

兴奋性氨基酸与帕金森病研究进展

罗瑞静 何建成

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是老年人常见的、以黑质 - 纹状体系统多巴胺 (dopamine, DA) 功能不足为主要特征的中枢神经系统退行性疾病。多巴胺能神经元变性是引起症状的主要原因,但纹状体和黑质内 DA 的缺失不是 PD 的唯一发病基础,脑内其他神经递质也参与了发病过程。近来的研究表明,兴奋性氨基酸 (excitatory amino acid, EAA) 及其受体介导的兴奋性毒性在 PD 的发生发展过程中可能发挥重要作用^[1,2]。对 EAA 进行深入广泛的研究,将有助于 PD 病因、病机的阐明及预防、治疗药物的研发。

一、兴奋性氨基酸

兴奋性氨基酸是广泛存在于哺乳类动物中枢神经系统的正常兴奋性神经递质,参与突触兴奋传递、学习记忆形成及多种神经变性疾病的发生^[3-5]。在中枢神经系统内,EAA 主要是 L - 谷氨酸 (Glu) 和 L - 天门冬氨酸 (Asp),两者由葡萄糖经 Krebs 循环产生 α - 酮戊二酸和草酰乙酸,通过转氨酶作用分别产生 Glu 和 Asp。这部分 EAA 主要储存于突触前神经末梢内,通过突触前电压门控性通道 Ca^{2+} 依赖释放,作用于突触后膜的 EAA 受体 (EAA receptor, EAAR),完成兴奋性突触传递及其他生理作用。突触间隙中的 EAA 一部分在酶的作用下被灭活,另一部分被位于神经元细胞和胶质细胞膜上的 EAA 转运体 (EAA transporters, EAAT) 摄回而被迅速灭活。哺乳动物脑内含有大量 EAAR,目前已发现 5 种类型^[6]:① N - 甲基 - D - 天门冬氨酸受体 (N - methyl - D - aspartate, NMDA);② α - 氨基 - 3 - 羟基 - 5 - 甲基 - 4 - 异恶唑丙酸受体 (α - amino - 3 - hydroxy - 5 - methyl - 4 - isoxazole propionic acid, AMPA);③ 海人藻酸受体 (kainic acid, KA);④ L - 2 - 氨基 - 4 - 磷酸丁酸 (L - AP4) 受体;⑤ 代谢型受体。后 4 种又称为非 NMDA

受体,在这些受体中以 NMDA 研究最多,NMDA 受体广泛分布于中枢,在大脑皮质、海马、纹状体、隔区及杏仁核密度较高。

二、EAA 与 PD

自 1969 年 Olney 报道 Glu 有神经毒性以来,脑内 EAA 与中枢系统疾病的关系便成为研究热点^[7]。国内外多数研究表明,EAA 与 PD 的发生及发展有密切的联系。李振等^[8]通过对偏侧帕金森病 PD 大鼠基底神经节亚区新纹状体、内侧苍白球、外侧苍白球和背侧丘脑底核氨基酸递质含量的测定,发现损毁侧新纹状体、内侧苍白球、外侧苍白球和背侧丘脑底核内的 GABA,新纹状体、外侧苍白球和背侧丘脑底核内的 Glu,以及背侧丘脑底核内的 Asp、甘氨酸与未损毁侧相同解剖部位相比含量明显增加。李霞等^[9]通过实验发现在 PD 小鼠前庭神经核内 Glu 表达增加 ($P < 0.01$),透射电镜的结果显示前庭神经核内神经元超微结构呈病理性改变:神经元线粒体肿胀变性、嵴消失、呈空泡状改变,粗面内质网 (RER) 扩张,星形胶质细胞呈增生状改变,推测与 PD 发生有关。王彦春等^[10]应用电针治疗 PD 大鼠,发现治疗组兴奋性氨基酸含量明显低于模型组,认为减少兴奋性氨基酸的释放是电针治疗 PD 的作用途径之一。刘承伟等^[11]研究发现中脑组织中 D - 谷氨酸可能具备与 L 型对映体相同的兴奋毒性,并参与帕金森的发病机制。伦学庆等^[2]通过对 PD 大鼠血浆及纹状体内兴奋性氨基酸测定,发现明显高于正常组,推测其参与了帕金森病的发病过程,减少或阻断兴奋性氨基酸的释放将有助于帕金森病的治疗。Turski 等^[12]将 MPTP 注入猕猴体内,发现苍白球和丘脑下核团的兴奋性增高,核周围或全身注射 NMDA 受体拮抗剂能使运动减少和震颤缓解。Dorsey 等^[13]从胚胎中多巴胺能神经元超微结构特点的研究中也发现,对 AMPA 敏感的谷氨酸受体的激活是多巴胺能神经元死亡的启动因素。总之,EAA 参与 PD 的发生及发展。

