DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.06.022

毛蕊花糖苷对帕金森病小鼠多巴胺细胞保护作用的蛋白组学研究

夏欢[1],杨珊[1],朱筱潇[2],王子豪[1],李沛珊[1],蔡倩[3],杨新玲[4]
(1.新疆医科大学第二附属医院,新疆 乌鲁木齐 830063;2.陕西中医药大学,陕西 咸阳 712046;
3.新疆医科大学附属肿瘤医院,新疆 乌鲁木齐 830011;4.新疆医科大学,新疆 乌鲁木齐 830017)

摘要:目的 探索毛蕊花糖苷(Verbascoside,VB)对帕金森病(Parkinson's disease,PD)小鼠多巴胺细胞保护作用的机制。方法 纳入63只C57/BL雄性小鼠为实验对象,随机分为空白对照组、MPTP组、10 mg/kg组、30 mg/kg组、60 mg/kg组、120 mg/kg组、180 mg/kg组,每组9只。造模成功后采用矿场、爬杆、悬挂实验评估小鼠行为学改变。采用苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin,HE)、尼氏染色评估小鼠黑质区神经元计数。采用免疫组化和免疫荧光染色分别评估黑质区TH阳性、阳性细胞计数。采用Western blotting检测小鼠黑质区酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase,TH)蛋白的表达情况。采用HE染色评估肝脏和肾脏细胞形态和细胞计数。最后筛选的最佳剂量组黑质组织进行蛋白组学分析。结果 (1)矿场实验中,120 mg/kg组总路程和中央区的路程均高于MPTP组和其他各浓度梯度组(均$P<0.05$);爬杆实验中,120 mg/kg组爬杆时间均低于MPTP组和其他各浓度梯度组(均$P<0.05$);悬挂实验中,120 mg/kg组悬挂评分均高于MPTP组和10 mg/kg组(均$P<0.05$)。(2)HE染色、尼氏染色和免疫组化中,120 mg/kg组细胞计数、棕褐色像素占比均高于MPTP组和其他各浓度梯度组(均$P<0.05$)。(3)免疫荧光中,120 mg/kg组平均荧光强度均高于MPTP组和其他各浓度梯度组(均$P<0.05$)。(5)Western blotting中,TH在120 mg/kg组小鼠中的相对表达量均高于MPTP组和其他各浓度梯度组(均$P<0.05$)。(6)蛋白组学分析显示120 mg/kg组和MPTP组比较,具有统计学差异的蛋白质合计181个,其中上调蛋白83个,下调蛋白98个;亚细胞定位于细胞核的差异蛋白最多有85个,且基因本体(Gene Ontology, GO)功能分析显示最多有6个与免疫直接相关的生物过程(Biological Process, BP);KEGG通路分析显示与精氨酸生物合成的富集度水平最高(均$P<0.05$)。结论 120 mg/kg的VB对PD小鼠的DA神经元具有保护作用,且该保护作用可能与包括精氨酸生物合成在内的多种生物过程有关。

关键词:帕金森病;毛蕊花糖苷;酪氨酸羟化酶;保护作用
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)06-0126-10

Proteomics Study on Protection of Dopamine Cell in Mice with Parkinson's Disease

XIA Huan[1],YANG Shan[1],ZHU Xiaoxiao[2],WANG Zihao[1],LI Peishan[1],CAI Qian[3],YANG Xinling[4]
(1.The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University,Urumqi 830063,Xinjiang,China;
2.Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine,Xianyang 712046,Shaanxi,China;
3.Tumor Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University,Urumqi 830011,Xinjiang,China;
4.Xinjiang Medical University,Urumqi 830017,Xinjiang,China)

Abstract:*Objective* To explore the mechanism of verbascoside(VB) on dopamine cell protection in the mice with Parkinson's disease(PD). *Methods* A total of 63 C57/BL male mice were enrolled as the experimental subjects and randomly divided into blank control group,1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP) group,10 mg/kg group,30 mg/kg group,60 mg/kg group,120 mg/kg group and 180 mg/kg group,with 9 mice in each group. After successful modeling,the behavioral changes of the mice were evaluated by mining,climbing pole and hanging experiments. Hematoxylin-eosin(HE) and Nissl staining were used to evaluate the neuron counts in the substantia nigra of the mice. Immunohistochemistry method and immunofluorescence staining were used to evaluate the tyrosine hydroxylase(TH)-positive and positive cell counts in the substantia nigra,respectively. Western blotting was used to detect the expression of TH protein in the substantia nigra of the mice. HE staining was used to evaluate liver and kidney cell morphology and cell count. Finally,the optimal dose group screened for proteomic analysis was performed. *Results* (1) In the mine experiment,the total distance and the distance of the 120 mg/kg group were higher than those of the MPTP group and other concentration gradient groups(all $P<0.05$). In the pole climbing experiment,the pole climbing time of the 120 mg/kg group was both higher than that of the MPTP group and other concentration gradient groups(all $P<0.05$). In the pole climbing experiment,the pole climbing time of the 120 mg/kg group was both higher than that of the pole

基金项目:国家自然科学基金项目(82371258);新疆维吾尔自治区重点研发任务专项(2023B03003);新疆维吾尔自治区天山英才-科技创新领军人才项目(2022TSYCLJ0066);新疆维吾尔自治区研究生科研创新项目(XJ2024G160)
作者简介:夏欢(1987-),男,湖北咸宁人,主治医师,博士在读,研究方向:帕金森病的诊断与治疗。
通讯作者:杨新玲(1967-),女,新疆乌鲁木齐人,主任医师、教授,博士研究生导师,研究方向:帕金森病发病机制。E-mail:poplar862@163.com。

climbing experiment. The suspension scores of the MPTP group and the other concentration gradient groups (all $P<0.05$). In the suspension experiment, the suspension scores of the 120 mg/kg group were higher than those of the MPTP group and the 10 mg/kg group (all $P<0.05$). (2) In HE staining, Niss - type staining and immunohistochemistry method, the cell count and tan pixel proportion of the 120 mg/kg group were higher than those of the MPTP group and other concentration gradient groups (all $P<0.05$). (3) In immunofluorescence, the average fluorescence intensity of the 120 mg/kg group was higher than that of the MPTP group and other concentration gradient groups (all $P<0.05$). (5) In Western blotting, the relative expression of TH in the 120 mg/kg group was higher than that in the MPTP group and other concentration gradient groups (all $P<0.05$). (6) Proteomic analysis showed that compared with the 120 mg/kg group and the MPTP group, there were 181 proteins with statistical differences, including 83 up - regulated proteins and 98 down - regulated proteins. There were up to 85 differential proteins localized to the nucleus of subcellular nucleus, and gene ontology (GO) functional analysis showed that there were up to 6 biological processes directly related to immunity (BP). KEGG pathway analysis showed the highest level of enrichment with arginine biosynthesis (all $P<0.05$). *Conclusion* VB with the dose of 120 mg/kg has a protective effect on DA neurons in PD mice, and this protective effect may be related to a variety of biological processes including arginine biosynthesis.

