

6-OHDA 诱导 PD 大鼠黑质神经细胞 凋亡的观察

马羽¹, 刘媛媛², 李子军¹, 高东明¹

(1. 锦州医学院生理学教研室; 2. 锦州医学院附属第一医院神经内科, 辽宁 锦州 121001)

【摘要】目的 探讨帕金森病发病过程中黑质神经元的缺失形式。方法 将 6-OHDA 立体定向微量注射于右侧内侧前脑束 (MFB) 制备 PD 大鼠模型, 观察大鼠的行为改变, 并运用特殊染色, DNA 原位末端标记技术检测黑质内多巴胺 (DA) 神经元凋亡的发生及其变化规律。结果 成功复制出符合临床特点的 PD 大鼠模型, 且旋转行为与黑质区神经元数目呈反变关系, 损伤侧黑质 DA 神经元存在着细胞凋亡, 以术后两周最明显。结论 6-OHDA 诱导的 PD 大鼠 SNc 中存在以凋亡为主的死亡方式, 细胞凋亡在 PD 发病中可能起关键作用。

【关键词】 6-OHDA; 帕金森病; 细胞凋亡; 黑质

【中图分类号】 R742.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-5161(2003)05-0017-04

A Study of Apoptosis of Substantia Nigra Neurons in 6-OHDA-induced PD Model Rats

MA Yu, LIU Yuan-yuan, LI Zi-jun, GAO Dong-ming

(1. Department of Physiology, Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001 China;

2. The Affiliated Hospital of Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001 China)

【Abstract】 Objective To investigate the possible losing model of neurons in SNc during the development of Parkinson's disease (PD). **Methods** Using special-dyeing and TUNEL techniques, the changes of apoptosis, the course of Dopaminergic (DA) neurons in SNc and the change of behavior were observed after stereoscopically injecting 6-OHDA to right side of the medial forebrain bundle (MFB). **Results** The rotation rate in PD rat model was increased with the decrease of the DA neurons in SNc. Apoptosis was the main losing mode of DA neurons in PD. It was found that the high peak took place within 2 weeks after lesion. **Conclusions** The study showed that apoptotsis could be found in substantia nigra neurons in 6-OHDA induced PD model rats, which may play a key role in the development of Parkinson's diseaes.

【Key words】 6-Hydroxydopamine; Parkinson's disease; apoptosis; the substantia nigra

帕金森病 (PD) 是一种常见的中老年神经系统变性疾病, 发病机制尚不明确, 内、外源性神经毒素可能起重要作用, 因此在 PD 的研究中, 神经毒素 MTPT、6-OHDA、DA 等常用于 PD 动物模型制作。虽有多种因素可导致 PD 发病, 但各种因素引起的 PD 最终都表现为患者中脑黑质多巴胺

(DA) 能神经元的缺失, 因此 PD 可能是由一条共同的最后通路而致。近来的研究提示, 这一共同途径可能与细胞凋亡有关。本实验旨在观察 PD 模型大鼠的中脑黑质神经细胞的凋亡情况, 探讨细胞凋亡与 PD 发病机制间的相关性。

〔作者简介〕 马羽 (1977-), 女, 辽宁省辽阳市人, 在读研究生, 从事神经生理学研究。

高东明 (1950-), 男, 辽宁省丹东市人, 教授, 硕士生导师, 从事神经生理学研究。

1 材料方法

1.1 主要试剂和仪器 6-OHDA、APO (阿扑吗啡)、焦油紫购自美国 Sigma 公司; TUNEL 试剂盒购自南京建成公司; 脑立体定位仪、自动进样仪, 美国 STEOELTING 公司; OLYMPUS 光学显微镜, 日本 LEICA 公司。

1.2 建立动物模型及实验分组 锦州医学院实验动物中心提供的健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠共 25 只, 平均体重 (250±30) g, 随机分为 2 组, 实验组 21 只, 对照组 4 只。立体定向于右侧内侧前脑束区行两点注射 6-OHDA (8μg/4μl), 坐标为: (1) AP: 3.5mm ML: 0.5mm DV: 9mm; (2) AP: 4.4mm ML: 1.5mm DV: 7.8mm。分别于术后 3d, 6d, 9d, 14d, 30d 皮下注射阿扑吗啡 0.5mg/kg (0.5g/L) 诱导旋转行为, 大于 7r/min 视为成功偏侧 PD 大鼠模型。随机分为术后 1 周、2 周、1 个月 3 组进行观察。对照组大鼠注射等剂量含 0.02% 抗坏血酸的生理盐水。

