

损毁或高频刺激丘脑底核对黑质神经元的保护作用*

马羽¹, 高东明³, 张建国^{1,2}, 刘焕光²

(1. 首都医科大学北京市神经外科研究所功能神外研究室, 北京 100050;

2. 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科, 北京 100050;

3. 辽宁省辽宁医学院生理教研室, 辽宁 锦州 121001)

摘要 目的: 探讨损毁或高频刺激丘脑底核(STN)对帕金森病(PD)大鼠黑质致密部神经元的保护作用及其可能的发生机制。方法: 应用6-羟基多巴胺(6-OHDA)制备偏侧PD大鼠模型,于丘脑底核(STN)区分别植入刺激电极给以高频电刺激,或注入鹅膏蕈氨酸(IA)进行损毁后,观察PD大鼠行为改变;运用尼氏(Nissl)染色、DNA原位末端标记技术(TUNEL)、免疫组化方法检测并分析黑质致密部(SNc)神经元存活及凋亡发生情况。结果: 刺激组黑质致密部凋亡神经元的阳性率显著低于模型组与损毁组($P < 0.05$)。与正常大鼠相比,刺激组Bcl-2染色呈强阳性,Bcl-2/Bax比值较高,模型组、损毁组SNc区的Bcl-2表达有所下调,Bax表达增加,Bcl-2/Bax比值降低($P < 0.05$),虽然损毁组SNc的凋亡阳性神经元少于模型组($P < 0.05$),但二者的Bcl-2、Bax的表达及Bcl-2/Bax比值无显著性差异($P > 0.05$)。结论: 损毁或高频刺激STN对PD大鼠黑质SNc神经元存在保护作用,高频刺激的长期保护作用更为明显。

关键词: 帕金森病; 细胞凋亡; 深脑部高频电刺激术; 毁损术

中文分类号: R342.8

文献标识码: A

文章编号: 1000-6834(2009)03-387-04

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是常见于中老年人的进展性神经系统变性疾病,随着病程的延长,黑质区残存的正常多巴胺神经元数量不断减少,症状逐渐加重。发病机制及神经元缺失的原因至今未清,近年来的相关研究发现细胞凋亡在帕金森病的发生发展中起着重要的作用^[1,2]。用于PD动物模型制作的神经毒素6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyltetrahydropyridine, MPTP)均可诱导大鼠及其原代培养的中脑神经元发生凋亡,Reum等尸检研究结果也证实PD患者的中脑黑质区存在凋亡神经元^[3],由此提出能否通过干扰细胞凋亡的进程而延缓或阻止PD病情的进展这一设想。高频电刺激术(high frequency stimulation, HFS)和毁损术是目前帕金森病外科治疗的两种主要方法,而HFS因其独特的优点得到了更为广泛的应用^[4],有关这两种外科治疗方法对PD病程是否有影响至今鲜有报道。本研究通过行为学观察,TUNEL法及免疫组化等检测手段观察高频电刺激或损毁丘脑底核(subthalamic nucleus, STN)对PD大鼠黑质致密部(substantia nigra pars compacta, SNc)神经凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 动物和分组

成年雄性SD大鼠,体重(250 ± 30)g,正常对照

组大鼠10只;实验组分为PD模型组、刺激组及损毁组,每组大鼠各15只。

1.2 PD及损毁模型的建立

大鼠麻醉后颅平位固定在脑三维立体仪上(美国STEOELTING公司),按Paxinos-Watson的大鼠脑定位图谱,确定右侧内侧前脑束两点坐标:(1)前囟后3.5 mm,中线右侧0.5 mm,硬膜下9 mm;(2)前囟后4.4 mm,中线右侧1.5 mm,硬膜下7.8 mm,用牙钻钻开颅骨。采用10 μl微量注射器由自动进样仪(美国STEOELTING公司)推动向两点分别注入6-OHDA 2.5 μl、3.0 μl,制成PD模型。STN损毁模型大鼠于右侧STN(前囟后4.0 mm,中线右侧2.6 mm硬膜下8.0 mm)处注入IA 0.3 μl,注射速度0.1 μl/min。

