

在清醒与麻醉状态下的比较 [J]. 药物评价研究, 2010, 33 (1): 43-47.

[11] Baartseheer A, Sehumaehar C A, Belterman C N, et al. [Na<sup>+</sup>]; and the driving force of the Na<sup>+</sup> / Ca<sup>2+</sup>- exchanger in

heart failure [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(15): 986-995

[12] Bers D M, Despa S. Cardiac myocytes Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> regulation in normal and failing hearts [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100(5): 315

## 止颤胶囊对帕金森模型大鼠脑内单胺氧化酶 B 的影响

刘亚珍<sup>1</sup>, 施雨露<sup>2</sup>, 刘永茂<sup>2</sup>, 万全<sup>3</sup>

(1. 吉林大学第一医院 药剂科, 吉林 长春 130021; 2 吉林大学白求恩医学院, 吉林 长春 130021;

3. 吉林大学生命科学学院 生物技术系, 吉林 长春 130051)

**摘要:**目的 探讨止颤胶囊对帕金森病 (PD) 模型大鼠脑内单胺氧化酶 B (MAO-B) 表达的调节作用。方法应用脑内定位注射 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 方法制备部分损伤 PD 模型; 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 对 PD 大鼠脑内 MAO-B mRNA 的表达进行分析; 采用生化法对脑内 MAO-B 活性进行测定。结果 从给药后第 10 天开始, 模型组 MAO-B mRNA 表达明显增加, 扩增产物的量为止颤胶囊的 4 728 倍, 远远高于止颤胶囊组 and 对照组; MAO-B 的活性检测结果与 RT-PCR 分析结果一致, 止颤胶囊对大鼠脑内 MAO-B 活性抑制率大于 40%。结论 止颤胶囊对 PD 大鼠脑内 MAO-B mRNA 表达和活性有下调作用, 可使 6-OHDA 引起的脑内 MAO-B mRNA 高表达得到抑制。

**关键词:** 止颤胶囊; 帕金森病; 单胺氧化酶 B (MAO-B)

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)06-0963-03

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种神经系统疾病, 多发于中老年, 呈缓慢的神经元细胞变性。主要病理特点是黑质致密区多巴胺 (DA) 能神经元严重缺失<sup>[1]</sup>。6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 对黑质 DA 能神经元的损伤程度与注入的剂量有关。调整 6-OHDA 的用量可相对保留较多的 DA 能神经元, 从而制造部分损伤的 PD 大鼠模型, 以模拟中、早期 PD 病人的症状<sup>[2]</sup>。单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 在大脑和周围神经组织中催化生物体产生的胺, 氧化脱氨产生过氧化氢<sup>[3]</sup>。因此, MAO-B 活力的变化与 PD 密切相关。

以滋养肝肾, 育阴熄风作为根本法则, 由生黄芪、人参、白首乌、女真子、续断、厚朴、川芎为主要组分的止颤胶囊方药具有改善大鼠旋转行为、提高黑质纹状体 DA 量和抗自由基酶活性的作用, 临床应用也取得一定疗效。研究表明止颤胶囊对 PD 模型大鼠血液中超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 的量以及小鼠免疫功能均有影响<sup>[4-6]</sup>。本实验主要研究止颤胶囊对 PD 模型大鼠脑内 MAO-B 基因表达及活性变化的影响, 为止颤胶囊治疗 PD 研究提供理论依据。

### 1 材料与方法

1.1 药品和试剂: 止颤胶囊由长春中医学院盖国忠教授研制; 6-OHDA 是美国 Sigma 公司产品; Trizol 试剂为美国 Life Technologies; 逆转录试剂盒、Taq 酶、DL-2000 Marker、DEPC、琼脂糖均由日本 Takara 生物工程公司提供; MAO-B 和  $\beta$ -actin PCR 引物由上海生物工程技术服务公司合成; 溴乙锭为瑞士 Fluka 产品, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器: 日本 Narishige 公司生产的 WDT-7 脑立体定位仪; 日本岛津公司生产的 UV-7200 紫外分光光度计; 美国 PE 公司生产的 9700 型 PCR 仪; 杭州天能生物科技有限公司生产的凝胶成像系统; 德国 Heraeus 公司生产的 Biofuge primo R 高温离心机等。

