

# 帕宁方对帕金森病大鼠行为及氧化应激反应的影响

王冬梅<sup>1</sup>, 海静如<sup>1</sup>, 魏风<sup>1</sup>, 莫遗盛<sup>1</sup>, 冯洁<sup>2\*</sup>

(1. 广西医科大学第三附属医院, 南宁 530031; 2. 广西医科大学药学院, 南宁 530021)

**[摘要]** **目的:**观察帕宁方对帕金森病(PD)大鼠行为和氧化应激反应的影响。**方法:**运用 6-羟基多巴胺(6-OHDA)立体定向脑内注射复制 PD 大鼠模型。将 PD 模型大鼠随机分为模型组、阳性对照组(美多巴 0.125 g·kg<sup>-1</sup>)与帕宁方高、中、低剂量组(按生药量计为 84, 42, 21 g·kg<sup>-1</sup>),另设同期正常组、假手术组。观察各组治疗前后大鼠旋转圈数,测定大鼠中脑黑质纹状体活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)含量,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性。**结果:**与模型组比较,帕宁方高、中、低剂量组大鼠旋转圈数为(237.26 ± 19.23), (246.71 ± 37.06), (278.81 ± 20.09)圈,活性氧含量为(231.02 ± 10.11), (235.87 ± 12.76), (247.93 ± 11.30) U·mg<sup>-1</sup>, MDA 含量为(4.56 ± 1.25), (4.70 ± 1.17), (4.63 ± 1.06) nmol·mg<sup>-1</sup>,均明显减少;GSH 含量明显增多,为(6.20 ± 0.81), (6.24 ± 0.76), (6.18 ± 0.90) mg·g<sup>-1</sup>;GSH-Px 活性为(2.68 ± 0.27), (2.59 ± 0.34), (2.31 ± 0.22) nU·g<sup>-1</sup>, SOD 活性为(188.40 ± 5.86), (170.87 ± 9.80), (165.62 ± 6.54) nU·mg<sup>-1</sup>,均明显增高,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。**结论:**帕宁方能明显改善 PD 大鼠旋转行为,减轻其黑质纹状体氧化应激损伤。

**[关键词]** 帕金森病; 帕宁方; 行为学; 氧化应激

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0199-04

## Effects of Paning Decoction on Behavior and Oxidative Stress Reaction in Rats with Parkinson's Disease

WANG Dong-mei<sup>1</sup>, HAI Jing-ru<sup>1</sup>, WEI Feng<sup>1</sup>, MO Yi-sheng<sup>1</sup>, FENG Jie<sup>2\*</sup>

(1. The Third Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530031, China;  
2. School of Pharmaceutical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of Paning decoction on behavior and oxidative stress reaction in rats with Parkinson's disease (PD). **Method:** The PD model were established through stereotoxic microinjection of 6-OHDA. Fifty SD rats were randomly divided into five groups: model group, positive group (madopar 0.125 g·kg<sup>-1</sup>) and the high, middle and low dose of Paning decoction groups (84, 42, 21 g·kg<sup>-1</sup>). In addition, a normal group and a sham operated group were established. The behavior (number of rotation) was observed before and after treatment. Moreover, the contents of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH), the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxidodismutase (SOD) in themed brain nigro-striatum were detected. **Result:** Compared with the model group, the number of rotation was 237.26 ± 19.23, 246.71 ± 37.06 and 278.81 ± 20.09 (in high, middle and low dosage groups, respectively). the content of ROS were (231.02 ± 10.11), (235.87 ± 12.76), (247.93 ± 11.30) U·mg<sup>-1</sup>, and the content of MDA were (4.56 ± 1.25), (4.70 ± 1.17), (4.63 ± 1.06) nmol·mg<sup>-1</sup>, respectively. The content of ROS and MDA were decreased significantly. On the other hand, the content of GSH were (6.20 ± 0.81), (6.24 ± 0.76), (6.18 ± 0.90) mg·g<sup>-1</sup>, the activities of GSH-Px were (2.68 ± 0.27), (2.59 ± 0.34), (2.31 ± 0.22) nU·g<sup>-1</sup>, SOD

