

滋补肝肾通络解毒中药对帕金森病模型大鼠酪氨酸羟化酶及其信使核糖核酸的影响

何建成¹ 袁灿兴² 卫洪昌¹ 陈汝兴²

摘要 目的:探讨滋补肝肾通络解毒中药治疗帕金森病(PD)的作用机制。方法:采用6-羟基多巴胺(6-OHDA)注射于大鼠脑右侧黑质造成偏侧PD模型。并用滋补肝肾通络解毒中药进行治疗,同时设立正常对照组、假手术组。用免疫组化和RT-PCR的方法观察对酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞及酪氨酸羟化酶信使核糖核酸(THmRNA)表达的影响。结果:滋补肝肾通络解毒中药可使TH阳性细胞数目明显增加,TH mRNA的表达亦明显增加,且两者的变化趋势是一致的。结论:滋补肝肾通络解毒中药对TH含量的升高作用是通过影响TH mRNA而产生的。

关键词 帕金森病/中医药疗法 补益肝肾 通络

我们已有的临床研究证明,滋补肝肾、通络解毒中药配合西药治疗帕金森病(PD)具有增效减毒作用^[1]。本研究检测了酪氨酸羟化酶(TH)、酪氨酸羟化酶信使核糖核酸(TH mRNA),旨在从分子水平揭示滋补肝肾、通络解毒中药治疗PD的作用机制。

1 材料

1.1 动物:Wistar大鼠,雄性,体重180~220g,由上海中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号:沪动合格字152号。

1.2 药物:滋补肝肾、通络解毒中药,包括汤药和胶囊。其中汤药内含熟地黄、桑寄生、枸杞子、天麻、钩藤、僵蚕、丹参、莪术、白芍、生胆南星,按既定工艺煎煮成汤药,每毫升含原药材2.961g,由上海中医药大学附属龙华医院制剂室制备;蝎蜈胶囊内含全蝎、蜈蚣,每粒0.3g,由上海中医药大学附属龙华医院提供,批号(院内制剂)010813。按比例将胶囊混匀于汤药中,使浓度为3.006g/ml,备用。盐酸氯胺酮为上海中西药业股份有限公司产品,卫药准字000602。庆大霉素为上海第一制药厂产品,卫药准字001250。

1.3 试剂:6-OHDA:美国Sigma公司产品;阿朴吗啡(APO):美国Sigma公司产品;抗坏血酸:美国Sigma公司产品;兔抗TH抗体:浓度为1:400,Pei-Freez

Biologicals 产品(USA);羊抗兔IgG:浓度为1:200,VECTOR产品;AB液:浓度为1:100,VECTOR产品;多聚甲醛:Merke产品;DAB:上海伯奥生物科技有限公司(美国进口分装),批号为980225;异硫氰酸胍:Gibco公司产品;AMV逆转录酶:Promega公司产品;Oligo(dT):Promega公司产品;Taq酶:华美公司产品;引物:塞百胜公司产品。

1.4 仪器:大鼠脑立体定位仪:TOW-3A型,汕头市教育医学仪器厂;微量进样器(5 μ l):上海第三分析仪器厂;核酸蛋白分析仪:Beckman公司;核酸蛋白成像仪:Pharmacia公司;电泳仪及水平电泳槽:Bio-Rad公司;PCR仪:PE公司;显微镜:Nikon UFX-II, Japan;IMS彩色图像分析综合系统:上海申腾信息技术有限公司。

