

6-OHDA 诱导帕金森病大鼠模型行为学及脑内神经递质的动态变化

孙玉芝¹, 赵贝贝², 雒晓东¹

1. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510120; 2. 深圳市宝安区中医院, 广东 深圳 518113

[摘要] 目的: 观察 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 诱导帕金森病大鼠模型 (PD) 不同时间点行为学及左侧纹状体内多巴胺 (DA) 和乙酰胆碱 (ACh) 含量的变化。方法: 采用 6-OHDA 左侧纹状体两点注射法建立 PD 大鼠模型, 观察术后不同时间点大鼠经阿扑吗啡 (APO) 诱导出现旋转行为改变, ELISA 法测定各时间点大鼠左侧纹状体区 DA 和 ACh 含量, HE 染色观察左侧中脑黑质区多巴胺能神经细胞的病理形态学改变。结果: 行为学方面: 假手术组各时间点大鼠经 APO 诱导无旋转行为; 6-OHDA 组大鼠经 APO 诱导出现异常旋转行为, 48 h 后右侧旋转速度逐渐增快, 4 周右侧旋转速度达到高峰, 4 周到 8 周恒定右侧旋转速度稳定。DA 和 ACh 含量变化: 假手术组各时间点 DA 和 ACh 无明显变化。6-OHDA 组造模术后 6h, DA 含量降低, 术后 1 周、2 周、4 周 DA 含量明显减少, 术后 4 周与 8 周 DA 含量比较无明显差异。HE 染色: 假手术组各时间点左侧黑质区神经元细胞形态正常。6-OHDA 组 6 h 少量神经细胞肿胀, 24 h、48 h、1 周可见大量神经细胞肿胀, 部分核裂变, 胶质细胞增多, 2 w 时神经细胞肿胀减轻, 核仁明显偏移或破裂, 神经元数量减少, 4 周、8 周神经细胞凝固性坏死, 伴有大量胶质细胞弥漫性或局限性增生。结论: 6-OHDA 组造模后, 随着造模时间延长, 大鼠左侧纹状体内 DA 含量逐渐下降, ACh 含量逐渐上升, 于术后 4 周达到稳定状态, 与大鼠右侧旋转行为表现一致; HE 染色见左侧纹状体神经元随时间延长表现为变性、坏死, 胶质细胞增生。

[关键词] 帕金森病; 6-羟基多巴胺 (6-OHDA); 多巴胺 (DA); 乙酰胆碱 (ACh); 动物实验; 雄性大鼠

[中图分类号] R742.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2016) 09-0225-06

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.09.099

The Behavioristics of Parkinson's Disease Rat Model Induced by 6-OHDA and Dynamic Change of Neurotransmitter

SUN Yuzhi, ZHAO Beibei, LUO xiaodong

Abstract: Objective: To observe behavioristics of Parkinson's disease (PD) rat model induced by 6-OHDA on different time point and levels of dopamine (DA) and acetyl choline (ACh) inside left corpus striatum. Methods: Established PD rat model by 6-OHDA two points injection on left corpus striatum. Rotational behavior changes of rats were observed after induction on different time point after injection. DA and ACh content of left corpus striatum on different time point were detected by ELISA method, pathomorphism change of dopaminergic nerve cell of left midbrain nigra area by HE coloration. Results: The rats in sham-operation group have no rotational behaviors after apomorphine (APO) induction on every time point. The rats in 6-OHDA group have abnormal rotational behaviors after APO induction, rotational speed on the right side increased gradually after 48h, rotational speed on the right side peaked after 4-week, constant rotational speed remains stable from 4-week to 8-week. Contents of DA and ACh in sham-operation group have no obvious changes on every time point. Six hours after modeling, DA contents in 6-OHDA group were decreased, 1-week, 2-week and 4-week after operation, DA contents were decreased obviously. There have no obvious difference of DA contents between 4-week and 8-week after operation. Neuron cells morphology was normal on left substantia nigra in sham-operation group. A few of neuron cells was swelling in 6-OHDA group after 6h, a large number of neuron cells swelling could be found after 24h, 48h and 1-week, in which there were nuclear fission, and number of gliocyte were increase. The neuron cells swelling were relieved after 2-week, nucleolus were skewed or broke obviously, number of neuron cells were decreased, neuron cells were appeared coagulative necrosis after 4-week and 8-week, a large number of gliocyte were appears diffuse or focal hyperplasia. Conclusion: After modeling, with modeling time increase, DA content in left corpus striatum of 6-OHDA group were decreased gradually, ACh content

