

# 纹状体源性神经营养因子治疗帕金森病 大鼠模型的实验研究

郭晚华, 贺江海, 庆宏

(中山医科大学组织学胚胎学教研室神经科学研究室, 广东 广州 510089)

**摘要:** 【目的】探讨纹状体源性神经营养因子(SDNF)在帕金森病(PD)治疗方面的应用前景。【方法】建立6-羟基多巴胺(6-OHDA)诱导的大鼠“半”PD模型,进行早期一次性注射SDNF,以及损伤两周后重复注射SDNF,以观察SDNF对模型鼠的治疗作用。【结果】早期一次性注射SDNF能明显阻止中脑黑质多巴胺(DA)神经元数量的减少。而损伤两周后重复注射SDNF,虽不再能改变DA神经元的数量,但能降低模型鼠由阿朴吗啡(APO)诱导的旋转,以及增加损伤侧纹状体内DA含量和降低HVA(高香草酸)/DA值。【结论】SDNF对6-OHDA诱导的中脑DA神经元的变性有阻止作用,同时对残留DA神经元的功能有增强作用。

**关键词:** 纹状体源性神经营养因子/治疗应用; 帕金森病/药物疗法; 疾病模型, 动物; 6-羟基多巴胺; 阿朴吗啡

中图分类号: R741; R349 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)06-0413-04

## An Experimental Study of Striatal-derived Neurotrophic Factor Treating the Rat Model of Parkinson's Disease

GUO Wan-hua, HE Jiang-hai, QING Hong

(Division of Neurosciences, Department of Histology and Embryology, Sun Yat-sen  
University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**Abstract:** 【Objective】To explore the therapeutic potential of striatal-derived neurotrophic factor (SDNF) in Parkinson's disease. 【Method】The 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced hemiparkinsonian rat model was established and the intranigral single injection of SDNF at early stage of 6-OHDA lesion and the supemigral repeated injection of SDNF 2 weeks later in 6-OHDA lesion were performed to observe the therapeutic role of SDNF on the rat model. 【Results】The early single injection of SDNF could arrest a decline of the number of mesencephalic dopamine (DA) neurons caused by 6-OHDA lesion. Although there was no obvious influence on the survival number of mesencephalic DA neurons in the repeated injection of SDNF 2 weeks later in 6-OHDA lesion, it could decrease the average rate of apomorphine-induced rotations of rat model and increase the level of DA as well as reduce the rate of homovanillic acid (HVA) level to DA level in the lesion side of striatum of rat model. 【Conclusion】SDNF may prevent the degeneration of mesencephalic DA neurons at early stage of 6-OHDA lesion and enhance the function of remaining DA neurons later.

**Key words:** striatal-derived neurotrophic factor/therapeutic use; Parkinson's disease/drug therapy; disease model, animal; 6-hydroxydopamine; apomorphine

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是神经系统锥体外系的一种慢性、进行性的神经变性疾病

(neurodegenerative disorders), 中脑黑质多巴胺(dopamine, DA)神经元的变性导致其靶——纹状

收稿日期: 1999-11-08

基金项目: 国家教委博士点科研基金(96056909)

作者简介: 郭晚华(1928), 女, 广东大埔人, 教授, 博士生导师, 主要研究化学因子与神经再生的关系。

体内 DA 含量的下降是此病的主要神经化学特点。我们实验室曾从纹状体提取液中分离并纯化到了一种能促进体外中脑黑质 DA 神经元的存活和神经突起生长的蛋白质,命名为纹状体源性神经营养因子(striatal-derived neurotrophic factor, SDNF)<sup>[1]</sup>。为了进一步探讨该因子在 PD 治疗方面的应用前景,我们用神经毒素 6-羟基多巴胺(6-OH-DA)注入大鼠一侧中脑黑质,破坏该侧黑质-纹状体通路,建立 6-OHDA 诱导的大鼠“半”PD 模型(hemiparkinsonian rat model)。然后用 SDNF 处理模型鼠:6-OHDA 损伤早期一次性注射 SDNF,观察 SDNF 有无阻止 DA 神经元变性的作用;6-OH-DA 损伤 2 周后重复注射 SDNF,观察 SDNF 有无促进残留 DA 神经元功能的作用。无论是阻止 DA 神经元变性或是促进残留 DA 神经元功能均有利于 PD 的治疗。近年来,神经营养因子研究领域的迅速发展,已导致人们去了解如何把这类蛋白质因子应用于临床治疗神经变性疾病。本实验期望能展示 SDNF 在治疗 PD 中的潜力及其实用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 SDNF 的制备

