DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20240113

基于垂体腺苷酸环化酶激活多肽在帕金森动物模型中的神经保护作用及机制探索

裴丽娟[1]，田洪战[2]，李蕊[2]，田婷[2]，张敏[2]，蔡宏斌[2]*

［1. 甘肃省第三人民医院，甘肃 兰州 730030；
2. 兰州大学第二医院（第二临床医学院），甘肃 兰州 730030］

【摘要】目的 探讨垂体腺苷酸环化酶激活多肽（PACAP）在帕金森病（PD）动物模型中的神经保护作用及机制。**方法** SD大鼠设置假手术组（Sham组）、PD组（帕金森造模组）、PD+PACAP_低浓度组（造模+按体重5 μg/kg予PACAP鼻腔给药）、PD+PACAP_中浓度组（造模+按体重10 μg/kg予PACAP鼻腔给药）、PD+PACAP_高浓度组（造模+按体重20 μg/kg予PACAP鼻腔给药）5组，最终每组纳入10只。四个PD组将脂多糖溶液注射至SD大鼠黑质中建立PD模型，假手术组同法操作但注射生理盐水。通过转棒法检测大鼠行为学表现；ELISA法检测黑质谷氨酸浓度（Glu）和α-突触核蛋白（α-syn）水平，WB法检测黑质α-syn及核因子激活的B细胞的κ-轻链（NF-κB）、核因子κB抑制蛋白α（IκBα）的表达水平；实时荧光定量聚合酶链式反应法（qPCR）检测大鼠黑质炎症因子肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素-1β（IL-1β）、白细胞介素-6IL-6的mRNA表达水平；WB法和免疫荧光法检测核转录因子胶质纤维酸性蛋白（GFAP）水平来观察星形胶质细胞的活化水平，TUNEL法检测黑质神经元的凋亡情况。**结果** （1）行为学结果显示，在转棒实验中，与Sham组比较，PD组潜伏期缩短，掉落次数增加（37.20±5.27次/min）；与PD组比较，PACAP组潜伏期延长，掉落次数减少（14.50±2.32次/min），PACAP治疗组的潜伏期和掉落次数随着PACAP浓度的增加而潜伏期可以更长，掉落次数可以更少（P<0.001）。（2）星形胶质细胞激活相关指标显示，PD组GFAP表达水平和黑质神经元的凋亡数量较Sham组显著升高；PACAP治疗组上述指标随着PACAP的浓度增加而显著减低（P<0.01）。（3）黑质神经炎症指标显示，与Sham组比较，PD组NF-κB含量及*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6*的mRNA显著升高，IκBα含量显著降低；PACAP治疗组NF-κB含量及*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6*的mRNA随着PACAP的浓度增加而减低，IκBα含量随着PACAP的浓度增加而升高（P<0.01）。（4）PD疾病特征指标显示，PD组谷氨酸和α-syn含量均较Sham组显著升高，3个PACAP组的上述指标较PD组显著降低；PACAP治疗组的上述指标随着PACAP的浓度增加而递减（P<0.01），以PD+PACAP_高浓度组效果最为明显。**结论** PACAP在PD模型中具有神经保护作用，其机制可能为通过抑制星形胶质细胞激活来减轻神经炎症的发生。

【关键词】帕金森病；神经炎症；垂体腺苷酸环化酶激活多肽；星形胶质细胞

中图分类号：R742.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096−8965（2024）01−0108−09

Exploring the neuroprotective effects and mechanisms of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides in Parkinson's disease animal models

Pei Lijuan[1], Tian Hongzhan[2], Li Rui[2], Tian Ting[2], Zhang Min[2], Cai Hongbin[2]*

(1. Third People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730030, Gansu, China;
2. The Second Hospital & Clinical Medical School, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China)

收稿日期：2023-12-07；**修回日期：**2024-02-20

基金项目：甘肃省自然科学基金项目（23JRRA0976）；兰州大学第二医院萃英学子科研培育计划项目（CYXZ2019-02）

通信作者：蔡宏斌（1980-），男，甘肃秦安人，主任医师，副教授，主要从事神经退行性疾病的临床和研究。E-mail：ery_caihbery@lzu.edu.cn

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the neuroprotective effects and mechanisms of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) in Parkinson's Disease (PD) animal models. **Methods** SD rats were divided into five groups: sham-operated group (Sham group), PD group (Parkinson's modeling group), PD + PACAP_low concentration group (modeling + 5 μg/kg of PACAP intranasal administration according to body weight), PD + PACAP_medium concentration group (modeling + 10 μg/kg of PACAP intranasal administration according to body weight), PD + PACAP_high concentration group (modeling + 20 μg/kg of PACAP intranasal administration according to body weight). Each group included 10 animals. The four PD models were established by injecting lipopolysaccharide solution into the substantia nigra of SD rats. The Sham group was operated in the same way but injected with saline. The behavioral performance of the rats was assessed using the rotarod test. The concentration of glutamate (Glu) and the levels of α-synuclein (α-syn) in the substantia nigra were detected using ELISA. The expression levels of α-syn in the substantia nigra, as well as those of κ-light chain of nuclear factor-activated B-cells (NF-κB) and inhibitor of nuclear factor κB (IκBα) were detected using WB analysis. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) was used to detect the mRNA expression levels of the rat nigral inflammatory factors Tumor Necrosis Factor α (TNF-α), Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-6 (IL-6). WB and immunofluorescence methods were used to detect the levels of nuclear transcription factor Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) to observe the activation level of astrocytes, and the TUNEL method was used to detect apoptosis in nigrostriatal neurons. **Results** (1) Behavioral results from the rotarod test indicated that compared to the Sham group, the PD group had a shorter latency and an increased number of falls (37.20±5.27 falls/min). In comparison to the PD group, the PACAP group showed a prolonged latency and a decreased number of falls (14.50±2.32 falls/min). As the concentration of PACAP increased, the latency in the PACAP group was prolonged, and the number of falls decreased (P<0.001). (2) Indicators related to astrocyte activation showed that the expression level of GFAP and the number of apoptotic nigrostriatal neurons were significantly higher in the PD group than in the Sham group. These indicators in the PACAP group were significantly reduced with the increasing concentration of PACAP (P<0.01). (3) Neuroinflammation markers in the substantia nigra showed that compared to the Sham group, the PD group had significantly increased NF-κB content and mRNA levels of *TNF-α, IL-1β, IL-6*, along with a significantly decrease in IκBα content. In the PACAP group, NF-κB content and mRNA levels of *TNF-α, IL-1β, IL-6* were reduced, and IκBα content was increased with rising concentration of PACAP (P<0.01). (4) Indicators of PD disease characteristics revealed that both glutamate and α-syn levels were significantly higher in the PD group compared to the sham group. These levels were significantly reduced in all three PACAP groups compared to the PD group, with a decreasing trend as the PACAP concentration increased (P<0.01), with the most pronounced effect observed in the PD + PACAP high concentration group. **Conclusion** PACAP exhibits neuroprotective effects in the PD model, potentially through the inhibition of astrocyte activation, thereby reducing neuroinflammation.

