补肾止颤方对帕金森病小鼠模型神经保护及抗兴奋性氨基酸作用

刘蕾蕾，田心韵，李文涛*

上海中医药大学附属市中医医院，上海　200000

摘　要：目的　研究补肾止颤方对帕金森病小鼠模型神经保护及抗兴奋性氨基酸作用。**方法**　采用 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶盐酸盐（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine，MPTP）诱导帕金森病小鼠模型，随机分为对照组、模型组、金刚烷胺（41.1 mg/kg）组和补肾止颤方低、中、高剂量（6.6、9.9、19.8 g/kg）组，每组 8 只。连续 14 d 给药干预后，通过爬杆和自主活动实验评价小鼠行为学，并选择补肾止颤方最佳作用剂量用于后续研究；苏木素-伊红（HE）染色观察脑组织病理变化；ELISA 法测定外周血谷氨酸含量；Western blotting 和 qRT-PCR 法检测小鼠黑质纹状体酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）、多巴胺转运体（dopamine transporter，DAT）、兴奋性氨基酸转运体 1（excitatory amino acid transporter 1，EAAT1）、YY-1、β-catenin 蛋白和 *TH*、*DAT*、*EAAT1*、*YY-1* mRNA 表达。**结果**　与模型组比较，补肾止颤方组小鼠行为学症状显著改善（P＜0.05、0.001），纹状体区域细胞整体形态与排列情况得到改善，黑质纹状体 TH、DAT 表达显著升高（P＜0.05、0.01、0.001），外周血谷氨酸含量显著降低（P＜0.001），黑质纹状体 YY1 表达水平均显著降低（P＜0.01、0.001），EAAT1 表达水平均显著升高（P＜0.05、0.001），β-catenin 蛋白表达水平显著升高（P＜0.05）。**结论**　补肾止颤方对帕金森病小鼠多巴胺能神经元有一定保护作用，其机制可能与通过转录调控 EAAT1 表达，从而减少过量的谷氨酸有关。

关键词：补肾止颤方；帕金森病；神经保护；兴奋性氨基酸毒性；地黄苷 D；腺苷；尿囊素；莫诺苷；马钱苷；2,3,5,4′-四羟基二苯乙烯-2-*O*-β-*D*-葡萄糖苷；大黄素；松果菊苷；毛蕊花糖苷

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2023)21 - 7096 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.21.018

Effect of Bushen Zhichan Prescription on neuroprotection and anti-excitatory amino acid in mice with Parkinson's disease

LIU Lei-lei, TIAN Xin-yu, LI Wen-tao

Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200000, China

Abstract: Objective　To study the effect of Bushen Zhichan Prescription (补肾止颤方) on neuroprotection and anti-excitatory amino acid in mice model with Parkinson's disease. **Methods**　A mouse model of Parkinson's disease was induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride (MPTP). The mice were randomly divided into control group, model group, amantadine hydrochloride (41.1 mg/kg) group, and Bushen Zhichan Prescription low-, medium-, high-dose (6.6, 9.9, 19.8 g/kg) groups, with eight mice in each group. After 14 consecutive days of administration intervention, the behavior of mice was evaluated through pole climbing and autonomous activity experiments, and the optimal dosage of Bushen Zhichan Prescription was selected for subsequent research; Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in brain tissue; ELISA method was used to measure the content of glutamate in peripheral blood; Western blotting and qRT-PCR methods were used to detect tyrosine hydroxylase (TH), dopamine transporter (DAT), excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1), YY-1, β-catenin protein and *TH*, *DAT*, *EAAT1*, *YY-1* mRNA expressions in nigrostriatal tissue of mice. **Results**　Compared with model group, the behavioral symptoms of mice in Bushen Zhichan Prescription group were significantly improved (P < 0.05, 0.001), the overall morphology and arrangement of cells in striatum area were improved, the expressions of TH and DAT in nigrostriatal tissue were significantly increased (P < 0.05, 0.01, 0.001), glutamine

收稿日期：2023-07-23

基金项目：上海市科委自然基金项目（22ZR1459300）；上海市十三五重点专科建设项目（shslczdzk04901）；上海市中医医院未来计划项目（WL-HBBD-2021002K）

作者简介：刘蕾蕾，硕士研究生，研究方向为中医药治疗神经系统疑难病。E-mail: 857591844@qq.com

***通信作者：**李文涛，博士生导师，教授，研究方向为中医药治疗神经系统疑难病。E-mail: lwt1132@163.com

content in peripheral blood was significantly reduced ($P < 0.001$), YY1 expression level in nigrostriatal tissue was significantly reduced ($P < 0.01$, 0.001), EAAT1 expression level was significantly increased ($P < 0.05$, 0.001), β-catenin expression level was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Bushen Zhichan Prescription has a certain protective effect on dopaminergic neurons in mice with Parkinson's disease, and its mechanism may be related to reducing excessive glutamate through transcriptional regulation of EAAT1 expression.

