

DOI:10.16305/j.1007-1334.2025.z20240713001

健脾补肾方对肌萎缩侧索硬化小鼠的干预效果及作用机制

潘 昊¹, 刘 特², 张 祯¹, 吕星航³, 刘逸舟¹, 王明哲¹, 段继峰⁴, 费智敏¹

1. 上海中医药大学附属曙光医院(上海 201203); 2. 上海市中医老年医学研究所(上海 200031); 3. 中欧国际工商学院(上海 201206); 4. 澎立生物医药技术(上海)股份有限公司(上海 201201)

【摘要】 目的 探索健脾补肾方对肌萎缩侧索硬化(ALS)模型小鼠运动功能的影响及其机制。**方法** 将12只采取转基因法繁育的保留部分运动功能的ADAR2^{flox/flox}/VChT-Cre小鼠(AR2小鼠)随机分为模型组和治疗组,每组6只;以6只同批次野生型(WT)小鼠为对照组。治疗组小鼠灌胃给予健脾补肾方[30 g/(kg·d)],对照组和模型组小鼠灌胃给予0.2 mL氯化钠溶液(9 g/L),每日1次,连续干预8周。每周观察小鼠活动状况、体质量以及抓力、抗疲劳能力(滚轮测试)等行为学功能。第24周后取样,采用苏木精-伊红(HE)染色法、尼氏染色法观察各组小鼠脊髓前角组织病理变化,采用Western blot法检测各组小鼠脊髓组织中作用于RNA的腺苷脱氨酶2(ADAR2)、转录反应DNA结合蛋白-43(TDP-43)的蛋白表达量,透射电镜观察小鼠脊髓组织超微结构。**结果** 与对照组比较,模型组小鼠体质量随周龄逐渐增长;与模型组比较,治疗组小鼠体质量降低。与对照组比较,模型组小鼠与治疗组小鼠抗疲劳程度均有所下降,但是治疗组小鼠的抗疲劳能力下降相对模型组有所延缓。与对照组比较,模型组小鼠抓力下降;与模型组比较,治疗组抓力下降相对减缓。与对照组相比,模型组TDP-43表达量显著降低($P<0.001$);与模型组相比,治疗组TDP-43表达量显著升高($P<0.05$)。与对照组相比,模型组ADAR2表达量显著降低($P<0.01$),治疗组与模型组之间ADAR2表达量没有显著差异($P>0.05$)。与对照组相比,模型组脊髓前角运动神经元损伤严重,神经元结构不完整;与模型组相比,治疗组神经细胞凋亡数量减少。透射电镜下,模型组与对照组比较出现明显的线粒体肿胀凋亡、髓鞘脱散现象;治疗组与对照组相比较存在部分髓鞘脱散、线粒体肿胀,相对于模型组,存在肿胀凋亡现象的神经细胞数量有所减少。**结论** 健脾补肾方能延缓ALS模型小鼠运动功能的减退,减少脊髓运动神经元的凋亡和损伤,阻止散发性ALS(sALS)病理异常标志物TDP-43的生成,保护脊髓神经元有髓神经纤维与线粒体,有效延缓ALS小鼠疾病的进展与功能的丧失。

【关键词】 肌萎缩侧索硬化;健脾补肾方;作用机制;小鼠模型;中药研究

Intervention effect and mechanism of Jianpi Bushen Formula on amyotrophic lateral sclerosis mouse

PAN Hao¹, LIU Te², ZHANG Zhen¹, LYU Xinghang³, LIU Yizhou¹, WANG Mingzhe¹, DUAN Jifeng⁴, FEI Zhimin¹

1. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Geriatric Institute of Chinese Medicine, Shanghai 200031, China; 3. China Europe International Business School, Shanghai 201206, China; 4. Pengli Biomedical Technology (Shanghai) Co., LTD, Shanghai 201201, China

Abstract: Objective To explore the effect of Jianpi Bushen Formula on motor function of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model mice and its mechanism. **Methods** Twelve ADAR2^{flox/flox}/VChT-Cre mice (AR2 mice) produced by transgenic method to retain part of the motor function were divided into the model group and the treatment group, with 6 mice in each group; 6 wild-type (WT) mice from the same batch were used as the control group. The mice in the treatment group were given Jianpi Bushen Formula [30 g/(kg·d)] by intragastric administration, while the mice in the

control and model groups received 0.2 mL of sodium chloride solution (9 g/L) by intragastric administration once a day for 8 consecutive weeks. Mice were observed weekly for activity, body mass, and behavioral functions such as grip strength and fatigue resistance (roller test). Following a 24-week period, the mice were subjected to sampling, with the anterior horn of the spinal cord undergoing staining with both haematoxylin-eosin (HE) and Nissl stainings, in order to observe the histopathological changes in the aforementioned