[收稿日期] 2016-04-06

[基金项目] 广东省中医药局建设中医强省科研课题 (20132150)

[作者简介] 孙玉芝 (1978-), 女, 主治医师, 研究方向: 中医药治疗帕金森病的临床与实验研究。

[通讯作者] 雒晓东, E-mail: 64699609@qq.com。

were increased gradually, and comes to steady state after 4h of operation, which correspond with rotational behaviors of right side. The left corpus striatum neuron cells were shown degeneration during coloration, necrosis and gliocyte proliferation over time.

Keywords: Parkinson's disease (PD); Hydroxydopamine (6-OHDA); Dopamine (DA); Acetyl choline (Ach); Animal experiment; Male rat

多巴胺(DA)和乙酰胆碱(Ach)是黑质-纹状体神经通路内两种重要神经递质,有实验研究表明,当多巴胺能神经元减少60%~80%,DA含量下降到正常的30%,突触处DA含量减少消失,对突触后结构抑制作用消除,导致Ach功能过度活化,两者失衡就会出现帕金森(PD)症状^[1-2],6-羟基多巴胺(6-OHDA)立体定向损毁黑质纹状体建立偏侧PD大鼠模型是目前应用最为广泛的动物模型之一。本实验采用左侧纹状体两点注射6-OHDA法建立PD大鼠模型,术后不同时间点观察PD大鼠纹状体DA与Ach含量的变化、行为学变化以及中脑黑质区病理形态学变化,以评估PD大鼠模型的稳定性及提示最佳干预时间,为临床实验提供可参考的依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 健康雄性SPF级SD大鼠133只,体重 220 ± 20 g,实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2008-0094。大鼠饲养在广东省中医药科学院SPF级实验动物中心,自由饮水、进食。

1.2 仪器和试剂 主要仪器:TL-251603型大鼠脑立体定位仪、YD-129智能生物组织脱水机、YD-6L石蜡包埋冷冻机、YD-AB石蜡切片机、XS-105DU精密分析天平。主要实验试剂:6-羟基多巴胺(6-OHDA)、阿扑吗啡(APO)、抗坏血酸、苏木素染液、大鼠乙酰胆碱(ACh)酶联免疫试剂盒、大鼠多巴胺(DA)酶联免疫试剂盒。配制试剂:①10%水合氯醛溶液:水合氯醛10 g,生理盐水稀释并定容至100 mL,于4℃冰箱保存;②6-OHDA溶液:5 mg 6-OHDA溶解于含0.02%抗坏血酸的生理盐水至1 mL,迅速分装,锡箔纸包裹避光,-20℃冰箱保存备用。

2 实验方法

2.1 动物分组 雄性SD大鼠133只常规饲养1周,大鼠称重后按照体重从轻到重进行标号,随机分为假手术组和6-OHDA组,然后按照术后6 h、24 h、48 h、1周、2周、4周、8周分为7个亚组,6-OHDA组各时间点11只和假手术组各时间点8只。

2.2 6-OHDA诱导PD动物模型制备 所有大鼠造模前经APO(0.5 mg/kg)颈背部皮下注射诱发,确定无异常旋转行为。采用左侧纹状体两点注射6-OHDA法制备PD模型。大鼠以10%水合氯醛(0.35 mL/kg)腹腔注射麻醉后,俯卧位固定于脑立体定位仪上,头顶毛发备皮,切开皮肤,充分暴露前囟、正中缝、人字缝,调整前囟与人字点处于同一水平。记录前囟坐

