

抑颤汤对帕金森病大鼠脑内多巴胺受体和神经降压素含量的影响

杨明会,王海明,刘毅,窦永起
(解放军总医院中医研究所,北京 100853)

【摘要】 目的 探讨抑颤汤治疗帕金森病(PD)的作用机制。方法 用直接向脑组织内注入神经毒剂 6-羟多巴胺损毁脑黑质致密部的方法建立 PD 大鼠模型。将 100 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、PD 模型组和抑颤汤治疗组,连续治疗 8 周。观察各组治疗前及治疗 5 周起 PD 大鼠旋转行为特征的变化,用放射免疫法测定治疗后大鼠脑组织多巴胺(DA)受体亲和常数(Kd)和最大结合量(Bmax)以及神经降压素免疫活性物(NT-IR)含量的变化。结果 抑颤汤能明显改善 PD 模型大鼠的旋转行为,使治疗后大鼠每 40 min 的平均旋转次数从(349.56±62.28)圈降为(61.63±17.93)圈, $P<0.01$ 。与模型组比较,抑颤汤组大鼠损毁侧脑组织 DA 受体 Bmax 和 Kd 明显提高[Bmax:(304.350±19.328)nmol/kg 比(264.630±22.124)nmol/kg, $P<0.05$; Kd:(1.476±0.546)nmol/L 比(1.248±0.658)nmol/L, $P<0.01$];损毁侧脑组织 NT-IR 含量较模型组显著降低,差异有统计学意义[(72.37±29.15) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 比(152.68±26.21) $\mu\text{g}/\text{kg}$, $P<0.01$]。结论 抑颤汤能调节 PD 模型大鼠大脑释放神经降压素,增加脑内 DA 含量,促进受损脑黑质神经细胞修复,从而改善 PD 大鼠的旋转行为。

【关键词】 帕金森病;作用机制;抑颤汤

中图分类号:R285.5;R742.5 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2008)02-0071-03

Effects of Yichan decoction (抑颤汤) on dopamine receptors and neurotensin in cerebral tissue of rats with Parkinson's disease YANG Ming-hui, WANG Hai-ming, LIU Yi, DOU Yong-qi. Department of Traditional Chinese Medicine, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100853, China
Corresponding author: WANG Hai-ming (Email: wanghaiming403@126.com)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of Yichan decoction (抑颤汤) in treatment of Parkinson's disease (PD). Methods A PD rat model was made by direct injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the brain to destruct the compact part of substantia nigra (SNC). One hundred Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a normal control group, a PD model group and a Yichan decoction treatment group and they were treated for 8 weeks. The rats' behavior pattern changes were observed before treatment and from 5th weeks after treatment. The changes in the dissociation constant (Kd) and maximum number of binding sites (Bmax) of dopamine (DA) receptors, and neurotensin-immunoreactive (NT-IR) in substantia nigra after treatment were determined by using the technique of radioimmunity. Results Yichan decoction could markedly improve the rotation of PD model rats and decrease the average number of rotation from (349.56±62.28) circle/40 minutes to (61.63±17.93) circle/40 minutes ($P<0.01$). The Bmax and Kd of DA receptors in the brain tissues on the lesion side of Yichan decoction group were more improved obviously than those of the PD model group [Bmax: (304.350±19.328) nmol/kg vs. (264.630±22.124) nmol/kg, $P<0.05$; Kd: (1.476±0.546) nmol/L vs. (1.248±0.658) nmol/L, $P<0.01$]. The content of NT-IR of the rats' lesion side was significantly less in Yichan decoction group than that in the PD model group [(72.37±29.15) $\mu\text{g}/\text{kg}$ vs. (152.68±26.21) $\mu\text{g}/\text{kg}$, $P<0.01$]. Conclusion Yichan decoction can regulate the release of neurotensin from the cerebrum, increase the DA content in the brain, and promote the repair of the injured black substance neural cells in the PD model rat, thus the behavior of PD rat rotation is improved.

【Key words】 Parkinson's disease; mechanism of action; Yichan decoction

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672762)

通讯作者:王海明,硕士研究生,主治医师,Email:wanghaiming403@126.com

作者简介:杨明会(1962-),男(汉族),河北省人,教授,博士生导师,Email:yhm9651@yahoo.com.cn.

