

## 美多巴对帕金森病大鼠模型脑多巴胺转运体影响的自显影

陈玲<sup>1</sup>, 黎锦如<sup>1</sup>, 刘长征<sup>2</sup>, 叶俊鹏<sup>3</sup>, 吴克宁<sup>4</sup>, 刘焯霖<sup>1</sup>  
(中山大学 1. 附属第一医院神经科; 2. 中山医学院 实验核医学教研室;  
3. 附属第一医院 药学部; 4. 附属第一医院核医学科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】研究美多巴对帕金森病大鼠模型脑多巴胺转运体的影响。【方法】立体定位右侧纹状体注射6-羟多巴胺制备偏侧帕金森病大鼠模型, 模型成功后给予美多巴灌胃治疗5周。分4组(正常组、帕金森病模型大鼠组、帕金森病模型大鼠经美多巴治疗组、帕金森病模型大鼠未治疗组)行脑多巴胺转运体<sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1放射自显影, 每组4只。图像分析得到左、右侧纹状体及小脑的光密度值, 计算左、右侧脑多巴胺转运体的特异性放射性摄取比值(纹状体/小脑-1), 比较各时间点(正常、术后4周、术后9周)多巴胺转运体比值的变化。【结果】正常大鼠脑多巴胺转运体对<sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1的特异性摄取比值左、右两侧无显著性差异; 术后4周大鼠成为帕金森病模型后, 大鼠两侧脑多巴胺转运体的比值较正常均降低, 右侧(损毁侧)降低明显。术后9周末治疗组帕金森病模型大鼠双侧脑多巴胺转运体的比值均较4周刚成为模型时明显升高; 经美多巴治疗后, 双侧的比值均较未服药组明显降低, 右侧(损毁侧)降低幅度更大。【结论】长期美多巴治疗可能会使帕金森病模型大鼠脑多巴胺转运体的数量减少。

关键词: 多巴胺转运体; 帕金森病; 美多巴; TRODAT-1; 放射自显影

中图分类号: R742.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)06-0564-04

## Radioautographic Study on the Effect of Madopar on Dopamine Transporter in Parkinsonian Rat Models

CHEN Ling<sup>1</sup>, LI Jin-ru<sup>1</sup>, LIU Chang-zheng<sup>2</sup>, YE Jun-peng<sup>3</sup>, WU Ke-ning<sup>4</sup>, LIU Zhuo-lin<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, 2. Department of Experimental Nuclear Medicine, Zhongshan Medical College, 3. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital, 4. Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou, 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To investigate the effect of Madopar on dopamine transporter in Hemiparkinsonian rat models.【Methods】Hemiparkinsonian rat models were induced by injection of 6-OH-DA into right striatum. Four weeks after the procedure, they were fed with anti-Parkinsonian therapy for 5 weeks. There are four groups in this study, including normal group, Parkinsonian rat model group, Parkinsonian rat model group taking madopar and Parkinsonian rat model group without madopar, four rats in each group. The dopamine transporters of four hemiparkinsonian rats were imaged by radioautography with <sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1. Optical density of striatum and cerebellum was measured through image analysis. At last the average ratios of specific radioactivity uptake of bilateral dopamine transporters (Striatum/Cerebellum-1) were evaluated and compared among three time-points (normal, 4 and 9 weeks after operation).【Results】The specific radioactivity uptake

收稿日期 2003-07-07

基金项目 广东省自然科学基金资助项目(21868)

作者简介 陈玲(1968-), 女, 广东梅县人, 博士, 主治医师. E-mail: chenling68@tom.com

ratios of dopamine transporter had no difference between bilateral striatum in normal rats. Four weeks after operation, the ratios of dopamine transporter decreased in bilateral striatum, more in right (lesioned) side. Nine weeks after operation, ratios were significantly increased in bilateral striatum in Non-administration group and reduced in madopar group, more in right(lesioned) side too.

【Conclusion】Long-term administration of madopar may interfere the number of dopamine transporter.

