

· 基础研究 ·

强制性运动训练对帕金森病大鼠酪氨酸羟化酶及胶质细胞源性神经营养因子表达的影响

黄月 张善锋 任秀花 张杰文

【摘要】目的 观察强制性运动训练对帕金森病(PD)模型大鼠酪氨酸羟化酶(TH)及胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)表达的影响。**方法** 共选取 50 只 SD 大鼠,采用 6-羟基多巴胺(6-OHDA)单侧两点注射法制备 PD 动物模型,1 周后将制模成功的 42 只大鼠随机分为运动组及对照组。运动组通过石膏固定健侧前肢,从而强制大鼠使用患侧肢体;对照组制模后未给予特殊处理。待 2 周训练结束后,每组大鼠腹腔注射阿朴吗啡(APO)进行行为学测试,记录 30 min 内转圈数量;然后处死大鼠取脑纹状体制成标本,采用高效液相-电化学法测定各组大鼠纹状体内多巴胺(DA)及其代谢物 3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)含量;采用免疫组化技术检测各组大鼠纹状体 TH 及 GDNF 表达情况,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定 TH 及 GDNF mRNA 表达。**结果** 与对照组比较,运动组在 APO 诱导下 30 min 内转圈数量显著减少($P < 0.05$);运动组纹状体匀浆中 DA 及其代谢物 DOPAC 含量显著增加($P < 0.05$);运动组纹状体 TH、GDNF 蛋白及 mRNA 表达均显著强于对照组($P < 0.05$)。**结论** 强制性运动训练可改善 PD 大鼠行为学功能,其机制可能与促进大脑纹状体 TH 及 GDNF 表达、提高 DA 及其代谢产物 DOPAC 含量有关。

【关键词】 强制性运动训练; 帕金森病; 多巴胺; 酪氨酸羟化酶; 胶质细胞源性神经营养因子

The effects of constraint-induced movement therapy on expression of tyrosine hydroxylase and glial cell derived neurotrophic factor in Parkinson's disease model rats HUAGN Yue*, ZHANG Shan-feng, REN Xiu-hua, ZHANG Jie-wen. * Department of Neurology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: ZHANG Jie-wen, Email: zhangjiwen9900@126.com

【Abstract】Objective To explore the effects of constraint-induced movement therapy (CIMT) on the expression of tyrosine hydroxylase (TH) and glial cell derived neurotrophic factor (GDNF) in Parkinson's disease (PD) model rats. **Methods** PD models were established by microinjection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) solution into substantia nigra of rats' right cerebral hemisphere. Forty-two model rats were divided randomly into an exercise group and a control group 1 week after microinjection. The exercise group rats were forced to use their impaired limbs by placing their nonimpaired fore-limbs in casts. The control group rats were housed in the same environment without any special treatment. Two weeks after 6-OHDA infusion and exercise training, the behavioral changes of rats were examined after intraperitoneal injection apomorphine (APO). The content of dopamine (DA) and dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) was measured by high performance liquid chromatography with electrochemistry (HPLA-EC); the expressions of TH and GDNF in striatum were detected by immunohistochemical methods and TH, GDNF mRNA were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** After 2 weeks of training, the rotating laps of the rats in exercise group within 30 min after APO induction, reduced to a significantly greater extent when compared to the control group ($P < 0.05$). The content of DA and its metabolites DOPAC in striatum homogenate was significantly higher in exercise group than that in the control group ($P < 0.05$), and the expression levels of TH and GDNF protein/ mRNA were also significantly higher in the exercise group than those in control group ($P < 0.05$). **Conclusions** CIMT can improve the behavioral performance of PD rats, probably through promoting the expressions of TH and GDNF protein/mRNA in striatum, and increasing DA and its metabolites DOPAC level.

