m^2)	左前推进时间/(s)	左后推进指数/(s)
正常组	11	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.06	0.17 ± 0.06	0.19 ± 0.56	0.23 ± 0.12	0.25 ± 0.06
模型组	11	0.13 ± 0.05	0.24 ± 0.06 * *	0.16 ± 0.06	0.23 ± 0.55 *	0.36 ± 0.18 * *	0.27 ± 0.06
阳性药组	11	0.10 ± 0.02	0.25 ± 0.04	0.14 ± 0.01	0.21 ± 0.03	0.24 ± 0.08	0.25 ± 0.03
地黄饮子低剂量组	11	0.11 ± 0.04	0.21 ± 0.03	0.14 ± 0.10	0.17 ± 0.06	0.24 ± 0.05	0.25 ± 0.01
地黄饮子低剂量组	11	0.12 ± 0.04	0.19 ± 0.05##	0.13 ± 0.55	0.19 ± 0.04	0.24 ± 0.07	0.25 ± 0.01
地黄饮子低剂量组	11	0.12 ± 0.04	0.16 ± 0.04##	0.21 ± 0.54#	0.19 ± 0.04	0.24 ± 0.08	0.25 ± 0.04

步态指标	n	右前推进指数	右后推进指数	左前支撑时相/(s)	左后支撑时相/(s)	右前支撑时相/(s)	右后支撑时相/(s)
正常组	11	0.28 ± 0.05	0.24 ± 0.12	0.23 ± 0.15	0.24 ± 0.08	0.25 ± 0.16	0.25 ± 0.02
模型组	11	0.35 ± 0.13	0.36 ± 0.04 * *	0.25 ± 0.08	0.35 ± 0.05 * *	0.33 ± 0.16 * *	0.23 ± 0.04
阳性药组	11	0.30 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.09	0.29 ± 0.03#	0.27 ± 0.04#	0.26 ± 0.01
地黄饮子低剂量组	11	0.28 ± 0.04#	0.25 ± 0.07##	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.07	0.24 ± 0.07	0.22 ± 0.03
地黄饮子低剂量组	11	0.30 ± 0.06	0.25 ± 0.04##	0.24 ± 0.09	0.24 ± 0.04##	0.22 ± 0.07##	0.37 ± 0.02
地黄饮子低剂量组	11	0.29 ± 0.05#	0.25 ± 0.07##	0.30 ± 0.01	0.24 ± 0.06##	0.24 ± 0.06##	0.35 ± 0.02

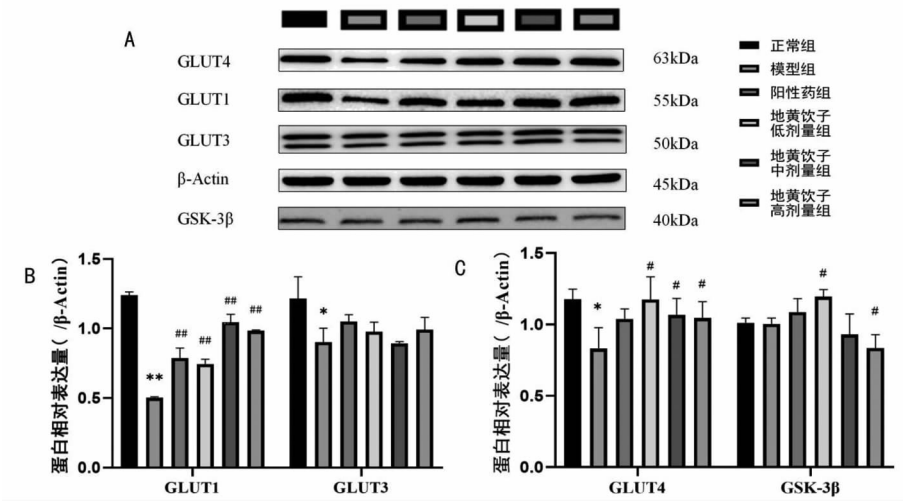
注：* 与正常组相比，$P<0.05$；* * 与正常组相比，$P<0.01$；# 与模型组相比，$P<0.05$；## 与模型组相比，$P<0.01$。

与模型组相比，阳性药组 GLUT3 蛋白表达增加，GSK－3β 蛋白表达降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；地黄饮子低剂量组 GLUT3 蛋白表达增加，地黄饮子中剂量组 GLUT1 蛋白表达增加，GSK－3β 蛋白表达降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；地黄饮子高剂量组 GLUT1 蛋白表达增高，差异有统计学意义（$P<0.05$），GLUT3 蛋白表达显著增高，差异有显著统计学意义（$P<0.01$），GLUT4 蛋白表达升高，GSK－3β 蛋白表达降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。

3.5 PCR 检测结果

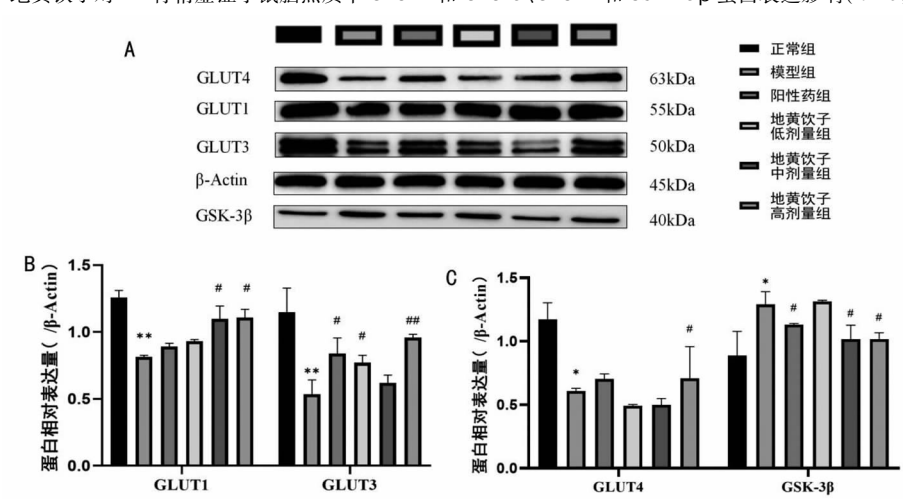
3.5.1 PCR 法检测小鼠黑质 GLUT1、GLUT3、GLUT4 和GSK－3β 的 mRNA 表达 结果如表 6 所示，与正常组相比，模型组小鼠黑质 GLUT1、GLUT3、GLUT4 mRNA 表达显著降低，差异有显著统计学意义（$P<0.01$），GSK－3β 表达升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与模型组相比，阳性药组 GLUT3、GLUT4 表达增加，差异有统计学意义（$P<0.05$）；地黄饮子低剂量组 GLUT3、GLUT4 表达显著增加，差异有显著统计学意义（$P<0.01$）；地黄饮子中剂量组 GLUT4 表达显著增加，差异有显著统计学意义（$P<0.01$），GLUT1、GLUT3 表达增高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；地黄饮子高剂量组 GLUT1、GLUT3、GLUT4 表达增高，GSK－3β 表达降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。

3.5.2 PCR 法检测对小鼠纹状体中 GLUT1、GLUT3、GLUT4 和 GSK－3β 的 mRNA 表达 结果如表 7 所示，与正常组相比，模型组小鼠纹状体 GLUT1 和 GLUT3 mRNA 表达显著降低，差异有显著统计学意义（$P<0.01$），GLUT4 表达降低，GSK－3β 表达升高，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。与模型组相比，阳性药组 GLUT3、GLUT4 表达显著增加，GSK－3β 蛋白表达显著降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；地黄饮子低剂量组 GLUT4 表达显著增加，差异有显著统计学意义（$P<0.01$），GLUT3 表达增加，GSK－3β 表达显著降低，差异



注：A. 蛋白印迹法检测糖代谢相关蛋白条带图；B. 黑质 GLUT1、GLUT3 蛋白表达含量比较；C. 黑质 GLUT4、GSK－3β 蛋白表达含量比较。＊与正常组相比，$P<0.05$；＊＊与正常组相比，$P<0.01$；#与模型组相比，$P<0.05$；##与模型组相比，$P<0.01$。

图 4 地黄饮子对 PD 肾精虚证小鼠脑黑质中 GLUT1 和 GLUT3、GLUT4 和 GSK－3β 蛋白表达影响（$n=6, \bar{x}\pm s$）



注：A. 蛋白印迹法检测糖代谢相关蛋白条带图；B. 纹状体 GLUT1、GLUT3 蛋白表达含量比较；C. 纹状体 GLUT4、GSK－3β 蛋白表达含量比较。＊与正常组相比，$P<0.05$；＊＊与正常组相比，$P<0.01$；#与模型组相比，$P<0.05$；##与模型组相比，$P<0.01$。

图 5 地黄饮子对 PD 肾精虚证小鼠脑纹状体中 GLUT1 和 GLUT3、GLUT4 和 GSK－3β 蛋白表达影响（$n=6, \bar{x}\pm s$）

