

正交试验法分析平帕汤治疗帕金森病的最佳配伍比例

鲍晓东^{1*} 赵金平² 连胜利³

(1. 浙江中医药大学, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053;

2. 浙江中医药大学基础医学院; 3. 中国医学创新杂志社)

基金项目: 浙江省中医药管理局资助课题(2008CA003)

* 通讯作者: bxd580412@sina.com, 13905811519

[摘要] 目的 探讨平帕汤治疗帕金森病(PD)的配伍规律并确定其最佳配伍比例。方法 112 只 C57/BL 雄性小鼠, 采用 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)腹腔注射法建立 PD 模型, 随机分为中药 1~8 组, 每组 14 只。按 $L_8(2^7)$ 正交设计表, 各组以相应配伍比例的平帕汤(银杏叶、肉苁蓉、罗布麻、山梗菜)灌胃, 每日 1 次, 给药 10 天后, 采用高效液相色谱法(HPLC-ECD)检测各组小鼠纹状体内多巴胺(DA)、3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)和高香草酸(HVA)含量; 采用免疫组化染色法观察各组小鼠黑质酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞点光密度(OD 值)。结果 各组小鼠黑质致密部可见阳性神经元呈条带状, 胞体呈梭形或锥形, 胞浆深棕黄色到浅黄色不等, 可见轴突纤维同时伴有不同程度上的胞间纤维缺失。平帕汤治疗 PD 的影响因素主次顺序为银杏叶>肉苁蓉>山梗菜>罗布麻, 银杏叶、肉苁蓉及二者的交互作用为主要影响因素, 其中银杏叶及其与肉苁蓉交互作用的差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 平帕汤最佳配伍比例为银杏叶 20 g、肉苁蓉 40 g、罗布麻 20 g、山梗菜 20 g。

[关键词] 帕金森病; 平帕汤; 配伍比例; 正交设计

An Analysis of Compatibility Proportions of Pingpa Decoction for Parkinson's Disease with Orthogonal Test Method

BAO Xiaodong¹, ZHAO Jinping¹, LIAN Shengli²

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Province 310053; 2. Medical Innovation of China Magazine)

ABSTRACT Objective To study the compatibility law and optimal compatibility proportion of Pingpa Decoction for Parkinson's disease (PD). **Methods** Totally 112 C57/BL male mice were induced into PD models with intraperitoneal injection of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and randomized into 8 Chinese medication groups, with 14 in each. According to the $L_8(2^7)$ orthogonal array, each group was gavaged with corresponding Pingpa Decoction [Yinxingye (*Folium Ginkgo*), Roucongrong (*Herba Cistanches*), Luobuma (*Folium Apocyni Veneti*) and Shangengcai (*Lobelia sessilifolia*)] once daily for 10 consecutive days. The dosage in Chinese medication group 1, group 2 to 7 and group 8 was 12 g/(kg·d), 24 g/(kg·d) and 48 g/(kg·d) respectively. High performance liquid chromatography-electrochemical detector (HPLC-ECD) was used to determine the contents of dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) in striatum. Immunohistochemical method was used to observe the expression of tyrosine hydroxylase (TH) in the substantia nigra. **Results** Banded positive neurons, spindle or tapered cell body, dark brown yellow to pale yellow cytoplasm, axon fibers and missing intercellular fibers could be seen in the substantia nigra of mice in each group. The therapeutic effect of Pingpa Decoction for PD was influenced by Yinxingye, Roucongrong, Shangengcai and Luobuma in order, especially Yinxingye and the interaction of Yinxingye and Roucongrong ($P<0.05$). **Conclusion** The optimal compatibility proportion of Pingpa Decoction is 20g Yinxingye, 40g Roucongrong, 20g Luobuma and 20g Shangengcai.

