

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.13.017

舒肌汤对帕金森病肌僵直模型大鼠纹状体多巴胺及其代谢物含量的影响

刘军, 鲍晓东*

(浙江中医药大学基础医学院, 浙江省杭州市滨文路 548 号, 310053)

摘要 目的 探讨舒肌汤治疗帕金森病肌僵直的可能作用机理。方法 采用颅内注射乳胞素诱导帕金森病肌僵直大鼠模型共 24 只, 随机分为模型组和中药高、中、低剂量组, 每组 6 只, 另设假手术组 6 只 (颅内注射生理盐水)。假手术组和模型组均灌胃生理盐水 20 g/(kg·d), 舒肌汤浓缩至 2.0 g/ml, 中药高、中、低剂量组分别灌服舒肌汤 40、20、10 g/(kg·d), 每日 1 次, 持续灌胃 30 天。检测大鼠纹状体多巴胺 (DA)、高香草酸 (HVA) 和二羟苯乙酸 (DOPAC) 的含量, 电镜观察膈肌神经肌肉接头超微结构改变。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠纹状体 DA、HVA、DOPAC 含量明显减少, DA/DOPAC 和 DA/HVA 值下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 中药中、低剂量组大鼠纹状体 DA、HVA、DOPAC 含量及 DA/DOPAC 和 DA/HVA 值均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与中药中剂量组比较, 中药高剂量组 DOPAC 含量和 DA/DOPAC、DA/HVA 值下降, 中药低剂量组 DOPAC 含量亦降低 ($P < 0.05$)。电镜下, 模型组存在神经肌肉接头处肌纤维密集, 排列紊乱, 突触前膜囊泡和线粒体增多, 突触后膜皱褶明显, 乙酰胆碱受体增多等超微结构改变, 中药各剂量组均能不同程度改善上述改变。结论 舒肌汤可能通过促进 DA 分泌, 同时减少神经肌肉接头处乙酰胆碱的释放, 调节中枢和外周神经兴奋, 从而缓解帕金森病肌僵直。

关键词 帕金森病; 肌僵直; 舒肌汤; 多巴胺; 乙酰胆碱; 神经肌肉接头

帕金森病是一种常见于老年人的中枢神经系统退行性疾病, 主要的病理特征是黑质多巴胺能神经元大量变性丢失, 黑质纹状体通路破坏, 进而导致锥体外系功能异常, 其临床主要表现为静止性震颤、肌僵直、运动迟缓、姿势反射障碍等^[1]。肌僵直的治疗是帕金森病的治疗核心, 目前临床中对肌僵直并没有针对性的防治策略, 主要伴随帕金森病的治疗进行, 多采用以外源性补充多巴胺 (DA) 为主的药物治疗, 但这种治疗方案长期症状难以控制, 毒副作用明显^[2]。临床观察显示, 中药舒肌汤可以明显缓解帕金森病肌僵直症状, 帮助患者不同程度地减撤复方左旋多巴制剂, 长期症状控制良好^[3]。前期研究显示, 舒肌汤能有效保护和修复帕金森病模型大鼠多巴胺能神经元并且缓解肌僵直^[4]。本研究通过高效液相色谱法 (HPLC) 和电镜技术, 观察舒肌汤对帕金森病肌僵直模型大

鼠纹状体 DA 及其代谢物含量的影响, 以探讨其治疗帕金森病肌僵直的可能作用机理。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 雄性大鼠 36 只, 清洁级, 7~9 周龄, 体重 (250 ± 20) g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 实验动物合格证号: 2013001815341。

1.2 药物和试剂

舒肌汤由毛叶轮环藤、青风藤、防己、厚朴和山梗菜组成, 每味中药 500 g, 采用大煎药桶先加水浸泡 30 min, 然后先后水煎两次, 每次 1 h, 合并浓缩至 2.0 g/ml 后置 4℃ 冰箱保存。水合氯醛 (上海化学试剂采购供应五联化工厂, 批号: 20120902), 阿扑吗啡 (Sigma 公司, 批号: 20121106), 乳胞素 (密理博中国有限公司, 批号: 20120505), 高氯酸 (Sigma 公司, 批号: 20120614)。

1.3 主要仪器

Forma-86C ULT 超低温冰箱 (美国 Thermo 公

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY12H27004)

