

。 方药研究 。

天麻钩藤饮对帕金森病模型大鼠多巴胺能神经元凋亡的影响

何建成 王文武

(上海中医药大学基础医学院,上海市浦东新区张江蔡伦路 1200号,201203)

[摘要] 目的 研究天麻钩藤饮对帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型大鼠多巴胺能神经元凋亡的影响。方法 采用6-羟多巴胺注射于脑右侧黑质造成单侧PD损毁模型,并将造模成功的大鼠随机分为模型组和天麻钩藤饮组(给药浓度为5.13g/ml),共给药14天。同时设立正常对照组、假手术组。应用TUNEL透射电镜观察多巴胺能神经元凋亡的变化,免疫组化法观察黑质Bcl-2、Bax的表达。结果 模型组均能检测到TUNEL染色阳性细胞核,且模型组凋亡细胞数明显多于正常对照组、假手术组($P < 0.01$)。天麻钩藤饮组也能检测到凋亡细胞核,但与模型组比较,凋亡细胞数较少($P < 0.01$)。与正常对照组及假手术组比较,模型组Bax和Bcl-2表达水平均显著升高($P < 0.01$),且以Bax蛋白升高为主;而与模型组比较,天麻钩藤饮组Bcl-2显著升高,Bax显著降低($P < 0.01$)。电镜结果显示,天麻钩藤饮组神经细胞病理变化比模型组明显为轻。结论 天麻钩藤饮对PD模型大鼠多巴胺能神经元凋亡有明显抑制作用,其作用机制可能是通过抗氧化应激,升高Bcl-2,抑制Bax激活而实现的。

[关键词] 帕金森病;细胞凋亡;天麻钩藤饮;多巴胺能神经元

Effect of Tianma Gouteng Yin on Apoptosis of Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease Model Rats

HE Jiancheng, WANG Wenwu

(College of Preclinical Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

ABSTRACT Objective To study the effect of Tianma Gouteng Yin (Decoction of Gastrodia and Uncaria) on apoptosis of dopaminergic neurons in Parkinson's disease (PD) model rats. **Methods** The PD models were established by injecting 6-hydroxy dopamine into the right substantia nigra of brain and treated with Tianma Gouteng Yin (5.13g/ml) for 14 days. At the same time the normal control group and pseudo-operation group were set up for comparison. The changes of dopaminergic neurons apoptosis were observed with the help of TUNEL and transmission electron microscopy and the expression of substantia nigra Bcl-2 and Bax was observed with immunohistochemical method. **Results** The positive TUNEL stained nucleus could be detected on the samples in the model group and the apoptosis cells were significantly more than those of the normal control group and pseudo-operation group ($P < 0.01$). In the Tianma Gouteng Yin group, there was also apoptotic nucleus found, but the apoptotic cells were much less than in the model group ($P < 0.01$). Compared with the normal control group and pseudo-operation group, the expression of Bax and Bcl-2, especially Bax, in the model group was significantly higher. Compared with the model group, the expression of Bcl-2 in the Tianma Gouteng Yin group was significantly higher, but that of Bax was significantly lower ($P < 0.01$). The electron microscopy examination showed that the pathological changes of neurons in Tianma Gouteng Yin group were significantly milder than those in the model group. **Conclusion** Tianma Gouteng Yin restrains significantly the apoptosis of dopaminergic neurons in rats with Parkinson's disease and its mechanism may be actualized by lifting the expression of Bcl-2 and restraining the activation of Bax through anti-oxidation stress.

