

拜颤停复方对帕金森病小鼠模型多巴胺的影响

任燕冬^{1,2} 井月娥¹ 张淑香¹ 王洪玉¹ 卢芳¹ 刘树民¹

摘要 目的 观察拜颤停复方组分配比对帕金森病(Parkinson's disease, PD)小鼠纹状体内多巴胺(dopamine, DA)的影响,筛选最优配比。**方法** 以 MPTP 诱导 C57BL/6 小鼠建立 PD 模型,采用均匀设计的实验方法,将组成拜颤停复方的 3 味中药提取物按不同配比(刺五加提取物 X1:白芍提取物 X2:钩藤提取物 X3 = 30.00:34.92:82.50, 48.00:19.98:72.19, 18.00:44.88:61.88, 36.00:29.94:51.56, 54.00:15.00:41.25, 24.00:39.90:30.94, 42.00:24.96:20.63)进行干预,模型组和正常组灌胃等量 5%羧甲基纤维素钠,连续干预 20 日。运用超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS)方法,观察各组小鼠 DA 含量。除正常组 10 只外,筛选 PD 模型小鼠 20 只,随机数字表法分为模型组和拜颤停复方组(优化配比如方),拜颤停复方组灌胃优化配比提取物,模型组和正常组灌胃等量 0.5%羧甲基纤维素钠,连续干预 20 日。观察各组小鼠行为学,检测纹状体内 DA 含量。**结果** 与正常组比较,模型组小鼠纹状体内 DA 含量降低($P < 0.01$),提示造模成功。与模型组比较,1、2 组纹状体内 DA 含量升高($P < 0.05$),根据二次多项式逐步回归统计结果,得出回归方程为 $Y = 0.265 + 0.026X_2 - 0.056X_3 + 0.334 \times 10^{-3} \times X_1 \times X_3 + 0.691 \times 10^{-3} \times X_3^2$,钩藤提取物为影响药效的主因素($P < 0.01$),由回归方程预测其最佳配伍为:X1(刺五加提取物) = 54.00 mg/(kg · d), X2(白芍提取物) = 44.88 mg/(kg · d), X3(钩藤提取物) = 82.50 mg/(kg · d),拜颤停复方组爬杆时间缩短,自主活动次数升高,DA 含量升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 拜颤停复方能增加帕金森病小鼠纹状体 DA 的含量,最优配比为 54.00:44.88:82.50。

关键词 拜颤停复方;帕金森病;多巴胺;均匀设计

Effect of Baichanting Compound on Dopamine Contents in Parkinson's Disease Model Mice REN Yan-dong^{1,2}, JING Yue-e¹, ZHANG Shu-xiang¹, WANG Hong-yu¹, LU Fang¹, and LIU SHU-min¹
1 Center for Safety Evaluation, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin (150040);
2 College of Jiamusi, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang (154007)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Baichanting Compound (BC) on dopamine (DA) in striatum of Parkinson's disease (PD) mice, and to screen the optimal component proportion. **Methods** The PD model was established in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) induced C57BL/6 mice. By using uniform design, they were intervened by three extracts of BC in different proportions [*Acanthopanax senticosus* extract (X1):white peony root extract (X2):*Uncaria rhynchophylla* extract (X3) = 30.00:34.92:82.50, 48.00:19.98:72.19, 18.00:44.88:61.88, 36.00:29.94:51.56, 54.00:15.00:41.25, 24.00:39.90:30.94, 42.00:24.96:20.63]. Equal volume of 5% carboxymethylcellulose sodium was administered to mice in the model group and the normal group by gastrogavage. All medication was lasted for 20 successive days. The dopamine (DA) content was determined by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS). Except 10 in the normal group, 20 PD model mice were screened and divided into the model group and the BC group (with the optimal proportion) according to random digit table. BC extract in optimal proportion was administered to mice in the BC group by gastrogavage, while equal volume of 5% carboxymethylcellulose sodium was administered to mice in the model group and the normal

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(No. 81303249)

作者单位:1.黑龙江中医药大学药物安全性评价中心(哈尔滨 150040);2.黑龙江中医药大学佳木斯学院(黑龙江 154007)

