基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.001

左旋多巴对帕金森病大鼠神经行为学影响的动态研究

丁宏娟，何建成，王文武
（上海中医药大学中医诊断教研室，上海 201203）

【摘 要】目的：探讨 50 mg/kg 剂量左旋多巴（L-dihydroxy-phenylalanine，L-dopa）对帕金森病（Parkinson disease，PD）大鼠神经行为学影响的动态变化。方法：采用经典的 6-OHDA 脑立体定向注射术建立大鼠 PD 模型，并将成功 PD 模型随机分成 2 组：PD 模型组和 L-dopa 组，其中 L-dopa 组连续腹腔注射 50 mg/kg 剂量的 L-dopa，共 8 周，并在不同时间点（2、4、6、8 周）观察 PD 大鼠神经行为学（大鼠对侧旋转圈数、旋转启动时间、旋转持续时间、剂峰旋转圈数和大鼠 AIM 评分）变化。结果：随着 L-dopa 用药时间的延长，①大鼠对侧旋转圈数不断增加，且在 6 周时达到峰值，与 2 周比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）；②旋转启动时间不断减少，但差异无统计学意义（$P>0.05$）；③旋转持续时间不断增加，且 6、8 周时与 2、4 周比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；④剂峰旋转圈数有不断增加趋势，且 6 周时与 2 周比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）；⑤AIM 评分不断增加，其中 6、8 周时与 2 周比较，差异有统计学意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），8 周时与 4 周比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。结论：50 mg/kg 剂量的 L-dopa 对 PD 大鼠具有明显的神经毒性，模型动物具有典型的神经行为学改变且稳定可靠，可用于 L-dopa 毒副反应的研究。

【关键词】左旋多巴；帕金森病；模型；神经行为学
【中国图书分类法分类号】R742.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-08-25

The dynamic study on the behavioral effect on rats with Parkinson's disease treated by Levodopa

DING Hong-juan, HE Jian-cheng, WANG Wen-wu
(*Department of Traditional Chinese Diagnostics, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine*)

【Abstract】*Objective*: To observe the behavioral effect on rats with parkinson disease treated by 50 mg/kg dose of L-dopa (L-dihydroxy-phenylalanine). *Methods*: The PD model rats were established through stereotaxic injection of 6-OHDA, and the successful models of PD were randomized into two groups: the PD control group and the LD model group, then the LD model group was treated intraperitoneally with 50 mg/kg dose of L-dopa for 8 weeks. Then at different time (2, 4, 6, 8 weeks), the behavioral changes of PD models (include the rotation behavior induced by APO, the initiating time of rotation, the lasting time of rotation, the maximum number of rotation, and the score of abnormal involuntary movement) were observed. *Results*: As the time given L-dopa went by ①the rotation behavior induced by APO gradually increased, and reached the peak at 6 weeks, compared with 2 weeks, there was difference ($P<0.05$); ②the initiating time of rotation gradually decreased, but there was no difference ($P>0.05$); ③the lasting time of rotation gradually increased, and 6, 8 weeks compared with 2, 4 weeks, there were significant difference ($P<0.05$); ④the maximum number of rotation gradually increased, and 6 weeks compared with 2 weeks, there were difference ($P<0.05$); ⑤the score of abnormal involuntary movement gradually increased, and 6, 8 weeks compared with 2 weeks, there were difference ($P<0.05$ or $P<0.01$), 8 weeks compared with 4 weeks, there was also difference ($P<0.05$). *Conclusion*: The 50 mg/kg dose of levodopa has neurotoxic effect on rats with PD, the models display the typical and stable behavior, so it is suitable for the side-effect study of LD.

