

银杏平颤方及其拆方对帕金森病模型小鼠脑内 线粒体酶复合体活性的影响

孙红梅 白丽敏 张 军 吴海霞 许 红 崔 龙

摘要 **目的** 探讨银杏平颤方防治帕金森病的机理及其阻止帕金森病模型小鼠黑质多巴胺神经元凋亡的途径。**方法** 取雄性 C₅₇BL/6J 小鼠,分为正常组、模型组和 4 个中药组(即全方组、解毒方组、平肝方组和化痰方组)。采用 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6 四氢吡啶腹腔注射建立帕金森病模型,分别于用药 14 天和 28 天处死,测定小鼠脑线粒体酶复合体 I、II 和 IV 的活性。**结果** 与正常组比较,模型组小鼠脑线粒体酶复合体 I 和 IV 的活性明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), II 的活性无明显变化;与模型组比较,全方组和化痰方组 14 天时脑线粒体酶复合体 I 活性均显著提高($P < 0.05$),解毒方组 14 天、平肝方组 28 天、化痰方组两个时段复合体 II 的活性均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,中药各组在 14 天时复合体 IV 活性均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),平肝方组和化痰方组在 28 天时显著升高($P < 0.05$)。**结论** 银杏平颤方及其拆方可能通过部分抑制脑内线粒体酶复合体活性下降,维持线粒体的功能,阻止中脑多巴胺神经元的凋亡,以减缓帕金森病的进展。

关键词 银杏平颤方;拆方;帕金森模型小鼠;线粒体酶复合体

Effects of Yinxing Pingchan Recipe and its Components on Activity of Mitochondrial Enzyme Complex in Brain of Mice with Parkinson's Disease SUN Hong-mei, BAI Li-min, ZHANG Jun et al *Department of Anatomy, Basal Medical College, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100029)*

Abstract Objective To investigate the mechanisms of Yinxing Pingchan recipe (YXPC) and its components, i. e. the components for detoxicating (A), for calming liver (B) and for dissolving blood stasis (C), in preventing and treating Parkinson's disease, and the path of its inhibition on nigrostriatal dopaminergic neuron (DAn) apoptosis in model mice of Parkinson's disease. **Methods** Male C₅₇BL/6J mice were divided into the normal group, the model group and four Chinese medicinal groups, that is, the YXPC group, and Group A, B and C, treated with YXPC and its components A, B and C respectively. Mouse model of Parkinson's disease was established by intraperitoneal injection with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP). All mice were sacrificed in 2 batches at the 14th and the 28th day respectively. The activity of mitochondrial enzyme complex I, II and IV (MEC I, II and IV) in the brain of mice were measured, respectively. **Results** As compared with the normal group, the activity of MEC I and IV in brain was significantly lower ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and that of MEC II had no obvious change in the model group. As compared with the model group, the activity of MEC I was significantly higher in YXPC group and Group C at the 14th day ($P < 0.05$), while the activity of MEC II in Group A at the 14th day, Group B at the 28th day and Group C at both 14th and 28th day was significantly lower ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Activity of MEC IV in the four Chinese medicinal groups at the 14th day all significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and retained at high level in Group B and Group C at the 28th day ($P < 0.05$). **Conclusion** YXPC and its components can maintain the mitochondrial function by partial inhibiting the activity of its enzyme complex, preventing DAn apoptosis to slow down the progress of Parkinson's disease.

基金项目:清华大学、香港浸会大学、北京中医药大学中医药合作研究计划资助项目(No. 02BJ4)

作者单位:北京中医药大学基础医学院解剖教研室(北京 100029)

通讯作者:白丽敏, Tel: 010-64287075, E-mail: bailimin163@163.com

Key words Yinxing Pingchan recipe; dissembled prescription; mouse model of Parkinson's disease; mitochondrial enzyme complex

目前,帕金森病(Parkinson's disease, PD)的发病机制尚不十分明了。许多研究报道 PD 患者黑质等组织存在线粒体酶复合体功能障碍。有研究发现神经毒素能通过抑制线粒体酶复合体(mitochondrial enzyme complex, MEC) I 导致 PD 样症状^[1,2]。银杏平颤方是根据中医对 PD 的认识并结合临床经验拟定的,以前的实验已证明银杏平颤方及其拆方可以增加 PD 鼠脑内自由基清除的能力,降低脂类过氧化物的含量^[3]。为了进一步探讨防治 PD 的机理以及阻止多巴胺神经元丢失和凋亡的途径,本研究观察了银杏平颤方及其拆方对 PD 小鼠线粒体酶复合体活性的影响。