Keywords Parkinson's disease; Pingpa Decoction; compatibility proportion; orthogonal design

帕金森病(PD)是一种常见的中枢神经系统变性疾病,以静止性震颤、运动迟缓、肌僵直、姿势障碍等为主要临床表现,主要病理生化改变为黑质多巴胺能神经元进行性变性和缺失,导致纹状体多巴胺(DA)含量显著减少。现代医学运用左旋多巴复方制剂外源性补充脑内 DA 治疗 PD,此类药物在远期疗效、量效关系和副作用等方面还存在争议。我们在长期诊疗 PD 的过程中,反复验证了自拟方平帕

汤的临床疗效^[1]。前期研究也已证实平帕汤对 PD 模型小鼠的多巴胺能神经元具有保护作用并可促进其分泌 DA^[2],现采用正交设计法,进一步探讨其配伍规律,旨在为临床合理用药和新药开发研究等提供依据。

1 材料

1.1 动物

C57/BL 雄性小鼠 112 只,清洁级,体重(22±

2)g,由浙江中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号:2008001614413。

1.2 药物及制备

平帕汤(银杏叶、肉苁蓉、罗布麻、山梗菜)由浙江中医药大学中医门诊部提供,水煎两次,每次 1 h,合并后浓缩至 1.2 g/ml,4℃保存备用。

1.3 试剂

1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)盐酸盐(批号:090M1552V)、多巴胺盐酸盐(DA,批号:086K2504)、高香草酸(HVA,批号:056K5009)、二羟基苯乙酸(DOPAC,批号:03002KE)、水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,批号:069K0359)、乙二胺四乙酸(EDTA,批号:080M0010V)、三乙胺(TEA,批号:16696TMV)、高氯酸(Perchloric acid,批号:08496AP)、1-辛烷磺酸钠(1-Octanesulfonic acid sodium salt,批号:MKBF6438V)均为 Sigma 公司产品。兔抗小鼠酪氨酸羟化酶一抗(Anti-Tyrosine Hydroxylase Antibody,批号:2115918)为 Millipore 公司产品。免疫组织化学 Power Vision 试剂盒(批号:1257197A)为中杉金桥生物技术有限公司产品,其他为国产分析纯试剂。

1.4 仪器

1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Coulechem III 电化学检测器(美国 ESA 公司);JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Allegra™ 64R 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);Forma-86 CULT 超低温冰箱(美国 Thermo 公司);STP120 脱水机(Microm 公司);AP280-2 包埋机(Microm 公司);HM335E 切片机(Microm 公司);Nikon eclipse 80i 显微镜(Nikon 公司);Carl Zeiss Imaging Systems(Carl Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 造模方法

参考 Sonsalla 等^[3]和 Heikkila 等^[4]的方法,腹腔注射 MPTP 30 mg/(kg·d),连续 5 天。观察模型小鼠行为改变,以出现步长缩短、动作迟缓、震颤、竖毛、爬杆不能等作为模型成功标准^[5-6],全部小鼠均造模成功。

2.2 动物分组、给药和处理方法

以药味为因素、药量为水平(以临床常用剂量及其 2 倍剂量为两种水平),按 $L_8(2^7)$ 正交设计表进行实验(见表 1,表 2),随机抓取分为 8 个中药组,每组 14 只。造模成功 24 h 后以相应中药灌胃,每天 1

次,连续 10 天。灌胃 10 天后,各组随机抓取 7 只小鼠行高效液相电化学法(HPLC-ECD)分析,另 7 只行免疫组织化学分析。

表 1 平帕汤药物配伍剂量因素水平表(g)

水平	银杏叶	肉苁蓉	罗布麻	山梗菜
1	20	20	20	20
2	40	40	40	40

表 2 平帕汤配伍比例的正交试验表

组别	银杏叶	肉苁蓉	罗布麻	山梗菜
中药 1 组	1	1	1	1
中药 2 组	1	1	2	2
中药 3 组	1	2	1	2
中药 4 组	1	2	2	1
中药 5 组	2	1	1	2
中药 6 组	2	1	2	1
中药 7 组	2	2	1	1
中药 8 组	2	2	2	2

