论著

文章编号:1000-5404(2008)04-0322-04

# 重复经颅磁刺激对帕金森模型小鼠纹状体 VMAT-2 和 SYN 表达的影响

王全懂,董巧云,顾 平,王彦永,刘 静,王铭维 (河北医科大学第一医院神经内科,河北省脑老化与认知神经科学重点实验室,石家庄 050017)

**摘 要:目的** 探讨重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic, rTMS)对帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型鼠纹状体多巴胺(dopamine, DA)含量及Ⅱ型单胺囊泡转运体(vesicular monoamine transporter-2, VMAT-2)和突触体素(synaptophysin, SYN)表达的影响。**方法** 65只雄性C57BL/6J小鼠随机分为:对照组、PD模型组、假磁刺激组、rTMS-1组、rTMS-2组,每组13只。小鼠皮下注射MPTP(15 mg·kg$^{-1}$,每小时注射1次,注射4次)复制帕金森病模型,重复经颅磁刺激干预,利用高效液相色谱-电化学(HPLC-ECD)测定纹状体DA含量;免疫组织化学染色检测VMAT-2和SYN的表达变化,并借助图像分析系统对其进行定量分析。**结果** rTMS-1组和rTMS-2组纹状体DA含量较对照组明显减少($P<0.01$),但显著高于PD模型组和假磁刺激组($P<0.01$);rTMS-1组和rTMS-2组纹状体VMAT-2和SYN表达均明显少于对照组且显著高于PD模型组和假磁刺激组,其免疫反应产物校正光密度值(COD)均显著低于对照组($P<0.05$),并显著高于PD组和假磁刺激组($P<0.05$),TMS-1组和rTMS-2组间无显著差异。**结论** rTMS可诱导PD鼠纹状体区DA释放增加,并使VMAT-2和SYN表达上调。

**关键词**:重复经颅磁刺激;多巴胺;纹状体;SYN;VMAT-2

**中图法分类号**:R338.2;R454.1;R742.5 **文献标识码**:A

# Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on vesicular monoamine transporter-2 and synaptophysin expressions in striatum of Parkinson's disease model mice

WANG Quan-dong, DONG Qiao-yun, GU Ping, WANG Yan-yong, LIU Jing, WANG Ming-wei (Department of Neurology, The First Hospital of Hebei Medical University, Brain Aging and Cognitive Neuroscience Laboratory of Hebei Province, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on the contents of Dopamine and vesicular monoamine transporter-2 (VMAT-2) and synaptophysin (SYN) expressions in striatum of Parkinson's disease (PD) model mice. **Methods** Sixty-five male C57BL/6J mice were randomly divided into 5 experimental groups: control group, PD model group, sham rTMS group, rTMS-1 group exposed to 110% motion threshold, rTMS-2 group exposed to 130% motion threshold, with 13 mice in each group. The model of Parkinsion's disease of C57BL/6J mice were made by the subcutaneous injection of MPTP solution and then were treated with rTMS for 14 days. The contents of Dopamine in the striatum were measured by high performance liquid chromatography (HPLC-ECD). The VMAT-2 and SYN expressions in striatum were detected by immunohistochemistry and analysed quantitatively by image analysis system. **Results** The contents of Dopamine and the positive expressions of VMAT-2 and SYN in rTMS-1 and rTMS-2 groups were significantly lower than those in control group ($P<0.01$), but higher than those in PD and sham rTMS groups ($P<0.01$). The corrected optical density (COD) of immunoreactive products of VMAT-2 and SYN was lower than that of control group ($P<0.05$), and significantly higher than that of PD and sham rTMS groups ($P<0.05$). There

**基金项目**:河北省自然科学基金(C2007000842)

Supported by the National Natural Science Foundation of Hebei Province(C2007000842)

**作者简介**:王全懂,男,河北省饶阳县人,博士,主治医师,主要从事神经系统退行性疾病方面的研究。电话:13784359983,E-mail: qdwang99@126.com

**通信作者**:王铭维,电话:(0311) 85917005

**收稿日期**:2007-05-16;**修回日期**:2007-08-20

was no significant difference in COD between rTMS-1 and rTMS-2 groups. **Conclusion** rTMS can increase the release of Dopamine and the expressions of VMAT-2 and SYN in striatum of PD model mice, therefore we presume that rTMS may play a role in treating parkinson's disease by increasing the expressions of VMAT-2 and SYN.

