

自拟复方中药对 PD 多巴胺能神经元保护作用的研究

张丽¹, 许康¹, 张允建², 郭建敏¹

【摘要】 目的: 观察一种新型自拟复方中药对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)所致小鼠帕金森病(PD)的预防作用及其作用机制。方法: C57BL/6J 小鼠 80 只随机分为正常对照组(A 组)、中药对照组(B 组)、PD 模型组(C 组)、中药干预组(D 组)各 20 只; 给予 B、D 组中药灌胃, A、C 组给予等量生理盐水灌胃, 30d 后给予 C 和 D 组连续 5 d 腹腔注射 MPTP 造成 PD 模型, A 和 B 组注射等量的生理盐水。干预结束后连续 5 d 内检测行为学变化(爬杆试验、游泳试验)、纹状体 DA 浓度及一氧化氮系统(nNOS 和 iNOS)含量。结果: 造模后第 3~5 天, D 组较 C 组爬杆实验分值明显增高($P < 0.05$); 第 1~5 天, D 组较 C 组游泳实验分值明显增高($P < 0.05, 0.01$)。造模后第 5 天, D 组 DA 浓度明显高于 C 组($P < 0.05$); D 组 iNOS mRNA 表达量明显低于 C 组($P < 0.05$)。结论: 中药自拟方对小鼠 PD 有一定的防治作用, 其机制之一可能是通过调节脑内 iNOS 的表达发挥作用。

【关键词】 帕金森氏病; 自拟复方中药; 一氧化氮; MPTP

【中图分类号】 R49; R742.5 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2012.04.002

Neuroprotective effect of a new formulated traditional Chinese medicine in the MPTP model mice with Parkinson's disease ZHANG Li, XU Kang, ZHANG Yun-jian, et al. Department of Neurology, XinHua Hospital, Wuhan 430015, China

【Abstract】 Objective: To investigate the neuroprotective effect of a new formulated traditional Chinese medicine (FTCM) in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced mouse model of Parkinson's disease (PD). Methods: Eighty C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups: group A (normal control group), group B (FTCM control group), group C (PD group), group D (FTCM plus PD group). Mice in group B and group D were given FTCM by a gavage daily for one month, and those in group A and group C were given equivalent saline. Rats in group C and group D were injected with MPTP 30 mg/(kg·day) daily for 5 days, and those in group A and group B received equivalent saline only. In the consecutive 5 days, behavioral changes, DA in the corpus striatum, nNOS and iNOS were observed. Results: At 3rd to 5th day after the operation, the climb rod test score in group D was significantly higher than in group C ($P < 0.05$), and at 1st to 5th day after the operation, the swim test score in group D was significantly higher than in group C ($P < 0.05, 0.01$). At 5th day after operation, DA in group D was significantly higher than in group C ($P < 0.05$). iNOS mRNA in group D was significantly lower than in group C ($P < 0.05$). Conclusion: FTCM can prevent PD rats from impairment by MPTP to some extent probably by regulating the expression of iNOS in the brain.

【Key words】 Parkinson's disease; formulated traditional Chinese medicine; Nitric oxide; MPTP

帕金森病(Parkinson's disease, PD)又称“震颤麻痹”, 以静止性震颤、运动迟缓、肌张力增高和姿势平衡障碍为典型临床症候群, 目前发病机制尚不完全清楚。本实验拟观察一种新型自拟复方中药对 PD 模型小鼠的影响, 并通过行为学、纹状体多巴胺(Dopamine, DA)含量、一氧化氮(NO)系统的检测, 探讨此药物在 PD 发生发展中的作用。

收稿日期: 2012-02-15

作者单位: 1. 湖北省新华医院神经内科, 武汉 430015; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院, 武汉 430030

作者简介: 张丽(1982-), 女, 住院医师, 主要从事临床神经内科帕金森方面的研究。

通讯作者: 郭建敏, 主治医师。

1 材料和方法

1.1 材料 ①动物: C57BL/6J 小鼠, 8 周龄, 雄性, 体质量 18~22 g, 购于北京维通利华实验动物有限公司。②试剂: MPTP (Sigma 公司); 标准品盐酸多巴胺(L-DOPA) (Switzerland); Bio-rad 蛋白定量试剂盒(美国 Bio-rad 公司); Trizol (Invitrogen 公司); RNA 逆转录试剂盒及 SYBR® 实时定量试剂盒(大连宝生物工程有限公司); 蛋白酶 K(Amersco 公司); PCR 反应引物由上海英骏生物技术有限责任公司合成。

