DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.04.007

肾上腺髓质脑内移植后帕金森病鼠纹状体内单胺类神经递质的变化*

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

提 要 采用高压液相色谱——电化学检测法测定纹状体内单胺类递质多巴胺及其代谢产物3,4-二羟基苯乙酸、去甲肾上腺素,以研究肾上腺髓质脑内移植后帕金森病(PD)鼠纹状体内部分神经生化改变。结果发现肾上腺髓质脑内移植可以基本矫正PD鼠异常旋转行为、弥补单胺类神经递质缺乏。研究结果提示肾上腺髓质脑内移植后可能与宿主神经组织形成神经再支配,肾上腺髓质脑内移植是治疗PD的较有效的手段。

关键词 肾上腺髓质;脑内移植;单胺类神经递质;大鼠;实验性帕金森病

中图法分类号 R742.5

帕金森氏病(Parkinson's disease,PD)是一种常见的神经综合征,主要病理变化是中脑黑质神经元变性、坏死,及其引起的黑质－纹状体系统内多巴胺(dopamine,DA)及代谢产物含量降低。肾上腺髓质(adrenal medulla,AM)胞浆内含有丰富的DA,因而将AM移植到黑质神经元靶区作为外源性DA源,藉以弥补纹状体内因失去黑质神经元支配后所致的DA含量匮,达到外科治疗帕金森氏病的目的。测定AM脑内移植后纹状体内DA含量,可以判断移植在宿主脑内存活情况,DA代谢产物3,4-二羟基苯乙酸(3,4-dihydroxyheylacetic acid,DOPAC)、去甲肾上腺素(noradrenaline,NE)是移植物细胞中单胺递质释放和分解代谢的直接证据,DOPAC/DA能准确地反映多巴胺能(AM)细胞的活性程度。上述内容的研究将有助于深入认识AM脑内移植发挥作用的机理。

1 材料与方法

健康Wistar种大鼠96只,雌雄各半,初用体重约140±10 g;6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine,6-OHDA)及色谱标准品DA、DOPAC、NE购自Sigma公司;Waters460系列高压液相色谱仪及M460电化学检测器。

据Freed法[1]用6-OHDA制备PD鼠模型,术后2、4周分别用Apomorphine诱发旋转行为,连续计数40 min,两次诱发平均速度≥7圈/min者,即为PD鼠模型,PD鼠按随机原则分为3组:(1)非移植对照组即做移植处理但移植区无移植物;(2)移植对照组即移植物为坐骨神经片;(3)移植组移植异体AM于移植区。另外再设正常组,即未受任何处理的正常大鼠组。

取出青年大鼠的肾上腺置于无菌冷乳酸林格氏液中,迅速将髓质剥出,制成小于0.5 cm^3的移植块,并将其准确地置入预置在黑质损毁同侧尾状核部头部的脑腔中,完成移植手术。移植对照组移植物大小与移植组一致。

移植术后6个月于安静状态下在自制断头刀上迅速处死各组动物,于冰碟上迅速分离所需组织供下述检测备用。

取各组(含移植物)纹状体称重后参照叶惟冷法[2]以高效液相色谱－电化学检测器测定DA、DOPAC、NE。

移植术后两周、1月、2月、6月分别按前述方法测试各组动物的旋转行为并计数。

数据采用本校编制的统计程序包对双因素差分析及t检验,数据均以$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$表示。

2 结果

2.1 旋转行为测试

大鼠旋转行为是反映黑质神经元变性、坏死,纹状体失神经支配、神经再支配的重要指标,移植前2周与移植前1周比较旋转次数无显著差异;移植两周后,移植组旋转次数有所减少,有统计学意义,移植1月后,旋转次数进一步减少,与移植前相比有显著性差异,但与移植术后2周相比,相差不明显;移植术后2月及6月与移植术后1月比较,旋转次数明显减少(见表1)。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39370248

** 基础部组织胚胎学教研室

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

表 1　AM 脑内移植对 PD 鼠旋转行为影响

Tab 1　The effect of adrenal medulla on the rotational behavior of PD rats after intracerebral implantation ($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)

