

芍药甘草汤加减对 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠的影响

秦劭晨, 王爱梅*, 李若瑜

(山西中医学院附属医院, 太原 030024)

[摘要] **目的:**研究芍药甘草汤加减对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导的帕金森病模型小鼠的作用。**方法:**将 60 只 C57/BL6 小鼠随机分为正常组,模型组,美多巴组(50 mg·kg⁻¹)和芍药甘草汤加减低、中、高剂量组(1,2,4 g·kg⁻¹)。将 C57/BL6 小鼠腹腔注射 MPTP(40 mg·kg⁻¹),每天 1 次,连续 7 d。除正常组和模型组每天灌胃生理盐水外,给药组每天灌胃 1 次相应的药物,灌药第 3 天后按上述方法造模(除正常组外),给药 15 d 后,检测各组小鼠的行为学(爬杆实验、游泳实验和悬尾实验)。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测各组小鼠血清中胱抑素-C(Cys-C)和神经元特异烯醇化酶(NSE)的含量,采用分光光度法检测各组小鼠纹状体中超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的水平,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组小鼠纹状体中 α -突触核蛋白(α -syn),酪氨酸羟化酶(TH),B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的表达。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠的行为学实验中游泳实验得分和悬挂实验得分显著降低($P < 0.01$),爬杆时间显著增加($P < 0.01$),血清中 Cys-C 含量显著减少($P < 0.01$),NSE 含量明显增加($P < 0.05$),纹状体中 SOD 水平和 GSH-Px 水平显著减少($P < 0.01$),MDA 水平明显增加($P < 0.05$),TH 表达和 Bcl-2 表达显著减少($P < 0.01$), α -syn 和 Bax 表达明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,芍药甘草汤加减各剂量组与美多巴组的行为学实验中游泳实验得分和悬挂实验得分均明显增加($P < 0.05$),爬杆时间明显减少($P < 0.05$),血清中 Cys-C 含量显著增加($P < 0.05$),NSE 含量显著减少($P < 0.05$);纹状体中 SOD 水平和 GSH-Px 水平显著增加($P < 0.05$),MDA 水平明显减少($P < 0.05$),纹状体中 TH 表达和 Bcl-2 表达明显增加($P < 0.05$), α -syn 和 Bax 表达明显减少($P < 0.05$);与美多巴组比较,芍药甘草汤加减高剂量组的行为学实验中游泳实验得分和悬挂实验得分明显增加($P < 0.05$),爬杆时间明显减少($P < 0.05$),血清中 Cys-C 含量明显增加($P < 0.05$),而 NSE 含量明显减少($P < 0.05$);纹状体中 SOD 水平和 GSH-Px 水平明显增加($P < 0.05$),MDA 水平明显减少($P < 0.05$),纹状体中 TH 和 Bcl-2 表达显著增加($P < 0.05$), α -syn 和 Bax 表达明显减少($P < 0.05$)。**结论:**芍药甘草汤加减对 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠神经保护作用可能是通过抑制氧化损伤和细胞凋亡来实现的。

[关键词] 芍药甘草汤;帕金森病;凋亡;氧化;神经保护

[中图分类号] R289;R339.3+8;R373.2;R338;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)13-0015-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191141

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190219.0839.003.html>

[网络出版时间] 2019-02-19 13:25

Effect of Modified Shaoyao Gancao Tang on MPTP-induced Parkinson's Disease Model Mice

QIN Shao-chen, WANG Ai-mei*, LI Ruo-yu

(The Hospital of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of modified Shaoyao Gancao Tang on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson's disease model mice. **Method:** The sixty C57/BL6 mice were randomly divided into normal group, model group, Madopar group (50 mg·kg⁻¹) and low, medium and high

[收稿日期] 20181129(013)

[基金项目] 山西省卫生和计划生育委员会科研课题项目(201601119)

[第一作者] 秦劭晨,博士,主治医师,从事神经内科临床工作,E-mail:410291246@qq.com

[通信作者] *王爱梅,硕士,主任医师,从事神经内科临床工作,E-mail:w15803439738@qq.com

doses modified Shaoyao Gancao Tang (1, 2, 4 g·kg⁻¹). The modeling method was to intraperitoneally inject C57/BL6 mice with MPTP (40 mg·kg⁻¹) once a day for 7 days. Except normal group and model group were given normal saline daily, drug-administered group was intragastrical administered once a day, and the third day after the drug was administered according to the above method (except normal group). The behavior of each group of mice (climbing test, swimming test, and tail suspension test) was examined up to 15 days after administration. Subsequently, the levels of Cystatin-C (Cys-C) and neuron-specific enolase (NSE) in the serum of each group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in striatum of each group were detected by spectrophotometry. The protein expression of α -synuclein (α -syn), tyrosine hydroxylase (TH), B lymphoma-2 gene (Bcl-2) and Bcl-2 related X protein (Bax) in the striatum of each group was detected by Western blot.

