

• 实验研究 •

补肾养肝熄风汤对帕金森病小鼠纹状体神经递质和多巴胺受体的影响

陆征宇 赵虹* 汪涛 陈洁 张琦君 金环 李文婷

上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院神经内科, 上海市虹口区甘河路 110 号, 200437

基金项目: 上海市卫生局青年科研项目(2009Y084); 上海中医药大学科学技术发展基金项目(2009031)

* 通讯作者: drzhaohong@126.com, (021)62536300

[摘要] 目的 探讨补肾养肝熄风汤对帕金森病(PD)小鼠纹状体神经递质和多巴胺(DA)受体的调节机制。方法 将 C₅₇/BL 雄性小鼠 56 只随机分为正常组、模型组、中药组和西药组, 每组 14 只。采用 MPTP 腹腔注射复制 PD 小鼠模型, 正常组、模型组生理盐水灌胃(0.1ml/10g), 中药组以补肾养肝熄风汤灌胃(0.1ml/10g), 西药组多巴丝肼灌胃(0.1ml/10g), 每日 1 次, 治疗 14d。治疗结束后分离取出小鼠纹状体组织, 测定纹状体 DA、去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT)、亮氨酸脑啡肽(LEK)含量以及 DA D₁、D₂ 受体的含量。结果 模型组、中药组和西药组小鼠纹状体 DA、NE、5-HT、LEK 含量显著低于正常组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 中药组和西药组 DA、NE、5-HT 含量显著高于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 模型组、中药组和西药组纹状体 DA D₁ 受体免疫组化指数(IHC)显著低于正常组($P < 0.01$), 西药组 DA D₁ 受体 IHC 高于模型组和中药组($P < 0.05$); 中药组、西药组 DA D₂ 受体 IHC 显著高于模型组($P < 0.01$)。结论 补肾养肝熄风汤可提高纹状体下降的 DA、NE、5-HT 水平, 可提高纹状体 DA D₂ 受体的含量。

[关键词] 帕金森病; 神经递质; 多巴胺受体; 补肾养肝熄风汤

Effect of Bushen Yanggan Xifeng Decoction on Neurotransmitters and Dopamine Receptors in the Striatum of Parkinson's Disease Model Mice

LU Zhengyu, ZHAO Hong, WANG Tao, CHEN Jie, ZHANG Qijun, JIN Huan, LI Wenting

(Yueyang Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200437)

ABSTRACT **Objective** To observe the adjustment mechanism of Bushen Yanggan Xifeng Decoction (Decoction for reinforcing the kidney, nourishing the liver, and stopping wind) on neurotransmitters and dopamine receptor in the striatum of mice with parkinson's disease (PD). **Methods** Fifty-six adult male C₅₇/BL mice were randomized into normal group, PD model group, TCM group, and western medicine group, 14 in each. The PD models were established by intraperitoneal injection of MPTP. The normal group and model group were given intragastric feeding with normal saline (0.1ml/10g), the TCM group with Bushen Yanggan Xifeng Decoction (0.1ml/10g), and the western medicine group with Levodopa and Benserazide Tablet (0.1ml/10g), once every day, for 14 days. The level of striatal DA, NE, 5-HT, level of striatal LEK and content of dopamine receptors, D1R and D2R in each group were assayed. **Results** The levels of striatal DA, NE, 5-HT, and LEK in the model group, TCM group, and western medicine group were lower significantly than those in the normal group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the levels of DA, NE, and 5-HT in the TCM group and western medicine group were higher significantly than those in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Immunohistochemistry (IHC) index of striatal D1R in the model group, TCM group, and western medicine group was lower significantly than that in the normal group ($P < 0.01$), and the IHC index of striatal D1R in the western medicine group was higher significantly than that in the model group and TCM group ($P < 0.05$). IHC index of striatal D2R in the TCM group and western medicine group was higher significantly than that in the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Bushen Yanggan Xifeng Decoction can increase the lowered striatal DA, NE, and 5-HT of mice models and increase the content of striatal D2R as well.

