

帕宁方对帕金森病大鼠多巴胺神经元凋亡的影响

谢丽圣¹ 莫遗盛¹ 冯洁² 王冬梅¹ 通讯作者

1 广西医科大学第三附属医院 南宁 530031 2 广西医科大学药学院 南宁 530021

〔摘要〕目的 探讨帕宁方对帕金森病(PD)模型大鼠多巴胺(DA)神经元凋亡的影响。方法 运用6-羟基多巴胺(6-OHDA)立体定向注射复制PD大鼠模型。将大鼠随机分为正常组、空白组、阳性对照组(美多巴0.125g/kg)与实验组(帕宁方42g生药/kg),应用TUNEL染色法透射电镜观察DA神经元凋亡情况。结果 模型组可见大量TUNEL阳性细胞,阳性细胞数明显多于正常组($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组、帕宁方组阳性细胞明显减少($P < 0.05$),而两组相比无显著性差异($P > 0.05$)。结论 帕宁方对6-OHDA所致PD大鼠DA神经元损伤具有保护作用。

〔关键词〕帕金森病;帕宁方;细胞凋亡;多巴胺神经元

〔中图分类号〕R285.5 〔文献标识码〕A 〔文章编号〕2095-7165(2022)05-002-03

〔基金项目〕1.广西中医药管理局(gzzc1063);2.广西南宁市科技局(201003045C-5)

Effects of Paning decoction on apoptosis of dopaminergic neurons of Rats with Parkinson's Disease

Xie Li-sheng¹, MO Yi-sheng¹, FENG Jie², WANG Dong-mei¹ corresponding author 1. Corresponding author: The Third Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530031, China 2. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

〔Abstract〕Objective To observe the effects of Paning decoction on apoptosis of dopaminergic neurons of Rats with Parkinson's Disease. Methods PD model rats were established through stereotaxic microinjection of 6-OHDA. Forty SD rats were randomly divided into four groups: blank group, normal group, positive group (madopar 0.125g/kg) and experience group (Paning decoction 42g/kg). The changes of dopaminergic neurons apoptosis were observed with the help of TUNEL and transmission electron microscopy. Results A large number of TUNEL positive cells were found in the model group. The positive cells were significantly more than those of the normal group ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the number of positive cells of the positive group and the experience group significantly reduced ($P > 0.05$). Conclusion There are protective effects of Paning decoction on 6-OHDA type of Parkinson's disease in substantia nigra of rats dopaminergic neurons.

〔Key words〕Parkinson's disease; Paning decoction; Apoptosis; Dopaminergic neurons

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是世界上增长最快的神经系统疾病之一^[1]。有研究预测,到2040年全球帕金森病患者将超过1200万人^[2]。其主要病理学改变是黑质多巴胺(dopamine, DA)能神经元变性和路易氏小体的形成^[3]。导致这一病理改变的确切发病机制目前尚未明确,有研究认为是年龄、环境及遗传因素相互作用的结果^[4]。而线粒体及溶酶体途径、氧化应激和细胞凋亡在PD发病机制中起到了重要作用^[5]。因此目前PD治疗的研究方向已逐渐转为寻求神经元保护和抗细胞凋亡的药物。通过我们前期实验研究,结果提示帕宁方不仅能改善PD大鼠旋转行为,还可以提高机体的抗氧化能力和清除自由基的能力,能减少氧化应激反应对机体的损害^[6]。本研究旨在进一步探讨帕宁方是否能抑制神经细胞凋亡,减轻PD大鼠模型脑内组织和神经元的受损程度,为寻求具有防治PD作用的中药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物

雄性SD大鼠60只,体重180—220g,由广西医科大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(桂)2009-0002。

1.1.2 药物

用10倍量水将天麻、钩藤、桑枝、杜仲、仙茅、豨莶草等十余味中药的帕宁方提取3次,过滤减压浓缩至稠膏,冻干。临用前用5%CMC-Na溶解。

1.1.3 试剂

阿朴吗啡(apomorphine, APO)、6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)、抗坏血酸购自美国Sigma公司;戊巴比妥钠购自德国Solarbio公司;TUNEL试剂盒(武汉博士德生物工程研究所)。

1.1.4 仪器

大鼠脑立体定位仪:TOW-3A型(广东);透射电镜:日立60024型;CX41奥林巴斯生物显微镜(德国)。

1.2 方法

1.2.1 建立帕金森动物模型(采用右侧黑质两点注射法)

[4]

