

· 论著 ·

MPTP 偏侧恒河猴帕金森病模型研究

马羽 张凯 张建国 胡文瀚 孟凡刚 张颖 张东

[摘要] 目的 对血管介入法、手术夹闭颈外动脉行颈总动脉穿刺、单纯颈总动脉穿刺三种甲基-苯基-四氢吡啶(MPTP)制备偏侧猴帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型的方法进行比较,探讨偏侧猴 PD 模型的制作技术及效果。方法 健康恒河猴 6 只行单侧颈内动脉 MPTP 注射,其中 2 只于 DSA 下行血管介入法注药;2 只采用夹闭颈外动脉颈总动脉注药;2 只行单纯颈总动脉注药。术后采用行为学观察和评估,包括运动障碍评分、阿扑吗啡诱发旋转实验等。猴处死后两侧黑质组织切片,NISSL 和酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)免疫组织化学染色。结果 血管介入法和夹闭颈外动脉颈总动脉注药法均一次建模成功;单纯颈总动脉注药法的 2 只分别于重复注药 2 次和 3 次后成功。行为学观察可见猴的自主运动明显减少,运动障碍评分 1 个月后稳定在 6 分以上。阿扑吗啡(apomorphine, APO)试验可诱发出向健侧旋转行为。病理检查可见注药侧黑质内神经细胞缺失减少,残留神经元变性。黑质纹状体区 TH 阳性多巴胺神经元较正常侧减少 65% 以上。结论 血管介入法、颈外动脉夹闭颈总动脉注药法和单纯颈总动脉注药法均能够建立满意的偏侧猴 PD 模型。

[关键词] 帕金森病;恒河猴;甲基-苯基-四氢吡啶;颈内动脉注药

中图分类号:R742.5

文献标识码:A

文章编号:1008-2425(2008)04-0212-04

Establish of hemiparkinsonism rhesus monkey model by unilateral internal carotid artery injection of MPTP Ma Yu, Zhang Kai, Zhang Jianguo, et al. Beijing Neurosurgical Institute, Neurosurgical Department, Beijing Tiantan Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing, 100050

[Abstract] **Objective** To investigate the skills and results of establishing hemiparkinsonism rhesus monkey models by comparing three different methods of unilateral internal carotid artery injection of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Methods** Six healthy rhesus monkeys received MPTP injection through the internal carotid artery, among them 2 through endovascular interventional method under DSA, the other 4 through common carotid artery injection with or without external carotid artery clipping. All monkeys were evaluated after surgery according to a disability rating scale. Apomorphine (APO) evoked rotation was also tested. After death of the monkey models, both sides of substantia nigra were cut into serial sections, and tyrosine hydroxylase (TH), immunohistochemical study was performed. **Results** The monkeys who received endovascular injection and common carotid artery injection with external carotid artery clipping developed symptoms of Parkinson's disease successfully after the first injection. Injection had to be performed 3 times and 2 times among the 2 monkeys without external carotid artery clipping. Monkeys showed PD symptoms including reduction of voluntary movement, rigidity of left limbs, bradykinesia and gait abnormality. The disability scores of hemiparkinsonian monkeys were all higher than 6 at 1 months after the last injection of MPTP. APO could evoke rotation to left. NISSL and TH immunohistochemistry staining showed that DA neurons reduced by more than 65% in the lesioned side compared with the contralateral side.

收稿日期:2008-05-04

基金项目:北京市科技新星计划项目(编号:2004-B-26)

作者单位:100050 北京 首都医科大学附属北京市神经外科研究所,首都医科大学附属北京天坛医院神经外科(马羽,张凯,张建国,胡文瀚,孟凡刚,张颖),长春挺进医院检验科(张东)

通讯作者:张凯

Conclusion All three methods can establish satisfactory MPTP monkey models of hemiparkinsonism.

[**Key words**] Parkinson's disease ; rhesus monkey ; MPTP ; Carotid artery injection

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 的实验动物模型已有多,包括大鼠、小鼠的外科损伤或 6-羟多巴立体定向注射毁损的模型等^[1,2]。最有价值的模型动物应是和人类神经系统尤其是中脑基底节区有着相似结构、功能和复杂程度的物种。灵长类 PD 动物模型能够反映 PD 症状的基本特征,是目前最接近人类 PD 的动物模型,为 PD 的基础研究提供了良好的基础和平台。

资料与方法

1. 实验动物 健康老年恒河猴 6 只,随机分组 (表 1)。实验动物均为 8~12 岁龄,其中雄性 5 只,雌性 1 只,体重 9.8~11.8 Kg,由北京市神经外科研究所动物中心提供。

