

· 实验研究 ·

涤痰汤对帕金森病左旋多巴毒副反应
大鼠纹状体多巴胺转运蛋白的影响

罗瑞静 何建成*

(上海中医药大学基础医学院中医诊断教研室, 上海市蔡伦路1200号, 201203)

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);

上海市第三期重点学科项目资助(S30302)

通讯作者: 何建成, hejc8163@163.com, (021) 51322142

[摘要] **目的** 观察涤痰汤对帕金森病(PD)药物左旋多巴(LD)毒副反应大鼠纹状体多巴胺转运蛋白(DAT)的影响。**方法** 在PD模型大鼠的基础上腹腔注射左旋多巴/苄丝肼2周制备LD模型,将成功LD模型大鼠随机分为LD模型组、涤痰汤组各9只,另取正常对照组和PD模型对照组大鼠各9只。LD模型组、涤痰汤组分别给予生理盐水、涤痰汤灌胃;PD模型对照组、正常对照组给予生理盐水灌胃(分别为2、4、6周)。每组在2、4、6周各取3只大鼠,行脑纹状体内DAT¹²⁵I-βCIT放射自显影,同时用γ计数器测定DAT放射活性。**结果** LD模型组随时间延长DAT数量有减少趋势,且在4、6周时均较PD模型对照组为低;涤痰汤组随干预时间的延长,DAT数量有增加趋势,且在4、6周时均较LD模型组为高,但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。自显影结果与DAT变化基本一致。**结论** 涤痰汤可以缓解帕金森病左旋多巴治疗引起的DAT数量减少。

[关键词] 涤痰汤;帕金森病;左旋多巴;多巴胺转运体;放射活性

Effect of Ditan Decoction on Dopamine Transporter in Striatum of Parkinson's Disease Rats with Side-effects of Levodopa

LUO Ruijing, HE Jiancheng

(Preclinical Medicine Institute, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 201203)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Ditan Decoction (Phlegm-dissolving decoction) on dopamine transporter (DAT) in striatum of Parkinson's disease (PD) rats with side-effects by Levodopa (LD). **Methods** Based on the PD model rats LD models were made through intraperitoneal injection of LD for 2 weeks. The successfully made LD models were randomized into LD model group and Ditan Decoction group, 9 rats for each group. And the normal control group and PD model group were set up for comparison, 9 rats in each group. The LD model group and Ditan Decoction group were given normal saline and Ditan Decoction respectively by intragastric feeding. PD model group and normal control group were given normal saline by intragastric feeding. In the 2nd, 4th, and 6th week, 3 rats were taken from each group for the examination of DAT autoradiography in striatum with ¹²⁵I-βCIT and the determination of DAT radioactivity with γcounter. **Results** With the time going on, the number of DAT of the LD model group had the tendency of decrease, and in the 4th and 6th week, it was lower than in the PD model group. While the number of DAT of the Ditan Decoction group had the tendency of increase, and in the 4th and 6th week, it was higher than in the LD model group. But the difference was not significant ($P > 0.05$). The result of autoradiography was basically consistent with it. **Conclusion** Ditan Decoction might be effective against the decrease of DAT caused by LD treatment of PD.

Key Words Ditan Decoction (phlegm-dissolving decoction); Parkinson's disease; levodopa; dopamine transporter; radioactivity

左旋多巴(L-dopa, LD)迄今仍是帕金森病(Parkinson's disease, PD)的主要治疗药物,然而长期治疗所表现出来的运动障碍等毒副反应比疾病本身更加严重^[1]。脑内多巴胺转运蛋白(dopamine-transporter, DAT)含量的变化与PD的发生发展以及LD治疗过程中的毒副反应有着密切的联系。前

期研究表明,涤痰汤能改善PD大鼠旋转行为,通过多条途径减轻其黑质纹状体氧化应激损伤,保护神经元^[2]。本实验在前期研究的基础上,通过对帕金森病左旋多巴毒副反应大鼠(LD大鼠)脑纹状体内DAT含量变化的观察来探讨涤痰汤对LD毒副反应的干预效果。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠70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。动物许可证号:SYXK(沪)2004-2005。

1.2 药品

戊巴比妥钠:上海中西药业股份有限公司产品(批号:WS20090920);LD 干粉:美国 Sigma 公司产品(批号:192K1885);苄丝肼:美国 Sigma 公司产品(批号:BCBB8323);庆大霉素:上海第一制药厂产品(批号:H31021994),0.3g/支;涤痰汤(姜半夏8g,胆南星8g,橘红6g,枳实6g,茯苓6g,人参3g,石菖蒲3g,竹茹2g,甘草2g,浓度为1.98g/ml),由上海雷允上药业有限公司提供。

