

定振丸对帕金森病大鼠神经递质及黑质多巴胺能神经元氧化应激的改善作用

霍绮雯, 谭 峰, 林东雄, 金培群
(广东省佛山市中医院, 广东 佛山 528000)

摘要: **目的** 探讨定振丸对帕金森病大鼠儿茶酚胺类神经递质及黑质多巴胺能神经元氧化应激的改善作用。**方法** 利用 6-羟多巴胺建立帕金森病大鼠模型, 大鼠随机分为假手术组, 模型组, 定振丸低、中、高剂量组 (11.03、22.05、44.10 mg/kg) 及阳性组 (美多芭 1.67 mg/kg), 1 次/d, 连续灌胃给药 15 d。ELISA 法检测脑黑质中 DA、DOPAC、HVA、5-HT 水平; 应用硫代巴比妥那比色法、邻苯三酚自氧化法和二硫代二硝基苯甲酸直接法分别检测脑黑质匀浆上清液中 MDA、SOD 及 GSH-Px 水平; 免疫组化法检测 TH 阳性率; TUNEL 染色检测多巴胺能神经元细胞凋亡率; Western blot 法检测 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 定振丸组 DA、DOPAC、HVA、5-HT、SOD、GSH-Px 水平, TH 阳性率及 Bcl-2 蛋白表达均升高 ($P<0.05$); MDA 水平、多巴胺能神经元凋亡率、Bax 及 caspase-3 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。**结论** 定振丸能改善帕金森病大鼠儿茶酚胺类神经递质及黑质多巴胺能神经元氧化应激的作用, 下调 Bax、caspase-3 蛋白表达, 上调 Bcl-2 蛋白表达, 从而促进 TH 表达、抑制多巴胺能神经元凋亡。**关键词:** 定振丸; 帕金森; 神经递质; 神经元氧化应激; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)03-0604-07
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.03.011

Effects of Dingzhen Pills on neurotransmitters and oxidative stress of nigrodopaminergic neurons of rat models of Parkinson’ s disease

HUO Qi-wen, TAN Feng, LIN Dong-xiong, JIN Pei-qun
(Foshan Hospital of TCM, Foshan 528000, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of Dingzhen Pills on neurotransmitters and oxidative stress of nigrodopaminergic neurons of rat models of Parkinson’ s disease. **METHODS** A rat model of Parkinson’ s disease was established using 6-hydroxydopamine. Rats were randomly divided into sham operation group, model group, low-dose, medium-dose, and high-dose Dingzhen Pills groups (11.03, 22.05, 44.10 mg/kg) and positive Medocor group (1.67 mg/kg), for 14-day corresponding intragastric administration once daily. The levels of DA, DOPAC, HVA and 5-HT in the substantia nigra were measured by ELISA, the levels of MDA, SOD and GSH-Px in supernatant of brain homogenate were detected by thiobarbital nabil assay, pyrogallol autooxidation assay and dithionitrobenzoic acid direct assay. The rats were also subjected to determination of TH positive rate by immunohistochemical method, apoptosis rate of dopaminergic neurons by TUNEL staining, and detection of protein expressions of Bax, Bcl-2 and caspase-3 by Western blot. **RESULTS** Compared with the model group, Dingzhen Pills groups shared increased levels of DA, DOPAC, HVA, 5-HT, SOD, GSH-Px, TH positive rate and Bcl-2 protein expression ($P<0.05$); decreased MDA levels, dopaminergic neurons apoptosis rate, Bax and caspase-3 protein expression ($P<0.05$). **CONCLUSION** Dingzhen Pills can improve the oxidative stress of catecholamine neurotransmitters and substantia nigra dopaminergic neurons in rat models of Parkinson’ s disease, down-regulate the expres-

收稿日期: 2019-06-01
基金项目: 国家自然科学基金 (81072974, 81473470, 81774423); 佛山市医学类科技攻关项目 (2017AB002771)
作者简介: 霍绮雯 (1981—), 女, 硕士, 副主任中医师, 从事帕金森病与运动障碍性疾病的研究。Tel: (0757) 83303773, E-mail: chachahqw@163.com

sion of Bax and caspase-3 protein, and up-regulate the expression of Bcl-2 protein, thereby promoting TH expression and inhibiting dopaminergic Neuron apoptosis.

