

[药 理]

菖蒲郁金汤对多发性抽动症大鼠线粒体自噬及 PINK1/Parkin 信号通路的影响

黄爽¹, 闫亚丽¹, 梅镐¹, 姚景曦¹, 薛付春¹, 尚菁¹, 唐彦², 史正刚^{1*}

(1. 甘肃中医药大学中医临床学院, 甘肃兰州 730000; 2. 云南中医药大学第一临床医学院, 云南昆明 650500)

摘要: **目的** 探讨菖蒲郁金汤对多发性抽动症 (TS) 大鼠纹状体线粒体自噬和 PINK1/Parkin 信号通路的影响。**方法** 36 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为空白组 (9 只) 和 TS 组 (27 只), TS 组大鼠每天腹腔注射亚氨基二丙腈 (300 mg/kg), 连续 7 d 以建立 TS 模型。造模成功后, 将 TS 大鼠随机分为模型组、泰必利组 (47.91 mg/kg) 和菖蒲郁金汤组 (77.28 g/kg), 并分别予以相应药物干预 28 d。给药结束后, 各组大鼠进行行为学评分, HE 染色观察纹状体病理改变, 透射电子显微镜 (TEM) 观察纹状体超微结构变化, TUNEL 染色评价神经元凋亡水平, ELISA 法检测纹状体 ROS 水平, 免疫荧光染色 (IF) 检测纹状体 PINK1 与 LC3B 共表达, RT-qPCR 和 Western blot 法检测纹状体 PINK1、Parkin、Beclin-1、P62、LC3B (LC3B-II/I) mRNA、蛋白表达。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠行为学评分、神经元凋亡率及纹状体 ROS 水平均升高 ($P<0.01$), 纹状体神经元和线粒体发生损伤, 纹状体 PINK1、Parkin、Beclin-1、LC3B (LC3B-II/I) mRNA、蛋白表达均降低 ($P<0.01$), P62 mRNA、蛋白表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 泰必利组和菖蒲郁金汤组大鼠行为学评分、神经元凋亡率及纹状体 ROS 水平均降低 ($P<0.01$), 纹状体线粒体和神经元病理损伤改善, 纹状体 PINK1、Parkin、Beclin-1 mRNA、蛋白表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), P62 mRNA、蛋白表达降低 ($P<0.01$); 菖蒲郁金汤组大鼠纹状体 LC3B mRNA、LC3B-II/I 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 菖蒲郁金汤对 TS 大鼠的改善作用可能与调节 PINK1/Parkin 信号通路激活线粒体自噬、改善线粒体功能、降低 ROS 水平, 进而保护神经元相关。

关键词: 菖蒲郁金汤; 多发性抽动症; PINK1/Parkin 信号通路; 神经元凋亡; 纹状体; 线粒体自噬

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2025)10-3225-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.10.008

Effects of Changpu Yujin Decoction on mitophagy and PINK1/Parkin signaling pathway in a rat model of Tourette syndrome

HUANG Shuang¹, YAN Ya-li¹, MEI Hao¹, YAO Jing-xi¹, XUE Fu-chun¹, SHANG Jing¹, TANG Yan², SHI Zheng-gang^{1*}

(1. Clinical College of Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. The First Clinical Medical College, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of Changpu Yujin Decoction (CPYJD) on striatal mitophagy and PINK1/Parkin signaling pathway in a rat model of Tourette syndrome (TS). **METHODS** Thirty-six SPF male SD rats were randomly assigned to the control group ($n=9$) and the TS modeling group ($n=27$). Rats in the modeling group received daily intraperitoneal injections of 3, 3'-iminodipropionitrile (IDPN) (300 mg/kg) for 7 consecutive days to establish the TS model. Post-modeling, successfully induced TS rats were re-randomized into model group (no treatment), tiapride group (47.91 mg/kg) and CPYJD group (77.28 g/kg). All groups received

收稿日期: 2025-04-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81960886, 82460951); 甘肃中医药大学科研发展基金项目 (20YF3FA041)

作者简介: 黄爽 (1995—), 男, 博士生, 从事中医药防治小儿神经精神疾病研究。Tel: 18482134494, E-mail: hscool164@163.com

* 通信作者: 史正刚 (1963—), 男, 博士, 教授, 从事中医药防治小儿神经精神疾病研究。Tel: 13993196511, E-mail: shizhenggang007@163.com

their respective interventions *via* intragastric administration daily for 28 days. Following drug administration, behavioral scores were assessed in each group. Pathological alterations in the striatum were examined using HE staining, while ultrastructural changes were evaluated by transmission electron microscopy (TEM). Neuronal apoptosis was quantified *via* TUNEL staining, and ROS levels in striatum were measured by ELISA. Co-localization of PINK1 and LC3B was assessed using immunofluorescence (IF). Finally, mRNA and protein expressions of PINK1, Parkin, Beclin-1, P62 and LC3B (LC3B-II/I ratio) were analyzed by RT-qPCR and Western blot.