Keywords: Parkinson's disease; verbascoside; tyrosine hydroxylase; protective function

帕金森病(Parkinson's disease, PD)属于常见中枢神经系统退行性疾病之一。中脑黑质区多巴胺细胞(Dopamine, DA)的突触功能失调、神经元不可逆损伤已成为PD的病理基础[1-2]。毛蕊花糖苷(Verbascoside, VB)是一种天然的水溶性苯乙醇类糖苷化合物,最初由毛蕊蛋白中分离出来,存在于多种药用植物中,如肉苁蓉、桂花、芦荟、地黄等[3]。研究表明VB作为一种活性苯乙醇苷,能够有效渗透过血脑屏障[4],提高缺血再灌注小鼠大脑神经元的细胞活力,减少神经元损伤和细胞死亡[5]。在D-半乳糖构建的阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型小鼠中,30、60、120 mg/kg的VB均能够缩短小鼠在水迷宫定位航行实验中寻找水下平台的时间,高剂量VB还能够增加神经元数量,证实了VB具有神经保护和改善记忆的作用[6]。酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH)是中脑黑质区DA的特异性蛋白分子,因此本研究将通过不同浓度梯度VB干预PD小鼠模型后多个水平观察TH差异,然后进一步通过蛋白组学分析,探索VB发挥抗PD机制的最佳保护剂量和相关保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选择SPF级C57/BL小鼠63只,6~8周龄,体质量约(20±2)g,购自斯贝福北京生物技术有限公司,生产许可证:SCXK(京)2019-0010。饲养地点为新疆医科大学实验动物中心,饲养室温维持在20~24 ℃,自由饮食水。本研究通过新疆医科大学伦理委员会批准(伦理审批号:IACUC-20230228-33)。

1.1.2 试剂与仪器 VB(批号:61276-17-3,成都瑞芬斯生物科技有限公司);1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)(批号:23007-85-4,Sigma公司);一抗TH、GAPDH(货号分别为:ab137869、ab181602,美国Abcam公司)、二抗CY3标记山羊抗兔(货号:GB21303,武汉塞维尔科技有限公司)。苏木素染液和伊红染液(货号:BL700B-1和BL700B-2,北京兰杰柯科技有限公司);尼氏染色液(货号:G1436,北京索莱宝科技有限公司);旷场分析系统(上海吉量软件有限公司);正置荧光拍照显微镜(型号:Eclipse Ci-L,Nikon公司);蛋白电泳仪、化学发光分析仪(北京六一生物有限公司);酶标分析仪(型号:RT-6100,Rayto公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 小鼠被随机分为空白对照组、MPTP组、10 mg/kg组、30 mg/kg组、60 mg/kg组、120 mg/kg组、180 mg/kg组,每组9只小鼠。空白对照组:未经任何处理的C57小鼠。MPTP组:单次腹腔注射30 mg/kg MPTP溶液,2次/周,连续给予5周。10~120 mg/kg组:VB的给药方式参考PENG等研究[7],分别进行10、30、60、120、180 mg/(kg·d)的VB,灌胃1周后,再腹腔注射30 mg/kg的MPTP,2次/周,连续给予5周,同时期继续原剂量的VB灌胃干预,合计VB灌胃6周。

1.2.2 小鼠行为学评价 旷场实验:采用旷场实验评估小鼠行为学改变,主要方法为在大小50 cm×30 cm×20 cm的旷场实验箱中,将小鼠置于箱角处,记录5 min内小鼠的运动功能改变,主要评估指标包括总路程(单位:cm)、和中央区的路程(单位:cm)。爬杆实验:提前制作工具,将一直径为2 cm的圆形海绵压紧,用纱布包裹固定在一根直径约1 cm长度约50 cm的木棍顶端,然后将该木棍垂直固定在一个平板上面。将直径约1 cm且长度约50 cm的木棍垂直固定于平板上,然后将小鼠轻置木棍顶端,记录小鼠由木棍顶端爬行至平板上的时间(单位:s)。悬挂实验:将直径约0.2 cm的金属铁丝水平悬挂固定于两侧箱壁,距离水平面约25 cm,然后将小鼠以头上尾下的方式双前爪抓住金属丝,观察10 s进行评分,评分标准:小鼠四肢均能抓住金属丝计3分;双前肢可以悬挂,但后肢不可以抓住金属丝计2分;四肢均无法抓住金属丝计1分。所有小鼠均测3次,间隔10 min,取平均值。

1.2.3 苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin, HE)染色 戊巴比妥(1%)腹腔麻醉小鼠后,取全脑组织、肝脏和肾脏组织进行多聚甲醛(4%)固定备用,依次进行切片、加热、脱蜡、脱水,然后再苏木精浸泡染色6 min,1%盐酸乙醇洗30 s,0.5%伊红液染色2 min,最后脱水并树胶封固,Image J软件进行细胞计数。

1.2.4 尼氏染色 将脑切片置于0.5%甲苯胺蓝中室温下染色30 min,蒸馏水冲洗5 min后依次浸入70%、80%、95%的酒精中,每次约5 min,特殊分色液中分色25 s,然后浸入100%酒精3 min,二甲苯20 min,最后中性树胶封片。Image J软件进行细胞计数。

1.2.5 免疫组化 脑组织切片脱蜡和水化后,依次EDTA微波炉15 min,冷却到室温,然后用PBS溶液洗涤3次,每次5 min,用笔画圈,圈内加内源性过氧化物酶,室温10 min,然后PBS洗3次。然后封闭血清37 ℃孵育30 min,滴加TH一抗(稀释倍速为1∶300),常温37 ℃孵育60 min后PBS溶液洗3次,加入二抗IgG 37 ℃,孵育20 min,PBS溶液洗3次,最后

DAB 孵育 5 ~ 8 min,苏木素染色 5 ~ 8 min,分化乙醇 10 s,氨水 10 s,蒸馏水冲洗 1 ~ 2 min,最后 70%、80%、95% 的酒精、二甲苯脱水,最后中性树胶封片,TH 阳性细胞胞质染成棕褐色,Image J 软件分析棕褐色像素占比面积。

1.2.6 免疫荧光 切片脱蜡后乙醇脱水、用 5% BSA 按一定比例稀释抗体,切片中滴加一抗包括 TH(稀释比分别为 1∶500)工作液,4 ℃过夜。PBS 洗 3 次,每次 5 min,切片滴加适量二抗 CY3 标记山羊抗兔抗体(稀释比分别为 1∶100)工作液,37 ℃水浴锅,避光孵育 40 min,滴加 DAPI 染核,室温避光孵育 30 min,最后用抗荧光淬灭封片剂封片,显微镜下观察拍照,Image J 软件分析平均荧光强度。

1.2.7 Western blotting 实验 麻醉后取小鼠黑质组织,加入 RIPA 裂解配置液,按 BCA 说明书进行蛋白浓度定量,100℃蛋白变性 10 min,依次凝胶电泳、转膜、封闭、一抗孵育(TH、GAPDH)、二抗(CY3 标记山羊抗兔)孵育后曝光显色;Image J 软件采集条带上的灰度值。

1.2.8 蛋白组学分析 取最佳浓度 VB 组 MPTP 组黑质组织进行 DIA(Data - independent acquisition)质谱分析,先采用纳升流速 Vanquish Neo 系统(赛默飞)进行色谱分离,纳升级高效液相色谱分离后的样品用 Astral 高分辨质谱仪(Thermo Scientific)进行 DIA(数据非依赖)质谱分析。检测模式:正离子,母离子扫描范围为 380 ~ 980 m/z,一级质谱分辨率为 240 000 at 200 m/z,Normalized AGC Target 为 500%,Maximum IT 为 5 ms。MS2 采用 DIA 数据采集模式,设置 299 个扫描窗口,Isolation Window 为 2 m/z,HCD Collision Energy 为 25 ev,Normalized AGC Target 为 500%,Maximum IT 为 3 ms。

1.3 统计学方法

SPSS 23.0 分析软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布两组间计量资料比较采用 LSD - t 法检验,多组间计量资料比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。蛋白组学对差异蛋白质筛选中,以表达倍数(Fold Change, FC) > 1.5 倍(上调大于 1.5 倍或下调小于 0.67 倍)且 P value < 0.05(T - test 或其他)为标准,得到比较组间的上调、下调蛋白质数目;聚类分析采用层次聚类算法(Hierarchical Cluster)差异蛋白质进行分组归类,以倍数变化 > 1.5 倍且 P value < 0.05(T - test 或其他)的筛选标准;亚细胞结构定位采用预测软件 CELLO(http://cello.life.nctu.edu.tw)分析;基因本体(Gene Ontology, GO)分析采用 Blast2Go(https://www.blast2go.com/)软件进行 GO 功能注释;通路分析通过 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库对蛋白质进行解析注释。