1.3 刺激电极安装与固定

刺激组大鼠确定右侧STN坐标(同上),将刺激电极垂直缓慢插入脑内后牙托粉固定;术后每24 h刺激STN 20 min,强度2 V,波宽0.2 ms,频率130 Hz,间停10 min,共刺激2次,持续40 min。

1.4 行为学观察

各组大鼠于术后2周内各检测时间点大鼠颈部

*基金项目: 中国博士后科学基金(20070420399); 北京市科技新星计划(2008B43)

收稿日期: 2007-12-16; 修回日期: 2009-05-14

作者简介: 马羽(1977-), 辽宁本溪人, 博士后, 从事功能神经外科和神经电生理研究。 通讯作者

皮下注射阿扑吗啡(APO)0.5 mg/kg(0.5 g/L),诱发大鼠健侧旋转行为,旋转速度达到7 r/min视为成功PD模型。注射10 min后开始记录旋转频率,共记录30 min。

1.5 病理学观察

2周后处死大鼠,常规灌流固定石蜡包埋,连续冠状切片并编号,片厚6-8 μm,分别行Nissl染色、TUNEL及Bcl-2蛋白、Bax蛋白免疫组织化学检测,光镜下观察脑组织形态。采用CIAS1000彩色病理图文分析系统对切片进行图像分析,高倍镜下,每张切片于SNc区随机取3个视野,测量灰度值取平均值。

1.6 数据处理

所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)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 11.0软件包完成。

2 结果

2.1 行为学检测结果

术后的实验组大鼠的旋转频率随着时间的延长逐渐增加。模型组诱导的旋转行为出现最早,平均(6.4±0.8)d,毁损组、刺激组分别为(7.7±1.4)d、(0.1±2.5)d。1周时刺激组与模型组大鼠旋转速度之间无显著性差别(P>0.05);2周、4周时刺激

组大鼠明显慢于模型组(P<0.05),接近损毁组。(表1)

Tab.1 Comparison of rotation frequency in different experience groups(r/min, $\bar{x} \pm s$)

Group	Postoperative time	
	1 week	2 weeks
Model group	9.85 ±2.59	13.45 ±2.07
Stimulation group	7.83 ±1.47	10.50 ±0.58*
Lesion group	5.25 ±2.22*	9.78 ±2.28*

*P<0.05, vs model group

2.2 TUNEL及Bcl-2、Bax检测

2周时各组PD大鼠相较于正常大鼠SNc区,损毁侧SNc神经元数量减少,尼氏体模糊,颗粒密度降低(图1,见彩图页),图像灰度均降低,平均灰度值显著低于对照组(P<0.05)。损毁组患侧SNc平均灰度值高于模型组与刺激组(P<0.05)。刺激组虽然稍高于模型组,但两者的差别不明显(P>0.05,表2)。

PD模型各组患侧中脑SNc均检测出TUNEL阳性细胞(图2,见彩图页),刺激组、损毁组凋亡神经元阳性率显著低于模型组(P<0.05)。损毁组黑质的凋亡神经元阳性率少于模型组(P<0.05),但二者的Bcl-2、Bax的表达及Bcl-2/Bax比值,差别不显著(P>0.05)。

Tab.2 Percentage of Bcl-2-, Bax-, and TUNEL-positive cells in substantia nigra of rat midbrain(% , $\bar{x} \pm s$)

Group	Nissle values	TUNEL	BCL-2	BAX	Bcl-2/Bax
Control	168.16 ±11.59	4.21 ±0.49	32.14 ±1.12	25.14 ±1.03	1.33
Model	117.29 ±10.62	61.74 ±7.82	18.57 ±0.92#	49.15 ±6.18#	0.39
Stimulation	129.97 ±14.33*	39.98 ±12.11*	25.63 ±3.76	30.35 ±3.71*	0.84
Lesion	136.03 ±12.82*	44.88 ±11.45*	20.24 ±1.56#	44.38 ±1.25#	0.35