1.3 试剂

6-羟基多巴胺(6-OHDA):美国 Sigma 公司产品(批号:048K3728);阿扑吗啡(APO):美国 Sigma 公司产品(批号:057K1462);抗坏血酸:美国 Sigma 公司产品(批号:063K1082);Na¹²⁵I:由成都中核高通同位素公司提供;TMS-CT:德国 ABX 公司(批号:250501)。

1.4 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;微量进样器(5μl):上海第三分析仪器厂生产;SN-682型γ计数器,上海应用物理研究所日环仪器厂生产;放射性活度计,上海电子仪器厂生产。

2 方法

2.1 模型制备

参照文献[3-4],在经典 PD 模型基础上,进一步腹腔注射 LD。术前确认无异常旋转行为后,用3%戊巴比妥钠50mg/kg 腹腔注射麻醉。常规消毒后,暴露前囟,以前囟为准,确定左侧黑质二坐标:①前囟后5.2mm,正中左侧1.0mm,硬膜下9.0mm。②前囟后5.2mm,正中左侧2.5mm,硬膜下8.5mm。用颅骨钻颅骨,用5μl 微量进样器将6-OHDA(2μg/μl)注入左侧黑质部,以1.0mm/min 速度进针,每孔3μl,注射速度为1μl/min,注射完毕后留针5min。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,以旋转圈数平均>7次/min 者为合格的 PD 模型。

将成功的 PD 模型大鼠给予腹腔注射 LD 和苄丝肼(50mg/kg LD 和12.5mg/kg 苄丝肼溶于含

0.05%的乙醇和0.1%的抗坏血酸的注射用水中,配成10mg/ml),每日2次,连续2周。再次以腹腔注射 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,旋转圈数较2周前增加的为合格的 LD 模型大鼠。

正常对照组大鼠不进行手术处理。正常对照组、PD 模型对照组10天后给予腹腔注射等量含0.05%的乙醇和0.1%的抗坏血酸的注射用水,每日2次,连续2周。

2.2 分组及给药

采用区组随机法,将成功 LD 模型大鼠随机分为 LD 模型组、涤痰汤组,每组9只。另取正常对照组和 PD 模型对照组,每组9只。其中 LD 模型组大鼠给予生理盐水灌胃;涤痰汤组大鼠给予涤痰汤(浓度为1.98g/ml)灌胃;PD 模型对照组、正常对照组给予生理盐水灌胃。各组大鼠每次灌胃量为2ml,每日1次,分别为2、4、6周。

2.3 ¹²⁵I-βCIT 的标记

将5μg 的 βCT 溶于10μl 乙醇中,60μl pH 为7.4,浓度为0.2M 的 PB,加入约111MBq(3mCi)的¹²⁵I,反应10min。然后将标记液转移至1.5ml 离心管中,并用200μl ×5 乙醚萃取,乙醚相合于一处时,将乙醚相用氮气小心吹干,再用约150μl 乙醇溶解,并加入生理盐水稀释,配制成1.48MBq(40μCi)/300μl 的¹²⁵I-βCIT 溶液。标记率约为95%,放射化学纯度大于99%。

2.4 放射自显影

每组在灌胃后2、4、6周各取大鼠3只,经尾静脉注射¹²⁵I-βCIT 0.5ml(2.22MBq),于注射后4h 断颈快速取出全脑,迅速剥离双侧纹状体,称重后曝光30min,曝光结束后进行显影。

2.5 纹状体放射活性测定

显影结束后,用γ计数器测定放射活性,计算每克纹状体含放射性剂量占注射剂量的百分比(ID/g)。

2.6 统计学方法

计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 16.0 软件进行齐性检验并做方差分析。

3 结果

3.1 各组大鼠纹状体 DAT 特异性放射性摄取值比较

表1示,与正常对照组比较,其他各组在不同时间点的 DAT 特异性放射性摄取值的数量都明显降低($P<0.01$)。LD 模型组随时间延长 DAT 数量有

减少趋势,且在4、6周时均较PD模型对照组为低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。涤痰汤组随干预时间的延长,DAT数量有增加趋势,且在4、6周时均较LD模型组为高,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 各组大鼠纹状体 DAT 特异性放射性
摄取值比较(%ID/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	2周	4周	6周
正常对照组	9	0.0107±0.00063	0.0117±0.00260	0.0095±0.00035
PD模型对照组	9	0.0024±0.00057△	0.0028±0.00030△	0.0028±0.00046△
LD模型组	9	0.0029±0.00186△	0.0022±0.00017△	0.0020±0.00090△
涤痰汤组	9	0.0025±0.00270△	0.0037±0.00097△	0.0027±0.00250△