1.3 NISSL 染色及 DNA 末端标记检测 各组动物在规定处死时间, 以 10% 水合氯醛超量腹腔注射麻醉, 剪开胸腔, 经左心室升主动脉插管灌注生理盐水, 冲洗出血液, 然后再快速滴注 4% 多聚甲醛溶液, 断头取脑, 浸泡在相同固定液后固定 2h, 作脑冠状切片, 取前囟后 4.0mm 到 6.0mm 中脑组织, 置酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 浸蜡包埋, 连续冠状切片并编号, 片厚 6~8μm, 每组单数片号行 Nissl 染色, 双数号片用于 TUNEL 检测, 光镜下观察组织形态。

采用彩色病理图文分析系统对切片进行定量图象分析。

1.4 记录结果 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验和单因素方差分析 *F* 检验, 数据处理均应用 SPSS of Windows 11.0 软件包完成。

2 结果

2.1 旋转行为 多数大鼠于术后 1~2 周出现旋转行为, 一般注射 APO 后 1~5min 内开始旋转, 旋转时多数以左侧后肢为支点, 身体向左侧弯曲, 首尾相接, 原地转动, 有的甚至出现翻转, 少数则做小环形运动, 持续 30 分钟以上。结果显示, 模型组大鼠旋转圈数随时间逐渐增加, 比较 3d, 7d,

2w 小组大鼠的平均转数有显著性差异, $P < 0.05$, 但 7d 与 9d, 14d 与 30d 的检测结果显示无显著性差别 (见表 1)。

表 1 术后 3d, 7d, 2w, 4w 大鼠旋转统计

组别	N	旋转鼠	平均转数 (圈/min)
对照组	4	0	1.00±1.33
模型组 3d	21	0	2.67±1.00*
7d	21	9	9.75±1.00*
9d	14	10	10.88±0.61*
2w	14	13	13.63±2.39*
4w	7	14	13.00±0.91*

与对照组相比* $P < 0.05$

2.2 NISSL 染色 尼氏染色结果示: 正常黑质致密带神经元表现为细胞呈条带状分布, 为大中型锥体细胞, 细胞核淡染, 核仁明显, 细胞质呈蓝色, 尼氏体清晰, 颗粒密度分布正常。模型组大鼠损毁部位均位于目标区域, 神经元消失, 明显胶质细胞增生, 周边结构基本正常。黑质致密带神经元数目显著减少, 尼氏体模糊, 颗粒及密度均降低。模型组损毁侧黑质致密区灰度值随术后时间的延长而减少, 且明显低于对照组和对侧的黑质区, 模型组 2w 组与 4w 组相比差别不大 (表 2, 图 1、2)。

表 2 模型组与对照组损毁侧 SNc 区灰度值

	对照组	模型组 7d	模型组 2w	模型组 4w
灰度值	170.5425	149.5079 ^a	117.2883 ^{a*}	110.4052 ^{a*}

^a $P < 0.05$ 与对照组相比, * $P < 0.05$ 与模型组 7d 组相比

2.3 TUNEL 检测 模型组损毁侧中脑黑质区可见大量染色阳性细胞, 细胞核固缩, 呈棕黄色, 不规则形或圆形, 部分细胞核裂解成多个深棕色凋亡小体。2 周模型鼠的凋亡细胞最多, 明显高于 7 天和 4 周模型组 ($P < 0.05$)。在对侧黑质部位亦可见到少数凋亡细胞, 对照组未见到明显阳性细胞 (见表 3、图 3)。

表 3 模型组术后各个时期损毁侧 SNc 区 TUNEL 阳性细胞数 (个/视野)

术后时期	TUNEL 阳性细胞数
7 d	3.07±0.39
2 w	3.60±0.27
4 w	2.27±0.43

3 讨论

目前在 PD 动物实验中, 多采用 6-OHDA 或 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶

