基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1149-03

MPTP 诱导慢性帕金森病小鼠模型的实验研究

罗 琴[1],彭国光[2],王加才[2],王少君[2]

(1.自贡市第一人民医院神经内科,自贡 643000;2.重庆医科大学附属第一医院神经内科、重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察慢性长期小剂量注射 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,MPTP)对小鼠黑质多巴胺能神经元损伤及 α-突触核蛋白(α-synuclein 蛋白)表达的影响。方法:C57BL 小鼠背部皮下注射 MPTP 25 mg/kg 体重,每周注射 2 次,连续注射 5 周,观察小鼠行为学改变,应用免疫组化染色检测酪氨酸羟化酶(Throsine hydroxylase,TH)和 α-突触核蛋白(α-synuclein,α-syn)的表达,原位末端标记法(TUNEL 法)检测多巴胺能神经细胞凋亡。结果:与注射生理盐水组相比,注射 MPTP 组小鼠出现短暂一过性的震颤、后腿拉直、躬背、竖毛、运动减少等;黑质部酪氨酸羟化酶阳性细胞数目减少,α-突触核蛋白阳性细胞数目增加;生理盐水组未观察到细胞凋亡,MPTP 组存在凋亡现象。结论:慢性长期注射 MPTP 可诱导小鼠行为学改变,黑质部多巴胺神经元细胞凋亡,以及 α-突触核蛋白持续表达增多和聚集。

【关键词】帕金森病;1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶;α-突触核蛋白;细胞凋亡

【中国图书分类法分类号】R742.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-20

The establishment of chronic parkinson's desease in mouse model induded by mptp

LUO Qin, et al

(*Department of Neurology, the First People's Hospital of Zigong*)

【Abstract】*Objective*: To investigate dopaminergic neuron injury and α-synuclein expression of mouse exposed chronically to low dose of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Methods*: The C57BL mice received bake hypodermic injections of 25 mg/kg MPTP twice a week for 5 consecutive weeks. Abnormal behavior was observed during the treatment by using herbicide. The expression of throsine hydroxylase(TH) and α-synuclein was determined by immunohistochemistry. The dopaminergic neurons apoptosis was determined by TdT-mediatd dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL). *Results*: As compared with the controls of mice, those treated with MPTP displayed markedly hypoactive behavior. Immunohistochemical staining showed that the numbers of TH stain cells was decreased significantly after treatment with MPTP, and the density of α-synuclein stain was increased significantly after treatment with MPTP. Apoptosis displayed after treatment with MPTP. *Conclusion*: Chronical injection with MPTP might induce abnormal behavior. apoptosis and continual aggregation of α-synuclein in dopaminergic neurons of substantial nigra.

【Key words】Parkinson's disease; 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; α-synuclein; Apoptosis

帕金森病是(Parkinson's disease,PD)是一种常见的中枢神经系统变性疾病。目前,PD 的病因及发病机制尚未明确,主要与环境因素和遗传因素有关。其主要病理改变是黑质多巴胺能神经元进行性缺失,病理性特征标志物是 Lewy 小体的形成。研究发现 α-突触核蛋白(α-synuclein,α-syn)是 Lewy 小体的主要成份[1],α-syn 蛋白的异常聚集可能是 PD 病理的中心环节,在家族性和散发性 PD 的发病过程中起着重要的作用。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,MPTP)是一种黑质神经毒素。人们发现,暴露于 MPTP 的农民,以及吸毒者误吸 MPTP 后均可出现帕金森病的临床症状[2],从而引起了对环境中黑质毒素 MPTP 的重视。MPTP 现已用来制备 PD 动物模型,因接受 MPTP 的动物可出现类似 PD 病的症状。不过在以往的急性模型中,尚未发现有 α-syn 蛋白的表达增多,但这并不能代表 MPTP 不会导致 α-syn 蛋白表达的改变。因为帕金森病的发病呈慢性进行性过程,本实验采用慢性长期 MPTP 注射,于不同时期观察 MPTP 对小鼠 α-syn 蛋白表达的变化和对多巴胺能神经元的影响,以期探讨 PD 的发病机制,并为其他实验提供病理改变与帕金森病相似的动物模型。

作者介绍:罗 琴(1981-),女,硕士,研究方向:帕金森病。

通讯作者:彭国光,男,教授,E-mail:penwan233@sina.com。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和动物