【**Keywords**】 Parkinson's disease; Neuroinflammation; Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; Astrocytes

帕金森病（Parkinson's Disease，PD）是最常见的神经退行性疾病之一，其患病率仅次于阿尔茨海默病[1-2]，到目前为止，其发病机制仍未明确。研究发现，PD患者中促炎细胞因子种类和数量均增加，此外较为常见的还有TNF-α、IL-1β和IL-6，目前IL-8、IL-12等在PD患者的脑脊液或血液中也存在着明显增多的趋势，表明神经炎症是PD多巴胺神经元退行性改变的重要因素之一[3-4]。中枢神经系统的炎症发生发展与小胶质细胞和星形胶质细胞的活化密切相关[5]。目前尚未有通过上述靶点抑制神经炎症的有效药物。研究表明，垂体腺苷酸环化酶激活多肽（Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide，PACAP）用于PD动物模型，可以显著缓解PD症状和提高动物存活率[6-8]，其机制可能与PACAP在神经退行性疾病中抑制神经炎症的免疫调节作用有关[9-10]。另有研究表明[8]，PACAP不能抑制PD动物模型中小胶质细胞的活化，也不能减少其数量，因此推测PACAP对PD的干预可能

是通过抑制星形胶质细胞的活化而产生抗炎效果，从而发挥神经保护作用。因此，本研究拟通过脂多糖（Lipopolysaccharides，LPS）注射入大鼠大脑黑质致密部建立PD动物模型[11]，探讨PACAP对PD大鼠模型星形胶质细胞活化水平和神经炎症的影响，期望可以为PACAP治疗PD的机制研究提供新思路。

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 动物

8周龄、360 g左右SD雄性大鼠65只，购自兰州大学动物房（批号SCXK[甘]2018-0002），大鼠在SPF环境中饲养；自由摄食和饮水；日夜光照交替各12 h；相对湿度为45%~65%；环境温度为22°C±2°C。

本实验严格遵照国家实验动物研究委员会的指南操作，所有实验动物由兰州大学第二医院伦理委员会、动物保护和使用委员会批准使用。

1.1.2 主要试剂和仪器

PACAP（Peptide Institute，日本大阪）；Lipopolysaccharide，LPS（Sigma-Aldrich公司，美国）；谷氨酸检测试剂盒（索莱宝科技有限公司，北京）；α-突触核蛋白抗体、GFAP抗体、核因子激活的B细胞的κ-轻链（NF-κB）抗体及核因子κB抑制蛋白α（IκBα）抗体（Adcam公司，英国）；*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6*引物设计与合成（英潍捷基贸易有限公司，上海）；TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（碧云天生物技术有限公司，上海）；PBS缓冲液（Coolaber公司，北京）；BSA牛血清白蛋白（金泰宏达生物科技有限公司，北京）；RIPA试剂盒（凯基试剂公司，南京）；Ethovision XT视频跟踪（Noldus信息技术有限公司，荷兰）；Bio-Rad电泳仪系统、ChemiDoc Touch化学发光成像系统（伯乐公司，美国）；51900型脑三维立体定位仪（Stoelting公司，美国）；SZX7体式显微镜（奥林巴斯公司，日本）；CM3050型冰冻切片机（LEICA公司，德国）。

1.2 方法

1.2.1 动物造模及给药

（1）造模处理：将65只SD雄性大鼠随机分为两组，实验组（PD组）54只，假手术组（Sham组）11只，经反复行为检测确认其无旋转行为后进行实验。①实验组：用10%水合氯醛（3.5 mL/kg）麻醉成功后，使用脑立体定位仪注射LPS（1 μg/kg）至大鼠大脑黑质中建立PD模型，术后第7 d腹腔注射阿扑吗啡（0.5 mg/kg），诱发大鼠旋转行为，记录其30 min内旋转圈数，当其转速>420 r/h，即为成功建立大鼠PD模型。最终共筛选出PD模型48只，进一步将其随机平均分为4组，分别记为模型组和低、中、高浓度治疗组，每组12只；②假手术组：用上述同样方法注射生理盐水至大鼠大脑黑质中。

（2）给药处理：①治疗组：从PD建模成功后当天，PACAP低、中、高浓度治疗组大鼠每天分别按体重5、10、20 μg/kg予PACAP鼻腔给药，持续21 d；②模型组：模型组大鼠予等体积生理盐水鼻腔给药，持续21 d；③假手术组：同模型组。