材料与方 法

1 材 料

1.1 中药及制备 (1)银杏平颤方(简称全方)由金银花、黄连、黄芪、熟地、银杏叶、野葛根、大叶红景天、白芍、天麻、钩藤、生甘草组成;(2)清热解毒方(简称解毒方)由金银花、黄连、生甘草组成;(3)平肝熄风方(简称平肝方)由天麻、钩藤、白芍组成;(4)化痰通络方(简称化痰方)由银杏叶、大叶红景天、野葛根、黄芪组成。中药制备:按成人用药 6 倍称取各组药材,用乙醇提取,得浸膏,存于 4℃ 冰箱备用,灌胃时溶于蒸馏水中。

1.2 试剂 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6 四氢吡啶(MPTP)、细胞色素 C、N, N, N, N-4-甲基对苯二胺二氢氯化物、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2'-乙烷磺酸(Hepes)均为 Sigma 公司产品;还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、蔗糖、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、K₃PO₄、MgCl₂、NaN₃、K₃FeO₉(CN)₆、琥珀酸钠、二甲胍酸钠、抗坏血酸等购于北京化学试剂公司,均为分析纯。

1.3 动物 C₅₇BL/6J 小鼠,雄性,6~7 周龄,体重(18±2)g,购于北京维通利华公司实验动物中心。

2 方 法

2.1 造模与分组 用生理盐水配制 0.3% MPTP 予小鼠腹腔注射,每天 30 mg/kg,连续 5 天,制造帕金森病小鼠模型,随机分成 6 组(每组 12 只):模型组每天灌胃生理盐水 0.5 ml/只;全方组小鼠每天灌胃全方中药 0.5 ml/只(约含生药量 1.18 g/ml);解毒方组小鼠每天灌胃解毒方中药 0.5 ml/只(约含生药量 0.6

g/ml);平肝方组小鼠每天灌胃平肝方中药 0.5 ml/只(约含生药量 0.6 g/ml);化痰方组小鼠每天灌胃化痰方中药 0.5 ml/只(约含生药量 0.6 g/ml)。各组小鼠从造模第一天开始每次在腹腔注射 MPTP 前 40 min 给小鼠灌胃,每天 1 次,连续 5 天,造模完成后每天继续灌胃至处死。正常组小鼠(12 只)不做任何处理。各组分别于开始造模后的 14 天和 28 天颈椎脱臼处死小鼠。取全脑,迅速置冰上,沿视交叉后方 1 mm 处做额状切面断开,取其后半,分别称重, -70℃ 冰箱保存。

2.2 线粒体提取 用常规蔗糖-Hepes 法提取脑线粒体。

2.3 蛋白质含量测定 用考马斯亮蓝 G-250 染色法进行脑蛋白质含量测定。

2.4 MEC 活性测定 MEC I 和 II 活性的测定:采用常规比色法。测得的数值是以每 100 μg 蛋白中 K₃FeO₉(CN)₆ 消耗的 mmol 数表示,数值越高,表明酶的活性越高。MEC IV 活性的测定:采用测氧法,测得的数值是以每分钟中每毫克蛋白中利用的原子氧的量(ng)表示,数值越高,表明酶的活性越高。

3 统计学方法 用 SPSS10.0 统计软件,各组间比较采用方差分析。

结 果

1 中药全方及其拆方对 PD 小鼠脑 MEC I 活性的影响 见表 1。与正常组比较,模型组于造模后 14、28 天时 MEC I 活性显著下降($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$);与模型组比较,全方组和化痰方组(14 天)显著上升($P < 0.05$),解毒方组和化痰方组(28 天)显著下降($P < 0.01$)。