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373619);上海市浦东新区卫生行业专项(PW2022E-03)

[作者简介] 潘昊,男,硕士研究生,主要从事神经退行性疾病研究工作

[通信作者] 费智敏,主任医师,教授,硕士研究生导师;

E-mail:tommyfei@126.com

region of the spinal cords of the mice in all experimental groups. The protein expression of adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) and TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) in the tissues of each group was detected by Western blot, and the ultrastructural changes of the anterior horn in each group were detected by transmission electron microscopy. **Results** In comparison to the control group, the body mass of mice in the model group exhibited a gradual increase with age, whereas the body mass in the treatment group demonstrated a decline in comparison to the model group. Compared with the control group, the anti-fatigue degree of mice in the model group and the treatment group decreased. However, the decline in anti-fatigue capacity observed in the treatment group occurred at a later stage in comparison to the model group. In comparison to the control group, the model group of mice exhibited a reduction in grip strength, with the decline in grip strength in the treatment group occurring at a relatively slower rate than that observed in the model group. The expression of TDP-43 was found to be significantly lower in the model group when contrasted with the control group ($P<0.001$). The treatment group exhibited elevated TDP-43 expression when contrasted with the model group ($P<0.05$). ADAR2 expression was observed to be significantly lower in the model group when contrasted with the control group ($P<0.01$), but no significant difference in ADAR2 expression was noted between the treatment group and the model group ($P>0.05$). Compared with the control group, the model group had severe motor neuron damage in the anterior horn of the spinal cord, and the neuronal structure was incomplete; Compared with the model group, the apoptosis number of nerve cells was reduced in the treatment group. Transmission electron microscopy revealed a notable increase in mitochondrial swelling apoptosis and demyelination in the model group when compared to the control group. Additionally, the treatment group exhibited partial demyelination and mitochondrial swelling when compared to the control group; the number of nerve cells with swelling and apoptosis was observed to be reduced when compared to the model group. **Conclusion** Jianpi Bushen Formula can delay the hypokinesia in ALS model mice, reduce the apoptosis and damage of spinal cord motor neurons, prevent the production of TDP-43, an abnormal marker of sporadic ALS (sALS) pathology, and protect the myelinated nerve fibers and mitochondria of spinal cord neurons, so as to effectively delay the progression of the disease and the loss of function in ALS mice.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis; Jianpi Bushen Formula; mechanism of action; mouse model; traditional Chinese herbal medicine research

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种常见的成人运动神经元病,其特征为上下运动神经元进行性丧失,患者常起病于单侧肢体,后病情进展迅速,最后因呼吸肌无力、营养障碍在发病后数年内死亡^[1]。ALS 发病大多数 (>90%) 为散发性起病,仅有少数 (<10%) 患者为家族性,除了刚上市在使用阶段的 Tofersen 是针对于家族性的 ALS 之外,目前治疗方法的研发都集中于散发性 ALS (sporadic ALS, sALS)^[2]。

健脾补肾方 (又称温肾健脾方、加味四君子汤) 是上海中医药大学附属曙光医院治疗 ALS 的协定方,由茯苓、人参、白术、甘草、黄芪、淫羊藿和肉苁蓉组成,具有健脾补肾、强筋壮骨、营养宗筋的作用。临床研究^[3-4]显示,健脾补肾方可减轻 ALS 患者症状,该方联合基础西药与营养支持治疗显著优于单用基础西药与营养支持治疗。为进一步探讨其作用机制,本研究采用健脾补肾方对 ADAR2^{flox/flox}/VChAT-Cre 小鼠 (简称“AR2 小鼠”) 进行干预,观察其对 AR2 小鼠运动功能、脊髓组织病理变化、转录反应 DNA 结合蛋白-43 (TDP-43) 表达以及脊髓组织超微结构变化的影响,探索其治疗 ALS 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 AR2 小鼠 12 只,同批次野生型 (WT) 小鼠 6 只,体质量 20~30 g,SPF 级,购于上海南方模式生物科技有限公司。动物生产许可证号:SCXK (沪) 2019-

