

基于析因设计的佛手散防治帕金森病作用机制探讨

曹方引^{1,2}, 向菊芳^{2,3}, 唐大轩², 邓勇¹, 包旭¹, 熊静悦², 陈重华^{1*}, 谭正怀^{2*}

1. 四川大学华西药学院, 靶向药物与释药系统教育部重点实验室, 四川省植物来源工程实验室和四川省小分子药物精准化工程技术研究中心, 四川 成都 610041
2. 四川省中医药科学院, 防治重大疾病中药药效学评价平台, 四川省中药质量评价重点实验室, 四川 成都 610042
3. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075

摘要: **目的** 探讨佛手散防治帕金森病(PD)的作用及相关机制。**方法** 体内实验采用利血平模型, 观察小鼠肛温和运动不能指标, 考察当归挥发油和川芎挥发油及其联合应用的影响; 体外实验采用荧光分光光度法, 以犬尿胺为底物, 检测人单胺氧化酶(hMAO)活性和抑制模式, 在此基础上, 采用2×4析因设计, 探讨当归挥发油与川芎挥发油之间的相互作用。**结果** 利血平实验发现联合应用当归挥发油和川芎挥发油可显著改善模型小鼠肛温下降和运动不能; 酶活性实验发现当归挥发油和川芎挥发油对hMAO-A和hMAO-B均为竞争性抑制作用, 两者配伍使用时对hMAO-A和hMAO-B的活性均有显著的协同增效作用。**结论** 佛手散中的当归、川芎在防治PD中具有显著的协同增效效应, 其机制可能与抑制hMAO活性有关。

关键词: 佛手散; 当归挥发油; 川芎挥发油; 人单胺氧化酶; 帕金森病; 析因设计

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)06-1559-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.06.024

Anti-Parkinson mechanism of Foshou Powder based on factorial design

CAO Fang-yin^{1,2}, XIANG Ju-fang^{2,3}, TANG Da-xuan², DENG Yong¹, BAO Xu¹, XIONG Jing-yue², CHEN Zhong-hua¹, TAN Zheng-huai²

1. Key Laboratory of Drug-Targeting and Drug Delivery System of Education Ministry, Sichuan Engineering Laboratory for Plant-Sourced Drug and Sichuan Research Center for Drug Precision Industrial Technology, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chendu 610041, China
2. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Evaluation Platform of Pharmacodynamics of TCM for Major Disease Prevention and Treatment, Sichuan Key Laboratory of TCM Quality Evaluation, Chendu 610042, China
3. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chendu 610075, China

Abstract: Objective To explore the effects and potential mechanism of Foshou Powder on Parkinson's disease. **Methods** Reserpine was injected in KM mice to establish Parkinson's disease model, and hypothermia and akinesia were measured to evaluate the effects of volatile oil of *Angelica sinensis*, *Ligusticum chuanxiong* and combination. The human monoamine oxidase (hMAO) activity and inhibition mode were measured by fluorescence spectrophotometry *in vitro* with kynuramine as the common substrate of human monoamine oxidase A (hMAO-A) and human monoamine oxidase B (hMAO-B). On this basis, the 2 × 4 factorial design was applied to research the interaction between *Angelica sinensis* volatile oil and *Ligusticum chuanxiong* volatile oil. **Results** The antagonistic experiments of reserpine showed that the application of *Angelica sinensis* volatile oil and *Ligusticum chuanxiong* volatile oil significantly improved hypothermia and akinesia. Enzyme activity test revealed that volatile oil of *Angelica sinensis* and *Ligusticum chuanxiong* had competitive inhibitory effects on hMAO-A and hMAO-B, and the combination of the two substances had significant synergistic effect on the activity of both hMAO. **Conclusion** *Angelica sinensis* and *Ligusticum chuanxiong* in Foshou Powder have significant synergistic effects in the prevention and treatment of Parkinson's disease, which may be related to the inhibition of MAO activity.

Key words: Foshou Powder; *Angelica sinensis* volatile oil; *Ligusticum chuanxiong* volatile oil; human monoamine oxidase (hMAO); Parkinson's disease; factorial design

收稿日期: 2019-11-18

基金项目: 四川省科技厅成果转化项目(2018YSZH0012); 四川省科技计划项目(2019JDJQ0040)

作者简介: 曹方引, 硕士研究生, 主要从事神经内分泌药理研究。Tel: 15751005206 E-mail: 1138665174@qq.com

*通信作者 陈重华, 硕士, 副教授, 主要从事复方制剂药效学评价方法研究。Tel: (028)85503525 E-mail: chenzhonghua-1@163.com

