

天麻钩藤饮对帕金森病模型大鼠行为学及纹状体内多巴胺含量的影响

张立娟¹ 张倩¹ 王康锋¹ 李思毅² 杨洁¹ 王庆庆¹ 彭伟¹

(1.山东中医药大学附属医院,山东济南250014; 2.陕西中医药大学针灸推拿学院,陕西西安710000)

摘要 目的:观察天麻钩藤饮对帕金森病(PD)模型大鼠行为学及纹状体内多巴胺含量的影响。方法:采用6-羟基多巴胺(6-OHDA)注射法建立PD大鼠模型,造模成功的大鼠随机分为模型组、天麻钩藤饮高剂量组、天麻钩藤饮低剂量组和西药组,同时设立假手术组。天麻钩藤饮低、高剂量组分别予天麻钩藤饮11.88g/(kg·d)、47.52g/(kg·d)灌胃,西药组予美多芭75mg/(kg·d)灌胃,假手术组、模型组灌胃等量生理盐水,连续干预8周。治疗前后采用旋转试验、悬挂试验检测大鼠行为学,治疗后采用酶联免疫吸附试验(ELISA法)测定纹状体中多巴胺(DA)含量。结果:行为学检测提示,治疗后天麻钩藤饮高、低剂量组和西药组悬挂试验得分均明显高于模型组($P<0.01$),其中天麻钩藤饮高剂量组得分最高,与低剂量组、西药组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),天麻钩藤饮低剂量组与西药组比较差异无统计学意义($P>0.05$);治疗后天麻钩藤饮高、低剂量组和西药组旋转圈数均明显低于模型组($P<0.01$),其中高剂量组旋转圈数最少,与低剂量组、西药组比较差异有统计学意义($P<0.01$),低剂量组与西药组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后天麻钩藤饮高、低剂量组和西药组DA含量较模型组明显升高($P<0.01$),其中高剂量组DA含量升高最明显,与低剂量组、西药组比较差异有统计学意义($P<0.05$),低剂量组与西药组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:天麻钩藤饮可明显改善PD大鼠行为学症状,其取效机制可能与促进PD大鼠内源性多巴胺分泌,有效改善PD大鼠脑内微环境和神经元代谢有关。

关键词 天麻钩藤饮 帕金森病 行为学 多巴胺 大鼠 实验研究

中图分类号 R742.505 文献标志码 A 文章编号 1672-397X(2018)02-0079-04

基金项目 山东省中医药科技发展计划项目(2017-037);国家自然科学基金青年科学基金项目(81303028);国家中医药管理局中医药重点学科建设专项科研课题(中医脑病学)

帕金森病(Parkinson's disease, PD),又称震颤麻痹,是一种严重危害老年人健康的神经退行性疾病,主要临床表现有静止性震颤、肌强直、运动迟缓及自主神经症状等。该病多见于中老年人,在年龄大于65岁的人群中发病率大约为1%~3%,仅次于阿尔茨海默病^[1]。据统计,我国目前PD患者已经超过百万,预计到2030年我国PD患者人数将达到500万^[2],这必然给家庭和社会带来沉重负担。遗憾的是,PD的发病机制仍未完全阐明,目前依然没有有效根治方法,现有的临床治疗方法只能缓解症状,却不能阻止或逆转疾病进程。近年来我们在临床上应用天麻钩藤饮治疗PD取得满意疗效,但其取效机制仍不明确。本研究以6-羟基多巴胺(6-OHDA)致PD模型大鼠为研究对象,从行为学和神经递质角度探讨天麻钩藤饮对PD的治疗作用及其机理,以期为临床应用提供实验依据。

1 实验材料

1.1 动物 SD大鼠65只,雄性,SPF级,200~220g,由山东省实验动物中心提供,实验动物许可证号:CSXK(鲁)20140007。

1.2 仪器 多功能脑立体定位仪:Stoelting,美国;低温离心机:型号为MICROMAX RF, Thermo IEC(美国);高速离心机:型号为1-13, SIGMA(德国);5 μ L微量进样器,产自上海安亭微量进样器厂。