1.3 动物: SD 大鼠 150~160 g, 白求恩医学院实验动物中心生产, 清洁级动物。

1.4 PD 动物模型制备: 参照陈生弟等<sup>[7]</sup>方法, 选用体质量 150~160 g SD 大鼠, 麻醉后固定于立体定向仪上, 确定黑质坐标: 前囟后 4.4 mm, 中线旁开 1.1 mm, 硬膜下 7.5 mm, 以微量注射器向上述坐标点注入 6-OHDA 10  $\mu$ L/min, 注药后留针 1~5

<sup>1</sup> 收稿日期: 2009-11-27

基金项目: 吉林省自然科学基金资助项目 (2000006)

作者简介: 刘亚珍 (1959-), 女, 吉林省长春市人, 主管药师, 研究方向为中药治疗帕金森病作用机制。

Tel: (0431) 85619709 E-mail: lymmm8338@sina.com

min, 缝合伤口后抗感染治疗 3~5 d, 两周后大鼠 sc 阿朴吗啡 0.25 mg/kg, 诱发大鼠旋转, 记录 40 min 总的旋转次数及方向, 确定旋转模型成功的大鼠。

1.5 分组及给药: 实验分 3 组, 包括对照组、模型组和止颤胶囊试验组。止颤胶囊试验组: PD 模型大鼠 30 只, 每天 ig 给予止颤胶囊 2 g/kg。对照组 10 只和模型组 30 只大鼠, 每天 ig 给予等体积的生理盐水。自给药开始, 每隔 10 天为一个时间点, 每个时间点模型组和给药组各随机取 5 只, 处死后超净工作台内无菌取脑组织, -80 °C 保存备用。

1.6 MAO-B 的 mRNA 表达的 RT-PCR 分析

1.6.1 合成的 PCR 引物序列: 见表 1。

表 1 MAO-B 和  $\beta$ -actin 引物序列

Table 1 Primer sequence of MAO-B and  $\beta$ -actin

基因名称	引物核苷酸序列	片段长度/bp
MAO-B	正向: 5'-AGA ACCTCCAGT TGCCCTA CA CG-5'	268
	反向: 5'-AGAG AAA TCTG AGAGTG TTCA T-5'	
$\beta$ -actin	正向: 5'-TCCGGCATGT GCAAGCCGG-3'	570
	反向: 5'-AGAG GATCGGCCAGTGGCCA-3'	

1.6.2 脑内总 RNA 的制备和鉴定: 按照 Trizol 试剂盒说明提取脑内总 RNA。每个脑组织标本取约 10 mg 于玻璃匀浆器中, 加 Trizol 试剂 1 mL, 在冰上将组织匀浆。再将组织裂解液转移至 1.5 mL EP 管中, 并用 1 mL 枪头反复吹打直至裂解液中无明显沉淀, 在室温下放置 5 min, 使得核酸蛋白复合物完全分离; 各组裂解液中各加入氯仿 0.3 mL, 盖紧离心管管盖, 用手上下振荡 15 s, 室温静置 3 min; 12 000  $\times$  g, 4 °C 离心 15 min, 小心吸取无色上清水相移至另一离心管中, 加入等体积的异丙醇, 轻轻混匀, 室温静置 10 min; 12 000  $\times$  g, 4 °C 离心 10 min, 弃上清, 缓慢沿管壁加入 1 mL 75% 乙醇, 轻轻混匀。12 000  $\times$  g, 4 °C 离心 10 min, 小心吸尽上清, 室温干燥沉淀 2~5 min, 每管加入 50  $\mu$ L 的无 RNase 水溶解 RNA 沉淀, 待完全溶解后于 -70 °C 保存; 吸取 RNA 样品各 5  $\mu$ L, 加载到 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, EB 染色分析提取细胞总 RNA 的纯度。吸取 RNA 样品各 5  $\mu$ L, 用 1  $\times$  TE 缓冲液稀释样品 100 倍, 测定样品在 260 nm 和 280 nm 的吸光度值确定 RNA 的纯度。

1.6.3 逆转录反应将 RNA 逆转录为 cDNA: 按 GenAmp RNA PCR 试剂盒操作说明, 取 0.5 mL EP 管, 按下列次序加入溶液: dNTPs (10 mmol/L) 40  $\mu$ L、RNase 抑制剂 0.5  $\mu$ L、随机引物 0.5  $\mu$ L、总 RNA 2  $\mu$ L, 点动离心, 于 70 °C 孵育 5 min, 冰浴冷却后, 再加入逆转录酶 0.5  $\mu$ L, 5  $\times$  逆转录缓冲液