2. 手术方法

(1) 血管介入法制备偏侧猴 PD 模型 (A 组 - M1, M2) : 氯胺酮诱导麻醉,依据术中动物状态随

时补充。将猴置于 DSA 检查床上,以 Seldinger 法行右侧股动脉穿刺右侧颈内动脉 (图 1A),缓慢注入 MPTP (1.0~1.2mg/kg) 生理盐水溶液。MPTP 用量见表 1。

(2) 暂时夹闭颈外动脉,颈总动脉内注射 MPTP 制备猴偏侧 PD 模型 (B 组 - M3, M4) 准备及麻醉同 A 组。动物仰卧于手术床上,逐步分离暴露右颈总动脉、颈动脉分叉部及颈内、外动脉。暂时完全夹闭颈总动脉近心端及颈外动脉,穿刺针穿刺颈总动脉 (图 1B),缓慢注入 MPTP 生理盐水溶液后放开颈总动脉、颈外动脉,拔出穿刺针,逐层缝合切口敷料包扎固定。

(3) 颈总动脉内注射 MPTP 制备猴偏侧 PD 模型 (C 组 - M5, M6) : 准备、麻醉及手术操作同 2.2。分离暴露颈总动脉,穿刺颈内动脉 (图 1C),缓慢注入 MPTP 生理盐水溶液。

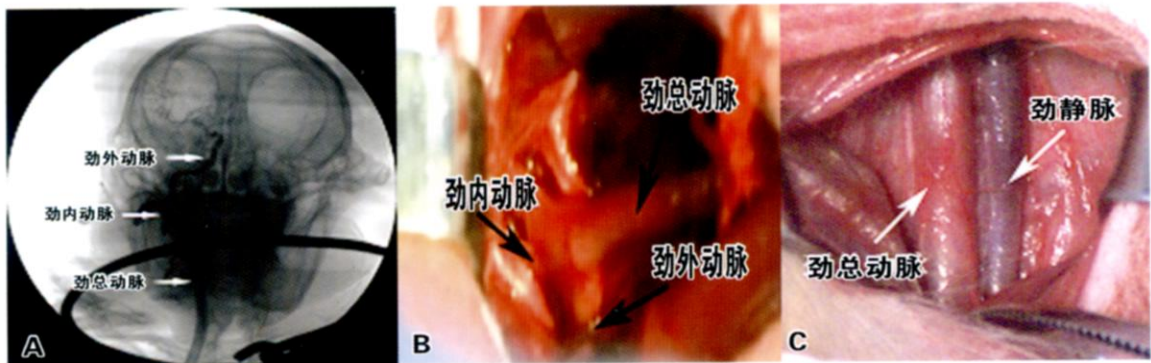


图 1 恒河猴颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉的血管分布情况

A: 猴 DSA 血管造影; B、C: 猴颈部血管解剖

3. 行为学观察

(1) 运动评分量表 (0~10 分) 依据 Gomez - Mancilla 与 Bedard 创建的加拿大评分量表 (The Canadian scale)^[3] 分别于术后 1、2、4、8、12 周对模型猴的运动和行为进行评分。

(2) 阿扑吗啡诱发试验: 分别于模型制作后 4 周、8 周、12 周肌注突触后膜多巴胺 D₂R 受体激动剂 APO (0.2mg/Kg), 注射后观察 3h, 记录每分钟旋转次数, 统计旋转总次数和平均圈数。

4. 组织学检查

动物猝死, 固定后完整取出脑组织, 对照恒河猴脑解剖图谱, 分离黑质区, 制成石蜡切片, 行尼氏 (Nissl) 染色、酪氨酸羟化酶 (TH) 免疫组织化学检测, 光镜下观察黑质区神经元改变情况, 行半定量分析, 统计观察结果。

结 果

1. 术后恢复及行为观察 A 组、B 组动物建模均一次成功, C 组动物分别重复注射 2 次和 3 次后出现 PD 表现。A、B 组动物分别术后 4h 和 16~

24h 左右恢复至正常进食状态,2 周内逐渐出现了典型的 PD 表现,如面部表情僵硬和叫声减少,注药对侧肢体活动减少、屈曲,肌张力增高,取食基本以健侧为主。术后 1~3 月运动评分分别达到 7~8 分和 6~9 分,并稳定在此水平。C 组动物术后 10h 左右可恢复至正常进食状态,活动基本正常。猴 M5 第一次手术给予 MPTP 的剂量为 10mg,观察 4 周后注药对侧肢体活动略减少,运动评分仅有 4 分,APO 诱导试验未出现持续异常旋转运动,1 个月后再次同侧手术给药 12 mg,术后 10 h 左右完全清醒,但以趴伏为主,自主活动减少,4 周后注药对侧肢体活动较第一次活动少,运动评分 5 分。2 周后