KEY WORDS: Dingzhen Pills; Parkinson's disease; neurotransmitters; neuronal oxidative stress; apoptosis

帕金森是临床中常见的锥体外系统疾病，中老年人群是高发群体。临床调查发现，我国 65 岁以上人群帕金森发病率约 1.70%，以肌强直、静止性震颤等运动异常为典型表现，且伴随睡眠障碍、抑郁等非运动表现，对患者的生活造成严重影响^[1]。目前帕金森病仍无根治方法，常采用美多芭干预治疗，短期内可获得较好疗效，但长期用药可出现疗效波动或减退、不良反应增加的情况^[2]。近年来，中医药在多种慢性疾病的治疗中表现出疗效好的优点，在临床中获得广泛认可。帕金森病属中医“颤证”范畴，多由肝肾阴虚引起，治疗应以补肝益肾、熄风止痉为主^[3]。定振丸方出自《证治准绳·类方》，具有养血柔筋、熄风止痉的功效，临床中已有应用定振丸加减方治疗帕金森病的报道^[4]，但关于定振丸对帕金森儿茶酚胺类神经递质及黑质多巴胺能神经元氧化应激的影响及机制研究尚少。为此，本研究观察定振丸对帕金森大鼠儿茶酚胺类神经递质及黑质多巴胺能神经元氧化应激的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠，75 只，8 周龄，体质量 (200±20) g，购自南京大学模式动物研究所，生产许可证号 SCXK (苏) 2018-0001。

1.2 药物和试剂 中药药材 (天麻、秦艽、全蝎、生地、熟地、当归、川穹、白芍、防风、白术、黄芪、石决明、生牡蛎、钩藤) 均由广州至信中药饮片有限公司提供，符合《中国药典》2015 年版一部质量标准。美多芭片 (0.25 mg，上海罗氏制药有限公司，国药准字 H10930198，批号 SH2282)；多巴胺 (DA) ELISA 检测试剂盒 (美国 R&D 公司，批号 201503)；二羟基苯乙酸 (DOPAC) ELISA 检测试剂盒 (美国 R&D 公司，批号 201503)；高香草酸 (HVA) ELISA 检测试剂盒 (美国 R&D 公司，批号 201503)；5-羟色胺 (5-HT) ELISA 检测试剂盒 (美国 R&D 公司，批号 201503)；二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司，批号 123115160511)；酪氨酸羟化酶 (TH) 免疫组化试剂盒 (美国 Sigma 公司，批号 101M4796)；丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所，

批号 20161120)；超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所，批号 20160614)；谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所，批号 20161122)；原位凋亡检测 (TUNEL 法) 试剂盒 (瑞士罗氏公司，批号 11684817910)；Bcl-2 (英国 Abcam 公司，货号 ab59348)；Bax 单抗 (英国 Abcam 公司，货号 ab182733)、山羊抗兔 Bcl-2 (英国 Abcam 公司，批号 ab97051)、Bax 多抗 (二抗，英国 Abcam 公司，货号 ab7832)。

1.3 仪器 SM2235R 切片机 (徕卡显微系统贸易公司)，电泳仪、ChemiDoc XRS 化学发光成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 定振丸制备 定振丸由天麻 10 g、秦艽 10 g、全蝎 9 g、生地 12 g、熟地 15 g、当归 12 g、川穹 10 g、白芍 15 g、防风 9 g、白术 15 g、黄芪 15 g、石决明 20 g、生牡蛎 20 g (先煎)、钩藤 15 g (后下) 组成。加 500 mL 蒸馏水浸泡 30 min 后慢煎 90 min，重复 2 次，合并 2 次水煎液，用高压旋转蒸发仪将其浓缩至 200 mL，使生药质量浓度为 9.3 g/mL。

2.2 帕金森大鼠模型建立及分组干预 取 75 只 Wistar 大鼠，1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后，立体仪上固定，颅顶去毛备皮，消毒后沿正中切开颅顶皮肤，暴露前囟，定位纹状体，标出注药点 1 (前囟前 0.8 mm、中线右 3.0 mm)，注药点 2 (前囟后 0.2 mm、中线右 2.7 mm、硬膜下 5 mm)，牙科钻在标注带开直径 2 mm 小孔。其中 65 大鼠只用微量注射器在 2 个注药点分别注射 2 μg/μL 含 0.2% 抗坏血酸的 6-羟多巴胺 (6-OHDA) 各 5 μL。剩余 10 大鼠作为假手术组，注射等量生理盐水，术后常规给予青霉素抗感染。造模 1 周后，腹腔注射 0.5 mg/kg 阿扑吗啡诱发旋转行为，观察大鼠向左侧逆时针旋转速度>210 r/30 min 则造模成功^[5]。将造模成功大鼠随机分为模型组、阳性组、定振丸低、中、高剂量组。根据体表面积法计算大鼠相当于成人的临床等效剂量，低、中、高剂量组大鼠分别给予相当于成人 1/2、1、2 倍的临床等效剂量 (生药 11.03、22.05、44.10 g/kg) 的定振丸混悬

