

高压氧联合抗震颗粒对帕金森病大鼠的神经保护作用研究

盘晓荣, 胡玉英, 樊秋萍, 俸道荣, 张青萍, 许立民

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:桂科自 0832209)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院高压氧科(盘晓荣, 樊秋萍, 俸道荣, 许立民); 530023 南宁, 广西中医学院第一附属医院神经内科(胡玉英, 张青萍)

作者简介: 盘晓荣(1966-), 女, 大学本科, 医学学士, 副主任医师, 研究方向: 神经系统疾病的高压氧基础与临床研究。E-mail: panxron@163.com

[摘要] 目的 探讨高压氧(HBO)联合抗震颗粒对帕金森病(PD)大鼠的神经保护治疗作用。方法 将采用 6-羟基多巴胺(6-OHDA)成功制作的 PD 大鼠模型, 随机分为模型组(A 组)及 HBO 联合抗震颗粒组(B 组), 用分光光度计检测两组谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性及丙二醛(MDA)含量的变化; 用免疫组化法测定黑质酪氨酸羟化酶(TH)阳性神经元、胶原纤维酸性蛋白(GFAP)及 Bcl-2、Bax 蛋白的表达。结果 B 组 GSH-Px、SOD 活性明显升高, MDA 含量降低($P < 0.05$)。TH 阳性神经元及 Bcl-2 蛋白表达升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)、GFAP 平均光密度及 Bax 蛋白的表达降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 HBO 联合抗震颗粒治疗 PD 大鼠, 能抑制大鼠脑部氧化应激反应, 提高大鼠的抗氧化及抑制细胞凋亡功能, 是一种有效的神经保护和治疗措施。

[关键词] 高压氧; 抗震颗粒; 帕金森病; 神经保护

[中图分类号] R 742.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2011)07-0593-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2011.07.01

Neuroprotective effect of hyperbaric oxygen combined with anti-parkinson granule in treating Parkinson's disease rats PAN Xiao-rong, HU Yu-ying, FAN Qiu-ping, et al. Department of Hyperbaric Oxygen, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To explore the neuroprotective effect of hyperbaric oxygen(HBO) combined with anti-parkinson granule on Parkinson's disease (PD) rats. **Methods** PD rat model was established by 6-OHDA. Model rats were randomly divided into 2 groups: model group(A) and treatment group(hyperbaric oxygen combined with anti-parkinson granule)(B). The changes of the activities of SOD and GSH-Px, the content of MDA were determined by using immunohistochemistry and the changes of expression of TH, GFAP, Bcl-2 and Bax protein were determined by using immunohistochemistry in PD rats. **Results** The changes of ethology appeared obviously. The activities of SOD and GSH-Px significantly increased, and the content of MDA decreased in HBO group compared to model group ($P < 0.05$). The activities of TH, Bcl-2 significantly increased, and the expression of GFAP, Bax protein content decreased in treatment groups compared with the model group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** Hyperbaric oxygen combined with anti-parkinson granule can restrain the degree of oxidative stress, elevate its antioxidant abilities and significantly restrain apoptosis in substantia nigra. It is an effective neuroprotective and therapeutic measure for PD model rats.

[Key words] Hyperbaric oxygen(HBO); Anti-parkinson granule; Parkinson's disease(PD); Neuroprotection