谭正怀, 博士, 研究员, 主要从事神经内分泌药理研究。Tel: (023)85258982 E-mail: tanzh616@sohu.com

帕金森病 (Parkinson's disease, PD), 又称震颤麻痹, 是仅次于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的神经退行性疾病, 其终身患病率为 0.2%, 且随着年龄的增长而显著增加, 60 岁以上 PD 患病率为 1%, 而到了 80 岁以上患病率达到 4%^[1]。目前比较公认的病理学机制是黑质纹状体多巴胺能神经元缺失, 导致纹状体多巴胺耗竭。有研究表明, 当黑质致密带中有约 60% 的多巴胺能神经元死亡和纹状体中 70%~80% 的多巴胺消失时, 会表现出 PD 症状^[2]。临床主要表现为运动迟缓、僵化、震颤和姿势不稳, 有些可伴有抑郁和痴呆症状。目前临床治疗药物主要是左旋多巴及其辅助用药, 以提高大脑多巴胺水平, 达到改善症状的目的^[3]。

单胺氧化酶 (MAO) 属于黄素腺嘌呤二核苷酸蛋白酶, 在脑神经元、神经胶质及其周围细胞的线粒体细胞膜上均有表达, 可催化机体内各种胺类物质的代谢。MAO 分为 A 型 (MAO-A) 和 B 型 (MAO-B) 2 种亚型, 这 2 种亚型结构具有 70% 的相似氨基酸序列^[4]。MAO-A 主要分布在儿茶酚胺能神经元中, 可氧化 5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NA) 等^[5]。研究表明, MAO-A 的升高与情绪障碍相关, 其抑制剂可以用于治疗焦虑症或抑郁症^[6]。而 MAO-B 则广泛分布在神经胶质细胞和组胺能神经元中, 可催化苯胺、 β -苯乙胺等物质发生代谢, MAO-B 升高可能与 PD 或 AD 相关^[7], 其抑制剂如雷沙吉兰, 可以选择性降低 MAO-B 的活性, 能有效减轻 PD 患者的运动失能症状, 改善症状的波动^[8]。但雷沙吉兰作为 MAO-B 不可逆抑制剂具有较为严重的副作用, 所以, 探索一种能高效、选择性和可逆性的抑制剂, 成为越来越多的研究人员关注的热点。

佛手散又称芎藭汤, 出自于宋代许叔微的《普济本事方》, 由当归和川芎 2 味中药组成。古时主要用于妇产科产前、产后诸症, 尤其是用于验胎、安胎、下胎^[9]。现代药理学研究发现其对脑血管疾病、脑神经疾病有一定的治疗作用^[9-10]。但佛手散是否可以防治 PD, 目前并未见相关文献报道, 本研究拟就其抗 PD 作用及相关机制进行较为深入的探讨, 以期为其临床应用以及后期开发提供理论及实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

当归购自甘肃岷县, 川芎购自彭州绿叶公司, 经四川省中医药科学院中药资源研究所舒光明研究

员鉴定, 分别为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎; 异丙烟肼磷酸盐 (Tokyo Chemical Industry, 批号 206-164-1); 雷沙吉兰 (Accela, 批号 S056-1065-41B); 利血平 (Sigma, 批号 BCBJ4421V); 人单胺氧化酶 A (hMAO-A, Sigma, 批号 SLBW9211, 200 U/mg); 人单胺氧化酶 B (hMAO-B, Sigma, 批号 SLBW8259, 61 U/mg); 犬尿胺 (kynuramine dihydrobromide, Sigma, 批号 MKBZ2673V); 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 动物

SPF 级的昆明小鼠, 雄性, 体质量 18~22 g, 由四川省中医药科学院实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (川) 2018-19, 饲养于四川省中医药科学院实验动物中心研究所 SPF 屏障系统, 许可证号 SYXK (川) 2018-100, 室内温度 20~22 °C, 相对湿度 40%~70%, 12 h 明暗交替照明。

1.3 仪器

BP211D 分析天平, 德国赛多利斯公司; XW-80A 涡旋仪, 上海青浦沪西仪器厂; CORNING 黑色 96 孔板, TST101A-1B 电热鼓风干燥箱, 成都特斯特仪器有限公司; Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪, 美国 Thermo 公司; FT3400 动物体温仪, 南京卡尔文生物科技有限公司。

2 方法

2.1 挥发油的制备

当归挥发油 (批号 2019072901, 收率 2.2%), 用 HPLC 法测得其中藁本内酯质量分数为 41.5%; 川芎挥发油 (批号 2019080201, 收率 5.9%), 用 HPLC 法测得其中藁本内酯质量分数为 30.4%, 均由中国科学院化学物理研究所提供。

2.2 供试药品溶液制备

2.2.1 体内实验用样品的制备 (1) 当归挥发油: 称取当归挥发油适量, 加适量食用油配成所需浓度的油溶液备用。(2) 川芎挥发油: 称取川芎挥发油适量, 加适量食用油配成所需浓度的油溶液备用。(3) 当归-川芎挥发油: 取相应浓度当归挥发油和川芎挥发油按 1:1 混合, 即得。(4) 雷沙吉兰: 称取雷沙吉兰适量, 加适量食用油配成所需浓度的油溶液备用。(5) 利血平: 称取利血平 3.34 mg, 加 70 μ L 冰醋酸和 13.29 mL 的双蒸水涡旋至溶解, 配得质量浓度为 0.25 mg/mL。

