

滋肾平颤颗粒对异动症大鼠行为学及黑质纹状体 DAT 和 VMAT2 基因表达的影响

叶青 周洁 袁灿兴

(上海中医药大学附属龙华医院,上海 200032)

摘要 目的:观察滋肾平颤颗粒对异动症(levodopa-induced dyskinesias,LID)大鼠行为学和黑质纹状体多巴胺转运体(dopamine transporter,DAT)及囊泡单胺转运体 2(vesicular monoamine transporter2,VMAT2)基因表达的影响。方法:采用 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine,6-OHDA)注射于大鼠脑右侧黑质造成偏侧帕金森病(Parkinson's disease,PD)模型,进一步对 PD 大鼠予以左旋多巴/苄丝肼制作异动症模型。实验设立正常对照组、模型组、中药干预组、中止给药对照组和中止给药+中药干预组,分别处理或给药 1 个月后观察药物对 LID 大鼠异常不自主运动(abnormal involuntary movement,AIM)评分的影响,运用实时定量 PCR 检测黑质纹状体 DAT 及 VMAT2 mRNA 表达。结果:与模型组和中止给药对照组比较,中药干预可明显减少异动症大鼠的 AIM 积分;荧光实时定量 PCR 结果显示,模型组大鼠 DAT mRNA 以及 VMAT2 mRNA 表达率明显低于正常对照组及其他各组,中药干预组与模型组,中止给药+中药组与中止给药组比较,两种 mRNA 表达均上调,其中 VMAT2 增高的趋势更明显。结论:中药可以有效缓解异动症症状,上调 DAT mRNA 以及 VMAT2 mRNA 表达。

关键词 异动症 滋肾平颤颗粒 行为学 多巴胺转运体 囊泡单胺转运体 2 实验研究

中图分类号 R742.5 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2014)04-0074-03

异动症是左旋多巴(levodopa,LD)长期治疗帕金森病过程中普遍出现的并发症,主要表现为舞蹈症和手足徐动症,严重影响帕金森病患者的日常生活质量。目前,各国学者在努力寻找帕金森病(Parkinson's disease,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。本研究主要探讨滋肾平颤颗粒对异动症(levodopa-induced dyskinesias,LID)模型大鼠行为学和黑质纹状体多巴胺转运体(dopamine transporter,DAT)及囊泡单胺转运体 2(vesicular monoamine transporter2,VMAT2)基因表达的影响。

1 实验材料

1.1 实验药物 滋肾平颤颗粒为上海市名中医胡建华教授经验总结方,由熟地黄 15g、枸杞 15g、桑寄生 20g、天麻 15g、僵蚕 10g、莪术 15g、白芍药 20g、天南星 15g、全蝎 3g、蜈蚣 3g 组成,由江阴天江药业有限公司制成颗粒剂(批号:0504312)。每袋重 4.8g,相当于生药 32g。将 4 袋滋肾平颤颗粒(相当于成人 1 日用量,含生药 128g)混合后溶于 100mL 生理盐水中,使每毫升含生药 1.28g。LD 粉剂 5g(批号:SLD6382)和苄丝肼粉剂 5g(批号:SL06492),由美国 Sigma 公司提供。

1.2 实验动物 成年雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 180~220g,由上海西普尔必凯实验动物有限公司提供,动物许可证号为

SCXK 沪 2003-0002。

1.3 主要试剂和仪器 6-羟基多巴胺、阿朴吗啡(apomorphine,APO),美国 Sigma 公司产品;TaKaRa 反转录试剂和荧光定量 PCR(F-PCR)反应试剂盒,宝生物工程大连有限公司;DEPC,赛百胜公司;大鼠脑立体定位仪,TOW-3A 型,第二军医大学产品;超速离心机,LE80K 型,Beckman 公司产品;液体闪烁发光记数仪,Wallac1450 型,美国 PerkinElmer 公司产品。IQS 多色实时定量 PCR 检测系统,美国 BIO-RAD;Eppendorf 核酸蛋白检测仪,德国产。