1.2.2 转棒法观察小鼠行为学表现

将SD大鼠造模前使用转棒法训练3 d，每天训练30 min。给PACAP不同浓度干预后的第0、5、10、15、21 d各进行转棒法观察一次，试验期间将动物放在旋转杆上；如果大鼠从杆上掉下来，必须立即放回杆上，大鼠在转棒上不掉落的时间记做潜伏期。将大鼠放置于正在运转的水平转棒上开始计时，软件自动记录小鼠2 min内掉落次数及潜伏期。

1.2.3 免疫荧光法观察各组大鼠黑质星形胶质细胞活化情况

Sham组、PD组和PACAP低、中、高浓度治疗组大鼠在持续21 d给药后完成行为学检测，每组随机选择3只大鼠立即灌流处死，迅速取出大脑，剥离脑皮质、小脑等组织，获取大脑黑质部分。制备大鼠大脑黑质冰冻切片，将大脑黑质组织迅速放入异戊烷中速冻10 s左右，用锡箔纸轻柔将其包裹好放-80°C冰箱冻硬保存，复温，用OTC包埋剂包埋大鼠脑组织，进行大鼠脑组织冠状面切片，切片厚度设定为10 μm，切片5张左右，用冰甲醇进行固定20 min；PBS洗涤5 min×3次；滴加BSA封闭，37°C下孵育30 min；滴加稀释一抗兔抗鼠GFAP多克隆抗体（1∶150稀释）4°C过夜，PBS洗涤5 min×5次，同时滴加稀释的Alexa Fluor647标记的抗兔二抗（1∶1 000稀释）避光孵育2 h，PBS洗涤5 min×5次，每张切片上滴加一滴DAPI复染，冲洗后用抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜下拍照，使用Image J进行图像分析，若有星形胶质细胞活化可看到GFAP表达的增加，即红色荧光表达增多。本实验中通过DAPI染的细胞核呈蓝色，Alexa Fluor647标记的GFAP蛋白呈现红色荧光。

1.2.4 TUNEL荧光法观察各组大鼠黑质神经元凋亡情况

Sham组、PD组和PACAP低、中、高浓度治疗

组大鼠在持续21 d给药后完成行为学检测，每组随机选择3只大鼠立即麻醉后，采用100 mL生理盐水和250 mL多聚甲醛溶液依次进行左心室灌流，待四肢僵硬灌注成功后，快速断头取全脑，置4%多聚甲醛中4°C过夜，随后脱水、OCT包埋，用冷冻切片机制备10 μm厚度的大鼠大脑黑质冰冻切片，每只大鼠3张黑质切片，用冰甲醇进行固定20 min；PBS洗涤5 min×3次；浸入封闭液（3%H_2O_2）室温封闭10 min，PBS漂洗5 min×3次；浸入通透液（0.1% Triton X-100溶于PBS中），室温通透30 s-2 min；配制适量的TUNEL检测液，其中含有终端脱氧核苷酸转移酶（Terminal deoxynucleotidyl Transferase，TdT）、荧光标记液、TUNEL检测液；样品上加入适量TUNEL检测液，37°C避光孵育60 min，PBS漂洗5 min×3次；用DAPI复染细胞核；使用抗荧光淬灭封片液封片后在荧光显微镜下进行观察。若有细胞凋亡发生，可观察TUNEL阳性细胞数目和细胞类型，可通过TUNEL荧光强度判别凋亡程度的相对强弱。

1.2.5 实时荧光定量核酸扩增检测法（qPCR）检测黑质*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6*基因表达水平

组织获取同前。称取每组7只大鼠的右侧大脑黑质组织50 mg存放于1 mL Trizol中保存，组织匀浆5 min，静置于冰上15 min；将离心后的上清液转移至新离心管；加入200 μL氯仿，震荡15 s，静置10 min；以12 000 rpm的条件离心15 min；离心结束后吸取中间层水相RNA，移入新离心管；加入等体积500 μL异丙醇，混匀后静置10 min；继续离心10 min；离心结束后弃上清液取RNA沉淀；加入1 mL 75%的DEPC乙醇，震荡15 s，静置30 s；再次离心5 min；弃上清液，室温下静置5 min，用适量DEPC水溶解RNA；利用NanoDrop 2000c紫外-可见分光光度计（NanoDrop 2000）测定RNA浓度后，于-80°C冰箱保存；取出RNA样品反转录成cDNA后保存于-30°C冰箱，用于qPCR检测。在42°C条件下15 min和85°C条件下反转录5 min，收集所产生的cDNA。qPCR分析的反应体系由Ultra SYBR Mixture 10 μL、10 μmol/mL PCR前引物1 μL、10 μmol/mL PCR后引物1 μL、cDNA模板2 μL和双蒸水6 μL构成。qPCR反应条件：95°C变性5 min；之后95°C 15 s、60°C 60 s共循环40次。本文使用的引物包括：*TNF-α*前引物：ATGAGCACAGAAAGCATGATC，后引物：TACAGGCTTGTCACTCGAATT；*IL-1β*前引物：AAGAAGAGCCCATCCTCTGTG，后引物：TGTTCATCTCGGAGCCTGTAG；*IL-6*前引物：CTGGATTCAATGAGGAGACTTGCC，后引物：GGTTGGGTCAGGGGTGGTTA。

1.2.6 ELISA法检测各组大鼠谷氨酸和α-突触蛋白水平

既往有研究表明[12]，在PD患者黑质中存在谷氨酸代谢异常和α-突触蛋白的异常表达，二者可视为PD的疾病特征之一。Sham组、PD组和PACAP低、中、高浓度治疗组大鼠在持续21 d给药后完成行为学检测，每组随机选择7只大鼠立即灌流处死，迅速取出大脑，剥离脑皮质、小脑等组织，将其分为左、右侧大脑黑质两部分，分别放置于-80°C冰箱备用。称取每组3只大鼠的左侧大脑黑质0.5 mg，加入500 μL的PBS（pH7.4），将标本匀浆充分，在3 000 rpm的条件下离心20 min，过滤得上清液，配置浓度梯度的标准品，用450 nm波长的酶标仪从空白开始检测标准品及各组样品的吸光度（OD值），依据标准品浓度绘制浓度-吸光度曲线，通过各组样品的吸光度值得出相应样品的浓度。