Result: Compared with normal group, the swimming experiment scores and suspension experiments scores in the behavioral experiments of model group mice were significantly lower ($P < 0.01$), The climbing time was significantly increased ($P < 0.01$); the serum Cys-C content was significantly decreased ($P < 0.01$), serum NSE content increased significantly ($P < 0.05$). SOD level and GSH-Px level in striatum decreased significantly ($P < 0.01$), MDA level in striatum increased significantly ($P < 0.05$), TH and Bcl-2 expression in striatum were significantly decreased ($P < 0.01$), α -syn and Bax expression in striatum were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the scores of swimming experiment and suspension experiment in the behavioral experiments of Shaoyao Gancao Tang group and Madopar group were significantly increased ($P < 0.05$), while the climbing time was significantly reduced ($P < 0.05$). The serum Cys-C content increased significantly ($P < 0.05$), the serum NSE content decreased significantly ($P < 0.05$). The SOD level and GSH-Px level in the striatum increased significantly ($P < 0.05$), while the MDA level in the striatum decreased significantly ($P < 0.05$). There was also a significant increase in TH and Bcl-2 expression in the striatum ($P < 0.05$), α -syn and Bax expression in striatum were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with Madopar group, the scores of swimming experiment and suspension experiment in the behavioral experiment of high-dose group of Shaoyao Gancao Tang were significantly increased ($P < 0.05$), while the climbing time was significantly reduced ($P < 0.05$). The serum Cys-C content increased significantly ($P < 0.05$), while the serum NSE content decreased significantly ($P < 0.05$). The SOD level and GSH-Px level in the striatum increased significantly ($P < 0.05$), while the MDA level in the striatum decreased significantly ($P < 0.05$). There was also a significant increase in TH expression and Bcl-2 expression in the striatum ($P < 0.05$), while α -syn expression and Bax expression in the striatum were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The neuroprotective effect of modified Shaoyao Gancao Tang on MPTP-induced Parkinson's disease model mice may be achieved by inhibiting oxidative damage and apoptosis.

[**Key words**] modified Shaoyao Gancao Tang; Parkinson's disease; apoptosis; oxidative; neuroprotective

帕金森病(PD)是最常见的好发于中老年人的慢性神经系统退行性病变之一,其主要症状体现在运动障碍症状,如静止性震颤、行动迟缓和肌强直等^[1]。研究报道美国有 100 万人口患有此种疾病,而且以每年新增 5 万多新病例的速度增加^[2],在我国每 10 万 65 岁以上人群的患病人数为 1 700 例,并随发现患病率年龄增长而升高,PD 患者增加给家庭和社会都会带来沉重的负担^[3]。PD 主要病理特征是多巴胺能神经元变性丢失、损伤和神经细胞内 α -突触核蛋白(α -syn)蛋白大量积聚,但其发病机制

尚不明确。

现代治疗的左旋多巴替代疗法副作用较大,如加重运动障碍、抑郁等,而中医药在治疗 PD 有显著优势,芍药甘草汤出自张仲景《伤寒论·辨太阳病脉证并治》,有柔肝舒筋、缓急止痛的功效,名老中医李如奎教授根据芍药甘草汤加减,创止颤汤,对临床治疗 PD 有较好效果^[4],虽然该方发现可改善 PD 大鼠脑内微环境^[5],但其机制鲜有报道。有研究指出炎症反应会经常出现在 PD 病程的急性过程中^[6],而炎症反应介导的神经毒性在 PD 中表现为神经

炎症刺激损伤神经元^[7]。有研究报道,PD 患者会存在氧化应激状态,黑质多巴胺能神经元对活性氧物质(ROS)特别敏感而导致细胞功能障碍和凋亡、甚至细胞死亡,而脑组织主要通过抗氧化酶,如超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等,清除细胞内增加的 ROS^[8]。本实验采用 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)制备 PD 模型小鼠为研究对象,探讨芍药甘草汤加减对 PD 模型小鼠的作用及其机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 C57/BL6 小鼠 60 只,体质量(25±2)g,由山西医科大学实验动物中心提供,许可证号 SYXK(晋)2015-0001,饲养于山西医科大学 SPF 级动物实验室,饲养温度为(22±2)℃,湿度为(55±5)%,自由饮食和自由饮水,小鼠适应性饲养 3 d 后进行实验,动物操作均符合山西医科大学动物伦理委员会规定。

