

拜颤停复方对帕金森病小鼠模型氧化应激反应的影响

任燕冬^{1,2}, 井月娥¹, 张淑香¹, 王洪玉¹, 卢芳¹, 刘树民^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江佳木斯 154007)

[摘要] 目的:通过研究拜颤停复方(BCT)对1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)致小鼠帕金森病(PD)模型神经行为学、纹状体多巴胺(DA)含量、氧化应激反应的影响,探讨BCT对PD模型神经保护作用的可能作用机制。方法:雄性C57BL/6小鼠,MPTP-HCl(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹,ip,0.9%生理盐水溶解)5 d,造成PD小鼠模型;设立正常组、模型组、多巴丝肼组(62.50 mg·kg⁻¹·d⁻¹)及BCT高、中、低剂量组(363.00,181.50,95.75 mg·kg⁻¹·d⁻¹),各给药组均用0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶解;BCT高、中、低剂量组ig给药治疗20 d后,进行爬杆实验和自主活动实验以观察小鼠行为学的变化;采用UPLC-MS-MS三重四级杆串联质谱技术检测小鼠纹状体多巴胺(DA)的含量;化学比色法检测小鼠黑质(SN)部位超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及单胺氧化酶B(MAO-B)。结果:与正常组比较,模型组小鼠爬杆时间显著延长($P < 0.05$),自主活动次数显著减少($P < 0.05$),纹状体DA含量、SOD及GSH-Px水平显著降低($P < 0.01$),MDA及MAO-B水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,经过BCT治疗,PD小鼠的神经行为学得到显著改善($P < 0.05$),纹状体DA含量,SOD及GSH-Px水平显著升高($P < 0.01, P < 0.05$),MDA及MAO-B水平显著降低($P < 0.01$)。结论:BCT可以通过提高机体的抗氧化和清除自由基能力,明显改善PD小鼠的神经行为学变化及纹状体DA的含量,是其对PD模型神经保护作用的可能机制。

[关键词] 拜颤停; 帕金森病; 氧化应激; 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)22-0154-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220154

Effect of Baichanting Compound on Oxidative Stress Responses in Mice Model of Parkinson's Disease

REN Yan-dong^{1,2}, JING Yue-e¹, ZHANG Shu-xiang¹, WANG Hong-yu¹, LU Fang¹, LIU Shu-min^{1*}
(1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Haerbin 150040, China; 2. Department of Jiamusi, Heilongjiang University of TCM, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Baichanting compound (BCT) on neuroethology, oxidative stress response, and dopamine (DA) content in mice with Parkinson's disease (PD) induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), and discuss the possible mechanism of BCT's neuroprotection effect in PD models. **Method:** Male C57BL/6 mice were processed with MPTP-HCl (30 mg·kg⁻¹·d⁻¹, ip, 0.9% normal saline solution) for 5 days to establish PD mice models; the mice were randomly divided into normal group, model group, levodopa and benserazide tablets group (62.50 mg·kg⁻¹·d⁻¹), BCT high-dose, middle-dose and low-dose groups (363.00, 181.50, 95.75 mg·kg⁻¹·d⁻¹). All treatment groups were dissolved with 0.5% carboxyl methyl cellulose (CMC-Na); BCT compound was ig given once daily for 20 days. The pole and independent activity experiments were done to observe the mice behavior change. The content of DA in corpus striatum was detected by UPLC-MS-MS method. Superoxide dismutase (SOD), glutathione-peroxidase (GSH-Px), monoamine oxidase-B (MAO-B), and malondialdehyde (MDA) levels in midbrain substantia nigra tissues were detected by chemical colorimetry method. **Result:** Compared with the normal group, pole climbing time was significantly longer in model group ($P < 0.05$), autonomic activity significantly reduced ($P < 0.05$), content of DA in corpus striatum, SOD and GSH-Px levels significantly reduced ($P < 0.01$), MDA and MAO-B