1.2.7 Western Blot（WB）法检测各组大鼠α突触蛋白、NF-κB、IκBα和GFAP表达水平

组织获取同前。称取每组3只大鼠的左侧大脑黑质组织20 mg，加入RIPA裂解液，冰上超声裂解后在12 000 rpm的条件离心10 min，取上清液采用BCA法测定蛋白浓度，以1∶4的体积加入（5X）SDS上样缓冲液，配成终浓度为5 μg/μL的蛋白浓度，涡旋混匀后于100°C水浴中变性10 min；将等量蛋白和分子量标志物上样至SDS-PAGE凝胶孔中，每孔20 μg，进行SDS-PAGE电泳，电泳结束后电X转至PVDF膜，封闭1 h后进行相应抗体（GAPDH、α突触蛋白、NF-κB、IκBα和GFAP）孵育，洗膜后置于成像仪中进行化学发光显影，经凝胶成像系统曝光并采集图片，以GAPDH作为内参，Image J软件对各条带灰度值半定量分析。

1.3 统计学处理

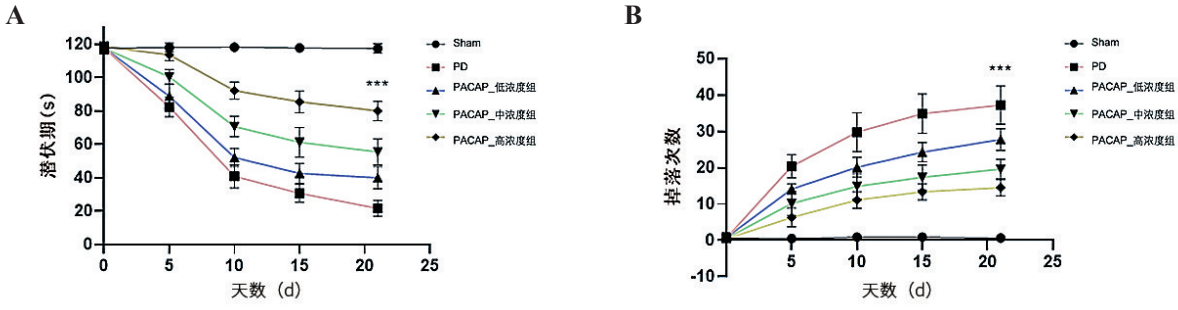
使用GraphPad Prism 9.1和Image J软件进行统计分析及作图。所得数据经检验后均符合正态分布，采用均数±标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），组间两两比较采用LSD-*t*检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠行为学表现比较

图1A所示，与Sham组相比，PD组第5、10、

15和21 d相同时间点的转棒行为学潜伏期显著性减少（P<0.001）；各PACAP治疗组上述指标均较PD组显著增加（P<0.001），且增加程度随PACAP给药浓度升高而升高，其中PD+PACAP_高浓度组在第5、10、15、21 d的转棒行为学潜伏期较PD组显著性改善，即PD+PACAP_高浓度组大鼠在第5、10、15、21 d的旋转棒上停留的时间远多于PD组，平衡性优于PD组（P<0.001）。图1B所示，与Sham组相比，PD组在第5、10、15和21 d相同时间点的转棒行为学掉落次数显著性增多；而PACAP治疗组的掉落次数较PD组显著减少，且减少程度随PACAP浓度升高而升高（P<0.001），说明在给予PACAP治疗后可以一定程度改善PD大鼠的运动协调性和平衡能力。



A.各组大鼠在转棒实验中从开始在旋转棒上移动直至掉落之间的时间比较；B.各组大鼠在转棒实验中从旋转棒上掉落的次数比较（***：P<0.001）。Sham组：假手术组；PD组：帕金森模型组；PD+PACAP_低浓度组：帕金森模型+低浓度PACAP治疗组；PD+PACAP_中浓度组：帕金森模型+中浓度PACAP治疗组；PD+PACAP_高浓度组：帕金森模型+高浓度PACAP治疗组。

图1　各组大鼠的行为学表现

Figure 1　Behavioral performance of rats in each group

2.2　各组大鼠大脑黑质GFAP表达和神经元凋亡比较

神经炎症的发生可以导致星形胶质细胞的活化，且同时可能伴有神经元损伤和凋亡。如图2A-D所示，与Sham组相比，PD组GFAP表达水平显著升高，WB结果与免疫荧光结果保持一致（P<0.001）；而各PACAP治疗组GFAP表达水平均较PD组明显下降，且随PACAP浓度升高而下降，表明造模成功后神经炎症的发生，星形胶质细胞被激活，而PACAP对黑质星形胶质细胞活化有抑制的作用。