三、EAA 与左旋多巴

PD 是慢性病,一经确诊即需终身服药,左旋多巴

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30672684)、上海市教委基金 (05CZ04)

作者单位:201203 上海中医药大学

通讯作者:何建成,电子信箱:hejc8163@163.com

(L-dopa, LD)迄今仍是 PD 的金标准治疗药物。然而,长期治疗所表现出来的不良反应,如运动功能波动、左旋多巴诱发的运动障碍等比疾病本身更加严重,严重影响了 PD 患者的正常生活质量^[14]。近几年的研究认为,EAA 参与 LD 治疗 PD 过程中不良反应的发生。肖勤等^[15]通过实验研究发现长期使用左旋多巴治疗 PD 大鼠能使大鼠血清中 Asp 增高,推测其与 LD 毒性反应发生有关。Basma^[16]及 Han 等^[17]研究显示左旋多巴对体外培养的 DA 能神经元有毒性作用,并认为是 DA 代谢增强或左旋多巴和 DA 自身氧化产生的自由基所致。Maeda 等^[18]实验发现左旋多巴可使大鼠纹状体神经元培养液中的 Glu 浓度升高,进而推测左旋多巴的毒性也涉及兴奋毒性作用。我们在经典的 PD 大鼠模型基础上,进一步腹腔注射 LD,连续 2 周,制备了大鼠 LD 不良反应模型。结果发现,在 2 周、4 周、6 周不同时间点,LD 不良反应模型组 Glu、Asp 含量明显高于单纯 PD 模型对照组,其中在 4 周、6 周时,差异均有统计学意义($P < 0.01$),且 LD 不良反应模型组 Glu、ASP 含量,随着 LD 用药时间的延长,有增高趋势,6 周与 2 周、6 周与 4 周相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

四、EAA 毒性作用机制

细胞外 EAA 的浓度由于神经元释放增加、重摄取减少和死亡细胞内 EAA 大量溢出而大幅度增加,通过多重途径发挥兴奋性神经毒作用。①EAA 增多:一方面是各种因素导致的 EAA 生成增多,另一方面是由于其分解代谢障碍而导致的 EAA 堆积,增多后与抑制性氨基酸等失衡,进而导致功能失调;②EAAR 介导的毒性反应:高钙电导是 NMDA 受体的特点之一,大量的 EAA 使得 NMDA 受体被持续激活,离子通道开放,大量钙离子内流,导致胞质内钙离子浓度持续增加,使 DNA 酶、蛋白酶和磷脂酶等激活,引起 DNA、蛋白质和磷脂降解,最终使神经元变性或坏死。此外,细胞内 Ca^{2+} 超载,大量 Ca^{2+} 与钙调蛋白结合,可以激活一氧化氮合酶(NOS),使一氧化氮(NO)产生增加。内源性 NO 过量产生和释放,产生大量的氧自由基,从而促进一系列氧化反应,导致细胞的氧化损伤;过度兴奋的 EAAR 还可以使 Na^+ 的通透性增加, Na^+ 的大量内流,膜电位发生变化, Cl^- 顺着电位差大量内流,导致 H_2O 大量内流,造成神经元的急性肿胀,甚至死亡^[6,19];③EAAT 与囊泡谷氨酸转运体(vesicular glutamate transporters, VGLUTs)功能缺陷或发生故障:细胞外液缺乏 Glu 水解酶系统,

