

补肾活血颗粒对帕金森大鼠脑腺苷 A2A 受体影响的研究

郭云霞 李绍旦 刘毅 杨明会

【摘要】 目的 探讨补肾活血颗粒治疗帕金森病的作用机制。**方法** 用 6-羟基多巴损毁脑右侧内侧前脑束的方法建立帕金森大鼠模型。将 33 只 SD 模型大鼠随机分为治疗组 18 只和对照组 15 只,另设正常组 15 只,治疗组以中药补肾活血颗粒灌胃每日 1 次,连续 8 周。对照组及正常组同法以生理盐水灌胃 8 周,灌胃结束,观察帕金森大鼠旋转行为变化,后断头取脑,免疫荧光法观察大鼠脑腺苷 A2A 受体变化。**结果** 治疗组大鼠旋转行为较对照组改善,治疗组大鼠脑纹状体 A2A 受体表达较对照组明显减弱 ($P < 0.01$),模型组比正常组表达显著增强 ($P < 0.01$)。三组大鼠黑质中 A2A 受体均无表达。**结论** 补肾活血颗粒能改善帕金森大鼠旋转行为,抑制大鼠纹状体腺苷 A2A 受体表达,对帕金森病治疗起到较好疗效。

【关键词】 补肾活血颗粒; 帕金森模型大鼠; 腺苷 A2A 受体

【中图分类号】 R742.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.03.002

Effect of Bushen Huoxue Granule (BSHXG) on adenosine A2A receptor in brain of Parkinsons disease (PD) rats GUO Yun-xia, LI Shao-dan, LIU Yi, et al. Department of Traditional Chinese Medicine, PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: YANG Ming-hui, E-mail: ymh9651@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of treating Parkinson's disease (PD) with Bushen Huoxue Granule (BSHXG). **Methods** Establishing rat model of PD with 6-hydroxydopamine lesion as medial forebrain bundle the right side of the brain of. 33 PD rats modes were randomly divided into treatment group 18 (BSHXG group) and control group 15. Additionally other 15 SD rats were selected in normal group. BSHXG was applied for treatment group once daily for 8 weeks. Physiologic saline was applied for control group and normal group in the same way. Gavage end, observed changes in the rotational behavior of PD rats. After decapitated, Immunofluorescence was used to observe the changes of adenosine A2A receptor in rat brain. **Results** Rotational behavior of rats in the treatment group was much better improved than in the control group. A2A receptor expression in the treatment group compared with the control group was significantly decreased ($P < 0.01$). A2A receptor expression in the model group was significantly increased than the normal group ($P < 0.01$). A2A receptor were not expression in three groups of rats substantia nigra. **Conclusion** BSHXG can improve the rotational behavior of PD rats, inhibit adenosine A2A receptor expression in PD rat striatum, and has a significant therapeutic effect on the treatment of Parkinson's disease.

【Key words】 Bushen Huoxue Granule (BSHXG); Parkinson's disease rats; Adenosine A2A receptor

基金项目:国家自然科学基金(81273969)

作者单位:100853 北京,解放军医学院[郭云霞(博士研究生)];解放军总医院中医科(郭云霞、李绍旦、刘毅、杨明会)

作者简介:郭云霞(1976-),女,2011 级在读博士研究生。研究方向:中西医结合老年病。E-mail: guoyx1999@sina.com

通讯作者:杨明会(1962-),博士,教授,主任医师,博士生导师。中华中医药学会副会长,中国人民解放军中医药学会会长。研究方向:老年病中医研究。E-mail: ymh9651@yahoo.com.cn

帕金森病 (parkinsons disease, PD) 是中老年常见的慢性神经系统退行性疾病,其特征是中脑黑质致密部多巴胺能神经元变性丢失,纹状体多巴胺水平下降,发病机制尚不明确。主要治疗药物为左旋多巴制剂,长期应用后存在药效下降或失效,出现不同程度的副作用。中药在 PD 治疗上有一定优势,补肾活血颗粒是杨明会教授多年临床经验总结方,课题组通过制作帕金森大鼠动物模型,给予补肾活血颗粒干预后,观察帕金森大鼠旋转行为及大鼠脑腺苷 A2A 受体变化,探讨补肾活血颗粒治疗帕金森病的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 Sprague-Dawle (SD) 雄性大鼠 80 只,体重 190 ~ 210g 左右,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2012-0001。

1.2 药物与试剂

补肾活血颗粒由山茱萸 20 g、肉苁蓉 10 g、何首乌 15 g、川芎 10 g、当归 10 g、丹参 15 g、蜈蚣 2 条等组成,解放军总医院、全军中医研究所统一制成中药颗粒冲剂,规格为一袋 8 g,产品批号 100101。

