

# 神经毒素诱导帕金森病动物模型的研究进展

孙 雪 梁建庆 何建成 马利芳

**摘 要** 帕金森病 (parkinson disease, PD) 是一种以静止性震颤、肌强直、运动减少及体位障碍为主要临床表现的中枢神经系统退行性疾病。黑质 - 纹状体多巴胺 (dopamine, DA) 能神经元的进行性丢失和胞质内路易小体的形成是 PD 的主要病理改变。目前, PD 确切的病因病机尚未可知。对 PD 病因病机的挖掘多归功于 PD 动物模型的深入研究。本文对神经毒素诱导的经典 PD 动物模型进行综述, 以期为 PD 研究者制备稳定适合的动物模型提供依据。

**关键词** 帕金森病 动物模型 6-OHDA MPTP 鱼藤酮 百草枯

**中图分类号** R742 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.12.006

帕金森病 (parkinson disease, PD) 是一种以静止性震颤、肌强直、运动减少及体位障碍为主要临床表现的中枢神经系统退行性疾病。黑质 - 纹状体多巴胺 (dopamine, DA) 能神经元的进行性丢失和胞质内路易小体 (Lewy body) 的形成是 PD 主要病理改变<sup>[1]</sup>。目前, PD 确切的病因病机尚未可知, 而随着 PD 发生率的不断攀升, 该领域的研究备受人们关注。论及 PD 的研究必离不开实验动物模型的制备。PD 的动物模型主要分为神经毒素模型和转基因模型两大类。神经毒素模型作为 PD 经典模型, 主要针对 DA 信号模拟 PD 大部分病理和表型<sup>[2]</sup>。与基因模型比较, 神经毒素动物模型病理机制更加清楚, 造模方法更加完善。遗传基因动物模型的制备不仅复杂耗时且极易产生不良反应<sup>[3,4]</sup>。各种动物模型的制备都是模拟 PD 部分病理改变, 有其各自的优势和局限性。本文针对国内外 PD 神经毒素实验动物的制备方法及相关原理进行综述, 以期能进一步了解 PD 病理过程, 为科研实验提供最优方案。

## 一、6-羟基多巴胺损伤动物模型

6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 是特异性的儿茶酚胺能神经毒素。6-OHDA 虽受血 - 脑脊液屏障阻挡, 但其对 DA 质膜转运蛋白具

有高亲和力, 可通过触发氧化应激相关细胞毒性和小胶质细胞依赖性 DA 神经元炎症, 发挥毒性作用<sup>[5]</sup>。

1. 作用机制: 目前 6-OHDA 神经毒素作用的确切机制并未完全明了, 已有研究表明 6-OHDA 的机制与氧化应激和抑制线粒体呼吸链有关。6-OHDA 可与 DA 转运体结合进入黑质纹状体 DA 能神经元, 经过多重氧化, 最终损伤细胞。6-OHDA 还可通过抑制线粒体呼吸酶复合体, 阻断电子传递链, 增加氧化应激, 导致线粒体呼吸链被抑制, 最终细胞内 ATP 耗尽引起细胞死亡<sup>[6,7]</sup>。

2. 6-OHDA 损伤动物模型: 6-OHDA 因受血 - 脑脊液屏障阻碍, 造模需要脑内注射。脑内注射为立体定向注射, 注射部位多为黑质致密部 (substantia nigra pars compacta, SNc)、纹状体 (corpora striate, CS)、中脑腹侧被盖区 (ventral tegmental area, VTA)、前脑内侧束 (medial forebrain bundle, MFB), 通常采用单点或双点注射法来制备单侧或双侧损毁的 PD 模型<sup>[8]</sup>。6-OHDA 的剂量、浓度及损毁位点的选择都会影响 PD 模型的最终呈现。

3. 6-OHDA 损伤动物模型优劣性: 6-OHDA 的单侧损毁方法成熟简单, 存活率高, 模型评价方法简便。模型动物腹腔注射阿朴吗啡 (或苯丙胺) 不自主的向健侧 (或伤侧) 旋转运动行为可评估 6-OHDA 对黑质 DN 损伤程度。单点注射常用方法主要包含 SNc、CS、VTA、MFB 位点的注射, 这些方法各有优缺点。SNc 的单点注射可以根据 6-OHDA 注入内部剂量的多少, 而相应制作出急性完全和部分损伤的模型。这种方法的劣势为 SNc 的范围小, 定位困难, 成功率较低, 且难以区分最后的结果是毒性损伤还是机械损伤造成<sup>[9]</sup>。CS 分布广, 易定位, DA 能神经元末

