

止颤颗粒联合美多芭对1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶引起亚急性帕金森病模型小鼠的药效学研究

阮克锋^{1,2}, 张丹³, 洪燕龙^{1,2*}, 张继全^{1,2}, 王优杰^{1,2}, 王炜为⁴, 刘毅⁴, 李文涛⁴

1. 上海中医药大学 中药现代制剂技术教育部工程研究中心, 上海 201203

2. 上海张江中药现代制剂技术工程研究中心, 上海 201203

3. 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050

4. 上海中医药大学附属市中医医院 脑病科, 上海 200071

摘要: **目的** 联合应用止颤颗粒和美多芭, 观察止颤颗粒是否具有增强美多芭治疗帕金森病(PD)的作用。**方法** 采用经典的1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱发小鼠亚急性PD模型, 105只小鼠, 随机分为7组, 每组15只, 分别为对照组、模型组、止颤颗粒低剂量(3.5 g/kg)+美多芭(50 mg/kg)组、止颤颗粒中剂量(9.0 g/kg)+美多芭(50 mg/kg)组、止颤颗粒高剂量(22 g/kg)+美多芭(50 mg/kg)组、止颤颗粒(22 g/kg)组、美多芭(50 mg/kg)组。采用转棍法和爬杆法检测各组小鼠的行为学指标, 采用HPLC法测定纹状体中多巴胺(DA)水平、免疫组化法检测黑质多巴胺神经元数量。**结果** 止颤颗粒低剂量+美多芭组与美多芭组相比, 纹状体内DA的水平、TH阳性神经元数目均明显提高, 而且PD模型小鼠行为学障碍改善作用较明显。与模型组相比, 止颤颗粒组小鼠的行为学障碍改善作用较明显。**结论** 止颤颗粒可增强美多芭的疗效, 具有一定的神经保护作用, 止颤颗粒低剂量与美多芭合用可适当减少美多芭的用量。

关键词: 止颤颗粒; 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶; 帕金森病; 美多芭; 多巴胺

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)19-3456-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.19.017

Pharmacodynamics of Zhichan Granule combined with Madopa on subacute Parkinson's disease model mice induced by methylphenyltetrahydropyridine

RUAN Ke-feng^{1,2}, ZHANG Dan³, HONG Yan-long^{1,2}, ZHANG Ji-quan^{1,2}, WANG You-jie^{1,2}, WANG Wei-wei⁴, LIU Yi⁴, LI Wen-tao⁴

1. Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Zhangjiang, Shanghai 201203, China

3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

4. Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China

Abstract: Objective To study whether Zhichan Granule could enhance the effect of Madopar for treating Parkinson's disease (PD).

Methods Subacute PD model induced by methylphenyltetrahydropyridine (MPTP) in mice was adopted and 105 male C57 mice were randomly divided into seven groups with 15 in each group, they were control group, model group, Zhichan Granule in low dose (3.5 g/kg) medium dose (9.0 g/kg), and high dose (22 g/kg) combined with DOPA (50 mg/kg) groups, Zhichan Granule (22 g/kg), and Madopar (50 mg/kg) groups, respectively. Behaviors of mice in each group were observed by rollover and pole climbing method. The content of striatum dopamine and the number of dopamine neurons of substantia nigra were detected by HPLC and immunohistochemical method. **Results** Compared with the Madopar group, the content of striatum dopamine and the number of dopamine neurons of substantia nigra were significantly increased in the group of low-dose Zhichan Granule combined with Madopar, and the behaviors were significantly improved. Compared with the model group, the behaviors were significantly improved in the group of Zhichan Granule. The results indicated that

收稿日期: 2016-04-15

基金项目: 上海市科委科技支撑项目(13401900901); 上海市卫计委新三年行动计划(ZY3-CCCX-3-5001, ZY3-JSFC-2-2012)

作者简介: 阮克锋, 男, 教授级高级工程师, 主要从事中药新药研发工作。Tel: (021)51322493 E-mail: ruankf@126.com

*通信作者 洪燕龙, 男, 副研究员。Tel: (021)58980297 Fax: (021)50796207 E-mail: hfuir@163.com

Zhichan Granule in a low-dose could enhance the effect of Madopar for treating PD, resulting in reduction of the dose of Madopar to a certain degree. **Conclusion** Zhichan Granule could enhance the effect of Madopar for treating PD, which has nerve protective effect.