**Key words:** dopamine transporter; Parkinson disease; madopar; TRODAT-1; radioautography

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003, 24(6): 564 ~ 567 572]

目前对帕金森病的诊断主要依据临床表现及症状对复方多巴类抗帕金森药物的反应。帕金森病临床症状出现时, 头颅 CT 及 MR 在黑质及纹状体等病变部位并无特殊发现, 肌电图检查也不特异。近年来脑多巴胺转运体 (dopamine transporter, DAT) 核素显像及放射自显影成为早期诊断帕金森病的敏感方法<sup>[1,2]</sup>。脑 DAT 是位于黑质—纹状体多巴胺能神经元末梢突触前膜的一种膜蛋白, 较集中地分布在纹状体部位。它的主要功能是将突触间隙多余的多巴胺再摄取回多巴胺能神经元内, 中止多巴胺对突触后膜多巴胺受体的刺激。它的多少间接反映了黑质—纹状体通路多巴胺能神经元的数量及功能<sup>[3]</sup>, 故脑 DAT 被认为是多巴胺能神经元的标志物。美多巴对突触后膜多巴胺受体影响的报道已较多, 但它对突触前膜多巴胺能神经元的标志物 DAT 的影响国内尚未见报道。我们在 2001~2002 年间用帕金森病大鼠模型对此进行了一些初步的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 帕金森病大鼠模型的制备

腹腔注射 100 g/L 水合氯醛 (3~4 mL/kg) 麻醉大鼠 (健康雄性 SD 大鼠, 体质量 210~240 g, 广东省医学实验动物中心或本校实验动物中心), 平稳入睡后将大鼠按包新民<sup>[4]</sup>方法固定在大鼠脑立体定位仪 (江湾 I 型, 上海) 上。剪去头顶鼠毛, 局部消毒, 在正中从前向后切开大鼠头顶皮肤, 切口长约 2.5 cm; 分离颅骨表面软组织, 暴露右侧顶骨。以前囟为坐标原点, 前囟右旁开 3 mm, 脑面下 4 mm 为右侧纹状体定位。用解剖针钻开颅骨后, 用微量注射器注入 30 μg/5 μL 的 6-羟多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA, 美国 Sigma 公司) 与 2 g/L 抗坏血酸 (淄博化学试剂厂) 生理盐水的混合液。每推注 1 μL 停留 1 min, 全部推注完后留针 10

min; 出针时每退 1 mm 停留 1 min, 全部退出后局部消毒缝合。

### 1.2 成功帕金森病大鼠模型的判定

术后 3 周、4 周腹腔注射阿朴吗啡 (美国 Sigma 公司) 0.5 mg/kg, 开始出现右向左旋转后观察 30 min, 数出大鼠 30 min 内旋转的总数, 计算每分平均转数, 两次或其中一次 (术后 4 周) 大于或等于 6 r/min 的即为成功帕金森病大鼠模型。模型成功率约 50%, 成功帕金森病大鼠约 30 余只。

### 1.3 帕金森病大鼠模型的治疗

术后第 5 周开始抗帕金森治疗。将转速相近的帕金森病大鼠随机放在美多巴 (madopar, 上海罗氏公司) 组及未服药组, 服药组按美多巴 20 mg/(kg·d), 磨成精细粉末后溶于 50 g/L 葡萄糖水中制成混悬液, 每次灌胃量约 0.01 mL/kg, 每日灌胃一次, 续喂 5 周; 未服药组不作任何特殊处理。在治疗过程中大鼠因自然死亡或服药致纳差衰竭死亡约 20%~30%。

### 1.4 <sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1 的制备

将新鲜配制的氯化亚锡 (广州化学公司) 溶液 200 mg/L 及 1 850~3 700 MBq/(0.5~1.0 mL) <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 新鲜淋洗液 (中国原子能科学研究院广州医用同位素服务中心) 先后加入 TRODAT-1 药盒 (江苏无锡核医学国家重点实验室江苏省原子医学研究所), 100 °C 加热 30 min, 冷却至室温即可。用方平等<sup>[5]</sup>介绍的方法进行放射化学纯度测定, 在 80% 左右。

