

抑颤汤对帕金森病模型大鼠 M、多巴胺受体及儿茶酚胺类物质的影响

杨明会* 奚永起* 刘毅*

摘要 目的:探讨抑颤汤治疗帕金森病(PD)的作用机理。方法:建 PD 大鼠模型,设立正常对照组、生理盐水对照组、抑颤汤组,采用脑组织液微透析技术,用高效液相色谱电化学法测定细胞外液中儿茶酚胺类物质含量,用放免法测定 M 受体、多巴胺(DA)受体亲和力、数量的变化。结果:抑颤汤提高了 PD 模型大鼠损毁侧脑组织 M 和 DA 受体最大结合量(Bmax)和亲和常数(KD),损毁侧尾状核和壳核部位细胞外液中 3,4-二羟苯甲酸(DOPAC)、高香草酸(HVA)、DA、5-羟色胺(5-HT)明显低于未损毁侧,经抑颤汤治疗后,与生理盐水组对照差异有显著性($P < 0.01$)。结论:抑颤汤能够刺激 PD 模型大鼠受体系统,使 M、DA 受体的亲和力和敏感性提高;促进其损毁侧黑质纹状体分泌儿茶酚胺类物质,提高脑组织中儿茶酚胺类物质的含量。
主题词 帕金森病/中医药疗法 儿茶酚胺类/代谢 @抑颤汤

帕金森病(PD)是以震颤、肌强直、运动减少和姿势异常为特征的慢性神经系统变性疾病。我们用抑颤汤治疗 PD 患者取得了较好的临床疗效,为探索其作用机理,观察了抑颤汤对 PD 大鼠模型脑组织 M 受体、多巴胺(DA)受体含量和脑组织透析液中儿茶酚胺类物质的影响。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料:雌性 SD 大鼠 120 只,体重 180~200g,全部由解放军总医院医学实验动物中心提供;6-羟基多巴(6-OHDA)、阿朴吗啡、维生素 C 均为 Sigma 公司产品;日本产 SN-2 型脑立体定位仪,国产 QL-1 型小动物旋转监测仪,Beckman 公司 LS-9800 液闪仪,安捷伦 1100 高效液相色谱仪,0.32M 蔗糖溶液、0.05M Tris-HCl 缓冲液、甲苯闪烁液、阿托品(10^{-5} mol)液、5-羟色胺(5-HT, 10^{-4} mol)液、生理盐水。英国 Amersham 公司的产品 ^3H -QNP(比活度 48ci/mmol)、 ^3H -spiperor(比活度 24ci/mmol)。

1.2 药物及制法:抑颤汤由山茱萸 15g、石菖蒲 15g、淫羊藿 10g、肉苁蓉 15g、枸杞子 15g、丹参 15g、蜈蚣 1 条等组成,解放军总医院中药房鉴定并提供。按传统煎药法文火煎 30min 获取药液,以恒温水浴锅浓缩成含

生药 1.0g/ml 汤剂,消毒玻璃瓶密闭盛装,冰箱 4℃ 保存备用。

1.3 造模方法^[1,2]:大鼠称重、编号,用 10%水合氯醛溶液腹腔注射(5ml/kg),头顶部去毛发,固定于 SN-2 型脑立体定位仪上,碘酒、酒精消毒,切开皮肤及筋膜,暴露颅骨。脑核团定位方法依据大鼠脑立体定位图谱^[3],将右侧黑质坐标选定为:门齿线低于水平线 - 3.3mm、A/P(距前囟中心后) - 4.8mm、L/R(距前囟中心左右)1.6mm、O/V(距脑膜表面深度) - 8.2mm。将右侧黑质坐标定位后,钻开右侧颅骨。用微量注射器抽取新鲜配制的 6-OHDA 液($2\mu\text{g}/\mu\text{l}$),以 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度缓慢进针,注射完毕后留针 3min,以 1mm/min 的速度缓慢旋转退针,止血、缝合皮肤,碘酒消毒。腹腔注射青霉素(10 万 U/kg),每日 1 次,局部碘酒消毒每日 1 次,7 日后拆线。术后 2 周,用 0.01%阿朴吗啡腹腔注射(1ml/只),然后观察记录每 5min 向健侧旋转次数及 40min 旋转的总次数,旋转次数 ≥ 7 圈/min(280 圈/40min)者为阳性。每周 1 次,连续 4 周阳性者为合格 PD 模型大鼠^[2]。