通讯作者:刘树民, Tel:0451-82193278, E-mail: keji-liu@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.01.0094

group by gastrogavage. All medication was lasted for 20 successive days. Praxiology was observed in each group. DA content in striatum was also detected. Results Compared with the normal group, the DA content in striatum decreased significantly in the model group ($P < 0.01$), suggesting a successful PD modeling. Compared with the model group, the DA content in striatum increased significantly in 1 and 2 groups ($P < 0.05$). According to results of quadratic polynomial stepwise regression statistics, the regression equation obtained was: $Y = 0.265 + 0.026X_2 - 0.056X_3 + 0.334 \times 10^{-3} \times X_1 \times X_3 + 0.691 \times 10^{-3} \times X_3^2$. X_3 extract was the main factor influencing the effectiveness ($P < 0.01$). The optimal proportion of BC was predicted by the regression equation: $X_1 = 54.00 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, $X_2 = 44.88 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, the $X_3 = 82.50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$. The pole climbing time was shortened, times of autonomic activities increased, DA content was elevated, all with statistical difference in BC groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Conclusion BC could increase DA content in PD model mice with the optimal proportion as 54.00:44.88:82.50.

KEYWORDS Baichanting Compound; Parkinson's disease; dopamine; uniform design

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见于中老年人的中枢神经系统退行性疾病, PD 主要病理特征为黑质致密部多巴胺能神经元进行性缺失和死亡, 黑质-纹状体通路多巴胺(dopamine, DA)释放减少, 纹状体 DA 含量显著降低^[1]。目前对 PD 的发病机制尚不完全清楚^[2], 临床未发现药物可减缓、阻止甚至逆转 PD 黑质多巴胺能神经元的变性过程。拜颤停复方源于临床经验方, 本课题组前期对拜颤停复方进行了大量的文献调研、临床考证和实验研究, 证实拜颤停复方(原名:复原平颤宁)能够有效治疗 PD, 减轻 PD 患者临床症状^[3,4]。为了进一步优化组方配伍, 提高临床疗效, 本课题组将方中单味药分别进行提取纯化, 并运用均匀设计的方法, 观察各组分不同比例配伍作用, 确定最优配伍组合。

材料与方法

1 实验动物 雄性 C57BL/6 小鼠, 8 周龄, 清洁级, 体重(20 ± 2)g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2012-0001。于黑龙江中医药大学药物安全性评价中心饲养, 光线 12 h 明暗交替, 温度: (23 ± 3) °C, 湿度: (55 ± 5)%, 自由饮食饮水, 适应性喂养 1 周。

2 药物 刺五加、白芍、钩藤药材(哈尔滨市世一堂制药厂提供, 经黑龙江中医药大学中医研究院付克教授鉴定为合格品), 刺五提取物(提取方法: 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), 白芍提取物(提取方法: 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), 钩藤提取物(提取方法: 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)。将刺五加、白芍、钩藤提取物按比例混匀后用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶解。

3 试剂及仪器 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(MPTP, 美国 Sigma 公司, 批号 MKBQ8635V); 色谱乙腈(美国迪马公司); 盐酸多巴胺(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号 32321)。ZIL-2 小鼠自发活动监测仪(中国医学科学院药物研究所); Vortex-Genie 2 漩涡混合器(上海乔跃电子有限公司); KDC-160HR 高速冷冻离心机(安徽科大创新股份有限公司); ACQUITY UPLC Quattro Micro 三重四级杆串联质谱仪(美国 Waters 公司)。

4 模型制备 将小鼠适应性喂养 1 周, 腹腔注射 MPTP-HCl 30 mg/(kg · d), 连续注射 5 日, 制备 PD 模型, 正常组腹腔注射等量生理盐水。小鼠行为改变、出现步长缩短、动作迟缓、震颤、竖毛、爬竿不能、对外界刺激反应低下者作为成模标准^[3]。本次造模成功率为 91.92%。

5 分组及干预方法 除正常组 10 只外, 筛选出符合造模标准 C57BL/6 小鼠 80 只, 按随机数字表分为模型组及刺五加、白芍和钩藤提取物 7 个不同配比干预组(表 1)。造模后开始灌胃提取物, 模型组和正常组灌胃等量 0.5% 羧甲基纤维素钠, 连续干预 20 日。

根据原方临床常用剂量^[4]、《中华人民共和国药典》^[5]规定的原药材给药范围及各原药材提取物的提取率折算后确定小鼠的给药剂量范围, 刺五加: 18 ~ 24 mg/(kg · d), 白芍: 15 ~ 35 mg/(kg · d), 钩藤 20.63 ~ 82.5 mg/(kg · d), 根据均匀设计方案选用 $U_7(7^4)$ 表, 将刺五加、白芍、钩藤提取物用量作为考察因素, 每个因素分别取 7 个水平。