表 6 GLUT1/β - Actin, GLUT3/β - Actin, GLUT4/β - Actin, GSK - 3β/β - Actin mRNA 相对表达比率($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GLUT1	GLUT3	GLUT4	GSK - 3β
正常组	6	1.25 ± 0.23	1.69 ± 0.90	1.33 ± 0.28	1.11 ± 0.03
模型组	6	0.74 ± 0.22**	1.09 ± 0.26**	0.88 ± 0.16**	1.36 ± 0.06*
阳性药组	6	0.85 ± 0.22	1.31 ± 0.13#	1.10 ± 0.26#	1.27 ± 0.04
地黄饮子低剂量组	6	0.86 ± 0.04	1.46 ± 0.71##	1.24 ± 0.17##	1.19 ± 0.01
地黄饮子中剂量组	6	0.94 ± 0.12#	1.32 ± 0.66#	1.25 ± 0.13##	1.43 ± 0.19
地黄饮子高剂量组	6	0.90 ± 0.21#	1.301 ± 0.02#	1.02 ± 0.1.11#	0.71 ± 0.03#

注：*与正常组相比，$P<0.05$；**与正常组相比，$P<0.01$；#与模型组相比，$P<0.05$；##与模型组相比，$P<0.01$。

均有统计学意义（$P<0.05$）；地黄饮子中剂量组 GLUT1 表达增加，差异有统计学意义（$P<0.05$），GLUT3、GLUT4 显著增加，差异有显著统计学意义（$P<0.01$），GSK - 3β 蛋白表达降低，差异有显著统计学意义（$P<0.01$）；地黄饮子高剂量组 GLUT1、GLUT3、GLUT4 表达增高，GSK - 3β 表达降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。

表 7 GLUT1/β - Actin, GLUT3/β - Actin, GLUT4/β - Actin, GSK - 3β/β - Actin mRNA 相对表达比率($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GLUT1	GLUT3	GLUT4	GSK - 3β
正常组	6	1.25 ± 0.05	1.05 ± 0.17	1.18 ± 0.20	1.28 ± 0.42
模型组	6	0.81 ± 0.01**	0.49 ± 0.10**	0.60 ± 0.12*	1.42 ± 0.28*
阳性药组	6	0.89 ± 0.02	0.75 ± 0.16#	1.10 ± 0.56#	1.18 ± 0.08#
地黄饮子低剂量组	6	0.93 ± 0.01	0.66 ± 0.02#	1.49 ± 0.11##	0.86 ± 0.07##
地黄饮子中剂量组	6	1.09 ± 0.09#	0.94 ± 0.69##	1.49 ± 0.02##	0.76 ± 0.13##
地黄饮子高剂量组	6	1.10 ± 0.06#	0.65 ± 0.23#	0.93 ± 0.52#	0.81 ± 0.01##

注：*与正常组相比，$P<0.05$；**与正常组相比，$P<0.01$；#与模型组相比，$P<0.05$；##与模型组相比，$P<0.01$。

3.6 免疫组化检测结果

3.6.1 免疫组化法检测各组小鼠黑质中 GLUT1、GLUT3、GLUT4 和 GSK - 3β 的表达 结果见表 8、插页ⅩⅩⅤ图 6 - 插页ⅩⅩⅧ图 9。与正常组相比，模型组小鼠黑质 GLUT1、GLUT4 的表达降低，GSK - 3β 表达升高，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。与模型组相比，地黄饮子低剂量组 GLUT1 表达显著增加，差异有显著统计学意义（$P<0.01$），GLUT4 和 GLUT3 表达升高，GSK - 3β 表达降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；地黄饮子中剂量组 GLUT1、GLUT3、GLUT4 表达升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；地黄饮子高剂量组 GLUT1 表达显著升高，差异有显著统计学意义（$P<0.01$）。

3.6.2 免疫组化法检测各组小鼠纹状体中 GLUT1、GLUT3、GLUT4 和 GSK - 3β 的表达结果 结果见表 9、插页ⅩⅩⅨ图 10 - 插页ⅩⅩⅫ图 13。与正常组相比，模型组小鼠纹状体 GLUT1 表达显著降低，差异有显著统计学意义（$P<0.01$），GLUT4 表达降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与模型组相比，阳性药组 GLUT3，GSK - 3β 表达降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；地黄饮子低剂量组 GLUT1 表达增加，GSK - 3β 表达降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；地黄饮子中剂量组 GLUT1、GLUT3 表达显著增加，差异有显著统计学意义（$P<0.01$）；地黄饮子高剂量组 GLUT1、GLUT3 表达显著增高，差异有显著统计学意义（$P<0.01$）；GLUT4 表达升高，GSK - 3β 表达降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。

表 8 GLUT1、GLUT3、GLUT4 和 GSK - 3β 蛋白在黑质中的表达情况($\bar{x} \pm s$) 单位：个

组别	n	GLUT1	GLUT3	GLUT4	GSK - 3β
正常组	6	5.68 ± 1.47	4.26 ± 4.24	9.33 ± 10.99	1.86 ± 1.31
模型组	6	1.64 ± 3.58*	3.56 ± 2.24	3.69 ± 0.56*	7.13 ± 6.28*
阳性药组	6	2.50 ± 1.45	3.50 ± 2.56	2.78 ± 2.31	5.15 ± 4.92
地黄饮子低剂量组	6	11.58 ± 3.55##	7.53 ± 4.23#	5.66 ± 3.51#	2.58 ± 1.33#
地黄饮子中剂量组	6	4.66 ± 3.93#	8.15 ± 9.96#	6.35 ± 4.47#	6.17 ± 3.34
地黄饮子高剂量组	6	21.97 ± 2.42##	4.01 ± 1.69	3.14 ± 2.92	5.81 ± 3.30

注：*与正常组相比，$P<0.05$；**与正常组相比，$P<0.01$；#与模型组相比，$P<0.05$；##与模型组相比，$P<0.01$。

表 9 GLUT1、GLUT3、GLUT4 和 GSK - 3β 蛋白在纹状体中的表达情况($\bar{x} \pm s$) 单位：个

组别	n	GLUT1	GLUT3	GLUT4	GSK - 3β
正常组	6	14.95 ± 10.83	1.11 ± 0.81	3.39 ± 2.03	7.75 ± 11.16
模型组	6	7.90 ± 6.59**	0.91 ± 1.41	0.20 ± 0.249*	9.80 ± 10.57
阳性药组	6	9.88 ± 6.18	3.36 ± 4.43#	1.49 ± 0.41	5.04 ± 3.66#
地黄饮子低剂量组	6	11.57 ± 7.45#	3.01 ± 3.11	0.52 ± 0.59	5.17 ± 4.27#
地黄饮子中剂量组	6	21.91 ± 8.35##	10.15 ± 5.52##	0.75 ± 0.56	10.39 ± 11.38
地黄饮子高剂量组	6	13.20 ± 11.42##	5.04 ± 3.99##	2.77 ± 1.37#	5.72 ± 3.97#

注：*与正常组相比，$P<0.05$；**与正常组相比，$P<0.01$；#与模型组相比，$P<0.05$；##与模型组相比，$P<0.01$。

4 讨论

帕金森病是一种常见的中枢神经系统疾病，它的临床表现为运动迟缓、静止性震颤、认知功能障碍等症状。葡萄糖和能量代谢的改变是 PD 发病的潜在危险因素[10-11]，从糖代谢异常的角度探讨 PD 神经退行性疾病具有重要的医疗及社会价值。脑的正常功能活动依赖从血液中不断提供的葡萄糖来维持。脑组织中几乎无葡萄糖和氧的储备，脑的代谢特点决定脑组织必须依赖于葡萄糖的摄取才能维持正常的活动。但是葡萄糖不能自由穿过血脑屏障进入神经元，需要相应的运载工具，葡萄糖转运蛋白（Glucose transporters，GLUTs）就起着运送葡萄糖进入相应组织的作用[12]。在哺乳动物大脑中，GLUT1 是脑中主要的葡萄糖运载体，在脑中分布在脑的毛细血管内皮和神经胶质细胞上，其作用是把血液循环当中的葡萄糖跨血脑屏障转运至脑脊液中，使血糖通过血脑屏障进入大脑，进入脑组织和胶质细胞，其表达水平和活性不受胰岛素浓度变化的影响[13]。它对葡萄糖分子具有高亲合力，即使在低浓度葡萄糖的情况下也能有效地转运葡萄糖分子[14]。GLUT3 的表达由 SLC2A3 基因控制，其分布广泛，包括海马 CA1、CA3 区和皮层神经元等组织中。在脑内，GLUT3 蛋白的含量很高，主要作用是将葡萄糖从脑脊液转运至神经元和神经胶质细胞内。它是神经元特异的葡萄糖转运蛋白，且对葡萄糖的亲和力高。GLUT3 基因表达与神经元功能活动密切相关[15]。GLUT4 在海马依赖的学习记忆期间的神经元葡萄糖供给中发挥重要作用，在学习记忆期间向神经元提供更多的葡萄糖供给用以维持神经元结构和功能完整性[16]。它主要存在于胰岛素敏感组