1.4 分组及给药方法:将造模成功的 70 只 PD 模型大鼠随机分为生理盐水组 30 只和抑颤汤组 40 只;另取未经造模的正常雌性 SD 大鼠 30 只作为正常对照组。抑颤汤组 PD 大鼠每千克体重给药量按成人(60kg)每千克体重剂量的 10 倍计算,灌胃法给药^[4],给药时间为上午 9~10 时,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。给药第 5 周开始观察其旋转行为的改变,每周观察 1 次,连续观察 4 周。生理盐水对照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。

1.5 M 受体和 DA 受体结合实验^[5]:将大鼠断头,取出大脑称重,将大脑放入实验缓冲液中,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(0.25mg/ml), - 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,用液闪仪测试不同结合管的 M 受体(或 DA 受体)放射量。

1.6 脑组织液透析:将大鼠麻醉(20%乌拉坦)固定于脑立体定位仪上,将微透析针尖定位于黑质部(坐标同

基金项目:国家自然科学基金资助课题(39970913)

* 中国人民解放军总医院中医科,北京市复兴路 28 号(100853)

收稿日期:2002-07-02;修回日期:2002-08-20

表1 各组大鼠脑组织中儿茶酚胺类物质含量比较 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	DA	DOPAC	HVA	5-HTAA	5-HT
正常对照组(左侧)	10	2.96±1.04	24.31±10.38	31.22±11.30	5.16±2.87	3.41±2.64
抑颤汤组(左侧)	15	2.51±0.97	23.07±10.12	29.47±10.05	5.13±2.19	3.37±2.36
生理盐水对照组(左侧)	10	2.46±1.21 [▲]	22.86±9.32 ^{▲▲}	25.19±10.12 [▲]	5.11±2.26	3.18±2.68
正常对照组(右侧)	10	2.94±1.13	24.29±10.40	30.25±11.33	5.41±2.49	3.58±2.36
抑颤汤组(右侧)	15	1.98±0.87 [△]	20.87±8.73 [△]	24.06±10.68 [△]	5.18±2.61	3.23±2.09
生理盐水对照组(右侧)	10	1.26±0.53 ^{△△}	10.17±5.07 ^{△△}	11.92±10.59 ^{△△}	4.75±2.11	1.97±1.06

与同侧正常对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与同侧生理盐水组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与生理盐水组右侧比较, $\blacktriangle P<0.05$,

$\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$

表2 抑颤汤对PD大鼠脑组织中M受体的KD和Bmax的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	Bmax(fmol/mg)	KD(nmol/L)
正常对照组	10	422.2584±18.0672	1.5399±0.4612
抑颤汤组	12	399.8696±28.8958	1.4937±0.4253
生理盐水对照组	10	327.1812±23.0495 [△]	1.3717±0.4386

Δ 与抑颤汤组比较, $P<0.01$; *与正常对照组比较, $P<0.01$

表3 抑颤汤对PD大鼠脑组织中DA受体的KD和Bmax的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	Bmax(fmol/mg)	KD(nmol/L)
正常对照组	10	328.934±27.1219	1.4947±0.5717
抑颤汤组	12	300.7695±17.5895	1.3649±0.5455
生理盐水对照组	10	266.017±21.1852 [△]	1.2679±0.4308