(MPTP) 制作 PD 动物模型。一些研究认为大鼠体内 MAO-B 活性不高, 不能使 MPTP 有效的转变成毒性 MPP⁺, 因此 MPTP 不是制作大鼠模型的理想药物。6-OHDA^[1] 因不易通过血脑屏障, 偏侧 PD 大鼠模型只能经脑室和脑实质内用药才能制备。本实验采用 SD 大鼠 MFB 立体定向注射 6-OHDA, 通过破坏黑质与纹状体通路间的神经纤维, 引起黑质 DA 能神经元逆行性变性, 以及纹状体 DA 能纤维末梢顺行性变性, 损伤的速度较快, 可较好的模拟 PD 进展期病变过程及行为学改变。多巴胺能神经元的破坏与 6-OHDA 的剂量、注射部位及不同动物内在的敏感性有关。多数研究发现 6-OHDA 剂量在 8~12 μ g (2 μ g/ μ l) 时, TH 免疫组化中 DA 活性损失可达 80%~90%。本实验结果显示, 随着术后时间的延长, SNc 区细胞密度不断降低, 大鼠旋转次数逐渐增加, 第 2 周最显著, 但 2~4 周差别不大。Carman-LS 等人^[2] 也认为 SNc 处神经元的数目与 APO 诱发的旋转次数有显著性联系, 呈反变关系, 并于注射 6-OHDA 术后 2 周形成稳定的损伤。

细胞凋亡是 1972 年 Kerr 等在正常生理状态下观察到的一种细胞死亡过程, 又称程序性细胞死亡 (programmed cell death PCD), 亦可在某些病理刺激条件下发生。目前已认识到细胞凋亡可能在某些神经系统变性疾病中起着关键作用^[3]。最近, 来自几个不同研究单位的文献报道, PD 患者死后尸检病理发现黑质神经细胞存在着明显的凋亡样改变。1997 年, Mochizuki 等^[4] 用 TUNEL 法检测正常人和 PD 病人脑黑质中的 DNA 降解片段, 发现 4/7 例晚发的散发性 PD 病例中存在 TUNEL 标记阳性的神经元, 提示至少在部分 PD 病人的发病中, 凋亡可能参与了黑质细胞的缺失过程。

TUNEL 法是目前公认的检测组织细胞凋亡的敏感方法, 能用于石蜡包埋的组织, 实用性较好^[5]。本实验应用 TUNEL 法也检测到 PD 大鼠中脑黑质致密部存在染色阳性细胞, 呈棕黄色, 不规则形, 偶可见细胞裂解的凋亡小体。但因细胞凋亡过程是一个快速事件^[6], 在每张切片上可检测到的凋亡细胞很少。本结果与 N. A. Tatom 等人利用 MPTP 制成的 PD 模型鼠黑质区凋亡细胞的检测结果一致^[7]。时间上, 6-OHDA 术后 2 周内发生凋亡的神经元较多, 第 2 周达到高峰, 与 SNc 区神经元密度降低趋势相仿, 可能是 6-OHDA 激活了该通路中促进细胞凋亡的基因, 从而引起细胞凋亡的发生, 最终导致黑质内 DA 能神经元的减少。

本实验证实 6-OHDA 诱导的 PD 大鼠 SNc 中存在着凋亡现象, 这一结果将为探索 PD 的发病机制提供依据。PD 的发病过程中可能是某些长期轻微的、不显著因素引起细胞损伤, 启动基因控制的凋亡程序, 最终导致 DA 能神经元发生凋亡。根据这一机制, 采取针对性治疗手段, 有可能阻止其病程进展, 达到根治 PD 的目的。

[参 考 文 献]

- [1] Sachs C, G Jonsson. Mechanism of action of 6-hydroxydopamine [J]. *Biochem Pharmacol*, 1975; 24: 1-8.
- [2] Carman LS, Gage FH, Shults CW. Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior [J]. *Brain Res*, 1991 Jul 12, 553 (2): 275-83.
- [3] Savitz SI, Rosenbaum DM. Apoptosis in neurological diseases [J]. *Neurosurg*, 1998, 42: 555-572.
- [4] Mochizuki H, Mori H, Mizuno Y. Apoptosis in neurodegenerative disorders [J]. *J Neural Transm Suppl*, 1997, 50: 125-40.
- [5] 张开, 石玉秀. TUNEL 法——细胞凋亡的组织化学鉴定法 [J]. *日本医学介绍*, 1995, 16: 469.
- [6] Rossiter J P, Riopelle R J, Bisby M A. Axotomy-induced apoptotic cell death of neonatal rat facial motoneurons: time course analysis and relation to NADPH-diaphorase activity. *Exp Neurol*, 1996, 138: 47-54.
- [7] N A Tatom, S J Kish. In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labeling and acridine orange staining [J]. *Neuroscience*, 1997, 77: 1037-1048.