帕金森病(parkinson's disease, PD)是一种椎体外系的进行性变性疾病。近年来,随着临床应用经

验的积累,高压氧(hyperbaric oxygenation, HBO)在治疗 PD 中取得了一定的疗效^[1,2]。本研究采用 6-

羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)脑立体定向注入大鼠右侧中脑腹侧被盖区制作偏侧 PD 大鼠模型,观察 HBO 联合运用中医滋肾平肝、活血化瘀、化痰散结的中药复方抗震颗粒对中脑黑质抗氧化及细胞凋亡表达指标的影响^[3],以进一步探讨其抗氧化及抑制神经细胞凋亡的神经保护治疗作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 SPF 级雄性 wistar 大鼠,体重 250 ~ 290 g,鼠龄 12 ~ 15 W,购于广西医科大学医学试验动物中心,符合健康一级动物标准,合格证号:SCXK 桂 2009-0002。饲养条件:室温(25 ± 5)℃,湿度(60 ± 20)%。饲养食物为实验动物中心提供的饲料(成分有大米粉、玉米粉、奶粉、麦麸、多维素及盐等)。自由摄食、饮水。参照盘晓荣等^[4]的方法单点注射 6-OHDA 建立 PD 大鼠模型,将造模成功的 24 只大鼠,按照随机数字表随机分为模型组(A 组, $n = 12$)及 HBO 联合抗震颗粒组(B 组, $n = 12$)。其动物来源、等级、性别、鼠龄及造模条件等差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 药物 抗震颗粒为本实验室提取(药物由江苏天阴制药厂提供),成分为熟地黄 12 g、山药 0.6 g、山萸肉 2.5 g、枸杞 12 g、菟丝子 0.6 g、牛膝 3 g、白芍药 2.5 g、甘草 1.5 g、珍珠母 0.5 g、党参 4.5 g、制何首乌 1.5 g、肉苁蓉 3 g、补骨脂 1.5 g、益智仁 1.5 g、丹参 3 g、全蝎粉 0.5 g、粉葛根 3 g、鹿角胶 10 g、龟版胶 30 g,按照既定工艺煎成浓度为 0.5 g/ml 的混悬液供灌胃之用。

1.3 主要试剂与仪器 6-OHDA(批号 MKAA4439, Sigma 公司);丙二醛(malondialdehyde, MDA, 批号 20100417),谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px, 批号 20100521),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, 批号 20100521),试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。Anti-TYH/TH(批号 900888, 北京博奥森生物技术有限公司);Rabbit anti-GFAP(批号 10113505)、Rabbit anti-bax(批号 H0709)、Rabbit anti-bcl-2(批号 L0409),均购于北京中杉金桥生物技术有限公司;多聚甲醛(批号 F20080529, 国药集团化学试剂有限公司);03-Y900-001 型动物舱(烟台宏远氧业有限公司);SR-6N 型脑立体定位仪(日本);722S 可见分光光度计(上海);CX41 奥林巴斯生物显微镜(德国);PMR + Q550 病理图像分析仪(德国)等。

1.4 实验方法

1.4.1 给药方法 A 组每只鼠予生理盐水 2 ml/(100 g · d)灌胃;B 组每只鼠予抗震颗粒 10g 生药/(kg · d)灌胃,同时予 HBO 处理(将大鼠置于动物舱内,先用纯氧洗舱 10 min,然后按 100 kPa/min 速率升压致 0.25 MPa,并在高压下停留 60 min 吸舱内氧气,然后以 10 min 匀速减压至常压后动物出舱,1 次/d,共处理 14 d)。

1.4.2 大鼠处理与取材 每组随机抽出 6 只($n = 6$)大鼠,深度麻醉后立即断头取脑,根据脑立体定位图谱^[5]置于冰盘上小心分离中脑黑质组织,制备脑组织匀浆液。再取剩下的 6 只($n = 6$)大鼠深度麻醉后仰卧固定,快速开胸暴露心脏,直视下将穿刺针经左心室刺入升主动脉,先用 37℃ 生理盐水 250 ml 快速冲洗,再灌注 4% 多聚甲醛(PBS, 0.1 M, pH 7.4)250 ml,先快后慢,全灌注时间为 1 h,然后开颅分离出黑质置于 4% 的多聚甲醛中固定、脱水、石蜡包埋备用。

1.4.3 GSH-Px 和总 SOD(包括 Mn-SOD 和 Cu/Zn-SOD 两种)活性及 MDA 含量的分光光度计测定 取适量脑组织匀浆上清液按试剂盒说明书分别测定 GSH-Px、Mn-SOD、Cu/Zn-SOD 和 MDA 的含量。