Key words: Zhichan Granule; methylphenyltetrahydropyridine; Parkinson's disease; Madopar; dopamine

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种循序渐进的神经退行性疾病, 目前在 60 岁以上的人群中, 大约有 1% 的患病率^[1], 其症状主要表现为静止性震颤、肌强直、运动迟缓、姿势反射障碍等, 病理特征是患者黑质致密部位的多巴胺能神经元变性, 纹状体内多巴胺神经递质的量减少, 黑质纹状体多巴胺神经元功能低下而胆碱能神经元功能相对占优势, 从而产生运动障碍^[2]。其发病机制可能与遗传、环境、氧化应激、免疫炎症等诸多因素有关^[3-7], 目前尚未完全清楚, 但神经毒素在 PD 的发病过程中起着重要作用。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 是一种合成的神经毒素, 其脂溶性的特点使其容易通过血脑屏障, MPTP 本身毒性不高, 但其能被脑星形胶质细胞、5-羟色胺能神经元等细胞的单胺氧化酶-B (MAO-B) 氧化生成中间代谢产物 MPDP⁺, 并进一步氧化形成高毒性的 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺)^[8], 后者被多巴胺能神经元通过末梢高亲和力的多巴胺摄取系统摄入, 并在线粒体内聚集, 阻断 NADH 氧化磷酸化系统, 干扰 ATP 合成, 进一步导致多巴胺能神经元变性坏死^[9]。基于 MPP⁺ 的这一特点, 其主要被选择用来制备 PD 的动物及细胞模型^[10-11]。非人灵长类如猴对 MPTP 最敏感, 但由于经济和伦理道德限制极少使用; 小鼠对 MPTP 毒性的敏感性次之, 但引起的生化和细胞改变与人类 PD 非常相似, 故应用普遍。

左旋多巴 (L-DOPA) 是 PD 临床常见的一线治疗药物, 其作用机制是补充脑内缺乏的多巴胺 (DA), 但会出现药物剂量依赖性而且产生不自主的异常动作、运动障碍等副作用^[12-14]。中医从整体观念、辨证论治角度, 利用中药成分的多组分、多靶点来治疗 PD, 效果确切且药性平和、不良反应小^[15-17]。止颤颗粒来源于临床有效方, 由钩藤、黄芪、白芍、知母等 7 味药组成, 具有益气养阴、熄风清热的功效, 可有效改善 PD 病人肢体僵硬、震颤等症^[18-22]。随机、双盲、安慰剂对照临床研究表明, 在 UPDRS 量表总分及分项 III (运动检查) 积分、中医证候总分及主要症状积分的改善等方面, 止颤颗粒联合常规化学药治疗组优于常规化学药治疗组^[23]。目前围绕 PD 开展的临床前研究多集

中在 MAO-B 抑制剂、DA 受体激动剂、神经营养因子和中药复方^[24-26], 而中药复方与美多芭 (主要成分为 L-DOPA) 联合用药的药效学研究并不多见。本研究拟采用经典的 MPTP 诱发的小鼠亚急性 PD 模型, 观察联合应用止颤颗粒和美多芭对 PD 小鼠行为学、纹状体多巴胺水平、黑质多巴胺神经元数量等的影响, 评价止颤颗粒是否具有增强美多芭药效的作用, 为中西医结合治疗 PD 提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雄性 C57 小鼠 105 只, 体质量 (24±1) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2009-0007。饲养条件: 屏障级动物房饲养, 许可证号 SYXK (京) 2009-0004, 标准饲养盒内饲养, 每盒 5 只。

1.2 药物与试剂

止颤颗粒, 由上海张江中药现代制剂技术工程研究中心制备, 每克颗粒相当于原生药材 3.5 g, 其中每克颗粒含知母以芒果苷计, 不得低于 1.6 mg, 每克颗粒含生白芍以芍药苷计, 不得低于 2.4 mg。美多芭 (多巴丝肼片), 上海罗氏制药有限公司, 批号 SH0895。MPTP, Sigma 公司; DA 和异丙肾上腺素 (IP) 购自 Sigma 公司。其余试剂均为分析纯, 购自北京化学试剂公司。

1.3 仪器

岛津 LC-10AT vp Plus 高效液相色谱仪 (检测器: BASi CC-5e, LC-4C), 美国; Nikon eclipse 80i 正置显微镜 (日本); 2K15 低温高速离心机 (Sigma 公司, 美国); 转棍仪和爬杆棒 (中国医学科学院药物研究所)。