2.2.2 体外实验样品制备 (1) 磷酸钾缓冲液 (0.1

mol/L): 称取磷酸氢二钾·三水 7.031 g, 磷酸二氢钾 2.647 g, 溶解于 500 mL 双蒸水中, 再加入氯化钾 0.757 g, 调节 pH 值至 7.4。(2) 当归挥发油: 临用前先用适量 DMSO(终体积分数低于 2.0%)溶解, 再用磷酸钾缓冲液分别稀释为 300、150、75、37.5、18.75、9.375、4.687 5 mg/mL 备用。(3) 川芎挥发油: 临用前先用适量 DMSO(终体积分数低于 2.0%)溶解, 再用磷酸钾缓冲液分别稀释为 300、150、75、37.5、18.75、9.375、4.687 5 mg/mL 备用。(4) 异丙烟肼磷酸盐: 临用前先用适量 DMSO(终体积分数低于 2.0%)溶解, 再用磷酸钾缓冲液分别稀释为 13.86、2.77、0.554、0.111 mg/mL 用于检测 hMAO-A 活性, 将 13.86 mg/mL 溶液稀释为 4.62、1.54、0.513、0.171、0.057 0 mg/mL 用于检测 hMAO-B 活性。(5) 雷沙吉兰: 临用前先用适量 DMSO(终体积分数低于 2.0%)溶解, 用磷酸钾缓冲液分别稀释为 8.46、1.69、0.338、0.067 7 mg/mL 用于检测 hMAO-A 活性, 再将 8.46 mg/mL 溶液分别稀释为 0.846、0.169、0.033 8、 6.77×10^{-3} 、 1.35×10^{-3} 、 2.71×10^{-4} mg/mL 用于检测 hMAO-B 活性。

2.3 体内实验

2.3.1 对单胺类神经递质耗竭小鼠体温的影响 取小鼠 48 只, 适应性饲养 2 d, 按体质量随机分为对照组、模型组、当归挥发油组 (150 mg/kg)、川芎挥发油组 (150 mg/kg)、当归-川芎挥发油组 (150 mg/kg+150 mg/kg) 和雷沙吉兰组 (5 mg/kg), 每组 8 只。根据体质量按 5 mL/kg ig 给予相应药物, 连续给药 5 次, 每天 2 次, 于末次给药前将体温仪探头轻轻插入小鼠肛门内, 维持 10~15 s, 检测肛温作为小鼠基础体温 (T_0)。给药后 30 min, 除对照组外, 其余各组小鼠背部 sc 5 mg/kg 利血平进行造模, 2 h 后重复测定小鼠肛温 (T_c), 计算肛温差值 ($\Delta T = T_c - T_0$)^[11]。

2.3.2 对单胺类神经递质耗竭小鼠运动能力的影响 分组、给药及造模方法同“2.3.1”项, 于造模后 2 h 将各组动物放于直径 7.5 cm 的圆形白纸的中央观察 15 s, 检测留在圈内的动物个数, 计算出圈率 (出圈动物数/动物总数)^[11]。

2.4 体外对 hMAO-A/hMAO-B 活性的影响

2.4.1 对 hMAO-A/hMAO-B 半数抑制浓度 (IC_{50}) 值检测 酶活性测定方法根据参考文献报道略加修改^[12], 反应包含 hMAO-A/hMAO-B、底物犬尿胺和受试抑制剂 (当归挥发油或川芎挥发油), 磷酸钾缓

冲液 (0.1 mol/L, pH 7.4, 包含 20.2 mmol/L KCl) 作为该反应的稀释溶剂, 反应总体积为 50 mL。采用 DMSO 将受试挥发油稀释为不同质量浓度 (4.687 5~300.00 mg/mL), 并保证 DMSO 的最终体积分数不超过 4%。取稀释的受试挥发油分别与 hMAO-A/hMAO-B (0.007 5 mg/mL) 于 37 °C 恒温孵育 30 min, 然后加入底物犬尿胺 (hMAO-A 为 45 mmol/L, hMAO-B 为 30 mmol/L) 继续在 37 °C 条件下恒温孵育 30 min。孵育完成后加入 2 mol/L 氢氧化钠溶液 40 mL 和双蒸水 100 mL, 终止反应, 于激发波长 310 nm, 发射波长 400 nm 处测定其荧光强度, 记录荧光值 IF_i。阴性对照组用磷酸钾缓冲液代替样品溶液做平行实验, 荧光值记录为 IF_c, 空白组以磷酸钾缓冲液分别代替样品+hMAO-A/hMAO-B+犬尿胺做平行实验, 荧光值记录为 IF₀。计算受试挥发油对酶活性的抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (IF_i - IF_0) / (IF_c - IF_0)^{[12]}$$