标,参照 Paxions 大鼠脑立体定位图谱^[3],确定左侧纹状体两点坐标,坐标1:前囟前1.2 mm,矢状缝左侧2.2 mm,硬膜下4.0~6.0 mm;坐标2:前囟后1.0 mm,矢状缝左侧4.4 mm,硬膜下4.5~6.5 mm(见图1,图2)。微量进样器吸取6-OHDA溶液(5 ug/uL)3 μL,分别缓慢进针达6.0 mm和6.5 mm处,在4.0~6.0 mm和4.5~6.5 mm之间以1 μL/min速度注射,注射完毕后留针15 min,然后以1.0 mm/min速度缓慢退针。伤口处涂抹适量红霉素软膏,腹腔注射青霉素防止感染,术中、术后注意动物保暖,待动物清醒后放回饲养笼中饲养。

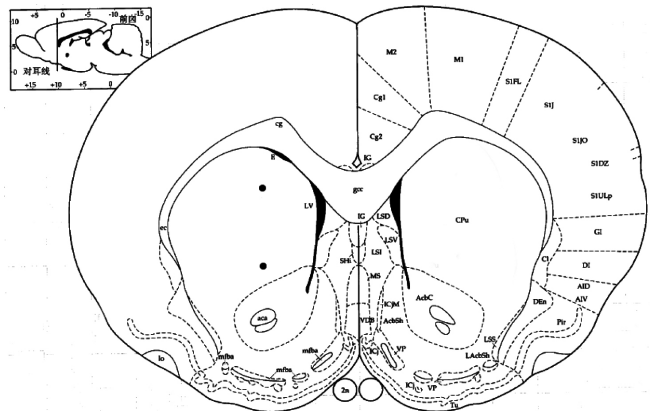


图1 左侧纹状体坐标

1:前囟前1.2 mm,矢状缝左侧2.2 mm,硬膜下4.0 mm~6.0 mm

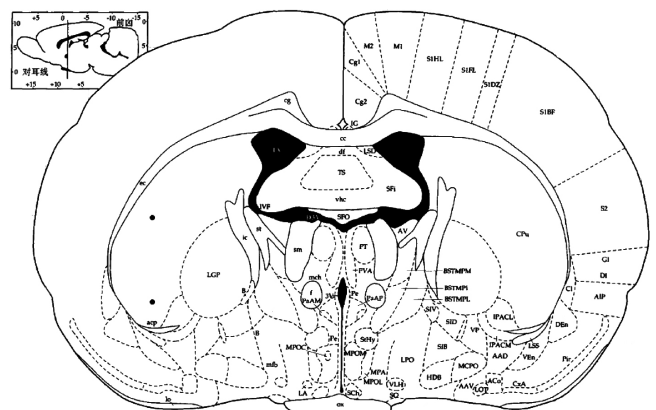


图2 左侧纹状体坐标

2:前囟后1.0 mm,矢状缝左侧4.4 mm,硬膜下4.5 mm~6.5 mm

2.3 假手术组动物制备 假手术组左侧纹状体两点坐标定位同6-OHDA组模型制备。假手术组大鼠左侧纹状体内两点分别注射含0.02%抗环血酸生理盐水溶液3 μ L,操作步骤同PD模型制备。

2.4 大鼠旋转行为学检测 相应时间点取材前进行APO诱发旋转行为学检测。受试大鼠颈背部皮下注射APO(0.5 mg/kg),记录开始旋转后30 min内旋转圈数,计算旋转速度,并观察其行为表现。

2.5 标本采集 术后相应时间点取材,6-OHDA各时间点造模成功和假手术组分别抓取6只大鼠腹腔注射10%水合氯醛,深度麻醉后,立即断头取脑,在冰上迅速分离出大鼠左侧纹状体,称重,-80 $^{\circ}$ C冰箱保存待测。各组中剩余大鼠腹腔注射10%水合氯醛深度麻醉后,先后灌注生理盐水、4 $^{\circ}$ C 4%多聚甲醛溶液(200~250 mL),当大鼠全身僵硬表示灌注完成,然后迅速断头取鼠脑切取中脑部位,置于4%多聚甲醛固定液于4 $^{\circ}$ C冰箱过夜,梯度脱水,石蜡包埋,依据图谱于黑质部位连续切片进行HE染色。