突触间隙中 Glu 清除和失活的唯一途径是通过神经末梢和胶质细胞高亲和力谷氨酸转运体主动重摄取,终止其神经毒性作用。因此,EAAT 功能缺陷或发生故障,则不能及时将突触间隙内多余 EAA 摄取,同样会导致突触间隙 EAA 含量增高^[21];VGLUTs 能特异地装载 Glu 进入突触囊泡并促进释放,其调控功能失常同样会影响到 EAA 的释放,PD 患者脑内不同部位 VGLUTs 的含量变化不同,进而通过不同途径发挥作用参与 PD 发生^[21];④PD 时机体对 EAA 敏感性增强。

总之,PD 的病因及发病机制至今尚未完全明了,EAA 及其相关物质介导的兴奋性毒性通过多条途径在 PD 的发病机制中发挥重要作用。减少 EAA 的释放或阻断其兴奋性作用将成为 PD 治疗的有效途径之一,阐明其在神经细胞继发性损害中的作用机制,将为临床预防和治疗 PD 提供重要的参考价值,是未来一个极具临床应用价值的研究领域。

参考文献

- 1 Papa SM, Chase TM. Levodopa - induced dyskinesias improved by a glutamate antagonist in parkinsonian monkeys [J]. *Ann Neuro*, 1996, 39:574 - 578
- 2 伦学庆,张春芬,章翔. 实验性帕金森病血浆及纹状体兴奋性氨基酸变化及其意义 [J]. *济宁医学院学报*, 1998, 21(1): 21
- 3 王文,徐天乐. NMDA 受体通道的结构和功能 [J]. *生物化学与生物展*, 1997, 24:321 - 326
- 4 吕辉,徐天乐. 兴奋性氨基酸转运研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2000, 16(1): 22 - 25
- 5 Liu HT, Markus W, Liu WH, *et al.* Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium. *Anesth Analg* [J]. 2001, 92(5): 1173 - 1181
- 6 张春芬,薛玉荣. 兴奋性氨基酸及其与 Parkinson 病 [J]. *国外医学老年医学分册*, 1997, 18(2): 49 - 52
- 7 Olney JW. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate [J]. *Science*, 1969, 164:719 - 721
- 8 李振,赵忠新. 偏侧帕金森病大鼠基底神经节亚区氨基酸递质及 GABAA 受体亚单位 mRNA 的表达 [J]. *中华神经科杂志*, 2008, 41(6): 416 - 419
- 9 李霞,高明. 帕金森病小鼠前庭神经核内谷氨酸和谷氨酸受体 1 的表达 [J]. *中国医科大学学报*, 2008, 37(2): 181 - 183
- 10 王彦春,马骏. 穴位电针刺激帕金森病大鼠纹状体谷氨酸含量的变化 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10(15): 183 - 185
- 11 刘承伟,卢洁. D - 谷氨酸与帕金森模型鼠发病相关性研究 [J]. *解剖学杂志*, 2007, 30(2): 137 - 139
- 12 Turski L, Bressler K, Retig KJ, *et al.* Protection of substantia nigra from MPP + neurotoxicity by N - methyl - D - aspartate antagonists [J]. *Nature*, 1991, 349(6308): 414 - 418
- 13 Dorsey DA, Masco DH, Dikranian K *et al.* Ultrastructural characterization of alpha - amino - 3 - hydroxy - 5 - methyl - 4 - isoxazolepro-

- pionic acid - induced cell death in embryonic dopaminergic neurons [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(4): 535 - 544
- 14 Nutt JG. Levodopa - induced dyskinesia: review, observations, and speculations [J]. *Neurology*, 1990, 40: 340 - 345
- 15 肖勤, 翁多芳. 左旋多巴对帕金森病大鼠血清兴奋性氨基酸及抗氧化指标的影响 [J]. *临床神经病学杂志*, 2003, 16(2): 69 - 71
- 16 Basma AN, Morris EJ, Nicklas WJ, *et al.* L - DOPA cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation [J]. *Neurochem*, 1995, 64(2): 825
- 17 Han SK, Mytilineou C, Cohen G. L - DOPA up - regulates glutathione and protects mesencephalic cultures against oxidative stress [J].