液灌胃给药，模型组和假手术组分别灌胃等体积生理盐水，阳性组给予浓度为 25 mg/mL 的美多芭混悬液 1.67 mg/kg（溶剂为生理盐水）灌胃，连续灌胃 15 d。

2.3 组织取材 治疗 15 d 后脱颈法处死所有大鼠，迅速取出大脑，在冰面分离切取包含脑黑质的脑组织，放入 4% 多聚甲醛中固定，取部分大脑黑质置于-80 ℃保存备用。

2.4 儿茶酚胺类神经递质检测 取大脑黑质，加入磷酸盐缓冲液（PBS），制备组织匀浆液，超声破碎后，放于 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，取上清液，0.22 μm 滤膜过滤，严格按照试剂盒说明书步骤操作，采用 ELISA 法检测脑黑质中 DA、DOPAC、HVA、5-HT 水平。

2.5 脑黑质 MDA、SOD、GSH-Px 检测 取大脑黑质匀浆上清液，采用 MDA、SOD 及 GSH-Px 检测试剂盒，分别应用硫代巴比妥那比色法、邻苯三酚自氧化法和二硫代二硝基苯甲酸法检测脑黑质匀浆上清液中 MDA、SOD 及 GSH-Px 的水平。

2.6 脑黑质 TH 表达检测 取固定脑组织，经酒精梯度脱水，二甲苯透明后，常规制作石蜡切片（厚度为 4 μm 的冠状位切片），然后进行一步法免疫组化染色。切片常规脱蜡，然后用 3% H₂O₂ 孵育 10 min，PBS 冲洗 3 次，3 min/次，然后滴加 50 μL 山羊血清工作液，室温孵育 10 min 后立即滴加一抗（1：500）4 ℃摇床过夜，PBS 冲洗 3 次，3 min/次，滴加生物素化二抗（1：5 000），室温孵育 15 min 后 PBS 冲洗 3 次，3 min/次，显色剂显色后，蒸馏水冲洗，封片。显微镜下观察脑黑质，采用图像分析软件 Image-pro Plus 5.0，每张切片取 5 个不同视野，计算 TH 阳性细胞率。

2.7 黑质中多巴胺能神经元细胞凋亡水平检测 取脑组织石蜡切片，脱蜡至水后，每张切片滴加 50 μL 现配蛋白酶 K 肠胃孵育 15 min，PBS 冲洗后晾干，保鲜膜覆盖放置于 0.3% H₂O₂ 甲醇溶液，室温放置 5 min，然后用 PBS 冲洗 2 次、2 min/次，擦干周围液体，滴加 50 μL 末端脱氧核苷酸转移酶标记（TUNEL）工作液（含 TDT 酶 1 μL、荧光素标记 dUTP 49 μL），于 37 ℃避光 60 min，PBS 洗涤 3 次、2 min/次，擦干后，滴加 50 μL SA-HRP 工作液，37 ℃孵育 30 min，加入 DAB 显色液显色，蒸馏水终止，滴加苏木素复染，自来水冲洗，常规脱水、待透明后，用中性树脂封片。显微镜观察脑黑质，细胞染色为棕黄色或棕色判定凋亡细

胞，计算细胞凋亡率。

2.8 脑黑质中 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达检测 取液氮研磨脑黑质组织，加入 50 μL 细胞裂解液，置于沸水浴 8 min，离心后取上清液，BCA 法测定蛋白总量。取 50 μg 样品加入等体积上扬缓冲液，沸水浴 3 min，然后 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液，进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 60 min 后，蛋白转至硝酸纤维素膜 NC 膜，加入封闭液室温放置 2 h，加入一抗（1：1 000）4 ℃摇床孵育过夜，洗涤液冲洗后加入二抗（1：5 000），常温孵育 30 min，暗室中显影。以凝胶成像系统扫描拍照，并进行灰度值分析，以目的蛋白与内参 β-actin 的灰度值比值代表目的蛋白的相对表达量。

