维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)01-0028-04

应用6-羟多巴胺建立鼠帕金森病动物模型的研究

罗海彦[1]，彭国光[2]

（1.重庆医科大学第二临床学院神经内科　重庆　400010；2.重庆医科大学神经病学研究所　重庆　400016）

【摘　要】目的：建立稳定的类似人类帕金森病病理改变的PD动物模型。方法：于黑质致密部，黑质旁部及纹状体区等不同部位采用不同剂量神经毒素6-羟多巴胺注射，造成黑质多巴胺神经元不同程度损伤。运用免疫组织化学方法，对各种不同程度损伤的帕金森病鼠黑质区和纹状体TH阳性神经元及神经纤维进行计数，并观察其与旋转行为，注射部位及剂量的关系。结果：（1）.单侧黑质致密部6-羟多巴胺8μg注射，可以造成注射侧黑质区TH神经元95%以上的缺失。（2）.单侧黑质旁部6-羟多巴胺8μg注射，可以造成注射侧黑质区TH神经元70%以上的缺失。（3）.单侧纹状体区6-羟多巴胺三点注射，可造成注射侧黑质区TH神经元30%－40%的缺失。结论：6-羟多巴胺不同部位和不同剂量注射，可以建立模拟临床上不同病程时期PD动物模型，其症状稳定，为帕金森病的发病机制的研究，药物治疗及各种移植治疗提供了条件。

【关键词】6-羟多巴胺；帕金森病；动物模型

【中国图书分类法分类号】R742.5　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2001-03-13

The establishment of Parkinson's rat model induced by 6-hydroxydopamine lesione

LUO Hai yan , et al

(Department of Neurology, Second College of Clinical Medicine , Chongqing Medical University)

【Abstract】 *Objective* : To establish Parkinson's rat model mimicking different stages in the evolution of Parkinson's disease *Methods*: In three different lesion groups 6-OHDA was injected into substantia nigra, lateral substantia nigra pars compacta and striatum. The behavioural and morphological change were observed after the microinjection with different amount of 6-OHDA solution. *Results*: (1) Unilateral subtantia nigra lesion in rat causes dopaminergic neurons loss more than 95%. (2) Unilateral lateral substantia nigra lesion in rat causes dopaminergic neurons loss more than 70%. (3) Unilateral striatum lesion in rat causes dopaminergic neurons loss less than 50%. *Conclusion* : The different site and amount of microinjection 6-OHDA can establish PD rat mimicking different symptomatic stage in PD. It may be particularly useful as an experimental model in studies of experimental interventions aimed at neuroprotection, regeneration or functional recovery in the nigrostriatal DA system.

【Key words】6-OHDA; Parkinson's disease; Animal model

帕金森病（Parkinsons disease, PD）多发生于中年以上的中枢神经系统变性疾病，严重影响患者的生活与工作，建立帕金森病动物模型可为深入研究该病提供有利条件。本实验采用不同剂量的6-羟多巴胺（6-OHDA）于不同部位注射，选择性的破坏儿茶酚胺类神经元，造成黑质多巴胺神经元不同程度的缺失，建立模拟不同临床分期，与人类帕金森病的病理改变相同的帕金森病模型鼠，以期能为PD的深入研究奠定基础。

1　材料与方法

作者介绍：罗海彦（1965-），男，讲师，硕士，

主要研究方向：帕金森病。

1.1　实验试剂及药品

（1）6-羟多巴胺（6-OHDA）sigma公司（2）阿扑吗啡（apomorphine）sigma公司（3）苯丙胺（amphetamine）英国L.ligh公司。

1.2　实验动物

健康的Wistar大鼠，体重200－250g，由我校实验动物中心提供，经反复行为检测确认其无旋转行为后，同性配伍，随机分为3组，分别为黑质致密体部组，黑质致密体旁组和纹状体区组。大白鼠给予自由饮水进食，白天和夜晚各12 h的睡眠、活动，术前12 h给予禁食，以3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉。

1.2.1　黑质致密体部组PD模型鼠

按照包新民的大鼠脑立体定位图谱[3]，使上门齿钩平面比耳间线平面低2.4mm，使大鼠前囟和后囟在同一平面，参照 Stella[4]方法，头皮正中切口，暴露前囟，于前囟后

维普资讯 http://www.cqvip.com

4.4mm，矢状缝旁1.3mm，颅骨下8.5mm为注射点，使用微量注射器注射6-OHDA8μg，注射速度2μg/min，术毕留针10 min。

1.2.2 黑质致密体旁部组PD模型鼠

按照Lauries[5]方法，使前囟与后囟在同一平面，选择黑质致密体旁为注射点（人字缝前3.5mm，矢状缝旁2.3mm，硬膜下6.8mm），6-羟多巴胺注射量8μg、注射速度2μg/min，术毕留针10 min。