Key Words Parkinson's disease; Apoptosis; Tianma Gouteng Yin (Decoction of Gastrodia and Uncaria); Dopaminergic neurons

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是以静止性震颤、肌强直、运动迟缓和姿势异常为主要临床特征的慢性神经系统变性疾病。随着人口老龄化的日趋明显,本病的发病率有上升趋势^[1]。帕金森病的病理生化机制是黑质、纹状体多巴胺神经元进行性变性,导致多巴胺能神经元含量显著降低。直接和间接的依据均提示,细

胞凋亡的增加是导致黑质纹状体多巴胺能神经元丢失的主要原因^[2]。近年来的研究发现,中医药不仅对本病具有较好的疗效,而且与西药合用可以提高临床疗效,降低化学药物的副作用^[3],病机与肝肾阴虚动风有关^[4],天麻钩藤饮功能滋补肝肾、平肝熄风,与美多芭合用治疗帕金森病,可明显提高疗效,减少副作用^[5]。前期研究发现,天麻钩藤饮可以明显改善PD大鼠的神经行为学变化,并可以提高机体的抗氧化和清除自由基的能力^[6]。本实验进一步观察天麻钩藤饮对PD模型

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672684);上海市教委基金资助项目(05CZ04);上海市重点学科建设项目(S30302)

通讯作者:何建成,hej8163@163.com, (021)51322142

大鼠细胞凋亡的影响 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 动物

SD大鼠 50只,SPF级,雄性,体重 180~ 200g,由上海中医药大学实验动物中心提供 实验动物许可证号: SYXK(沪) 2004- 0005

1.2 药品、试剂和仪器

药品: 盐酸氯胺酮: 上海中西药业股份有限公司产品,批号: 000602, 0. 05g /ml; 美多芭: 上海罗氏制药有限公司,批号: SH0526, 250mg /片; 庆大霉素: 上海第一制药厂生产,批号: 001250, 0. 3g /皮; 天麻钩藤饮: 天麻 9g, 钩藤 12g, 石决明 18g, 栀子 9g, 黄芩 9g, 川牛膝 12g, 杜仲 9g, 桑寄生 9g, 夜交藤 9g, 朱茯神 9g, 益母草 9g, 药材煎煮 2次合并滤液, 减压浓缩至含生药 5. 13g /ml, 由上海雷允上药材有限公司代加工。 试剂: 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA)、阿扑吗啡 (APO)、抗坏血酸, 均为美国 Sigma 公司产品; 细胞凋亡检测试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品; Bcl-2 Bax 检测试剂盒为北京博奥森生物技术有限公司产品; 二氨基联苯胺 (DAB): 上海伯奥生物科技有限公司 (美国进口分装), 批号 980225 仪器: 大鼠脑立体定位仪: TOW-3A型, 广东汕头市教育医学仪器厂; 振动切片机: 日本 AIW A; 透射电镜: 日立 600-4型; 光学显微镜: Olympus Ahbt-5B

1.3 模型制备

术前按常规 (有无对侧旋转行为) 进行行为学测试, 确认无异常旋转行为后, 用盐酸氯胺酮 (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, 苯扎溴铵 (商品名: 新洁尔灭) 常规消毒。 以前囟为准, 根据包新民等^[7]著《大鼠脑立体定位图谱》, 确定右侧黑质二坐标^[8]: 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 5μl 微量进样器将 6-OHDA (溶于含 0. 02% 维生素 C 的生理盐水中, 浓度为 2g /μl) 注入右侧黑质部 (以 1. 0mm /min 速度缓慢进针), 每孔 3μl, 注射速度为 1μl /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 7 天, 待动物清醒后放回饲养笼中饲养。

假手术组只注射含 0. 02% 维生素 C 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

造模手术 10天以后, 以腹腔注射 APO (0. 5mg / kg) 诱发大鼠向健侧旋转, 记录开始旋转至 30min 内的

旋转圈数, 以旋转圈数平均每分钟超过 7次者为合格的 PD模型^[9]。

1.4 分组与给药

将造模成功的 14只大鼠按旋转圈数随机数字法分为 2组: 模型组 天麻钩藤饮组, 每组 7只; 另纳入正常对照组、假手术组, 每组 7只 实验共计 4组 模型组、假手术组和正常对照组给予生理盐水灌胃 (2ml /只), 天麻钩藤饮组灌胃天麻钩藤饮 (5. 13g /ml, 2ml /只), 各组动物正常摄食、饮水, 共 14天

