

依达拉奉对帕金森病小鼠黑质多巴胺能神经元的形态学影响

周波^{1a}, 文敏^{1a}, 何宇红^{1a}, 焦玲^{1b}, 张春林^{1c}

摘要: [目的] 探讨依达拉奉对帕金森病(Parkinson's disease, PD)小鼠黑质多巴胺能神经元的作用, 为依达拉奉临床PD治疗提供实验依据。[方法] 将30只健康雄性C57BL/6小鼠随机分为对照组、模型组和治疗组, 每组10只。模型组和治疗组给予腹腔注射百草枯(paraquat)和代森锰(maneb)建立PD模型, 完成建模后, 治疗组给予依达拉奉治疗。观察3组小鼠行为学的改变, 并用免疫组织化学和体视学方法对黑质酪氨酸羟化酶阳性神经元进行计数和形态计量分析。[结果] 模型组与治疗组比较, 自主运动活性明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与治疗组相比, 模型组黑质酪氨酸羟化酶阳性神经元数量明显降低, 细胞胞体肿胀, 平均截面积、平均周长和平均体积明显增大, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 胞浆内染色极为浅淡, 轴突减少或消失, 细胞轮廓不清。[结论] 依达拉奉对PD小鼠黑质多巴胺能神经元有明显的神经保护作用。

关键词: 帕金森病; 依达拉奉; 百草枯; 代森锰; 形态学; 体视学

Effects of Edaravone Administration on Morphological Changes of Dopaminergic Neurons in Substantia Nigra of Parkinson's Mice ZHOU Bo^{1a}, WEN Min^{1a}, HE Yu-hong^{1a}, JIAO Ling^{1b}, ZHANG Chun-lin^{1c} (a.Department of Anatomy; b.Department of Neurology of Affiliated Hospital; c.Department of Biology; 1.Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China). Address correspondence to ZHANG Chun-lin, E-mail: zcl@gmc.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To investigate the protective effect of edaravone on substantia nigra dopaminergic neurons in mice with Parkinson's disease (PD). [Methods] A total of 30 male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group and treatment group. Model group and treatment group were intraperitoneally injected with paraquat (PQ) and maneb (Mb) to establish PD model. Treatment group were then administrated with edaravone. Their motor coordination and expression of tyrosine hydroxylase (TH) in the substantia nigra pars compacta (SNc) were detected by immunohistochemistry and stereology. [Results] Administration of edaravone significantly attenuated the impairment of behavioral performance ($P < 0.05$), increased the number of TH-positive neurons and improved the cell morphology such as cell body, average sectional area, circumference and volume in SNc ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). [Conclusion] The present findings suggest that edaravone has a beneficial influence on nigrostriatal dopaminergic neurons in PD mice.

Key Words: Parkinson's disease; edaravone; paraquat; maneb; morphology; stereology

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是以静止性震颤、运动迟缓、肌肉强直等为主要临床特征的慢性、进行性、神经退行性疾病, 于65岁以上人群的发病率约为1%~3%, 仅次于阿尔茨海默病^[1-2]。其典型的病理改变是黑质致密部多巴胺神经元进行性退化、丢失^[3]。迄今, 其病因与发病机制仍不清楚, 大量研究提示可能与环境毒素百草枯密切相关。PD目前尚缺乏特异性的治疗方法, 多年来一直以左旋多巴替代治疗为主, 但远期疗效差, 出现症状波动、异动症以及精神症状等并发症, 不能延缓病程的发展和减少死亡率。因此探究长期

有效的治疗方法, 延缓病情进程, 提高PD患者生活质量是目前亟待解决的课题。依达拉奉(edaravone, 3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5-酮)是一种广泛运用于缺血性脑卒中患者的氧自由基清除剂^[4-5], 它可以通过抑制脂质过氧化和调控凋亡相关基因的表达抑制细胞死亡^[6], 发挥神经保护作用。目前, 将依达拉奉应用于PD的治疗尚鲜有报道。本实验拟采用百草枯联合代森锰建立PD小鼠模型, 通过对比治疗前、后黑质酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)阳性神经元的数量及形态改变, 探讨依达拉奉对黑质多巴胺神经元的保护作用。

[基金项目] 贵州省社会发展科技攻关计划项目(编号: 黔科合SY字[2008]3046号)

[作者简介] 周波(1979—), 男, 学士, 讲师; 研究方向: 神经生物学的研究; E-mail: xiaomao_zhoubo@163.com

[通信作者] 张春林教授, E-mail: zcl@gmc.edu.cn

[作者单位] 1. 贵阳医学院 a. 人体解剖学教研室 b. 附属医院神经内科 c. 生物学教研室, 贵州 贵阳 550004

1 材料与方法

1.1 模型建立

健康雄性C57BL/6小鼠30只, 鼠龄7周, 体重24~26g, 由重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司提供。小鼠饲养于贵阳医学院动物实验中心, 室温维持在 $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$, 湿度维持在 $(50 \pm 10)\%$, 12-12光暗周期, 自由进食和饮水。实验开始前先给予