2 结果

2.1 各组小鼠行为学比较

旷场实验结果显示空白对照组、MPTP 组、10 mg/kg 组、30 mg/kg 组、60 mg/kg 组、120 mg/kg 组、180 mg/kg 组的总路程差异有统计学意义($F = 16.345$, $P < 0.001$),其中 120 mg/kg 组总路程均高于 MPTP 组和其他各浓度梯度组,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$),见插页Ⅻ图 1A、B。空白对照组、MPTP 组、10 mg/kg 组、30 mg/kg 组、60 mg/kg 组、120 mg/kg 组、180 mg/kg 组的中央区的路程差异有统计学意义($F = 4.736$, $P = 0.001$),其中 120 mg/kg 组中央区的路程均高于 MPTP 组、10 mg/kg 组、30 mg/kg 组、60 mg/kg 组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),见插页Ⅻ图 1A、C。爬杆实验结果显示:空白对照组、MPTP 组、10 mg/kg 组、30 mg/kg 组、60 mg/kg 组、120 mg/kg 组、180 mg/kg 组的爬杆时间差异有统计学意义($F = 27.752$, $P < 0.001$),其中 120 mg/kg 组爬杆时间均低于 MPTP 组和其他各浓度梯度组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),见插页Ⅻ图 1D。悬挂实验结果显示:空白对照组、MPTP 组、10 mg/kg 组、30 mg/kg 组、60 mg/kg 组、120 mg/kg 组、180 mg/kg 组的悬挂评分差异有统计学意义($F = 7.253$, $P < 0.001$),其中 120 mg/kg 组悬挂评分均高于 MPTP 组和 10 mg/kg 组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),见插页Ⅻ图 1E。

2.2 各组小鼠黑质神经元细胞的 HE 染色和尼式染色

形态上,40 倍镜视野下 HE 阳性的细胞核呈深蓝色,细胞数量方面,空白对照组、MPTP 组、10 mg/kg 组、30 mg/kg 组、60 mg/kg 组、120 mg/kg 组、180 mg/kg 组的 HE 阳性细胞计数差异有统计学意义($F = 32.539$, $P < 0.001$),其中 120 mg/kg 组细胞计数均高于 MPTP 组和其他各浓度梯度组,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$),见插页Ⅻ图 2A、B。40 倍镜视野下尼氏染色下神经元胞质中的尼氏小体被染色深蓝色,细胞数量方面,空白对照组、MPTP 组、10 mg/kg 组、30 mg/kg 组、60 mg/kg 组、120 mg/kg 组、180 mg/kg 组的 HE 阳性细胞计数差异有统计学意义($F = 26.227$, $P < 0.001$),其中 120 mg/kg 组细胞计数均高于模型组和其他各浓度梯度组,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$),见插页Ⅻ图 2A、C。

2.3 各组小鼠 TH 免疫组化染色

形态上,4 倍镜和 20 倍镜视野下 TH 阳性的细胞质呈棕褐色,棕褐色像素占比面积差异方面,空白对照组、MPTP 组、10 mg/kg 组、30 mg/kg 组、60 mg/kg 组、120 mg/kg 组、180 mg/kg 组间差异有统计学意义($F = 142.138$, $P < 0.001$),其中 120 mg/kg 组棕褐色像素占比面积均高于 MPTP 组和其他各浓度梯度组,差异有统计学意义(均 $P < 0.001$),见插页Ⅻ图 2A、D。

2.4 各组小鼠 TH 阳性细胞的免疫荧光差异

形态上,10 倍镜和 40 倍镜视野下 TH 阳性的细胞质呈绿色荧光。平均荧光强度的差异方面,空白对照组、MPTP 组、10 mg/kg 组、30 mg/kg 组、60 mg/kg 组、120 mg/kg 组、180 mg/kg 组间差异有统计学意义($F = 32.427$, $P < 0.001$),其中 120 mg/kg 组平均荧光强度均高于 MPTP 组和其他各浓度梯度组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),见插页Ⅻ图 3A - C。

2.5 各组小鼠 TH 蛋白的相对表达量差异

Western blotting 结果显示 TH 在 120 mg/kg 组小鼠中的相对表达量均高于 MPTP 组和其他各浓度梯度组,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$),见插页Ⅻ图 3D、E。

2.6 各组小鼠肝、肾细胞的 HE 染色差异

由于 VB 为灌胃给药,经肝脏、肾脏进行代谢,因此本研究评估了其对小鼠的主要的代谢脏器(肝脏、肾脏)病理学的影响,结果显示,所有纳入研究的小鼠均未见死亡现象,存活率为 100%,且空白对照组、MPTP 组和 120 mg/kg 组间细胞形态未见明显的病理变化,且细胞计数方面,三组间肝细胞、肾细胞计数差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),结果见插页ⅩⅫ图 4。

2.7 蛋白组学的差异蛋白计数分析

120 mg/kg 组和 MPTP 组每组取 3 个样本进行重复实验,结果显示 120 mg/kg 组和 MPTP 组肽段分别为 90 470.00 ± 324.52,89 524.33 ± 3418.28,差异无统计学意义($t = 0.468$, $P = 0.664$);120 mg/kg 组和 MPTP 组蛋白质分别为 7 763.67 ± 41.79,7 753.67 ± 99.11,差异无统计学意义($t = 0.161$, $P =$

0.880)。120 mg/kg 组和 MPTP 组比较,具有统计学差异的蛋白质合计 181 个,其中上调蛋白 83 个,下调蛋白 98 个,结果见插页ⅩⅫ图 5。

2.8 蛋白组学的亚细胞定位分析

对所有差异表达的蛋白质进行亚细胞定位分析,结果显示定位于细胞核的差异蛋白数量最多(85 个),其中上调的蛋白 40 个,下调的 45 个,结果见插页ⅩⅩⅢ图 6。

2.9 蛋白组学的结构域分析

结构域预测对于研究蛋白关键功能区域及其发挥的潜在生物学作用具有重要意义。结果显示排名前 5 的富集结构域分别为胰蛋白酶结构域、血清淀粉样蛋白 A、中间丝蛋白、免疫球蛋白 V 区结构域、黄素单加氧酶,结果见插页ⅩⅩⅣ图 7。

2.10 蛋白组学的基因本体(Gene Ontology, GO)功能分析

通过 GO 对所有显著差异表达蛋白质进行注释. 一般情况下,某一功能类别对应的差异表达蛋白质数目越多,说明该功能越重要,需要重点关注或者进行后续深入机制的探讨,因此,本研究对 BP 类 GO 功能注释分析显示与免疫直接相关的生物过程(Biological Process, BP)最多(6 个),包括 B 细胞的激活、补体激活、B 细胞的增殖、适应性免疫反应、体液免疫反应、先天免疫反应,结果见插页ⅩⅩⅤ图 8。

2.11 KEGG 信号通路分析

本研究通过 KEGG 数据库对显著差异的蛋白质进行解析注释。结果显示表达上调的前 3 个 KEGG 信号通路分别为精氨酸生物合成、军团病、癌症的转录失调;表达下调的前 3 个 KEGG 通路分别为肾素 - 血管紧张素系统、糖胺聚糖生物合成 - 硫酸乙酰肝素、病毒 - 腺病毒。其中,表达上调中的精氨酸生物合成的富集度的显著性水平最高($P < 0.001$),且该生物合成与促进 M2 抗炎型小胶质细胞极化有关,结果见插页ⅩⅩⅤ图 9。

3 讨论

血脑屏障是中枢神经系统抵御外来有毒物质、维持脑稳态的一道天然屏障,VB 是否能够渗透过血脑屏障到达脑部也是考察神经变性疾病治疗药物的重要指标。利用斑马鱼作为实验模型,用 2000 μg/mL 浓度 VB 处理斑马鱼胚胎 4 d 后,研究人员能够在胚胎头部检测到 VB,而当给成年斑马鱼腹腔注射 200 mg/kg 浓度 VB 时,注射完毕 15 min 后即可在其脑组织中检测到 VB[8]。研究人员发现采用同样的方法在大鼠的脑组织中也能够检测到 VB[9],且 VB 在大脑不同区域如脑干、大脑皮层、小脑、海马和纹状体等分布较为均匀。CUI 等[10]对 VB 灌胃后的大鼠血浆、胆汁、尿和粪便进行分析,结果发现部分原型 VB 会被代谢成一系列的小分子化合物如咖啡酸和羟基酪醇,进而被血液吸收。剩余的原型 VB 将经由肠内皮细胞进入肝门静脉,被肝脏代谢后再进行Ⅱ相代谢。而在血浆中的主要代谢产物为羟基酪醇硫酸盐(> 56%)和 3 - 羟苯丙酸硫酸盐(> 21%),口服 VB 时实际发挥药理作用的可能是 VB 的Ⅱ相代谢产物,因为既往也有研究证实羟基酪醇和 3 - 羟苯丙酸具有抑制蛋白糖基化、抗氧化和神经保护的作用。此外,羟基酪醇还能够抑制 Aβ 聚集,改善 APP/PS1 小鼠的认知功能[11]。通过上述研究显示 VB 具有良好的血脑屏障穿透性,以及相关药理证据也支持 VB 的神经保护作用,因此,基于 VB 构建的动物模型在抗 AD、PD 等的机制研究中具有相对稳定的药物浓度和有效分子基础。