织,如脂肪组织、骨骼肌和心肌中[17]。此外,该分子还在大鼠小脑、海马、下丘脑等脑部组织中表达。该分子被储存在特殊的囊泡中,并具有独特性[18]。GLUT4 一般情况不能转运葡萄糖,仅在胰岛素信号分子刺激下起转运作用。在学习记忆期间的神经元葡萄糖供给中发挥重要作用。与 GLUT3 相似,具有高度的亲和力和转运能力。GSK - 3β 蛋白由基因 GSK3B 编码,是一种广泛表达的细胞信号转导分子,在许多细胞功能和疾病过程中发挥重要作用[19]。GSK - 3β 蛋白可以通过抑制胰岛素受体信号转导,导致胰岛素抵抗和糖代谢紊乱。此外,GSK - 3β 蛋白还可以通过调节肝酶的活性,影响葡萄糖的产生和利用,从而进一步调节血糖水平。GSK - 3β 蛋白主要参与细胞的生长、增殖、分化、凋亡等多种生物学过程,其活性调节与神经退行性疾病、炎症性疾病、肿瘤等多种疾病的发生和发展有关[20]。GSK - 3β 蛋白的磷酸化状态和活性受多种信号通路的影响,如 Wnt 信号通路、PI3K - AKT 信号通路、MAPK/ERK 信号通路等。GSK - 3β 蛋白在药物开发中也是一个重要的靶点,已有多种 GSK - 3β 抑制剂被研究和应用于治疗阿尔茨海默病、帕金森病、糖尿病等疾病[21]。PD 患者因 GLUT1 缺乏导致局部丘脑和小脑代谢不足,葡萄糖通过血脑屏障的运输受到损害,导致慢性神经性血糖低下,进而产生认知障碍和不同程度的痉挛、共济失调和肌张力障碍。在 PD 患者的脑组织中,GLUT1、GLUT3 和 GLUT4 的表达水平降低,葡萄糖转运率下降,进而发生神经元能量代谢障碍,最终引起神经元退化和 PD 症状的出现。通过增加 GLUT1、GLUT3 和 GLUT4 的表达,提高葡萄糖向神经元的转运率,可能是防止 PD 进展的一个重要途径。GSK - 3β 蛋白在帕金森病的发病机制中也扮演了重要的角色。研究表明[22],GSK - 3β 蛋白可以促进 α - 突触核蛋白的聚集,从而导致神经元的损伤和死亡。此外,GSK - 3β 蛋白也可以影响线粒体功能,从而影响神经元的代谢和生存。

中医将 PD 归属于“颤证”范畴,颤证以头部或肢体摇动、颤抖为主要临床表现,认为其病位在脑,其涵盖范围与 PD 临床发病表现重合。中医药在防治 PD 方面具有丰富的临床经验。中医学认为脑为奇恒之腑,汇聚元神和诸髓的致密性器官,与周身髓质联系紧密,脊髓、脑髓及骨髓均通于脑。《灵枢·海论》载“脑为髓之海,其输上在于其盖,上通于脑,合称脑髓,下在风府。”风府内通脊椎,以脊髓充养,络属于脑。肾为先天之本,精之处也,精生聚而成髓,脑为髓海,肾精尤其与“人身大主 - 脑”关系密切[23]。大脑的功能活动与肾息息相关,肾精所化之髓通过督脉上充于脑,激发和推动大脑的功能活动。中医认为颤证是由于肾虚髓空导致脑失所用,进而脑功能发生障碍。PD 肾精虚证是指帕金森病患者肾精虚的中医辨证类型。在中医理论中,肾为先天之本,主生髓。肾精的充足与否与人体的健康密切相关,影响人体的各种生理功能和代谢活动。地黄饮子为滋肾阴、补肾阳、开窍化痰之要方,现代药理学的研究证实,地黄饮子能够提高胆碱能系统活性、改善脑组织能量代谢、提高学习记忆能力、保护神经元等作用。因此,地黄饮子在防治帕金森病方面有着巨大的潜力。以糖代谢为基础的发展与未来医药学有着密切的联系。从糖代谢的角度来看,人体处于不同的生理病理状态时,糖代谢也必然存在差异。大脑是人体消耗葡萄糖最多的器官之一,大脑糖代谢异常可能会导致 PD 肾精虚证的发生和发展。同时,肾精亏虚也可能会影响大脑糖代谢。总体而言,糖代谢与 PD 肾精虚证之间存在密切关系,糖代谢异常可能导致 PD 肾精虚证的发生。

SAMP8 快速老化小鼠以回避反应和空间学习记忆能力呈增龄性加速衰退为主要特征,并且会出现葡萄糖代谢障碍[24]。SAMP8 小鼠对 MPTP 的敏感性随着年龄的增长而增加。注射 MPTP 后可表现出自发活动显著减少,多巴胺神经元数量和酪氨酸羟化酶蛋白减少等变化[25]。因此本实验选用 SAMP8 小鼠,采用腹腔注射 MPTP 损害黑质区致密部的多巴胺能神经元构建 PD 肾精虚证证候模型[26]。“肾虚辨证标准”带有明显的年龄依赖特征,衰老是肾虚证的内涵,即为生理性肾虚[27],采用经典的帕金森病相关行为学实验进行评价,包括旷场实验、爬杆实验、步态分析实验,经以上方法筛选出符合 PD 疾病临床表现的肾精虚证模型小鼠。旷场分析实验主要反映动物对新环境的探索,实验结果表明 MPTP 注射导致小鼠运动总路程、潜伏期与正常组比较明显较长,表明 PD 肾精虚证小鼠对新环境的探索能力下降,运动功能减低。与模型组相比,地黄饮子中剂量组在总路程上差异有统计学意义。高剂量组在潜伏期上差异有统计学意义。这表明地黄饮子能够改善 PD 肾精虚证小鼠的探索能力和行为表现。爬杆实验是检测小鼠运动协调行为的常用方法,可评估动物运动速度和四肢协调性,为了进一步研究小鼠探索能力下降是否与肢体协调度相关,本实验中发现,小鼠在造模后爬杆时间显著延长,表明小鼠运动协调能力下降。而给药后期地黄饮子低、高剂量组的时间明显降低。这表明地黄饮子能够改善 PD 肾精虚证小鼠的协调能力。步态分析实验是一种评价神经系统运动行为敏感度的检测方法。其中,四肢接触面积是小鼠在行走过程中足迹面积的变化,可以反映动物行走时肢体肌力的情况。步行周期分为支撑相和推进相,支撑相指动物肢体支撑时长与步行周期的比例。在实验中,模型组小鼠的接触面积出现异常,提示其肢体推动能力下降,异常的步行周期提示动物行走整体功能出现障碍。与模型组比较,地黄饮子高剂量组小鼠潜伏期明显缩短,推进指数、支撑时相、接触面积都明显改善,这表明地黄饮子能够改善 PD 肾精虚证小鼠的步态表现。

为了验证帕金森病小鼠行为学改变是否与糖代谢相关,实验检测了空腹血糖值和脑内糖代谢相关蛋白含量,空腹血糖结果显示,造模前,小鼠的空腹血糖值维持在 4.5 ~ 7.5 mmol/L 之间。造模后,正常组小鼠空腹血糖值稳定在正常范围 6 ~ 7.5 mmol/L 之间,模型组、给药组血糖上升,血糖值在 8 ~ 9 mmol/L 之间,给药期间,模型组小鼠血糖值持续处于高血糖状态,低、中、高剂量组各组小鼠血糖水平在给药后开始有所降低,高剂量组下降趋势明显。表明地黄饮子对 PD 肾精虚证小鼠具有一定的降血糖作用,通过纠正糖代谢,改善机体能量代谢发挥对 PD 肾精虚证小鼠的治疗作用。随着 PD 肾精虚证小鼠空腹血糖水平的变化,其运动功能亦不断变化,提示 PD 血糖水平与其运动功能及其预后状况相关。其机制可能是 PD