适应环境 1 周。小鼠随机分为对照组 (10 只)、模型组 (10 只) 和治疗组 (10 只)。模型组于每周二、四早上 10:00 依次给予百草枯 (paraquat, 10 mg/kg, 美国 Sigma 公司, 溶于 0.5 mL 生理盐水) 和代森锰 (maneb, 30 mg/kg, 美国 Sigma 公司, 溶于 0.5 mL 生理盐水) 腹腔注射, 连续给药 6 周, 行为学检测确定模型是否成功; 治疗组在成功建模后给予依达拉奉注射液 (商品名: 必存, 3 mg/kg, 先声药业提供) 腹腔注射, 每天 1 次, 连续 2 周。

1.2 敞箱实验

敞箱实验用于检测小鼠的自主运动活性^[7-8]。自制敞箱, 长 × 宽 × 高为 80 cm × 80 cm × 40 cm, 底部刻出 16 cm × 16 cm 的格子 25 个。内壁涂黑。在安静、光线较暗的环境中检测。小鼠适应环境 10 min 后计数 3 min 内小鼠水平运动 (移动的格子数) 和垂直运动 (双前肢离开地面站立的次数)。水平运动计分: 动物穿过 1 格 (三爪以上跨入) 为 1 分, 如果沿直线走每 10 cm 为 1 分; 垂直运动计分: 动物双足离开地面为标志, 无论站立多长时间直至放下双足为 1 分。

1.3 标本采集

用 3.6% (质量分数, 下同) 的水合氯醛按 (每 100 g 体重 1 mL) 麻醉小鼠, 在其左胸前壁纵行剪开心包, 充分暴露心脏, 经心包横窦引过一丝线, 绕主动脉及肺动脉根部打一松结, 剪开左心室, 将套管插入升主动脉中, 结扎固定套管并立即开始灌注。先用生理盐水 50 mL (37℃) 冲去血液, 流速宜大, 至右心室流出液体无色或略带红色, 即可终止灌注而改用固定液 (4% 多聚甲醛、饱和苦味酸、戊二醛) 灌注, 时间约 30 min。灌注后开颅取脑, 放入后固定液 (4% 多聚甲醛) 中固定 24 h。经脱水、常规石蜡包埋、连续冠状切片用于免疫组织化学染色。

1.4 TH 免疫组化 (streptavidin-biotin complex, 链霉亲和素-生物素复合物法, SABC 法)

(1) 石蜡切片常规脱蜡至水; (2) 经新鲜配置 3% H₂O₂ 10 min 灭活内源性酶; (3) 用 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液进行热抗原修复; (4) 滴加正常山羊血清封闭液, 室温 20 min。甩去多余液体, 不洗; (5) 滴加一抗, 兔抗酪氨酸羟化酶多克隆抗体 (rabbit anti-tyrosine hydroxylase polyclonal antibody, 1 : 100, Boster 公司提供), 湿盒中 4℃ 过夜; (6) 滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 湿盒中 37℃ 20 min; (7) 滴加试剂 SABC, 湿盒中 37℃ 20 min; (8) 3, 3'-二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色, 镜下控制反应时间; (9) 脱水、透明和封片, 显微镜下观察。各组切片均在相同时间、相同条件下完成免疫组织化学显色。对照组切片用 0.1 mol/L PBS 取代一抗, 其余步骤同实验组。结果判定: 以胞质中出现棕黄色颗粒为阳性神经元。

1.5 图像分析

每只小鼠随机选取 5 张切片, 每张切片随机选取 4 个视野, 在同一视场面积, 同一放大倍数, 同一背景光强度下采集图像, 运用美国 Mc 公司 Image-Pro Plus 6.0 软件统计 TH 阳性神经元数量以及形态学参数。

1.6 统计分析

测量数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据运用 SPSS 11.5/PC One-way ANOVA 进行方差分析及 LSD 进行组间均数的两两比较, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 敞箱实验

敞箱实验检测显示, 百草枯联合代森锰腹腔注射后, 小鼠水平运动、垂直运动活性较对照组明显降低; 依达拉奉治疗后, 运动活性较模型组有了明显改善, 但与对照组间仍存在明显差异, 各组间差异均有统计学意义 (水平运动 $F=23.983$, $P<0.05$ 或 $P<0.01$; 垂直运动 $F=34.548$, $P<0.05$ 或 $P<0.01$), 见表 1。