2.4.2 酶活性恢复实验 为了确定受试挥发油对 hMAO-A/hMAO-B 的抑制作用是否可逆, 需要测定其抑制作用的时间依赖性。将受试挥发油 (浓度为 $2 \times IC_{50}$) 与 hMAO-A/hMAO-B (0.030 mg/mL) 于 37 °C 恒温孵育 0、15、30、60 min 后, 稀释 2 倍再加入犬尿胺 (hMAO-A 为 45 mmol/L, hMAO-B 为 30 mmol/L) 继续 37 °C 恒温孵育 15 min。孵育完成后加入 2 mol/L 氢氧化钠溶液 40 mL 和双蒸水 100 mL, 终止反应, 于激发波长 310 nm, 发射波长 400 nm 处测定其荧光强度, 记录为 IF_{i'}。阴性对照组用磷酸钾缓冲液代替样品溶液做平行实验, 荧光值记录为 IF_{c'}, 空白组以磷酸钾缓冲液分别代替样品+hMAO-A/hMAO-B+犬尿胺做平行实验, 荧光值 IF_{0'}。计算产物生成率^[12]。

$$\text{产物生成率} = (IF_i' - IF_0') / (IF_c' - IF_0')$$

2.4.3 Lineweaver-Burk 图 构建 Lineweaver-Burk 双倒数图, 考察受试抑制剂的抑制模式。受试抑制剂浓度设置为 $1 \times IC_{50}$ 、 $3/4 \times IC_{50}$ 、 $1/2 \times IC_{50}$ 和 $1/4 \times IC_{50}$, 分别与 hMAO-A/hMAO-B (0.015 mg/mL) 于 37 °C 恒温孵育 30 min, 然后分别与 4 种不同浓度的犬尿胺 (15~90 mmol/L) 继续在 37 °C 条件下恒温孵育 30 min。孵育完成后加入 2 mol/L 氢氧化钠溶液 40 mL 和双蒸水 100 mL, 终止反应, 于激发波长 310 nm, 发射波长 400 nm 处测定其荧光强度^[12]。

2.4.4 当归挥发油和川芎挥发油对 hMAO-A/hMAO-B 活性相互作用及最佳配方研究 在测得当

归挥发油、川芎挥发油单独使用对 hMAO-A/hMAO-B 活性 IC₅₀ 的基础上,为进一步探讨两药合用对 hMAO-A/hMAO-B 活性是否存在交互作用及

最佳配方比例,采用 2×4 析因设计进行研究,其设计及药物终质量浓度见表 1。其测定方法参照“2.4.1”项进行。

表 1 针对 hMAO-A/hMAO-B 活性配方研究的析因设计

Table 1 Factorial design for formulation study of hMAO-A/hMAO-B activity

水平	hMAO-A		hMAO-B	
	当归挥发油/(μg·mL ⁻¹)	川芎挥发油/(μg·mL ⁻¹)	当归挥发油/(μg·mL ⁻¹)	川芎挥发油/(μg·mL ⁻¹)
1	0.63	0.69	1.27	1.61
2	1.26	1.38	2.54	3.22
3	2.52	2.75	5.08	6.45
4	5.04	5.50	10.16	12.9

2.5 统计方法

采用 DAS 3.2.8 统计软件(上海博佳医药科技有限公司开发)进行统计学分析,计算 IC₅₀;采用 GraphPad Prism 5 绘制时间依赖图和 Lineweaver-Burk 双倒数图;采用 SPSS 统计软件,进行析因设计方差分析和 χ² 检验。当归挥发油和川芎挥发油酶的选择性用 RS (relative selectivity of isozymes) 值来表示。

$$RS_A = hMAO-B IC_{50} / hMAO-A IC_{50}$$

$$RS_B = hMAO-A IC_{50} / hMAO-B IC_{50}$$

RS_A 表示样品对 hMAO-A 活性抑制的选择性;RS_B 表示样品对 hMAO-B 活性抑制的选择性;hMAO-A IC₅₀ 表示样品对 hMAO-A 的 IC₅₀;hMAO-B IC₅₀ 表示样品对 hMAO-B 的 IC₅₀

3 结果

3.1 对利血平诱导小鼠体温下降的影响

由表 2 可知,与对照相比较,模型组小鼠肛温明显下降,差异极显著 (P<0.001);与模型组比较,单用当归挥发油和川芎挥发油对小鼠肛温下降无改善作用 (P>0.05),而联合应用时可显著拮抗利血平诱导的降温作用 (P<0.01);阳性药雷沙吉兰组与模型组相比,差异极显著 (P<0.001)。由表 3 的析因分析结果可知,当归挥发油和川芎挥发油联合应用时对改善利血平体温下降有协同作用 (P<0.01)。

3.2 对利血平诱导小鼠运动不能的影响

由表 4 可知,和对照组比较,模型组小鼠出圈率明显下降,结果采用 χ² 检验两组间差异极显著 (P<0.001);与模型组比较,联合使用当归挥发油和川芎挥发油能显著拮抗利血平造成的小鼠运动不能 (P<0.05),而单用时尽管在统计学上没有显著差异,但其出圈率均有所提高;阳性药雷沙吉兰与模型组相比,差异显著 (P<0.05)。

表 2 佛手散对利血平诱导小鼠体温下降的影响 (x̄±s, n=8)