2.3 HPLC-ECD 分析

①样本提取。小鼠断头取脑,置冰袋上迅速剥离双侧纹状体,精密称重,置-80℃冻存;每 100 mg 脑组织加 1 ml 0.1 mol/L HClO_4 溶液,超声粉碎,离心,取上清液经微孔滤膜过滤,分装,-80℃冻存,待测。②HPLC-ECD 检测 DA 及其代谢物的色谱条件。色谱柱:ESAMD-150 ODS C18 反相分析柱(3.2 mm×150 mm);流动相: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 75 mmol/L,1-辛烷磺酸钠 1.7 mmol/L,TEA 100 μmol/L,EDTA 25 μmol/L,乙腈 10%的混合液;流速:0.6 ml/min;柱温:30℃;进样量:20 μl。检测各组小鼠纹状体内 DA、DOPAC、HVA 的含量。综合评分^[7-8] = 20×DA 含量/DA 含量最大值 + 15×(DA/DOPAC 比值)/(DA/DOPAC 比值最大值) + 15×(DA/HVA 比值)/(DA/HVA 比值最大值) + 50×IOD 值/IOD 值最大值。

2.4 免疫组织化学分析

小鼠断头取脑,置于 10% 甲醛固定,脑组织经常规步骤处理,石蜡包埋,切片,常温保存备用。采用常规免疫组织化学两步法显示小鼠中脑黑质酪氨酸羟化酶(TH)的阳性表达,小鼠抗酪氨酸羟化酶第一抗体浓度为 1:200。每张切片选黑质部位,于 Nikon eclipse 80i 显微镜 40 倍物镜下拍照,CCD:DS-Fi1(500 万像素),光源亮度为恒定电压 5.5 V,放大倍数为 400,采用 Carl Zeiss 公司的 Carl Zeiss Imaging Systems 进行图像分析,测定 TH 阳性细

胞总光密度(OD 值)。

2.5 统计学方法

采用正交设计助手 II V 3.1 进行直观分析和方差分析,实验数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

3 结果

3.1 注射 MPTP 后小鼠的行为学表现

给予 MPTP 数分钟后,小鼠不同程度表现出挠嘴、竖毛、竖尾、弓背、慌张步态、爬杆不能等急性症状,少数出现下颌震颤,但在 30~1 min 内消失;随时间延长,运动迟缓、运动减少等有所加重,但均在 24 h 后完全消失。

3.2 黑质 TH 阳性细胞免疫组化结果

各组小鼠黑质致密部可见阳性神经元呈条带状,胞体呈梭形或锥形,胞浆深棕黄色到浅黄色不等,可见轴突纤维同时伴有不同程度上的胞间纤维缺失。

3.3 平帕汤不同配伍比例对 PD 小鼠各项指标的影响

不同配伍比例平帕汤干预 PD 模型小鼠后,各组小鼠纹状体 DA、DA/DOPAC、DA/HVA 值和黑质 TH 阳性细胞 IOD 值结果见表 3,经综合加权评分确定平帕汤抗 PD 的最佳配伍比例。评分时以各指标的最大值为参照将数据进行归一化,再给出不同的权重。具体权重为:TH 是主要存在于黑质多巴胺能神经元内合成左旋多巴的限速酶,也是多巴胺能神经元的标记酶,将其阳性细胞表达的 IOD 值权重系数设为 0.5;DA 及其代谢物含量是反应 PD 病情的常用生化手段,DA/DOPAC、DA/HVA 又可以反映 DA 在脑内的代谢情况,因此,将权重系数分别设为:DA:0.2,DA/DOPAC:0.15,DA/HVA:0.15。

3.4 平帕汤不同配伍比例正交试验结果

表 4 示,平帕汤抗 PD 的影响因素主次顺序为银杏叶>肉苁蓉>山梗菜>罗布麻,且由表 5 可知,银杏叶、肉苁蓉及二者的交互作用为主要影响因素,其中银杏叶及其与肉苁蓉交互作用的差异有统计学意义($P<0.05$)。当 $\kappa=1$ 时(银杏叶), $\bar{T}_{11}>\bar{T}_{21}$,故银杏叶 20 g 比 40 g 抗 PD 作用更好;肉苁蓉、罗布麻、山梗菜同理。以上分析得知,银杏叶 20 g、肉苁蓉 20 g、罗布麻 20 g、山梗菜 20 g 时治疗效果较好。但由于银杏叶与肉苁蓉存在交互作用,因此,还需确定较好的银杏叶与肉苁蓉的二元交互作用。由表 6 知,银杏叶 20 g、肉苁蓉 40 g>银杏叶 20 g、肉苁蓉 20 g>银杏叶 40 g、肉苁蓉 20 g>银杏叶 40 g、肉苁蓉 40 g,因