**[收稿日期]** 20111130(012)

**[基金项目]** 广西中医药管理局(gzcc1063);广西南宁市科技局(201003045C-5)

**[第一作者]** 王冬梅,副主任药师,从事临床药理研究,Tel:0771-2178891, E-mail:wangdongmei067@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \*冯洁,博士,副教授,Tel:0771-5360143, E-mail:ezjiefeng@hotmail.com

were  $(188.40 \pm 5.86)$ ,  $(170.87 \pm 9.80)$ ,  $(165.62 \pm 6.54)$   $\text{nU} \cdot \text{mg}^{-1}$ , respectively. The content of GSH and the activity of GSH-Px, SOD were increased significantly. All the experimental data had statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Paning decoction can improve the behavior in PD rats, furthermore can reduce the injury of oxidative stress.

[**Key words**] Parkinson's disease; Paning decoction; behavioristics; oxidative stress

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种常见的中老年人中枢神经系统慢性退行性疾病, 发病率仅次于阿尔茨海默病, 是世界卫生组织确定的疑难疾病之一。随着世界人口老龄化, 发病率逐年增高, 65 岁以上老年人中的患病率高达 1% ~ 2%<sup>[1]</sup>。以静止性震颤、运动迟缓、肌张力增高和姿势平衡障碍为主要临床特征。本研究观察了帕宁方对帕金森病模型大鼠行为学和氧化应激反应的影响, 以探讨其治疗 PD 的作用机制, 为寻找安全有效的中药提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康 SD 大鼠 70 只, SPF 级, 雄性, 体重 180 ~ 220 g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(桂) 2009-0002。

**1.2 药物** 将帕宁方中的中药(药物组成: 天麻、桑枝、杜仲、钩藤、巴戟天、仙茅、豨莶草等组成)。用 10 倍量水提取 3 次, 过滤减压浓缩至稠膏, 冻干, 得率为 17.5%。临用前用 5% CMC-Na 溶解成  $0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的药液。

**1.3 试剂** 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA 批号 MKAA4439), 阿朴吗啡 (apomorphine, APO 批号 A4393-100G), 抗坏血酸批号 A8100(均为美国 Sigma 公司), 戊巴比妥钠(德国 Solarbio 公司批号 6900183), 活性氧 (reactive oxygen species, ROS 批号 20110110), 丙二醛 (malondialdehyde, MDA 批号 20100417), 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px 批号 20100521), 谷胱甘肽 (glutathione, GSH 批号 20110110), 超氧化物歧化酶 (superoxidedismutase, SOD 批号 20100521), 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

**1.4 仪器** TOW-3A 型大鼠脑立体定位仪(广东汕头市教育医学仪器厂), 微量进样器(上海第三分析仪器厂), XW-80A 型旋涡混合器(上海医科大学仪器厂), HH-W21-Cr600 型电热恒温水温箱(北京长安科学仪器厂), 80-2 型离心机(上海手术器具厂)。

## 2 方法

**2.1 建立帕金森动物模型**(采用右侧黑质两点注射法) 除了正常对照组外, 实验大鼠经戊巴比妥

钠 ( $0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 麻醉后, 固定于脑立体定位仪上, 参照大鼠脑立体定位图谱<sup>[2]</sup>取两个靶点 a 点: 前囟尾侧 5.0 mm, 中线右侧 1.9 mm, 硬脑膜腹侧 7.4 mm; b 点: 前囟尾侧 5.3 mm, 中线右侧 2.5 mm, 硬脑膜腹侧 6.5 mm。将  $12 \mu\text{g}$  6-羟基多巴胺立体定向注射于右侧黑质 a, b 两个靶点(每点注射量  $6 \mu\text{g}$ , 浓度  $0.002 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 溶解于含 0.1% 抗坏血酸的生理盐水), 注射速度  $0.3 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ , 注毕留针 15 min。成功帕金森模型标准: 模型建立 2 周后, 用阿朴吗啡  $0.5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  诱发大鼠向左侧旋转, 记录 30 min 内旋转次数, 210 转/30 min ( $7 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 以上即可。