用凝胶过滤和两步高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析技术,从新生大鼠纹状体提取液中分离纯化获得 SDNF<sup>[1]</sup>,取其反相高效液相色谱(reverse-HPLC, R-HPLC)单一活性峰洗脱液脱盐后真空干燥备用。

### 1.2 大鼠“半”PD 模型的制作

6-OHDA (Sigma 产品) 8  $\mu\text{g}$  (4  $\mu\text{g}$   $\times$  2  $\mu\text{L}$  含 0.2 mL/L 抗坏血酸的无菌生理盐水)注入 SD 大鼠(180 ~ 240 g, 中山医科大学动物中心提供)左侧中脑黑质,破坏该侧黑质-纹状体通路,建立 6-OHDA 诱导的大鼠“半”PD 模型。主要参照 Perese 等的方法<sup>[2]</sup>,但将其两点注射 6-OHDA 改为一点注射。注射座标(以 200 g 鼠为标准,其余体重鼠作相应调整)为:前后(AP), -5.1 mm (相对于前囟);内外(ML), 2.5 mm (左侧);背腹(DV), 7.7 mm (从颅骨表面标起)。立体定位注射的手术操作按先前报道<sup>[3]</sup>。

部分实验的“半”PD 模型大鼠接受埋管手术:先在原 6-OHDA 注射孔周围钻入 4 颗固定螺丝,然

后将截短的 9 号注射针头(总长 6.5 mm)作为小管,套在 5.5 号针头上,由定位仪送入原注射孔内,进管 1.5 mm (从颅骨表面算起),用牙科水泥封固管的外露部分固定螺丝于颅骨表面。退针后再将相同长度的 5.5 号针头插入管内以防堵管,四环素软膏封口。

### 1.3 旋转行为测定

用阿朴吗啡(apomorphine, APO) (Sigma) 0.25 mg/kg 腹腔注射于“半”PD 模型大鼠,诱发旋转。开始旋转后计时和计数,每一个向健侧的 360° 旋转计数一次,持续 30 min,注药后 15 min 不旋转者不再计数。

### 1.4 酪氨酸羟化酶(TH)免疫细胞化学

按先前报道<sup>[3]</sup>, 40 mL/L 多聚甲醛(Sigma)灌注动物,作脑冰冻冠状切片(厚 37.5  $\mu\text{m}$ )。从前囟后 4.2 mm 到 6.0 mm 每间隔 300  $\mu\text{m}$  取切片一张。用 ABC 法进行 TH 单克隆抗体(Sigma)免疫细胞化学染色, DAB 显色。计数每张切片上能见到细胞核的 TH 阳性(TH<sup>+</sup>)细胞,并以存活百分数即损伤侧(6-OHDA 注射侧)TH<sup>+</sup>细胞总数/健侧 TH<sup>+</sup>细胞总数  $\times$  100% 表示 TH 阳性细胞的变化。中脑 TH 阳性细胞数能近似地表示中脑多巴胺神经元数量<sup>[4]</sup>。

### 1.5 HPLC-电化学检测(HPLC-ECD)

用于检测纹状体 DA 及 HVA 含量, HVA (homovanillic acid, 高香草酸)为 DA 的代谢终产物。所用 DA 及 HVA 均为 Sigma 产品。样品处理主要参照佟宏霞等的报道<sup>[5]</sup>,将动物断头处死,低温下速取其左右纹状体分置于塑料离心管中,快速称重后放液氮中暂存,取材结束后全部样品融化,加入高氯酸溶液,低温下粗研磨后超声波破碎, 15 000 r/min ( $r = 5.8 \text{ cm}$ ) 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 30 min, 取上清进样,用 Waters 高效液相色谱系统检测,色谱条件除流速改为 1.2 mL/min 外,其余参照廖瑛等的报道<sup>[6]</sup>。

### 1.6 实验分组

1.6.1 6-OHDA 损伤后早期一次性注射 SDNF 实验组大鼠 5 只全部制成 6-OHDA 诱导的“半”PD 模型,术后 12 h 一次性注射 SDNF (5  $\mu\text{g}/\mu\text{L} \times 2 \mu\text{L}$ )于同侧中脑黑质。对照组分 6-OHDA 对照组(只注射 6-OHDA,不注射 SDNF)、SDNF 对照组(单独注射 SDNF 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L} \times 2 \mu\text{L}$  于正常鼠)和生理盐水对照组(单独注射生理盐水 2  $\mu\text{L}$  于正常鼠)