1.2 方法 ①分组: 采用爬杆法训练小鼠, 选取四肢灵活、1 次顺利从杆上爬下的小鼠 80 只随机分为正常

对照组(A组)、中药对照组(B组)、PD模型组(C组)、中药干预组(D组)各20只;②干预:每天给予B、D组每只小鼠0.2ml中药灌胃,A、C组给予等量生理盐水灌胃,连续灌胃30d后给予C及D组连续5d腹腔注射每天每千克体质量30mg MPTP造成PD模型,A组和B组注射等量的生理盐水。实验期间各组小鼠均自由进食饮水。③自拟复方中药:将方药按照每千克体质量含生药为1g的比例熬成浓缩中药,熟地黄、珍珠母各30g,桑寄生、白芍、紫苏叶各20g,甘草、党参、益智仁、知母各15g,龟板、茯神、紫花地丁、生姜各10g,羚羊角、绿豆各5g。

1.3 评定标准 运用爬杆和游泳等动物行为学实验检测其肢体运动协调能力^[1-2],每天测定1次,连续5d。①爬杆试验:参照Arai等^[1]的方法,将一直径为25cm的软木球固定于一根长50cm粗1cm的木杆顶端,木杆上缠上纱布以防打滑,将被测小鼠置于小球上,小鼠头朝上置于杆顶端,开始计时,记录小鼠从小球上下来所需要的时间、小鼠爬完杆子的上半部及下半部所用的时间。记分标准:3s内完成上述某一动作的为3分;6s内完成的为2分;超过6s的为1分。分值越高表示小鼠肢体运动协调能力越好。②游泳实验:参照Donnan等^[2]的方法,将受试小鼠放入一个20cm×30cm×20cm规格的水箱中,水温为22℃~25℃。评分标准如下:在10min能连续不断游泳者记30分;大部分时间游泳仅偶尔漂浮者记25分;漂浮时间占整个受试时间50%以上者记20分;偶尔游泳者记15分;偶尔用后肢游动者并漂浮在一边者记10分。分值越高表示肢体运动协调功能越好,反之则说明小鼠肢体震颤、肌强直等情况越严重。③DA浓度测定:使用高效液相法(HPLC法)测定DA的含量,结果用占对照组的百分比表示。④Real-time PCR检测神经元型一氧化氮合酶(Neuronal nitric oxide synthase,nNOS)及诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase,iNOS)mRNA表达量:取小鼠脑组织,轻轻分离中脑黑质部位,用冰冷的生理盐水冲净表面血迹,滤纸吸干并冻于液氮中。用TIANGEN公司的Trizol RNA试剂盒进行总RNA提取。操作过程严格按照试剂盒说明书进行,每个样品重复3次。引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

基因	5' to 3'	序列
<i>nNOS</i>	forward	GCCTCGAAACCCCCAGGTGC
	reverse	CGGGTCCCGGGAGTAGGCA
<i>iNOS</i>	forward	GCATTGCCCTTCCGAGT
	reverse	GGCTGTCCAGGGAGGCGAGA
β -actin	forward	AGGCAGACTGTTACTGAGCTGC
	reverse	CTCAGGGCATGGACCGCGACC

1.4 统计学方法 采用SPSS 12.0统计学软件进行分析,定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析,LSD法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。其中Real-time PCR结果计算由软件直接得到 C_t 值,然后用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行分析。

2 结果

造模后第1~5天,C组爬杆及游泳实验评分均较A组低,造模后第3~5天,D组较C组爬杆实验评分明显增高,第1~5天,D组较C组游泳实验评分明显增高,各时间点A、B2组间比较差异无统计学意义。造模后第5天,C组DA浓度明显低于A组,iNOS及nNOS mRNA表达量明显高于A组,D组DA浓度明显高于C组,iNOS表达量明显低于C组,2组间nNOS mRNA表达量比较差异无统计学意义,A、B2组间比较,各指标差异均无统计学意义。见表2、3。

表2 小鼠爬杆及游泳实验各时间点4组评分比较 分, $\bar{x} \pm s$

项目	时间	A组	B组	C组	D组
爬杆	1d	6.45±1.25	5.43±1.01	3.42±1.29 ^a	4.12±1.13
	2d	6.74±1.49	6.72±1.13	3.59±1.21 ^a	4.76±1.31
	3d	7.98±1.51	7.35±1.27	3.87±1.42 ^a	5.92±1.43 ^b
	4d	8.05±1.42	4.76±1.31	4.29±1.32 ^a	6.37±1.20 ^b
	5d	8.17±1.34	8.24±1.22	5.03±1.27 ^a	7.96±1.37 ^b
游泳	1d	27.31±4.72	26.77±5.21	15.73±7.12 ^a	25.81±5.01 ^b
	2d	26.76±4.91	27.22±4.93	15.68±7.31 ^a	25.79±4.28 ^b
	3d	27.81±3.60	28.01±3.62	16.00±6.27 ^a	26.06±4.32 ^c
	4d	28.76±2.87	28.23±4.96	16.59±7.01 ^a	27.73±4.91 ^c
	5d	29.82±1.67	28.97±1.83	17.23±7.50 ^a	28.67±3.01 ^c

