

· 基础研究 ·

高压氧对帕金森病大鼠多巴胺神经元保护作用的研究

曹学兵 林素芳 刘昌勤 秦开蓉 王同礼 尤春景 黄晓琳 郭铁成

【摘要】目的 探讨高压氧对帕金森病大鼠多巴胺神经元的保护作用。**方法** 将 68 只雌性 Sprague-Dawley 大鼠随机分成 5 组:注射生理盐水高压氧处理组(A 组, $n=7$)、全程高压氧处理模型组(B 组, $n=18$)、未经高压氧处理模型组(C 组, $n=7$)、造模后高压氧处理组(D 组, $n=18$)、造模前高压氧处理组(E 组, $n=18$)。在实验第 1 天至第 7 天给予 A 组、B 组和 E 组大鼠高压氧治疗;而在实验第 8 天时,分别向 B 组、C 组、D 组及 E 组大鼠单侧脑黑质内定位注射 6-羟基多巴胺以制作偏侧帕金森病大鼠模型,给予 A 组等量生理盐水定位注射。从实验第 8 天至结束,分别给予 A 组、B 组及 D 组大鼠高压氧处理;并于造模后第 9 天、16 天及 21 天每组各处死 6 只大鼠,取其纹状体用分光光度计测定超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量,选用免疫组织化学方法测定黑质区域内酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞数量及胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达。**结果** 与 C 组比较,B、D、E 组大鼠病变侧纹状体内 SOD 及 GSH-Px 活性显著增高,MDA 含量及 GFAP 表达明显降低,6-羟基多巴胺毁损黑质区残存的 TH 阳性细胞数目明显增加。**结论** 高压氧治疗可以显著提高机体抗自由基损伤功能、减弱胶质细胞效应发挥,从而有效保护脑黑质区多巴胺(DA)能神经元功能。

【关键词】 高压氧; 帕金森病; 多巴胺神经元; 神经保护

Neuroprotective effect of hyperbaric oxygenation on dopaminergic neuron in hemiparkinsonian rats CAO Xue-bing, LIN Su-fang, LIU Chan-qin, QIN Kai-rong, WANG Tong-li, YOU Chun-jin, HUANG Xiao-lin, GUO Tie-cheng. Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

【Abstract】Objective To evaluate the neuroprotective effect of hyperbaric oxygenation(HBO) on dopaminergic neuron in hemiparkinsonian rats. **Methods** Sixty-eight female Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: group A, normal rats injecting physiological saline solution into substantia nigra followed by HBO intervention($n=7$); group B, Parkinson disease(PD) models with HBO before and after the injection of 6-hydroxydopamine($n=18$); group C, PD models without HBO all through the course($n=7$); group D, PD models that with HBO only after the injection of 6-hydroxydopamine($n=18$); group E, PD models with HBO only before the injection of 6-hydroxydopamine($n=18$). From the 1st to the 7th day, groups A, B and E were under the HBO treatment. On the 8th day, groups B, C, D and group E accepted 6-OHDA solution injections into the right striatum. Group A was given equal physiological saline solution injection of the same dose. From the 9th day onwards, groups A, B and D began to be treated with HBO. On the 9th day, 16th day and 21st day after the models were established, 6 animals of each group were sacrificed, respectively. The levels of Cu/Zn superoxide dismutase(Cu/Zn-SOD), manganese superoxide dismutase(MnSOD), glutathione peroxidase(GSH-Px) and malondialdehyde(MDA) of the striatum were measured by using immunohistochemistry, the expression of glial fibrillary acidic protein(GFAP) and tyrosine hydroxylase(TH)-positive neurons in the right substantia nigra were observed. **Results** In the groups accepted prevention or treatment of HBO, the numbers of TH-positive neurons and the levels of Cu/Zn-SOD, MnSOD and GSH-Px were significantly increased when compared with group C($P<0.01$, respectively), and in groups B, D and E, the expression of GFAP and the level of MDA decreased dramatically when compared with group C($P<0.01$, respectively). **Conclusion** HBO can attenuate the degree of oxidative stress in the striatum and protect dopaminergic neurons against the toxicity of 6-OHDA in substantia nigra.

