

· 实验研究 ·

抗震止痉胶囊对帕金森病作用 机制的实验研究*

鲍远程 汪 瀚 张 波 陈怀珍 王晓阳 徐国存 王艳昕 杨兴涛

内容提要 目的 探讨抗震止痉胶囊对帕金森病(PD)大鼠作用机理。方法 采用 6-羟基多巴胺微量注射损毁左侧黑质致密区复制帕金森病大鼠模型,将模型大鼠随机分为 3 组,分别用抗震止痉胶囊(中药组)、左旋多巴(西药组)和生理盐水(模型组)治疗 30 天,并检测各组大鼠治疗前后旋转行为,处死后测定各组左侧纹状体、黑质相关指标。结果 中药组大鼠旋转行为有一定改善作用($P<0.05$)与模型组比较,纹状体多巴胺(DA)含量、DA/高香草酸(HVA)比值均增高($P<0.01$),黑质谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽均显著升高($P<0.01$),丙二醛降低($P<0.01$)。西药组大鼠旋转行为有明显改善($P<0.01$)。结论 抗震止痉胶囊能部分改善 PD 大鼠旋转行为,提高纹状体 DA 含量及 DA/HVA 比值,其机制可能在于减轻自由基损害,减少 DA 分解代谢。

关键词 抗震止痉胶囊 帕金森病 旋转行为 多巴胺 高香草酸 脑黑质 氧化应激

Preliminary Experimental Study on Therapeutic Mechanism of Kangzhen Zhijing Capsule in Treating Parkinson's Disease BAO Yuan-cheng, WANG Han, ZHANG Bo, et al *Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Anhui College of TCM, Hefei (230031)*

Objective: To explore the therapeutic mechanism of Kangzhen Zhijing Capsule (KZZJC) on rats with Parkinson's disease (PD). **Methods:** PD rat model was established by microinjection of 6-hydroxydopamine solution into left substantia nigra zona compacta (SNZC). Model rats were randomly divided into 3 groups and treated with KZZJC, levodopa and normal saline respectively for 30 days. The rotational behavior of rats before and after treatment was observed. Then rats were sacrificed and relevant indexes of left SNZC and striatum were examined. **Results:** In rats treated with KZZJC, the rotational behavior was improved ($P<0.05$), the levels of dopamine (DA) content and DA/homovanillic acid (HVA) ratio in striatum, and glutathione peroxidase, superoxide dismutase and glutathione in SNZC increased, but malondialdehyde in SNZC decreased, as compared with those in rats treated with normal saline, the difference was significant ($P<0.01$ or $P<0.05$). Rotational behavior in rats treated by levodopa was improved significantly ($P<0.01$). **Conclusion:** KZZJC could partially improve the rotational behavior in PD model rats, increase DA content and DA/HVA ratio in striatum. The mechanism might be the reducing of free radical damage and DA catabolism.

Key words Kangzhen Zhijing Capsule, Parkinson's disease, rotational behavior, dopamine, homovanillic acid, substantia nigra zona compacta, oxidative stress

帕金森病(Parkinson's disease, PD)又称震颤麻痹(shaking palsy),是一种常发于中老年人的慢性神经系统变性疾病,主要病理变化是选择性中脑黑质多巴胺神经元丧失,纹状体多巴胺含量显著性减少,导致锥体

外系一系列症状。

以滋养肝肾,育阴熄风为组方原则的抗震止痉胶囊在临床应用中取得一定疗效。本研究采用 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)脑立体定向微量注入大鼠一侧中脑黑质致密部(substantia nigra zona compacta, SNC)制作 PD 大鼠模型,观察抗震止痉胶囊对由阿朴吗啡(apomorphine, APO)所诱发旋转

* 安徽省教委高等学校自然科学基金资助课题(No. 98JL086)

安徽中医学院第一附属医院神经内科(合肥 230031)

行为,受损侧纹状体多巴胺(dopamine, DA)、高香草酸(homovanillic acid, HVA)含量及中脑黑质抗氧化指标的影响。

材料和方法

1 材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠 80 只,雄性,体重 180~220g,由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物和试剂 左旋多巴(L-dopa) 250mg/片,上海福达制药有限公司生产,批号:990309。抗震止痉胶囊(内含何首乌、天麻、白芍、生地、五味子等中药),1g/粒,相当于生药 3g,由安徽中医学院附属医院制剂室提供,批号:990711。6-OHDA、APO,美国 Sigma 公司产品。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)测试盒均由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 仪器 NS 型三维脑立体定位仪(日本, NARISHIGE 公司),5 μ l 微量进样器(上海第三分析仪器厂),MPF-4 型荧光分光光度计(日本日立),307-3 型台式牙钻车(中国上海)。