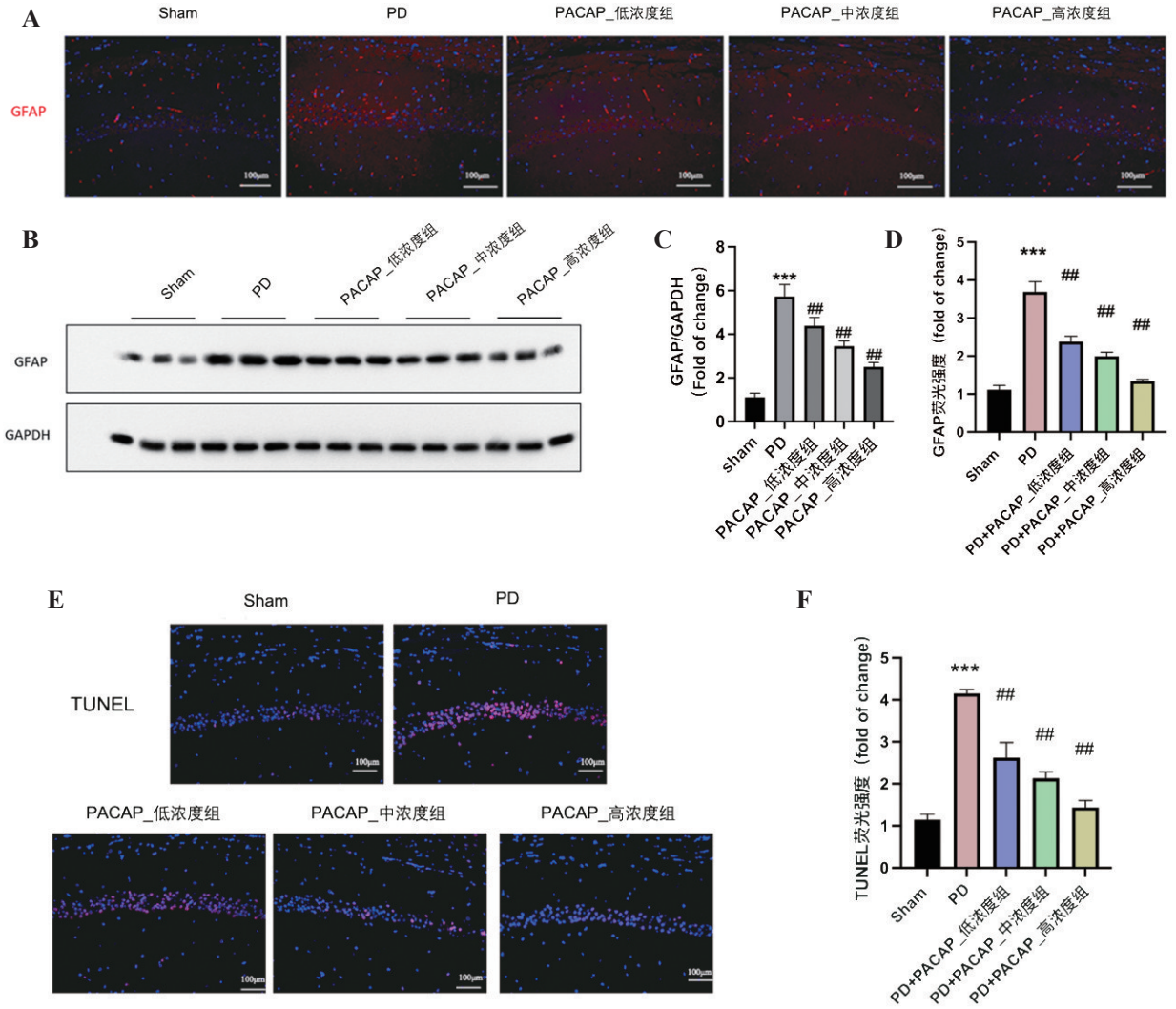
由图2E和2F可见，与Sham组相比，PD组神经元凋亡数量明显上升，约为Sham组的3.6倍（P<0.001）；PACAP治疗组的神经元凋亡水平均较PD组显著下降，且随PACAP浓度升高而下降，其中PD+PACAP_高浓度组是PD组的0.35倍（P<0.01）。即造模后可观察到神经元凋亡数量明显增加，而PACAP对神经元凋亡数量有缓解作用。

2.3　各组大鼠黑质神经炎症因子表达比较

神经炎症是PD多巴胺神经元退行性改变的重要因素之一，炎性细胞活化和炎性因子释放增加可能加速多巴胺神经元的退行性变化，并可能促进PD的病理进展。图3A和3B结果所示，与Sham组相比，PD组NF-κB表达水平显著升高；PACAP治疗组NF-κB表达水平均较PD组显著降低，且随PACAP浓度升高而降低（P<0.001）。同样，与Sham组比较，PD组NF-κB的抑制蛋白IκBα表达水平显著下降；PACAP治疗组IκBα表达水平均较PD组显著升高，且随PACAP浓度升高而升高（见图3C和3D）（P<0.001）。对一些常见的炎症因子通过qPCR实验方法检测发现，如图3E-G结果所示，与Sham组相比，PD组*TNF-α*、*IL-1β*和*IL-6*的mRNA表达水平显著上升，PACAP治疗组*TNF-α*、*IL-1β*和*IL-6*的mRNA表达水平均较PD组显著下降（P<0.001），且随PACAP浓度升高而降低（P<0.01）。即在造模后大鼠海马组织内的NF-κB表达明显升高，IκBα表达明显下降，表明存在一定的炎症，而在给予不同浓度的PACAP治疗后，其常见炎症因子的表达有所下降，我们认为PACAP对于PD引起的神经炎症可能存有缓解的作用。

2.4　黑质谷氨酸和α-突触蛋白表达比较

Glu和α-syn的异常表达可视为帕金森疾病的特征之一[12]。从图4可以看出，与Sham组相比，PD组Glu和α-syn表达水平显著升高（P<0.001）；各PACAP治疗组Glu和α-syn表达水平较PD组显著减少，且减少程度随PACAP浓度升高而升高，其中PD+PACAP_高浓度组Glu和α-syn表达水平分别是PD组的0.53倍和0.45倍，远低于PD组表达水



A、D：通过免疫荧光对GFAP在各组的表达进行了定性、定量分析；B、C：通过WB检测GFAP蛋白在各组海马组织中的表达；E、F：通过TUNEL染色评估神经元凋亡的定性、定量分析（***：P<0.001，与Sham组相比；##：P<0.01，与PD组相比）。Sham组：假手术组；PD组：帕金森模型组；PD+PACAP_低浓度组：帕金森模型+低浓度PACAP治疗组；PD+PACAP_中浓度组：帕金森模型+中浓度PACAP治疗组；PD+PACAP_高浓度组：帕金森模型+高浓度PACAP治疗组；GFAP：核转录因子胶质纤维酸性蛋白。