2 中药全方及其拆方对 PD 小鼠 MEC II 活性的影响 见表 1。与正常组比较,模型组造模后 14、28 天时 MEC II 活性差异无显著性;与模型组比较,解毒方组(14 天)、平肝方组(28 天)和化痰方组(14 天和 28 天)MEC II 活性均明显提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 中药全方及其拆方对 PD 小鼠脑 MEC IV 活性的影响 见表 1。与正常组比较,造模组造模 14、28 天时 MEC IV 活性明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,14 天时全方组和解毒方组,平肝方组和化痰方组两个时间段(14 天和 28 天)MEC IV 活性均明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠不同时间脑 MEC I、II、IV 活性测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间 (d)	I [K ₃ Fe ₃ (CN) ₆ nmol/100μg 蛋白]	II [K ₃ Fe ₃ (CN) ₆ nmol/100μg 蛋白]	IV [ng 原子氧/mg 蛋白/min]
正常	6	14	105.64 ± 1.91	38.77 ± 0.82	823.05 ± 48.92
		28	118.12 ± 2.00	38.77 ± 0.82	698.26 ± 15.40
模型	6	14	97.35 ± 2.27 *	35.65 ± 0.67	577.18 ± 33.55 **
		28	96.09 ± 1.22 **	35.65 ± 0.67	638.55 ± 5.06 *
全方	6	14	108.91 ± 1.95 △	36.71 ± 0.90	691.10 ± 21.84 *△
		28	97.99 ± 2.64 **	35.14 ± 2.76	618.52 ± 14.26 *
解毒方	6	14	103.38 ± 3.07	42.49 ± 0.60 *△	706.74 ± 38.29 **△△
		28	86.56 ± 2.11 **△△	37.74 ± 0.60	622.10 ± 10.90 *
平肝方	6	14	100.47 ± 3.32	35.40 ± 1.39	677.04 ± 20.82 **△
		28	95.86 ± 0.78 **	44.76 ± 0.81 *△△	694.42 ± 10.68 △
化痰方	6	14	110.50 ± 5.25 △	41.68 ± 2.21 △	719.06 ± 22.51 *△△
		28	80.64 ± 2.38 **△△	45.12 ± 1.88 *△△	682.95 ± 12.76 △

注:与正常组同期比较, * P < 0.05, ** P < 0.01; 与模型组同期比较, △ P < 0.05, △△ P < 0.01

讨 论

线粒体是细胞能量代谢的主要场所,其内膜上酶复合体 I ~ V 组成线粒体呼吸链氧化磷酸化系统,产生能量,维持细胞的正常功能。有研究发现线粒体功能障碍与帕金森发病密切相关^[1,2,4]。在帕金森病的实验研究中发现神经毒性物质 MPTP 能通过血脑屏障进入脑内,首先被单胺氧化酶-B 氧化后成为 MPP⁺,它被多巴胺转运体摄取到多巴胺神经元后,抑制线粒体复合物 I 的功能,使活性氧物质等产生增加,导致多巴胺神经元损伤、死亡,引起和临床类似 PD 的症状,因此被用来作为制造帕金森动物模型的工具药^[5-7],但也有个别学者发现 MPTP 可能通过激活氧化呼吸链引起呼吸链旁路电子漏增多,从而导致过氧化氢生成增加,引起细胞损伤^[8]。本实验发现 MPTP 可导致脑内线粒体(包括中脑黑质)酶复合体 I、IV 的活性下降,对酶复合体 II 的活性无明显影响,对酶复合体 I 的影响 28 天较 14 天明显,对酶复合体 IV 的影响与酶复合体 I 相反,提示 MPTP 抑制中脑内线粒体酶复合体的功能与时间进程有关。

本实验发现全方和化痰方中药在早期(14 天)可拮抗 PD 鼠脑内线粒体酶复合体 I 活性下降,后期(28 天)各组中药作用均不明显;但解毒方中药在早期,平肝方中药在后期,化痰方中药在两个时段可提高复合体 II 的活性;各组中药在早期均可拮抗 PD 鼠脑内复合体 IV 活性的下降,后期只有平肝方中药和化痰方中药有此作用。PD 属于中医“颤证”范畴,在发病早期毒瘀阻络较严重,解毒方中金银花具有清热解毒、凉风散热和补虚之功,黄连可清热燥湿,甘草益脾和胃协调诸药,故清热解毒中药效果较明显;而后期由于疾病的不断进展,造成肝肾阴虚、虚风内动,平肝方中天麻、钩藤万方数据