### 1.5 大鼠脑 DAT <sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1 放射自显影

分四组 (正常组、帕金森病模型大鼠组、帕金森病模型大鼠经美多巴治疗组、帕金森病模型大鼠未治疗组) 分别行鼠脑 DAT <sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1 放射自显影, 每组 4 只。将 814 MBq (22 mCi, 0.6 mL)<sup>[6]</sup> <sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1 注入大鼠鼠尾静脉, 1 h 后处死, 立即断头迅速取出全脑在 -20 °C 丙酮溶液中浸泡 20 min, 继而用吸水纸吸干颅底的丙酮, 然后用冰

冻切片包埋剂包埋并置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温冰冻切片仪 (美国 Reichert Histo 公司) 内冰冻 15 min, 最后在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰冻切片仪中切成水平切片, 片厚  $20\text{ }\mu\text{m}$ 。从上向下切, 出现纹状体的结构后开始收集完整的大鼠脑切片, 每 3 个脑切片置于一张载玻片上, 待纹状体的结构消失后停止切片, 每个大鼠脑约有 10~12 张载玻片。晾干所有载玻片并将其移入暗盒, 在暗室条件下用接触法将一张氚片 (美国柯达公司) 贴紧一只大鼠脑的全部切片标本, 置于含干燥剂的暗盒中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下曝光 24 h。曝光结束后显影 1~3 min, 定影 15 min, 用流动的自来水冲洗氚片上的显影液和定影液 (广州科艺化工厂) 30 min, 晾干后待计算机图像分析系统进行图像分析。

### 1.6 大鼠脑氚片图像分析

每 3 个连续的大鼠脑切片中选一个, 每只大鼠选 10~12 个有纹状体的清晰的切片进行图像分析。将氚片置于彩色图像摄录输入仪 (JVC ky-F30B 3-CCD, 日本), 调好灯光后将图像输入到全自动图像分析系统 (KONTRON IBAS 2.0, 德国), 手动勾画出左右侧纹状体及小脑的轮廓, 图像分析系统自动给出每个脑切片 3 个区域的平均光密度值。10~12 个脑切片 3 个区域的平均光密度值再取平均, 即得到每个大鼠左右侧纹状体的光密度值 ( $n_{\text{ST.L}}$ 、 $n_{\text{ST.R}}$ ) 及小脑的光密度值 ( $n_{\text{CB}}$ ),

计算左、右侧 DAT 对  $^{99\text{m}}\text{Tc-TRODAT-1}$  的特异性摄取比值 ( $r_{\text{L}} = n_{\text{ST.L}}/n_{\text{CB}} - 1$ ,  $r_{\text{R}} = n_{\text{ST.R}}/n_{\text{CB}} - 1$ )。正常大鼠双侧 DAT 的特异性放射性摄取比值为  $r_{\text{L}}$  与  $r_{\text{R}}$  的均值, 以  $r_{\text{L}}$ 、 $r_{\text{R}}$  分别表示左、右两侧脑 DAT 的数量。

### 1.7 统计方法

用 Excel 整理数据, 左、右比较用配对  $t$  检验, 两组比较用成组  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 正常大鼠脑 DAT 特异性放射性摄取比值

$r_{\text{L}} = 0.13 \pm 0.03$ ,  $r_{\text{R}} = 0.11 \pm 0.04$ ;  $r_{\text{L}}$  与  $r_{\text{R}}$  无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 1.1, 图的右侧为大鼠左侧大脑半球, 下同)。

### 2.2 帕金森病大鼠脑 DAT 特异性放射性摄取比值

成为帕金森病模型后, 大鼠左右两侧脑 DAT 对  $^{99\text{m}}\text{Tc-TRODAT-1}$  的特异性摄取比值不同而且同向变化, 右侧 (损毁侧) 变化更明显 (表 1, 图 1.2、图 1.3、图 1.4)。术后 4 周刚成模型时, 双侧脑 DAT 的特异性摄取比值均降低 (表 1、图 1.2); 术后 9 周末治疗组大鼠双侧脑 DAT 的特异性摄取比值增加 (表 1、图 1.3), 经美多巴治疗后, 双侧脑 DAT 的特异性摄取比值明显减少 (表 1、图 1.4)。

