论著

文章编号:1000-5404(2006)05-0454-04

MPTP致小鼠黑质致密部多巴胺能神经元损伤及定量研究

梁亚杰[1],李淑蓉[2],苏炳银[1] ([1]第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038;[2]成都医学院组织学与胚胎学教研室,成都 610083)

提 要:目的 建立正常小鼠黑质致密部部位-细胞数量标准曲线,并以之判定MPTP损伤的小鼠PD模型中多巴胺能神经元的损失。**方法** 根据小鼠大脑解剖图谱观察小鼠黑质致密部的走向,酪氨酸羟化酶免疫组化染色显示正常小鼠大脑黑质致密部及多巴胺能神经元;观察计数MPTP处理小鼠的大脑黑质致密部多巴胺能神经元,与正常小鼠的相似部位进行比较。**结果** 建立了正常小鼠黑质致密部部位-细胞数量分布图,利用曲线对MPTP处理小鼠所得到的切片进行分析,发现样本中多巴胺能神经元明显减少,证明判定方法可行而有效。**结论** 本实验成功建立了MPTP致小鼠黑质致密部多巴胺神经元损伤模型,并对其损伤判定进行了标准化。

关键词:帕金森病;MPTP;标准曲线;酪氨酸羟化酶;黑质致密部;定量研究;C57/BL6小鼠

中图法分类号:R322.81;R741.02;R971 **文献标识码**:A

Quantitative study on loss of dopaminergic neurons in SNpc of C57/BL6 mice induced by MPTP

LIANG Ya-jie[1], LI Shu-rong[2], SU Bing-yin[1] ([1]Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Histology and Embrology, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

Abstract: **Objective** To observe the distribution of dopaminergic neurons in SNpc and to establish standard curve in normal mice so as to measure the changes of dopaminergic neurons in number in SNpc of the mice toxicated with MPTP. **Methods** Ten male C57BL6 mice aged 8 – 12 weeks, weight 20 – 22 g, were randomized to receive 20 mg/kg MPTP or physical saline every 3 h for 4 times, then killed 7 d later. The mouse mesocerebrum was taken out and fixed, frozen, sectioned. All sections containing SNpc were observed under the guide of mouse brain atlas. Every other sections were chosen to stain tyrosine hydroxylase (TH) to show dopaminergic neurons immunohistochemically. The TH positive cells in SNpc were counted in each section and the standard curve was established. **Results** The standard curve of SNpc compact part position and TH positive cells was established. By comparing the standard curves for the MPTP intoxicated mice and the saline mice, TH positive cells in SNpc from MPTP toxicated mice decreased significantly, which confirmed the validity and feasibility of the standard curve. **Conclusion** The establishment of standard curve greatly facilitates the comparison of specimen from different groups and makes the assessment of dopaminergic neuron loss more accurate and efficient. The standard curve can serve as an excellent reference curve for the assessment of dopaminergic neurons in SNpc in normal C57BL6 mice.

Key words: Parkinson disease; MPTP; standard curve; tyrosine hydroxylase; SNpc; quantitative study; C57BL6 mice

在1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine, MPTP)神经毒素致小鼠帕金森病(Parkinson disease, PD)模型中,MPTP引起小鼠黑质致密部(substantia nigra compact part, SNpc)内多巴胺能(dopamine, DA)神经元明显减少[7]。在此模型中,对SNpc的DA神经元计数以判断其损失情况,就成为判断模型是否成功,或所采用措施是否参与MPTP引起的病理变化的关键指标。目前所

基金项目:成都医学院科研基金资助项目(2006)
Supported by the Scientific Research Foundation of Chengdu Medical College (2006)

作者简介:梁亚杰(1980 –),男,河北省藁城市人,硕士研究生,主要从事神经退行性疾病方面的研究。电话:(023)68753935

通讯作者:苏炳银,电话:(023)68753935,E – mail: subingyin@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-08-26;**修回日期**:2005-09-16

用的计数方法存在一个明显的问题，即不同标本间的可比性较差。原因有二：首先，SNpc 并非一个各向均匀的结构，即在不同切面水平，其形状和细胞数量不同，因此相同间隔的抽样会因为起点的误差而出现较大变化；第二，抽样起点的判断比较粗略，一般以肉眼判断，而且由于切片方位的差异，会在不同标本间出现较大差异。

