

牵正散提取物对帕金森病模型小鼠震颤、运动障碍、黑质神经元超微结构的影响

李晓秀, 王俊平, 汲坤, 王春胜, 董旭, 黄梦娇, 叶梦, 王晓东, 刘波*
(沈阳医学院基础医学院, 沈阳 110034)

[摘要] **目的:**建立3种帕金森病小鼠模型,观察牵正散提取物对小鼠行为学影响,初步探讨其作用机制。**方法:**①昆明小鼠随机分组,设立模型组,牵正散低、高剂量组(1.7,5.0 g·kg⁻¹),阳性药组(盐酸苯海索,3.35 mg·kg⁻¹)。各治疗组小鼠连续ig给药4 d。末次给药后1 h,各组ip给予氢溴酸槟榔碱(25 mg·kg⁻¹)或氧化震颤素(0.15 mg·kg⁻¹)。记录各组小鼠震颤潜伏期和震颤持续时间。②C57BL/6小鼠随机分组,设立正常组,模型组,牵正散低、高剂量组剂量组(1.7,5.0 g·kg⁻¹),阳性药组(美多芭,50 mg·kg⁻¹)。除正常组,各组小鼠ip给予1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP,30 mg·kg⁻¹),连续5 d。第6天开始治疗组ig给予牵正散提取物和美多芭,连续7 d,末次给药后检测小鼠行为学变化,电镜观察黑质神经元结构变化。**结果:**①小鼠ip槟榔碱或氧化震颤素后出现明显震颤,与模型组比较,牵正散提取物高剂量组震颤潜伏期显著延长($P < 0.05$),低、高剂量组震颤持续时间均显著缩短($P < 0.01$)。②与模型组比较,小鼠ip MPTP后出现明显运动障碍,黑质神经元超微结构明显损伤,经牵正散提取物处理后,小鼠自主活动次数增加、转棒潜伏期延长、爬杆时间缩短($P < 0.05$),黑质神经元线粒体等结构损伤程度减轻。**结论:**牵正散提取物显著抑制帕金森病模型小鼠震颤、改善运动障碍,其作用机制可能与减轻线粒体损伤、保护神经元有关。

[关键词] 牵正散; 帕金森病; 氢溴酸槟榔碱; 氧化震颤素; 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0130-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210130

Effect of Qianzheng San Extract on Parkinsonian Tremor, Motor Dysfunction and Ultrastructure of DAergic Neurons in Mice LI Xiao-xiu, WANG Jun-ping, JI Kun, WANG Chun-sheng, DONG Xu, HUANG Meng-jiao, YE Meng, WANG Xiao-dong, LIU Bo* (Basic Medical Department, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China)

[Abstract] **Objective:** To establish three types of parkinsonian mice models, observe the effect of Qianzheng San extract on mice behavior and explore possible mechanisms of its actions. **Method:** ①The Kunming mice were randomly divided into four groups: model group, Qianzheng San low dose group and high dose group (1.7, 5.0 g·kg⁻¹), positive drug group (benzhexol hydrochloride, 3.35 mg·kg⁻¹). The mice in the treatment groups received the corresponding medicines by intragastric administration for 4 days. 1 hour after the last administration, all mice were injected with arecoline hydrobromide (25 mg·kg⁻¹) or oxtremorine (0.15 mg·kg⁻¹). The incubation period and duration time of tremor were recorded. ②C57BL/6 mice were randomly divided into five groups: normal group, model group, Qianzheng San low dose group and high dose group (1.7, 5.0 g·kg⁻¹), positive drug group (madopar, 50 mg·kg⁻¹). All mice except normal group were injected with 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP, 30 mg·kg⁻¹) for 5 consecutive days. From 6th day, the mice in treatment group received Qianzheng San extract or madopar by intragastric administration for 7 days. After the last treatment, behavior changes of the mice were detected and ultrastructure changes of substantia nigra neurons were observed by electron microscope. **Result:** ①After injection of arecoline hydrobromide or oxtremorine, the

[收稿日期] 20150322(008)

[基金项目] 辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2012371);沈阳医学院优秀人才启动基金项目(20123047);沈阳医学院大学生科研项目(20139026)