RESULTS Compared to the control group, the model group demonstrated significantly increased behavioral scores ($P<0.01$), elevated neuronal apoptosis rate and higher ROS levels in the striatum ($P<0.01$); severe neuronal and mitochondrial damage in the striatum; significantly reduced mRNA and protein expressions of PINK1, Parkin, Beclin-1 and LC3B (LC3B-II/I ratio) in the striatum ($P<0.01$); markedly upregulated P62 mRNA and protein expressions ($P<0.01$). Compared to the model group, both the tiapride and CPYJD intervention groups exhibited significantly reduced behavioral scores ($P<0.01$); decreased neuronal apoptosis rate and lower ROS levels ($P<0.01$); improved pathological alterations in the striatal neurons and mitochondria; increased mRNA and protein expressions of PINK1, Parkin and Beclin-1 in the striatum ($P<0.05$, $P<0.01$); and decreased P62 mRNA and protein expressions ($P<0.01$). Furthermore, the rats in the CPYJD group specifically showed elevated LC3B mRNA level and LC3B-II/I protein ratio in striatum ($P<0.05$, $P<0.01$).

CONCLUSION The effect of CPYJD intervention in TS rats may involve activation of mitophagy through regulation of the PINK1/Parkin signaling pathway, improving mitochondrial function, reducing ROS levels, and thereby protecting neurons.

KEY WORDS: Changpu Yujin Decoction; Tourette syndrome; PINK1/Parkin signaling pathway; neuron apoptosis; striatum; mitophagy

多发性抽动症 (Tourette syndrome, TS) 是一种常见的儿童、青少年时期神经发育障碍性疾病, 以运动和 (或) 发声抽动为临床特征, 并常伴注意缺陷多动障碍、强迫障碍等精神行为障碍^[1], 对患者学习、认知、心理健康造成严重负面影响^[2-3]。目前, TS 的发病机制尚未完全明晰, 研究表明患者纹状体存在线粒体功能障碍和氧化代谢失衡^[4], 可能与 PTEN 诱导的假定激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1) /帕金森蛋白 (parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase, Parkin) 信号通路介导线粒体自噬障碍有关, 该信号通路的抑制会导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积累, 加速神经元凋亡进程^[5]。菖蒲郁金汤是史正刚教授治疗 TS 的经验方, 临床研究显示其能改善患者临床症状, 安全性良好^[6], 并可修复 TS 大鼠纹状体线粒体超微结构损伤, 促进神经元数量恢复^[7-8], 然而其内在作用机理尚未明确。本研究通过构建 TS 疾病模型, 旨在探讨菖蒲郁金汤对线粒体自噬和 PINK1/Parkin 信号通路的影响, 进而深入挖掘该方潜在相关分子机制。

1 材料

1.1 动物 36 只雄性 SPF 级 SD 大鼠, 3 周龄, 体重 (60±10) g, 购自常州卡文斯动物实验有限公

司 [实验动物生产许可证号 SCXK (苏) 2021-0013, 动物质量合格证号 320730240100030686], 饲养于甘肃中医药大学 SPF 级实验动物房 [实验动物使用许可证号 SYXK (甘) 2021-0004], 环境温度 (22±2) °C, 相对湿度 (55±5)%, 12 h/12 h 光/暗循环照明, 自由摄食饮水, 适应性喂养 1 周后进行实验。本研究方案通过甘肃中医药大学动物伦理审查 (伦理审查编号 GZRSQ2024-021)。

1.2 药物 菖蒲郁金汤由石菖蒲 10 g、郁金 10 g、天竺黄 8 g、远志 8 g、僵蚕 8 g、蝉蜕 8 g、全蝎 3 g、天麻 8 g、磁石 20 g、石决明 20 g、川牛膝 10 g、焦山楂 8 g 组成, 均由甘肃中医药大学附属医院中药房提供, 经甘肃中医药大学药学院中药鉴定教研室侯嘉副教授鉴定为正品, 符合 2020 年版《中国药典》规定。前期研究结果显示, 菖蒲郁金汤高剂量 (77.28 g/kg) 的抗抽动作用优于中、低剂量 (38.64、19.32 g/kg) 的^[9], 因此本实验选择高剂量进行研究。上述饮片分别以 10、8、6 倍量水提取 3 次, 提取时间分别为 90、60、30 min, 过滤, 合并滤液, 浓缩成生药量 5.15 g/mL 的药液。泰必利 (批号 DLY-23G01) 购自江苏恩华药业股份有限公司, 生理盐水稀释成 3.19 mg/mL 溶液; 亚氨基二丙腈 (3, 3'-iminodipropionitrile,

IDPN, 货号 317306) 购自美国 Sigma 公司, 生理盐水稀释成 30 mg/mL 溶液。

1.3 试剂 苏木素、伊红染液 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 G1080、G1100); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒、TRIeasy™ Total RNA Extraction Reagent 试剂盒 [圣圣生物科技 (上海) 股份有限公司, 货号 40308ES50、10606ES60]; ROS ELISA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号 E004-1-1); 逆转录试剂盒、qPCR 预混液 [新贝 (上海) 生物科技有限公司, 货号 R202-02、Q204-01]; PINK1、Parkin、Beclin-1、P62、微管相关蛋白 1 轻链 3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B)、GAPDH 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 货号 bsm-51265M、bs-23687R、bs-1353R、bs-55207R、bs-2912R、bs-10900R); 鼠二抗、兔二抗 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号 GB25301、GB28301)。