【Key words】levodopa; parkinson disease; model; behavior

左旋多巴（L-dihydroxy-phenylalanine，L-dopa）替代疗法仍是目前治疗帕金森病（Parkinson disease，PD）的主要手段，是其它治疗方法和药物所无法替代和比拟的[1]。但近来研究发现 L-dopa 具有神经毒性作用[2]，且随着服药时间的增加，其毒副反应愈加明显。本研究采用在经典的 6-OHDA 黑质偏侧注射致 PD 模型基础上，观察 50 mg/kg 剂量的L-dopa对 PD 大鼠模型神经行为学的影响，进一步探讨 L-dopa 治疗 PD的效果和毒副反应，以期为后续 L-dopa 毒副反应的研究提供可靠的实验动物模型，同时也为临床应用L-dopa治疗 PD 提供依据。

作者介绍：丁宏娟（1981-），女，助教，硕士，
研究方向：帕金森病基础研究。
通信作者：何建成，男，教授，Email：hejc8163@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30672684、30973722）。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 大鼠，180 只，SPF 级，雄性，体重 180~200 g，由上海中医药大学实验动物中心提供。许可证号：SYXK(沪)2004-0005。实验条件：动物饲养在上海中医药大学实验动物中心，恒温(23±2)℃，自动光-暗控制(LD12:12，即 07:00~19:00 光照，19:00~07:00 暗置)，相对湿度 60%~65%，动物摄食饮水自由。

1.1.2 药品 水合氯醛：分析纯，上海国药集团；L-dopa 干粉：美国 Sigma 公司产品；苄丝肼：美国 Sigma 公司产品；庆大霉素：上海第一制药厂产品。

1.1.3 试剂 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine，6-OHDA)：美国 Sigma 公司产品；阿扑吗啡(Apomorphine，APO)：美国 Sigma 公司产品；抗坏血酸(Antiscorbic acid)：美国 Sigma 公司产品。

1.1.4 仪器 大鼠脑立体定位仪：TOW-3A 型，广东汕头市教育医学仪器厂；微量进样器(5 μl)：上海第三分析仪器厂。

1.2 模型制备方法

采用经典、公认的 Ungerstedt 等[3]所创立的方法制备 PD 模型。术前按常规进行行为测试，确认无异常旋转行为后，用 10%水合氯醛(35 mg/kg)腹腔注射麻醉。然后将大鼠固定于脑立体定位仪上，头部去毛，苯扎溴铵(商品名：新洁尔灭)常规消毒。无菌条件下，沿正中线切开大鼠颅顶皮肤，剥离骨膜，暴露前囟。以前囟为准，根据包新民等[4]大鼠脑立体定位图谱，确定右侧黑质二坐标：①前囟后 5.2 mm，正中线右侧 1.0 mm，硬膜下 9.0 mm；②前囟后 5.2 mm，正中线右侧 2.5 mm，硬膜下 8.5 mm。用颅骨钻于手术要求部位小心钻开颅骨，用 5 μl 微量进样器将 6-OHDA(溶于含 0.02%抗坏血酸的生理盐水中，即秤量药品抗坏血酸 0.001 g，溶于生理盐水 0.5 ml 中)注入右侧黑质部(以 1.0 mm/min 速度缓慢进针)，每孔 3 μl，注射速度为 1 μl/min，注射完毕后留针 5 min，然后以 1.0 mm/min 速度缓慢退针。手术完成后，用医用明胶海绵填塞颅骨孔，缝合切口皮肤，肌肉注射庆大霉素 7 d，待动物清醒后放回饲养笼中饲养。假手术组只注射含 0.02%维生素 C 的等量生理盐水，其余条件与造模手术相同。正常对照组只固定大鼠，不进行任何处理。10 d 后，以腹腔注射 APO 0.5 mg/kg 诱发大鼠向一侧旋转，记录开始旋转至 30 min 内的旋转圈数，以旋转圈数平均>7 次/min 者为合格的 PD 模型[3]。

