

蛋白酶体抑制剂诱导大鼠黑质变性伴包涵体形成

潘琪 牛朝诗

【摘要】 目的 观察蛋白酶体抑制剂 Lactacystin 诱导大鼠黑质变性伴包涵体形成及运动行为学的改变,探讨蛋白酶体功能下降在帕金森病(PD)发病机制中的作用。方法 24 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为 Lactacystin 实验组和生理盐水组,每组 12 只,Lactacystin 实验组将蛋白酶体抑制剂 Lactacystin 立体定向注入大鼠左侧黑质致密部(SNc),生理盐水组注射等体积生理盐水;观察大鼠自主行为和阿朴吗啡(APO)诱导的旋转行为的改变;Nissl 染色法观察 SNc 病理改变;免疫组化法观察 SNc 及纹状体酪氨酸羟化酶(TH)和 SNc 中 α -共核蛋白的表达;透射电镜观察 SNc 超微结构的改变。结果 Lactacystin 实验组大鼠给药 7 d 后出现自发性活动减少、动作缓慢、震颤、且症状逐步加重,APO 可诱导出向健侧的旋转运动;Nissl 染色发现 Lactacystin 实验组左侧 SNc 神经元数量减少,尼氏体结构松散;免疫组化结果表明 21 d 后 Lactacystin 实验组左侧 SNc 出现变性,TH 免疫阳性神经元数量减少, α -共核蛋白表达增强,纹状体内 TH 免疫阳性纤维数量减少;电镜观察到蛋白质聚集形成的包涵体。结论 Lactacystin 单侧 SNc 注射可以诱导大鼠黑质变性伴包涵体形成及大鼠行为改变,蛋白酶体功能下降可能在 PD 发病机制中起重要作用。

【关键词】 帕金森病; Lactacystin; α -共核蛋白; 蛋白酶体; 包涵体

【中图分类号】 R742.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)05-0455-04

Proteasome inhibitor induces substantia nigra degeneration and inclusion body formation in rats

PAN Qi, NIU Chao-shi. Department of Neurosurgery, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei, 230001, China

Corresponding author: NIU Chao-shi, Email: niuchaoshi@163.com

【Abstract】 Objective To observe nigral degeneration with inclusion body formation in rats and their behavioral changes after treatment with proteasome inhibitor, and investigate the role of proteasomal dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease. **Methods** Lactacystin, a selective proteasome inhibitor, was injected stereotactically into the left substantia nigral pars compacta of the rats, and an equal volume of saline was injected in the control group. Spontaneous behavioral abnormalities and apomorphine-induced contralateral rotations of the rats were observed after the injection. The pathological changes in the substantia nigra were detected using Nissl staining, and the expressions of tyrosine hydroxylase (TH) and α -synuclein in the substantia nigra and TH expression in the striatum were investigated by immunohistochemistry. The ultrastructural changes in the substantia nigral pars compacta were observed with transmission electron microscope. **Results** Seven days after lactacystin injection, the rats exhibited reduced spontaneous activities, tremor, progressive bradykinesia, and apomorphine-induced contralateral rotation. Nissl staining 3 weeks after lactacystin injection revealed significantly reduced neurons in the left substantia nigra pars compacta and loosened structures of the Nissl bodies; immunohistochemistry demonstrated obvious degeneration in the left substantia nigra pars compacta, where the TH-positive cells were significantly decreased with enhanced expression of α -synuclein. The number of TH-positive fibers in the striatum was significantly reduced 3 weeks after

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.05.006

基金项目:安徽省优秀青年科技基金(04043072);安徽省人才开发基金(2006Z037)

作者单位:230001 合肥,安徽医科大学附属省立医院神经外科、安徽省立体定向神经外科研究所(潘琪现为南方医科大学珠江医院神经外科在读博士研究生)

通信作者:牛朝诗,Email: niuchaoshi@163.com

lactacystin injection, and electron microscopy revealed the formation of inclusion bodies as a result of protein aggregation. **Conclusion** Lactacystin injected stereotactically into the left substantia nigral pars compacta can induce substantia nigra degeneration, inclusion body formation and behavioral changes in rats, suggesting the applicability of lactacystin for establishment of animal models of Parkinson disease. Proteasomal dysfunction may play an important role in the pathogenesis of Parkinson disease.

