

· 论著 ·

正常及帕金森病大鼠黑质细胞凋亡与左旋多巴剂量相关性的实验研究

曹非 孙圣刚 王涛 陈吉相 刘昌勤 梅元武 曹学兵 童萼塘 骆芳

【摘要】 目的 研究左旋多巴对黑质细胞的神经毒性作用,探讨合理应用左旋多巴治疗帕金森病的方法。**方法** 通过 6-羟基多巴胺脑立体定向注射术制作大鼠帕金森病模型,采用 TUNEL 方法观察左旋多巴小(每天每公斤 10 mg)、中(每天每公斤 50 mg)、大(每天每公斤 100 mg)三种不同剂量、不同的作用时间(1 d、3 d、5 d、7 d)对帕金森病大鼠黑质细胞的毒性作用,并观察治疗后 7 d 各项指标的变化。**结果** 帕金森病大鼠细胞凋亡数随着左旋多巴治疗的时间、剂量增加而增加。**结论** 左旋多巴能加速帕金森病大鼠黑质细胞凋亡,小剂量、间隔使用左旋多巴能有效减少其神经毒性作用。

【关键词】 帕金森病; 左旋多巴; 凋亡

The relationship between nigral cell apoptosis and different doses of L-dopa in normal rats and rats with Parkinson's disease CAO Fei*, SUN Shenggang, WANG Tao, CHEN Jixiang, LIU Changqin, MEI Yuanwu, CAO Xuebing, TONG Etang, LUO Fang. * Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To evaluate the cytotoxic effects of levodopa on nigral cells and explore the method by which Parkinson's disease(PD) can be treated reasonably with levodopa. **Methods** One hundred 6-OHDA induced PD rats were assigned randomly into L-dopa group ($n = 75$) and PD group ($n = 25$). The rats in the former group were subdivided further into 3 subgroups (25 of each) and were treated respectively by intraperitoneal injections of Levodopa with different dosages (10 mg/kg/d, 50 mg/kg/d and 100 mg/kg/d). The cytotoxic effects on apoptosis of the nigral cells were observed at different durations(1 d, 3 d, 5 d, 7 d) after the injections of levodopa. Parameters were compared among those groups, and 25 normal rats served as control. **Results** The number of substantia nigral apoptosis cells was increased and positively related to the changes of doses and durations of use of levodopa. **Conclusion** The Levodopa enhances the apoptosis of substantia nigra cells of PD rats, if it is given intermittently and/or appropriate doses are used, its cytotoxic effect can be minimized.

【Key words】 Parkinson's disease; Levodopa(L-dopa); Apoptosis

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见于老年人的中枢神经系统慢性退行性疾病,目前临床治疗仍以左旋多巴(L-dihydroxy-phenylalanine, L-dopa)为代表的多巴胺替代疗法为主,有研究者^[1,2]认为 L-dopa 具有神经毒性作用。新近研究认为各种病因可能由细胞凋亡(Apoptosis)这一条共同路径而导致 PD 发病^[3]。L-dopa 能否加重 PD 大鼠黑质细胞凋亡所起作用尚有争议,该作用是否与剂量有关尚未见报道。本课题通过行为学观察、黑质细胞凋亡数检测技术研究不同剂量 L-dopa 对 PD 大鼠黑质细胞的毒性作用,并探讨其毒性作用的基因调控机制,从而为临床更合理地运用 L-dopa 治疗帕金森病提供实验依据。

资料与方法

一、PD 大鼠模型制备

选用健康雄性 Wistar 大鼠(同济医科大学动物中心提供),体重 180~200 g(3 月龄),采用改良 Thomas 方法(6-羟基多巴胺立体定向注射术)^[4]制作 PD 大鼠模型并验证模型成功与否。

二、动物选择及分组

选择模型成功的 PD 大鼠 100 只,随机分为 PD 组($n = 25$)和 L-dopa 注射组($n = 25$),选择正常大鼠作为对照组($n = 25$)。L-dopa 组 PD 大鼠每日上午 8 点注射 L-dopa 注射液。用 L-dopa 干粉剂(Sigma 公司产品)溶于含 0.05% 乙醇和 0.1% 抗坏血酸(Sigma 公司产品)注射用水中,配制成 10 mg/ml、50 mg/ml、100 mg/ml 三种浓度的 L-dopa 注射液。至观察时点,按其注射剂量分小(每天每公斤 10 mg)、中(每天每公斤 50 mg)、大(每天每公斤 100 mg)三小组(每组 25 只);

