论著

文章编号:1000-5404(2012)17-1754-04

6-羟多巴损伤黑质导致迷走神经背核乙酰胆碱转移酶和酪氨酸羟化酶表达变化

连 辉[1,2],蔡青青[1,2],王志勇[1,2] (453003 河南 新乡,新乡医学院:基础医学院人体解剖学教研室[1],河南省高等学校组织再生重点开放实验室[2])

[摘要] **目的** 观察6-羟多巴(6-hydroxydopamine,6-OHDA)损伤大鼠黑质后迷走神经背核(dorsal motor nucleus of the vagus,10N)中乙酰胆碱转移酶(choline acetyltransferase,ChAT)和酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)含量的变化。**方法** 16只SD大鼠根据随机数字表分为6-OHDA大鼠组和对照组。6-OHDA大鼠组双侧黑质(substantia nigra,SN)内注射6-OHDA,对照组双侧SN内注射等体积的生理盐水。6周后断头取脑,Nissl染色观察SN和10N中的Nissl小体,免疫荧光和免疫印迹检测SN内TH和10N内ChAT与TH的表达。**结果** 与对照组比较,6-OHDA大鼠组SN内TH阳性细胞数量从(54±5)个减少至(13±2)个($P<0.05$),蛋白表达水平从0.62±0.13降低至0.34±0.11($P<0.05$),10N中ChAT阳性细胞数量从(37±3)个减少到(26±5)个($P<0.05$),TH阳性细胞数量从(6±3)个增加到(13±2)个($P<0.05$),背侧延髓内ChAT的蛋白表达水平从0.07±0.02下降至0.05±0.02($P<0.05$),TH蛋白表达水平从0.08±0.05增高到0.13±0.04($P<0.05$)。**结论** 6-OHDA大鼠10N中ChAT和TH表达变化可能与帕金森病患者的胃排空障碍存在一定的联系。

[关键词] 6-羟多巴;迷走神经背核;乙酰胆碱转移酶;酪氨酸羟化酶
[中图法分类号] R322.85; R345; R343.27 [文献标志码] A

Changes of choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase expression in dorsal motor nucleus of vagus induced by substantia nigra lesion by 6-hydroxydopamine

Lian Hui[1,2], Cai Qingqing[1,2], Wang Zhiyong[1,2] ([1]Department of Anatomy, College of Basic Medical Science, [2]Key Laboratory for Tissue Regeneration of Henan University, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan Province, 453003, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the expression of choline acetyltransferase (ChAT) and tyrosine hydroxylase (TH) in rat dorsal motor nucleus of vagus (10N) induced by substantia nigra lesion by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). **Methods** According to the random number table, a total of 16 female SD rats were randomly divided into a 6-OHDA group and a normal control group. 6-OHDA was injected into the bilateral substantia nigra (SN) of the rats in the 6-OHDA group, and the same volume of saline was injected into the same position of the rats in the normal control group. After six weeks, the rats were sacrificed and the brains were obtained. Nissl staining was used to detect the Nissl bodies in the SN and 10N, and immunofluorescent assay and Western blot analysis were used to detect TH expression in the SN and ChAT and TH expression in the 10N. **Results** Compared with the normal control group, the number of TH immunoreactive neurons in the SN of the 6-OHDA group decreased from 54±5 to 13±2 ($P<0.05$), and the protein level of TH decreased from 0.62±0.13 to 0.3±0.11 ($P<0.05$). The number of ChAT immunoreactive neurons in the 10N of the 6-OHDA group decreased from 37±3 to 26±5 ($P<0.05$), but the number of TH immunoreactive neurons increased from 6±3 to 13±2 ($P<0.05$). In the dorsal medulla, the level of ChAT protein decreased from 0.07±0.02 to 0.05±0.02 ($P<0.05$), and the level of TH protein increased from 0.08±0.05 to 0.13±0.04 ($P<0.05$). **Conclusion** The changes of ChAT and TH expression in 10N may be associated with gastric emptying dysfunction in patients with Parkinson's disease.