α-syn 蛋白多克隆抗体，酪氨酸羟化酶(TH)单克隆抗体(美国 Chemicon 公司)；生物素标记抗绵羊二抗(美国 Vecter 公司)，生物素化标记抗小鼠二抗(深圳晶美公司)；TUNEL 试剂盒(德国 Roche 公司)；Image Pro-plus 5.0 图像分析系统(Media Cybemetics 公司)。C57BL 小鼠(重庆医科大学动物实验中心)。

1.2 动物实验的环境条件

每日光照 14 h，黑暗 10 h，室温 20℃ ± 2℃，水食任意摄取。实验过程中对动物的饲养及取材均遵守实验动物管理与保护的有关规定。

1.3 动物分组及处理

8 周龄雄性 C57BL 小鼠 80 只，体重 22~26 g，随机分为 MPTP 组，和生理盐水组，每组各 40 只。MPTP 组背部皮下注射 MPTP 25 mg/kg，每周 2 次，连续注射 5 周；生理盐水组经相同方式给与相同体积的生理盐水，观察小鼠的行为学改变。

1.4 取材

分别最后 1 次注射完毕后 1 d，3 周，2 个月，6 个月随机抽取 MPTP 组和生理盐水组小鼠各 10 只，灌注固定、取脑，石蜡包埋、黑质部位冠状切片待检。

1.5 免疫组化染色

①TH 免疫组化染色。切片脱蜡至水，微波热修复抗原，磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗，正常山羊血清封闭后，滴加抗 TH 小鼠单克隆抗体(1:200)4℃过夜；PBS 冲洗后加生物素标记的抗小鼠二抗工作液 37℃孵育 30 min；滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 37℃ 30 min，冲洗后用 3，3- 二氨基联苯胺(DAB)显色。②α-syn 蛋白免疫组化染色 切片脱蜡至水，微波热修复抗原，PBS 冲洗，正常山羊血清封闭后，滴加抗 α-syn 蛋白绵羊多克隆抗体(1:1 000)4℃过夜；PBS 冲洗后加生物素标记的抗绵羊二抗(1:500)37℃孵育 30 min；滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 37℃ 30 min，冲洗后用 3，3- 二氨基联苯胺(DAB)显色。

1.6 TUNEL 法检测凋亡

切片脱蜡至水，蛋白酶 K 室温孵育 30 min，PBS 冲洗，滴加 TUNEL 反应混合溶液 37℃孵育 2 h，充分冲洗，加转化剂 POD37℃孵育 30 min，冲洗后用 DAB 显色。

1.7 统计学处理

全部数据均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，使用 SPSS 14.0 统计软件完成统计。

2 结 果

2.1 动物行为学表现

MPTP 组小鼠在每次给药后 1 h 内出现震颤、竖毛、竖尾、肢体僵硬、运动减少、平衡障碍等表现，震颤、竖毛、竖尾症状于 24 h 内消失，肢体僵硬、运动减少、平衡障碍也于 24 h 内减退，但随着注射时间的延长，此 3 项症状逐渐加重并且持续时间也延长。生理盐水组小鼠无明显异常表现。

2.2 黑质部 TH 免疫组化染色

MPTP 组和生理盐水组冠状中脑组织切片经过 TH 免疫组化染色发现，注射完毕后 1 d、3 周、2 个月、6 个月 MPTP 组黑质部位 TH 阳性染色明显较生理盐水组减弱，阳性细胞数目较生理盐水组明显减少，MPTP 组与生理盐水组相比有显著性差异($P<0.05$)，两组各时间点 TH 在中脑黑质中的表达情况见表 1。MPTP 组于注射完毕后 1 d，TH 免疫组化阳性细胞数减少最多，随着时间的推移，阳性细胞数又有所增加。

2.3 黑质部 α-syn 蛋白免疫组化染色

MPTP 组和生理盐水组冠状中脑组织切片经过 α-syn 蛋白免疫组化染色发现，注射完毕后 1 d，3 周，2 个月，6 个月 MPTP 组黑质部位 α-syn 阳性染色明显较生理盐水组增强，阳性细胞数明显增多，MPTP 组与生理盐水组相比有显著性差异($P<0.01$)，2 组各时间点 α- 突触核蛋白在黑质中的表达情况见表 2。且随着注射完毕后的时间推移，MPTP 组 α-syn 阳性染色在 3 周的时候表达最强。

