

· 实验研究 ·

3-硝基丙酸诱发肌张力障碍大鼠的相关脑区 细胞外神经递质变化

刘焕光, 马羽, 杨岸超, 孟大伟, 张颖, 张建国

【摘要】目的 研究 3-硝基丙酸 (3-NP) 诱发肌张力障碍大鼠相关核团的神经递质变化。方法 24 只 SD 大鼠随机分为对照组和实验组, 每组 12 只。实验组大鼠尾壳核注射 3-NP 4 000 μmol , 对照组尾壳核注射生理盐水 4 μl , 3 d 后对两组大鼠进行行为学评分, 然后对尾壳核、苍白球内侧、苍白球外侧和丘脑底核行微透析, 用高效液相色谱法测定透析液中的神经递质含量。结果 实验组尾壳核天冬氨酸及谷氨酸较对照组明显增加 ($P < 0.05$), 而甘氨酸及 γ -氨基丁酸较对照组明显减少 ($P < 0.01$); 苍白球内侧细胞外神经递质较对照组均明显减少 ($P < 0.01$); 丘脑底核细胞外神经递质较对照组均明显增加 ($P < 0.05$); 苍白球外侧细胞外神经递质含量较对照组均无明显差异 ($P > 0.05$)。结论 3-NP 可引起尾壳核神经递质变化, 并通过直接和间接通路引起苍白球内侧及丘脑底核神经递质变化, 从而诱发肌张力障碍。

【关键词】肌张力障碍; 神经递质; 色谱法, 高压液相; 3-硝基丙酸

中图分类号: R742, R-33

文献标志码: A

文章编号: 1009-122X (2012)07-0319-03

Changes of extracellular neurotransmitters in related brain regions in rats with dystonia induced by 3-nitropropionic acid

Liu Huan'guang¹, Ma Yu², Yang Anchao¹, Meng Dawei¹, Zhang Ying², Zhang Jianguo¹

1. Department of Neurosurgery; 2. Beijing neurosurgical institute, Beijing Tiantan Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To investigate the changes of neurotransmitters in related brain regions in rats with dystonia induced by 3-nitropropionic acid (3-NP). **Methods** Twenty four SD rats were randomly divided into control group and experimental group, and 12 rats for each group. 4 000 μmol 3-NP was injected into the caudate putamen (CPU) in rats of experimental group, and 4 μl normal saline in control group. The behavior scores were measured 3 days after injection, and microdialysis probes were placed into the CPU, globus pallidus intemus (GPI), lateral globus pallidus (LGP) and subthalamic nucleus (STN) of the rats. The levels of neurotransmitters in dialyate were determined by high-performance liquid chromatography. **Results** Compared with the control group, the levels of extracellular aspartate and glutamate in CPU significantly increased in experimental group ($P < 0.05$), while the levels of glycine and γ -aminobutyric acid significantly decreased ($P < 0.01$). The extracellular neurotransmitters in GPI significantly decreased ($P < 0.01$), and significantly increased in the STN ($P < 0.05$). There was no significant difference in extracellular neurotransmitters in LGP between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusions** 3-NP can cause the change of neurotransmitters in the CPU, and lead to neurotransmitter change in LGP and STN by direct and indirect channels, thus finally inducing dystonia.

Key words: dystonia; neurotransmitters; chromatography, high pressure liquid; 3-nitropropionic acid

本实验研究采用 3-硝基丙酸 (3-nitropropionic acid, 3-NP) 立体定向方法诱发大鼠肌张力障碍症状^[1], 并收集、检测相关核团神经递质, 探讨继发性肌张力障碍的发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料 健康雄性 SD 大鼠 24 只 (军事科学院

动物实验中心提供), 体质量为 200~300 g, 所有大鼠头无固定偏转 (头部与躯干之间无固定角度)。3-NP (美国 Sigma 公司) 配成 1 000 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$, PH 值调定 7.40, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 大鼠立体定向仪 (David Kopf Instruments, 美国)、5 μl 微量进样器。

1.2 分组与干预 将 24 只 SD 大鼠随机分为实验组和对照组, 各 12 只。10%水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 腹腔麻醉, 大鼠固定在立体定向仪上, 左侧尾壳核坐标为前囟前 1 mm, 矢状缝左侧 3 mm, 硬脑膜下 4~7 mm。常规钻开颅骨 (勿损伤硬脑膜), 定向用微量注射器将 4 μl 3-NP 溶液注入大鼠尾壳核, 硬脑膜下 4~7 mm 多点注射, 注射速度 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$, 注毕

