

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*

蔡定芳 陈锡群 高 颖 刘 静 沈自尹 李文伟

内容提要 目的:探讨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系统功能的影响。方法:建立 6-羟基多巴胺(6-OHDA)帕金森病大鼠模型,随机分为 4 组:假手术组、模型组、左旋多巴组、左旋多巴加补肾养肝组,每组 10 只。各组药物处理每日 1 次,12 周后处死取材。结果:(1)模型组纹状体多巴胺(DA)、多巴胺(DOPAC)、高香草酸(HVA)含量及 DOPAC/DA、HVA/DA 显著低于假手术组($P < 0.05$),降低幅度约为 90%;左旋多巴组 DA、DOPAC、HVA 含量及 DOPAC/DA、HVA/DA 明显高于假手术组;左旋多巴加补肾养肝组 DA、DOPAC、HVA 含量及 DOPAC/DA、HVA/DA 显著低于左旋多巴组($P < 0.05$),接近假手术组水平($P > 0.05$)。(2)模型组纹状体酪氨酸羟化酶(TH)活性显著低于假手术组,左旋多巴组较模型组显著降低,左旋多巴加补肾养肝组纹状体 TH 活性显著高于左旋多巴组($P < 0.05$)。(3)左旋多巴加补肾养肝组中脑 THmRNA 表达明显高于左旋多巴组。结论:补肾养肝方药能有效改善长期服用左旋多巴造成的不良反应。

关键词 帕金森病 左旋多巴 补肾养肝 黑质 纹状体

Effect of Bushen Yanggan Recipe on Nigrostriatal Function in Parkinsonian Model Rats after Long-term Levodopa Treatment CAI Ding-fang, CHEN Xi-qun, GAO Ying, et al *Institute for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai (200040)*

Objective: To investigate the effect of Bushen Yanggan Recipe (BSYGR) on the function and morphology of nigrostriatal system in Parkinsonian model rats with long-term levodopa treatment. **Methods:** Unilateral Parkinsonian rat models were established by injecting 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the substantia nigra pars compacta (SNpc) and ventral segmental area (VTA). Animals were randomly divided into four groups, the sham control group, model control group, levodopa group and levodopa plus BSYGR group. The content of striatal dopa (DA), digydroxy-phenyl acetic acid (DOPAC) and homovanilic acid (HVA) or the THmRNA expression level in the midbrain were measured. **Results:** (1) Levels of striatal DA, DOPAC, HVA, DOPAC/DA, HVA/DA decreased in the model control group by about 90% as compared with those in sham control group ($P < 0.05$). These parameters in the levodopa group were higher than those in the sham control group, while in the levodopa plus BSYGR group, they were lower than those in the levodopa group ($P < 0.01$), approaching the levels in the sham control group ($P > 0.05$). (2) Striatal TH activity in the model group was lower than that in the sham control group significantly, but higher than that in the levodopa group, while in the levodopa plus BSYGR group, it showed a level obviously higher than that in the levodopa group ($P < 0.05$). (3) Levodopa plus BSYGR group had a higher midbrain THmRNA expression level than that in the levodopa group. **Conclusion:** BSYGR could effectively reduce the side effects resulting from the long-term treatment of levodopa.

Key words Parkinson disease, levodopa, Bushen Yanggan Recipe, nigra, striatum

* 本课题得到教育部博士点基金(No. 9747)、卫生部科研基金(No. 98-2-151)、国家中医药管理局科研基金(970154)、上海市卫生系统百人计划(97BR016)等基金资助

复旦大学华山医院中西医结合研究所(上海 200040)

帕金森病(PD)是神经系统慢性进行性变性疾病。目前,仍认为左旋多巴制剂是治疗 PD 的最有效最主要的药物。但人们也注意到它所带来的的一系列严重问题:(1)多巴替代疗法不能阻止或延缓多巴胺能神经元的进行性变性;(2)长期使用多巴制剂可以产生严重远