帕金森病(Parkinson disease,PD)是一种常见于老年人的神经系统退行性疾病,以静止性震颤、运动迟缓、肌僵直和姿势平衡障碍为主要临床特征。目前认为该病与中脑黑质纹状体多巴胺(DA)能神经

元有关,DA 类药物为 PD 主要的替代治疗方法,但长期治疗会出现明显的不良反应或功能障碍。因此,寻找更有效的治疗方法已成为目前研究的热点。神经降压素(neurotensin,NT)是一种脑肽,广泛存在于中枢神经系统及胃肠道^[1]。目前已有实验证实,中脑及黑质内的 NT 和 DA 能够相互作用、相互影响^[2-3]。在我们以往的动物实验及临床观察中已证实了抑颤汤对 PD 的治疗作用,本实验旨在进一步观察 PD 大鼠脑内 DA 受体及 NT 在治疗前后的变化,以阐明抑颤汤治疗 PD 的机制,报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物:雌性 SD 大鼠 100 只,体重 180~200 g,由解放军总医院医学实验动物中心提供。

1.2 中药:抑颤汤由山萸肉、石菖蒲、仙灵脾、肉苁蓉、枸杞子、丹参、蜈蚣等组成,解放军总医院中药房鉴定并提供。按传统煎药法文火煎 30 min 取药液,以恒温水浴锅浓缩成含生药 1.0 kg/L 汤剂,消毒后玻璃瓶密闭盛装,冰箱 4℃ 保存备用。

1.3 仪器和实验用药物:6-羟基多巴(6-OHDA)、阿朴吗啡、维生素 C 均为美国 Sigma 产品;日本产 SN22 型脑立体定位仪,国产 QL21 型小动物旋转监测仪,美国 Bacman 公司产 Bacman Ls-29800 液闪仪,国产 MZKRO22R 离心机,国产 XH-B 型旋涡混合器,国产自动 γ 放射免疫计数器, I¹²⁵NT 放射免疫分析药盒为北京普尔伟业生物科技有限公司产品。³H-QNP 和 ³H-spiperor 由英国 Amersham 公司提供。0.32 mol/L 蔗糖溶液、0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液、甲苯闪烁液、阿托品液(10⁻⁵ mol)、生理盐水。

1.4 制模方法^[4-5]:大鼠称重、编号,用体积分数为 10% 的水合氯醛溶液(5 ml/kg)腹腔注射,头顶部去毛,固定于 SN22 型脑立体定位仪上,碘酒、乙醇消毒,切开皮肤及筋膜,暴露颅骨。脑核团定位按大鼠脑立体图谱^[6],将右侧黑质坐标选定:门齿线低于水平线-3.3 mm、A/P(距前囟中心后)-4.8 mm、L/R(距前囟中心左右)1.6 mm、O/V(距脑膜表面深度)-8.2 mm。用坐标定位右侧黑质,钻开右侧颅骨,注入 6-OHDA 液体(2 g/L)6 μ l,退针,止血、缝合皮肤。腹腔注射青霉素(100 kU/kg),每日 1 次。术后 2 周,用质量分数为 0.01% 的阿朴吗啡腹腔注射(每只 1 ml),然后观察记录每 5 min 向健侧旋转次数及 40 min 旋转的总次数,每分钟旋转次数 ≥ 7 圈(40 min 旋转 280 圈)为阳性。每周 1 次,连续 4 周阳性者为合格 PD 模型大鼠。

1.5 分组:将制模成功的 70 只 PD 模型大鼠按随

机数字表法分为模型组(30 只)和抑颤汤组(40 只);另取未经制模的正常雌性 SD 大鼠 30 只作为正常对照组。抑颤汤组 PD 大鼠给药量按成人(60 kg)每公斤体重剂量的 10 倍计算,灌胃法给药^[7],给药时间为 09:00—10:00,每日 1 次。每周称体重 1 次,按体重调整给药量,连续给药 8 周。在给药后即刻及给药 5、6、7 和 8 周观察其旋转行为的改变。模型组和正常对照组每日按体重给予等量生理盐水灌胃,观察方法同抑颤汤组。