1.5 指标检测

实验结束后: ① 每组中取 4只大鼠断头处死, 取出中脑组织, 于 10% 甲醛液中固定 24h, 梯度脱水, 常规石蜡包埋, 冠状切片, 片厚为 5μm ② 每组中取 3只进行心脏灌注固定 先灌注生理盐水 (约 200ml) 至流出液体不见血色为止, 接着灌注 4% 多聚甲醛 PBS液 (约 200ml), 当动物出现四肢抽搐, 四肢变硬时, 表示灌注完成 分离中脑黑质, 用于电镜标本的制作。

TUNEL法观察细胞凋亡, 石蜡组织切片, 片厚为 5μm, 按试剂盒方法操作; 免疫组化染色检测 Bax、Bcl-2, 采用 ABC法^[10]。 在光镜高倍镜下随机取 2mm× 2mm 视野, 计算染色阳性细胞数 分析软件使用 IMS 彩色图像分析系统软件。 电镜观察: 在黑质部切取 1mm× 1mm× 1mm 组织块 3块, 立即用 20g /L 戊二醛和 10g /L 锇酸双重固定, 系列乙醇脱水, 环氧树脂 618包埋, 切片, 铅染, 透射电镜观察

1.6 统计学方法

所有资料均用均数± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13. 0 统计软件进行齐性检验并做方差分析。

2 结果

2.1 天麻钩藤饮对 PD大鼠黑质 TUNEL阳性细胞数、Bcl-2 Bax 蛋白表达的影响

表 1 各组大鼠黑质 TUNEL阳性细胞数、Bcl-2 Bax 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	视野数	凋亡细胞数	Bcl-2	Bax
正常对照组	16	1. 67± 1. 94	18. 06± 1. 42	10. 13± 0. 92
假手术组	16	1. 83± 1. 92	16. 05± 1. 16	11. 50± 1. 08
模型组	16	38. 11± 9. 76 [*] ▲	23. 38± 1. 3 [*] △	49. 50± 1. 47 [*] △
天麻钩藤饮组	16	26. 22± 8. 54 [*] ▲	38. 38± 2. 19 [*] ▲	34. 56± 1. 58 [*] ▲

注: 与正常对照组比较, * $P < 0. 01$; 与假手术组比较, △ $P < 0. 01$; 与模型组比较, ▲ $P < 0. 01$

模型组大鼠黑质中均能检测到 TUNEL阳性细胞核, 细胞核呈棕褐色, 主要集中在黑质区内, 细胞核体积缩小, 或明显皱缩, 形态呈圆形或不规整 表 1示, 经细胞凋亡计数, 发现模型组与其他各组结果比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0. 01$)。 天麻钩藤饮组也能检测

到凋亡细胞核,但与模型组比较,凋亡细胞数显著减少($P < 0.01$)。模型组与天麻钩藤饮组 Bcl-2 Bax 表达明显高于正常对照组及假手术组($P < 0.01$),模型组与天麻钩藤饮组组间差异亦有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 天麻钩藤饮对 PD 大鼠神经细胞电镜结果的影响

图 1-4 示,模型组细胞膜出现明显皱缩,细胞体积明显缩小,胞浆明显减少,线粒体嵴部分溶解,其他细胞器形态基本正常,染色质凝聚成块并有边聚倾向,核膜部分不完整。而天麻钩藤饮组则明显减轻,细胞膜稍有皱缩,细胞体积缩小,胞浆减少,线粒体等细胞器形态正常,细胞核亦呈皱缩状态,染色质凝聚成块并有边聚倾向,核膜基本完整。正常对照组、假手术组超微结构正常。

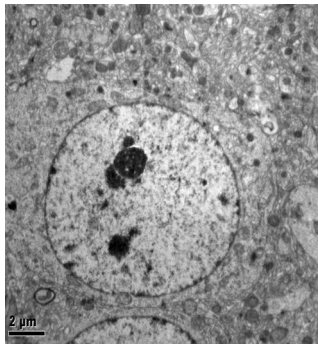


图 1 正常对照组 (× 6000)