Key Words Parkinson's disease; neurotransmitter; dopamine receptor; Bushen Yanggan Xifeng Decoction (Decoction for reinforcing the kidney, nourishing the liver, and stopping wind)

帕金森病(PD)是一种中老年常见的神经变性疾病,以黑质多巴胺能神经元变性缺失和路易小体形成成为病理特征。前期临床研究显示,补肾养肝熄风汤对各期 PD 均有一定疗效,可以减慢肝肾阴虚型 PD 患者帕金森氏病综合评分量表(UPDRS)评分的上升速度,改善肝肾阴虚症状,减少每日左旋多巴用量,可能具有延缓病程进展的作用^[1]。本研究以 C₅₇/BL 雄性小鼠为实验动物,探讨补肾养肝熄风汤对 PD 小鼠纹状体多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT)、亮氨酸脑啡肽(LEK)等神经递质以及 DA 受体 D₁、D₂ 的影响,从而为临床研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

雄性 8 周龄 C₅₇/BL 小鼠 56 只,清洁级,体重 20~25g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证号:SCXK(沪)2007-0005,清洁级动物饲养室喂养,自由饮水取食。采用数字表法将 56 只小鼠随机分为正常组、模型组、中药组、西药组,每组 14 只。

1.2 药物制备

补肾养肝熄风汤由药物组成,熟地黄 15g、生地黄 15g、钩藤 15g、白芍 15g、(制)何首乌 9g 等补肾养肝熄风方药根据文献^[2]方法制成 2.0g/ml 水煎液(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药剂科制备);多巴丝肼片(上海罗氏制药有限公司产品,批号 052000,250mg/片)配制成 2.5mg/ml 溶液。

1.3 试剂和仪器

1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)、DA 盐酸盐、NE 盐酸盐、5-HT 盐为 Sigma 公司产品;LEK 放射免疫试剂盒由上海第二军医大学神经生物学教研室提供;抗小鼠 D₁、D₂ 受体免疫组化试剂盒为上海麦莎生物科技有限公司产品。

LC210A 型高效液相色谱仪(SHIMADZU)、Waters460 电化学检测器(Waters)、Hypersil ODS23 柱(GL)、保护柱(DIKMA)、Micro Max RF 高速离心机(Thermo IEC)、LXJ2 II B 低速离心机(上海安亭科学仪器厂)、MIQAS 医学图像定量分析系统、医学图像定量分析软件、TK-C1481BEC 彩色摄像机(JVC)、BH2 生物显微镜(Olympus)、4500 数码相机(Nikon)、HISTOSTAT-820 切片机(RMC)等。

1.4 模型制备及给药

模型组、中药组、西药组按 30mg/kg 腹腔注射

MPTP^[3],每日 1 次,连续注射 7d,制备 PD 模型;正常组腹腔注射等量生理盐水,每日 1 次,连续注射 7d。

造模成功后,各组分别给予相应治疗,正常组、模型组生理盐水灌胃(0.1ml/10g);中药组补肾养肝熄风汤灌胃(0.1ml/10g);西药组多巴丝肼灌胃(0.1ml/10g)。每日 1 次,连续治疗 14d。小鼠在最后一次相应处理后次日断头处死,分离取出纹状体组织,-70℃保存。因小鼠纹状体组织很小,检测指标较多,故每组随机抽取 7 只检测神经递质、7 只检测 DA 受体。

1.5 指标检测

1.5.1 NE、DA、5-HT 含量的测定 采用高效液相色谱-电化学检测法。取纹状体组织匀浆,加正丁醇 210ml,混匀,于 4℃ 下离心(10000r/min) 15min;取上清液,加 0.11mol/L HClO₄ 0.150ml、正庚烷 210ml,旋涡振荡 3min 后低速离心(3000r/min) 3min;除去有机相,在下层的水相中加 CHCl₃ 210ml,经旋涡振荡 3min、低速离心 3min 后,取上层水样直接进样,进样量 20.0μl。流动相为缓冲液(0.102mol/L 柠檬酸三钠和 0.105mol/L 磷酸氢二钠):甲醇=90:10 的溶液,经 0.145μm 滤膜过滤并超声脱气后使用,流速为 110ml/min;工作电极为玻璃碳电极,参比电极 Ag/AgCl,电化学监测器设定电压为 +650mV。共测定 3 种单胺类神经递质,其洗脱顺序依次为 NE、DA、5-HT。