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573899, 81660767); 敦煌医学与转化教育部重点实验室开放课题 (DHYX18-08); 甘肃中医药大学引进人才科研启动基金资助项目 (2016YJRC-07); 甘肃中医药大学中青年科研基金资助项目 (ZQ2015-17)

作者单位: 730000 兰州, 甘肃中医药大学基础医学院 (孙雪、梁建庆、马利芳); 730000 兰州, 敦煌医学与转化教育部重点实验室 (梁建庆); 201203 上海中医药大学基础医学院 (何建成)

通讯作者: 梁建庆, 副教授, 副主任医师, 医学博士后, 硕士生导师, 电子信箱: 1766424015@qq.com

稍吸收 6-OHDA 后,发生逆行性变性,从而破坏中脑黑质 DA 能神经元<sup>[10]</sup>。VTA 是制备 PD 模型的重要靶点,注入后可增加大鼠模型旋转强度,方法简单易成功,但与人类 PD 病理特征不相符<sup>[11]</sup>。MFB 的位置较深,定位困难,易发生变异,成功率较低。MFB 多点注射可以提高造模的成功率,缩短周期,广泛的浸润损伤可以大量破坏 DA 能神经元,模拟出中晚期症状。此方法虽然提高了模型的稳定性和成功率,但其损伤重并不完全符合发病机制。6-OHDA 的注射剂量决定模型 DA 纹状体通路病变及纹状体 DA 的显著下降程度<sup>[12]</sup>。综上所述,6-OHDA 模型的优势主要表现在绝佳的评估方法上,通过一侧损毁,出现对侧行为症状来评断模型成功与否。其劣势为病死率较高,不能完全模拟 PD 的发病机制。

## 二、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶动物模型

1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)是一种本身没有毒性的脂溶性有机化合物,其能通过血-脑脊液屏障。MPTP 在大脑中代谢产生有毒物质 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP<sup>+</sup>),引起毒性机制。

1. 作用机制:MPTP 作为高亲脂性化合物,能有效地透过血-脑脊液屏障。在脑内,先是被细胞线粒体外膜的单胺氧化酶 B(MAO-B)催化变成中间代谢产物 1-甲基-4-苯基-2,3-二氢吡啶离子(MP-DP<sup>+</sup>),后自发氧化成毒性的 MPP<sup>+</sup>。MPP<sup>+</sup>的结构与 DA 类似,能够与多巴胺转运体(DAT)高度亲和,被纹状体内多巴胺能(DAG)神经元轴突末梢突触前膜的 DAT 运载进入胞体内<sup>[13,14]</sup>。

2. MPTP 动物模型优劣性:MPTP 的 PD 动物模型会因不同的给药方式、给药时间呈现出不同的病理特征。MPTP 动物模型通常采用腹腔内注射、皮下注射、静脉注射的方式制备。这种给药方法操作相对简便易行,模型代表性好,成功率也高。目前 MPTP 最常用的 PD 动物是小鼠动物模型,因其病理生理机制与 PD 吻合度较高,备受青睐。各种 PD 小鼠模型根据注射剂量、间隔时间、方式以及时间长短的不同来制备不同研究目的模型,主要分为急性模型、亚急性模型和慢性模型<sup>[15]</sup>。急性模型是采用腹腔或皮下注射,间隔时间短,建模速度快,损伤严重,但其模型并不符合 PD 慢性发病的特点,并且这种建模方法并非神经元慢性凋亡而是快速损伤坏死,病死率相对较