与A组比较,^a $P < 0.01$;与C组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

表3 4组造模后第5天脑组织组织内DA浓度、iNOS及nNOS mRNA表达比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	DA(%)	iNOS mRNA	nNOS mRNA
A组	20	100	1.04 ± 0.31	1.06 ± 0.19
B组	20	99.77 ± 1.14	0.98 ± 0.12	0.97 ± 0.27
C组	20	49.46 ± 4.24 ^a	11.46 ± 1.24 ^a	2.39 ± 0.64 ^a
D组	20	73.43 ± 4.41 ^b	6.43 ± 0.41 ^b	2.17 ± 0.72

与A组比较,^a $P < 0.05$;与C组比较,^b $P < 0.05$

3 结论

MPTP小鼠模型被认为是PD理想的动物模型。现存治疗PD的药物在取得一定疗效的同时也引起了大量的副作用,对患者的整体健康造成了不良的影响。中医药治疗PD的历史悠久,近年来受到广泛的关注,但运用现代理念和实验方法客观评价中药对PD治疗效应的文章却仍较少。本文采用MPTP法制作小鼠PD模型,依据PD的中毒学说,给予一种新型自拟复方中药干预,在传统方剂中加入了具有良好解毒功效的紫苏叶、紫花地丁、绿豆及生姜。评价该种新型配伍

配方中药对 PD 的治疗作用,发现该种配方中药对 PD 具有较好的预防效果,这将为开发新型抗 PD 药物奠定理论基础。

研究发现 MPTP 模型小鼠黑质致密部 iNOS mRNA 表达水平明显增高,且 PD 患者黑质区也可见 iNOS 大量表达^[3-4],而当 MPTP 模型小鼠缺乏 iNOS 及 nNOS 时,MPTP 所致的脑神经元损伤情况减轻^[5-6]。这提示 iNOS 在 PD 的发生发展过程中扮演了重要的作用。NO 是神经系统中重要的细胞间信号分子。催化 NO 合成的酶 NOS,包括 3 个亚型:nNOS、iNOS 和内皮型(Constitutive nitric oxide synthase, eNOS)^[7]。正常情况下,nNOS 产生的 NO 可作为神经递质、神经调节物质和细胞内信号分子^[8],而 iNOS 则含量很低。然而在应激和刺激物存在的情况下,iNOS 被诱导产生高浓度的 NO 进而导致细胞及神经元的损伤^[9]。iNOS 选择性抑制剂能够明显减少 PD 模型动物黑质区 DA 能神经元的丢失并起到良好的神经保护作用^[10]。本实验 PD 小鼠黑质区 iNOS mRNA 表达水平升高,与以往的研究相一致,而中药干预后小鼠黑质区 iNOS mRNA 表达水平大幅下降,提示中药预防性改善 PD 的功能可能与其调节 iNOS 的表达平衡有关。

总之,本研究结果显示该新型自拟配方中药对治疗 PD 小鼠有显著的疗效,能够一定程度地改善黑质内多巴胺含量的减少,同时能够有效降低 iNOS 的表达,改善 iNOS 所介导的细胞神经毒性反应,保护多巴胺神经元的功能,而对正常小鼠的行为学无明显作用,这可能是其预防 PD 的发生发展的可能机制之一。此研究对新药的开发和 PD 的防治有着重要的意义,也为传统中药应用于人群研究提供了理论依据。

【参考文献】

- [1] Arai N, Misugi K, Goshima Y, et al. Evaluation of a 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-

- treated C57 black mouse model for parkinsonism [J]. Brain Res, 1990, 515(1-2): 57-63.
- [2] Donnan GA, Willis GL, Kaczmarczyk S J, et al. Motor function in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mouse [J]. J Neurol Sci, 1987, 77 (2-3): 185-191.
- [3] Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, et al. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease [J]. Nat Med, 1999, 5(12): 1403-1409.
- [4] Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, et al. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(10): 4565-4571.
- [5] Dehmer T, Lindenau J, Haid S, et al. Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo [J]. J Neurochem, 2000, 74(5): 2213-2216.
- [6] Dehmer T, Heneka MT, Sastre M, et al. Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I kappa B alpha induction and block of NF kappa B and iNOS activation [J]. J Neurochem, 2004, 88 (2): 494-501.
- [7] Moncada S, Bolanos JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration [J]. J Neurochem, 2006, 97(6): 1676-1689.
- [8] Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity [J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8(10): 766-775.
- [9] Guix FX, Uribe-Salguero P, Coma M, et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain [J]. Prog Neurobiol, 2005, 76(2): 126-152.
- [10] Arimoto T, Bing G. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration [J]. Neurobiol Dis, 2003, 12(1): 35-45.

作者·读者·编者

参考文献著录格式

参考文献:文稿中有关引用资料以近期出版的期刊及著作为主,应用的资料必需是正式发行的出版物,按在文稿中首次出现的顺序编码,并用方括号标注如“曾敏等^[1]报道”。参考文献著录格式应将作者的前 1~3 名列出,3 名后加等。①著作:作者. 书名[M]. 出版地:出版社,年,起止页码. ②期刊:作者. 文稿题[J]. 期刊名,年,卷(期):起止页码。