0002; 动物使用许可证号:SYXK (沪) 2018-0002。小鼠饲养于上海懿尚生物科技有限公司,动物饲养条件:饲养于 SPF 小鼠设施 IVC 笼盒中,饲养盒规格为长×宽×高=389 mm×200 mm×150 mm,每笼 5 只;动物自由摄食和饮水,环境条件控制在室温 20~26 °C,相对湿度 40%~70%,光照 12 h 明暗交替。各项动物实验均遵守相关管理条例,并通过上海南方模式生物科技有限公司动物看护与使用委员会审批 (伦理审批号:2023-0022)。

1.1.2 药物与试剂 健脾补肾方由人参 15 g,茯苓 15 g,白术 15 g,甘草 10 g,黄芪 30 g,肉苁蓉 30 g,淫羊藿 25 g 组成。制备方法:将上述药材与 500 mL 蒸馏水混合,煮沸 1 h,过滤得到上清液。再次加入 500 mL 蒸馏水,继续煮沸 1 h。将两次得到的药液合并,使用小火将其浓缩至 50 mL。待药液冷却后,加入无水乙醇并进行搅拌,持续一整夜。随后,以 25 000 r/min 的速度离心 20 min,只取上清液部分。然后,通过恒温蒸发的方式去除乙醇,再用蒸馏水调整药物浓度至 1 g/mL。最后,进行高压灭菌处理,并将处理后的药物存放在 -20 °C 的冰箱中待用。根据前期研究结果^[5],确定小鼠最佳有效剂量为 30 g/(kg·d)。

二辛可酸 (BCA) 定量试剂盒 (批号: B69320), 上海翌圣生物科技有限公司; 增强型化学发光 (ECL) 显影液 (批号: P0018M), 上海碧云天生物技术有限公司; 磷酸盐缓冲盐 (PBS) 溶液 (批号: BF-0011), 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; PAGE 凝胶快速制备试剂盒、无蛋白快速封闭液 (批号分别为 PG-112、PS108P), 上海雅酶生

物医药科技有限公司;蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(批号分别为 04693116001、04906837001),瑞士 Roche 公司;聚偏二氟乙烯膜(PVDF)(批号:PR05507),美国 Millipore 公司;HRP 标记的抗兔二抗、HRP 标记的抗鼠二抗(批号分别为 111-035-00、115-035-003),美国 Jackson ImmunoResearch 公司;TDP-43 抗体(批号:A19123),武汉爱博泰克有限公司;作用于 RNA 的腺苷脱氨酶 2(ADAR2)抗体、 β -微管蛋白(批号分别为 ab290638、ab18207),英国 Abcam 公司;尼氏染色液(批号:G1036),武汉赛维尔公司。

1.1.3 主要仪器 凝胶成像仪(型号:Tanon-1600),上海天能科技有限公司;组织匀浆机(型号:TL-48E),上海净信科技有限公司;垂直电泳仪(型号:O43BR47575),美国 Bio-Rad 公司;转轮式疲劳仪(型号:YLS-10B),济南益延科技有限公司;透射电镜(型号:JEM-1230),日本电子公司。

1.2 分组 12 只采用转基因方法制备保留部分运动功能的 AR2 模型小鼠随机分为模型组、治疗组,每组 6 只;以同批次 6 只 WT 小鼠为对照组。

1.3 干预方法 小鼠 15 周龄时开始给药干预。治疗组每日灌胃给予按“1.1.2”项下要求配制的健脾补肾方 0.2 mL[30 g/(kg·d)],模型组、对照组灌胃给予与治疗组等体积(0.2 mL)的氯化钠溶液(9 g/L),每日 1 次,连续给药 8 周。24 周后对各组小鼠进行取材。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 行为学检测 小鼠每周进行 1 次行为学检测,行为学检测包括体质量检测、抗疲劳学检测以及抓力检测。

1.4.1.1 体质量检测 每周对小鼠体质量进行测量,观察各组小鼠的体质量变化。

1.4.1.2 抗疲劳学检测(滚轮测试) 小鼠被放置在转轮式疲劳仪中,仪器转速 20 r/min,滚轮下端有电击设备刺激小鼠向滚轮上方跑动,电击电流 2 mA,最大电击时间 10 s,超过时间后将自动停机休息 30 s,然后再次启动,总运转时间 10 min。最终获得被电击次数,以此推断各组小鼠抗疲劳程度是否有差异,被电击次数越多代表抗疲劳能力越差。每只小鼠测试 1 次,正式检测前 2 周行适应性训练。