1.3 L-dopa毒副反应的行为学观察

将造模成功的 72 只 PD 大鼠随机分为 PD 模型组和 L-dopa 组，各 36 只。其中 L-dopa 组于每日 9:00 和 17:00 行腹腔注射 50 mg/kg 剂量的 L-dopa，配成 10 mg/ml(即按 50 mg/kgL-dopa和 12.5 mg/kg 苄丝肼溶于含 0.05%的乙醇和 0.1%的抗坏血酸的注射用水中)；PD 模型组于每日 9:00 和 17:00 给予腹腔注射等量的含 0.05%的乙醇和 0.1%的抗坏血酸的注射用水。均连续注射 8 周。(1)APO 诱导大鼠对侧旋转行为的评定：2 组大鼠均腹腔注射 APO 0.5 mg/kg 以诱发大鼠向对侧旋转，记录开始旋转至 30 min内总的旋转圈数。每 2 周观察 1 次。(2)对侧旋转行为的评定：L-dopa 组大鼠在腹腔注射L-dopa后进行行为学观察，记录用药后每 5 min 的旋转圈数，同时记录 L-dopa 用药后旋转启动时间，剂峰旋转圈数以及旋转持续时间。每 2 周观察 1 次。(3)异常不自主动作(Abnormal involuntary movement，AIM)评分：每 2 周观察 1次。①肢体运动障碍：损毁对侧前肢重、节律性的反射运动或肌肉运动障碍；②轴性运动：头部及躯体朝向损毁侧的侧屈及轴性旋转；③咀嚼行为：重复性的吐舌及下颚咀嚼行为；④对侧旋转：向损毁对侧转身或旋转。各组大鼠于用药期间进行 AIM 评分，每次评定结果由经用药后每间隔 35 min 的 AIM 总分数组成，每次连续评定 4 组数据，持续 140 min，4次评分之和为最终得分[5]。

1.4 统计学处理方法

所有资料均用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，采用 SPSS13.0 版软件进行齐性检验，对 L-dopa 组与 PD 模型组同一时间点的比较采用 t 检验，其余不同时间点的比较均采用单因素方差分析，多个样本均数间的两两比较采用 *SNK* q 检验。

2 结 果

2.1 L-dopa 对 APO 诱导 PD 大鼠对侧旋转行为的影响

L-dopa 组大鼠注射 APO 后 0.5~5 min 时，均出现了旋转行为。随着 L-dopa 使用时间的延长，L-dopa 组旋转圈数不断增加，6 周时达到峰值，其中 6 周与 2 周比较，差异有统计学意义($P<0.05$)；在各个时间点，L-dopa 组与 PD 模型组比较，旋转圈数均明显增加，差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。详见表 1、图 1。

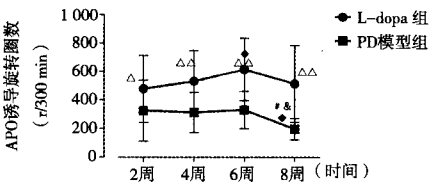


图 1 L-dopa 对 APO 诱导 PD 大鼠旋转圈数的影响

2.2 L-dopa 对 PD 大鼠旋转启动时间的影响

随着 L-dopa 用药时间的延长，旋转启动时间有降低趋势，但在不同时间点，差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2、图 2。

表 1 L-dopa 对 APO 诱导 PD 大鼠对侧旋转行为影响的动态研究($\bar{x}\pm s$，r/30 min)

组 别	2 周(n=36)	4 周(n=36)	6 周(n=24)	8 周(n=12)
L-dopa组	477.23 ± 236.18△	530.90 ± 217.43△△	613.80 ± 220.28△△◆	513.10 ± 270.57△△
PD模型组	324.60 ± 213.53	311.30 ± 140.57	328.70 ± 130.87	194.10 ± 74.52◆#&

注：△，$P<0.01$；△△，$P<0.001$ 与 PD 模型组比较；◆，$P<0.05$ 与 2 周比较；#，$P<0.01$ 与 4 周比较；&，$P<0.01$ 与 6 周比较

表 2 L-dopa 对 PD 大鼠旋转启动时间影响的动态研究（$\bar{x}\pm s$,s）

组 别	旋转启动时间
2周（n=36）	439.47 ± 223.20
4周（n=36）	371.80 ± 223.47
6周（n=24）	363.20 ± 116.25
8周（n=12）	298.50 ± 173.16