1.3 药物 美多芭(多巴丝肼片):上海罗氏制药有限公司,生产批号H10930198;天麻钩藤饮:天麻9g,钩藤12g,石决明18g,栀子9g,黄芩9g,川牛膝12g,杜仲9g,桑寄生9g,夜交藤9g,茯神9g,益母草9g,药材煎煮2次合并滤液并浓缩。

1.4 试剂 6-羟基多巴胺(6-Hydroxydopamine, 6-OHDA)、阿扑吗啡(APO),均为Sigma公司产品;ELISA试剂盒:大鼠多巴胺(Dopamine, DA),批号

201611, 联科生物技术有限公司。

2 实验方法

2.1 造模 术前按常规对大鼠进行行为学测试, 确认无异常旋转行为后, 3%戊巴比妥钠 (50mg/kg) 腹腔注射麻醉。参照文献方法, 将大鼠固定在脑立体定位仪上, 剪去颅顶的鼠毛, 用碘伏常规消毒, 沿正中中线切开大鼠颅顶皮肤, 剥离骨膜, 暴露前后凶^[3]。纯双氧水擦拭颅骨表面, 以前凶为准, 根据《大鼠脑立体定位图谱》^[4], 确定右侧黑质二坐标: (1) 前凶后 5.2mm, 正中右侧 1.0mm, 硬膜下 9.0mm; (2) 前凶后 5.2mm, 正中右侧 2.5mm, 硬膜下 8.5mm。用牙科钻于手术部位小心钻开颅骨, 用 5 μ L 微量进样器将 6-OHDA (溶于含 0.02% 抗坏血酸的生理盐水中, 浓度为 2 μ g/ μ L) 溶液注入右侧黑质部 (以 1.0mm/min 速度缓慢进针), 每孔 3 μ L, 注射速度为 1 μ L/min, 注射完毕后留针 5min, 然后以 1.0mm/min 速度缓慢退针。手术完成后, 用医用明胶海绵堵塞颅骨孔, 缝合皮肤切口, 肌肉注射庆大霉素 (20 万单位/只, 共 7d), 待动物清醒后放回笼中饲养。假手术组只注射含 0.02% 抗坏血酸的等量生理盐水, 其余处理同造模组。造模手术 10d 以后, 腹腔注射阿扑吗啡 (APO) 0.5mg/kg 诱发大鼠向健侧旋转, 记录开始旋转至 30min 内的旋转圈数, 以旋转圈数平均每分钟超过 7 次者为合格的 PD 模型^[5]。

2.2 分组与给药 造模成功后, 通过随机数字表法将 PD 模型大鼠随机分为模型组、天麻钩藤饮高剂量组、天麻钩藤饮低剂量组和西药组, 另设假手术组, 共 5 组。天麻钩藤饮低、高剂量组分别予天麻钩藤饮 11.88g/(kg·d)、47.52g/(kg·d) 灌胃, 分别相当于临床人日用量的 6.25、25 倍量; 西药组予美多芭 75g/(kg·d) 灌胃; 模型组、假手术组予等量生理盐水灌胃。共干预 8 周。

2.3 检测指标

2.3.1 行为学测试 行为学测试包括悬挂试验和震颤麻痹评分。于治疗前后分别进行。

悬挂试验 (参照 Kuribara 法改良)^[6]: 该试验目的是检测大鼠肢体运动的协调情况。将大鼠两前爪悬挂于水平固定的金属杆上, 金属杆直径 1.5mm, 距离地面 70cm, 记录大鼠悬挂时间, 仅一爪抓住绳子属失败。根据悬挂实际进行评分: 0~4s 评 0 分; 5~9s 评 1 分; 10~14s 评 2 分; 15~19s 评 3 分; 20~24s 评 4 分; 25~29s 评 5 分; 超过 30s 评 6 分。每隔 5min 测 1 次, 共测 3 次, 取平均值进行统计学分析。

