

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01337

MPTP对快速老化小鼠 SAMP8 学习记忆能力及黑质多巴胺神经元的影响

苑振云^{1,2}, 顾平^{2,3}, 籍文强¹, 崔冬生², 刘力², 王彦永^{2,3}, 耿媛², 王铭维^{2,3*}

1. 河北医科大学第一医院急诊科, 石家庄 050031
2. 河北省脑老化与认知神经科学实验室, 石家庄 050031
3. 河北医科大学第一医院神经内科, 石家庄 050031

[摘要] **目的:**探讨1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)对SAMP8小鼠空间学习和记忆能力及黑质多巴胺神经元的影响。**方法:**采用雄性3个月龄SAMP8小鼠皮下注射MPTP(36 mg/kg),连续5 d。对照组皮下注射生理盐水(NS, 36 ml/kg)。用Morris水迷宫测试小鼠的寻找平台潜伏期及搜索策略。免疫组织化学观察黑质酪氨酸羟化酶(TH)阳性多巴胺能神经元变化。**结果:**MPTP小鼠黑质致密部TH免疫反应阳性神经元数目明显少于对照组($P < 0.01$)。Morris水迷宫实验表明MPTP小鼠寻找平台潜伏期较对照组明显延长($P < 0.01$),在目标象限(第I象限)游泳时间比对照组明显降低($P < 0.01$),在对侧象限(第IV象限)游泳时间比对照组明显升高($P < 0.05$),搜寻策略较对照组变差。**结论:**MPTP可造成SAMP8小鼠黑质多巴胺神经元损伤,并出现空间学习记忆能力下降。

[关键词] MPTP; SAMP8; 多巴胺能神经元; 学习; 记忆

[中图分类号] R 74 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1337-04

Effects of MPTP on spatial learning ability/memory and dopaminergic neurons in Nigra of senescence accelerated-prone 8 mice

YUAN Zhen-yun^{1,2}, GU Ping^{2,3}, JI Wen-qiang¹, CUI Dong-sheng², LIU Li², WANG Yan-yong^{2,3}, GENG Yuan², WANG Ming-wei^{2,3*}

1. Department of Emergency, First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China
2. Brain Aging and Cognitive Neuroscience Laboratory of Hebei Province, Shijiazhuang 050031
3. Department of Neurology, First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the spatial learning ability/memory and dopaminergic neurons in the Nigra of senescence accelerated-prone 8 (SAMP8) mice. **Methods:** Three-month old male SAMP8 mice were injected with MPTP (36 mg/kg, *s.c.*) for 5 days, and animals in the control group were injected with NS (36 ml/kg, *s.c.*) in the same manner. Morris water maze was used to examine the searching strategy, seeking-platform latency, and the swimming time in the aimed quadrant. Immunohistochemistry was used to observe the changes of TH-ir positive neurons in substantia nigra. **Results:** The number of TH-ir neurons in substantia nigra pars compacta was significantly reduced in MPTP group compared with the control group ($P < 0.01$). Morris water maze showed that the searching strategy of animals in MPTP group was worse than in the control group, with the seeking-platform latency of MPTP mice significantly prolonged ($P < 0.01$), the time spent in the aimed quadrant significantly decreased ($P < 0.01$) and time in the opposite quadrant significantly prolonged ($P < 0.05$). **Conclusion:** MPTP can cause damage to the dopaminergic neurons in the substantia nigra of SAMP8 mice, which is subsequently followed by deficit in the spatial learning and memory in the animals.

[KEY WORDS] MPTP; SAMP8; dopaminergic neuron; learning; memory

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(11):1337-1340]

快速老化小鼠 P8 (senescence accelerated mice prone 8, SAMP8) 由日本京都大学竹田俊男教授开发成功, 其特点为寿命短、认知功能障碍及脑神经元

退行性改变等。SAMP8 自建立以来, 一直被用于研究衰老与学习记忆功能及学习记忆功能障碍发生机制。帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是中老年

[收稿日期] 2008-05-15 **[接受日期]** 2008-07-15

[作者简介] 苑振云, 博士生, 副主任医师。E-mail: yuanzy2001@yahoo.com.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: wmw@jyyy.com.cn