6% 水合氯醛 (北京化学试剂公司),6-羟多巴 (6-OHDA) (美国 sigma 公司),阿朴吗啡 (沈阳第一制药厂)。

1.3 仪器

大鼠脑立体定位仪 (美国 KOPF 公司),帕金森动物旋转检测仪 (美国 columbus instruments 公司) 微量注射泵,牙科钻,外科手术器械,电子天平,超净工作台。

1.4 模型制备

80 只大鼠随机分为 2 组,模型组 65 只,正常组 15 只,模型组随机分为造模组 50 只,假手术组 15 只,适应环境、正常饲养 2 周,行为学测试无旋转行为后造模。术前 12 小时禁食,按照动物使用的 3R 原则^[1] 予人道关怀,称重,6% 水合氯醛 (350 mg/kg) 腹腔内注射,麻醉后,俯卧位固定于脑立体定位仪上,头部消毒,沿正中矢状线暴露颅骨,调整门齿杆,使前后囟位于同一水平面上,按照包氏大鼠立体定位图谱^[2] 定位右侧内侧前脑束 (MFB),于前囟后 4.3 mm,矢状线右旁开 1.5 mm,进针深度 7.6 mm,牙科钻钻透颅骨,微量注射泵吸取 6-hydroxydopamine (6-OHDA) 8 μ l,注射速度为 1 μ l/min,每次

注射后留针 5 分钟,缓慢出针,缝合头皮。假手术组以等量生理盐水进行上述操作,正常组不做任何处理。

术后 2 周进行旋转行为测试,给大鼠穿上束缚套后置于旋转检测仪中适应 5 分钟,大鼠安静后皮下注射阿朴吗啡 (0.5 mg/kg),5 分钟后由旋转检测仪统一记录旋转次数,设定记录时间为 30 分钟。如大鼠恒定转向左侧,如旋转数 > 210 转/30 分,则为成功的帕金森大鼠模型。

1.5 模型分组与给药

造模成功 33 只帕金森大鼠随机分为治疗组 (补肾活血颗粒) 18 只、对照组 15 只,同设正常组 15 只,按照大鼠与人的药物剂量换算公式,大鼠每公斤体重给药量按成人 (60 kg) 每公斤剂量的 10 倍计算^[3] 溶于生理盐水中,灌胃法给药,给药时间上午 9:00 ~ 10:00,每天一次,每周称重一次,调整给药量,连续 8 周,对照组、正常组同样方法给予等量生理盐水灌胃。

1.6 取材及处理

将模型组及正常大鼠迅速断头取脑,将脑组织平放入放有锡纸的托盘中,托盘平放到液氮表面,将组织迅速冷冻,取出组织放至置于 -80℃ 冰箱保存,冰冻切片机中切片,厚度约 10 μ m,冰冻切片丙酮固定 2 分钟,磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 洗 3 次,每次 5 分钟。含 5% 羊血清的抗体稀释液在 37℃ 封闭 30 分钟。弃液不洗,按 1/100 比例加入一抗,4℃ 过夜。PBS 洗 3 次,每次 5 分钟,加入荧光标记的羊抗兔二抗,室温反应 1 小时。PBS 洗 3 次,每次 5 分钟。DAPI 复染细胞核。PBS 洗 3 次,每次 3 分钟。甘油封片。显微镜观察并照相。

1.7 观测指标

旋转行为测试:灌胃结束后进行,方法同造模中旋转行为测试。

腺苷 A2A 受体表达:阳性细胞数及荧光表达,纹状体部位取 5 张切片,在 200 倍电镜视野下计数 100 个细胞中阳性细胞数,把不同部位视野内的细胞数相加后取平均数,就是每张切片的阳性细胞数。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件包。计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述,两样本间比较采用独立样本 t 检验,组间差异用单因素重复测量方差分析 (one-way-ANOVA)。

2 结果

2.1 旋转行为测试

治疗后治疗组大鼠旋转次数与治疗前比较明显下降($P < 0.01$),治疗后对照组大鼠旋转次数与治疗前比较无明显变化($P > 0.05$),治疗后治疗组大鼠旋转次数较对照组明显下降($P < 0.01$),见表 1。

表 1 两组帕金森大鼠治疗前后转数($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前转数	治疗后转数
治疗组	18	273.00 \pm 44.61	199.11 \pm 27.16 ^{ab}
对照组	15	277.53 \pm 44.28	275.73 \pm 45.47