1.4 仪器 透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) (日本 Hitachi 公司, 型号 HT7800/HT7700); 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号 IX51); 离心机 (德国 Kendrion 公司, 型号 D-37520); 酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 型号 MK3); 实时定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号 Iq5)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为空白组 (9 只) 和 TS 组 (27 只), TS 组大鼠每天腹腔注射 IDPN (300 mg/kg) 以建立 TS 模型^[10], 空白组大鼠则每天腹腔注射等体积生理盐水, 连续 7 d。造模结束后, 对大鼠刻板行为和运动行为进行评分, ≥ 2 分表明造模成功^[11], 标准见表 1。将造模成功的 TS 大鼠随机分为模型组、泰必利组和菖蒲郁金汤组, 每组 9 只, 泰必利组大鼠灌胃 47.91 mg/kg 药液, 菖蒲郁金汤组大鼠灌胃 77.28 g/kg 药液, 空白组、模型组大鼠灌胃 15 mL/kg 蒸馏水, 每天 1 次, 持续 28 d。

表 1 TS 大鼠行为学评分标准

Tab. 1 Behavioral scoring criteria for TS rats

评分/分	刻板行为	运动行为
0	无刻板运动	安静或正常活动
1	旋转行为	过度兴奋
2	头颈部垂直运动过多	探究行为增加
3	头颈部垂直运动过多加旋转行为	不停跑动
4	头向侧摆, 合并头颈部垂直运动过多	不停跑动加惊跳

2.2 行为学评分 各组大鼠于造模后 (给药前)

及给药结束后进行行为学评分, 将其放入观察笼内 (单只单笼) 适应 5 min 后每 5 min 评分 1 次, 持续 1 h, 记录总分并计算平均值。评分过程分别由 2 名训练有素但对分组情况不知晓的实验人员进行, 以期减少主观误差。

2.3 苏木素-伊红 (HE) 染色观察大鼠纹状体病理变化 各组大鼠麻醉后心脏采血, 灌注, 取全脑组织并进行固定, 石蜡包埋, 切片, 脱蜡, 水化, 苏木素、伊红染液染色, 封片, 在显微镜下观察纹状体并采集图像。

2.4 透射电子显微镜 (TEM) 观察大鼠纹状体超微结构变化 各组大鼠取纹状体组织, 切成 1 mm³ 小块, 电镜固定液、1% 锇酸固定, 梯度乙醇脱水, 浸透包埋, 烤箱聚合, 切成 60~80 nm 超薄片并染色, 在 TEM 下观察并采集图像。

2.5 TUNEL 染色评价大鼠纹状体神经元凋亡水平 脑组织经固定、脱水透明、石蜡包埋、切片、脱蜡、水化、蛋白酶 K 通透处理后进行预平衡, TdT 酶反应, 清洗, 封闭, 抗体标记, 在荧光显微镜下观察并采集图像。

2.6 ELISA 法检测大鼠纹状体 ROS 水平 纹状体组织经匀浆、离心后收集上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 ROS 水平。

2.7 免疫荧光 (IF) 法检测大鼠纹状体 PINK1 与 LC3B 共表达 脑组织石蜡切片经脱蜡、水化、抗原修复、通透、封闭液封闭后, 加入一抗 (鼠抗 PINK1、兔抗 LC3B, 1:200) 孵育过夜, 次日加入对应二抗孵育 60 min, PBS 清洗 3 次, 滴加 DAPI 室温染核, PBS 清洗后封片, 在荧光显微镜下观察并采集图像, 通过 Image J 1.5f 软件分析荧光信号强度。

2.8 RT-qPCR 法检测大鼠纹状体 PINK1、Parkin、Beclin-1、P62、LC3B mRNA 表达 取纹状体组织, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并去除 gDNA, 逆转录成 cDNA, 进行 PCR 扩增反应, 参数为 95 °C 预变性 30 s, 1 个循环; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火/延伸 30 s, 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。引物由奥科生物科技有限公司合成, 序列见表 2。

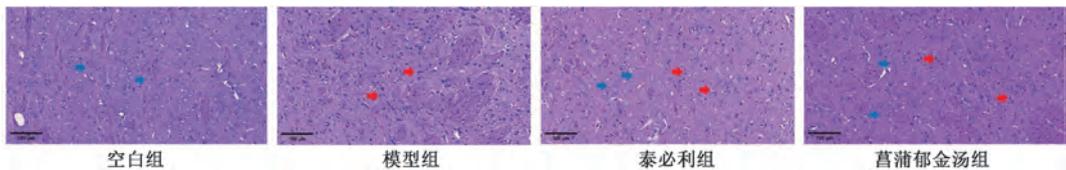
2.9 Western blot 法检测大鼠纹状体 PINK1、Parkin、Beclin-1、P62、LC3B-II/I 蛋白表达 取纹状体组织, 加入 RIPA 裂解液提取蛋白后进行定量, 电泳分离, 转移到 PVDF 膜上, 加入封闭液封闭 1 h, 加入一抗鼠抗 PINK1、兔抗 Parkin、兔抗