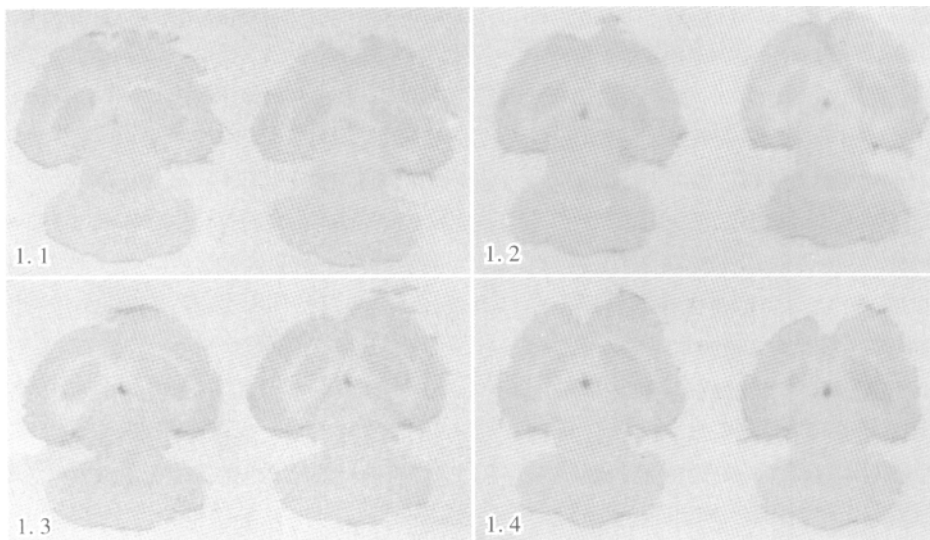


图 1 大鼠脑 DAT 放射自显影图像

Fig. 1 Dopamine transporter autoradiography in rat's brain

1.1: Showing symmetry and accumulation of the specific radioactivity uptake in bilateral striatum in the normal rat's brain; 1.2: Showing asymmetry and decrease of the specific radioactivity uptake in the right striatum in the brain of hemiparkinsonian rat model, four weeks after operation; 1.3: Showing increase of the specific radioactivity in the right striatum in the brain of hemiparkinsonian rat model without madopar, nine weeks after operation; 1.4: Showing significant decrease of the specific radioactivity uptake in the right striatum in the brain of hemiparkinsonian rat model taking madopar for five weeks, nine weeks after operation

表 1 大鼠脑 DAT 特异性放射性摄取比值

Table 1 Ratios of specific radioactivity uptake of dopamine transporters in rats

Group	n	r <sub>L</sub>	r <sub>R</sub>
Normal	4	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.03
PD rat model	4	0.09 ± 0.03 <sup>1),2)</sup>	0.07 ± 0.02 <sup>2)</sup>
Non-madopar	4	0.17 ± 0.05 <sup>1),2)</sup>	0.14 ± 0.04 <sup>2)</sup>
Madopar	4	0.06 ± 0.02 <sup>1),2)</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>2)</sup>

L: left; R: right; r: ratio of specific radioactivity uptake of bilateral dopamine transporters,  $r_L = n_{ST,L} / n_{CB} - 1$ ;  $r_R = n_{ST,R} / n_{CB} - 1$ ; 1) Compared with  $r_R$  in same group,  $P < 0.05$ ; 2) Compared with  $r_L$  (or  $r_R$ ) in upper group,  $P < 0.05$

### 3 讨 论

#### 3.1 抗帕金森药物对脑 DAT 的影响

多巴类抗帕金森药物 (包括左旋多巴、美多巴及息宁) 是临床最常用而且疗效最显著的帕金森病患者的治疗用药, 它们对脑 DAT 的影响各家报道不一致。Guttman 等<sup>[7]</sup>发现美多巴 (375 mg/d) 及 Pramipexole (1.5 mg/d) 均使帕金森病患者脑 DAT 下调, 程度相当。Innis 等<sup>[8]</sup>用息宁 (750 mg/d) 或司乐吉林 (10 mg/d) 治疗帕金森病患者, 并未发现脑 DAT 的变化; Nurmi 等<sup>[9]</sup>用左旋多巴治疗帕金森病患者也得到相同的结论。Dresel 等<sup>[10]</sup>发现左旋多巴仅在很大剂量 (100 ~ 125 mg/kg) 时才会影响 <sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1 与正常大鼠脑 DAT 的结合, 而常规的左旋多巴治疗剂量 (0.3 ~ 5 mg/kg) 并不会影响 <sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1 与大鼠脑 DAT 的结合。