【Key words】 Hyperbaric oxygenation; Parkinson disease; Dopaminergic neurons; Neuroprotection

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30170334)

作者单位:430022 武汉,湖北省神经系统重大疾病重点实验室,华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科(曹学兵、林素芳、刘昌勤);华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科(秦开蓉、王同礼、尤春景、黄晓琳、郭铁成)

帕金森病(Parkinson disease, PD)的病因目前尚不十分明确,纹状体-黑质部多巴胺(dopamine, DA)神经元的变性、死亡致使 DA 减少是该症主要的生化改变之一,而当前又缺乏行之有效的保护性治疗措施。

传统观点认为,环境毒素、多巴胺自身氧化、线粒体功能不全、铁离子代谢障碍、兴奋性氨基酸毒性作用、自由基清除系统功能降低或失活以及一氧化氮等原因均可能参与了 DA 神经元慢性缺失的过程或者是诱发过程^[1]。但无论是哪种病理机制假说,均支持线粒体功能不全及氧化应激是导致 PD 患者 DA 神经元死亡的最终原因。因此,寻求早期有效保护 DA 神经元的途径是 PD 临床治疗领域中的重大课题之一^[2]。

有研究表明,当压力 < 2.5 ATA 时,高压氧(hyperbaric oxygenation, HBO)治疗可减少脑内自由基的生成,抑制自由基对脑组织的损伤,提高脑组织对葡萄糖的利用率,促进损伤脑组织的修复及神经功能恢复^[3]。HBO 作为一种康复治疗手段,目前已在临床上广泛用于治疗多种神经疾病,如脑梗死、脑出血等^[4]。基于 HBO 的治疗机理,我们推测 HBO 可能具有保护 DA 神经元的功能,从而为 PD 患者的早期治疗及预防提供一种新的治疗手段。

材料与方法

一、实验材料

1. 主要试剂与仪器:6-OHDA (Sigma 公司), MDA 试剂盒、GSH-Px 试剂盒和 SOD 试剂盒(南京建成生物工程研究所), GFAP、TH (北京中山公司), 高压氧动物实验舱(烟台宏远 G2-Y900-002 型)。

2. 实验动物:共选取体重约 200 ~ 250 g 的雌性 Sprague-Dawley 大鼠 68 只,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

二、实验方法

1. 实验分组:将上述动物随机分为 5 组,包括注射生理盐水高压氧处理组(A 组, $n = 7$)、全程高压氧处理模型组(B 组, $n = 18$)、未给予高压氧处理模型组(C 组, $n = 7$)、造模后高压氧处理组(D 组, $n = 18$)、造模前高压氧处理组(E 组, $n = 18$)。

2. 偏侧帕金森病大鼠模型制备:于实验开始后第 8 天时,将各组大鼠用 10% 水合氯醛(450 mg/kg 体重, ip)麻醉后放置于水平定位仪上,调整齿杆高于耳杆 2 mm,向大鼠(A 组除外)右侧纹状体内分 3 点各注射 6-OHDA (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 加入 Vit C, 使其终浓度为 0.2%) 10 μl , A 组大鼠相同部位则分 3 点注射等量生理盐水 10 μl , 各组注射速度均为 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。上述大鼠的 3 点注射坐标分别为: A 点(前囟后 1.0 mm, 旁正中 3.0 mm, 硬膜下 5.0 mm)、B 点(前囟后 0.1 mm, 旁正中 3.7 mm, 硬膜下 5.0 mm)、C 点(前囟后 1.2 mm, 旁正中 4.5 mm, 硬膜下 5.0 mm)。拔针前须留针 2 min, 然后以 1 mm/min 的速度退针, 随后用补牙胶封颅骨孔并缝合头皮, 再肌注青霉素 100 000 IU。待大鼠清醒

