

MPTP损伤的小鼠 PD 模型的制作与评价

许耀刚^{1,2)} 庞晓峰¹⁾ 汲娟娟^{2)*}

¹⁾电子科技大学生命科学与技术学院, 成都 610054;

²⁾中国科学院生物物理研究所, 脑与认知国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 动物模型研究的目的是揭示多巴胺能神经元特异性损伤的机制, 进而探索针对这种损伤的神经保护方法或治疗方法. 由神经毒素 MPTP 损伤的小鼠 PD 模型, 广泛应用于散发性 PD 的研究中. 根据注射总剂量、两次注射间隔时间、注射方式的不同, 制成了适合于不同研究目的的各种小鼠 PD 模型. 关于 MPTP 导致的 PD 模型动物神经损伤的评价方式也是多层面、多指标并存的. 对 MPTP 动物模型的起源和 MPTP 导致多巴胺能神经元损伤途径进行了较为系统的概述, 并对 MPTP 小鼠 PD 模型的制作方法 with 评价指标进行较为详细的归纳.

关键词 帕金森病 (PD), MPTP, 小鼠, 模型

学科分类号 Q189

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种多发于老年人群并有向中年移行趋势的中枢神经退行性疾病, 其症状表现为动作迟缓, 肢体僵硬, 静止性震颤等. 其典型的病理特征为中脑黑质多巴胺能神经元缺失导致多巴胺分泌功能降低^[1,2], 以及多巴胺神经元胞质内产生一种称为路易小体 (Lewy bodies) 的包涵体^[3,4]. 大量研究表明, PD 的发生可能是外界环境和遗传因素之间复杂互动的结果, 但至今对于 PD 的具体病因尚没有定论^[5~8].

在 PD 的研究中, 人们创造和发展了诸多动物模型, 主要有生物毒素模型和基因模型两大类. 生物毒素模型主要有 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrapyridine, MPTP) 模型, 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 模型, 百草枯 (Paraquat) 模型和鱼藤酮 (Rotenone) 模型等. 而基因模型是基于近年来发现的 PD 相关基因如 α -Synuclein, Parkin 等而建立的基因突变模型或转基因模型^[9,10]. 在上述各种模型中, 基于 MPTP 损伤的 PD 动物模型由于其在神经生化, 病理和行为学方面与人类 PD 的极大相似性, 使我们对于 PD 有了更深入的了解. 实践证明, 在对神经元保护、修复和重建、细胞凋亡机制以及多巴胺 (dopamine, DA) 替代疗法等许多方面的研究中, MPTP 模型发

挥着重要的作用^[11]. 目前用于 MPTP 建模的实验动物主要有灵长类和啮齿类. MPTP 灵长类 PD 模型的优点是其行为学和病理学特征与人类 PD 很相似, 药物、基因治疗手段开发等方面比较方便, 但此种模型动物存在来源少、造价高、不易操控等一些不利因素, 从而限制了其广泛应用. 啮齿类动物 (尤其是小鼠) 由于在一定程度上可以模仿人类 PD, 且有来源广泛、造价低、方便操控以及遗传背景清楚等诸多优点而得到了更多的应用. 但是, 鼠类的毒性反应导致的行为变化与灵长类有一定的差距, 是 MPTP 损伤的小鼠 PD 模型制作和评价的难点, 本文着重介绍 MPTP 损伤的小鼠 PD 模型.

1 MPTP 动物模型的起源

1982 年在美国, 一些年轻的吸毒者因吸食自制的海洛因而迅速产生了急性的运动迟缓、震颤、平衡能力下降等与散发性 PD 极为相似的症状^[12], 并且对于散发性 PD 病人所采取的治疗手段, 例如服用左旋多巴 (L-DOPA) 或使用其他多巴胺激动剂法对上述吸毒者也具有积极的疗效. 但是随后一段

* 通讯联系人. Tel: 010-64888534, E-mail: jijj@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2006-06-19, 接受日期: 2006-07-28

时间的给药却使这些人产生了一些 L-DOPA 相关的运动并发症, 而且这种并发症仅仅在服用 L-DOPA 的数周内就发生, 而在散发性 PD 病人中, 这一过程往往要历时数年. 对上述吸毒者的神经病理学的正电子断层扫描 (positron emission tomography, PET) 检测结果显示, 他们的多巴胺神经元特异性损伤极其严重从而导致急性发病^[13,14], 而罪魁祸首就是自制海洛因中所含的杂质 MPTP. 在这之后, MPTP 就被用于啮齿类动物和灵长类动物的 PD 研究中, 至今依然是 PD 研究的重要病理模型.