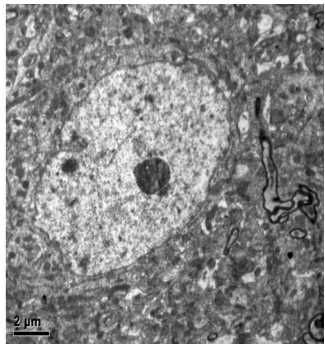


图 2 假手术组 (× 6000)

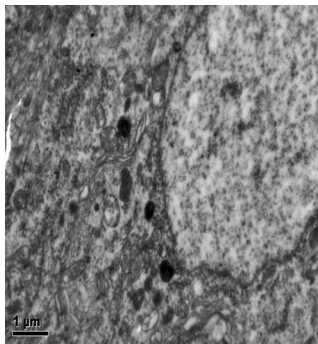


图 3 模型组 (× 8200)

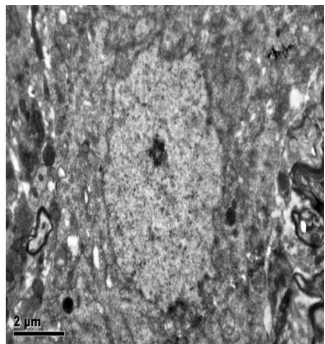


图 4 天麻钩藤饮组 (× 6000)

3 讨论

研究表明,6-O HDA 可致 DA 能神经元细胞凋亡^[11]。本实验检测到 6-O HDA 损伤后大鼠中脑黑质致密带神经细胞,发现损伤组大鼠右侧中脑黑质致密部(sNC)有大量染色阳性细胞,呈棕黄色,不规则形。电镜结果发现模型组细胞膜出现明显皱缩,细胞体积明显缩小,胞浆明显减少,线粒体嵴部分溶解,其他细胞器形态基本正常,染色质凝聚成块并有边聚倾向,核膜部分不完整。表明 6-O HDA 神经毒性损毁作用在导致多巴胺能神经元损伤中,细胞凋亡是重要的形式。天麻钩藤饮组的右侧黑质区染色阳性细胞数明显减少($P < 0.01$),电镜结果也显示比模型组明显减轻。说明

天麻钩藤饮可明显减轻 6-O HDA 造成的细胞凋亡,对神经细胞有保护作用。

哺乳动物的细胞凋亡是由 Bcl-2 家族蛋白、调节蛋白 Apaf-1(凋亡激酶激活因子 1)、caspase 家族调控的。Bcl-2 家族包括两类成员,一类如 Bcl-2 Bcl-x1 等抑制凋亡发生,另一类如 Bax Bak Bcl-xs Bad Bid Bik 等促进凋亡发生。Bcl-2 位于线粒体外膜,Bcl-2 的表达可显著地抑制过氧化物及自由基增加所诱导的细胞凋亡^[12]。Bax 可以形成线粒体通透性转移孔,而细胞色素 C 可从此孔中逃逸进入胞浆,其与 Apaf1 和 Pro-caspase9 等形成凋亡小体,然后激活 caspase3 形成凋亡基质。Bax 蛋白既能和 Bcl-2 形成异源二聚体使 Bcl-2 蛋白失活,对细胞凋亡有促进作用,又可以自身形成同源二聚体,直接促进凋亡。如果 Bax 等促进凋亡的分子占了上风,则细胞就会发生凋亡。反之,细胞受到保护^[13]。本实验中观察到在 6-O HDA 损伤后大鼠的脑黑质结构内,无论是 Bax 还是 Bcl-2,与正常组、假手术组比较,表达水平均显著升高,且以 Bax 蛋白升高为主,说明 6-O HDA 有导致凋亡的作用。而天麻钩藤饮组与模型组比较,Bcl-2 显著升高,Bax 显著降低,提示天麻钩藤饮对神经细胞的保护作用可能与对凋亡基因 Bcl-2 Bax 的调节作用有关。