第三次同侧给药 14mg,术后三周左右主要对侧肢体活动显著减少,肌张力增高,运动评分 7 分,3 周时 APO 诱导试验出现向对侧的异常旋转运动。猴 M6 二次手术共给予 MPTP 25 mg,平均 16 h 后猴恢复正常活动,20 h 左右可正常进食。第二次注药 5 天后逐渐出现 PD 表现(表 1)。

2. 阿扑吗啡试验 成功建模 4 周左右模型症状表现稳定,给予肌注 APO。注射 10 分钟左右模型开始出现向左侧的异常旋转运动,受刺激时加速,最高可达 15~20 圈/min。8~12 周仍然保持稳定(表 1)。

表 1 偏侧猴 PD 模型制作结果

实验分组	动物	手术用时 min	氯胺酮量 mg	手术次数	MPTP 用量 mg	恢复正常 时间(h)	每周运动评分					APO 旋转 测试(圈/分)		
							1	2	4	8	12	4W	8W	12W
A	M1	70	60	1st	10	2	3	5	7	7	8	11	14	16
	M2	60	60	1st	12	4	5	6	7	8	8	12	15	18
B	M3	180	140	1st	10	24	6	8	8	8	9	14	16	20
	M4	120	120	1st	12	16	4	5	6	7	7	10	17	17
C	M5	120	120	1st	10	8	0	0	4	×	×	0	×	×
	M5	100	80	2nd	12	10	2	2	5	×	×	0	×	×
	M5	90	80	3rd	14	10	2	4	7	7	7	8	11	10
	M6	90	100	1st	12	12	0	0	3	×	×	0	×	×
	M6	110	150	2nd	13	20	4	5	6	6	6	6	9	8

3. 病理学检查结果

(1) Nissl 染色 Nissl 染色光镜下可见 MPTP 注射侧的黑质致密部的神经细胞数目明显减少,残留神经元变性,轻度胶质细胞增生(图 2)。黑质纹状体区多巴胺神经元较正常侧减少 65% 以上。

(2) TH 免疫组织化学染色 采用免疫组化 ABC 法 TH 染色光镜观察到,注药侧与对侧相比黑质 TH 阳性神经元数目明显减少,为对侧的 15%~35%,残留神经元变性,或固缩坏死,其中致密带较网状带严重,可见噬细胞现象及胶质细胞增生(图 3)。

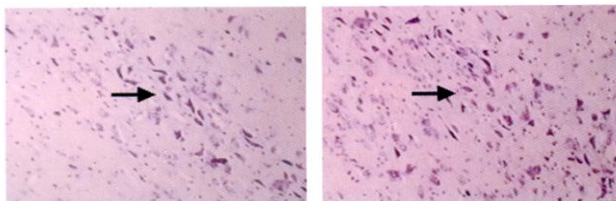


图 2 A:MPTP 注药对侧中脑黑质区() (Nissl 染色 $\times 200$); B:MPTP 注射侧黑质区() (Nissl 染色 $\times 200$) 可见神经细胞较对侧明显减少,残留神经元空泡变性或固缩坏死。

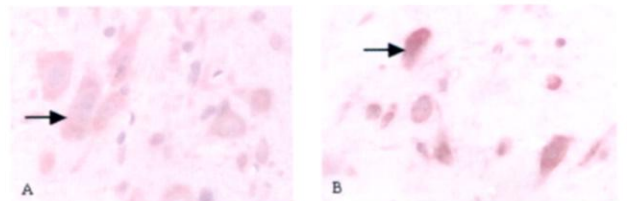


图 3 A:MPTP 注药对侧中脑黑质区域(TH 免疫组织化学染色, $\times 400$) 胞浆内有棕色颗粒者为 TH 阳性多巴胺神经元细胞()。

B:MPTP 注射侧的黑质神经细胞数目明显减少,残留神经元变性(),噬细胞现象(白)。伴轻度胶质细胞增生(TH 免疫组织化学染色, $\times 400$)

讨 论

选择长动物制作 PD 模型,其在结构、功能上更接近人类。本研究采用了 3 种方法注入 MPTP 制备偏侧 PD 模型。在 DSA 下通过动脉插管将导管送至颈内动脉处注入 MPTP 的介入法和分离颈动脉分支部,夹闭颈外动脉,穿刺颈总动脉注药的手术