由于 VB 具有可以穿透血脑屏障的特性[12-13],目前在许多临床前研究中,VB 已被证明具有抗炎、抗肿瘤等多种作用[14-16]。不同实验中使用的 VB 的剂量从 2.5 mg/kg 到 240 mg/kg 不等,这可能会影响实验结果。因此,寻找满足不同实验要求的最佳 VB 浓度是一个值得进一步探索的方向。在本研究中通过不同浓度梯度构建的 VB 干预模型中,120 mg/kg 组的 VB 干预小鼠较其他浓度显示出更加突出的行为学改变,如延长旷场实验中的总路程和中央区路程以及缩短爬杆时间等。DA 神经元变性发生在 PD 的早期阶段,TH 为 DA 合成关键酶,其活性和表达量的差异与 DA 神经元损伤的严重程度直接相关。本研究中 120 mg/kg 组的 HE、尼氏染色阳性神经元计数,免疫组化和免疫荧光中的 TH 阳性细胞也均高于其他浓度梯度组,提示 VB 不仅具有良好的 DA 神经元保护作用,而且在 MPTP 构建的 PD 小鼠模型中,120 mg/kg 的 VB 灌胃给药方式具有良好的抑制神经元损伤的功能,这为进一步深入分析 VB 保护神经元的分子机制研究提供了理论依据。在 Peng 等研究中[7],不仅 30、60、120 mg/kg 的 VB 干预组与 AD 模型组相比,Morris 迷宫测试均表现出更加突出的学习能力的提高,而且高剂量组(120 mg/kg)的 VB 通过降低小鼠一氧化氮含量、一氧化氮合酶活性和 Caspase - 3 蛋白表达的机制,高剂量组的 VB 显著增加了小鼠中海马区尼氏小体阳性的神经元数量,从而发挥对神经元的保护作用。在既往 PD 研究中也发现,通过 PD 大鼠模型,60 mg/kg 的 VB 干预后大鼠 TH 在 mRNA 和蛋白表达水平及 DA 神经元数量方面均显著高于 PD 模型组[17]。这与本研究中 120 mg/kg 的 VB 干预小鼠的保护结果相仿,造成 VB 浓度差异的原因可能与动物模型的种属有关。

毒理学研究表明,VB 对细胞和动物可产生不同的毒性作用。VB 对不同细胞系具有不同的毒性作用。例如,BY2 细胞的毒性试验中,VB 在 12 h 和 48 h 的半数致死量(LD50)[18]浓度分别是 52 μM 和 42 μM。多项研究表明,VB 对多种肿瘤细胞系,如乳腺癌细胞系 MDA - MB - 231 和 MCF - 7、卵巢癌细胞系 OVCAR - 3、胶质母细胞瘤细胞系 U138 - MG 和肝癌细胞系 HepG2 具有高度的细胞毒性,而对非肿瘤细胞系,如非致瘤性乳腺上皮细胞系 MCF - 12A 的毒性较低[19-20]。有趣的是,目前 VB 在动物模型的研究中没有明显毒性作用。例如,在急性毒性研究中,单剂量高达 5000 mg/kg 的 VB 不会导致雄性 BALB/c 小鼠(25 ~ 30 g)或 Wistar 大鼠(200 ~ 250 g)出现任何毒性症状或死亡[21]。而其他类似的动物模型研究中,急性毒性试验(LD50 > 2 g/kg)和亚急性毒性试验(LD50 > 1 g/kg)中均未引起任何小鼠的致死或不良反应,且小鼠在行为、运动、血液学和生化参数方面没有明显变化。主要器官(脾、肾和肝)的组织学分析显示没有结构变化[22]。本研究也得出类似的结果,一方面,本课题组所有纳入研究的小鼠未见死亡现象,存活率高达 100%。另一方面,在发现 120 mg/kg 的 VB 干预方式具有最佳的 DA 神经保护作用后,同样对不同组间的肝脏和肾脏 HE 染色结果也显示 120 mg/kg 组的肝细胞和肾脏细胞不仅在细胞形态还是细胞数量上均未显示出明显的差异。因此,虽然 VB 在体外实验中可能具有一定的细胞毒性,但在动物实验中,VB 仍然是一种相对安全可靠的天然成分。

虽然 VB 作为一种有效且相对安全的神经保护性药物,研究也表明 VB 促进神经保护和逆转神经损伤的作用与抑制氧化应激、神经炎症、维持 Ca^{2+} 稳态、抑制细胞凋亡等多种机制有关[23-26]。然而本研究的蛋白组学分析显示 VB 对 PD 的保护作用不仅与上述机制有关,而且多个与免疫直接相关的生物

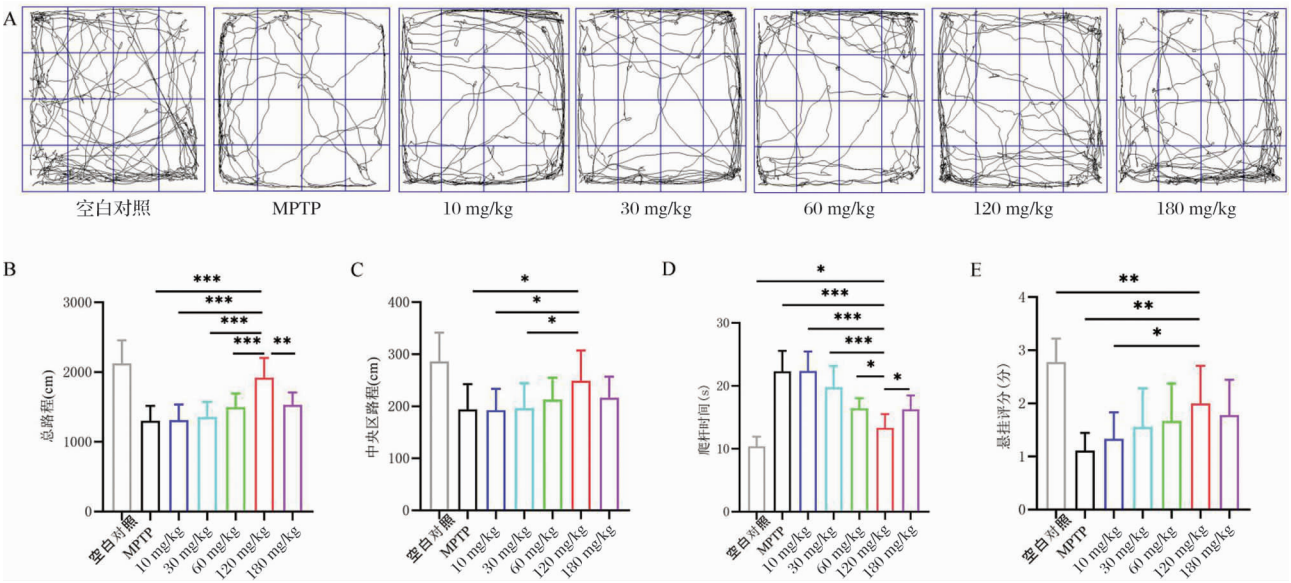
过程,包括 B 细胞的激活、补体激活、B 细胞的增殖、适应性免疫反应、体液免疫反应、先天免疫反应也参与其中,而进一步的富集分析则证实精氨酸生物合成在该保护作用中变现更为突出。研究表明 M2 小胶质细胞可通过分泌抗炎细胞因子如精氨酸酶 1(Arginase - 1,Arg - 1)等抑制炎症并促进神经修复和再生[27]。因此 VB 的抗炎机制可能与精氨酸生物合成有关。进一步的亚细胞定位显示细胞核中参与的差异蛋白数量最多。在哺乳动物中,核因子 κb (Nuclear factor kappa B,NFκB) 家族参与了免疫炎症反应生物过程,其经典路径为核心蛋白 P65 分子发生磷酸化后形成 p - NFκB P65 分子,后者异位穿过细胞核膜,进入细胞核内增强促炎因子等发生转录。然而本研究的 KEGG 富集分析的前 20 个显著差异的信号通路中未明确显示该 NFκB 通路与 VB 的保护作用直接相关,这可能与样本数量以及 VB 较为复杂的保护机制有关。因此,120 mg/kg 的 VB 对 PD 小鼠的 DA 神经元的抗炎保护作用可能与包括精氨酸生物合成在内的多种生物过程有关,未来有望在该模型的基础上更进一步深入探索。

