DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.01.008

胎脑黑质脑内移植后帕金森病大鼠纹状体内THmRNA含量的研究*

杨 辉 蔡文琴** 张可成 (第三军医大学附属新桥医院脑外科) 重庆,630037

提 要 采用核酸斑点杂交技术对移植区可特异性反映移植物存活、功能状态的酪氨酸羟化酶的基因表达进行了连续定量分析,研究发现移植早期该酶mRNA表达量较高,移植术后4周,移植物的功能开始处于稳定状态。反映移植物与宿主形成神经再支配,即帕金森病(PD)大鼠的旋转行为矫正的结果提示移植物的功能除了与该酶的含量有关外,还与形成神经再支配的程度有关。

关键词 胎脑黑质;脑内移植;酪氨酸羟化酶;基因表达;帕金森病,实验性

中图法分类号 R622.3;R651.1

将胎脑黑质移植到去神经支配的纹状体内可以纠正因去神经支配造成的行为异常、多巴胺递质匮乏以及多种功能紊乱[1],被移植的多巴胺神经元在恢复宿主脑功能方面起着决定性作用,多巴胺的合成是受其合成限速酶—酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)调节的,TH含量与活性在一定程度上能够反映出细胞的代谢水平。THmRNA的含量与TH的含量在很大程度上一致,THmRNA的含量高低决定了TH的表达量[2]。先前的研究多采用TH免疫组化来反映移植物存活[3],但很少有文献报道移植后移植物THmRNA的含量变化,本文将采用斑点杂交法对移植区THmRNA进行定量分析,以反映移植物在宿主脑内功能状态。

1 材料与方法

帕金森病(Parkinsion's disease, PD)大鼠模型建立、胎脑黑质细胞悬液制备、移植操作、动物旋转行为测试、总RNA抽提、斑点杂交及mRNA含量检测按我们已建立方法进行[4]。

动物分组:取正常Wistar大鼠6只作为正常组;PD鼠按随机原则分为:①损伤组(7只):移植区无移植物;②移植对照组(7只):移植区移植胎小脑细胞悬液;③移植组(27只):移植区移植胎脑黑质细胞悬液,并将其分成术后2周、4周以及3月3个观察组。

统计学处理:在计算机上按本校编制统计程序处理数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,大鼠旋转行为作 t 检验和单因素方差分析;THmRNA含量作单因素方差分析。

2 结果

2.1 旋转次数

移植对照组、损伤组的旋转次数移植前后无明显差别($P>0.05$);胎脑黑质移植两周后大鼠旋转次数轻度减少($P<0.05$);胎脑黑质移植4周后,旋转次数较移植前进一步减少($P<0.01$);胎脑黑质移植3月后,大鼠旋转行为几乎被完全矫正($P<0.005$);移植前各组旋转次数相比相差不显著($P>0.05$)。

表1 不同处理对PD鼠旋转行为的影响

Tab 1 The effects of different treatment on the rotational behavior of PD rats

Group	n	Rotations (turns/min)	
		pre−graft	post−graft
Normal	6	−	−
Lesioned	7	11.49±2.05	11.33±1.85
Control	7	11.76±1.98	11.51±2.17
Post-grafted			
2 weeks	9	10.93±1.54	8.03±1.50#△
4 weeks	9	11.27±1.72	3.78±2.03##△△
3 months	9	11.08±1.34	0.67±0.28###△△△

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, ###: $P<0.005$ *vs* control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$, △△△: $P<0.005$ *vs* pre-graft; "−" couldn't be measured

2.2 移植区THmRNA含量(见表2)

表2 不同处理组移植区TIImRNA含量(ng/mg·湿组织)

Tab 2 The contents of TIImRNA in the implanted regions of different group(ng/mg·wet tissue)

Group	n	contents of THmRNA
Normal	6	0.08±0.001
Lesioned	7	—
Control	7	—
Post−grafted		
2 weeks	7	80.34±15.93
4 weeks	7	61.86±15.25*
3 months	7	53.41±13.67*