[**Key words**] 6-hydroxydopamine; dorsal motor nucleus of vagus; choline acetyltransferase; tyrosine hydroxylase; Parkinson's disease

Supported by the Fund for Excellent Master of Xinxiang Medical College (2012). Corresponding author: Wang Zhiyong, Tel: 86-373-3831655, E-mail: wangliheng@VIP.163.com

[基金项目] 新乡医学院优秀硕士资助项目(2012)
[通信作者] 王志勇,电话:(0373)3831655,E-mail:wangliheng@VIP.163.com

迷走神经背核(dorsal motor nucleus of the vagus, 10N)在调节胃的运动中起主要作用,10N 中几乎所有的运动神经元都含有乙酰胆碱(acetylcholine, Ach),许多运动神经元含有去甲肾上腺素(noradrenaline, NE)和多巴胺(dopamine, DA)[1-3]。酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是含有儿茶酚胺能(NE、肾上腺素和 DA)的神经元和内分泌细胞的标志[4]。免疫组织化学研究已经证明了 10N 中含有儿茶酚胺[5]。超过 80% 的帕金森病(Parkinson's disease, PD)患者同时伴有胃排空障碍[6]。胃的运动过程中,10N 中的胆碱能和儿茶酚胺能神经元起主要作用。目前,黑质(substantia nigra, SN)内注射 6-羟多巴(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)制备的 PD 模型得到了广泛应用。研究发现,用 6-OHDA 损伤双侧 SN 中的 DA 能神经元(以下称 6-OHDA 大鼠),大鼠的运动协调能力降低,同时存在胃排空障碍[7]。因此,我们研究了 6-OHDA 大鼠 10N 中乙酰胆碱转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)和 TH 含量的变化,为进一步揭示 PD 患者胃排空障碍的发生机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年健康 SD 品系雌性大鼠 16 只,体质量 220 ~ 250 g(新乡医学院实验动物中心提供)。大鼠均进行行为检测,确认无震颤、运动减少、肢体僵硬、竖毛、竖尾等行为后,每笼 4 只喂养(室温 24 ℃,湿度 45%)。3 d 后根据随机数字表分为对照组与 6-OHDA 大鼠组(n = 8),6-OHDA 大鼠组双侧 SN 内分别注射 2 μl 6-OHDA,其中 4 只做免疫荧光染色,4 只做免疫印迹。

1.2 6-OHDA 大鼠模型的建立

大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后,固定于脑立体定位仪上,剪去头部毛发,在常规消毒下,于头颅正中切开头皮和皮下组织,确定前囟坐标,参照大鼠脑立体定位图谱,确定两侧 SN 坐标:前囟尾侧 4.4 mm,矢状缝两侧 1.2 mm,硬膜下 7.8 mm。进行标记定位后,牙科钻在相应部位钻透颅骨,勿损伤硬脑膜。用 5 μl 微量进样器吸取 6-OHDA 4 μl(4 μg/μl),每孔 2 μl,缓慢进针至预定深度,1 μl/min 注入,注射完毕后留针 10 min,1 mm/min 缓慢退出,缝合皮肤。对照组大鼠用同样的方法在两侧 SN 给予等体积的生理盐水。术后前 3 d 腹腔注射青霉素钠 20×10^4 U/只,以预防感染。

1.3 Nissl 染色

6 周后,分别取 2 组大鼠 4 只,依次用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,4% 多聚甲醛灌流固定,取大脑,在同种固定液中继续固定 24 h,然后依次用 15% 和 30% 的蔗糖溶液梯度脱水 48 h,-80 ℃深冻冰箱中放置 30 min 后,根据大鼠脑图谱确定 SN 和 10N 的位置,做冰冻连续冠状切片,切片 20 μm 厚。切片入蒸馏水洗涤 2 min,Nissl 染色液染 3 min,蒸馏水洗涤 1 min 后,依次脱水、透明、封片,显微镜下观察 SN 和 10N 中的 Nissl 小体。