Key words: Bushen Zhichan Prescription; Parkinson's disease; neuroprotection; excitatory amino acid toxicity; rehmannioside D; adenosine; allantoin; morroniside; loganin; 2,3,5,4′-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-*O*-β-*D*-glucoside; emodin; echinacoside; verbascoside

帕金森病是仅次于阿尔茨海默病位于第 2 位的神经退行性疾病[1]。随着人口老龄化，帕金森病患者有不断增多趋势，预计 2030 年全球 65 岁以上的老年人中 3%将会患有帕金森病[2]，临床以多巴胺替代治疗为主的帕金森病药物属于对症治疗的范畴[3]，但不能阻止疾病发展。因此研究具有神经保护作用、延缓疾病发展的药物具有重要意义。帕金森病发病机制复杂，病因与年龄、遗传、饮食及生活习惯、环境等有关，病变机制涉及氧化应激反应、免疫及神经炎症、线粒体功能障碍、兴奋性氨基酸神经毒性等，最终导致多巴胺能神经元变性死亡。

补肾止颤方来源于经典名方六味地黄丸，是本课题组多年临床治疗帕金森病的经验总结。临床研究发现，补肾止颤方能改善帕金森病患者的运动症状震颤，强直和动作迟缓等精神症状，睡眠障碍和自主神经功能障碍等非运动症状[4-5]。动物实验研究发现，补肾止颤方联合左旋多巴能显著增强兴奋性氨基酸转运体 1（excitatory amino acid transporter 1，EAAT1）蛋白表达，而对 EAAT2 没有增强作用，提示补肾止颤方可能有一定抗兴奋性氨基酸毒性作用[6]。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶盐酸盐（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine，MPTP）诱导的帕金森病实验模型是有代表性的研究模型，其作用机制是 MPTP 进入体内，在单胺氧化酶的作用下转化为 1-甲基-4-苯基吡啶（1-methyl-4-phenylpyridinium，MPP^+）产生类似帕金森病症状。而且研究发现，该小鼠模型可检测到纹状体谷氨酸升高，可以作为研究兴奋性氨基酸毒性的模型[7]。本研究选择 MPTP 诱导的帕金森病小鼠实验模型，系统研究补肾止颤方抗兴奋性氨基酸毒性的作用，为补肾中药治疗帕金森病的机制提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 48 只，7 周龄，体质量（20±5）g，购自上海杰思捷实验动物有限公司，合格证号 20180004064117，许可证号 SCXK（沪）2018-0004。实验室温度 20～22 ℃，相对湿度 45%～65%，明暗光照。动物实验经上海中医药大学附属市中医医院实验中心批准（批准号 2021028）。

1.2 药材

补肾止颤方由熟地黄、山药、山茱萸、制何首乌、肉苁蓉组成，每味中药均为颗粒，由四川新绿色药业科技发展有限公司提供，以上药材经该公司质量管理部分别鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的新鲜或干燥块根的炮制加工品、薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb.的干燥根茎、山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.的干燥成熟果肉、蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb.的干燥块根的炮制加工品、列当科植物管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight 的干燥带鳞叶的肉质茎。

1.3 药品与试剂

金刚烷胺片（0.1 g/片，批号 H31021561）购自上海市中医医院药剂科；MPTP（批号 HY-15608）购自美国 Med Chem Express 公司；抗兔二抗（批号 A051）、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（批号 AF118）、BCA 试剂盒（批号 P0010S）购自上海碧云天生物技术有限公司；兔抗酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）抗体（批号 ab1532Y）、兔抗多巴胺转运体（dopamine transmitter transporter，DAT）抗体（批号 ab184451）、兔抗 EAAT1 抗体（批号 ab181036）、兔抗 YY1 抗体（批号 ab10923）购自英国 Abcam 公司；Prime Script™ RT Master Mix TaKaRa（批号 RR036A）、SYBR Prime Ex Taq™ TaKaRa（批号 RR420A）购自宝生物工程有限公司；10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶（批号 PG212）、化学发光试剂盒（批号 SQ201）购自上海雅酶生物医药科技有限公司；聚偏二氟乙烯膜（批号 PR00509）购自美国 Millipore 公司；Trizol（批号

15596-026）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；β-catenin 抗体（批号 8480）购自美国 CST 公司；谷氨酸试剂盒（批号 BC1585）购自上海索莱宝生化科技有限公司。