1.2.3 纹状体区组PD模型鼠

参照Kirik[6]方法，调节门齿钩与耳间线处于同一平面、以前囟，矢状缝，硬膜为标志，以下三点为注射点（AP+1.0，ML-3.0，DV-5.0，TB-0.0），（AP-0.1，ML-3.7，DV-5.0，TB0.0）及（AP-1.2，ML-4.5、DV-5.0，TB0.0），分别注入6-羟多巴胺7μg，注射速度2μg/min，术毕留针10 min。

1.3 动物行为检测及评价

1.3.1 黑质致密体部组PD模型鼠

1.3.1.1 苯丙胺诱导的向损伤同侧旋转的行为超过5次/min，持续时间超过30 min。

1.3.1.2 阿扑吗啡诱导的向损伤对侧的旋转行为超过7次/min，持续时间30 min以上。

1.3.2 黑质致密体旁部组PD模型鼠

1.3.2.1 苯丙胺诱导的旋转行为大于5次/min，持续时间30 min。

1.3.2.2 阿扑吗啡诱导的旋转行为小于7次/min，持续时间不超过30 min。

1.3.3 纹状体区组PD模型鼠

1.3.3.1 苯丙胺诱导的向同侧损伤旋转行为大于5次/min，持续时间30 min。

1.3.3.2 阿扑吗啡诱导的向损伤对测的旋转行为小于7次/min，持续时间不超过30 min。

1.4 病理学观察

分别取不同注射部位组的PD模型鼠7只，以3.5%水合氯醛麻醉，生理盐水100～200ml左心室冲洗，然后以4%多聚甲醛300ml灌注，取脑组织于4%多聚甲醛24 h外固定，在20%蔗糖液中脱水1～2天，于纹状体（前囟后0.2mm）及黑质区（前囟后5.5mm）行连续冰冻横切片，片厚30μm，每间隔5张取一片作为切片[7]。

1.4.1 神经元尼氏体染色 采用Olszwski氏[8]焦油紫染色方法，

1.4.2 免疫组织化学法 采用北京中山生物技术公司提供的过氧化酶标记的链霉卵白素(streptavidine/peroxidese)染色试剂盒。

1.4.3 TH免疫阳性神经元及神经纤维计数

1.4.3.1 每只大鼠均取6张中脑横切片，分别累积左侧和右侧黑质区的TH样免疫反应阳性神经元数目，求出每张中脑横切片上左侧和右侧黑质区中TH样免疫反应神经元数目。

1.4.3.2 每只大鼠均取3张纹状体区横切片，分别累积右侧和左侧3个高倍视野下的TH样免疫反应神经纤维，求得每张纹状体区左侧和右侧每一高倍镜下TH免疫反应阳性的神经纤维数。

1.5 数据统计处理

所有统计描述结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验或方差分析。

2 结 果

2.1 大鼠行为的检测

不同注射部位组的PD模型鼠均于术后7、15、22、30及60天分别给于苯丙胺及阿扑吗啡进行旋转行为检测。苯丙胺诱导旋转行为阳性时，以前肢为支撑点，头尾相接，身体弯曲成环状，向损伤同侧旋转。阿扑吗啡诱导旋转行为阳性时，大白鼠且多以旋转侧前肢为支撑点向损伤对侧的原地转动。阿扑吗啡诱导的旋转行为只在黑质致密体部组PD模型中出现，而苯丙胺诱发的旋转行为在三种不同注射部位组PD鼠中均可见，在黑质致密体部组PD模型中苯丙胺诱发的旋转次数与阿扑吗啡诱发的旋转次数二者间有显著性差别（$P<0.05$），各组PD鼠苯丙胺诱发的旋转次数不存在着显著性差异（$P>0.05$），见表1。

2.2 神经元尼氏体观察

表1 不同注射部位组PD模型鼠诱发旋转行为的变化(turns/min，$\bar{x}\pm s$)

诱导试验组别	术后(d)	黑质致密体部组PD模型鼠	黑质致密体旁部组PD模型鼠	纹状体区组PD模型鼠
苯丙胺组	7	7.96 ± 3.61	*	*
	21	8.64 ± 5.78	8.20 ± 2.05	8.14 ± 2.12
	60	*	7.89 ± 1.92	7.67 ± 1.86
阿扑吗啡组	15	13.9 ± 4.15	*	*
	30	16.14 ± 5.10	*	*
	60	16.43 ± 5.86	*	*

注：*诱发试验旋转行为未引出

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2　不同注射部位组PD鼠神经元尼氏体的变化（$\bar{x}\pm s$）

组别	黑质致密体部组PD模型鼠	黑质致密体旁部组PD模型鼠	纹状体区组PD模型鼠
注射侧黑质区	87.75 ± 6.85*△	117.0 ± 17.42	149.75 ± 18.43
非注射侧黑质区	385.0 ± 87.85	390.0 ± 85.12	387.0 ± 80.35