*P<0.05 vs model group; #P<0.05 vs control group

3 讨论

神经元仅能生长而不能分裂增殖,这一特性决定了保护残存神经元,挽救受损神经元有着重要意义。形态学研究表明PD患者脑内DA神经元死亡方式呈凋亡样改变^[3],而PD中脑黑质区残存DA能神经元凋亡的过度发生是其继发性损伤机制之一。有人认为细胞凋亡控制系统可能是调节黑质纹状体退行性变的关键。细胞凋亡是一种受基因调控的特殊类型的细胞死亡方式,通过合成某些新的蛋白质而实现的,其中包括抗凋亡蛋白(如Bcl-2及Bcl-XL等)和促凋亡蛋白(Bax、Bcl-XS及Bad等)。Bcl-2和

Bax分别是这两类蛋白的代表。其中Bax是促凋亡因子,而Bcl-2则是抗凋亡蛋白。Bcl-2及Bax的表达量及比值变化还能够调节细胞死亡与存活之间的平衡,决定着凋亡的发生,并同凋亡发展阶段密切相关^[5],测定Bcl-2/Bax的比值有助于判断能否发生凋亡。本实验中,损毁组与刺激组大鼠患侧SNc的凋亡神经元阳性率明显低于模型组,说明两种处理因素对SNc神经元都有一定的保护作用。虽然检测结果并没有显示出损毁STN与高频刺激STN对SNc神经元保护作用的差别,但刺激组的Bcl-2表达呈强阳性,Bcl-2/Bax比值较高,说明高频刺激能够诱导有保护作用的Bcl-2等因子的基因表达,因此,长期

的高频刺激可能比损毁具有更强的保护作用。

实验中,我们还观察到损毁组与刺激组的 PD 大鼠异常行为出现的时间均晚于模型组,且刺激 STN 后,其易激惹、尾僵直、行走缓慢等异常行为得到明显改善。Bergmen 等人^[6]证实损毁 STN 能明显减轻或完全扭转 MPTP 所致的猴 PD 样症状。损毁及高频刺激 STN 改善大鼠旋转行为的作用机理可能是,二者均降低了 STN 神经元的兴奋性,引起黑质-纹状体通路中 DA、兴奋性氨基酸及肽类递质的变化,最终使 PD 症状得到改善。而其保护 DA 能神经元作用的机制,很可能与阻断了神经递质 Gu 的兴奋毒作用有关。在许多神经退行性疾病如 Huntington 病和 Alzheimer 病的发病机制中,Gu 介导的兴奋毒作用可能是造成神经元死亡的“最后公路”^[7,8]。近年对 PD 有关兴奋性氨基酸(EAA)的研究证实,谷氨酸(Gu)的神经毒作用可选择性引起黑质 DA 能神经元损伤,STN 的病理性过度兴奋则可能通过 Gu 引起了 SNc 残存 DA 能神经元的继发性伤害。动物实验发现,Gu 受体拮抗剂的应用能够有效地保护黑质 DA 能神经元,缓解 PD 症状。损毁或高频刺激 STN 是否是通过降低 STN 兴奋性,减少至 SNc 区的 Gu 输出,阻断了 SNc 的 Gu 投射通路,引起 SNc 内神经递质的分布及代谢改变,降低兴奋性神经递质对 DA 神经元的损伤作用,有效地保护