参考文献

[1] 刘康慧, 张淑岩. 坏死性凋亡在帕金森病病理机制中的研究进展[J]. 中华神经医学杂志, 2024, 23(7): 729 - 734.
[2] 金刚, 李英真, 施维, 等. 帕金森病在病理生理学中的研究进展[J/OL]. 中华脑科疾病与康复杂志(电子版), 2023, 13(5): 315 - 319.
[3] DE PAIVA LOPES K, SNIJDERS G J L, HUMPHREY J, et al. Genetic analysis of the human microglial transcriptome across brain regions, aging and disease pathologies[J]. Nat Genet, 2022, 54(1): 4 - 17.
[4] LI M Q, ZHOU F, XU T, et al. Acteoside protects against 6 - OHDA - induced dopaminergic neuron damage *via* Nrf2 - ARE signaling pathway[J]. Food Chem Toxicol, 2018, 119: 6 - 13.
[5] ZHOU H W, ZHANG C, HUANG C R. Verbascoside attenuates acute inflammatory injury caused by an intracerebral hemorrhage through the suppression of NLRP3[J]. Neurochem Res, 2021, 46(4): 770 - 777.
[6] GAO L, PENG X M, HUO S X, et al. Memory enhancement of acteoside (verbascoside) in a senescent mice model induced by a combination of D - gal and $AlCl_3$[J]. Phytother Res, 2015, 29(8): 1131 - 1136.
[7] PENG X M, GAO L, HUO S X, et al. The mechanism of memory enhancement of acteoside (verbascoside) in the senescent mouse model induced by a combination of D - gal and $AlCl_3$[J]. Phytother Res, 2015, 29(8): 1137 - 1144.
[8] 张之菁, 梁建庆. 中药有效成分治疗帕金森病的实验研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51(9): 216 - 220.
[9] CHAO C L, HUANG H W, HUANG H C, et al. Inhibition of amyloid beta aggregation and deposition of cistanche tubulosa aqueous extract[J]. Molecules, 2019, 24(4): 687.
[10] CUI Q L, PAN Y N, BAI X W, et al. Systematic characterization of the metabolites of echinacoside and acteoside from Cistanche tubulosa in rat plasma, bile, urine and feces based on UPLC - ESI - Q - TOF - MS[J]. Biomed Chromatogr, 2016, 30(9): 1406 - 1415.
[11] QIN C, HU S Q, ZHANG S X, et al. Hydroxytyrosol acetate improves the cognitive function of APP/PS1 transgenic mice in ERβ - dependent manner[J]. Mol Nutr Food Res, 2021, 65(3): e2000797.
[12] GUO Z L, QIAN Q Y, XIAOLIN L I, et al. Efficacy of verbascoside, echinacoside, crenatoside on altitude - induced fatigue in rats and possible mechanism[J]. J Tradit Chin Med, 2023, 43(5): 934 - 943.
[13] ROSSI R, MAINARDI E, VIZZARRI F, et al. Verbascoside - rich plant extracts in animal nutrition[J]. Antioxidants, 2023, 13(1): 39.
[14] PONGKITWITOON B, PUTALUN W, TRIWITAYAKORN K, et al. Anti - inflammatory activity of verbascoside - and isoverbascoside - rich Lamiales medicinal plants[J]. Heliyon, 2023, 10(1): e23644.
[15] DANESHFOROUZ A, NAZEMI S, GHOLAMI O, et al. The cytotoxicity and apoptotic effects of verbascoside on breast cancer 4T1 cell line[J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2021, 22(1): 72.
[16] ZHU X F, SUN M, GUO H M, et al. Verbascoside protects from LPS - induced septic cardiomyopathy *via* alleviating cardiac inflammation, oxidative stress and regulating mitochondrial dynamics[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 233: 113327.
[17] GOMES D B, SERPA P Z, MIORANDO D, et al. Involvement of anti - inflammatory and stress oxidative markers in the antidepressant - like activity of aloysia citriodora and verbascoside on mice with bacterial lipopolysaccharide - (LPS -) induced depression[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 1041656.
[18] SMEJKAL K, BABULA P, SLAPETOVÁ T, et al. Cytotoxic activity of C - geranyl compounds from Paulownia tomentosa fruits[J]. Planta Med, 2008, 74(12): 1488 - 1491.
[19] BUDZIANOWSKA A, TOTOŃ E, ROMANIUK - DRAPAŁA A, et al. Cytotoxic effect of phenylethanoid glycosides isolated from plantago lanceolata L[J]. Life, 2023, 13(2): 556.
[20] ŞENOL H, TULAY P, ERGÖREN M Ç, et al. Cytotoxic effects of verbascoside on MCF - 7 and MDA - MB - 231[J]. Turk J Pharm Sci, 2021, 18(5): 637 - 644.
[21] HOSSEINZAD H, ETEMAD L, ZAFARI R, et al. Acute, sub - acute and cell toxicity of verbascoside[J]. Res J Med Plant, 2015, 9(7): 354 - 360.
[22] GUTIÉRREZ - REBOLLEDO G A, GARDUÑO - SICILIANO L, GARCÍA - RODRÍGUEZ R V, et al. Anti - inflammatory and toxicological evaluation of Moussonia deppeana (Schldl. & Cham) Hanst and Verbascoside as a main active metabolite[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 187: 269 - 280.
[23] CHEN S S, LIU H H, WANG S M, et al. The neuroprotection of verbascoside in Alzheimer's disease mediated through mitigation of neuroinflammation *via* blocking NF - κB - p65 signaling[J]. Nutrients, 2022, 14(7): 1417.
[24] 谢良骐, 柴智, 弓强, 等. 毛蕊花糖苷对中枢神经系统的作用及其机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(7): 179 - 182.
[25] QU Y J, DING M R, GU C, et al. Acteoside and ursolic acid synergistically protects H_2O_2 - induced neurotrosis by regulation of AKT/mTOR signalling: from network pharmacology to experimental validation[J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 1751 - 1761.
[26] AIMAITI M, WUMAIER A, AISA Y, et al. Acteoside exerts neuroprotection effects in the model of Parkinson's disease *via* inducing autophagy: Network pharmacology and experimental study[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 903: 174136.
[27] 黄晨蓉, 张强, 曾芳月. 益肾除颤汤改善帕金森病患者认知功能的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2025, 52(2): 89 - 93.

