

恩他卡朋对异动症大鼠行为学及其纹状体区 DARPP-32磷酸化表达的影响

王磊¹, 邢国平¹, 王安宁¹, 汪明玉¹, 李昀¹, 付文玉², 钟池¹

摘要 目的:研究左旋多巴/卡比多巴与左旋多巴/卡比多巴/恩他卡朋诱发异动症模型大鼠的行为学特点,以及纹状体区多巴胺和环磷腺苷调节的磷酸化蛋白-32(DARPP-32)磷酸化状态的改变。**方法:**成功建立的帕金森病模型大鼠29只随机分为4组:生理盐水组(NS)5只,左旋多巴/卡比多巴组(LC)8只,恩他卡朋等效剂量组(LCE)8只,恩他卡朋额外添加组(LCE+)8只。分别予以相应药物灌胃,共给药28 d。开始灌胃后的第1、4、8、12、16、20、24、27 d进行行为学观察。通过western blot检测纹状体区DARPP-32磷酸化水平。**结果:**LCE组AIM评分为(21.7±10.2)分,LC组AIM评分为(22.2±11.1)分,差异无统计学意义($P>0.05$);且2组各时间点AIM评分差异无统计学意义($P>0.05$)。LCE+组AIM评分为(28.6±14.9)分,高于LCE组和LC组(均 $P<0.05$);自第8天起,LCE+组AIM评分开始高于LC组和LCE组(均 $P<0.05$)。LCE组、LCE+组与LC组毁损侧DARPP-32磷酸化水平均高于各组健侧水平(均 $P<0.05$);LCE+组毁损侧DARPP-32磷酸化水平高于NS组、LCE组和LC组毁损侧(均 $P<0.05$),LCE组和LC组毁损侧DARPP-32磷酸化水平差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**在等效剂量水平下添加恩他卡朋作为左旋多巴添加治疗不会增加或减少异动症发生。

关键词 帕金森病;异动症;持续性多巴胺能刺激;恩他卡朋;环磷腺苷调节的磷酸化蛋白-32

中图分类号 R741;R741.02;R742 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2018.12.002

作者单位

1. 潍坊市人民医院
神经内科

山东 潍坊 261000

2. 潍坊医学院组织
学与胚胎学教研室

山东 潍坊 261000

基金项目

山东省医药卫生科技
发展计划项目

(No. 2014WS0266)

收稿日期

2018-08-06

通讯作者

钟池

ZHONG7376_CN

@sina.com

Effects of Entacapone on Behavior and DARPP-32 Phosphorylation in Striatum of Rats with Levodopa-Induced Dyskinesia WANG Lei¹, XING Guo-ping¹, WANG An-ning¹, WANG Ming-yu¹, LI Yun¹, FU Wen-yu², ZHONG Chi¹. 1. Department of Neurology, Weifang People's Hospital, Shandong Weifang 261000, China; 2. Department of Histology and Embryology, Weifang Medical University, Shandong Weifang 261000, China

Abstract Objective: To study the behavioral characteristics and changes in DARPP-32 phosphorylation level in the striatum of the levodopa/carbidopa and levodopa/carbidopa/entacapone-induced dyskinesia rat model.

Methods: Twenty-nine Parkinson's disease rat models were successfully established then randomly divided into four groups. The normal saline (NS) group included 5 rats, and the levodopa/carbidopa (LC) group, entacapone equivalent dose (LCE) group, and entacapone additional dose (LCE+) group each included 8 rats. Rats in each group were given intragastric administrations of the corresponding drugs for 28 days. Rat behavior was observed on the 1st, 4th, 8th, 12th, 16th, 20th, 24th, and 27th day after drug administration. Changes in DARPP-32 phosphorylation level in the striatum were measured by western blot technique. **Results:** The abnormal involuntary movement (AIM) scores of the LCE group and LC group were respectively (21.7±10.2) and (22.2±11.1) points, the difference showing no statistical significance ($P>0.05$), and the difference between the AIM scores of the two groups at each measured timepoint showed no statistical significance ($P>0.05$). The AIM score of the LCE+ group was (28.6±14.9) points, and this was higher than that of the LCE group and LC group (both $P<0.05$). Starting with the 8th day of drug administration, the AIM score of the LCE+ group began surpassing that of the LC group and LCE group (both $P<0.05$). The LCE, LCE+, and LC groups showed a higher lesion-side DARPP-32 phosphorylation level than that of the non-lesion side of all groups (all $P<0.05$). The LCE+ group showed a higher lesion-side DARPP-32 phosphorylation level than that of the NS, LCE, and LC groups ($P<0.05$). The LCE group and LC group lesion-side DARPP-32 phosphorylation levels displayed no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion:** The addition of entacapone to levodopa treatment under equivalent dose conditions results in neither deterioration nor relief of dyskinesia.