表2 引物序列
Tab. 2 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')
PINK1	正向 GAAAAGGCCAGATGTCGTC
	反向 TTTGCTGAACCCAAGGCTTC
Parkin	正向 TCCAGTGGCCCAAGATTCAT
	反向 CAGCAAACATTGTCTCGGCT
Beclin-1	正向 ACATCTGGCACAGTGGACAGTTTG
	反向 AGCATGGAGCAGCAACACAGTC
P62	正向 TGATTGAGTCCCTCTCCCAGATGC
	反向 CCGCTCCGATGCATAGTTCTTGG
LC3B	正向 TCTTGGACGCTTGTACGCAT
	反向 TTGTGTGTCTCTCAACCCG
GAPDH	正向 TGATGGGTGTGAACCACGAG
	反向 AGTGATGGCATGGACTGTGG

Beclin-1、兔抗 P62、兔抗 LC3B 和兔抗 GAPDH 孵育过夜，次日 TBST 洗膜，加入相应二抗孵育 90 min，采用化学发光法在暗室中曝光、显影，通过 Image J 1.5f 软件分析条带灰度值。

2.10 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理，数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，符合正态分布者组间比较采用单因素方差分析，方差齐时两两比较采用 LSD 法，方差不齐时采用 Games-Howell 法。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。



注：蓝色箭头指向正常神经元，红色箭头指向异常神经元。

图1 各组大鼠纹状体 HE 染色 (×100)

Fig. 1 HE staining of rat striatum in each group (×100)

3.3 菖蒲郁金汤对 TS 大鼠纹状体超微结构的影响 如图 2 所示，空白组大鼠纹状体神经元核膜完整，线粒体嵴清晰并排列紧密有序；与空白组比较，模型组大鼠纹状体神经元核膜边界不清，甚至出现凹陷，线粒体肿胀、膜模糊、嵴疏松断

3 结果

3.1 菖蒲郁金汤对 TS 大鼠行为学评分的影响 在造模结束时，TS 组大鼠刻板行为和运动行为评分均 ≥ 2 分，表明造模成功。如表 3 所示，给药结束后，与空白组比较，模型组大鼠刻板行为和运动行为评分均升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，泰必利组和菖蒲郁金汤组大鼠刻板行为和运动行为评分均降低 ($P < 0.01$)。

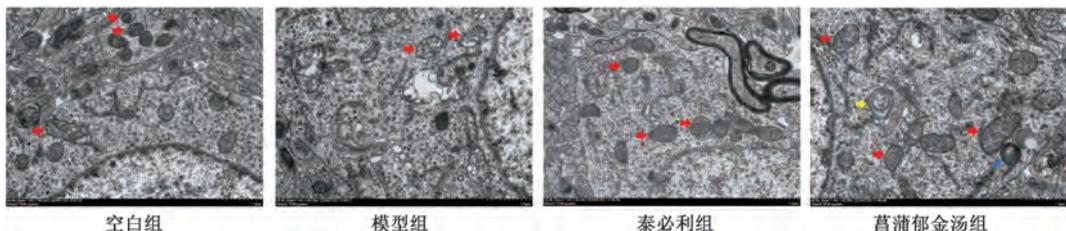
表3 各组大鼠行为学评分比较 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Tab. 3 Comparison of rat behavioral score in each group ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	刻板行为评分/分	运动行为评分/分
空白组	0.05±0.06	0.09±0.10
模型组	3.05±0.19**	2.94±0.14**
泰必利组	1.50±0.21###	1.50±0.08###
菖蒲郁金汤组	1.19±0.10###	1.20±0.16###

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，### $P < 0.01$ 。

3.2 菖蒲郁金汤对 TS 大鼠纹状体病理改变的影响 如图 1 所示，空白组大鼠纹状体神经元呈圆形，形态完整，细胞核清晰，排列紧密有序，胞质均匀；模型组大鼠纹状体神经元形态不规则，部分出现核固缩，胞质疏松、不均匀；与模型组比较，泰必利组、菖蒲郁金汤组大鼠纹状体神经元形态完整，核固缩减轻，排列紧密有序，胞质均匀。



注：红色箭头指向线粒体，黄色箭头指向自噬体，蓝色箭头指向溶酶体。

图2 各组大鼠纹状体超微结构 (TEM, ×6000)

Fig. 2 Ultrastructure of rat striatum of each group (TEM, ×6000)