3组,每组动物均5只。4周后进行酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)免疫细胞化学分析。

1.6.2 6-OHDA 损伤2周后重复注射SDNF 将6-OHDA 诱导的“半”PD 模型大鼠于术后两周进行APO 诱发的旋转行为测定,根据旋转测定结果将16只大鼠分成体重和平均转速都较相近的两组(每组8只):一组为SDNF 组,用于重复注射SDNF;另一组为细胞色素C(Cyt C)对照组(用Cyt C 取代生理盐水作对照是因为Cyt C 本身只是细胞呼吸链的成分并不参与细胞特殊功能的调节,而它同时又与许多神经营养因子有相似的大小和电荷;再者是考虑到动物体在反复接受外来蛋白质刺激下极易产生免疫反应,为此加入一种蛋白质对照有助于消除可能由免疫反应造成的误差)。两组大鼠均接受埋管手术,埋管术后两天分别注入SDNF 或Cyt C 于中脑黑质上部,进针深度根据每只鼠的原始记录有所不同,假设其注射6-OHDA 的原始进针深度为 $X$ ,则注药时进针深度 $X' = X + (6.5 - 1.5) - 0.5(\text{mm})$ 。注射每2天1次,共10次,每次剂量为:SDNF  $4 \mu\text{g}(2 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 2 \mu\text{L})$ , Cyt C (医用注射液)  $2 \mu\text{L}$ 。注药后每7天测定1次旋转行为,共3次(21 d)。然后每组各取3只旋转数最接近平均旋转数的鼠作HPLC-电化学分析,其余5只作TH 免疫细胞化学分析。

## 2 结果

### 2.1 6-OHDA 损伤早期注射SDNF 的结果

实验组(6-OHDA 损伤后12 h 注射SDNF)大鼠的腹侧中脑 $\text{TH}^+$  神经元存活百分数明显高于6-OHDA 对照组( $P < 0.01$ )(图1左和图2)。在SDNF 和生理盐水两对照组中,SDNF 对照组的 $\text{TH}^+$  神经元存活百分数(其损侧 $\text{TH}^+$  细胞数与健侧的几乎相同)高于生理盐水对照组(其损侧 $\text{TH}^+$  细胞数低于健侧的)( $P < 0.05$ )(图1右)。

### 2.2 损伤2周后重复注射SDNF 的结果

APO 诱导的旋转行为测试结果如图3所示,从曲线看出SDNF 组旋转数保持稳定而Cyt C 对照组则不断增加。TH 阳性神经元存活百分数的比较如图4所示,SDNF 和Cyt C 两组无显著差异( $P > 0.05$ )。纹状体中DA 和HVA 含量的HPLC-电化学分析结果见表1,在损伤侧,SDNF 组的DA 值约为Cyt C 组的3倍,而HVA/DA 值却比Cyt C

组的低约25%。在健侧,两组之间的数值几乎一致。

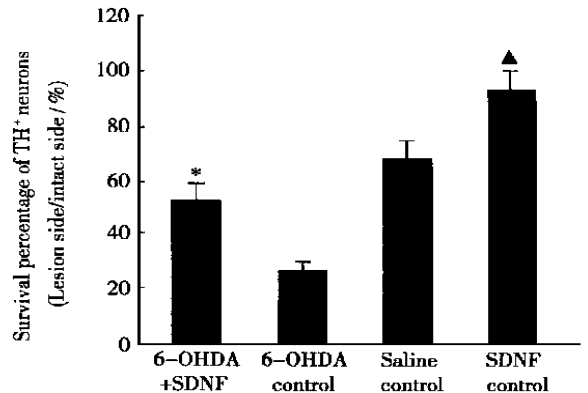


图1 各组大鼠第4周的中脑黑质TH 阳性神经元的存活百分数

Fig. 1 Survival percentage of TH positive neurons of rat mesencephalic substantia nigra at the 4th week after available treatment

Experimental group (6-OHDA+SDNF), Control groups (6-OHDA, Saline, and SDNF controls). \*:  $P < 0.01$ , compared with 6-OHDA control (Duncan's new method); ▲:  $P < 0.05$ , compared with Saline (normal saline) control (one-side  $t$ -test)

