

· 基础研究 ·

电针治疗对帕金森病大鼠多巴胺能神经元的影响

马骏 王彦春 甘水咏

【摘要】目的 观察电针治疗对帕金森病大鼠黑质多巴胺(DA)能神经元的影响。**方法** 选取 Wistar 大白鼠 40 只,随机分为正常组、假手术组、模型组和电针组,以 6-羟基多巴胺(6-OHDA)注入中脑右侧黑质制作单侧黑质损毁的帕金森病大鼠模型,电针组采用电针进行治疗。检测各组大鼠黑质酪氨酸羟化酶(TH)阳性神经元数、DA 能神经元凋亡数及纹状体 DA 含量。**结果** 与正常组和假手术组比较,模型组大鼠损毁侧 DA 能神经元凋亡数增加,TH 阳性神经元数和纹状体 DA 含量减少,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与模型组比较,电针组大鼠损毁侧 DA 能神经元凋亡数减少,TH 阳性神经元数和纹状体 DA 含量增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 电针治疗对帕金森病黑质 DA 能神经元损伤有一定的防治作用。

【关键词】 电针; 黑质细胞; 帕金森病

The effect of electroacupuncture on dopaminergic neurons MA Jun, WANG Yan-chun, GAN Shui-yong. Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of electroacupuncture (EA) on dopaminergic neurons in the mesencephalic substantia nigra (MSN) of rats with Parkinson's disease (PD). **Methods** A model of PD was induced in rats by injecting 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the MSN. Acupuncture was then used to treat the model rats. To examine the apoptosis of dopaminergic neurons, the number of tyrosine hydroxylase (TH) positive neurons and the concentration of dopamine (DA) were measured in a normal control group, a sham-operation group, the EA group and the PD group which received no EA. **Results** In the EA group, markedly less apoptosis of dopaminergic neurons was observed, and the number of TH positive neurons and the concentration of DA were significantly higher. **Conclusion** Electroacupuncture may mitigate injury to the substantia nigra in Parkinson's disease.

【Key words】 Electroacupuncture; Substantia nigra; Parkinson's disease

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是中老年人常见的致残性神经系统变性疾病之一,位居老年神经系统退行性疾病的第 2 位,临床表现为静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势步态异常等。其基本病理改变为中脑黑质的多巴胺(dopamine, DA)能神经元进行性丢失,但具体病因与发病机制至今尚未完全明了,目前认为与遗传、环境因素、氧化应激、兴奋性毒素、神经系统老化、自身免疫、细胞凋亡等有密切关系。过去,PD 的治疗都是以对症治疗和左旋多巴替代性疗法为主,但长期使用不仅会出现难以耐受的毒副作用,而且患者易出现症状波动。近年来的临床实践表明,采用针灸治疗 PD 具有一定的潜力和优越性,并取得了较为肯定的疗效^[1,2]。本研究旨在探讨电针对帕金森病大鼠 DA 能神经元的影响,为临床治疗提供依据。

材料与方法

一、实验动物及分组

基金项目:湖北省教育厅资助项目(No. 2000B06005);武汉市科委资助项目(No. 20036004056)

作者单位:430061 武汉,湖北中医学院研究生处

健康 Wistar 大白鼠 40 只,雌雄不限,体重为(200 ± 20)g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,随机分为正常组、假手术组、模型组和电针组,每组 10 只。所有动物均在通风良好的条件下分笼饲养,自由摄食、饮水。

二、主要药物试剂及器材

6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)、阿朴吗啡、维生素 C (Vit C)、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体均购于 Sigma 公司, TUNEL 检测试剂盒由德国宝灵曼公司提供, SABC 试剂盒购于武汉博士德公司,上海产江湾 II 型脑立体定位仪。

三、PD 大鼠模型制作

模型组和电针组参考文献[3]所拟的方法,采用 6-OHDA 损毁大鼠的右侧黑质。用 6% 水合氯醛(6 ml/kg 体重)腹腔注射麻醉大鼠后,将其头颅固定于脑立体定位仪上,上切牙平面比耳间线平面低 2.4 mm,于颅部正中切开头皮和筋膜,充分暴露前囟。参照文献[4]确定右侧黑质方位(前囟后 4.8 mm,中线右 2.0 mm,硬膜下 7.5 mm),用脑外科电动颅骨钻钻颅孔(直径约 1 mm),用 5 μl 微量注射器抽取 3 μg/μl 的 6-OHDA 3 μl(内含 0.2%