2.6 ELISA法测定大鼠左侧纹状体组织裂解液中DA、ACh含量 用纯化的抗体包被微孔板,制成固相载体,向包被抗DA、ACh抗体的微孔中依次加入标本或标准品、生物素化的抗DA、ACh抗体、HRP标记的亲合素,TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,经过彻底洗涤后用底物TMB显色,并在酸作用下最终转化成黄色。颜色深浅和样本中DA、ACh呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度(OD值),计算出样本浓度。

2.7 大鼠中脑黑质致密部HE染色 中脑组织块经4%多聚甲醛内外固定后,全自动组织脱水机脱水,石蜡包埋,石蜡切片、染色。

2.8 统计学方法 采用SPSS13.0统计软件处理数据,定量资料数据采用($\bar{x} \pm s$)表示;各组数据符合正态分布和方差齐性,采用单向方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用最小显著差值法;若数据不符合正态分布和方差齐性,则采用非参数检验,两组间比较采用两独立样本非参数检验。

3 实验结果

3.1 大鼠行为学测试结果 见表1,表2。假手术组造模后6 h、24 h、48 h出现少动、拒食、竖毛表现,1周、2周、4周、8周的大鼠无异常行为表现。假手术组各时间点大鼠给予APO颈背部皮下注射未出现异常旋转行为。

6-OHDA组大鼠出现不同程度倦卧、少动、运动迟缓、自发性右侧旋转行为(向健侧旋转)、尾僵,给予APO颈背部皮下注射后首先出现木僵、弓背或颤抖,1~5 min后出现典型右侧旋转行为,少数出现向右侧小环形运动,常伴竖毛、搔耳、咬足、身体翻转、易激惹、嗅探、觅食、闭眼、洗脸样等动作,少数大鼠出现恒定左旋行为。6-OHDA组24 h与6 h大鼠右侧旋转速度比较,差异无统计学意义($P>0.05$);48 h、1周、2周、4周旋转速度逐渐增快,分别与相应前一时间点比较,差异有统计学意义($P<0.05$);4周旋转速度达到高峰,4周与8周恒定右侧旋转速度比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.2 大鼠左侧纹状体DA与ACh含量动态变化 见表3。假手术各时间点DA、ACh含量比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。6-OHDA组术后6 h DA含量降低,与假手术组6 h比较,差异有统计学意义($P<0.05$);6-OHDA组术后24 h、48 h DA含量无明显变化;6-OHDA组术后1周、2周、4周DA含量明显降低,分别与相应前一时间点比较,差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);6-OHDA组术后4周与8周DA含量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。6-OHDA组术后6 h、

表1 术后不同时间点APO诱发大鼠旋转行为表现

组别	术后时间	恒定右侧旋转(只)	恒定右侧旋转(只)	右侧小环形运动(只)	恒定左侧旋转(只)	无旋转(只)
		($\geq 7r/min$)	(4-7r/min)	($\geq 7r/min$)		(<4r/min)
假手术组	6 h	0	0	0	0	8
	24 h	0	0	0	0	8
	48 h	0	0	0	0	8
	1 w	0	0	0	0	8
	2 w	0	0	0	0	8
	4 w	0	0	0	0	8
	8 w	0	0	0	0	8
	6-OHDA组	6 h	5	2	1	1
24 h		5	1	2	1	2
48 h		7	0	1	1	2
1 w		8	1	1	0	1
2 w		8	2	0	0	1
4 w		8	1	1	0	1
8 w		9	1	0	0	1

表2 术后不同时间点 APO 诱发大鼠恒定右侧旋转速度(r/min)($\bar{x} \pm s$)

组别	术后时间	恒定右侧旋转大鼠只数	30min 平均旋转速度(r/min)
假手术组	6 h	0	0
	24 h	0	0
	48 h	0	0
	1 w	0	0
	2 w	0	0
	4 w	0	0
	8 w	0	0
	6-OHDA组	6 h	8
24 h		8	6.88± 1.55 ^①
48 h		8	9.13± 1.46 ^{②③}
1 w		8	11.38± 2.50 ^{②③}
2 w		8	13.50± 1.77 ^{②③}
4 w		8	15.63± 2.66 ^{②③}
8 w		9	16.78± 2.11 ^④