期副作用,表现为多种复杂的运动波动、运动障碍等;(3)多巴制剂的长期疗效几乎无一例外地随疗程进行性下降;(4)许多体外实验证明左旋多巴促进多巴胺能神经元变性。因此,各国学者在努力寻找 PD 病因的同时将研究重点集中在如下两方面:一是如何阻止或减缓黑质多巴胺能神经元的进行性变性,二是如何减少左旋多巴制剂毒副作用。本研究在既往工作基础上,探讨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系统形态和功能的影响,为提高左旋多巴疗效、降低左旋多巴不良反应提供中西医结合实验依据。

材料与方法

1 动物 雄性 7 周龄健康清洁级 SD 大白鼠,体重 250g 左右(中国科学院上海实验动物中心提供),饲养于复旦大学医学院清洁级实验动物中心,动物自由进食饮水,动物房 12h 光暗交替,平均温度 22℃,相对湿度 30%。

2 主要试剂 6-羟基多巴胺(6-OHDA)、阿朴吗啡、左旋多巴及苄丝肼、HPLC 标准品[多巴胺(DA)、多巴胺(DOPAC)及高香草酸(HVA)]及 NSD-1015 均为 Sigma 公司产品;TRIzol Reagent 购自 GIBCOBRL 公司;GeneAmp RNA PCR Kit (Perkin Elmer Cetus)。

3 补肾养肝方药制备 生地、当归、枸杞子、白芍、何首乌、制黄芪、元参、北沙参、参三七、炙甘草、山萸肉由上海恒顺天堂药店提供。按 3:2:2:2:2:2:2:2:2:1:1 比例称量,水煎醇提后用蒸馏水调节药物浓度至 200%,0.1mPa 灭菌 15min,4℃ 保存备用。

4 动物分组 动物随机分为 4 组:假手术组、模型组、左旋多巴组、左旋多巴加补肾养肝组,每组 10 只。假手术组、模型组以等体积生理盐水腹腔注射和等体积蒸馏水灌胃;左旋多巴组以左旋多巴 100mg/kg、苄丝肼 25mg/kg 腹腔注射,另以 5ml/kg 蒸馏水灌胃;左旋多巴加补肾养肝组以补肾养肝方药水煎醇提液 5ml/kg 灌胃,另以左旋多巴 100mg/kg 加苄丝肼 25mg/kg 溶于生理盐水 1ml/kg 腹腔注射。上述处理自第 2 次阿朴吗啡行为鉴定后 1 周开始(6-OHDA 毁损后 4 周),每日 1 次,持续 12 周。腹腔给药时间为每日上午 9:00 左右,灌胃给药时间为每日下午 3:00 左右。最后 1 次腹腔用药后 24h 取材。

5 偏侧帕金森病大鼠模型制作 1%戊巴比妥(腹腔注射 50mg/kg)麻醉下固定于立体定向仪上,常规备皮并消毒,正中矢状切开头皮,钝性分离皮下组织

及骨膜,暴露前后囟,以 1.5% H_2O_2 溶液清洗,使骨缝显露清晰。参照大鼠脑立体定位图谱^[1],调整门齿钩平面高度,使门齿钩平面低于耳间线 2.4mm,此时前囟与后囟基本处于同一水平,相差不超过 0.1mm,在手术显微镜下准确定位前后囟(后囟以人字缝尖为准)。注射靶点取右侧黑质致密部(SNpc)和中脑腹侧被盖区(VTA)。VTA:前囟向后 5.2mm,右旁开 0.9mm,深度为 8mm(以颅骨平面为 0 点);SNpc:前囟向后 5.6mm,右旁开 2.0mm,深度 7.5mm(以硬膜平面为 0 点)。牙科钻钻开颅骨并重新定位后,以 10 μ l 微量进样器抽取 2 μ l(8 μ g)6-OHDA,按上述坐标缓慢注射至设定靶点,每靶点 1 μ l(4 μ g)。注射速度 0.5 μ l/min,留针 10min,退针速度 2.0mm/min。注毕缝合头皮,动物清醒后置动物房按上述条件继续饲养。假手术组动物以等量生理盐水代替 6-OHDA 作上述两点注射,余处理相同。

