

## ◆古籍古方研究◆

## 补阳还五汤对帕金森病大鼠药理作用及 JNK 通路调控作用研究

金蓉蓉

温岭市第一人民医院, 浙江 温岭 317515

**[摘要]** 目的: 分析补阳还五汤对帕金森病大鼠的药理作用及对 c-jun 氨基末端激酶 (c-jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路的调控作用。方法: 用 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine hydrobromide, 6-OHDA) 建立帕金森病大鼠模型, 并灌注补阳还五汤治疗。检测其行为学, 并以免疫组化法检测黑质内酪氨酸羟化酶 (Tyrosine hydroxylase, TH)、胞外信号调节的蛋白激酶磷酸化 c-jun (phosphorylated c-jun, p-c-jun) 和半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 的含量, 分析补阳还五汤对模型大鼠及对 JNK 通路的药理作用。结果: 与空白组比较, 模型组有明显的旋转行为 ( $P < 0.01$ ), 黑质内 TH 表达显著减少, 而 p-c-jun 和 Caspase-3 表达显著增多 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 治疗组大鼠行为学有所改善, 黑质内 TH 表达增多, 而 p-c-jun 和 caspase-3 表达减少但仅 28 天治疗组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 补阳还五汤可改善帕金森病大鼠的行为学, 对帕金森病大鼠有一定的保护作用, 这可能与抑制 JNK 通路的异常激活和黑质内黑质神经元的凋亡有关。

**[关键词]** 帕金森病; 补阳还五汤; c-jun 氨基末端激酶 (JNK) 通路; 动物实验; 大鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 05-0072-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.05.021

## Pharmacological Effect of Buyang Huanwu Tang on Rats with Parkinson's Disease and Its Regulatory Effect on JNK Pathway

JIN Rongrong

**Abstract:** Objective: To analyze the pharmacological effect of Buyang Huanwu tang on rats with Parkinson's disease and its regulatory effect on c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. **Methods:** The model of rats with Parkinson's disease was established by using 6-hydroxydopamine hydrobromide (6-OHDA). They were treated with Buyang Huanwu tang via perfusion. Detected their behavior, measured the contents of tyrosine hydroxylase (TH), phosphorylated extracellular signal-regulated kinase c-jun (p-c-jun) and cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (Caspase-3) in substantia nigra by immunohistochemistry, and analyzed the pharmacological effect of Buyang Huanwu tang on model rats and JNK pathway. **Results:** Comparing with the blank group, significant rotational behavior occurred in the model group ( $P < 0.01$ ), the expression of TH in substantia nigra was significantly decreased, and expressions of p-c-jun and Caspase-3 were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Comparing with the model group, there was significant improvement in behavior of rats in the treatment group, the expression of TH in substantia nigra was increased, and expressions of p-c-jun and Caspase-3 were decreased, but only the group after 28 days treatment has significant difference ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Buyang Huanwu tang can improve the behavior of rats with Parkinson's disease, which has certain protective effect on rats with Parkinson's disease. Its functional mechanism may be related to inhibiting the abnormal activation of JNK pathway and apoptosis of substantia nigra neurons.

**Keywords:** Parkinson's disease; Buyang Huanwu tang; c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway; Animal experiment; Rats

帕金森病是中老年人常见的中枢神经系统疾病, 目前我国 60 岁以上老人中约有 1%~2% 的帕金森病患者<sup>[1]</sup>。帕金森病

**[收稿日期]** 2018-10-15

**[基金项目]** 2016 年台州市椒江区科技计划项目 (162056)

**[作者简介]** 金蓉蓉 (1991-), 女, 药师, 研究方向: 药理学和毒理学。

的中医发病机制以肝肾亏虚为本,风、痰、瘀为标,其治疗基本偏于补虚而轻于祛邪<sup>[2]</sup>。补阳还五汤出自清代名医王清任的《医林改错》,有补气、活血、通络的功效<sup>[3]</sup>。研究证明对帕金森病患者以补阳还五汤加减,可改善患者症状,减小抗胆碱药物的用量与副作用,提高抗胆碱药物的疗效和耐受性,改善患者的生活质量<sup>[4]</sup>。