*: $P<0.05$ *vs* 2 weeks post−grafted; "−" couldn't be measured

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39370248

** 第三军医大学基础部组织胚胎学教研室 重庆,630038

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

3 讨论

TH存在于肾上腺素能、多巴胺能神经元和肾上腺髓质嗜铬细胞的胞浆内，TH在胞体内及近端突起中的浓度要高于末梢。TH专一性强、活性较低、含量少、合成速度又在全过程中最慢，是多巴胺合成的限速酶[5]，THmRNA的量在很大程度上决定着TH在神经元中的浓度[4,6]。转录出来的THmRNA透过核膜，集中在细胞质内供翻译TH用，和多数mRNA一样，它不会随轴浆流运送到神经纤维末梢中。纹状体是黑质多巴胺能神经元的作用靶区，在正常纹状体中只有TH阳性纤维存在，而没有THmRNA表达，因此本实验的移植对照组、损伤组、正常组移植区中均没有THmRNA表达，从斑点杂交中可以看到正常组一样本有阳性表现，这是杂交点样时污染所致，并非此样本含有THmRNA。移植对照组、损伤组PD大鼠在移植前后旋转次数没有改变，恰好与移植区内无THmRNA表达相吻合，这说明能表达THmRNA的多巴胺神经元是影响PD大鼠旋转行为的关键因素[7]。移植组移植术后两周，PD大鼠旋转行为得到部分纠正，说明移植物开始发挥作用，移植区THmRNA含量为整个移植观察期中的最高含量，与此同时，我们的TH免疫组化结果(有关内容待发表)显示移植物也有较高浓度的TH表达。但是，移植两周后，PD大鼠的旋转行为只得了部分纠正，似乎与THmRNA以及TH高度表达相矛盾，我们认为造成这种现象的原因可能主要有两方面，一是因为多巴胺能神经元处于幼稚发育阶段，与TH共同作用的还原型喋啶辅酶[5]以及催化多巴转变成多巴胺的多巴脱羧酶的功能尚不完善，多巴胺递质合成量偏低所致，这个问题有待更深入地研究；另一方面，可能是因为此时移植物多巴胺能神经元与宿主没有建立神经纤维联系，合成的多巴胺递质只有依靠细胞的"旁分泌"机理作用到周围靶区[8]，其作用距离、作用时间以及作用对象均受到了很大限制。移植组移植术后4周，PD大鼠旋转行为进一步改善，移植区THmRNA含量较前减少，并有统计学意义($P < 0.05$)，但是多巴胺移植物改善PD大鼠旋转行为的作用并没有因为THmRNA表达量的减少而受影响，我们认为此时移植物神经元虽然尚未完全发育成熟，它们可能已经有短距离的突起与宿主的脑组织建立了纤维联系，这些短突起将移植物的作用直接传递给宿主复杂的神经纤维网络，即通过对脑啡肽能、胆碱能、神经肽Y能以及GABA能等神经元产生影响[9~11]而发挥作用。除此之外，移植物扩散释放递质的作用也不能排除[12]。发育日臻成熟的细胞代谢不如幼稚细胞旺盛，可能也是移植区THmRNA含量降低的原因之一，另外，随着移植时间的延长，宿主脑内部分移植物细胞会因种种原因死亡，这就不可避免地影响到移植区THmRNA的总含量，但是，这并不影响存活细胞发挥功能。

移植组术后3个月，大鼠的旋转行为几乎得到了完全纠正，移植区THmRNA含量较移植4周时虽略有减少，但是，没有统计学意义，说明存活的多巴胺细胞表达THmRNA的功能已经进入稳定状态，多巴胺递质的作用也得到充分发挥，此时，移植物可能与宿主脑发生了神经整合，建立了健全的神经环路[4]，实现了神经再支配。

因此，多巴胺能神经元脑内移植后的效果除了与THmRNA及TH浓度有关外，起决定性作用的是移植物与宿主重建神经支配，移植物的长期效果依赖于它对宿主实现神经再支配的程度。

(感谢美国Pasenitti，G. M.教授提供THcDNA质粒)

参考文献

1 Bjorklund A. Dopaminergic transplants in experimental parkinsonism cellular mechanism of graft－induced functional recovery. Curr Opin Neurobiol，1992；2：683

2 Zhu YS，Jones，SB，Burke RE *et al*. Quantition of the levels of tyrosine hydroxylase and preproenkephalin mRNAs in nigrostriatal sites after 6－OHDA lesions. Life Sci，1993；52：1577