3.4 菖蒲郁金汤对TS大鼠纹状体神经元凋亡水平的影响 如图3、表4所示,与空白组比较,模型组大鼠纹状体 TUNEL 阳性细胞数量增加,神经元

凋亡率升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,泰必利组、菖蒲郁金汤组大鼠纹状体 TUNEL 阳性细胞数量减少,神经元凋亡率降低 ($P < 0.01$)。

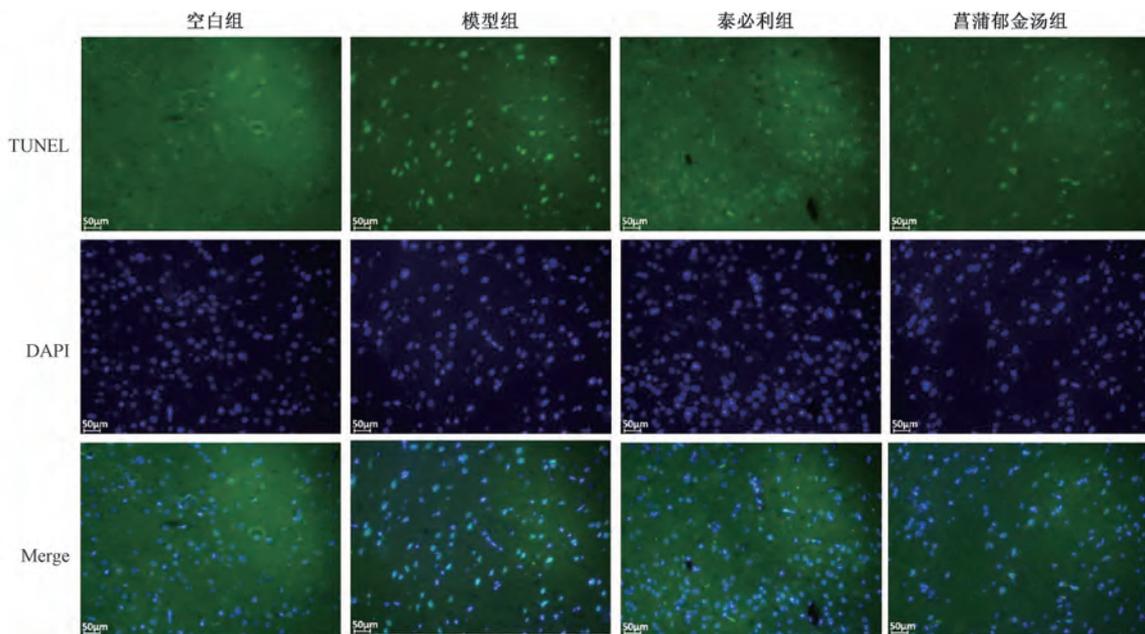


图3 各组大鼠纹状体神经元凋亡染色 (TUNEL, ×200)

Fig. 3 Staining of neuronal apoptosis in rat striatum of each group (TUNEL, ×200)

表4 各组大鼠纹状体神经元凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 4 Comparison of neuronal apoptosis rate in rat striatum in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	凋亡率/%
空白组	1.95±0.32
模型组	11.62±0.56**
泰必利组	7.48±1.43##
菖蒲郁金汤组	6.67±1.20##

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

3.5 菖蒲郁金汤对TS大鼠纹状体ROS水平的影响 如表5所示,与空白组比较,模型组大鼠纹状体ROS水平升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,泰必利组、菖蒲郁金汤组大鼠纹状体ROS水平降低 ($P < 0.01$)。

表5 各组大鼠纹状体ROS水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 5 Comparison of ROS level in rat striatum in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	ROS/(ng·g ⁻¹)
空白组	130.69±8.61
模型组	357.08±18.00**
泰必利组	277.92±13.86##
菖蒲郁金汤组	239.03±10.09##

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

3.6 菖蒲郁金汤对TS大鼠纹状体PINK1与LC3B共表达的影响 如图4、表6所示,与空白组比较,

模型组大鼠纹状体PINK1、LC3B表达均降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,泰必利组、菖蒲郁金汤组大鼠纹状体PINK1、LC3B表达均升高 ($P < 0.01$)。

表6 各组大鼠纹状体PINK1与LC3B共表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 6 Comparison of PINK1 and LC3B co-expressions in rat striatum in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PINK1	LC3B
空白组	1.00±0.06	1.00±0.03
模型组	0.40±0.02**	0.41±0.03**
泰必利组	0.61±0.03##	0.61±0.02##
菖蒲郁金汤组	0.81±0.03##	0.86±0.02##

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

3.7 菖蒲郁金汤对TS大鼠纹状体PINK1、Parkin、Beclin-1、P62、LC3B mRNA表达的影响 如表7所示,与空白组比较,模型组大鼠纹状体PINK1、Parkin、Beclin-1、LC3B mRNA表达均降低 ($P < 0.01$),P62 mRNA表达升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,泰必利组、菖蒲郁金汤组大鼠纹状体PINK1、Parkin、Beclin-1 mRNA表达均升高 ($P < 0.05, P < 0.01$),P62 mRNA表达降低 ($P < 0.01$),菖蒲郁金汤组大鼠纹状体LC3B mRNA表达升高 ($P < 0.01$),而泰必利组大鼠纹状体LC3B mRNA表达无明显变化 ($P > 0.05$)。