课题基金:2001 年国家自然科学基金资助项目(基金编号:30170334)

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科(曹非、孙圣刚、王涛、陈吉相、刘昌勤、梅元武、曹学兵、童萼塘);湖北省新华医院内科(骆芳)

PD 组注射除 L-dopa 外的 L-dopa 注射液其它成分。观察时点为 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d, 14 d 为 PD 各组大鼠按剂量腹腔注射 L-dopa 注射液 7 d, 停药 7 d。每组每时点 5 只 PD 大鼠。对照组按上述时点给予每天每公斤 10 mg L-dopa 注射。

三、观察指针

1. 行为学检测: 对照组、L-dopa 组均在预定时间点的第 2 天上午 8 点进行行为学观察, 腹腔注射阿朴吗啡(apomorphin, APO) 每公斤 0.5 mg, 在直径 40 cm 的不锈钢盆中观察大鼠的旋转行为, 测量旋转次数。然后灌注固定, 取中脑, 石蜡包埋。

2. 细胞凋亡检测(TUNEL 方法): 按 Seaton 方法进行黑质凋亡细胞检测^[5]。

四、图像分析

采用北航多媒体真彩色病理图文分析系统对切片进行图像分析, 所有切片均采用统一放大倍数($\times 100$), 同一光强度下分析, 每例细胞凋亡、原位杂

交为紧邻的 3 张切片, 观察黑质区相同面积, 测量窗为 $262144 \mu\text{m}^2$, 分析指针: 阳性数密度、阳性面密度。所有资料均由分析系统自动计算并打印。

五、统计方法

所有资料均以均数 $\pm$ 标准差表示, 运用 Oxstat 数理统计程序完成组间、组内配对资料的显著性检验(ANOVA)。

结 果

一、L-dopa 诱发 PD 大鼠细胞凋亡结果(表 1)

PD 组黑质细胞凋亡数随时间逐渐下降; 小剂量组 1 d、3 d 变化不大, 5 d、7 d 下降, 14 d 组最低, 除 14 d 外, 其余各时点与 PD 组无显著性差异; 中剂量组凋亡数 14 d $< 1 \text{ d} < 3 \text{ d} < 7 \text{ d} < 5 \text{ d}$, 5 d 最高, 各时点比 PD 组、小剂量组显著性增高; 大剂量组凋亡数 14 d $< 7 \text{ d} < 5 \text{ d} < 3 \text{ d} < 1 \text{ d}$, 1 d 最高, 各时点大剂量组细胞凋亡数比小、中剂量组及 PD 组显著性增高。

表 1 正常及 PD 大鼠黑质细胞凋亡数变化(单位: 个/ mm^2)

组 别	PD 大鼠 L-dopa 治疗时间				
	第 1 d	第 3 d	第 5 d	第 7 d	第 14 d
对照组	45 $\pm$ 9	54 $\pm$ 7	51 $\pm$ 8	50 $\pm$ 5	48 $\pm$ 3
PD 组	407 $\pm$ 32 *	400 $\pm$ 29 *	388 $\pm$ 26 *	368 $\pm$ 20 *	174 $\pm$ 15 *
小剂量组	412 $\pm$ 35 *	418 $\pm$ 26 *	409 $\pm$ 23 *	403 $\pm$ 24 *	226 $\pm$ 22 **
中剂量组	468 $\pm$ 33 * $\diamond$	533 $\pm$ 49 * $\diamond$	690 $\pm$ 45 * $\triangle$ $\diamond$	605 $\pm$ 37 * $\triangle$ $\diamond$	320 $\pm$ 22 * $\diamond$
大剂量组	759 $\pm$ 61 * $\triangle$ $\triangle$ $\diamond$	647 $\pm$ 47 * $\triangle$ $\triangle$ $\diamond$	577 $\pm$ 49 * $\triangle$ $\triangle$ $\diamond$	486 $\pm$ 37 * $\triangle$ $\triangle$ $\diamond$	386 $\pm$ 20 * $\triangle$ $\triangle$ $\diamond$

注: * 与对照组比较 $P < 0.05$; * 与 PD 组比较 $P < 0.05$; $\triangle$ 与 PD 组比较 $P < 0.01$; $\diamond$ 与小剂量相比较 $P < 0.05$; $\triangle$ 与中剂量组比较 $P < 0.05$