【Key words】 Constraint-induced movement therapy; Parkinson's disease; Dopamine; Tyrosine hydroxylase; Glial cell derived neurotrophic factor

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.01.003

作者单位:450003 郑州,河南省人民医院神经内科(黄月、张杰文);
郑州大学基础医学院(张善锋、任秀花)

通信作者:张杰文;Email:zhangjiwen9900@126.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是神经系统常见的退行性疾病,患者主要临床症状包括静止性震颤、肢体僵硬、运动迟缓、姿势异常等,其主要病理改变是黑质多巴胺(dopamine, DA)能神经元变性,导致纹状

体内 DA 及其代谢产物 3,4-二羟基苯乙酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC) 含量明显减少^[1]。本研究通过对 PD 模型大鼠给予强制性运动训练(constraint-induced movement therapy, CIMIT), 观察该疗法对 PD 大鼠行为功能、纹状体 DA、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH) 及胶质细胞源性神经营养因子(glial derived neurotrophic factor, GDNF) 表达的影响, 从而为临床应用 CIMIT 治疗 PD 患者提供参考依据。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及主要试剂

共选取健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 50 只, 5 月龄, 雌雄各半, 质量 250 ~ 300 g, 由河南省实验动物中心提供。主要实验试剂包括: 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)、阿朴吗啡(apomorphine, APO)、DA 及 DOPAC 标准品购自美国 Sigma 公司; RT-PCR 试剂盒购自美国 Transgene 公司, TH 免疫组化试剂盒购自美国 RD 公司, TH 及 GDNF 引物购自北京三博远志基因技术公司。

二、PD 模型制作

上述 50 只大鼠采用体积分数为 4% 水合氯醛按每千克体重 400 mg 进行腹腔注射麻醉, 待麻醉剂生效后, 将大鼠固定于脑立体定位仪上, 参照大鼠脑立体定位图谱, 采用单侧两点注射法制备 PD 大鼠模型, 选择右侧黑质作为注射点, 注射位点分别为: ①前囟后 5.2 mm, 正中右侧 1.0 mm, 硬膜下 8.0 mm; ②前囟后 5.2 mm, 正中右侧 2.5 mm, 硬膜下 7.8 mm。选用 10 μ l 微量进样器向上述位点注入 6-OHDA 共 12 μ g, 注射速度为 1 μ l/min, 每孔注射 6 μ l。每点注射完毕后均留针 15 min, 然后缓慢退出微量进样器, 采用明胶海绵填充钻孔并缝合皮肤切口。术后大鼠腹腔注射青霉素(20 U/d) 1 周以预防感染。于术后 1 周时按每千克体重 0.5 mg 向大鼠腹腔注射 APO 诱发其转圈, 记录 30 min 内转圈数量。若大鼠身体首尾相接、转向恒定且转圈数量超过 7 r/min, 则视为 PD 模型大鼠制作成功, 去除死亡及制模未成功大鼠, 共有 42 只大鼠制模成功。采用随机数字表法将其分为运动组(22 只) 及对照组(20 只)。

三、制模后处理

于制模结束后将运动组大鼠右侧肢体(即健侧前肢)固定于石膏中, 固定时使健侧前肢相对于胸骨呈自然屈曲状态, 迫使大鼠使用对侧前肢(即患侧前肢)活动, 固定时间持续 2 周; 对照组大鼠制模后未给予特殊处理。2 组大鼠均被安置在透明、含有木屑的有机玻璃笼内喂养, 每笼 4 ~ 5 只, 自然昼夜节律光照, 期间

自由摄食、饮水。

四、行为学检查和脑内 DA 及 DOPAC 含量检测

于实验进行 2 周后进行行为学检查, 具体方法如下: 2 组大鼠(运动组大鼠于检查前去除石膏固定)均按每千克体重 0.5 mg 腹腔注射阿朴吗啡(APO), 诱发其向健侧转圈, 记录 30 min 内大鼠转圈数量。待行为学检查结束后, 运动组取 6 只、对照组取 5 只大鼠采用高效液相-电化学法(high performance liquid chromatography with electrochemistry, HPLA-EC) 检测 DA 及 DOPAC 含量, 具体操作如下: 选用体积分数为 4% 水合氯醛按每千克体重 400 mg 进行腹腔注射麻醉, 待麻醉剂生效后快速切取右侧纹状体组织, 并置入 0.4 mol/L 高氯酸溶液中于冰上匀浆离心(2000 r/min) 20 min, 取上清液加入钾盐溶液混匀离心(2000 r/min) 20 min, 再取上清液用高效液相色谱仪检测 DA 及 DOPAC 含量。