Table 2 Effects of Foshou Powder on hypothermia after reserpine induction (x̄±s, n=8)

组别	单次给药 剂量/(mg·kg ⁻¹)	ΔT/°C
对照	—	0.51±0.64
模型	—	-2.86±1.02 ^{####}
当归挥发油	150	-2.70±1.07
川芎挥发油	150	-3.04±0.73
当归-川芎挥发油	150+150	-0.81±1.08 ^{**}
雷沙吉兰	5	-0.31±0.40 ^{***}

与对照组比较:####P<0.001;与模型组比较:**P<0.01 ***P<0.001
####P<0.001 vs control group; **P<0.01 ***P<0.001 vs model group

表 3 体温下降的析因分析结果

Table 3 Factorial analysis of hypothermia after reserpine induction

来源	III 类平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	25.672	3	8.557	8.839	0.000
截距	176.720	1	176.720	182.538	0.000
当归挥发油	11.281	1	11.281	11.653	0.002
川芎挥发油	5.780	1	5.780	5.970	0.021
当归-川芎挥发油	8.611	1	8.611	8.895	0.006
误差	27.107	28	0.968		
总计	229.500	32			
修正后总计	52.780	31			

3.3 当归挥发油和川芎挥发油对 hMAO-A/hMAO-B 的抑制作用

3.3.1 IC₅₀ 值与选择性分析 从表 5 可见,当归挥发油以及川芎挥发油对 hMAO-A 和 hMAO-B 都有一定的抑制作用,且按 1:1 联合应用时对 hMAO-A

表 4 佛手散对利血平诱导小鼠运动不能的影响

Table 4 Effects of Foshou Powder on akinesia after reserpine induction

组别	单次给药剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只	出圈数/只	出圈率/%
对照	—	14	14	100.0
模型	—	14	2	14.3 ^{###}
当归挥发油	150	14	7	50.0
川芎挥发油	150	14	4	29.6
当归-川芎挥发油	150+150	14	8	57.1 [*]
雷沙吉兰	5	14	9	64.3 [*]

与对照组比较: ^{###}*P*<0.001; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05

^{###}*P*<0.001 vs control group; ^{*}*P*<0.05 vs model group

和 hMAO-B 的抑制作用均有所增强, 但对 hMAO-A 的选择性稍好于 hMAO-B, 其对 hMAO-A 的选择性分别为 hMAO-B 的 2.1 倍和 3.0 倍, 联合应用时为 13.9 倍。

3.3.2 酶的恢复实验 将当归挥发油和川芎挥发油分别与 hMAO-A 和 hMAO-B 在质量浓度为 2×IC₅₀ 值的条件下预孵育不同时间 (0~60 min), 以抑制相应酶的活性, 经 2 倍稀释后终质量浓度等于 IC₅₀, 记录产物生成率。由图 1 可知, 在当归挥发油和川芎挥发油的抑制作用下, 随着酶反应时间的延长, 酶活性有所恢复, 说明两者对 hMAO-A 和 hMAO-B 的抑制作用都是可逆性抑制。

表 5 当归挥发油、川芎挥发油对 hMAO-A/hMAO-B 的抑制能力和选择性比较

Table 5 Comparison of inhibition potencies and selectivity of *Angelica sinensis* volatile oil and *Ligusticum chuanxiong* volatile oil on hMAO-A and hMAO-B

受试抑制剂	对 hMAO-A	对 hMAO-B	RS _A	RS _B
	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)		
当归挥发油	5.04	10.16	2.0	
川芎挥发油	5.50	12.90	2.3	
当归-川芎挥发油	0.28	3.89	13.9	
异丙烟肼磷酸盐	1.33	0.23		5.8
雷沙吉兰	0.31	4.87×10 ⁻³		63.7

3.3.3 Lineweaver-Burk 图 由图 2 可知, 当归挥发油和川芎挥发油对 hMAO-A 和 hMAO-B 的抑制模式均为竞争性抑制作用。

3.3.4 当归挥发油和川芎挥发油针对 hMAO-A/hMAO-B 活性的最佳配方及交互作用分析 结果见表 6~9, 从表 6 和表 8 可见, 当归挥发油或川芎挥发油随着质量浓度的升高, 其对 hMAO-A 和 hMAO-B 活性的抑制作用均增强, 其最优组合均为当归挥发油 4 水平和川芎挥发油 4 水平配比; 从表 7 和表 9 的方差分析结果可以看出, 当归挥发油、川芎挥发油在配方中均对 hMAO-A 和 hMAO-B 活性具有显著的抑制作用, 二者合用具有显著的协同增效作用。