注:与治疗前比较,^a $P < 0.01$;与对照组比较,^b $P < 0.01$

2.2 大鼠脑纹状体腺苷 A2A 受体阳性细胞数

治疗组及对照组大鼠脑纹状体腺苷 A2A 受体阳性细胞均较正常组升高($P < 0.01$),治疗后治疗组大鼠纹状体腺苷 A2A 受体阳性细胞数较对照组明显减少($P < 0.01$),见表 2。

表 2 纹状体腺苷 A2A 受体阳性细胞数($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	大鼠脑纹状体 A2A 受体阳性细胞数
正常组	15	4.80 \pm 1.66
治疗组	18	9.72 \pm 1.41 ^{ab}
对照组	15	14.47 \pm 1.81 ^a

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与对照组比较,^b $P < 0.01$

2.3 大鼠脑纹状体腺苷 A2A 受体表达免疫荧光图像

免疫荧光结果显示在大鼠脑纹状体部位,腺苷 A2A 受体在电镜下观察其染色呈红色,主要表达于细胞核。正常组大鼠脑纹状体腺苷 A2A 受体阳性细胞数目偏少、染色偏淡,见图 1;对照组大鼠脑纹状体腺苷 A2A 受体阳性细胞数目偏多、染色深,见图 2;对照组大鼠脑纹状体腺苷 A2A 受体阳性细胞数目居于正常组与对照组之间,见图 3。

3 讨论

帕金森病发病机制至今尚不明确,为了更好研究其发病机制,研发有效治疗药物,观察药物的安全性及有效性,需要建立能够模拟人类帕金森病的动物模型。其中 6-羟多巴损毁法(将 6-羟多巴局部定向注射到黑质或纹状体等部位,损伤黑质纹状体

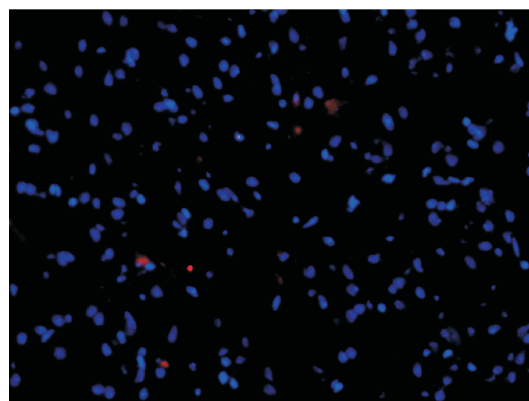


图 1 正常大鼠脑纹状体腺苷 A2A 受体表达图像
(电镜, $\times 20$)

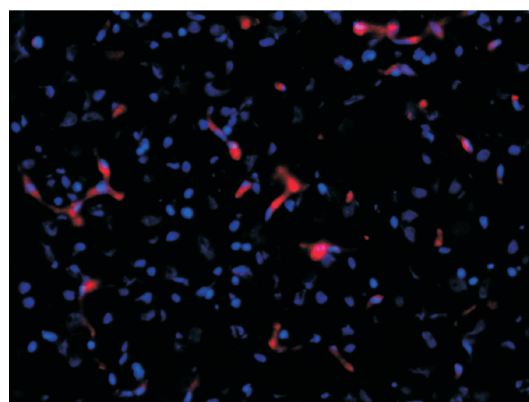


图 2 对照组大鼠脑纹状体腺苷 A2A 受体表达图像
(电镜, $\times 20$)

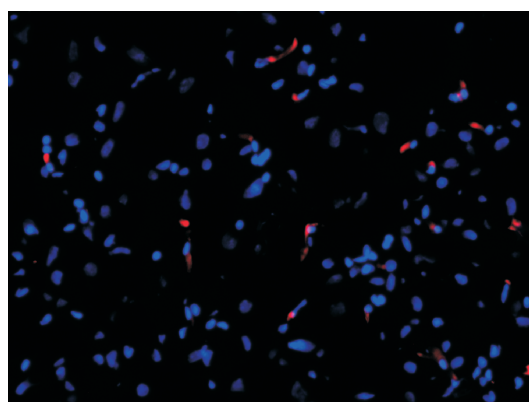


图 3 治疗组大鼠脑纹状体腺苷 A2A 受体表达图像
(电镜, $\times 20$)

多巴胺能神经元通路)制备帕金森病大鼠模型,在病理和生理及行为学上与人类帕金森病有许多相似之处,且经济、方便、成功率高、稳定可靠,能够将多巴胺受体激动剂(阿扑吗啡)诱导的旋转行为进