**Key words**: repetitive transcranial magnetic stimulation; Dopamine; striatum; synaptophysin; VMAT-2

重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic, rTMS)对帕金森病(Parkinson's disease, PD)症状的改善取得了令人满意的疗效[1,2],但其机制尚不清楚。文献报道 rTMS 可增加纹状体多巴胺含量[3,4]。Ⅱ型囊泡单胺转运体(vesicular monoamine transporter-2, VMAT-2)位于单胺能神经元轴突末梢的突触囊泡,对多巴胺的贮存、释放及再利用起关键作用。突触体素(synaptophysin, SYN)为重要的突触囊泡膜结合蛋白,担负神经递质的包装、储存,尤其在神经递质释放中起重要作用。另有报道突触体素可增加 VMAT-2 转运功能[5]。那么 rTMS 是否通过诱导 VMAT-2 和 SYN 的表达上调,发挥协同作用,从而增加多巴胺转运、释放和利用率而发挥治疗作用,值得探讨。本研究拟通过检测帕金森病模型鼠纹状体内多巴胺含量(dopamine, DA)及 VMAT-2 和 SYN 等活性物质表达的变化,探讨 rTMS 对帕金森病的治疗机制,为临床应用 rTMS 治疗帕金森病提供理论依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　动物选择及分组

选用 8 ~ 12 周龄,体质量 20 ~ 22 g 的雄性 C57BL/6J 小鼠 65 只(由河北医科大学实验动物中心提供),分为对照组、PD 模型组、假磁刺激组、rTMS-1 组、rTMS-2 组,每组 13 只。

### 1.2　仪器

MagProX100 磁刺激治疗仪(丹麦),Leica2145 冰冻切片机(德国),奥林帕斯光学显微镜(日本),江苏 JD801 图像分析系统(南京)。

### 1.3　动物模型复制

小鼠背部皮下注射 1-甲基-4-苯基 1,2,3,6 四氢吡啶(MPTP)15 mg · $kg^{-1}$,连续注射 4 次,每次间隔 2 h,复制急性帕金森病鼠模型。对照组注射生理盐水代替 MPTP。

### 1.4　rTMS 方法

末次注射 MPTP 24 h 后,将磁刺激组动物于清醒状态下置于一长圆形器具中,头部暴露于 MagProX100 磁刺激治疗仪 MC125 圆形线圈下,线圈内径 10 mm,外径 60 mm,最大输出场强 3.7 T。线圈距头皮 1.5 cm,给予刺激频率为 1 Hz,rTMS-1 组刺激剂量为 110% 运动阈值(约 1 T),rTMS-2 组刺激强度为 130% 运动阈值(约 1.2 T),刺激 25 次为一序列,序列间隔 2 min,每天刺激 5 个序列,刺激 14 d。假磁刺激组置于相同环境,但不接受磁刺激。对照组和 PD 模型组不做处理。

### 1.5　高效液相-电化学(HPLC-ECD)检测纹状体 DA 含量

最后一次 rTMS 24 h 后,乙醚麻醉动物,直接断头取脑,取对照组、PD 模型组、假磁刺激组、rTMS-1 组、rTMS-2 组,每组 5 只。取纹状体称质量,-70 ℃保存。标本按 30 μl/10 mg 加 0.05 mol/L 高氯酸溶液,超声粉碎制成匀浆,于 4 ℃ 12 000 r/min,离心 20 min,取上清同样条件下再次离心 10 min。取上清 20 μl 进样,在 HPLC-ECD 上检测 DA 含量。检测条件:色谱柱为十八烷基硅烷分析柱,流动相为氯乙酸-氢氧化钠缓冲液。各组 DA 含量(ng · $g^{-1}$)以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 11.5 统计软件行方差分析方法。

### 1.6　组织固定与免疫组化染色步骤

最后一次刺激 24 h 后,取各组动物,每组 8 只,于腹腔内注射水合氯醛 10% 麻醉,经左心室依次灌入生理盐水 30 ml, 4% 多聚甲醛液 100 ml(0.5 ~ 1 h),立即取脑并依次浸入 15% 和 30% 蔗糖溶液。冰冻后行纹状体冠状切片,厚 30 μm。每 4 张取 1 张,切片置于含有 0.01 mol/L,pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中保存,行 ABC 法进行免疫组织化学染色:将纹状体切片浸入 0.3% 的甲醇-双氧水中 10 min,加 BSA 封闭液,分别将纹状体切片浸入羊抗 VMAT-2 (1∶100 Santa Cruz) 和兔抗 SYN(1∶200 Chemcon )溶液中,随后依次进入生物素化 IgG 工作液(北京中杉)和 SABC 三抗工作液(北京中杉),室温下各孵育 2 h,辣根过氧化物酶标记的 DAB 将免疫产物显为棕黄色,免疫组织化学染色后,将切片裱于多聚赖氨酸处理的载玻片上,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。在孵育过程中用 PBS 溶液代替一抗做空白对照。