[收稿日期] 20150324(007)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81303249);黑龙江省博士后基金项目(LBH-Z11017)

[第一作者] 任燕冬,在读博士,讲师,从事中药药理研究,E-mail:renyandong@163.com

[通讯作者] *刘树民,博士,教授,博士生导师,从事中药药性理论研究,E-mail:keji-liu@163.com

levels significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, neural behavior was improved significantly ($P < 0.05$), the content of DA in corpus striatum, the activity of SOD and GSH-Px were increased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.01$), and MDA and MAO-B levels were significantly reduced ($P < 0.01$) in PD model mice after the treatment of BCT. **Conclusion:** BCT can significantly improve neurobehavioral change and the content of striatal DA in PD mice by improving the body's ability to resist oxidation and scavenging free radicals. It is the possible mechanism of neuroprotective potential for BCT in PD model.

[Key words] Baichantang; Parkinson's disease; oxidative stress; 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine

帕金森病(PD)是以震颤、肌强直、运动减少和姿势异常为特征的慢性神经系统变性疾病,多发生于中老年人。病理上以选择性中脑黑质多巴胺(DA)能神经元丧失、纹状体多巴胺含量显著减少为其特点。近年来研究表明,氧化应激在DA能神经元变性中起重要作用,正常情况下,体内抗氧化系统与氧化系统存在平衡,体内自由基能被及时清除,而PD患者处于氧化应激状态,氧化应激反应是帕金森病重要的发病机制之一^[1-2]。拜颤停复方(BCT)是本实验室由临床治疗PD的经验方复元平颤宁精制而成,为刺五加、白芍及钩藤的有效提取部位组合而成的组分中药,前期研究结果表明其对PD具有很好的疗效^[3-4]。本文通过观察BCT对PD小鼠模型神经行为学、纹状体DA含量、氧化应激反应的影响,进一步揭示BCT对PD小鼠氧化应激反应的神经保护作用机制。

1 材料

1.1 药物 拜颤停复方[由刺五加有效部位(刺五加药材用80%乙醇回流提取,浓缩后经大孔树脂分离纯化,收集30%乙醇洗脱部位,浓缩后冷冻干燥)648 mg,白芍有效部位(白芍药材用乙醇回流提取,浓缩后经大孔树脂分离纯化,收集70%乙醇洗脱部位,浓缩干燥)540 mg,钩藤有效部位(钩藤药材用乙醇提取,浓缩后经大孔树脂分离纯化,收集75%乙醇洗脱部位,浓缩干燥)990 mg]提取物溶于120 mL 0.5% CMC-Na水溶液中制成;多巴丝肼片(上海罗氏制药有限公司,国药准字H10930198)。

1.2 试剂 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(MPTP,美国Sigma公司,批号MKBQ8635V),盐酸DA(阿拉丁公司,批号32321),超氧化物歧化酶(SOD,批号20141208),丙二醛(MDA,批号20141208),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px,批号20141209),单胺氧化酶(MAO,批号20150115)试剂盒,均为南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 ZZ-6型小鼠自主活动仪(成都泰盟科

技术有限公司),UV-2450型紫外分光光度计(日本岛津公司),KDC-160HR型高速冷冻离心机(科大创新公司),ACQUITY UPLC Quattro Micro型三重四级杆串联质谱仪(美国Waters公司)。

1.4 动物 雄性C57BL/6小鼠,(20 ± 2) g北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2012-0001。

2 方法

2.1 模型制备 将小鼠适应性喂养1周,MPTP-HCl $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续ip 5 d,造成PD模型,正常组ip等量的生理盐水。

2.2 分组与给药 小鼠,随机分为6组,每组10只,分别为正常组、模型组、多巴丝肼组($62.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)及BCT高、中、低剂量组(363.00 , 181.50 , $95.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),各给药组均用0.5% CMC-Na溶解。造模后第6天各给药组药物开始ig给药,模型组和正常组给予等量的0.5% CMC-Na,连续给药20 d。