Key words Parkinson's disease; dyskinesia; continuous dopaminergic stimulation; entacapone; DARPP-32

左旋多巴制剂是目前治疗帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 最有效的药物,但长期应用后患者可能会出现异动症等难以控制的运动并发症,严重影响患者生活质

量。目前认为,异动症发生的主要原因是间断性给予短效多巴胺能药物导致了对纹状体多巴胺受体的波动性刺激^[12];而生理情况下,黑质多巴胺持续释放,纹状体神经元接受相对稳定的多巴胺能刺激。根据这一理论,有学者提出PD治疗的新理念--持续性多巴胺能刺激(CDS)^[3]。发现一种能够达到CDS的方法成为解决PD运动并发症的希望所在。

儿茶酚-O-甲基转移酶抑制剂恩他卡朋在与左旋多巴制剂合用时能够安全有效地抑制左旋多巴代谢,延长其半衰期,提高生物利用度^[4],有望通过对多巴胺受体的持续性刺激,尽量避免或延缓异动症的发生^[5,6]。

但STRIDE-PD临床试验^[7]结果却显示,恩他卡朋不仅没有减少早期PD患者异动症的发生,反而使得异动症发生时间提前,发生率增高;Olanow等^[8]提出恩他卡朋是异动症发生的一项危险因素。但STRIDE-PD试验在设计上有其局限性,其2组左旋多巴当量的一致可能是导致恩他卡朋组异动症发生率增高的一个重要因素。中国PD治疗指南(第三版)^[9]仍将恩他卡朋作为治疗异动症的方案之一。因此,恩他卡朋在防治异动症方面的疗效有待进一步探索,尤其注意保持各组左旋多巴当量相等^[10]。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

6-羟多巴胺、阿朴吗啡、左旋多巴、卡比多巴均购自Sigma公司;恩他卡朋购自Novartis公司;多巴胺和环磷腺苷调节的磷酸化蛋白-32(dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa, DARPP-32)抗体、Thr34位点磷酸化的DARPP-32抗体购自Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG购自Boster公司。

1.2 实验动物及模型制备

成年雄性SD大鼠,体质量200~250 g,由潍坊医学院实验动物中心提供。采用改良Thomas方法^[11],左侧前脑内侧束立体定位注射6-羟多巴胺,制备偏侧PD大鼠模型。3周后腹腔注射阿朴吗啡(0.5 mg/kg),记录1 h内大鼠向毁损对侧旋转总圈数,>100圈/h为PD模型造模成功^[12]。

1.3 动物分组处理及行为学观察

PD大鼠模型造模成功29只,随机分为4组:生理盐水组(NS)5只,左旋多巴/卡比多巴组(LC)8只,恩他卡朋等效剂量组(LCE)8只,恩他卡朋额外添加组(LCE+)8只。从应用阿朴吗啡后第3天开始给4

组进行灌胃(2次/d),分别以如下成分为每日总量予以灌胃:生理盐水,20 mg/kg左旋多巴+5 mg/kg卡比多巴,16 mg/kg左旋多巴+4 mg/kg卡比多巴+20 mg/kg恩他卡朋^[10,13]、20 mg/kg左旋多巴+5 mg/kg卡比多巴+20 mg/kg恩他卡朋,共给药28 d。开始灌胃后的第1、4、8、12、16、20、24、27天进行行为学观察。计算每次用药后2 h内,每5分钟的对侧旋转平均圈数,将给药后旋转圈数增至平均旋转圈数50%时的首个5 min与降至该值的首个5 min之间的时间段视为药物作用时间^[14]。异常不自主运动(AIM)评分参照Lee等^[15]介绍的评分标准进行,将AIM分为4个部分进行评定:上肢AIM(损毁对侧上肢不自主拍动)、口面部AIM(不自主向损毁对侧舔食动作)、轴性AIM(躯体和颈部不自主向损毁对侧弯曲扭转)和运动AIM(向损毁对侧的旋转行为);每部分又根据其有无和严重程度分5个等级(0~4):0级为无;1级为偶尔出现,不自主运动总体时间<50%观察时间;2级为经常出现,不自主运动总体时间>50%观察时间;3级为持续存在,刺激使之停止;4级为持续存在,给予刺激(如刺激毛发、声音)不能使之停止。在给予药物后每30分钟进行1次AIM评分,持续120 min,4次评分之和为最终得分。