**2.2 动物分组及给药** 将造模成功的 50 只实验大鼠, 分为 5 组, 每组 10 只随机分成模型对照组, 阳性对照组, 帕宁高、中、低剂量组, 另纳入 10 只正常大鼠为正常对照组, 10 只大鼠在右侧黑质部注射 0.02% 抗坏血酸的等量生理盐水, 其余条件与造模手术相同, 为假手术组。正常对照组、假手术组和模型对照组灌服等体积的生理盐水, 阳性对照组给予美多巴  $0.125 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 帕宁方高、中、低剂量组按生药 84, 42, 21  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  中药, 1 次/d, 连用 4 周。

**2.3 行为学检测** 实验各组在给药前及给药 4 周后, 大鼠 ip 阿朴吗啡  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  诱发大鼠向左侧旋转, 记录 30 min 内旋转次数。

**2.4 氧化应激指标检测** 行为学检测结束后, 立即取上述 6 组动物处死取脑, 小心分离中脑组织, 制备脑组织匀浆液: ①取脑组织块 0.3 ~ 0.5 g 在冰冷的 NaCl 溶液中漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 放入 10 mL 小烧杯内; ②在烧杯中加入冷的 0.86% NaCl 溶液 0.65 mL 并用眼科剪尽快剪碎脑组织块; ③将剪碎的脑组织块混悬液倒入匀浆管中, 并加入冷的 0.86% NaCl 溶液 0.3 mL 进行充分的匀浆。将匀浆液以  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min; ④将上清液置  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中贮存, 备用。氧化应激指标(活性氧, MDA, GSH, GSH-Px, SOD)按试剂盒说明书步骤进行检测。

**2.5 统计学分析** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 11.0 版软件对数据进行齐性检验及分析, 采用单因素方差分析处理实验数据。  $P < 0.05$  有统计

学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠旋转行为的影响** 正常对照组,假手术组治疗前后均未出现旋转行为;其他各组治疗前旋转圈数的差异无显著性;与治疗前相比,治疗后模型对照组的旋转圈数有所增加,但无显著性差异;与模型组相比,美多巴组、帕宁方高、中剂量组治疗后旋转圈数明显减少( $P < 0.05$ )。见表1。

**3.2 对大鼠氧化应激反应的影响** 与正常组、假手术组比较,模型组的 ROS, MDA 明显升高, GSH, GSH-Px, SOD 明显降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,帕宁方各剂量组的 ROS,

表1 帕宁方对 PD 大鼠旋转行为的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	30 min 内的旋转圈数	
		治疗前	治疗后
正常对照	-	0	0
假手术	-	0	0
模型对照	-	295.98 ± 35.22	316.80 ± 26.42
美多巴	0.125	300.36 ± 21.34	228.33 ± 29.14 <sup>1,2)</sup>
帕宁方	84	298.30 ± 28.51	237.26 ± 19.23 <sup>1,2)</sup>
	42	301.06 ± 23.65	246.71 ± 37.06 <sup>1,2)</sup>
	21	296.37 ± 31.49	278.81 ± 20.09 <sup>2)</sup>