2 方法

2.1 模型制备

小鼠采用转棍法提前训练 3 d, 将运动不协调的小鼠剔除。造模小鼠每天 ip MPTP (溶于生理盐水) 20 mg/kg, 每天 1 次, 连续 10 d。

2.2 分组及给药

105 只小鼠, 随机分为 7 组, 每组 15 只。分别为对照组、模型组、止颤颗粒低剂量 (3.5 g/kg) + 美多芭 (以 L-DOPA 计, 50 mg/kg, 下同) 组、止颤颗粒中剂量 (9.0 g/kg) + 美多芭 (50 mg/kg) 组、

止颤颗粒高剂量 (22 g/kg) + 美多芭 (50 mg/kg) 组、止颤颗粒 (22 g/kg) 组、美多芭 (50 mg/kg) 组。止颤颗粒溶于无菌双蒸水中, 美多芭片剂悬浮于 0.5% CMC-Na 中。止颤颗粒、美多芭 ig 给药后 30 min ip MPTP, 每天 1 次, 连续 10 d。MPTP 停止注射后继续给予小鼠止颤颗粒、美多芭, 每天 1 次, 连续 7 d。对照组 ig 和 ip 相同剂量的无菌双蒸水和生理盐水, 模型组 ig 给予相同剂量的无菌双蒸水。

2.3 行为学检测

2.3.1 转棍法 转棍仪 (中国医学科学院药物研究所研制) 为直径 3 cm, 长为 50 cm, 用隔板分隔为 5 段的水平杆, 保证动物彼此不受影响。转棍仪转速设为恒速 14 转/min。将小鼠置于杆上, 打开开关, 开始计时, 记录从开始转棍到小鼠从杆上掉落的时间, 记为潜伏期 (即第 1 次掉落的时间), 以此表示其运动协调能力。每只小鼠测试 3 次, 每次间隔 1 h, 取平均值。小鼠分别于实验的第 5、9、16 天进行转棍测试。

2.3.2 爬杆法 用一直径 13 mm, 高 50 cm, 顶部有一直径 3 cm 的木球的光滑木杆 (中国医学科学院药物研究所研制), 垂直放置, 将小鼠头向下放置在杆的顶部球上, 让其沿杆自然爬下, 观察动物在爬下过程中的行为。小鼠爬下过程中的行为按标准记分, 评分标准如下^[27]: 四肢并用, 一步一步协调向下爬行, 计 5 分; 一步一步向下爬行但兼有后肢滑行行为, 计 4 分; 爬过一半距离后向下滑行, 但可抱紧杆, 计 3 分; 未爬过一半距离即出现滑行行为, 计 2 分; 爬过一半距离后不能抓杆从杆上掉落, 计 1 分; 未爬过一半距离即不能抓杆, 从杆上掉落, 计 0 分。实验前每只小鼠训练 2 次。于实验第 6、10、17 天进行爬杆测试, 每只小鼠测试 2 次, 每次间隔 1 h, 按照上述标准进行评分, 取平均值。

2.4 纹状体 DA 水平检测

末次行为学结束后, 将小鼠断头取脑, 分离纹状体, 处理过程均在冰浴条件下进行, 遵循低温快速的原则。加入 A 液 (0.6 mol/L 高氯酸溶液含浓度为 0.375 $\mu\text{g/mL}$ 的 IP), 匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$, 20 000 $\times g$ 离心 20 min, 吸取一定量上清, 加入半体积的 B 液 (柠檬酸钾 20 mmol/L, 磷酸氢二钾 300 mmol/L, EDTA $\cdot\text{Na}_2$ 2 mmol/L), 冰浴 30 min, 混匀, 静置, 20 000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 吸取上清, 20 000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 吸取上清, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