尽管众多研究证明补阳还五汤对帕金森病患者有较好的临床效果,临床却鲜有相关药理学及其机制研究。帕金森病的发生和发展可能与c-jun氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK)通路的异常激活以及黑质区细胞凋亡的发生有关。通过抑制JNK通路的异常激活以及黑质区细胞凋亡的发生,对帕金森病有较好的疗效。酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH)是儿茶酚胺类神经递质合成的限速酶,也是多巴胺能神经元的标记物,多巴胺能神经元损伤越严重,黑质内TH的含量就越低<sup>[5-6]</sup>。通过免疫组化检测各组大鼠损伤侧黑质区TH的表达量,分析补阳还五汤对多巴胺能神经元的保护作用。胞外信号调节的蛋白激酶c-jun是JNK通路上的重要调节蛋白,其磷酸化蛋白磷酸化c-jun(phosphorylated c-jun, p-c-jun)的含量与JNK通路的激活程度呈正相关<sup>[7-8]</sup>。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)是细胞凋亡级联反应的重要成员之一,其表达量和激活程度与细胞凋亡程度亦呈正相关<sup>[9-10]</sup>。本研究通过免疫组化检测各组大鼠右侧黑质区p-c-jun和Caspase-3的含量,研究各组大鼠黑质区JNK通路的激活程度和黑质区的细胞凋亡程度,分析补阳还五汤对JNK通路和大鼠黑质细胞凋亡程度的影响。拟探讨补阳还五汤对帕金森病大鼠行为学、JNK信号通路的激活程度以及黑质神经元凋亡程度的影响,分析补阳还五汤对帕金森病大鼠的药理作用及其可能的机制,为补阳还五汤临床治疗帕金森病提供科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 清洁级雄性SD大鼠40只,体质量(200±20)g,购自中国上海斯莱克实验动物公司,动物合格证号:SCXK(沪)2007-0005。饲养于相对湿度(50±10)%、(22±2)℃的动物房里,鼠笼内备有饲料及水,可供大鼠自由饮食。

**1.2 实验药物** 补阳还五汤所用药物购自台州市中医院中药房,按原处方比例配比(黄芪:当归:赤芍:地龙:川芎:桃仁:红花:陈皮:僵蚕:蝉蜕:防风:荆芥:半夏=50:2:2:2.5:2:2:5:2:2:5:1:1:1),常规煎煮后浓缩提纯至2 g/mL,置于4℃冰箱备用。

**1.3 试剂及仪器** 水合氯醛、6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine hydrobromide, 6-OHDA)、阿朴吗啡(APO)(Sigma-Aldrich公司);酪氨酸羟化酶抗体、p-c-jun抗体、Caspase-3抗体(Santa Cruz Biotechnology公司);多聚体抗兔IgG-HRP、DAB显色液(博士德生物工程有限公司)。电子天平(METTLER TOLEDO公司);大鼠立体定向仪(日本Narishige公司);脑立体微量注射泵(瑞沃德公司);20 μL微量注射器(上海精密仪器公司);光

学显微镜(日本Nikon公司)。

**1.4 模型制备** SD大鼠(300~320 g)经检查无旋转行为后,以水合氯醛麻醉,于脑立体定位仪上固定。将头顶部皮肤沿中线做切口约1.5 cm,根据《大鼠脑立体定位图谱》精确定位,并于前囟后4.4 mm、矢状缝旁1.3 mm处钻孔。将6-OHDA溶液抽入微量注射器后固定于脑立体定位仪,缓慢将药物注入右侧纹状体内8.5 mm处。停针10 min,缓慢退出微量注射器,缝合皮肤并以每天2 U的剂量经腹腔注入庆大霉素,连续3天,预防感染,回笼常规饲养<sup>[11-12]</sup>。术后第30天,大鼠以0.5 mg/kg的剂量腹腔注射阿朴吗啡诱发旋转行为,记录大鼠30 min内逆时针转圈圈数。平均旋转圈数达7 r/min以上的认为是成模大鼠,用于后续实验。

**1.5 分组和给药** 将成模大鼠随机分为模型组、14天治疗组和28天治疗组,与空白组大鼠分笼饲养给药,每组10只。14天治疗组连续14天,每天按5 mL/kg的剂量经胃灌注补阳还五汤1次;28天治疗组连续28天,每天按5 mL/kg的剂量经胃灌注补阳还五汤1次,空白组和模型组每天按5 mL/kg的剂量经胃灌注生理盐水。

**1.6 行为学评价和黑质内TH、p-c-jun和Caspase-3含量检测** 结束给药后2 h,按0.5 mg/kg的剂量对大鼠腹腔注射阿朴吗啡,诱发大鼠旋转行为。记录各组大鼠的旋转圈数,观察药物对帕金森病模型大鼠行为学的改善情况。各组大鼠经行为学评价后,用生理盐水通过心脏进行全身灌流,再用10%中性福尔马林液通过心脏进行全身灌流,然后断头处死,取出脑组织。脑组织用10%中性福尔马林液固定72 h后,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,石蜡切片,进行免疫组化染色。检测黑质内TH、p-c-jun和Caspase-3含量。

**1.7 统计学方法** 应用SPSS20.0软件进行统计学处理,结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用t检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠旋转圈数结果比较** 见表1。空白组不旋转,与空白组比较,模型组旋转圈数大于7 r/min,表明造模成功。与模型组比较,14天治疗组和28天治疗组的旋转圈数明显下降( $P < 0.05$ )。