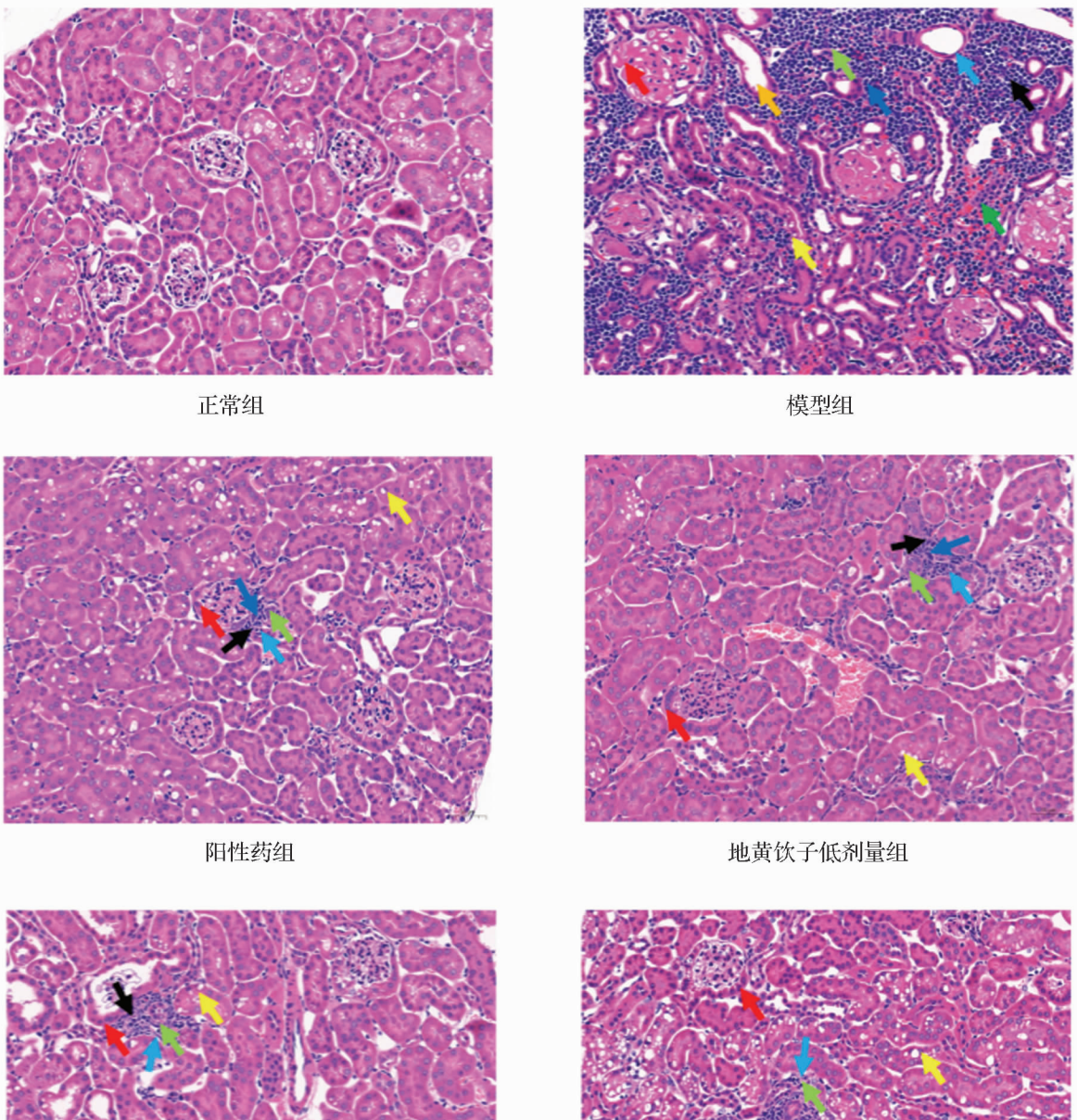
肾精虚证小鼠高血糖水平引起机体组织的代谢紊乱，侵犯感觉神经、运动神经和自主神经，累及运动神经进而导致运动功能障碍，对小鼠脑神经细胞的损伤、脑内糖代谢亦可能产生影响。采用 Western Blot、免疫组化法和 PCR 技术对脑内糖代谢相关蛋白进行定性定量检测结果显示，在 PD 肾精虚证小鼠的脑黑质、纹状体组织中，GLUT1、GLUT3、GLUT4 蛋白表达降低，从而导致葡萄糖转运率降低，葡萄糖转运体活性低、葡萄糖摄取量不足，神经元糖代谢异常，神经元能量代谢障碍出现 PD 肾精虚证的相应症状。纹状体 GSK－3β 表达升高，与造模前差异明显，引起神经元退化。提示 PD 肾精虚证模型小鼠存在脑葡萄糖摄取减少，大脑对于糖代谢的反应减弱，这可能是其发生行为紊乱及神经认知障碍的原因。PD 肾精虚证小鼠脑黑质 GLUT1、GLUT4、GSK－3β，脑纹状体 GLUT1、GLUT3、GLUT4、GSK－3β 蛋白含量在给药后期均与模型组有差异；脑黑质、纹状体 GLUT1、GLUT3、GLUT4、GSK－3β m RNA 含量在给药后期均与模型组有差异，地黄饮子低剂量组的效果差于中、高剂量组。提示地黄饮子治疗 1 个月后改善了小鼠脑内葡萄糖代谢异常，表明地黄饮子可以通过调节 GLUT1、GLUT3、GLUT4、GSK－3β 蛋白含量、mRNA 含量，提高 PD 肾精虚证小鼠黑质和纹状体组织中糖代谢水平，改善 PD 肾精虚证小鼠神经传导功能的作用。综上所述，地黄饮子可以降低血糖水平并改善小鼠的运动能力，调节帕金森病小鼠黑质、纹状体中 GLUT1、GLUT3、GLUT4、GSK－3β 蛋白、mRNA 的表达，表明其可能通过影响糖代谢通路来改善帕金森病的症状。增加葡萄糖从血液转运至大脑从而改善神经元的能量代谢很有可能是防止 PD 肾精虚证进展的一个重要途径。

参考文献

[1] 闫川慧，张俊龙，郭蕾，等. 颤振中医治疗方案的文献研究[J]. 辽宁中医杂志，2010，37(8)：1464－1465.
[2] 陈桑桑，李清华. 帕金森病与糖尿病相关机制研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘，2019，19(99)：117－118.
[3] 王孟迪，魏山山，姜宁，等. 金钗石斛对 MPTP 诱导 PD 小鼠的神经保护作用及机制研究[J]. 中国比较医学杂志，2022，32(1)：48－56.
[4] 朱斌，王策，徐青青. 地黄饮子联合认知康复治疗帕金森病轻度认知障碍临床研究[J]. 新中医，2021，53(17)：38－41.
[5] 成金枝，张俊龙，郭蕾，等. 阿尔茨海默病肾虚证病证结合动物模型的制备及验证[J]. 中华中医药杂志，2018，33(3)：1063－1066.
[6] 胡雅岑，徐倩，郭纪峰，等. MPTP 诱导的帕金森病小鼠模型黑质脑组织 DNA 甲基化研究[J]. 生物化学与生物物理进展，2015，42(3)：277－285.
[7] 李玉明，廖程娟，朱沅如，等. 白簕中性多糖对 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢的作用[J]. 中国民族民间医药，2022，31(20)：12－17.
[8] 于锦锦，薛雁，刘翠，等. 苍白球大麻素对大鼠运动行为的调控及受体机制[J]. 青岛大学学报(医学版)，2021，57(2)：178－181.
[9] 李艳荣，樊慧杰，柴智，等. 五子衍宗丸对帕金森病小鼠的神经保护及抗炎作用[J]. 中华中医药杂志，2020，35(7)：3623－3626.
[10] RYU W I，BORMANN M K，SHEN M Q，et al. Brain cells derived from Alzheimer's disease patients have multiple specific innate abnormalities in energy metabolism[J]. Mol Psychiatry，2021，26：5702－5714.
[11] VIHAR P，THOMAS R，SHAHRIAR S，et al. Energy metabolism deficits in Alzheimer disease[J]. Modern Pathology，2019，32.
[12] 文雯，高丽娟，魏江平，等. 能量代谢与阿尔茨海默病研究进展[J]. 世界科学技术－中医药现代化，2018，20(12)：2145－2149.
[13] DICK A P，HARIK S I，KLIP A，et al. Identification and characterization of the glucose transporter of the blood－brain barrier by cytochalasin B binding and immunological reactivity[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1984，81(22)：7233－7237.
[14] KOCH H，WEBER Y G. The glucose transporter type 1(Glut1) syndromes[J]. Epilepsy Behav，2019，91：90－93.
[15] 魏兰兰，任煦，赵妍妍，等. 易化型葡萄糖转运体的表达、分布及相关疾病的研究进展[J]. 生理学报，2019，71(2)：350－360.
[16] 衣雪洁，孙玉霞，姚婷婷，等. 急、慢性运动对 2 型糖尿病大鼠脂肪 PI3K/AKT/GLUT4 通路的影响[J]. 中国应用生理学杂志，2020，36(1)：12－16.
[17] WANG T N，WANG J，HU X G，et al. Current understanding of glucose transporter 4 expression and functional mechanisms[J]. World J Biol Chem，2020，11(3)：76－98.
[18] 刘佩. 益智健脑颗粒对 AD 模型大鼠海马胰岛素受体和葡萄糖转运蛋白 4mRNA 表达的影响[D]. 长沙：中南大学，2011.
[19] MISHRA N，BASU A，JAYAPRAKASH V，et al. Structure based virtual screening of GSK－3β：importance of protein flexibility and induced fit[J]. Bioorg Med Chem Lett，2009，19(19)：5582－5585.
[20] VALLÉE A，VALLÉE J N，LECARPENTIER Y. Potential role of cannabidiol in Parkinson's disease by targeting the WNT/β－catenin pathway，oxidative stress and inflammation[J]. Aging(Albany NY)，2021，13(7)：10796－10813.
[21] KHAN S S，JANRAO S，SRIVASTAVA S，et al. GSK－3β：an exuberating neuroinflammatory mediator in Parkinson's disease[J]. Biochem Pharmacol，2023，210：115496.
[22] DEMURO S，DI MARTINO R M C，ORTEGA J A，et al. GSK－3β，FYN，and DYRK1A：master regulators in neurodegenerative pathways[J]. Int J Mol Sci，2021，22(16)：9098.
[23] 杨远滨，沈沁暄. 帕金森病中医研究现状[J]. 光明中医，2018，33(20)：3104－3106.
[24] TONG J J，CHEN G H，WANG F，et al. Chronic acarbose treatment alleviates age－related behavioral and biochemical changes in SAMP8 mice[J]. Behav Brain Res，2015，284：138－152.
[25] 孙筱璇，薛莉，周畅，等. 晚期糖基化终末产物受体对帕金森病模型小鼠脑内酪氨酸羟化酶表达的影响[J]. 中国临床神经科学，2017，25(1)：1－7.
[26] 周丽丽，莫超然，刘心朗，等. 蒙药香青兰总黄酮对帕金森病模型小鼠的神经保护作用[J]. 中国比较医学杂志，2021，31(5)：41－46.
[27] 沈自尹，黄建华，林伟，等. 从整体论到系统生物学进行肾虚和衰老的研究[J]. 中国中西医结合杂志，2009，29(6)：548－550.