2.3 神经行为学的观察 于给药20 d后对小鼠进行爬杆实验和自主活动实验的测试。

2.3.1 爬杆实验 将一直径为2 cm的泡沫塑料小球固定于一根长50 cm粗1 cm的缠有胶布的木杆顶端。持小鼠尾部将其头向下置于杆顶,以小鼠双后肢置于球上为准,让其自然爬下,小鼠自站于杆顶至双前肢接触杆底平台为爬完全长,记录爬杆时间。

2.3.2 自主活动 该实验用于测定小鼠的自发运动变化,将小鼠置于自主活动计数仪内,保持环境安静,预适应2 min后,记录小鼠5 min内自发运动次数,包括直立运动和水平运动的次数的总和。

2.4 纹状体DA含量的检测

2.4.1 脑组织的采集与处理 断头取脑,于冰上剥离纹状体,称重,液氮保存。用时取出,加入1 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高氯酸制备匀浆, $15\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心15 min,取上清液,过 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜,待测。

2.4.2 色谱条件 色谱柱 ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ 柱 (50 mm × 2.1 mm × 1.7 μm, Waters Corp, Milford, USA), 柱温 26 °C, 流速 0.2 mL·min⁻¹, 流动相 0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水 7:93, 进样量 5 μL。

2.4.3 质谱条件 电喷雾电离正离子源 (ESI⁺) 多反应监测 (MRM) 模式, 质荷比 (*m/z*) 154.00 ~ 137.00, 毛细管电离电压 3.0 kV, 萃取电压 3 V, 锥孔电压 20 V, 碰撞能 9 eV, 离子源温度 120 °C。

2.5 脑黑质组织匀浆的制备 断头取脑, 于冰板上剥离双侧黑质, 称重, 液氮保存。取小鼠黑质部位, 加入 1:9 的生理盐水, 制备匀浆, 3 000 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min, 取上清液置 -80 °C 冰箱备用。

2.6 脑黑质组织氧化应激水平测定 取 2.5 项下制备的上清液, 进行 SOD, MDA 及 GSH-Px 检测, 具体方法按试剂盒说明书步骤进行。

2.7 脑组织单胺氧化酶水平的测定 取 2.5 项下制备的适量上清液, 进行 MAO-B 的测定, 具体方法按试剂盒说明书步骤进行。

2.8 统计学方法 所有数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 所有数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性检验用单因素方差分析。P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状态 造模后各组小鼠均表现出运动障碍, 动作迟缓, 前肢抬举伴震颤、竖毛, 对外界反应低下, 短暂性活动减少, 体重减轻等症状, 经 BCT 治疗后的小鼠, 上述症状明显减轻。

3.2 神经行为学 与正常组相比, 模型组小鼠爬杆时间显著升高 (P < 0.05), 自主活动次数显著降低 (P < 0.01); 与模型组相比, BCT 高、中、低剂量组及多巴丝肼组均能够显著降低小鼠爬杆时间 (P < 0.05), 增加小鼠自主活动次数 (P < 0.05), 见表 1。

3.3 小鼠纹状体 DA 含量 与正常组相比, 模型组 DA 含量显著降低 (P < 0.01), 提示造模成功; 与模型组相比, 多巴丝肼及 BCT 高、中剂量组均能够显著升高 DA 含量 (P < 0.01, P < 0.05), 见表 2。

3.4 单胺氧化酶水平 与正常组比较, 模型组小鼠中脑黑质部位 MAO-B 水平显著升高 (P < 0.01); 与模型组比较, 多巴丝肼及 BCT 高、中剂量组能够显著降低 MAO-B 水平 (P < 0.05, P < 0.01), 见表 2。

3.5 氧化应激水平 与正常组比较, 模型组小鼠中脑黑质部位 SOD, GSH-Px 水平均显著降低 (P < 0.01), MDA 水平显著升高 (P < 0.01); 与模型组相比, 多巴丝肼能够显著升高 SOD 水平 (P < 0.01),