人常见的中枢神经系统退行性疾病。70% PD患者伴有痴呆。PD伴痴呆主要表现是记忆障碍和视空间知觉缺陷^[1]。MPTP小鼠模型是最普遍应用的帕金森病动物模型^[2]。本研究用MPTP干预SAMP8,观察小鼠空间学习和记忆能力及多巴胺神经元的改变,以探讨MPTP-SAMP8小鼠模型能否作为PD并发痴呆的动物模型。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 MPTP购于美国Sigma公司;兔抗TH多克隆抗体购于美国Chemicon公司;生物素化二抗、封闭用正常山羊血清、辣根酶标记链霉卵白素原液购于中国中杉金桥公司;其余试剂为国产分析纯试剂。SLY-WMS Morris水迷宫分析系统由安徽淮北正华生物仪器有限公司生产。

1.2 模型制备 选用雄性3个月龄SAMP8 16只,平均体重(21.23±0.12)g,由香港中文大学解剖系姚大卫教授赠送。标准啮齿类动物饲料喂食,自由进食水,室温23~25℃,保持12h照明、12h黑暗的周期。将SAMP8按体重采用随机数字法随机分为实验组(MPTP组)8只、对照组(NS组)8只。实验组每天上午9:00皮下注射MPTP 36 mg/kg,连续5d。对照组同法注射等量生理盐水。

1.3 Morris水迷宫实验 迷宫主要由两部分组成,即内含平台的圆形水池和记录装置。水池直径120 cm、高50 cm。池壁上标有东、南、西、北4个人水点,将水池分为I、II、III、IV 4个象限。内置直径14 cm、高20 cm的平台,加水至超过平台高度1~1.5 cm,为避免鼠直接看见平台,在水中加入墨水,水温保持在(22±2)℃。迷宫上方安置带有显示系统的摄像机,计算机自动跟踪计时并记录游泳轨迹。保持实验室内光线良好,周围参照物固定不变。测试内容包括定位航行实验(place navigation)和空间探索实验(spatial probe test)。(1)定位航行实验:测试时,将平台置于圆池内第I象限并固定,小鼠每日分别从第I、II、III、IV 4个象限面向池壁轻轻放入水中,记录该鼠自入水后至找到平台所需时间(寻找平台潜伏期)。4次潜伏期成绩的平均值作为当日最终成绩进入最后统计。如小鼠在120 s内找不到平台,则由实验者将其引向平台,其潜伏期记为120 s。每次测试间隔60 s,连续4 d。(2)空间探索实验:定位航行实验结束后撤除平台,自第IV象限作为入水点将小鼠面向池壁放入水中,观察小鼠120 s内寻找平台的游泳轨迹,并计算其在第I象限及第IV象限游泳的时间。水迷宫实验在造模后1~5 d

进行。

1.4 免疫组织化学测定鼠黑质酪氨酸羟化酶(TH)造模后第14日动物经10%水合氯醛腹腔注射麻醉(4 ml/kg),开胸,经左心室插管,灌注生理盐水,待冲净血液后,灌注4%多聚甲醛。取鼠脑。将鼠脑固定于4%多聚甲醛。24 h后将固定好的组织块经常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。连续切片,厚度为5 μm,取切片裱于涂有多聚赖氨酸的载玻片上。切片常规脱蜡至水。0.01 mol/L PBS清洗3次,每次5 min。0.3%过氧化氢室温下孵育20 min。蒸馏水清洗3次,每次5 min。0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)微波炉内修复,98℃维持20 min。冷却至室温。10%山羊血清,37℃温箱湿盒内孵育30 min。滤纸吸去多余血清,加入一抗(兔抗TH多克隆抗体,1:5 000)。4℃过夜。0.01 mol/L PBS清洗3次,每次5 min。滴加生物素化二抗(1:100)工作液,37℃温箱湿盒内孵育30 min。0.01 mol/L PBS清洗3次,每次5 min。滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素(1:100)工作液,37℃温箱湿盒内孵育30 min。0.01 mol/L PBS清洗3次,每次5 min。DAB显色2~5 min。自来水充分冲洗,终止显色。封片。光镜观察,选取3个相同的黑质致密部切面,100倍光镜下计数一侧TH阳性细胞数,并计算平均值。