1.4 western blot检测纹状体区DARPP-32磷酸化水平

灌胃处理后28 d,10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后断头处死,迅速取脑并在冰盒上分离纹状体。RIPA裂解液提取组织蛋白,取适量蛋白样品测定蛋白浓度;剩余的加入适量5×蛋白上样缓冲液和RIPA后,100℃沸水浴5 min,自然冷却后-20℃保存。制备10%分离胶和5%浓缩胶后,蛋白样品解冻上样行SDS-PAGE凝胶电泳;“三明治”夹子放入预装有转膜液的转移装置中进行转膜;转膜结束后,适量5%脱脂奶粉孵育1 h;加入兔抗大鼠DARPP-32抗体与Thr34位点磷酸化的DARPP-32抗体室温孵育1 h;4℃过夜;PBST洗膜3次;加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗室温孵育1 h;TBST洗膜3次。ECL显色,暗室内曝光,冲洗胶片。应用IPP软件进行灰度分析,以Thr34位点磷酸化的DARPP-32与总DARPP-32比值表示各组蛋白磷酸化水平。

1.5 统计学处理

采用SPSS17.0软件进行统计学处理,符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间的比较采用独立样本均数t检验;多组间比较采用单因素方差分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 帕金森异动症大鼠的行为学特点及评分

NS组整个干预过程中无明显AIM发生,评分为0分;LC组、LCE组与LCE+组大鼠出现了程度不同的AIM。LC组、LCE组及LCE+组大鼠AIM评分均随给药时间的延长而增高。

LCE组AIM评分为(21.7±10.2)分,LC组AIM评分为(22.2±11.1)分,差异无统计学意义($P>0.05$);且2组各时间点AIM评分差异无统计学意义($P>0.05$),见图1。

LCE+组AIM评分为(28.6±14.9)分,高于LCE组和LC组(均 $P<0.05$);自第8天起,LCE+组AIM评分开始高于LC组和LCE组(均 $P<0.05$),见图1。

2.2 各组大鼠纹状体区DARPP-32磷酸化水平

LCE组、LCE+组与LC组毁损侧DARPP-32磷酸化水平均高于各组健侧水平(均 $P<0.05$);LCE+组毁损侧DARPP-32磷酸化水平高于NS组、LCE组和LC组毁损侧(均 $P<0.05$),LCE组和LC组毁损侧DARPP-32磷酸化水平差异无统计学意义($P>0.05$);见图2,表1。

3 讨论

本实验结果显示,在保持LCE组和LC组左旋多巴当量相同的情况下,2组的异动症发生情况差异无统计学意义;在LCE+组中额外添加恩他卡朋治疗,则会导致异动症增加。即在等效剂量水平情况下,恩他卡朋没有显著增加异动症的发生,也没有显著减弱异动症的发生。

3.1 等效剂量下恩他卡朋没有显著增强异动症的发生

在STRIDE-PD试验的后期分析中,Olanow等^[8]将恩他卡朋使用与低龄发病、每日左旋多巴使用量、低体重、女性、UPDRS II评分值等一起列为了异动症发生的影响因素;结合本实验结果,提示恩他卡朋这一危险因素实际上可能只相当于对左旋多巴剂量的增加,而并非导致异动症发生的完全独立因素;但额外添加恩他卡朋治疗,则会增加异动症发生。目前临床上,恩他卡朋主要用于作为左旋多巴制剂的添加手段治疗症状波动(尤其是用于疗效减退,延长开期),而非用于防治异动症;这也符合国际运动障碍学会(MDS)在循证医学总结中所指出的:恩他卡朋用于治疗症状波动有效,而用于预防症状波动和异动症无效,用于治疗异动症证据不充分^[16]。