注：6-OHDA组 6 h、24 h、48 h 各时间点的大鼠只数包括恒定右侧旋转 4~7 r/min 及恒定右侧小环形运动的大鼠。与假手术组各相应时间点比较，^① $P < 0.05$ ；与同组各前一个时间点比较，^② $P < 0.05$

24 h Ach 含量无明显变化，与假手术组相应时间点比较，差异均无统计学意义($P > 0.05$)；6-OHDA 组术后 48 h、1 周、2 周、4 周 Ach 含量明显升高，分别与相应前一时间点比较，差异均有统计学意义($P < 0.05$)；6-OHDA 组术后 4 周与 8 周 Ach 含量比较，差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3.3 大鼠左侧中脑黑质致密区 HE 染色光镜下观察 见图 3。光镜下观察，假手术组各时间点左侧黑质区组织结构清晰，神经元形态完整，排列整齐，数量多，细胞核清晰，核

表3 不同时间点大鼠左侧纹状体区 DA、Ach 含量比较($\bar{x} \pm s$) ng/mL

组别	术后时间	样本数(只)	DA	Ach
假手术组	6 h	6	12.38± 1.45	19.53± 3.60
	24 h	6	12.20± 1.04	19.04± 3.51
	48 h	6	12.83± 1.12	19.98± 3.17
	1 w	6	12.57± 1.30	19.72± 2.88
	2 w	6	12.18± 1.39	18.27± 2.17
	4 w	6	12.07± 1.24	18.67± 1.01
	8 w	6	12.37± 1.36	19.05± 2.57
	6-OHDA组	6 h	6	10.73± 1.34 ^①
24 h		6	9.23± 1.02 ^②	20.48± 2.90
48 h		6	8.65± 0.98	23.12± 1.73 ^②
1 w		6	7.13± 0.61 ^②	26.32± 1.64 ^②
2 w		6	5.43± 0.95 ^③	29.47± 2.36 ^②
4 w		6	3.23± 0.45 ^③	32.85± 1.82 ^②
8 w		6	3.20± 0.50	32.87± 2.70

与假手术组 6 h 比较，^① $P < 0.05$ ；与同组各前一个时间点比较，^② $P < 0.05$ ，^③ $P < 0.01$

仁明显，神经纤维排列整齐且结构紧密。6-OHDA 组 6 h 可见部分神经细胞形态正常，少量神经细胞肿胀，胞核稍大；24 h、48 h 可见大量神经细胞胞体肿胀，细胞核变大，核呈空泡状，部分出现核裂解，部分胞体溶解，胶质细胞增多；1 周可见神经细胞水肿稍减轻，神经细胞数目明显减少，部分神经细胞周围出现 4~6 个胶质细胞围绕，形成卫星现象；2 周见神经细胞肿胀减轻，核仁明显偏移或破裂；随着造模时间延长，神经元数量减少，4 周、8 周见神经细胞凝固性坏死，核仁不明显，并伴有大量胶质细胞弥漫性或局限性增生，可见胶质细胞进入坏死神经细胞的胞体或突起中，形成噬神经细胞现象。