2 方法

2.1 大鼠模型制备^[2]:雄性大鼠,术前按常规进行行为测试,确认无异常旋转行为后,用氯胺酮(80mg/kg)腹腔注射麻醉。然后将大鼠固定于脑立体定位仪上,头部去毛,新洁尔灭常规消毒。无菌条件下,沿正中中线切开大鼠颅顶皮肤,剥离骨膜,暴露前囟。以前囟为准,根据包新民等^[3]大鼠脑立体定位图谱,确定右侧黑质二坐标:(1)前囟后5.2mm,正中右侧1.0mm,硬膜下9.0mm;(2)前囟后5.2mm,正中右侧2.5mm,硬膜下8.5mm。用颅骨钻于手术要求部位小心钻开颅骨,用5 μ l微量进样器将6-OHDA(溶于含0.02%抗坏血酸的生理盐水中,浓度为2 μ g/ μ l)注入右侧黑质部(以1.0mm/min速度缓慢进针),每孔3 μ l,注射速度为1 μ l/min,注射完毕后留针5min,然后以1.0mm/min速度缓慢退针。手术完成后,用医用明胶海绵填塞颅骨孔,缝合切口皮肤,肌肉注射庆大霉素,待动物清醒后放回饲养笼中饲养。

假手术组只注射含0.02%抗坏血酸的等量生理盐水,其余条件与造模手术相同。正常对照组只固定大鼠,不进行任何处理。

10天后,以腹腔注射APO 0.5mg/kg诱发大鼠向一侧旋转,记录开始旋转至30min内的旋转圈数,以旋

基金项目:上海市教委科研基金资助项目(98C08)

1 上海中医药大学基础医学院,上海市零陵路530号(200032)

2 上海中医药大学附属龙华医院

收稿日期:2002-10-15;修回日期:2002-11-14

转圈数平均每分钟超过 7 次者为合格的 PD 模型^[4]。

2.2 动物分组及给药:本实验共分正常对照组、假手术组、模型组、中药组 4 组,每组 9 只。其中正常对照组、假手术组、模型组每鼠灌胃等体积生理盐水,中药组每鼠灌胃滋补肝肾、通络解毒中药混悬液 30.06g/kg。每日 1 次,共 45 天。

2.3 观察指标及测试方法:实验结束测其旋转行为后,在每组中取 3 只动物进行灌注固定,另在每组取 6 只动物作为 RT-PCR 样本。

2.3.1 TH 测试方法:将灌注固定的大鼠断头,打开头颅顶盖,小心取出脑组织,分离纹状体和黑质,并浸于含 20%蔗糖的磷酸盐缓冲液(PBS)中(4℃)过夜。用冰冻切片机作 50μm 的连续切片,切片按 Hsu 的 ABC 方法^[5],作 TH 免疫组织化学染色。

每组观察 6 张切片,每张切片在光镜高倍镜下随机取 3 个 4mm² 的视野,用 IMS 彩色图像分析系统进行 TH 神经元计数。

2.3.2 RT-PCR 样本制作及测试方法:将实验大鼠迅速断头,打开头颅顶盖,小心取出脑组织,分离黑质,置液氮中保存。(1)组织总 RNA 抽提:用异硫氰酸胍法^[6]。将抽提好的总 RNA 取 10μl 稀释至 1ml 测 OD260 和 OD280 光密度定量并用凝胶电泳鉴定其分子的完整性。(2)TH 引物的设计与合成:根据文献^[7]合成引物序列。

引物 TH:正向:5'-GGA CGG CGA CAG AGT CTC AT-3'

反向:5'-AGC TTC CGA CGC TGG CGA TA-3' 扩增片段为 512bp。

引物 β-actin:正向:5'-TGT CCC TGT ATG CCT CTG GT-3'

反向:5'-TTG ATG TCA CGC ACG ATT TC-3'

扩增片段为 217bp。

(3)逆转录(RT,总体积为 20μl):42℃反应 50min,70℃反应 10min 灭活逆转录酶。(4)多聚酶链反应(PCR):94℃预变性 5min;94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 30s,30 个循环;72℃延伸 7min。(5)电泳分析及计算:取 PCR 产物(靶基因 10μl,β-actin 产物 10μl)进行 1.8%的琼脂糖凝胶电泳。结束后用凝胶成像系统拍照,并进行电泳条带光密度分析。标本靶基因条带光密度参数与内参基因条带的光密度参数之比值作为该标本 mRNA 的表达水平参数。