[第一作者] 李晓秀,博士,讲师,从事新药发现的药理学研究,Tel:024-62215689,E-mail:sylxiaoxiu@163.com

[通讯作者] *刘波,博士,讲师,从事天然药物化学研究,Tel:024-62215711,E-mail:liubopaul@163.com

mice exhibited obvious tremor. Compared with the model group, Qianzheng San extract high-dose group significantly prolonged the incubation period of tremor ($P < 0.05$), and Qianzheng San low dose group and high dose group significantly shortened the duration time of tremor ($P < 0.01$). ②Compared with the model group, the MPTP-treated mice displayed a significant decrease in spontaneous motor activity and ultrastructure of substantia nigra neuron was obviously damaged. However, Qianzheng San extract treatment significantly increased autonomic activities, prolonged incubation period and shortened the pole-climbing time ($P < 0.05$), and reduced the damage of ultrastructure of substantia nigra neurons. **Conclusion:** Qianzheng San extract could effectively suppress tremor and improve motor dysfunction in PD mice models, whose mechanism may be associated with reducing mitochondrial damages and protecting neurons.

[**Key words**] Qianzheng San; Parkinson's disease; arecoline hydrobromide; oxotremorine; 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine

帕金森病(Parkinson's disease, PD)又称“震颤麻痹”,是一种常见于中老年人的中枢神经系统退行性疾病,具有典型的临床症状,包括静止性震颤、肌肉强直、运动迟缓、姿势平衡障碍等。据世界卫生组织(WHO)统计,全球现有PD患者400余万,50岁以上人群PD发病率为1%~2%。迄今,医学界尚没有治愈PD的方法,现有治疗药物仅可以缓解症状。^[1]。研制新型抗PD药物用于缓解症状、阻止病情发展、治疗疾病十分必要。牵正散方出《杨氏家藏方》,由白附子、僵蚕、全蝎3味药组成,具有补气活血、祛风化痰、去瘀通络的功效。本实验建立了3种PD小鼠模型,考察了牵正散提取物对帕金森病模型小鼠的行为学影响,初步探讨了其作用机制,为将牵正散开发为疗效确切、机制清楚的现代中药复方提供了实验基础。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠80只,雌雄各半,体重18~22g,由沈阳医学院动物实验中心提供,合格证号SCXK(辽)2010-0001。C57BL/6小鼠60只,雄性,体重18~22g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2012-0001。

1.2 药物及试剂 牵正散组方,包括白附子、僵蚕、全蝎(去毒)均购自北京同仁堂药店,盐酸苯海索(常州康普药业有限公司,批号1209002),氢溴酸槟榔碱(arecoline hydrobromide,北京百灵威科技有限公司,批号LV10N03),氧化震颤素(oxotremorine),1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)(批号分别为33M4724V,037K1403),均购自美国Sigma公司,美多芭(上海罗氏制药公司,批号SH1058),所用试剂均为市售分析级。

1.3 仪器 ZIL-2型自主活动监测装置,DXP-2型旋转系统(中国医学科学院药物研究所研制),

H-6000型透射电子显微镜(日本Hitachi公司)。

2 方法

2.1 牵正散醇提取物的制备 将用于测定的样品在35℃的烘箱中烘干,粉碎机粉碎,置于干燥器中备用。精密称取白附子、僵蚕、全蝎(去毒)各30g置于索氏提取器中,以乙醇为溶剂回流提取90℃水浴加热5h,减压旋转蒸馏回收溶剂。

2.2 氢溴酸槟榔碱/氧化震颤素致小鼠震颤模型建立和分组 小鼠随机分为4组,每组10只,分别为模型组,牵正散提取物低剂量组($1.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),高剂量组($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),盐酸苯海索组($3.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。适应环境1周后,给药组小鼠每天ig给予牵正散提取物和盐酸苯海索,模型组小鼠ig给予相应量的生理盐水,连续4d。末次给药1h后,各组小鼠腹腔注射氢溴酸槟榔碱($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)或氧化震颤素($0.15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。记录小鼠ip后到出现肌肉震颤的时间(潜伏期)、肌肉震颤开始到肌肉震颤结束的时间(持续时间)。