APO 诱导的旋转试验^[7]: 大鼠腹腔内注射 APO (0.5mg/kg), 10min 后观察并记录大鼠的旋转行

为, 表现为以对侧的前肢或后肢为支撑点, 头尾相接, 身体弯曲成环状向损伤对侧旋转, 共记录 30min。

2.3.2 纹状体内 DA 含量检测 实验结束后处死大鼠, 取脑, 剥离纹状体, 存放于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。酶联免疫吸附试验 (ELISA 法) 测定纹状体中 DA 含量, 具体方法参考试剂盒说明书进行。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 实验动物数量分析 假手术组大鼠均全部存活。其余 55 只大鼠在 6-OHDA 注射过程中死亡 5 只, 术后 10d 存活 48 只。腹腔注射阿扑吗啡诱发大鼠向健侧旋转, 从开始旋转至 30min 内的旋转圈数平均每分钟超过 7 次者共 42 只, 采用随机数字表法选取 40 只成功模型, 分为模型组、天麻钩藤饮高剂量组、天麻钩藤饮低剂量组和西药组, 最终纳入结果分析的大鼠 50 只, 每组 10 只。

3.2 行为学测试结果

3.2.1 悬挂试验结果 见表 1。治疗前模型组、天麻钩藤饮高剂量组、天麻钩藤饮低剂量组和西药组得分均明显低于假手术组 ($P < 0.01$), 模型组、天麻钩藤饮高剂量组、天麻钩藤饮低剂量组和西药组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗后天麻钩藤饮高、低剂量组和西药组得分均显著高于模型组 ($P < 0.01$), 其中天麻钩藤饮高剂量组得分最高, 与低剂量组、西药组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 低剂量组与西药组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠悬挂试验得分情况比较 ($\bar{x} \pm s$) 分

组别	动物数 (只)	治疗前	治疗后
假手术组	10	5.50 \pm 0.77	5.90 \pm 0.32
模型组	10	1.30 \pm 1.06**	1.00 \pm 0.94
天麻钩藤饮高剂量组	10	1.40 \pm 1.17**	4.50 \pm 1.08## \blacktriangle
天麻钩藤饮低剂量组	10	1.60 \pm 1.27**	3.30 \pm 1.34##
西药组	10	1.5 \pm 1.27**	3.30 \pm 1.89##

注: **与同时期假手术组比较, $P < 0.01$; ##与同时期模型组比较, $P < 0.01$; \blacktriangle 与同时期天麻钩藤饮低剂量组、西药组比较, $P < 0.05$ 。

3.2.2 旋转试验结果 见表 2。治疗前模型组、天麻钩藤饮高剂量组、天麻钩藤饮低剂量组和西药组大鼠旋转圈数组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 治疗后天麻钩藤饮高、低剂量组和西药组旋转圈数

均明显低于模型组 ($P<0.01$), 其中天麻钩藤饮高剂量组旋转圈数最少, 与低剂量组、西药组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$), 低剂量组与西药组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表2 各组大鼠30min旋转圈数比较 ($\bar{x} \pm s$) 圈

组别	动物数(只)	治疗前	治疗后
假手术组	10	0	0
模型组	10	253.18 ± 18.09	256.40 ± 13.43**
天麻钩藤饮高剂量组	10	257.20 ± 18.47	148.10 ± 15.15***▲▲
天麻钩藤饮低剂量组	10	246.60 ± 12.92	186.20 ± 12.94***
西药组	10	249.10 ± 18.29	175.90 ± 14.72***

注: **与同时期假手术组比较, $P<0.01$; ##与同时期模型组比较, $P<0.01$; ▲▲与同时期天麻钩藤饮低剂量组、西药组比较, $P<0.01$ 。

3.3 各组大鼠治疗后纹状体内DA含量比较 见表3。模型组、天麻钩藤饮高剂量组、天麻钩藤饮低剂量组和西药组大鼠DA含量均明显低于假手术组 ($P<0.01$), 治疗后天麻钩藤饮高、低剂量组和西药组DA含量较模型组显著升高 ($P<0.01$), 其中天麻钩藤饮高剂量组DA含量升高最明显, 与低剂量组、西药组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 低剂量组与西药组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表3 各组大鼠治疗后纹状体内DA含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	DA含量(pg/mL)
假手术组	10	56.50 ± 9.35
模型组	10	33.45 ± 5.77**
天麻钩藤饮高剂量组	10	49.27 ± 6.87***▲
天麻钩藤饮低剂量组	10	41.34 ± 5.55***
西药组	10	42.75 ± 5.21***