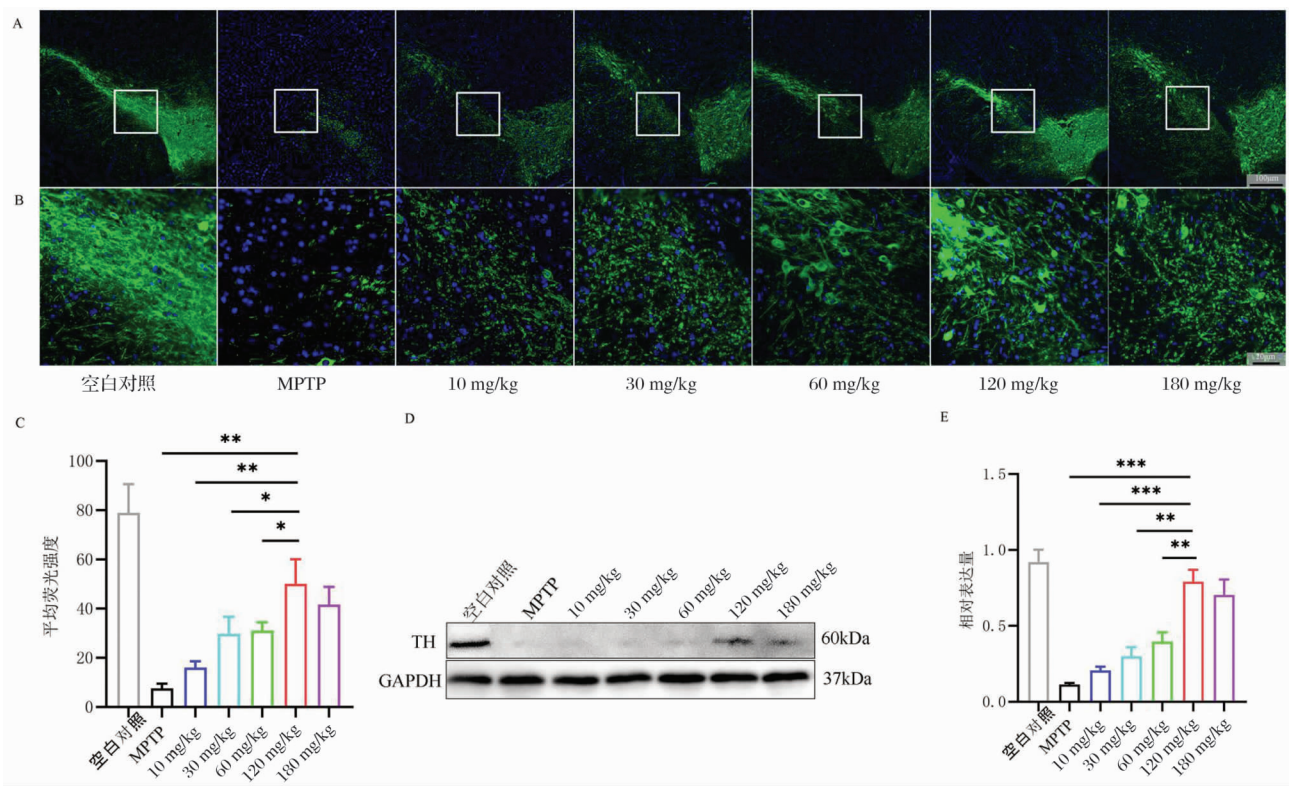
毛蕊花糖苷对帕金森病小鼠多巴胺细胞保护作用的蛋白组学研究

（正文见 126－130 页）



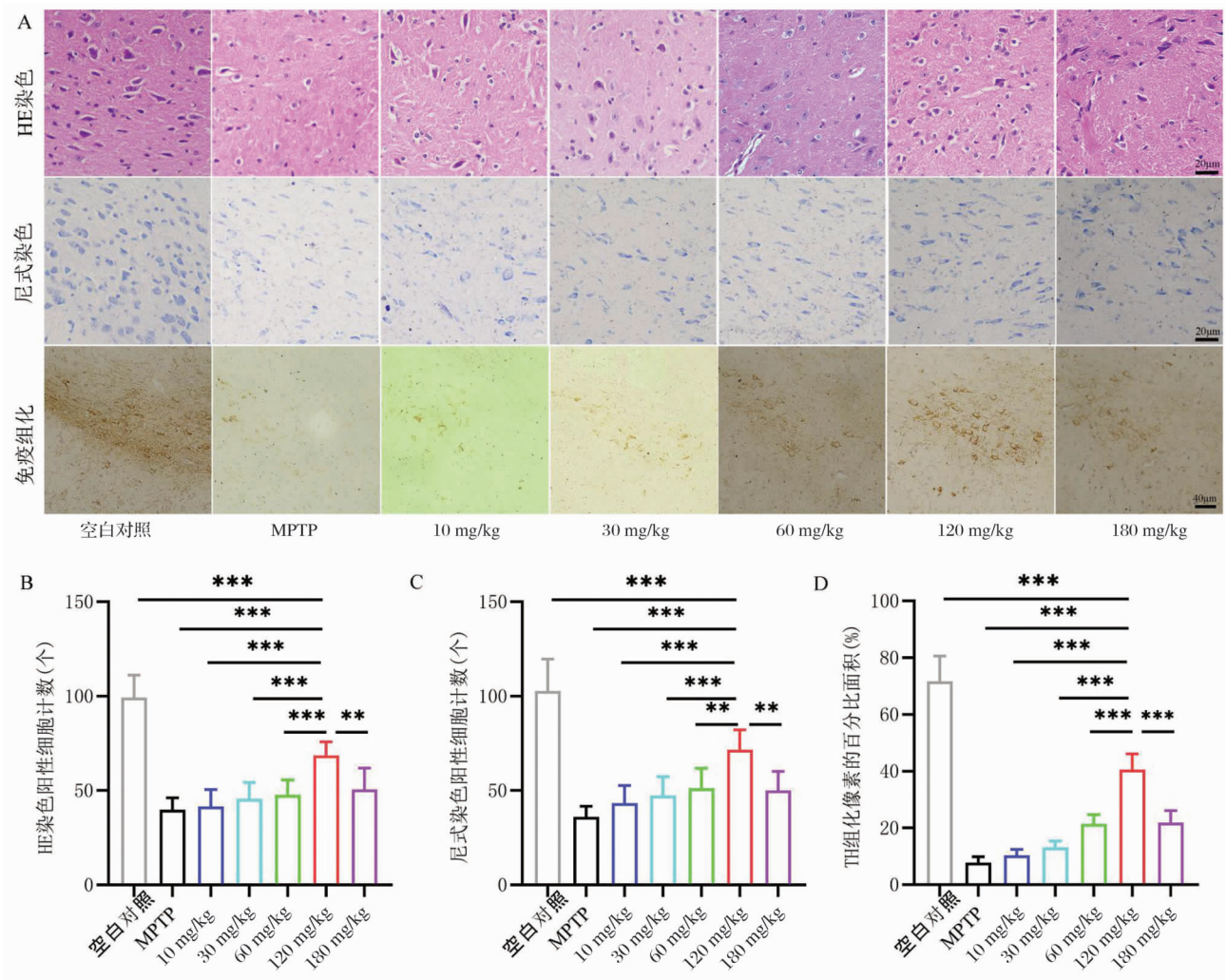
注：＊$P<0.05$；＊＊$P<0.01$；＊＊＊$P<0.001$。

图 1　各组小鼠旷场实验行走轨迹图



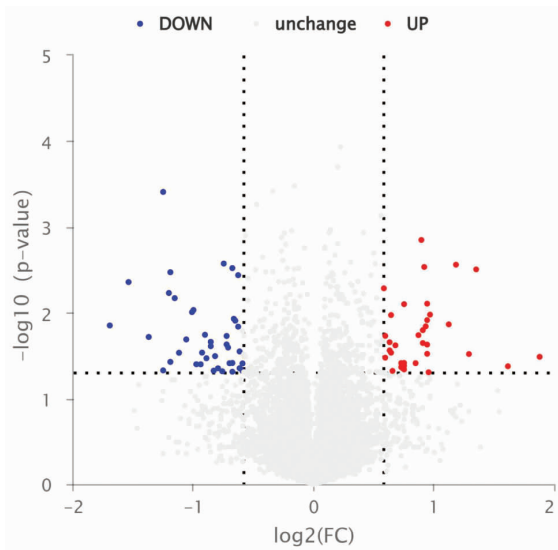
注，A 和 B 分别为 10 倍镜和 40 倍镜视野下；TH 阳性的细胞质呈绿色荧光；D 为蛋白印迹图；＊$P<0.05$；＊＊$P<0.01$；＊＊＊$P<0.001$。

图 3　各组小鼠免疫荧光图



注,HE 染色下细胞核呈深蓝色;尼氏染色下胞质中的尼氏小体被染色深蓝色;TH 阳性细胞质被染色呈棕褐色;＊＊$P<0.01$;＊＊＊$P<0.001$。

图 2 各组见 HE 染色和尼氏染色阳性细胞图



注:横坐标为差异倍数(以 2 为底的对数变换),纵坐标为差异的显著性 P－value(以 10 为底的对数变换)。图中红色点为上调的显著性差异表达蛋白质,蓝色点为下调的显著性差异表达蛋白质,灰点为无差异变化的蛋白质。且在有无差异比较中,以一组样品中半数及半数上不为空值,另一组所有数据均为空值的筛选标准得到蛋白质数目不参与火山图。