3.2 等效剂量下恩他卡朋没有显著减弱异动症的发生

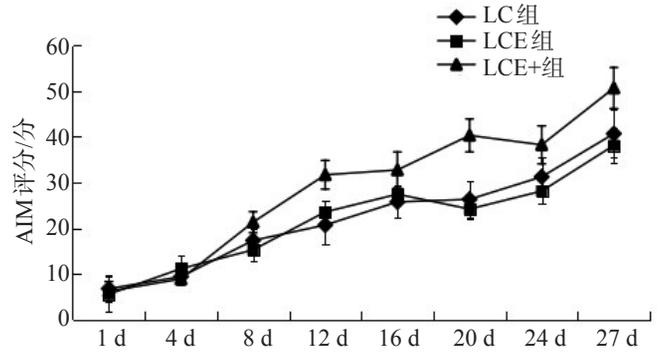
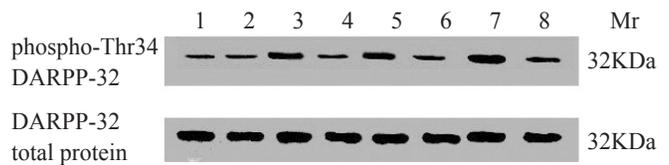


图1 LC组、LCE组与LCE+组帕金森异动症模型大鼠AIM评分变化



注:1为NS组毁损侧,2为NS组健侧,3为LC体组毁损侧,4为LC组健侧,5为LCE组毁损侧,6为LCE组健侧,7为LCE+组毁损侧,8为LCE+组健侧

图2 各组大鼠纹状体区phospho-Thr34DARPP-32与总DARPP-32 western blot结果

表1 各组大鼠纹状体区phospho-Thr34DARPP-32表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	毁损侧	健侧
NS组	5	0.128±0.012 ^②	0.130±0.017
LC组	8	0.678±0.036 ^{①②}	0.127±0.012
LCE组	8	0.653±0.021 ^{①②}	0.126±0.032
LCE+组	8	0.845±0.030 ^①	0.129±0.026

注:与同组健侧比较,^① $P<0.05$;与LCE+组比较,^② $P<0.05$

虽然理论上恩他卡朋可通过抑制左旋多巴外周代谢,使血浆左旋多巴浓度保持相对稳定,并增加左旋多巴的入脑量,提高其生物利用度,延长半衰期,而不增加剂峰浓度,可能在异动症防治中发挥积极作用^[4,17],但临床试验的结果却得出了相反的结论^[8]。除STRIDE-PD试验LC组与LCE组在左旋多巴当量上不一致的局限性以外,Stocchi等^[7]指出其它的可能解释还包括:①CDS理论本身可能存在问题。②该试验的给药方法没有提供有效的CDS。有研究表明,2次/d给予左旋多巴制剂加恩他卡朋可能会增加异动症风险,增加每日给药次数可减少异动症风险;以3h为间隔,5次/d在左旋多巴卡比多巴标准剂基础上额外添加恩他卡朋,可避免单纯应用左旋多巴卡比多巴标准剂时的波谷效应^[1]。结合本实验结果,在恩他卡朋防治异动症的探索中,控制给药时间间隔并增加每日给药

次数(达到至少5次)可能非常必要。

目前中国PD治疗指南(第三版)^[9]中,在关于异动症的处理方法如下:①减量复方左旋多巴,增加给药次数;②减量复方左旋多巴,增加多巴胺受体激动剂;③减量复方左旋多巴,增加COMT抑制剂;④加用金刚烷胺;⑤加用非典型抗精神病药尤其是氯氮平;⑥行脑深部电刺激术(DBS)等。但以上方法并无优先推荐顺序。笔者认为将以上方法作分层推荐可能更为合适,如:将减量复方左旋多巴同时增加给药次数和减量复方左旋多巴适当增加多巴胺受体激动剂这类临床上行之方便,有一定循证医学证据支持^[18]的方法列为第1层次;将效果较为确切的药物金刚烷胺和氯氮平^[19]及DBS^[20]列为第2层次,但需要注意药物不良反应或经济负担;将具有一定探索前景,目前效果尚不明确的恩他卡朋列为第3层次;而对于那些对日常生活并不造成明显影响的异动症,可暂不处理^[19](除非药物治疗存在原则性问题:如单次左旋多巴剂量过大、每日给药次数<3次、药物加量过快等)。这样的分层推荐,或更有利于指导当下对于异动症处理的临床实践,且可提示未来进一步探索的方向。