注: **与同时期假手术组比较, $P<0.01$; ##与同时期模型组比较, $P<0.01$; ▲与同时期天麻钩藤饮低剂量组、西药组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

帕金森病是一种临床常见的中枢神经系统退行性疾病, 受损部位位于黑质纹状体, 该病主要病理特征为中脑黑质致密部多巴胺能神经细胞渐进性减少和神经元内出现路易小体(LB)^[8]。目前, 国际神经科学界一致认为PD治疗的理想目标是控制症状, 提高患者生存质量, 延缓病程进展, 延长控制症状药物使用的年限, 以及减少药物的不良反应和并发症^[9]。近年来中医药治疗PD在临床上取得了满意疗效, 越来越受到临床医生的重视, 具有重要的研究意义。

帕金森病属于中医“颤证”范畴, 病因多为年老体虚, 肝肾亏损, 肝风内动, 气血阴阳亏虚, 筋脉失

养, 治疗当以补肾平肝息风为法。而天麻钩藤饮具有平肝息风、补益肝肾之效, 切中病机, 为临床治疗PD的常用方剂。现代药理研究发现, 天麻的有效成分主要是天麻素和天麻昔元, 有临床研究证实天麻素能够使PD合并轻度认知功能损害患者的认知功能明显改善, 尤其在视空间与执行、语言流畅及延迟记忆等方面改善明显^[10]。动物实验表明, 天麻素可以抑制多巴胺代谢率, 使多巴胺含量升高, 并对多巴胺能神经元的形态及功能有保护作用, 减慢多巴胺神经元的代谢速度进而减少多巴胺的自身氧化, 提高多巴胺神经元摄取中的酪氨酸和胞质内酪氨酸羟化酶(TH)、多巴胺脱氢酶(DDC)的活性, 促进多巴胺生成, 以对抗多巴胺神经元死亡造成的多巴胺含量下降^[11-12]。本研究结果发现: 天麻钩藤饮可以改善PD大鼠行为学症状, 延长PD大鼠悬挂时间, 减少阿扑吗啡诱导的旋转圈数, 其中高剂量组疗效最明显, 低剂量组与西药组疗效相当; 干预8周后, 天麻钩藤饮高剂量组大鼠纹状体DA含量明显升高, 与低剂量组、西药组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 低剂量组与西药组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。由此我们推测, 天麻钩藤饮治疗帕金森病的取效机制可能与促进PD大鼠内源性多巴胺分泌, 有效改善PD大鼠脑内微环境和神经元代谢有关。

综上所述, 天麻钩藤饮可以明显改善PD大鼠行为学症状, 提高黑质纹状体内多巴胺含量, 如果将其用于轻度或早期帕金森患者, 可推迟临床使用西药, 减少西药用量或缩短疗程, 从而减少西药治疗的不良反应, 值得进一步推广。本次实验还未涉及单胺类神经递质相关代谢指标的具体起效时间、起效通路以及相关蛋白、基因等指标, 还有很多内容需要探索及深入研究, 以期为临床应用天麻钩藤饮治疗PD提供更加明确的科学依据。

参考文献

- [1] PAN-MONTOJO F, ANICHTCHIK O, DENING Y, et al. Progression of Parkinson's Disease Pathology Is Reproduced by Intragastric Administration of Rotenone in Mice[J]. PLoS ONE, 2010, 5 (1): e8762.
- [2] DORSEY E R, CONSTANTINESCU R, THOMPSON J P, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030[J]. Neurology, 2007, 68 (5): 384.
- [3] 冉秋, 何建成. 一体化病证结合帕金森病大鼠模型中医证候属性研究[J]. 中国实验动物学报, 2011, 19 (6): 466.
- [4] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 50.