Group	Rotation (turns/40 mins)					
	2 weeks pregraft	1 week pregraft	1 week post-graft	1 month post-graft	2 months post-graft	6 months post-graft
Non-grafted Controll group	426.67±34.12 ($n=9$)	447.22±26.06 ($n=9$)	415.32±36.35 ($n=9$)	438.09±53.20 ($n=9$)	449.25±70.11 ($n=9$)	452.76±39.03 ($n=9$)
Grafted control group	457.89±40.23 ($n=9$)	439.56±44.04 ($n=9$)	468.72±49.28 ($n=9$)	436.11±29.07 ($n=9$)	431.45±65.43 ($n=9$)	443.79±53.66 ($n=9$)
Grafted group	431.11±52.16 ($n=9$)	463.28±81.42 ($n=9$)	329.57±62.35*△ ($n=9$)	313.65±96.37*△ ($n=9$)	192.00±72.53**△△ ($n=8$)	76.87±70.56**△△ ($n=7$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ *vs* pre-graft; △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ *vs* non-grafted control group or grafted control group

2.3　纹状体内单胺类递质变化

脑内移植术后6个月各组纹状体内单胺类递质含量(见表2)，移植对照组和非移植对照组的 DA、DOPAC 和 NE 含量明显低于正常组。移植组的 DA、DOPAC 含量接近于正常组，DA 相当于正常组77.83%、DOPAC 相当于正常组的84.72%，但两物质与正常组相差仍然显著，NE 含量与正常组比较亦相差显著；移植对照组、非移植对照组分别与移植组比较，移植组各物质含量明显增加。

表2　脑移植术后6个月纹状体内单胺类递质含量

Tab 2　The contents of monoaminergic neurotransmitters in the striatum after 6 months intracerebral implantation ($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)

Group	Cases	The contents of monoaminergic neurotransmitters [ng/g(wet-tissue weight)]			
		DA	DOPAC	DOPAC/DA	NE
Normal adrenal medulla group	4	6881.32±47.53	930.78±34.29	0.128±0.046***△△△	120644.01±100.97***△△△
Normal group	5	653.21±71.65	698.84±25.14	1.063±0.014	303.94±37.18
Non-grafted control group	8	109.74±1.52△	118.23±2.07△	1.058±0.013	98.50±1.33△
Grafted controll group	8	111.26±1.38△	135.94±1.76△	1.084±0.005	110.15±2.91△
Grafted group	6	508.41±7.85△	592.03±38.29△*	1.079±0.022	174.79±22.67△

△ $P<0.05$, △△△ $P<0.005$ *vs* normal group; * $P<0.05$, *** $P<0.005$ *vs* non-grafted control group or grafted control group

3　讨论

3.1　脑内移植 AM 对 PD 鼠旋转行为的影响

本研究发现移植组动物在移植术后两周便出现旋转行为的改善，尽管术后2周至1月动物的旋转行为改善并不明显，但是，随着时间的推移，这些动物的异常行为不断得到改善，整个移植组的旋转次数由术前的431.1±52.16降至术后6个月的76.87±70.56，旋转行为改善非常明显，这表明 AM 脑内移植改善 PD 症状不仅能产生急性效果，而且还具有长期疗效。这与 Dunnett[3] 用胎中脑脑内移植治疗 PD 猴观察到的结论相符合。移植对照组和非移植对照组动物的旋转行为没有因时间推移得以矫正说明移植手术本身并非改善旋转行为的根本原因，手术的机械刺激作用不影响 PD 鼠的旋转行为，行为矫正的根本因素可能是 AM 移植物成活产生的。