有舒肝郁、散气滞的作用;白芍可养血柔肝,故补益肝肾,兼以平肝熄风的中药疗效显著;临床观察帕金森患者经常伴有气滞血瘀或风火痰瘀,化痰通络方中银杏叶、红景天和野葛根则可活血化瘀、疏通经络;黄芪可扶正益气、生血行血,故化痰通络中药在两个时段均有疗效;全方中药的组成虽兼有上述各个拆方的功用,但防止线粒体酶复合体活性降低的作用并不是 3 个拆方药效的累加,其机制还需深入研究。

越来越多的研究已发现细胞凋亡是 PD 中多巴胺神经元丢失的主要方式之一,而线粒体在诱导细胞凋亡方面起很关键作用^[6,9,10]。以往多从抗自由基、抗氧化化的角度研究中药防治 PD 的机理,也发现银杏平颤方中的银杏叶提取物和葛根素可减轻 PD 鼠多巴胺神经元的凋亡,其机制与中药的抗氧化有关^[11]。关于中药能否直接抑制 PD 中脑线粒体酶活性的下降,我们未见报道。我们的实验也证实银杏平颤方及其拆方可不同程度的抑制 MPTP 诱导的 PD 小鼠黑质多巴胺神经元的丢失和凋亡(待发表),因此推测银杏平颤全方及其拆方可能通过阻止线粒体酶复合体活性的下降,保护线粒体的功能,防止多巴胺神经元的凋亡,减缓 PD 病程的进展。

参 考 文 献

- Mellick GD, Silburn PA, Prince JA, et al. A novel screen for nuclear mitochondrial gene associations with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2004;111(2):191-199.
- Hoglinger GU, Carrard G, Michel PP, et al. Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2003;86(5):1297-1307.
- 张 军,孙红梅,白丽敏,等. PD 小鼠脑内 SOD、MDA 和 GSH-Px 含量的变化和银杏平颤全方及其拆方的影响. *中医药学刊* 2004;22(5):911-913.
Zhang J, Sun HM, Bai LM, et al. The experimental study on treatment of Yinxingpingchan Recipe and its different combination on free radical in the model mouse with Parkinson's disease. *Chin Arch TCM* 2004;22(5):911-913.
- Chinopoulos C, Adam-Vizi V. Mitochondrial deficient in complex I activity are depolarized by hydrogen peroxide in nerve terminals: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 2001;76(1):302-306.
- Conn KJ, Ullman MD, Eisenhauer PB, et al. Decreased expression of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) subunit 4 in 1-methyl-4-phenylpyridinium-treated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2001;306(3):145-148.

- 6 Kalivendi SV, Kotamraju S, Cunningham S, et al. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced apoptosis and mitochondrial oxidant generation: role of transferrin-receptor-dependent iron and hydrogen peroxide. *Biochem J* 2003;371(Pt 1):151-164.
- 7 Bywood PT, Johnson SM. Mitochondrial complex inhibitors preferentially damage substantia nigra dopamine neurons in rat brain slices. *Exp Neurol* 2003;179(1):47-59.
- 8 冯卫红,刘耕陶. N-甲基-4-苯基 1,2,3,6 四氢吡啶及多巴胺体外引起大鼠脑线粒体损伤作用. *药学报* 2000;35(1):11-17.
- Feng WH, Liu GT. Comparative study of the toxic effect of N-methyl-4-phenyl 1,2,3,6 tetrahydropyridine and dopamine on rat brain mitochondria in vitro. *Acta Pharm Sin* 2000;35(1):11-17.
- 9 Naoi M, Maruyama W, Akao Y, et al. Mitochondria determine the survival and death in apoptosis by an endogenous neurotoxin, N-methyl (R) salsolinol, and neuroprotection by propargylamines. *J Neural Transm* 2002;109(5-6):607-621.
- 10 Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi M, et al. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. *Life Sci* 2003;73(25):3277-3288.
- 11 曹非,孙圣刚,童萼塘,等.银杏叶提取物治疗帕金森大鼠的研究. *临床神经学杂志* 2003;16(5):282-283.
- Cao F, Sun SG, Tong ET, et al. Study on the effect of treating Parkinson's disease rats by Extract Ginkgo Bilobar. *J Clin Neurol* 2003;16(5):282-283.