除了正常对照组外,实验大鼠经戊巴比妥钠(30mg/kg)麻醉后,固定于脑立体定位仪上,参照大鼠脑立体定位图谱取两个靶点a点:前囟尾侧5.0mm,中线右侧1.9mm,硬脑膜腹侧7.4mm; b点:前囟尾侧5.3mm,中线右侧2.5mm,硬脑膜腹侧6.5mm。将12μg6-羟基多巴胺立体定向注射于右侧黑质a、b两个靶点(每点注射量6μg,浓度2μg/ml,溶解于含0.1%抗坏血酸的生理盐水),注射速度0.3μl/min,注毕留针15min。成功帕金森模型标准:模型建立两周后,用阿朴吗啡按0.5mg/kg诱发大鼠向左侧旋转,记录半小时内旋转次数,

第一作者:谢丽圣,男,副主任医师,研究方向:临床医学。

* 通讯作者:王冬梅,女,主任药师,研究方向:药学。

210 转 /30min (7 转 / 分) 以上即可。

1.2.2 动物分组及给药

将实验大鼠建立动物模型 40 例, 分为 4 组, 每组 10 只, 随机分成正常对照组, 模型对照组, 阳性对照组, 帕宁方组。阳性对照组给予美多巴 125mg/kg, 帕宁方组按 42g 生药 /kg 灌服中药, 1 次 / 每日, 连用 4 周, 正常对照组和模型对照组灌服等体积的生理盐水。

1.2.3 TUNEL 染色法检测神经元凋亡

各组动物迅速断头取脑, 置于冰盘上迅速分离中脑黑质, 于 10% 甲醛溶液中固定 24h, 梯度脱水, 常规石蜡包埋, 冠状切片, 片厚为 5 μ m。切片常规脱蜡入水, 新鲜配制 3% H₂O₂ 室温处理 10min; 标本片加 0.01mol/L 的枸橼酸缓冲液 (TBS)1:200 新鲜稀释蛋白酶 K37℃ 消化 10min; 标本片加标记缓冲液 20 μ L/ 片, 放置在湿盒中 2h; 加封闭液 50 μ L/ 片, 室温下反应 30min, 甩去封闭液; 用抗体稀释液 1: 100 稀释生物素化抗地高辛抗体 (取 1ml 抗体稀释液加生物素化抗地高辛抗体 10 μ L), 50 μ L/ 片加至标本片上, 湿盒中 37℃ 反应 30min; 用体积比为 1: 100 的抗体稀释液稀释 SABC (取 1ml 抗体稀释液加 SABC10 μ L), 混匀后加至切片上, 37℃ 反应 30min; 采用新配的 DAB 在室温下显色, 苏木素复染, 水洗、脱水、透明、封片、镜检, 以细胞核中有棕黄色颗粒为阳性细胞, 即凋亡细胞。每例在光镜 400 倍条件下观察 3 张切片, 每张切片取 3 个不同视野计数后取凋亡细胞的平均值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计处理, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本对应参数平均值方差齐性用 F 检验, 均值间比较用 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

在光镜下可以看见, 正常对照组大鼠黑质多巴胺神经元几乎都是 TUNEL 阴性细胞, 阳性偶见。模型组可见大量 TUNEL 阳性细胞, 即凋亡细胞, 核呈棕黄色, 有些细胞核固缩深染呈深棕色, 形状不规则, 细胞体积缩小, 与正常对照组有显著性差异 (P<0.05); 阳性对照组、帕宁方组阳性细胞较少, 两组相比无显著性差异 (P>0.05), 但与模型组比较, 两组阳性细胞均显著减少 (P<0.05), 结果见表 1, 图 1。

表 1 TUNEL 染色检测神经元凋亡结果
(n=10, $\bar{x} \pm s$, 400 $\times$)

Tab1 Results of the apoptosis of substantia nigra neurons of TUNEL ($\bar{x} \pm s$, 400 $\times$)

组别	剂量	凋亡细胞
正常对照组	—	8.69 $\pm$ 3.23*
模型对照组	—	37.52 $\pm$ 4.91
阳性对照组	125 mg/kg	11.37 $\pm$ 3.01*
帕宁方组	42g 生药 /kg	12.46 $\pm$ 2.78*#

注: 与模型组比较, *P<0.05; 与阳性对照组比较, #P>0.05

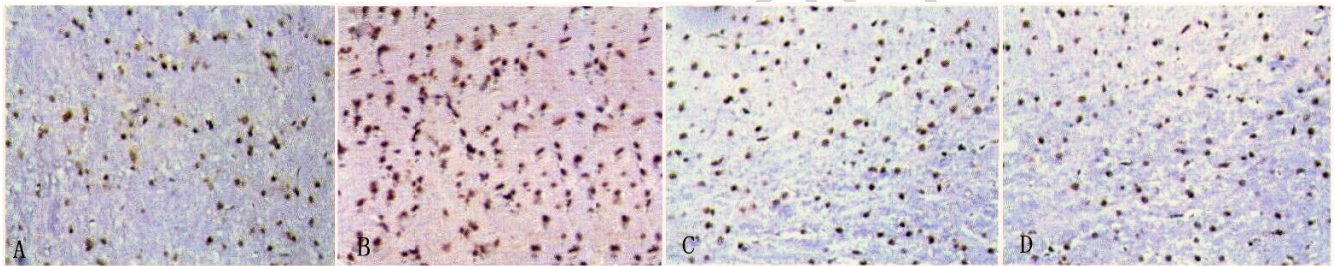


图 1 神经元凋亡电镜结果 (400 $\times$)