基金项目: 北京市科技新星基金资助项目 (编号: 2008-B-43)

作者单位: 100050 北京, 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科 (刘焕光、杨岸超、孟大伟、张建国), 北京市神经外科研究所 (马羽、张颖)

通讯作者: 张建国, Email: zjguo73@126.com

留针 5 min,退针速度 1 mm/min。对照组在尾壳核注入生理盐水 4 μl。实验组与对照组大鼠在同一环境下常规喂养。

1.3 扭转评分 实验处理后第3天,所有大鼠放入动物行为观察箱内,采用动物运动轨迹跟踪系统(NOLDUS,荷兰)进行观察,每只大鼠记录1h。评分标准:以大鼠头体尾为长轴,确定鼻尖、躯干中点、尾根部3个关键点,计算鼻背连线和背尾连线的夹角并评分:0分无固定夹角;1分<30°;2分30°~<60°;3分60°~<90°;4分≥90°。

1.4 微透析 将实验大鼠用20%氨基甲酸乙酯(1 g/kg)腹腔注射麻醉,固定于动物立体定向仪上。各脑区透析针定位坐标:尾壳核为前囟前1 mm,旁开3 mm,颅骨下6 mm;苍白球内侧为前囟后2.5 mm,旁开2.6 mm,颅骨下7.8 mm;苍白球外侧为前囟后1 mm,旁开3 mm,颅骨下7 mm;丘脑底核为前囟后3.8 mm,旁开2.5 mm,颅骨下8.1 mm。微透析探针(CMA 12,瑞典)滤过膜长度为2 mm。钻孔开颅后将探针按坐标植入,用人工脑脊液以2 μl/min的速度灌流,所得透析液流入冰浴收集管中,弃去前2h的透析液,每隔30 min收集1管,收集1 h共2管。收集好的透析液立即放入-80℃的冰箱中冷冻待测。最终参与统计的值取该两管测定值的平均值。透析完毕后大鼠处死,自心脏灌注含4%多聚甲醛的生理盐水,迅速取出完整的脑组织,放入同样的固定液中,隔日行冷冻切片,焦油紫染色,光镜下观察,检查探针插入位置。

1.5 微透析液的高效液相色谱分析 采用Waters 600泵,Waters 474荧光检测仪,流动相为0.05 mol/L的磷酸缓冲液(PH 6.8),0.22 μm滤过膜滤过并超声波除气。衍生剂的配制为:20 mg邻苯二甲醛(OPA)+400 μL乙醇+0.1 mol/L硼酸缓冲液(PH 9.5)3 600 μL+16 μL 2-巯基乙醇,避光静放过夜,第2天使用。20 μL待测液+100 μL衍生试剂震荡,2 min后进样20 μL。色谱条件:Waters Symmetry C₁₈ 3.5 μm,4.6 mm×150 mm色谱柱,柱温35℃,激发波长357 nm,发射波长455 nm。梯度洗脱程序为:初始为65%的流动相,每分钟递减2%,第15分钟结束时流动相占35%,剩余的比例用甲醇补齐。处理软件为Waters Empower 2软件包,外标法测定待测物质浓度。氨基酸标准品、OPA均购自Sigma公司,甲醇为色谱纯,人工脑脊液成分为分析纯。

1.6 统计学分析 统计软件使用SPSS13.0软件包。大鼠肌张力障碍偏转评分采用等级资料秩和检验。氨基酸浓度采用独立样本t检验,P<0.05为差

异有统计学意义。

2 结果(图1)

2.1 行为观察 实验组大鼠术后第1天开始出现头部向注药侧偏转,右前爪抓握,后背痉挛性弓起,部分后肢伸直,并有进食少、精神萎靡不振、运动明显减少等症状。其行为学改变在术后1~3 d最典型,可持续1周;对照组基本无此变化。对照组和实验组术后第3天行偏转评分,实验组平均秩次18.25,对照组6.75;两组大鼠偏转评分差异有统计学意义

