

医药卫生

完全毁损型偏侧帕金森病大鼠模型的行为及影像特征

王志忠 姚 昊 欧阳小辉 何宝明 张 婷

(解放军第三零九医院核医学科,北京 100091)

摘 要 为研究完全毁损型偏侧帕金森病大鼠模型的行为和影像学改变,建立完全毁损型偏侧帕金森病大鼠模型。观察模型大鼠在自然状态下和阿朴吗啡诱导中出现的异常行为学改变, Micro-PET 模型大鼠神经系统功能改变。帕金森病大鼠模型在行为学上表现了在自发状态下的患肢运动感觉能力降低。在阿朴吗啡诱导下出现对侧旋转及异常不自主运动。影像学上表现为损毁侧纹状体内多巴胺转运蛋白缺失及损毁侧纹状体、皮层及丘脑的功能活性降低。说明完全毁损型偏侧帕金森病大鼠模型表现为单侧肢体的运动感觉功能障碍和损毁侧纹状体内多巴胺能神经末梢的缺失及相应区域的脑功能降低,类似于人类严重的帕金森末期阶段强直运动功能障碍的表现。

关键词 帕金森大鼠模型 异常不自主运动 正电子发射断层扫描

中图法分类号 R322.81; **文献标志码** B

帕金森病(Parkinson disease, PD)是发病机理与脑内的黑质—纹状体系统中多巴胺(dopamine DA)含量减少有关神经系统变性疾病,主要临床症状常为震颤、肌强直以及运动迟缓。大鼠动物模型是将神经毒素(6—hydroxydopamine, 6—OHDA)注射到大鼠中脑可以造成中脑黑质部位的多巴胺能神经元特异性损伤,从而造成PD动物模型。这一模型自20世纪70年代初创立以来已经在PD发病机理、诊断和治疗的研究中发挥了重要作用。但是这种模型往往以旋转的程度来判断模型的建立和判断病情的严重程度,与临床上的震颤、肌肉强直及运动迟缓在机制上相关性不大。本试验通过观察模型大鼠,在药物诱导和自然状态下的感觉运动行为异常改变,并通过正电子断层扫描显像技术对大鼠脑功能进行观察,判断大鼠多巴胺神经元的状况,指标更贴近人PD的临床特点。

1 材料和方法

1.1 材料

雌性wistar大鼠体重(180—250)g,由解放军总医院动物实验中心提供。实验所用6-羟基多巴(6—hydroxydopamine, 6—OHDA)、阿朴吗啡购自SIGMA公司,2 β —甲基酯-3 β -(4—F—苯基)去甲基托烷购自德国ABX公司。脑立体定位仪和微量注射泵为美国STOELTING公司。动物自转测试仪为北京新天地科技公司。Micro-PET为中国科学院高能物理所研制。

1.2 方法

1.2.1 完全毁损型偏侧帕金森病大鼠模型建立^[1]

大鼠用10%水合氯醛溶液腹腔注射麻醉(4 mg/kg),固定于脑立体定位仪上。剪去头顶部毛发后,碘酒、酒精消毒,切开皮肤及筋膜,暴露颅骨。参考Paxinos和Watson图谱,将右侧MFB两点选定为:第一点,门齿线(TB)高于水平线3.4 mm、AP(距前囟中心后)4.0 mm、LR(距中线右)0.8 mm,硬脑膜下8.0 mm;第二点,门齿线(TB)低

2011年5月30日收到

第一作者简介:王志忠(1975—),男,解放军第309医院核医学科主治医师,博士,研究方向:神经系统核医学。

于水平线 2.3 mm, AP(距前囟中心后)4.4 mm LR(距中线右)1.2 mm,硬脑膜下 7.8 mm。钻开表面颅骨,用微量注射器抽取新鲜配制的 6-OHDA 液(3.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),一次性进针到位点,停针 5 min 后,以 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度缓慢推药,两点分别给药 3 μL ,注射完毕留针 10 min;以 1 m/min 的速度缓慢退针。拔针后彻底止血、缝合皮肤、碘酒消毒。对照组大鼠用生理盐水代替 6-OHDA,其它的操作同模型组。术后两周应用阿朴吗啡(0.25 mg/kg)皮下注射后,放置动物自转测试仪内记录 40 min 内旋转圈数,每周检测 1 次,向对侧旋转次数平均大于 7 圈/min 者为阳性,连续 3 周阳性者为合格的 PD 模型大鼠。