A. 正常对照组; B. 模型对照组; C. 阳性对照组; D. 帕宁方组

Fig1 Electron microscopy results of the apoptosis of substantia nigra neurons (400 $\times$)

A. normal group; B. model group; C. positive group; D. Paning decoction group

3 讨论

PD 显著的病理学特征是黑质致密部多巴胺能神经元脱失使纹状体多巴胺分泌不足, 对基底节神经调节功能造成紊乱^[7]。由于多巴胺能神经元的丢失, 当黑质纹状体通路中的神经递质多巴胺减少达 70% 以上时, 患者将出现姿态不稳、肌强直、运动缓慢、静息性震颤等临床症状^[8]。6-OHDA 制备的 PD 大鼠是研究 PD 防治的理想模型, 注射 6-OHDA 到纹状体后, 黑质纹状体系统将发生缓慢的退行性病变, 因此, 在纹状体的一侧注射小剂量 6-OHDA, 将建立有 PD 早期病理特征的动物模型^[9]。研究提示采用 TUNEL 方法可见帕金森病大鼠出现黑质损伤时, 细胞凋亡同步动态改变, 且观察到凋亡黑质细胞沿着 6-OHDA 注射针道分布的现象, 动物实验证实细胞凋亡参与了大鼠帕金森病的发病^[10]。凋亡是由基因控制的主动的细胞死亡方式, 近年来进一步的神经生物化学和组织化学研究证实了细胞凋亡是导致 PD 的重要发病机制^[11]。随着深入研究发现细胞凋亡可能参与了多巴胺神经元的死亡过程, 加速了 PD 的发生与发展^[12]。PD 的进展中黑质内多巴胺能神经细胞明显出现了减少, 使乙酰胆碱和纹状体中神经递质 DA 的动态平衡被打破而失衡, 使病情加重^[13-14]。PD 目前的治疗多采用补

充多巴胺等对症治疗, 治疗时间越长治疗效果越差, 肌强直、静息性震颤等锥体外系反应症状越明显, 患者的生活质量严重降低, 经济负担加重^[15]。因此, 我们着手研究能够治疗帕金森病的中药, 帕金森病属中医学“颤症”、“颤震”、“振掉”等范畴, 责其主要原因是由于机体肝肾亏损, 阴虚阳亢。因此, 我们选择具有补肾养肝、熄风止颤之功效的壮族民间验方帕宁方治疗帕金森病。研究表明帕宁方在临床上应用有着较好的疗效^[16-17]。本研究结果提示模型组可见大量 TUNEL 阳性细胞, 核呈棕黄色, 形状不规则, 细胞体积缩小, 阳性对照组、帕宁方组阳性细胞较少, 与模型组比较, 阳性对照组、帕宁方组这两组凋亡细胞均显著减少 (P<0.05), 可见帕宁方可明显减少 6-OHDA 造成的细胞凋亡, 对神经细胞有着保护作用, 从而发挥了抗 PD 的作用, 为进一步临床应用提供了理论依据, 值得我们更深入开展研究, 更好地发挥中药多机制、多靶点的整体治疗优势。

[参考文献]

[1] Wenya Yang, et al. Current and projected future economic burden of Parkinson's disease in the U.S.[J].npj Parkinson's Disease (2020) 15.

[2] Dorsey E, Bloem BR. The Parkinson Pandemic-A Call to Action[J]. JAMA Neurol. 2018 Jan 1;75(1):9-10.

[3] ABE M,MUNAKATA H,ABE K, et al. Effects of 1-cyclohexyl-and 1-cyclohexyl-N-propargyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline on dopaminergic spontaneous discharge in nigral neurons of rats[J]. Brain Research Bulletin, 2016,121:201-208.

[4] Harris J R . Protein aggregation and fibrillogenesis in cerebral and systemic amyloid disease[DB/OL]. springer: King' s College London,2016 [2012-12-06]. https: / /link. springer. com/book /10.1007 /978-94-007-5416-4.

[5] Von Stockum S,Nardin A,Schrepfer E,et al. Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson' s disease: A fly point of view [J]. Neurobiol Dis,2016,90: 58.

[6] 王冬梅, 海静如, 莫遗盛, 等. 帕宁方对帕金森病大鼠行为及氧化应激反应的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (10) : 199-202.

[7] Ferrer I,Martinez A,Blanco R ,et al. Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease[J]. J Neural Transm,2011,118(5):821-839.