6 观察指标

6.1 纹状体 DA 及其代谢产物测定 依据文献^[2]方法采用 HPLC-EC 方法检测各组动物纹状体 DA 及其主要代谢物 DOPAC、HVA 的含量。

6.2 酪氨酸羟化酶(TH)活性的间接体内检测 采用 HPLC-EC 方法检测多巴脱羧酶抑制剂 NSD-1015 100mg/kg 腹腔注射 30min 后纹状体的 L-Dopa 蓄积量,作为体内 TH 活性的指标。操作步骤同 DA 及代谢物含量检测,但动物处死前 30min 腹腔注射 2.5%的 NSD-1015(用前以生理盐水配制)100mg/kg。结果以 ng/mg 组织湿重表示。

6.3 中脑 TH mRNA 大鼠迅速断头,剥离全脑,沿下丘脑下缘上 1mm 和脑桥上缘两个平面冠状切取中脑组织,再正中矢状分开左右两侧,切取腹侧部分,称重约 40mg,置液氮罐内冻存。据文献^[3]方法提取中脑 TH mRNA,经 RT-PCR 检测其含量。

7 统计学方法 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析并以 Newman-Keuls 检验(q 检验)作组间比较。

结 果

1 补肾养肝方药对长期服用左旋多巴帕金森病大鼠纹状体 DA 及其代谢产物的影响 见表 1。模型组纹状体 DA、DOPAC、HVA 含量及 DOPAC/DA、HVA/DA 显著低于假手术组($P < 0.05$),降低约 90%。左旋多巴加补肾养肝组 DA、DOPAC、HVA 含量及 DOPAC/DA、HVA/DA 显著低于左旋多巴组(P

表 1 补肾养肝方药对长期服用左旋多巴帕金森病大鼠纹状体 DA 及其代谢产物的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	DA	DOPAC ($\mu\text{g/L}$)	HVA	DOPAC/DA	HVA/DA
假手术	10	15.38 ± 1.24	1.29 ± 0.32	0.83 ± 0.06	0.124 ± 0.003	0.056 ± 0.004
模型	10	1.46 ± 0.18*	0.06 ± 0.01*	0.07 ± 0.01*	0.049 ± 0.002*	0.038 ± 0.002*
左旋多巴	10	26.21 ± 5.98* [△]	5.59 ± 1.00* [△]	6.61 ± 1.64* [△]	0.253 ± 0.025* [△]	0.267 ± 0.042* [△]
左旋多巴加 补肾养肝	10	14.51 ± 3.20 ^{△△}	2.74 ± 0.87 ^{△△}	1.06 ± 0.26 ^{△△}	0.184 ± 0.027 ^{△△}	0.061 ± 0.007 ^{△△}

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$;与左旋多巴组比较,^{△△} $P < 0.05$

<0.05)。提示长期服用左旋多巴帕金森病大鼠纹状体 DA 及其代谢产物异常升高,补肾养肝方药能抑制这种异常升高。

2 补肾养肝方药对长期服用左旋多巴帕金森病大鼠中脑 TH mRNA 表达及纹状体 TH 活性的影响见表 2。模型组纹状体 TH 活性显著低于假手术组;左旋多巴组纹状体 TH 活性较模型组显著降低;左旋多巴加补肾养肝组纹状体 TH 活性显著高于左旋多巴组($P < 0.05$)。左旋多巴加补肾养肝组中脑 THmRNA 表达明显高于左旋多巴组。提示帕金森病大鼠长期服用左旋多巴时纹状体 TH 活性显著降低,补肾养肝方药能有效升高帕金森病大鼠长期服用左旋多巴时纹状体低水平的 TH 活性及中脑 THmRNA 表达。

表 2 补肾养肝方药对长期服用左旋多巴帕金森病大鼠中脑 THmRNA 表达及纹状体 TH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TH 活性 (ng/mg)	THmRNA/GAPDH
假手术	10	3.41 ± 0.22	1.785 ± 0.231
模型	10	0.90 ± 0.21*	0.492 ± 0.133*
左旋多巴	10	0.47 ± 0.11* [△]	0.601 ± 0.041*
左旋多巴加 补肾养肝	10	1.91 ± 0.57 ^{△△}	1.024 ± 0.067* [△]