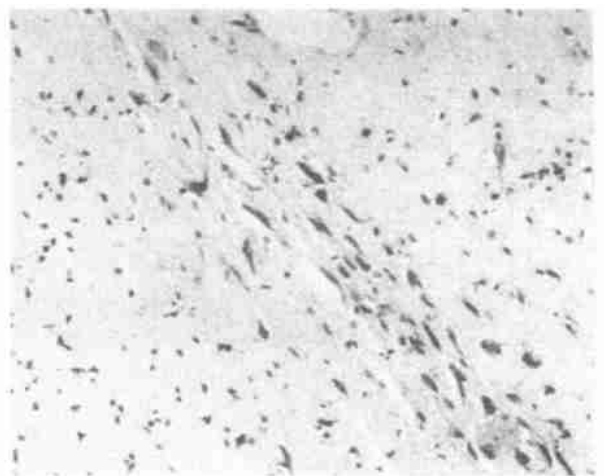


图 1 对照组 Nissl \times 400 细胞呈条带状呈簇分布, 为大中型锥体细胞, 细胞核淡染, 核仁明显, 细胞质呈蓝色, 尼氏体清晰, 颗粒密度分布正常

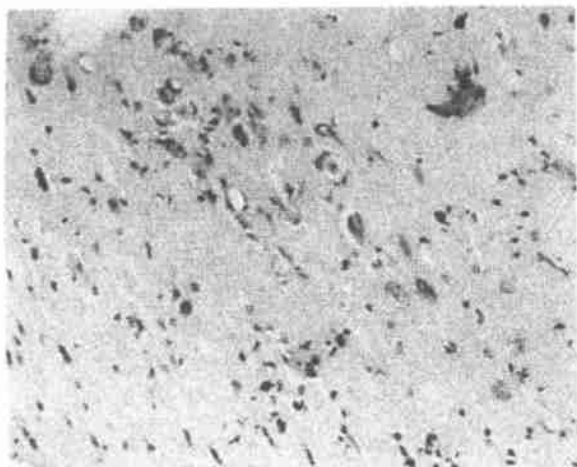


图2 模型组(2周) Nissl×400 黑质致密带神经元数目明显减少, 尼氏体模糊, 颗粒及密度均降低

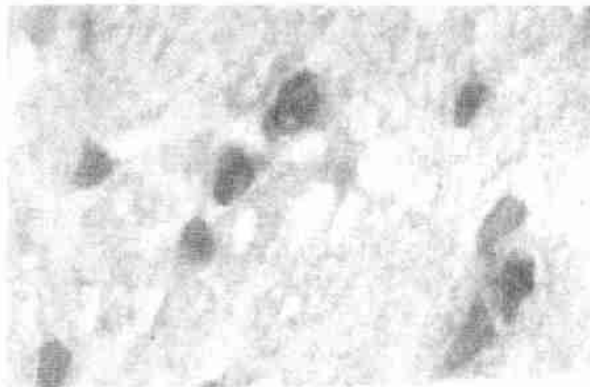


图3 模型组(2周) TUNEL×1000 SNc区可见染色阳性细胞, 细胞核固缩, 呈棕黄色, 不规则形或圆形, 周边可见正常黑质神经元, 锥形或三角形, 细胞核淡染, 核仁明显, 细胞质呈蓝色, 颗粒密度分布正常
〔收稿日期〕2003-07-04

237 名 50 岁以上 ②型糖尿病患者现状调查分析

韩敏华

(锦州铁路中心医院, 辽宁 锦州 121000)

【中图分类号】 R587.1

【文献标识码】 B

【文章编号】 1000-5161(2003)05-0020-01

糖尿病是现代疾病中的第二杀手, 其对人体的危害仅次于癌症, 已成为威胁人们健康和生命的主要因素。为了解正大社区内中老年人糖尿病的患病情况, 我们于 2000 年 5 月在社区内开展了一次调查。调查对象为社区内所有确诊为 ②型糖尿病的患者, 其中, 男性 154 人, 女性 83 人, 年龄在 50~70 岁之间。

在调查的 237 名 ②型糖尿病患者中, 年龄在 50~60 岁之间的 113 人, 60 岁以上的 124 人。患者中绝大多数合并有高血压, 占调查总人数的 62.03%, 并且随年龄的增长而增加, 但男女患者之间无显著差异。

同时调查了患者的配偶、家庭经济状况、饮食、锻炼、饮酒、家庭病史及重大生活变故情况。结果发现, 丧偶、家庭经济困难、不良饮食习惯及遭受重大打击, 都是使中老年人患糖尿病的危险因素。而家庭病史、锻炼、饮酒都居于次要的地位。

因此, 改变糖尿病患者的生活状况, 建立健康的生活方式, 是预防糖尿病最有效的途径。只有这样才能延长患者生命, 提高生命质量。

〔收稿日期〕2003-07-01