注：*与同程度未注射区比较P<0.0001；△与不同损伤程度PD注射侧比较P<0.05

表3　不同注射部位组PD鼠黑质区TH神经元变化（$\bar{x}\pm s$）

组别	黑质致密体部组PD模型鼠	黑质致密体旁部组PD模型鼠	纹状体区组PD模型鼠
损伤侧黑质区	4.0 ± 1.58*△	12.6 ± 5.22	34.4 ± 8.73
未损伤侧黑质	83.5 ± 11.7	85.4 ± 13.6	89.0 ± 12.5

注：*与同程度未注射区比较P<0.0001；△与不同损伤程度PD注射侧比较P<0.05

表4 不同注射部位组PD鼠纹状体背外侧部TH神经纤维的变化（$\bar{x}\pm s$）

组别	黑质致密体部组PD模型鼠	黑质致密体旁部组PD模型鼠	纹状体区组PD模型鼠
损伤侧纹状体区背外侧部	5.0 ± 2.0*△	19.5 ± 6.76	30.33 ± 4.57
正常侧纹状体区背外侧部	59.25 ± 6.25	61.0 ± 5.15	58.75 ± 5.35

注：*与同程度未注射区比较P<0.0001；△与不同损伤程度PD注射侧比较P<0.05

不同注射部位组模型的PD鼠其注射侧黑质区神经元尼氏体计数与非注射侧黑质区神经元尼氏体计数存在着显著性差别（P <0.0001），但各组PD鼠注射侧神经元尼氏体计数无显著性差异（P > 0.05）。纹状体区、黑质致密体旁部、黑质致密体部组PD鼠其注射侧神经元尼氏体分别为非射侧神经元尼氏体的22%，30%，38%。见表2。

2.3　免疫组织化学

2.3.1　不同注射部位组的PD模型鼠损伤侧黑质区TH样免疫反应神经元数目较未注射侧明显减少，存在显著性差异（P <0.05）而且各损伤程度PD鼠其损伤侧黑质区TH阳性神经元也存在显著差异（P <0.05），黑质致密体部组损伤侧黑质TH神经元为未损伤侧的4%，黑质致密体旁部组为14%，纹状体区组为38%。见表3。

2.3.2　不同注射部位组其损伤侧纹状体区背外侧部的TH阳性神经纤维的表达也存在着显著性的差异。黑质致密体部组损伤侧的TH阳性纤维表达为正常侧的8%，黑质致密体旁部组为32%，纹状体区组为51%。

不同注射部位组PD鼠损伤侧纹状体区TH神经纤维计数与未注射侧存在着显著性差别（P < 0.001），各注射部位PD鼠损伤侧纹状体区背外侧部TH神经纤维数有显著性差异（P <0.05），而未注射侧纹状体背外侧部TH神经纤维无显著性变化。见表4。

3　讨　论

帕金森病最恒定的病理改变是黑质及其他含黑色素神经核的黑色素细胞丧失，合格的帕金森病鼠的建立必须具有多巴胺能神经元减少及胶质细胞反应增生的基本病理特征。采用6-OHDA微量注射法，于黑质致密部、黑质旁部及纹状体部为注射点，根据不同的注射剂量及部位，造成不同程度的多巴胺神经元缺失。实验中发现不同部位的注射，可造成损伤侧神经元尼氏体数量减少、消失或溶解。在黑质致密部组模型中损伤侧尼氏体约为正常的22%，黑质旁部组为30%，纹状体部组为38%。但三者之间的损伤无显著差别，这说明神经元尼氏体不能作为不同损伤程度的PD鼠病理的指标。

6-OHDA于黑质致密部，黑质旁部及纹状体部的注射，可以造成注射侧黑质区TH免疫活性表达的神经元数目减少，纹状体区的多巴胺神经纤维轴突变性、溶解，神经纤维的TH表达明显减少。在黑质致密部组模型中其损伤侧黑质区TH阳性神经元数为未损伤侧的4%，黑质旁部组为14%、纹状体部组为38%。纹状体区的TH阳性神经纤维表达，黑质致密部组模型损伤侧为未损伤的8%，黑质旁部组为32%，纹状体部组为51%，这说明6-OHDA能选择性的毁损注射区内多巴胺神经元，并导致同侧纹状体内多巴胺纤维未梢的损害。实验中不同部位组的6-OHDA注入均可引起黑质区多巴胺能神经元的损