DA 能神经元,有待进一步的研究和探讨。

4 参考文献

- [1] 黄觉斌. 帕金森病的危险因素及其预防[J]. 现代康复, 2000, 4(2): 163-165.
- [2] Nagatsu T, Sawada M. Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects [J]. *J Neural Transm Suppl*, 2007, (72): 113-120.
- [3] Reum P G, Meissner W, Marburger A, et al. High frequency stimulation of the subthalamic nucleus influences striatal dopaminergic metabolism in native rats [J]. *Neuro Report*, 2000, 11: 441-444.
- [4] Voges J, Koulousakis A, Sturm V. Deep brain stimulation for Parkinson's disease [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2007, 97 (Pt 2): 171-184.
- [5] Shinoura N, Satou R, Yoshida Y, et al. A denovirus-mediated transfer of bcl-X(L) protects neuronal cells from bax-induced apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 2000, 254(2): 221-231.
- [6] Bergman H, Wichmann T, DeLong M R. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus [J]. *Sci*, 1990, 249(): 1436-1438.
- [7] Savitz S I, Rosenbaum D M. Apoptosis in neurological diseases [J]. *Neurosurg*, 1998, 42: 555-572.
- [8] Martin L J. Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury [J]. *Int J Mol Med*, 2001, 7(5): 455-478.

THE NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF LESION AND HIGH FREQUENCY STIMULATION OF THE SUBTHALAMIC NUCLEUS ON THE SUBSTANTIA NIGRA NEURONS

MA Yu¹, GAO Dong-ming³, ZHANG JIAN-guo^{1,2}, LIU Huan-guang²

(1. Department of Functional Neurosurgery, Beijing Neurosurgical Institute, Capital Medical University, Beijing 100050;

2. Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050;

3. Physiological department, Liaoning Medical University, Liaoning 121001, China)

ABSTRACT

Aim: To investigate the neuroprotective effects of lesion and high frequency stimulation (HFS) of the subthalamic nucleus (STN) on the substantia nigra pars compacta (SNc) neurons and its probable mechanism. **Methods:** The PD models were induced by unilateral administration of 6-hydroxydopamine into right substantia nigra in rats. After the high-frequency stimulation to STN and injection of ibotenic acid to STN on PD rats, the changes of behavior were observed. The substantia nigra neurons were detected by using special-dyeing, TUNEL techniques and immunohistochemistry methods. **Results:** In the stimulation group, the apoptotic rate was significantly lower than PD model group and lesion group ($P < 0.05$). Compared with normal rats, model group and lesion one had the similar results of expression of Bcl-2, Bax and their ratio, which were lower expression of Bcl-2, higher expression of Bax and the decrease of their ratio ($P < 0.05$). In the stimulation group, the expression of Bcl-2 and Bcl-2/Bax were much higher than model group and lesion group. The number of apoptotic neurons of rats in lesion group was smaller than model ones ($P < 0.05$), but there was no significant difference in expression of Bcl-2, Bax and their ratio ($P > 0.05$). **Con-**

clusion: Lesion or HFS of STN have the neuroprotective effects on SNc neurons of PD rats, and HFS has a better long-term effect.

KEY WORDS: parkinson's disease; apoptosis; high frequency stimulation

膳食因素和运动对脑内葡萄糖转运蛋白 Gut1、Gut4 基因表达的影响*

魏守刚, 褚金花, 张淑华, 肖忠新

(首都医科大学营养与食品卫生学系, 北京 100069)

摘要 目的: 探讨运动和膳食因素对小鼠脑内葡萄糖转运蛋白 Gut1 和 Gut4 基因表达的影响。**方法:** ICR 小鼠分组施以高脂膳食、限量摄食、运动、高脂膳食 + 运动等不同实验干预 60d, RT-PCR 法测定大脑 Gut1、Gut4 mRNA 水平。**结果:** 与正常对照组比较, 运动组和限食组小鼠脑组织 Gut1 和 Gut4 基因表达显著增高, 高脂膳食组小鼠 Gut4 基因表达显著降低而 Gut1 表达水平无显著改变。**结论:** 限食和运动增强脑内胰岛素反应型 Gut4 和非胰岛素反应型 Gut1 基因的表达, 高脂膳食降低脑内胰岛素反应型 Gut4 基因的表达。