后让其自由摄食、饮水。

3. HBO 处理:于实验开始后第 1 天至第 7 天, 分别给予 A 组、B 组及 E 组大鼠 HBO 处理;从实验开始后第 8 天至结束时, 分别给予 A 组、B 组及 D 组大鼠 HBO 处理。将大鼠置于高压氧舱内, 先用纯氧洗舱 10 min, 然后在 10 min 内缓慢升压至 2.25 ATA 并保持 60 min, 其间稳定通纯氧 10 min, 最后舱内压力于 20 min 内匀速减至常压后大鼠出舱。

4. 动物处理与取材:取 1 ml 阿朴吗啡(APO)行大鼠腹腔注射, 观察注射后 10 min 内大鼠的行为学变化。B、D、E 组分别于造模后第 9 天, 16 天及 21 天时各抽出 6 只大鼠, 于深度麻醉条件下取出其大脑组织, 置于冰盘上分离出双侧纹状体, 用吸水纸吸干后称重, 并立即置于 -70℃ 冰箱内保存;分离出的黑质部脑组织则置入 4% 的多聚甲醛液中固定, 随后脱水、透明并石蜡包埋。

5. 免疫组织化学染色及图像分析:将石蜡包块进行超薄切片, 参照免疫组织化学 ABC 法分别进行酪氨酸羟化酶(TH)及胶质纤维酸性蛋白(GFAP)染色, 各组大鼠均选取 3 张连续脑切片并分析同一部位后计算出平均值。GFAP 经美国 Nikon FX-35DX 图像采集处理系统采图后, 选用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统进行分析, 测量免疫组织化学染色的阳性目标总面积与统计场总面积(面密度)的比值;于光镜下计数 3 张连续切片中同一部位 TH 阳性细胞的数量, 并取平均值。

6. SOD、GSH-Px 活性及 MDA、组织蛋白含量的检测:待标本全部收集后, 置于玻璃匀浆器内, 按 10% 比例加入冰冻生理盐水, 于冰盘上充分匀浆, 制成 10% 的组织匀浆液。参照试剂盒说明书测定标本 MDA 含量(TBA 法), 然后将 10% 组织匀浆液用冰冻生理盐水稀释成 2% 组织匀浆液及 1% 的组织匀浆液, 按试剂盒说明书分别测定 GSH-Px 和 Cu/Zn-SOD 以及 Mn-SOD 活性(黄嘌呤氧化酶法)。用双缩脲法测定组织蛋白含量。

三、统计学分析

所有数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组内左、右侧及组间比较采用 R 软件作 ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠纹状体组织 Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量的比较

A 组两侧纹状体组织 Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 对各组损毁侧进行比较, 发现 C 组损毁侧 Mn-

SOD、Cu/Zn-SOD 及 GSH-Px 活性显著降低,MDA 含量显著增高($P < 0.01$);将 B 组损毁侧与 D、E 组损毁侧进行比较,发现前者 Mn-SOD、Cu/Zn-SOD 以及 GSH-Px 活性显著增高($P < 0.01$),MDA 含量显著降低($P < 0.01$);与 E 组损毁侧比较,发现 D 组损毁侧 Mn-SOD、Cu/Zn-SOD 及 GSH-Px 活性均明显增高($P < 0.05$),MDA 含量显著降低($P < 0.05$),具体数据详见表 1。

二、各组大鼠黑质区域 GFAP 表达水平比较

C 组大鼠损毁侧黑质区域星形胶质细胞较 A 组明显增多($P < 0.01$),同时伴有细胞形态改变,如星形胶质细胞胞体肥大,突起增粗、变长,染色加深等,A 组大鼠黑质区域 GFAP 阳性细胞呈散在分布,且阳性细胞胞体较小;B、D、E 组损毁侧黑质区域 GFAP 表达水平明显较对照侧减弱($P < 0.01$),其星形胶质细胞胞体较小,突起变细、变短,其中以 B 组及 D 组的星形胶质细胞胞体变化最为显著(图 1,3~7)。