1.5.2 LEK 含量测定 采用放射免疫检测法测定 LEK。

1.5.3 DA D₁、D₂ 受体测定 ①组织包埋及切片:将新鲜纹状体浸入 2.5%戊二醛固定液中,固定 1h;组织脱水,机器平板包埋;1~2h 后用石蜡切片机切取 3~4μm 厚冠状平面的脑片。②指标检测:二甲苯 60℃脱蜡 3 次,每次 10min;经乙醇水合;流水冲洗,双氧水冲洗 10min,再经流水冲洗,蒸馏水冲洗,切片于脱蜡修复液中 100℃水浴 10min,保温 10min,自然冷却,PBS 漂洗;将切片置于湿盒中,加入第一抗体,室温过夜;次日用 PBS 冲洗 3 次,每次 10min;加入通用型第二抗体,室温 30min,PBS 冲洗 3 次,每次 10min;加入 DAB 显色 10min;显色后流水冲洗苏木精复染 45s,1%盐酸乙醇分化,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。用 MIQAS 医学图像定量分析系统对脑片进行分析,测出阳性面积及光密度值(Optical Density)。通过 OLYMPUS

表 1 各组小鼠纹状体 DA、NE、5-HT、LEK 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	DA(ng/g)	NE(ng/g)	5-HT(ng/g)	LEK(pg/mg)
正常组	7	22.57±2.36	314.38±10.54	262.63±10.25	35.00±9.96
模型组	7	15.03±1.33**	270.74±4.24**	236.22±12.09**	21.91±4.75*
中药组	7	18.96±2.04**△△	289.79±7.97**△△	249.37±9.72*△	23.40±8.99*
西药组	7	19.10±2.19**△△	285.10±5.12**△△	251.96±8.68*△	22.27±9.51*

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

BH₂ 生物显微镜 25 倍物镜下(10 倍目镜),全视场(351000 像素点)测量,并对每张脑片摄片,每张选取 3 个视野,取平均值。最后计算出免疫组化指数(IHC)(IHC=阳性面积×光密度)。

1.6 统计学方法

采用 SigmaStat3.1 统计分析软件进行统计分析。计量数据以($\bar{x}\pm s$)表示,统计检验均采用双侧检验,采用单因素方差分析并以 q 检验作组间比较。

2 结果

2.1 各组小鼠纹状体 DA、NE、5-HT、LEK 含量比较

表 1 示,模型组、中药组、西药组 DA、NE、5-HT 及 LEK 含量均低于正常组($P<0.01$);中药组、西药组 DA、NE 及 5-HT 含量高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);中药组与西药组各指标含量差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组小鼠纹状体 DA D₁、D₂ 受体 IHC 比较

表 2 示,模型组、中药组、西药组 DA D₁ 受体 IHC 均低于正常组($P<0.01$);西药组 DA D₁ 受体 IHC 高于模型组和中药组($P<0.05$);中药组与模型组 DA D₁ 受体 IHC 差异无统计学意义($P>0.05$);模型组 DA D₂ 受体 IHC 低于正常组($P<0.01$),正常组、中药组、西药组 DA D₂ 受体 IHC 指数差异无统计学意义($P>0.05$);中药组、西药组 DA D₂ 受体 IHC 高于模型组($P<0.01$)。

表 2 各组小鼠纹状体 DA D₁、D₂ 受体 IHC 比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	D ₁ 受体	D ₂ 受体
正常组	7	40069.65±5025.47	30059.73±3347.57
模型组	7	21276.20±4888.56*	12845.53±2611.40*
中药组	7	21119.23±3869.35*	24362.42±5581.13△△
西药组	7	27830.59±3371.14*△▲	27318.85±4601.01△△