2.4 统计学处理方法:所有资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 版软件进行齐性检验并统计结果。

3 结果

3.1 各组两侧黑质的 TH 阳性细胞计算结果比较:在正常对照组、假手术组的黑质均可见密集的

表 1 各组两侧黑质的 TH 阳性细胞计数比较(个/每视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	视野数	损毁侧	损毁对侧
正常组	18	37.22±4.59*△	38.50±6.34
假手术组	18	36.06±4.89*△	37.00±8.76
模型组	18	4.50±1.82▲▲	38.06±8.29
中药组	18	29.00±4.60*▲	35.50±7.24

与模型组比较,* $P<0.001$;与中药组比较,△ $P<0.001$;与本组损毁对侧比较,▲ $P<0.01$,▲▲ $P<0.001$

表 2 各组 TH mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	TH mRNA
正常对照组	6	1.64±0.17*
假手术组	6	1.66±0.18*
模型组	6	0.73±0.09
中药组	6	1.45±0.19*

与模型组比较,* $P<0.01$

TH 阳性细胞,呈棕褐色,这些细胞体主要为圆形或卵圆形,少数为极形。有些细胞分枝状树突、单根或成束的轴突清晰可见,左右两侧的细胞数目相近;纹状体内可见细而密集的 TH 阳性终末,呈棕褐色。模型组右侧黑质可见少量、稀疏的 TH 阳性细胞,纹状体内可见细而稀疏的 TH 阳性终末,呈棕褐色;而模型组左侧可见密集的 TH 阳性细胞,细胞计数与正常对照组、假手术组相近;中药组黑质可见较密集的 TH 阳性细胞,呈棕褐色,细胞体亦主要为圆形或卵圆形,少数为极形;纹状体内也可见细而较密集的 TH 阳性终末,呈棕褐色。表 1 示,模型组损毁侧 TH 阳性细胞计数与各组比较,差异有显著性($P<0.001$)。中药组虽较模型组为好($P<0.001$),但仍不及正常组及假手术组($P<0.001$)。

3.2 总 RNA 抽提结果:随机在各组取 RNA 样本,经紫外分光光度计测定,A260/A280 比值在 1.8~2.0 之间,说明 RNA 无污染;将 RNA 经变性琼脂糖凝胶电泳后,在紫外灯下,可见到 28S 和 18S 两条清晰带,且 28S 的荧光强度为 18S 的二倍以上,说明 RNA 分子无降解。

3.3 各组 TH mRNA 表达情况:凝胶电泳结果发现,各组靶基因条带均出现在 512bp 附近,其中模型组荧光强度最暗,中药组次之,正常组及假手术组最亮;内参 β-actin 条带均出现在 217bp 附近。

从表 2 可见,模型组黑质内 TH mRNA 虽有表达,但比正常对照组、假手术组明显降低,其结果经统计学处理,差异有显著性意义($P<0.01$)。而经中药治

疗后有所上升,与模型组相比差异有显著性($P < 0.01$)。

4 讨论

本病病因繁多,病机复杂。我们认为其病理性质属于本虚标实,虚实夹杂。本虚为肝肾亏损,气血不足,标实为风、痰、瘀、火、毒胶结。盖肝藏血主筋,肾藏精主骨,年老体衰,肾水无以滋养肝木,筋骨失于濡养,风阳扰动,兼夹瘀、毒、痰、火,伤及脑窍所致。此中以虚、风、痰、毒、火为主,而本虚则尤其重要。是故其治,不仅要重点突出,又要兼顾全面,即以补虚为主,兼顾风、痰、毒、火、痰。滋补肝肾、通络解毒中药便是以此为据组方研制而成的,由熟地黄、枸杞子、桑寄生、白芍、天麻、钩藤、丹参、莪术、全蝎、蜈蚣、生胆南星、僵蚕组成。