1.4 ChAT 和 TH 免疫荧光染色

切片经微波辐射法抗原修复 15 min,5% 的山羊血清封闭 30 min,SN 处滴加小鼠单克隆抗体 TH(1∶10 000,Sigma),10N 处分别滴加小鼠单克隆抗体 ChAT(1∶100,Chemico)和小鼠单克隆抗体 TH(1∶10 000),4 ℃孵育 12 h 后,10N 处 TH 滴加 Alexa Fluro 488 标记山羊抗小鼠 IgG(1∶500,碧云天生物技术有限公司),其余滴加 Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG(1∶500,碧云天生物技术有限公司),室温反应 1 h,抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜下观察 SN 中 TH 和 10N 中 ChAT 与 TH 的表达,计数每个视野中阳性细胞的数量。

1.5 Western blot 检测 SN 中 TH 和背侧延髓中 ChAT、TH 的表达

按 1.3 中方法麻醉其余大鼠,冰上直接断头快速取出大鼠 SN 及背侧延髓组织。常规提取组织中蛋白质,考马斯亮蓝法检测蛋白浓度。2 组蛋白各取样 100 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜,裁剪目的条带。5% 脱脂奶粉封闭 2 h,小鼠单克隆抗体 TH(1∶10 000),小鼠单克隆抗体 ChAT(1∶1 000,Chemico),4 ℃过夜;HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(1∶5 000,碧云天生物技术有限公司)孵育 2 h,ECL 显色。应 FluorchemV 2.0 系统进行光密度测定,以目的条带与内参照 GAPDH 的平均光密度的比值表示蛋白水平,进行分析。

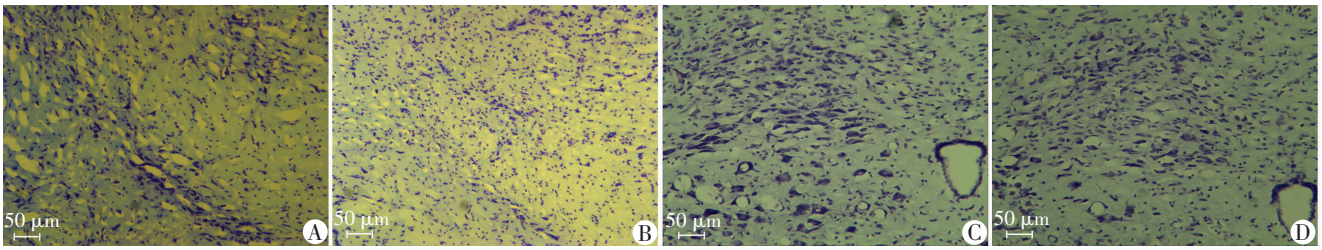
1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 软件,组间比较进行方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 Nissl 染色结果

Nissl 染色可见 SN 和 10N 处神经元的 Nissl 小体。与对照组相比,6-OHDA 大鼠组 SN 处的 Nissl 小体明显减少,10N 中的 Nissl 小体未见明显变化。见图 1。

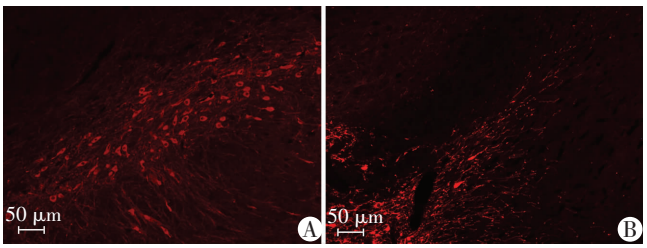


A、C:对照组;B、D:6-OHDA 组;A、B:SN;C、D:10N

图 1 2 组大鼠 SN 和 10N 处的 Nissl 染色观察

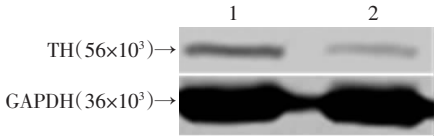
2.2 6-OHDA 大鼠组 SN 的病变

TH 是儿茶酚胺合成过程中的限速酶，是确定儿茶酚胺能神经元的标志。SN 中 TH 阳性的神经元大部分是 DA 能的，TH 阳性的神经元可间接地反映 SN 中 DA 能神经元的分布。与对照组相比，6-OHDA 大鼠组注入 SN 6 周后，免疫荧光染色可见 SN 中每个视野（×100）TH 的阳性的神经元数量从（54 ± 5）个减少至（13 ± 2）个（$P < 0.05$，图 2）；Western blot 分析可见 SN 中 TH 的蛋白水平从 0.62 ± 0.13 降低至 0.34 ± 0.11（$P < 0.05$，图 3）。