图2　各组大鼠大脑黑质GFAP表达和神经元凋亡比较

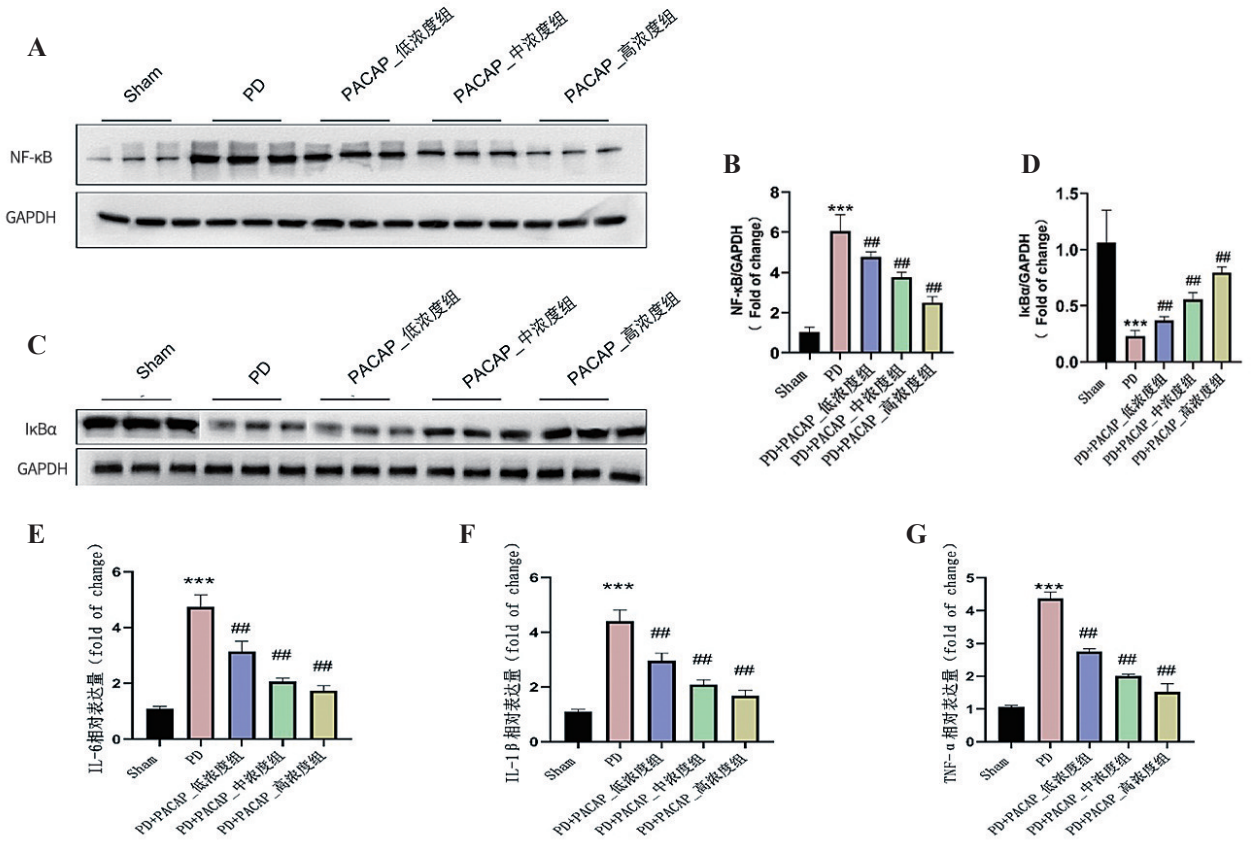
Figure 2　Comparison of GFAP expression and neuronal apoptosis in the substantia nigra of rat brain

平（P<0.01）。而通过海马组织内α-syn蛋白水平的检测（见图4）可见PD组的表达明显多于Sham组，在不同浓度PACAP治疗后，其α-syn蛋白水平的表达随PACAP浓度的升高表达呈现下降趋势（P<0.01）。即不同浓度的PACAP治疗后对PD本身引起的Glu和α-syn异常表达具有一定的改善作用。

3　讨论

PACAP是一种重要的神经保护肽，其不仅在神经元上表达，还存在于星形胶质细胞、小胶质细胞和外周炎症细胞[13-14]。在损伤或神经炎症发生后，其在神经元和免疫细胞中表达上调，这使其不仅具有保护神经元的作用，也具有强大的免疫调节作用[15-16]。中枢神经系统中的星形胶质细胞能对炎症信号产生响应，并且在某种程度上也能自身促进炎症反应的发生，因此在PD等神经退行性疾病中扮演重要角色[5]。

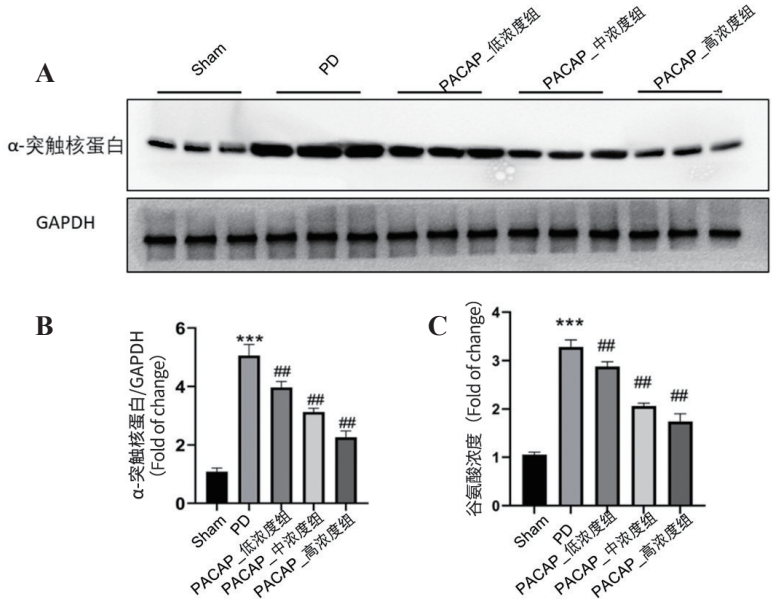
本研究使用向大鼠黑质中注射LPS的方法建立大鼠PD模型。转棒法是用于观察PD模型大鼠运动平衡和协调能力的常用方法。本研究结果发现，与Sham组比较，PD组在转棒上的潜伏期显著缩短，掉落次数显著增加，这与多数文献报道一致[17]。谷氨酸增多诱发的兴奋性毒性也常被认为是PD发病的重要特征[18-19]，在本次研究中，通过ELISA检测大鼠黑质的谷氨酸含量发现PD组较对照组显著升高。此外，构成路易小体的α-syn在黑质中增多也