基于糖代谢的帕金森病肾精虚证生物学机制及地黄饮子的干预作用研究

（正文见 107－116 页）



注：肾小球囊上皮细胞增生（↑）脂滴（↑）肾小管扩张（↑）细胞碎片（↑）脂滴（↑）淋巴细胞（↑）成纤维细胞（↑）纤维细胞（↑）。

图 2　肾脏组织病理 HE 染色（×200）

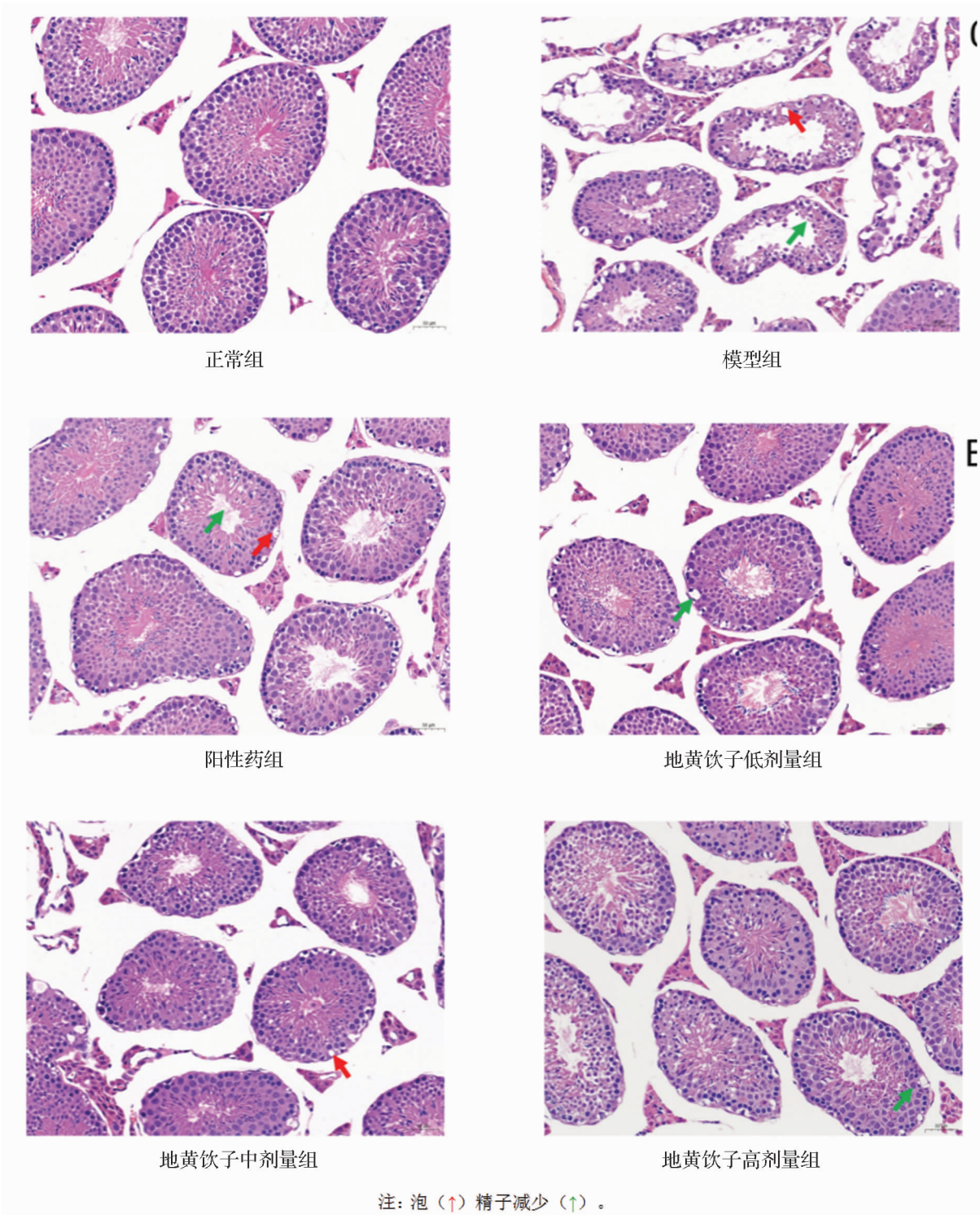


图 3　睾丸组织病理 HE 染色（×200）

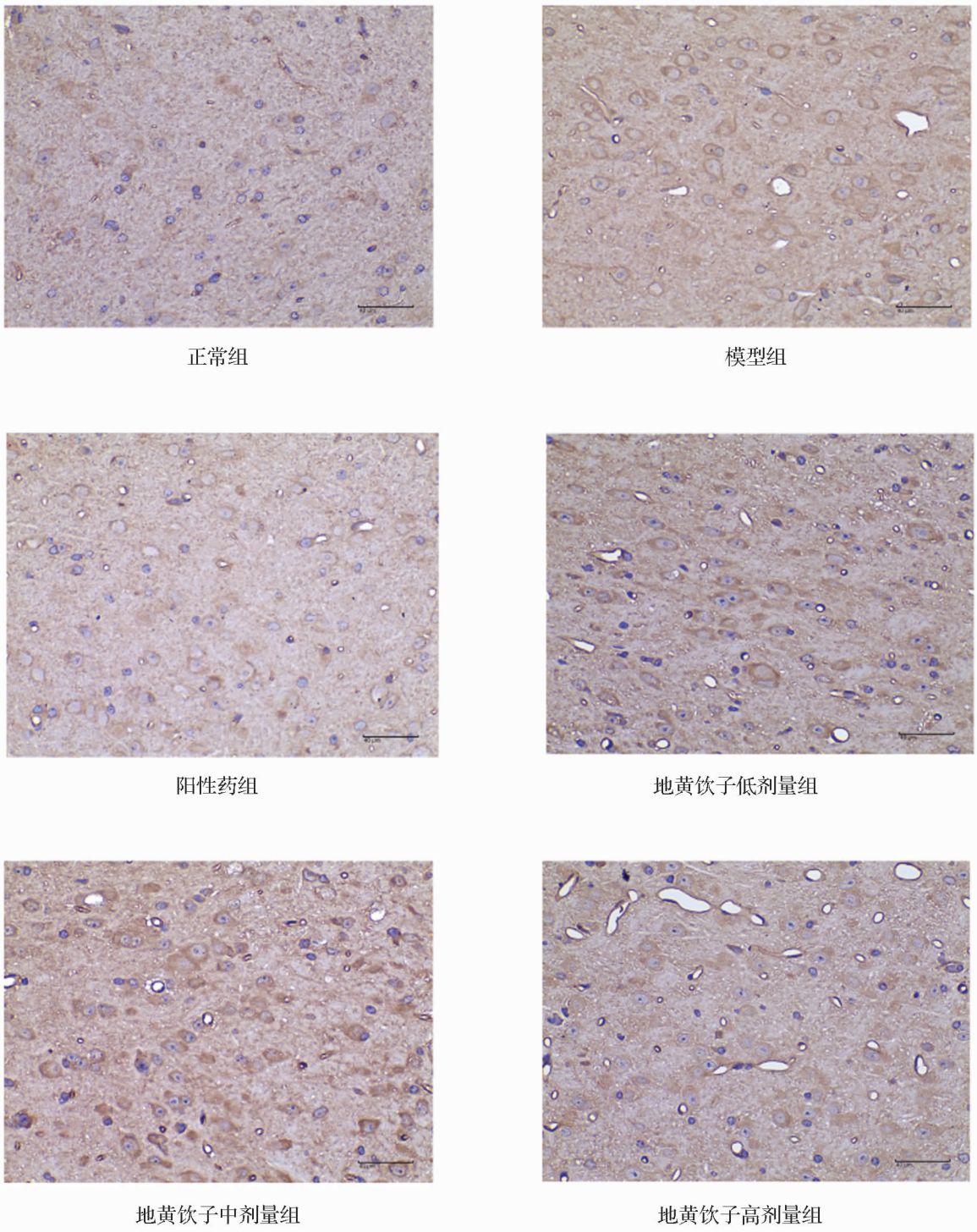


图 6 各组小鼠黑质内 GLUT1 免疫组化比较(×400)