维普资讯 http://www.cqvip.com

害，尤其是来自于纹状体内的逆行性6-OHDA细胞毒性，也可以损伤多巴胺能神经元。提示除黑质之外，纹状体区损伤可以作为PD的动物模型原发病变部位。

6-OHDA与多巴胺竞争摄取位点，可以产生氧自由基，造成线粒体呼吸链NADH脱氢酶，细胞色素C氧化酶的阻滞，引起细胞凋亡或坏死。国内有人在6-OHDA注射造成的PD模型中发现DA能神经元缺失后，才有胶质细胞增生，所以6-OHDA动物模型的病理特点与人类PD病理相似。

6-OHDA注入动物大脑一侧纹状体通路中，能造成注射侧纹状体区内多巴胺丧失[13]及D_2受体超敏[14]。本实验发现，在黑质致密部组PD动物模型鼠，黑质多巴胺神经元缺失只有达90%以上时阿扑吗啡才可诱导旋转行为出现，而在黑质旁部和纹状体部组PD鼠未能引出其旋转行为，说明阿扑吗啡诱导的旋转行为与黑质多巴胺细胞损害程度有关。苯丙胺诱导的旋转行为在各种损伤程度的PD鼠均出现，表明苯丙胺诱导旋转行为的产生与黑质多巴胺损伤程度关系不明显，只要黑质多巴胺神经元缺失50%以上时既可产生。实验结果显示黑质致密部组PD动物模型鼠的黑质多巴胺神经元缺失达96%，阿扑吗啡与苯丙胺诱导的旋转行为均为阳性，相当重度损伤模型。黑质致密体旁部组PD模型鼠的黑质多巴胺神经元缺失达84%，苯丙胺诱导的旋转行为阳性，相当中度损伤模型。纹状体区组PD模型鼠的黑质多巴胺神经元缺失达62%，苯丙胺诱导的旋转行为阳性，相当轻度损伤模型。

应用6-OHDA不同部位及剂量的注射，可以建立不同程度损伤的帕金森病动物模型鼠，为帕金森病的药物及毒性机制研究提供了条件。且为黑质细胞，转基因细胞移植治疗及研究黑质纹状体系统在接受促生长因子及神经保护介质治疗后，其神经元再生和功能恢复提供了实验模型。

参 考 文 献

[1] 史玉泉. 实用神经病学[M]. 第二版，上海：上海科学技术出版社，1994;749-759.

[2]Glinka Y, Gassen M, Youdim MBH. Meachanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. [J]. J Neural Transm, 1997;50 (S):55-66.

[3] 包新民，舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 北京：人民卫生出版社，1991;50-57.

[4] Stella M, Engber T M, Kask AM, et al. Motor fluctuations in levodopa treatment parkinonian rats: relation to lesion extent and treatment duration [J]. Brain Res, 1994; 662: 69-74.

[5] Carman L S, Gage F H, Shults CW. Partial lesion of the substantial nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior [J]. Brain Res. 1991;553: 275-283 .

[6] Kirk D, Rosenblad C, Bjorklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrstriatal 6-hydroxydopamine in the rat [J]. Exper neurol, 1998;152: 259-277.

[7] 周明付，张 华，吴金良. 帕金森病动物模型的建立 [J]. 河南医科大学学报，1994;29(4):4-5.

[8] 张 哲，陈 辉. 实用病理组织染色技术 [M]. 辽宁：辽宁科学技术出版社，1998;96.

[9] Ungerstedt U. 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons [J].Eur J Pharmacol, 1968;5: 107.

[10]. Decker DE, Althaus JS, Buxser SE, et al. Competrativve irreversi ble inhbition of dopamine up take by 6-hydroxydopamine [J]. Res Comman Chem Pathol Pharmacol, 1993;79: 195-208.

[11]. Cerrati C, Drian M J, Kamenka J M, et al. Protection by B T C P of cultured dopaminergic neurons exposed to neurotoxins [J]. Brain Res, 1993; 617:138-142.

[12]. Glinka Y, Youdim MBH. Inhibition of mitchondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine [J]. Eur J Pharmacol Environ Toxicol Pharmacol, 1995;292: 329-332.

[13] 王 尧，杜子威. 神经生物化学与分子生物学[M]. 北京：人民卫生出版社，1997;142-151.

[14] 邹 冈. 基础神经生理学[M]. 北京：科学出版社，1988;171-176.

(上接第27页)

[2] Holfman R, Paper D H, Donaldson J,et al. Inhibition of angiogenesis and murine tumour growth by laminarin sulphate [J].B J Cancer,1996;73(10):1183-1186.

[3] Bareton G B, Piebold J, Christotforis G,et al. Apoptosis and immunohistochemical Bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas, aspects of carinogensis and prognostic significance[J]. Cancer, 1996; 77(2):255-264.

[4] Hockenbery DM. Bcl-2 in cancer, development and apoptosis[J]. Cell Sci,1994,18(s):51-59.

[5] Huang Y, Ray S, Reed JC, et al. Estrogen increases intracellular p26 to p21 BaX ratos and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 1997;42(1):73-81.