图 5 两组差异蛋白数量的火山图

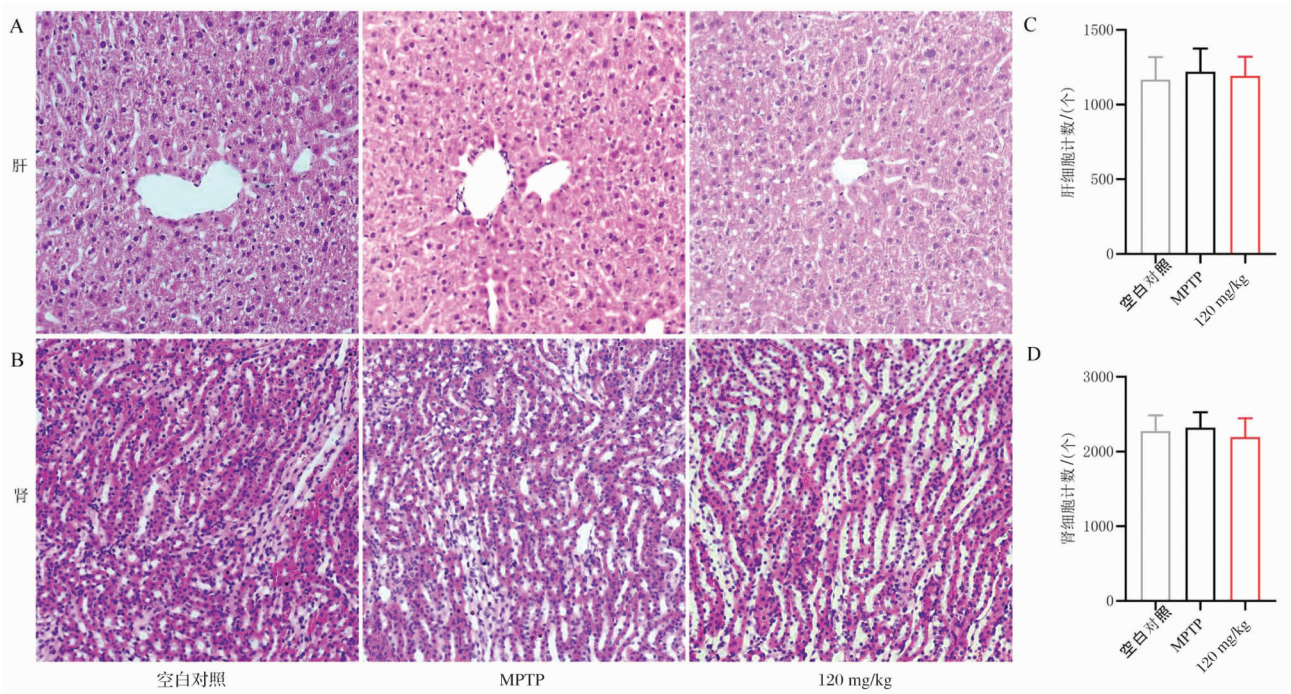
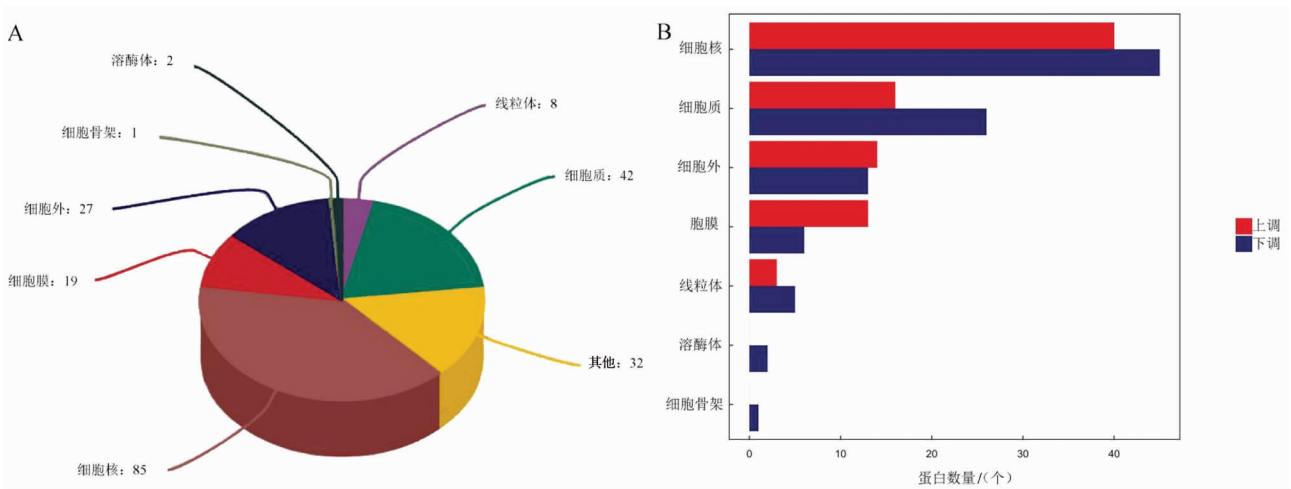
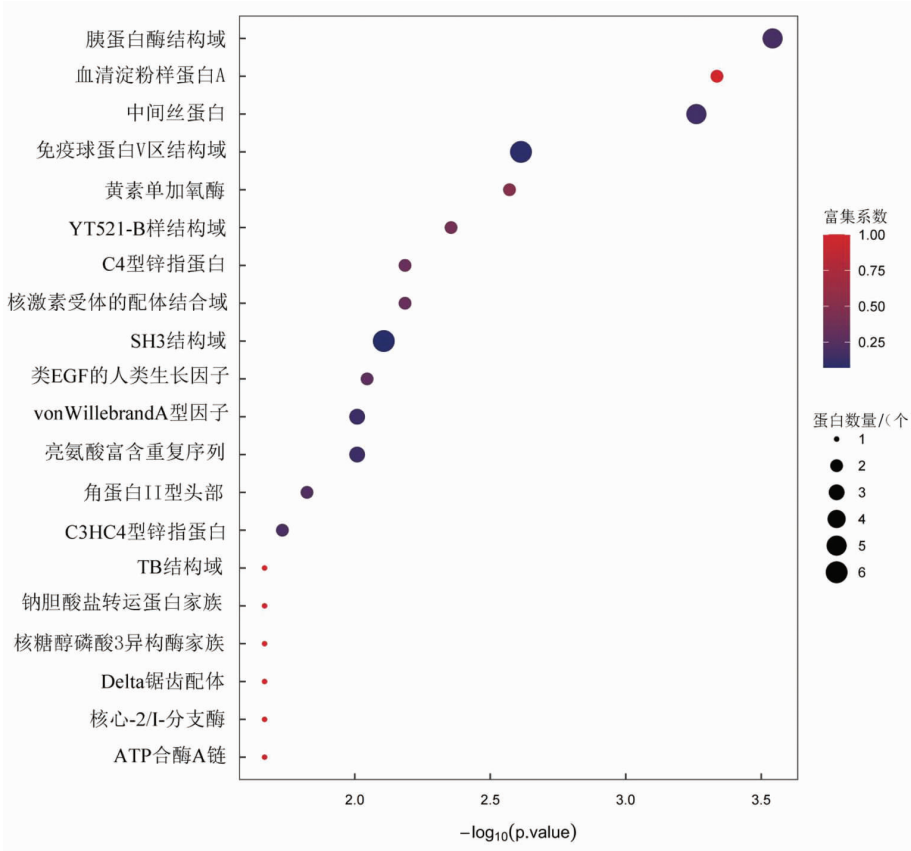