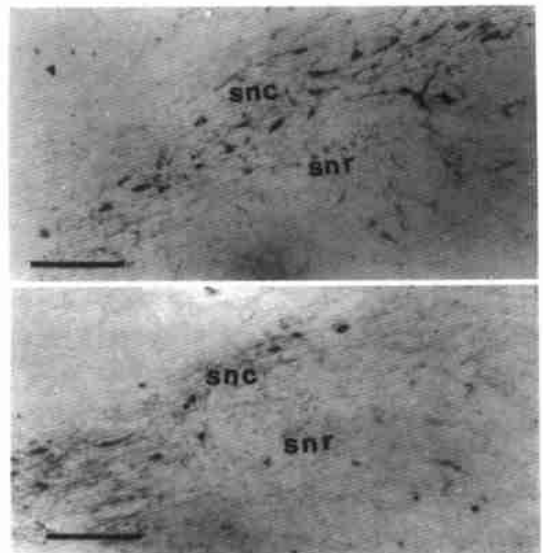


图2 实验组(上)和6-OHDA 对照组(下)大鼠的损伤侧中脑黑质

Fig. 2 The lesion side of rat mesencephalic substantia nigra in experimental group (upper) and 6-OHDA control group (lower)

The survival of TH positive neurons has a significant decrease in 6-OHDA control group compared with experimental group; TH immunocytochemistry staining; "snc" stands for compact part of substantia nigra (SN), "snr" stands for reticular part of SN. Bar=120  $\mu\text{m}$

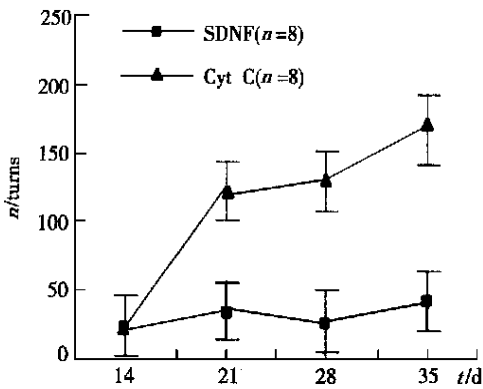


图3 6-OHDA损伤2周后重复注射SDNF的大鼠(SDNF组)由APO诱导的每30 min的旋转圈数

Fig. 3 APO induced rotations (every 30 min) of rat model repeated injection of SDNF 2 weeks later in 6-OHDA lesion ( $\bar{x} \pm s$ )

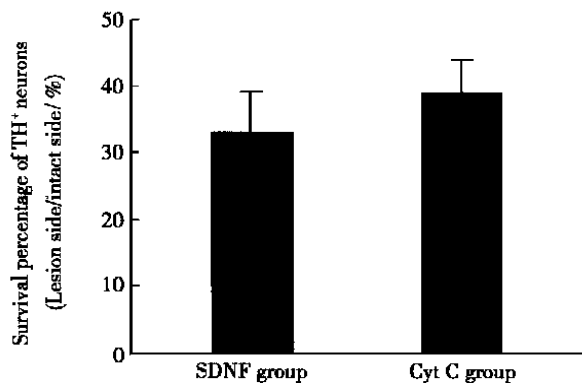


图4 6-OHDA损伤2周后重复注射SDNF的大鼠(SDNF组)的中脑黑质TH阳性神经元存活百分数平均值

Fig. 4 Survival percentage of TH positive neurons of rat mesencephalic substantia nigra repeated injection of SDNF 2 weeks later in 6-OHDA lesion (SDNF group)

表1 “半”PD模型大鼠每克纹状体组织中DA、HVA含量的HPLC-电化学法测定平均值

Table 1 Dopamine (DA) and homovanillic acid (HVA) mass in one gram striatum tissue of hemiparkinsonian rat model measured by HPLC with electrochemical detection ( $n = 3$ )

Group	Region	$m_{DA}/ng$	$m_{HVA}/ng$	$m_{HVA}/m_{DA}$
SDNF group	Lesion side	314.4	103.7	0.33
	Intact side	3356.1	445.4	0.13
Cyt C group	Lesion side	113.7	65.2	0.57
	Intact side	3646.2	376.8	0.10

### 3 讨论

神经营养因子治疗PD主要表现在两个方面:一是对中脑DA神经元变性的直接阻止作用,二是对残存DA神经元功能的改善作用。实际上,功能的改善本身又有利于阻止DA神经元发生新的变性。从本实验看出,SDNF同时具有这两种作用。在损伤早期的实验中,实验组的TH阳性神经元的存活百分数明显高于6-OHDA对照组(图1左和图2),说明SDNF对6-OHDA诱导的中脑DA神经元的变性具有阻止作用。另外,SDNF对照组的TH阳性神经元存活百分数在90%以上明显高于生理盐水对照组(接近70%,图1右)。由于生理盐水的损伤可能是机械性的,说明SDNF对机械性损伤有极好的抵御作用。损伤2周后的实验数据说明SDNF虽然已不再能改变“半”PD模型动物中残留DA神经元的数量(图4),但却能改善其功能,主要表现在降低由APO诱导的旋转率(图3),以及增加损毁侧(注射侧)纹状体中DA的含量(表1)。然而有趣的是在增加DA的同时,SDNF却使HVA/DA值下降。而一些其它因子如GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor)<sup>[7,8]</sup>, BDNF (brain-derived neurotrophic factor)<sup>[9]</sup>的相应研究中HVA/DA与DA含量多为同时增加。由于HVA/DA是反映单个DA神经元末梢上DA转换率(turnover)的一个指标<sup>[10]</sup>。可以推测当HVA/DA与DA含量同时增加时,DA的增加主要是靠每个末梢上DA产出率的增加来实现的;而当DA含量增加、HVA/DA没有相应增加或反而降低时,DA含量的增加主要靠末梢数量的增加所致。在损伤2周后的实验中SDNF并未改变中脑残留DA神经元的数量。它对残留DA神经元功能的改善作用很可能是建立在增加每个残留DA神经元末梢分枝的基础上。