1.4 仪器

JX-FSTPRP48 型组织匀浆机（上海净信科技）；ABI Stepone plus 型实时荧光定量 PCR 仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；ME1002/02 型电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；DMIL 型倒置显微镜（德国 Leica 公司）；E6006 型 SDS-PAGE 蛋白系统装置（上海碧云天生物技术有限公司）；ChenmiDoc XRS 型凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 补肾止颤方的制备

分别取熟地黄、山药、山茱萸、制何首乌、肉苁蓉饮片，加水煎煮，滤过，滤液浓缩成清膏（干浸膏出膏率为 44.0%～76.5%），加辅料适量干燥（或干燥粉碎），再加辅料适量混匀，制粒即制成各配方颗粒。每制成 1000 g 颗粒，所需各中药饮片分别为熟地黄饮片 1300 g、山药饮片 4000 g、山茱萸饮片 1200 g、制何首乌饮片 4000 g、肉苁蓉饮片 2200 g。补肾止颤方由熟地黄配方颗粒、山药配方颗粒、山茱萸配方颗粒、制何首乌配方颗粒、肉苁蓉配方颗粒按照 12∶12∶12∶3∶9 比例混合制成。

按照《中国药典》2020 年版通则 0512 高效液相色谱法测定各中药的主要成分含量，作为各中药配方颗粒的质控标准。其中熟地黄配方颗粒每克含地黄苷 D（$C_{27}H_{42}O_{20}$）为 0.70～2.70 mg；山药配方颗粒每克含腺苷（$C_{10}H_{13}N_5O_4$）为 0.30～1.50 mg、尿囊素（$C_4H_6N_4O_3$）为 7.0～42.0 mg；山茱萸配方颗粒每克含莫诺苷（$C_{17}H_{26}O_{11}$）和马钱苷（$C_{17}H_{26}O_{10}$）为 16.0～31.0 mg；制何首乌配方颗粒每克含 2,3,5,4′-四羟基二苯乙烯-2-*O*-β-*D*-葡萄糖苷（$C_{20}H_{22}O_9$）为 15.4～55.5 mg、大黄素（$C_{15}H_{10}O_5$）为 0.27～1.13 mg；肉苁蓉配方颗粒每克含松果菊苷（$C_{35}H_{46}O_{20}$）和毛蕊花糖苷（$C_{29}H_{36}O_{15}$）为 30.0～100.0 mg。

2.2 帕金森病模型的建立、分组及给药

C57BL/6J 小鼠适应性饲养 1 周后，按照文献方法[8-9]ip MPTP（25 mg/kg）建立帕金森病小鼠模型，对照组 ip 等体积生理盐水，连续 10 d。观察小鼠行为学改变，包括震颤、后腿拉直、躬背、竖毛、运动减少。检测小鼠黑质及纹状体区域 TH、DAT 表达，评估模型是否成功。造模完成后，小鼠随机分为对照组、模型组、金刚烷胺片（41.1 mg/kg）组和补肾止颤方低、中、高剂量（6.6、9.9、19.8 g/kg）组，每组 8 只。各给药组 ig 相应药物，对照组和模型组 ig 等体积生理盐水，1 次/d，连续 14 d。

2.3 行为学检测

观察小鼠行为学改变，包括一过性的震颤、后腿拉直、躬背、竖毛、运动减少。

2.3.1 爬杆实验　参照文献方法[10]，造模前 3 d 各组小鼠进行适应性爬杆实验，末次给药 1 h 后进行小鼠爬杆实验，评价小鼠运动协调能力。选取直径 1.5 cm、高 60 cm 的不锈钢直立杆，纱布缠裹棉球为 15 cm 左右圆球置于杆顶固定，底部金属底座固定。将小鼠头朝上置于爬杆顶部，使其自然顺杆而下，记录小鼠爬向底部时间。

2.3.2 自主活动实验　参照文献方法[11]，末次给药 1 h 后进行自主活动实验。于自制 30 cm×30 cm×15 cm 的有机玻璃盒中，底部刻出 6 cm×6 cm 的格子，在安静、光线较暗的环境中检测，计数 5 min 内小鼠移动的格子数和站立的次数，连续测定 3 次，取平均值。

2.4 样品收集

在行为学检测结束后，ip 舒泰 50（50～75 mg/kg）麻醉小鼠，采用抗凝管取小鼠眼球血，室温静置 1 h，3000 r/min 离心 15 min，取上清转入冻存管内于−80 ℃保存，作为后续谷氨酸含量检测。在完成小鼠眼球取血后，使用精密的手术刀片从正中线分离出小鼠的黑质和纹状体组织，然后用镊子钝性分离，将分离出的黑质和纹状体放入离心管内，经过液氮速冷冻，最后将其放入−80 ℃储存，用于 Western blotting 及 qRT-PCR 检测。