方法,均可制作满意的猴偏侧 PD 模型,但是通过对两种方法的比较,我们发现采用介入法制备偏侧 PD 猴模型相对于手术方法操作时间短,药物无外漏,给药剂量准确,创伤小,术后恢复较快。1986 年 Bankiewicz 等^[4]就已报道了采用动脉插管在屏幕监视下将导管插入颈内动脉给药,效果较好,虽然猴的血管直径要比人细很多,但利用微导管技术已经完全可以安全的到达颈内动脉。本研究介入组手术时间一般在 1h 左右。由于手术时间短,所需麻醉药剂小,但对设备和操作技术的要求较高。手术组平均手术时间在 2.5h 左右,麻醉药品的需要量较大,动物易产生耐受,术后苏醒及恢复正常活动和饮食的时间也较介入组晚,不过操作实施相对容易,也是可推荐方法。单纯颈总动脉注药组建模需要多次手术注药才能成功,考虑可能存在以下的原因:未夹闭颈外动脉,药物进入颈外动脉系统;注射药物时由于推注速度不易控制,出现药物返流和外渗。因此,虽此法操作简单,能够制备偏侧 PD 模型但给药量不宜掌握,一次手术成功率不高,不是建模的优先选择。也有文献报道^[5]MPTP 小剂量(0.2mg/kg)长期(8~18 周)应用可制备慢性 PD 模型,这种模型的行为、生化及病理与人类 PD 几乎无差别,但由于制备模型所需时间太长,限制了其应用。

健康猴以及 PD 模型行为的长期观察表明,猴子是灵长类高级动物,不仅具有明显的个体差异,也存在着年龄、性别、性格、运动技能等多方面不同,很难用单一的行为学指标来评价并进行个体间的比较,而偏侧模型则能够方便的进行术前术后、肢体正常侧与异常侧的自身对照分析。在行为学指标选择上,我们采用了综合性的运动评分量表^[3]包含多方面的行为学内容,以定性指标为主,较为客观,是我们最重要的评价依据。APO 诱发旋转实验也是评价 PD 模型制作成功的一项重要检查项目。单侧黑质纹状体的损伤,使两侧半球功能不对称,损伤侧纹状体的 DA 受体超敏。若注射突触后膜 D2 受体激动剂 APO,将诱导出动物向注药对侧的旋转行为。本研究中动物在给予 MPTP 后评分在 6 分以上者均可经 APO 诱导出向健侧的异常旋转运动,在受刺激后旋转次数明显增多。而评分在 4 分以下者诱导试验均为阴性。实验过程中发现运动评分较高的

模型其 APO 诱发旋转次数多,因此国内外报道中有将其作为定量指标的,也有的仅将其作为定性指标。但其易因猴的个体差异、刺激强度的不同而变化,定量意义有限,但可作为一个可靠的定性指标。特异性病理学检测被认为是验证猴偏侧 PD 模型制作成功的金标准,病理检查能够发现黑质 TH 阳性的多巴胺能神经元广泛损伤和消失,与 PD 病人病理改变一致。也有应用 PET、SPECT 等功能成像影响学技术证实 PD 模型猴内基底节功能区的改变与人类 PD 相似^[6,7],为判断建模的成功提供依据。

为揭开 PD 的神经科学奥秘,猴动物模型是一个很好的工具,能够为我们研究 PD 发生发展过程及其可行的新的治疗方法提供实验基础平台。

参 考 文 献

- 1 Paille V, Henry V, Lescaudron L, et al. Rat model of Parkinson's disease with bilateral motor abnormalities, reversible with levodopa, and dyskinesias[J]. *Mov Disord*, 2007, 22(4):533~539.
- 2 贡志刚,黄强,兰青. 适用于细胞移植治疗帕金森病研究的大鼠模型的建立及其特征分析[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21:886.
- 3 Gomez - Mancilla B, Bedard PJ. Effect of nondopaminergic drugs on L - dopa - induced dyskinesias in MPTP - treated monkeys[J]. *Clin Neuropharmacol*, 1993, 16(5):418~427.
- 4 Bankiewicz KS, Oldfield EH, Chiueh CC, et al. Hemiparkinsonism in monkeys after unilateral internal carotid artery infusion of 1 - methyl - 4 - phenyl - 1,2,3,6 - tetrahydropyridine (MPTP) [J]. *Life Sci*, 1986, 39(1):7~16.
- 5 Hantraye P, Varastet M, Peschanski M, et al. Stable parkinsonian syndrome and uneven loss of striatal dopamine fibres following chronic MPTP administration in boons[J]. *Neuroscience*, 1993, 53(1):169~178.
- 6 Nader MA, Morgan D, Cage HD, et al. PET imaging of dopamine D2 receptors during chronic cocaine self - administration in monkeys[J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(8):1050~1056.
- 7 张力,江澄川,徐斌,等. 立体定向下黑质毁损偏侧帕金森恒河猴模型的制作与评价[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23:1463~1465.