Δ 与抑颤汤组比较, $P<0.01$; *与正常对照组比较, $P<0.01$

前), 钻开颅骨, 打开脑膜暴露大脑皮质, 将透析针(有效长度3mm)插入黑质部, 连接微透析泵, 以1.2 μ l/min的灌注速度注入灌注液(NaCl 140mmol/L、KCl 2.4mmol/L、MgCl₂ 1.0mmol/L、CaCl₂ 1.2mmol/L、NaHCO₃ 5.0mmol/L、VitC 0.6mmol/L, pH=7.4), 每30min收集1份(40 μ l)灌流液入预先加入10 μ l 0.1N高氯酸的离心管中, 分别获取左右两侧组织液, -80℃低温冰箱保存。

1.7 儿茶酚胺类物质测定^[6]: 用高效液相色谱法测定脑组织微透析液中儿茶酚胺类物质。

2 结果

2.1 各组大鼠儿茶酚胺类物质测定结果比较: 采用高效液相色谱电化学法测定脑组织透析液中儿茶酚类物质DA、3,4-二羟基苯酸(DOPAC)、高香草酸(HVA)、5-HT、5-羟基吲哚乙酸(5-HTAA)的含量。表1结果表明, 抑颤汤组脑组织透析液中DA、5-HT、HVA、5-HTAA的含量左右侧对比差异无显著性($P>0.05$), 但其脑组织透析液中的DA、HVA、含量明显高于生理盐水对照组, 差异有显著性意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 5-HT、5-HTAA的含量虽然也有所增高, 但差异无显著性意义($P>0.05$); 而生理盐水组左右对比DA、HVA、DOPAC明显低于未损毁侧($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

2.2 各组大鼠脑组织中M受体和DA受体最大亲和力与结合量测定比较: 通过测量不同结合点(5个结合点)放射量, 计算出其亲和常数(KD)和最大结合量(Bmax), 表2、表3示, 给予抑颤汤的PD模型大鼠脑组织中M受体和DA受体含量明显增加, 活性明显增强, 而生理盐水对照组则明显低于正常对照组和抑颤汤组($P<0.01$)。结果表明, 抑颤汤可提高脑组织中M受体和DA受体的最大结合量及亲和力($P<0.01$), 提示抑颤汤治疗PD有效与提高脑组织中M、DA受体的活性有关。

3 讨论

我们根据多年的临床经验认为, 该病病机以肝肾亏损为本, 瘀血痰风为标, 主张治疗本病以补肾为主, 兼以化痰祛痰熄风。抑颤汤用山茱萸、枸杞子、淫羊藿、肉苁蓉等补肾益脑, 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”。全方配伍合理, 药中病机。

本文实验结果表明, 抑颤汤能够提高PD模型大鼠脑组织中儿茶酚胺类物质的含量, 促进DA的释放, 使M、DA等受体的亲和力和敏感性提高, 受体协同作用增强而产生治疗作用, 有关作用机理还有待进一步研究。

参考文献

- 1 Schwartung RK, Bonatz AE, Carey RJ, et al. Relationships between indices of behavioral asymmetries and neurochemical changes following mesencephalic 6-hydroxydopamine injections. Brain Res, 1991; 551(1-2): 46-55.
- 2 薛毅成, 罗芸, 崔忻, 等. 6-羟基多巴诱发偏侧帕金森样大鼠模型的制作和特征. 军医进修学院学报, 1999; 20(3): 161-166.
- 3 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱. 北京: 人民卫生出版社, 1991; 30-59.
- 4 施新猷主编. 医学动物实验方法. 北京: 人民卫生出版社, 1986; 111.
- 5 徐叔云, 卞如谦, 陈修, 等. 药理实验方法学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1994; 349-377.
- 6 程兰英, 郑肖利, 卞叶, 等. 大鼠脑组织中单胺类神经递质及代谢产物的液相色谱测定法. 中日友好医院学报, 1992; 6(2): 219.