表1 各组大鼠旋转圈数结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

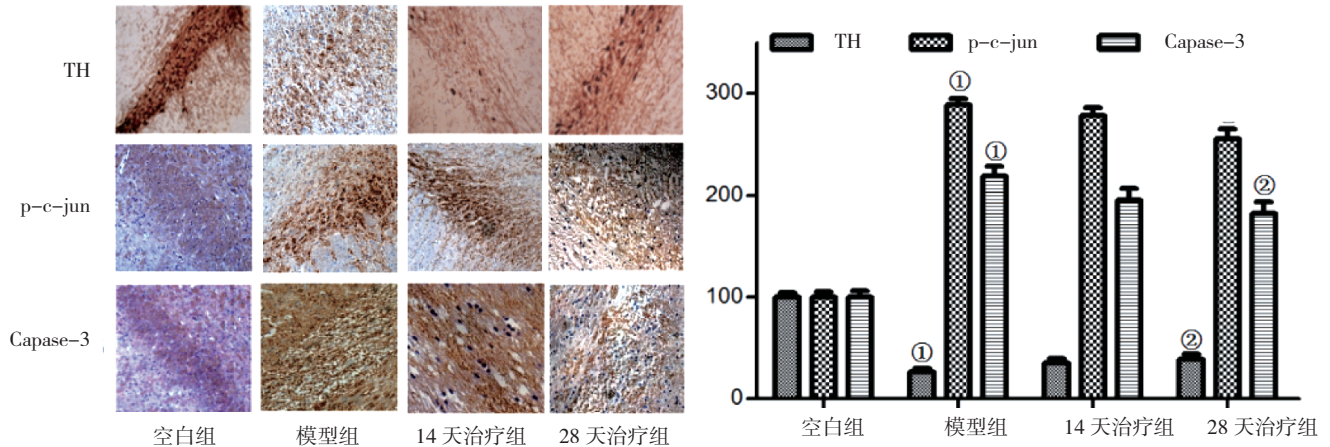
组别	鼠数	旋转圈数
空白组	10	0
模型组	10	7.41±0.38 <sup>①</sup>
14天治疗组	10	6.94±0.48 <sup>②</sup>
28天治疗组	10	6.77±0.53 <sup>②</sup>

与空白组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$

**2.2 各组大鼠TH、p-c-jun、Capase-3免疫组化染色结果比较** 见图1。空白组大鼠右侧黑质区TH沿黑质长轴方向排列,

数量多且呈深棕色,胞体密度高,多呈圆形或椭圆形,p-c-jun和Capase-3阳性颗粒数目较少、着色较浅。而模型组大鼠右侧黑质区,TH阳性神经元和阳性纤维显著减少,可见深棕色的黑质丛,阳性颗粒数目较多且着色较深。与模型组比较,14

天治疗组和28天治疗组大鼠右侧黑质中TH的含量有所上升,阳性颗粒数目有所减少,着色也变浅,但仅28天治疗组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



与空白组比较,① $P < 0.01$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$

图1 各组大鼠TH、p-c-jun、Capase-3免疫组化染色结果比较

### 3 讨论

补阳还五汤中重用黄芪以补元气,配当归尾、川芎、白芍活血和营,桃仁、红花、地龙化瘀通络,诸药合用可补气、活血、通络,充分体现了中医学“气为血帅”的理论<sup>[9]</sup>。研究证明补阳还五汤对帕金森病患者有较好的临床疗效。如张灿灼等<sup>[13]</sup>研究发现以补阳还五汤加减内服的帕金森病患者对左旋多巴类药物副作用易于耐受,且临床疗效明显提高,临床症状显著改善。朱政等<sup>[14]</sup>亦发现,应用针灸、龟鹿二仙膏合补阳还五汤配合小剂量抗胆碱药物对帕金森病患者进行康复治疗,能较好地改善帕金森病的症状,减小抗胆碱药物的用量及副作用,提高抗胆碱药物的疗效及患者的生存质量。尹亚东等<sup>[15]</sup>对帕金森病患者以补阳还五汤加减,以益气活血为大法辨治震颤,取得了较好的临床疗效。熊继柏教授亦曾用本方加减治疗乳腺癌根治术后手足综合征、帕金森病和局限性硬皮病,疗效较为显著<sup>[4]</sup>。

本研究发现经补阳还五汤治疗的帕金森病大鼠行为学改善明显,黑质内TH的表达也有所增加,表明补阳还五汤对帕金森病模型大鼠受损的多巴胺能神经元有一定保护作用。同时,黑质内p-c-jun和Caspase-3的表达有所减少,表明黑质内JNK通路的激活程度有所抑制,黑质神经元凋亡程度也有所下降,这可能是补阳还五汤对帕金森病大鼠药理作用的机制之一。