2.3 MPTP 帕金森病小鼠模型的建立和分组 C57BL/6小鼠随机分为5组,每组12只,分别为正常组,MPTP模型组,牵正散提取物低剂量组($1.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),高剂量组($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)和美多芭阳性组($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。适应环境1周后,小鼠ip MPTP($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),正常组给予相应剂量的生理盐水,连续5d。第6天开始ig给予牵正散提取物和美多芭,正常组和MPTP模型组给予相应剂量的蒸馏水,连续7d。在给予MPTP后观察小鼠的各种急性表现,末次给药后进行行为学指标测试。

2.4 小鼠自主活动实验 使用ZIL-2型小鼠自主活动仪测定小鼠自主活动并计数,将小鼠放入自主活动箱中(高13cm,直径25cm,每次同时测定4只小鼠,每个活动箱中1只),由记录仪自动记录小鼠

活动,测定前每只小鼠自由活动 3 min,然后测定每只小鼠 5 min 内的活动次数。

2.5 小鼠爬杆实验^[2] 将一直径为 2.5 cm 的软木小球固定于一根长 50 cm 直径 1 cm 的木杆顶端,木杆上缠以纱布以防打滑,作为实验爬杆。测试前连续训练 3 d,每天 2 次,引导小鼠从杆顶爬至杆底。正式测试时,持小鼠尾部,将其头向下置于杆顶部(以小鼠双后肢置于球上为准),让其自然爬下,记录小鼠自杆顶至双前肢接触杆底平台所需时间,超过 60 s 记为 60 s。每只小鼠测 3 次,取平均值。

2.6 小鼠转棒实验^[3] 使用 DXP-2 型小鼠转棒仪测试小鼠的转棒行为表现。测试前连续训练 3 d,每天 2 次。将小鼠置于转棒上,转速为 16 r·min⁻¹,测试小鼠从转棒开始旋转到离开转棒的时间(转棒潜伏期),测试时间 180 s,超过 180 s 记为 180 s,每只小鼠测 3 次,取平均值。

2.7 免疫组织化学染色 将脑片用 PBST 振荡漂洗,3%的 H₂O₂ 处理,PBST 振荡漂洗,封闭液孵育 1 h,加入 TH 抗体(1:500) 4 ℃孵育过夜。PBST 振荡漂洗,加入生物素标记的二抗(1:300)室温孵育 1 h。PBST 振荡漂洗、加入卵白素-生物素复合物(ABC)室温孵育 2 h。PBST 振荡漂洗,DAB 显色,镜下观察,适时用 PBS 终止反应。免疫组化对照组不加一抗,用 PBS 代替,其余步骤同前。贴片、晾干、乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片、光镜下观察并摄片。免疫组化切片采用 IPP5.1 图像分析系统进行图像分析,每只小鼠选取 4 张切片,分别累计左侧和右侧黑质的免疫反应阳性神经元数目并计算其均数。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用单因素方差分析统计实验结果,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对槟榔碱致小鼠震颤模型的影响 与模型组比较,盐酸苯海索组震颤潜伏期显著延长、震颤持续时间显著缩短($P < 0.01$);与模型组比较,牵正散提取物高剂量组震颤潜伏期显著延长($P < 0.05$),低剂量组和高剂量组的震颤持续时间均显著缩短($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对氧化震颤素致小鼠震颤模型的影响 与模型组比较,盐酸苯海索组显著延长震颤潜伏期、同时显著缩短震颤持续时间($P < 0.01$)。与模型组比较,牵正散提取物低、高剂量组震颤潜伏期均显著延长($P < 0.01$),震颤持续时间均显著缩短($P <$

表 1 牵正散提取物对氢溴酸槟榔碱致小鼠震颤的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effects of Qianzheng San extract on parkinsonian tremor induced by arecoline hydrobromide in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	潜伏期/s	持续时间/s
模型	-	75.00 ± 19.00	665.20 ± 141.39
牵正散	1.7	83.90 ± 16.79	449.67 ± 108.84 ²⁾
	5	105.30 ± 27.56 ¹⁾	341.50 ± 110.95 ²⁾
盐酸苯海索	0.003 35	107.20 ± 28.86 ²⁾	465.50 ± 122.93 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