1.2 药物与试剂 美多巴(上海罗氏制药有限公司,国药准字 H10930198);MPTP(美国 Sigma 公司,批号 M0896);小鼠半胱氨酸蛋白酶抑制剂/胱抑素-C(Cys-C),小鼠神经特异性烯醇化酶(NSE)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号分别为 CSB-E08386m, CSB-E07962m);SOD,丙二醛(MDA),GSH-Px 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 A001-3, A003-1, A005);兔抗 α -syn 抗体,兔抗酪氨酸羟化酶(TH)抗体,兔抗 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)抗体,兔抗 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体,兔抗微管蛋白(tubulin)抗体和山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记免疫球蛋白(Ig)G 抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab1903, ab112, ab182858, ab32503, ab59680, ab7090);RIPA 裂解液,BCA 蛋白浓度测定试剂盒,SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒,SDS-PAGE 电泳液,转膜液,封闭液,一抗、二抗稀释液(碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0013B, P0012S, P0012A, P0014A, P0021A, P0023B, P0023A, P0023D);ECL 化学发光液(美国 Bio-Rad 公司,批号 170-5060)。

1.3 仪器 3K30 型低温高速离心机(美国 Sigma 公司);T25 basic 型分散机(德国 IKA 公司);Multiskan MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司);AE-200 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Mini Trans-blot 型电泳装置及转膜装置,ChemiDoc XRS + 型化学发光成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 芍药甘草汤加减由黄芪片、大黄各 15 g,丹参、升麻各 9 g,知母、白芍各 12 g 和钩藤 18 g 组成,先浸泡约 20 min,加水煎煮 2 次,第 1 次加 10 倍量水,煎煮 1 h,冷却至室温后过滤药液;第 2 次再加 10 倍量水,复煮 1 h,把 2 次药液合并,浓缩至含生药 1 g·mL⁻¹,搅匀,分装即得。上述中药饮片购于山西中医学院附属医院,经山西中医学院附属医院药剂科史美娟主任鉴定均为正品。

2.2 分组 将 60 只小鼠随机分为正常组,模型组,美多巴组(50 mg·kg⁻¹)和芍药甘草汤加减低、中、高剂量组(1,2,4 g·kg⁻¹)。将 C57/BL6 小鼠腹腔注射 MPTP(40 mg·kg⁻¹),每天 1 次,连续 7 d,制备 PD 小鼠模型,观察模型前后小鼠行为状态,小鼠活动能力减弱表明造模成功^[9]。除正常组和模型组每天灌胃生理盐水外,给药组每天灌胃 1 次相应的药物,灌药第 3 天后按上述方法造模(除正常组外),给药 15 d 后,依次检测各组小鼠的行为学实验(爬杆实验、悬尾实验和游泳实验)。芍药甘草汤加减和美多巴的剂量是根据 PD 小鼠与人体质量换算,以临床等效剂量计算为低剂量^[2,10]。

2.3 各组小鼠的行为学检测

2.3.1 爬杆实验 长 50 cm,直径 1 cm 的铁杆作为小鼠实验用爬杆。将直径 2 cm 的泡沫塑料小球固定在爬杆的顶端,爬杆上缠绕 5 层医用胶布以防止小鼠爬行过程中打滑,各组小鼠适应性饲养结束后每天进行 1 次爬杆训练,直到第 15 天给药结束后进行检测。检测时,将每只小鼠放至球顶使其自由爬下,以小鼠双前肢接触杆底平台认定为爬完全长,记录小鼠爬完全长所需的时间,每只小鼠重复爬杆 3 次,取各只小鼠平均值进行分析。

2.3.2 悬尾实验 各组小鼠适应性饲养结束后每天将受试小鼠两前爪悬挂于一根水平金属线上(直径 1 mm,距地面 30 cm)停留 10 s。直到第 15 天给药结束后进行检测。评分标准如下,受试时间为 10 s,在受试时间内小鼠用两后爪抓住金属线记 3 分,小鼠用一后爪抓住金属线记 2 分,小鼠两后爪均抓不住金属线记 1 分,小鼠跌落记 0 分^[10]。

2.3.3 游泳实验 将 20 cm×30 cm×20 cm 规格的水箱作为实验游泳箱。实验前游泳箱中灌注水深 10 cm,水温为(22~26)℃的饮用水,实验开始时,将小鼠放入水箱。评分标准如下,受试时间为 10 min,在受试时间内小鼠连续不断游泳者记