(收稿:2004-09-17 修回:2005-03-22)

通心络胶囊和拜阿司匹林对心绞痛患者炎症因子干预的对比观察

赵玉霞¹ 刘运芳² 于会明² 孙尚文³

2003 年 10 月-2004 年 10 月我们观察通心络胶囊和拜阿司匹林药物干预前后冠心病心绞痛患者血清 C 反应蛋白(CRP)的变化,现报告如下。

临床资料 全部患者均经冠状动脉造影确诊,根据病史、体征及实验室检查排除各种感染性疾病、肿瘤及结缔组织疾病。选择入院治疗的冠心病心绞痛患者 60 例,根据心绞痛症状和美国心脏病协会(AHA)的诊断标准分为稳定型心绞痛和不稳定型心绞痛。稳定型心绞痛患者 26 例,男 10 例,女 16 例;年龄 36~68 岁,平均(60.2±9.8)岁;其中 1 支血管病变 15 例,2 支血管病变 11 例。不稳定型心绞痛患者 34 例,按患者就诊顺序编号,用数字表法随机分为两组,治疗组 17 例,男 7 例,女 10 例;年龄 34~65 岁,平均(60.3±6.9)岁;病程 3~5 个月,平均(4.3±1.6)个月;其中 1 支血管病变 9 例,2 支血管病变 8 例;合并症:高血压 3 例,糖尿病 2 例。对照组 17 例,男 6 例,女 11 例;年龄 36~66 岁,平均(63.3±8.8)岁;病程 3~5 个月,平均(4.1±1.8)个月;其中 1 支血管病变 12 例,2 支血管病变 5 例;合并症:高血压 5 例,糖尿病 3 例。两组资料比较差异无显著性($P>0.05$),具有可比性。

治疗方法 两组不稳定型心绞痛均给予鲁南欣康(山东鲁南制药有限公司)20 mg,每日 2 次;有高血压和糖尿病患者予以对症治疗。对照组加服拜阿司匹林(德国拜耳医药有限公司)100 mg,每日 1 次。治疗组加服通心络胶囊(由人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、冰片等组成,每粒胶囊含生药

0.38 g,石家庄以岭药业股份有限公司提供),每次 3 粒,每日 3 次,疗程 8 周。稳定型心绞痛患者予以鲁南欣康 20 mg,每日 2 次,拜阿司匹林 75 mg,每日 1 次,每疗程 10 天,共用药 3 个疗程。C 反应蛋白(CRP)的含量测定:取静脉血,用酶联免疫吸附法(ELISA),按照试剂盒说明进行操作(试剂盒由美国 Diagnostic System Laboratory 公司生产)。统计学方法:采用 *t* 检验。

结果

1 不稳定型心绞痛与稳定型心绞痛患者血清中 CRP 含量比较 不稳定型心绞痛患者 CRP 水平[(6.8±2.4)mg/L]显著高于稳定型心绞痛患者[(2.8±1.5)mg/L, $P<0.01$]。

2 两组不稳定型心绞痛患者治疗前后 CRP 水平的比较 治疗组治疗后 CRP 水平[(2.5±1.8)mg/L]与治疗前[(6.8±2.4)mg/L]比较明显改善($P<0.01$),但与对照组治疗后[(4.7±1.4)mg/L]比较差异无显著性。

讨论 近年来的研究显示,血清中炎症因子 CRP 是冠心病的独立危险因素,与动脉粥样硬化斑块的形成有密切关系,是人类主要的、最敏感的反映炎症急性期蛋白之一。国外报道 CRP 浓度与急性冠脉事件的发生密切相关,我们亦发现血清中 CRP 的含量随着不稳定型心绞痛患者病情的加重而升高。已有研究证实,拜阿司匹林能有效抑制心绞痛患者的炎症反应,本研究结果亦显示该药能在一定程度上抑制炎症反应,降低血清中 CRP 含量。通心络治疗后 CRP 含量显著降低,提示具有补气活血、通络逐瘀作用的通心络胶囊有抑制炎症、防止血栓形成的作用,可以延缓心血管事件的发生。

(收稿:2005-01-20 修回:2005-08-02)

作者单位:1. 山东大学齐鲁医院中医科(济南 250012);2. 山东大学医学院;3. 山东省医学科学院