为解决这一问题，我们拟通过由前到后全程染色 SNpc，在不同的冠状切面连续计数 DA 神经元，建立标准的部位-数量曲线，作为与不同标本的各个切面比较的标准，从而解决标本间的可比性问题；而后建立 MPTP 损伤小鼠的 PD 模型，以标准曲线判定小鼠 DA 神经元损伤情况，为下一步的机制探讨奠定基础。

1　材料与方法

1.1　动物模型的建立和样本收集

C57BL/ 6J 小鼠 10 只，雄性，8 ~ 12 周龄，体质量 20 ~ 22 g，由北京中国医学科学院实验动物中心提供。MPTP 购自 sigma，无菌生理盐水溶解后，实验组为腹腔注射小鼠（n = 5）20 mg/ kg，连续 4 次，间隔 2 h。饲喂 7 d 后断头致死，迅速取出小鼠中脑入 4 ℃ Zamboni 固定液，2 d 后入 30% 蔗糖，待其下降至瓶底后，冰冻切片（片厚 20 μm），取全程 SNpc 切片，于 0.01 mol/L PBS 4 ℃保存。对照组（n = 5）注射等体积生理盐水，处理方法同 MPTP 注射组，用以建立标准曲线。

1.2　免疫组织化学方法检测 SNpc 内 TH 阳性神经元

采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶染色法（S-P 免疫组化法）进行常规免疫组化染色。一抗为抗 TH 抗体（1∶5 000，Chemicon，Lucerne，Switzerland），S-P 试剂盒购于中杉公司。

1.3　观察黑质致密部 DA 能神经元分布随方位的变化

根据 Franklin and Paxinos 小鼠大脑解剖图谱，观察 SNpc 走行和不同部位的形状，及相应的明显解剖标志。酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）免疫组化染色显示 DA 神经元后，对正常对照组的 SNpc 切片进行数码照相，找出与图谱 SNpc 相对应部位的切片，对其走行和形状进行比较。

1.4　连续切片中黑质致密部内 TH 阳性细胞计数及部位对应关系

根据小鼠大脑图谱，自头端约 AP-2.80 至 AP-3.80，共收集到约 50 张切片。每隔 1 张取 1 切片，进行免疫组化染色后计数 SNpc 的 TH 阳性细胞。确定 SNpc 边界后，在 ×400 放大倍数下，计数胞核突起均显示清晰的细胞。统计各个切片 SNpc 内 TH 阳性细胞数，建立正常对照组的部位-细胞数量标准曲线。由于后屈束（fasciculus retroflexus，fr）是判断 SNpc 大小的主要解剖标志，由前到后观察 fr 和 SNpc 两个结构的相对位置变化。在 Photoshop CS 中编辑这些图片，标记 fr 和 SNpc 后，图像重叠显示，通过两种坐标轴显示其结构走向：其一为中线（y）和通过大脑脚最内侧的水平线（x），此体系显示 fr 由前到后的走向（称为 fr 坐标），用以提示 SNpc 的大小和方位；其二为中线（y）和通过各切面 fr 中心的水平线（x），以观察 SNpc 的走向和结构变化（称为 SNpc 坐标）。

1.5　利用标准曲线判断 MPTP 处理小鼠的黑质致密部 DA 神经元损失

对 MPTP 损伤后小鼠的 SNpc 切片（20 μm），每 6 张取 1 张，得到 8 ~ 10 张切片，免疫组化染色后分别计数 TH 阳性细胞数；并对每张切片在对照组标准切片中寻找形态相似者，比较二者细胞数量。

在确定 MPTP 损伤小鼠样本中各个切片在正常曲线中的定位后，就可对样本各个切面 TH 阳性细胞进行计数。由于各切面细胞数量分布不均匀，属于未知分布总体，需要采用非参数检验，样本个切面细胞数量构成一组样本值，相应的标准曲线中切面的细胞数量均值构成的另一组值。