30 分;小鼠游泳时间占受试时间一半时间以上者记 25 分;小鼠漂浮时间占受试时间一半时间以上者记 20 分;小鼠偶尔游泳者记 15 分;小鼠漂浮在一边偶尔用后肢游动者记 10 分。第 15 天给药结束后进行检测记录。

2.4 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测各组小鼠的血清 Cys-C 和 NSE 含量 各组小鼠经行为学检测后,通过眼底静脉丛进行取血,各血液室温静置 0.5 h,随后经室温 $3\ 000\ r\cdot\min^{-1}$ 离心 10 min,得到的血清按 ELISA 试剂盒的要求进行操作,用酶标仪检测波长 450 nm 的吸光度。

2.5 分光光度法检测各组小鼠纹状体中 SOD, MDA 和 GSH-Px 的水平 各组小鼠经眼眶取血后,脱颈椎处死,冰水迅速分离大脑中右侧纹状体部分,组织可暂时存放在 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。把各组组织按质量加入 9 倍量生理盐水进行匀浆, $4\ ^\circ\text{C}$ $3\ 000\ r\cdot\min^{-1}$ 离心 10 min 后,把各组织上清液按各个试剂盒要求进行检测。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组小鼠纹状体中 α -syn, TH, Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 各组小鼠经眼眶取血后,脱颈椎处死,冰水迅速分离大脑中左侧纹状体部分,组织可暂时存放在 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。各组组织加入含 PMSF 的蛋白裂解液匀浆,

$3\ 000\ r\cdot\min^{-1}$ 离心 10 min 后,各上清液按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。按每孔 $50\ \mu\text{g}$ 蛋白上样量配制样品,加入 SDS-PAGE 上样缓冲液配置最终样品。凝胶蛋白电泳约 1.5 h(恒压 100 V),电转移恒流 300 mA 1 h 至 PVDF 膜,室温封闭 1 h。用抗体稀释液稀释 α -syn, TH, Bcl-2, Bax 和 tubulin 抗体(1:1 000), $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜。用抗体稀释液稀释 HRP 标记羊抗兔 IgG(1:1 000),室温摇床孵育 1 h。用化学发光液进行检测观察,使用 Image Lab 图像分析软件进行分析。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用单因素方差分析 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 芍药甘草汤加减对小鼠行为学的影响 与正常组比较,模型组小鼠的悬尾实验得分和游泳实验得分显著减少($P < 0.01$),爬杆时间显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,芍药甘草汤加减各剂量组与美多巴组的悬尾实验得分和游泳实验得分均明显增加,爬杆时间明显减少($P < 0.05, P < 0.01$);与美多巴组比较,芍药甘草汤加减方高剂量组的悬尾实验得分和游泳实验得分明显增加($P < 0.05$),爬杆时间明显减少($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 芍药甘草汤加减对小鼠行为学的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of modified Shaoyao Gancao Tang on behavior of mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	爬杆时间 /s	悬尾实验得分 /分	游泳实验得分 /分
正常	-	9.10 ± 0.60	4.60 ± 0.10	29.60 ± 1.50
模型	-	18.50 ± 1.20 ¹⁾	1.80 ± 0.01 ¹⁾	16.10 ± 1.70 ¹⁾
美多巴	0.05	15.90 ± 0.60 ²⁾	2.50 ± 0.09 ²⁾	20.00 ± 1.10 ²⁾
芍药甘草汤加减	1	14.60 ± 0.90 ²⁾	2.70 ± 0.08 ²⁾	21.70 ± 1.90 ²⁾
	2	12.70 ± 0.80 ²⁾	3.20 ± 0.07 ²⁾	22.90 ± 1.10 ²⁾
	4	11.10 ± 1.00 ^{3,4)}	3.80 ± 0.30 ^{3,4)}	24.20 ± 1.60 ^{3,4)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$;与美多巴组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 芍药甘草汤加减对小鼠血清中 Cys-C 和 NSE 的影响 与正常组比较,模型组的 Cys-C 含量显著减少($P < 0.01$),NSE 含量显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,芍药甘草汤加减各剂量组与美多巴组的 Cys-C 含量明显增加($P < 0.05$),NSE 含量明显减少($P < 0.05$);与美多巴组比较,芍药甘草汤加减中、高剂量组的 Cys-C 含量明显增加($P < 0.05$),NSE 含量明显减少($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 芍药甘草汤加减对小鼠纹状体中 SOD, MDA 和 GSH-Px 的影响 与正常组比较,模型组小鼠的 SOD 和 GSH-Px 水平显著减少($P < 0.01$),MDA 水平显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,芍药甘草汤加减各剂量组与美多巴组的 SOD 和 GSH-Px 水平明显增加($P < 0.05$),MDA 水平明显减少($P < 0.05$);与美多巴组比较,芍药甘草汤加减各剂量组的 SOD 和 GSH-Px 水平明显增加($P < 0.05$),MDA 水平