表 1 各组小鼠自主运动活性计量分析结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	水平运动	垂直运动
对照组	0.4716 ± 0.1078 ^{~∞}	1.4732 ± 0.2766 ^{~∞}
模型组	0.2483 ± 0.0414 ^{**∞}	1.9686 ± 0.2610 ^{**∞}
治疗组	0.3399 ± 0.0336 ^{**~}	1.5248 ± 0.2511 ^{**~}

[注]*: 与对照组比较, $P<0.05$, **: $P<0.01$; ^: 与模型组比较, $P<0.05$, ~: $P<0.01$; ∞: 与治疗组比较, $P<0.05$, ∞: $P<0.01$ 。

2.2 TH 阳性神经元计数

TH 阳性神经元计数结果显示, 对照组小鼠中脑腹侧黑质致密部和腹侧被盖区可见大量 TH 阳性神经元细胞; 模型组小鼠黑质致密部和腹侧被盖区 TH 阳性神经元细胞明显减少, 较对照组减少约 66.5%; 依达拉奉治疗后 TH 阳性神经元细胞有了明显回升, 但数量上仍比对照组少, 各组之间差异有统计学意义 ($F=263.404$, $P<0.01$), 见表 2。

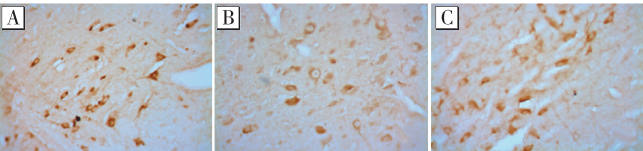
表 2 各组小鼠中脑黑质 TH 阳性神经元计数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TH 阳性神经元计数
对照组	107.83 ± 7.885 ^{~∞}
模型组	36.17 ± 4.082 ^{**∞}
治疗组	84.67 ± 4.082 ^{**~}

[注]**: 与对照组比较, $P<0.01$; ^: 与模型组比较, $P<0.01$; ∞: 与治疗组比较, $P<0.01$ 。

2.3 TH 阳性神经元形态计量

对照组小鼠 TH 阳性神经元多为锥体形和三角形, 胞浆内棕色颗粒浓, 神经元轴突明显 (图 1A); 模型组 TH 阳性神经元胞体肿胀, 平均截面积、平均周长和平均体积均明显增大, 胞浆内染色极为浅淡, 轴突减少或消失, 细胞轮廓不清 (图 1B), 与对照组及治疗组间有明显差异且差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。依达拉奉治疗后细胞形态有了明显改善 (图 1C), 与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。



[注]A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组。

图 1 各组小鼠黑质 TH 免疫组织化学染色 (SABC 法, ×400)

表 3 各组 TH 阳性神经元形态计量参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	平均周长 (10 ³ μm)	平均截面积 (10 ³ μm ²)	平均体积 (10 ³ μm ³)
对照组	1.4732 ± 0.2766 [~]	1.2411 ± 0.3316 [~]	1.2243 ± 0.7386 [~]
模型组	1.9686 ± 0.2610 ^{**∞}	2.8220 ± 0.7441 ^{**∞}	2.6711 ± 0.9427 ^{**∞}
治疗组	1.5248 ± 0.2511 [~]	1.4606 ± 0.6648 [~]	1.1024 ± 0.4959 [~]

[注]**: 与对照组比较, $P<0.01$; ~: 与模型组比较, $P<0.01$; ∞: 与治疗组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

百草枯是世界上最为常用的除草剂之一, 由于其化学结构与 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 的活性物质 MPP⁺ (一种非自然产生的神经毒素, 能够引起人类及动物产生 PD) 极为相似, 自 2007 年起已经被美国等 13 个国家禁用, 但在我国仍广泛使用^[9-10]。尽管大量的研究证实百草枯具有神经毒性, 可以引起小鼠和人类 PD 样改变, 但百草枯单独致病与人类散发性 PD 的多重环境危险因素致病不尽相符^[9, 11]。代森锰是一种除真菌剂, 属于农业化学药品范围, 能够加剧多巴胺神经元的丢失和运动障碍, 与百草枯的使用存在地域上的重叠, 两者联合使用能够产生更稳定的协同效应^[12-14]。因此, 联合百草枯与代森锰建立小鼠 PD 模型, 既符合我国国情, 又与 PD 多环境因素致病学说相一致。