3.2　AM 脑内移植后纹状体内单胺类递质含量改变

6-OHDA 能选择地损毁一侧黑质纹状体通路，造成该侧纹状体内多巴胺神经递质匮乏，但健侧纹状体内该递质含量不受影响，两侧 DA 含量失衡便构成了

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

PD 鼠模型的神经生化基础。本实验研究发现移植对照组和非移植对照组动物纹状体内单胺类递质明显低于正常组，这恰好支持了这两组动物旋转行为得不到纠正的事实，AM 胞浆内含有丰富的 DA，在 ATP 和 DA-β-羟化酶的作用下，DA 转化为 NE。DA-β-羟化酶位于髓质交感神经末梢，交感神经兴奋冲动使 DA-β-羟化酶释放。本实验结果表明正常 AM 内 DA 含量很高，并且在 DA-β-羟化酶的作用下，NE 含量占绝对优势。脑内移植时已将肾上腺髓质与皮质分离，交感神经冲动无法传至髓质细胞。胞浆中 DA 失去了 DA-β-羟化酶的作用而停滞于 DA 阶段不再进一步转化为 NE，此外，皮、髓质分离后，来自糖皮质激素调节作用的苯氨乙醇-N-甲基转移酶活性丧失，增加了 DA 含量[4]。任本等[5]观察了人 AM 培养液里 NE、DA 含量随时间变化的规律，发现随着时间延长，与 NE 比较，DA 合成、分泌均占绝对优势。我们的研究表明在正常 AM 内由于单胺氧化酶的活性相对较低，因而，DA 的另一重要代谢产物 DOPAC 含量明显比 NE 含量低。在神经组织中，即使在损毁了黑质纹状体通路的组织中，单胺氧化酶的活性相对较高，DOPAC 的含量相对较高。DOPAC/DA 能准确地反映 DA 能细胞的活性程度[6]，从本实验 DOPAC/DA 含量可以看出，AM 脑内移植6个月后移植侧纹体内 DA 含量恢复近至正常水平，即相当于正常组的77.83%，DOPAC/DA 在正常范围(即与正常组相比无统计学差异)。且具有神经组织 DA 合成、代谢的特征，AM 的功能能够朝 DA 神经元的功能转化。故用 AM 作为 DA 源脑内移植治疗 PD 的 DA 缺乏是一种切实可行的手段。

用6-OHDA 造成一侧黑质纹状体通路受损后，不仅直接导致 DA 含量不足，而且还能间接地影响位于多巴胺能神经末梢后的 DAD_2 受体密度，我们先前的研究表明 AM 脑内移植后移植物分泌 DA 能够纠正纹状体因失神经支配而造成的 D_2 受体密度过度增加，并且，这种作用不仅随移植存活时间而增强、明显直至使之恢复近至正常水平，而且不影响受体亲和力，即受体性质[7]。Anglade 等[8]发现 AM 移植物与宿主脑组织之间有酪氨酸羟化酶阳性的纤维相互投射，并存在突触结构；Moloni[9]证实胎鼠中脑移植物与宿主形成的上述突触结构有类似于黑质纹状人体完整侧的反馈调节机制，有效地控制着 DA 合成、释放与分解代谢。。综合本研究和先前的研究结果，可以设想 AM 移植物可能与宿主脑发生神经整合，建立了突触联系，AM 移植物长期发挥作用的机制可能是 AM 移植物与宿主细胞间形成了神经再支配的结果。随着科学研究的深入，AM 脑内移植治疗 PD 的手段和理论将得到进一步的发展和完善。

参考文献

1 Freed WJ, Perlow MJ, Karoum F et al. Restoration of dopaminergic function by grafting of fetal rat substantia nigra to the caudate nucleus: long-term behavioural, biochemical and histochemical studies. Ann Neurol, 1987; 39(4): 510

2 叶惟冷. 用高效液相色谱-电化学检测法快速、灵敏分析生物样本中的单胺类递质及代谢产物. 生理学报, 1987; 39(4): 412

3 Dunnett SB, Annett LE. Nigral transplants in primate models of parkinsonism. In: Lindvall O, Bjorklund A, Windner H, editors. Intracerebral transplantation in movement disorders. Restorative Neurology, Amsterdam, Elsevier, 1991: 27

4 Winkller H, Sietzen M, Suchober M. The life of catecholamine-storing vesicles. Ann N Y Acad Sci, 1987; 493: 3

5 任 本，鲍耀东，惠国桢等. 体外培养人胎肾上腺髓质家兔脑内移植的研究. 苏州医学院学报, 1990; 10(3): 180

6 Schmidt RH, Bjorklund A, Stenevi U et al. Activity of intrastriatal synthesis and metabolism. Acta Physiol Scand, 1983; Suppl 522: 19

7 杨 辉，张可成，周 政. 肾上腺髓质脑内移植对 PD 鼠纹状体 D_2 受体的影响. 功能性和立体定向神经外科杂志, 1993; 6(1): 19

8 Amglade P, Hirsch EC, Brandel JP et al.. Adrenal transplant, dopaminergic neurons, and Parkinson's disease. Ann Neurol, 1993; 33(6): 662