1.5 统计学处理 各组实验数据均用SAS 8.1统计软件做统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对资料进行两样本均数比较的 t 检验。

2 结果

2.1 注射MPTP后动物的急性行为表现 MPTP组小鼠于每次注药后出现不同程度的自主活动减少、竖毛、对外界刺激反应迟钝,症状于24 h后基本消失。对照组未见类似表现。

2.2 Morris水迷宫实验

2.2.1 定位航行 MPTP组小鼠寻找平台潜伏期较对照组明显延长(表1)。

2.2.2 空间探索 第5日撤除平台后,观察小鼠的空间探索能力发现,MPTP组小鼠在目标象限游泳时间较对照组明显降低,在对侧象限游泳时间较对照组明显增高(表2)。小鼠寻找平台的轨迹经图形叠加(8个图形叠加)处理后发现:NS组SAMP8小鼠轨迹大部分位于原平台象限,其次较多地在原平台象限相邻的左右两侧象限寻找,MPTP组小鼠基本满池内寻找,其轨迹呈随机分布于各象限之中,并有围绕池壁寻找现象(图1)。

表 1 水迷宫实验中两组小鼠寻找平台潜伏期的比较

Tab 1 Comparison of average latent period between MPTP and NS groups in Morris water maze test

(n=8, $\bar{x} \pm s, t/s$)

Group	Time			
	d1	d2	d3	d4
MPTP	111.32 ± 5.86 **	108.72 ± 5.33 **	77.80 ± 4.65 **	63.59 ± 5.81 **
NS	79.18 ± 5.42	54.00 ± 7.80	49.26 ± 6.15	38.88 ± 6.32

** P < 0.01 vs NS group. MPTP: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

表 2 两组小鼠空间探索测试中在目标象限及对侧象限游泳时间比较

Tab 2 Comparison of swimming time in the aimed and opposite quadrants in spatial probe test

(n=8, $\bar{x} \pm s, t/s$)

Group	Aimed quadrant (I)	Opposite quadrant (IV)
MPTP	34.09 ± 3.33 **	22.16 ± 5.12 *
NS	45.34 ± 3.06	14.44 ± 3.09

* P < 0.05, ** < 0.01 vs NS group

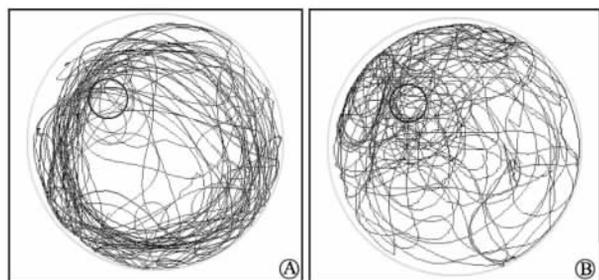


图 1 SAMP8 小鼠的空间探索轨迹

Fig 1 Routes of SAMP8 mice in spatial probe test

A: MPTP group; B: NS group

2.3 MPTP 对 SAMP8 小鼠黑质致密部多巴胺神经元的影响 NS 组黑质可见大量棕黄色 TH 阳性细胞, 细胞呈连续分布, 纤维较多且有规律; MPTP 组 TH 阳性细胞减少, 胞质着色程度减弱, 细胞分布不如 NS 组连续, 纤维少而紊乱(图 2)。表明 MPTP 组小鼠黑质致密部多巴胺神经元明显脱失。MPTP 组与 NS 组 TH 阳性细胞数比较差异有统计学意义 (59 ± 8 vs 119 ± 9, n=8, P < 0.01)。

3 讨论

PD 是以黑质纹状体通路多巴胺能神经元变性为特征的中老年常见的神经系统变性疾病, 居神经系统退行性疾病第二位, 65 岁以上患病率近 1% ~ 2% [3]。随着人口老龄化, PD 已成为严重的社会经济问题。PD 的发病机制和病因至今仍不清楚, 一般认为 PD 是一种多因子疾病, 有着复杂的病因学, 包括遗传、内外环境毒素、衰老等, 而且更倾向于多种因素共同作用的结果 [4]。利用多种危险因素