三、各组大鼠黑质区域 TH 阳性细胞数目比较

A 组黑质区域 TH 阳性细胞密集,呈多角形。C 组损毁侧 TH 阳性细胞数量显著减少($P < 0.01$),较对照侧减少了 65.2%,细胞呈圆形,着色浅,突起少见,其形态变化以损伤后第 21 天时最为明显。与 C 组比较,B、D、E 组损毁侧黑质区域 TH 阳性细胞数均显著增多

($P < 0.05$),其细胞形态也呈圆形,着色浅,突起明显增多,可见多角细胞,B 组及 D 组细胞形态变化在损伤后第 16 天时最为显著,其突起数量较损伤后第 9 天时明显增多,而第 21 天与第 16 天时比较,差异无统计学意义(图 2,8~12)。

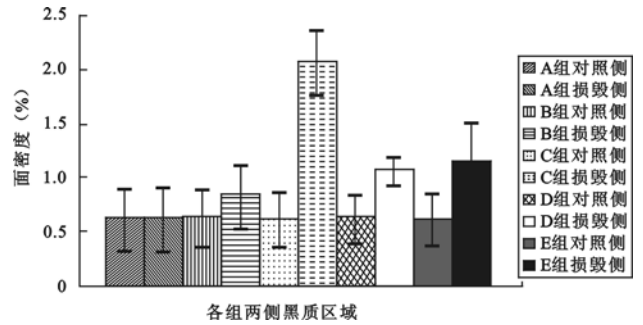


图 1 各组大鼠黑质区域 GFAP 表达变化的比较

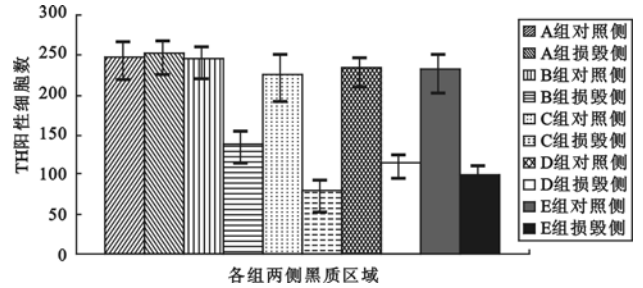


图 2 各组大鼠黑质区域 TH 阳性细胞数目的比较

表 1 各组大鼠纹状体组织 Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Mn-SOD(U/mg)	Cu/Zn-SOD(U/mg)	GSH-Px(U/mg)	MDA(nmol/mg)
A组 左侧	41.354 ± 7.858	34.263 ± 2.261	26.715 ± 5.708	1.717 ± 0.73
右侧	46.803 ± 6.755	34.592 ± 5.273	34.830 ± 8.436	3.442 ± 1.471
B组 损毁侧(右侧)	37.747 ± 9.459 *	25.159 ± 8.171 *	23.069 ± 5.306 *	7.287 ± 1.718 *
C组 损毁侧(右侧)	5.656 ± 2.471	5.677 ± 1.643	3.916 ± 1.774	26.901 ± 4.379
左侧	20.419 ± 4.093	18.393 ± 0.588	20.404 ± 1.431	3.642 ± 0.098
D组 损毁侧(右侧)	26.421 ± 5.667 *#△	22.216 ± 9.446 *△	23.788 ± 12.988 *#△	10.743 ± 1.169 *#△
E组 损毁侧(右侧)	20.056 ± 3.305 *#	17.636 ± 1.782 *#	13.758 ± 1.281 *#	16.138 ± 2.575 *#

注:各组损毁侧(右侧)与 C 组损毁侧(右侧)比较,* $P < 0.01$;B 组与 D、E 组损毁侧比较,# $P < 0.01$;D 组与 E 组损毁侧比较,△ $P < 0.05$