2.4 TUNEL 染色结果

TUNEL 染色阳性的细胞胞核呈棕褐色，单个散在分布，胞核着色，胞浆不着色，凋亡细胞的细胞核体积缩小或者固缩，形态不规则，有的呈圆形，有的呈不规则形，呈空泡状，主要位于双侧黑质区；MPTP 组注射完毕后 1 d 即可见凋亡细胞，3 周时凋亡细胞最多，达高峰，之后有所减少，6 月时仍可见到凋亡细胞，而生理盐水组未见明显的凋亡细胞(图 1)，由于凋亡仅存在于 MPTP 组，因此未作统计处理。

3 讨 论

本实验所建立的动物模型符合理想的帕金森病动物模型所具备的条件[3]。本实验结果发现，MPTP 小鼠黑质多巴胺能神

表 1 各时间点生理盐水组和 MPTP 组黑质区 TH 阳性细胞数情况(均数 ± 标准差)(n=10)

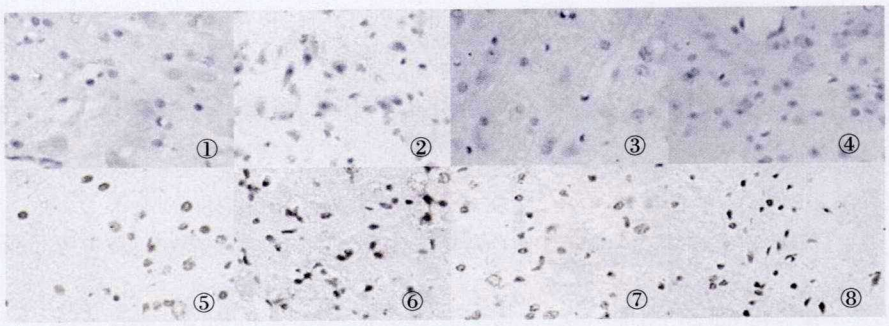
分组	第 1 d(CPC)	第 3 周(CPC)	第 2 月(CPC)	第 6 月(CPC)
生理盐水组	66.83 ± 4.45	63.50 ± 3.28	66.83 ± 5.98	62.83 ± 4.916
MPTP 组	35.00 ± 7.21*	43.17 ± 3.54*	45.50 ± 5.13*	39.00 ± 6.782*

注：各时间点 MPTP 组和生理盐水组比较：*$P<0.01$

表 2 各时间点生理盐水组和 MPTP 组小鼠黑质部位 α- 突触核蛋白的表达(平均值 ± 标准差)(n=10)

分组	第 1 d(IOD)	第 3 周(IOD)	第 2 月(IOD)	第 6 月(IOD)
生理盐水组	8 135.52 ± 106.40	8 160.23 ± 191.55	8 404.98 ± 403.67	8 284.10 ± 280.38
MPTP 组	69 545.73 ± 5 904.03*	236 244.70 ± 23 502.91*	111 161.50 ± 24 088.71*	118 069.2 ± 21 746.91*

注：各时间点 MPTP 组和生理盐水组比较：*$P<0.01$



①②③④分别为生理盐水组处理后第 1 d、第 3 周、第 2 月、第 6 月，生理盐水组均未见凋亡细胞；⑤⑥⑦⑧为 MPTP 组处理后第 1 d、第 3 周、第 2 月、第 6 月，MPTP 组均有阳性染色的凋亡细胞，呈圆形或不规则形

图 1 TUNEL 染色结果

经元内 α-syn 蛋白表达持续增多，并与小鼠的病理改变和行为学改变有关。流行病学研究认为，PD 是由多种基因突变间相互作用和(或)基因突变加上环境毒素共同作用所致。环境毒素 MPTP 等是否会在动物模型中诱导 α-syn 蛋白表达的改变，尚无定论。既往在 MPTP 急性模型中并未观察到有 α-syn 蛋白的明确表达，而目前有研究观察到 MPTP 慢性模型可有 α-syn 蛋白的增高和聚集[4]，但是对 α-syn 蛋白持续增高及存在的时间没有进行详细的观察和描述。本研究中通过对 C57BL 小鼠长时间小剂量注射 MPTP，使其出现类似 PD 的症状，并通过免疫组化方法长时间观察黑质多巴胺能神经元的损害和黑质部 α-syn 蛋白表达变化情况，同时观察 α-syn 蛋白随着时间变化在脑内表达的改变。实验发现：MPTP 处理后的小鼠黑质多巴胺能神经元减少，出现凋亡；α-syn 蛋白表达增多，且主要在多巴胺能神经元的胞浆内表达；α-syn 蛋白可长时间的表达(本实验仅观察至注射后 6 个月)，以注射完毕后 3 周时表达最明显；胞核胞浆内均有 α-syn 蛋白表达，到注射完毕后 2 个月仅表达于胞浆，但能持续至注射完毕后 6 个月。MPTP 诱导 α-syn 蛋白表达增高的原因可能是由于 MPTP 影响了 α-syn 的降解。MPTP 可抑制泛素-蛋白酶体途径，而 α-syn 蛋白主要通过该途径降解[5]。