A-D：用WB实验方法检测NF-κB和IκBα蛋白水平的表达；E-G：用q-PCR实验技术观察*IL-6*、*IL-1β*和*TNF-α*的mRNA表达水平（***：P<0.001，与Sham组相比；##：P<0.01，与PD组相比）。Sham组：假手术组；PD组：帕金森模型组；PD+PACAP_低浓度组：帕金森模型+低浓度PACAP治疗组；PD+PACAP_中浓度组：帕金森模型+中浓度PACAP治疗组；PD+PACAP_高浓度组：帕金森模型+高浓度PACAP治疗组。

图3　各组大鼠黑质相关炎症因子比较

Figure 3　Comparison of nigrostriatal-associated inflammatory factors in rats in each group



Sham组：假手术组；PD组：帕金森病；PACAP：垂体腺苷酸环化酶激活多肽；α-syn：α突触蛋白；Glu：谷氨酸；GAPDH：管家蛋白（参照）。（***：P<0.001，与Sham组相比；##P<0.01，与PD组相比）。

图4　WB检测各组大鼠黑质α-syn表达水平（GAPDH做参照）

Figure 4　WB detection of rat nigral α-syn expression level in each group （GAPDH was used as a reference）

是PD的重要病理生理学特征[12,20]，本研究中ELISA联合WB实验均证实PD组黑质的α-syn较对照组显著升高，进一步表明PD大鼠模型建立成功。同时，在不同浓度的PACAP治疗下，发现与PD组相比，治疗5 d后治疗组大鼠在转棒上的潜伏期延长，掉落次数明显减少，且PD+PACAP_高浓度组的表现优于PD+PACAP_中浓度组和PD+PACAP_低浓度组，表明PACAP对于PD模型症状有改善作用。越来越多的研究表明，神经炎症可能在PD的发病机制中发挥重要作用[21-22]，NF-κB是TLR4通路下游的重要靶点，其由胞浆转移至胞内发挥激活炎症因子表达的作用，其激活的炎症因子包括TNF-α、IL-1β和IL-6等[13,23-24]。而IκBα是NF-κB的抑制蛋白。本研究中PD组NF-κB表达水平较对照组表达水平显著升高，而PACAP治疗组的NF-κB表达水平较PD组显著降低，且随PACAP浓度升高而降低，同时IκBα在PD组和PACAP治疗组的表达水平变化与NF-κB相反。这些结果表明，PACAP干预帕金森病的机制与NF-κB炎症通路密切相关。通过q-PCR检测大鼠黑质NF-κB下游炎症因子基因*TNF-α*、*IL-1β*和*IL-6*的表达水平进一步佐证了上述结果。

当发生神经炎症时，星形胶质细胞是最先被激活的细胞类型之一，激活的星形胶质细胞会释放细胞因子和炎性介质，释放的炎性介质可能会导致神经元损伤和凋亡[25-26]。本研究使用WB法和免疫荧光检测了大鼠黑质的星形胶质细胞标志物GFAP表达水平，结果表明PD组GFAP表达水平较对照组显著升高，表明PD模型大鼠黑质的星形胶质细胞被激活。而各PACAP治疗组的GFAP表达水平较PD组明显降低，且随PACAP浓度升高而降低更明显，这些结果表明，PACAP干预PD的机制可能与降低星形胶质细胞活化水平密切相关。接着又使用Tunel法检测了大鼠黑质神经元的凋亡情况，结果显示，PD组较Sham组其凋亡的神经元数量明显增多，而不同浓度的PACAP治疗组与PD组相比，其凋亡的神经元数量呈下降趋势，表明PACAP能减少PD模型中的神经元凋亡，且随其浓度升高而减少更明显，说明PACAP可能通过抑制神经炎症而减少PD模型中神经元凋亡，发挥神经保护作用。

综上所述，本研究表明PACAP在帕金森病模型中通过抑制星形胶质细胞的激活，来减轻神经炎症的发生从而发挥神经保护作用，鉴于目前治疗帕金森病的药物存在的局限性和副作用，这可能为PACAP治疗帕金森病的机制研究提供了新思路。

参考文献

[1] JANKOVIC J, TAN E K. Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2020, 91(8): 795-808.

[2] 王诗婵, 商慧芳. 帕金森病精准诊疗的现状和展望[J]. 中华神经科杂志, 2023, 56(5): 469-475.

[3] DE CHIRICO F, POETA E, BABINI G, et al. New models of Parkinson's like neuroinflammation in human microglia clone 3: Activation profiles induced by INF-γ plus high glucose and mitochondrial inhibitors[J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 1038721.

[4] FU J, CHEN S, LIU J, et al. Serum inflammatory cytokines levels and the correlation analyses in Parkinson's disease[J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1104393.

[5] KISLER K, NELSON A R, MONTAGNE A, et al. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2017, 18(7): 419-434.