在 PD 的发病过程中,氧化应激可促进神经元凋亡^[14]。我们以前的研究表明,天麻钩藤饮可以明显降低 PD 模型大鼠的活性氧、MDA 水平,明显提高谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)的含量,可以提高机体的抗氧化和清除自由基的能力^[6]。综合以上分析,可以认为天麻钩藤饮对 PD 细胞凋亡有明显抑制作用,其作用机制不仅与抗氧化应激作用有关,也可能是通过升高 Bcl-2,抑制 Bax 激活而达到抗神经细胞凋亡的目的。

参考文献

[1] Zhang ZX, Roman GC, Hong Z, et al. Parkinson's disease in China: prevalence in Beijing, Xian, and Shanghai [J]. Lancet, 2005, 365(9459): 595-597.
[2] Lev N, Melamed E, Offen D. Apoptosis and Parkinson's disease [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003, 27(2): 245-250.
[3] 贾玉勤,张伦忠,冯乐燕,等.帕金森病的中医药治疗概况 [J]. 中国中医药科技, 2010, 17(2): 184-185.
[4] 何建成.帕金森病中医药治疗的在思考——兼谈“滋肾平肝,化痰活血,解毒散结”是帕金森病的基本治疗法则 [J]. 中医药通报, 2005, 4(1): 12-14.
[5] 张永全,谭文澜,陆晖,等.天麻钩藤饮合美多巴治疗帕金森病 62 例 [J]. 陕西中医, 2008, 29(6): 666-667.
[6] 王文武,何建成,丁宏娟.天麻钩藤饮对帕金森病大鼠神经行为学及氧化应激反应的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2010,

30(12): 1657-1659.

[7]包新民,舒思云.大鼠脑立体定位图谱[M].北京:人民卫生出版社,1991: 53.

[8]冉秋,李亚明,何建成.不同中医治法对帕金森病大鼠氧化应激反应的影响[J].老年医学与保健,2009,15(2): 119-122.

[9]Carman LS, Gage FH, Shults CW. Partial lesion of the substantia nigra relation between extent of lesion and rotational behavior[J]. Brain Res, 1991,553(2): 275-283.

[10]汪冬梅,徐红,徐静,等.如何用免疫组化ABC法做好脑组织冰冻切片[J].卫生职业教育,2010,28(2): 118-119.

[11]Kobayashi H,Oikawa S,Umemura S,et al. Mechanism of metal-mediated DNA damage and apoptosis induced by 6-

hydroxydopamine in neuroblastoma SH-SY5Y cells[J]. Free Radic Res, 2008, 42(7): 651-660.

[12]Hussain SA,Ganesan R,Hiller L,et al. Proapoptotic genes BAX and CD40L are predictors of survival in transitional cell carcinoma of the bladder[J]. Br J Cancer, 2003, 88(4): 586-592

[13]Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407(6805): 770-776.

[14]卢芳,刘树民,杨婷婷.帕金森病的最新国内外研究进展[J].中国老年学杂志,2009,29(9): 1171-1174.

(收稿日期: 2009- 10- 16;修回日期: 2010- 07- 11)

[编辑: 行 之]

稳心颗粒与缬沙坦联用治疗老年阵发性心房颤动 50例

蔡 广 曾海城 庞亮亮 肖 旋 陈晓霞

(中国人民解放军第三〇三医院老年病二区,广西壮族自治区南宁市植物路 52 号,530021)

心房纤颤(简称房颤)是临床最常见心律失常之一,随着老龄人口的增加,房颤的发生率逐渐提高。目前,药物治疗仍是房颤的重要治疗手段。我们用稳心颗粒联用缬沙坦治疗 50 例老年阵发性房颤患者,与胺碘酮治疗的 46 例对比,探索稳心颗粒联用缬沙坦治疗阵发性房颤的疗效和安全性。