6 检测指标及方法

6.1 脑组织样品处理 断头取脑, 于冰板上剥离双侧纹状体, 称重, 液氮保存。取各组小鼠纹状体,

表 1 $U_7(7^4)$ 均匀设计不同配比及
剂量分组 [mg/(kg·d)]

组别编号	X1 刺五加提取物	X2 白芍提取物	X3 钩藤提取物
1	30.00	34.92	82.50
2	48.00	19.98	72.19
3	18.00	44.88	61.88
4	36.00	29.94	51.56
5	54.00	15.00	41.25
6	24.00	39.90	30.94
7	42.00	24.96	20.63

加入 1 mL 0.1 mol/L 高氯酸除蛋白,制备匀浆,4 ℃ 15 000 r/min 离心 15 min,取上清液用于检测。

6.2 纹状体 DA 含量测定 色谱条件:色谱柱 ACQUITYUPLCTm BEH C18 column (50 mm × 2.1 mm × 1.7 μm, Waters Corp, Milford, USA); 流动相:0.1% 甲酸乙腈:0.1% 甲酸水 = 7:93;流速 0.2 mL/min;柱温 26 ℃;进样量 5 μL。质谱条件:采用电喷雾电离正离子源(ESI⁺)多反应监测(MRM)模式监测反应质荷比(m/z):154.00→137.00,锥孔电压 20 V,碰撞能量为 9 eV,离子源温度为 120 ℃,毛细管电离电压为 3.0 kV,萃取电压为 3 V。

线性关系考察:将 DA 标准品配制成浓度为 10 000、2 000、400、80、16、3.3 ng/mL 标准品,以进样浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

6.3 验证实验 除正常组 10 只外,筛选 PD 模型小鼠 20 只,采用随机数字表法分为模型组和拜颤停复方组(优化配比组),拜颤停复方组灌胃优化配比提取物,模型组和正常组灌胃等量 0.5% 羧甲基纤维素钠,连续干预 20 日。观察各组小鼠行为学,检测纹状体内 DA 含量。

6.3.1 爬杆实验 参照文献[3],将一根长 50 cm

粗 1 cm 的木杆作为爬杆,爬杆顶端固定一直径为 2 cm 的泡沫塑料小球,爬杆缠胶布以防打滑。持小鼠尾部将其头向下置于杆顶(以小鼠双后肢至于球上为准),使其自然爬下,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,每只小鼠爬杆 3 次,取平均值。每天训练小鼠爬杆 1 次,于干预结束后检测。

6.3.2 自主活动实验 测定小鼠自发活动变化,将小鼠置于自主活动计数仪内,盖好盖子,采用自主活动计数仪检测并记数,包括直立运动和水平运动的次数的总和,预适应 2 min 后,记录小鼠 5 min 内自发运动次数,于干预结束后检测。

6.3.3 纹状体内 DA 含量测定 于干预结束后检测,脑组织样品处理方法同 6.1,测定方法同 6.2。

7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,均匀设计数据采用 DPS v7.05 软件,运用二次多项式逐步回归的方法进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组一般状态比较 造模后模型组及各给药组小鼠均表现出前肢抬举伴震颤、竖毛,运动障碍,动作迟缓,对外界反应低下,短暂性活动减少,体重减轻等症状,各给药组小鼠干预后上述症状减轻。

2 均匀设计实验

2.1 线性关系考察(图 1) 绘制 DA 标准曲线,得回归方程为: $Y = 1.104\ 68X + 1.850\ 52$ ($r = 0.999\ 6$),表明 DA 浓度在 3.3 ~ 10 000 ng/mL 与其峰面积呈良好的线性关系。

