

· 基础研究 ·

蛋白酶体抑制剂诱导大鼠帕金森病模型的建立

汪 纯¹, 马石楠², 杨 棋², 王 洋², 戢翰升¹

(1. 湖北医药学院附属十堰市人民医院神经外科 442000; 2. 湖北医药学院附属太和医院神经外科, 湖北十堰 442000)

摘 要:目的 探讨用蛋白酶体抑制剂乳胞素(lactacystin)建立帕金森病(PD)大鼠模型的方法,并对模型进行综合评价。方法 应用立体定向单针道双靶点方法在大鼠黑质致密部注射乳胞素,观察大鼠行为变化、黑质细胞形态及黑质致密部酪氨酸羟化酶的变化。结果 注射乳胞素 1 周后,大鼠出现活动迟缓、震颤、少动、头向健侧倾斜、竖毛等行为改变,阿扑吗啡诱导后出现向左旋转;给药后 4 周,每组大鼠运动活跃性均低于生理盐水组。病理学检查发现进针部位均有小胶质细胞增生、多巴胺能神经细胞体肿胀或萎缩;8 μg 组变化较明显,部分黑质细胞内出现嗜伊红包涵体;2、4、8 μg 组的酪氨酸羟化酶(TH)免疫阳性细胞数与生理盐水组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),随着注射剂量的提高 TH 免疫阳性细胞数逐渐减少。结论 采用单针道双靶点注射 Lactacystin 能成功建立临床症状和病理特征均符合 PD 要求的大鼠模型。

关键词: 帕金森病;大鼠;蛋白酶体抑制剂

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.29.014

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)29-2949-03

Establish of Parkinson's disease model induced by lactacystin in rats

Wang Chun¹, Ma Shinan², Yang Qi², Wang Yang², Ji Hansheng¹

(Department of Neurosurgery, the Affiliated People's Hospital, Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To establish one model of Parkinson's disease(PD)for rats, and to comprehensively evaluate the model. Methods The rat PD model was established by the unilateral single-path and two-targets injection of lactacystin into the NSr through stereotaxic technique. And then, the behaviors features, the tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in substantia nigra were observed. Results After lactacystin injection for 1 week, the behavior of rats was changed, including progressively bradykinetic, contralateral head tilting and tremor, and apomorphine-induced contralateral behavior was observed. After 4 weeks, sports activity of rats in each group were reduced compared with the saline group. Pathological examination revealed microglia proliferation and dopaminergic neurons swelling or shrinking in the needle parts; The change in 8 μg group was more apparent, and some of nigral cells in it contained Lewy body. The number of tyrosine hydroxylase positive cells in 2 μg , 4 μg and 8 μg groups were significantly decreased($P < 0.01$) compared with the control group. And as the dose increased the number of TH immunoreactive cells gradually decreased. Conclusion The rat PD model established by the unilateral single-path and two-targets injection of lactacystin into the NSr through stereotaxic technique is similar to the clinical PD both in symptoms and pathological changes.

Key words: Parkinson disease; rats; lactacystin

帕金森病(Parkinson's disease PD),是一种常见于中老年人的第二大中枢神经系统退行性疾病,发病率在 65 岁以上老年人群中接近 2%,其发病率随年龄增长而升高,我国每年新增的 PD 患者近 10 万人^[1]。帕金森病模型的建立是探讨其发病机制、治疗手段的前提条件。本研究将乳胞素通过单针道双靶点法注射入大鼠黑质致密部制备 PD 大鼠模型,观察其行为学和组织学变化,证实了该模型的科学性和可靠性,以期 PD 的研究提供了一种简便有效的模型制作方法。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂 健康清洁级雄性 SD 大鼠,体质量 275~325 g,购于湖北医药学院实验动物中心。脑立体定向仪(江湾-II 型)上海第二军医大学产品,蛋白酶体抑制剂乳胞素(lactacystin)(L6785)购自 Sigma 公司, S-P 超敏试剂盒(KIT-9710)、DAB(DAB-0031)购自 MaixinBio 公司。