五、大鼠纹状体 TH 及 GDNF 免疫组化染色

待行为学检查结束后, 运动组取 6 只、对照组取 5 只大鼠采用体积分数为 4% 水合氯醛按每千克体重 400 mg 进行腹腔注射麻醉, 经左心室由体循环灌注 250 ml 生理盐水, 然后再灌入预冷 4% 多聚甲醛 250 ml, 提取纹状体组织, 置入 4% 多聚甲醛中固定过夜, 后经脱水、浸蜡、包埋、切片、烘片、二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水等处理, 按照 SP 法进行酪氨酸羟化酶(TH) 及胶质细胞源性神经营养因子(GDNF) 免疫组化染色, DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封片。TH、GDNF 阳性细胞均为胞浆着色, DAB 染色显示为棕黄色或棕褐色。每只大鼠选取纹状体部位 5 张切片, 在显微镜下随机计数 5 个视野的阳性细胞数量, 取其平均值纳入统计分析。

六、大鼠纹状体 TH 及 GDNF mRNA 检测

待行为学检查结束后, 每组取 10 只大鼠采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测其纹状体内 TH 及 GDNF mRNA 表达, 首先快速提取大鼠右侧纹状体组织并迅速投入液氮中, 采用 Trizol 法提取脑组织中总 RNA, 根据 RT-PCR 试剂盒说明书加样, 各指标上、下游引物均为 1 μ l, 总反应体系为 50 μ l。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参照, TH 上游引物序列为: TCTGGAACGGTACTGTG-GCT, 下游引物序列为: CAATGTCCTGGGAGAACTGG; GDNF 上游引物序列为: TCTGCCTGGTGTTCCTCC, 下游引物序列为: GTTCCTCCTTGGTTTCGT; GAPDH 上游引物序列为: CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT; 下游引物序列为: AGGGGCCATCCACAGTCTTC。RT-PCR 反应条件如下: 94℃ 预变性 2 min, 1 个循环; 94℃ 变性 30 s, 退火

30 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环; 末轮循环后 72℃ 延伸 6 min, 待扩增结束后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。采用凝胶成像系统分析目标 RNA 扩增产物与内参 GAPDH 扩增产物的积分光密度值 (integrated optical density, IOD), 并计算二者的比值 ($IOD_{\text{目标基因}} / IOD_{\text{GAPDH}}$), 将其作为目标 RNA 的相对表达量。

七、统计学分析

本研究所得数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 11.0 版统计学软件包进行数据分析, 组间比较选用 *t* 检验, 均采用双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、2 组大鼠行为学检查结果比较

对 2 组大鼠行为学检查结果比较后发现, 运动组大鼠自主活动较对照组增多, 自主觅食能力明显增强, 活动范围增大; 2 组大鼠分别利用 APO 诱发旋转并记录 30 min 内旋转圈数, 结果显示运动组大鼠旋转圈数为 (9.56 ± 1.03) 圈, 显著少于对照组的 (11.48 ± 1.29) 圈, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

二、2 组大鼠纹状体 DA 及 DOPAC 含量比较

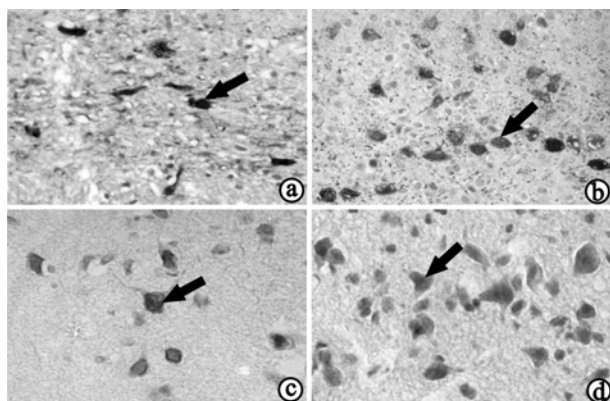
通过高效液相-电化学法检测 2 组大鼠损毁侧纹状体匀浆液中 DA 及 DOPAC 含量, 结果显示运动组大鼠纹状体内 DA、DOPAC 含量分别为 (0.516 ± 0.071) nmol/L 和 (0.183 ± 0.023) nmol/L, 均较对照组相应含量 [该组大鼠 DA 为 (0.371 ± 0.042) nmol/L, DOPAC 为 (0.139 ± 0.017) nmol/L] 显著增高, 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