2.5 ELISA 测定外周血清谷氨酸含量

取各组小鼠外周血，按照试剂盒说明书测定谷氨酸含量。

2.6 苏木素-伊红（HE）染色观察脑组织病理变化

取各组小鼠固定后的脑组织，进行石蜡包埋、切片、脱蜡、水化后，用 HE 染色，显微镜下观察脑组织病理变化。

2.7 Western blotting 检测黑质纹状体 TH、DAT、EAAT1、YY1、β-catenin 蛋白表达

取各组小鼠黑质纹状体，采用含蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂蛋白质裂解液处理脑组织提取总蛋白，经 BCA 试剂盒测定蛋白含量，加入上样缓冲液

混合，100 ℃加热 15 min 使蛋白变性。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，用 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h。分别加入一抗，4 ℃孵育过夜，然后加入二抗，室温孵育 2 h，采用化学法发光试剂进行检测，凝胶成像仪显影拍照，Image J 软件进行灰度值分析。

2.8 qRT-PCR 检测黑质纹状体 *TH*、*DAT*、*EAAT1*、*YY1* mRNA 表达

取各组小鼠黑质纹状体，采用 Trizol 法提取脑组织中总 RNA。通过逆转录试剂盒转录合成 cDNA，加入引物，经反转录试剂盒检测采用 PCR 核酸扩增仪进行实验，反应条件：95 ℃预变性 30 s，95 ℃变性 5 s，60 ℃退火 45 s，共 40 个循环，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析，引物序列见表 1。

2.9 统计学分析

使用 Graphpad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析，用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据满足正态分布且方差齐时采用单因素方差分析（ANOVA）；数据不满足正态分布时，则使用非参数检验。

3 结果

3.1 补肾止颤方对帕金森病小鼠行为学的影响

模型小鼠行为上都表现出一定程度的震颤、后腿拉直、躬背、竖毛、运动减少等帕金森病典型表征，说明造模成功。如图 1 所示，与模型组比较，补肾止颤方高剂量组和金刚烷胺组小鼠爬杆时间显著缩短（$P<0.001$），补肾止颤方高剂量组小鼠自主活动步数显著增多（$P<0.001$）。因此，选择补肾止颤方高剂量组进行后续指标观察。

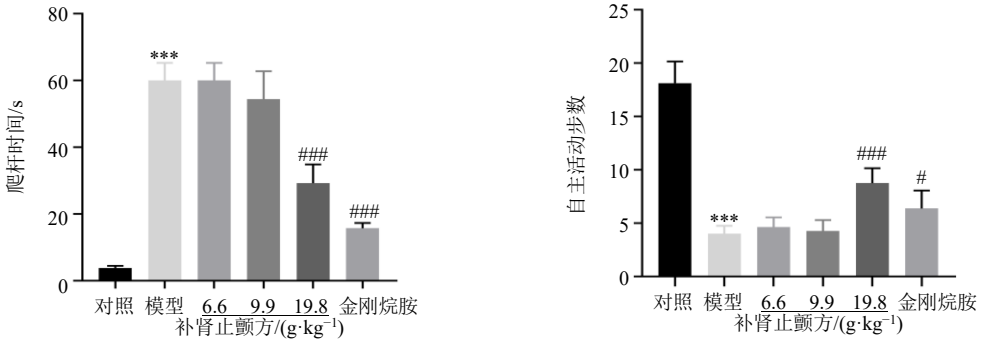
表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5’-3’)
GAPDH	F: AAGAAGGTGGTGAAGACAGG
	R: GAAGGTGGAAGAGTGGGAGT
TH	F: TCTCCTTGAGGGGTACAAAACC
	R: ACCTCGAAGCGCACAAAGT
DAT	F: TTCATGGTTATTGCCGGGATG
	R: TGTAGAAGAAGCCCACGTAGAA
EAAT1	F: ACCAAAAGCAACGGAGAAGAGA
	R: GGCATTCCGAAACAGGTAACTC
YY1	F: GTGGTTGAAGAGCAGATCATTGG
	R: TTGCTTAGGGTCTGAGAGGTC

3.2 补肾止颤方对帕金森病小鼠脑组织病理变化的影响

如图 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠纹状体区域细胞数量减少，排列疏松，胞体轮廓模糊，胞核固缩与空泡变性增多；与模型组比较，金刚烷



与对照组比较：$^{*}P<0.05$ $^{***}P<0.001$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$，下图同

$^{*}P<0.05$ $^{***}P<0.001$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* model group, same as below figures

图 1 补肾止颤方对帕金森病小鼠爬杆时间和自主活动步数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Fig. 1 Effect of Bushen Zhichan Prescription on pole climbing time and autonomic activity steps of mice with Parkinson’s disease ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