注:与治疗前比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

MDA 明显降低, GSH, GSH-Px, SOD 明显升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 帕宁方对 PD 大鼠氧化应激反应的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ROS/U·mg <sup>-1</sup>	MDA/nmol·mg <sup>-1</sup>	GSH/mg·g <sup>-1</sup>	GSH-Px/nU·g <sup>-1</sup>	SOD/nU·mg <sup>-1</sup>
正常对照	-	120.31 ± 11.02 <sup>1)</sup>	3.91 ± 0.85 <sup>1)</sup>	8.06 ± 0.73 <sup>1)</sup>	3.03 ± 0.58 <sup>1)</sup>	218.33 ± 9.67 <sup>1)</sup>
假手术	-	124.27 ± 12.03 <sup>1)</sup>	3.86 ± 0.96 <sup>1)</sup>	8.10 ± 0.84 <sup>1)</sup>	2.98 ± 0.37 <sup>1)</sup>	225.11 ± 8.75 <sup>1)</sup>
模型对照	-	345.27 ± 13.25	8.08 ± 0.93	4.27 ± 0.62	1.65 ± 0.24	124.12 ± 6.62
美多巴	0.125	216.55 ± 8.36 <sup>1)</sup>	3.68 ± 1.10 <sup>1)</sup>	3.36 ± 0.55 <sup>1)</sup>	2.62 ± 0.19 <sup>1)</sup>	175.54 ± 7.41 <sup>1)</sup>
帕宁方	84	231.02 ± 10.11 <sup>1)</sup>	4.56 ± 1.25 <sup>1)</sup>	6.20 ± 0.81 <sup>1)</sup>	2.68 ± 0.27 <sup>1)</sup>	188.40 ± 5.86 <sup>1)</sup>
	42	235.87 ± 12.76 <sup>1)</sup>	4.70 ± 1.17 <sup>1)</sup>	6.24 ± 0.76 <sup>1)</sup>	2.59 ± 0.34 <sup>1)</sup>	170.87 ± 9.80 <sup>1)</sup>
	21	247.93 ± 11.30 <sup>1)</sup>	4.63 ± 1.06 <sup>1)</sup>	6.18 ± 0.904 <sup>1)</sup>	2.31 ± 0.22 <sup>1)</sup>	165.62 ± 6.54 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

### 4 讨论

帕金森病属中医学“颤症”、“颤震”、“振掉”等范畴,主要原因是由于机体肝肾亏损,阴虚阳亢。中医药治疗 PD 的机制,概括地说,是通过中药培补肝肾之阴精,从根本上进行治疗,竭力扭转肝肾亏损的局面,阴阳恢复平衡,则虚风可熄、震颤得止。帕宁方源于壮族地区,为民间验方。方中天麻甘平入肝经,具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络之功效为主药。钩藤、桑枝、防风、豨签草性甘,入肝经,具有祛风通络,清热透邪解表,助天麻祛风通络之功效为臣药。“逐风掉眩,皆属于肝”,肝肾同源,杜仲、川断、巴戟天、牛膝、仙茅入肾经,补肝肾,祛风通络,肝肾强壮则风邪不可入内,正所谓正气存内,邪不可干为佐药。白芍、生龙骨、生牡蛎、决明子入肝肾经,养血敛阴,平肝潜阳为使药。诸药配合具有补肾养肝、熄风止颤之功效。帕宁方在临床上应用有着较好的疗效<sup>[3]</sup>。

6-OHDA 制备的 PD 大鼠模型是目前较好的模型制备方法,广泛应用于 PD 的研究上。APO 诱导后的大鼠旋转圈数与脑黑质纹状体系统的损毁程度

正相关,因此检测造模大鼠的旋转行为可以衡量单侧 6-OHDA 损伤后果<sup>[4]</sup>。本研究结果表明,与模型组相比,帕宁方高、中、低剂量组的旋转圈数显著减少( $P < 0.05$ )。可见帕宁方可以改善 PD 大鼠 APO 诱发的旋转行为异常。

氧化应激是指体内产生的自由基增多,而清除自由基的能力降低(抗氧化酶活性减弱或抗氧化剂浓度降低),体内会有多余的自由基,从而损伤细胞成分<sup>[5]</sup>。PD 病人机体处于氧化应激状态,PD 病人中脑黑质内存在铁离子浓度升高、线粒体功能下降、抗氧化保护系统如低分子自由基清除剂 GSH 及清除自由基的酶 SOD, GSH-Px 等功能异常,导致氧化应激反应增强,氧自由基产生过多,产生脂质过氧化物,如 MDA、羟基、羰基等而引起细胞死亡导致神经元发生凋亡,或是产生活性氧与各种突变蛋白相互作用,共同调节了蛋白的纤维沉积,促进神经元凋亡,甚至死亡<sup>[6]</sup>。研究结果显示与模型组相比,帕宁方高、中、低剂量组活性氧、MDA 明显降低, GSH, GSH-Px, SOD 明显升高( $P < 0.05$ )。可见帕宁方可以提高机体的抗氧化能力和清除自由基的能力。

