DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.020
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

文章编号:1000-5404(2002)02-0161-03

论著

MPP^+对体外培养的中脑多巴胺能神经元活性的影响

陈锦华,黄其林,张可成 (第三军医大学附属新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨1-甲基-4-苯基吡啶(MPP^+)对体外培养的中脑多巴胺能神经元的影响。方法 将不同浓度的MPP^+加入体外培养的中脑多巴胺能神经元培养液中,分别测定[^3H]多巴胺和[^3H]胆碱摄取能力及细胞内的多巴胺含量,并进行酪氨酸羟化酶(TH)免疫细胞化学染色。结果 MPP^+对体外培养的中脑多巴胺能神经元的[^3H]多巴胺摄取力有明显的抑制作用($P<0.05$);但对[^3H]胆碱摄取力无抑制作用($P>0.05$);这种抑制作用在未抑制胶质细胞组明显强于抑制胶质细胞组($P<0.05$);加用MPP^+后中脑多巴胺能神经元细胞内的多巴胺含量明显减少($P<0.05$),TH阳性细胞明显减少($P<0.05$)。结论 MPP^+对体外培养的中脑多巴胺能神经元活性有明显的抑制作用。

关键词:1-甲基-4-苯基吡啶;多巴胺能神经元;酪氨酸羟化酶
中图法分类号:R322.81;R329.25;R971 文献标识码:A

Influence of 1-mythl-4-phenylpyridinium ion (MPP^+) on viability of mesencephalic Dopamine neuron cell *in vitro*

CHEN Jin-hua, HUANG Qi-lin, ZHANG Ke-cheng (Department of Neurosugery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstrats: Objective To investigate the influences of 1-mythl-4-phenylpyridinium ion (MPP^+) on mesencephalic Dopamine neuron cell *in vitro*. Methods Rat mesencephalic cells were exposed to the mediums with MPP^+ at different concentrations. The experiments were undergone either in presence of glia or in absence of glia. Then, the amounts of [^3H] DA and taken [^3H] Choline uptake, and the intrace Uular DA content were detected, and the tyrosine hydroxylase(TH) immunocytochemical staining was perfomed. Results The treatment of rat embryo mensencephalic cell cultured with MPP^+ reduced the awount of [^3H] DA uptake both in presence and absence of glia($P<0.05$), but did not reduce the [^3H] Choline uptake($P>0.05$). The effect was more significant in presence of glia than that without($P<0.05$). Both the DA content and the number of TH positive cells significantly were decreased in the rat embryo mensencephalic cells when being treated with MPP^+ ($P<0.05$). Conclusion The treatment of mouse embryo mensencephalic cell cultured with MPP^+ reduces the aetivity of dopaminergic cells.

Key words: 1-mythl-4-phenylpyridinium ion(MPP^+); Dopaminergic neuron; tyrosine hydroxylase(TH)

1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,MPTP)可以导致帕金森病(Parkinson disease,PD)的发病已是不争的事实,利用MPTP制作的PD动物模型已经成为研究PD的公认模型。近年来,人们在对MPTP致帕金森病的机制研究中发现,MPTP主要是通过单胺氧化酶B(Monoamine oxidase B, MAO-B)氧化成1-甲基-4-苯基吡啶(MPP^+),并作用于多巴胺能神经元的线粒体而最终导致帕金森病的发生的[1]。本研究拟通过观察MPP^+对体外培养的中脑多巴胺能神经元多巴胺及胆碱摄取能力、多巴胺含量变化及细胞形态的改变,探讨MPP^+建立体外PD模型的可能及实际意义。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