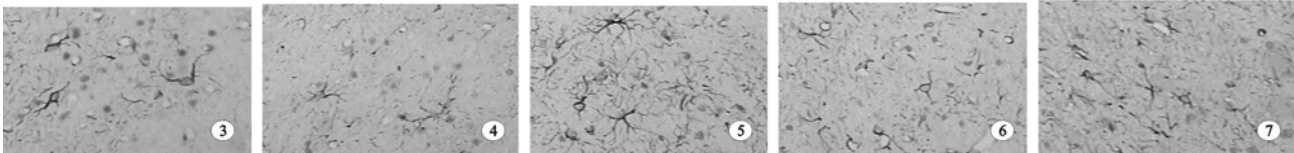


图 3 A 组右侧黑质区域 GFAP 表达($\times 400$); 图 4 B 组右侧黑质区域 GFAP 表达($\times 400$); 图 5 C 组右侧黑质区域 GFAP 表达($\times 400$); 图 6 D 组右侧黑质区域 GFAP 表达($\times 400$); 图 7 E 组右侧黑质区域 GFAP 表达($\times 400$)

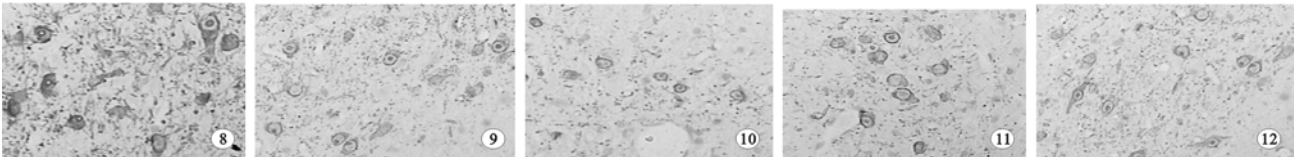


图 8 A 组右侧黑质区域 TH 阳性细胞($\times 400$); 图 9 B 组右侧黑质区域 TH 阳性细胞($\times 400$); 图 10 C 组右侧黑质区域 TH 阳性细胞($\times 400$); 图 11 D 组右侧黑质区域 TH 阳性细胞($\times 400$); 图 12 E 组右侧黑质区域 TH 阳性细胞($\times 400$)

讨 论

HBO 治疗可以提高动脉氧分压,维持脑组织氧供,增强 Na^+/K^+ -ATP 酶活性以及脑组织对葡萄糖的利用率,提高自由基清除酶系统的功能,抑制自由基对脑组织的损害,促进受损脑组织的修复及神经功能恢复,故目前在临床上广为应用。前苏联 Neretin 等^[5]曾对 PD 患者进行 HBO 治疗,结果表明 HBO 能明显改善 PD 患者的僵直症状,但对震颤的改善效果不是很明显。赵伟秦等^[6]研究发现,HBO 治疗可部分缓解由 MPTP 诱发的小鼠黑质纹状体区 DA 及其代谢产物的耗竭,于电镜下观察发现,其轴索肿胀及神经细胞缺血性改变亦明显轻于未经 HBO 处理的模型组,但在行为学改变及黑质区神经细胞脱失方面则组间差异不显著。

GFAP 是星形胶质细胞的特异性标志物。目前有多项研究表明,星形胶质细胞可分泌 TNF- α 、IL-1 及 IL-6 等细胞因子,诱导免疫炎症反应参与 DA 能神经元的损伤过程^[7,8]。C 组损毁侧黑质-纹状体内星形胶质细胞明显增生,同时伴有细胞形态改变,如细胞胞体肥大、突起增粗、变长、染色加深等,提示 6-OHDA 可能通过诱导星形胶质细胞增生,引发免疫炎症反应而导致 DA 能神经元损伤。本研究结果提示 HBO 治疗可显著抑制星形胶质细胞增生及由其引发的免疫炎症反应,增强 DA 能神经元对 6-OHDA 的耐受能力,起到保护 DA 能神经元及促进其功能恢复的功效。