针灸治疗癫痫的作用机理研究概况

吴立群 邹小秋 李荣蓉 谢 丹 李可欣 汤顺莉 易 玮

(广州中医药大学, 广东广州 510405)

摘 要 临床上针灸治疗癫痫具有较好的疗效,也开展了大量的实验研究,取得了较大的进展。针灸对脑电活动、脑神经细胞、细胞因子、钙离子、一氧化氮、神经递质等多方面均有一定影响。目前针灸治疗癫痫的机制研究以动物实验为主,其选穴较局限,目前对百会、大椎的选穴频率较高,研究较为集中,缺少突破性的穴位观察及辨证选穴、随症加减的整体调节作用的研究,难以进行有效比较。为进一步研究本病,应制定统一的中医辨证分型标准,应用循证医学的方法进行合理的科研设计,这是提高研究科学性、可靠性的前提条件。

关键词 针灸疗法 癫痫 综述 实验研究

中图分类号 R742.105 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2018)02-0082-04

癫痫(epilepsy)是由多种原因导致的脑部神经元高度同步化异常放电的临床综合征,临床表现具有发作性、短暂性、重复性和刻板性的特点。癫痫状态若不及时治疗可因高热、循环衰竭、电解质紊乱或神经元兴奋毒性损害导致永久性脑损害,甚至死亡,必要时需按急症方式处理。针灸作为中医特色的疗法之一,在急救中具有一定的作用,对于本病的治疗也有较好效果。近年来,开展了大量的针灸抗癫痫的动物实验,研究其发病机制和作用途径,并取得了突破性的进展,进一步为临床上针灸治疗癫痫提供了确切的实验依据,并得到现代医学

理论的支持。现将针灸治疗癫痫作用机制的实验研究进展概述如下。

1 针灸对脑电活动的影响

癫痫的病因复杂,发病机理也不尽相同,但大量神经元反复发作的异常同步放电却是其细胞水平的基本特点之一^[1]。癫痫的发作期均存在脑电图的改变,因此脑电图对癫痫的诊断、指导用药和预后评价都有着重要作用。何伟等^[2]探讨了电针耳甲对癫痫大鼠的抑制效应及机制。结果表明电针耳甲、大椎穴都能改善癫痫大鼠的行为学表现,且电针耳甲效果优于电针大椎穴的效果;电针耳甲预处理也具有

- [5] CARMAN L S, GAGE F H, SHULTS C W. Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior[J]. Brain Res, 1991, 553 (2): 278.
- [6] KURIBARA H, HIGUCHI Y, TADOKORO S. Effects of central depressants on rota-rod and traction performances in mice[J]. Jpn J Pharmacol, 1977, 27 (1): 121.
- [7] 李晓明, 张丽华, 蔡艳秋, 等. 镇肝熄风汤对帕金森病肝阳上亢证大鼠旋转行为的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18 (12): 2138.
- [8] ALI S F, BINIENDA Z K, IMAM S Z. Molecular aspects of dopaminergic neurodegeneration: gene-environment interaction in parkin dysfunction[J]. Int J Environ Res Public Health, 2011, 8 (12): 4702.
- [9] 陆征宇, 赵虹, 汪涛, 等. 针刺对帕金森病小鼠行为学及纹状体神经元凋亡的影响[J]. 针刺研究, 2012, 37 (3): 189.
- [10] 徐德洲, 冯为菊, 李玉梅, 等. 天麻素对帕金森病合并轻度

认知功能损害患者的认知和运动功能影响[J]. 环球中医药, 2013, 6 (S1): 63.

- [11] 王维扬, 黄怀宇. 天麻素治疗帕金森病大鼠的实验研究[J]. 实用老年医学, 2013, 27 (5): 404.

- [12] HEMANT K, IN-SU K, SANDEEP V M, et al. Gastrodin protects apoptotic dopaminergic neurons in a toxin-induced Parkinson's disease model[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013 (3): 10.

第一作者: 张立娟(1981—), 女, 医学博士, 主治医师, 主要从事针灸治疗老年病的基础与临床研究。

通讯作者: 彭伟, 医学硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师。pengwei0625@163.com

收稿日期: 2017-08-18

编辑: 吴 宁