1.4.1.3 抓力检测 使用小鼠抓力测试仪,一手握持住小鼠尾端,将小鼠前爪搭于仪器抓力网上,向小鼠尾端施加水平向后的力,记录小鼠前爪维持于抓力网上最大抓力,每只小鼠测试 3 次,获得最稳定的抓力数据,以此推断各组小鼠抓力的差异。各组小鼠均在前期进行过适应性训练。

1.4.2 Western blot 法检测小鼠脊髓组织 TDP-43、ADAR2 蛋白表达 采用 Western blot 法检测小鼠脊髓

组织中 TDP-43、ADAR2 蛋白的表达。分离小鼠脊髓组织,加入含磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀法(RIPA)细胞裂解液及磁珠,置于磁力组织匀浆机中研磨裂解,裂解完成后离心取含组织裂解后的蛋白上清液,BCA 法检测上清液中蛋白含量并定量。采用试剂盒配制体积分数为 10%的聚丙烯酰胺凝胶,电泳分离蛋白(上样 20 μ g,恒压 220 V,30 min),然后将蛋白转至 PVDF 膜(恒流 200 mA,45 min)。置于无血清快速封闭液封闭 15 min,使用配置好的磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗膜,分别加入 TDP-43(稀释比例 1:2 000)、ADAR2(稀释比例 1:1 000)一抗,置于摇床上 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日洗膜后加入 HRP 标记的二抗(稀释比例 1:800)孵育 1 h。再次洗膜后,于膜上加入 ECL 发光液进行显影并记录图像分析。

1.4.3 苏木精-伊红(HE)染色法检测小鼠脊髓前角组织病理变化 小鼠麻醉后,采用心脏灌流法去除全身血液,灌注多聚甲醛溶液固定组织,然后取出脊髓组织,置于多聚甲醛溶液中固定(固定时间>24 h),固定完成后依次置于质量分数为 10%、20%、30%的蔗糖溶液中梯度脱水,每个糖水浓度中放置时间>24 h。利用冰冻切片包埋剂进行包埋,在冰冻切片机上进行连续水平面冰冻切片,切片固定于载玻片上。将载玻片完全浸入盛有苏木精的染色缸内,浸泡时间为 5 min。用流动的清水迅速冲洗,以去除多余的苏木精染料。将载玻片快速浸入 1%的盐酸乙醇分化液中,时间控制在 2 s 左右。再用清水简短冲洗。将载玻片放入伊红染色液中,浸泡 3 min。按照顺序将载玻片通过乙醇和二甲苯溶液进行脱水处理,直至达到透明状态。最后,使用树胶进行封片,并在显微镜下进行观察。

1.4.4 尼氏染色法检测小鼠脊髓前角组织病理变化 按“1.4.3”项下方法制备小鼠脊髓组织冰冻切片。将切片放入尼氏染色液,在 60 $^{\circ}$ C 恒温箱中染色 25 min,然后依次用清水、体积分数为 75%的乙醇冲洗,再用体积分数为 95%的乙醇分化,无水乙醇脱水,二甲苯溶液脱水至透明,树胶封片后于显微镜下观察。

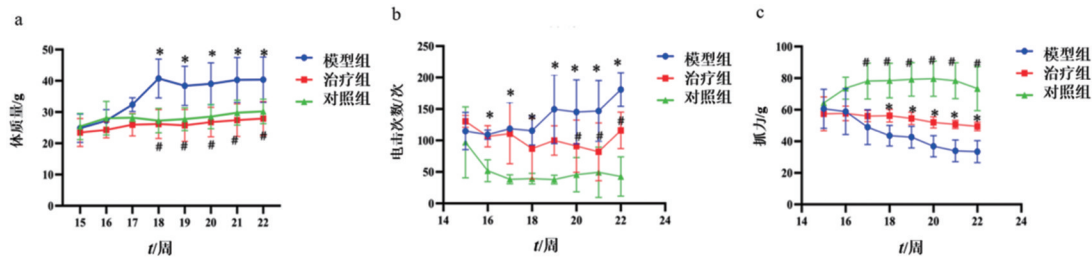
1.4.5 透射电镜检测小鼠脊髓前角组织超微结构变化 按“1.4.3”项下心脏灌流法固定和提取小鼠脊髓组织。将组织置于戊二醛溶液中固定(固定时间>24 h),弃去固定液后于 PBS 中漂洗,加适量锇酸固定液固定 2 h,然后使用体积分数 30%、50%、70%、90%、100%的丙酮溶液梯度脱水置换,再使用树脂(EPON):丙酮=3:7 的溶液、EPON:丙酮=7:3 的溶液置换,最后用 100% EPON 包埋,修块、超薄切片(厚度 50 nm),体积分数 1%乙酸双氧铀染色 30 min,柠檬酸铅染色 20 min。然后置于透射电镜下观察。