表 1 拜颠停复方 (BCT) 对帕金森病小鼠模型行为学指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of BCT on index of behavioral tests in Parkinson's mice model ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	爬杆时间 /s	自主活动数/ 次/min
正常	-	5.9 ± 1.3 ³⁾	72.9 ± 14.0 ³⁾
模型	-	7.6 ± 2.3 ¹⁾	59.5 ± 5.6 ¹⁾
多巴丝肼	62.50	5.8 ± 1.6 ³⁾	72.1 ± 13.3 ³⁾
BCT	363.00	6.1 ± 1.1 ³⁾	73.3 ± 16.1 ⁴⁾
	181.50	5.9 ± 1.4 ³⁾	71.1 ± 10.7 ³⁾
	95.75	6.2 ± 1.2 ³⁾	74.6 ± 10.6 ³⁾

注: 与正常组相比¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与模型组相比³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01 (表 2~4 同)。

表 2 BCT 对帕金森病小鼠模型纹状体 DA 含量及黑质 MAO-B 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of BCT on DA content in striatum and level of MAO-B in substantia nigra tissues of Parkinson's mice model ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	DA /ng·mg ⁻¹	MAO-B /U·h ⁻¹ ·mg ⁻¹
正常	-	1.899 ± 0.215 ⁴⁾	30.4 ± 4.2 ⁴⁾
模型	-	0.758 ± 0.144 ²⁾	46.0 ± 6.0 ²⁾
多巴丝肼	62.50	1.155 ± 0.080 ⁴⁾	33.3 ± 8.8 ³⁾
BCT	363.00	1.031 ± 0.204 ³⁾	24.2 ± 11.4 ⁴⁾
	181.50	1.104 ± 0.273 ⁴⁾	33.6 ± 8.2 ⁴⁾
	95.75	0.966 ± 0.224	41.0 ± 5.3

BCT 高、中剂量组均能够显著升高 SOD, GSH-Px 水平 (P < 0.05, P < 0.01), 多巴丝肼及 BCT 高、中、低剂量组能够显著降低 MDA 水平 (P < 0.01), 见表 3。

表 3 BCT 对帕金森病小鼠模型黑质 SOD, GSH-Px 活力和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of BCT on content of MDA and activity of SOD, GSH-Px in substantia nigra tissues of Parkinson's mice model ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹	GSH-Px /U·mg ⁻¹
正常	-	111.46 ± 12.31 ⁴⁾	0.87 ± 0.16 ⁴⁾	14.81 ± 0.67 ⁴⁾
模型	-	83.59 ± 10.90 ²⁾	1.37 ± 0.21 ²⁾	11.24 ± 1.25 ²⁾
多巴丝肼	62.50	115.45 ± 10.93 ⁴⁾	1.04 ± 0.09 ⁴⁾	13.26 ± 1.58
BCT	363.00	102.66 ± 12.82 ⁴⁾	1.05 ± 0.07 ⁴⁾	16.18 ± 1.57 ⁴⁾
	181.50	99.06 ± 13.23 ³⁾	1.04 ± 0.24 ⁴⁾	14.23 ± 1.80 ⁴⁾
	95.75	94.43 ± 8.47	1.08 ± 0.06 ⁴⁾	13.07 ± 3.25

4 讨论

BCT 是由刺五加、白芍、钩藤 3 味中药各自提取的有效部位合理配伍组成,具有补气养血、熄风止痉的功效,用于帕金森病的治疗。钩藤对 6-羟多巴胺(6-OHDA)诱导的 PD 大鼠及 PC12 细胞毒性具有良好的神经保护作用^[5]。白芍的有效成分芍药苷能明显拮抗 PD 模型黑质和纹状体多巴胺能神经元的损伤,对运动迟缓等帕金森病症状有明显的改善作用^[6]。刺五加有效部位对 PD 小鼠多巴胺能神经元具有保护作用^[7],对 MPP⁺ 诱导 PC12 细胞损伤也具有保护作用^[8],可见以上 3 味药物均是防治帕金森病的有效候选药物。

