

## 不同脑区注射 6-羟基多巴胺制备帕金森病动物模型的方法

闫明俞<sup>2</sup>, 陈虹<sup>1,2</sup> (1. 新疆石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002; 2. 省部共建教育部新疆特种植物药资源重点实验室, 新疆 石河子 832002)

**摘要** 帕金森病是中老年人常见的中枢神经系统退行性疾病, 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 建立的模型是目前国内外公认的、可靠的 PD 模型。本文拟就 6-OHDA 建立 PD 模型脑内注射的方法、靶点的选择进行综述。

**关键词** 帕金森病; 6-OHDA; 注射方法

**中图分类号**: R96 **文献标识码**: A **文章编号**: 1006 - 0111 (2009) 01 - 0001 - 03

帕金森病 (Parkinson's Disease, PD) 是一种常见的中老年性疾病, 主要病理学特征是中脑黑质部位多巴胺 (dopamine, DA) 能神经元变性死亡<sup>[1]</sup>, 引起纹状体内 DA 递质含量显著降低。主要临床表现为锥体外系功能失调, 出现运动迟缓、静止性震颤、肌肉强直、姿势不稳等症状<sup>[2,3]</sup>。物理、化学以及免疫<sup>[4]</sup>等手段损毁 DA 能神经元均可以得到与 PD 病人临床表现及病理变化相似的动物模型。而 6-OHDA 偏侧 PD 模型是目前 PD 研究中最常用的模型之一, 多数采用黑质致密部、纹状体、中脑腹侧被盖区、前脑内侧束单点或双点注射法, 根据注射部位的不同来制作不同的 PD 模型。因此注射方法及靶点的选择对模型的成功及模拟 PD 不同临床阶段尤为关键, 现将其综述如下。

### 1 单靶点注射法

**1.1 黑质致密部 (substantia nigra pars compacta, SNc) 注射法** SNc 是多巴胺能神经元最密集的部位, 神经元由此发出纤维投射到纹状体的尾壳核<sup>[5]</sup>。早期经典的大鼠 PD 模型就是通过在鼠脑内 SNc 注射 6-OHDA 引起的。该处的 DA 能神经元遭受不可逆损伤, 多巴胺受体数量和敏感性代偿性增加, 直接损毁 DA 能神经元胞体, 并延轴突顺行变性引起同侧纹状体内 DA 水平下降。注射后数小时就可观察到 SNc 内神经元广泛死亡, DA 含量急剧下降至 DA 耗竭, 经药物诱发后出现特征性旋转行为。

由于损毁严重、迅速, 属于急性的完全损毁模

型, 与临床 PD 病人黑质多巴胺能神经元进行性死亡有所差异。其次黑质呈扁柱状, 注射范围小, 不易定位, 损毁部位紧邻神经元胞体, 使得近距离的损毁很难把握程度并且破坏的神经元局限于 A9 区, 模型成功率较低。此外黑质注射存在机械损伤, 不利于区分 6-OHDA 所致的神经元损伤与造模所致的神经元损伤。故该方法受到了限制, 目前主要用于神经组织移植和基因治疗的研究。

**1.2 纹状体 (corpora striata, CS) 注射法** 多巴胺能神经元投射主要有两条路径<sup>[6]</sup>, 即黑质纹状体通路和新边缘系统通路, 前者是 SNc 与纹状体相连接, 后者是中脑腹侧被盖区与纹状体相联系, 可见纹状体是影响 DA 能神经元的关键部位。6-OHDA 注入纹状体后作用于黑质纹状体通路, 经 DA 能神经末梢吸收, 引起为期数周 (4~6 周) 的黑质纹状体系统缓慢逆行性退变<sup>[7]</sup>。纹状体多巴胺终末端通路发生部分耗竭, 与临床上 PD 病人的病程进展类似, 是一种渐进的退变过程。该模型属于慢性不完全损毁模型, 类似于 PD 早、中期的病理变化, 是一种适用于各类物质如神经营养因子对 PD 保护机制研究的动物模型。