行量化而被广泛应用。

帕金森病属于中医“颤证”范畴,其病机在古籍文献中最早见于《黄帝内经》“诸风掉眩皆属于肝”,金元之前多数医家认为是“外风”为患,之后众多医家多以“内风”立论,明清后认为风、火、痰、瘀是主要病因,与肝、脾、肾等脏腑,尤其是肝密切相关。现代多数医家认为肝肾亏虚,气血不足为本,风火痰瘀为标,为本虚标实之证。杨明会教授在多年的临床经验基础上提出 PD 的肾虚血瘀之说,以补肾活血法治疗 PD,经反复优化筛选创建的中药复方补肾活血颗粒,由山茱萸、肉苁蓉、何首乌、川芎、当归、丹参、蜈蚣等组成,山茱萸、肉苁蓉、何首乌有补肾健脑之效,川芎、当归、丹参具有养血活血通络之功,蜈蚣其走窜之力最速,内达脏腑,外至经络,凡气血凝聚之处皆能开之,全方标本兼治,共奏补肾活血之功。

腺苷是内源性嘌呤核苷,目前已知 4 种腺苷受体(A1、A2A、A2B、A3),属 G 蛋白偶联受体家族^[4]。中枢神经系统中在纹状体含量最丰富,其它区域表达水平很低^[5]。腺苷 A2A 受体与多巴胺 D2 受体共同表达于纹状体—苍白球的中间棘状神经元^[6],伏隔核的核心区及嗅结节^[7],两者形成异源二聚体和/或异源低聚体,此二聚体可降低多巴胺 D2 受体的活性,阻断多巴胺 D2 受体与 G 蛋白偶联,在第二信使水平二者互相拮抗^[8]。纹状体中传出神经元至少受 γ -氨基丁酸和乙酰胆碱两种神经递质控制,这些神经递质同时又受 A2A 受体的调节。A2A 受体可以刺激纹状体神经元中乙酰胆碱的释放。阻断腺苷 A2A 受体,可使多巴胺 D2 受体活性增加,调节纹状体内 γ -氨基丁酸能神经元、抑制乙酰胆碱和兴奋性氨基酸,起到治疗 PD 的作用。腺苷 A2A 受体拮抗剂作为非多巴胺靶点已发展成为治疗 PD 的热点^[9]。

实验中采用旋转检测仪记录大鼠旋转次数,采用免疫荧光法大鼠脑纹状体及黑质腺苷 A2A 受体表达,结果发现应用补肾活血颗粒干预后,治疗组大鼠旋转行为与治疗前相比明显改善,模型组大鼠无明显变化,提示补肾活血颗粒可以改善 PD 模型

大鼠旋转行为。腺苷 A2A 受体在帕金森大鼠脑纹状体有广泛表达,而在黑质中无表达,与既往文献报道一致^[5]。腺苷 A2A 受体在电镜下染色呈红色,正常大鼠脑纹状体腺苷 A2A 受体表达较帕金森模型大鼠减弱,治疗组与对照组比较表达又减弱,说明应用补肾活血颗粒干预后帕金森大鼠脑纹状体中腺苷 A2A 受体表达减弱,课题组推测补肾活血颗粒治疗帕金森病的作用机制可能与抑制腺苷 A2A 受体表达有关,抑制腺苷 A2A 受体表达、间接升高多巴胺 D2 受体的活性,起到了多巴胺受体保护的作用。

参 考 文 献

- [1] Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique[M] . London: Methuen, 1959.
- [2] 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,1991:49-59.
- [3] 施新猷. 医学动物实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1986:11.
- [4] ChuYY, TuKH, Lee YC, et al. Characterization of the ratA2a adenosine receptor gene . DNA Cell [J]. Bio,1996,15 (4) : 329-337.
- [5] Svenningsson P, Hall H, Sedvail G, et al. Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain;an extended autoradiographic study[J]. Synapse,1997,27 (4) :322-335.
- [6] Fink JS, Weaver DR, Rivkees SA, et al. Molecular Cloning of the rat A2 adenosine receptor ;Selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1992,14:186-195
- [7] Svenningsson P, Le Moine C, Kull B, et al. Cellular expression of adenosine A2A receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas[J]. Neuroscience,1997,80:1171-1185
- [8] Fuxe K, Ferre S, Canals M, et al. Adenosine A2A and dopamine D2 heteromeric receptor complexes and their function[J]. Journal of Molecular Neuroscience,2005,26 (2-3) :209-220.
- [9] Pinna A, Wardas J, Simola N, et al. New therapies for the treatment of Parkinsons disease: Adenosine A2A receptor antagonists [J]. Life Sci,2005,77 (26) :3259-3267.

(收稿日期:2014-01-15)

(本文编辑:秦楠)