1.4.4 免疫组织化学染色及图像分析 将石蜡包块进行超薄切片,参照免疫组织化学法分别进行 TH、GFAP、Bcl-2 和 Bax 染色后,中性树脂封片。每张切片在 400 倍相差显微镜下,取 4 个黑质不重叠视野,采用数码医学图像分析系统,统计出切片中 TH 阳性神经元数量(个/HP)和 GFAP 平均光密度(GFAP 阳性区域光密度—GFAP 背景光密度)以及黑质 Bcl-2、Bax 阳性神经元的细胞千分率(‰,采用半定量计数法在病理图像分析仪下观察,在每张玻片上,分别随机选择 10 个区域,每个区域计数 100 个细胞,然后加在一起统计出每千个黑质细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白阳性表达的细胞数),并计算其均数。

1.5 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件完成数据资料的统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 PD 大鼠治疗后脑毁损侧(右侧)黑质抗氧化指标测定结果比较 B 组与 A 组比较,其 GSH-Px、总 SOD 活性、Mn-SOD 活性升高,而 MDA 含量降低(P 均 < 0.05)。见表 1。

表 1 两组 PD 大鼠治疗后脑毁损侧黑质抗氧化指标测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(n)	GSH-Px(U/mg)	总 SOD(NU/mg)	Cu/Zn-SOD(NU/mg)	Mn-SOD(NU/mg)	MDA(nmol/mg)
A 组	6	249.23 ± 118.01	123.89 ± 13.81	32.20 ± 16.22	91.69 ± 16.25	10.68 ± 0.82
B 组	6	393.07 ± 94.71	181.28 ± 34.81	32.60 ± 20.74	148.68 ± 47.54	6.83 ± 1.36
t	-	2.3285	3.7538	0.0372	2.7786	5.9383
P	-	0.0422	0.0038	0.9710	0.0195	0.0001

2.2 两组 PD 大鼠治疗后毁损侧(右侧)中脑黑质区域 TH、GFAP、Bax、Bcl-2 含量变化比较 B 组与 A 组比较, B 组 TH 阳性细胞数量及 Bcl-2 蛋白表达

均明显升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而 GFAP 平均光密度、Bax 蛋白表达明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组 PD 大鼠治疗后毁损侧中脑黑质区域 TH、GFAP、Bcl-2、Bax 含量变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	TH 阳性细胞(个/HP)	GFAP(平均光密度)	Bax(%)	Bcl-2(%)
A 组	6	23.50 ± 4.51	64.17 ± 24.13	174.64 ± 86.18	155.7 ± 23.76
B 组	6	55.17 ± 14.33	22.50 ± 7.71	93.28 ± 20.07	203.33 ± 40.33
t	-	5.1638	4.0293	2.2522	2.4925
P	-	0.0004	0.0024	0.048	0.0319

3 讨论

3.1 PD 的病理特征是中脑黑质多巴胺能神经元的进行性变性, 由于目前治疗措施都只能是控制其临床症状, 而不能阻止神经元的变性。因此, 探讨阻止 PD 变性过程的神经保护治疗措施正越来越多地被人们重视。保护性治疗旨在通过尽可能消除 PD 病因或干预其发病机理来阻止疾病发生或至少减慢疾病的进展^[6]。其神经保护治疗包括抗氧化、拮抗兴奋性毒性作用、补充神经营养因子、改善线粒体能量代谢、抗炎治疗、抗凋亡治疗、免疫治疗、中药的保护治疗、细胞移植或基因治疗以及脑深部电刺激的保护作用等^[7]。

3.2 PD 属中医学“颤证”范畴, 病本在于肝肾不足、气血两亏, 病标在于风火痰瘀^[8]。为此, 我们确立了滋养肝肾、熄风通络这一基本治疗方案。本研究抗震颗粒方中熟地黄补肾益精、滋阴养血; 山药、党参健脾益气; 山萸肉、枸杞、制何首乌滋补肝肾; 肉苁蓉益肾填精; 白芍和血益气敛阴; 丹参活血通经; 珍珠母定惊止颤、养血舒筋; 全蝎熄风祛瘀; 菟丝子与牛膝健筋骨; 龟板胶与鹿角胶益精填髓; 诸药共用可以收到综合之功效。