5.0  $\mu$ L, DEPC 水 10.5  $\mu$ L。稍离心, 37 °C 孵育 60 min, 90 °C 孵育 5 min 后, 迅速冰浴冷却, 此即 cDNA 溶液。

1.6.4 PCR 反应: 将正、反向引物用无 RNase 无菌水稀释为 10 pmol/L, 按 PCR 反应体系加入下列溶液至 0.2 mL EP 管中: 10  $\times$  Taq 酶缓冲液 5  $\mu$ L、dNTPs (10 mmol/L) 2  $\mu$ L、目的基因正反向引物各 10  $\mu$ L、内参正反向引物各 5  $\mu$ L、cDNA 溶液 5  $\mu$ L、Taq 酶 3  $\mu$ L、DEPC 处理水 5  $\mu$ L、总反应体积 50  $\mu$ L, 先 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 完成 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。

1.6.5 产物分析: 吸取待测 PCR 扩增产物 10  $\mu$ L, 加 6  $\times$  样品缓冲液 2  $\mu$ L, 混合后, 分别加到各上样孔内; 上 0.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电压为 10 V/cm, 在低温条件下电泳 30 min, 通过凝胶成像系统进行拍照, 记录结果。

1.7 大鼠脑组织 MAO-B 活性测定: 参照王本祥等<sup>[8]</sup>方法测定脑组织中 MAO-B 活性。酶活力计算以 3 h 产生 0.01 个吸光度值 (242 nm) 改变为一个活性单位, 表示为 U/(mg  $\cdot$  h)。计算抑制率[抑制率=(模型组酶活力-止颤胶囊组酶活力)/模型组酶活力  $\times$  100%]。

2 实验结果

2.1 止颤胶囊对 PD 模型大鼠脑内 MAO-B mRNA 表达的影响: 利用 RT-PCR 方法对 PD 模型大鼠脑内 MAO-B mRNA 表达情况进行检测分析, 用  $\beta$ -actin 为内标基因, 结果表明从给药后第 10 天的时间点开始, 模型组 MAO-B 基因明显增加, 扩增产物的量远远高于止颤胶囊组和对照组 (只测定 0 d 结果), 并且在观察期内持续高表达。而止颤胶囊组在给药后第 10 天的时间点 MAO-B mRNA 表达最高, 之后随着用药时间的延长, MAO-B mRNA 表达量逐渐降低, 到第 50 天的时间点时几乎与对照组相当。RT-PCR 产物的电泳结果见图 1。

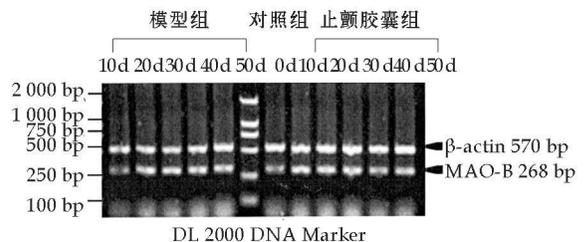


图 1 大鼠脑内 MAO-B mRNA 表达

Fig. 1 MAO-B mRNA Expression in brain of rats

2.2 止颤胶囊对 PD 模型大鼠脑内 MAO-B 活性的影响: 实验各组大鼠脑中 MAO-B 活性检测分析的统计学结果见表 2。对照组 0 d MAO-B 活性为  $(35.354 \pm 0.596) U/(mg \cdot h)$  ( $n = 10$ ), 模型组

MAO-B 活性明显高于对照组; 止颤胶囊组大鼠脑 MAO-B 活性明显低于模型组, 止颤胶囊对 MAO-B 活性的抑制率均值大于 40%, 至给药的第 50 天时已降到接近对照组水平。

表 2 止颤胶囊对大鼠脑组织 MAO-B 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Table 2 Effect of Shiver-stopping Capsula on MAO-B activity in brain of rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

组别	MAO-B/(U · mg <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )					
	0 d	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d
模型	85.384 ± 1.015 <sup>*</sup>	86.369 ± 1.208 <sup>*</sup>	89.284 ± 1.635 <sup>*</sup>	85.376 ± 1.289 <sup>*</sup>	83.216 ± 1.365 <sup>*</sup>	81.342 ± 1.280 <sup>*</sup>
止颤胶囊	85.384 ± 1.015 <sup>*</sup>	55.442 ± 1.009 <sup>** ΔΔ</sup>	53.382 ± 0.989 <sup>** ΔΔ</sup>	51.349 ± 1.386 <sup>** ΔΔ</sup>	45.263 ± 1.568 <sup>** ΔΔ</sup>	41.487 ± 1.634 <sup>** ΔΔ</sup>