表 3 平帕汤不同配伍比例对 PD 模型小鼠各项指标的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	DA 含量 (ng/g)	DA/DOPAC AC 比值	DA/HVA 比值	IOD 值 (像素 $\times 10^5$)	综合评分(分)
中药 1 组	7	799.58	1.473	38.852	1.3296	76.33
中药 2 组	7	915.13	1.099	45.123	1.2551	73.45
中药 3 组	7	972.30	0.860	58.877	1.3818	77.75
中药 4 组	7	801.28	1.418	27.489	1.6560	84.16
中药 5 组	7	751.63	0.661	28.306	1.4107	68.18
中药 6 组	7	605.09	0.461	22.548	1.6645	70.01
中药 7 组	7	657.16	0.670	32.944	1.0089	54.84
中药 8 组	7	412.73	0.284	12.864	0.6719	34.72

表 4 平帕汤配伍比例的 $L_8(2^7)$ 正交试验直观分析表

组别	银杏叶	肉苁蓉	罗布麻	山梗菜	综合评分(分)
中药 1 组	1	1	1	1	76.33
中药 2 组	1	1	2	2	73.45
中药 3 组	1	2	1	2	77.75
中药 4 组	1	2	2	1	84.16
中药 5 组	2	1	1	2	68.18
中药 6 组	2	1	2	1	70.01
中药 7 组	2	2	1	1	54.84
中药 8 组	2	2	2	2	34.72
$\bar{T}_{1k}$	84.08	76.79	73.43	75.42	
$\bar{T}_{2k}$	58.67	65.96	69.31	67.32	
R	25.41	10.83	4.13	8.10	

表 5 平帕汤配伍比例的 $L_8(2^7)$ 正交试验方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F 值	P 值
银杏叶	1291.285	1	34.313	<0.05
银杏叶与肉苁蓉交互作用	543.313	1	14.437	<0.05
肉苁蓉	234.556	1	6.233	
罗布麻	34.081	1	0.906	
山梗菜	131.285	1	3.489	
误差	112.90	3		

注: $F_{0.05}(1,3)=10.1$;罗布麻、银杏叶与罗布麻的交互作用和银杏叶与山梗菜的交互作用作为误差项

表 6 银杏叶与肉苁蓉交互作用分析表

$\bar{T}$ 值和	银杏叶(g)	
	20	40
肉苁蓉(g)	20	149.78
	40	161.91
		89.56

此,银杏叶 20 g、肉苁蓉 40 g 时,平帕汤抗 PD 作用较强。综上,银杏叶 20 g、肉苁蓉 40 g、罗布麻 20 g、山梗菜 20 g 是抗 PD 验方平帕汤的最佳配伍比例。

4 讨论

PD 是目前国内外神经科的研究热点,动物模

型的选择对其科学研究至关重要。Ungerstedt等^[9]报道了利用6-羟基多巴胺(6-OHDA)制作成功PD动物模型;Burns等^[10]在1983年首次报道了利用MPTP制成的非人灵长类动物PD模型,MPTP通过腹腔给药,操作简便、无创、成功率高、作用明确、模型较稳定,是目前中医药研究较为理想的动物模型。本实验即采用腹腔注射MPTP 30 mg/(kg·d),连续5天制备PD小鼠模型,其造模机制为MPTP在单胺氧化酶(MAO)作用下转变为MPP⁺,MPP⁺是线粒体呼吸链复合酶I的可逆性抑制剂,可使细胞内ATP和还原型谷胱甘肽(GSH)减少,从而导致Ca²⁺平衡破坏和氧自由基增多,最终引起多巴胺能神经元变性死亡^[11]。该模型在病理、生化及对药物治疗反映方面与原发PD特征较为相似,适用于本实验神经保护性药物的研究。