MPTP 对多巴胺能神经元的毒性作用主要表现在以下几个方面：MPTP 可以导致自由基的过度产生；导致 NO 的大量生成；抑制线粒体呼吸链；导致胶质细胞反应性增生；诱导细胞凋亡[6]。凋亡是单个细胞的程序性死亡，是一种主动过程，需要一些特定的物质来启动凋亡的发生。在既往对 MPTP 急性模型的研究中并没有观察到凋亡的发生，而亚急性模型中能观察到[7]，这种原因可能是由于短时间大量毒素进入细胞内，细胞本身还没有充足的时间来启动凋亡，而神经元已经死亡。有学者认为 5 d 亚急性模型是观察凋亡的最好模型[8]。但是，迄今尚无学者观测慢性模型中细胞凋亡的现象，我们认为慢性模型中的细胞凋亡现象能较急性模型更具代表意义。在本实验中，MPTP 慢性模型中观察到凋亡的发生，证明凋亡过程参与了慢性模型中多巴胺能神经元的死亡。动物模型中，在 MPTP 注射完毕后的各个时期均有凋亡的产生，说明 MPTP 长期慢性注射其毒性作用能使动物的病理改变出现长时间缓慢进展的过程，对于帕金森病更具有代表意义。因为慢性模型在病程上更接近临床帕金森病的缓慢发病特点，其病理表现也更能体现帕金森病的病理特征。

怎样建立理想的帕金森病模型是众多学者所关注的，大家都在探索 6-OHDA[9]、鱼藤酮、百草枯、MPTP 等模型，而在以往的研究中所采用 MPTP 的急性模型不能观察到 α-syn 蛋白表达的改变，也没有凋亡现象，故长时间来，人们认为 MPTP 不能诱导 α-syn 蛋白水平的改变，病理表现不能很好的模拟临床帕金森病的病理特点，使得 MPTP 模型的运用受到限制。近期的研究，通过减少 MPTP 剂量，延长 MPTP 注射时间来建立慢性模型。本实验不仅观察到 α-syn 蛋白稳定的表达，还观察到 α-syn 蛋白能长时间持续表达，为今后进一步探讨 PD 发病机制的实验提供了有效的动物模型。

参 考 文 献

[1] Spillantini M G, Schmide M L, Lee V M, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies [J]. Nature, 1997, 388(6645): 839-840.

[2] Langston J W, Forno L S, Tetrud J, et al. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans year after 1-methy-4-pheny-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure[J]. Ann Neurol, 1999, 46(4): 598-605.

[3] 陈生弟，王 刚. 帕金森病的实验研究进展[J]. 中华老年医学杂志，2004，23(7)：447-449.

[4] Fornai F, Schluter O M, Lenzi P, et al. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: Convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and α-synuclein[J]. PNAS, 2005, 102(9): 3413-3418.

[5] Park T H, Kwon O S, Park S Y, et al. N-methylated beta-carbolines protect PC12 cells from cytotoxic effect of MPP+ by attenuation of mitochondrial membrane permeability change[J]. Neurosci Res, 2003, 46(3): 349-358.

[6] Eriksen J L, Wszolek Z, Petrucelli L. Molecular pathogenesis of Parkinson disease[J]. Arch Neurol, 2005, 62(3): 353-357.

[7] Tatton N A, Kish S J. In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methy-4-pheny-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynuceotidyl transferase labeling and acridine orange staining[J]. Neuroscience, 1997, 77(4): 1037-1048.

[8] Eberhardt O, Sehulz J B. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease[J]. Toxical Lett, 2003, 139(2-3): 135-151.

[9] 罗海彦，彭国光. 应用 6-羟多巴胺建立鼠帕金森病动物模型的研究[J]. 重庆医科大学学报，2002，27(1)：28-31.

(责任编辑：冉明会)