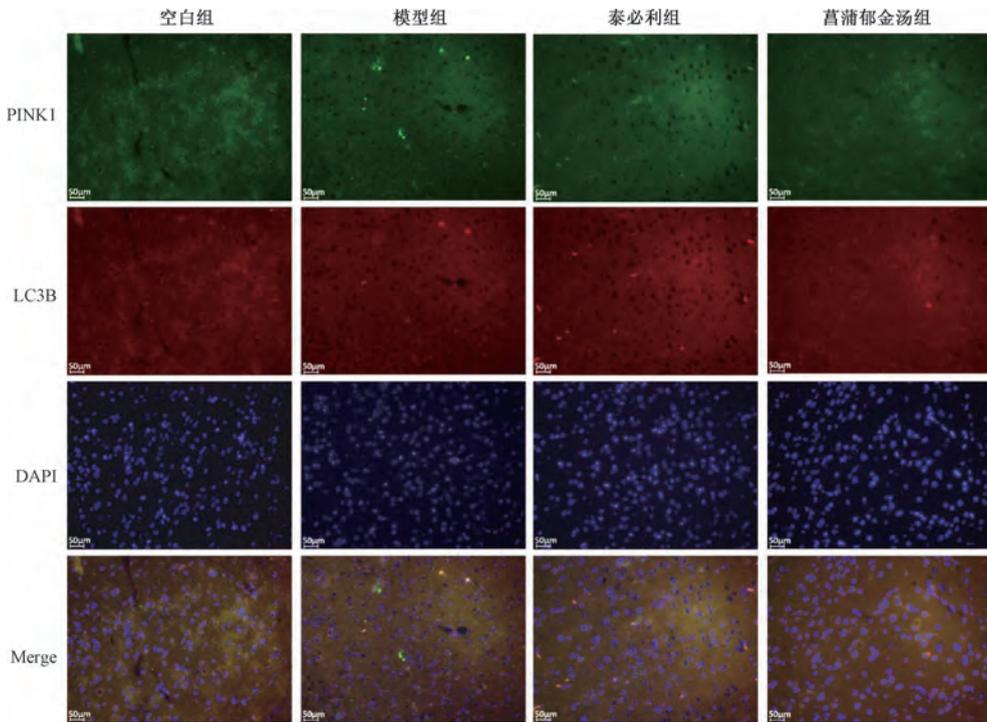


图4 各组大鼠纹状体 PINK1 与 LC3B 共表达染色 (IF, ×200)

Fig. 4 Co-staining of PINK1 and LC3B in rat striatum of each group (IF, ×200)

表7 各组大鼠纹状体 PINK1、Parkin、Beclin-1、P62、LC3B mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab. 7 Comparison of mRNA expressions of PINK1, Parkin, Beclin-1, P62 and LC3B in rat striatum in each group ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	PINK1	Parkin	Beclin-1	P62	LC3B
空白组	1.01±0.17	1.02±0.19	1.01±0.15	1.00±0.11	1.02±0.19
模型组	0.14±0.03**	0.16±0.03**	0.16±0.02**	4.36±0.44**	0.10±0.02**
泰必利组	0.41±0.08#	0.37±0.07#	0.41±0.08##	1.60±0.16##	0.23±0.04
菖蒲郁金汤组	0.77±0.15##	0.52±0.10##	0.65±0.12##	1.29±0.12##	0.50±0.10##

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

3.8 菖蒲郁金汤对 TS 大鼠纹状体 PINK1、Parkin、Beclin-1、P62、LC3B-II/I 蛋白表达的影响 如图 5、表 8 所示，与空白组比较，模型组大鼠纹状体 PINK1、Parkin、Beclin-1、LC3B-II/I 蛋白表达均降低 ($P < 0.01$)，P62 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，泰必利组和菖蒲郁金汤组大鼠纹状体 PINK1、Parkin、Beclin-1 蛋白表达均升高 ($P < 0.01$)，P62 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)，菖蒲郁金汤组大鼠纹状体 LC3B-II/I 比值升高 ($P < 0.05$)，而泰必利组大鼠纹状体 LC3B-II/I 比值无明显变化 ($P > 0.05$)。

4 讨论

线粒体作为细胞的能量中心和 ROS 的主要来源，对维持细胞稳态起重要作用。当机体受到刺激时，线粒体内氧化还原失衡，ROS 积蓄，引发线粒体氧化应激损伤，线粒体功能障碍，并进一步加速神经元凋亡的进程^[12]，影响着帕金森病、亨廷