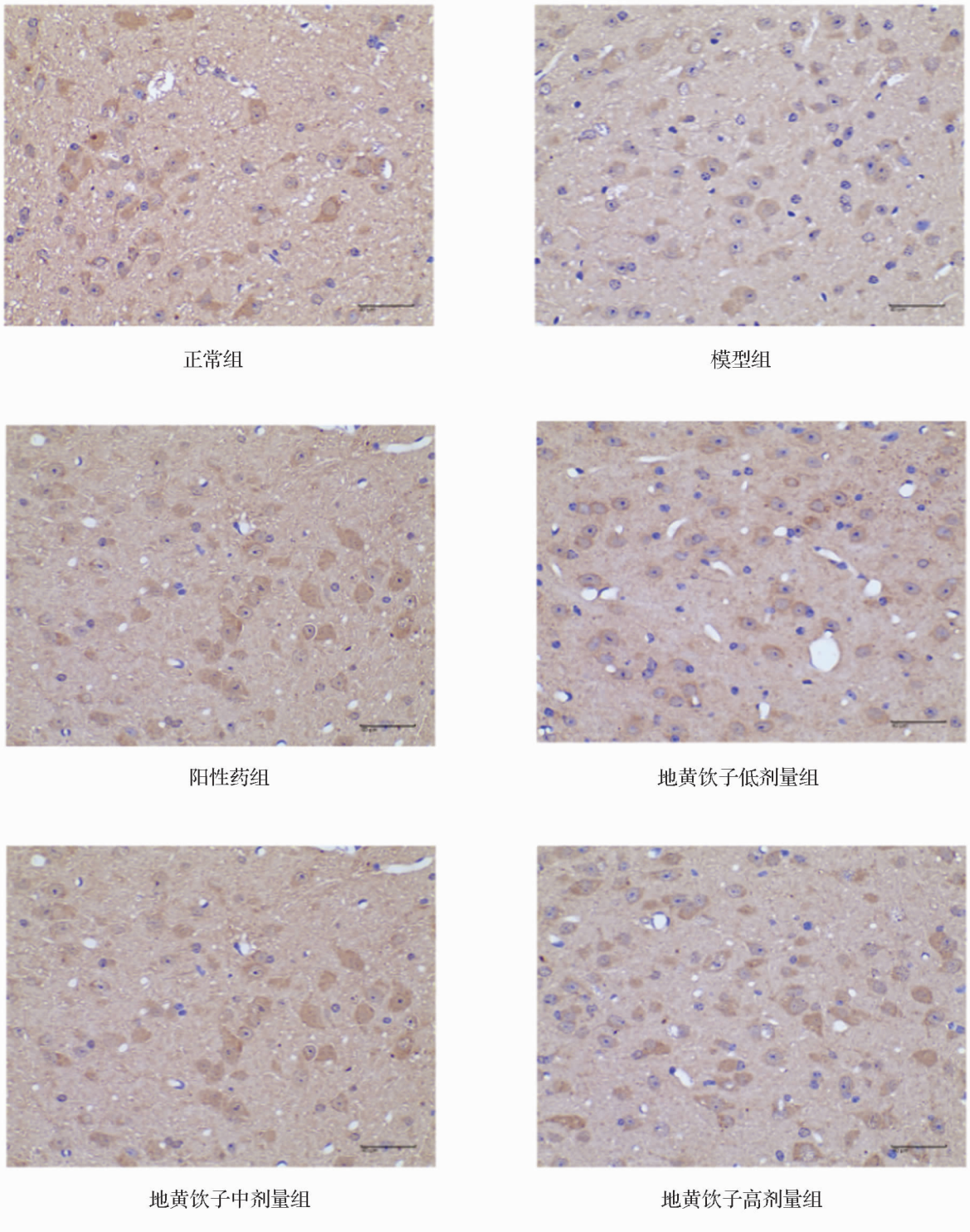
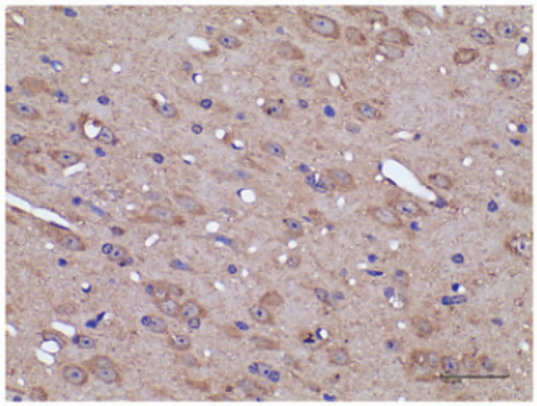
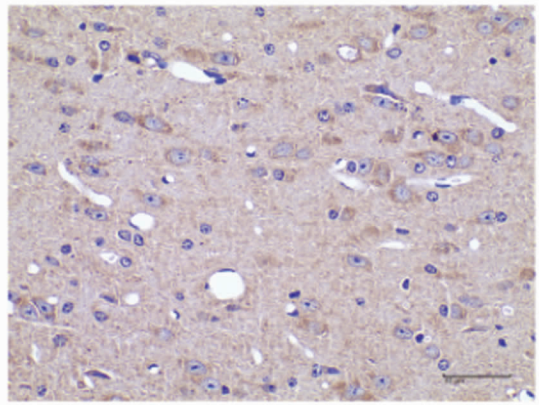


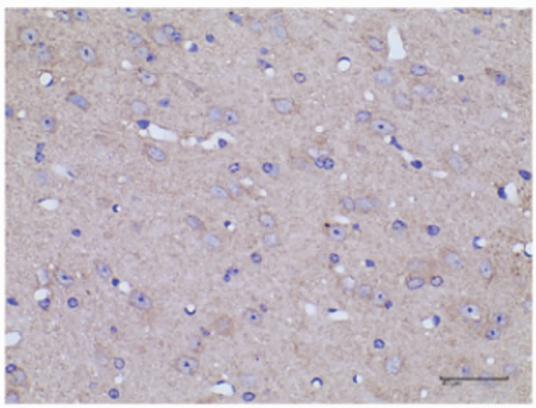
图 7 各组小鼠黑质内 GLUT3 免疫组化比较(×400)



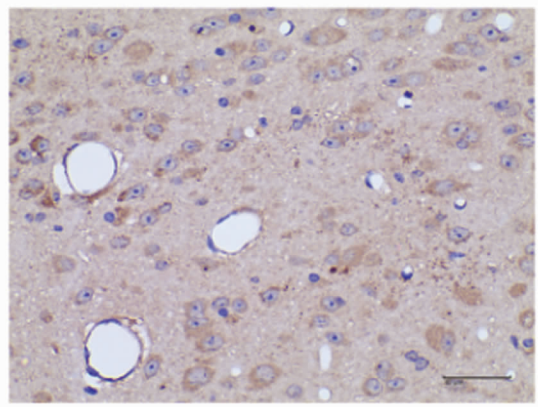
正常组



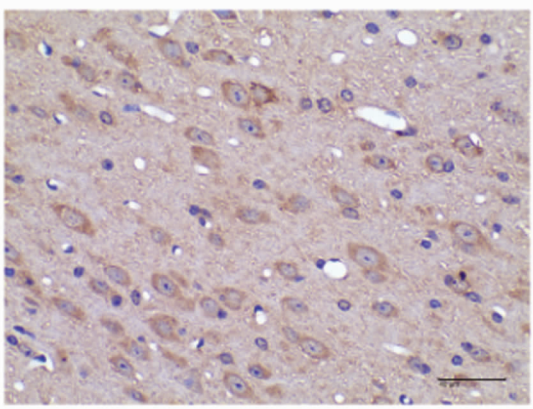
模型组



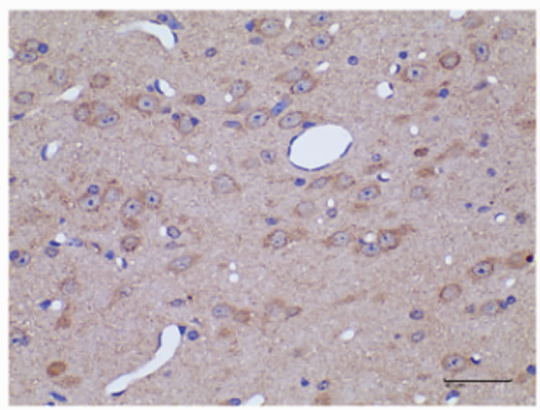
阳性药组



地黄饮子低剂量组



地黄饮子中剂量组



地黄饮子高剂量组

图 8 各组小鼠黑质内 GLUT4 免疫组化比较(×400)