2.9 统计学分析 采用 SPSS21.0 统计软件进行分析，计量资料以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状态 75 只大鼠共 65 只参与造模（10 只进行假手术），造模成功率为 76.92%，其中 7 只大鼠向左侧逆时针旋转速度 < 210 r/30 min，5 只未苏醒或苏醒后死亡，剔除实验；假手术组 10 只均存活参与后续实验。假手术组大鼠饮食、活动状况均正常；模型组大鼠背毛黯淡无光、精神萎靡、喜卧、采食量下降，均出现肌肉震颤、抖动及四肢僵硬等典型帕金森症状，随着时间的延长，上述状态更加严重，部分大鼠出现惊厥或濒死状态；定振丸各剂量组随着干预时间的延长症状缓解，精神及活动状态有所改善，但仍较假手术组差，其中定振丸中剂量组与阳性组大鼠状态相似，定振丸高剂量大鼠状态最好，无惊厥和濒死状态。

3.2 儿茶酚胺类神经递质水平 与假手术组比较，模型组儿茶酚胺类神经递质 DA、DOPAC、HVA、5-HT 水平降低（ $P < 0.05$ ）；与模型组比较，定振丸低、中、高剂量组和阳性组均能以上指标均升高（ $P < 0.05$ ）。见表 1。

3.3 脑黑质 SOD、MDA、GSH-Px 水平 与假手术组比较，模型组 SOD、GSH-Px 水平降低，MDA 水平升高（ $P < 0.05$ ）；与模型组比较，定振丸低、中、高剂量组和阳性组 SOD、GSH-Px 水平升高，MDA 水平降低（ $P < 0.05$ ）。见表 2。

3.4 脑黑质 TH 阳性率及多巴胺能神经元凋亡率 与假手术组比较，模型组 TH 阳性率降低，

表 1 定振丸对儿茶酚胺类神经递质水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Tab. 1 Effects of Dingzhen Pills on the levels of catecholamine neurotransmitters ($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

组别	动物数/只	DA	DOPAC	HVA	5-HT
假手术组	10	4.45±0.58	25.16±2.87	30.12±3.48	3.81±0.38
模型组	10	1.50±0.24 [*]	11.38±1.10 [*]	13.44±1.52 [*]	2.10±0.21 [*]
阳性组	10	2.90±0.55 [#]	17.23±2.04 [#]	19.58±2.08 [#]	3.02±0.31 [#]
定振丸低剂量组	10	2.04±0.35 [#]	14.79±1.84 [#]	16.80±1.89 [#]	2.68±0.26 [#]
定振丸中剂量组	10	2.93±0.54 ^{#▲}	17.20±1.95 ^{#▲}	19.55±2.04 ^{#▲}	3.01±0.30 ^{#▲}
定振丸高剂量组	10	3.65±0.68 ^{#▲※}	19.35±2.08 ^{#▲※}	24.38±2.50 ^{#▲※}	3.44±0.32 ^{#▲※}

注:与假手术组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与定振丸低剂量组比较,[▲] $P<0.05$;与定振丸中剂量组比较,[※] $P<0.05$ 。

表 2 定振丸对对脑黑质 SOD、MDA、GSH-Px 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Effects of Dingzhen Pills on SOD, MDA, GSH-Px levels in brain substantia nigra ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	SOD/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	MDA/($\text{mmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	GSH-Px/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)
假手术组	10	187.10±20.15	2.04±0.24	75.10±8.04
模型组	10	95.42±9.37 [*]	6.54±1.03 [*]	27.26±3.19 [*]
阳性组	10	140.08±16.85 [#]	4.20±0.65 [#]	46.21±5.27 [#]
定振丸低剂量组	10	113.78±12.84 [#]	5.19±0.84 [#]	34.38±3.78 [#]
定振丸中剂量组	10	141.37±15.80 ^{#▲}	4.22±0.60 ^{#▲}	46.10±5.29 ^{#▲}
定振丸高剂量组	10	162.10±17.55 ^{#▲※}	3.17±0.52 ^{#▲※}	52.64±6.47 ^{#▲※}

注:与假手术组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与定振丸低剂量组比较,[▲] $P<0.05$;与定振丸中剂量组比较,[※] $P<0.05$ 。