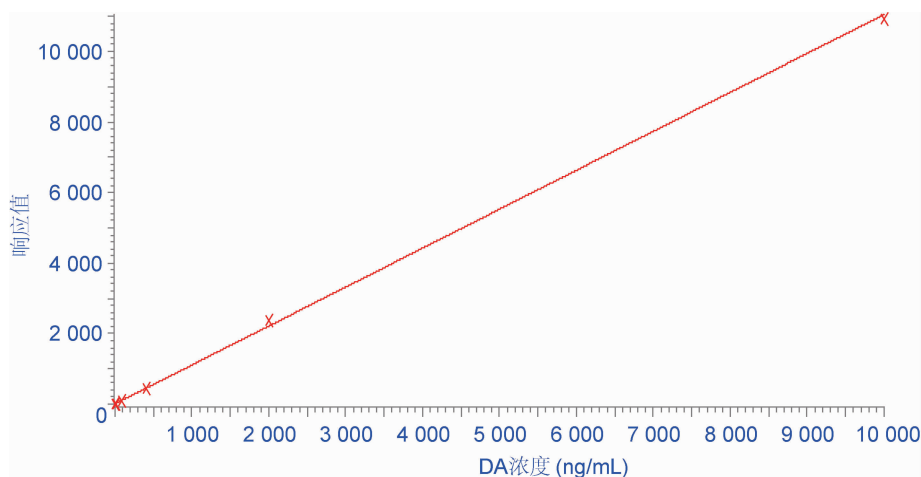


图 1 DA 标准曲线

2.2 DA 含量测定实验结果(表 2) 与正常组比较,模型组小鼠纹状体内 DA 含量降低($P < 0.01$)。与模型组比较,1、2 组纹状体内 DA 含量升高($P < 0.05$)。根据二次多项式逐步回归统计结果,得出回归方程为 $Y = 0.265 + 0.026X_2 - 0.056X_3 + 0.334 \times 10^{-3} \times X_1 \times X_3 + 0.691 \times 10^{-3} \times X_3^2$ ($r = 0.875$),得出钩藤提取物为影响药效的主因素($P < 0.01$),由回归方程预测其最佳配伍为: X_1 (刺五加提取物)=54.00, X_2 (白芍提取物)=44.88, X_3 (钩藤提取物)=82.50。

表 2 各组小鼠纹状体 DA 含量比较 (ng/mg, $\bar{x} \pm s$)		
组别	n	DA 含量
1	10	1.66 ± 0.67 *
2	10	0.96 ± 0.27 *
3	10	0.58 ± 0.19
4	10	0.41 ± 0.06
5	10	0.60 ± 0.15
6	10	0.54 ± 0.18
7	10	0.52 ± 0.13
模型	10	0.50 ± 0.08
正常	10	2.78 ± 0.62 *

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

3 验证实验 按照均匀设计确定的优化配比方案,即给予小鼠刺五加提取物 54.00 mg/(kg · d)、白芍提取物 44.88 mg/(kg · d)、钩藤提取物 82.50 mg/(kg · d)混合物做验证试验。

3.1 各组小鼠爬杆时间及自主活动次数比较(表 3) 与正常组比较,模型组小鼠的爬杆时间延长($P < 0.01$),自主活动次数降低($P < 0.01$)。与模型组比较,拜颤停复方组爬杆时间缩短($P < 0.05$),自主活动次数升高($P < 0.01$)。

表 3 各组小鼠爬杆时间及自主活动次数比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	爬杆时间(s)	自主活动次数(次/min)
正常	10	4.0 ± 1.2 **	218 ± 30 *
模型	10	5.7 ± 1.8	134 ± 40
拜颤停复方	10	4.9 ± 1.1 *	201 ± 45 *

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.2 各组小鼠纹状体 DA 含量比较(表 4) 与正常组比较,模型组 DA 含量降低($P < 0.01$)。与模型组比较,拜颤停复方组 DA 含量升高($P < 0.01$)。

表 4 各组小鼠纹状体 DA 含量比较 (ng/mg, $\bar{x} \pm s$)		
组别	n	DA 含量
正常	10	2.70 ± 0.50 *
模型	10	0.72 ± 0.14
拜颤停复方	10	2.09 ± 0.27 *

注:与模型组比较,* $P < 0.01$

讨 论

均匀设计法是将数论和多元统计相结合的一种实验设计方法,适用于多因素、多水平的实验研究。其方法是让实验点在其实验范围内充分地“均匀分散”,每个实验点具有更好的代表性,实验点的数目也可大幅度地减少,且实验结果可通过计算机处理,运用回归方程分析各因素对实验结果的影响,得出理论的最佳优化实验条件,因此具有方便、适用、预测性好的特点。目前均匀设计已广泛应用于工艺筛选,近年来也越来越多应用于复方药物筛选的研究^[6],在分析复方配伍规律的探索方面,涉及各药味对复方药效的影响,可以充分发挥均匀设计法多因素多水平的优势。该法的运用简化了实验操作,降低了实验次数,可以定量地分析各因素对试验结果的影响,定量地预报优化条件及优化结果的区间估计。