2.4.1 色谱条件 采用岛津高效液相色谱仪和电

化学检测器检测。检测器检测灵敏度 10 nA, 玻碳工作电极, Ag/AgCl 参比电极, 检测电位 0.76 V。流动相为乙酸钠-柠檬酸缓冲液 (柠檬酸 85 mmol/L、无水乙酸钠 100 mmol/L、EDTA $\cdot\text{Na}_2$ 0.2 mmol/L、15% 甲醇), 三蒸水定容至 1 L, 调节 pH 为 3.68, 抽滤后加入适量辛烷磺酸钠 (SOS) (先加 90 mg, 再根据分离情况而定)、正二丁胺 (先加 15 μL) 使峰完全分离。岛津 C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 进样量 50 μL , 体积流量 1.2 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4.2 对照品溶液的制备 称取 DA、IP 分别溶于 0.1 mol/L HClO₄ 中, 配制成对照品储备液, 取储备液定量混合, 用 0.1 mol/L HClO₄ 稀释使 DA 质量浓度为 0.125 $\mu\text{g/mL}$, IP 为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 免疫组化检测黑质多巴胺神经元

末次行为学实验后, 每组随机取 5 只小鼠, 0.5% 戊巴比妥钠 ip 麻醉后, 用 4% 多聚甲醛 (含 3% 蔗糖, 用 pH 7.4 的 PBS 配制) 灌注, 灌注固定后断头取脑。在黑质部位行连续冠状面切片, 厚度 20 μm 。然后在 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, PBST 洗 5 min \times 3 次。用羊血清原液室温封闭 30 min, 加入酪氨酸羟化酶 (TH) 一抗 (1:500) 置于水平摇床中室温下孵育 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBST 洗 5 min \times 3 次, 加生物素标记的兔抗山羊二抗 (1:300), 室温孵育 2 h, PBST 洗 5 min \times 3 次。加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记链亲合素三抗 (1:300), 室温孵育 2 h, PBST 洗, 5 min \times 3 次。用 DAB 工作液显色 2 min, 将显色后的脑切片置于 0.01 mol/L PBST 中。酒精依次脱水后用二甲苯透明 2 次, 每次 5 min, 中性树脂封片。正置显微镜下观察计数小鼠黑质致密部 TH 阳性神经元数目, 将每只小鼠的脑片取平均值为最后该小鼠 TH 阳性神经元数目。

2.6 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行处理, 多组数据之间差异比较采用 One-way ANOVA 及 LSD 法, 组间差异比较用 *t* 检验; 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对亚急性 PD 模型小鼠转棍行为的改善作用

转棍法结果显示 (表 1), 在实验的第 5、9、16 天, 模型组小鼠转棍掉落潜伏期明显低于对照组 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 止颤颗粒低剂量 + 美多芭组和止颤颗粒中剂量 + 美多芭组在第 5 天可明显提高小鼠转棍潜伏期 ($P < 0.05$); 在实验第 9、16 天止颤颗粒低剂量 + 美多芭、止颤颗粒中剂量 + 美

表 1 止颤颗粒对 MPTP 引起的亚急性 PD 模型小鼠转棍行为的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Zhichan Granule on rotary rod behavior disorder in subacute PD model mice induced by MPTP ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	转棍潜伏期/s		
			第 5 天	第 9 天	第 16 天
对照	—	15	100.20±8.13	101.37±6.09	108.27±4.67
模型	—	15	55.43±7.19**	61.97±5.75**	70.00±7.01**
止颤颗粒+美多芭	3.5+0.05	15	79.07±8.35 [#]	98.30±7.69 ^{##△}	101.47±8.64 ^{##△}
	9.0+0.05	14	79.17±9.25 [#]	92.60±7.57 ^{##}	96.25±9.62 [#]
	22.0+0.05	14	68.80±8.14	89.79±7.83 ^{##}	90.21±8.91
止颤颗粒	22.0	15	63.93±9.11	91.37±7.93 ^{##}	96.83±9.13 [#]
美多芭	0.05	15	69.10±8.73	78.33±8.35	80.37±5.82

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与美多芭组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$, 下同
^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs Madopar group, same as below

多芭、止颤颗粒高剂量+美多芭(第 16 天没有统计学差异)以及单用止颤颗粒均可明显提高小鼠转棍潜伏期($P < 0.05$ 、 0.01)。单用美多芭对小鼠行为学无明显改善作用。止颤颗粒低剂量+美多芭组的药效优于其他各组。止颤颗粒中剂量+美多芭组、止颤颗粒高剂量+美多芭对转棍行为的改善作用与美多芭组相比有增强趋势,但无显著差异,止颤颗粒低剂量+美多芭组对转棍行为障碍的改善作用明显高于美多芭组。