1.2 PD 大鼠模型制作 将 80 只大鼠按给药剂量不同随机分为 4 组,其中 2 μg 组 24 只,4 μg 组 24 只,8 μg 组 24 只和生理盐水对照组 8 只,经反复行为检测确认其无旋转行为后进行实验。按照 2.5 mL/kg 体质量腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,固定到脑立体定向仪上,颅顶去皮,铺巾,消毒,沿 SD 大鼠矢状线切开头皮及筋膜,暴露前后囟;立体定向仪进行准确定位并标记,牙科钻钻孔,据包新民和舒斯云^[2]报道的方法确定右侧黑质致密部坐标,前囟后 5 mm,矢状缝右 2.4 mm,颅骨下 8 mm 和 7.5 mm 单针道双靶点按上述分组剂量注射 Lactacys-

tin,注射时间控制在 10 min,以便于药物的吸收与利用,生理盐水组注射等体积的生理盐水。注毕留针 5 min,以 1 mm/min 的速度缓慢退针,链霉素喷淋、消毒处理后缝合伤口,术后肌肉注射青霉素(20 WU/只),连续注射 2 周。

1.3 观察大鼠行为学变化及阿扑吗啡诱导旋转实验 在黑质致密部注射 lactacystin 后第 2、4、6 周,观察自主行为变化。随后皮下注射多巴胺受体激动剂盐酸阿扑吗啡(0.5 mg/kg),诱导动物旋转行为,记录 30 min 内动物旋转次数。

1.4 旷场实验(open-field test)^[3-4] 术后第 2、4、6 周分别行旷场实验检测。旷场实验箱:黑色敞口木箱一只(规格为 50 cm×50 cm×30 cm,箱底划为 25 个方格 38 cm×10 cm),将 SD 大鼠放入正中一格,20 s 后开始记录 15 min 内的各项行为指标。反映运动活跃性的指标有:(1)大鼠躯干处于水平位置时向前、后或左右两侧运动的时间为总跑动时间;(2)规定时间内跑动的格子数(两爪以上跨入邻格为跑动 1 格)为穿笼距离;(3)大鼠不表现任何活动的时间即无头或肢体运动及理毛行为的时间为总停息时间;(4)下肢站立时左侧或右侧前肢倚靠箱壁的次数;(5)双前肢抬起离地 1 cm 以上的次数为下肢站立次数;(6)嗅觉实验,大鼠靠近箱壁进行探究活动鼻子距离箱壁 5 cm 以内的次数;(7)大鼠自发向左侧或右侧行 1/4 弧度的环形活动次数为反映不对称运动行为的指标。实验在 16:00~21:00 进行,实验室内暗光、安静,两次实验之间将箱底彻底打扫干净。

表 1 试验组与生理盐水组大鼠活动活跃性记录(±s)

实验组别	穿梭距离(格数)		总跑动时间(s)		总停息时间(s)		下肢站立次数(t)	
	4 周	6 周	4 周	6 周	4 周	6 周	4 周	6 周
生理盐水组	220.25±8.34	217.40±6.42	323.37±6.63	317.43±5.31	11.27±1.96	12.53±2.15	29.55±1.85	28.34±1.47
2 μg 组	196.97±7.65*	172.53±5.39*▲	298.65±5.57*	273.93±4.17*▲	28.24±7.74*	41.24±5.09*▲	27.52±1.90	20.31±2.43*▲
4 μg 组	163.63±7.28*	141.39±6.41*▲	257.41±6.47*	235.81±5.29*▲	90.62±5.42*	110.35±6.37*▲	15.10±1.59*	13.84±2.33*
8 μg 组	122.95±3.51*	102.63±3.51*▲	181.93±5.62*	158.37±7.34*▲	106.54±7.32*	128.65±9.38*▲	10.32±1.27*	9.81±1.32*

*: $P<0.05$, 与相同时间生理盐水组比较; ▲: $P<0.05$, 与第 4 周同剂量组比较。

1.5 大鼠黑质病理学检测 用药后第 2、4、6 周每组随机取大鼠各两只,10%水合氯醛麻醉后用 4%多聚甲醛灌注固定后,取中脑组织(含黑质),置于 4℃固定液中继续固定。1 周后取材,常规脱水、石蜡包埋,切片,行黑质的 HE 染色及酪氨酸羟化酶(TH)免疫组化染色(S-P 法),光镜观察。