图 4　各组小鼠肝、肾细胞的 HE 染色差异



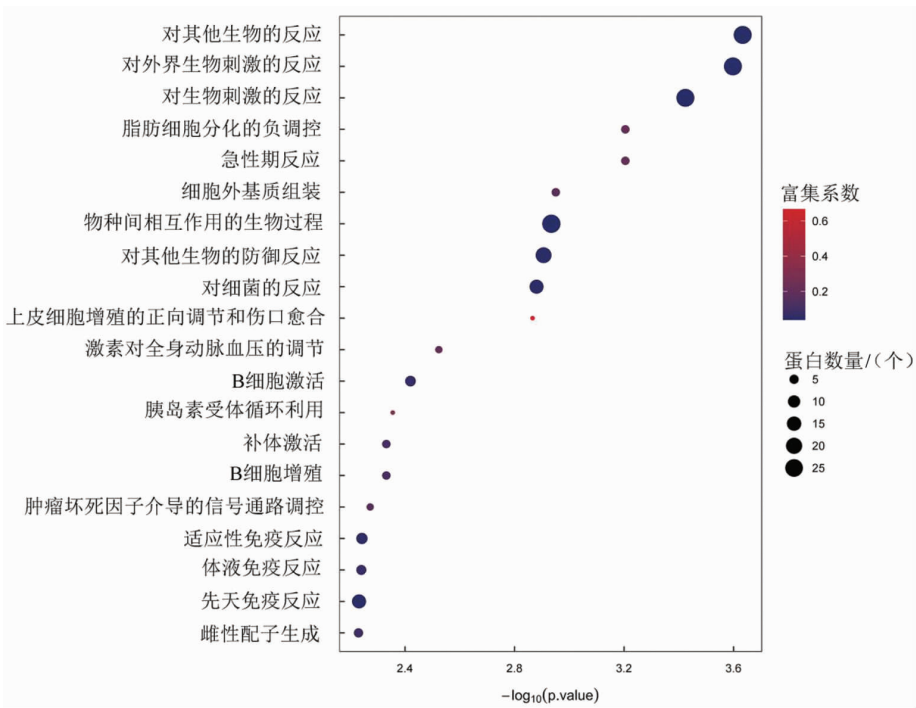
注：B 的纵坐标代表亚细胞定位，横坐标代表该亚细胞注释到的差异蛋白质数量，红、蓝色代表上、下调的蛋白质。

图 6　两组差异表达蛋白质亚细胞定位分布图



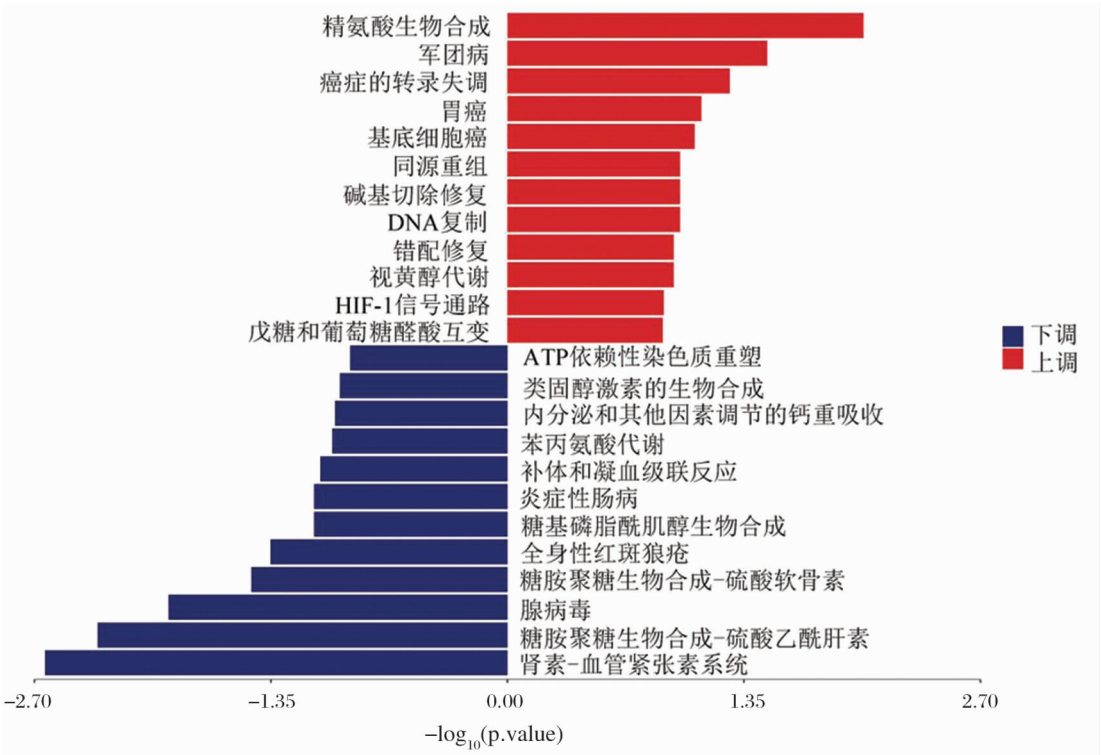
注:横坐标的值越大表示对应的结构域分类下富集度的显著性水平越高,颜色梯度代表富集系数的大小,颜色越接近红色代表富集系数值越大,气泡的大小表示每个结构域分类下差异蛋白质数目。

图7 两组结构域富集分析气泡图



注:图中横坐标为GO功能的富集显著性,即基于Fisher精确检验(Fisher's Exact Test)计算*P*值(取-log10),横坐标的值越大表示对应的GO功能下富集度的显著性水平越高,颜色梯度代表富集系数的大小,颜色越接近红色代表富集系数值越大,气泡的大小表示每个GO功能分类下差异蛋白质数目。

图8 所有差异蛋白质的GO富集气泡图(BP)



注：横坐标为 Fisher 精确检验的 p value 值（取以 10 为底的对数），横坐标的绝对值越大表示对应的通路下富集度的显著性水平越高，纵坐标表示通路名称。上调和下调蛋白参与的通路 用红色（右）和蓝色（左）条表示。

图 9　两组显著上、下调差异表达蛋白质的通路富集蝴蝶图

茵陈五苓散化学成分、药理作用研究及质量标志物（Q－Marker）预测

（正文见 66－73 页）

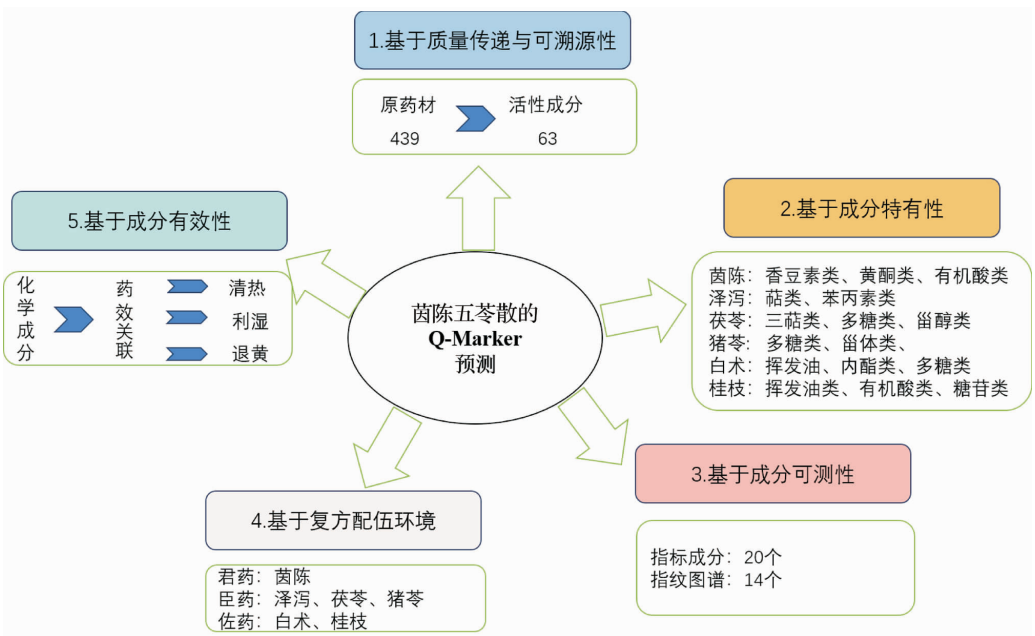


图 1　茵陈五苓散的 Q－Marker 发现研究途径