2 实验方法

2.1 PD 大鼠模型制备^[1] 雄性 SD 大鼠,在 1%戊巴比妥(30mg/kg 体重)麻醉下,固定于大鼠脑立体定向仪上,参照包新民等^[2]所著大鼠脑立体定位图谱,确定右侧黑质致密部(SNC)和中脑腹侧被盖部(VTA)三维坐标位置。SNC:前囟后 4.8mm,矢状缝右侧 2.0mm,硬膜下 8.0mm;VTA:前囟后 4.8mm,矢状缝右侧 1.2mm,硬膜下 8.2mm。牙科钻打孔,向两坐标点各注射 6-OHDA 6 μ g(溶于含质量分数为 0.2%抗坏血酸的生理盐水中,浓度为 2 μ g/ μ L),注射速度为 1 μ L/min,留针 10min。术后,用医用明胶海绵填塞颅骨孔,缝合切口皮肤,肌肉注射庆大霉素,待动物清醒后放回饲养笼中饲养。术后 2 周开始行为学检测,应用阿朴吗啡腹腔注射(0.5mg/kg 体重),若大鼠恒定转向左侧且旋转圈数>210r/30min 则视为成功 PD 模型。

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81302926);上海市中医药事业发展三年行动计划(ZYSNXD-CC-HPGC-JD-003)

2.2 假手术方法 用上述同样方法向右侧 SNe 和 VTA 分别注射 3 μ L 生理盐水(仅含 0.2%质量分数的抗坏血酸),术后,用医用明胶海绵填塞颅骨孔,缝合切口皮肤,肌肉注射庆大霉素预防感染。

2.3 LID 大鼠模型制备^[3] 对造模成功的 PD 大鼠予以左旋多巴/苄丝肼处理(10mg/kg 左旋多巴和 2.5mg/mL 苄丝肼溶于含 0.05%乙醇和 0.1%抗坏血酸的消毒生理盐水中),每日 10mg/kg,每日 2 次腹腔注射,连续 4 周。根据其是否出现异常不自主运动(AIM)包括刻板动作和对侧旋转行为,筛选出 LID 模型(AIM 评分>20 分则视 LID 造模成功)。

2.4 行为学测试方法(AIM 评分测定) 各组大鼠均每周 1 次进行 AIM 评分^[4]。腹腔注射左旋多巴/苄丝肼后立即评分,每 30min 评定 1 次,持续 120min,共有 5 组数据,5 组数据之和为该次评定结果。将 AIM 分为 4 个部分(前肢、口面部、轴性及运动)进行评定,每部分又根据其有或无及严重程度划分为五个等级(0~4 分)。0 分:无;1 分:偶尔出现;2 分:经常出现;3 分:持续存在,刺激使之停止;4 分:持续存在,刺激也不能使之停止。理论上 1 只大鼠 1 次用药后的 AIM 最高评分为 64 分。

2.5 动物分组与给药 54 只大鼠造模后经行为学测试,成功造模的 LID 模型大鼠 24 只,随机分为模型组、中药干预组、中止给药对照组、中止给药+中药干预组,每组 6 只。另取 6 只假手术大鼠为正常对照组。正常对照组及中止给药对照组给予生理盐水灌胃,模型组继续予以左旋多巴/苄丝肼腹腔注射(注射剂量为每千克体质量 10mg),中药干预组在模型组处理基础上给予中药灌胃,中止给药+中药干预组则在停用左旋多巴/苄丝肼的基础上加用中药(同中药干预组),每次灌胃量为 9mL/kg,1 次/d,连续 4 周。

2.6 大鼠脑组织抽提 RNA 步骤 大鼠用 1%戊巴比妥钠麻醉,迅速断头处死,冰浴中快速剥离大脑,准确切取双侧中脑黑质和尾壳核脑组织,用镊子分别转移到匀浆器中,加入 1mL Trizol 匀浆,室温 5~10min,转入 doff 管中,加 0.2mL 氯仿,震荡 15min,室温或 4℃静置 15min,4℃12000g(15000r/min)离心 15min,上清转入另一 doff 管,加入 0.5mL 异丙醇,-20℃静置 15min,4℃12000g(15000r/min)离心 10min,去上清,加入 1mL 95%乙醇洗涤沉淀,4℃8000g(10000r/min)离心 5min,晾干沉淀,加入 DEPC 水溶解,-20℃保存。