表 2 芍药甘草汤加减对小鼠血清中 Cys-C 和 NSE 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of modified Shaoyao Gancao Tang on Cys-C and NSE in serum of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

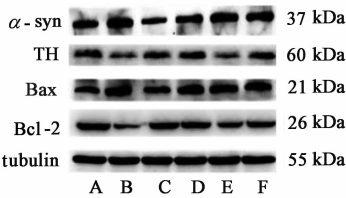
组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Cys-C/ $mg \cdot L^{-1}$	NSE/ $\mu g \cdot L^{-1}$
正常	-	1.37 ± 0.01	0.34 ± 0.02
模型	-	0.72 ± 0.02 ¹⁾	0.78 ± 0.04 ¹⁾
美多巴	0.05	0.90 ± 0.02 ²⁾	0.68 ± 0.01 ²⁾
芍药甘草汤加减	1	1.01 ± 0.02 ²⁾	0.56 ± 0.03 ²⁾
	2	1.12 ± 0.04 ^{3,4)}	0.41 ± 0.04 ^{3,4)}
	4	1.23 ± 0.03 ^{3,5)}	0.37 ± 0.05 ^{3,5)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与美多巴组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ (表 3,4 同)。

表 3 芍药甘草汤加减对小鼠纹状体中 SOD,MDA 和 GSH-Px 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect of modified Shaoyao Gancao Tang on SOD,MDA and GSH-Px in striatum of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	SOD/ $U \cdot mg^{-1}$	MDA/ $mmol \cdot g^{-1}$	GSH-Px/ $U \cdot mg^{-1}$
正常	-	2.98 ± 0.10	2.53 ± 0.16	38.04 ± 1.09
模型	-	0.75 ± 0.12 ¹⁾	7.79 ± 0.22 ¹⁾	16.06 ± 1.12 ¹⁾
美多巴	0.05	1.56 ± 0.16 ²⁾	6.00 ± 0.34 ²⁾	20.41 ± 1.09 ²⁾
芍药甘草汤加减	1	2.43 ± 0.15 ^{2,4)}	4.16 ± 0.19 ^{2,4)}	29.26 ± 1.04 ^{2,4)}
	2	2.69 ± 0.16 ^{2,5)}	3.61 ± 0.15 ^{2,5)}	31.51 ± 1.07 ^{2,5)}
	4	2.88 ± 0.11 ^{3,5)}	3.10 ± 0.16 ^{3,5)}	33.80 ± 1.10 ^{3,5)}



A. 正常组;B. 模型组;C~E. 芍药甘草汤加减高、中、低剂量组;F. 美多巴组

图 1 各组 α -syn,TH,Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达电泳

Fig.1 Electrophoresis of protein expression of α -syn,TH,Bcl-2 and Bax in each group

表 4 芍药甘草汤加减对小鼠纹状体中 α -syn,TH,Bcl-2 和 Bax 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effect of modified Shaoyao Gancao Tang on α -syn,TH,Bcl-2 and Bax in striatum of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	α -syn/tubulin	TH/tubulin	Bax/tubulin	Bcl-2/tubulin
正常	-	1.50 ± 0.08	3.20 ± 0.15	2.00 ± 0.10	3.00 ± 0.10
模型	-	3.00 ± 0.15 ¹⁾	1.10 ± 0.10 ¹⁾	3.60 ± 0.10 ¹⁾	0.80 ± 0.05 ¹⁾
芍药甘草汤加减	4	1.20 ± 0.10 ^{3,4)}	2.80 ± 0.15 ^{3,4)}	1.80 ± 0.05 ^{3,5)}	2.80 ± 0.10 ^{3,4)}
	2	1.80 ± 0.15 ³⁾	2.40 ± 0.10 ³⁾	2.50 ± 0.09 ³⁾	2.50 ± 0.10 ³⁾
	1	2.40 ± 0.13 ²⁾	1.80 ± 0.10 ²⁾	3.10 ± 0.10 ²⁾	1.70 ± 0.10 ³⁾
美多巴	0.05	2.00 ± 0.11 ²⁾	2.20 ± 0.10	2.70 ± 0.09 ²⁾	2.10 ± 0.15 ³⁾