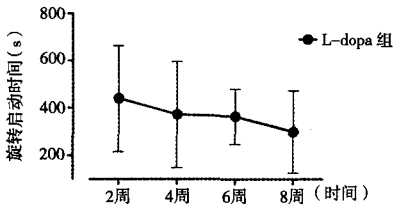


图 2 L-dopa 对 PD 大鼠旋转启动时间的影响

2.3 L-dopa 对 PD 大鼠旋转持续时间的影响

随着 L-dopa 用药时间的延长，旋转持续时间有增加的趋势。在 6、8 周时，与 2、4 周比较，差异有统计学意义（P<0.05）。见表 3、图 3。

表 3 L-dopa 对 PD 大鼠旋转持续时间影响的动态研究（$\bar{x}\pm s$,min）

组 别	旋转持续时间
2周（n=36）	150.67 ± 43.34
4周（n=36）	152.13 ± 46.14
6周（n=24）	185.50 ± 33.45*#
8周（n=12）	188.40 ± 32.17*#

注：*，P<0.05 与 2 周比较；#，P<0.05 与 4 周比较

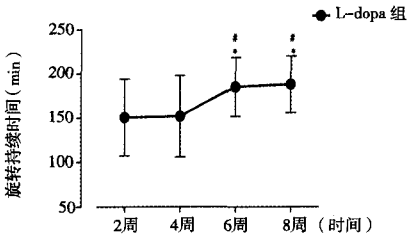


图 3 L-dopa 对 PD 大鼠旋转持续时间的影响

2.4 L-dopa 对 PD 大鼠刻峰旋转圈数的影响

随着 L-dopa 用药时间的延长，刻峰旋转圈数有增加趋势，且 6 周与 2 周比较，差异有统计学意义（P<0.05）。见表 4、图 4。

表 4 L-dopa 对 PD 大鼠刻峰旋转圈数的影响（$\bar{x}\pm s$,5 min）

组 别	旋转圈数
2周（n=36）	86.03 ± 39.19
4周（n=36）	107.30 ± 47.00
6周（n=24）	116.15 ± 52.50*
8周（n=12）	115.20 ± 13.30

注：*，P<0.05，与 2 周比较

2.5 L-dopa 对 PD 大鼠 AIM 评分的影响

L-dopa 组大鼠主要表现出程度不同的 AIM，包括刻板动作和对侧旋转行为，前者又包括损毁对侧前肢不自主拍动（前肢 AIM）、躯体和颈部不自主向对侧弯曲、扭转（轴性 AIM）和不自主向对侧舔食动作（口面部 AIM），对侧旋转行为与刻板动作几乎同时发生。随 L-dopa 用药时间的延长，AIM 评分有增加的趋势。6、8 周与 2 周比较，差异均有统计学意义（P<0.05 或 P<0.01，8 周与 4 周比较，差异有统计学意义（P<0.05）见表 5、图 5。

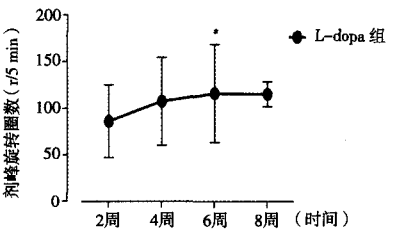


图 4 L-dopa 对 PD 大鼠刻峰旋转圈数的影响

表 5 L-dopa 对 PD 大鼠 AIM 评分影响的动态研究（$\bar{x}\pm s$）

组 别	AIM 评分
2周（n=36）	23.50 ± 8.09
4周（n=36）	26.43 ± 7.56
6周（n=24）	28.25 ± 6.51*
8周（n=12）	32.90 ± 4.10**#