### 1.7　图像分析及统计学处理

用光学显微镜观察并确定 VMAT-2、SYN 免疫反应产物及免疫阳性产物分布部位。应用江苏 JD801 图像分析系统测定纹状体区免疫阳性产物的光密度值(OD 值),同时测定同一张切片上胼胝体的 OD 值作为背景,用 VMAT-2、SYN 的 OD 值减去胼胝体的 OD 值作为实际 OD 值(矫正光密度值 COD 值)。用 COD 值进行比较分析,每只动物取 3 张切片,求平均值,各组 COD 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 11.5 统计软件进行方差分析。

## 2　结果

### 2.1　注射 MPTP 后动物行为表现

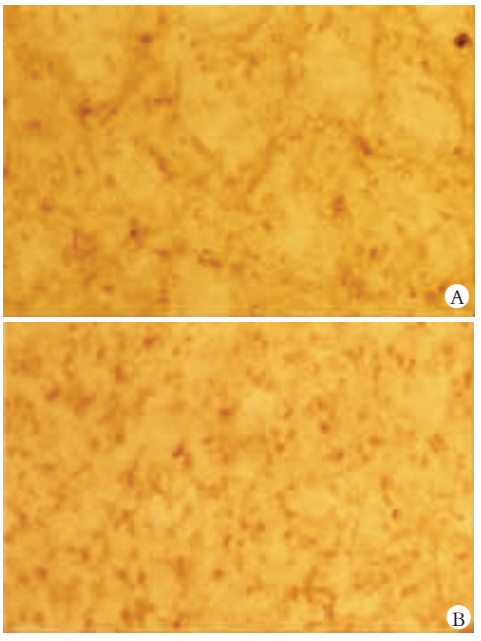
对照组动物在注射生理盐水前后,其行为表现无明显差异,其余 4 组小鼠都出现不同程度的运动障碍、动作迟缓、震颤、竖毛,甚至尿失禁等。对外界刺激反应低下,随着所给 MPTP 剂量增加,用药时间延长,动物运动障碍程度增加,症状持续时间延长。

### 2.2 纹状体 DA 含量检测结果

最后一次 rTMS 24 h 后，HPLC-ECD 检测纹状体 DA 含量，rTMS-1 组（578.1 ± 99.8）和 rTMS-2 组（522.5 ± 31.3）较对照组（1 162.4 ± 110.3）分别减少 51.2% 和 52.9%（$P < 0.01$）；较 PD 模型组（232.1 ± 22.3）分别增加 285.5% 和 272.7%（$P < 0.01$）；较假磁刺激组（219.2 ± 30.5）分别增加 256.1% 和 243.6%（$P < 0.01$）。rTMS-1、rTMS-2 组间无显著性差异（$P > 0.05$），PD 模型组与假磁刺激组无显著性差异（$P > 0.05$）。

### 2.3 rTMS 对小鼠纹状体区 VMAT-2 表达的影响

对照组纹状体区可见大量 VMAT-2 阳性产物，呈点状或环状，深染，分布密集；PD 模型组和假磁刺激组纹状体区阳性产物较对照组减少，且染色较浅，分布稀疏；rTMS-1 和 rTMS-2 组纹状体区可见较多棕黄色点状或环状阳性产物，分布较密集（图 1）。COD 值比较：PD 模型组（0.249 4 ± 0.108 0）和假磁刺激组（0.249 2 ± 0.102 1）显著低于对照组（0.272 9 ± 0.103 0）（$P < 0.01$）；rTMS-1 组（0.261 3 ± 0.099 1）和 rTMS-2 组（0.261 5 ± 0.101 1）明显低于对照组（$P < 0.05$），但显著高于 PD 模型组和假刺激组（$P < 0.05$），rTMS-1 组和 rTMS-2 组间无显著性差异（$P > 0.05$）。