1.2.2 药物诱导行为检测

应用阿朴吗啡后,观察大鼠在药物诱导下的异常行为,包括表现包括对侧旋转行为和刻板动作^[2]。刻板动作表现为异常不自主运动(abnormal involuntary movement AIM),包括损毁对侧上肢节律性不自主拍击(前肢 AIM);头颈、躯干向损毁对侧弯曲及扭转(轴性 AIM);不自主咀嚼、舔食动作等(口面部 AIM)。

1.2.3 自发的运动感觉功能障碍^[3]

(1)观测大鼠在自然状态下运动状况。(2)调整步态的试验:一手握住大鼠的后部,非测试的前肢用另一只手固定在动物的体侧。动物轻度倾斜,使得非测试前肢的肩膀高于测试前肢的肩膀,大鼠的后部高于头部。将动物横向移动,5 s 内移动 0.9 m。记录前手方向(远离测试前肢)测试前肢的跨步次数,右前肢先测,左前肢后测。每天两个前肢都做两次测试,连续测 3 天。(3)前肢启动时间测定:抓握大鼠方法同上,将测试前肢置于桌面,记录测试从接触桌面开始到前肢开始出现调整运动的时间。(4)圆柱内的测试:将大鼠置于透明的直径为 40 cm 圆柱体容器内。观察大鼠应用两前肢接触桶壁的情况,应用录像机记录。计数 20 次接触,分析左侧前肢接触比例。

1.2.4 帕金森大鼠脑功能的影像学检测

大鼠 DAT 显像:大鼠尾静脉注射¹¹C- β -CFT 4 mCi 30 min 后,水合氯醛溶液麻醉,大鼠置于 Micro

PET 下,扫描视野包括大鼠整个脑部及颈部,记录一千万个计数,滤波反投影图像重建,图像为 $128 \times 128 \times 64$ 形式。应用 MRIcro 软件计算左右纹状体感兴趣区(VOI)的素值,选取双侧小脑为本底,计算各感兴趣区的标准结合率,比较毁损侧和对照侧。

标准结合率(SBR) = (感兴趣区像素值 - 本底像素值)/本底像素值。

大鼠 FDG 显像:大鼠尾静脉注射 FDG 2.5 mCi 30 min 后,水合氯醛溶液麻醉,大鼠置于 Micro PET 下,扫描视野包括大鼠整个脑部及颈部,记录三千万个计数,滤波反投影图像重建,图像为 $128 \times 128 \times 64$ 形式。应用 MRIcro 软件计算左右纹状体、皮层和丘脑的 FDG 的像素值,通过各感兴趣的比值来计算左右脑区的差异。

1.3 统计学分析

观察所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,模型与对照大鼠组间的比较采 t 检验,模型大鼠显像的结果,比较损毁侧和对侧的脑区的变化也采取 t 检验, $p < 0.05$ 为差异具有统计学意义,所有的统计学都应用 EXCEL 软件进行。

2 结果

2.1 模型大鼠自发行行为的改变

2.1.1 模型成功大鼠

表现为左侧身体的功能低下,自然状态下,头部偏向右侧,同时表现出患侧的清洁功能缺失,左侧躯干毛发不清洁(图 1 A);当提起大鼠尾巴,大鼠呈向右侧旋转,术前及不旋转大鼠不表此特性。

2.1.2 左侧前肢

表现为感觉和运动的功能低下,调整步态试验显示左侧前肢的跨步次数明显减少和缺失,同时左侧前肢的启动反应时间较对侧延长。应用患侧前肢接触桶壁的比例明显降低。见表 1。

2.2 阿朴吗啡诱导所致模型大鼠的异常非自主运动

大鼠在皮下注射阿朴吗啡后在(1~5) min 内开始出现向毁损对侧(左侧)旋转,表现为头部和躯干向对侧侧弯,以躯干为动力,右侧后肢为轴,其余

三个肢体被动调整,向对侧旋转。大鼠向对侧旋转同时表现为身体轴的姿势不正常,头部、躯干扭向左后背侧,呈坐立状,重心在右侧后肢(图1B);不能保持平衡时,出现轴向扭转,更严重的大鼠不能保持身体的直立造成大鼠躺倒,腹部向上,此时大鼠旋转不能,头部重复的节律性向左背侧扭转。肢体的运动障碍:左侧前肢重复的节律性的收缩和姿势不自然,右侧前肢不断的抓挠左侧前肢。咀嚼功能障碍:大鼠在处于扭转状态同时,表现为重复咀嚼运动,伸舌并舔食、撕咬左侧躯干的皮毛。