造成抗帕金森药物对脑 DAT 影响结果不一致的原因可能有: ①观察时间过短。上述文献中帕金森病患者治疗仅 4 ~ 12 周; 而现在的临床治疗中, 帕金森病患者需终生服药, 在服药的不同阶段脑 DAT 的变化可能不一样。②各研究者所用的药物剂量及给药方式不一样。将多巴制剂一次性大量给予正常动物与长期小剂量给予帕金森病模型动物对脑 DAT 的影响是有差别的。③各研究者所使用的仪器设备不同, 有的用 SPECT, 有的用 PET, 两者的清晰度及效果不同, 价钱也有很大的差异。

#### 3.2 美多巴对帕金森病模型大鼠脑 DAT 的影响

目前国内外暂未见用核医学方法研究美多巴对帕金森病模型大鼠脑 DAT 影响的报道, 我们进行了这方面的探索性研究。

本实验发现, 正常大鼠左右双侧纹状体脑

DAT 的数量对称 (表 1, 图 1.1); 术后 4 周成为帕金森病模型大鼠后双侧脑 DAT 的数量均减少, 右侧更明显 (表 1, 图 1.2); 术后 9 周末治疗组帕金森病模型大鼠双侧脑 DAT 的数量较 4 周刚成帕金森病模型时明显增加 (表 1, 图 1.3), 这与我们的帕金森病模型猴的结果相似<sup>[11,12]</sup>, 可能与动物的可自我恢复<sup>[13]</sup>有关。但这却与帕金森病患者的临床情况有很大的不同, 帕金森病患者的病情是进行性发展的, 作为多巴胺能神经元标志物的脑 DAT 的数量只有减少, 不可能增加。

经美多巴 (按 20 mg/(kg·d)) 治疗 5 周后 (即术后 9 周), 帕金森病模型大鼠双侧脑 DAT 对 <sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1 的特异性摄取较术后 9 周末治疗组明显减少, 右侧 (损毁侧) 减少更多 (表 1, 图 1.4)。说明美多巴对帕金森病大鼠脑 DAT 有影响, 这与 Guttman 等<sup>[7]</sup>的结果一致。

综上所述, 我们认为长期美多巴治疗可能会使帕金森病模型大鼠双侧脑 DAT 数量减少, 右侧 (损毁侧) 受影响更多。基于此因, 我们认为帕金森病患者行脑 DAT 显像前最好停药; 但能否停药要结合临床, 停药多久才能使脑 DAT 恢复到其不受复方多巴制剂影响的状态还需进一步研究。长期使用美多巴会使帕金森病患者双侧脑 DAT 数量产生怎样的变化还不十分清楚; 若病情需要多次显像, 每次显像前均不停药, 这样是否使前后的显像结果具有可比性又不影响治疗呢? 这些均是以后需要深入研究的课题。

#### 参考文献:

- [1] Elmaleh D R, Fischm A J, Shoup T M, *et al.* Preparation and biological evaluation of Iodine-125-IACFT: a selective SPECT agent for imaging dopamine transporter sites [J]. *J Nucl Med*, 1996, 37(7): 1197.
- [2] Brownell A L, Elmaleh D R, Meltzer P C, *et al.* Cocaine congeners as PET imaging probes for dopamine terminals[J]. *J Nucl Med*, 1996, 37(7): 1186.
- [3] Tipton K F, Singer T P. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds[J]. *J Neurochem*, 1993, 61: 1191.
- [4] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 22 ~ 29.
- [5] 方平, 吴春英, 陈正平, 等. 多巴胺转运蛋白显像剂 <sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1 的制备和动物实验 [J]. *中华核医学杂志*, 1999, 19(3): 146.