2.7 反转录反应 合成引物,每条引物 10D,用于染色法定量 PCR。VMAT2 mRNA:F(CCTTCGAAGTCCA CCTGCTAA);R(CATCACCGATGGGA TATGACTG)。DAT mRNA:F(GCTGC TACATCGGCATCGAG);R (GTGCCA GCTGCAAAGTGGTC)。反转录反应条件:37℃,15min 反转录反应;85℃,5s 反转录酶的失活反应。

2.8 FQ-PCR 反应条件 定量 PCR 仪测定各组 mRNA 相对含量。

0.05min $\rightarrow$ 95℃,0.05min $\rightarrow$ Tm,0.2min $\rightarrow$ 72℃,0.1min $\rightarrow$ 72℃,5min (Tm:B-action-STR 61.6℃,B-actionSN 61.4℃,DAT 60.9℃,VMAT2 57.4℃)。按照 FQ-PCR 间接定量公式计算:平均相对含量(%)=2^{-平均 $\Delta\Delta$ Ct}, $\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct 样本- Δ Ct 对照, Δ Ct 样本= Δ Ct 样本- Δ Ct 内参。

2.9 统计学方法 所有数据以($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS13.0 统计学软件分析,采用单因素方差分析及 t 检验进行组间比较,P<0.05 为差异有统计学意义。统计学得到的结果用 Excel 以及 SPSS18.0 软件分析做图。

3 实验结果

3.1 各组大鼠给药前后神经行为学(AIM 评分)的变化 见表 1。与用药前(第 0 周)比较,模型组大鼠用药后第 1、2、3 和 4 周的 AIM 评分逐步升高。与同期模型组比较,中药干预组大鼠第 1 周 AIM 评分差异无统计学意义,自第 2 周开始下降,第 3 和 4 周的 AIM 评分值明显降低(P<0.01)。中止给药对照组大鼠第 2、3 和 4 周 AIM 评分明显低于同期模型组(P<0.01)。中止给药+中药干预组大鼠 AIM 评分自第 2 周开始低于同期中止给药对照组(P<0.01)。

3.2 各组大鼠治疗后损毁侧黑质纹状体 DAT、VMAT2 mRNA 相对表达量比较 见表 2。FQ-PCR 结果计算后经由 Excel 软件套用公式分析,得到各组大鼠黑质纹状体 DAT 及 VMAT2 mRNA 的相对表达量。从表 2 可以看出,治疗 4 周后各组大鼠 DAT mRNA 的表达量均较正常对照组明显降低(P<0.01);中药干预组较模型组,中止给药+中药干预组较中止给药对照组,DAT mRNA 的表达量均明显增高(P<0.01)。模型组、中药干预组、中止给药对照组大鼠 VMAT2 mRNA 的表达量均较正常对照组明显降低(P<0.05,P<0.01),中止给药+中药干预组 VMAT2 mRNA 的表达量较正常对照组明显升高(P<0.01),中药干预组较模型组,中止给药+中药干预组较中止给药对照组,VMAT2 mRNA 的表达量均明显升高(P<0.01)。