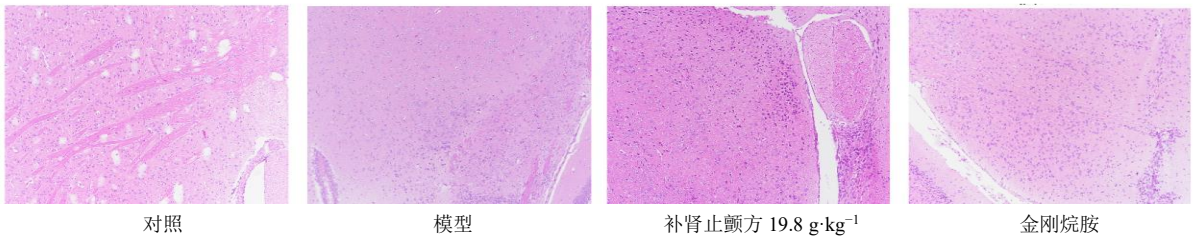


图 2 补肾止颤方对帕金森病小鼠脑组织病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 2 Effect of Bushen Zhichan Prescription on pathological changes in brain tissue of mice with Parkinson’s disease (HE, × 100)

组小鼠纹状体区域细胞状态改善不明显，补肾止颤方高剂量组小鼠纹状体区域细胞整体形态及排列情况得到改善。

3.3　补肾止颤方对帕金森病小鼠黑质纹状体 TH、DAT 蛋白和 mRNA 表达的影响

如图 3 所示，与对照组比较，模型组小鼠黑质纹状体 TH、DAT 蛋白和 mRNA 表达水平均显著降低（P＜0.01、0.001）；与模型组比较，补肾止颤方高剂量组小鼠黑质纹状体 TH、DAT 蛋白和 mRNA 表达水平均显著升高（P＜0.05、0.01、0.001）。

3.4　补肾止颤方对帕金森病小鼠外周血谷氨酸含量的影响

如图 4 所示，与对照组比较，模型组小鼠外周血谷氨酸含量显著增加（P＜0.001）；与模型组比较，补肾止颤方高剂量组外周血谷氨酸含量显著减少（P＜0.001）。

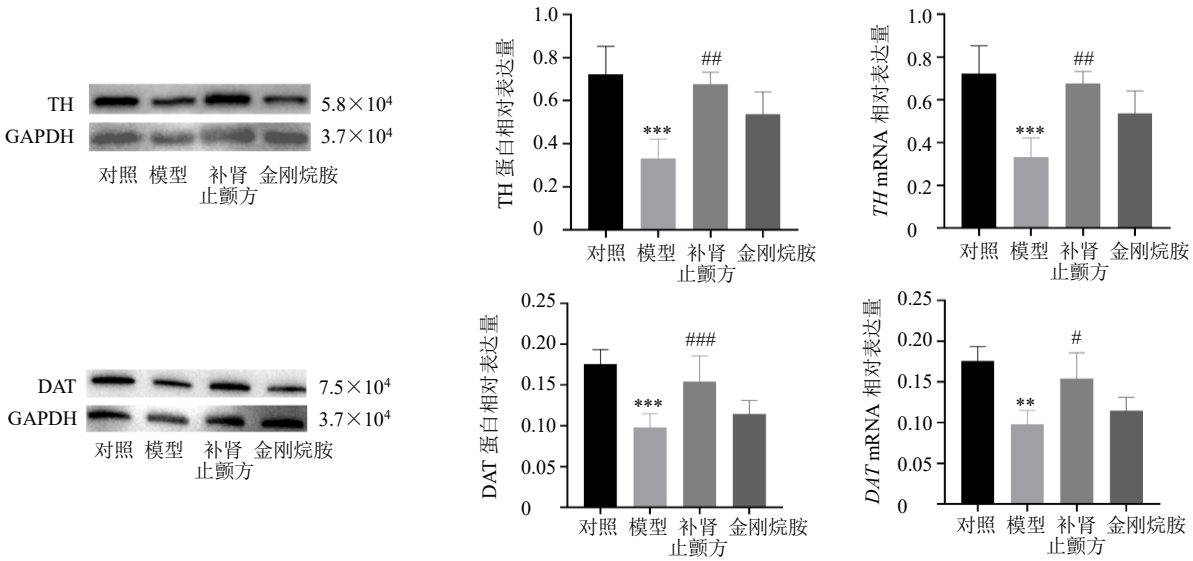


图 3　补肾止颤方对帕金森病小鼠黑质纹状体 TH、DAT 蛋白和 mRNA 表达的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 3）

Fig. 3　Effect of Bushen Zhichan Prescription on TH and DAT protein and mRNA expressions in nigrostriatal tissue of mice with Parkinson's disease ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