3.2 对亚急性 PD 模型小鼠爬杆行为的改善作用
爬杆法结果显示(表 2),在实验的第 6、10、

17 天,模型组与对照组比较,小鼠爬杆评分明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,在实验第 6 天,止颤颗粒低剂量+美多芭组小鼠爬杆评分明显提高($P < 0.05$),在第 10 天和第 17 天,止颤颗粒低剂量+美多芭组、止颤颗粒中剂量+美多芭组、止颤颗粒高剂量+美多芭组和止颤颗粒组均可明显提高小鼠爬杆评分($P < 0.01$),而美多芭组对小鼠爬杆行为无明显改善作用。

3.3 对亚急性 PD 模型小鼠纹状体中 DA 的影响

表 3 结果显示,模型组小鼠纹状体 DA 水平明显低于对照组($P < 0.01$)。与模型组比较,止颤颗粒

表 2 止颤颗粒对 MPTP 引起的亚急性 PD 模型小鼠爬杆行为的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Zhichan Granule on climbing behavior disorder in subacute PD model mice induced by MPTP ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	爬杆评分		
			第 6 天	第 10 天	第 17 天
对照	—	15	4.77±0.08	4.83±0.08	4.80±0.08
模型	—	15	3.70±0.14**	3.80±0.14**	3.80±0.13**
止颤颗粒+美多芭	3.5+0.05	15	4.13±0.13 [#]	4.67±0.14 ^{##}	4.37±0.13 ^{##}
	9.0+0.05	14	4.03±0.11	4.43±0.15 ^{##}	4.46±0.15 ^{##}
	22.0+0.05	14	3.97±0.13	4.61±0.12 ^{##△}	4.50±0.14 ^{##}
止颤颗粒	22.0	15	4.03±0.13	4.50±0.15 ^{##}	4.30±0.16 ^{##}
美多芭	0.05	15	4.00±0.12	4.13±0.17	4.17±0.16

表 3 止颤颗粒对 MPTP 引起的亚急性 PD 模型小鼠纹状体中 DA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Zhichan Granule on level of striatum DA in subacute PD model mice induced by MPTP ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	DA/(μg·g ⁻¹)
对照	—	10	4.24±0.89
模型	—	10	1.52±0.11**
止颤颗粒+美多芭	3.5+0.05	10	4.92±0.61 ^{##△△}
	9.0+0.05	9	2.94±0.25 [#]
	22.0+0.05	9	2.93±0.10
止颤颗粒	22.0	10	2.24±0.04
美多芭	0.05	10	2.74±0.28 [#]

低剂量+美多芭组、止颤颗粒中剂量+美多芭组以及美多芭组均可显著提高小鼠纹状体 DA 水平($P < 0.05$ 、 0.01)。止颤颗粒组和止颤颗粒高剂量+美多芭组有提高 DA 水平的趋势,但与模型组比较差异不显著。此外,各剂量止颤颗粒联合用药组小鼠纹状体 DA 水平均高于美多芭组,且止颤颗粒低剂量+美多芭组效果显著优于美多芭组($P < 0.01$)。