3.3 在 HBO 下, 氧弥散进入缺氧脑区的能力增强, 使脑组织含氧量增加, 改善脑组织缺氧状态, 使受损的多巴胺能神经元功能恢复。同时, HBO 可兴奋交感-肾上腺髓质系统, 使肾上腺素-多巴胺分泌增加, 症状获得改善^[9]。HBO 还可使线粒体三磷酸腺苷(ATP)酶活性增强, 加速信息传递过程, 使 ATP 产

生增加, 恢复大脑神经元的能量供应^[10]。另外 HBO 可增加血脑屏障通透性, 促进血液中的药物更易通过血脑屏障进入脑细胞^[11], 更好地发挥药物的生物活性, 因而增强抗震颗粒的药效等。

3.4 SOD 和 GSH-Px 是体内重要的氧自由基清除剂, 其活力的高低直接或间接地反映了组织抗氧化损伤能力。MDA 为体内脂质过氧化反应的最终代谢产物, 其水平高低间接反映了组织受自由基攻击程度^[12]; 中脑 TH 免疫反应阳性神经元为 DA 神经元^[13], 亦即是神经凋亡细胞; GFAP 是星形胶质细胞(可分泌细胞因子诱导免疫炎症反应参与 DA 神经元的损伤过程)的特异性标志物^[14], 而 Bcl-2 和 Bax 是两种功能相反的与细胞凋亡相关的基因(Bcl-2 是抗凋亡基因, Bax 是促凋亡基因)^[15]。鉴于此, 我们应用分光光度计检测 PD 大鼠毁损侧中脑黑质区域内总 SOD、GSH-Px 和 MDA 含量; 免疫组织化学法检测 TH 阳性细胞数量、GFAP、Bcl-2 和 Bax 的表达, 观察 HBO 联合抗震颗粒治疗对上述 7 个指标的影响, 为研究其是否具有神经保护治疗作用提供充足的理论和实验依据。

3.5 本研究中模型组毁损侧中脑黑质 GSH-Px 为(249.23 ± 118.01), 总 SOD 为(123.89 ± 13.81), 而经 HBO 联合抗震颗粒治疗后, 其含量均有不同程度的升高, 而 MDA 的含量下降(P 均 < 0.05), 提示 HBO 联合抗震颗粒治疗后, PD 黑质内抗氧化系统功能增强, 脑部氧化应激反应受抑制, 从而提高了机体的抗氧化和清除自由基的能力。本实验中 Cu/

Zn-SOD 活性的变化不明显, A 组为 (32.20 ± 16.22) , B 组为 (32.60 ± 20.74) , 两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 Mn-SOD 含量的升高较明显, 总 SOD 及 GSH-Px 活性的变化较显著 ($P < 0.05$), 说明 Mn-SOD 及 GSH-Px 的活性较为敏感。

3.6 本实验观察到 PD 模型鼠经 HBO 联合抗震颗粒治疗后, PD 大鼠 GFAP 平均光密度表达明显降低, TH 神经元数目有一定程度的升高 ($P < 0.05$), 提示 HBO 联合抗震颗粒治疗可抑制星形胶质细胞的增生及由其引发的免疫炎症反应, 增加了 PD 大鼠多巴胺神经元数量, 从而起到保护多巴胺能神经元的作用。

3.7 本实验还观察到模型组大鼠经 HBO 联合抗震颗粒治疗后, Bcl-2 蛋白表达明显升高, Bax 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 显示 HBO 联合抗震颗粒能在一定程度上促进中脑黑质内 Bcl-2 基因和抑制 Bax 基因的表达, 亦即抑制神经细胞发生凋亡。