A：对照组；B：6-OHDA 大鼠组

图 2 2 组大鼠 SN 中 TH 免疫荧光染色结果



1：对照组；2：6-OHDA 大鼠组

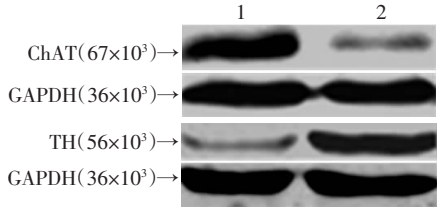
图 3 Western blot 检测 2 组大鼠 SN 中 TH 蛋白表达

2.3 10N 中 ChAT 和 TH 阳性神经元的分布

免疫荧光染色可见 ChAT 分布于神经元的细胞体，TH 分布于神经元的细胞体和突起。与对照组相比，6-OHDA 大鼠组 10N 中每个视野（×200）ChAT 阳性神经元数量从（37 ± 3）个减少到（26 ± 5）个（$P < 0.05$）；TH 阳性神经元数量从（6 ± 3）个增加到（13 ± 2）个（$P < 0.05$），突起密度增高。在 10N 的背侧，同时可观察到 ChAT 和 TH 在孤束核（nucleus tractus solitaries，Sol）的分布与 10N 中 ChAT 和 TH 的变化趋势一致。见图 4。

2.4 背侧延髓 ChAT 和 TH 蛋白水平 Western blot 检测

10N 及其背外侧的 Sol 均位于延髓的背侧。6-OHDA 注入 SN 6 周后，背侧延髓 ChAT 的蛋白表达水平从 0.07 ± 0.02 下降至 0.05 ± 0.02（$P < 0.05$，图 5），TH 的蛋白表达水平从 0.08 ± 0.05 增高到 0.13 ± 0.04（$P < 0.05$，图 5）。



1：对照组；2：6-OHDA 组

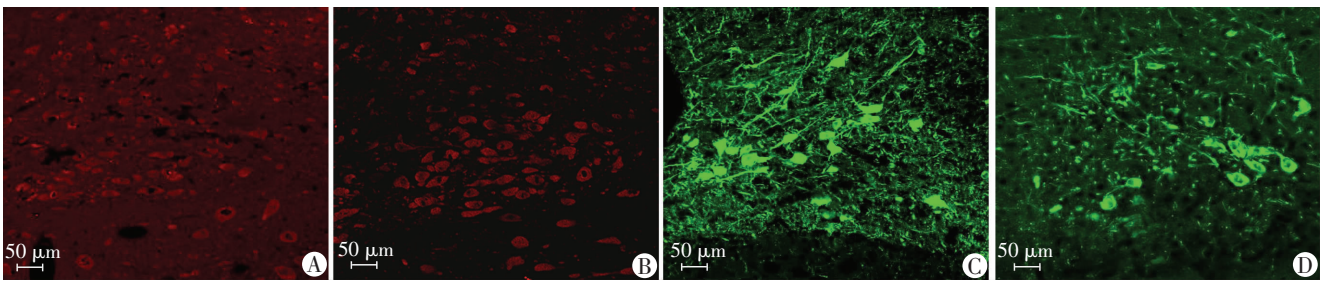
图 5 Western blot 检测 2 组大鼠背侧延髓处 ChAT 和 TH 蛋白的表达

3 讨论

6-OHDA 损伤 SN 6 周后，10N 中 ChAT 含量减少，TH 含量增多，提示在 SN 和 10N 之间可能存在直接或间接地纤维联系。研究表明，SN 的 DA 能神经元可投射至下丘脑，SN 中的 DA 能神经元可通过儿茶酚胺的传输而激活自主神经[8]。同样，在下丘脑与 10N 之间也存在纤维联系。因此，SN 中 DA 能神经元的退行性变可能会通过下丘脑影响 10N 中一些神经元的活性。SN 与 10N 之间是否存在直接的纤维联系，尚需进一步研究。在损伤了 SN 的 DA 能神经元后，10N 中 TH 的表达却增高了，具体机制尚不清楚。