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与中药组比较,▲ $P<0.05$

3 讨论

PD 临床表现为静止性震颤、肌强直、动作迟缓

递质的异常在 PD 的发病中起着一定的作用。PD 最显著的生物化学特征是脑内 DA 含量减少。DA 的前体是酪氨酸,在酪氨酸羟化酶(TH)的催化下生成左旋多巴,在 PD 病理条件下,TH 活性可发生异常改变,表现为酶总活性的下降。有研究显示,补肾养肝中药能升高脑内 TH mRNA 表达,提高 TH 活性^[4]。本研究发现,经过治疗,中药组和西药组小鼠纹状体 DA 含量显著高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与西药组直接提供左旋多巴的机理不同,中药组改善 DA 含量的机理可能是由于补肾养肝熄风方药激活了 TH,从而使 DA 合成增加。NE 在纹状体中的含量相当高,在 PD 时,纹状体区的 NE 含量降低。本研究发现,经过治疗,中药组和西药组小鼠纹状体 NE 含量较模型组增高($P<0.05$)。脑中 5-HT 能神经分布比较广泛,纹状体中的 5-HT 含量丰富,主要来自中缝核的 5-HT 能神经。普遍认为,PD 患者脑内除了 DA 与乙酰胆碱的代谢失衡外,尚存在 5-HT 的减少和组织胺相对增多。本研究发现,经过治疗,中药组和西药组小鼠纹状体 5-HT 含量较模型组增高($P<0.05$)。

神经肽在基底节中的含量分布很高,但与 PD 的关系尚不明确。有研究显示在 PD 动物模型中,DA 明显耗竭并出现运动障碍症状之前,基底节神经环路的运动区域前脑啡肽表达上调,脑啡肽 mRNA 上调出现在 PD 运动障碍之前^[5];类似的研究显示纹状体脑啡肽神经元蛋白表达增多出现在 DA 不断耗损及神经递质平衡失调之前^[6]。在黑质纹状体 DA 系统损伤的动物模型中也发现纹状体脑啡肽免疫染色和前脑啡肽 mRNA 表达明显上调^[7]。本研究发现,PD 小鼠模型纹状体内 LEK 含量显著降低,经过西药和中药治疗后 LEK 含量无明显变化。

经典的 DA 受体分类根据其药理、生化、生理特性分为 D₁ 和 D₂ 两个亚型,D₁ 受体激活腺苷酸环化酶,而 D₂ 受体激活磷酸肌醇水解酶。根据 PD 临床及病理表现分析认为,患者运动协调障碍与其 D₁ 受体缺失可能存在关系^[8]。有研究表明 D₂ 受体可

能与 PD 的发病有关^[9],缺少 D₂ 受体基因的动物则表现为运动不佳、动作迟缓、自发性运动减少等类似 PD 的症状,该基因是 PD 的易感基因。本研究发现,MPTP 造模后小鼠纹状体 D₁、D₂ 受体均不同程度受损,经补肾养肝熄风汤治疗后 D₁ 受体含量无明显变化,D₂ 受体含量明显增高。本实验只提示了 D₁、D₂ 受体数量的变化,而对 D₁、D₂ 受体功能的影响需要进一步研究。

PD 属于中医学“颤证”的范畴,病位在肝肾,基本病机是肝肾不足,常伴发肝风内动,治疗原则为补肾养肝熄风。本实验所用方药系在长期临床中反复调整筛选,该方熟地黄、生地黄补益肝肾为君药,白芍、钩藤柔肝熄风为臣药,何首乌补益肝肾为佐药,全方共奏补肾养肝熄风之效。综上所述,补肾养肝熄风方药能提高纹状体 DA、NE、5-HT 含量,调节 D₂ 受体的含量,从而具有治疗 PD 的功效,但其详细的机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 赵虹,李文伟,高俊鹏,等. 补肾养肝方药治疗肝肾阴虚型帕金森病临床研究[J]. 中国中西医结合杂志,2007,27(9):780-784.
 - [2] 李仪奎. 中药药理试验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991:38.
 - [3] 陈生弟. 帕金森病[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:116-127.
 - [4] 蔡定芳,陈锡群,高颖,等. 补肾养肝方药对长期服用左旋多巴帕金森病大鼠黑质纹状体功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2002,22(1):43-46.
 - [5] Bezard E, Ravenscroft P, Gross CE, et al. Upregulation of striatal preproenkephalin gene expression occurs before the appearance of parkinsonian signs in 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys[J]. Neurobiol Dis, 2001, 8(2): 343-350.
 - [6] Ariano MA, Grissell AE, Littlejohn FC, et al. Partial dopamine loss enhances activated caspase-3 activity: Differential outcomes in striatal projection systems[J]. J Neurosci Res, 2005, 83(3): 387-396.
 - [7] 徐琲琲,刘纯青,马涛,等. 人参皂苷 Re 对 MPTP 致帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元的保护作用[J]. 沈阳药科大学学报,2005,22(1):36-44.
 - [8] Olanow CW, Obeso JA, Stocchi F. Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson's disease: Scientific rationale and clinical implications[J]. Lancet Neurol, 2006, 5(8): 677-687.
 - [9] 刘军,陈生弟,刘振国,等. 大鼠纹状体区多巴胺受体的变化对动物行为的影响[J]. 上海第二医科大学学报,2004,24(7):531-533,537.
- (收稿日期:2010-11-26;修回日期:2011-04-20)
[编辑:侯建春]