2 MPTP 的代谢途径和多巴胺神经元的特异性损伤

MPTP 进入血液循环并且利用其高亲脂性穿过血脑屏障 (blood-brain barrier) 进入脑内. 在胶质细胞中, MPTP 经单胺氧化酶 B (MAO-B) 催化生成 1-甲基-4-苯基-2,3-二氢吡啶离子 (1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium, MPDP⁺) 后, 经自发氧化生成活性毒素分子 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺). 由于 MPP⁺ 高度亲和于多巴胺载体 (dopamine transporter, DAT), 因此被转运进入多巴胺能神经元^[15] (图 1), 随后, MPP⁺ 进入如下 3 条可能的路径 (图 2):

a. MPP⁺ 进入线粒体并沉积, 进而阻止线粒体膜蛋白复合物 I 的电子传递, 破坏 ATP 的合成, 并导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的不正常生成^[16].

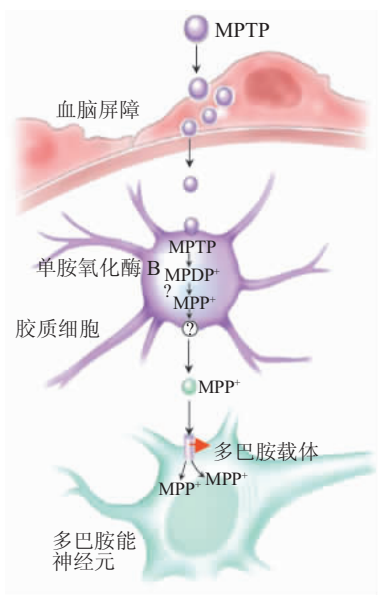


Fig. 1 Schematic representation of MPTP metabolism^[17]

图 1 MPTP 转化为 MPP⁺ 的途径^[17]

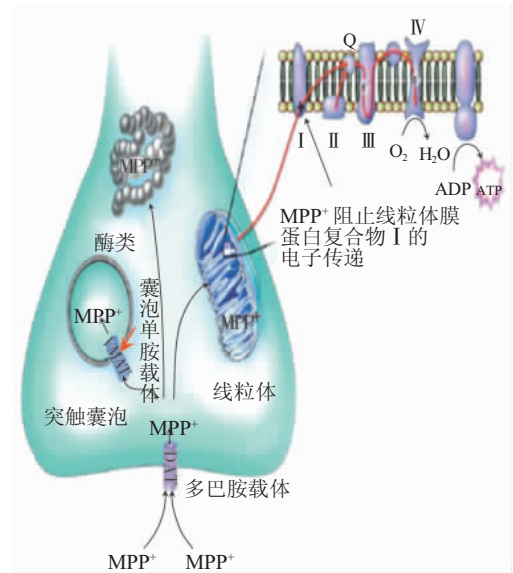


Fig. 2 Schematic representation of MPP⁺ intracellular pathways^[17]

图 2 MPP⁺ 在多巴胺神经元内的通路^[17]

b. MPP⁺ 与胞质中其他酶发生反应, 破坏细胞的正常代谢^[18].

c. MPP⁺ 由囊泡单胺类载体 (vesicular monoamine transporter, VMAT) 运送进入突触囊泡中^[19].

在上述 3 种途径中, 前 2 种途径都对多巴胺神经元造成损伤, 进而造成黑质-纹状体通路 DA 水平的下降, 第 3 种代谢途径可能在一定程度上因疏散了多巴胺神经元周围的 MPP⁺ 从而对细胞起到保护作用.

3 MPTP 小鼠 PD 模型的制作方案

如上所述, 给小鼠注射 MPTP 会使其黑质区尤其是致密带多巴胺能神经元发生退行性变化, 并导致纹状体多巴胺量减少. 由 MPTP 引起损伤的严重性取决于所采取的注射方案, 并以此为依据, 建立了多巴胺神经元急性损伤模型和慢性损伤模型 (分别对应于表 1 中的快速模型和慢速模型).