4 讨论

DAT 是位于多巴胺(dopamine,DA)能神经元突触前膜上

表 1 各组大鼠不同时期 AIM 评分变化情况($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
模型组	6	35.02 $\pm$ 3.11	38.76 $\pm$ 3.61**	47.71 $\pm$ 10.75**	50.38 $\pm$ 7.29**	53.44 $\pm$ 5.34**
中药干预组	6	34.18 $\pm$ 6.54	37.05 $\pm$ 10.45	41.16 $\pm$ 7.12	31.19 $\pm$ 2.13 $\Delta\Delta$	26.19 $\pm$ 2.12 $\Delta\Delta$
中止给药对照组	6	33.17 $\pm$ 9.59	27.98 $\pm$ 8.72	26.60 $\pm$ 7.69 $\Delta\Delta$	19.40 $\pm$ 4.32 $\Delta\Delta$	14.38 $\pm$ 3.34 $\Delta\Delta$
中止给药+中药干预组	6	33.26 $\pm$ 7.32	27.76 $\pm$ 17.02	12.76 $\pm$ 6.53 $\Delta\Delta$	7.05 $\pm$ 3.33 $\Delta\Delta$	4.76 $\pm$ 3.05 $\Delta\Delta$

注:与第 0 周比较,**P<0.01;与同期模型组比较, $\Delta\Delta$ P<0.01;与同期中止给药对照组比较,###P<0.01。

表 2 各组大鼠损毁侧黑质纹状体 DAT、VMAT2 mRNA 相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	DAT mRNA	VMAT2 mRNA
模型组	6	0.09 $\pm$ 0.01**	0.25 $\pm$ 0.02**
中药干预组	6	0.23 $\pm$ 0.03** $\Delta\Delta$	0.88 $\pm$ 0.16* $\Delta\Delta$
中止给药对照组	6	0.33 $\pm$ 0.05**	0.43 $\pm$ 0.04**
中止给药+中药干预组	6	0.58 $\pm$ 0.13***	1.59 $\pm$ 0.26***

注:与正常对照组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较, $\Delta\Delta$ P<0.01;与中止给药对照组比较,###P<0.01。

的一种膜蛋白,其主要功能是再摄取突触间隙中的 DA 进入 DA 能神经元,终止 DA 的神经传递^[9]。Counihan 等^[9]在 PD 患者脑内也观察到 DAT mRNA 在黑质致密部的表达较对照组减少 50%,在黑质纹状体通路减少 43%,表明 DAT 是研究 PD 发病机制的一个重要的参考指标。有体外实验显示:左旋多巴不仅对 D8 细胞(产生 DAT 的细胞)有毒性损害,还能使 DAT 数量明显减少^[7]。这一现象在我们的实验中从 mRNA 水平得到证实。接受治疗的 LID 模型大鼠,其 DAT mRNA 的表达量与正常大鼠比较都有较大程度的下降,模型组表达量几乎为零,运用中药协同治疗后,DAT mRNA 的表达有明显上升。

VMAT2 为 DA 能神经元突触末梢内单胺递质囊泡膜上的转运体,负责将 DAT 转运入细胞内的 DA 转运入囊泡并调节随后的释放,VMAT2 通过携带 DA 进入突触囊泡和调节随后的释放而在 DA 的储存与释放中起关键作用。另外,VMAT2 对细胞内毒素的清除也起着非常重要的作用,通过将毒物清除入囊泡而防止对神经元的毒性作用。Miller 等^[8]研究发现,在 PD 小鼠纹状体区 VMAT2 结合位点明显减少,在黑质致密部的 mRNA 表达也同样减少,而且在 PD 患者的脑内也观察到 VMAT2 的含量减少,表明 VMAT2 也是反映 PD 损害的一个重要指标。在 LD 替代治疗过程中,如能适当地增强 VMAT2 功能或表达,使外源性 LD 在脑内迅速转化为多巴胺后发挥最大效应,减少用量以减轻其毒副作用。另外可增加多巴胺的释放,促进多巴胺的转运,提高多巴胺的利用率以减少自由基的产生,减轻体内抗氧化系统的压力,减少残存神经元的变性,达到有效的远期治疗效果^[9]。实验中我们发现,除了 VMAT2 mRNA 在中止给药+中药干预组中有较高的表达,甚至超出了正常大鼠的表达水平之外,其他 3 组的 VMAT2 mRNA 表达量与正常对照组相比均有明显下降。但较之模型组,中药干预组的 VMAT2 mRNA 表达也有明显提高。VMAT2 mRNA 检测的是与检测 DAT mRNA 相同的黑质纹状体区域。相比较之下,我们可以看出,在同样等级数的黑质纹状体多巴胺能神经元中,中止给药+中药干预组 VMAT2 mRNA 的表达比例较之 DAT mRNA 远远升高,中药干预组的 VMAT2 mRNA 表达比例与 DAT mRNA 的差异也很明显。从这一结果我们可以推测,中药有促进黑质多巴胺能神经元表达 VMAT2 的作用。这可以有效地缓解游离 DA 在胞体中的含量,恢复多巴胺能神经元末梢储存与释放多巴胺的能力即缓冲能力,从而缓解异动症症状。