第二届名老中医临床经验学术研讨会征文通知

中医人才面临着诸多方面的挑战,也是目前中医学发展的瓶颈之一,如何培养适合现代中医药需求的人才,全面提高中医人才的质量;如何挖掘、整理名老中医的学术思想和临床实践经验,进一步做好中医药继承工作成为促进中医药发展的关键。根据国家中医药管理局师承有关规定,我们将通过师授、带帮等形式,力求培养更多的基层中医药人才和技术骨干,培养更多的中医药优秀人才,故特举办此次研讨会。本届师承研讨会将以沈绍功教授学术思想、临床经验为主题。沈绍功教授是全国名老中医药专家学术经验继承指导老师,承担和参与国家中医心脑血管病等多项攻关课题;享受国务院特殊津贴;上海沈氏妇科第十九代传人;悬壶济世 50 余年,德高医精,治学严谨,在医疗、科研、教学等方面具有深厚造诣。本次研讨会将请沈绍功教授现场传承沈氏家族 600 余年的医家真传与诊疗经验。

一、会议内容:继承和研究名老中医药专家学术思想和临床诊疗经验论谈。国家中医药管理局科研成果、中医百项临床实用技术的推广利用。中医药验方、技术、发明、专利的推广与转让。推选一批德医双馨优秀工作者,颁发“白求恩奖章”、“优秀基层医生”等荣誉证书、奖牌。二、征文内容:1、名老中医诊疗经验在临床中的应用体会。2、国家医疗百项实用技术临床推广经验。3、慢性、疑难杂病防治经验谈及名方名药或单味中草药的临床应用体会。4、中医药养生保健食疗、偏方、秘方等民间疗法的探索与应用。三、征文要求:论文论点明确,论据充分,结构严密,层次分明,文字精炼。具有科学性、创新性、实用性、突出中医药简便验廉的特点。稿件无论发表与否均可投稿交流。征文截止日期 2011 年 9 月 16 日,征文字数限 2000 字以内,请自留底稿。文题下署作者姓名、单位名称、地址、邮编请写在文稿末尾。请使用电子邮件投稿,手写文稿不予受理。电子邮箱:dudy001@sina.com,中文域名:中国基层医疗,网址:www.Chinaimt.com。四、参会办法:为确保会议代表的住宿,请参会代表每人务必提前预交报名费和住宿预订费共计 100 元,我们将按照所收预订费的排序安排参会事宜。报到时预交报名费可抵冲会务费 200 元。会务费 2800 元(含三星级宾馆住宿及餐费,将安排考察活动)。五、会议时间:2011 年 10 月 23 日至 25 日(23 日报到)。咨询电话:(010)84035349、84044191。六、相关待遇:1、凡正式会议代表均有机会免费获得(4 选 2)A:《沈绍功中医方略论》、B:《基层医生实用全书》、C:《名老中医临床经验汇编》(共 5 册)、D:《临床经验论文汇编》。七、相关荣誉及奖项:1、部分优秀文章将推荐相关医学杂志发表并安排大会演讲交流。2、会议将设优秀论文奖、民族医药贡献奖、白求恩纪念奖、优秀基层医生奖。八、联系地址:北京市东直门内海运仓 1 号国家中医药管理局中医药发展综合改革示范基地海运仓国际大厦 6 层 606 室,邮编:100007,联系人:冯金凤。

您有第二职业吗?招聘兼职医生

实用针灸刮痧拔罐培训班,咨询电话:010—84035349/84044191/84032002 传真:010—84032002 转 22。