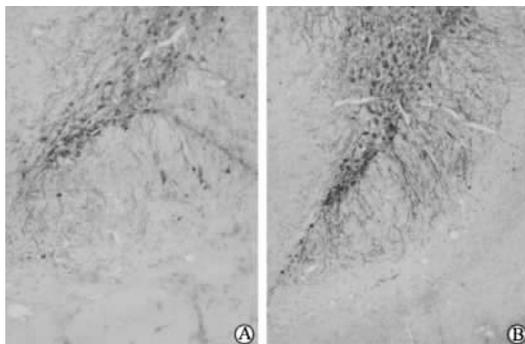


图 2 黑质致密部 TH 阳性细胞

Fig 2 TH+ neurons in SNpc

A: MPTP group; B: NS group. Original magnification: ×100

综合作用制作 PD 动物模型能更好地模拟人的 PD 发病过程, 为人类了解 PD、治疗 PD 提供新的思路 [5]。MPTP 发现于 20 世纪 80 年代, 具有特异性的神经毒性作用, 能产生可靠的、复制性良好的黑质纹状体多巴胺能通路损害 [6], 能导致人类及多种动物产生 PD 症状。目前 PD 模型多选用 C57BL 小鼠, 动物模型的发病因素相对单一 [7]。PD 的发病率随年龄的增长逐渐增高, 衰老是 PD 重要的危险因素 [8]。有学者认为动物的年龄是建立动物模型时应考虑的重要因素, 通过对老龄与小龄动物比较, 从行为和神经化学分析, 认为 MPTP 处理之老龄鼠可作为研究帕金森病理想的动物模型 [9]。但选老龄动物做 PD 模型, 不仅有饲养时间长、价格昂贵等不足, 而且老年动物健康状况差, 因此在一定程度上制约了用衰老动物制作模型的进展。SAM 小鼠是日本京都大学 Takeda 教授经 20 多年精心培育而得到的一种近交系衰老模型鼠, SAMP8 小鼠是 SAMP 系中的一个亚系, 具有典型的痴呆特征和脑部病理变化。SAMP8 小鼠在 2 月龄就开始出现学习记忆功能衰退, 并随增龄而加重 [10]。4~6 个月成熟期后迅速衰老, 除具一般老化症状外, 主要以学习记忆功能呈增龄性加速衰退为特点, 是研究衰老及衰老相关疾病的很好的动物模型 [11]。如果用 MPTP 干预 SAMP8 造成小鼠 PD 模型的改变, 体现了衰老和环境因素共同作用的结果, 在模拟 PD 的发病方面更具有独到之

处,这比单因素造成 PD 模型更有优越性。而用 SAMP8 制作 PD 模型还未见报道。

很多 PD 患者常伴有认知功能损害,严重影响其社会功能和生活质量,相当一部分患者在病程中逐渐进展成痴呆^[12]。Lewy 等^[13]发现轻度 PD 患者虽然没有明显出现学习记忆障碍的临床表现,在用适当的行为学检测后也能发现轻度的空间学习记忆能力的降低。帕金森痴呆(PDD)在 65 岁以上老年人中的发病率将超过 0.2%~0.5%^[14]。所以 PDD 的早期诊断和治疗极为重要。而目前并未有好的研究 PDD 的模型。

本研究首次用 MPTP 干预 SAMP8,观察小鼠空间学习和记忆能力及多巴胺神经元的改变。用 MPTP 36 mg/kg,连续 5 d 皮下注射,MPTP 组小鼠于每次注药后出现不同程度的自主活动减少、竖毛、对外界刺激反应迟钝。造模后第 14 日取脑可观察到 MPTP 组小鼠黑质多巴胺能神经元显著损伤,TH 阳性细胞明显减少,成功模拟了帕金森病的病理改变。在 Morris 水迷宫实验中,检测出小鼠在 4 d 的学习过程中,随着时间的推移,寻找平台潜伏期逐渐缩短,提示寻找平台是一个学习和记忆的过程。而 MPTP 组小鼠寻找平台潜伏期显著长于对照组,具有统计学意义。在第 5 日记忆能力测试中 MPTP 组小鼠的搜索策略明显不同于 NS 组,在目标象限(第 I 象限)游泳时间比对照组明显降低,在对侧象限(第 IV 象限)游泳时间比对照组明显升高,搜寻策略较对照组变差。关于 MPTP 鼠模型是否引起空间学习记忆障碍,Da Cunha 等^[15]报道 MPTP 大鼠模型有空间学习记忆功能障碍。殷盛明等^[16]报道 MPTP 小鼠在黑质多巴胺能神经元损伤后,运动协调性下降并伴有空间学习记忆能力的下降。其可能机制主要是 PD 所涉及的单胺类神经递质、胆碱能递质均与学习记忆有关。本实验用 MPTP 干预 SAMP8 小鼠制作的模型,在黑质多巴胺能神经元损伤后不仅有帕金森病样症状,还伴有一定程度空间学习记忆能力的下降。我们将进一步研究 MPTP 对 SAMP8 小鼠纹状体 TH、多巴胺转运体(DAT)及多巴胺含量的影响,以探讨 SAMP8-MPTP 小鼠模型作为 PD 并发痴呆动物模型的可行性。