关键词: 运动; 高脂膳食; 限食; 葡萄糖转运蛋白; 脑

KEY WORDS: exercise; high-fat diet; food restriction; glucose transporter; brain

中图分类号: R151.2; Q591

文献标识码: A

文章编号: 1000-6834(2009)03-390-03

脑组织必须依赖于不断从血液中获得葡萄糖方能维持正常的代谢活动和功能, 细胞对葡萄糖的摄取是通过葡萄糖转运蛋白 (glucose transporter, Gut) 介导的。Gut1 是脑中主要的葡萄糖运载体, Gut4 在脑内的分布量相对较低, 但对胰岛素刺激反应较敏感, 因此二者均是脑内重要的 Gut。运动和膳食因素在调节脑糖代谢方面具有明显作用, 本研究拟观察有氧运动、限量进食、高脂膳食等生活方式因素对小鼠脑内 Gut1 和 Gut4 基因表达的影响, 旨在为科学保护脑健康防止脑功能衰退提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及处置

3 月龄健康雄性 ICR 小鼠, 按体重随机分为 5 组, 即运动、限食、高脂膳食、高脂膳食 + 运动和对照组, 每组 6 只, 饲养于 SPF 级动物房内, 实验期 60 d。其中, 运动采用耐力游泳训练法, 水深 80 cm, 水温 (28 ± 2)。每天游泳 1 次, 每周游泳 6 d 休息 1 d, 运动量为第一周每天游泳 10 min, 第二周 15 min, 第三周 30 min, 从第四周开始维持在每天游泳 45 min 直至实验结束。限食组小鼠连续称量记录 5 d 摄食量后, 按平均每日每只正常摄食量的 70% 投喂鼠料 (强化以蛋白粉和微量营养素, 强化量为正常含量的 30%)。高脂膳食小鼠饲以清洁级高脂饲料, 饲料配方为基础鼠料 79%, 猪油 10%, 蛋黄粉 10%, 胆固醇 1% (饲料均由军事医学科学院实验动物部加工)。

干预结束后, 断头处死小鼠, 迅速取脑组织, 分离皮层和海马, 置液氮中保存待测。

1.2 RT-PCR 检测 Gut1 和 Gut4 基因表达

样品称重, Trizol 法提取总 RNA, 取总 RNA 2ug 为模板,

用 MMLV cDNA 合成试剂盒进行逆转录反应合成 cDNA。PCR 反应体系 20ul, 反应条件为: 94 预变性 3 min, 94 变性 45 s, 60 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 30 或 35 个循环, 72 终延伸 5 min。其中, Gut1 的上游引物为 5'-CCG CTT CCT GCT CAT CAA TCG TAA-3', 下游引物 5'-CTG ACA GCT CGG CCA CAA TGA AC-3'; Gut4 上游引物 5'-CCC ACA GAA GGT GAT TGA ACA G-3', 下游引物 5'-GAT GGC CAG TTG GIT GAG TG-3'。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后进行凝胶图像分析, 用目的基因与内参基因 PCR 条带灰度值的比值反映目的基因在各组表达水平的高低。

1.3 统计学处理

实验所得各组数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 利用 SPSS 13.0 软件, 首先进行方差齐性检验, 再行单因素方差分析和 LSD 检验。

2 结果

Gut1 和 Gut4 mRNA 测定结果见图 1。

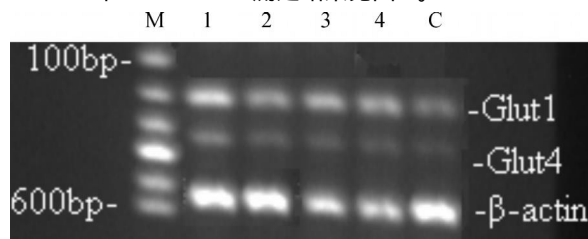


Fig. 1 Gut1 and Gut4 mRNA levels in mice brain examined by RT-PCR

M: Marker; 1: Food restriction; 2: Exercise; 3: Highfat + exercise; 4: Highfat; C: Control group

损毁或高频刺激丘脑底核对黑质神经元的保护作用

(正文见第 388 页)