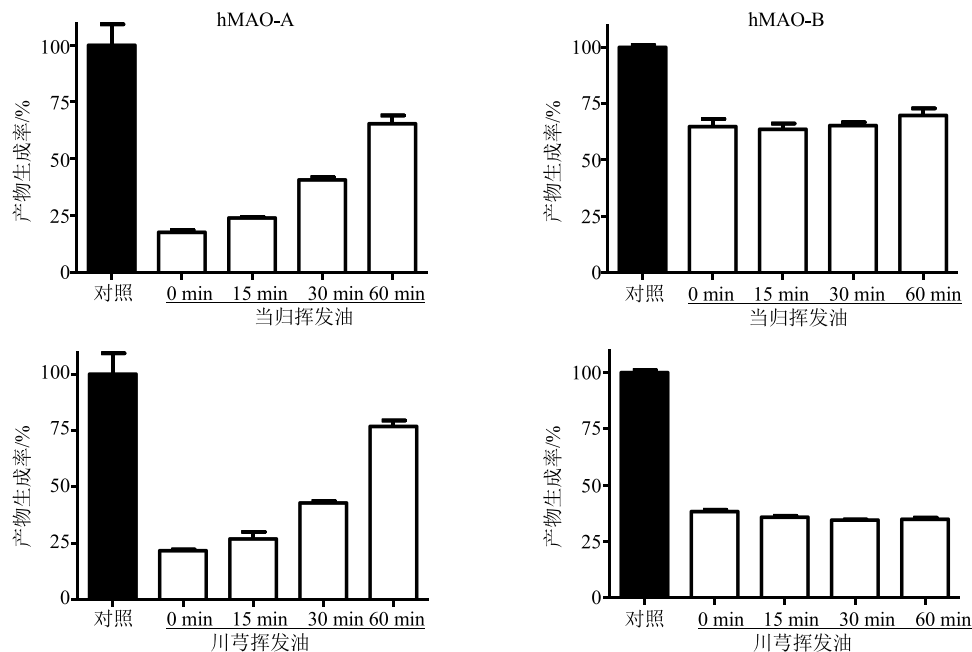


图 1 当归挥发油和川芎挥发油对 hMAO-A/hMAO-B 时间依赖抑制作用

Fig. 1 Time-dependent inhibition of *Angelica sinensis* volatile oil and *Ligusticum chuanxiong* volatile oil on hMAO-A/B

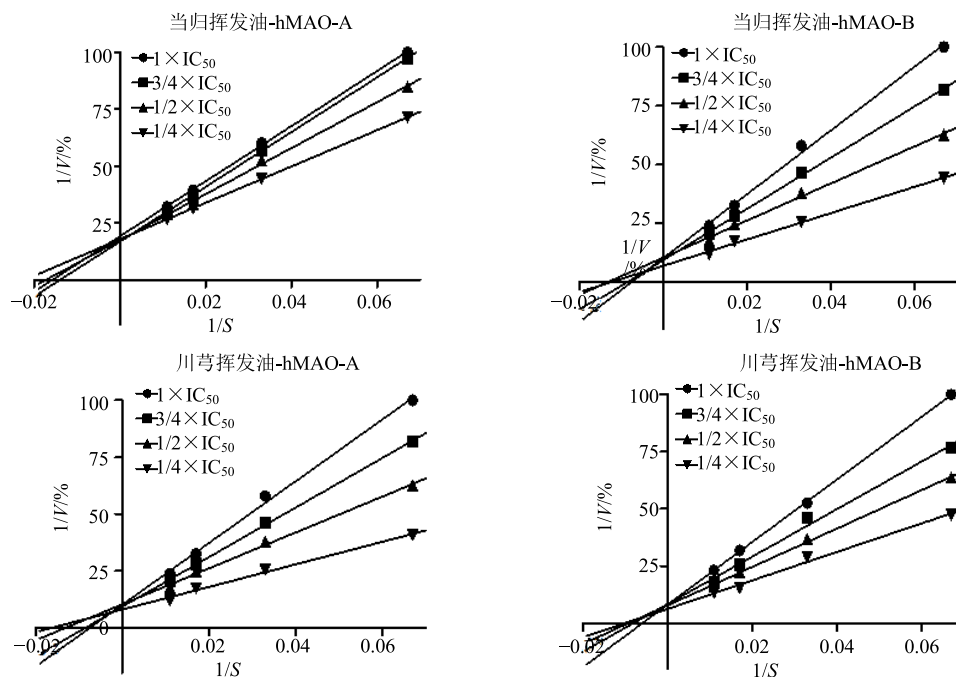


图 2 当归挥发油和川芎挥发油对 hMAO-A/hMAO-B 抑制的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 2 Lineweaver-Burk diagram of hMAO-A/B inhibition by *Angelica sinensis* volatile oil and *Ligusticum chuanxiong* volatile oil

表 6 两因子 4 水平析因探讨当归挥发油和川芎挥发油针对 hMAO-A 活性的最佳配方

Table 6 Best formula of *Angelica sinensis* volatile oil and *Ligusticum chuanxiong* volatile oil for hMAO-A activity by factorial design