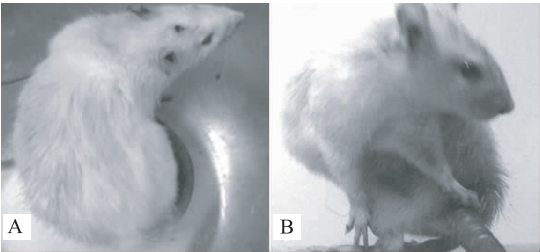


图1 A 为大鼠在自然状态下的姿态,身体向毁损(右侧)弯曲,尾部也是弯向右侧,并且表现出半侧的清洁能力降低,对侧(左侧)躯干部毛发不整洁。B 为当大鼠给予多巴胺受体激动剂(阿朴吗啡)后,表现为姿态向对侧(左侧)扭转,尾部弯向左侧。

表1 完全毁损型偏侧帕金森模型大鼠感觉运动功能的改变($n=18$)					
	调整步态次数		前肢启动时间/s		患侧前肢应用比例/%
	左前肢	右前肢	左前肢	右前肢	
对照组	11±1.2	11±1.6	3.4±1.4	2.9±1.3	48±12%
模型组	0.6±0.3*	10.9±0.7	15.4±5.0*	3.8±1.7	23±10%*

* $P<0.01$ 表示模型大鼠与对照大鼠之间具有显著性差异

2.3 Micro-PET 对完全毁损型偏侧帕金森大鼠模型显像

大鼠 DAT 显像:对照大鼠的双侧纹状体平均标准结合率没有显著差异。模型大鼠显像示毁损侧的纹状体显像多巴胺转运蛋白缺失,仅有很少区域存有,强度与对侧比较也明显降低,毁损和正常侧的平均标准结合率差值为 0.759 ± 0.076 。见图2。

大鼠 FDG 显像:正常和对照大鼠的各个脑区,FDG 代谢左右基本对称;模型大鼠显像示毁损侧的纹状体、皮层(运动和感觉)和丘脑各区的代谢功能

对侧比较降低明显,见表2,图3。



图2 在尾静脉注射 3.0mCi¹¹C-β-CFT 后在 Micro-PET 下进行 2D 方式采集 10 M 个计数,滤波反投影图像重建,图像由嘴(左上)到尾(右下)顺序排列。大鼠脑右侧半球在图的左边,完全毁损型帕金森模型大鼠的纹状体内多巴胺能神经元末梢的多巴胺转运蛋白轴状面显像。左侧的纹状体内多巴胺神经元末梢的 DAT 可以清楚的显示,右侧纹状体内 DAT 缺失严重,仅有部分残余。每层图片的厚度为 1mm。

表2 右侧完全毁损型帕金森偏侧大鼠模型各脑区 FDG 正常侧和毁损侧比值($n=6$)				
	纹状体	丘脑	运动皮层	感觉皮层
正常对照组	0.995±0.049	1.003±0.069	0.973±0.0434	0.991±0.043
模型组	1.087±0.030*	1.079±0.079△	1.090±0.089*	1.106±0.055*

* 模型组和对照组比较差异显著, $P<0.001$,△模型组和对照组比较, $P=0.050$

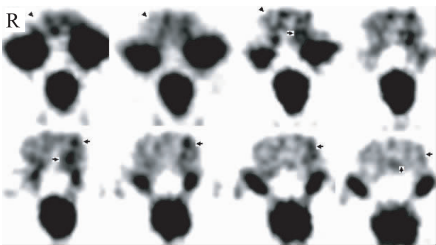


图3 尾静脉注射 2mCi FDG 后在 Micro-PET 下进行 2D 方式采集 30 M 个计数,滤波反投影图像重建,图像由嘴(左上)到尾(右下)顺序排列。大鼠脑右侧半球在图的左边。图像可以清晰的显示出大鼠的纹状体和皮层以及丘脑各个部位的代谢情况。完全毁损型帕金森模型大鼠的与左侧纹状体(→)比较,毁损侧的 FDG 代谢降低明显,运动皮层(↓)、感觉皮层(←)下丘脑(↑)的 FDG 代谢水平毁损侧要低于正常侧。每层图片厚度为 1 mm。