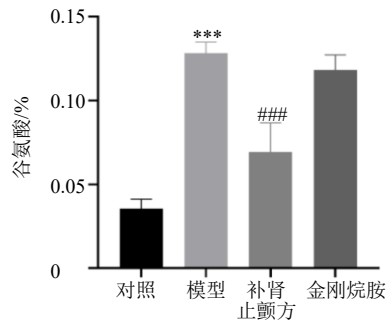


图 4　补肾止颤方对帕金森病小鼠外周血谷氨酸含量的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 3）

Fig. 4　Effect of Bushen Zhichan Prescription on glutamate content in peripheral blood of mice with Parkinson's disease ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

3.5　补肾止颤方对帕金森病小鼠黑质纹状体 EAAT1、YY1、β-catenin 蛋白和 *EAAT1*、*YY1* mRNA 表达的影响

如图 5 所示，与对照组比较，模型组小鼠黑质纹状体 EAAT1 蛋白及 mRNA 表达水平均显著降低（P＜0.001），YY1 蛋白及 mRNA 表达水平均显著升高（P＜0.05、0.001），β-catenin 蛋白表达水平显著降低（P＜0.05）；与模型组比较，补肾止颤方高剂量组黑质纹状体 YY1 蛋白及 mRNA 表达水平均显著降低（P＜0.01、0.001），EAAT1 蛋白及 mRNA 表达水平均显著升高（P＜0.05、0.001），β-catenin 蛋白表达水平显著升高（P＜0.05）。

4　讨论

帕金森病是由遗传、感染、药物、氧化应激等导致多巴胺神经元中多巴胺含量下降或相应受体退行性改变而引起的一种神经元退行性病变[12-13]。目前治疗方法有药物治疗、外科手术、细胞移植及基因治疗等[3]，外科手术如立体定向苍白球或丘脑损毁术创伤较大，代价昂贵，适应对象受限，不是一种理想方法。而细胞移植及基因技术目前还不成熟，主要在实验阶段，因此以多巴胺替代的药物治疗仍是主要方法，虽然短期内可以减轻患者症状，但多巴制剂长期应用后会带来症状波动、运动障碍、精

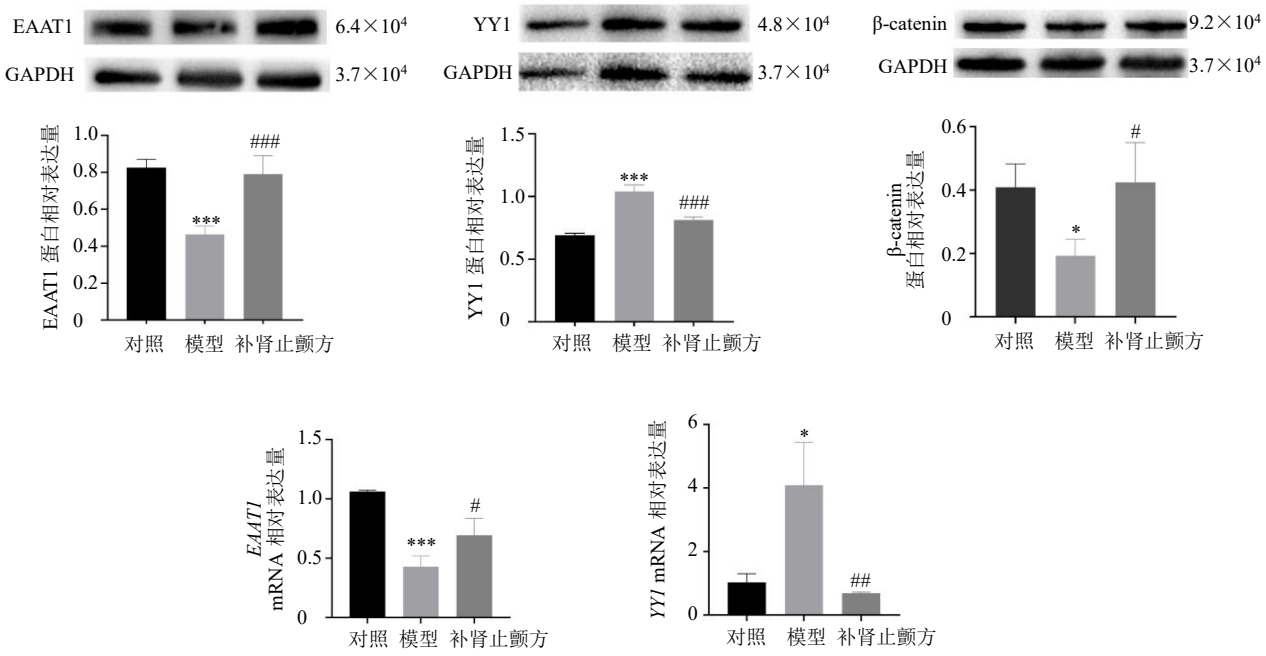


图 5　补肾止颤方对帕金森病小鼠黑质纹状体 EAAT1、YY1、β-catenin 蛋白和 *EAAT1*、*YY1* mRNA 表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 5　Effect of Bushen Zhichan Prescription on EAAT1, YY1, β-catenin proteins and *EAAT1*, *YY1* mRNA expressions in nigrostriatal tissue of mice with Parkinson's disease ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