3 Mahalik TJ，Clayton GH. Specific outgrowth from neurons of ventral mesencephalic grafts to the catecholamine－depleted striatum of adult hosts. Exp Neurol，1991；113：18

4 杨　辉，蔡文琴，张可成. 胎脑黑质脑内移植矫正PD鼠纹状体内脑啡肽mRNA过度表达. 中国组织化学与细胞化学杂志，1995；4(2)：115

5 许绍芬，莫浣英，黄登凯. 神经生物学. 上海：上海医科大学出版社，1990：78～80

6 Pasinetti GM，Osterburg HH，Kelly AB *et al*. Slow change of tyrosine hydroxylase gene expression in dopaminergic brain neurons after neurotoxin lesioning：model for neuron aging. Mol Brain Res，1992；13：63

7 Lidrall O. Transplants in Pankinson's disease. Eur Neurd，1991；31(suppl)：17

8 Bankewicz KS，Emborg M，Leff S *et al*. Clinical recovery in parkinsonian non－human primates after striatal grafting

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

of fibroblasts genetically modified with tyrosine hydroxylase cDNA. In: 5th International Symposium on Neural Transplantation. Paris: France, 1994: 195～199

9 Sirinathsinghji DJS. Increased proenkephalin mRNA levels in the rat neostriatum following lesion of the ipsilateral nigrostriatal dopamine pathway with MPP^+: reversal by embryonic nigral dopamine grafts. Mol Brain Res, 1991; 9: 263

10 Jackisch R, Duschek M, Neufang B *et al*. Long-term survival of intrastriatal dopaminergic grafts: modulation of acetylcholinerelease by graft-derived dopamine. J Neurochem, 1991; 57: 267

11 Moukhles H, Nieoullon A, Daszuta A. Early and widespread normalization of dopamine—neuropeptide Y interaction in the rat striatum after transplantation of fetal mesencephalon cells. Neuroscience, 1992; 47: 781

12 Fisher LJ, Young SJ, Tepper JM *et al*. Electrophysiological characteristics of cells within fetal mesencephalon suspension grafts. Neuroscience, 1991; 40: 109

(收稿: 1995-10-22; 修回: 1996-01-20)

(编辑 沈锡庚、王 红)

Study of tyrosine hydroxylase mRNA level in the striatum after intracerebral implantation of fetal substantia nigra in rats with Parkinson's disease

Yang Hui, Cai Wenqin, Zhang Kecheng (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

Abstract In order to observe the survival and functions of the grafts of fetal substantia nigra implanted in the striatum of the rats with Parkinson's disease (PD), the gene expression of tyrosine hydroxylase (TH) was continuously quantitated with the method of dot blot hybridization. It was found that the TH mRNA level was the highest in the early stage after implantation and the function of the implants became steady in the fourth week after operation and onward. The findings of the rotationl behavior of PD rats and TH mRNA expression indicate that the functions of the grafts of fetal substantia nigra were dependent not only on the contents of TH but also on the renervation of the grafts.

Key words substantia nigra/fetal; implantation/intracerebral; tyrosine hydroxylase; gene expression; Parkinson's disease

腹腔镜用于10例子宫穿孔的诊断与处理

Laparoscopy in diagnosis and management of perforation of uterus by curettage: Analysis of 10 cases

王 琳 史常旭 阳光珍 (第三军医大学附属西南医院妇产科) 重庆, 630038

子宫穿孔是人工流产术的并发症之一。我院对10例行人流术或清宫术时疑有子宫穿孔的患者，施行了腹腔镜诊断和监护，顺利完成了5例人流手术，现报道如下：

1 临床资料

1.1 一般资料

本组10例患者，除2例发生在院内，其余8例均由院外转入。年龄：20～30岁，9例子宫穿孔发生在人流术中，1例发生在中孕引产后清宫术中。10例中有双角子宫畸形3例，瘢痕子宫1例，哺乳期子宫1例，合并子宫肌瘤1例。导致子宫穿孔的器械为吸引管6例，鳄圆钳2例，探针2例，均因术中器械进入宫腔后超出术前探测深度或无宫底感，或吸出脂肪组织而怀疑子宫穿孔。

(下转 25 页)

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