参照Shimoda[2]法,将E 14 d Wistar大鼠氯胺酮麻醉后,剖腹取出胎鼠。D-Hanks清洗后,于解剖显微镜下剥离出整个脑部。去除表面脑膜及血管组织,分离出脑干。取A8、A9、A10区组织约1 mm^3(1.5 mm×1.0 mm×0.75 mm)。不加胰酶,直接以吸管吹打成均匀的细胞悬液。用DMEM/F12(Sigma)+15%胎牛血清(美国Sigma公司)(未加用抗生素)调整细胞数量至2×10^5个/ml。种植于预先包被有多聚赖氨酸(美国Sigma公司)的24孔培养板内,每孔50 μl,加培养液至400 μl。抑制胶质细胞组于培养3 d后加用阿糖胞苷,终浓度为10 μmol/L。

1.2 细胞分组及MPP^+处理

分离培养的中脑多巴胺能神经元,培养至第7天时,分别加入200 μl浓度为0.2、2、20 μmol/L的MPP^+(Kohuda提供),使其终浓度分别为0.1、1、10 μmol/L。继续孵育3 d后,用PBS漂洗3次,加入400 μl新鲜培养液继续孵育24 h后,每组取6孔细胞分别测定[^3H]多巴胺和[^3H]胆碱摄取力,及细胞内多巴胺含量,并取5孔细胞进行酪氨酸羟化酶(TH)免疫细胞化学染色。

1.3 [^3H]多巴胺和[^3H]胆碱摄取力的测定

取待测细胞,PBS漂洗细胞3次后,加入含1 mmol/L $CaCl_2$,1 mmol/L $MgCl_2$,33.3 mmol/L葡萄糖的PBS中孵育。随后将细胞与50 nmol/L[^3H]多巴胺(23.9 Ci/mmol,美国NEN Reaerch Products)共孵育15 min或[^3H]胆碱(87.6 Ci/mmol,NEN Reaerch Products)共孵育5 min;PBS漂洗细胞3次,终止反应,并用冰

基金项目:第三军医大学校管课题(2000)
作者简介:陈锦华(1974-),男,江苏省如皋市人,医师,主要从事帕金森病的发病机制方面的研究。电话:(023)68755114-74610
通信作者:黄其林,电话:(023)68755365
收稿日期:2001-03-16;修回日期:2001-06-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PBS 漂洗 3 次后，将细胞加入 0.5 ml 0.2 mol/L 含 0.2% Triton X-100的 NaOH 中。取 10 μl 为一个测定单位，并用 0.5 ml 0.2 mol/L HCL 平衡 pH 值为 7.4，以正常培养细胞作空白对照。用β闪烁计数器测量放射性活性，结果为 dpm/mg，用实测值与空白对照的比值表示。

1.4 细胞内多巴胺含量的测定

取待测细胞，PBS 漂洗 3 次。以 0.12 mol/L 的高氯酸破膜，冰冻离心 15 s，用 HPLC（德国 GE 公司）进行细胞内多巴胺含量的测定。选用的柱子为 C18 ODS，4.5 cm×2.5 cm，5 mm（美国 Beckmam. San Ramon，CA）。淋浴相的配制为：庚烷磺酸钠 1.25 g；EDTA 0.12g；三乙胺 9 ml；85%磷酸 6 ml；乙晴 20 ml；终末 pH 为 2.4。流速为 1.5 ml/min，电压为 0.75 mV。结果以 ng/mg 表示。

1.5 TH 免疫细胞化学染色

采用 S-P 法，按照本室常规方法进行 TH 免疫细胞化学染色[3]，S-P 试剂盒（美国 Sigma 公司）行 TH（1∶5 000，由杨辉教授提供）免疫细胞化学染色，细胞计数通过在普通显微镜下观察 TH^+ 细胞的一般状态，将 TH 染色标 5 张，在 10× 目镜和 20× 物镜下，每张盖玻片随机计数按目测微网格（1/2 mm）内的阳性细胞代表一个标本量进行统计学处理。不同条件下的 TH^+ 细胞，通过平行移动视野，取 5 张盖玻片，统计每张盖玻片上的阳性细胞数。