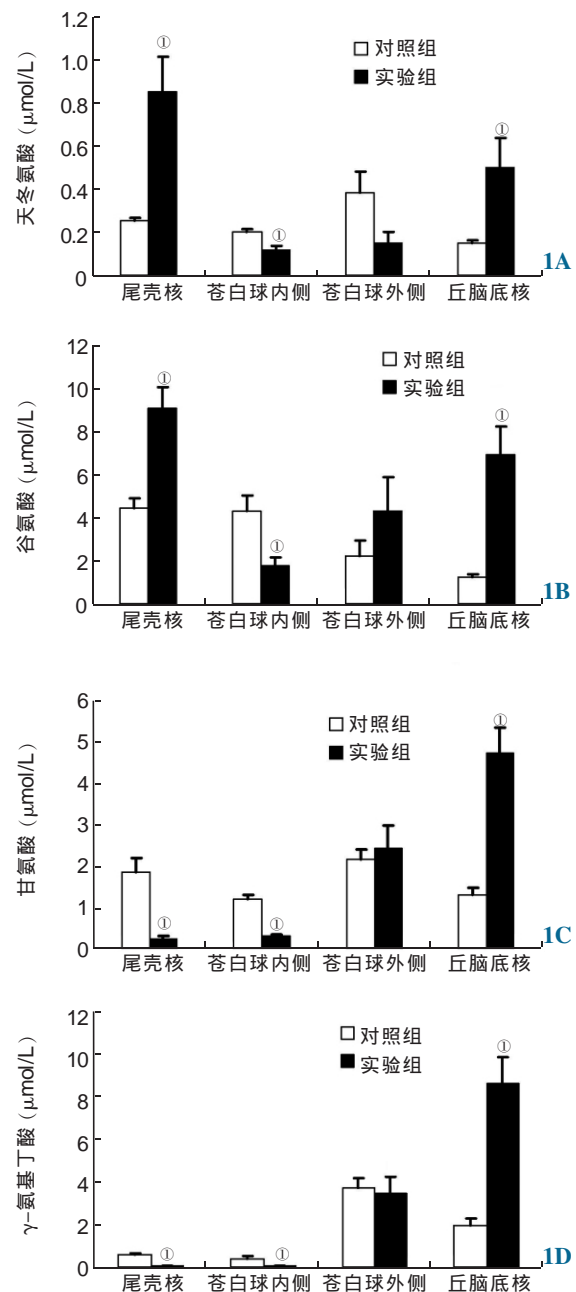


图1 两组各核团细胞外神经递质含量对比 1A 天冬氨酸 1B 谷氨酸 1C 甘氨酸 1D γ-氨基丁酸 ①与对照组比较,均 P<0.05

($z = -4.21, P = 0.004$)。

2.2 透析液中氨基酸含量测定(图 1) 实验组尾壳核细胞外兴奋性神经递质天冬氨酸及谷氨酸较对照组明显增加($P < 0.01$),而抑制性神经递质甘氨酸、 γ -氨基丁酸较对照组明显减少($P < 0.01$);苍白球内侧细胞外神经递质较对照组均明显减少($P < 0.01$);丘脑底核细胞外神经递质较对照组均明显增加($P < 0.05$);苍白球外侧细胞外神经递质含量较对照组无明显差异($P > 0.05$)。

3 讨论

肌张力障碍是一种以不自主、持续性肌肉收缩引起的扭曲、重复运动或姿势异常为主要表现的综合征。继发性肌张力障碍多与中枢神经系统损伤有关,病变主要位于基底核和丘脑。3-NP 是琥珀酸脱氢酶的不可逆竞争性抑制剂,注入大鼠尾壳核后会导导致线粒体功能异常,ATP 产生减少,细胞膜电位发生改变,最终导致纹状体组织变性、凋亡及坏死^[2-3]。

本实验采用 3-NP 立体定向注射入大鼠尾壳核的方法,诱发大鼠肌张力障碍症状。在实验组大鼠尾壳核中,兴奋性神经递质(谷氨酸和天冬氨酸)显著增加,而抑制性神经递质(γ -氨基丁酸及甘氨酸)显著下降。Marti 等^[4]认为:在 3-NP 处理的大鼠中,纹状体琥珀酸脱氢酶受抑制导致谷氨酸盐自发流出突触体,使谷氨酸增加。Storgaard 等^[5]研究发现:3-NP 还能抑制谷氨酸盐再摄取,增加 3-NP 的毒性。另外,通过调节 γ -氨基丁酸能神经元,抑制谷氨酸等可降低 3-NP 的神经元毒性^[6]。这些均直接或间接证实本研究的结果。而这种氨基酸的变化可能导致尾壳核传出兴奋性增高。