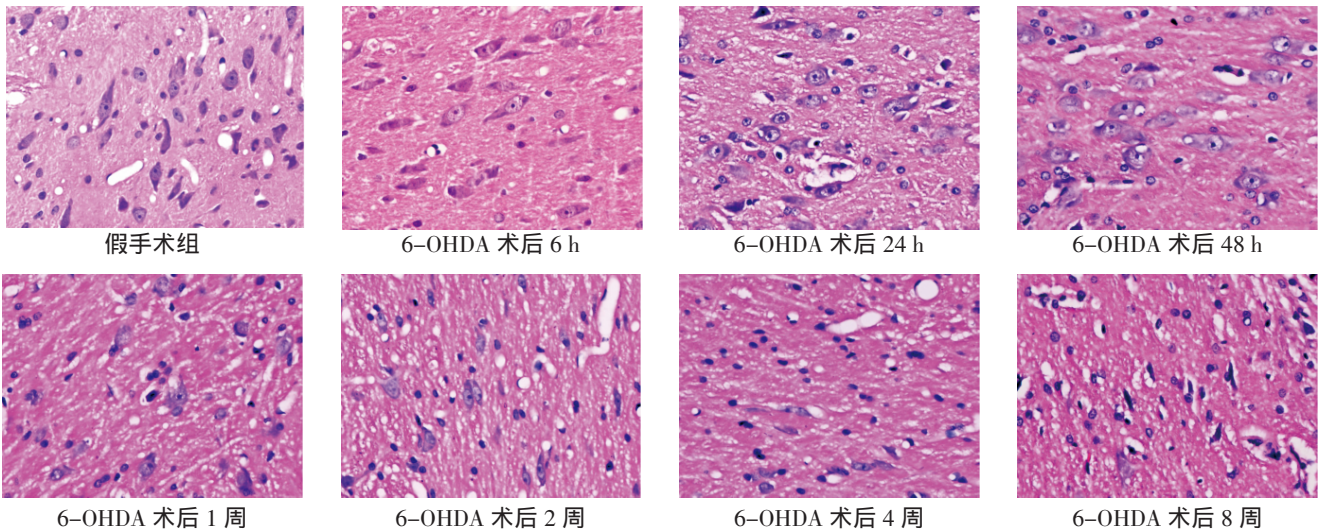


图3 HE 染色观察大鼠左侧中脑黑质区神经元形态变化(400x)

4 讨论

6-OHDA 立体定向损毁黑质纹状体建立偏侧 PD 大鼠模型是目前应用最为广泛的动物模型之一。6-OHDA 立体定向注射单侧黑质纹状体系统,多巴胺能神经细胞被选择性毁损,使得两侧大脑半球机能不对称,损毁侧 DA 含量减少,引起偏侧损伤。给予多巴胺受体激动剂 APO 皮下注射后,出现向健侧旋转。已有研究表明,黑质纹状体系统损毁程度与 APO 诱导后大鼠健侧旋转圈数呈正相关^[4]。且出现旋转行为可以量化,持续时间长,易于观察,是评价和筛选治疗 PD 药物疗效的可靠指标。

实验发现,假手术组 6 h、24 h、48 h 时间点,大鼠出现少动、拒食、竖毛等症状,这些表现是手术对机体创伤所引起。假手术组 1 周、2 周、4 周、8 周时间点,大鼠无异常表现,活动自如,各时间点给予 APO 后未见异常旋转行为。而 6-OHDA 组注射 6h 后出现少动、拒食、竖毛的表现,经 APO 颈背部皮下注射后,5 只大鼠出现典型右侧旋转行为,且旋转速度 ≥ 7 r/min,2 只大鼠有典型右旋行为,旋转速度为 4-7 r/min,1 只大鼠表现为右侧小环形运动,速度 ≥ 7 r/min,1 只出现恒定左侧旋转,2 只无旋转行为,说明 6-OHDA 注入纹状体后,通过黑质纹状体通路的转运,迅速对黑质多巴胺能神经元造成损伤。由于大鼠个体差异及对药物的敏感程度不同,部分药物尚未转运至中脑黑质,以及手术过程中药物损耗均可造成损伤程度不同。24 h 大鼠平均旋转速度与 6 h 组无显著差异,考虑在损伤初期,损伤侧代偿性分泌 DA 以维持两侧 DA 含量平衡。随着术后时间延长,大鼠恒定右侧旋转速度逐渐加快,4 周达到高峰,8 周与 4 周比较无显著差异。通过中脑黑质组织 HE 染色,可以看到,6-OHDA 组术后 6 h 即见到部分神经细胞出现急性水肿,24 h、48 h、1 周神经细胞水肿均较明显,随后神经细胞水肿逐渐减轻,4 周、8 周神经细胞凝固坏死,大量胶质细胞增生。因此,我们可以认为 6-OHDA 纹状体注射 6 h 即对黑质多巴胺能神经元造成急性损伤,4 周后大鼠旋转速度达到稳定状态。