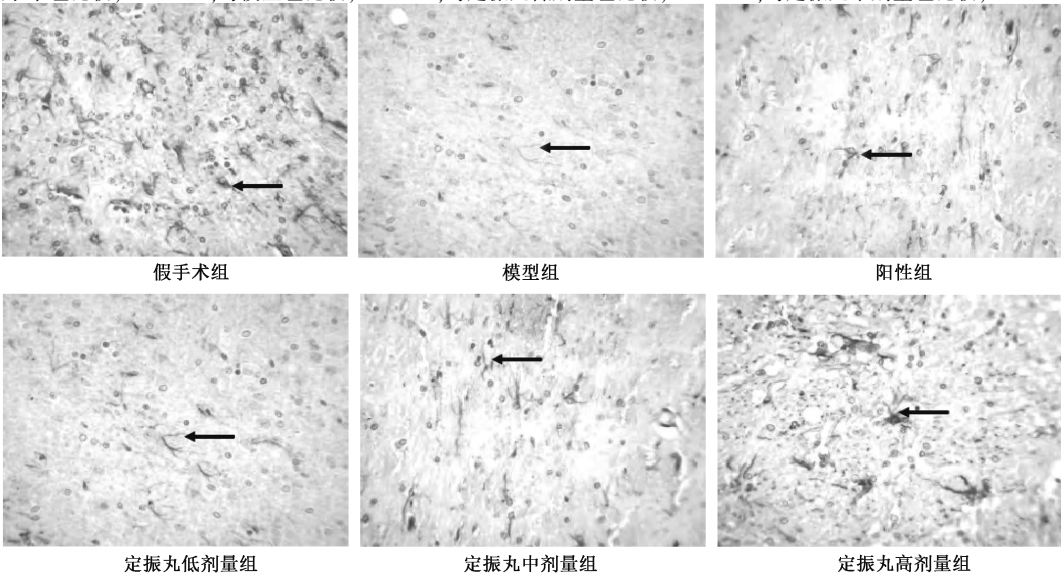
DN 凋亡率升高 ($P<0.05$), 与模型组比较, 定振 DN 凋亡率降低 ($P<0.05$)。见表 3, 图 1~2。
丸低、中、高剂量组和阳性组 TH 阳性率升高,

表 3 定振丸对脑黑质 TH 表达及多巴胺能神经元凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 3 Effects of Dingzhen Pills on TH expression in brain substantia nigra and apoptosis of dopaminergic neurons ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	TH 阳性率/%	多巴胺能神经元凋亡率/%
假手术组	10	30.17±3.22	10.31±1.02
模型组	10	10.64±1.18 [*]	42.74±4.50 [*]
阳性组	10	19.20±2.13 [#]	30.23±3.12 [#]
定振丸低剂量组	10	15.80±1.94 [#]	35.11±3.68 [#]
定振丸中剂量组	10	19.21±2.06 ^{#▲}	30.15±3.06 ^{#▲}
定振丸高剂量组	10	25.40±2.51 ^{#▲※}	21.35±2.68 ^{#▲※}

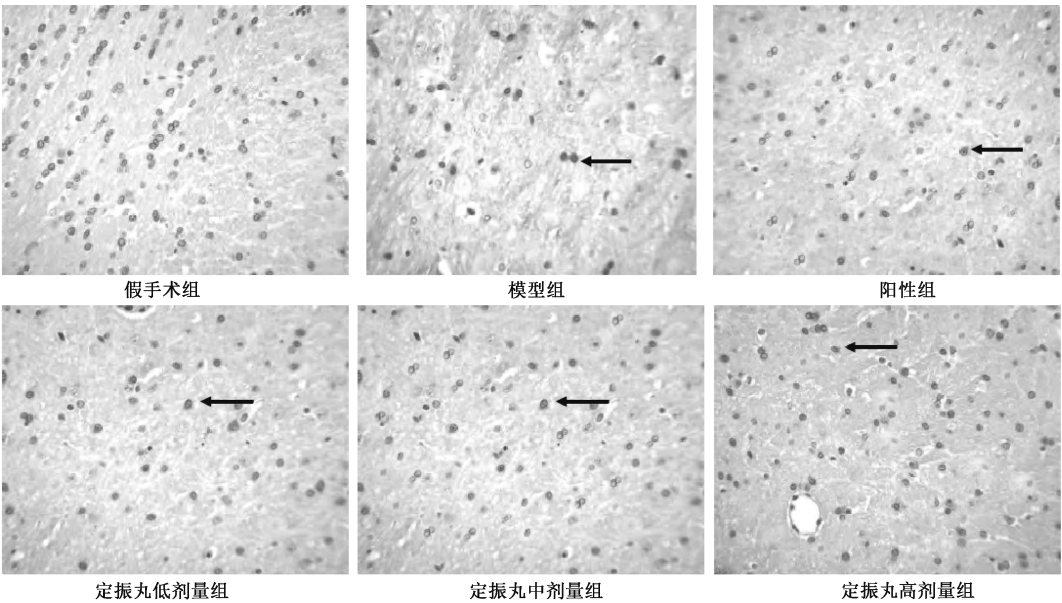
注:与假手术组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与定振丸低剂量组比较,[▲] $P<0.05$;与定振丸中剂量组比较,[※] $P<0.05$ 。