1.5 统计学方法 本研究数据采用 SPSS 25.0 软件进

行统计分析,采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行作图。所有数据均进行正态性检验和方差齐性检验,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布、方差齐性检验的数据,多组间比较采用单因素方差分析;非正态分布或方差不齐的计量资料采用非参数检验方法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学实验结果



注:a为小鼠每周体质量曲线,b为小鼠每周于转轮式疲劳仪上被电击次数,c为小鼠每周抓力变化情况。与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$; $n = 6, \bar{x} \pm s$ 。

图1 各组小鼠行为学比较

2.1.2 抗疲劳学检测 各组小鼠在经过训练后均可以顺利完成滚轮测试,第16周开始模型组小鼠受电击次数与对照组相比有所上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗组受电击次数相对模型组减少,从第20周开始差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,未经干预的模型组小鼠与使用健脾补肾方干预的治疗组小鼠抗疲劳程度均有所下降,但是治疗组小鼠的抗疲劳能力下降相对模型组有所延缓。见图1b。

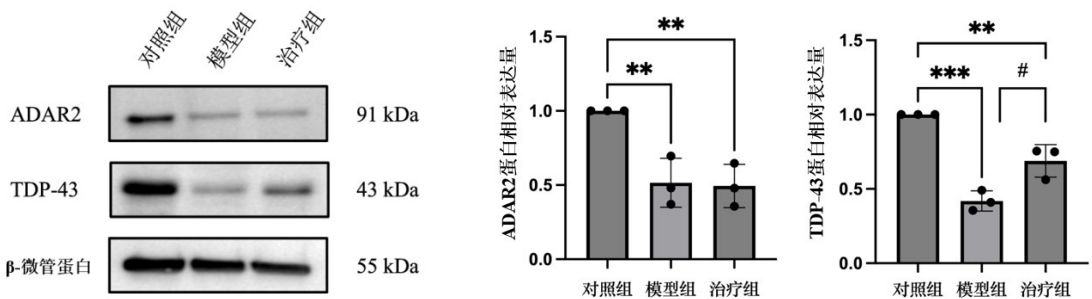
2.1.3 小鼠抓力检测 各组小鼠在经过训练后均能完成抓力检测。与对照组比较,模型组小鼠抓力下降,从第18周起至22周时与对照组小鼠的平均抓力差异接近40 g,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,治疗组抓力下降相对减缓,从第18周起治疗组与模型组

2.1.1 小鼠一般情况 各组小鼠在完成给药实验后均存活。与对照组比较,模型组小鼠体质量随周龄逐渐增长,从第18周开始有统计学差异($P < 0.05$);与模型组比较,治疗组小鼠体质量减轻,从第18周开始差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗组小鼠体质量较对照组小鼠减轻,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果表明,模型组随周龄增长体质量增加,而治疗组体质量未见明显增加。见图1a。

相比有显著差异($P < 0.05$)。见图1c。

2.2 对小鼠 TDP-43、ADAR2 蛋白表达的影响 结果显示,与对照组相比,模型组 TDP-43 表达量显著降低($P < 0.001$);与模型组相比,治疗组 TDP-43 表达量显著升高($P < 0.05$)。结果表明,健脾补肾方干预可以阻止或延缓脊髓运动神经元内 TDP-43 被钙蛋白酶降解为碎片小体,从而对运动神经元起保护作用。