假手术组大鼠各时间点 DA 和 Ach 含量未见明显变化。而 6-OHDA 组注射造模术后 6 h 即可见 DA 含量下调,48 h 与 24 h 比较有下降趋势,但无统计学差异,考虑 6-OHDA 注射早期,机体应激反应导致代偿性的 DA 分泌增多,随着造模时间延长,纹状体区 DA 含量逐渐下降,术后 4 周、8 周 DA 含量没有显著性差异。Ach 含量在术后 6 h、24 h 与相应假手术组时间点比较无显著性差异,48 h Ach 明显上调,随着造模时间延长,1 周、2 周、4 周呈现梯度上升,4 周达到顶峰,8 周与 4 周比较无显著差异。由此可见,纹状体内 DA 含量随着 PD 病情进展逐渐下降,Ach 在初期没有明显变化,随后逐渐升高。DA 含量下降,引起 Ach 含量相对升高,随着多巴胺神经元损伤加重,DA 含量减少,对 Ach 拮抗作用大大降低,Ach 含量绝对升高,造成两种递质比例严重失调。曹非^[5]等将

6-OHDA 注射入黑质致密部、中脑腹侧被盖部,发现在术后 7 天、14 天、21 天纹状体 Ach 含量逐渐增加,且大鼠旋转圈数也不断增加,与本次实验研究结果较为一致。因此根据大鼠旋转行为学和纹状体区 DA、Ach 含量动态变化,6-OHDA 造模术后 4 w,模型可达到相对稳定状态,且随时间延长,未见损伤有好转趋势,因此认为造模 4 周-8 周是药物干预及疗效评价的最佳时间窗。

目前采用 6-OHDA 建立 PD 大鼠模型被研究者广泛使用,但由于动物个体因素、注射部位、注射剂量、定位的准确性以及个体操作技术等因素影响,模型成功率不尽相同,差别较大,本实验造模成功率可达 90%(6 h、24 h、48 h 时间点大鼠经 APO 诱发右侧旋转速度 ≥ 4 r/min;1 周、2 周、4 周、8 周大鼠右侧旋转速度 ≥ 7 r/min 判定造模成功)。总结实验体会有以下几点:①选择动物性别问题。研究发现,雌激素可以调节 DA 释放和摄取,Becker^[6]等研究发现雌激素可以减轻 6-OHDA 造成的大鼠纹状体 DA 损耗。此外,雌激素具有抗凋亡、抗氧化、抗炎、维持细胞内 Ca^{2+} 稳态,抗神经萎缩等作用^[7-10]。故实验选用雄性大鼠。②定位准确。准确定位前囟和人字点,并调整门齿杆,确保颅骨水平位。由于微量注射器针头较细,易弯曲,不易准确定位,因此我们采用 1 mL 注射器针头更有利于定位准确。③6-OHDA 溶液配制。由于 6-OHDA 易于氧化,配制时注意避光,选用含 0.02% 抗坏血酸生理盐水,将 5 mg 6-OHDA 一次性溶解,浓度为 5 ug/uL,然后快速分装,避光保存于 -20℃ 冰箱。此溶液配制严格操作能够最大程度保证 6-OHDA 药物有效浓度。④关于微量注射器。使用前注意检查针头是否通畅和垂直,抽取溶液时注意避免空气进入,抽取溶液后微量进样器针身迅速给予锡箔纸包裹固定于立体定位仪。⑤进针深度。以针孔斜面中心点计算,注射时使针孔斜面向鼠尾方向,注射速度控制在 1 ul/min,防止药液倒流,如果条件允许,建议使用微量泵,注射完毕留针 10 min 后缓慢退针,以保证 6-OHDA 足量达到预定位置。⑥术中、术后注意动物保暖,术后 3 天单笼饲养。

[参考文献]

- [1] Baptista MJ, Cookson MR, Miller DW. Parkin and α -Synuclein: Opponent Actions in The Pathogenesis of Parkinson's Disease[J]. The Neuroscientist, 2004, 10(1): 63-72.
- [2] Casetta I, Govoni V, Granieri E. Oxidative stress, antioxidants and neurodegenerative diseases [J]. Current pharmaceutical design, 2005, 11(16): 2033-2052.
- [3] George Paxinos, Charles Watson. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2005:18.
- [4] Hudson JL, van Horne CG, Stromberg I, et al.