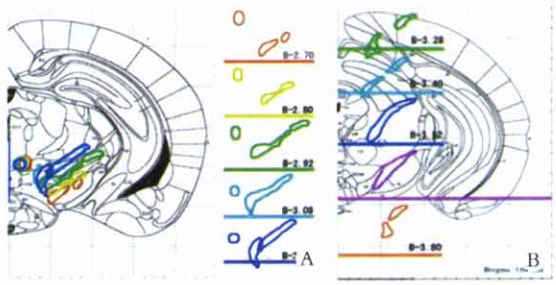
1.6　统计学处理

利用 SPSS 10.0 软件进行配对秩和检验。

2　结果

2.1　正常小鼠黑质致密部的分布和走形

全程切面分为两部分：在 B - 3.16 之前（包括 B - 3.16），fr 为主要的定位标志，暂称为 A 系列（图 1A）；其后则根据 SNpc 形态判断，暂称为 B 系列（图 1B）。A 系列在小鼠大脑解剖图谱共有 5 个切面（含明显 SNpc 者），即 B - 2.70，B - 2.80，B - 2.92，B - 3.08，B - 3.16，为直观显示，我们通过两个坐标体系来分别观察 fr 和 SNpc 的走向。在 fr 坐标系中（图 1A fr Coordinate），可见 fr 由前至后向内下行进，在 B - 3.16 后离开冠状切面视野，SNpc 的面积和分布与其同时发生变化，因此，可以通过 fr 的下降程度大致判断 SNpc 的面积和形状。在 SNpc 坐标系中（图 1A SNpc Coordinate），可见 SNpc 形状的变化，而且与 fr 的相对位置越来越接近。在图 1A SNpc Coordinate 右侧的简化图中可以更加清楚看到 SNpc 在不同切面的形状差异：由前至后（红色-黄色-绿色-浅蓝色-深蓝色-紫色）SNpc 的面积由小到大，由分隔至融合，在 B - 3.16 又被 MT 分隔开。



A：含有后屈束的切面；B：不含后屈束的切面

图 1　小鼠大脑解剖图谱中黑质致密部的走行和形状变化

B 系列在解剖图谱抽取 5 个切面，即 B - 3.20，B - 3.40，B - 3.52，B - 3.64，B - 3.80。在以中线为 y 轴，经过大脑脚内侧上界水平线为 x 轴的坐标体系中，观察到 SNpc 的形态和走向

(图1B),可见SNpc先下行至大脑基底部后,又向上行,其形状呈分-合-分状分布(由前到后为绿色-浅蓝色-深蓝色-紫色-红色)。

2.2 DA能神经元及黑质致密部走向

TH免疫组化染色清晰显示出SNpc,从图2可见其大体形态与脑图谱中SNpc的形态非常接近,走向也相同。在免疫组化照片中可以清晰观察到fr与SNpc的相对位置变化(图3),从前到后(腹侧到背侧),fr体现出与在解剖图谱中相似的走向,在中脑不断下行,每个位置都伴随着相对恒定的SNpc形态。

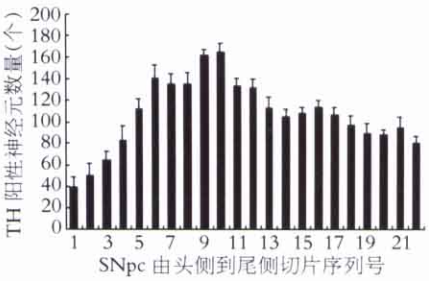
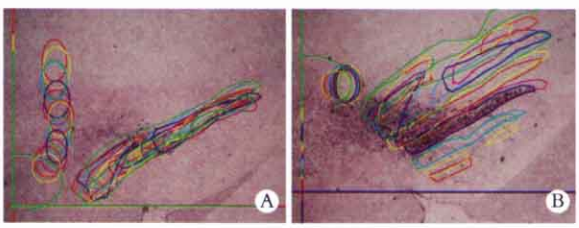


图2 正常年轻小鼠一侧黑质致密部TH阳性细胞计数

2.3 连续切片中的TH阳性细胞计数及部位对应关系

对正常小鼠半侧大脑的SNpc进行TH阳性细胞计数,根据Franklin and Paxinos小鼠大脑图谱及切片的形态和厚度,其序号对应情况为3:B-2.8;6:B-2.92;10:B-3.08;12:B-3.16;15:B-3.28;18:B-3.4。由图2可见SNpc的TH阳性细胞数量在不同部位差异很大,在不同动物有一定个体差异,但总体走向一致。