MPTP 小鼠模型制作时采用的注射方案主要涉及以下几点: a. MPTP 注射总剂量; b. MPTP 的注射方式: 腹腔注射 (intraperitoneal, i.p.) 或皮下注射 (subcutaneous, s.c.); c. 2 次注射之间的时间间隔; d. 是否有其他药物伴随注射. 注射方案的不同会导致所制备模型的一系列生理、生化和病理指标如纹状体 DA 水平, DA 神经元减少程度及行为学表现等方面的差异. 例如, 表 1 介绍的多次注射的快速模型 (4 次注射, 每次 20 mg/kg, 2 h 间隔) 在

短期内会导致纹状体 DA 量减少 90%，多巴胺神经元会减少 60%~70%^[20]，而且往往表现为坏死的状态。而慢速模型无论从纹状体 DA 水平下降程度还是多巴胺神经元减少程度来说都不如急性模型变化剧烈，而是表现出渐进发展的态势。形态学研究表明，其 DA 神经元是以凋亡的形式逐步减少，这与散发性 PD 中多巴胺神经元的凋亡类似。

另外值得一提的是，有些小鼠在多次或一次大量注射 MPTP 之后会产生体温下降效应，C57 小鼠尤其明显^[21]，所以在注射 MPTP 后应密切监控小鼠的行为变化，应适时采取一些保暖措施，以防止小鼠体温进一步下降而导致死亡，从而提高模型制作的成功率。

Table 1 The comprison among several typical MPTP-induced mouse PD models

表 1 几种典型的 MPTP 小鼠 PD 模型对比

模型分类	注射方案	优点	缺点
快速模型	单次注射	剂量为 10, 20 或 30 mg/kg, 腹腔注射或皮下注射.	模型成活率高, DA 神经元损伤轻, 纹状体 DA 含量减少不严重.
	多次注射	通常为 4 次, 每次剂量为 20 mg/kg, 间隔为 2 h. 腹腔注射.	损伤快且严重, DA 神经元从损伤到死亡可在 1~3 天内完成.
慢速模型	多次注射, 无其他药物伴随注射	多次注射, 每天 1 次, 共注射 5, 7, 10 次或更多. 剂量为 20 或 30 mg/kg, 腹腔注射或皮下注射.	模型成活率高, 渐进性的细胞死亡, 形态学表现为凋亡状态.
	多次注射, 有其他药物伴随注射	多次注射, 每周 2 次, 每次剂量为 20 或 30 mg/kg, 伴以丙磺舒或其他能够增强 MPTP 毒性的药物, 共 5 周, 腹腔注射.	渐进性的细胞死亡, 形态学表现为凋亡状态, 比单独注射 MPTP 的模型具有更长时间的稳定性.

4 MPTP 小鼠模型的评价

按照上述 MPTP 注射方案所制作的小鼠模型是否能够模拟 PD 的一些特点，我们还需进一步对其进行评价，以考察其是否真正具备成为 PD 模型的潜质，并可用于 PD 相关的研究。目前的评价体系主要包括如下几个方面：

4.1 行为学测试^[22]

a. 开放场地小鼠活动记录 (open field): 用树脂玻璃制作底板为白色，壁透明的容器作为进行测试的开放场地 (26 cm × 26 cm × 39 cm)。外加红外检测装置，记录红外光束被打断的方式 (用 Truscan Software) 并获取小鼠的运动行为参数，来衡量小鼠的活动能力。除此之外，还可辅以小鼠粪便颗粒计数以进行综合评价。

b. 旋转杆测试 (rotarod): 制作一个直径为 2.5 cm，表面为橡胶质地的杆。测试时将其水平放置，并在外加旋转仪的带动下使其以 12 r/min 的恒

定转速旋转，然后将小鼠放置于杆上，并开始计时直到小鼠从杆上掉下为止。分别统计 MPTP 处理组和对照组小鼠所用时间并进行分析。

c. 爬杆测试 (pole test): 制作一个直径 1 cm，长 50 cm 并且顶端固定有一个直径为 1.5 cm 的软木小球的杆，并且缠上纱布以增加摩擦，将杆竖直放置，然后将小鼠头朝上放置于软木球下方不远处，开始计时，直到小鼠先上到小球并折返回到杆的底部为止。分别统计 MPTP 处理组和对照组小鼠所用时间并进行分析。

除上述几种小鼠行为学评价手段外，人们还创造或发展了其他许多评价方法，如悬挂测试 (traction test)^[23]，游泳测试 (swim test)^[10]，以及抓咬测试 (grip test)^[22] 等。需要引起注意的是，小鼠 (如 C57/BL) 在注射 MPTP 后 10~30 min 内出现颤抖、平衡能力差等一系列行为学改变，可能是 MPTP 在外周器官如肾脏、肝脏中代谢时 (MPTP 经外周 MAO-B 催化生成 MPP⁺) 对这些器官产生的毒害作