- Neurochem*, 1996, 66: 501 - 510
- 18 Maeda T, Cheng N, Kume T. *et al.* L - dopamine neurotoxicity is mediated by glutamate release in cultured rat striatal neurons [J]. *Brain Res*, 1997, 77: 159 - 162
- 19 Olney JW. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate [J]. *Science*, 1969, 164: 719 - 721
- 20 杨彦玲. 谷氨酸转运体与神经退行性疾病 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2003, 8(2): 227 - 230
- 21 程肖蕊, 周文霞. 囊泡谷氨酸转运体与神经系统疾病 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(3): 290 - 294

(收稿: 2010 - 05 - 27)

动脉粥样硬化动物模型研究进展

赵 欣 赵全明

心脑血管疾病是人类健康的“头号杀手”, 是世界范围的主要死亡原因。而冠心病、缺血性脑卒中和外周血管病的主要病因是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS)。由于伦理学的原因, 无法直接在人体进行动脉粥样硬化的发生机制、药物疗效和检测方法的系统研究。因此, 动脉粥样硬化动物模型就成为了进行这一领域研究的主要工具。本文将系统复习各种动物 AS 模型的特点和建立方法, 为科研人员进行 AS 相关研究提供参考。

一、鼠模型

大白鼠具有饲养方便、抵抗力强、食性与人相近的优点。利用大白鼠建立 AS 模型主要采用的方法包括: 脂质浸润法、内膜损伤法和免疫刺激法^[1~3]。利用小白鼠制造实验模型取血不便、难做动态观察, 所以较少采用。虽然鼠类被认为对动脉粥样硬化具有抗性, 然而随着转基因技术和基因敲除技术的出现, 目前已成功培育出脂蛋白代谢基因缺陷鼠, 使得鼠模型在动脉粥样硬化模型的研究中重新受到重视^[4]。

在转基因方法上, 1993 年出现的转载脂蛋白 E 3 Leiden 基因小鼠常规饲料喂养即可出现高胆固醇血症和高三酰甘油血症, 但无 AS 病灶^[5]; 若同时喂以高脂饲料, 可引发整个主动脉出现从脂质条纹到纤维

斑块、钙化灶等 AS 病灶。在基因敲除技术方面, 利用胚胎干细胞和同源重组的方法建立的载脂蛋白 E (ApoE) 基因敲除小鼠模型同样提供了新的动脉粥样硬化鼠模型^[6]。ApoE 基因敲除小鼠产生的 AS 病变广泛, 全身大中动脉如主动脉根部、胸主动脉、颈动脉、肾动脉、冠状动脉和股动脉等均可发生。若进食高脂饲料, AS 病变的形成更快更严重。随着基因敲除和转导技术的出现, 后来产生了目前应用最为广泛的两种鼠模型: ApoE 缺陷株 (ApoE^{-/-}) 和 LDL 受体缺陷株 (LDL - R^{-/-}) 小鼠。这类小鼠可以自发形成动脉粥样病变, 如同时配合高脂饮食, 能够产生易损斑块或形成血栓。近年来这两种模型的研究主要集中在利用遗传或药物调控加速病变的发生。其中比较高效的途径包括: 快速升高血浆脂质水平和诱导产生与人类血脂代谢障碍相似的脂蛋白表现。

鼠 AS 模型的病变具有两大优势: 首先, 病变的形态与人类产生的十分相似。其次, 斑块的破裂位置也与人类相似, 同样是发生在斑块的肩部。然而, 鼠模型的斑块破裂主要由周围黄瘤内密集的泡沫巨噬细胞凋亡所引起的, 且斑块破裂处缺乏纤维蛋白和血栓形成, 这与人类的情况有所不同^[7]。由此可见此类模型需要进一步地改进, 以更符合人类病变的特征。

二、兔模型

兔是最早被用于制作动脉粥样硬化模型的动物, 至今仍然被广泛应用。兔对外源性胆固醇的吸收率高 (75% ~ 95%)、清除能力低, 饲喂高脂饮食后可形

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30972810)

作者单位: 100029 首都医科大学附属北京安贞医院心内科

通讯作者: 赵全明, 电子信箱: zhaoqm123@sohu.com