1.6 NT 的放射免疫测定(RIA)^[8]:于灌胃 8 周后分别从正常对照组、模型组和抑颤汤组随机抽取 10、10 和 12 只大鼠,迅速断头,取出大脑称重后,放入实验缓冲液中,在冰浴中用高速匀浆器匀浆,低温离心,取上清液,置于 4℃ 的冰箱中孵育 48 h,3 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 25 min,吸弃上清液,以自动 γ 计数器测定各管沉淀物中 NT 免疫活性物(NT-IR)的含量,进一步换算成湿重组织中的 NT-IR 含量。

1.7 DA 受体结合实验测定^[9]:于灌胃 8 周后分别从正常对照组、模型组和抑颤汤组随机抽取 10、10 和 12 只大鼠,断头取大脑,称重后放入实验缓冲液中,在冰浴中用高速匀浆器匀浆,低温离心,取上清液,再次低温离心,沉淀加入缓冲液混合制成膜(0.25 g/L),-20℃ 保存备用。实验共设特异性结合管、平行管、非特异性结合管 3 组,用液闪仪测试各管的受体放射量,通过测量 5 个不同结合点放射量计算出其最大结合量(Bmax)和亲和常数(Kd)。

1.8 统计学分析:采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理,计量资料以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间率比较用 χ^2 检验,均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 旋转行为检测(表 1):正常对照组大鼠在腹腔注射 0.01% 阿朴吗啡后,每 40 min 旋转次数较少,且无固定旋转方向;PD 模型组大鼠给药前后每 40 min 旋转次数无改变,但给药后旋转次数明显多于正常对照组,差异有统计学意义(P 均 < 0.01)。抑颤汤组大鼠给药后每 40 min 旋转次数呈逐渐下降趋势,明显少于模型组(P 均 < 0.01)。

2.2 脑组织中 NT-IR 含量变化(表 2):给予抑颤汤的 PD 大鼠脑组织内 NT-IR 含量明显少于模型组大鼠($P < 0.01$),较正常对照组大鼠略高,但无统计学意义($P > 0.05$)。提示抑颤汤治疗 PD 与减少脑组织内 NT 有关。

表 1 抑颤汤对 PD 模型大鼠旋转行为(平均每 40 min 的旋转总次数)的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	给药后即刻	给药 5 周	给药 6 周	给药 7 周	给药 8 周
正常对照组	28	22.61 ± 6.28	23.32 ± 7.14	24.47 ± 8.16	21.21 ± 7.13	19.25 ± 8.73
模型组	25	341.18 ± 71.56 ^b	337.45 ± 73.50 ^b	330.30 ± 59.79 ^b	338.35 ± 67.90 ^b	340.90 ± 52.97 ^b
抑颤汤组	34	349.56 ± 62.28	112.34 ± 33.36 ^{de}	91.10 ± 73.06 ^{de}	72.05 ± 20.77 ^{de}	61.63 ± 17.93 ^{de}

注:与正常对照组同期比较,^b $P < 0.01$;与模型组同期比较,^d $P < 0.01$;与本组给药后即刻比较,^e $P < 0.01$

表 2 抑颤汤对 PD 模型大鼠脑组织中 NT-IR 含量以及 DA 受体 Bmax 和 Kd 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	NT-IR 含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Bmax(nmol/kg)	Kd(nmol/L)
正常对照组	10	66.19 ± 28.28	340.875 ± 30.110	1.524 ± 0.483
模型组	10	152.68 ± 26.21 ^b	264.630 ± 22.124 ^a	1.248 ± 0.658 ^b
抑颤汤组	12	72.37 ± 29.15 ^d	304.350 ± 19.328 ^c	1.476 ± 0.546 ^d

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,

^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

2.3 脑组织中 DA 受体 Bmax 和 Kd 比较(表 2):模型组脑组织中 DA 受体含量明显低于正常对照组,而给予抑颤汤的 PD 大鼠脑组织中 DA 受体含量明显增加,活性明显增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明抑颤汤可提高脑组织中 DA 受体的 Bmax 及亲和力,提示抑颤汤治疗 PD 有效与提高脑组织中 DA 受体的活性有关。