用所致,因为这些毒害作用可能会引起一些生理指标诸如血压、体温和肝功能等的变化^[24, 25]。因此,有人认为应在 MPTP 最后一次注射后第 3 天或第 4 天(即多巴胺神经元损伤完全)进行行为学测试^[24],从而更客观地检测小鼠 PD 模型的行为学变化。

4.2 神经元形态学评价

MPTP 处理若干天后,将处理组和对照组小鼠麻醉后,用 4% 多聚甲醛灌注固定,在黑质(substantia nigra, SN)和腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)水平上连续冰冻切片,然后进行酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)免疫组织化学染色。然后在光镜下(放大倍数为 400 倍)对 SN 和 VTA 的 TH 阳性细胞进行计数,并比较两组的差异^[22]。

4.3 神经生化评价

将 MPTP 处理组和对照组小鼠断头,取脑并且快速分离纹状体组织,然后经称重,超声波降解,离心,过滤,并利用高效液相色谱-电化学法(HPLC-EC)最终检测出纹状体 DA 水平。比较两组的差异以考察模型小鼠多巴胺神经元的损伤对纹状体 DA 水平的影响^[22, 26]。

通过上述三个层次、多个方面的评估,我们可以比较完全地了解所制备的模型是否达到预期的目标,即是否真正能够模拟 PD 的一些特征,并能够应用于与 PD 相关的研究中。

5 讨论与展望

MPTP 损伤模型是 PD 研究中普遍使用的动物模型,给灵长类和一些啮齿类动物注射 MPTP 会不同程度地引起黑质纹状体多巴胺能神经元退行性变化。在啮齿类动物中,尤以 C57/BL 小鼠对 MPTP 最为敏感。因此,常用该品系小鼠来制作 MPTP 损伤的 PD 模型。MPTP 模型能较好地模拟 PD 的病理生理学变化和行为学变化。相对于我们从 PD 病人所获取的资料大多来源于对晚期病人的病变分析,利用 MPTP 动物模型,我们可以全程监控实验动物各项生理和生化指标,从而使我们能深入地了解 PD 病变的渐进性及其内在机制,进而发展有效的 PD 治疗方案。另外,除了 MPTP 小鼠活体模型外,现在还建立了基于 MPTP 毒性的活性形式——MPP⁺的小鼠或大鼠体外模型,主要有细胞模型和脑片模型。目前已经知道 MPP⁺进入细胞内部会阻碍线粒体膜蛋白复合物 I 的电子传递,从而造成 ATP 产量减少,ROS 的过量生成,这种能量应激

和氧化应激的双重压力将直接导致细胞的死亡。此外,由于细胞内 Ca²⁺ 稳态的失衡所致的谷氨酸介导的细胞兴奋毒性,以及一氧化氮合成酶 NOS 受激所产生的 NO 均对细胞的生存状态造成影响,甚至诱发细胞死亡。因此,通过在脑片或细胞层次上对 MPP⁺所引发的细胞中一系列生化反应的研究,将帮助我们了解 MPTP 导致细胞凋亡或坏死的机制和路径,推进神经保护方面的探索。

总之, MPTP、MPP⁺ 通过阻断线粒体功能而导致黑质多巴胺神经元的凋亡,提示 PD 的发病机理与细胞代谢相变化之间的关系。此外,一些相关基因的发现为 PD 研究提供了更多的思路。可以认为,系统地讨论 PD 相关基因与细胞代谢相等细胞环境信息的相互作用,及作用的路径所形成的细胞信息网络,将为 PD 研究带来突破性进展^[17]。