1 临床资料

96 例老年阵发性房颤患者随机分为稳心组(50 例)和对照组(46 例)。稳心组中男 32 例,女 18 例;年龄 66~ 78 岁,平均 71.3 岁。对照组中男 26 例,女 20 例;年龄 66~ 79 岁,平均 70.6 岁。两组患者一般资料差异无统计学意义($P> 0.05$)。所有患者均排除病态窦房结综合征、慢性阻塞性肺疾病、低血压、严重肝、肾损害病例。

2 治疗方法

在全部患者治疗原发病的基础上,稳心组给予稳心颗粒(由步长集团山东制药有限公司生产),每次 9g,每日 3 次,缬沙坦(北京天大药业生产)每次 80mg,每日 1 次;对照组给予胺碘酮每次 0.2g,每日 3 次,每 5~ 7 天逐渐减量至 0.1g,每日 1 次维持量。共观察 3 个月。

3 疗效观察

3.1 疗效评定标准

显效:在治疗期间,房颤消失转复为窦性心律,或者发作 < 1 次/周,维持用药仍保持疗效。有效:房颤未完全消失,发作 < 2 次/周,非睡眠时间心率 < 80 次/min,维持用药仍有发作,药物加量后能控制心率。无效:未达到以上标准。

3.2 两组患者临床疗效比较

稳心组 50 例,显效 24 例,有效 19 例,无效 7 例,总有效率 86%;对照组 46 例,显效 24 例,有效 16 例,无效 6 例,总有效率 87%。稳心组房颤发生次数由 (8.6 ± 1.4) 次/周降至 (1.3 ± 0.5) 次/周;对照组由 (8.3 ± 1.3) 次/周降至 (1.2 ± 0.7) 次/周。两组患者治疗后房颤的发生率与治疗前比较均明显下降,有统计学差异($P< 0.01$)。治疗后两组间房颤发生率无统计学差异($P> 0.05$)。

3.3 两组患者治疗后心功能及心脏结构改变比较

稳心组治疗后左室射血分数(EF)、心排血指数(CI)、每搏输出量(SV)明显较治疗前提高,左房比治疗前缩小,差异有统计学意义($P< 0.05$)。对照组治疗后 EF、CI、SV 也有明显提高($P< 0.05$),而左房大小无明显改变。治疗后稳心组左房大小与对照组比较差异有统计学意义($P< 0.05$)。

3.4 毒副作用

治疗期间,对照组有 2 例患者出现恶心、无呕吐,考虑为胺碘酮反应,未停药,对症处理以及胺碘酮减量后症状自行消失,1 例出现角膜色素沉着。稳心组所有患者未出现不适主诉。疗程结束后,两组患者的肝、肾功能、血脂、血糖均无明显变化。

4 讨论

房颤是老年心脏患者临床常见心律失常之一,主要机制是在冠心病、高血压、糖尿病基础上,出现心房肌的电重构,引起心房内电活动的不均一性,导致房颤的发生和维持^[1]。稳心颗粒的主要成分是党参、黄精、三七、甘松、琥珀等,研究表明,甘松的抗心律失常作用与其含有缬草酮有关,缬草酮具有膜稳定作用,缬草酮能够抑制膜电位和延长动作电位的时间,延长心房不应期,阻断折返激动^[2],党参、三七具有活血化瘀、抗血小板凝聚、改善冠脉供血、增加心排出量、降低心肌耗氧量的作用。缬沙坦是一种特异性的血管紧张素 II(AngII)1 型受体拮抗剂,其抗心肌重构作用与其 AngII 阻断效应有关。此外,缬沙坦还具有通过抑制多聚二磷酸腺苷核糖合成酶(PARP)的活性,减少细胞因子表达,延缓心室重构。

参考文献

[1]Nattel S. New ideal about atrial fibrillation 50 years on[J]. Nature, 2002, 415(6868): 219- 226.

[2]刘峰,兰燕平,周筠,等.稳心颗粒对家兔左心室内、外膜电生理特性的影响[J].心脏杂志,2006,18(6): 622- 625.

(收稿日期: 2010- 03- 29)

[编辑: 黄 健]

通讯作者:蔡广,13321717867

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net