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ΔΔ  $P < 0.01$

\*\*  $P < 0.01$  vs control group; ΔΔ  $P < 0.01$  vs model group

### 3 讨论

据报道, 6-OHDA 部分损伤大鼠模型比较稳定, 适合各种程度 PD 的研究<sup>[7]</sup>。本研究将 MAO-B mRNA 表达和活性作为判断 PD 大鼠模型形成及症状恢复的生化判定指标来分析止颤胶囊对 PD 大鼠的治疗作用。从实验结果看, 从给药后第 10 天开始, PD 模型组 MAO-B mRNA 表达明显增加, 并且在近两个月的时间内持续高表达。而止颤胶囊组在给药后第 10 天的 MAO-B mRNA 表达最高, 为对照组的 4.728 倍, 之后随着用药时间的加长, MAO-B mRNA 表达量逐渐降低, 至第 50 天时几乎与对照组相当。活性检测结果与 RT-PCR 分析结果一致。说明用止颤胶囊后对帕金森病大鼠脑内 MAO-B 的 mRNA 表达和活性均有下调作用, 可缓解由 6-OHDA 引起的 MAO-B 表达增高。这些结果充分说明止颤胶囊在一定程度上缓解了 PD 大鼠的临床症

状, 使 6-OHDA 引起的脑内 MAO-B 高表达得到抑制, 并且随给药时间的加长, 抑制率不断升高。提示止颤胶囊作为 PD 治疗中药, 有一定开发价值。

#### 参考文献:

- [1] Youdim M B, Riederer P. Understanding Parkinson's Disease [J]. *Sci Am*, 1997, 276: 52-59
- [2] Shih J C. Molecular basis of human MAO A and B [J]. *Prog Biochem Biophys Neuro Psycho Pharmacol*, 1991, 4(1): 1-7
- [3] 罗恩丽, 王德生. 帕金森病大鼠模型的研究进展 [J]. *中国老年保健医学*, 2004, 2(3): 43-46
- [4] 韩玲, 刘永茂. 止颤胶囊对帕金森模型小鼠血中超氧化物歧化酶及丙二醛水平的影响 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2003, 29: 36-37
- [5] 刘永茂, 庞勇, 刘亚珍, 等. 止颤胶囊对小鼠 T 淋巴细胞转化的影响 [J]. *中国民康医学杂志*, 2006, 18(1): 58-60
- [6] 刘亚珍, 罗天戈, 刘永茂, 等. 止颤胶囊对小鼠 B 淋巴细胞转化的影响 [J]. *中国民康医学杂志*, 2006, 18(1): 53-55
- [7] 陈生弟, 陈先文. 帕金森病动物模型的研制 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2003, 10(1): 28-32
- [8] 王本祥, 陈晓光. 次黄嘌呤对单胺氧化酶的抑制作用 [J]. *药学报*, 1989, 24(8): 573-577

## 中药辅助治疗带状疱疹后遗神经痛疗效分析

杨丽姣, 李繁荣, 陈天葆

(杭州市第三人民医院, 浙江 杭州 310009)

**摘要:** 目的 观察带疱痛方辅助治疗带状疱疹后遗神经痛的疗效。方法 维生素新 B<sub>1</sub> 片 102 例患者随机分成治疗组和对照组, 均予以神经阻滞治疗 4 周, 治疗组服用带疱痛方, 对照组服用弥可保片和吡喃硫胺片, 口服 8 周, 分别于治疗 2、4、6、8 周后观察疼痛视觉模拟评分 (VAS) 和生活质量评分 (QLS) 的变化。结果 8 周后治疗组的 VAS 评分和 QLS 评分与对照组比较有显著差异, 说明带疱痛方治疗的远期疗效明显优于对照组。结论 传统中药结合神经阻滞治疗带状疱疹后遗神经痛疗效显著, 值得推广。

**关键词:** 带状疱疹后遗神经痛; 辅助治疗; 神经阻滞

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)06-0965-03

<sup>1</sup> 收稿日期: 2009-11-20

作者简介: 杨丽姣 (1978-), 女, 学士, 主管中药师, 主要从事中药制剂研究。E-mail: aaaa102077@sina.com

\* 通讯作者 李繁荣 Tel: (0571) 87823122 E-mail: aaaa102077@sina.com