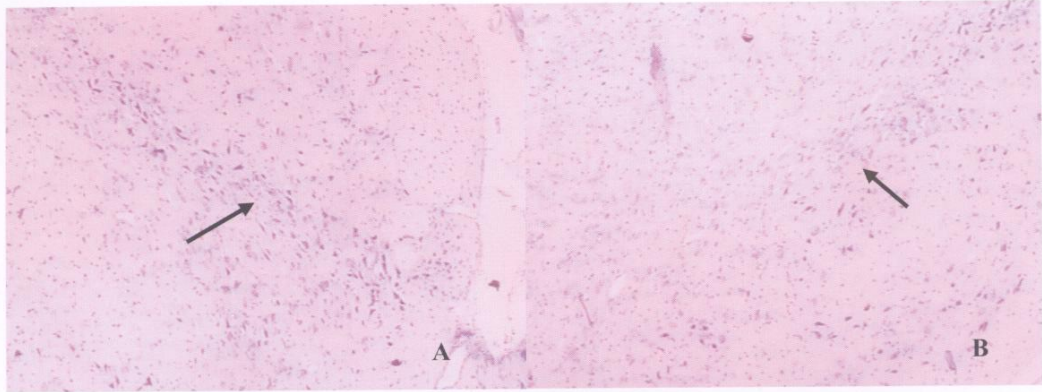


Fig. 1 Neuronal survival in substantia nigra of rat midbrain (Nissl stain, $\times 400$)

- A: In the control group, the arrow indicates clusters of neurons distributed in the substantia nigra, consisting of large- and medium-sized pyramidal cells
- B: In the model group, the arrow indicates decreased number of sparsely distributed neurons in the substantia nigra

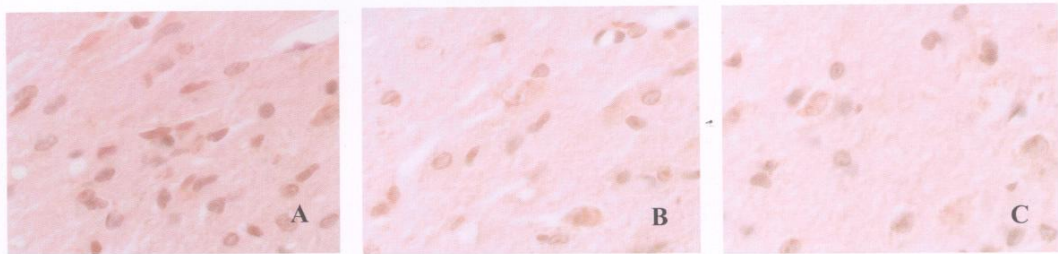


Fig.2 Apoptotic neurons in the substantia nigra (TUNEL, $\times 400$), TUNEL-positive neurons stained yellow

- A: Model group; B: Lesion group; C: Stimulation group

运动性疲劳对大鼠乳头体nNOS表达的影响

(正文见第 382 页)

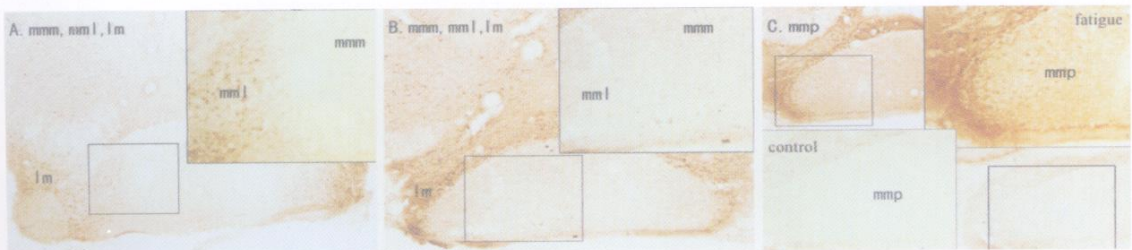


Fig.1 Immunohistochemistry shows the nNOS immunoreactive neurons in mammillary body (10×5 and 10×20)

- A: Fatigue group; B: Control group