Vit C), 缓慢进针, 注射速度 $0.5 \mu\text{l}/\text{min}$, 注射完毕后停针 10 min , 以 $1.0 \text{ mm}/\text{min}$ 的速度缓慢拔针, 明胶海绵填塞颅骨孔, 缝合皮肤。假手术组注射等量生理盐水(含 0.2% Vit C), 方法同上。正常组不作处理。

术后 2 周, 造模大鼠腹腔注射阿朴吗啡 ($0.5 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重) 诱导实验动物的旋转行为, 每分钟旋转不少于 7 次者为造模成功。

四、治疗方法

电针组于造模成功后给予电针治疗。参照华兴邦^[5]的方法取风府、太冲穴, 采用 0.5 寸 的毫针, 风府穴直刺, 太冲穴斜刺, 然后接 G6805 型电针治疗仪, 采用连续波, 频率为 120 Hz , 每次治疗 30 min , 每天 1 次, 7 d 为 1 个疗程, 疗程间休息 1 d。电针组大鼠治疗 2 个疗程后取材, 其余 3 组动物同步喂养、取材。

五、检测方法

1. 样本的采集: 所有大鼠给予 6% 水合氯醛麻醉后迅速断头处死, 快速开颅取出脑组织置于冰台上, 参照文献^[4]的方法分离黑质和纹状体。黑质行冰冻切片, 片厚 $6 \mu\text{m}$, 纹状体置于 -70°C 冰箱中保存。

2. 黑质 DA 能神经元调亡的测定: 每只大鼠选取 2 张切片, 采用 TH/TUNEL 双标染色。先行 SABC 法染色, 以 $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ 的 PBS (pH 值 7.4) 浸洗 3 次, 滴加正常山羊血清于室温下孵育 20 min ; 加入一抗(兔抗大鼠 TH 多克隆抗体, 稀释度 1:400), 于 4°C 下孵育过夜; 加入二抗于室温下孵育 30 min ; 加 SABC 溶液于室温下孵育 20 min ; DAB 显色, PBS 代替一抗体作阴性对照。然后用 TUNEL 检测试剂盒进行染色, PBS 浸洗切片 3 次后, 用 0.1% 的 TritonX-100- 0.1% 枸橼酸钠室温下孵育 10 min , PBS 浸洗 2 次, 每次 5 min ; 加 TUNEL 反应液于 37°C 下闭光孵育 1 h ; 加入抗 FITC 碱性磷酸酶抗体于 37°C 下孵育 30 min ; NBT-BCIP 避光显色 30 min , PBS 冲洗终止反应。以不加 TdT 酶的核苷酸标记液代替 TUNEL 反应液作为阴性对照。DA 能调亡神经元判断标准为细胞核着蓝紫色, 胞浆呈棕黄色。

3. 黑质 TH 阳性神经元数量的测定: 采用 SABC 免疫组化染色法, 以 $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ 的 PBS (pH 值 7.4) 浸洗切片 3 次, 滴加正常山羊血清于室温下孵育 20 min ; 加一抗(兔抗大鼠 TH 多克隆抗体, 稀释度 1:400), 于 4°C 下孵育过夜, PBS 洗 3 次, 每次 2 min ; 加二抗(山羊抗兔 IgG 抗体)于室温下孵育 30 min , PBS 洗 3 次, 每次 2 min ; 加 SABC 溶液于室温下孵育 20 min , PBS 洗 4 次, 每次 5 min ; DAB 显色, PBS 代替一抗作阴性对照。TH 阳性神经元判断标准为细胞浆呈棕褐色。

4. 纹状体 DA 含量的测定: 用分析天平称纹状体湿重 ($60 \sim 95 \text{ mg}$), 分装入塑料管中, 每管加入 1 ml 冰冷的 HClO_4 ($0.05 \text{ mol}/\text{L}$), 在冰冷下用内切式组织匀浆

机匀浆 30 s , 然后于 4°C 下以 $15\,000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 30 min , 取上清液 $20 \mu\text{l}$ 用于高效液相色谱-电化学检测。色谱条件为 C18 色谱柱 ($4.6 \times 105 \text{ mmID}$, $5 \mu\text{m}$), 流动相为 pH 值 2.7, $0.01 \text{ mol}/\text{L}$ 磷酸二氢钠-乙腈 (2:1), 流速 $1.1 \text{ ml}/\text{min}$, 柱压 9.8 MPa , 进样量 $20 \mu\text{l}$, 柱温为室温。