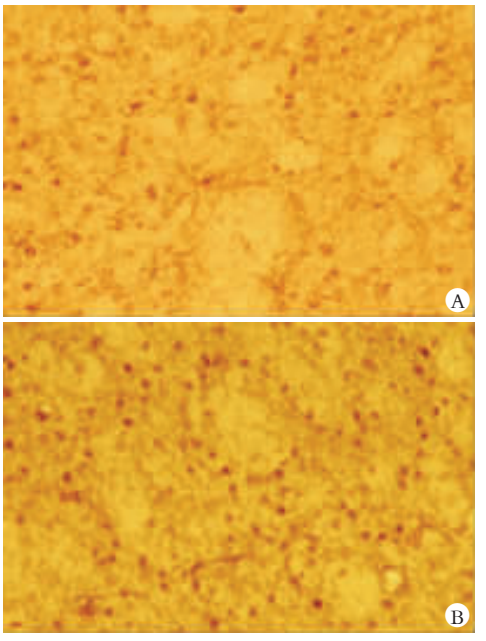



A：PD 模型组；B：rTMS-1 组

**图 1 纹状体 VMAT-2 免疫组织化学染色** （SABC × 200）

### 2.4 rTMS 对小鼠纹状体区 SYN 表达的影响

对照组纹状体区可见大量 SYN 阳性产物，呈点状，深染，分布密集；PD 模型组和假刺激组纹状体区阳性产物较对照组明显减少，分布稀疏；rTMS-1 组和 rTMS-2 组纹状体区可见较多棕黄色点状、分布较密集的阳性产物（图 2）。免疫产物 COD 值比较：PD 模型组（0.165 2 ± 0.013 6）和假磁刺激组（0.165 2 ± 0.046 8）较对照组（0.175 1 ± 0.019 0）显著降低（$P < 0.01$）；rTMS-1 组（0.169 8 ± 0.025 8）和 rTMS-2 组（0.169 6 ± 0.047 1）显著低于对照组（$P < 0.05$），但明显高于 PD 模型组和假磁刺激组（$P < 0.05$）；rTMS-1 组和 rTMS-2 组无显著性差异（$P > 0.05$）。




A：PD 模型组；B：rTMS-1 组

**图 2 纹状体 SYN 免疫组织化学染色** （SABC × 200）

## 3 讨论

临床研究表明 PD 患者经颅磁刺激治疗后其动作反应时间和运动灵活性均有显著改善，临床症状和临床评分均有明显好转[1,6]。同时有研究证实，rTMS 可引起 PD 患者或 PD 动物纹状体多巴胺释放增加[3,4]。本研究发现各实验组纹状体多巴胺含量较对照组明显减少（$P < 0.01$），但 rTMS-1 组和 rTMS-2 组纹状体多巴胺含量较 PD 模型组和假刺激组明显增多（$P < 0.01$），表明 rTMS 可上调受损的纹状体内多巴胺的释放，与研究[3,4]结果基本一致。

多巴胺由黑质致密部多巴胺能神经元胞体合成，经黑质纹状体通路输送并储存于多巴胺神经末梢的囊泡中。当神经冲动传至时，囊泡与突触前膜结合以量子形式释放到突触间隙，并与纹状体突触后膜多巴胺受体结合发挥生理效应。发挥效应后的多巴胺被突触前膜重吸收以终止其生理效应。突触间隙的多巴胺约 75% 被多巴胺转运体转运至细胞内。进入细胞质中的多巴胺再由囊泡膜上的 VMAT-2 转运至囊泡内，以待重新利用。故 VMAT-2 数量、突触囊泡数量及突触的传递功能对多巴胺的转运、释放及再利用起着重要作用。

VMAT-2 为多巴胺能神经元突触末梢内单胺递质囊泡膜上的一种转运体，不仅将新合成的多巴胺而且可以将从突触间隙重吸收的多巴胺转运至囊泡内。VMAT-2 直接调控细胞质内多巴胺含量外，同时兼有转运递质和调节递质释放作用，故对多巴胺储存与释

放起关键作用。研究发现:在 PD 患者的脑组中,VMAT-2 蛋白含量明显减少[7],在 MPTP 小鼠模型上也观察到纹状体区 VMAT-2 的结合位点及黑质区 mRNA 的表达减少[8]。表明 VMAT-2 表达减少在 PD 的发病机制中起一定作用,是反映 PD 损害的重要指标。本研究发现:各实验组与对照组相比,纹状体区 VMAT-2 阳性产物明显减少,且分布稀疏,PD 模型组和假刺激组阳性产物 COD 值较对照组显著降低($P < 0.01$),表明 PD 小鼠纹状体 VMAT-2 显著下调。但 rTMS-1 组和 rTMS-2 组纹状体内 VMAT-2 免疫反应产物较 PD 模型组及假磁刺激组明显增多,COD 值均显著高于 PD 模型组和假刺激组($P < 0.05$),提示 rTMS 可诱导 PD 小鼠纹状体内 VMAT-2 表达上调,rTMS-1 组和 rTMS-2 组无显著性差异,说明磁刺激强度超过运动阈值后,再增加刺激强度对 VMAT-2 的表达无显著影响。