1.6 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件包进行数据分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,各组间进行 Duncans 多重比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物的行为表现 2、4、8 μg 组均在给药后 1 周开始出现活动迟缓、静止性震颤、嗅探、抓握、少动、头向健侧倾斜、觅食差、弓背、身体俯曲、竖毛等行为改变。APO 诱导后给药组 72 只大鼠,14 只不旋转,12 只右转,46 只左转。2、4、6 周恒定左转的小鼠平均转速均大于 7 r/min,且 3 个不同时期平均转速之间差异无统计学意义($P>0.05$),为成功的 PD 模型。

2.2 旷场实验 在术后第 4 周,各剂量组在穿梭距离、总跑动时间、总停息时间及旷场实验中反映运动活跃性的指标均低于生理盐水组,且第 6 周与之比较差异有统计学意义($P<0.05$)。下肢站立次数第 4 周 2 μg 组与生理盐水组比较差异无统计学意义($P>0.05$),其他各剂量组与生理盐水组比较差异有统计学意义($P<0.05$),第 6 周各组与生理盐水组比较差异有统计学意义($P<0.05$),4、8 μg 组与第 4 周比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.3 HE 染色和 TH 免疫组化结果 HE 染色显示,3 种给药剂量进针部位均有小胶质细胞增生,可见多巴胺能神经元胞体肿胀或萎缩,8 μg 组损伤较明显,可见神经元包膜不完整,结构不清,胞浆内见嗜伊红包涵体,见封 3 图 1。TH 免疫组化示:在注射 lactacystin 2 周后,2、4、8 μg 组与生理盐水组对比,TH 免疫阳性细胞元的数量差异均有统计学意义($P<0.01$),随着注射剂量的提高,TH 免疫阳性细胞的数量逐渐减少,见封 3 图 2、3,表 2。

表 2 注射 lactacystin 后 TH 免疫阳性细胞元的数量(±s,个)

时间	2 μg 组	4 μg 组	8 μg 组	生理盐水组
第 2 周	45.96±3.22*	34.01±2.36*#	22.49±1.10*△	66.46±2.75
第 4 周	38.99±1.73*	28.86±2.27*#	18.75±1.85*△	66.19±2.24
第 6 周	37.12±2.20*▲	27.19±1.77*▲#	17.17±2.16*▲△	66.55±1.32

*: $P<0.01$, 与生理盐水组比较; ▲: $P>0.05$, 与第 4 周同剂量组比较; #: $P<0.05$, 与 2 μg 组比较; △: $P<0.05$, 与 4 μg 组比较。

3 讨 论

引起 PD 发病的遗传和获得性因素十分复杂,目前尚没有一种动物模型能模拟帕金森发病的过程及病理特征。PD 是一种神经退行性疾病,其病理特征是中脑黑质多巴胺能神经元选择性、进行性变性和缺失,残存神经元呈 α-突触核蛋白和泛素染色阳性的胞浆内出现 Lewy 体,而 α-突触核蛋白主要由清理毒性蛋白的泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system, UPS)降解^[5]。Lactaccystin 是一种不可逆的哺乳动物的蛋白酶体抑制剂,难以通过细胞膜,但在细胞培养介质中能转变为

clasto-lactacystin-β-lactone 进入细胞内,通过组织细胞内 20S 蛋白酶体与蛋白起接触反应的 α 亚单位,抑制 20S/26S 蛋白酶体功能,使 UPS 功能异常,导致 α-突触核蛋白单体及寡聚体降解受阻在细胞内堆积,引起氧化应激水平的升高,氧化产物增加,损害线粒体功能,诱发内质网应激,激活小胶质细胞,这些因素将导致多巴胺能神经元损伤,最终导致 PD 的发生^[6-8]。该实验用蛋白酶体抑制剂 Laetacystin 立体定向注入大鼠单侧黑质致密部,能够阻碍 α-突触核蛋白的降解,由此建立有 Lewy 体的 PD 大鼠模型。传统的 PD 模型只能复制出选择性多巴胺神经元损伤,Lewy 体形成少,不能完全反映帕金森病的病理特点。