神症状等多种不良反应，不但疗效减退，也无法延缓疾病进展，因此临床上迫切需要能延缓疾病发展、不良反应小、适宜长期服用的有效药物[14]。

帕金森病属于中医“颤病”范畴，在古籍中关于帕金森病因有诸多记载，如《素问·至真要大论》“诸暴强直，皆属于风”“诸风掉眩，皆属于肝”[15]指出肝风与帕金森病关系密切。明代孙一奎提出“木火上盛，肾阴不充，实为痰火，下虚上实，虚则肾亏”，指出帕金森病的病变可能与肝肾有关[16]。课题组在实践中发现，肝肾亏虚是帕金森病的根本内因，不但震颤等运动症状与肝肾亏虚有关，也是各种非运动症状及运动并发症治疗取效的关键[17-18]，临床荟萃分析的证候研究中发现“肝肾亏虚”是帕金森病最主要的证候[19]。近年来，在帕金森病相关中医专家共识[20-21]中也指出帕金森病以肝肾不足为本，风、痰、瘀等为标。治疗强调滋补肝肾为根本治法，同时结合辨证论治以达到调整脏腑功能及气血阴阳平衡，以及延缓疾病发展。

补肾止颤方来源于经典补肾名方六味地黄丸，由熟地黄、山药、山茱萸、制何首乌、肉苁蓉组成。在六味地黄丸主要药物熟地黄、山药、山茱萸基础上，加肉苁蓉温补肾阳，制何首乌补肝肾，益精血。全方补肾为主，肝肾兼顾；滋阴为主，阴阳并补，能够改善帕金森病患者的运动及非运动症状，显示出一定治疗帕金森病的作用[22]，临床研究发现补肾止颤方有效改善帕金森病非运动症状和生活质量，并可能有延缓帕金森病进展的作用[4-5]。

帕金森病机制复杂且尚未完全清楚，但兴奋性氨基酸的过度活跃是其主要机制之一[23]。谷氨酸作为中枢兴奋性神经递质之一，参与神经元生理功能[24]。过量的谷氨酸使得兴奋性氨基酸受体（excitatory amino acid receptor，EAAR）被持续激活，离子通道开放，大量钙离子内流，导致胞质内钙离子浓度持续增加，使脱氧核糖核酸酶、蛋白酶和磷酯酶等激活，引起 DNA、蛋白质和磷脂降解，最终使神经元变性或坏死[25-26]。EAATs 能将过量的谷氨酸清除，其中 EAAT1 是主要转运体之一，位于星形胶质细胞胞膜上，对维持中枢神经系统中谷氨酸稳态至关重要[24]，但 EAAT1 在翻译和转录水平上受到多种机制的调节，其中转录调控是主要机制之一。本研究发现，与对照组比较，MPTP 诱导的帕金森病小鼠表现出一定程度的震颤、后腿拉直、躬背、竖毛、运动减少等帕金森病表征。同时多巴胺前体物质 TH、DAT 作为多巴胺能神经元的标志物，在模型小

鼠中表达显著增加表明该模型具备帕金森病的临床及病理特征。同时发现，补肾止颤方高剂量组小鼠的自主活动步数显著增多，爬杆时间显著减少，运动迟缓及震颤等帕金森病临床症状得到缓解。表明高剂量的补肾止颤方能显著改善小鼠的行为症状。与模型组比较，补肾止颤方组小鼠纹状体区域细胞形态和数量及排列情况得到改善，TH、DAT 蛋白及 mRNA 表达显著增高，表明该方具有一定的神经保护作用。进一步研究发现，补肾止颤方组谷氨酸水平显著降低，同时 EAAT1 蛋白及 mRNA 表达水平升高，β-catenin 蛋白表达水平升高，YY1 蛋白及 mRNA 表达水平降低，表明补肾止颤方可能通过调控 β-catenin 及 YY1 转录因子，提高 EAAT1 的表达，从而清除过量的谷氨酸，发挥神经保护和治疗帕金森病的作用，但该机制仍需通过进一步的敲减或过表达模型来证实。

综上，以滋补肝肾立方的补肾止颤方初步显示出对帕金森病的治疗作用，其机制可能与抗兴奋性氨基酸毒性有关。帕金森病病机与“风痰瘀虚毒”等有关，肝肾亏虚是根本，风阳化热、痰瘀滞化毒为标。从滋补肝肾入手，有可能为延缓帕金森病的发展，提供一种中医药的治疗方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Lill C M, Klein C. Epidemiologie und ursachen der Parkinson-erkrankung [J]. *Der Nervenarzt*, 2017, 88(4): 345-355.