【Key words】 Parkinson's disease; Lactacystin; α -synuclein; Proteasome; Inclusion body

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种中老年人常见的进行性神经系统变性疾病,其病理特征为黑质致密部(substantia nigra pars compacta, SNc)多巴胺(dopamine, DA)能神经元选择性、进行性的丧失和在残存神经元内出现 Lewy 小体^[1]。目前 PD 的发病机制尚未完全阐明。近年来多个研究结果表明泛素-蛋白酶体系统受损与 PD 的发生密切相关^[2]。抑制蛋白酶体可引起胎鼠中脑原代培养中选择性 DA 能神经元退变,且伴有胞质内 α -共核蛋白和泛素水平升高及两者免疫阳性包涵体形成。该病理表现类似于 PD 中脑黑质的病理表现,提示蛋白酶体功能下降可能参与了 PD 的发病。本实验采用立体定向技术将蛋白酶体抑制剂 Lactacystin 注入大鼠 SNc, 在体研究抑制蛋白酶体引起中脑黑质及纹状体的病理改变,探讨蛋白酶体功能下降在 PD 发病机制中所扮演的角色。

材料与方 法

一、实验动物与材料

健康成年 SD 大鼠 24 只,体质量 200~250 g,由安徽医科大学动物实验中心提供。Lactacystin、小鼠抗酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)单克隆抗体、阿扑吗啡(APO)为美国 Sigma 公司产品。兔抗 α -共核蛋白多克隆抗体、免疫组化试剂盒(SP-9001、SP-9002)、DAB 显色试剂盒(ZLI-9032)为北京中杉金桥公司产品。大鼠立体定向仪(SR-6N 型,日本 NARISHIGE 公司),笔式小型磨钻(韩国世新精密公司),10 μ L 微量注射器,透射电子显微镜(JEM-1230 型,日本 JEOL 公司)。图像分析系统为日本 Olympus BX51 图像分析系统。

二、方 法

1. 动物分组与干预:将 SD 大鼠采用随机数字表法分为 Lactacystin 实验组和生理盐水组,每组 12 只,经反复行为检测确认其无旋转行为后进行实验。35 g/L 水合氯醛腹腔注射麻醉动物(350 mg/kg)后固定在立体定向仪上,齿杆较耳杆低 2.4 mm。根据包新民等^[3]著《大鼠脑立体定向图谱》,确定左侧 SNc

为前凶后 5.2 mm、矢状缝左侧 2.2 mm、硬膜下 7.2 mm。切开头部皮肤,小型磨钻钻开颅骨,按已确定的坐标将微量注射器缓慢进针到预定深度。Lactacystin 实验组注射生理盐水溶解的 2 μ L Lactacystin(10 μ g),注射速度为 0.5 μ L/min,留针 5 min,缓慢退针,缝合切口。生理盐水组按照相同方法注射等体积生理盐水。

2. 动物行为学观察及阿扑吗啡诱导旋转实验:给药后 7 d、14 d、21 d 观察 2 组大鼠是否出现震颤、活动迟缓、抓握、嗅探等异常行为,并腹腔注射阿扑吗啡(0.5 mg/kg),观察旋转行为的改变,记录 30 min 的旋转圈数。

3. 大鼠黑质 Nissl 染色:给药后第 22 天,每组大鼠各取 2 只,水合氯醛麻醉,40 g/L 多聚甲醛灌注固定后留取中脑组织,后固定 24 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后行连续冠状切片,片厚 5 μ m。采用 Thionine 氏硫堇染色法行 Nissl 染色,光镜下观察 SNc 神经元数目及尼氏体形态。