拜颤停复方是由刺五加、白芍、钩藤 3 味中药的提取物合理配伍组成,具有补气养血、熄风止痉的功效,用于 PD 的治疗。临床研究表明,白芍在治疗 PD 的处方中出现的频率排在第一位,钩藤排在第十一位^[7],可见白芍和钩藤在 PD 的临床治疗中具有重要的地位;实验研究表明,刺五加有效部位对 PD 小鼠多巴胺能神经元具有保护作用^[8],对 1-甲基-4-苯基吡啶离子诱导 PC12 细胞损伤也具有保护作用^[9],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,并对运动迟缓等 PD 症状有明显的改善作用^[10,11],钩藤对 6 羟多巴胺诱导的 PD 大鼠及 PC12 细胞毒性具有良好的神经保护作用^[12],可见以上 3 味药物均是防治 PD 的有效候选药物。

PD 动物模型有很多,其中利用 MPTP 制作的 PD 小鼠模型的症状、病理和生化指标均与人类 PD 表征相似,并且症状稳定,是目前最合适的 PD 动物模型之一^[13],已被广泛用于 PD 发病机制、诊断和治疗研究^[10,14],本实验选取此模型作为 PD 模型。

PD 主要病理特征为黑质致密部多巴胺能神经元进行性缺失和死亡,黑质-纹状体通路 DA 释放减少,纹状体 DA 含量显著降低,因而纹状体 DA 含量的变化是衡量治疗 PD 药物疗效的一个主要药效学指标,本实验即以小鼠纹状体 DA 含量为检测指标,考察拜颤停复方不同组分配比的治疗作用。

本实验在拜颤停原方的基础上将方中各味中药分别进行提取、纯化,得到精制组分,并通过均匀设计实验统计结果得出钩藤提取物为主效应组分,可见钩藤提取物量的改变对整个复方的药效起着最重要的作

用,同时预测出拜颤停复方治疗 PD 的最佳组分配比;通过对预测出的最优拜颤停复方进行验证试验进一步确证其组方合理,药效确切,干预后 PD 小鼠爬杆时间明显缩短、单位时间内自主活动次数显著增多,纹状体 DA 含量显著上升,表明本方可以改善 PD 小鼠模型四肢协调能力、抓握能力及活动能力等,由此证实拜颤停复方是具有良好前景的治疗 PD 的候选药物,同时本实验的研究模式也为中药方剂的二次开发提供新思路,即根据治疗需要利用科学的实验设计合理配伍复方组分。

综上,本研究选取经典的 MPTP 诱导小鼠模型作为 PD 动物模型,选取主要药效指标纹状体 DA 含量为检测指标,利用现代均匀设计的方法,将拜颤停复方按照组分配比的组合方式筛选出最佳组分配伍复方,用科学数据诠释了拜颤停复方的合理配伍关系。

参 考 文 献

- [1] 杨秀娟,洪燕龙,阮克锋,等. 中药治疗帕金森病临床及升高脑内多巴胺含量的研究进展[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(2): 187-191.
- [2] 陈生弟,王刚,刘军,等. 帕金森病发病机制与诊治的基础与临床研究进展[J]. 上海交通大学学报, 2012, 32(9): 1221-1226.
- [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] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部)[M]. 北京:化学工业出版社, 2015: 97, 193, 240.
- [6] 陈少东,胡义扬,冯琴,等. 基于均匀设计的祛湿化痰复

方抗脂毒性作用的主效应中药分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(5): 421-425.

- [7] 魏维,蔡晶. 帕金森病的中医证型分布及中医药治疗方药文献分析[J]. 中医杂志, 2013, 54(20): 1778-1782.
- [8] 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.
- [9] An L, Liu S, Dong Y, et al. Protective effect of effective part of *Acanthopanax senticosus* on damage of PC12 cells induced by MPP⁺ [J]. China J Chin Mater Med, 2010, 35(15): 2021-2026.
- [10] Kim HG, 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: 293-300.
- [11] Lin B. Polyphenols and neuroprotection against ischemia and neurodegeneration [J]. Mini Rev Med Chem, 2011, 11(14): 1222-1238.
- [12] Shima JS, Kima HG, Jua MS, 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.
- [13] 裴媛,马进,李娜. 帕金森病模型的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(2): 543-547.
- [14] Rekha KR, Selvakumar GP. Gene expression regulation of Bcl2, Bax and cytochrome C by geraniol on chronic MPTP/probenecid induced C57BL/6 mice model of Parkinson's disease[J]. Chem Biol Interact, 2014, 217: 57-66.

(收稿:2015-04-28 修回:2015-09-30)

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