9 Meoni R. Effect of haloperidol on transplants of fetal substantia nigra: evidence for feedback regulating of dopamine turnover in the graft and its projections. In: Bjorklund, A, eds. Neural grafting in the mammaliam CNS. Amsterdam, Elsevier, 1985: 457

(收稿：1995-01-15；修回：1995-07-22)

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

Changes of monoaminergic neurotransmitter level after implantation of adrena medulla grafts in the striatum of the rats with Parkinson's disease

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

Abstract In order to investigate the intrastriatal neurochemical changes after implantation of adrenal medulla in the striatum of rats with Parkinson's disease, the levels of dopamine, a neurotransmitter, its metabolite, 3,4-dihydroxypgenyiacetic acid, and noradrenaline were quantitively determined with HPLC-ECD. It was found that the grafts of arenal medulla were able to provide a substantial restoration of the dopaminergic neurotransmitters in denervated striatum and dorrect the motor asymmetry of the rats with Parkinson's disease. Our findings suggest that intracerebral transplantation of adrenal medulla grafts in an efficient therapy for Parkinson's disease and renervation between the recipient and the grafts in the possible basic mechanism of the recovery.

Key words adrenal medulla; intracerebral implantation; monoaminergic neurotransmitter; rat; Parkinson's disease

****

丙型肝炎病毒外膜蛋白基因的克隆、序列分析及表达研究*

Cloning, sequencing and expression of envelope E_2/NS_1 gene of hepatitis C virus

沈定霞 李梦东 逯好英** (第三军医大学附属西南医院传染病中心) 重庆,630038

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus,HCV)是引起病毒性肝炎的病原之一。HCV 感染后,约50%病人转成慢性,并可能发展为肝硬化及肝细胞癌。对 HCV 基因组序列分析的结果表明,HCV 基因组具有高度变异的特点。根据 HCV 基因序列的差异,目前可将 HCV 分为Ⅰ～Ⅳ种基因型。在 HCV 基因组中,外膜蛋白基因 E_1 和 E_2/NS_1 区变异最大,而且,在 E_2/NS_1 区的 N 端内具有两个高变部位(hypervariable region,HVR),即 HVR_1 和 HVR_2。HCV 不同分离株的 HVR 序列各异,此部位又是体内免疫系统作用的主要靶目标,具有与细胞免疫反应和体液免疫反应相关的抗原表位。在体内免疫选择的压力下,HCV 产生逃避突变株,致使病毒难以清除,容易形成慢性感染,HVR 序列的差异也影响干扰素的治疗效果。因此,对于 HCV 外膜蛋白,尤其是 HVR 序列特点、抗原性及免疫功能的深入研究,对 HCV 致病机理的探讨,HCV 感染的诊断、治疗、预后判断及疫苗的研制方面都具有重要意义。

本文从我国丙型肝炎病人血清中经逆转录－聚合酶链反应(RT－PCR)扩增并克隆了900 bp 左右的 $HCVE_2/NS_1$ 基因,应用全自动 DNA 序列分析仪测出该基因 N 端431 bp 的核苷酸序列,将此序列与其余9个分别属于四种基因型的 HCV 分离株核苷酸序列及其它们的推导氨基酸序列进行比较分析,结果表明,我们所克隆的 $HCVE_2/NS_1$ 基因与 HCV Ⅰ型基因序列具有较高的同源性,在该基因 N 端内具有两个与文献报道一致的 HVR。我们还观察到,在 HVR 内部和外部存在有相对保守的氨基酸基团和氨基酸区域,它们的功能有待进一步深入研究。

将 HCV、E_2/NS_1 基因亚克隆至融合型表达载体 PRX_1 及 PGEX-2T,在大肠杆菌中诱导表达,获得具有较高表达的工程菌株,经免疫印迹试验(Western blot)和酶联免疫吸附试验(ELISA)鉴定,表达的重组蛋白质具有抗原性,能与丙型肝炎病毒感染者血清发生特异性抗原抗体结合反应。本研究为今后进一步研究 HCV 外膜蛋白的结构与功能,分析 HCV 的致病机理及研制疫苗奠定了基础。

关键词 丙型肝炎病毒;包膜蛋白;序列分析

中图法分类号 R373.21

(收稿:1995-06-20;修回:1995-07-26)

* 国家"863"计划资助项目

** 军事医学科学院三所

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