目前中药复方配伍的研究多以不完全因子设计和单因素设计考察复方的变化,采用撤药分析法和简单拆分等方法,忽视了药物之间的交互作用,并多以中医药传统理论及临床经验指导确定复方、拆方方案,尚未脱离经验认识的水平。平帕汤由银杏叶、肉苁蓉、罗布麻、山梗菜组成,本实验采用数理统计中的正交设计法,按L₈(2⁷)正交设计表将平帕汤中的四味药物(因素)和两个剂量(水平)合理安排,统计出各因素对实验指标的影响和各因素的主次及交互作用,找出诸因素各水平的最佳组合。其显著特点是只要通过挑选部分有代表性的水平组合进行试验,就能够分析了解全面试验的情况,从而找出最优的水平组合^[12]。

为避免使用单一活性指标难以综合反映复方药效,本实验采用HPLC-ECD和免疫组化染色两种方法,DA、DA/DOPAC、DA/HVA和IOD值四个指标进行综合评估。同时采用综合加权评分法,将具有不同考察范围的多个指标转变为一个指标,从而能够更全面、方便、快捷、有效地筛选出平帕汤最佳配伍比例。评分时以各指标的最大值为参照将数据进行归一化,再给出不同的权重^[7-8]。

本实验结果显示,银杏叶、肉苁蓉及二者的交互作用是影响平帕汤疗效的主要因素,其中银杏叶、银杏叶与肉苁蓉交互作用的差异具有统计学意义。由直接分析得知,银杏叶20g、肉苁蓉20g、罗布麻20g、山梗菜20g时治疗效果较好。但由于银杏叶与肉苁蓉存在交互作用,因此,还需确定较好的银杏叶与肉苁蓉二元交互作用。银杏叶20g、肉苁蓉40g>银杏叶20g、肉苁蓉20g>银杏叶40g、肉苁蓉20g>银杏叶40g、肉苁蓉40g,由此得知,银杏叶

20g、肉苁蓉40g时,平帕汤对PD的治疗作用较强。但二者相互作用的具体机制还有待进一步深入研究。

综上所述,平帕汤在保护PD患者残存的DA神经元、挖潜增效、增加脑内DA含量的过程中,银杏叶20g和肉苁蓉40g起到主要作用,而罗布麻20g和山梗菜20g仅起着辅助作用。

参考文献

- [1]鲍晓东.平帕汤治疗帕金森病86例临床观察[J].中华中医药杂志,2007(增刊):357-359.
- [2]鲍晓东,赵金平.平帕汤对PD模型小鼠多巴胺能神经元保护作用的研究[J].中国医学创新,2012,9(16):1-4.
- [3]Sonsalla PK,Heikkila RE. The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice[J]. Eur J Pharmacol,1986,129(3):339-345.
- [4]Heikkila RE,Hess A,Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice[J]. Science,1984,224(4656):1451-1453.
- [5]Yao QH,Gao GD. Behavioral characteristics in mice models of Parkinson disease and its detecting method[J]. Chin J Clin Rehabil,2004,8(28):6177-6179.
- [6]Arai N,Misugi K,Goshima Y, et al. Evaluation of a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), treated C57 black mouse model for parkinsonism[J]. Brain Res,1990,515(1-2):57-63.
- [7]Zhang X,Hou Y,Jia TS. Optimization of cutting technology associated with pharmacodynamic index for aucklandia radix by orthogonal design[J]. Chin J Exp Trad Med Form,2011,17(7):9-12.
- [8]Tang XM,Wang ZY,Tang YH,et al. Optimization of extraction process of Rumex gmelini by multiple guidelines grading method[J]. J Chin Med Mater,2009,32(9):1460-1462.
- [9]Herrera-Marschitz M,Forster C,Ungerstedt U. Rotational behaviour elicited by intracerebral injection of apomorphine and pergolide in 6-hydroxy-dopamine-lesioned rats. I: Comparison between systemic and intrastriatal injections[J]. Acta Physiol Scand, 1985, 125(3):519-527.
- [10]Burns RS,Chiueh CC,Markey SP,et al. A primate model of Parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by MPTP[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1983,80(14):4546-4550.
- [11]姚庆和. MPTP的毒性机制与帕金森病动物模型[J]. 国外医学神经病学神经外科学分册,2004,31(1):45-47.
- [12]沈群. 中药研究中的正交设计问题[J]. 数理医药学杂志,2011,24(1):19.

(收稿日期:2013-03-15;修回日期:2013-06-17)

[编辑:侯建春]