PD 大鼠模型的制作方法有多种,主要由单点和多点注射给药,注射部位包括中脑黑质、纹状体、内侧前脑束(MFB)以及中脑黑质被盖区等^[9-10]。Lee 等^[11]采用黑质致密区四点注射法成功制造 PD 模型,多点注射可以提高模型的成功率,但造成的机械损伤不可避免,死亡率高,操作难度大,同时也不符合 PD 的病理改变和不利于后续实验。单点注射法亦见报道,如 Ahmad 等^[12]采用纹状体单点注射法,Gold 等^[13]采用前脑内侧束单点注射法,均可建立 PD 模型。本科室根据脑立体定向图谱精确定位后,采用单针道双靶点法将 lactacystin 注入黑质建立 PD 大鼠模型,与传统的单针道单靶点相比减少了用药的剂量、扩大了药物的浸润范围,克服了因定位不准或操作技术不稳定导致实验失败的困难,提高了制备模型的成功率;与传统的双针道多靶点相比,降低了对动物模型的损伤程度,简化了过程,使大鼠模型的存活率和成功率均得到提高。

PD 理想模型的标准是有能测量的行为学异常或缺陷,同时伴有解剖和生化的改变^[14]。旋转行为的出现及频率是鉴定模型成功和损毁程度的一个重要标志,一般公认的标准是 30 min 内旋转圈数大于或等于 210 圈,并且连续 4 次以上为合格 PD 模型^[15]。本实验组中 72 只大鼠中,经 APO 诱导后 46 只恒定向左转且转速大于 7 r/min,占 64%,术后 6 周的动物旋转行为同术后 4 周无显著改变($P>0.05$),免疫组化亦发现术后 6 周的 TH 反应阳性神经元数目同术后 4 周相比差异无统计学意义($P>0.05$),说明本研究建立的 PD 大鼠模型的稳定性。在组织学评价上,TH 免疫阳性细胞计数是重要的评价指标,该实验大鼠黑质部位神经元变性,数量减少,小胶质细胞增生,高剂量病理变化更加明显,发生神经元细胞膜不完整,结构不清晰,胞浆内出现嗜伊红包涵体。免疫组化显示,各实验组 TH 阳性细胞数均发生明显减少,并呈现剂量和时间的依赖性,体现了 PD 的缓慢性和渐进性的特点,说明其组织学与行为学改变的一致性,也说明该模型更符合 PD 患者的临床过程。

综上所述,本实验通过立体定向采用单针道双注法将蛋白酶体抑制剂注入大鼠黑质部成功构建了在行为学、形态学等方面接近于人类特点的 PD 模型,为帕金森病的预防、发病机制及治疗等研究提供了良好的实验基础。

参考文献:

[1] 刘朝东,胡钢,张杰. 帕金森病排尿症状及其相关因素分

- 析[J]. 重庆医学,2010,39(6):651-655.
- [2] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定向图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:48.
 - [3] Fornaguera J, Schwarting RK. Early behavioral changes after striatal system damage can serve as predictors of striatal dopamine depletion[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,1999,23(8):1353-1368.
 - [4] Reglodi D, Lubics A, Tamas A, et al. Pituitary adenylate cyclase activating poly-peptide protects dopaminergic neurons and improves behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease[J]. Behav Brain Res,2004,151(1/2):303-312.
 - [5] Mcnaught KS, Olanow CW. Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease [J]. Neurobiol Aging,2006,27(4):530-545.
 - [6] Jung TW, Lee JY, Shim WS, et al. Rosiglitazone protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP+ induced cytotoxicity via inhibition of mitochondrial dysfunction and ROS production[J]. J Neurol Sci,2007,253(1/2):53-60.
 - [7] Rao RV, Bredesen DE. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration [J]. Curr Opin Cell Biol,2004,16(6):653-662.
 - [8] 史树贵,李露斯. 细胞凋亡与神经系统变性疾病[J]. 重庆医学,2003,33(7):928-930.
 - [9] Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, et al. Comparison of bilaterally 6-OHDA-and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease; histological, neurochemical, motor and memory alterations[J]. J Neurosci Methods,2005,148(1):78-87.
 - [10] Hsieh PF, Chia LG, Ni DR, et al. Behavior, neurochemistry and histology after intranigral lipopolysaccharide injection[J]. Neuroreport,2002,13(3):277-280.
 - [11] Lee JH, Zhu WM, Stanic D, et al. Sprouting of dopamine terminals and altered dopamine release and uptake in Parkinsonian dyskinesia[J]. Brain,2008,131(6):1574-1587.
 - [12] Ahmad M, Saleem S, Ahmad AS, et al. Neuroprotective effects of Withania somnifera on 6-hydroxydopamine induced Parkinsonism in rats[J]. Hum Exp Toxicol,2005,24(3):137-147.
 - [13] Gold SJ, Hoang CV, Potts BW, et al. RGS9-2 Negatively Modulates L-3, 4-Dihydroxyphenylalanine-Induced Dyskinesia in Experimental Parkinson's Disease[J]. Neuroscience,2007,27(52):14338-14348.
 - [14] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models[J]. Neuro Rx,2003,39(6):889-909.
 - [15] Iancu R, Mohapel P, Brundin P, et al. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice[J]. Behav Brain Res,2005,162(1):1-10.