* 通讯作者: 13905811519, bxd580412@sina.com

司); 1200 系列高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Allegra 64R 高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司); H-7650 透射电镜 (日本 Hitachi 公司); 牙科钻 (成都康发医疗器械有限公司)。

1.4 造模方法

采用颅内注射乳胞素诱导大鼠帕金森病肌僵直模型^[9]。以 10% 的水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 给予大鼠腹腔注射麻醉, 将其俯卧位固定, 常规消毒后, 头颅正中切开头皮和皮下组织, 剥离骨膜, 确定前后囟坐标并充分暴露, 根据大鼠脑立体定向图谱^[6], 确定右侧大鼠内侧前脑束 (MFB): 前囟后 4.2 mm, 矢状缝右侧 1.2 mm, 用铅笔在颅骨上标示出来, 颅骨表面下 8.0 mm, 注射深度视大鼠体重和头颅大小略微变动, 范围以不超过 0.3 mm 为宜; 用牙科钻在相应部位小心钻透颅骨, 将微量注射器缓慢进针至预定深度, 注射 2 μ l 乳胞素 (1 μ g/ μ l), 控制注射速度为 1 μ l/min, 注射完毕后留针 5 min, 缓慢拔针, 缝合伤口, 术后大鼠送回鼠笼正常喂养。术后 1 周行旋转行为测试, 腹腔注射阿扑吗啡 (0.5 mg/kg) 10 min 后观察并计算大鼠的旋转次数, 筛选造模成功大鼠^[9]。

1.5 动物分组与干预方法

24 只造模成功大鼠按照随机数字表分为模型组和中药高、中、低剂量组, 每组 6 只, 另设假手术组 6 只 (颅内注射 2 μ l 生理盐水)。假手术组和模型组均灌胃生理盐水 20 g/(kg · d), 中药高、中、低剂量组分别灌服舒肌汤 40、20、10 g/(kg · d), 每日 1 次, 持续灌胃 30 天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 HPLC 测定纹状体 DA 及其代谢物水平 大鼠断头取脑, 迅速在冰皿上剥离双侧纹状体, 精密称重后加入 0.4 mol/L 高氯酸除蛋白, 制备匀浆, 4℃ 条件下, 经 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 20 μ l 进样, 运用高效液相色谱技术色谱分析测定样品组织 DA、高香草酸 (HVA) 和二羟苯乙酸 (DOPAC) 的含量。

1.6.2 电镜观察膈肌神经肌肉接头超微结构 大鼠断头处死, 分离出左侧膈肌终板区肌条, 固定, 脱水, 包埋, 切片染色, 在电镜下观察膈肌神经肌肉接头突触前、突触后及突触间隙的超微结构改变, 突触前结构主要观察突触小泡、长管型泡、自噬体样结构的密度改变, 突触后及突触间隙结构主要观察突触褶的形态改变。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用两独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠纹状体 DA、HVA、DOPAC 含量比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠纹状体 DA、HVA、DOPAC 含量明显减少, DA/DOPAC 和 DA/HVA 值有不同程度下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 中药高、中、低剂量组大鼠纹状体 DA、HVA、DOPAC 含量均有不同程度升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 中药中、低剂量组 DA/DOPAC 和 DA/HVA 值有明显提高 ($P < 0.05$)。中药各剂量组之间的 DA 及 HVA 含量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与中药中剂量组比较, 中药高剂量组 DOPAC 含量和 DA/DOPAC、DA/HVA 值下降 ($P < 0.05$), 中药低剂量组 DOPAC 含量亦降低 ($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠膈肌神经肌肉接头超微结构比较

假手术组大鼠膈肌神经肌肉接头肌纤维排列整齐, 突触前、后膜结构完整, 囊泡和线粒体结构亦完好; 模型组肌纤维密集, 排列紊乱, 突触前膜囊泡和线粒体增多, 突触后膜皱褶明显, 乙酰胆碱受体增多; 中药低剂量组相较于模型组突触前膜囊泡减少, 皱褶稍缩短; 中药高剂量组的线粒体进一步减少, 部分呈空泡化; 中药中剂量组变化最为明显, 突触前膜囊泡和线粒体明显减少, 突触后膜乙