顿病等神经系统疾病的发生发展^[13-14]。研究报道，IDPN 诱导的 TS 大鼠脑中存在氧化应激水平和神经元凋亡率升高^[15-16]，提示线粒体氧化应激和神经元凋亡进程加速可能是本病的重要病理基础。本研究结果显示，模型组大鼠刻板行为和运动行为评分升高，同时伴随着纹状体线粒体、神经元损伤，ROS 水平、凋亡率上升；菖蒲郁金汤能有效控制 TS 大鼠刻板行为和运动行为，并清除过量 ROS，改善线粒体损伤，减缓神经元凋亡，提示它对 TS 大鼠纹状体线粒体功能障碍、神经元氧化应激损伤起改善作用。此外，TEM 显示菖蒲郁金汤还增加了自噬体和溶酶体数量，可能与激活线粒体自噬有关。

线粒体自噬通过选择性清除受损线粒体和 ROS 来维持质量控制，其中以 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬过程研究广泛^[17]。在线粒体应激或去极化状态下，PINK1 稳定在受损的线粒

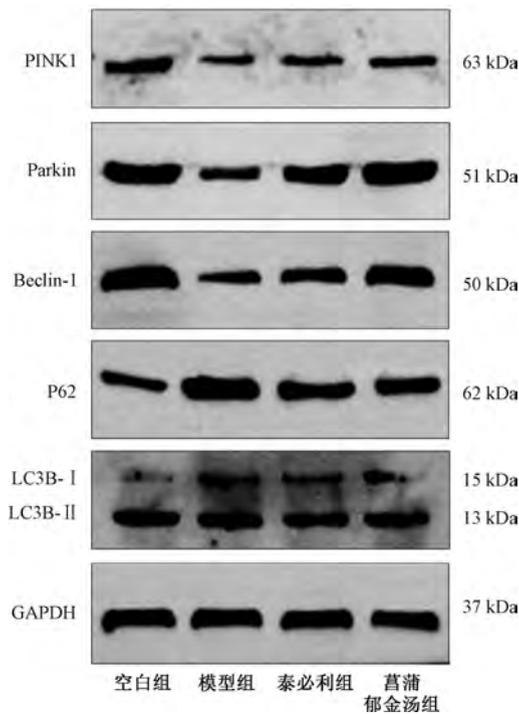


图5 各组大鼠纹状体 PINK1、Parkin、Beclin-1、P62、LC3B- II / I 蛋白条带

Fig. 5 Protein bands of PINK1, Parkin, Beclin-1, P62 and LC3B- II / I in rat striatum of each group

表8 各组大鼠纹状体 PINK1、Parkin、Beclin-1、P62、LC3B- II / I 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 8 Comparison of protein expressions of PINK1, Parkin, Beclin-1, P62 and LC3B- II / I in rat striatum in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	PINK1	Parkin	Beclin-1	P62	LC3B- II / I
空白组	0.85±0.02	1.22±0.04	1.04±0.03	0.46±0.05	2.43±0.36
模型组	0.26±0.02**	0.59±0.06**	0.46±0.05**	1.08±0.09**	1.35±0.12**
泰必利组	0.55±0.03##	0.88±0.03##	0.64±0.05##	0.87±0.04##	1.56±0.15
菖蒲郁金汤组	0.68±0.03##	1.06±0.04##	0.93±0.01##	0.75±0.01##	1.96±0.29#

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

体膜上，招募 Parkin，使其磷酸化并泛素化线粒体底物蛋白以形成多聚泛素链，此时泛素接头蛋白 P62 通过其 C 端连接泛素化线粒体，再通过与自噬体中 LC3 结合，将泛素化线粒体聚集并包裹进入自噬体，并最终被溶酶体降解清除。LC3B 是 LC3 研究最多的亚型，在自噬过程中，其前体经剪切生成 LC3B-I，并在相关蛋白作用下与磷脂酰乙醇胺偶联形成 LC3B-II，并定位于自噬体膜，因此 LCB-II 是自噬体标志物，LC3B-II / I 比值与自噬水平呈正比^[18]。此外，Beclin-1 作为自噬体成核的关键分子，对后者形成起重要调控作用，因此也常作为自噬标志物进行检测^[19]。当 PINK1、Parkin、Beclin-1、LC3B-II / I 表达降低，P62 表达升高时，表明 PINK1/Parkin 信号通路介导线粒体自噬水平降低，这是帕金森病、阿尔茨海默病等神经系统疾病的重要病理特征，而激活该途径对这些疾病有着

改善作用^[20-21]。前期报道，促进 LC3、Beclin-1 表达可减缓 IDPN 诱导的抽动障碍模型大鼠纹状体神经元凋亡^[16]，本研究在此基础上，进一步探讨 PINK1/Parkin 信号通路激活线粒体自噬对 TS 大鼠的影响，结果显示，模型组大鼠 PINK1 与 LC3B 共表达及 PINK1、Parkin、Beclin-1、LC3B (LC3B-II / I) mRNA、蛋白表达降低，P62 mRNA、蛋白表达升高，提示 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬被抑制。值得注意的是，菖蒲郁金汤组大鼠 PINK1 与 LC3B 共表达及 PINK1、Parkin、Beclin-1、LC3B (LC3B-II / I) mRNA、蛋白表达升高，而 P62 mRNA、蛋白表达降低，提示菖蒲郁金汤对 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬具有促进作用。

综上所述，菖蒲郁金汤能激活 TS 大鼠纹状体线粒体自噬，改善线粒体功能，降低 ROS 水平，

进而保护神经元,其机制可能与调控 PINK1/Parkin 信号通路有关。后续课题组将使用自噬抑制剂进行反向验证,进一步明确其因果关系,以期揭示菖蒲郁金汤干预 TS 的作用机制,并为相关新药开发提供科学依据。

参考文献:

[1] 卢青,孙丹,刘智胜.中国抽动障碍诊断和治疗专家共识解读[J].中华实用儿科临床杂志,2021,36(9):647-653.