高。亚急性模型同样也采用腹腔注射或皮下注射的方式,间隔时间较急性长,建模速度一般,成活率较高,损伤比急性轻,并且具有 PD 一定的发病特点,DAG 神经元有部分凋亡。亚急性模型的缺点是损伤时间比急性模型长,病理机制与 PD 患者慢性发病机制差别比较大,其损伤的 DAG 神经元有部分凋亡的同时还有大量坏死<sup>[16]</sup>。经目前研究表明,不管是急性还是亚急性,都只是一个短暂的对于黑质-纹状体神经元容易发生逆转的神经毒性作用,这种快速的方法无法与缓慢、渐进性的 PD 相匹配<sup>[17]</sup>。慢性模型除了给药时间间隔长,其病死率非常低,症状典型稳定,且病理损伤过程稳固不易恢复,与 PD 的病理生理过程相符合。综上所述,不管哪种 MPTP 方案都只能是部分模拟 PD 的病理机制,完全模拟 PD 的运动障碍仍存在困难。

## 三、鱼藤酮动物模型

鱼藤酮是属异黄酮家族的一种植物性杀虫剂。研究表明,用鱼藤酮染毒可诱发动物出现运动迟缓、僵直、震颤等类似 PD 的典型临床症状;用鱼藤酮染毒小鼠在黑质纹状体的细胞中也可出现  $\alpha$  突触蛋白( $\alpha$ -synuclein)聚集和 DA 神经元的丢失现象<sup>[18]</sup>。

1. 作用机制:目前关于鱼藤酮导致 PD 的发病机制还不是十分清晰,尚认为其可能主要从细胞凋亡、细胞自噬、神经炎症反应方面导致 PD 的发生<sup>[19]</sup>。鱼藤酮的脂溶性,可通过血-脑脊液屏障及生物膜,继而选择性地与线粒体复合物 I 结合,破坏氧化磷酸化,诱发氧化应激,从而发挥细胞毒性作用。

2. 鱼藤酮动物模型优劣性:鱼藤酮 PD 大鼠动物模型最大的优势为 PD 模型行为学改变和病理学特征均与临床 PD 相似。鱼藤酮模型的慢性暴露方式在病理、生化等各方面均能较好地模拟 PD 相关特征<sup>[20]</sup>。但鱼藤酮的全身毒性致使 PD 动物模型存在成模率低、成本高、方法复杂等缺点。鱼藤酮模型给药方式较多,优劣各异。脑立体定位给药的造模方法较难,需定位准确,但其病死率低,成功率高。静脉给药方式的存活率相对其他大剂量的存活率高,方法简单,药物直接进入全身循环,但全身毒性大。腹腔注射造模,吸收面积大,成模率高,操作简便,不仅症状与 PD 患者相似,且能制备 PD 的胃肠功能障碍模型<sup>[21]</sup>。皮下注射的方式更为便捷,成本低,成模率高,但皮下注射会引起大鼠全身毒性,导致较高病死率,且不符合 PD 病变特点。口服造模符合 PD 慢性进行性病程,还避免了外周毒性,该方式病死率低,成

模率高,适于研究 PD 病机病程变化及治疗药物的作用机制。鱼藤酮动物模型更符合 PD 病理进程,黑质-纹状体通路及肠道神经元均出现路易小体,其明显的劣势为动物病死率过高。由此可见,对于选择鱼藤酮造模方法要根据实际操作进一步选择。

#### 四、百草枯动物模型

百草枯(paraquat,PQ)是一种与 MPP<sup>+</sup> 结构相似,与 MPTP 神经毒性相似的快速灭生性除草剂。百草枯机制尚不明确,但其可通过血-脑脊液屏障到达黑质纹状体系统,选择性地破坏黑质致密部 DA 能神经元,最终产生类似于 PD 的症状<sup>[22]</sup>。

1. 作用机制:百草枯是 PD 病因的外源性神经毒素,长期低剂量暴露于百草枯会造成 DA 能神经易损。PQ 的神经毒性机制尚不明确,但就目前研究认为可能是:①激活星形胶质细胞合成和释放致炎细胞因子;细胞外基质降解加速神经元损伤及毛细血管基膜胶原成分降解破坏血-脑脊液屏障增加通透性,最终脑损害加重;②氧化应激:自由基作用形成过氧化物,对 DNA 和蛋白质产生氧化损伤;③抑制线粒体功能。黑质和纹状体中线粒体功能障碍,致使细胞凋亡加速加重,黑质区 TH 神经元数目减少,甚至脑组织有坏死空腔形成。