表 1 各组大鼠纹状体 DA、HVA、DOPAC 含量及 DA/DOPAC 和 DA/HVA 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	DA (ng/g)	HVA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	DA/DOPAC	DA/HVA
假手术组	6	1561.28 $\pm$ 221.36	773.08 $\pm$ 143.70	895.87 $\pm$ 151.93	2.06 $\pm$ 0.43	1.92 $\pm$ 0.46
模型组	6	823.17 $\pm$ 206.85**	463.64 $\pm$ 92.65**	547.08 $\pm$ 136.56**	1.45 $\pm$ 0.38**	1.53 $\pm$ 0.40*
中药高剂量组	6	976.32 $\pm$ 185.25 Δ	538.18 $\pm$ 87.47 Δ	651.26 $\pm$ 110.81 Δ $\blacktriangle$	1.54 $\pm$ 0.35 $\blacktriangle$	1.61 $\pm$ 0.38 $\blacktriangle$
中药中剂量组	6	1146.27 $\pm$ 259.22 Δ Δ	564.24 $\pm$ 80.92 Δ Δ	766.58 $\pm$ 135.72 Δ Δ	1.77 $\pm$ 0.44 Δ	1.98 $\pm$ 0.52 Δ
中药低剂量组	6	942.30 $\pm$ 190.63 Δ	510.72 $\pm$ 66.54 Δ	635.18 $\pm$ 124.55 Δ $\blacktriangle$	1.66 $\pm$ 0.37 Δ	1.74 $\pm$ 0.42 Δ

注: DA, 多巴胺; HVA, 高香草酸; DOPAC, 二羟苯乙酸; 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, Δ $P < 0.05$, Δ Δ $P < 0.01$; 与中药中剂量组比较, $\blacktriangle$ $P < 0.05$

酰胆碱明显减少, 间距增宽, 神经肌肉接头皱褶明显缩短。

3 讨论

帕金森病肌僵直归属于中医学“痹证”范畴。对于此类病证之因,《素问·至真要大论》论述有“诸颈项强,皆属于湿”“诸暴强直,皆属于风”;在《素问·痹论》阐述“痹之安生”问题时,则直接指出“风寒湿三气杂至,合而为痹也。其风气胜者为行痹,寒气胜者为痛痹,湿气胜者为著痹也”。本病病性本虚标实,病机多属风、寒、湿邪气夹杂。舒肌汤由毛叶轮环藤、青风藤、防己、厚朴、山梗菜组成,《药性考》提到青风藤主治“湿痹骨痛,脚腿转筋,治风有灵”,《本草再新》言防己能“利湿,除风”,《本草经疏》论述厚朴“风寒湿入腠理,则气血凝涩而成痹,甚则肌肉不仁,此药辛能散结,苦能燥湿,温热能祛风寒,故悉主之也”,诸药相配,共奏祛风除湿、散寒止痛之效。

研究认为,肌僵直的发生是基于多巴胺能神经元的变性缺失,DA 与乙酰胆碱两大递质的失衡,兴奋性神经递质乙酰胆碱相对增多,胆碱能神经元功能相对亢进,引起中枢内一条长反射回路兴奋性增强,同时使外周运动神经兴奋性提高,导致全身主动肌和拮抗肌肌张力同时增加,进而产生僵直、运动减少、姿势异常等肌僵直的症状^[8]。如何保护和增强残存多巴胺能神经元的活性,提高纹状体 DA 含量,同时降低外周乙酰胆碱浓度,纠正这种递质失衡,无疑是临床治疗帕金森病肌僵直的有效途径。因此,中脑黑质纹状体 DA 的含量测定成为临床诊断的主要指标之一^[9],DA 和乙酰胆碱两大递质失衡能否得到纠正,也是衡量肌僵直治疗有效与否的最客观指标。DA 代谢的最终产物主要是 HVA、DOPAC 等,可作为间接反映脑内 DA 含量变化的指标^[10]。本研究结果显示,模型组大鼠纹状体 DA 及其代谢物 HVA、DOPAC 的含量和 DA/HVA、DA/DOPAC 值均较假手术组降低,而中药各剂量组 DA、HVA、DOPAC 的含量相较于模型组有不同程度的升高,提示舒肌汤对多巴胺能神经