[2] Kim S, Jackson S R, Groom M, et al. Visuomotor learning and unlearning in children and adolescents with tourette syndrome[J]. *Cortex*, 2018, 109: 50-59.

[3] Ho C S, Chen Y C, Lee M Y, et al. Factors associated with Tourette syndrome among adolescents in Taiwan: a cross-sectional correlational study[J]. *J Pediatr Nurs*, 2023, 73: e75-e82.

[4] Wang Y, Fasching L, Wu F, et al. Interneuron loss and microglia activation by transcriptome analyses in the basal ganglia of Tourette syndrome[J]. *Biol Psychiatry*, 2025, 98(3): 260-270.

[5] Sun E, Zhang J, Deng Y, et al. Docosahexaenoic acid alleviates brain damage by promoting mitophagy in mice with ischaemic stroke[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3119649.

[6] 李玉霞,史正刚,赵彬元.菖蒲郁金汤加减治疗小儿多发性抽动症 60 例临床观察[J].中医儿科杂志,2015,11(3):27-30.

[7] Lu M Q, Shi Z G, Shang J, et al. ChangPu YuJin Tang improves Tourette disorder symptoms by modulating amino acid neurotransmitters in IDPN model rats[J]. *Metab Brain Dis*, 2024, 39(8): 1543-1558.

[8] Lu M Q, Shi Z G, Shang J, et al. Network pharmacology combined with animal models to investigate the mechanism of ChangPu YuJin Tang in the treatment of Tourette syndrome[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2025, 28(1): 166-184.

[9] 高汉媛,史正刚,尚菁,等.菖蒲郁金汤对 TS 模型大鼠行为及纹状体单胺类神经递质的影响[J].西部中医药,2017,30(11):28-32.

[10] 冯鹏,李玉霞,田文霞,等.菖蒲郁金汤对抽动秽语综合征大鼠突触胞吞相关蛋白表达的影响[J].中成药,2023,45(4):1101-1108.

[11] Tian X, Ou G, Hu S, et al. Integrated network pharmacology and experimental verification to explore the molecular mechanism of Jingxin Zhidong formula for treating Tic disorder[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 305: 116114.

[12] 周剑杰,谭子虎,杨哲,等.加減薯蓣丸介导线粒体自噬改善 APP/PS1 小鼠氧化应激损伤及学习记忆能力[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(6):43-53.

[13] 鲁立颖,王琳.多奈哌齐联合美多芭对帕金森病大鼠神经细胞凋亡及认知功能的影响[J].中国免疫学杂志,2024,40(10):2064-2070.

[14] 宋知晓,郭霖,刘雪柔,等.丁苯酞改善大鼠纹状体注射喹啉酸所致亨廷顿病样症状[J].沈阳药科大学学报,2021,38(12):1296-1301;1353.

[15] Chen J, Leong P K, Leung H Y, et al. A Chinese herbal formulation, Xiao-Er-An-Shen Decoction, attenuates Tourette syndrome, possibly by reversing abnormal changes in neurotransmitter levels and enhancing antioxidant status in mouse brain[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 812.

[16] 张南,朱沁泉,何炜星,等.健脾柔肝息风汤联合针刺对抽动障碍模型大鼠纹状体区细胞自噬及凋亡的影响[J].广州中医药大学学报,2023,40(7):1741-1748.

[17] 刘润生,张晓东,李昭晴,等.基于 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬探讨中西医防治糖尿病肾病的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2025,31(7):302-313.

[18] 李欢,邱紫欣,徐文洁,等.木犀草素通过增加 ROS 的产生和下调 AKT/mTOR 通路及 HO-1 蛋白表达抑制肺癌 A549 细胞增殖[J].南方医科大学学报,2024,44(12):2367-2374.

[19] 贾艳艳,赵莹莹,余祖华,等. Beclin-1 基因 shRNA 慢病毒载体的构建及其对 B16F10 细胞自噬及活力的影响[J].畜牧兽医学报,2021,52(9):2609-2616.

[20] 张贵君,汪瑶,李军令,等.电针对帕金森病小鼠 SIRT3/PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬的影响[J].针刺研究,2024,49(3):221-230.

[21] 杨苗,于文静,贺春香,等.基于 PINK1-Parkin 介导的线粒体自噬研究当归芍药散对 AD 大鼠的影响[J].中国中药杂志,2023,48(2):534-541.