[6] SOLÉS-TARRÉS I, CABEZAS-LLOBET N, VAUDRY D, et al. Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide against cognitive decline in neurodegenerative diseases [J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 221.

[7] MAASZ G, ZRINYI Z, REGLODI D, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration in rat and snail Parkinsonian models[J]. Dis Model Mech, 2017, 10(2): 127-139.

[8] YU R J, LI J F, LIN Z C, et al. TAT-tagging of VIP exerts positive allosteric modulation of the PAC1 receptor and enhances VIP neuroprotective effect in the MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2020, 1864(8): 129626.

[9] FIGUEIREDO-PEREIRA M E, CORWIN C, BABICH J. Prostaglandin J2: A potential target for halting inflammation-induced neurodegeneration[J]. Ann N Y Acad Sci, 2016, 1363(1): 125-137.

[10] 孙悦, 刘梅芳, 郇宇, 等. 神经肽PACAP对帕金森病的保护作用[J]. 生理科学进展, 2020, 51(6): 422-426.

[11] MIYANISHI K, CHOUDHURY M E, WATANABE M, et al. Behavioral tests predicting striatal dopamine level in a rat hemi-Parkinson's disease model[J]. Neurochem Int, 2019, 122: 38-46.

[12] ZHANG Y, MENG X, JIAO Z, et al. Generation of a novel mouse model of Parkinson's disease via targeted knockdown of glutamate transporter GLT-1 in the substantia nigra[J]. ACS Chem Neurosci, 2020, 11(3): 406-417.

[13] BALANCE W C, QIN E C, CHUNG H J, et al. Reactive oxygen species-responsive drug delivery systems for the

treatment of neurodegenerative diseases[J]. Biomaterials, 2019, 217: 119292.

[14] FIGUEIREDO C A, DÜSEDAU H P, STEFFEN J, et al. The neuropeptide PACAP alleviates T. gondii infection-induced neuroinflammation and neuronal impairment[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 274.

[15] BROOME S T, MUSUMECI G, CASTORINA A. PACAP and VIP mitigate rotenone-induced inflammation in BV-2 microglial cells[J]. J Mol Neurosci, 2022, 72(11): 2163-2175.

[16] KARUNIA J, NIAZ A, MANDWIE M, et al. PACAP and VIP modulate LPS-Induced microglial activation and trigger distinct phenotypic changes in murine BV2 microglial cells[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 10947.

[17] BREMBATI V, FAUSTINI G, LONGHENA F, et al. Changes in α-Synuclein posttranslational modifications in an AAV-Based mouse model of Parkinson's disease[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(17): 13435.

[18] TODD A C, HARDINGHAM G E. The regulation of astrocytic glutamate transporters in health and neurodegenerative diseases[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9607.

[19] 马利芳, 梁建庆, 何建成, 等. 谷氨酸转运体在帕金森病发病机制中作用的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2021, 41(12): 1813-1817.

[20] SULZER D, ALCALAY R N, GARRETTI F, et al. T cells from patients with Parkinson's disease recognize α-synuclein peptides[J]. Nature, 2017, 546(7660): 656-661.

[21] ZHANG Z B, LIU Q Z, LIU M, et al. Upregulation of HMGB1-TLR4 inflammatory pathway in focal cortical dysplasia type Ⅱ[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 27.

[22] 赵秀鑫, 任惠. 帕金森病与炎症相关的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(1): 52-56.

[23] JIAO F Z, WANG Y, ZHANG H Y, et al. Histone deacetylase 2 inhibitor CAY10683 alleviates lipopolysaccharide induced neuroinflammation through attenuating TLR4 / NF-κB signaling pathway[J]. Neurochem Res, 2018, 43 (6): 1161-1170.

[24] SAKLANI P, KHAN H, GUPTA S, et al. Neuropeptides: Potential neuroprotective agents in ischemic injury[J]. Life Sci, 2022, 288: 120186.

[25] BATISTA C R A, GOMES G F, CANDELARIO-JALIL E, et al. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2293.

[26] 刘静, 司景梅. 神经炎症介导的帕金森病运动防治研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(6): 1510-1515.

（上接第107页）

A retrospective case–control study[J]. Lipids Health Dis, 2022, 21(1): 123.

[24] WENZEL H, OLTHOF E P, BEKKERS R, et al. Primary or adjuvant chemoradiotherapy for cervical cancer with intraoperative lymph node metastasis-A review[J]. Cancer Treat Rev, 2022, 102: 102311.

[25] TIAN Y, MA J, WANG H, et al. BCAT2 promotes melanoma progression by activating lipogenesis via the epigenetic regulation of FASN and ACLY expressions[J]. Cell Mol Life Sci, 2023, 80(11): 315.

[26] UMEH-GARCIA M, SIMION C, HO P Y, et al. A novel bioengineered miR-127 prodrug suppresses the growth and metastatic potential of triple-negative breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2020, 80(3): 418-429.

[27] MAO X, LEI H, YI T, et al. Lipid reprogramming induced by the TFEB-ERRα axis enhanced membrane fluidity to promote EC progression[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 28.

[28] DU D, LIU C, QIN M, et al. Metabolic dysregulation and emerging therapeutical targets for hepatocellular carcinoma[J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(2): 558-580.

[29] CASTAGNOLI L, CORSO S, FRANCESCHINI A, et al. Fatty acid synthase as a new therapeutic target for HER2-positive gastric cancer[J]. Cell Oncol (Dordr), 2023, 46 (3): 661-676.

[30] XU G, ZHAO Z, WYSHAM W Z, et al. Orlistat exerts anti-obesity and anti-tumorigenic effects in a transgenic mouse model of endometrial cancer[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1219923.

[31] XING X, TIAN Y, JIN X. Immune infiltration and a necroptosis-related gene signature for predicting the prognosis of patients with cervical cancer[J]. Front Genet, 2022, 13: 1061107.