元的形态及功能有保护作用;同时,中药中、低剂量组 DA/DOPAC 和 DA/HVA 值相较于模型组有明显提高,说明舒肌汤能减慢多巴胺能神经元的代谢速度,保护脑内残存多巴胺能神经元,并促进其分泌 DA。电镜结果显示,模型大鼠膈肌神经肌肉接头肌纤维密集,排列紊乱,突触前膜囊泡和线粒体增多,突触后膜皱褶明显,乙酰胆碱受体增多,而中药各剂量组可以明显改善这些变化,说明舒肌汤可以减少神经肌肉接头乙酰胆碱的浓度,降低外周神经的兴奋性,从而缓解肌张力的增高。总之,本实验从中枢和外周两个角度,基于对神经兴奋性的整体调节,部分阐明了舒肌汤对帕金森病肌僵直的外周作用的可能机制。

参考文献

- [1] 汪锡金,张煜,陈生弟. 帕金森病发病机制与治疗研究十年进展 [J]. 中国现代神经疾病杂志,2010,10(1):36-42.
- [2] 陈生弟,汪锡金. 帕金森病的神经保护治疗:现状与分析 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2010,17(3):159-162.
- [3] 鲍晓东. 试论中医药治疗帕金森病的综合优势 [J]. 中医杂志,2006,47(8):619-620.
- [4] 鲍晓东,周清善. 舒肌汤对帕金森病模型大鼠肌僵直的影响 [J]. 中医杂志,2014,55(23):2034-2038.
- [5] 朱少平,胡利,鲍波. 乳胞素诱导帕金森病大鼠模型行为学及病理学观察 [J]. 实验动物科学,2013,30(4):26-30.
- [6] 牛朝诗,李健. 立体定向技术注射 6-OHDA 至内侧前脑束建立帕金森病大鼠模型 [J]. 立体定向和功能性神经外科杂志,2007,20(1):19-24.
- [7] 张厚亮,丁正同,王坚,等. 恩他卡朋对帕金森病大鼠的疗效 [J]. 中国临床神经科学,2007,15(6):620-624.
- [8] 杨虹,张莉萍,魏桂荣. 多巴胺/乙酰胆碱动态平衡在帕金森病发病中研究进展 [J]. 中国老年学杂志,2009,29(13):1708-1710.
- [9] 王倩,陈兴华. 针刺对帕金森模型大鼠纹状体多巴胺及代谢产物含量影响的实验研究 [J]. 新中医,2006,38(6):92-93.
- [10] 王媛媛,孙红梅,和欣,等. 针刺百会和大椎穴对帕金森病小鼠多巴胺能神经元的保护作用 [J]. 解剖科学进展,2010,16(1):16-20.

The Effect of *Shuji Decoction* (舒肌汤) on Dopamine and Its Metabolite in Corpus Striatum of Parkinson Disease Rigidity Model Rats

LIU Jun, BAO Xiaodong

(Basic Medical School, Zhejiang Unieversity of Chinese Medicine, Hangzhou, 310053)

ABSTRACT Objective To explore possible functional mechanism of *Shuji Decoction* (舒肌汤) in treating Parkinson disease muscle rigidity. **Methods** Using encephalic injection of Lactacystin to induce 24 Parkinson disease rigidity

model rats in total. Divided them into the model group and the Chinese medicine high, middle and low dose groups randomly, with 6 in each group. Set 6 rats in the sham-operation group in addition (injected with saline encephalically). The sham-operation group and the model group were both perfused with saline 20 g/(kg · d). *Shuji Decoction* was concentrated to 2.0 g/ml. The Chinese medicine high, middle and low dose groups were respectively gavaged with *Shuji Decoction* 40, 20 and 10 g/(kg · d), once per day, for 30 days. Examined content of dopamine (DA), homovanillic acid hva (HVA) and dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in corpus striatum. Observed changes of ultrastructure at neuromuscular junction of nervus phrenicus under electron microscopy. **Results** Compared with the sham-operation group, the content of DA, HVA and DOPAC in rats of the model group remarkably decreased, with value of DA/DOPAC and DA/HVA decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); Compared with the model group, the content of DA, HVA, DOPAC, value of DA/DOPAC and DA/HVA of corpus striatum of mice in the Chinese medicine high, middle and low dose groups all remarkably increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); Compared with the Chinese medicine middle dose group, content of DOPAC, and value of DA/DOPAC, DA/HVA of the Chinese medicine high dose group decreased, and content of DOPAC of the Chinese medicine low dose group also decreased ($P < 0.05$). Under electron microscopy, there existed changes of ultrastructure like muscular fiber concentrating and being arranged in disorder at neuromuscular junction, vesicles and mitochondria of presynaptic membrane increasing, postsynaptic membrane folding remarkably and acetylcholine receptors increasing. The above changes were improved in each dose of the Chinese medicine groups to different degree. **Conclusion** *Shuji Decoction* can release muscle rigidity in Parkinson by promoting secretion of DA, at the same time decreasing the release of acetylcholine at neuromuscular junction, and regulating central and peripheral nerve excitation.