3 讨论

通过颅骨钻孔直接注入神经毒剂 6-OHDA 损毁大鼠脑黑质致密部,使纹状体系统损伤,引起 DA 及儿茶酚胺类物质分泌减少的方法,模拟了 PD 的临床病理现象,这种方法制备出的 PD 模型已被证明稳定可靠,重复性好,成功率较高,也符合 PD 的发病机制和临床特征^[10],为研究 PD 提供了良好的实验基础。本实验中经该法制模的大鼠由阿朴吗啡诱发的旋转行为改变较正常对照组有明显不同,表明本实验中 PD 模型复制成功。

PD 属中医“颤证”范畴,病机以肝肾亏损为本,痰瘀风为标,治疗本病以补肾为主,兼以化痰祛瘀熄风。抑颤汤中山茱萸、枸杞子、仙灵脾、肉苁蓉等为补肾健脑之品,石菖蒲化痰开窍益智,丹参活血化瘀,蜈蚣“节节有脑,乃物类之至异者,是以性能入脑,善理脑髓神经,使不失所司”,其味微辛,性微温,走窜之力最速,内而脏腑,外而经络,凡气血凝聚之处皆能开之。全方配伍,既能补益肝肾,又能化痰祛瘀,标本兼治^[11]。本实验结果表明,抑颤汤能够降低黑质内 NT 释放。有文献报道,经过对 PD 患者血液检查及尸检发现,PD 患者血浆中及脑组织内 NT 均升高,并且发现未进行任何治疗的 PD 患者较药物治疗后的 PD 患者血浆中 NT 更高^[12-13]。动物实验也

证实黑质内的 NT 在细胞水平具有减弱 DA D2 受体感受器的作用^[14],因而我们推测抑颤汤治疗 PD 的机制可能为调节黑质内 NT 含量,提高 PD 模型大鼠脑组织中 DA 受体的含量和活性,通过提高脑组织 DA 受体的含量和活性达到改善脑组织的功能,但其详细机制尚有待进一步阐明。

参考文献

- 王向红,李志超,贾斌. 脑血管病发生发展中神经降压素的变化[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(7): 650-652.
- Tyler-McMahon B M, Boules M, Richelson E. Neurotensin: peptide for the next millennium [J]. Regul Pept, 2000, 93(1-3): 125-136.
- 路长林. 神经肽基础与临床[M]. 上海: 上海第二军医大学出版社, 2000: 3.
- Schwartz R K, Bonatz A E, Carey R J, et al. Relationships between indices of behavioral asymmetries and neurochemical changes following mesencephalic 6-Hydroxydopamine injections [J]. Brain Res, 1991, 554(1-2): 46-55.
- 薛毅珑, 罗芸, 崔忻, 等. 6-羟多巴诱发偏侧帕金森病样大鼠模型的制作和特征[J]. 军医进修学院学报, 1999, 20(3): 164-166.
- 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 30-59.
- 施新猷. 医学动物实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1980: 111.
- 何波, 王玉新. 黑质神经降压素与多巴胺相互作用及机制探讨[J]. 山东医科大学学报, 1995, 33(1): 20-24.
- 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 349-377.
- Bjorklund L M, Sánchez-Pernaute R, Chung S, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(4): 2344-2349.
- 杨明会, 襄永起, 刘毅, 等. 抑颤汤治疗帕金森病临床对照观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9(5): 256-257.
- Schimpff R M, Avard C, Fénelon G, et al. Increased plasma neurotensin concentrations in patients with Parkinson's disease [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2001, 70(6): 784-786.
- Fernandez A, de Ceballos M L, Rose S, et al. Alterations in peptide levels in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease [J]. Brain, 1996, 119(Pt 3): 823-830.
- Werkman T R, Kruse C G, Niveltstein H, et al. Neurotensin attenuates the quinpirole-induced inhibition of the firing rate of dopamine neurons in the rat substantia nigra pars compacta and the ventral tegmental area [J]. Neuroscience, 2000, 95(2): 417-423.

(收稿日期: 2007-10-14 修回日期: 2008-03-04)

(本文编辑: 李银平)