GSH-Px 可特异催化 GSH 对 H₂O₂ 的还原反应,对细胞结构和功能的完整具有重要的保护作用,GSH-Px 活力的高低直接反映了机体清除自由基的能力。SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起着重要作用,它能清除超氧阴离子和自由基而保护细胞免受损伤,其活力高低间接反映了机体清除氧自由基的能力。MDA 是由机体产生的氧自由基攻击生物膜中的不饱和脂肪酸而产生得脂质过氧化物,可以引起细胞死亡,反映了体内脂质过氧化的程度,从而间接反映细胞受自由基攻击的严重程度^[9]。本实验中,与模型组相比,BCT 组 SOD 和 GSH-Px 水平明显升高,而 MDA 水平明显降低,提示 BCT 可以提高机体的抗氧化能力和清除自由基的能力。

MAO-B 是一种线粒体膜复合酶,人脑中将近 70% 的多巴胺被 MAO-B 分解,在 DA 氧化分解代谢的同时产生一些自由基和其他有活性的氧簇,引起氧化应激最终使神经元死亡。抑制 MAO-B 的活性即能抑制其对 DA 的降解作用,抑制该过程中自由基的产生,增加脑内 DA 含量,从而保护 DA 能神经元^[10]。MPTP 在脑内被 MAO-B 氧化为 MPP⁺,MPP⁺ 被多巴胺能神经元特异性吸收,聚集在黑质纹状体内 DA 能细胞的线粒体内,抑制电子传递链的 complex I,从而阻断其氧化磷酸化的过程,导致神经元细胞凋亡。MAO-B 抑制剂则可以抑制 MPTP 转化为 MPP⁺,起到神经保护作用。本实验中,与模型组相比,BCT 组 MAO-B 水平明显降低,提示 BCT 能够抑制 MAO-B,不仅可以抑制 DA 的降解,而且可以抑制 MPTP 转化为 MPP⁺,从多个途径起到保护 DA 能神经元的作用。

综上所述,BCT 对 PD 小鼠模型神经行为学、纹状体 DA 含量,中脑黑质部位 SOD,MDA,GSH-Px 及 MAO-B 水平均有明显的改善作用,故认为 BCT 可能是通过抑制 MAO-B 的水平,降低 DA 的降解以及自由基的产生,并同时增强自由基的清除能力和抗氧化能力,阻止氧化应激反应的发生,从而产生对 PD 小鼠的神经保护作用。

[参考文献]

- [1] Perfeito R, Cunha-Oliveira T, Rego A C. Reprint of: revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease-resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 62(SI):186-201.
- [2] Yan M H, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 62(SI):90-101.
- [3] 严斌,张琳,刘树民,等. 复元平颤宁配伍比例及抗帕金森病作用研究 [J]. 中医药学报, 2006, 34(3):16-18.
- [4] 肖莹. 复元平颤宁胶囊的药学研究 [D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2007.
- [5] Shima J S, Kima H G, Jua M S, et al. Effects of the hook of *Uncaria rhynchophylla* on neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 126(2):361-365.
- [6] Kim H G, Park G, Piao Y, et al. Effects of the root bark of *Paeonia suffruticosa* on mitochondria-mediated neuroprotection in an MPTP-induced model of Parkinson's disease [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 65(3):293-300.
- [7] 李煦照. 刺五加提取物对帕金森病小鼠多巴胺能神经的保护作用研究 [D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2013.
- [8] 安丽凤,刘树民,董杨,等. 刺五加有效部位对 MPP⁺ 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15):2021-2026.
- [9] 王文武,何建成,丁宏娟. 天麻钩藤饮对帕金森病大鼠神经行为学及氧化应激反应的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(12):1657-1659.
- [10] 孟凛冽,李峰,伞勇智,等. 帕金森病氧化应激机制及抗氧化药物治疗进展 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(2):380-383.

[责任编辑 聂淑琴]