1.6 统计学处理

利用计算机统计软件 SPSS 对实验数据作 Scheffe F 检验，方差分析。

2 结果

2.1 MPP^+ 对多巴胺能神经元[^{3}H] 多巴胺和[^{3}H] 胆碱摄取力的影响

抑制胶质细胞组及未抑制胶质细胞组，加入 MPP^+ 后中脑多巴胺能神经元[^{3}H] 多巴胺摄取力较对照组明显下降（$P<0.05$），而未抑制胶质细胞组[^{3}H] 多巴胺摄取力下降尤为明显，（$P<0.05$）；[^{3}H] 胆碱摄取力与对照组比差异不显著（$P>0.05$）；不同浓度 MPP^+ 组间[^{3}H] 多巴胺和[^{3}H] 胆碱摄取力无显著性差异（$P>0.05$），见表 1。

表 1 MPP^+ 对中脑培养细胞的[^{3}H] 多巴胺 和[^{3}H] 胆碱摄取力的影响

Tab 1 The influence of MPP^+ on the [^{3}H] DA and [^{3}H] Choline uptake of the mesencephalic culture cells

	[3H] DA (%)		[3H] Choline (%)	
	With glia	Without glia	With glia	Without glia
Control	100±1.7	100±1.7	100±2.4	100±2.4
MPP^+ 0.1 μmol/L	6.2±0.7 *	34±0.7 *	97±2.6	96±2.4
1 μmol/L	5.9±0.5 *	36±0.5 *	98±3.1	97±3.6
10 μmol/L	5.4±0.4 *	32±0.4 *	96±1.9	98±2.3

*：$P<0.05$ *vs* control

2.2 神经元内多巴胺含量的变化

中脑多巴胺能神经元培养组中加入 MPP^+ 后，细胞内多巴胺含量明显下降（$P<0.05$）；不同浓度 MPP^+ 组间细胞内多巴胺含量无显著性差异（$P>0.05$），见图 1。

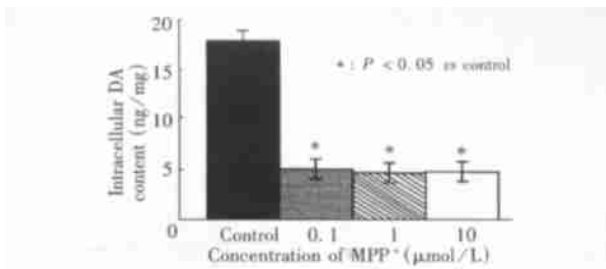
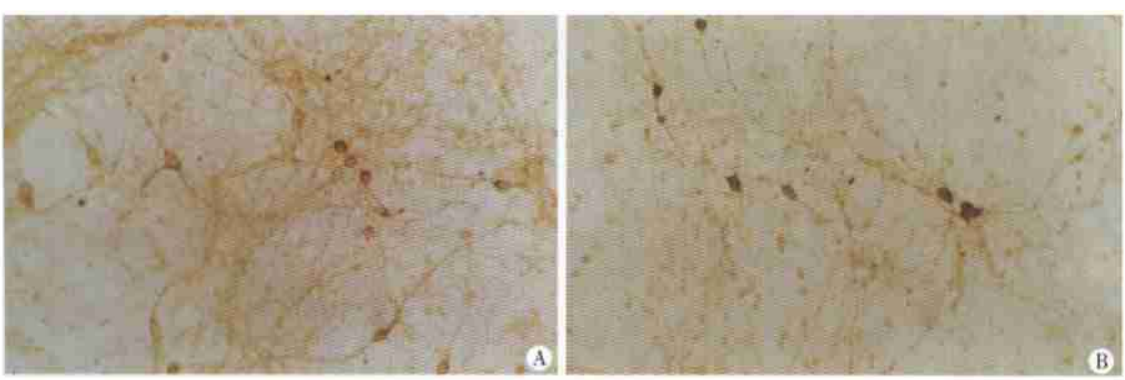


图 1 MPP^+ 对中脑培养细胞的细胞内多巴胺含量的影响

Fig 1 The influence of MPP^+ on intracellular DA content of mesencephalic culture cells

