

养肝熄风方药对帕金森病模型大鼠神经行为的影响*

李文伟[△] 蔡定芳^{△△} 陈锡群 沈思钰

内容提要 目的:探讨养肝熄风方药对帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型大鼠神经行为的影响。方法:运用 6-羟基多巴胺(6-OHDA)损毁大鼠中脑黑质致密部(SNc)和腹侧被盖区(VTA)两区多巴胺能神经元,造成 PD 模型;观察养肝熄风水煎醇提液对该模型阿朴吗啡(apomorphine)诱发旋转实验和阶梯实验的影响。结果:阿朴吗啡诱发旋转实验表明:养肝熄风方药可以降低 PD 大鼠阿朴吗啡诱发的旋转行为。阶梯实验表明:治疗前 PD 大鼠比对照组大鼠摄食的食物颗粒数明显减少。治疗后治疗组大鼠摄食的食物颗粒比模型组增多($P < 0.05$)。结论:养肝熄风方药能够改善 PD 大鼠的神经行为。

关键词 帕金森病模型 神经行为学 大鼠 养肝熄风方药

Effects of Yanggan Xifeng Recipe on Changes of Neurological Behavior of Rat of Parkinson's Model LI Wenwei, CAI Dingfang, CHEN Xiqun, et al. Huashan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200040)

Objective: To investigate the effect of Yanggan Xifeng Recipe (YGXFR) for nourishing Liver to calm down endogenous Wind on neurological behavior of Parkinson's disease (PD) rat model. **Methods:** PD rat model was established by destroying the substantia nigra condense area (SNc) and ventral tegmental area (VTA) unilaterally with 6-hydroxy dopamine (6-OHDA). The rats for control were injected in the same site with the same dose of normal saline. The animals were randomly divided into 3 groups (7 in each group), the control group, the model group and the TCM treated group. Staircase test and rotation test induced by apomorphine were performed in all groups and compared. **Results:** The staircase test demonstrated that, after being treated with YGXFR, the food pellets intake were increased compared to model group ($P < 0.05$), and their rotation induced by apomorphine was lessened ($P < 0.01$). **Conclusion:** YGXFR could recover the neurological behavior deficits of PD rat models.

Key words Parkinson's disease model, neurological behavior, rat, Yanggan Xifeng Recipe

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种与年龄因素相关的神经变性疾病。其主要病理改变为中脑多巴胺(dopamine, DA)神经元变性坏死;并且在疾病的发展过程中,这种改变不断缓慢地加重⁽¹⁾。典型患者表现为静止性震颤、肌僵直、动作迟缓、姿势反射障碍等临床特征⁽²⁾。大量的临床报道表明养肝熄风类方药治疗 PD 可以产生较好的疗效⁽³⁾。我们初步的临床研究发现中医方药尚不能替代左旋多巴制剂的疗效,但养肝熄风方药与抗 PD 西药一同应用,往往能够改善 PD 患者的临床症状,甚或某种程度上减少左旋多巴制剂的用量。为揭示养肝熄风方药能够提高 PD 疗效的

可能机制,我们探讨了养肝熄风方药对 PD 大鼠神经行为的影响,以期 PD 的中西医结合研究提供初步线索。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠 42 只,雄性,体重 200 ~ 250g,由中国科学院上海分院实验动物中心提供。

1.2 药物 将生地、当归、枸杞子、白芍、何首乌、鹿角霜、钩藤、三七、山茱萸、炙甘草(所有药材均购自上海医科大学华山医院中药房)按 10:5:5:3:3:3:5:1:3:2 的比例称量。根据文献⁽⁴⁾方法制成 200%养肝熄风水煎醇提液。

1.3 试剂与主要仪器 阿朴吗啡、6-羟基多巴胺(6-OHDA)购自美国 Sigma 公司,II-C 型立体定向仪为上海江湾仪器厂产品。

2 方法

* 本课题受上海市卫生系统“百人计划”基金(No.97BR016)、高等学校博士点专项科研基金(No.9747)、卫生部科研基金资助(No.98-2

- 151)

上海医科大学华山医院(上海 200040)

[△]现在山东省胜利油田中心医院(山东 257034)

^{△△}指导

2.1 模型建立 根据文献^[5]方法复制帕金森病模型。造模前随机分为对照手术大鼠(12 只)和模型制作大鼠(30 只,2 只作组织鉴定用,造模 28 只)。取前囟高于后囟 1 mm 为标准位置。定向注射点坐标参数为:(1)黑质致密部(SNc)注射点:后囟向前 0.33 × 前后囟间距 mm(A)、向右旁开中线 0.9 mm(R)、进针深度为 8.0 mm(H,以脑组织表面为 0 点);(2)中脑腹侧被盖区(VTA)注射点:A 同第(1)注射点,R 为 2.0 mm,H 为 7.5 mm。各点注射 6-OHDA 6 μg/3 μl,注射速度为 0.5 μl/min,留针 15 min。对照手术以等量生理盐水代替 6-OHDA,其余条件及方法与造模手术相同。手术分批进行,术后笼养观察。术后 2 周所有手术大鼠均放置在 40 cm × 50 cm 的塑料箱中,腹腔注射阿朴吗啡(0.5 mg/kg)诱发旋转,计数注射后 30 min 内的旋转次数,根据文献^[6]将 > 5 转/min 的大鼠用来作进一步研究。