4. 大鼠黑质 TH 和 α -共核蛋白免疫组化染色及纹状体 TH 免疫组化染色:给药后第 22 天,每组大鼠各取 6 只,水合氯醛麻醉,40 g/L 多聚甲醛灌注固定后留取中脑及纹状体组织,后固定 24 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后行连续冠状切片,片厚 5 μ m。常规脱蜡至水,3%双氧水室温孵育 10 min, PBS 冲洗,抗原微波热修复,封闭用正常山羊血清工作液室温孵育 15 min,倾去。滴加 1:500 的小鼠抗 TH 或 1:200 的兔抗 α -共核蛋白一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 冲洗,滴加生物素标记的抗小鼠或抗兔的二抗工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。PBS 冲洗,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。PBS 冲洗,DAB 镜下控制显色,行苏木精复染。自来水充分冲洗,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光镜下观察 TH 和 α -共核蛋白的表达情况及黑质部神经元内包涵体的形态、数量和分布,对 SNc 的 TH 免疫阳性细胞进行计数,并用图像分析系统对纹状体的 TH 表达情况进行平均吸光度值分析。

5. 大鼠黑质透射电镜观察:给药后第 22 天,每

组大鼠各取 4 只,断头处死,分别取左右侧 SNc, 25 g/L 戊二醛固定 2 h。磷酸缓冲液漂洗,2% 鞣酸固定 1 h。磷酸缓冲液漂洗,50% 乙醇漂洗 15 min,浸入澄清的饱和醋酸铀溶液过夜。梯度乙醇脱水,加入包埋剂,渗透过夜。常规制作电镜超薄切片。透射电镜下观察 SNc 的超微结构改变。

三、统计学分析

实验数据采用均数 ± 标准差表示,使用 SPSS12.0 统计软件进行分析,组间数据比较采用单因素方差分析和两样本 *t* 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

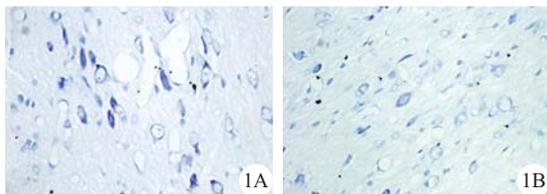
结 果

一、大鼠行为学改变

生理盐水组大鼠未观察到明显的行为改变,APO 亦未能诱发出旋转行为。Lactacystin 实验组大鼠给药 7 d 后出现自发活动减少,动作缓慢,震颤,对外界刺激不自主竖毛,症状逐步加重;注射 APO 后出现恒向健侧旋转,表现为以健侧后肢为支撑点、头尾相接、身体弯曲成环状的快速旋转行为;第 7、14、21 天大鼠 30 min 的旋转圈数分别为 116.500 ± 22.072 、 199.000 ± 14.523 和 266.917 ± 9.190 ,比较差异有统计学意义($F=261.028, P=0.000$)。

二、Nissl 染色观察黑质神经元变化

生理盐水组大鼠 SNc 神经元数量较多,尼氏体深染,形态结构完整(图 1A)。Lactacystin 实验组大鼠左侧 SNc 神经元数量减少,尼氏体染色较淡,结构松散(图 1B)。Lactacystin 实验组大鼠右侧 SNc Nissl 染色表现与生理盐水组大鼠双侧 SNc 相似。



1A:生理盐水组;1B:Lactacystin 实验组(左侧)

图 1 黑质部 Nissl 染色($\times 400$)

Fig.1 Nissl staining of the substantia nigra pars compacta

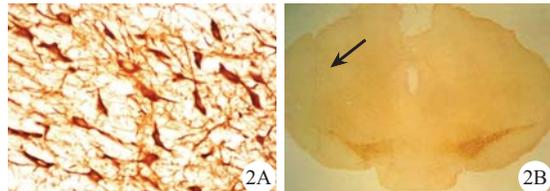
三、免疫组化染色观察黑质 TH 阳性神经元表达

生理盐水组大鼠 SNc TH 免疫阳性神经元数量较多,核大而圆,核浆边界清晰,胞浆浓染,突触细长密集(图 2A)。Lactacystin 实验组大鼠左侧 SNc TH 免疫阳性神经元数量较右侧明显减少(图 2B),胞体皱缩变小,结构不清(图 2C)。Lactacystin 实验组大鼠左侧 SNc TH 免疫阳性神经元计数(128.500 ± 19.045)