为直观显示切面与TH阳性细胞数量的关系,在免疫组化照片建立相应坐标系。对A系列切片,建立fr坐标和SNpc坐标,分别观察二者走行。可见fr明显的向下内走行,伴随SNpc形态的明显变化(图3A);SNpc的形态也表现出与图谱相似的分布和形态变化(图3B),即由少到多,由分至合,再分开。



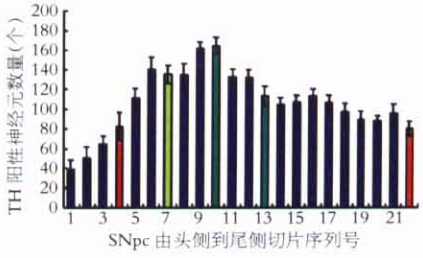
A: fr在SNpc中的走行; B: SNpc的形态变化

图3 黑质致密部全程切片的走行 (S-P×40)

2.4 利用标准曲线判断MPTP处理小鼠的黑质致密部DA神经元损失

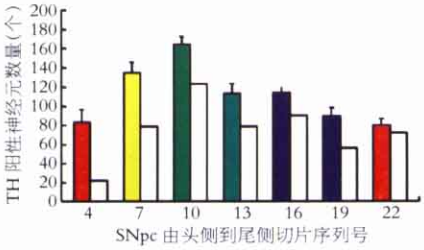
MPTP损伤后小鼠黑质全程切片,进行TH免疫组化染色后计数。由于需要考虑个体间差异,应对个体进行逐个判断,与标准曲线进行比较。按照前面所述的方法,首先对某个体所得到的8~10切片进行定位。

根据fr和SNpc的走向和形状,结合切片间距离,切片间距离在标准曲线上体现为间隔两个标准位,应为在标准曲线找出最相似的对应面。经过比较,找出与所选样本切面对应的标准曲线中的切面,从而得到这些切面在部位-细胞数标准曲线中的位置(图4)。对样本切片进行计数后与标准曲线比较(图5)。



不同颜色提示前后位置关系

图4 标本切面在标准数量曲线中的位置



彩色为正常对照抽样,白色为损伤组

图5 损伤组抽样切面与正常切面的比较

以标准曲线各切面细胞数量均值组成的样本与待定标本各个切面细胞数量组成样本进行配对秩和检验,两个样本差异显著($P<0.01$);为避免假阳性,进一步将标准曲线各切面细胞数量减去各自标准差的绝对值,再进行比较说明两样本相差非常显著($P<0.01$)。从而得出结论:MPTP处理后的大脑标本SNpc中,TH阳性细胞数量明显低于正常对照,具有统计学意义。

3 讨论

黑质致密部DA能神经元计数在MPTP损伤的小鼠PD模型中是一种常用的方法。虽然计数方法已经非常成熟,但各个研究小组所用的方法不尽相同。一些小组选择SNpc解剖结构明显的切面,对其进行染色计数,如选取有第三根颅神经出大脑的切片B-3.52至B-3.6[3],或者SNpc被第三根颅神经根分为内外侧的切片(B-3.16)[4],开面积较大,有fr的部分,如B-2.80至B-3.16。其它小组多采用SNpc全程切片等距离抽样免疫组化染色[5,6],其优点是可以排除不同部位敏感性的差异,能较全面反映总体的细

胞数量；但随之而来的问题是由于抽样时起点的误差，使各个样本可比性较差。

为解决这个问题，我们通过建立正常小鼠 SNpc 部位-细胞数量分布图，并证实其实用性和有效性。在标准曲线中中每个待定样本切片都有相应的正常对照，标本均与正常切片比较，从而避免了抽样后切片形态不同而无法比较的问题。有人也曾建立正常小鼠的标准曲线[7]，但所取切面较少，精细程度不够，不能确定中间的切片位置和确切的细胞数量。因此，在建立 MPTP 模型中，需要首先建立 TH 阳性细胞在 SNpc 的精确分布曲线，以全程切片为宜，切片数量和细胞数量随切片厚度不同而有差异，一旦选择切片厚度即应固定，以利于曲线的适用性。