本研究同时发现,6-OHDA 可导致大鼠损毁侧 GSH-Px 及 SOD 酶活性降低,黑质-纹状体内自由基浓度增高,造成黑质-纹状体内 DA 能神经元损伤;而 GSH-Px 和 SOD 是体内最主要的自由基清除酶物质,通过 HBO 处理能大大提高这两种酶的含量,从而加快自由基的清除,保护 DA 能神经元,降低脂质过氧化程度。另有研究发现,只有当黑质-纹状体内 DA 能神经元较正常数量减少超 90% 时(即处于 PD 晚期)才会出现典型的 PD 症状,也只有在此时才会出现由 APO 引发的旋转行为^[9]。本实验结果发现,C 组损毁侧黑质区域残余 TH 阳性神经元数量较对侧减少了 65.2%,且未观察到 APO 引发的旋转行为,符合早期 PD 的病理特征^[10];且该组损毁侧 TH 阳性神经元着色较正常细胞浅,胞体呈圆形,突起较少,其形态变化程度随时间进展逐渐加剧,以损伤后第 21 天时最为明显,而染色水平则未见明显改变,说明 6-OHDA 对 DA 能神经元的毒性作用较持久。经 HBO 处理后的各组损毁侧黑质区域内 TH 阳性神经元数

量均较 C 组明显增多,其 TH 阳性细胞胞体呈圆形,着色浅,突起明显增多,并可见多角形细胞,持续吸氧和预防性吸氧大鼠以损伤后第 16 天时的细胞形态改变最为显著,细胞突起较第 9 天时明显增多,而第 21 天与第 16 天时比较,差异无统计学意义,表明 HBO 治疗可以保护 DA 能神经元,对抗 6-OHDA 的神经毒性作用。

综上所述,HBO 治疗可以通过抑制星形胶质细胞增生,提高黑质-纹状体内 GSH-Px 及 SOD(包括 MnSOD 和 Cu/Zn-SOD)活性,降低脂质过氧化水平,加快自由基清除速度,从而增强 DA 能神经元对 6-OHDA 的耐受能力,促进其神经功能恢复。虽然本次研究结果提示 HBO 是一种潜在可用于预防和治疗 PD 患者的手段,但其临床应用是否能够有效延缓 PD 患者的病情进展、显著改善 PD 患者的症状仍需进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Dawson TM, Dawson VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*, 2003, 302:819-822.
- 2 Chung KK, Dawson VL, Dawson TM. New insights into Parkinson's disease. *J Neurol*, 2003, 250:15-24.
- 3 高春锦,杨捷云,编著.实用高压氧学.北京:学苑出版社,1997.212-214.
- 4 Masic-Pelcic J, Pelcic G, Vitezic D, et al. Hyperbaric oxygen treatment: the influence on the hippocampal superoxide dismutase and Na^+ , K^+ -ATPase activities in global cerebral ischemia-exposed rats. *Neurochem Int*, 2004, 44:29-38.
- 5 Neretin Vla, Lobov MA, Kotov SV, et al. Hyperbaric oxygenation in the complex treatment of Parkinson disease. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 1989, 89:38-40.
- 6 赵伟秦,童启进,孟杰,等.高压氧对 MPTP 引起的小鼠帕金森综合征行为、超微结构和生化改变的影响. *中华航海医学杂志*, 1997, 4:172-177.
- 7 Mogi M, Togari A, Tanaka K, et al. Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)- α in 6-OHDA-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on TNF- α induction. *Neurosci Lett*, 1999, 268:101-104.
- 8 曹学兵,王涛,孙圣刚,等.左旋多巴治疗影响实验性帕金森病大鼠黑质纹状体 TNF- α 表达的研究. *临床神经病学杂志*, 2002, 15:15-17.
- 9 Deniz K, Carl R, Anders B. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastratial 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol*, 1998, 152:259-277.
- 10 XU Y, SUN S, CAO X. The protective effect of glutathione on dopaminergic neurons. *J Tongji Med Univ*, 2002, 22:355-358.

(收稿日期:2005-03-20)

(本文编辑:易 浩)