纹状体解剖结构相对较大, 易于定位, 机械损伤较少, 这也使得传统的微量注射方法所致毁损往往较局限, 在黑质内仍可见到 40%~50% 的 DA 能神经元残存。据文献报道, 只有当黑质部位的 DA 能神经元毁损超过 90% 时, 才会出现相应的行为学变化<sup>[8]</sup>。单侧单点毁损纹状体所破坏 DA 能神经元的比例不足以达到 90%, 因而造成行为学变化阳性率较低。国外有学者用药物灌流增强输送法<sup>[9]</sup>, 即在压力梯度泵的作用下将大剂量 6-OHDA 注入纹状体使其分布广泛而均匀。尽管纹状体注射法有些不足, 但它避免了对黑质的机械性

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30560171)。

作者简介: 闫明俞 (1982-), 女, 硕士研究生。Tel: 15909937157, E-mail: 36220801@qq.com。

通讯作者: 陈虹。Tel: (0993) 2302286, E-mail: chen hong57@126.com。

损伤,是目前制作 PD 模型最常用的方法之一。

**1.3 中脑腹侧被盖区 (ventral tegmental area, VTA)注射法** VTA 是黑质纹状体、中脑皮层、中脑边缘系统 DA 能神经元及纤维的集中处。6-OHDA 注入该部位,不仅可以使黑质多巴胺能神经元胞体发生逆行性变性,而且可以使纹状体多巴胺能神经末梢发生顺行性变性。VTA 是制作 PD 模型的重要位点,它的投射与躯体运动密切相关,有学者发现 VTA 作为一个放大中心可以增加阿朴吗啡诱发的旋转行为。Thomas 等<sup>[10]</sup>报道, VTA 不仅可以增加大鼠旋转的强度,并且发现黑质完全毁损而 VTA 正常的大鼠不出现旋转行为。黑质完全毁损, VTA 毁损超过 40% 的大鼠,阿朴吗啡仅能诱发同侧旋转行为,而只有黑质完全毁损且 VTA 毁损超过 80% 的大鼠阿朴吗啡才能诱发典型的对侧旋转行为。

**1.4 内侧前脑束 (medial forebrain bundle, MFB)注射法** MFB 是通过下丘脑外侧区的一束神经纤维,连接隔区、下丘脑和中脑的被盖部位, SNc 的 DA 神经元的轴突可以通过 MFB 投射到纹状体。6-OHDA 注入 MFB 后, 97% 的黑质 DA 能神经元在较短时间内快速死亡,并且腹侧核、伏核和嗅结节的 DA 神经末梢完全消失,属于急性的完全损毁模型,与 SNc 注射法相似,多用于神经组织移植和基因治疗的研究。MFB 亦因解剖范围小,易变异,故很难定位。单独应用,模型成功率不同。国内学者单点注射 6-OHDA 于 MFB,模型成功率仅为 23.8%<sup>[11]</sup>,国外文献报道该模型的成功率一般在 30% ~ 70%<sup>[12]</sup>。

## 2 双靶点注射法

**2.1 同一脑区双靶点注射法** 该方法是在同一个脑区选择两个不同的靶点进行注射造模。郑杰胜<sup>[13]</sup>将 6-OHDA 分两点注入大鼠右侧纹状体,术后第 2 周出现旋转行为,随后旋转次数缓慢上升,至第 5 周升至较高水平并保持稳定,模型成功率达 60%。此后多名学者采用该方法,成功率亦较高,验证了该方法的有效性。为便于比较单点与双点注射的差异性,张伟等<sup>[14]</sup>向大鼠脑部左侧纹状体分别注射 4  $\mu\text{L}$  (单点)、8  $\mu\text{L}$  (单点)、12  $\mu\text{L}$  (单点)、8  $\mu\text{L}$  (双点) 6-OHDA。结果表明,12  $\mu\text{L}$  单点组动物模型病死率低,模型成功率高,方法实用简单,旋转行为持续达 10 个月之久。而双点组模型的病死率高于其余各组。近两年, MFB 的双点损毁较为常用。有报道<sup>[15]</sup>将同等剂量的 6-OHDA 注射于 MFB 不同的部位, (第 1 组注射位点:位点 1:前囟后 1.8 mm,右侧 2.0

mm,背腹 8.0 mm;位点 2:前囟后 1.8 mm,右侧 3.0 mm,背腹 7.5 mm。第 2 组注射位点:位点 1:前囟后 1.8 mm,右侧 2.5 mm,背腹 8.0 mm;位点 2:前囟后 1.8 mm,右侧 2.5 mm,背腹 7.5 mm),结果第 1 组注射位点成功率为 51%,第 2 组为 77%,有显著性差异。并且后者只需钻颅一次,仅需上下移动微量注射器,即可达到两位点注射的目的,不仅节约了时间还降低颅内出血和感染的机会。此外也有选用单侧黑质双靶点损毁,成功率亦较高。