三、2 组大鼠 TH 及 GDNF 免疫组化结果比较

2 组大鼠纹状体标本经免疫组化染色后, 通过光镜观察发现 2 组大鼠纹状体区均可见阳性物 (呈棕黄色颗粒) 分布于神经元胞浆中, 其中运动组大鼠纹状体区 TH 及 GDNF 免疫阳性细胞数量相对较多, 着色明显, 每高倍镜视野免疫阳性细胞数分别为 (14.96 ± 1.61) 个和 (19.37 ± 2.32) 个; 对照组 TH 及 GDNF 免疫阳性细胞数量相对较少, 着色较淡, 每高倍镜视野阳性细胞数分别为 (3.37 ± 0.42) 个和 (5.61 ± 0.69) 个; 经统计学比较发现, 运动组纹状体区 TH 及 GDNF 免疫阳性细胞数量均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 2 组大鼠 TH 及 GDNF 免疫组化结果详见图 1a-d。

四、2 组大鼠 TH 及 GDNF mRNA 比较

经 RT-PCR 检测后发现, 运动组纹状体区 TH 及 GDNF mRNA 表达量分别为 (0.164 ± 0.023) 和 (0.345 ± 0.039), 明显高于对照组 TH (0.103 ± 0.015) 及 GDNF (0.216 ± 0.024) 水平, 组间差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 2 组大鼠 TH 及 GDNF 电泳图详见图 2。



注: a 为对照组 TH 阳性细胞 (箭头示, $\times 200$); b 为运动组 TH 阳性细胞 (箭头示, $\times 200$); c 为对照组 GDNF 阳性细胞 (箭头示, $\times 400$); d 为运动组 GDNF 阳性细胞 (箭头示, $\times 400$)

图 1 2 组大鼠纹状体区 TH 及 GDNF 免疫组化结果比较

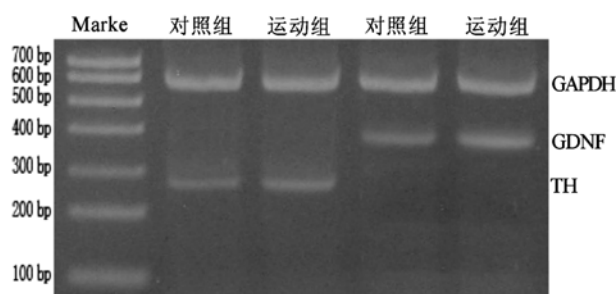


图 2 2 组大鼠纹状体区 TH 及 GDNF mRNA 表达

讨 论

帕金森病 (PD) 是一种多发于中老年人群且进展缓慢的神经系统变性疾病, 其发病率随年龄增长而增高, 给患者日常生活及工作均带来严重影响。关于 PD 的发病机制目前尚未明确, 环境毒素、遗传易感性、年龄老化、氧化应激等因素均可损伤 DA 能神经元, 参与 PD 发病过程^[2-4]。

目前研究已证明, 大脑纹状体 DA 与乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 两大神经递质系统的功能相互拮抗, 其动态平衡对维持基底核功能具有重要作用。PD 患者纹状体内 DA 含量显著降低, 造成乙酰胆碱系统功能相对亢进, 从而引发一系列神经系统症状^[4]。TH 是一种非血红素铁蛋白, 同时也是神经系统 DA 能神经元的标志蛋白之一, 它是中枢神经系统内合成 DA 的限速酶及关键靶点, 与体内其它参与 DA 合成的催化酶比较, TH 具有含量较低、且底物专一等特点^[4-5]。胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 是 20 世纪 90 年代初 Lin 等^[5] 从大鼠胶质细胞系 B49 的无血清培养基中浓缩、分离得来, 对 DA 能神经元具有特异性的营养、支持、保护和修复作用。相关动物实验发现, GDNF 能激活体外培养的大鼠胚胎

中脑腹侧 DA 能神经元摄取 DA,促进神经元存活^[6];同时还有研究证实,GDNF 能保护 DA 能神经元免受各种毒素损害,修复黑质纹状体受损功能^[7-8]。由此可见,通过各种手段促进纹状体 TH 及 GDNF 表达、提高脑内 DA 及其代谢产物 DOPAC 含量,对改善 PD 患者症状具有重要意义。