讨 论

L-dopa 是多巴胺替代治疗的主要用药, 其副作用也非常明显, 新近研究认为 L-dopa 有导致黑质细胞凋亡的作用^[7]。本试验发现小剂量 L-dopa 组细胞凋亡数与对照组无明显差异; 中剂量组黑质细胞凋亡数随 L-dopa 治疗时间增加而增加, 高峰出现在 5 d, 且停药 7 d 后细胞凋亡数下调至对照组水平, 大剂量组细胞凋亡高峰在 1 d, 3 ~ 7 d 逐渐下降, 停药后 7 d, 明显下降接近对照水平; 同时点各组黑质细胞凋亡数亦是随着 L-dopa 剂量增加而增加。上述结果说明从细胞凋亡的角度证明 L-dopa 具有神经毒性作用, 细胞凋亡参与了 L-dopa 对黑质细胞的损伤作用, L-dopa 能加速黑质细胞凋亡, L-dopa 神经毒性作用随用药剂量、用药时间增加而增加。L-dopa 治疗各组停药 7 d 后, 细胞凋亡数均明显减少, 说明 L-dopa 神经毒性作用是可逆的, 停药能使毒性作用减轻。

L-dopa 神经毒性作用并非自身引起, 而是其氧化代谢分解产物引起^[8]: ① L-dopa 自身氧化可产生超氧化物、过氧化氢、羟基自由基、醌、半醌等自由基, 可导

致 PC12 细胞凋亡或死亡, 即使 L-dopa 向多巴胺(DA)转化受到抑制, 该毒性作用仍存在, 且能被抗氧化剂抑制^[7]; ② 抑制黑质细胞线粒体复合酶 I(Complex I)^[9]; ③ 能造成神经细胞 DNA 大量破坏^[10]。本实验发现左旋多巴对正常大鼠黑质细胞无致凋亡作用。Jenner 认为^[11]长期口服 L-dopa 不会对正常的黑质纹状体造成损伤, 但却能加重已损伤的黑质纹状体的损害, 但目前临床尚无足够实验依据证实 L-dopa 对残存多巴胺神经元有损伤, 可能因为正常大鼠黑质纹状体系统存在完善的自由基清除系统, 铁离子合理分布是合理的, 对自由基的生成及代谢是合理的, 对毒性代谢产物具有一定的分解能力, 进行迅速的代谢。

关于 PD 治疗, 有研究者主张早期使用多巴胺受体激动剂, 但临床资料显示仅 30% 病人有效, 且存在意识模糊、视幻觉、偏盲等副作用, 所以传统的 DA 替代疗法仍不失为 PD 治疗主要手段, 关键是如何科学地使用, 以求最佳疗效、最少副作用。通过上述实验, 我们认为: ① PD 早期, 为减小因 DA 分解产物所致神经毒性作用, 可服用单胺氧化酶抑制剂或抗自由基药物如丙炔苯丙胺、维生素 E、A 等, 即 DATATOP 方案

(deprenyl and tocophenol antioxidation therapy of parkinsonism)。②L-dopa 治疗宜从小剂量开始,大剂量用药主张分多次服用,尽可能减少每次服药剂量,延长服药间隔时间。③L-dopa 控释片同时含有抑制 L-dopa 和 DA 分解的药物成分,是一种理想的治疗方法,且已有研究者发现持续性 DA 刺激的长期治疗比长期波动性治疗并发症少。

参 考 文 献

- 1 Henry B, Alan R, Jonathan M. Characterization of enhanced behavioral responses to L-dopa following repeated administration in the 6-hydroxydopamine lesioned rat model of Parkinson disease. *Exp Neurol*, 1998, 151:334-342.
- 2 Mena MA, Pardo B, Casarejos MJ, et al. Neurotoxicity of levodopa on catecholaminergic neurons. *Mov Disord*, 1992, 7:23-31.
- 3 Malkinshaw G, Waters CM. Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by apoptosis. *Neuroscience*, 1994, 63:975-987.
- 4 Thomas J, Wang J, Takuba H, et al. A 6-OHDA induced selective Parkinsonian rat model; further biochemical and behavioural characterization. *Exp Neurol*, 1994, 126:159-167.