3.4 对亚急性 PD 模型小鼠黑质多巴胺神经元的影响

免疫组化结果(图 1 和表 4)显示,模型组小鼠黑质致密部 TH 阳性神经元数目较正常小鼠数量明显减少($P < 0.01$)。给药各组均可增加 TH 阳性

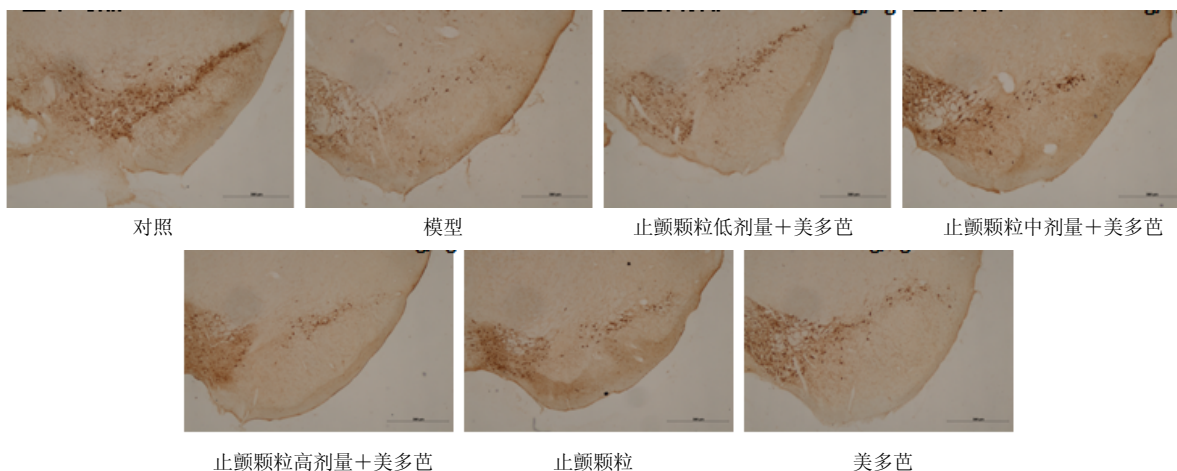


图 1 止颤颗粒对 MPTP 引起的亚急性 PD 模型小鼠黑质多巴胺神经元的影响

Fig. 1 Effect of Zhichan Granule on dopamine neurons of substantia nigra in subacute PD model mice induced by MPTP

表 4 止颤颗粒对 MPTP 引起的亚急性 PD 模型小鼠黑质 TH 阳性神经元数目的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of Zhichan Granule on dopamine neurons of substantia nigra in subacute PD model mice induced by MPTP ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TH 阳性细胞数目
对照	—	66.17 ± 8.15
模型	—	35.47 ± 4.72**
止颤颗粒+美多芭	3.5+0.05	48.47 ± 13.90 ^{#△}
	9.0+0.05	40.53 ± 5.15
	22.0+0.05	40.03 ± 6.27
止颤颗粒	22.0	38.60 ± 5.87
美多芭	0.05	35.27 ± 6.45

神经元数目,且止颤颗粒低剂量+美多芭组 TH 阳性神经元数量与模型组及美多芭组相比显著增多 ($P < 0.05$)。

4 讨论

PD 的主要病理改变是黑质致密部多巴胺能神经元的进行性变性死亡、残存神经元多巴胺合成能力降低,导致纹状体 DA 神经递质的不足,从而对锥体外系的运动调节功能失调^[28]。美多芭是临床上明确的治疗 PD 的药物,能补充脑中 DA,但对受损的多巴胺神经元没有保护作用,所以只能用于改善 PD 症状。

MPTP 模型是最常用的研究 PD 的模型, MPTP 能够引起黑质致密部多巴胺能神经元的变性,线粒体功能障碍和氧化应激反应,最终导致与帕金森病相似的临床和病理学特征,广泛的应用于 PD 药效评价的研究。因此,本研究采用 MPTP 诱发的小鼠

亚急性 PD 模型来评价止颤颗粒与美多芭合用是否能增强美多芭的疗效。

本研究分别选取 MPTP 注射期间, MPTP 刚注射后和 MPTP 注射后数日内, 3 个不同的毒性阶段观察 MPTP 对小鼠行为学的改变以及药物干预的影响。结果表明, 20 mg/kg MPTP 连续多日注射可诱发小鼠出现显著的 PD 症状, 动物的运动协调能力下降从实验初期维持至终点。有研究报道称, 小剂量 MPTP 给药, 根据动物品系、年龄的不同, 部分会出现明显的自发恢复倾向^[29], 但在本研究中, 并未发现。

在以往研究中, 通常采用 75 mg/kg 的美多芭 (以 L-DOPA 计) 作为阳性药物。在临床研究中发现, 止颤颗粒与 2/3 临床剂量的美多芭合用, 可达到美多芭全量的效果。因此在本实验中选择 50 mg/kg 的美多芭作为阳性药物。药物干预的结果显示, 随着造模时间的延长, 各剂量止颤颗粒+美多芭组以及单用止颤颗粒组动物在转棍及爬杆行为学测试中均表现出优于美多芭组的效果, 并且止颤颗粒低剂量+美多芭组在转棍实验第 9、16 天, 止颤颗粒高剂量+美多芭组在爬杆实验的第 10 天, 相比较单用美多芭组, 对小鼠的运动协调能力均有显著改善。这与前期临床研究中, 联合用药组在中医证候及运动评分中都优于单用美多芭的结果一致^[23]。

DA 及其代谢产物的减少是 PD 的主要神经生化改变, 其减少的程度与黑质细胞丧失的程度成正比。因此, 中脑黑质纹状体 DA 的量测定是临床诊断的主要指标之一^[30]。纹状体内 DA 的量极高, 由其调控大脑运动神经功能, 当 DA 变形死亡达到