注:箭头所指为 TH 阳性表达。

图 1 脑黑质中 TH 阳性表达 (SP, $\times 100$)

Fig. 1 TH positive expression in the substantia nigra (SP, $\times 100$)



注：箭头所指为凋亡细胞。

图 2 脑黑质中多巴胺能神经元凋亡 (TUNEL, ×100)

Fig. 2 Apoptosis of dopaminergic neurons in the substantia nigra (TUNEL, ×100)

3.5 脑黑质 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达 与假手术组比较，模型组 Bcl-2 蛋白表达降低，Bax、caspase-3 蛋白表达升高 (P<0.05)，与模型组比，

定振丸低、中、高剂量组和阳性组 Bcl-2 蛋白表达升高，Bax、caspase-3 蛋白表达降低 (P<0.05)。见表 4、图 3。

表 4 定振丸对脑黑质中 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达的影响 (x̄±s)

Tab. 4 Effects of Dingzhen Pills on Bax, Bcl-2, caspase-3 protein expression in brain substantia nigra (x̄±s)				
组别	动物数/只	Bax	Bcl-2	caspase-3
假手术组	10	0.54±0.06	1.64±0.21	0.36±0.05
模型组	10	1.94±0.23 *	0.36±0.05 *	1.51±0.18 *
阳性组	10	1.05±0.13 #	0.95±0.12 #	0.89±0.10 #
定振丸低剂量组	10	1.35±0.20 #	0.67±0.08 #	1.32±0.15 #
定振丸中剂量组	10	1.02±0.15 #▲	0.98±0.11 #▲	0.88±0.09 #▲
定振丸高剂量组	10	0.70±0.08 #▲※	1.15±0.17 #▲※	0.50±0.06 #▲※

注：与假手术组比较，* P<0.05；与模型组比较，# P<0.05；与定振丸低剂量组比较，▲ P<0.05；与定振丸中剂量组比较，※ P<0.05。

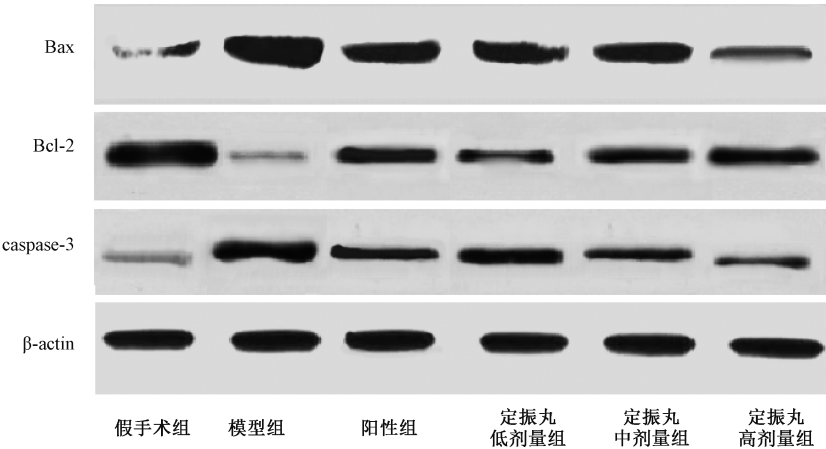


图 3 蛋白免疫印迹图

Fig. 3 Picture of Western blot

4 讨论

帕金森属于慢性进展性神经系统退化疾病，帕金森发病机制复杂，一旦发病则需终身干预治疗^[6-7]。美多芭由左旋多巴和周围脱羧酶抑制剂苄丝肼组成，为老年帕金森患者的常用药^[8]，近期疗效确切，但无法逆转病情进展，且药物的不良反应明显，远期效果多不理想。帕金森属于中医“颤证”范畴，以老年久病者多发，长期气血阴液匮乏、肝肾亏虚，导致阴虚阳盛、虚风内动，治疗关键在于养血柔筋。