2.3 TH 免疫组化染色

加入 MPP^+ 后，TH 阳性细胞数量明显减少，空白对照组 TH 阳性细胞数量为（365+74）/cm^2；加用 MPP^+ 组各组 TH 阳性细胞平均数量（217+71）/cm^2，两组相差显著，$P<0.05$。MPP^+ 作用的细胞呈多边形，神经元突起长度回缩、变短，见图 2。



A：Control； B：MPP^+ 0.1 μmmol/L

图 2 中脑多巴胺能神经元培养 11 d TH 免疫细胞化学染色 （S-P× 200）

Fig 2 Mesencephalic Dopamine cells TH immunocytochemical stain after 11 d culture （S-P× 200）

3 讨论

随着对 PD 发病机制研究的不断深入，MPTP 导致 PD 发病的原因受到普遍的关注。尽管 MPP^+ 导致帕金森病发生的具体机制尚不十分明了，但初步的研究结果表明，MPP^+ 极有可能是通过抑制线粒体酶，尤其

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

是线粒体复合酶 I[4] 的活性, 使 ATP 合成障碍, 多巴胺能神经元因此而凋亡, 终致帕金森病发病。但也有研究提出了不同的解释, Yoshinaga[5] 通过神经生长因子对的 MPP^+ 保护作用认为氧自由基的作用可能更为重要。而氧化应激的作用也得到了研究结果[6,7] 的支持。从本实验结果看, MPP^+ 对体外培养的中脑多巴胺能神经元多巴胺摄取力有明显的抑制作用, 不仅使多巴胺的摄取降低, 而且细胞内的多巴胺含量也显著减少, TH 免疫组化染色结果证实, 多巴胺能神经元细胞形态发生了明显的改变, 进一步佐证了 MPP^+ 对体外培养的中脑多巴胺能神经元的抑制作用。但 MPP^+ 对多巴胺能神经元胆碱摄取能力无明显抑制作用, 说明 MPP^+ 的抑制作用比较专一。但具体的机制还需要进一步探讨。

本实验过程中的一个有趣发现就是, 中脑多巴胺能神经元在加入 MPP^+ 后, 抑制胶质细胞组[^{3}H] 多巴胺摄取力明显高于未抑制胶质细胞组, 但对[^{3}H] 胆碱摄取力无明显影响, 说明胶质细胞在维持多巴胺能神经元的功能上具有重要作用。业已证明, 胶质细胞可以通过分泌多种神经营养因子促进神经细胞的生长与修复。鉴于此, 上述结果的一个可能解释就是在有胶质细胞存在的情况下, 神经元更多地依赖胶质细胞分泌的多种神经营养因子而存活并发挥功能, 加入 MPP^+ 后, 抑制胶质细胞组由于胶质细胞分泌的神经营养因子减少, 甚至缺乏, 多巴胺能神经元得不到来自胶质细胞的营养成分, 从而使神经元遭受 MPP^+ 对线粒体酶的抑制, 以及胶质细胞分泌的神经营养因子减少的双重打击[8], 从而出现[^{3}H] 多巴胺摄取力的锐减。此推论是否符合实际尚待深入研究加以证实。Smeyne[9] 的一项最新的研究认为 MAO-B 可能扮演的角色远远小于胶质细胞而且几乎没有任何作用; 他们通过加用 MAO-B 抑制剂测定 MAO-B 活性的方法得出的结论是决定 MPTP 代谢的真正主角是胶质细胞, 而与 MAO-B 无关, 但对胶质细胞究竟是如何起作用的尚无定论。

参考文献:

[1] Wu R M, Chen R C, Chiueh C C. Effect of MAO-B inhibitors on MPP^+ toxicity in Vivo[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 899(48): 255－261.

[2] Shimoda K, Sauve Y, Mirini A, *et al*. A high percentage yield of throsine hydroxylase-positive cell from rat E14-mescencephalia cell culture[J]. Brain Res, 1992, 586(2): 319－331.

[3] 黄其林、蔡文琴、张可成. 雄激素对脑穿刺损伤后反应性胶质化影响的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(1): 18－21.