参考文献

- [1] Olanow CW, Obeso JA, Stocchi F. Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson's disease: scientific rationale and clinical implications[J]. *Lancet Neurol*, 2006, 5: 677-687.
- [2] 张勇, 卢祖能, 董红娟, 等. 帕金森病并发剂峰异动症的危险因素及其对生活质量的影响[J]. *神经损伤与功能重建*, 2016, 11: 493-496.
- [3] Timpka J, Mundt-Petersen U, Odin P. Continuous dopaminergic stimulation therapy for Parkinson's disease - recent advances[J]. *Curr Opin Neurol*, 2016, 29: 474-479.
- [4] Paija O, Laine K, Kultalahti E R, et al. Entacapone increases levodopa exposure and reduces plasma levodopa variability when used with Sinemet CR[J]. *Clin Neuropharmacol*, 2005, 28: 115-119.
- [5] Marin C, Aguilar E, Obeso JA. Coadministration of entacapone with levodopa attenuates the severity of dyskinesias in hemiparkinsonian rats[J]. *Mov Disord*, 2006, 21: 646-653.
- [6] Marin C, Aguilar E, Bonastre M, et al. Early administration of entacapone prevents levodopa-induced motor fluctuations in hemiparkinsonian rats[J]. *Exp Neurol*, 2005, 192: 184-193.
- [7] Stocchi F, Rascol O, Kieburtz K, et al. Initiating levodopa/carbidopa therapy with and without entacapone in early Parkinson disease: the STRIDE-PD study[J]. *Ann Neurol*, 2010, 68: 18-27.
- [8] Warren OC, Kieburtz K, Rascol O, et al. Factors predictive of the development of Levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2013, 28: 1064-1071.
- [9] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组. 中国帕金森病治疗指南(第三版)[J]. *中华神经科杂志*, 2014, 47: 428-433.
- [10] Rodriguez-Violante M, Cervantes-Arriaga A, Villar-Velarde A, et al. Prevalence of non-motor dysfunction among Parkinson's disease patients from a tertiary referral center in Mexico City[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2010, 112: 883-885.
- [11] Thomas J, Wang J, Takubo H, et al. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model: further biochemical and behavioral characterization[J]. *Exp Neurol*, 1994, 126: 159-167.
- [12] Oh JD, Vaughan CL, Chase TN. Effect of dopamine denervation and dopamine agonist administration on serine phosphorylation of striatal NMDA receptor subunits[J]. *Brain Res*, 1999, 821: 433-442.
- [13] 张厚亮, 丁正同, 王坚, 等. 恩他卡朋对帕金森病大鼠的疗效[J]. *中国临床神经科学*, 2007, 15: 620-624.
- [14] 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: 649-652.
- [15] Lee CS, Cenci MA, Schulzer M, et al. Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease[J]. *Brain*, 2000, 123: 1365-1379.
- [16] Fox SH, Katzenschlager R, Lim SY, et al. The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2011, 26: S2-S41.
- [17] Chen S, Chan P, Sun S, et al. The recommendations of Chinese Parkinson's disease and movement disorder society consensus on therapeutic management of Parkinson's disease[J]. *Transl Neurodegener*, 2016, 5: 12.
- [18] Long-term effect of initiating pramipexole vs levodopa in early Parkinson disease[J]. *Arch Neurol*, 2009, 66: 563-570.
- [19] Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review[J]. *JAMA*, 2014, 311: 1670-1683.
- [20] 中华医学会神经外科学分会功能神经外科学组, 中华医学会神经病学分会帕金森病与运动障碍学组, 中国医师协会神经外科医师分会功能神经外科专家委员会, 等. 帕金森病脑深部电刺激疗法术后程控中国专家共识[J]. *中华神经外科杂志*, 2016, 32: 1192-1198.

(本文编辑:唐颖馨)