突触体素是一种突触囊泡蛋白,其数量和密度反映突触的数量、突触转运能力及突触传递功能,担负神经递质的包装、储存、调节和释放。尤其在钙依赖的神经递质释放中起重要作用。过表达的突触体素:首先可促进分泌囊泡的合成,从而提高囊泡数量[9],其次对其他突触蛋白有稳定和修饰作用,因而可对突触囊泡起稳定作用,另外通过磷酸化和去磷酸化增加突触囊泡的循环,从而增加其利用率。因此突触体素表达上调不仅增加突触内分泌囊泡的数量、稳定突触囊泡,而且可增加囊泡的利用率,因此为 VMAT-2 实现其转运功能提供了物质基础。有研究报道突触体素可增加 VMAT-2 转运功能[5]。本研究结果表明:PD 模型组和假磁刺激组 SYN 阳性产物较对照组明显减少,COD 值显著低于对照组($P < 0.01$),但 rTMS-1 组和 rTMS-2 组 SYN 免疫反应产物较 PD 模型组和假刺激组明显增多,分布密集,COD 值显著增高于 PD 模型组和假刺激组($P < 0.05$),表明 rTMS 可上调 PD 小鼠纹状体内突触体素表达。推测 rTMS 可通过上调受损的纹状体内突触体素表达使突触转运和传递功能呈现活跃状态,有助于黑质纹状体系统多巴胺转运。

rTMS 可促进 PD 模型小鼠纹状体内多巴胺含量,且上调 VMAT-2 和突触体素的表达,VMAT-2 的表达上调可增加细胞质内的多巴胺转运至突触囊泡,减少多巴胺在细胞质内的分解,提高多巴胺利用率。突触体素的表达上调可增加突触囊泡的数量以及提高突触的转运和传递功能。VMAT2 和突触体素有可能通过其协同作用进一步增加多巴胺转运及释放。因此推测 rTMS 可能通过上调 VMAT-2 和突触体素的表达增加多巴胺释放和提高多巴胺利用率而发挥治疗作用。但 rTMS 如何上调 VMAT-2 和突触体素的表达有待进一步探讨。

**参考文献:**


[1] Helmich R C, Siebner H R, Bakker M, *et al*. Repetitive transcranial magnetic stimulation to improve mood and motor function in Parkinson's disease[J]. J Neurol Sci, 2006, 248(1-2): 84-96.

[2] del-Olmo M F, Bello O, Cudeiro J. Transcranial magnetic stimulation over dorsolateral prefrontal cortex in Parkinson's disease[J]. Clin Neurophysiol, 2007, 118(1): 131-139.

[3] Erhardt A, Sillaber I, Welt T, *et al*. Repetitive transcranial magnetic stimulation increases the release of dopamine in the nucleus accumbens shell of morphine-sensitized rats during abstinence[J]. Neuropsychopharmacology, 2004, 29(11): 2074-2080.

[4] Strafella A P, Paus T, Barrett J, *et al*. Repetitive transcranial magnetic stimulation of the human prefrontal cortex induces dopamine release in the caudate nucleus[J]. J Neurosci, 2001, 21(15): RC157.

[5] Chen C X, Huang S Y, Zhang L, *et al*. Synaptophysin enhances the neuroprotection of VMAT2 in MPP+-induced toxicity in MN9D cells [J]. Neurobiol Dis, 2005, 19(3): 419-426.

[6] Khedr E M, Farweez H M, Islam H, *et al*. Therapeutic effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on motor function in Parkinson's disease patients[J]. Eur J Neurol, 2003, 10(5): 567-572.

[7] Bohnen N I, Albin R L, Koeppe R A, *et al*. Positron emission tomography of monoaminergic vesicular binding in aging and Parkinson disease[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(9): 1198-1212.

[8] Xu Z, Cawthon D, McCastlain K A, *et al*. Selective alterations of gene expression in mice induced by MPTP[J]. Synapse, 2005, 55(1): 45-51.

[9] Daly C, Sugimori M, Moreira J E, *et al*. Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(11): 6120-6125.


(编辑　栾　嘉)

## 血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg = 0.133 kPa)。

本刊编辑部