TH 是酪氨酸合成多巴胺的限速酶, 仅在胞浆中表达, 在多巴胺能神经元中含量丰富; 多巴胺- β -羟化酶 (dopamine- β -hydroxylases) 是催化多巴胺脱羧转化成为去甲肾上腺素的限速酶, 由于中脑缺乏多巴胺- β -羟化酶, 多巴胺合成后不能转化为去甲肾上腺素, 故中脑 TH 变化可反映多巴胺的变化, TH 免疫反应阳性神经元即多巴胺能神经元^[15-16]。本实验通过对比治疗前、后 TH 免疫反应阳性神经元数量和形态的变化, 探讨依达拉奉对中脑黑质多巴胺能神经元的保护作用。实验结果显示, 百草枯联合代森锰注射可使小鼠自主运动活性减退, 黑质多巴胺能神经元数量明显减少, 细胞肿胀, 平均截面积、平均周长和平均体积均明显增大, 胞浆内染色极为浅淡, 轴突减少或消失, 细胞轮廓不清。依达拉奉治疗后能够明显改善百草枯联合代森锰引起的小鼠运动能力下降, 黑质多巴胺能神经元数量减少和细胞形态的改变。YUAN 等^[17]在 6-OHDA 诱导的细胞模型和动物模型上亦观察到同样的结果。可见, 依达拉奉对中脑黑质多巴胺能神经元有较好的保护作用, 其机制可能与抗氧化应激和下调 caspases-3 的表达, 抑制细胞凋亡有关^[17-18]。本实验证实了依达拉奉对中脑黑质多巴胺能神经元具有较好的保护作用, 可为依达拉奉临床 PD 治疗提供实验依据。但实验数据显示, 依达拉奉对小鼠自主运动活性及黑质多巴胺能神经元数量的恢复能力仍然有限, 尚有很多关键的问题不清楚, 如治疗的最佳时机和剂量等, 故还有待于进一步的研究。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] PAN-MONTOJO F, ANICHTCHIK O, DENING Y, et al. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8762.
- [2] DE RIJK MC, LAUNER LJ, BERGER K, et al. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group[J]. Neurology, 2000, 54(11): S21-23.
- [3] HU X, ZHANG D, PANG H, et al. Macrophage antigen complex-1 mediates reactive microgliosis and progressive dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease[J]. J Immunol, 2008, 181(10): 7194-7204.
- [4] KAWAI H, NAKAI H, SUGA M, et al. Effects of a novel free radical scavenger, MCI-186, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1997, 281(2): 921-927.
- [5] SHICHINOHE H, KURODA S, YASUDA H, et al. Neuroprotective effects of the free radical scavenger Edaravone (MCI-186) in mice permanent focal brain ischemia[J]. Brain Res, 2004, 1029(2): 200-206.
- [6] CHEN JX, ZHAO T, HUANG DX. Protective effects of edaravone against cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells[J]. Neurosci Bull, 2009, 25(2): 67-74.
- [7] BARCLAY LL, GIBSON GE. Spontaneous open-field behavior in thiamin-deficient rats[J]. J Nutr, 1982, 112(10): 1899-1905.
- [8] TAYLOR TN, GREENE JG, MILLER GW. Behavioral phenotyping of mouse models of Parkinson's disease[J]. Behav Brain Res, 2010, 211(1): 1-10.
- [9] CICCETTI F, DROUIN-OUELLET J, GROSS RE. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models?[J]. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30(9): 475-483.
- [10] DI MONTE DA, LAVASANI M, MANNING-BOG AB. Environmental factors in Parkinson's disease[J]. Neurotoxicology, 2002, 23(4-5): 487-502.
- [11] 张闾艺, 黄小军, 黄晓峰. 帕金森病环境毒素模型的研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14(21): 3272-3275.
- [12] FEI Q, ETHELL DW. Maneb potentiates paraquat neurotoxicity by inducing key Bcl-2 family members[J]. J Neurochem, 2008, 105(6): 2091-2097.
- [13] MCCORMACK AL, THIRUCHELVAM M, MANNING-BOG AB, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat[J]. Neurobiol Dis, 2002, 10(2): 119-127.
- [14] COSTELLO S, COCKBURN M, BRONSTEIN J, et al. Parkinson's disease and residential exposure to mane and paraquat from agricultural applications in the central valley of California[J]. Am J Epidemiol, 2009, 169(8): 919-926.
- [15] 袁红, 徐瑰翎, 李春雷, 等. 天麻对帕金森病鼠黑质 Caspase-3 表达及 TH 阳性神经元的影响[J]. 解剖学报, 2007, 38(suppl): 4-9.
- [16] 孙凤艳. 医学神经生物学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008: 118-120.
- [17] YUAN WJ, YASUHARA T, SHINGO T, et al. Neuroprotective effects of edaravone-administration on 6-OHDA-treated dopaminergic neurons[J]. BMC Neurosci, 2008, 9: 75.
- [18] KAWASAKI T, KITAO T, NAKAGAWA K, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in cultured rat astrocytes: protection by edaravone, a radical scavenger[J]. Glia, 2007, 55(13): 1325-1333.

(收稿日期: 2011-06-01)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 王晓宇; 校对: 徐新春)