皮质-纹状体-丘脑-皮质的环路包括:直接通路,皮质-纹状体-苍白球内侧-丘脑-皮质;间接通路,皮质-纹状体-苍白球外侧-丘脑底核-苍白球内侧-丘脑-皮质^[7]。根据该环路分析:纹状体兴奋性增高,通过直接通路可导致苍白球内侧兴奋性降低(兴奋性神经递质明显减少),对丘脑的抑制作用下降,对皮质的兴奋作用增强。Ridding 等^[8]的研究还表明:在肌张力障碍的病人中,大脑皮质的抑制作用明显减弱。这可能与大脑皮质抑制作用下降,皮质-纹状体传入神经元释放抑制性神经递质减少有关。皮质兴奋性增强最终导致对侧肢体的肌张力障碍症状。通过以上分析:纹状体兴奋性增高可最终导致肌张力障碍,这个过程中,直接通路起关键作用。

本研究还发现:苍白球内侧细胞外抑制性神经递质含量较对照组也明显减少,这可能与丘脑底核的兴奋性神经递质增多有关,主要是间接通路的反

馈性代偿作用。1 周后实验组大鼠基本不再表现偏转症状,可能与间接通路逐渐发挥作用有关。另外, Cuny 等^[9]在研究 3-NP 致猴肌张力障碍模型时发现:利用胶原纤维酸性蛋白(GFAP)染色,纹状体病变的中心部位免疫反应性下降,而病变周边 GFAP 标记星形胶质细胞增生,且在病变周边广泛分布。而这种星形细胞可能对阻止 3-NP 继续破坏尾壳核也起到重要作用。

综上所述,大鼠尾壳核注射 3-NP 可引起尾壳核兴奋性升高,并通过直接通路及间接通路引起苍白球内侧和丘脑底核细胞外神经递质变化,最终通过苍白球-丘脑-皮质环路引起大脑皮质抑制作用下降,从而诱发肌张力障碍。

【参考文献】

- [1] 刘焕光,马羽,胡文瀚,等. 3-硝基丙酸诱导继发性肌张力障碍大鼠模型的行为学研究[J]. 中华神经医学杂志, 2010, 9(12): 1208-1211.
- [2] Gopinath K, Prakash D, Sudhandiran G. Neuroprotective effect of naringin, a dietary flavonoid against 3-nitropropionic acid-induced neuronal apoptosis[J]. Neurochem Int, 2011, 59(7): 1066-1073.
- [3] Liot G, Bossy B, Lubitz S, et al. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(6): 899-909.
- [4] Marti M, Mela F, Ulazzi L, et al. Differential responsiveness of rat striatal nerve endings to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: implications for Huntington's disease[J]. Eur J Neurosci, 2003, 18(4): 759-767.
- [5] Storgaard J, Kornblit BT, Zimmer J, et al. 3-Nitropropionic acid neurotoxicity in organotypic striatal and corticostriatal slice cultures is dependent on glucose and glutamate[J]. Exp Neurol, 2000, 164(1): 227-235.
- [6] Kumar P, Kalonia H, Kumar A. Possible GABAergic mechanism in the neuroprotective effect of gabapentin and lamotrigine against 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 674(2-3): 265-274.
- [7] Horie C, Suzuki Y, Kiyosawa M, et al. Decreased dopamine D2 receptor binding in the essential blepharospasm[J]. Acta Neurol Scand, 2009, 119(1): 49-54.
- [8] Ridding MC, Sheean G, Rothwell JC, et al. Changes in balance between motor cortical excitation and inhibition in focal task specific dystonia[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1995, 59(5): 493-498.
- [9] Cuny E, Ghorayeb I, Guehl D, et al. Sensory motor mismatch within the supplementary motor area in the dystonic monkey[J]. Neurobiol Dis, 2008, 30(2): 151-161.

(收稿日期:2011-07-03; 修回日期:2012-05-21)