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$;与左旋多巴组比较,^{△△} $P < 0.05$

讨 论

左旋多巴经血液吸收后透过血脑屏障进入脑内,在芳香族氨基酸脱羧酶(多巴脱羧酶)催化下脱羧成多巴胺。左旋多巴长期反复应用后可出现“生化耐受”现象。本研究以左旋多巴 100mg/kg 每日 1 次腹腔注射 12 周,结果显示,帕金森病大鼠纹状体 DA、DOPAC、HVA、DOPAC/DA 和 HVA/DA 均较模型组明显升高,治疗剂量的左旋多巴使帕金森病大鼠纹状体 DA 及其代谢物升高的程度远远超过了假手术组。这是一种既不同于 PD 原发病又不同于正常状态的更为复杂的非生理环境^[4,5]。本实验结果表明:补肾养肝方药能有效纠正长期服用左旋多巴 PD 大鼠黑质纹状体系统过高的 DA 及其代谢产物的水平,提示补肾养肝方药既不影响左旋多巴疗效又能改善左旋多巴对黑质纹状

体系统的毒副作用。

酪氨酸羟化酶是 DA 合成的第一限速酶。在 PD 病理条件下,由于酶活性调节功能的异常并且蛋白总量下降,TH 活性可发生明显的异常改变,主要表现为酶总活性的下降^[6]。左旋多巴长期应用抑制 TH 活性的一种可能机制就是历来倍受关注的左旋多巴毒性问题。体外和体内实验均证明 DA 或左旋多巴本身的氧化特性使其具有潜在毒性^[7-9]。本研究表明,左旋多巴长期治疗使帕金森病大鼠纹状体 TH 活性在模型组基础上进一步下降,补肾养肝方药组 TH 活性明显高于左旋多巴组,提示联合用药不仅改善了 6-OHDA 毁损造成的 TH 活性及 DA 含量下降,而且改善了左旋多巴单独应用对 TH 的不利影响,使纹状体过高的 DA 代谢下调。可能由于左旋多巴脱羧后生成的 DA 在纹状体积聚,从而反馈抑制 TH 活性。高浓度 DA 与 TH 中的铁结合,使铁维持于三价的还原态从而抑制酶活性,这一过程不影响 TH 基因转录,因此 TH mRNA 并不降低。尽管左旋多巴长期应用对中脑 TH mRNA 无显著影响,但补肾养肝方药能有效升高长期服用左旋多巴帕金森病大鼠中脑 TH mRNA 表达。

本研究采用 HPLC-EC 方法检测多巴脱羧酶抑制剂应用后纹状体 L-Dopa 的蓄积量,用来作为 TH 活性的代表。相对于传统 TH 活性检测方法,HPLC-EC 检测的最大优点就是直接测量体内的酪氨酸羟化产物 L-Dopa,代表了 TH 的体内催化活性,因而较其他测量 TH 体外催化反应产物的方法更为敏感。由于实验设计的取材时间为最后一次用药后 24h,而左旋多巴的半衰期较短,约为 1~3h,且不受同时使用的外周脱羧酶抑制剂苄丝肼影响,因此外源左旋多巴本身不会对检测结果造成影响。

根据 PD 的临床表现,中医学认为其基本病机属肝肾阴虚、虚风内动。根据临床长期服用左旋多巴出现的不随意运动等症状,认为其病机仍然是药物伤阴所致。本实验所用方药系在既往实验^[10]基础上反复调整筛选。该方仍重用生地作君药,配以当归、白芍、参三七养血活血,使肝有所充,筋有所养;使用枸杞子、何首乌、山萸肉等滋肾,全方共奏滋肾养肝之效。