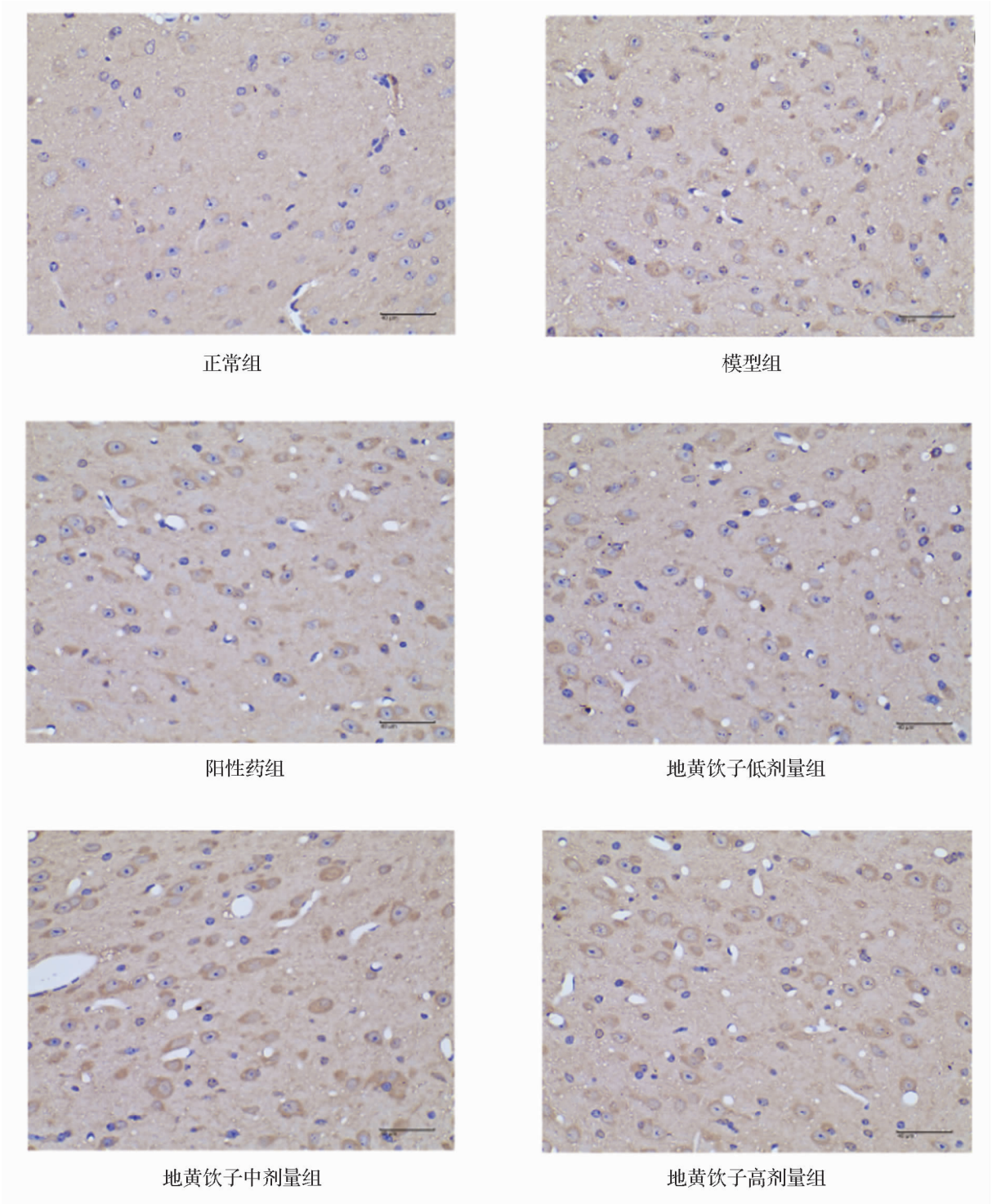


图 9 各组小鼠黑质内 GSK3β 免疫组化比较（×400）

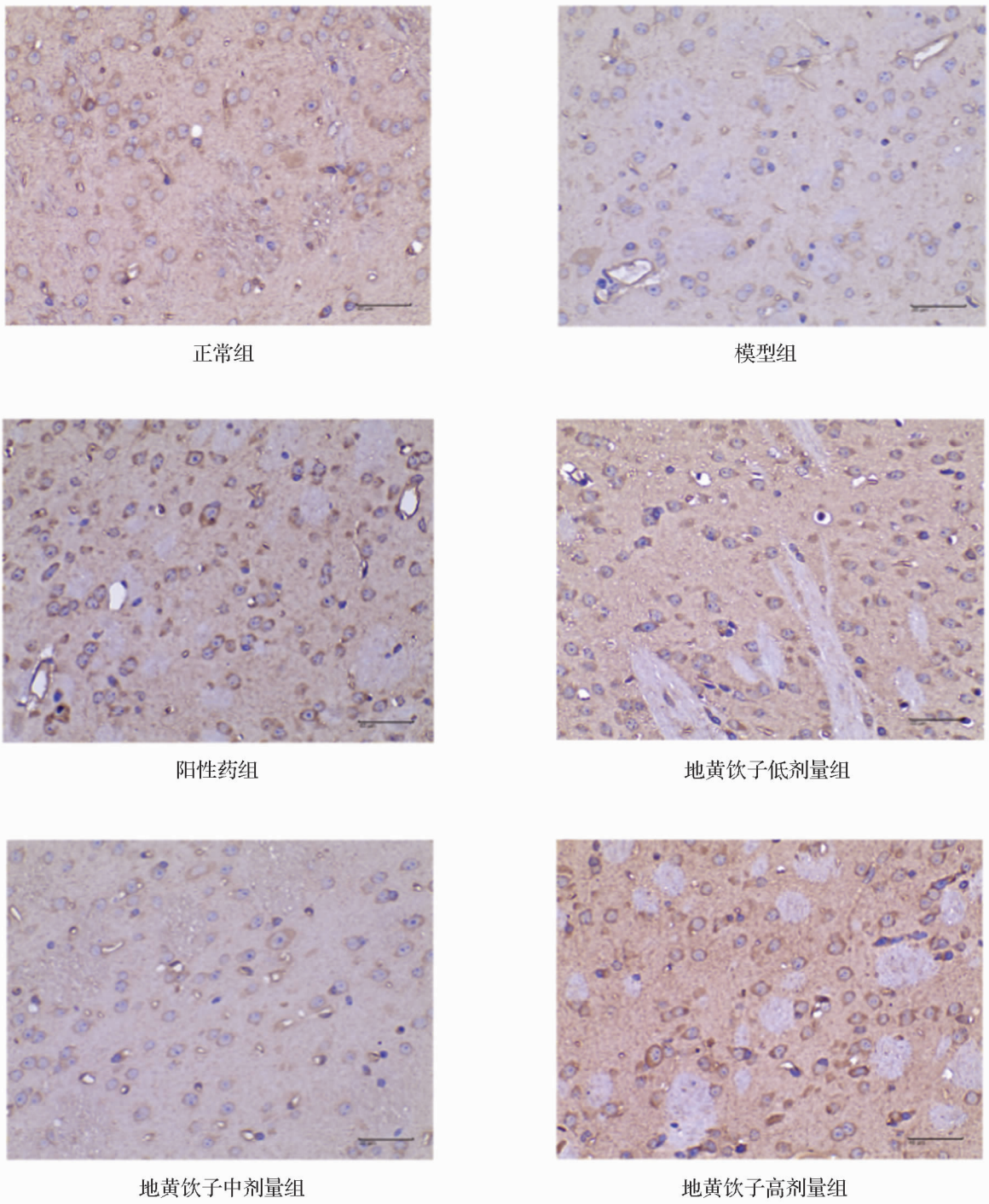


图 10 各组小鼠纹状体内 GLUT1 免疫组化比较(×400)

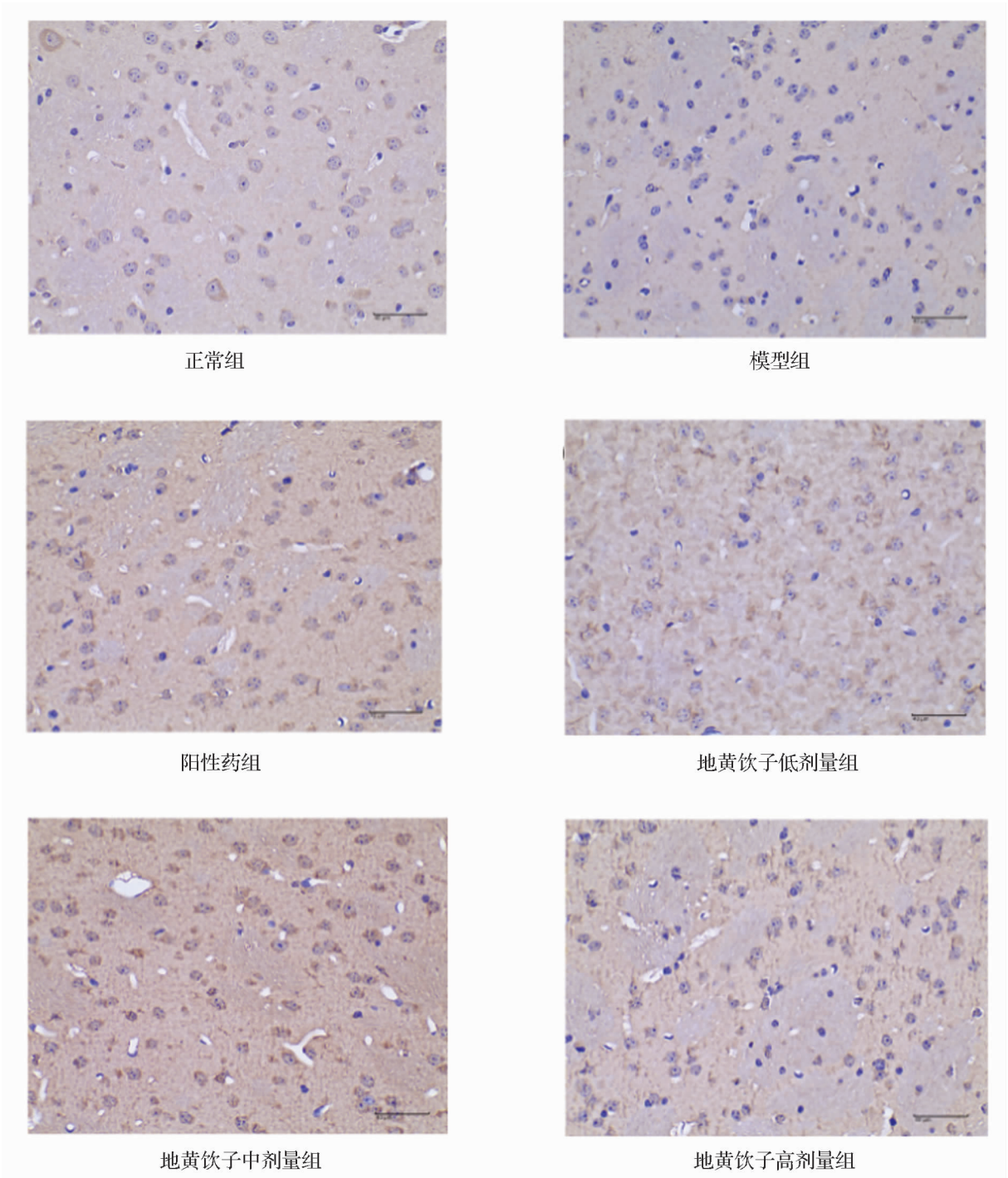
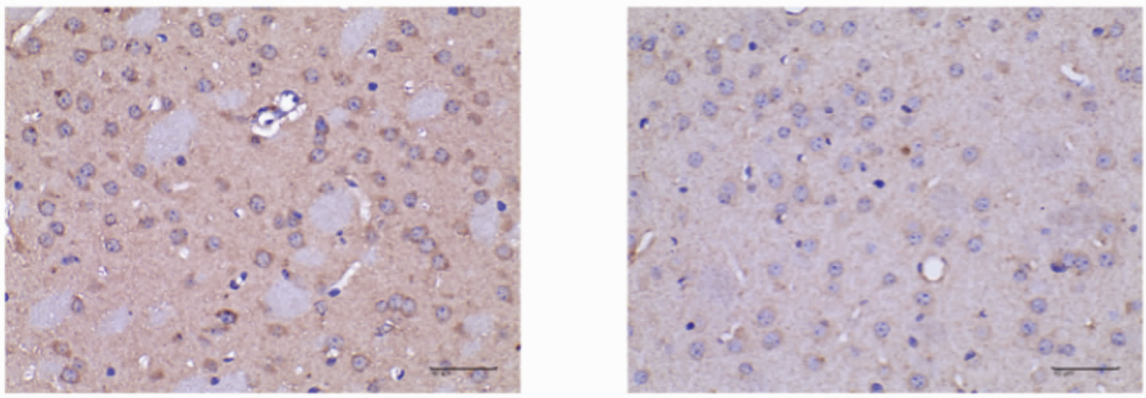
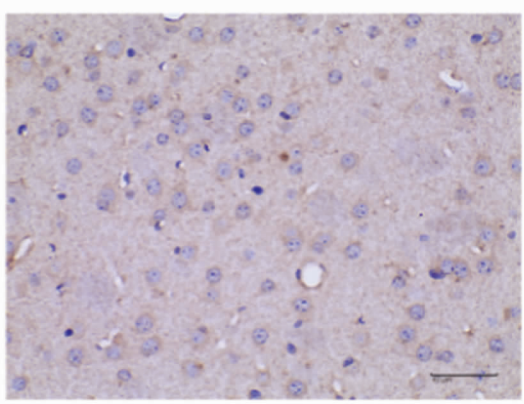