注：*，P<0.05 **，P<0.01 与 2 周比较；#，P<0.05 与 4 周比较

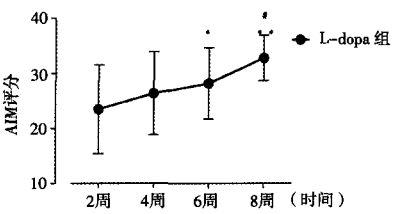


图 5 L-dopa 对 PD 大鼠 AIM 评分的影响

3 讨 论

PD 是以震颤、肌强直、运动减少和姿势异常为特征的慢性神经系统变性疾病。随着人口的老龄化，其发病率日渐攀升[1,6]。L-dopa 迄今仍是 PD 治疗的金标准药物，但在其治疗的 2~5 年内常出现诸多毒副反应如运动障碍、开关现象、剂末现象等，有一些副反应如运动障碍等比疾病本身更加严重[7]，严重影响了 PD 患者的生活质量。我们前期、初步的研究发现，50 mg/kg 剂量的 L-dopa 在 PD 大鼠治疗中随着治疗时间的延长，其旋转圈数增加、旋转启动时间减少、持续时间增加、刻峰旋转圈数增加、AIM 评分增加，且在电镜观察中存在多巴胺能神经元凋亡的形态学改变等[8]。本实验从不同的时间点（2、4、6、8 周），进一步观察了 50 mg/kg 剂量 L-dopa对 PD 大鼠行为学影响的动态变化。

对于 PD 大鼠的行为学评价，由于迄今尚无有效的非侵袭性生理学方法检测该模型 DA 能神经系统的损伤程度，APO 诱发的旋转实验依然是最主要的评价指标[9]。当黑质纹状体系统 DA 下降超过 80%，DA 受体就会出现超敏现象[10]。本实验研究发现，2 组大鼠注射 APO 后 0.5~5 min 时，均出现旋转行为。而且 L-dopa 组大鼠的旋转圈数较单纯的 PD 模型

组大鼠明显增加（$P<0.01$ 或 $P<0.001$），这是因为此时细胞外的 L-dopa 浓度升高，而残存的 DA 能神经元处于超敏状态，故 L-dopa 的摄入可使大鼠表现为向健侧旋转[11]。也说明受损的黑质纹状体 DA 能系统易受 L-dopa 毒性作用的损伤[12]。同时我们的研究还发现，随着 L-dopa 用药时间的延长，模型大鼠的旋转圈数也明显增加，且在 6 周时达到峰值，并与 2 周比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），说明随着 L-dopa 的蓄积，其对黑质的损伤程度越严重。但由于对侧旋转行为与刻板运动同时发生，而当刻板运动严重时对侧旋转运动明显受到抑制，这可能是 8 周时旋转圈数低于 6 周的原因，且依据 Lundblad 等[13]的研究，对侧旋转行为与人类的异动症（Levodopa-induced dyskinesia，LID）之间的关系不明确，因此对侧旋转行为不适于单独用于 LID 模型的评定。

已有的临床调查结果表明，约有 30%~80%的 PD 患者经长期 L-dopa 治疗后可出现 LID，并且随着疾病的加重及治疗时间的延长，其 LID 程度和发生频率均会增加；PD 患者的 LID 多为单侧性发作，主要累及 PD 症状严重侧肢体，而且各个体间 LID 的易患性、LID 严重程度、表现形式、发生时间等也均存在显著性差异[14]。同时近年来国内外研究表明，大鼠经长期 L-dopa 治疗后也会出现一些 AIM，与人类 LID 在许多方面具有相似之处[15]。

在研究中发现，L-dopa 组大鼠均表现出程度不同的 AIM，包括刻板动作和对侧旋转行为，前者又包括损毁对侧前肢不自主拍动（前肢 AIM）、躯体和颈部不自主向对侧弯曲、扭转（轴性 AIM）和不自主向对侧舔食动作（口面部 AIM），对侧旋转行为与刻板动作几乎同时发生。其行为学特点与 Lundblad 等[13]的报道一致。同时我们还发现，虽然各类型 AIM 在每只大鼠身上的表现程度虽轻重不一，但每只大鼠于每次用药后的 AIM 表现形式总是相对固定的，提示此模型稳定，也提示 AIM 评分可用于对 L-dopa 组大鼠的定量分析。因此，在进一步的定量分析研究中我们发现，AIM 开始出现以后，随 L-dopa 用药时间的延长，AIM 评分有增加的趋势。6、8 周与 2 周比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；8 周与 4 周比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），此研究结果与我们前期研究及徐氏[15]等研究的结果相一致。

除此以外，PD 大鼠旋转启动时间、剂峰旋转圈数、持续时间也可用来评价黑质损伤程度，启动越快、转速越高、旋转持续时间越长，则黑质损伤越重[16]。在我们的研究中，随着 L-dopa 使用时间的延长，L-dopa 组大鼠的旋转启动时间有降低趋势，但不同时间点，差异无统计学意义（$P>0.05$）；L-dopa 组大鼠的旋转持续时间有增加的趋势，在 6、8 周时，与 2、4 周比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；L-dopa 组大鼠的剂峰旋转圈数有增加趋势，且 6 周与 2 周比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