参考文献

- Jenner P, Olanow C W. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 1998, **44** (3 Suppl 1): S72~S84
- Dunnett S B, Bjorklund A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature*, 1999, **399** (6738 Suppl): 32~39
- Maslah E, Rockenstein E, Veinbergs I, *et al*. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*, 2000, **287** (5456): 1265~1269
- Baba M, Nakajo S, Tu P H, *et al*. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol*, 1998, **152** (4): 879~884
- Mattson M P. Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann Intern Med*, 2003, **139** (5 Pt 2): 441~444
- Mouradian M M. Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*, 2002, **58** (2): 179~185
- Smith A D, Castro S L, Zigmond M J. Stress-induced Parkinson's disease: a working hypothesis. *Physiol Behav*, 2002, **77** (4~5): 527~531
- Warner T T, Schapira A H. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 2003, **53** (Suppl 3): S16~S23
- Feany M B, Bender W W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*, 2000, **404** (6776): 394~398
- Haobam R, Sindhu K M, Chandra G, *et al*. Swim-test as a function of motor impairment in MPTP model of Parkinson's disease: a comparative study in two mouse strains. *Behav Brain Res*, 2005, **163** (2): 159~167
- Jakowec M W, Petzinger G M. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine lesioned model of parkinson's disease, with emphasis on mice and nonhuman primates. *Comp Med*, 2004, **54**

- (5): 497~513
- 12 Langston J W, Ballard P, Tetrud J W, *et al.* Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 1983, **219** (4587): 979~980
 - 13 Calne D B, Langston J W, Martin W R, *et al.* Positron emission tomography after MPTP: observations relating to the cause of Parkinson's disease. *Nature*, 1985, **317** (6034): 246~248
 - 14 Vingerhoets F J, Snow B J, Tetrud J W, *et al.* Positron emission tomographic evidence for progression of human MPTP induced dopaminergic lesions. *Ann Neurol*, 1994, **36** (5): 765~770
 - 15 Javitch J A, D'Amato R J, Strittmatter S M, *et al.* Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridinium by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82** (7): 2173~2177
 - 16 Ramsay R R, Singer T P. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by mitochondria. *J Biol Chem*, 1986, **261** (17): 7585~7587
 - 17 Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 2003, **39** (6): 889~909
 - 18 Klaidman L K, Adams J D Jr, Leung A C, *et al.* Redox cycling of MPP⁺: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic Biol Med*, 1993, **15** (2): 169~179
 - 19 Liu Y, Roghani A, Edwards R H. Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (19): 9074~9078
 - 20 Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke R E, *et al.* Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine. *Neurodegeneration*, 1995, **4** (3): 257~269
 - 21 Freyaldenhoven T E, Ali S F, Hart R W. MPTP and MPP⁺ induced effects on body temperature exhibit age and strain dependence in mice. *Brain Res*, 1995, **688** (1~2): 161~170
 - 22 Sedelis M, Hofele K, Auburger G W, *et al.* MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Genet*, 2000, **30** (3): 171~182
 - 23 Mori A, Ohashi S, Nakai M, *et al.* Neural mechanisms underlying motor dysfunction as detected by the tail suspension test in MPTP-treated C57BL/6 mice. *Neurosci Res*, 2005, **51** (3): 265~274
 - 24 Weissman J, Trevor A, Chiba K, *et al.* Metabolism of the nigrostriatal toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by liver homogenate fractions. *J Med Chem*, 1985, **28** (8): 997~1001
 - 25 Yoshihara S, Harada K, Ohta S. Metabolism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in perfused rat liver: involvement of hepatic aldehyde oxidase as a detoxification enzyme. *Drug Metab Dispos*, 2000, **28** (5): 538~543
 - 26 Shimoji M, Zhang L, Mandir A S, *et al.* Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, **134** (1): 103~108

The Creation and Assessment of MPTP-Lesioned Model of PD in Mice

XU Yao-Gang^{1,2)}, PANG Xiao-Feng¹⁾, JI Juan-Juan^{2)*}

⁽¹⁾Department of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China;

⁽²⁾State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The aim of studying on animal model of Parkinson's Disease (PD) is to discover the mechanism underlying the specific lesion of the dopaminergic neurons, then to seek out protective ways or therapies against the lesion. The mouse model of PD induced by neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrapyridine (MPTP) is applied extensively in the studies of the sporadic PD. Based on differences in the total amount of MPTP administrated, time between injections, and the injection style (intraperitoneally versus subcutaneously), various models of PD, which could satisfy many different studies, have been created. The assessment of the MPTP lesion is multilevel and contains a series of parameters. The origin of MPTP-lesioned model of PD and the pathways of MPTP causing lesions to dopaminergic neurons were systematically illuminated, then the creation and assessment of MPTP-lesioned PD model was elaborated.

Key words Parkinson's disease, MPTP, mouse, model

*Corresponding author. Tel: 86-10-64888534, E-mail: jijj@sun5.ibp.ac.cn

Received: June 19, 2006 Accepted: July 28, 2006