通过迷走神经，10N 中胆碱能神经元主要促进胃排空，儿茶酚胺能神经元则主要抑制胃的运动[9]。因此 10N 中乙酰胆碱含量的降低和儿茶酚胺含量的增多均可导致 PD 大鼠胃运动功能障碍。胃壁平滑肌中的乙酰胆碱和多巴胺可来源于迷走神经末梢，也可来源于消化道肌间神经丛中的胆碱能和 DA 能神经元。10N 中 DA 能神经元释放的 DA 可以通过作用于消化道肌间神经丛中胆碱能神经元上的 D2 能受体而减少 Ach 的释放而抑制胃运动[10]。由于 DA 的长期抑制，可能导致胆碱能神经元的萎缩。因此，10N 中胆碱能神经元的减少和儿茶酚胺能神经元的增多可直接或间接导致胃壁平滑肌中乙酰胆碱含量的降低。

胃的感觉信息主要是由 Sol 的神经元接收并整合才传递至 10N[11]。本实验在 Sol 可以观察到儿茶酚胺能的神经元（释放 NE 或 DA），PD 大鼠背侧延髓中 TH



A、C：6-OHDA 组；B、D：对照组；ChAT 为红色，TH 为绿色

图 4 10N 中 ChAT 和 TH 免疫荧光染色结果

的蛋白表达水平增高。研究表明,10N 投射至胃的神经元中,通过细胞膜上的 D1 或 D2 样受体介导,DA 可分别与 28% 或 43% 的神经元产生兴奋性或抑制性的效应[3]。NE 则可作用于 10N 神经元上的 α1 和 α2 受体,多数情况下,NE 可激活 α2 受体引起细胞膜超级化[12]。因此,Sol 中儿茶酚胺释放量的增多可能会抑制胆碱能神经元细胞膜的兴奋性效应,引起胆碱能神经元的减少,这可能是 PD 大鼠胃运动功能障碍的主要原因。具体的机制尚需进一步的研究。

本实验利用免疫荧光染色和 Western blot 检测技术,用 6-OHDA 损伤双侧 SN 中的 DA 能神经元,10N 中 ChAT 表达减少,TH 增多,二者含量的变化可能与胃排空障碍存在一定的联系,为揭示 PD 患者胃排空障碍的发病机制提供了依据。

参考文献:

[1] Hayakawa T, Takanaga A, Tanaka K, *et al*. Distribution and ultrastructure of dopaminergic neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus projecting to the stomach of the rat[J]. Brain Res, 2004, 1006(1): 66 - 73.

[2] Tsukamoto K, Hayakawa T, Maeda S, *et al*. Projections to the alimentary canal from the dopaminergic neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus of the rat[J]. Auton Neurosci, 2005, 123(1/2): 12 - 18.

[3] Zheng Z, Travagli R A. Dopamine effects on identified rat vagal motoneurons[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(4): G1002 - G1008.

[4] 伊宏亮, 郭文琼, 孙卫忠, 等. 雌激素上调神经营养因子增加雄性小鼠中脑多巴胺神经元数量的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(7): 663 - 666.

[5] Zhao D Q, Lu C L, Ai H B. The role of catecholaminergic neurons in the hypothalamus and medullary visceral zone in response to restraint water-immersion stress in rats[J]. J Physiol Sci, 2011, 61(1): 37 - 45.

[6] Pfeiffer R F. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2011, 17(1): 10 - 15.

[7] Zheng L F, Mi X L, Zhang X H, *et al*. Weakened gastric motor activity and enhanced peripheral dopaminergic system in the rodent model of Parkinson's disease[J]. Gastroenterology, 2009, 136(5): A - 145.

[8] Walters J R, Hu D, Itoga C A, *et al*. Phase relationships support a role for coordinated activity in the indirect pathway in organizing slow oscillations in basal ganglia output after loss of dopamine[J]. Neuroscience, 2007, 144(2): 762 - 776.