多巴胺(DA)合成的主要调节因素是TH,TH是DA能神经元合成的限速酶。TH免疫组织化学方法常被用于显示DA能神经元细胞体及其突起。本研究应用TH免疫组织化学方法清晰地显示了神经元细胞体及突起。研究结果显示,模型组右侧黑质可见少量、稀疏的TH阳性细胞,左侧可见密集的TH阳性细胞,右侧为左侧的11.82%,表明经6-OHDA处理后,右侧黑质及纹状体的DA能神经元大多数被损毁,与文献报道一致^[8]。

我们的研究还发现,模型组TH及TH mRNA的含量均降低,而经中药治疗后,中药组损毁侧黑质可见较密集的TH阳性细胞,呈棕褐色,是左侧的81.69%,提示中药可以升高TH的含量,提高TH的活力,阻止或缓解6-OHDA对黑质及纹状体的损毁作用;TH mRNA的表达亦明显增加,且与TH的变化相

一致,说明TH蛋白的升高是由于细胞内TH mRNA的升高所致。提示滋补肝肾通络解毒中药对TH含量的升高作用是通过影响TH mRNA而产生的。

总之,RT-PCR和免疫组化检测分别从核酸和蛋白质水平证明了滋补肝肾通络解毒中药在黑质纹状体内可以产生TH蛋白,它将酪氨酸转化为左旋多巴,后者脱羧成为神经递质DA,代偿了由于黑质的DA能神经元损毁所造成的黑质纹状体通路中DA缺乏造成的疾病,从而产生疗效。

参考文献

- 1 袁灿兴. 滋补肝肾通络解毒法治PD的增效减毒作用. 中医杂志, 2000, 41(增刊): 160-162.
- 2 Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-OHDA lesions of the nigrostriatal dopamine system. Brain Res, 1970, 24(3): 485-493.
- 3 包新民, 舒思云. 大鼠脑立体定位图谱. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 53-55.
- 4 Carman LS, Gage FH, Shults CW. Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. Brain Res, 1991, 553(2): 275-283.
- 5 Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem, 1981, 29(4): 577-580.
- 6 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998: 123-126.
- 7 Ferraris N, Perroteau I, De Marchis S, et al. Glutamatergic deafferentation of olfactory bulb modulates the expression of mGluR1a mRNA. Neuroreport, 1997, 8(8): 1949-1953.
- 8 蒋芝华, 刘振国, 陈生弟, 等. 人胚DA能神经元移植于帕金森病猴模型的TH免疫细胞化学的研究. 生理学报, 1995, 47(1): 31-37.