低于生理盐水组(683.167 ± 13.776),比较差异有统计学意义($t=1397.200, P=0.000$)。

四、免疫组化染色观察黑质 α - 共核蛋白的表达

生理盐水组大鼠 SNc 神经元胞浆内 α - 共核蛋白数量极少(图 3A)。Lactacystin 实验组大鼠左侧 SNc 神经元胞浆内 α - 共核蛋白数量增加,呈聚集样分布表现,胞浆浓染,可见数个圆形或椭圆形包涵体样浓聚物, α - 共核蛋白免疫反应呈强阳性(图 3B)。



2A:生理盐水组($\times 400$);2B:

Lactacystin 实验组大鼠两侧黑

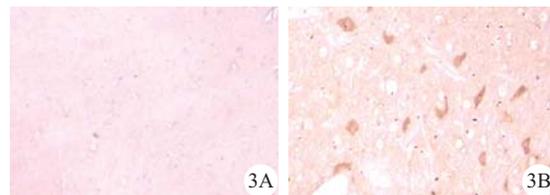
质整体观($\times 40$);2C:

Lactacystin 实验组左侧($\times 400$)

图 2 黑质部 TH 免疫组织化

学染色(箭头示针道)

Fig.2 Immunohistochemistry for TH expression in the substantia nigra (The arrow indicates the needle tract)



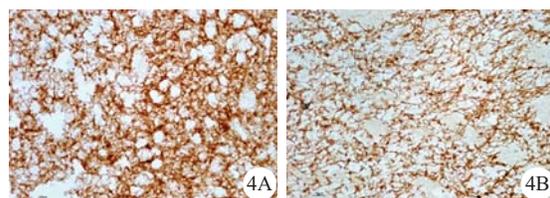
3A:生理盐水组($\times 100$);3B:Lactacystin 实验组左侧($\times 400$)

图 3 黑质部 α - 共核蛋白免疫组织化学染色

Fig.3 Immunohistochemistry for the expression of α -synuclein in the substantia nigra

五、免疫组化染色观察纹状体 TH 表达

生理盐水组大鼠纹状体 TH 免疫阳性纤维密集(图 4A),而 Lactacystin 实验组大鼠左侧纹状体 TH 免疫阳性纤维数量减少,分布稀疏(图 4B),Lactacystin 实验组左边和生理盐水组平均吸光度值分别为 0.217 ± 0.001 和 0.041 ± 0.001 ,差异有统计学意义($t=19985.497, P=0.000$),说明 Lactacystin 组大鼠左侧纹状体 TH 免疫阳性纤维数量减少。



4A:生理盐水组;4B:Lactacystin 实验组左侧

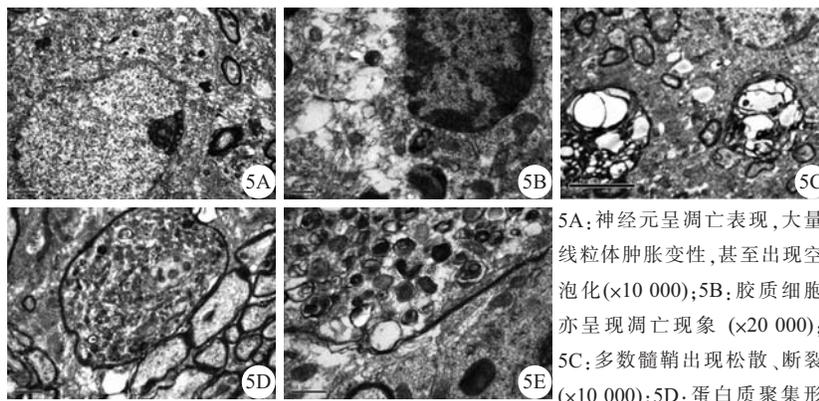
图 4 纹状体 TH 免疫组织化学染色($\times 400$)

Fig.4 Immunohistochemistry for the expression of TH in the striatum ($\times 400$)

六、透射电镜观察大鼠黑质超微结构变化

生理盐水组大鼠 SNc 神经元较多,核膜结构完整,核仁清晰,线粒体结构正常;胶质细胞形态正常,髓鞘结构完整清晰。Lactacystin 实验组大鼠左侧 SNc 神经元数量稀少,多数残存神经元呈现凋亡征象:核膜皱缩、凹凸不平,局部断裂,核内异染色质边聚;胞质内可见大量线粒体肿胀变性,甚至出现空泡