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: 20—40.
2. Hoane MR, Gulwadi AG, Morrison S, et al. Differential in vivo effects of neurturin and glial cell-line-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol* 1999; 160: 235—243.
3. Theo Hagg. Neurotrophins prevent death and differentially affect tyrosine hydroxylase of adult rat nigrostriatal neurons in vivo. *Exp Neurol* 1998; 149: 183—192.
4. Thomas N Chase. Levodopa therapy: consequences of the non-physiologic replacement of dopamine. *Neurology* 1998; 50 (Suppl 5): S17—S25.
5. 陈锡群, 蔡定芳. 酪氨酸羟化酶与帕金森病. 国外医学神经病学神经外科学分册 2001; 28(1): 59—61.
6. Venero JL, Revuelta M, Cano J, et al. Time course changes in the dopaminergic nigrostriatal system following transection of the medial forebrain bundle: detection of oxidatively modified proteins in substantia nigra. *J Neurochem* 1997; 68: 2458—2468.
7. Cho S, Duchemin AM, Neff NH, et al. Tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase and dopamine metabolism after chronic treatment with dopaminergic drugs. *Brain Res* 1999; 830: 237—245.
8. Ara J, Przedborski S, Naini AB, et al. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7659—7663.
9. 李文伟, 蔡定芳, 陈锡群, 等. 帕金森病大鼠神经行为和中脑酪氨酸羟化酶 mRNA 表达的改变. 中华老年医学杂志 2000; 19(6): 439—442.
10. 李文伟, 蔡定芳, 陈锡群, 等. 养肝息风方药对帕金森病模型大鼠神经行为的影响. 中国中西医结合杂志 2000; 20(12): 920—922.

(收稿: 2001-07-06 修回: 2001-09-26)

湿润烧伤膏治疗新生儿尿布皮炎 32 例

张淑琴 王玉芳

1997 年 6 月—2001 年 6 月, 我们用湿润烧伤膏治疗新生儿尿布皮炎 32 例, 疗效显著, 报告如下。

临床资料

本组新生儿尿布皮炎 64 例, 按门诊就诊先后顺序随机分为两组。治疗组 32 例, 男 13 例, 女 19 例; 年龄 6~28 天; 尿布接触区域大片皮损; 红色斑丘疹 20 例, 水泡脱皮糜烂 12 例。对照组 32 例, 男 15 例, 女 17 例; 年龄 6~28 天; 皮损(同前)分别为 24 例, 8 例。诊断标准参照《实用儿科学》(第 6 版, 北京: 人民卫生出版社, 1997: 500)。两组临床资料比较, 差异无显著性。

治疗方法

治疗组用湿润烧伤膏(由北京光明中医烧伤创疡研究所汕头经济特区美宝制药厂生产, 主要成分有黄芩、黄柏、黄连等)直接均匀涂抹患处, 每日 7 次。对照组用红霉素软膏直接均匀涂抹患处, 每日 7 次。两组用药前用温开水清洗患处轻轻擦干。

结 果

表现红色斑丘疹者: 从开始用药至皮损痊愈时间: 治疗组为 (2.0 ± 0.5) 天, 对照组为 (5.0 ± 0.5) 天 ($t = 19.8, P < 0.01$)。表现水泡脱皮糜烂者: 从开始用药至皮损痊愈时间: 治疗组为 (5 ± 1) 天, 对照组为 (9 ± 1) 天 ($t = 6.57, P < 0.01$)。两组间差异有显著性。

讨 论

由于被大小便浸湿的尿布未及时更换, 尿中的尿素被粪便中的细菌分解, 产生的氨刺激皮肤, 引起炎症。如不及时治疗, 易导致细菌感染, 甚至败血症。湿润烧伤膏为棕黄色油性软膏, 具有清热解毒、止痛生肌的作用。用于治疗尿布皮炎其油性成分无亲水性, 使尿液细菌不易侵入皮肤, 皮肤免受损伤, 其清热解毒、止痛生肌作用利于病变组织再生修复, 减轻疼痛。本法使用方便, 无刺激及不良反应, 止痛作用好, 疗效优于常规药物, 值得推广使用。

(收稿: 2001-07-20 修回: 2001-10-09)