(下转第 572 页 to page 572)

- intrauterine growth retardation[J]. *Horm Res*, 1997, 48 (suppl 1): 11.
- [2] 张庆, 黎海芪, 郑惠连. 宫内生长迟缓对新生幼鼠胃肠发育的影响[J]. *中华儿科杂志*, 1997, 35(11): 567.
- [3] 李光伟, 潘孝仁, Lillioja S, 等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数[J]. *中华内科杂志*, 1993, 32(10): 656.
- [4] Haffner S M, Miettinen H, Stern M P. The homeostasis model in the San Antonio heart study[J]. *Diabetes Care*, 1997, 20: 1087.
- [5] Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach[J]. *J Nutr*, 1998 128(2suppl): 401S.
- [6] Jelliffe D B. The volume and composition of human milk in poorly nourished communities[J]. *Am J Clin Nutr*, 1978, 31: 492.
- [7] 李芳萍, 程桦, 傅祖植. 胰岛素抵抗体内检测方法[J]. *国外医学内科学分册*, 1998, 23(3): 108.
- [8] 赵晓华, 杨燕, 宋征, 等. 优化复合纤维对糖尿病大鼠胰岛素敏感指数及血脂的影响[J]. *中华预防医学杂志*, 2002, 36(3): 184.
- [9] 丘小汕, 刘军, 张怡坚, 等. 早期营养对 IUGR 大鼠糖耐量和胰岛素敏感性的远期影响[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2003, 24(3): 238.
- [10] Jaquet D, Gaboriau A, Czernichow P, *et al.* Insulin resistance early in adulthood in subjects born with intrauterine growth retardation[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(4): 1401.
- [11] 米杰, Law C M, 张孔来, 等. 北京市 41~47 岁人群出生时发育指标与成年期糖耐量减低的关系[J]. *中华预防医学杂志*, 1999, 33(4): 209.
- [12] 殷峻, 陈名道, 陈家伦. 瘦素, 肥胖与胰岛素抵抗[J]. *国外医学内分泌分册*, 1999, 19(5): 213.
- [13] Osmond C, Barker D J P. Fetal, infant and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes and Hypertension in adult man and women[J]. *Environ Health Perspect*, 2000, 108(Suppl 3): 545.

(编辑 张恩健)

(上接第 567 页 from page 567)

- [6] Kung M P, Stevenson D A, Plossl K, *et al.* [ $^{99m}\text{Tc}$ ] TRODAT-1: A novel technetium-99m complex as a dopamine transporter imaging agent[J]. *Eur J Nucl Med*, 1997, 24(4): 372.
- [7] Guttman M, Stewart D, Hussey D, *et al.* Influence of L-dopa and Pramipexole on striatal dopamine transporter in early PD[J]. *Neurology*, 2001, 56(11): 1559.
- [8] Innis R B, Marek K L, Sheff K, *et al.* Effect of treatment with L-dopa/carbidopa or L-selegiline on striatal dopamine transporter SPECT imaging with [ $^{123}\text{I}$ ] beta-CIT[J]. *Mov Disord*, 1999, 14(3): 436.
- [9] Nurmi E, Bergman J, Eskola O, *et al.* Reproducibility and effect of Levodopa on dopamine transporter function measurements: a [ $^{18}\text{F}$ ] CFT PET study[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(11): 1604.
- [10] Dresel S H J, Kung M P, Plossl K, *et al.* Pharmacological effects of dopaminergic drugs on *in vivo* binding of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]TRODAT-1 to the central dopamine transporters in rats[J]. *Eur J Nucl Med*, 1998, 25: 31.
- [11] 胡平, 陈玲, 张海琴, 等.  $^{99m}\text{Tc}$ -TRODAT-1 人脑多巴胺转运体显像初步研究[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2000, 26(4): 196.
- [12] 陈玲, 胡平, 吴克宁, 等. 帕金森病猴模型脑多巴胺转运体 SPECT 显像[J]. *中山医科大学学报*, 2002, 23(3): 183.
- [13] Ovidia A, Zhang Z M, Gash D M. Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys[J]. *Neurobiol Aging*, 1995, 16(6): 931.

(编辑 刘清海)