80%以上, 大脑不再具有调节神经系统的正常功能, 进而出现 PD 症状^[31]。据此, 本研究选择纹状体 DA 的量测定来评价止颤颗粒联合用药是否优于单独使用美多芭。研究结果显示, 造模后, 模型组 DA 量相较对照组显著下降 ($P < 0.01$), 而低、中剂量止颤颗粒联合用药组以及美多芭组均能显著提升纹状体内 DA 的量 ($P < 0.05$ 、 0.01)。此外, 单用止颤颗粒及高剂量止颤颗粒联合用药也能一定程度保护由神经毒性造成的模型动物脑内 DA 量显著减少。提示, 止颤颗粒联合用药对 PD 模型小鼠中脑纹状体 DA 的量有保护作用, 其效果比单独使用美多芭为优。

另外, PD 的发病是因纹状体黑质致密部 DA 的量下降, 而多巴胺的合成途径是酪氨酸在 TH 的催化作用下生成多巴, 继而多巴在多巴胺脱酶的催化作用下形成 DA。由此可见 TH 是 DA 合成的第一步, 也是其合成过程中的限速酶。研究表明, PD 病人中 TH 的量降低, 同时动物 PD 模型的研究也发现, 模型动物 TH mRNA 的表达量降低, TH 的失活与 PD 的产生有着重要的联系^[32]。本研究中, 各剂量止颤颗粒联合用药组及单用止颤颗粒组 TH 阳性细胞计数数目均多于美多芭组, 其中低剂量止颤颗粒联合用药组 TH 阳性细胞数目与美多芭组比较有显著增多。表明止颤颗粒联合用药可以保护 DA 在体内生物合成的关键限速酶, 提高纹状体内 DA 的量, 其效果优于单用美多芭。

止颤颗粒来源于临床用方, 由钩藤、黄芪、白芍、知母等 7 味中药组成。有研究指出, 中药钩藤提取物异钩藤碱能够诱导多种神经细胞发生自噬, 清除积聚于大脑、导致 PD 症状的异常蛋白, 并促进神经细胞中 α -突触核蛋白的降解^[33]。同样, 黄芪甲苷也被报道可显著抑制 MPTP 诱导的凋亡前体蛋白 Bax 表达量的升高, 增加 Bcl-2 的表达量, 并能抑制其下游凋亡蛋白 caspase-3 的表达, 通过 BAX 途径抑制细胞凋亡起到神经保护作用^[34]。此外, 有报道称中药白芍中的主要成分芍药苷可以通过提升 PD 小鼠模型脑内超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的量, 抑制氧化损伤来起到对多巴胺能神经元的保护作用^[35]。

综上, 本研究发现各剂量止颤颗粒联合美多芭用药, 尤其是止颤颗粒低剂量+美多芭组能显著提升 PD 小鼠中脑纹状体内 TH 阳性细胞的数目, 提高 DA 的量, 并显著改善 PD 小鼠运动协调性, 其

作用效果优于单独使用美多芭, 其作用机制可能与抑制细胞凋亡、氧化损伤及诱导自噬有关, 并有待后续研究进一步验证。

参考文献

- [1] Jankovic J, Stacy M. Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease [J]. *CNS Drugs*, 2007, 21(8): 677-692.
- [2] Burch D, Sheerin F. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2005, 365(9459): 622-627.
- [3] Wakabayashi K, Takahashi H. Pathology of familial Parkinson's disease [J]. *Brain Nerve*, 2007, 59: 851-864.
- [4] Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? [J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8(4): 382-397.
- [5] Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, doi: 10.3389/fncel.2015.00124.
- [6] Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease [J]. *Ann Neurol*, 2003, 53(Suppl 3): 26-36.
- [7] Mosley R L, Benner E J, Kadiu I, et al. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease [J]. *Clin Neurosci Res*, 2006, 6(5): 261-281.
- [8] Przedborski S, Vila M. The 1-2methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 991(6): 189-198.
- [9] Janetzky B, Hauck S, Youdim MBH, et al. Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 1994, 169(1/2): 126-128.
- [10] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models [J]. *Neuron*, 2003, 39(6): 889-909.
- [11] Miller G W, Caine RR, Levey AI, et al. Dopamine transporters and neuronal injury [J]. *TIPS*, 1999, 20(10): 424-429.
- [12] Carta M, Carlsson T, Kirik D, et al. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats [J]. *Brain*, 2007, 130(7): 1819-1833.
- [13] Cenci M A. Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia [J]. *Trend Neurosci*, 2007, 30(5): 236-243.