阴虚,髓海失充,筋脉失荣,虚风内动,致颤动震掉,或拘急强直;证属本虚标实,以虚为主,肝肾阴虚,水

明显减少 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 芍药甘草汤加减对小鼠纹状体中 α -syn,TH, Bcl-2 和 Bax 的影响 与正常组比较,模型组小鼠的 TH 和 Bcl-2 表达显著减少 ($P < 0.01$), α -syn 和 Bax 表达明显增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,芍药甘草汤加减各剂量组与美多巴组的 TH 和 Bcl-2 表达显著增加 ($P < 0.01$), α -syn 和 Bax 表达显著减少 ($P < 0.01$);与美多巴组比较,芍药甘草汤加减高剂量组的 α -syn 和 Bax 表达明显减少 ($P < 0.05$),TH 和 Bcl-2 表达明显增加 ($P < 0.05$)。见图 1,表 4。

4 讨论

PD 是一种慢性神经系统退行性疾病,具有显著

的年龄依赖,伴随人口老龄化的加剧,PD 发病率也日趋增多,这会加重的社会和个人家庭经济负担。虽然目前 PD 发病机制还没有统一定论^[11],其中药物替代疗法(左旋多巴制剂)在 PD 的治疗中始终处于首选地位,被誉为治疗帕金森病的“金标准”,但是,该患者长期服用该类药物后观察发现,左旋多巴制剂的疗效会越来越差,并出现不少的副作用^[12-13]。因此,选择安全、低毒、有效的治疗 PD 的药物是迫在眉睫。在中医基础理论中可知 PD 属于“颤证”“振颤”等范畴,其病机为年老体弱,肝肾

不涵木,肝风内动^[14]。上海名中医李老集聚自己数十年经验创制出治疗 PD 的验方——芍药甘草汤加

减,其治疗原则以益气活血、养阴熄风、清热解毒为主,该方中黄芪补气、丹参活血;知母清热,天麻和钩藤平肝熄风,既能熄内风,又有平木解肝郁之功;升麻升清,大黄泻火降痰浊,既能解热毒,又有解火郁化痰郁之效;芍药敛阴柔肝,既能益气活血通络,又有柔肝行气活血以解气郁血郁,而且能舒筋缓急;诸药相伍,共奏平肝熄风止颤之功^[15]。由于芍药甘草汤加减对 PD 的基础研究较少,文献报道 MPTP 模型小鼠的神经毒性和组织病理学特点均符合临床 PD 的显著特征^[16],并且 MPTP 神经毒性作用对 C57/BL6 品系小鼠的敏感性最高^[17],则本实验着重探讨芍药甘草汤加减方对 MPTP 诱导 PD 模型 C57/BL6 小鼠的作用以及机制。

PD 的外在症状表现是运动障碍症状,本实验采用了爬杆实验、游泳实验和悬尾实验进行行为学观察。研究发现 α -syn 是位于神经元突触前膜和核膜上的膜蛋白^[18],其在细胞内大量积聚是 PD 发病的重要因素之一^[19]。研究报道细胞表达 TH 是判断多巴胺能神经元的金标准,其缺少也是一种 PD 发病的主要影响因素^[20-21]。从本实验结果可知,模型小鼠的游泳实验得分、悬尾实验得分和 TH 蛋白表达比正常小鼠显著减少,而爬杆时间和 α -syn 蛋白表达比正常小鼠显著增加,这说明 PD 模型制备成功,符合 PD 临床症状。经过芍药甘草汤加减和美多巴的药物干预后,游泳实验得分、悬尾实验得分和 TH 蛋白表达比模型小鼠显著增加,而爬杆时间和 α -syn 蛋白表达比模型小鼠显著减少,说明芍药甘草汤加减方对 PD 模型小鼠的 PD 的症状有所缓解。

研究发现 Cys-C 水平可以反映 PD 病情的严重程度,其可抑制神经元细胞的损伤,其水平增加可以保护神经元免受外源性刺激造成的细胞毒性伤害,则 Cys-C 可用于指示与判断神经元的修复或损伤情况^[22]。而 NSE 是存在于神经细胞中的酶类,当脑组织受损时 NSE 由细胞内释放入血液中,血清 NSE 水平升高指示神经元的损伤程度^[23]。由本实验结果可知,模型小鼠的 Cys-C 含量比正常小鼠显著减少,而 NSE 含量比正常小鼠显著增加,说明 PD 模型的神经细胞受损明显,符合 PD 临床症状。经过芍药甘草汤加减和美多巴的药物干预后,Cys-C 含量比模型小鼠显著增加,而 NSE 含量比模型小鼠显著减少,这说明芍药甘草汤加减方对 PD 模型小鼠的具有一定的神经保护作用。过多的 α -syn 表达可能会引起细胞内 ROS 产生氧化应激而导致多巴胺能