综上所述,可以认为SDNF是个既能阻止DA神经元变性又能增进其功能的神经营养因子,而且其功能机制与已知的一些营养因子不完全相同,对治疗PD方面可能是个前景较好的因子之一。

#### 参考文献:

[1] 庆宏,郭晓华.纹状体源神经营养因子的分离纯化

(下转第420页)

性和准确性。另外,由于 GC 含量很高,我们适当地提高退火温度,以减少模板与引物的非特异性结合。目前,我们正利用获得的含有 Exon 2 区基因片段的重组质粒(pT-I, pT-III)来研究反义 RNA(如 Ribozyme)对胶原蛋白基因表达的抑制作用。

#### 参考文献:

- [1] 翟中和. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995. 84~90.
- [2] Sato M, Ishikawa O, Miyachi Y. Distinct patterns of collagen gene expression are seen in normal and keloid fibroblasts grown in three-dimensional culture[J]. *Br J Dermatol* 1998, 138(6): 938.
- [3] D'Alessio M, Bernard M, Pretonius P J. Complete nucleotide sequence of the region encompassing the first

- twenty-five exons of the human pro alpha 1(I) collagen gene(COL1A1)[J]. *Gene* 1988, 67(1):105.
- [4] Chu M L, Weil D, de Wet W. Isolation of cDNA and genomic clones encoding human pro-alpha 1(III) collagen. Partial characterization of the 3' end region of the gene [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(7):4357.
- [5] Gallivan K, Alman B A, Moriarty K P. Differential collagen I gene expression in fetal fibroblasts [J]. *J Pediatr Surg*, 1997, 32(7):1033.
- [6] Hernandez M R, Ye H, Roy S. Collagen type IV gene expression in human optic nerve heads with primary open angle glaucoma [J]. *Exp Eye Res*, 1994, 59(1):41.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1~18.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 416 页)

和生物鉴定[J]. *解剖学报*, 1996, 27(4):363.

- [2] Perese D A, Ulman J, Viola J, *et al.* A 6-hydroxydopamine induced selective parkinsonian rat model[J]. *Brain Res*, 1989, 494(2): 285.
- [3] 贺江海, 郭晓华. 不同剂量 6-羟基多巴胺注射大鼠单侧前脑内侧束后对中脑多巴胺能神经元损伤作用的观察[J]. *解剖科学进展*, 1998, 4(3): 229.
- [4] 桂勤, 郭晓华. 纹状体和中缝核外植块促进体外培养的中脑多巴胺神经元的发育[J]. *解剖学报*, 1994, 25(1): 59.
- [5] 佟宏霞, 张进禄, 徐群渊等. 帕金森病大鼠基因治疗后脑中多巴胺的含量的变化[J]. *中华医学杂志*, 1996, 76(7): 490.
- [6] 廖瑛, 单济川, 余斌杰. HPLC-ECD 检测尿儿茶酚胺方法的优化[J]. *中山医科大学学报*, 1994, 15(3): 227.
- [7] Hudson J, Granholm A C, Gerhardt G A, *et al.* Glial cell

line-derived neurotrophic factor augments midbrain dopaminergic circuits in vivo [J]. *Brain Res Bull* 1995, 36(5):425.

- [8] Hebert M A, Gerhardt G A. Behavioral and neurochemical effects of intranigral administration of glial cell line-derived neurotrophic factor on aged Fischer 344 rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 282(2):760.
- [9] Shen R Y, Altar C A, Chiodo L A. Brain-derived neurotrophic factor increases the electrical activity of pars compacta dopamine neurons in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(19): 8920.
- [10] Zigmond M J, Abercrombie E D, Berger T W, *et al.* Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications [J]. *Trends Neurosci*, 1990, 13(7): 290.

(编辑 刘清海)