综上所述, HBO 联合抗震颗粒治疗可通过提高黑质内 GSH-Px、总 SOD 的含量, 减轻脂质过氧化损伤, 加快自由基清除速度, 增强多巴胺能神经元对 6-OHDA 的耐受能力, 抑制星形胶质细胞增生及细胞凋亡, 从而在一定程度上保护多巴胺能神经元, 促进其神经功能恢复, 改善临床症状。在 PD 大鼠治疗中发挥了抗氧化、改善线粒体能量代谢、抗凋亡及中药等多方面神经保护调节作用, 符合神经保护性治疗方案, 是一种有效的神经保护和治疗措施, 为临床 PD 患者的早期治疗和预防提供了新的理论依据。

参考文献

- 1 杨丽丽, 李振光, 高厚超. 高压氧综合治疗帕金森病疗效观察[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2006, 13(4): 255-256.

- 2 盘晓荣, 覃少清, 黄剑平, 等. 高压氧联合左旋多巴/卡丝肼治疗老年帕金森病的疗效观察[J]. 临床荟萃, 2009, 24(14): 1273-1274.
- 3 何建成. 帕金森病中医药治疗的再思考—兼谈“滋肾平肝, 化痰活血化痰, 解毒散结”是帕金森病的基本治疗法则[J]. 中医药通报, 2005, 4(1): 12-14.
- 4 盘晓荣, 胡玉英, 俸道荣, 等. 单点注射 6-羟基多巴胺成功建立帕金森病大鼠模型的实验研究[J]. 中国临床新医学, 2010, 3(10): 933-937.
- 5 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: 49-58.
- 6 蔡海鸥. 帕金森病肢体震颤和运动障碍的康复[J]. 现代康复, 2000, 4(2): 184-186.
- 7 侯颖, 张本恕. 帕金森病的神经保护治疗[J]. 国外医学·老年医学分册, 2006, 27(3): 102-105.
- 8 鲍远程, 周厚广, 汪瀚. 抗震止痉胶囊合谷胱甘肽对帕金森病患者血抗氧化酶影响[J]. 安徽中医学院学报, 2001, 20(4): 11-15.
- 9 吴钟琪. 医用高压氧临床手册[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001: 172.
- 10 Henchcliffe C, Schumacher HC, Burgut FT. Recent advances in Parkinson's disease therapy: use of monoamine oxidase inhibitors[J]. Expert Rev Neurother, 2005, 5(6): 811-821.
- 11 王强, 刘垒. 高压氧医学教程[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2006: 31.
- 12 何建成, 袁灿兴, 李亚明, 等. 滋补肝肾通络解毒中药对帕金森病动物模型氧化应激反应的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2003, 22(3): 160-163.
- 13 邓汝东, 李伊为, 汪华侨, 等. 重复注射 6-羟基多巴胺建立帕金森病大鼠模型[J]. 解剖学研究, 2007, 29(6): 401-404.
- 14 肖春苟, 沈伟哉, 郭国庆, 等. 应用 6-羟基多巴胺建立帕金森病模型大鼠黑质神经组织病理学变化[J]. 广东医学, 2009, 30(10): 1432-1434.
- 15 高国标. 帕金森病诊疗关键[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2004: 33-34.

[收稿日期 2011-04-12][本文编辑 宋卓孙 韦颖]

《中国临床新医学》杂志投稿须知

凡投本刊的稿件, 务请补全以下内容与项目:

1. 中文摘要、关键词(按规范格式书写)。
2. 英文题目, 作者(汉拼), 英文单位名称, 英文摘要和关键词(按规范格式书写)。
3. 论文的统计学处理方法。
4. 单位投稿介绍信。
5. 作者简介(姓名、出生年月、性别、学历、学位、职称、研究方向)。
6. 须寄(送) A4 纸打印稿一份, 并发电子邮件到本编辑部。
6. 第一作者联系地址、邮编、电话和 E-mail。

· 本刊编辑部 ·