神经元损伤^[24]。SOD,MDA 和 GSH-Px 作为氧化应激重要指标,其作用是监测继发性自由基过氧化损伤及其自由基清除药物治疗效果^[25],其中 SOD 作用主要是清除氧自由基、对抗与阻断氧自由基对细胞造成的损害,及时修复受损细胞,而 MDA 降低为了指示神经元受损程度降低^[26]。GSH-Px 是氧化应激反应过程中的一种重要的过氧化物分解酶,它的主要作用是在细胞内能清除有害的过氧化物代谢产物和保护细胞膜结构的作用^[27]。由本实验结果可知,模型小鼠的 SOD 和 GSH-Px 水平比正常小鼠显著减少,而 MDA 水平比正常小鼠显著增加,这说明 PD 模型的神经细胞受到了氧化应激损害。经过芍药甘草汤加减和美多巴的药物干预后,SOD 和 GSH-Px 水平比模型小鼠显著增加,而 MDA 水平比模型小鼠显著减少,这说明芍药甘草汤加减方对 PD 模型小鼠的具有一定的抵抗氧化应激刺激而保护神经元的作用。

有文献报道 PD 的发病过程中引起的多巴胺能神经元退行性病变与细胞凋亡有密切的关系^[28]。哺乳动物中凋亡调控基因对是 Bcl-2 基因和 Bax 基因,Bcl-2 是抑制凋亡的基因^[29],Bax 是促进凋亡的基因,因为 Bax 可以与 Bcl-2 组合成异源二聚体,其主要表现为 Bax 过剩会促进细胞的凋亡,Bcl-2 过多会抑制细胞的凋亡^[30]。从本实验结果可知,模型小鼠的 Bcl-2 蛋白表达比正常小鼠显著减少,Bax 蛋白表达比正常小鼠显著增加,这说明 PD 模型的神经细胞处于促进凋亡进程。经过芍药甘草汤加减和美多巴的药物干预后,Bcl-2 蛋白表达比模型小鼠显著增加,Bax 蛋白表达比模型小鼠显著减少,这说明芍药甘草汤加减方对 PD 模型小鼠的具有一定的抑制细胞凋亡的作用。

综上所述,芍药甘草汤加减对 MPTP 诱导的帕金森病模型小鼠具有一定的神经保护作用,表现在减缓运动障碍,增加 Cys-C、SOD、GSH-Px、TH 和 Bcl-2 水平,减少 NSE、MDA、 α -syn 和 Bax 含量,其机制可能是通过抑制氧化损伤和抑制细胞凋亡来实现的。

[参考文献]

- [1] Balestrino R, Martinez-Martin P. Neuropsychiatric symptoms, behavioural disorders, and quality of life in Parkinson's disease [J]. J Neurol Sci, 2017, 373: 173-178.
- [2] 黄宁静,WEI J N,李文涛. 止颤汤参与帕金森病大鼠自噬途径中 P62 调节 α -突触核蛋白的研究[J]. 中西