**2.2 不同脑区双靶点注射法** 该方法即在不同脑区选择两个不同的靶点进行注射。我国学者伦学庆<sup>[16]</sup>将 6-OHDA 分别注入大鼠右侧 SNc 和 VTA 区,通过酪氨酸羟化酶免疫组化染色证实,旋转大鼠损毁侧 SNc 和 VTA 区 DA 能神经元丧失,残留的细胞变性,模型成功率达 80%。邹志浩等<sup>[17]</sup>将 6-OHDA 间隔注射于 SNc 和 VTA,同时在制模后两周,无旋转行为的不成功模型大鼠再次原靶点损毁,二次制模成功率为 63.2%,制模总成功率为 82%。二次制模增加了动物模型的成功率,节约资源,但同时也增加了动物的死亡率。据报道将 6-OHDA 剂量加大,注入上述两个脑区,不仅可以提高模型的成功率还能缩短成模周期。最近几年有研究者选用 VTA 和 MFB 或 SNc 和 MFB 两脑区联合注射,模型成功率均达到 70% 以上。

两靶点注射,不仅使注射部位的 DA 能神经元发生损伤,还可使相应的黑质多巴胺能神经元出现逆行性变性及纹状体多巴胺能纤维末梢顺行性变性,造成更多由 A8、A9 区向尾壳核投射的 DA 能神经纤维变性,因而模型制作成功率较高。但由于损伤较重,不利于后续实验,并且增加了操作难度和工作量,也造成实验动物手术时间过长,创伤大,病死率高,动物出现吞咽不能、渴感缺乏、运动不能等症状,因此实验动物需要悉心照料。

## 3 多靶点注射法

多靶点注射比较少见,一般是在同一脑区选择两个以上靶点损毁。国内学者张力等<sup>[18]</sup>以 6-OHDA 对恒河猴右侧黑质进行 7 靶点的损毁。术后 2 周出现间断的对侧肢体的细微震颤,4 个月后对侧肢体症状趋于稳定,类似于人类帕金森病的渐进性表现。国外也有报道<sup>[19]</sup>通过四点注射 6-OHDA 到大鼠单侧纹状体制作慢性 PD 模型,几周后模型伤侧黑质缺失 75% DA 能神经元。这种慢性损伤模型与 PD 发病经过相似而较多应用于发病机制研究。

多靶点注射制作 PD 模型,使 6-OHDA 在颅内

浸润广泛,以利于分布在脑内的黑质多巴胺能神经元轴突末梢获取 6-OHDA,虽然模型成功率较高,但损伤严重,因此不常用。

#### 4 总结

6-OHDA 脑内注射方法很多,但都属于单侧损毁,其原因在于:为研究者提供同一动物患侧黑质的手术前后对比及与正常侧对比等多种比较方式<sup>[20]</sup>。单侧损毁手术操作相对较为容易,死亡率较低。进行双侧肢体运动的比较能区分细小的异常行为。双侧损毁靶点较多且同时一次性施加 6-OHDA 的量较大,极易影响脑干正常功能而增加动物死亡率<sup>[21]</sup>。然而,人类的 PD 是脑内双侧的退行性改变,动物模型的研制最终是为治疗病人服务的,而单侧的动物模型由于损毁靶点位于一侧,因为其本身的补偿机制,不能完美的模拟 PD 发病的早期过程,所以制作双侧动物模型的意义不言而喻。国外有学者通过注射 6-OHDA 到双侧 SNc 成功制作出双侧模型<sup>[22]</sup>,但由于制作双侧模型的大鼠较易死亡,所以仅应用在对 PD 模型的补偿机制实验中。