2 方法

2.1 造模 (1)立体定向微量注射:取大鼠 70 只,按以下方法制作模型:以 2%戊巴比妥钠 40mg/kg 给予大鼠腹腔注射麻醉后,剪去头部毛发,固定于脑立体定位仪上,在常规消毒下,于头颅正中切开头皮和皮下组织,确定前囟坐标,参照文献^[1]方法绘制大鼠脑立体定位图谱,确定左侧 SNC 坐标,即前囟尾侧 5.0mm,正中左侧 1.8mm,硬膜下 7.8mm,计算出注射点的相对坐标。进行标记定位后,牙科钻在相应部位钻透颅骨。用微量进样器吸取 6-OHDA 10 μ g/5 μ l (含 0.2%抗坏血酸的生理盐水配制)缓慢进针达预定深度,以 1 μ l/min 速度注入左侧 SNC 区,注射完毕后留针 10min,缓慢退出,缝合皮肤。另取大鼠 10 只为对照组,用上述同样方法和坐标操作,仅在左侧 SNC 区注射 5 μ l 生理盐水。(2)行为检测 术后第 1、2、3 周开始行行为学检测,每次给受试大鼠腹腔注射 APO 0.5mg/kg (溶于 0.9%生理盐水),以诱发大鼠向健侧(右侧)单向旋转。每周重复检测 1 次,每次在注射 APO 10min 后开始记录,共记录 30min 内旋转圈数,若大鼠恒定转向右侧,且平均转速大于 7 转/min,视为 PD 大鼠模型制作成功。若大鼠不旋转或平均转速小于 7 转/min,视为 PD 模型制作不成功,本造模共成功 21 只。

2.2 分组及给药 将造模成功的 21 只大鼠随机

分为 3 组,模型组 7 只,中药组 7 只,左旋多巴组(简称西药组)7 只。对照组 8 只(未造模,实验过程中死亡 2 只)。中药组给抗震止痉胶囊(将抗震止痉胶囊内粉末溶解于蒸馏水,配成 0.15g/ml 溶液),按 1.5g/kg 剂量灌胃,相当于成人临床等效型量的 6 倍。西药组给左旋多巴(左旋多巴溶于蒸馏水,配成 0.03g/ml 溶液),按 0.3g/kg 剂量灌胃,相当于成人临床等效型量的 6 倍。对照组、模型组按 10ml/kg 生理盐水灌胃,以上各组均每天给药 1 次,连续 30 天。

2.3 观察指标及方法 末次灌胃给药后 1.5h 用 APO 诱导,测试大鼠旋转行为并记录。各组大鼠行为测试完毕后,立即断头取脑,并迅速在冰盘上分离左侧纹状体组织和左侧黑质组织,称重后置 -70℃ 液氮储存待测。组织匀浆后,采用荧光分光光度法^[2]测定 DA、HVA。先后以正丁醇、庚烷等分离提取,经碘氧化,碱性亚硫酸钠还原,再用磷酸调 pH 值(7.8)后,在荧光计上以 310nm 激发,在 390nm 处测定荧光强度为 DA 含量。将分离所得含 HVA 溶液与氢氧化铵、高铁氰化钾反应后,在荧光计上以 320nm 激发,在 440nm 处测定荧光强度为 HVA 含量。采用化学比色法,按南京建成生物工程研究所试剂盒说明书步骤进行测试,根据计算公式分别求出 GSH-Px、SOD、MDA、GSH 测定值。

2.4 统计学方法 配对资料采用 *t* 检验。

结 果

1 各组大鼠治疗前后旋转行为的测定结果 见表 1。中药组、西药组大鼠治疗后较治疗前旋转次数有所减少($P<0.05$, $P<0.01$),而模型组治疗前后则无变化。

表 1 各组大鼠治疗前后旋转行为测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	平均转速(转/min)		<i>t</i>	<i>P</i>
		治疗前	治疗后		
对照	8	0	0		
模型	7	10.25 $\pm$ 1.01	10.10 $\pm$ 0.84	0.303	>0.5
中药	7	10.31 $\pm$ 1.71	8.36 $\pm$ 1.51	2.262	<0.05
西药	7	9.98 $\pm$ 1.84	6.91 $\pm$ 1.58	3.349	<0.01

2 各组大鼠损毁侧(左侧)纹状体神经递质 DA、HVA 及 DA/HVA 比值测定结果 见表 2。纹状体中 DA、HVA 的含量:与对照组比较,模型组大鼠均显著降低($P<0.01$),两给药组有所恢复($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但仍低于对照组($P<0.01$)。DA/HVA 比值:中药组基本接近对照组,模型组、西药组比对照组明显减小($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠治疗后左侧纹状体 DA、HVA 及 DA/HVA 比值测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	DA (ng/g 脑湿重)	HVA (ng/g 脑湿重)	DA/HVA (比值)
对照	8	734.52 ± 50.22	52.84 ± 4.51	13.93 ± 0.76
模型	7	122.91 ± 15.99*	15.86 ± 2.60*	7.85 ± 1.11*
中药	7	241.08 ± 27.08*△△	20.07 ± 2.96*△	12.23 ± 2.27△△
西药	7	314.94 ± 25.30*△△	38.25 ± 3.78*△△	8.25 ± 0.32*