2.2 动物分组及处理 将建立成功的模型大鼠随机分为两组:模型组 7 只,治疗组 7 只;随机取对照手术大鼠 7 只作为对照组。常规笼养 3 周后开始治疗。治疗组每天 15:00 ~ 17:00 灌胃相当于中药生药 15 g/kg(相当于人临床等效剂量的 10 倍)的养肝熄风水煎醇提液,模型组及对照组以等量生理盐水灌胃,连续 4 周。

2.3 旋转实验 PD 大鼠经中药灌胃处理 4 周后,进行本实验。大鼠腹腔注射阿朴吗啡 0.5 mg/kg 诱发旋转,实验过程同造模后的旋转实验鉴定,记录 30 min 的旋转次数。

2.4 阶梯实验 参照文献^[7]稍作改进:选择长、宽、高分别为 280 mm × 65 mm × 90 mm(外壳约 285 mm × 70 mm × 95 mm)的质量较好的硬纸盒,其内安放一长、宽、高分别为 210 mm × 24 mm × 55 mm 的木块,以铁钉固定在盒底,木块上方钉一宽 28 mm、与木块同长约 3 mm 厚的木板,制成中央平台。纸盒后 1/3 供大鼠尾部活动。两侧镶入约 6 mm 厚的硬纸板叠成楼梯 4 级,梯面冲压出约 4 mm 深小孔,供放置食物颗粒用,平台后设挡板防止大鼠滑下。将实验大鼠禁食 2 天后,放置在实验盒中,盒内楼梯上已预先在每个小孔放入 10 粒饲料颗粒(每个加工成 45 mg 大小),共 80 粒,允许大鼠摄食 15 min,观察大鼠的摄食动作;喂饲完毕分别记录大鼠左侧、右侧所食食物颗粒量。连续观察 4 天,以第 4 天的数据作统计分析。

2.5 统计学方法 全部数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。

结 果

1 旋转实验结果 见表 1。治疗前模型组和治疗组两组间的旋转次数差异无显著性($P > 0.05$)。治疗 1 周内,治疗组大鼠灌胃后 1 ~ 2 h 内未出现旋转。治疗 4 周后,治疗组经阿朴吗啡诱发的旋转次数比模型组明显减少,差异有显著性($P < 0.01$)。

表 1 两组动物治疗前后阿朴吗啡诱发旋转次数比较 (转/30 min, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	治疗前	治疗后
模型	7	214.57 ± 30.40	217.51 ± 26.54
治疗	7	203.14 ± 35.12	139.14 ± 14.68 [*]

注:与模型组同期比较,^{*} $P < 0.01$

2 阶梯实验测试结果 见表 2。治疗前 PD 大鼠(模型组和治疗组)与对照组比较,左侧前肢摄食的食物颗粒明显减少,差异有显著性($P < 0.01$);模型组与治疗组之间差异无显著性。治疗后治疗组左侧前肢摄食的食物颗粒数比模型组明显增多($P < 0.05$),但与对照组比较仍显著减少($P < 0.01$)。所有大鼠治疗前后右侧前肢摄食的食物颗粒差异无显著性。

表 2 治疗前后各组大鼠左侧前爪摄食食物颗粒量比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	治疗前		治疗后	
	左侧	右侧	左侧	右侧
对照	35.71 ± 4.72	33.86 ± 4.29	36.43 ± 3.78	36.00 ± 4.39
模型	17.14 ± 6.20 [*]	34.57 ± 3.91	18.86 ± 3.89 [*]	33.14 ± 3.44
治疗	18.29 ± 5.47 [*]	32.83 ± 4.34	25.14 ± 2.54 [*] ^A	35.57 ± 5.44

注:与对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组比较,^A $P < 0.05$;每组动物数为 7

讨 论

早在 6-OHDA 大鼠模型的首创时期,Ugerstedt 就发现了阿朴吗啡可以诱发该模型可逆性的旋转行为,并被以后的作者看作经典的 PD 模型神经行为学实验。由于迄今尚无有效的非侵袭性生理学方法检测该模型 DA 系统的损伤程度,因此,检测造模大鼠的旋转行为已经成为衡量单侧 6-OHDA 损伤后果的最常用手段。本研究显示:应用 6-OHDA 同时损毁 SNc 和 VTA 造模的 PD 模型饲养 7 周后,进行的第 2 次旋转实验表明,未经中药处理的模型大鼠,其旋转频率与第 1 次检测比较,差异无显著性($P > 0.05$)。提示:在 2 个月左右的实验过程中旋转实验结果稳定。本研究的结果还表明:在灌胃中药后即时观察治疗组大鼠 1 ~ 2 h,没有出现旋转行为,而灌胃 4 周后,阿朴吗啡诱发的旋转次数比对照组减少 36.04%,经统计学处理,差异有显著性($P < 0.01$)。既往的研究证实^[8]:能够迅