(收稿日期:2011-04-09 修回日期:2011-05-04)

(上接第 2948 页)

继续维持肿瘤细胞的生长与增殖,采用腺病毒负载的 hTERT 调控相关 miR-138 是否能有效抑制 hTERT 阳性的肿瘤细胞增殖与转移,这些问题有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 陈陵,杨仕明,蔡永国,等. 针对端粒酶蛋白催化亚单位的肿瘤免疫治疗研究[J]. 世界华人消化杂志,2005,13(4):528-533.
- [2] 孔燕,梁志清. miRNA 与肿瘤及子宫颈癌的研究进展[J]. 重庆医学,2008,37(16):1838-1839.
- [3] 熊晓峰,陈陵,范亚川,等. 负载 hTERT 调控相关 miR-138 复制缺陷型腺病毒的包装及鉴定[J]. 重庆医学,2011,40(9):177-180.
- [4] 陈陵,向国春,李向红,等. 负载 hTERT 复制缺陷型腺病毒的包装及鉴定[J]. 第四军医大学学报,2006,27(1):53-56.
- [5] Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification [J]. Blood,2009,113(21):5237-5245.
- [6] 陈陵,陈婷,蔡永国,等. 胃黏膜癌变过程中 hTERT 和相关基因表达的变化及其临床意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2006,15(5):443-447.
- [7] Philippi C, Loretz B, Schaefer UF, et al. Telomerase as an emerging target to fight cancer-opportunities and challenges for nanomedicine[J]. J Control Release,2010,146(2):228-240.
- [8] Chen L, Liang GP, Tang XD, et al. In vitro anti-tumor immune response induced by dendritic cells transfected with hTERT recombinant adenovirus[J]. Biochem Biophys Res Commun,2006,351(4):927-934.
- [9] Chen L, Tang XD, Yu ST, et al. Induction of anti-tumour immunity by dendritic cells transduced with hTERT recombinant adenovirus in mice[J]. J Pathol,2009,217(5):685-692.
- [10] 陈陵,余松涛,梁光萍,等. 端粒酶 hTERT 促进肿瘤细胞侵袭与转移及其机制研究[J]. 实用临床医药杂志,2010,14(5):13-20.
- [11] Wicha MS. Stemming a tumor with a little miR[J]. Nat Med,2011,17(2):162-164.
- [12] 陈陵,陈先华,李学成,等. miR-29 在胃癌患者血清中的表达及对预后的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志,2011,3(2):17-20.
- [13] Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21 [J]. Cancer Cell,2010,18(3):282-293.
- [14] Swarbrick A, Woods SL, Shaw A, et al. miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN-amplified neuroblastoma [J]. Nat Med,2010,16(10):1134-1140.
- [15] Li G, Kawashima H, Ogose A, et al. Efficient virotherapy for osteosarcoma by telomerase-specific oncolytic adenovirus[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2011,137(6):1037-1051.

(收稿日期:2011-04-09 修回日期:2011-05-16)