0.01)。见表 2。

表 2 牵正散提取物对氧化震颤素致小鼠震颤的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of Qianzheng San extract on parkinsonian tremor induced by oxotremorine in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	潜伏期/min	持续时间/min
模型	-	2.50 ± 0.53	28.30 ± 3.47
牵正散	1.7	3.30 ± 0.48 ²⁾	16.20 ± 1.69 ²⁾
	5	4.00 ± 0.82 ²⁾	11.50 ± 1.58 ²⁾
盐酸苯海索	0.003 35	5.60 ± 1.17 ²⁾	13.40 ± 2.46 ²⁾

3.3 对 MPTP 致 PD 模型小鼠一般行为学影响 小鼠腹腔注射 MPTP 后 3 ~ 5 min 开始,出现震颤、运动减少、弓背、后肢张开、步态不稳、竖尾、竖毛等表现,个别出现癫痫样发作,其持续时间一般为 2 ~ 3 h。牵正散提取物组和美多芭组小鼠症状表现较轻,持续时间较短。

3.4 对 MPTP 致 PD 模型小鼠自主活动,爬杆时间及转棒行为的影响 自主活动次数反应小鼠的随意运动能力。与正常组比较,MPTP 模型组小鼠测试时间内的自主活动次数转棒行为显著下降,小鼠爬杆时间明显延长($P < 0.01$)。与模型组比较,牵正散提取物高剂量组和美多芭组均可显著增加小鼠自主活动次数及转棒行为可明显缩短爬杆时间($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 牵正散提取物对 MPTP 致 PD 模型小鼠行为学的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

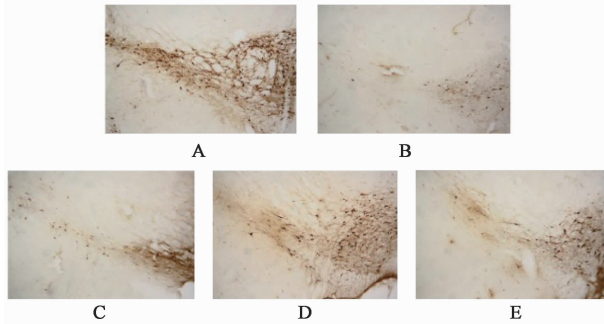
Table 3 Effects of Qianzheng San extract on parkinsonian behavior induced by MPTP in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	自主活动次数/次	爬杆时间/s	转棒潜伏期/s
正常	-	168.32 ± 30.90	11.30 ± 6.98	158.76 ± 23.27
模型	-	109.25 ± 52.42 ¹⁾	22.20 ± 9.81 ¹⁾	88.02 ± 47.16 ¹⁾
牵正散	1.7	126.90 ± 45.43	15.07 ± 5.78 ²⁾	126.25 ± 28.12 ²⁾
	5	152.45 ± 28.74 ²⁾	14.32 ± 5.40 ²⁾	135.3 ± 34.38 ²⁾
美多芭	0.05	145.96 ± 30.61 ²⁾	13.34 ± 6.28 ²⁾	141.57 ± 39.79 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

3.5 对 MPTP 致 PD 模型小鼠脑黑质 DA 能神经元

数目的影响 TH 是多巴胺合成代谢中的限速酶,也是多巴胺能神经元特异性的标志物。正常组小鼠黑质中,TH 免疫阳性神经元清晰可见,多巴胺神经元的胞体和纤维染色较深,有明显可见的免疫阳性突起。与正常组相比,模型组小鼠损黑质 TH 免疫阳性神经元显著减少。与模型组比较,牵正散提取物高、低剂量组和美多芭组黑质神经元病变有不同程度的减轻。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 牵正散提取物 $1.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;D. 牵正散提取物 $5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;E. 美多芭 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组

图 1 牵正散提取物对 MPTP 致 PD 模型小鼠脑黑质 DA 能神经元的影响(免疫组化, $\times 200$)