综上，随着 L-dopa 使用时间的延长，L-dopa 组大鼠 APO 诱导的对侧旋转圈数增加、旋转启动时间减少、旋转持续时间延长、剂峰旋转圈数增加、AIM 评分增加等，这与我们前期的研究[17]结果相一致，也说明 50 mg/kg 剂量 L-dopa 有明显的神经毒性作用，且随着使用时间的延长，神经毒性作用越严重。同时本次实验 L-dopa 组大鼠于每次用药后的 AIM 表现形式相对稳定，说明该模型稳定、可靠，可用于后续研究。

参 考 文 献

[1] 刘道宽，蒋雨平，江澄川，等.锥体外系疾病[M].上海：上海科技出版社，2000.91.

[2] Marin C，Aguilar E，Bonastre M.Early administration of entacapone prevents levodopa-induced motor fluctuations in hemiparkinsonian rats[J].ExpNeurol，2005，192(1)：184-193.

[3] Ungerstedt U.6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of Central monoamine neurons[J].Eur J Pharmacol，1968，5(1)：107-110.

[4] 包新民，舒思云[J].大鼠脑立体定位图谱[M].北京：人民卫生出版杜，1991.53.

[5] Lee C S，Cenei M A，Schulzer M，et al.Embryonic Ventrall Mesencephalic Grafts Improve Levodopa-induced Dyskinesia in a Rat Model of Parkinson's disease[J].Brain(S0006-8950)，2000，123(7)：1365-1379.

[6] Zhang Z X，Roman G C，Hong Z，et al.Parkinson's disease in China：prevalence in Beijing，Xian，and Shanghai[J].Lancet，2005，365(9459)：595-597.

[7] Theresa A，Zesiewi C Z，Kelly L，et al.Hauser Levodopa-induced Dyskinesia in Parkinson，s disease：Epidemiology，etiology，and treatment[J].Current Neurology and Neuroscience Reports，2007，7(4)：302-310.

[8] 何建成，王文武，丁宏娟，等.50 mg/kg 剂量左旋多巴对帕金森病大鼠神经行为学和超微结构的影响[J].中国老年学杂志，2010，30(9)：1209-1212

[9] Iancu R，M ohapelP，Brundin P，et al.Behavioral haracterization of a unila teral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice[J].Behav Brain Res，2005，162(1)：1-10.

[10] 艾民康，关新民.神经生物学基础[M].武汉：湖北省科技出版社，1992.1-172.

[11] Cao F，Sun S，Tong E T.Experimental study on inhibition of neuronal toxical effect of levodopa by ginkgobiloba extract on Parkinson's disease in rats[J].Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci，2003，23(2)：151-153.

[12] Murer M G，Raisman-Vozari R，Gershanik O V.Levodopa in Parkinson，s disease：neurotoxicity issue laid to rest[J].Drug Saf，1999，21(5)：339-352.

[13] Lundblad M，Andersson M，Winkler C，et al.Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson，s disease[J].Eur J Neurosci，2002，15：120-132.

[14] 李 丹，黄译腺，王晓君，等.左旋多巴诱发异动症 6-羟基多巴帕金森病大鼠模型的建立及行为学评价[J].苏州大学学报（医学版），2010，30(2)：236-239.

[15] 徐 岩，孙圣刚，曹学兵.左旋多巴诱发异动症大鼠模型的制作及其行为学评估[J].中华物理医学与康复杂志，2005，27(11)：649-652.

[16] 曹 非，孙圣刚，童萼塘，等.不同剂量左旋多巴对帕金森病大鼠行为学影响实验研究[J].中风与神经疾病杂志，2003，20(1)：14-16.

[17] 丁宏娟，何建成，王文武.不同剂量左旋多巴对帕金森病大鼠神经行为学的影响[J].西安交通大学学报·医学版，2011，32(1)：93-95.

（责任编辑：张学颖）