滋肾平颤颗粒是已故上海市名老中医胡建华教授基于中医理论,并参考民间验方及中医文献,经过数十年临床反

复摸索与验证,提炼出治疗帕金森病的经验总结方。胡教授认为,帕金森病的病变部位主要在肝、脾、肾,且以肝、肾为中心,病机为本虚标实。“虚”则指肝肾亏损,脏腑功能失调;“实”则指风、火、痰、瘀互结,蕴塞脑窍。治疗当以滋补肝肾、通络解毒为基本方法。本方标本兼治,重用熟地、枸杞、桑寄生滋补肝肾,治“风”之由,再用白芍养肝柔肝、熄风止痉,天麻平肝熄风,僵蚕、全蝎、蜈蚣搜风剔络,天南星化痰制痉,莪术破血除瘀。

本实验结果表明,中药可以有效缓解异动症症状,上调 DAT 尤其是 VMAT2 基因的表达,促进神经元中突触囊泡转运或转运体在膜上表达的功能,具有神经保护作用。DAT 功能的改善有利于多巴胺的再吸收利用;保护 VMAT2 的功能有利于多巴胺的储存和再释放,使多巴胺神经元得到保护,从而可能提高 DA 利用率,起到治疗 PD 的作用。

5 参考文献

- [1] 巴茂文,刘振国,孔敏,等.左旋多巴诱发帕金森病大鼠异动症模型的建立和评价.上海交通大学学报(医学版),2006,26(7):810
- [2] 包新民,舒思云.大鼠脑立体定位图谱.北京:人民卫生出版社,1991:53
- [3] Carman LS,Gage GH,Shults CW.Partiallesion of the substantia nigra:relation between extent of lesion and rotational behavior. Brain Res,1991,553(2):275
- [4] 曹学兵,孙圣刚,徐岩,等.左旋多巴治疗帕金森病诱发异动症的实验研究.中华医学杂志,2004,84(6):505
- [5] 张克忠,蒋雨平,徐星.Lactacystin 对大鼠纹状体 DAT 和 VMAT2 蛋白表达的影响.中国临床神经科学,2007,15(2):143
- [6] Counihan TJ,Penney JB.Regional dopamine transporter gene expression in the substantia from control and Parkinson's disease brains. J Neur Neurosurg Psychiatry,1998,65(2):164
- [7] Vermeulen RJ,Wolters EC,Tissingh G et al.Evaluation of [123I] beta -CIT binding with SPECT in controls,early and late Parkinson's disease.Nucl Med Biol,1995,22(8):985
- [8] Miller GW,Erickson JD,Perez JT,et al.Immunohistochemical analysis of vesicular monoamine transporter protein in Parkinson's disease. Experimental Neurology,1999,156(1):138
- [9] 顾兵,张颖冬,胡刚.帕金森病与 II 型囊泡单胺转运体的相关性.中国临床康复,2004,8(1):133

第一作者:叶青(1982-),男,博士研究生,主治医师,研究方向:中西医结合治疗帕金森病。

通讯作者:袁灿兴,ycanxing@hotmail.com

收稿日期:2013-12-23

编辑:吴宁



编辑部现有《江苏中医药》1990~2012 年期间各年度的合订本,价格分别为 90 元/本(1990~2008 年)和 114 元/本(2009~2012 年),邮购另加邮资 23 元/本。欢迎选购。地址:南京市汉中路 282 号,邮编:210029,电话:025-86612950。

《江苏中医药》编辑部