[8] Bernheimer H, BirkmayerW, Hornykiewicz O, et al. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations [J]. J Neurol Sci, 1973,20(4):4151.

[9] Jenner P. Functional models of Parkinson' s disease: avaluable tool in the evelopment of novel therapies [J]Ann

Neurol,2008,64(Suppl 2):16-29

[10] Xie W, Li X, Li C, et al. Proteasome inhibition modeling nigral neuron degeneration in Parkinson,s disease [J]. J Neurochem, 2010, 115(1):188-189.

[11] Jia Liu, Weijin Liu, and Hui Yang. Balancing apoptosis and autophagy for Parkinson' s disease therapy targeting BCL-2[J]. ACS Chem. Neurosci.2019,10,2,792-802.

[12] Valdeolivas S, Pazos MR, Bisogno T, et al. The inhibition of 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG) biosynthesis, rather than enhancing striatal damage, protects striatal neurons from malonate-induced death:a potentialrole of cyclooxygenase-2-dependent metabolism of 2-AG. Cell. Death Dis, 2013, 4: e862

[13] Ghosh A,Saminathan H,Kanthasamy A,et al. The peptidyl-prolylisomerase Pin1 up-regulation and proapoptotic function in dopaminergicneurons: relevance to the pathogenesis of Parkinson disease[J]. J Biol Chem,2013,288:21955-21971.

[14] Pengfei Yang, et al.Dopamine D3 receptor: A neglected participant in Parkinson Disease pathogenesis and treatment?[J]. Ageing Res Rev. 2020 Jan;57:100994.

[15] Hindle JV. The practical management of cognitive impairment and psychosis in the older Parkinson' s disease patient [J]. J Neural Transm,2013,120(4):649-653.

[16] 王冬梅, 海静如, 魏凤, 等. 帕宁方改善帕金森病患者非运动症状的作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23 (3) : 353-356.

[17] 王冬梅, 魏凤, 莫遗盛, 等. 帕宁方治疗帕金森病的临床研究 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27 (6) : 95-97.

(上接第 1 页)

表 1 续

特征	n	近一年继续教育情况		χ^2	P
		参加	未参加		
学历					
中专	35	27 (77.1)	8 (22.9)		
大专	168	134 (79.8)	34 (20.2)	2.97	0.000
本科及以上	61	52 (85.2)	9 (14.8)		
职务					
护士长	26	25 (96.2)	1 (3.8)		
护理人员	238	188 (79)	50 (21)	3.01	0.312
职称					
主任 / 副主任护师	11	10 (90.9)	1 (9.1)		
主管护师	57	55 (96.5)	2 (3.5)		
护师	79	65 (82.3)	14 (17.7)	33.57	0.000
护士	117	83 (70.9)	34 (29.1)		
人事关系					
编内	139	131 (94.2)	8 (5.6)		
编外	125	82 (65.6)	43 (34.4)	60.2	0.000
工作单位					
社区卫生服务中心	133	105 (78.9)	28 (21.1)		
乡镇卫生院	131	108 (82.4)	23 (17.6)	2.67	0.152
医院政策					
满意	186	146 (78.5)	40 (21.5)		
不确定	41	35 (85.4)	6 (14.6)	2.13	0.411
不支持	37	32 (86.5)	5 (13.5)		

3 讨论

本次调查研究发现,在新冠肺炎疫情影响下,基层护理人员继续教育需求主要包括公共卫生事件危机管理、健康教育。继续教育活动形式现状主要为远程教育,可见后疫情时代,基层护理人员的继续学习方式发生了改变,数字技术的应用得到推广^[4],学习可及性明显提升。此外,随国家政策及基层医疗形式转变,整个社会对护理这一群体的业务素质、知识水平提出了更高的要求^[5]。总之,基层护理继续教育要以政策为指导,以需求为导向,充分结合互联网技术,运用现代化的学习工具,全方位提高基层护理继续教育的参与度与质量。

[参考文献]

[1] 李佳芮, 何梦思, 朱俊敏等. 新冠肺炎疫情对我国健康事业的正面影响分析 [J]. 产业与科技论坛, 2021, 20(12):57-58.

[2] 陈哲. 后疫情时代护士职业前景看好 [J]. 成才与就业, 2021(04):14-15.

[3] 窦超, 冯娟, 王忠心, 史小慧等. 后疫情时代综合医院医务人员职业倦怠现状及心理服务需求调查 [J]. 齐鲁护理杂志, 2021, 27(14):71-74.

[4] 段玉琴. 大数据时代继续教育平台建设研究和实践 [J]. 继续教育研究, 2021(08):5-7.

[5] 周洁. 新医改后城乡卫生人力资源配置研究 [J]. 中外企业文化, 2021(06):41-42.