Fig.1 Effects of Qianzheng San extract on changes of dopaminergic neurons in substantia nigra of MPTP-induced PD mice (ICH, $\times 200$)

4 讨论

静止性震颤通常是 PD 出现最早、也是最典型的症状。本研究采用 M 受体激动剂槟榔碱和氧化震颤素诱发小鼠肌肉震颤,建立了两种 PD 震颤小鼠模型。

肌肉强直、运动迟缓、姿势平衡障碍是常见的 PD 症状,属于运动功能障碍。MPTP 是线粒体呼吸链复合物 I 的抑制剂,能够选择性损伤黑质致密部多巴胺能神经元,产生线粒体功能障碍和氧化应激反应等,使小鼠表现出与帕金森病相似的临床症状和病理变化^[4]。北京中医药大学 2010 年报道了牵正散提取物改善 MPTP 诱导 PD 小鼠爬杆行为学变化、抑制黑质多巴胺神经元缺失、提高受损线粒体酶活性等作用^[5-6]。本研究选用自主活动实验、爬杆实验和转棒实验,综合评价牵正散提取物对 MPTP 诱导 PD 小鼠运动障碍的影响。结果显示,MPTP 模型组小鼠随意运动减少、兴奋度下降,表现为自主活动次数减少;同时,模型组小鼠运动协调性下降,表现为爬杆时间延长,转棒实验中在滚轴上停留的时间缩短。与模型组比较,牵正散提取物组小鼠自主活动次数增加、爬杆时间缩短、转棒潜伏期延长,差异具有显著性,表明牵正散提取物明显改善 PD 小鼠运动障碍。电镜结果

显示,牵正散提取物明显改善黑质神经元超微结构,线粒体损伤程度减轻,提示牵正散提取物可能通过改善线粒体功能发挥神经保护作用。

中医学对 PD 的病因病机的基本认识来源于《黄帝内经》。《素问·至真要大论》所列症状“强直”、“掉”、“收引”与本病临床表现的肌肉强直、肢体震颤和关节拘挛三大主症相似^[7]。

中医将 PD 归属颤证,证属本虚标实,本虚为气血亏虚,肝肾不足;标实为内风、瘀血、痰热,蕴塞脑窍^[9],临床治疗以祛风化痰止痉和滋阴降火潜阳为重要法则。牵正散,方出《杨氏家藏方》,由白附子、僵蚕、全蝎 3 味药组成。分析牵正散组方发现,白附子善于去头面之风,僵蚕能够化痰散结,祛络中之风,全蝎为祛风止搐要药,全方配伍应用,主治素体气虚、兼挟风痰、瘀滞经脉,恰符合中医对 PD 的治疗法则。

综上所述,本研究建立了 3 种 PD 小鼠模型,考察了牵正散总提取物对 PD 小鼠震颤、运动障碍行为学的影响,研究表明牵正散提取物显著改善 PD 异常行为学变化,可能与其减轻线粒体损伤、保护神经元有关,其确切的作用机制和有效成分尚不明确,有待日后进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Pahwa R, Lyons K E. Treatment of early Parkinson's disease[J]. Curr Opin Neurol, 2014, 27(4):442-449.
- [2] Ogawa N, Hirose Y, Ohara S, et al. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice[J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1985, 50(3):435-441.
- [3] Rozas G, Lopez-Martin E, Guerra M J, et al. The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism[J]. J Neurosci Methods, 1998, 83(2):165-175.
- [4] Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability[J]. Front Neuroanat, 2014, 15(8):155.
- [5] 和欣,孙红梅,吴海霞,等. 大补阴丸牵正散及合方对 MPTP 诱导帕金森小鼠的神经保护作用[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(11):2098-2101.
- [6] 和欣,高誉珊,孙红梅,等. 大补阴丸、牵正散及合方对帕金森小鼠脑线粒体酶复合物活性作用的实验研究[J]. 江苏中医药,2010,42(9):72-73.
- [7] 王文武,何建成. 帕金森病的中医文献研究[J]. 新中医,2008,40(1):118-120.
- [8] 胡方波. 中医治疗帕金森病进展[J]. 实用中医药杂志,2010,26(5):350-351.

[责任编辑 周冰冰]