本研究发现，定振丸干预后帕金森大鼠症状均有所缓解，且各剂量组儿茶酚胺类神经递质水平、SOD水平、GSH-Px水平、TH阳性率均升高，MDA水平、多巴胺能神经元凋亡率均降低，提示定振丸对帕金森儿茶酚胺类神经递质及黑质多巴胺能神经元氧化应激均有改善作用，高剂量组定振丸效果最好。定振丸方中天麻、熟地为君药，平肝熄风；黄芪为臣药，健脾益气；当归、白芍、白术、川穹为佐药，养血补精、荣养筋脉；秦艽、防风、全蝎为佐药，辛温发散、祛风通络，诸药合用，共奏平肝熄风、养血柔筋之效^[9]。帕金森患者脑损伤后儿茶酚胺类神经递质DA、DOPAC、HVA、5-HT水平会异常升高^[10]，其升高后可造成神经元细胞损伤。定振丸方中含有当归，当归水提取物中含有的有机酸类、多炔类等成分具有营养神经和调节神经递质水平的作用^[11]。在患者帕金森病情进展中，脑组织中氧自由基大量产生，而氧自由基清除系统的缺陷可导致脑组织持续受到过氧化物损伤，引起黑质多巴胺能神经元死亡^[12-13]。另有研究发现^[14]，黄芪水提物预处理后可改善大鼠肠系膜缺血再灌注后氧化应激损伤，提示黄芪中的有效成分可能参与调节氧化应激水平。

此外，本研究中，定振丸各剂量组脑黑质Bcl-2蛋白表达升高，Bax、caspase-3蛋白表达量降低，提示定振丸对帕金森神经递质及氧化应激的改善作用可能与下调Bax、caspase-3、上调Bcl-2蛋白表达，从而增加TH免疫反应阳性神经元数目、抑制多巴胺能神经元凋亡有关。TH是酪氨酸羟化作用合成多巴胺的关键限速酶，是多巴胺能神经元免疫组化的标记酶^[15]。既往研究证实^[16]，帕金森发病过程中伴随多巴胺能神经元持续凋亡，而线粒体依赖性细胞凋亡途径是典型凋亡通路。Bcl-2主要分布在线粒体中，通过调控膜电位传递、减少钙离子释放等途径，发挥抗凋亡作用，Bax通过竞争

性抑制Bcl-2活性，激活下游caspase-3，发挥促凋亡作用^[17]。本研究中应用定振丸干预后，大鼠脑黑质中TH阳性表达水平升高，且多巴胺能神经元凋亡水平下降，推测定振丸可能通过上调Bcl-2蛋白表达，并且下调Bax蛋白表达，从而减少线粒体功能障碍，阻断下游凋亡信号传导，进而减少脑黑质中多巴胺能神经元的变性丢失和脑神经元氧化应激损伤，最终起抑制脑损伤作用。

综上所述，定振丸具有改善帕金森大鼠神经递质及黑质多巴胺能神经元氧化应激的作用，其中高剂量定振丸效果最佳，可能与下调Bax、caspase-3、上调Bcl-2蛋白表达水平，从而增加TH免疫反应阳性神经元数目、抑制多巴胺能神经元凋亡有关，但是否存在其他调控通路尚不确定，再进一步的研究中应深入探讨。

参考文献：

[1] 胡以松. 从流行病学的角度看待我国的帕金森病筛查[J]. 诊断学理论与实践, 2016, 15(2): 118-121.

[2] Vasta R, Nicoletti A, Mostile G, et al. Side effects induced by the acute levodopa challenge in Parkinson's Disease and atypical parkinsonisms[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172145.

[3] 高丽丽, 吴松鹰, 吴成翰, 等. 一贯煎治疗肝肾阴虚型老年帕金森病的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(7): 788-790.

[4] 黄宗文, 袁 勇, 宫爱民, 等. 定振丸加减速联合醒脑开窍针刺法治疗帕金森病的随机对照观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 190-195.

[5] 周厚广, 陆建明, 鲍远程, 等. 6-羟基多巴胺帕金森病大鼠模型的建立与评价[J]. 中国行为医学与脑科学, 2002, 11(1): 4-7.

[6] Monzani E, Nicolis S, Dell' Acqua S, et al. Dopamine, oxidative stress and protein-quinone modifications in Parkinson's and other neurodegenerative diseases[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(20): 6512-6527.

[7] Nombela C, Lozano A, Villanueva C, et al. Simultaneous Stimulation of the Globus Pallidus Interna and the Nucleus Basalis of Meynert in the Parkinson-Dementia Syndrome [J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2019, 47(1-2): 19-28.

[8] Fanni S, Scheggi S, Rossi F, et al. 5α-reductase inhibitors dampen L-DOPA-induced dyskinesia via normalization of dopamine D1-receptor signaling pathway and D1-D3 receptor interaction[J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 121: 120-130.

[9] 古春青, 金 杰. 滋肾疏肝、清热养血法治疗帕金森病临床研究[J]. 中医学报, 2017, 32(7): 1257-1261.