3 讨论

本试验中通过在内侧前脑束注射 6—OHDA 造

成完全毁损型偏侧帕金森大鼠模型。其原理是 6-OHDA 结构与 DA 类似,局部注射后被摄入到 DA 能神经元内,通过形成羟自由基和抑制线粒体氧化呼吸链复合物 I 和 IV,干扰 ATP 合成,选择性引起 DA 能神经元死亡,而造成单侧的黑质纹状体系统的损毁。

调整步态是检测肢体感受到重力的变化,再通过大脑调节进行步态调整使身体处于平衡状态的能力,是测定 6-OHDA 损毁帕金森病大鼠肢体运动能力降低最敏感的方法,可作为评价治疗有效性的工具^[3]。帕金森模型大鼠毁损侧纹状体对应的躯干和肢体的感觉运动功能低下,损毁侧支配的前肢明显的出现了调整功能低下(大于 90%),启动时间延长,损毁侧支配的前肢应用率明显下降。自发状态下大鼠损毁侧支配的前肢的感觉运动能力的下降,和完全毁损型帕金森大鼠模型多巴胺系统的损害程度上密切相关。其原因为 DA 能神经元变性丢失、黑质-纹状体 DA 通路变性,纹状体 DA 含量显著降低,造成乙酰胆碱系统功能相对亢进,导致基底节输出过多,丘脑—皮质反馈活动受到过度抑制,其对皮质运动功能的易化作用受到削弱,因此产生肌张力增高、动作减少等运动症状。

阿朴吗啡对 DA 神经元受体的激动诱导旋转和纹状体中多巴胺受体的超敏感性是密切相关的。当黑质纹状体系统多巴胺能神经元损伤超过 80%,纹状体多巴胺含量下降 50% 以上时,多巴胺 D2 受体就会代偿性大量增加,且敏感性增高,出现超敏现象。同时相关研究表明,VTA 外侧部的多巴胺神经元投射到尾状核内侧部,能阻止损毁 SN 所致的多巴胺受体超敏^[4]。完全毁损型偏侧帕金森大鼠对 VTA 和 SN 的损伤同时存在,VTA 对受体超敏感的抑制降低。此时多巴胺受体激动剂阿朴吗啡直接作用于多巴胺受体,由于毁损侧的多巴胺受体的超敏感,使得两侧激动的不平衡,可使实验动物向健侧旋转行为。

阿朴吗啡诱导大鼠对侧旋转的同时,原本运动感觉功能低下的肢体在药物的作用下出现了刻板的、反常性的重复动作。这种情况和左旋多巴诱发的异动症(LID)大鼠相似^[2],其发生原因还不是很

清楚。大脑基底直接通路和间接通路的平衡是维持正常运动的生理学基础,两条通路失衡被认为与左旋多巴诱发的异动症的发生有关。纹状体黑质神经元和纹状体苍白球神经元分别是直接通路和间接通路的起始神经元,多巴胺缺失导致纹状体苍白球神经元脱抑制而对纹状体黑质神经元的兴奋作用减弱。直接通路活动异常与异常非自主运动的发生密切相关^[5]。阿朴吗啡作为 DA 受体的激动剂,选择性活化了直接通路的活动,使基底节环路失衡,从而产生了类似左旋多巴诱导的运动失常,可能是产生这些刻板运动的原因。

研究^[6]报道完全毁损型偏侧帕金森大鼠模型毁损侧纹状体中有 97% 的多巴胺神经元丢失,分泌多巴胺递质相应减少,造成多巴胺转运蛋白(DAT)含量下降。DAT 主要由黑质纹状体 DA 能神经元胞体、树突、轴突合成和表达,分布在树突和轴突的浆膜上^[7]。对于多巴胺神经元的缺失的判定,本试验是应用 11C- β -CFT 作为示踪剂,应用 Micro-PET 进行观察。N-甲基-2 β -甲基酯-3 β -(4-F—苯基)托烷,能与多巴胺神经元前膜上的多巴胺转运蛋白特异性结合,应用放射性标记技术合成 11C- β -CFT 作为 DAT 的示踪剂^[8]。通过 11C- β -CFT Micro-PET 对大鼠的纹状体的 DAT 进行显像,显像的结果显示,完全毁损型偏侧帕金森大鼠模型的损毁侧纹状体内 DAT 水平缺失严重,与组织学上和行为学上的表现是相一致^[1]。