# 决明子提取物对链脲佐菌素诱发糖尿病小鼠晶状体氧化应激状态的影响

郑荣波<sup>1</sup>, 黄晓丹<sup>1</sup>, 何蓉蓉<sup>2\*</sup>, 李维熙<sup>2,3</sup>, 李小迪<sup>2</sup>, 李怡芳<sup>2</sup>, 栗原博<sup>2</sup>

(1. 广州王老吉药业股份有限公司, 广州 510600; 2. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广州 510632;  
3. 云南中医学院中药学院, 昆明 650500)

**[摘要]** 目的: 研究决明子提取物 *Cassia obtusifolia* extract (COE) 对链脲佐菌素 (STZ) 诱发糖尿病小鼠晶状体氧化应激状态的改善作用。方法: 雄性昆明种小鼠尾静脉注射 STZ 130 mg·kg<sup>-1</sup> 造成糖尿病模型后, 分成 STZ 模型组、二甲双胍组 (300 mg·kg<sup>-1</sup>, ig)、决明子提取物低、中、高给药组 (50, 150, 450 mg·kg<sup>-1</sup>, ig), 每组 10 只, 每天 ig 1 次, 连续给药 10 d 后。检测小鼠血糖浓度和晶状体氧化应激状态相关指标抗氧化能力指数 (ORAC)、丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO)、谷胱甘肽 (GSH)、超氧化物歧化酶 (T-SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的改善作用。结果: 小鼠尾静脉注射 STZ 7 d 后, 诱发小鼠血糖值明显增高 ( $P < 0.01$ ), 同时造成晶状体的氧化损伤。同时与模型组相比, 决明子提取物没有显示有效的降血糖作用, 但决明子给药均能显著降低小鼠晶状体的氧化应激产物 NO 和 MDA 含量 ( $P < 0.01$ ), 同时提高晶状体的抗氧化能力指数 ORAC 和 GSH 水平 ( $P < 0.01$ ), 并提高小鼠晶状体组织内抗氧化的自由基清除系统相关酶 (T-SOD 和 GSH-Px) 的活性 ( $P < 0.01$ )。结论: 决明子提取物可以改善 STZ 诱导糖尿病小鼠晶状体内的过氧化状态, 其作用机制可能通过清除自由基和抑制脂质过氧化过程实现的。

**[关键词]** 决明子; 晶状体; 氧化应激损伤; 自由基

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0202-05

**[收稿日期]** 20110907(006)

**[基金项目]** 广东省医学科研课题 (B2010167)

**[第一作者]** 郑荣波, 硕士, 高级工程师, 从事药用资源学研究, Tel: 13925018336, E-mail: zhengrongbo@sina.com

**[通讯作者]** \* 何蓉蓉, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药及保健品功能研究, Tel: 020-85227791, Fax: 020-85221559, E-mail: rongronghe66@163.com

研究提示, 帕宁方能明显减少 PD 大鼠旋转圈数, 改善其运动协调能力, 认为有可能是由于帕宁方通过局部治疗和整体协调的作用, 提高了机体清除自由基和抗氧化能力, 减少氧化应激反应对机体的损害。作者将进一步研究帕宁方对 PD 大鼠 DA 神经元凋亡的作用机制。

## [参考文献]

[1] Alves G, Forsaa E B, Pedersen K F, et al. Epidemiology of Parkinson's disease[J]. J Neurol, 2008, 255 (Suppl 5): 18.  
[2] 包新民, 舒思云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 48.

[3] 王冬梅, 魏风, 莫遗盛, 等. 帕宁方治疗帕金森病的临床研究[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(6): 95.  
[4] 何建成, 王振华, 袁灿兴, 等. 复方地黄方对帕金森病大鼠神经行为学及氧化应激的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(7): 590.  
[5] Sompol P, Ittarat W, Tangpong J. A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury [J]. Neuroscience, 2008, 153(1): 120.  
[6] Wu Z, Zhang J, Zhao B. Superoxide anion regulates the mitochondrial free Ca<sup>2+</sup> through uncoupling proteins [J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(8): 1805.

[责任编辑] 聂淑琴