实验号	水平		对 hMAO-A 的抑制率/%				合计/%
	当归挥发油	川芎挥发油					
1	1	1	34.58	40.72	38.72	36.19	150.20
2	1	2	44.06	48.86	46.48	49.18	188.58
3	1	3	65.58	69.07	71.05	72.02	277.72
4	1	4	82.76	84.73	84.32	85.71	337.52
5	2	1	41.08	51.37	48.31	25.87	166.64
6	2	2	51.29	58.65	48.76	45.29	203.99
7	2	3	70.02	68.04	70.95	62.86	271.86
8	2	4	84.17	85.10	84.84	84.72	338.83
9	3	1	53.66	53.76	55.59	60.97	223.98
10	3	2	61.54	63.37	65.71	66.25	256.87
11	3	3	72.66	75.34	76.89	78.56	303.45
12	3	4	83.59	85.30	85.30	86.41	340.61
13	4	1	62.93	65.01	67.04	68.47	263.45
14	4	2	72.01	70.03	68.87	70.37	281.29
15	4	3	76.18	72.42	80.80	80.08	309.49
16	4	4	88.98	89.11	86.26	86.84	351.18
R_1	954.03	804.27					
R_2	981.32	930.73					
R_3	1 124.91	1 162.53					
R_4	1 205.41	1 368.14					

表 7 hMAO-A 抑制率的方差分析结果

Table 7 Variance analysis for inhibition rate of hMAO-A

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
总变异	16 216.177	63			
当归挥发油	2 663.055	3	877.685	57.696	0.000
川芎挥发油	11 712.955	3	3 904.318	253.763	0.000
当归-川芎挥发油	1 101.655	9	122.406	7.956	0.000
误差	738.512	48	15.386		

表 8 两因子 4 水平析因探讨当归挥发油和川芎挥发油针对 hMAO-B 活性的最佳配方

Table 8 Best formula of *Angelica sinensis* volatile oil and *Ligusticum chuanxiong* volatile oil for hMAO-B activity by factorial design

实验号	水平		对 hMAO-B 的抑制率/%				合计/%
	当归挥发油	川芎挥发油					
1	1	1	13.04	24.77	21.98	18.94	78.73
2	1	2	35.43	30.58	47.46	36.95	150.42
3	1	3	60.45	50.60	54.07	52.32	217.44
4	1	4	71.46	73.28	70.79	76.87	292.41
5	2	1	25.15	24.01	21.80	21.68	92.64
6	2	2	36.66	43.42	37.62	26.75	144.45
7	2	3	58.50	50.00	57.15	58.77	224.41
8	2	4	69.06	76.20	71.76	79.72	296.73
9	3	1	25.15	34.06	38.92	48.69	146.83
10	3	2	38.12	40.66	48.26	51.34	178.38
11	3	3	62.96	57.52	74.21	68.25	262.94
12	3	4	73.92	75.54	75.27	82.44	307.16
13	4	1	38.55	42.81	43.07	45.72	170.15
14	4	2	48.32	41.55	47.48	46.87	184.21
15	4	3	63.36	59.53	57.94	59.35	240.18
16	4	4	76.33	77.17	74.52	73.48	301.49
R ₁	739.00	488.35					
R ₂	758.24	657.47					
R ₃	895.31	944.98					
R ₄	896.05	1 197.80					

表 9 hMAO-B 抑制率的方差分析结果

Table 9 Variance analysis for inhibition rate of hMAO-B

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
总变异	21 727.982	63			
当归挥发油	1 363.274	3	454.425	17.346	0.000
川芎挥发油	18 422.266	3	6 140.755	234.398	0.000
当归-川芎挥发油	684.939	9	76.104	2.905	0.008
误差	738.512	48	26.198		

4 讨论

佛手散最早正式记载于《普济本事方》，当时主要用于妇科相关疾病的治疗。然而，有关佛手散中当归和川芎的比例，各书记载一直就存在较大差异。如敦煌古医方、《外台秘要》与《成方切用》中皆为 1:1；《太平圣惠方》为 1:4；《陈素庵妇科补解》为 1:2；《医部全录》为 10:7；《证治准绳》为 7:

10 等多种用量比例。其用量的多样性估计不同的配伍比例与其临床适应症存在一定的相关性。体内研究发现当归挥发油与川芎挥发油 1:1（原生药材接近 1:1）时对 PD 模型小鼠具有显著的防治作用，当归与川芎之间存在显著的协同增效作用。进一步体外用析因设计研究发现，对 MAO-A 活性而言，当归挥发油与川芎挥发油的比例为 4:4 时作用最

佳, 而对 MAO-B 活性而言, 当归挥发油与川芎挥发油的比例为 3~4:4 时作用最佳。提示, 佛手散防治 PD 作用确实与其抑制 MAO 活性有关。

关于当归、川芎有效物质的研究, 早期集中在阿魏酸、川芎嗪等水溶性物质, 近年来研究发现当归、川芎挥发油中含有大量的藁本内酯、丁苯酞等成分, 结合故典书籍上均记载当归、川芎切后用酒煎煮的制法(如《外台秘要》“文仲徐王效神验胎动方: 当归六分, 芎蒭四分, 上二味, 切, 以水四升、酒三升半, 煮取三升, 分三服”等), 因而近年来将其有效成分的研究重点集中在其挥发油, 研究发现当归、川芎的挥发油的有效成分相似, 但也存在明显不同。两者都含有藁本内酯类, 其中, 当归的藁本内酯含量远高于川芎, 而川芎挥发油中的成分更复杂, 除了含有藁本内酯外, 还含有系列洋川芎内酯等特征性成分^[13]。传统上川芎和当归常一起煎煮, 但有人研究发现川芎与当归分煎与合煎的主要成分之间并无显著差别^[14]。提示本研究用单独制备的川芎挥发油、当归挥发油能够较大程度上反映临床应用的实际情况。