目前临床治疗 PD 的方法主要有药物、手术、细胞移植及基因治疗等,尽管上述方法已被证实具有一定作用,但总体疗效有待提高。近年来针对 PD 患者的康复干预越来越受到重视,大量临床研究发现,运动训练对各种神经退行性疾病(包括 PD、老年痴呆、脑卒中等)均有一定疗效^[9-10],能促进受损神经元存活、加速神经再生及大脑血管形成、增强学习和记忆功能,并且对维持机体认知功能具有重要作用^[11-12]。Lau 等^[13]等研究发现,强化运动训练能阻止慢性 PD 模型小鼠 DA 能神经元丢失,同时还能促进其行为学功能恢复;Tillerson 等^[14]通过迫使 PD 大鼠使用健侧肢体,发现对其患侧肢体功能恢复非常不利,该组大鼠较对照组表现出更严重的运动功能缺损,并且其纹状体内 DA 含量较对照组降低了 50% 以上。

本研究也得到类似结果,如运动组大鼠于制模后将其健侧肢体固定于石膏中,迫使大鼠使用患侧肢体活动,经 2 周训练后,通过行为学检查发现运动组大鼠自主活动增强,自主觅食能力提高,活动范围增大,并且由 APO 诱发的转圈效应亦显著减轻($P < 0.05$);脑组织生化检查显示运动组大鼠 TH 阳性神经元及内源性 GDNF 表达均显著强于对照组($P < 0.05$),纹状体内 DA 及 DOPAC 含量亦较对照组显著提高($P < 0.05$)。以上结果表明,强制性运动训练可改善 PD 大鼠行为学功能,其治疗机制可能与促进纹状体内源性神经营养因子 GDNF 和 TH 表达、减少或阻止 DA 能神经元丢失,进而提高 DA 及其代谢产物 DOPAC 含量有关。另外值得注意的是,虽然本实验显示强制性运动训练可改善 PD 大鼠神经系统症状,但关于强制性运动训练的介入时机、持续时间等均有待后续研究进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Goren B, Kahveci N, Eyigor O, et al. Effects of intranigral vs intrastriatal fetal mesencephalic neural grafts on motor behavior disorders in a rat Parkinson model. *Surg Neurol*, 2005, 64:33-44.
- [2] Riess O, Kruger R, Hochstrasser H, et al. Genetic causes of Parkinson's disease: extending the pathway. *J Neural Transm*, 2006, 70:181-189.
- [3] Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 2003, 53:S26-36.
- [4] Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 2000, 3:1301-1306.
- [5] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 1993, 260:1130-1132.
- [6] 张文华, 王晓民, 吴承远, 等. 人胶质细胞源性神经营养因子基因工程细胞保护多巴胺能神经元的实验研究. *中华医学杂志*, 2001, 81:1384-1386.
- [7] Gill SS, Patel NK, Hotton GR, et al. Direct brain infusion of glial cell line derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. *Nat Med*, 2003, 9:589-595.
- [8] Slevin JT, Gerhardt GA, Smith CD, et al. Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson's disease through the unilateral intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosurg*, 2005, 102:216-222.
- [9] Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, et al. Neurobiology of exercise. *Obesity*, 2006, 14:345-356.
- [10] 吴冰洁, 姜建勇, 孙咏虹, 等. 运动对快速老化小鼠海马 β -淀粉样蛋白及淀粉样蛋白前体蛋白的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2011, 33:2-5.
- [11] Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, et al. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104:5638-5643.
- [12] van Praag H, Shubert T, Zhao C, et al. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*, 2005, 25:8680-8685.
- [13] Lau YS, Patki G, Das PK, et al. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *Eur J Neurosci*, 2011, 33:1264-1274.
- [14] Tillerson JL, Cohen AD, Caudle WM, et al. Forced nonuse in unilateral parkinsonian rats exacerbates injury. *Neurosci*, 2002, 22:6790-6799.

(修回日期:2011-11-12)

(本文编辑:易 浩)

本刊办刊方向:

立足现实 关注前沿 贴近读者 追求卓越