Nagano-Saito 等^[9]研究在发现帕金森病人纹状体多巴胺能缺失的同时,第一运动皮层和认知功能皮层的葡萄糖代谢率有明显的降低,认为这和皮层基底节丘脑底神经调节环路密切相关;国内王维等^[10]应用 FDG 对偏侧帕金森猴子模型进行显像,在纹状体、皮层和丘脑都有葡萄糖代谢的降低。本文帕金森大鼠模型毁损侧多巴胺功能的降低,造成缺失对侧的肢体运动能力的降低,这和大脑的运动功能的变化密切相关。FDG 脑功能显像通过脑区的葡萄糖的利用情况来说明的脑功能状况,结果显示毁损侧的纹状体、丘脑和皮层与对侧相对应部位比较表现为葡萄糖的利用率降低,这种降低和多巴

胺能神经元的损伤是密切相关。多巴胺能神经元的缺失,造成了毁损侧的皮层基底结和丘脑的神经调节通路的调节功能的失调,造成了毁损侧运动和感觉能力的降低。FDG 所显示的脑区的结果和其行为学的表现是相吻合的。

4 结论

完全毁损型偏瘫帕金森大鼠模型类似于人类严重的帕金森末期阶段强直运动功能障碍的表现,其行为学上的特点与毁损侧的多巴胺系统损伤密切相关,表现为毁损侧运动感觉功能和神经调节功能异常所致的行为异常。同时,应用正电子发射扫描技术对脑组织进行显像,能客观的反映出多巴胺系统和大脑运动调节功能状况。

参 考 文 献

- 1 Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by Intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Experimental Neurology*, 1998; 152: 259—277
- 2 Lee C S, Cenci M A, Schulzer M, *et al.* Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Brain*, 2000; 123: 1365—1379
- 3 Olsson M, Nikkiah C, Bentlage, *et al.* Forelimb Akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *The Journal of Neuroscience*, 1995; 15: 3863—3875
- 4 Thomas J, Wang J, Takuba H, *et al.* A 6-OHDA induced selective Parkinson rat model: further biochemical and behavioural characterization. *Exp Neurol*, 1994; 126: 159—167
- 5 Calon F, Grondin R, Morissette M, *et al.* Molecular basis of levodopa-induced dyskinesias. *Ann Neurol*, 2000; 47: S70—S78
- 6 Kuhar M J, Sanchez P M, Wong D F, *et al.* Dopamine transporter: biochemistry, pharmacology and imaging. *Eur Neurol*, 1990; 30: 15—20
- 7 Griot B, Caron M G. Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends in Pharmacol Sci.* 1993; 14: 43—49
- 8 Dannals R F, Neumeyer J L, Milius R A, *et al.* Synthesis of a radiotracer for studying dopamine uptake sites in vivo using PET: [^{11}C] CFT or [^{11}C] WIN35,428 Labelled Compd Radiopharm, 1993; 30: 147—152
- 9 Nagano-Saito A, Kato T, Arahata Y, *et al.* Cognitive and motor-related regions in Parkinson's disease: FDOPA and FDG PET studies. *Neuroimage*, 2004; 22: 553—651
- 10 王维, 于小平, 毛俊, 等. 偏侧帕金森病猴模型的影像学对比研究. *中华放射学杂志*, 2003; 37: 5—10

Characterization of Behavioral and Image of Completely Unilaterally Lesioned Parkinson Rat Model

WANG Zhi-zhong, YAO Hao, OUAYNG Xiao-hui, HE Bao-ming, ZHANG Ting

(Department of Nuclear Medicine 309 Hospital of PLA, Beijing 100091, P. R. China)

[Abstract] The characterization of behavioral and image of completely unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned Parkinson rat model were investigated. Methods are given two 6-hydroxydopamine injection into right medial forebrain bundle (MFB) to setup completely unilaterally Parkinson rat model and observed their abnormal behavioral under both nature and apomorphine used situation. The ^{11}C - β -CFT and ^{18}F FDG Micro-PET are used to image change of the ability of the region of the rat brain. Results are compared with the inactive side, the initiation of stepping movements by the left (contra-lateral) paw are greatly reduced, the initial time is prolonged and the rate of using left paw reduced when the rat in the nature situation; under the apomorphine inducing, the rats show the contraversive rotation and abnormal involuntary movement, such as limb dyskinesia, axial dystonia and masticatory dyskinesia. The ^{11}C - β -CFT image show the depletion of presynaptic marker DAT in the lesion side of the striatum and the FDG image shows the reduced ability in the lesion side. It is concluded that completely unilaterally Parkinson rat model shows extensive neuropathology and profound loss of sensorimotor, analogous to severely rigid-akinetic terminal stage of human disease.

[Key words] Parkinson rat model abnormal involuntary movement PET