与对照组相比,模型组 ADAR2 表达量显著降低($P < 0.01$),表明该模型小鼠建模成功;但治疗组与模型组之间 ADAR2 表达量没有显著差异($P > 0.05$),表明健脾补肾方可能不是通过直接作用于 ADAR2 蛋白对运动神经元起保护作用。见图2。



注:ADAR2为作用于RNA的腺苷脱氨酶2,TDP-43为转录反应DNA结合蛋白-43。与对照组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与模型组比较,# $P < 0.05$; $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

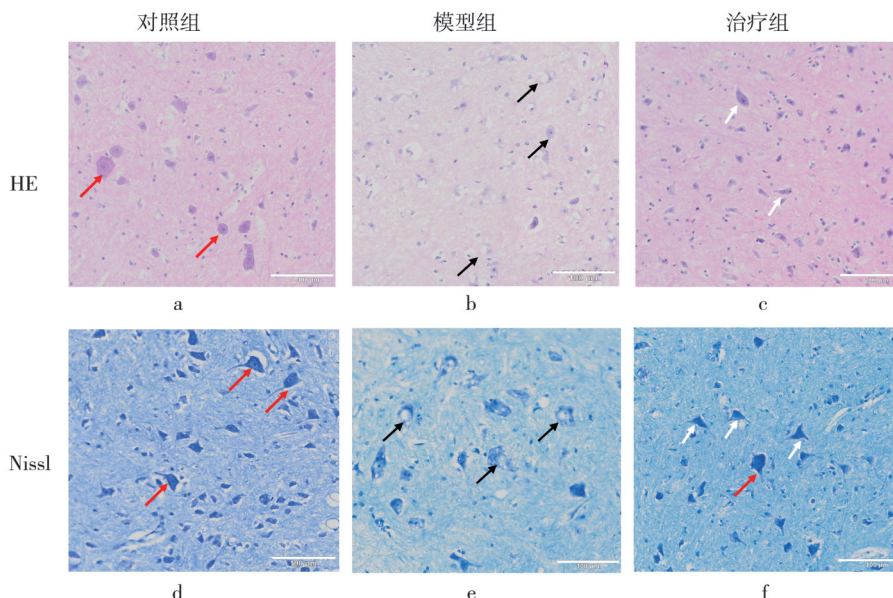
图2 各组小鼠脊髓组织 ADAR2、TDP-43 蛋白表达

2.3 对小鼠脊髓前角组织病理变化的影响 HE 染色法与尼氏染色法结果显示,对照组脊髓前角部位结构

完整,可以观测到一定数量的正常神经细胞,见图3a、d。与对照组相比,模型组脊髓前角运动神经元损伤严重,

神经元结构不完整,可看到凋亡后的空泡形成,见图 3b、e。与模型组相比,治疗组神经细胞凋亡数量减少,可

观察到完整结构神经元,损伤产生的空腔数量减少,见图 3c、f。

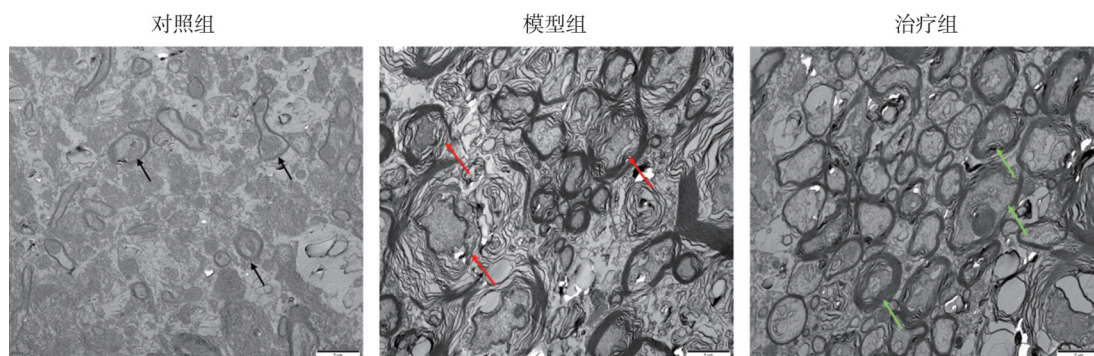


注:HE为苏木精-伊红染色法(a~c),Nissl为尼氏染色法(d~f)。红色箭头表示正常脊髓前角运动神经元,黑色箭头表示严重损伤运动神经元及凋亡后遗留空泡,白色箭头表示轻微损伤运动神经元。标尺:100 μm 。