北京明驰新瑞商贸有限公司产品报价

BJQ301 超中频透热导入治疗仪	880 元/台	绿海多功能治疗仪(医用四路)	4880 元/台	手诊治疗仪	890 元/台	充气式颈椎牵引器	178 元/个
三特无针型针灸按摩治疗仪	398 元/台	全日康电脑中频治疗仪 118A	690 元/台	颈椎保健按摩枕(加强型)	298 元/个	神奇手治疗仪(便携式)	218 元/台
三特 ST97 带定时可转换	566 元/台	18A2型 880 元/台 加热型	1080 元/台	颈椎保健按摩枕(电脑型)	478 元/个	青岛 G6805-1 型电针治疗仪	256 元/台
三特针灸双路	668 元/台	精工好医生消毒杀菌机	398 元/台	KOI 前列腺康复仪	468 元/台	青岛 G6805-2 型电针治疗仪	316 元/台
YD 药物导入治疗仪(单路)	280 元/台	精工好医生微电脑综合治疗仪	880 元/台	韩氏 202H 神经刺激仪	680 元/台	富康神茶(降血脂 血压)	156 元/盒
YD 药物导入治疗仪(双路)	680 元/台	WQ1001M10C2 电子测穴治疗仪	298 元/台	韩氏戒毒仪	1900 元/台	富康浴包(治疗皮肤病)	185 元/包
808 屏幕显示脉冲电针仪四路	350 元/台	WQ6F 多路电子针灸治疗仪	468 元/台	DAJ 多功能艾灸仪四路	560 元/台	通泰胶囊(通便润肠)	98 元/盒
808 屏幕显示脉冲电针仪六路	380 元/台	清激牌臭氧消毒净化器	650 元/台	DAJ 多功能艾灸仪 10 路	3980 元/台	康捷胆肾结石治疗仪(四路)	1680 元/台
ZYZ20GZ 高性能针灸治疗仪	1280 元/台	GZY 四路电脑骨质增生治疗仪	4500 元/台	妇宝菌迪洗液(女用)	96 元/套	清艾条 10 元/包 太乙艾条	9 元/包
VT91B 针灸按摩治疗仪四路	4800 元/台	家贝牌卫生间消毒柜系列	398~598 元/台	轮椅	700~1500 元/个	华佗针灸针、无菌针	26 元/50 元
VT91C 针灸按摩治疗仪双路	2800 元/台	JT 2A 经络疏通治疗仪	2200 元/台	电脑骨质增生治疗仪(单路)	680 元/台	天协无菌针	16 元/盒
VT91A 近视眼治疗仪医用双路	1680 元/台	GZYB 颈腰椎病治疗仪	590 元/台	电脑骨质增生治疗仪双路双表	2800 元/台	神龙针灸针、无菌针	18~30 元
VT91A 近视眼治疗仪(家用型)	480 元/台	GZYJ 电脑颈腰椎病治疗仪	4850 元/台	可调式悬挂颈椎牵引器带压力表	330 元/台	枪式真空拔罐(带书)	150 元/套
VT91A-1 前列腺治疗仪	3800 元/台	GZY-A 颈腰椎骨质增生治疗仪	7800 元/台	奇人高血压治疗仪	380 元/个	刮痧油 25 元/瓶 刮痧板	25 元/个
TDP 磁谱仪神灯台式普通型	350 元/台	心脑血管治疗仪 2000B 型	3800 元/台	可调式悬挂颈椎牵引器	390 元/台	男女挂图 36 元/套	足图 10 元/张
TDP 磁谱仪神灯台式豪华型	450 元/台	3C 骨质增生药物电脉冲治疗仪	486 元/台	人体骨骼模型(不带神经)	42cm 85 元/套	耳图	12 元/张
TDP 磁谱仪神灯立式普通型	560 元/台	3A 台式风湿治疗仪	2880 元/台	凯诺颈椎枕	380 元/个	汉章注射刀	210 元/套
TDP 磁谱仪神灯立式豪华型	620 元/台	178cm 人体穴位标准模型	1700 元/台	CD-9 痔疮治疗仪	328 元/台	汉章小针刀	160 元/套
TDP 磁谱仪神灯立式双头	920 元/台	多功能肢体瘫痪康复仪 IC 型	980 元/台	脊椎神经根模型(带骨盆)	280 元/套	食用菌(调理心 肝 脾 肺)	380~398 元/瓶
绿海多功能治疗仪(家用双路)	485 元/台	多功能肢体瘫痪康复仪 ID 型	5680 元/台	凯诺护腰	210 元/套	各种灸盒灸架	
绿海智能型治疗仪(家用单路)	388 元/台	颈椎保健按摩枕(普通型)	268 元/个	场效应治疗仪 02B	228 元/台		

注: 本公司还经营各种白大衣、手术衣、电子血压计、台式血压计、听诊器、医学 VCD 教材、美国斯达克助听器(可定做)等产品(详细目录备索)。以上商品 100 元以上办理邮购, 另加 10% 邮费。500 元以上免费邮购。我单位信譽, 讲效率。款到三天内必发货, 对所售产品实行三包。邮购地址: 北京市东城区张自忠路 8-2 号 邮编: 100007 电话: 010-64012454 帐号: 366201050320-14 开户行: 北京市商业银行朝外支行 网址: www.mohm.com.cn 联系人: 赵文美