我们首先在解剖图谱上观察了 SNpc 的走行和形状，虽然得到一个大体的形态变化和走向，但图谱显示的 SNpc 切面较少，切面间隔较大。为详细观察 SNpc 形态和走向，我们进行了 TH 免疫组化染色，这是显示 SNpc 的 DA 神经元最常用的形态学方法，不仅可以观察大体形态，还可对 DA 神经元进行计数。由此，我们不仅得到了完整详细的 SNpc 形态信息，还建立了部位-细胞数量分布的标准曲线。MPTP 损伤小鼠 SNpc 切片抽样后，首先通过形态比较，找出样本切片在标准曲线中的位置，再由部位-细胞数量曲线查到这个部位的正常 DA 神经元数量，与样本切面细胞数量相比较，通过统计学处理后，即可提示样本是否与正常标本是同一群体。我们的结果显示 MPTP 损伤后，小鼠 SNpc 内 DA 神经元明显少于正常对照小鼠，证实了这一方法的可行性和有效性。

MPTP 损伤小鼠后会造成明显的 SNpc 内 DA 神经元数量减少，是目前研究 PD 发生机制的经典模型[7]。虽然这些研究都以 MPTP 造成小鼠 DA 神经元损伤，但损伤的方式不尽相同，在时程上可分为急性，亚急性，慢性模型[8]。在这些模型中所用的 MPTP 注射间隔和剂量不同：急性模型每次注射剂量为 20 mg/kg，连续注射 4 次，间隔 2 h，即本研究所用的模型，用以研究 MPTP 对 DA 神经元的急性损伤，神经元死亡方式被认为以坏死为主，是最常用的注射方式；亚急性模型则注射剂量多为每次 30 mg/kg，每日 1 次，连续注射 5 d，神经元死亡方式被认为以凋亡为主，在研究炎症反应与 PD 关系研究中较常用；慢性模型则注射时间较长，可为十几天或几个月，用以模拟 PD 慢性发病中的病理变化。C57/BL6 雄性小鼠是对 MPTP 敏感的小鼠品系，因此应用最多，但各个研究的目的不同，采用小鼠的年龄也不同。研究 MPTP 损伤机制及其自发的恢复[9]，多采用年轻成年小鼠，即 8 ~ 12 周，而若研究小鼠随年龄增加而出现的敏感性增加，则采用大龄小鼠，8 ~ 12 个月者。结合下一步拟探讨其损伤机制，及自发性恢复的机制，我们成功建立了 MPTP 急性损伤年轻成年小鼠模型。

总之，我们所建立的标准曲线使得对 MPTP 损伤后小鼠黑质致密部 DA 神经元的计数，及不同样本间的比较更为准确和高效，而且对于评估 8 ~ 12 周龄 C57BL/6 小鼠黑质致密部 DA 神经元的分布和数量具有较大参考价值。MPTP 急性损伤小鼠模型的建立及对其损伤的判定，为下一步 PD 发病机制的探讨打下了基础。

参考文献：

[1] PAXINOS G, FRANKLIN K. The mouse brain in stereotaxic coordinates[M]. 2nd ed. New York: Academic Press, 2001: 101 - 112.

[2] DEHMER T, LINDENAU J, HAID S, *et al*. Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity *in vivo*[J]. J Neurochem, 2000, 74(5): 2213 - 2216.

[3] PARAIN K, MARCHAND V, DUMERY B, *et al*. Nicotine, but not cotinine, partially protects dopaminergic neurons against MPTP-induced degeneration in mice[J]. Brain Res, 2001, 890(2): 347 - 350.

[4] SCHMIDT N, FERGER B. Neuroprotective effects of (+/-)-kavain in the MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. Synapse, 2001, 40(1): 47 - 54.

[5] KURKOWSKA-JASTRZEBSKA I, LITWIN T, JONIEC I, *et al*. Dexamethasone protects against dopaminergic neurons damage in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(10 - 11): 1307 - 1318.

[6] CROCKER S J, SMITH P D, JACKSON-LEWIS V, *et al*. Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. J Neurosci, 2003, 23(10): 4081 - 4091.

[7] PRZEDBORSKI S, VILA M. The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 991: 189 - 198.

[8] VILA M, VUKOSAVIC S, JACKSON-LEWIS V, *et al*. Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP[J]. J Neurochem, 2000, 74(2): 721 - 729.

[9] BEZARD E, DOVERO S, IMBERT C, *et al*. Spontaneous long-term compensatory dopaminergic sprouting in MPTP-treated mice[J]. Synapse, 2000, 38(3): 363 - 368.

（编辑　陈聪连）