图 11 各组小鼠纹状体内 GLUT3 免疫组化比较(×400)

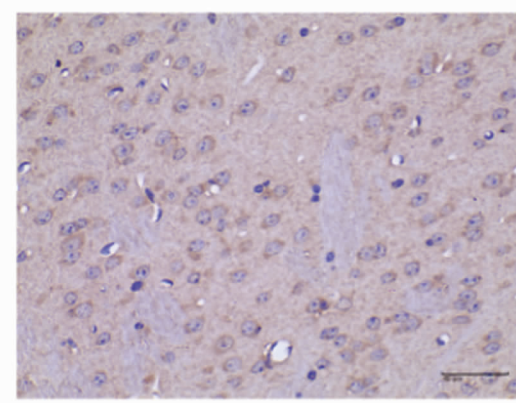


正常组

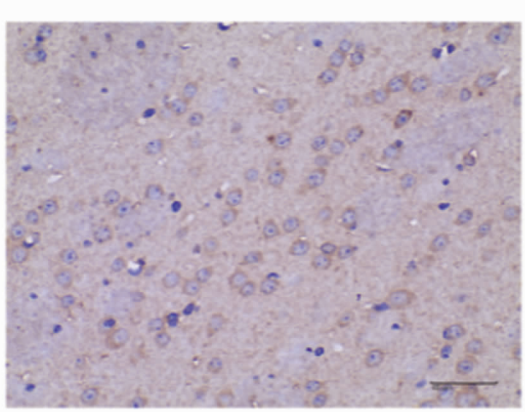
模型组



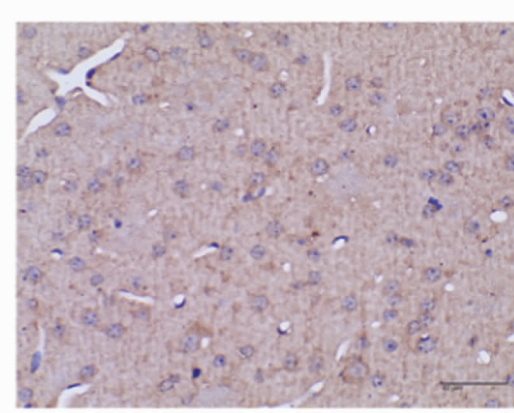
阳性药组



地黄饮子低剂量组

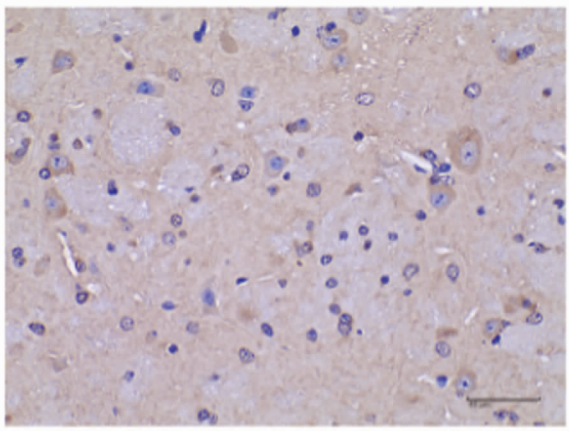


地黄饮子中剂量组

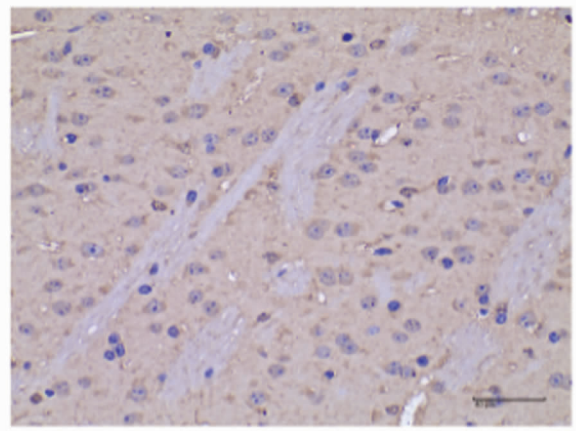


地黄饮子高剂量组

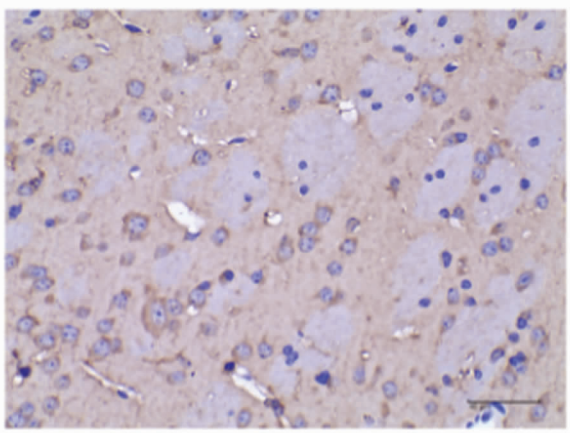
图 12 各组小鼠纹状体内 GLUT4 免疫组化比较(×400)



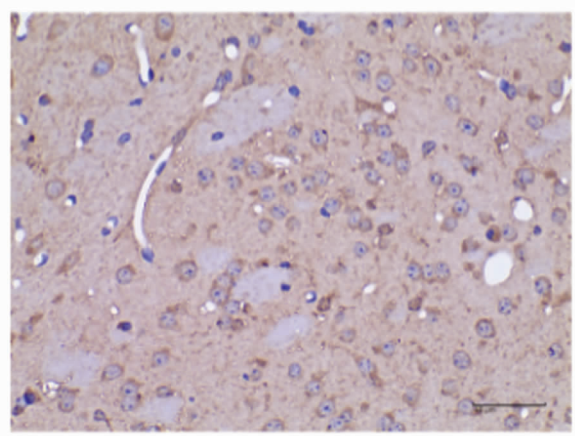
正常组



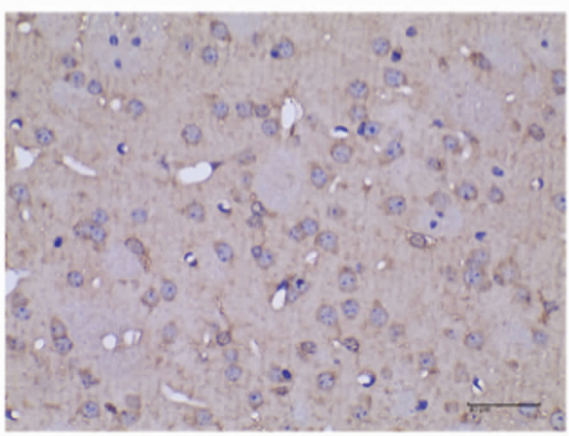
模型组



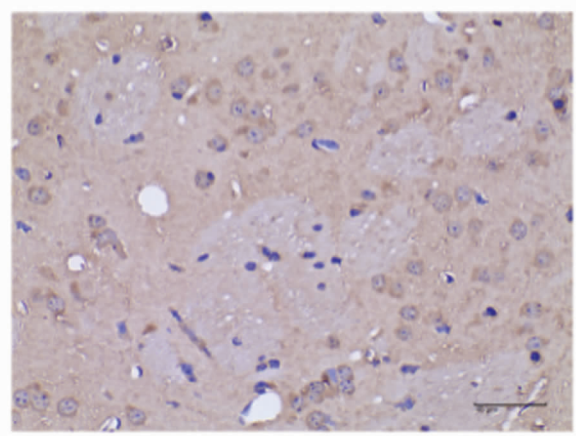
阳性药组



地黄饮子低剂量组



地黄饮子中剂量组



地黄饮子高剂量组

图 13 各组小鼠纹状体内 GSK3β 免疫组化比较(×400)