[4] Reichmann H, Janetzky B. Mitochondrial dysfunction-a pathogenetic factor in Parkinson's disease[J]. J Neurol, 2000, 247 (Suppl 2): 63－68.

[5] Yoshinaga N, Murayama T, Nomura Y. Apoptosis induction by a dopaminergic neurotoxin, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(＋)), and inhibition by epidermal growth factor in GH3 cells[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60(1): 111-120.

[6] Martignoni E, Blandini F, Godi L, *et al*. Peripheral markers of oxidative stress in Parkinson's disease: The role of L-DOPA[J]. Free Radic Biol Med, 1999, 27(3－4): 428－437.

[7] Lamensdorf I, Eisenhofer G, Harvey-White J, *et al*. Metabolic stress in PC12 cells induces the formation of the endogenous dopaminergic neurotoxin, 3, 4-dihydroxyphenylacetaldehyde[J]. J Neurosci Res, 2000, 60(4): 552－558.

[8] Engele J, Bohn M C. The neurotrophic effects of fibroblast growth factors on dopaminergic neurons in vitro are mediated by mesencephalic glia[J]. J Neurosci, 1991, 11(10): 3 070－3 078.

[9] Smeyne M, Goloubeva O, Smeyne R J. Train-dependent susceptibility to MPTP and MPP(＋)－induced Parkinsonism isdetermined by glia[J]. Glia 2001, 34(2): 73－80.

（编辑　潘式文）

（上接 154 页）

3.3　MLC 与直线加速器小机头旋转的配合使用

对于鼻咽癌的治疗, 目前常规所有的面颈联合野为等距离照射, 摆位重复性差, 挡铅制作复杂, 档块设置难以准确[2]。我们采用 MLC 技术结合等中心照射, 较好地避免了常规方法的不足。但不规则面颈联合野涉及范围较大, 且 MLC 对侧叶片不能过中线, 限制了射野在其纵轴方向上的使用, 通过转动小机头 90° 或 270°, 以 MLC 横轴方向的射野形式满足纵向布野。

3.4　操作中应注意手动式 MLC 结构局限性造成的“热点”和“冷点”

它主要包括以下几个方面: ①由于 MLC 对侧叶片不能过中线, 造成有些射野需要过中线遮挡的部分, 未能遮挡。②相邻叶片之间由于平面接触, 对于这些叶片垂直方向的凹陷部分不能遮挡。③由于 MLC 的叶片形成射野轮廓后, 仅靠位于一侧的两个螺杆固定, 机架在 0° 时固定较好, 其余角度, 特别是大角度加上小机头旋转时, 在重力的作用下, 易发生一侧滑动, 造成射野轮廓的改变。④由于手动控制叶片的移动, 当使用者粗心时, 易造成一些叶片未能到位。⑤对于一些小野, 第一由于叶片聚合后的张力作用, 造成 MLC 中心线处结合部的缝隙较大, 密合较差。第二准直器叶片厚度在等中心处造成的半影, 使其不适合于治疗小的病灶, 可考虑采用其他方法治疗。

我们认为, 对于①、②两种情况在进行治疗计划设计时应尽量避免。而③、④两方面只要操作者加强责任心, 认真对待是容易克服的。

3.5　模板制作的注意事项

模板制作应严格按照 TPS 给出的有效照射野, 采用有机玻璃制成模板。做好的模板用于首次治疗时, 应将其确定好的 MLC 射野轮廓于 TPS 绘出的有效照射野再次对照, 避免方向错误和前后颠倒引起的治疗失误。

关键词: 适形放疗; 手动式多叶准直器
中图法分类号: R817　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 冯宁远, 谢虎臣, 史　荣, 等. 实用放疗治疗物理学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998. 335.

[2] 张恩累, 钱剑扬. 鼻咽癌咽旁间隙的侵犯与放疗设计(Ⅰ)[J]. 癌症, 1987, 6(3): 183.

（编辑　薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net