图3 各组小鼠脊髓前角组织病理变化情况($\times 20$)

2.4 对小鼠脊髓组织超微结构的影响 透射电镜下观察各组小鼠脊髓组织超微结构显示,模型组与对照组比较出现明显的线粒体肿胀凋亡、髓鞘脱散现象。治疗组与对照组比较也存在部分髓鞘脱散、线粒体肿胀

现象,但相对于模型组,存在肿胀凋亡的神经细胞数量有所减少。结果表明,健脾补肾方对脊髓组织内神经髓鞘、线粒体起到了一定的保护作用,延缓了脊髓组织内神经细胞的凋亡进程。见图4。



注:黑色箭头表示正常脊髓运动神经元髓鞘,红色箭头表示严重有髓神经纤维损伤髓鞘,绿色箭头表示轻微损伤髓鞘。标尺:2 μm 。

图4 透射电镜下各组小鼠脊髓组织的超微结构($\times 8\,000$)

3 讨论

ALS 俗称“渐冻症”,发病率为十万分之三至十万分之五,发病机制不明,与基因、氧化应激、饮食、环境等有关。近期新型冠状病毒(简称“新冠”)感染疫情之后,ALS 发病率有上升趋势,是否与新冠感染等有关目前尚无定论^[6]。中医文献中没有类似于发生肌肉萎缩后呈慢性进展,最终因吞咽困难、营养不良、肌肉萎缩无力而死亡的病案。但根据患者发病症状,中医学中将此类疾病归于“痿证”,中医学认为其发生和进展应分别责之于“先天”“后天”。肾为先天之本,“先天因

素”就是先天肾功能不足,可以理解为“基因”欠缺,神经退行性疾病(如多系统萎缩、脊髓小脑性共济失调、帕金森病、阿尔茨海默病等)均与肾的先天不足有关^[7-8]。中医学认为“后天”与脾相关,出生之后的生长发育和新陈代谢均需得到后天营养以及精气神的支持,而其来源就是后天之本的脾,脾与胃相表里,影响阳明经络。脾功能正常,后天营养就充足。此外,中医学认为“脾主四肢肌肉”。《素问》云:“论言治痿者,独取阳明何也?”《灵枢》云:“太阳为开,阳明为合,少阳为枢……合折则气所止息,而痿疾起矣。故痿疾者,取之阳明。”因此,我们在治疗 ALS 患者的肌肉萎缩时,应关注

脾脏“后天之本”“主运化水湿”“主四肢”的功能。

健脾补肾方为上海中医药大学附属曙光医院潘卫东团队基于先后天理论研发、用于治疗 ALS 的重要方剂,在 ALS 临床诊疗上广泛应用。课题组前期对超过 500 例 ALS 患者进行中医证型解析^[9],针对最为广泛的病因制定针对性的有效方剂,并且通过网络药理学研究发现健脾补肾方治疗 ALS 的可行性与有效性^[10],从而验证了中医经典理论“治痿独取阳明”^[11]。人参性温而补气,用于治疗各种虚寒病证,配合其他滋补药物,可以达到气血双补功效;白术以健脾、固脱、止汗之功效著称,与人参、茯苓搭配可加强益气健脾功效;茯苓健脾胜湿,补而不滞;炙甘草甘缓和中,黄芪益气、固表、生肌,可以引药入肺,外达筋肉皮毛;肉苁蓉和淫羊藿结合使用被认为可以增强脾肾功能,促进血液和精液的生成,并强化肌肉和骨骼。这种药物组合有助于补充气血,强化五脏六腑,特别是脾胃,从而实现健脾和胃、补充气血、滋养肌肉和筋腱的目的。我们也通过网络药理学研究多次探讨了此配方治疗 ALS 的可能疗效和机制^[4,10]。本研究发现,健脾补肾方干预后 AR2 小鼠病情进展延缓,且治疗组小鼠在抗疲劳测试与抓力测试中的表现均优于模型组小鼠。行为学实验结果表明,健脾补肾方对延缓 ALS 病情发展是有效的。