六、资料处理及统计学分析

每只大鼠选取 1 张切片, 在显微镜下选择相邻的 5 个非重叠视野, 测定单位面积内的阳性细胞数目, 实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。用 SPSS 11.0 版软件包进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。

结 果

一、右侧纹状体区 DA 含量

正常组右侧纹状体区 DA 含量与假手术组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组与正常组、假手术组相比, DA 含量均明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 电针组与模型组相比, DA 含量明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组右侧纹状体区 DA 含量、黑质 TH 阳性神经元数及 DA 能神经元调亡数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	DA 含量 (ng/g 脑组织)	TH 阳性神经元 ($\text{个}/\text{mm}^2$)	DA 能神经元 调亡数 ($\text{个}/\text{mm}^2$)
电针组	10	$1\,772 \pm 42^*$	$28.3 \pm 3.1^*$	$16.2 \pm 4.0^*$
模型组	10	$1\,022 \pm 42$	26.0 ± 2.5	24.3 ± 7.3
假手术组	10	$7\,387 \pm 43^{\#\Delta}$	$37.2 \pm 1.3^* \Delta$	$11.0 \pm 3.3^{\#\Delta}$
正常组	10	$7\,384 \pm 95^{\#}$	$38.0 \pm 2.8^{\#}$	$9.7 \pm 3.1^{\#}$

注: 与模型组比较, $^* P < 0.05$, $^{\#} P < 0.01$; 与正常组比较, $\Delta P > 0.05$

二、右侧黑质 TH 阳性神经元数

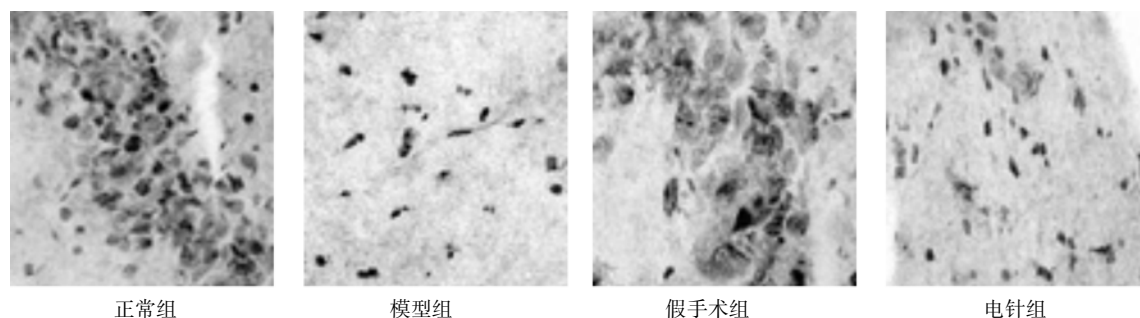
正常组右侧黑质 TH 阳性神经元数与假手术组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组与正常组、假手术组相比, TH 阳性神经元数明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 0.01); 电针组与模型组相比, TH 阳性神经元数明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 1。

三、右侧黑质 DA 能神经元调亡数

假手术组右侧黑质 DA 能神经元调亡数与正常组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组与正常组、假手术组相比, DA 能神经元调亡数明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 电针组与模型组相比, DA 能神经元调亡数明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 2。

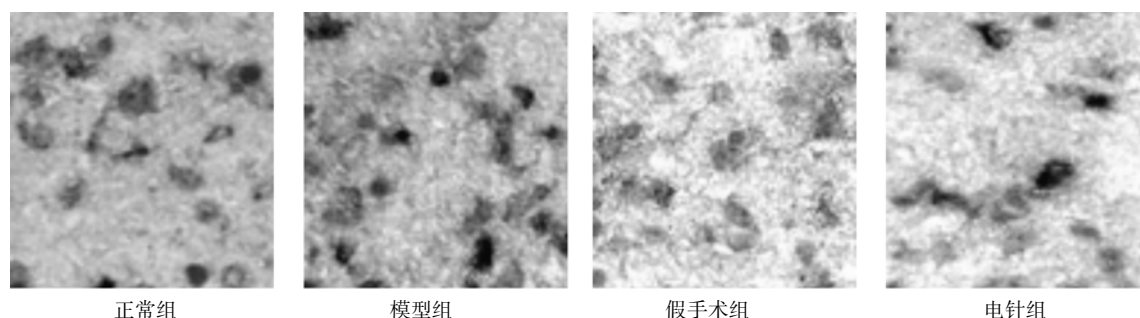
讨 论

帕金森病属中医“痉证”范畴, 该病的关键在于“肝风内动”。因此, 祛风止痉为本病的首要治则, 治疗上从肝从风着手, 取太冲、风府两穴。太冲穴为足厥阴肝经的原穴, 针刺可起到祛风止痉的功效; 风府穴为