速补充脑内缺失的 DA 或直接激动 DA 受体的药物,如左旋多巴,阿朴吗啡,安非他命(amphetamine)等,由于刺激了纹状体的 DA 受体,导致大鼠双侧运动不平衡,会在短时间内出现旋转行为。提示养肝熄风方药可能不具有直接迅速补充脑内缺失的 DA 作用,也不具有 DA 受体的激动作用。

有文献^[9]表明:左旋多巴长期处理大鼠后,模型大鼠也会出现对诱导药物的反应时间缩短,甚至无反应等现象,并认为这可能类似左旋多巴治疗过程中产生的“开-关”现象和剂末现象;为了排除这种可能性,我们观察了养肝熄风方药对 PD 大鼠非药物诱发的行为异常的影响。非药物诱发的行为异常也是 PD 大鼠的重要特征之一,但检测这些异常的实验均需复杂的设备,多数实验室很难进行。1991 年 Montoya^[7]发明了大鼠前肢功能实验盒,这是一种十分简便有效的神经行为学检测手段,很快被其他作者用来检测 PD 大鼠的前肢功能,并发现病变侧前肢摄取食物颗粒的能力明显下降^[10]。本研究阶梯实验结果显示:未经治疗时,治疗组和模型组大鼠病变前肢摄食的能力与对照组比较均明显下降,而治疗组与模型组比较无明显差别;中药治疗后,治疗组病变前肢摄食的能力比模型组提高 33.30%。提示养肝熄风方药不仅能够改善 PD 大鼠药物诱发的行为异常,也能够改善非药物诱发的行为异常。我们推论这种行为的改善是中药治疗作用的表现。当然,与对照组比较治疗组病变前肢的摄食能力仍明显下降($P < 0.01$),摄食食物颗粒数仅为对照组的 69.01%。

因为尚无充分的文献依据,阐明养肝熄风方药影响 PD 大鼠神经行为的确切机制是十分困难的。我们将在以后的研究中作进一步探讨。

参 考 文 献

1. Agid Y. Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet* 1991; 337: 1321—1324.
2. Bezard E, Gross CE. Compensatory mechanisms in experimental and human Parkinsonism: towards a dynamic approach. *Prog Neurobiol* 1998;55: 93—116.
3. 李文伟,蔡定芳.帕金森病中西医结合研究的现状及展望. *上海中医药杂志* 1998;(6): 45—47.
4. 李仪奎主编.中药药理实验方法学.上海:上海科学技术出版社,1991: 38.
5. 冯林音,陆璐,童蓓燕,等.建立大鼠 Parkinson's 病动物模型方法的改进. *上海医科大学学报* 1990;17(2): 160.
6. Pollack AE, Turgeon SM, Fink JS. Apomorphine priming alters the response of striatal outflow pathways to D₂ agonist stimulation in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience* 1997;79: 79—93.
7. Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD, et al. The "staircase test": a measure of independent forelimb reach and grasping abilities in rats. *J Neurosci Meth* 1991;36: 219—228.
8. Schwarting RKW, Huston JP. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog Neurobiol* 1996;49: 215—266.
9. Schwarting RKW, Huston JP. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 1996;50: 275—311.
10. Nikkhah G, Duan WM, Knappe U, et al. Restoration of complex sensorimotor behavior and skilled forelimb use by a modified nigral cell suspension transplantation approach in the rat Parkinson model. *Neuroscience* 1993;56: 33—43.

(收稿:1999-08-05 修回:2000-03-06)

中西经
典巨著

四十余年研究成果大总结 数十位学科带头人大手笔

《中国中西医结合临床全书》

定价:480.00 元 优惠价:288.00 元

顾 问 崔月犁 董建华 陈可冀 名誉主编 陈敏章
唐由之 尚天裕 高辉远 主 编 李 恩

6 折特
别优惠

全书包括临床十一个学科(内、外、妇、儿、骨、皮肤、眼、耳鼻喉、口腔、针灸推拿及诊断)近千种病症,每病按概述、病因病理、临床表现、实验室及其他检查、并发症、诊断与鉴别诊断、中医辨证、西医治疗、中医治疗、中西医结合治疗、预防护理等项详述,有的还专列中西医结合研究一项,内容丰富、资料翔实、兼收并蓄、实事求是,是目前比较系统、全面、权威的中西医结合临床专著。该书问世后,好评如潮。出版社再次重印,现货供应,款到发书。

汇款地址(免费邮资):北京 39 支局解放军医学图书馆内三想医药书店;邮编:100039;联系人:赵东升;电话:(010)68234503、68234504、66931860(门市近万种医药图书常年展销,备有详细书目,函索即寄)。