- 医结合心脑血管病杂志,2017,15(21):2689-2692.
- [3] 李艳霞,高华,王丹,等. α -硫辛酸对帕金森病细胞模型内质网应激及细胞凋亡的影响[J]. 山西医科大学学报,2018,49(9):1045-1050.
- [4] 王伟为,李文涛,李如奎. 止颤汤治疗帕金森病合并焦虑、抑郁的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(17):2556-2558.
- [5] 黄宁静,李文涛. 止颤汤对帕金森病异动症大鼠 DARPP-32 磷酸化表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(4):417-420.
- [6] Kim D S, Choi H I, WANG Y, et al. A new treatment strategy for Parkinson's disease through the gut-brain axis: the glucagon-like peptide-1 receptor pathway[J]. *Cell Transplant*,2017,26(9):1560-1571.
- [7] 王昌权,田宇,周刚,等. 帕金森患者血清 $A\beta_{1-42}$ 含量与炎症因子及受体、抗氧化酶的相关性研究[J]. 海南医学院学报,2018,24(1):138-140,144.
- [8] 陆征宇,赵虹,汪涛,等. 补肾养肝熄风方药对帕金森病小鼠纹状体抗氧化酶和细胞凋亡的影响[J]. 江苏中医药,2011,43(3):85-87.
- [9] 王冬梅,赵丹,殷盛明,等. MPTP 对 C57BL/6 小鼠脑内 κ 受体表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2014,34(23):6700-6702.
- [10] 万明珠,任路,于嵩,等. “肾脑相济”电针疗法对帕金森病模型小鼠中脑黑质胶质细胞的影响[J]. 中医杂志,2018,59(18):1597-1601.
- [11] Jang Y, Kwon I, SONG W, et al. Modulation of mitochondrial phenotypes by endurance exercise contributes to neuroprotection against a MPTP-induced animal model of PD[J]. *Life Sci*, 2018,209:455-465.
- [12] Solla P, Fasano A, Cannas A, et al. Dopamine agonist withdrawal syndrome (DAWS) symptoms in Parkinson's disease patients treated with levodopa-carbidopa intestinal gel infusion[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2015,21(8):968-971.
- [13] Crispo J A, Fortin Y, Thibault D P, et al. Trends in inpatient antiparkinson drug use in the USA, 2001—2012 [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2015, 71 (8): 1009-1011.
- [14] 陈宇,李燕. 天麻钩藤饮合芍药甘草汤加减治疗肝肾阴虚型帕金森病 36 例[J]. 福建中医药,2017,48(6):52-53.
- [15] 戈盾. 止颤汤合芍药甘草汤治疗帕金森病疼痛的临床疗效观察[J]. 内蒙古中医药,2017,36(14):44-45.
- [16] Abushouk A I, Negida A, Ahmed H, et al. Neuroprotective mechanisms of plant extracts against MPTP induced neurotoxicity: future applications in Parkinson's disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85:635-645.
- [17] Franke S K, Kesteren R E V, Wubben J A, et al. Progression and recovery of Parkinsonism in a chronic progressive MPTP-induction model in the marmoset without persistent molecular and cellular damage [J]. *Neuroscience*,2016,312:247-259.
- [18] QU L, XU H, JIA W, et al. Rosmarinic acid protects against MPTP-induced toxicity and inhibits iron-induced α -synuclein aggregation [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 144:291-300.
- [19] Pacheco C R, Morales C N, Ramírez A E, et al. Extracellular α -synuclein alters synaptic transmission in brain neurons by perforating the neuronal plasma membrane [J]. *J Neurochem*, 2015,132(6):731-741.
- [20] DING Y X, ZHANG Z X, MA J B, et al. Directed differentiation of postnatal hippocampal neural stem cells generates nuclear receptor related-1 protein-and tyrosine hydroxylase-expressing cells [J]. *Mol Med Rep*,2016,14(3):1993-1999.
- [21] Johnson M E, Lim Y, Senthilkumaran M, et al. Investigation of tyrosine hydroxylase and BDNF in a low-dose rotenone model of Parkinson's disease [J]. *J Chem Neuroanat*,2015,70(6):33-41.
- [22] 叶明,陈育华,刘晓林,等. 帕金森病患者血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 水平的变化及其临床意义 [J]. 中华全科医学,2016,14(12):268-271.
- [23] 谭文用,邹晓毅,周沐科,等. 神经节苷脂联合盐酸普拉克索对帕金森患者非运动症状及血清 Cys C、S-100B、NSE 含量的影响 [J]. 实用医院临床杂志,2018,15(2):125-128.
- [24] Perfeito R, Ribeiro M, Rego A C. Alpha-synuclein-induced oxidative stress correlates with altered superoxide dismutase and glutathione synthesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Arch Toxicol*,2016,91(3):1245-1259.
- [25] de Farias C C, Maes M, Bonifácio K L, et al. Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in Parkinson's disease and its progression: disease and staging biomarkers and new drug targets [J]. *Neurosci Lett*,2016,617:66-71.
- [26] ZOU J, CHEN Z, WEI X, et al. Cystatin C as a potential therapeutic mediator against Parkinson's disease via VEGF-induced angiogenesis and enhanced neuronal autophagy in neurovascular units [J]. *Cell Death Dis*, 2017,8(6):2854.
- [27] 李婷,梁舒婷,廖美爱,等. 川芎对衰老小鼠组织 SOD、GSH-Px、MDA 及学习记忆的影响 [J]. 医学理论与实践,2017,30(18):2661-2663,2666.
- [28] 刘疏影,陈彪. 帕金森病流行现状 [J]. 中国现代神经疾病杂志,2016,16(2):98-101.
- [29] MA L L, WANG D W, YU X D, et al. Tangeretin induces cell cycle arrest and apoptosis through upregulation of PTEN expression in glioma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016,81:491-496.
- [30] Erental A, Kalderon Z, Saada A, et al. Apoptosis-like death, an extreme SOS response in *Escherichia coli* [J]. *Mbio*,2014,5(4):e00426.

[责任编辑 孙丛丛]