- Correlation of apomorphine and amphetamine- induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6- hydroxydopamine lesioned rats[J]. Brain Res , 1993 , 626(1- 2) : 167- 174.
- [5] 曹非, 骆芳, 陈涵, 等. 帕金森病大鼠发病过程中纹状体区乙酰胆碱水平动态变化及行为学观察[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(15): 3246- 3247.
- [6] Becker JB. Estrogen rapidly potentiates amphetamine- induced striatal dopamine release and rotational behavior during microdialysis [J]. Neurosci Lett , 1990 , 118(2) : 169- 171.
- [7] Bourque M , Dluzen DE , Di Paolo T. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease[J]. Front Neuroendocrinol , 2009 , 30(2) : 142- 157.
- [8] Simpkins JW , Yang SH , Liu R , et al. Estrogen- like compounds for ischemic neuroprotection [J]. Stroke , 2004 , 35(11) : 2648- 2651.
- [9] 裴新, 陆地, 周宇冠. 雌激素对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化应激的保护作用研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2010, 32(5): 608- 612.
- [10] Morale MC , Serra PA , L'episcopo F , et al. Estrogen , neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease : glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration [J]. Neuroscience , 2006 , 138 (3) : 869- 878.
- (责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

川芎嗪对 3T3- L1 增殖分化及分泌 Leptin、PAI- 1 的影响

刘新迎¹, 周联², 王培训²

1. 佛山市南海区罗村医院, 广州 佛山 528226; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 研究川芎嗪 (Tetramethylpyrazine, TMP) 对小鼠前脂肪细胞 3T3-L1 增殖分化和分泌瘦素 (Leptin)、纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-1) 的影响。方法: 培养 3T3-L1 细胞, 并分别用川芎嗪 5 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 3 个浓度进行干预, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 测定 3T3-L1 的增殖; 油红 O 进行染色以及染色比色法测定细胞分化程度; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定细胞培养上清中 Leptin、PAI-1 含量。结果: 川芎嗪 100 μg/mL 浓度组能明显抑制 3T3-L1 细胞的增殖, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 3 个浓度组对细胞分化均无明显影响; TMP 3 个浓度组对 Leptin 的分泌和 50 μg/mL、100 μg/mL 浓度组对 PAI-1 的分泌均有明显抑制作用, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 川芎嗪对脂肪细胞的调节作用以影响其分泌功能为主。

[关键词] 川芎嗪; 前脂肪细胞 (3T3-L1); 增殖分化; 瘦素 (Leptin); 纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-1)

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256- 7415 (2016) 09- 0230- 03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.09.100

Effect of Tetramethylpyrazine on Proliferation and Differentiation and Secreting Leptin and PAI-1 of Preadipocyte 3T3-L1

LIU Xinying , ZHOU Lian , WANG Peixun

Abstract : Objective : To research the effect of tetramethylpyrazine (TMP) on proliferation and differentiation and secreting Leptin and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI- 1) of preadipocyte 3T3- L1 in rats. Methods : Cultured 3T3- L1 cells , and intervene with TMP of 5 μg/mL , 50 μg/mL and 100 μg/mL. Proliferation of 3T3- L1 was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). Dying with Oil Red O and detected cell differentiated degree by staining and colorimetric method , detected levels of Leptin and PAI- 1 in cell culture supernatants by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Results : TMP with concentration of 100 μ g/mL could inhibit cell proliferation obviously , 3 groups of TMP with different concentrations had no obvious effect on

[收稿日期] 2016-03-26

[作者简介] 刘新迎 (1972-), 女, 副主任中医师, 研究方向: 中医临床。