化(图 5A)。个别胶质细胞亦呈现凋亡现象(图 5B)。多数髓鞘出现松散、断裂(图 5C)。偶可见髓壳变薄,突起膨胀变粗,内含大量类圆形电子致密物。电子致密物有一个致密核心,周围为同心圆排列的纤维蛋白丝样结构,为突起内蛋白质聚集形成包涵体的电镜表现(图 5D,5E)。



5A: 神经元呈凋亡表现,大量线粒体肿胀变性,甚至出现空泡化($\times 10\ 000$);5B: 胶质细胞亦呈现凋亡现象 ($\times 20\ 000$);5C: 多数髓鞘出现松散、断裂($\times 10\ 000$);5D: 蛋白质聚集成包涵体的电镜表现($\times 8000$);5E: 蛋白质聚集成包涵体的电镜表现($\times 30\ 000$)

图 5 电镜观察 Lactacystin 实验组大鼠黑质部的超微结构表现

Fig.5 Ultrastructure of the substantia nigra of rats with lactacystin treatment under electron microscope

讨 论

PD是以 SNc DA 能神经元进行性的丧失和残存神经元内出现 Lewy 小体为主要病理特征的中枢神经系统变性疾病。其发病机制目前尚不完全清楚。现发现散发性 PD 患者的 SNc 内 α - 共核蛋白数量增多,Lewy 小体内含有大量 α - 共核蛋白,且蛋白酶体功能是下降的^[4]。这些发现提示 PD 的发病机制可能为: 黑质内蛋白酶体功能下降导致 DA 能神经元内 α - 共核蛋白无法被降解,这些蛋白发生聚集并形成包涵体,引起细胞功能紊乱,导致 DA 能神经元死亡。

抑制蛋白酶体可引起胎鼠中脑原代培养中选择性 DA 能神经元退变,且伴有胞质内 α - 共核蛋白和泛素水平升高及两者免疫阳性包涵体形成^[4]。这也证明了以上假设。本实验证明了蛋白酶体功能下降导致 SNc DA 能神经元选择性丧失并伴胞内 α - 共核蛋白免疫反应阳性包涵体形成。将 $10\ \mu\text{g}$ Lactacystin($2\ \mu\text{L}$)注入大鼠单侧 SNc,大鼠可出现自发活动减少等行为改变反映出黑质 DA 能神经元出现了损害并引起黑质—纹状体 DA 能通路功能失衡^[5]。Nissl 染色显示出损毁侧神经元数量减少且尼氏体结构松散,反映出神经元的丧失及结构受损。TH 免疫阳性细胞计数显示损毁侧 TH 免疫阳性细

胞减少,更明确地反映出 DA 能神经元的丧失。损毁侧纹状体内 TH 免疫阳性神经纤维的减少亦反映了黑质 DA 能神经元的丧失及黑质—纹状体 DA 能通路的变性。 α - 共核蛋白免疫组化检测出在损毁侧黑质内有 α - 共核蛋白免疫阳性的包涵体形成。电镜检测出损毁侧黑质内神经元的凋亡表现及包涵体形成。这些实验结果非常接近散发性 PD 的病理改变,提示蛋白酶体功能下降可能在 PD 的发病机制中起重要作用。

参 考 文 献

- [1] Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood NW. Understanding the molecular causes of Parkinson's disease [J]. Trends Mol Med, 2006, 12(11): 521-528.
- [2] Olanow CW, McNaught KS. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease[J]. Mov Disord, 2006, 21(11): 1806-1823.
- [3] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定向图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 48-54.
- [4] McNaught KS, Jenner P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease[J]. Neurosci Lett, 2001, 297(3): 191-194.
- [5] 潘琪,牛朝诗,程俊. 蛋白酶体抑制剂诱导大鼠运动行为改变的研究[J]. 立体定向和功能神经外科杂志, 2007, 20(3): 129-132.

(收稿日期:2008-12-25)

(本文编辑:王志娟)