sALS 的病理特征是胞质含有异常定位的 43 kDa 的 TDP-43。研究^[12]表明,sALS 患者的运动神经元中,本应定位于核内的 TDP-43 被钙蛋白酶(calpain)分解在神经元胞质内,形成分解产物的异常包涵体。细胞质中含有异常定位 TDP-43 的细胞表现出谷氨酸受体 2 (GluR2)免疫活性中 ADAR2 活性降低,ADAR2 通过 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(AMPA)受体调节 Ca^{2+} 内流,在 *GluR2* mRNA 的谷氨酰胺/精氨酸位点将腺苷转化为肌苷,这使得 ADAR2 成为脊髓运动神经元获得性 Ca^{2+} 阻力的重要因素。有研究^[13]发现,谷氨酸受体 GluR2 的 Q/R 位点编辑异常以及 ADAR2 酶的活性降低与运动神经元的退化有密切联系,基于这一发现,又成功建立了 ADAR2 基因敲除小鼠模型(或称 AR2 小鼠),这一模型能够模拟 sALS 的发病过程和症状进展,为 sALS 研究提供了重要的实验工具^[14],目前已被用于 sALS 的发病机制研究与药物研发^[3]。

目前,TDP-43 的细胞核至胞浆的异常定位被认为是 ALS 的病理标志之一。研究^[13]发现大部分 sALS 患者脊髓组织病理切片中出现了 TDP-43 在神经元胞浆中的异常包裹体,这些 TDP-43 被钙蛋白酶分解为小分子的碎片并且聚集于胞浆中,该现象在 AR2 小鼠模型中也有所体现。本研究结果显示,模型组脊髓组织中

TDP-43 表达量较对照组减少,而治疗组小鼠 TDP-43 表达量与对照组比较也有所下降,但是其表达量较模型组增加,表明健脾补肾方可能阻止了 TDP-43 被钙蛋白酶分解,对脊髓运动神经元起到了一定的保护作用。与之相对的,模型组条件性敲除的蛋白 ADAR2 与对照组比较表达量明显下降,但是健脾补肾方干预后,ADAR2 蛋白表达量与模型组差异不明显,表明健脾补肾方可能不是通过直接作用于 ADAR2 而对 ALS 的进展发挥作用。

通过 HE 染色法和尼氏染色法等组织病理学检查,我们发现与对照组相比较,模型组小鼠脊髓组织中的运动神经元损伤凋亡严重,表明 ALS 模型小鼠脊髓组织中存在严重的运动神经元病变,治疗组与对照组比较也出现了神经元的损伤,但是其损伤较模型组减轻,说明健脾补肾方减轻了运动神经元的损伤程度,从而延缓了病程进展。

透射电镜下观察小鼠脊髓组织切片,我们发现与对照组比较,模型组小鼠脊髓组织中出现典型的有髓神经纤维损伤现象,神经突触髓鞘损伤、脱散,视野下极难观察到线粒体结构,说明 ALS 模型小鼠存在严重的髓鞘损伤、线粒体凋亡现象;与对照组相比,治疗组小鼠也出现了髓鞘、线粒体损伤现象,但其损伤程度较模型组明显减轻,镜下还可以观察到其有髓神经纤维结构完整,虽有部分线粒体出现肿胀,但是仍可观察到其基本结构,与我们前期的研究结果一致^[14],说明健脾补肾方对 ALS 小鼠脊髓内神经细胞的髓鞘、线粒体有保护作用,能有效延缓小鼠脊髓神经细胞内髓鞘和线粒体的损伤和凋亡,对脊髓内神经结构和功能起保护作用。

ALS 目前尚无明确的临床有效药物,临床上常用的药物如依达拉奉、利鲁唑等均未在临床应用中取得较好疗效,故本研究中未设置阳性对照药物组。本研究主要探讨了健脾补肾方对于 ALS 模型小鼠的疗效及其部分机制,对于 ALS 发病多重机制的探索还不完善,我们后续将更侧重于研究健脾补肾方治疗 ALS 的上下游蛋白及通路的探索,并对健脾补肾方起效的具体成分、治疗疾病的原理进行更进一步的研究。

综上所述,补肾健脾方能有效延缓 ALS 模型小鼠肌萎缩和抗疲劳能力的下降,阻止 sALS 病理标志物 TDP-43 的生成,有效减轻 ALS 模型小鼠脊髓内运动神经元的损伤,保护 ALS 脊髓神经细胞内髓鞘和线粒体,延缓二者的损伤和凋亡。该方剂值得在临床上继续推广及在基础研究领域进一步探索其保护神经元、延缓病情进展的机制。

(下转第 94 页)