综上,补阳还五汤可改善帕金森病模型大鼠的行为学,对受损的多巴胺能神经元发挥保护作用,并抑制黑质内JNK通路的激活和黑质神经元的凋亡,有望为帕金森病的治疗提供新的思路和临床依据。然而帕金森病的发病机制和进程是个漫长而又复杂的过程,是多个基因和环境因素相互作用的结果。氧

化应激与泛素蛋白酶体系功能障碍、线粒体功能障碍、多聚ADP核糖聚合酶(PARP)过度活化等异常变化均直接或间接与帕金森病的发生和发展相关<sup>[16-18]</sup>。深入研究补阳还五汤对帕金森病大鼠药理作用的其他机制,为补阳还五汤的临床应用提供药理机制研究,对促进补阳还五汤的临床安全应用有深远的意义。

### [参考文献]

- [1] RODRÍGUEZ-VIOLANTE M, CERVANTES-ARRIAGA A, FAHN S, et al. Two-hundred Years Later: Is Parkinson's Disease a Single Defined Entity?[J]. Revista De Investigacion Clinica, 2017, 69(6): 308-313.
- [2] 李贤彬,姚源,熊震,等. 中西医结合治疗帕金森术后并发症:附126例报告[J]. 成都中医药大学学报, 2000, 23(4): 44-45.
- [3] 张丽萍. 补阳还五汤防治脑血管疾病的药理学研究现状[J]. 中国药房, 2007, 18(33): 2629-2630.
- [4] 周兴,李点. 熊继柏教授运用补阳还五汤治疗疑难病证举隅[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(9): 132-133.
- [5] CYNTHIA A K, ALEXANDER F L B, KELSEY J B, et al. Characterization of early-onset motor deficits in the Pink1-/-mouse model of Parkinson disease[J]. Brain Research, 2018, 1680: 1-12.
- [6] CHEN Y, LIAN Y J, MA Y Q, et al. The expression and significance of tyrosine hydroxylase in the brain tissue of Parkinson's disease rats [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2017, 14(5): 4813-4816.

- [7] 王永生, 张宇新, 李会, 等. JNK 信号通路对亚急性帕金森病 MPTP 模型小鼠黑质 iNOS 表达的影响[J]. 解剖学杂志, 2009, 32(3): 348-351.
- [8] 关榆根, 张建鹏. JNK 信号通路的激活在帕金森病发病机制中的作用[J]. 生物技术通讯, 2012, 23(6): 874-878.
- [9] XIA L, GUO D X, CHEN B. Neuroprotective effects of astragaloside IV on Parkinson disease models of mice and primary astrocytes[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017, 14(6): 5569-5575.
- [10] HOSSEINZADEH L, MONAGHASH H, AHMADI F, et al. Bioassay-guided isolation of neuroprotective fatty acids from *nigella sativa* against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity[J]. *Pharmacogn Mag*, 2017, 13(52): 627-633.
- [11] KATRINE F, PERNILLE B, JACOB J, et al. Application of the Physical Disector Principle for Quantification of Dopaminergic Neuronal Loss in a Rat 6-Hydroxydopamine Nigral Lesion Model of Parkinson's Disease[J]. *Front Neuroanat*, 2017, 11(109): 1-10.
- [12] JÉSSICA M B, TAYSA B B, HUMBERTO M, et al. Pioglitazone reduces mortality, prevents depressive-like behavior, and impacts hippocampal neurogenesis in the 6-OHDA model of Parkinson's disease in rats[J]. *Experimental Neurology*, 2018, 300: 188-200.
- [13] 张灿灿, 张春梅. 补气活血、温阳通脉法治疗帕金森病临床观察[J]. 中国中医急症, 2009, 18(7): 1036-1037.
- [14] 朱政. 针灸结合中药对帕金森病康复治疗疗效的观察[J]. 现代康复, 2001, 5(11): 125.
- [15] 尹亚东, 刘书红. 补阳还五汤加减治疗帕金森病体会[J]. 中医临床研究, 2013, 5(3): 58-59.
- [16] ALLEN REISH H E, STANDAERT D G. Role of  $\alpha$ -synuclein in inducing innate and adaptive immunity in Parkinson disease[J]. *Journal of Parkinson's Disease*, 2015, 5(1): 1-19.
- [17] JENNER P, MORRIS H R, ROBBINS T W, et al. Parkinson's disease—the debate on the clinical phenomenology, aetiology, pathology and pathogenesis[J]. *Journal of Parkinson's Disease*, 2013, 3(1): 1-11.
- [18] KALIVENDI S V, YEDLAPUDI D, HILLARD C J, et al. Oxidants induce alternative splicing of alpha-synuclein: Implications for Parkinson's disease[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 48(3): 377-383.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)