注:与正常对照组比较,△ $P<0.01$

3.2 各组大鼠纹状体 DAT¹²⁵I-βCIT 放射自显影的比较

图1示,正常对照组左、右两侧信号比较基本无差异,其他各组左侧(损毁侧)信号明显低于右侧(健侧),差异明显。损毁侧比较显示:LD模型组随时间延长,信号减弱;LD模型组与PD模型对照组相比,在4、6周时信号减弱;涤痰汤组与LD模型组比较,在4、6周时信号增强。

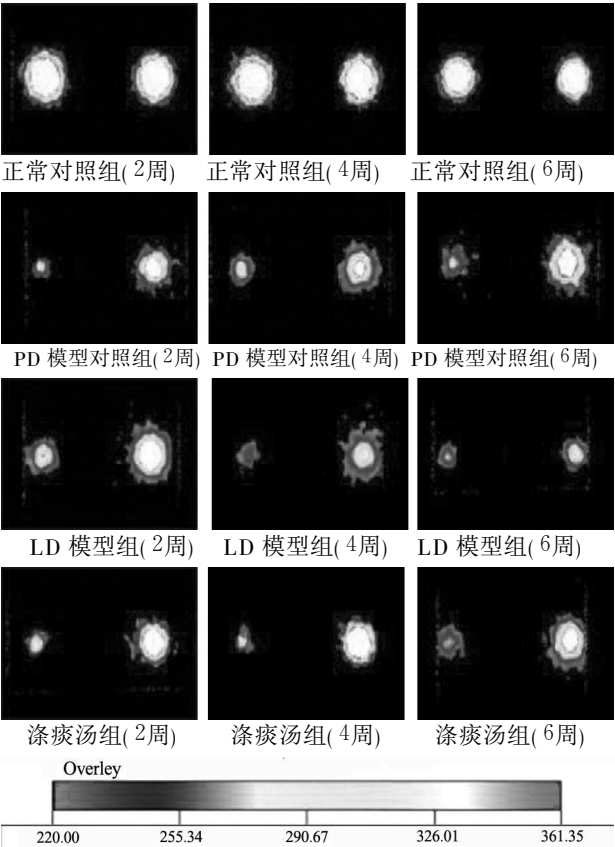


图1 各组大鼠纹状体 DAT¹²⁵I-βCIT 放射自显影

4 讨论

DAT 是一种膜蛋白,主要由黑质、纹状体 DA 能神经元胞体、树突、轴突合成和表达,分布在树突和轴突的浆膜上.DAT 能够通过再摄取突触间隙内的 DA 来调控突触间隙中多巴胺的有效浓度,使 DA 对突触前和突触后受体进行时间依赖性的激动.LD 类制剂对 DAT 有影响,且受用药时间和剂量等因素影响.陈玲等^[5]认为长期美多巴、吡贝地尔(泰舒达)治疗可能会使 PD 模型大鼠脑多巴胺转运体的数量减少.钱进军等^[6]研究结果显示,单用 LD 可显著改善早期 PD 患者运动功能,但纹状体的 DAT 活性却明显下降.本实验结果表明,PD 大鼠纹状体内 DAT 数量较正常大鼠有减少趋势,而一定剂量的 LD 长期应用能够使 PD 大鼠纹状体内 DAT 数量降低,且伴随用药时间延长呈现递减趋势.纹状体自显影结果与标记物放射活度测定结果基本一致.提示 LD 的长期应用可使大鼠脑 DAT 的数量减少.而涤痰汤则能减缓 LD 治疗 PD 过程中出现的 DAT 数量减少.涤痰汤有升高 DAT 的趋势,其作用是否与抗氧化应激、细胞凋亡作用有关,尚有待进一步研究。

参考文献

[1] Vermeulen RJ, Wolters EC, Tissingh G, et al. Evaluation of [¹²³I]-beta-CIT binding with SPECT in controls, early and late Parkinson's disease[J]. Nucl Med Biol, 1995, 22 (8): 985-991.

[2] 丁宏娟,何建成,王文武. 涤痰汤对帕金森病大鼠行为学和氧化应激反应的影响[J]. 上海中医药杂志, 2009, 43 (3): 63-65.

[3] Dresel SH J, Kung MP, Plossl K, et al. Pharmacological effects of dopaminergic drugs on in vivo binding of [^{99m}Tc] TRODAT-1 to the central dopamine transporters in rats [J]. Eur J Nucl Med, 1998, 25(1): 31-39.

[4] Nurmi E, Bergman J, Eskola O, et al. Reproducibility and effect of levodopa on dopamine transporter function measurements: a [¹⁸F] CFT PET study [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(11): 1604-1609.

[5] 陈玲,黎锦如. 美多巴对帕金森病大鼠模型脑多巴胺转运体影响的自显影[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2003, 24(6): 564-567.

[6] 钱进军,程言博. 吡贝地尔和左旋多巴对早期帕金森病患者多巴胺转运体及运动功能的影响[J]. 江苏医药, 2007, 33(5): 447-449.