[参考文献]

- [1] 徐德隆,陈生弟,刘振国.帕金森病临床新技术[J].北京:人民军医出版社,2002;61-62.
- [2] Schmidt N, Feger B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease[J]. J Neural Transm, 2001, 108: 1263-1282.
- [3] Ohashi S, Mori A, Kurihara N, Mitsumoto Y, Nakai M. Age-related severity of dopaminergic neurodegeneration to MPTP neurotoxicity causes motor dysfunction in C57BL/6 mice[J]. Neurosci Lett, 2006, 401: 183-187.
- [4] Melrose H L, Lincoln S J, Tyndall G M, Farrer M J. Parkinson's disease: a rethink of rodent models[J]. Exp Brain Res, 2006, 173: 196-204.
- [5] Carvey P M, Punati A, Newman M B. Progressive dopamine neuron loss in Parkinson's disease: the multiple hit hypothesis[J]. Cell Transplant, 2006, 15: 239-250.
- [6] Bové J, Zhou C, Jackson-lewis V, Taylor J, Chu Y, Rideout H J, et al. Proteasome inhibition and Parkinson's disease modeling[J]. Ann Neurol, 2006, 60: 260-264.
- [7] 高云朝,林祥通. MPTP 帕金森病动物模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2005, 13: 261-265.
- [8] Collier T J, Lipton J, Daley B F, Palfi S, Chu Y, Sortwell C, et al. Aging-related changes in the nigrostriatal dopamine system and the response to MPTP in nonhuman primates: diminished compensatory mechanisms as a prelude to parkinsonism[J]. Neurobiol Dis, 2007, 26: 56-65.
- [9] 蔡元奋. 神经毒素 MPTP 处理之年老大鼠可作为研究帕金森氏症候群的动物模型[J]. 生理科学进展, 1997, 28: 58-60.
- [10] Miyamoto M. Characteristics of behavioral disorders in senescence-accelerated mouse (SAMP8): possible animal model for dementia[J]. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi, 1994, 14: 323-335.
- [11] Colas D, Gharib A, Bezin L, Morales A, Guidon G, Cespeglio R, et al. Regional age-related changes in neuronal nitric oxide synthase (nNOS), messenger RNA levels and activity in SAMP8 brain[J]. BMC Neurosci, 2006, 21: 81.
- [12] Foltynie T, Brayne C E, Robbins T W, Barker R A. The cognitive ability of an incident cohort of Parkinson's patients in the UK: the Cam PaIGN study[J]. Brain, 2004, 127: 550-560.
- [13] Lewy B, Holl D, Zeng L, Herzog A, Behrens K, Mehdorn M. Spatial behaviour is driven by proximal cues even in mildly impaired Parkinson's disease[J]. Neuropsychologia, 2002, 40: 1443-1455.
- [14] Aarsland D, Zaccari J, Brayne. A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease[J]. Mov Disord, 2005, 20: 1255-1263.
- [15] Da Cunha C, Angelucci M E, Canteras N S, Wonnacott S, Takahashi R N. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities[J]. Cell Mol Neurobiol, 2002, 22: 227-237.
- [16] 殷盛明,于德钦,王世伟,高溪,赵杰,张万琴,等. MPTP 对小鼠空间学习和记忆能力的影响[J]. 中国行为医学科学, 2005, 14: 18-20.

[本文编辑] 孙岩