注:TH 阳性细胞胞浆着棕褐色(SABC 免疫组化法, $\times 200$)

图 1 右侧黑质 TH 阳性神经元



注:DA 能凋亡神经细胞核为蓝紫色,胞浆呈棕黄色(TH/TUNEL 双标法, $\times 400$)

图 2 右侧黑质 DA 能凋亡神经元

督脉经的腧穴,为祛风要穴,具有熄风的作用。两穴相配,可起到通调脑络、祛风止颤、柔肝舒筋的功效。

TH 是一种非血红素铁蛋白,在脑内可催化儿茶酚胺类神经递质在体内生物合成的起始步骤,即 L-酪氨酸羟化形成左旋多巴(L-Dopa)的反应。与参与儿茶酚胺合成步骤的其他催化酶相比,TH 含量最少、合成速率最低、催化活性最弱且底物专一性最强,因而被认为是儿茶酚胺合成的限速酶,可将酪氨酸转化为 L-Dopa, L-Dopa 脱羧即成为重要的神经递质 DA。有实验研究表明,损毁侧黑质 TH 含量较正常侧明显减少^[6,7],与本研究结果相同,提示 TH 含量降低可能与 PD 的发生和发展有关。我们的研究结果发现,电针组 TH 阳性神经元数量明显高于模型组($P < 0.05$),提示电针作用可使 PD 模型大鼠脑内 TH 表达增多。

有研究表明,细胞凋亡可能是 PD 患者 DA 能神经元死亡的共同通路^[8]。本实验采用 TH 和 TUNEL 双标染色法检测中脑黑质 DA 能神经元的凋亡,发现模型组 DA 能神经元凋亡数明显高于正常组和假手术组,差异具有统计学意义($P < 0.01$);电针组 DA 能神经元凋亡数明显少于模型组,差异也有统计学意义($P < 0.05$)。这说明电针治疗对 6-OHDA 所致的神经元凋亡具有一定的抑制作用,因此我们推测电针治疗对 PD 大鼠中脑黑质 DA 能神经元具有保护作用 and 损伤修复作用。

DA 为纹状体内的抑制性神经递质, Ach 为兴奋性神经递质,正常时两者处于动态平衡状态。PD 患者的黑质 DA 能神经元变性、脱落以及黑质-纹状体系统神经

通路神经纤维变性,可导致纹状体中 DA 显著减少,当 DA 浓度降低 80% 以上时出现临床症状。我们在实验中观察到,模型组右侧纹状体 DA 含量明显低于正常组和假手术组($P < 0.01$),而电针组 DA 含量明显高于模型组($P < 0.05$)。我们推测 DA 含量的增加可能与 DA 能神经元的凋亡受抑制,TH 含量增加有一定关系。

综上所述,电针对 6-OHDA 所致的神经元凋亡具有一定的抑制作用,可增加黑质 TH 阳性神经元的数量和纹状体 DA 的含量,对 DA 能神经元具有一定的保护作用,其作用机制还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 黄文燕,吴焕淦. 针灸治帕金森病概况. 中国针灸,1988,8:252-255.
- 2 何崇. 针灸治疗帕金森病的概况. 针灸临床杂志,1997,13:50-52.
- 3 孙晋浩,杨琳,高英茂,等. 6-羟基多巴不同部位毁损大鼠帕金森氏病模型的建立及比较. 中国临床康复,2001,5:46-47.
- 4 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定向图谱. 北京:人民卫生出版社,1991. 48-54.
- 5 华兴邦. 大鼠穴位图谱的研制. 实验动物与动物实验,1991,1:1.
- 6 李德鹏,徐群洲,张进禄,等. MPTP 处理的小鼠和 6-羟基多巴胺损毁的大鼠帕金森病模型病理变化的比较. 中风与神经疾病杂志,1999,16:79.
- 7 伦学庆. 毁损大鼠纹状体帕金森病模型的建立. 中国病理生理杂志,1999,15:188.
- 8 陈生弟. 老年帕金森病的病因与发病机制. 实用老年医学,2001,15:284-287.

(修回日期:2005-10-29)

(本文编辑:吴倩)