[2] Qi S G, Yin P, Wang L H, *et al*. Prevalence of Parkinson’s disease: A community-based study in China [J]. *Mov Disord*, 2021, 36(12): 2940-2944.

[3] Fox S H, Katzenschlager R, Lim S Y, *et al*. International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson’s disease [J]. *Mov Disord*, 2018, 33(8): 1248-1266.

[4] 高晗, 蔡丽, 王炜为, 等. 补肾止颤方加减治疗肝肾不足型帕金森病的随机对照研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35(2): 8-11.

[5] 张凌凌, 高晗, 索李慧, 等. 补肾止颤方颗粒治疗肝肾不足型帕金森病的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(2): 256-259.

[6] Li W H, Gao H, Li W T. Effects of combined Bushen Zhichan Recipe and levodopa in a rodent model of Parkinson disease: Potential mechanisms [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e922345.

[7] Bagga P, Pickup S, Crescenzi R, *et al*. *In vivo* GluCEST MRI: Reproducibility, background contribution and source of glutamate changes in the MPTP model of Parkinson’s disease [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 2883.

[8] 阮克锋, 张丹, 洪燕龙, 等. 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 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3456-3462.

[9] Jackson-Lewis V, Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson’s disease [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(1): 141-151.

[10] Meng F H, Wang J H, Ding F X, *et al*. Neuroprotective effect of matrine on MPTP-induced Parkinson’s disease and on Nrf2 expression [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(1): 296-300.

[11] Kawai H, Makino Y, Hirobe M, *et al*. Novel endogenous 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives: Uptake by dopamine transporter and activity to induce Parkinsonism [J]. *J Neurochem*, 2002, 70(2): 745-751.

[12] Beal M F. Experimental models of Parkinson’s disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2(5): 325-332.

[13] Dauer W, Przedborski S. Parkinson’s disease: Mechanisms and models [J]. *Neuron*, 2003, 39(6): 889-909.

[14] 李文涛, 李如奎. 帕金森病中医治疗之管见 [J]. 陕西中医, 2006, 27(3): 315-317.

[15] 李元, 王顺, 白妍, 等. 帕金森病药源性异动症中医治疗研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(4): 68-72.

[16] 王雯, 邱志新, 郑建彪, 等. 芪参还五胶囊治疗气血亏虚型帕金森病的临床效果 [J]. 中国医药导报, 2023, 20(5): 67-70.

[17] 崔笑玉, 李文涛, 李如奎. 中西医结合治疗肝肾阴虚型帕金森病非运动症状 38 例临床研究 [J]. 江苏中医药, 2015, 47(2): 30-31.

[18] 崔笑玉, 李文涛. 李如奎教授帕金森病辨治思路及组方研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(11): 1349-1350.

[19] 顾超, 袁灿兴. 帕金森病的中医证型分布和用药规律探析 [J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(7): 12-14.

[20] 雒晓东, 李哲, 朱美玲, 等. 帕金森病 (颤拘病) 中医临床诊疗专家共识 [J]. 中医杂志, 2021, 62(23): 2109-2116.

[21] 刘振国, 李文涛. 帕金森病运动并发症中西医结合诊治专家共识 (2020) [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2020, 27(4): 247-252.

[22] 薛红, 虢周科, 刘璇. 六味地黄丸对帕金森患者自主神经功能的影响 [J]. 中医学报, 2010, 25(2): 283-285.

[23] Carrillo-Mora P, Silva-Adaya D, Villaseñor-Aguayo K. Glutamate in Parkinson's disease: Role of antiglutamatergic drugs [J]. *Basal Ganglia*, 2013, 3(3): 147-157.

[24] Wang J, Wang F S, Mai D M, *et al*. Molecular mechanisms of glutamate toxicity in Parkinson's disease [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 585584.

[25] Parkin G M, Udawela M, Gibbons A, *et al*. Glutamate transporters, EAAT1 and EAAT2, are potentially important in the pathophysiology and treatment of schizophrenia and affective disorders [J]. *World J Psychiatry*, 2018, 8(2): 51-63.

[26] Iovino L, Tremblay M E, Civiero L. Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 144(3): 151-164.

[责任编辑 李亚楠]