综上所述,虽然 6-OHDA 建立 PD 模型的方法和靶点很多,但要找到能完全模拟 PD 病人的理想模型与注射方法,还有待于我们今后不断的探索。

#### 参考文献:

- [1] Kim J, Inoue K, Ishii J, *et al* A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons [J]. *Science*, 2007, 317 (5842): 1220.
- [2] Poujois A, Vidailhet M, Tröcell JM, *et al* Effect of gabapentin on oculomotor control and parkinsonism in patients with progressive supranuclear palsy [J]. *Eur J Neurol*, 2007, 14 (9): 1060.
- [3] 韩恩吉. 帕金森病的病因 [J]. *山东医药*, 2004, 41 (19): 55.
- [4] Ossowska K, Wardas J, Smialowska M, *et al* A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: an animal model of preclinical stages of Parkinson's disease? [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 22 (6): 1294.
- [5] Ronald D, Arjan B, Jos P. Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway [J]. *Experimental Neurology*, 2002, 175: 303.
- [6] Nicola B, Peter SF, Ezia G, *et al* Acute Effects of 6-Hydroxydopamine on Dopaminergic Neurons of the Rat Substantia Nigra Pars Compacta In Vitro [J]. *Neuro Toxicology*, 2005, 26: 869.
- [7] 师长宏,周少波. 帕金森病和 L-DOPA 诱导的运动障碍动物模型 [J]. *中国实验动物学杂志*, 2002, 12 (4): 254.
- [8] Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway [J]. *Exp Neurol*, 2002, 175 (2): 303.
- [9] Ojwa Y, Sanchez-Pemate R, Harvey-White J, *et al* Progressive and extensive dopaminergic degeneration induced by convection-enhanced delivery of 6-hydroxydopamine into the rat striatum: a novel rodent model of Parkinson disease [J]. *J Neurosurgery*, 2003, 98 (1): 136.
- [10] Thomas J, Wang J, Takubo H, *et al* A 6-OHDA-induced selective Parkinsonian rat model: Further biochemical and behavioral characterization [J]. *Exp Neurol*, 1994, 126: 159.
- [11] 牛朝诗,李健. 立体定向技术注射 6-OHDA 至内侧前脑束建立帕金森病大鼠模型 [J]. *立体定向和功能性神经外科杂志*, 2007, 20 (1): 19.
- [12] Signore AP, Weng Z, Hastings T, *et al* Erythropoietin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death [J]. *J Neurochem*, 2006, 96 (2): 428.
- [13] 郑杰胜,郑树森,詹仁雅,等. 大鼠帕金森氏病动物模型的建立 [J]. *科技通报*, 2001, 17 (6): 80.
- [14] 张伟,杨辉. 6-OHDA 制作帕金森病大鼠模型及评估 [J]. *四川医学*, 2007, 28 (8): 818.
- [15] 罗蔚峰,包仕尧,刘春风,等. 内侧前脑束不同部位注射 6-羟多巴胺建立帕金森病大鼠模型的对比性研究 [J]. *苏州大学学报(医学版)*, 2007, 27 (1): 66.
- [16] 伦学庆,章翔,张剑宁,等. 大鼠帕金森氏病动物模型建立方法的改进 [J]. *济宁医学院学报*, 1997, 20 (3): 23.
- [17] 邹志浩,张世忠,姜晓丹,等. 6-羟多巴胺定向注射建立帕金森病大鼠模型的实验研究 [J]. *中华神经医学杂志*, 2006, 5 (3): 244.
- [18] 张力,江澄川,徐斌,等. 立体定向下黑质毁损偏侧帕金森病恒河猴模型的制作与评价 [J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23 (12): 1463.
- [19] Kirik D, Rosenblad C, Björklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat [J]. *Exp Neurol*, 1998, 152 (2): 259.
- [20] Mona B, Lewis W, Abdul F, *et al* Antiparkinson-like effects of a novel neurotensin analog in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2001, 428: 227.
- [21] Isabella AM, Susana P, Timothy S, *et al* Sparing of behavior and basal extracellular dopamine after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway in rats exposed to a relesion sensitizing regimen of amphetamine [J]. *Experimental Neurology*, 2004, 189: 78.
- [22] Van Oosten RV, Verheij MM, Cools AR. Bilateral nigral 6-hydroxydopamine lesions increase the amount of extracellular dopamine in the nucleus accumbens [J]. *Exp Neurol*, 2005, 191 (1): 24.

收稿日期: 2008-07-16