- 5 Seaton AT, Cooper JM, Schapira AH. Cyclosporin inhibition of apoptosis induced by mitochondrial complex I toxins. *Brain Res*, 1998, 809: 12-17.
- 6 Joseph MM, Gong L, Kulaga H, et al. Dopamine induced apoptosis cell death of a catecholaminergic cell line derived from the central nervous system. *Mol Pharmacol*, 1996, 50:1309-1315.
- 7 Melamed E, Offen D, Shirvan A, et al. Levodopa toxicity and apoptosis. *Ann Neurol*, 1998, 44:149-154.
- 8 Zou L, Jankovic J, Rowe DB, et al. Neuroprotection by pramipexole against dopamine and levodopa-induced cytotoxicity. *Life Sci*, 1999, 64: 223-255.
- 9 Offen D, Ziv I. Prevention of dopamine induced cell death by thiol antioxidants; possible implications for treatment of Parkinson disease. *Exp Neurol*, 1996, 141:32-39.
- 10 Specser JP, Jenner A, Aruoma OI, et al. Intense oxidative DNA damage promoted by L-dopa and its metabolites; implications for neurodegenerative disease. *FEBS Lett*, 1994, 353:246-250.
- 11 Jenner PG, Brin MF. Levodopa neurotoxicity: experimental studies versus clinical relevance. *Neurology*, 1998, 50:39-43.

(收稿日期:2001-09-21)

(本文编辑:刘雅丽)

· 短篇报道 ·

紫外线照射治疗玫瑰糠疹 57 例疗效观察

赵欲晓 董春花

玫瑰糠疹是一种较为常见的皮肤病,一年四季均可发生,以春秋季节多见,好发于 20~40 岁,儿童及老年人较为少见,男女比例大致相同。紫外线照射对该病有很好的疗效,我科近几年用紫外线照射治疗玫瑰糠疹 57 例,现报告如下:

57 例病人,均经皮肤科诊断为玫瑰糠疹,其中男 30 例,女 27 例,20 岁以下者 8 例,20~40 岁者 46 例,40 岁以上者 3 例。1~3 月份发病者 14 例,4~6 月份发病者 24 例,7~9 月份发病者 10 例,10~12 月份发病者 9 例。病程时间为 3 d~3 个月。

采用 500 W 落地式紫外线治疗机,每次治疗时患者裸露患病皮肤,根据病变部位进行分区照射(即以耻骨联合为界分为前上、前下、后上、后下、左上侧、左下侧、右上侧、右下侧),非照射部位用白布遮盖,用红斑量隔日照射。照射时间首次为 30 s,灯距 30 cm,根据照射后的反应情况,以后每次照射在前一次治疗量的基础上增加 30 s,若照射后反应较重(如皮肤刺痛、发红、发痒等),则维持前一次的治疗量。

该病疗效标准为:痊愈,皮损全部消退,皮肤颜色恢复正常,无新发皮疹,治疗后随访 1 年未复发;有效,皮损基本消退,皮肤颜色基本恢复正常,无新发皮疹,治疗后随访 1 年有复发;无效,治疗前后,患病皮肤无任何改变。57 例病人中,最少照射 5 次,最多照射 15 次,平均照射 8 次;痊愈 53 例,占 93%;有效 4 例,

占 7%;无效 0 例,总有效率 100%。其中有一典型病例,某男,35 岁,个体户,1999 年 4 月 20 日就诊,自述因与朋友喝酒后,感觉胸前区轻度瘙痒,发现胸部有一椭圆形,大小如花生米样淡红色斑疹,1 周后,躯干及上肢的近心端相继有成批的皮损出现,经皮肤科诊断为玫瑰糠疹,外涂内服药物效果均不明显。经用紫外线照射治疗 5 次后,皮损逐渐起皮,脱皮,继续治疗 3 次后,皮损全部脱去,1 年后随访未复发。

讨论 玫瑰糠疹是以皮肤上发生椭圆形或圆形、淡红或黄褐色斑片、上覆糠秕样鳞屑为主症,因其形似玫瑰而得名。经多年来的临床研究,大多数学者根据发病经过及表现认为系病毒感染所致。用红斑量紫外线分区照射治疗玫瑰糠疹是目前治疗该病行之有效的方法之一。紫外线照射可使局部血管扩张,促进血液循环,改善局部营养,刺激上皮和结缔组织生长,增强防御功能。反复用紫外线照射,可致皮肤对紫外线的敏感性逐渐降低,这主要是由于机体的保护性反应。因此,在紫外线治疗过程中,必须逐渐增大照射剂量,才能保持一定的反应强度,取得较好的治疗效果。

(收稿日期:2001-12-11)

(本文编辑:易 浩)