Keywords Parkinson disease; rigidity; *Shuji Decoction* (舒肌汤); dopamine; acetylcholine; neuromuscular junction
(收稿日期: 2015-11-18; 修回日期: 2016-03-06)

编辑: 邓 媛

首届全国经方及经典名方研究与临床应用高峰论坛 暨国医名师学术思想及临床经验传承研修班

由中医杂志社主办, 刘玉洁国家级中医传承工作室协办, 央地共创(北京)科技中心承办的“首届全国经方及经典名方研究与临床应用高峰论坛暨国医名师学术思想及临床经验传承研修班”拟定于2016年9月23日-25日在北京举办, 论坛倡导“百花齐放, 百家争鸣”的学术氛围, 将继续秉承“高端性、前瞻性、学术性、实用性”的特点, 全力打造中医药界的高水平学术盛会, 搭建高质量的学习交流平台。本次论坛的主题为“传承国粹、创新发展”, 将邀请国医大师、首都国医名师、经方专家学者、国家级中医传承工作室(站)专家现场作精彩专题报告, 同时将邀请国家级重点学科(专科)带头人交流疑难病研究的新进展、新成果, 以及全国各地的中医、中西医结合界专家学者、中青年人才代表共同探讨疑难病诊治中的新经验、新思路和新方法。欢迎中医药界同仁积极参加, 参加会议的代表将授予国家级继续教育 I 类学分。现将论坛有关事宜通知如下:

一、会议内容及征文: 为使会议内容更丰富、实用, 方便各位参会代表相互交流学习和收藏, 将整理汇编《首届全国名老中医药专家传承团队领军人才论坛暨经方及经典名方研究与临床应用研修班论文集》; 1) 论文要求: 请参照中医杂志投稿要求, 只接收电子文稿, 投稿邮箱 zyzz1955@126.com; 2) 汇编进《论文集》符合条件的优秀论文将择优推荐在《中医杂志》发表。论文投稿截止日期 2016 年 8 月 23 日。1. 名医传承工作室建设经验; 2. 国医名师学术思想、临床经验继承与经方研究; 3. 国医名师诊治典型病例的探讨; 4. 国医名师治疗临床常见病、疑难病、危重病的用药经验; 5. 名老中医及中青年人才治疗疑难病新思路、新方法、新经验及验案交流; 6. 经方及经典名方临床应用总结与研究; 7. 经方及经典名方研究的方法探讨; 8. 运用经方及经典名方诊治常见病、多发病及疑难危重病的临床应用探讨; 9. 经方及经典名方的实验研究成果总结; 10. 经方及经典名方的组方配伍规律探讨; 11. 经方及经典名方与病证的相关性探讨; 12. 仲景学说的理论与文献研究; 13. 仲景学说的多学科研究; 14. 《伤寒论》和《金匮要略》的研究与临床应用; 15. 经方及经典名方用药剂量与临床应用; 16. 经方及经典名方疗效评价及安全性研究; 17. 经方体质研究; 18. 经方多学科研究探讨。

三、会议时间及地点: 时间: 2016 年 9 月 23-25 日 (23 日全天报到, 24 日全天会议, 25 日上午会议, 下午撤会。) 地点: 北京 (具体地点见第二轮会议通知)

四、会议费用: 1500 元/人 (含会议研修费、资料费、会议期间 24 日-25 日正餐等), 在校学生凭学生证减免会议费 600 元, 住宿统一安排, 费用自理。

五、其它事项: 1. 欢迎与会代表提供疑难讨论病例, 会务组将结合会议计划酌情安排与专家互动答疑。2. 具体内容请登陆中医杂志社网站 (www.jtcm.net.cn) 查询。

六、联系方式: 地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号中医杂志社, 邮政编码: 100700, 联系电话: 010-57039906, E-mail: zyzz1955@126.com, 联系人: 孙荣, 负责人: 张宇 (18911259118)。微信: [zyzz1955](https://www.wechat.com/p/zyzz1955)