[10] Kulikova O I, Berezhnoy D S, Stvolinsky S L, et al. Neuroprotective effect of the carnosine- α-lipoic acid nanomicellar complex in a model of early-stage Parkinson's disease [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2018, 95: 254-259.

[11]

刘亚敏, 李寒冰, 吴宿慧, 等. 当归水提物对小鼠的抗抑郁作用研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 106-109.

[12]

Yue P, Gao L, Wang X, *et al.* Pretreatment of glial cell-derived neurotrophic factor and geranylgeranylacetone ameliorates brain injury in Parkinson’ s disease by its anti-apoptotic and anti-oxidative property[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7): 5491-5502.

[13]

Mesika R, Reichmann D. When safeguarding goes wrong: impact of oxidative stress on protein homeostasis in health and neurodegenerative disorders[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2019, 114: 221-264.

[14]

裴志萍, 牛文革, 柴静波, 等. 黄芪预处理对大鼠肠系膜缺血再灌注损伤后氧化应激和炎症反应的抑制作用[J]. 中国中医急症, 2016, 25(6): 967-970.

[15]

Albert K, Voutilainen M H, Domanskyi A, *et al.* Downregulation of tyrosine hydroxylase phenotype after AAV injection above substantia nigra: caution in experimental models of Parkinson’ s disease [J]. *J Neurosci Res*, 2019, 97(3): 346-361.

[16]

Perier C, Tieu K, Guégan C, *et al.* Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(52): 19126-19131.

[17]

Haddadi R, Nayebi A M, Eyvari Brooshghalan S. Silymarin prevents apoptosis through inhibiting the Bax/caspase-3 expression and suppresses toll like receptor-4 pathway in the SNc of 6-OH-DA intoxicated rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 127-136.

四君子颗粒对大鼠糖尿病前期的改善作用

唐保露, 张旭, 袁萍, 朱元美, 杨解人, 郑书国*
(皖南医学院药理学教研室, 安徽 芜湖 241002)

摘要: **目的** 探讨四君子颗粒对大鼠糖尿病前期的改善作用。**方法** 采用高糖高脂饮食建立糖尿病前期大鼠模型, 随机分为正常组、模型组、四君子颗粒高、低剂量组 (10.50、5.25 g/kg), 连续灌胃 10 周。分别于第 2、4、6、8、10 周末检测 FBG、FINS、GHb 水平并计算 Homa-IR, 第 10 周末采用 TUNEL 染色法检测胰岛细胞凋亡水平, Western blot 法检测胰腺组织 p-PERK、GRP78、ATF4、CHOP 蛋白表达。**结果** 糖尿病前期大鼠 FBG、GHb、FINS 水平及 Homa-IR 均升高 ($P<0.01$), 胰岛中凋亡细胞增多, 胰腺组织 p-PERK、GRP78、ATF4、CHOP 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。给予四君子颗粒后, 血清 FBG、GHb、FINS 水平和 Homa-IR 降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 胰岛细胞凋亡减少, 同时, 胰腺组织 p-PERK、GRP78、ATF4、CHOP 蛋白表达下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 四君子颗粒可明显改善大鼠糖尿病前期状态, 其机制可能与减轻糖尿病前期大鼠胰岛素抵抗、抑制内质网应激诱导的胰岛细胞凋亡有关。

关键词: 四君子颗粒; 糖尿病前期; 胰岛素抵抗; 内质网应激; 凋亡

中图分类号: **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)03-0610-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.03.012

Effects of Sijunzi Granules on prediabetes in rats

TANG Bao-lu, ZHANG Xu, YUAN Ping, ZHU Yuan-mei, YANG Jie-ren, ZHENG Shu-guo*
(Department of Pharmacology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effect of Sijunzi Granules on prediabetes improvement in rats. **METHODS** A prediabetic rat model was established using a high-sugar and high-fat diet feeding. The rats were randomly divided into normal group, model group, high-dose and low-dose Sijunzi Granules groups (10.50, 5.25 g/kg) for 10-week consecutive gavage. FBG, FINS, and GHb levels were detected and Homa-IR was calcu-

收稿日期: 2017-09-16

基金项目: 安徽省高校省级自然科学研究重点项目 (KJ2015A192); 中国医药教育协会孙思邈中医药科研专项课题 (2016SKT-M033); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201810368007)

作者简介: 唐保露 (1994—), 男, 硕士生, 研究方向为临床药理学。Tel: (0553) 3932464, E-mail: 1171727113@qq.com

* 通信作者: 郑书国 (1967—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为临床药理学。Tel: (0553) 3932464, E-mail: zhengsg2000@163.com