2. 百草枯动物模型的优劣性:百草枯动物模型的制备主要是模拟了人类暴露于百草枯的方式。这种方法更符合环境因素诱发的 PD 患者。商用百草枯水剂成本低,实验周期长,符合 PD 慢性进程的特点。这种模型制备方式若单纯使用百草枯造模会导致小鼠病死率增高,同时加上抗纤维化的药物会使模型更易制备。但部分实验用百草枯造模时并未提及它致死率的高低,以及造模时是否有必要给予抗纤维化的药物用以预防其毒性不良反应的发生,其科学性与可行性有待讨论<sup>[23]</sup>。腹腔、脑内或皮下注射以及口服百草枯的方法均可制备百草枯 PD 模型。单次或短期较高剂量多次注射百草枯可诱导出神经元坏死的模型,但这种方式与长期暴露于百草枯的致病方式相悖,且这种百草枯试剂价格昂贵。脑内注射需借助脑立体定位仪,模型成功率较低,过程复杂,有一定技术难度。口服百草枯的制备方式更加符合人类的主要经口暴露方式,但这种方式建立 PD 模型的研究国内报道较为罕见。而口服百草枯造模和腹腔注射百草枯造模两者间比较,腹腔注射造模效果更好,行为学改变更为显著。所以运用百草枯动物模型的具体方法要根据实际试验操作慎重

选择。

#### 五、展 望

4 种神经毒素诱导的 PD 动物模型各有所长。不同的造模方法、给药方式及剂量均会影响模型作用机制与实验结果,建立一个稳定、成功率高、简便易行的模型是构建 PD 模型亟待解决的问题。目前 PD 的致病因素和发病机制尚不明确,但基因突变、环境等多种致病因素与 PD 密切相关。神经毒性药物模型在 PD 的相关研究中具有广阔前景,但现在所掌握的模型制备方法都没有 PD 明显的病理改变,仅有局限的生化反应,想要模拟出完备的 PD 动物模型仍需要进一步探讨研究。相信在未来,PD 动物模型能完全符合 PD 这一神经系统的慢性疾病的自然进程。随着 PD“基因时代”的来临,基因模型尚未被证实是否复制了 PD 的大部分主要特征,但神经毒素和基因模型的结合对于挖掘人类 PD 机制与治疗不可或缺,值得深入探讨。

#### 参考文献

- 1 Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease[J]. Lancet, 2015, 386(9996): 896-912
- 2 史肖锦, 屈洪党. 神经毒素诱导帕金森病动物模型的概述[J]. 中外医疗, 2015, 34(21): 197-198
- 3 梁建庆, 何建成. 帕金森病转基因动物模型研究进展[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(3): 4-9
- 4 Cubellini P, Kachidian P. Animal models of Parkinson's disease: an updated overview[J]. Rev Neurol, 2015, 171(11): 750-761
- 5 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): 303-317
- 6 Schindhelm RK, van der Zwan LP, Teerlink T, et al. Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? [J]. Clin Chem, 2009, 55(8): 1462-1470
- 7 Vincent, Perlberg, Justine, et al. Alterations of the nigrostriatal pathway in a 6-OHDA rat model of Parkinson's disease evaluated with multimodal MRI[J]. PLoS One, 2018, 13(9): e0202597
- 8 王刚, 郑静. 6-OHDA 损毁帕金森大鼠模型和 MPTP 诱导帕金森小鼠模型比较(综述)[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2010, 30(3): 383-385, 419
- 9 黎民, 常学辉, 张良芝, 等. 不同部位注射 6-羟基多巴胺建立帕金森病大鼠模型比较分析[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(4): 261-266
- 10 Iancu R, Mohapel P, Brundin P, et al. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice[J]. Behav Brain Res, 2005, 162(1): 1-10
- 11 王玉玲, 高华, 杨新玲. 6-羟基多巴胺单侧两点注射法构建的帕金森病模型鼠[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(46): 8030-8035
- 12 朱国旗. MPTP 调节海马突触传递和活性依赖可塑性的细胞机制