目前, 临床上用于 PD 防治的药物主要包括抗胆碱能神经药物如安坦、多巴胺补充剂左旋多巴以及 MAO-B 抑制剂, 左旋多巴短期内改善症状作用明显, 但存在“开关”现象以及外周多巴胺升高引起的副作用, 因而限制了其临床应用; 目前临床上使用的 MAO-B 选择性抑制剂雷沙吉兰由于是非可逆性抑制作用, 其副作用明显^[15]。另外, 近年来, 临床上研究发现焦虑症和抑郁症与 PD 具有复杂的双向关系, 当 PD 出现且无法控制时, 焦虑症和抑郁症也会显著加重 PD 的运动症状^[16]。PD 患者在出现运动障碍前表现出情感处理障碍^[17], 而 MAO-A 的升高与情绪障碍相关, MAO-B 升高可能与 PD 相关^[18]。本研究发现当归挥发油和川芎挥发油可显著、可逆性、竞争性抑制 hMAO 活性, 但对 A/B 亚型选择性不高; 提示佛手散在治疗 PD 时, 还可有效改善其情绪障碍, 有利于疾病走向良性循环。

由此可见, 佛手散防治 PD 作用与其能够有效抑制 MAO 活性有关, 其协同增效作用也与其协同抑制 MAO 活性有关, 其详细作用机制有待进一步深入研究。

参考文献

[1] MacDonald B K, Cockerell O C, Sander J W, *et al.* The incidence and lifetime prevalence of neurological disorders in a prospective community-based study in the UK [J]. *Brain J Neurol*, 2000, 123(Pt 4): 665-667.

[2] Ma Y, Dhawan V, Mentis M, *et al.* Parametric mapping of [18F] FPCT binding in early stage Parkinson's disease: APET study [J]. *Synapse*, 2002, 45(2): 125-133.

[3] Pahwa R, Lyons K E. Treatment of early Parkinson's disease [J]. *Curr Opin Neurol*, 2014, 27(4): 442-449.

[4] Forneris F, Battaglioli E, Mattevi A, *et al.* New roles of flavoproteins in molecular cell biology: Histone demethylase LSD1 and chromatin [J]. *FEBS J*, 2009, 276(16): 4304-4312.

[5] Edmondson D E, Binda C, Wang J, *et al.* Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases [J]. *Biochemistry*, 2009, 48(20): 4220-4230.

[6] Goldstein D S, Jinsmaa Y, Sullivan P, *et al.* Comparison of monoamine oxidase inhibitors in decreasing production of the autotoxic dopamine metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde in PC12 cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016, 356(2): 483-492.

[7] Dézsi L, Vécsei L. Monoamine oxidase B inhibitors in Parkinson's disease [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2017, 16(4): 425-439.

[8] Rascol O, Lozano A, Stern M, *et al.* Milestones in Parkinson's disease therapeutics [J]. *Mov Disord*, 2011, 26(6): 1072-1082.

[9] 白鹤, 李沛清, 刘洁, 等. 佛手散的传统功用与现代研究关联分析 [J]. *中成药*, 2014, 36(3): 601-604.

[10] 罗宝生. 当归与川芎药理作用研究进展及对比 [J]. *中国处方药*, 2016, 14(5): 20-22.

[11] 贾铷, 芦锰, 陈燕, 等. 解郁胶囊对药物所致抑郁模型小鼠的影响 [J]. *中医学报*, 2018, 33(237): 278-281.

[12] Strydom B, Malan S F, Castagnoli Jr N, *et al.* Inhibition of monoamine oxidase by 8-benzylxocaffeine analogues [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(18): 1018-1028.

[13] 刘洪玲, 于良生, 纪恒胜, 等. 川芎挥发油的 GC-MS 指纹图谱研究 [J]. *中国药房*, 2012, 23(43): 4101-4103.

[14] 宋金春, 代军, 以盛, 等. 不同比例川芎当归共煎液指纹图谱考察 [J]. *中国药房*, 2007, 18(9): 677-679.

[15] Mandel S, Weinreb O, Amit T, *et al.* Mechanism of neuroprotective action of the anti-Parkinson drug rasagiline and its derivatives [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005, 48(2): 379-387.

[16] Colpaert F C. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat [J]. *Neuropharmacology*, 1987, 26(9): 1431-1440.

[17] Youdim M B H, Edmondson D E, Tipton K F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(4): 295-309.

[18] Chen J J, Marsh L. Anxiety in Parkinson's disease: Identification and management [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2014, 7(1): 52-59.