[9] Tanaka T, VanKlompenberg L H, Sarr M G. Selective role of vagal and nonvagal innervation in initiation and coordination of gastric and small bowel patterns of interdigestive and postprandial motility[J]. J Gastrointest Surg, 2001, 5(4): 418 - 433.

[10] Korchounov A, Meyer M F, Krasnianski M. Postsynaptic nigrostriatal dopamine receptors and their role in movement regulation[J]. J Neural Transm, 2010, 117(12): 1359 - 1369.

[11] Babic T, Browning K N, Travagli R A. Differential organization of excitatory and inhibitory synapses within the rat dorsal vagal complex[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 300(1): G21 - G32.

[12] Martinez-Pena-y-Valenzuela I, Rogers R C, Hermann G E, *et al*. Norepinephrine effects on identified neurons of the rat dorsal motor nucleus of the vagus[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 286(2): G333 - G339.

(**收稿**:2012-02-09;**修回**:2012-04-25)

(编辑 王小宾)

(上接 1753 页)

患者予胰岛素泵治疗,由于其自身原因,未使用,故予甘精胰岛素 + 诺和锐 3 餐前注射,根据血糖调整,出院时患者的方案为甘精胰岛素 9 U/晚,诺和锐 4 U/早,14 U/中,11 U/晚,出院 4 个月后,患者自行在家严格控制饮食,规律运动,监测血糖调整胰岛素用量为甘精胰岛素 9 U/晚,诺和锐 4 U/早,8 U/中,7 U/晚,现血糖控制为空腹 5 ~ 6 mmol/L,餐后 2 h 6 ~ 8 mmol/L,极少发生低血糖,即便发生也可很快纠正,无严重低血糖出现,患者生活质量明显提高。

2 讨论

胃大部切除术使残胃容量小,术后残胃与空肠吻合,食物迅速通过胃排空而到空肠,吸收面积增大,易于消化,使餐后血糖迅速升高,因此使用口服降糖药即便是"餐时调节剂"——瑞格列奈,30 min 起效,1 h 内血浆药物浓度达峰值,然后血浆浓度迅速下降,4 ~ 6 h 被清除,代谢物无降糖作用,但在该患者身上用 0.25 mg 的小剂量仍可致其 6 ~ 8 h 后持续发生低血糖。因此,对这类患者,使用口服降糖药是不合理的。由患者目前使用的胰岛素剂量可以看出,其基础胰岛素与餐时胰岛素的比例(9∶19≈1∶2)离 1∶1相去甚远,患者餐前所需量较大,基础量较小,而目前我们使用的预混胰岛素(类似物),基础与餐时的比例最小为 1∶1,也达不到 1∶2,因此,对她而言,使用预混胰岛素(类似物)也不合理。由此,我们有理由认为,胃大部切除术后的糖尿病患者要控制血糖,用胰岛素泵或者基础胰岛素(长效胰岛素) + 餐时胰岛素(速效胰岛素)是比较合理的方案。近年出现的有望可治愈 2 型糖尿病的胃转流术[1],它与胃大部切除术有类似之处,但荟萃分析表明[2-3],其治疗 2 型糖尿病的治愈率为 78%,因此那些没有被治愈的 2 型糖尿病患者术后仍需要降糖治疗,那么这部分患者我们在予以降糖方案的选择时要考虑肠吸收与胃吸收的不同,予口服降糖药可能导致持续性低血糖的发生,此时,也许胰岛素是更好的选择,而预混胰岛素(类似物)比例固定,不能个体化的满足每个患者的具体需求,因此,我们认为,在这种情况下,应当首先考虑胰岛素泵或者长效胰岛素 + 速效胰岛素的方案控制患者血糖。

参考文献:

[1] Couzin J. Medicine. Bypassing medicine to treat diabetes[J]. Science, 2008, 320(5875): 438 - 440.

[2] Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, *et al*. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis[J]. Am J Med, 2009, 122(3): 248 - 256.

[3] Purnell J Q, Flum D R. Bariatric surgery and diabetes: who should be offered the option of remission?[J]. JAMA, 2009, 301(15): 1593 - 1595.

(**收稿**:2012-06-16;**修回**:2012-07-16)

(编辑 栾 嘉)