- [14] Fabbrini G, Brotchie J M, Grandas F, *et al.* Levodopa-induced dyskinesias [J]. *Mov Disord*, 2007, 22(10): 1379-1389.
- [15] 王冬梅, 魏 风, 莫遗盛, 等. 帕宁方治疗帕金森病的临床研究 [J]. *中药药理与临床*, 2011, 27(6): 96-97.
- [16] 曹子成, 李凤莲, 张耀升. 脑康泰胶囊治疗帕金森病 62 例 [J]. *中国临床药理学与治疗*, 2002, 7(1): 75-76.
- [17] 胡雅琼, 罗理勇, 曾 亮. 茶叶提取物对帕金森病的防治作用研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(9): 1342-1348.
- [18] 王友联, 苏国志, 张叔杰, 等. 止颤胶囊对帕金森大鼠血清中细胞因子 IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(4): 270-273.
- [19] 王慧新, 刘 毅, 李如奎. 止颤汤联合美多巴片治疗帕金森病 30 例临床研究 [J]. *中医杂志*, 2010, 51(1): 146-147.
- [20] 刘 毅, 王慧新, 李如奎. 止颤汤治疗帕金森病的临床疗效观察 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2007, 5(11): 1064-1065.
- [21] 刘亚珍, 施雨露, 刘永茂, 等. 止颤胶囊对帕金森模型大鼠脑内单胺氧化酶 B 的影响 [J]. *中草药*, 2010, 41(6): 963-965.
- [22] 王慧新, 刘 毅, 李如奎. 止颤汤联合西药治疗帕金森病的临床研究 [J]. *中医药导报*, 2010, 16(3): 17-18.
- [23] 陈梦云, 刘 毅, 阮克锋, 等. 止颤颗粒联合常规西药治疗肝肾不足、气血两虚型帕金森病的随机、双盲、安慰剂对照临床研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2014, 48(10): 27-30.
- [24] 杨 宇. 普拉克索治疗帕金森病的疗效分析与评价 [J]. *临床合理用药杂志*, 2011, 4(5C): 37-38.
- [25] Wolozin B, Wang S W, Li N C, *et al.* Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease [J]. *BMC Med*, 2007(5): 20.
- [26] 邵利霞, 刘 轲. 中医药治疗帕金森病综述 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(3): 724-725.
- [27] 郭德玉, 于向东, 陈 彪, 等. MPTP 致 C57BL/6 小鼠帕金森模型的复制及常用的行为学分析方法 [J]. *实验动物科学*, 2010, 27(2): 1-4.
- [28] 方 伟. 多巴胺能神经元轴突变性在 MPTP 诱导的帕金森病模型中的作用研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [29] Sugama S, Yang L, Cho B P, *et al.* Age-related microglial activation in MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice [J]. *Brain Res*, 2003, 964(2): 288-294.
- [30] 卢 晨. 川芎嗪对 MPTP 诱导大鼠中脑多巴胺神经元损伤所致帕金森病的脑神经保护机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [31] Chiasserini D, Paciotti S, Eusebi P, *et al.* Selective loss of glucocerebrosidase activity in sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies [J]. *Mol Neurodegener*, 2015, doi: 10.1186/s13024-015-0010-2.
- [32] 陈锡群. 酪氨酸羟化酶与帕金森病 [J]. *国外医学: 神经病学神经外科学分册*, 2001, 28(1): 59-62.
- [33] Lu J H, Tan J Q, Durairajan S S, *et al.* Isorhynchophylline, a natural alkaloid, promotes the degradation of alpha-synuclein in neuronal cells via inducing autophagy [J]. *Autophagy*, 2012, 8(1): 98-108.
- [34] 张治国. 黄芩甲苷对帕金森神经元的保护作用及其机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2012.
- [35] 郑梅竹, 范亚军, 时东方, 等. 白芍提取物对 MPTP 致帕金森小鼠的保护作用及机制的研究 [J]. *湖北农业科学*, 2015, 54(12): 2960-2963.