注 与对照组比较,* $P < 0.01$ 与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

3 各组大鼠损毁侧(左侧)中脑黑质抗氧化指标的测定结果 见表 3。(1)GSH-Px 活性:3 组造模后 GSH-Px 活性显著下降($P < 0.01$) 与模型组比较,中药组活性升高($P < 0.01$) 而西药组活性下降($P < 0.05$)。(2)SOD 活性:与对照组比较,模型组和西药组下降显著($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),中药组与对照组接近,显著高于模型组($P < 0.01$)。(3)MDA 含量:与对照组比较,模型组和西药组含量均显著升高($P < 0.01$) 中药组与对照组接近,显著低于模型组($P < 0.01$)。(4)GSH 含量:与对照组比较,3 组造模后 GSH 含量显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 与模型组比较中药组含量上升($P < 0.01$),西药组下降($P < 0.01$)。结果表明,PD 模型大鼠中脑黑质存在自由基生成过多,氧化反应增强,经中药治疗可改善各项抗氧化指标紊乱,而左旋多巴导致 GSH、GSH-Px 指标进一步紊乱。

讨 论

震颤麻痹属中医学“颤振”、“震颤”、“振掉”等范畴。结合历代医家著述及临床实验,我们认为本病的病机表现为本虚标实,虚指肝肾阴虚,病位在肝肾。以滋养肝肾,育阴熄风作为治疗根本法则,组成抗震止痉方,在临床取得明显疗效。抗震止痉方主要由何首乌、天麻、白芍、生地、五味子等组成,方中何首乌味甘而涩,微温不燥,善补益肝肾,养血滋阴,收敛精气,为平补阴血之良药;天麻性平味甘、辛,主入肝经,善熄风止痉,祛风通络;白芍性寒味甘,补肝柔肝,滋阴养肝,可

表 3 各组大鼠治疗后左侧黑质 GSH-Px、SOD、MDA、GSH 测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GSH-Px (u/ml)	SOD (NU/ml)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	GSH (mg/L)
对照	8	15.88 ± 2.71	321.95 ± 47.07	2.90 ± 0.44	8.69 ± 0.41
模型	7	8.04 ± 1.35**	254.73 ± 32.23**	4.26 ± 0.47**	4.87 ± 0.50**
中药	7	12.21 ± 2.58**△△	326.43 ± 48.82△△	2.51 ± 0.42△△	6.49 ± 0.30*△△
西药	7	6.14 ± 1.63**△	266.39 ± 36.67*	4.40 ± 0.31**	3.61 ± 0.49**△△

注 与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

“敛肝之液,收肝之气,而令气不妄行”生地为滋阴之上品;五味子益气生津,津血同源,更加滋阴之效能。

在 PD 患者残存的 DA 神经元内,DA 的合成、代谢和更新率加快⁽³⁾,在细胞内 DA 则主要通过 B 型单胺氧化酶(MAO-B)催化降解成 3,4-二羟基苯乙酸,再经儿茶酚胺-O-甲基移位酶代谢为 HVA,在 DA 能神经细胞中则主要是 MAO-B 活性较高,故中药可能主要通过抑制 MAO-B 的活性,而影响 DA 的降解代谢,而使 DA 有效浓度增高,从而起一定的改善症状作用。根据中医辨证论治原则,采用滋补肝肾,育阴熄风为治则外,方中何首乌、白芍、五味子等作为传统延缓衰老药具有明显抗氧化作用,能降低自由基和过氧化脂质水平,减轻细胞膜结构的损伤⁽⁴⁻⁶⁾。另外,何首乌、五味子等可降低 MAO-B 活性。天麻、五味子等可提高纹状体 DA 含量,对神经递质平衡有一定调节作用,而白芍具有抗胆碱作用^(7,8),故可改善 PD 动物旋转行为及 PD 患者临床症状,符合神经保护性治疗方案。

参 考 文 献

1. 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱.北京:人民卫生出版社,1991:49—58.
2. 徐叔云,卞如濂,陈 修主编.药理实验方法学.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1991:440—447.
3. Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. Neurology 1996;47(Suppl 3):161—170.
4. 陈晓光,崔志勇,常一丁,等.何首乌对老年小鼠衰老指标的影响.中草药 1991;22(8):357—359.
5. 国家中医药管理局编委会.中华本草.上海:上海科学技术出版社,1998:647.
6. 李 莉.五味子酚等三种抗氧化剂对氧化应激损伤中枢神经细胞的保护作用及其作用机理研究.生理科学进展 1998;29(1):35—38.
7. 戴光仁.某些药物对小鼠单胺氧化酶(B 型)活性影响.中草药 1985;(1):12—13.
8. 吴慧平,陆明荣,吴关娟.天麻对实验性癫痫豚鼠脑内儿茶酚胺含量的影响.南京中医学院学报 1990;3(2):49—51.

(收稿 2000-08-09 修回 2000-11-11)