- 研究[D]. 上海: 复旦大学, 2012: 9-10
- 13 许冰, 卢昌均. MPTP 诱导影响亚急性与慢性帕金森病模型小鼠黑质多巴胺能神经元[J]. 华夏医学, 2015, 28(1): 24-27
- 14 Kin K, Yasuhara T, Kameda M, *et al.* Animal models for Parkinson's disease research: trends in the 2000s[J]. *Int J Mol Ences*, 2019, 20(21): 5402
- 15 樊开阳, 朱丽娜, 张文利, 等. MPTP 诱导小鼠帕金森病亚急性模型和慢性模型的比较[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(1): 4-6
- 16 罗玉敏, 冯娟, 赵海萍, 等. 神经系统疾病动物模型[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017: 81-85
- 17 Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, *et al.* Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease[J]. *Nat Neurosci*, 2000, 3(12): 1301-1306
- 18 李慧珍, 牛丕业, 陈丽, 等. 鱼藤酮致帕金森病的机制研究进展[J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(9): 1130-1133
- 19 Goldstein DS, Sullivan P, Cooney A, *et al.* Rotenone decreases intracellular aldehyde dehydrogenase activity: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. *J Neurochem*, 2015, 133(1): 14-25
- 20 Greenamyre JT, Betarbet R, Sherer TB. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2003, 9(Suppl 2): S59-S64
- 21 Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, *et al.* Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation[J]. *Exp Neurol*, 2003, 179(1): 9-16
- 22 Zhang XF, Thompson M, Xu YH. Multifactorial theory applied to the neurotoxicity of paraquat and paraquat-induced mechanisms of developing Parkinson's disease[J]. *Lab Invest*, 2016, 96(5): 496-507
- 23 姜楠, 周志俊. 百草枯致肺纤维化机制的研究进展[J]. 职业卫生与应急救援, 2006, 4: 180-182
- (收稿日期: 2020-06-22)
- (修回日期: 2020-07-03)

## 肠道菌群在脑卒中发病中的研究进展

田 甜 卢 英 李 武 杜 珊 米 颜 程 叶 张 萌  
牛晓晨 张格娟 常明则 史文珍 田 晔

**摘 要** 肠道菌群被认为是人体最主要的微生物组,与人体健康密切相关。肠道菌群的平衡紊乱与多种疾病的发生、发展有着紧密联系。近年来研究发现,肠道菌群的失调能够通过多种机制参与脑卒中疾病的发生、发展。本文从肠道菌群在脑卒中发生中的参与作用、发病机制、外部干预治疗手段进行综述,以期对脑卒中的临床治疗及药物靶点研究提供一个新的视野。

**关键词** 肠道菌群 脑卒中 外部干预治疗

**中图分类号** R4

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.12.007

人的肠道中生活着数以万亿计的微生物,称为肠道菌群,其中大多数的肠道菌群驻留在回肠和结肠中,被称为人类的新器官<sup>[1]</sup>。这些微生物与其宿主之间的关系从出生开始就一直存在,并且以“互惠互利”的关系维持生命。在妊娠期间,即可从健康母亲的胎盘、早产儿的羊水和胎粪中发现细菌。许多因素均会影响宿主体内肠道微生物群的种类,例如宿主基

因型、地理、饮食、年龄、生活方式、怀孕、分娩方式、抗生素的使用、疾病状态等。研究显示,哺乳动物的微生物定植可调节和影响宿主的生理功能,肠道菌群失调与多种人类疾病有关,包括炎症肠病、肥胖症和心血管疾病等。近年来,人们逐渐认识到宿主肠道微生物能够影响中枢神经系统。在中枢神经系统中,突触发育、髓鞘形成、小胶质细胞活性、血-脑脊液屏障完整性等可能会受到微生物组信号的调节,肠道菌群可通过脑-肠轴机制参与某些中枢神经系统疾病的发病过程。

### 一、肠道菌群概述

肠道微生物数量庞大,种类繁多,其中包含的基因数量是人类基因组的 100 倍。肠道菌群按照特定的比例组合存在,各菌群之间相互制约、依存,在质和量上达成一种生态平衡,其中在门水平上占据优势的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81660210);陕西省重点研发计划项目(2018SF-107,2020ZDLSF04-03);陕西省西安市科技计划项目[201805104YX12SF38(2)]

作者单位:710018 西北大学附属医院、西安市第三医院医学研究中心(田甜、卢英、李武、杜珊、米颜、程叶、张萌、牛晓晨、张格娟、常明则、史文珍、田晔);716000 延安大学医学院(田甜、卢英、杜珊、米颜、牛晓晨、田晔)

通讯作者:史文珍,电子信箱:shiwenzhen736@163.com;田晔,电子信箱:chhty@sina.com